



ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DE WHEY PROTEIN SOBRE O CICLO CELULAR EM *ALLIUM CEPA*

*Renata Forte Menoli*¹; *Gabriella Leitzke*²; *Marcela Funaki dos Reis*³

¹Acadêmica do Curso de Biomedicina, UNICESUMAR, Maringá-PR. Bolsista PIBIC/Unicesumar.

²Acadêmica do Curso de Biomedicina, UNICESUMAR, Maringá-PR.

³Orientadora, Profa. Dra. do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, UNICESUMAR, Maringá-PR.

RESUMO: Neste estudo foi analisado os efeitos do suplemento Whey Protein sobre a citotoxicidade, ciclo celular e genotoxicidade em *Allium cepa*. Para tanto foi realizado um estudo quantitativo com as variáveis a serem analisadas obtidas por análise experimental. O suplemento Whey Protein foi avaliado nas concentrações indicadas no rótulo do produto, comparando assim com o controle negativo (água destilada) e controle positivo (sulfato de cobre). Foram avaliados a citotoxicidade, o índice mitótico, índice de fases e a presença de mutações cromossômicas em *A. cepa* exposto ao Whey Protein. Foi verificado que embora o tratamento com o Whey Protein reduza significativamente o crescimento radicular de *A. cepa*, esta redução não está relacionada a redução do índice mitótico e índice de fases indicando pelo teste que o suplemento testado não apresenta efeitos sobre o ciclo celular. Com relação ao potencial genotóxico Whey Protein não pode ser considerado um agente promotor de mutações. Assim, neste estudo e de acordo com o teste realizado o Whey Protein pode ser considerado seguro, no entanto é recomendado ensaios moleculares que analisem a sua ação sobre o DNA para verificar a segurança no consumo deste suplemento.

PALAVRAS-CHAVE: *Allium cepa*, whey protein, mutações cromossômicas, ciclo celular.

1 INTRODUÇÃO

O suplemento alimentar Whey Protein é frequentemente utilizado por atletas e frequentadores de academia que desejam desenvolver músculos por meio de hipertrofia de forma mais rápida. Esse suplemento é composto de proteína extraída do soro do leite bovino, o qual é obtido durante a fabricação de coalhadas e queijos brancos, além de carboidratos e gorduras (SGARBIERI, 2004). Estudos recentes mostram que os suplementos mais utilizados são os a base de proteínas e aminoácidos, mostrando as adversidades que o Whey Protein podem causar, tais como cetose, gota, sobrecarga renal e hipertensão arterial (ARAÚJO, ANDREOLO, 2002; TUMA, 2007). Testes realizados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA revelaram que muitas marcas comerciais Whey Protein oferecem risco ao serem consumidos. Por conta disso foram retiradas do mercado devido a irregularidades quanto a quantidade demonstrada pelo rótulo a qual ultrapassava o limite de 20% entre as informações nutricionais presentes nas embalagens do produto e sua real composição (LOVATO, 2014).

É possível obter diferentes concentrações proteínas do soro do leite por meio de processos de separação e purificação, como alfa lactoglobulina e beta lactoglobulina que compõe de 70 a 80% das proteínas totais. Além delas, são encontradas soroalbumina, imunoglobulinas, lactoferrina, transferrina e várias outras. Essas concentrações podem ser obtidas de diferentes formas, tais como em pó, whey protein concentrada (WPC), whey protein isolada (WPI) e whey protein hidrolisada (WPh). O whey protein em pó pode ser encontrada na forma doce, ácida, desmineralizada e reduzida, sendo as duas últimas utilizadas no suplementos esportivos. No processo para obter WPC remove-se a água, lactose, cinzas e alguns minerais e se comparado ao WPI apresenta mais componentes biologicamente ativos. Para usuários de Whey Protein com intolerância a lactose, WPI é o mais recomendado pois no seu processamento há uma significativa remoção de gorduras e lactose. Já WPh quando comparada as outras e em especial a WPC, obtém uma maior rapidez na absorção (ESTRATÉGIAS DE NUTRIÇÃO E SUPLEMENTAÇÃO NO ESPORTE, 2015).



Para analisar a segurança os efeitos do whey protein sobre um sistema celular *in vivo*, essa pesquisa utilizou o sistema teste de *Allium cepa* recomendado para pesquisas que avaliam o potencial genotóxico e citotóxico de substâncias. Uma das vantagens desse sistema teste é a germinação rápida, o qual é possível obter respostas em curto período de tempo (BAGATINI, SILVA e TEDESCO; 2007) compreendido entre cerca de 24 à 48 horas após a exposição a uma determinada substância. Outras vantagens do teste dizem respeito a sua robustez, pois em um único teste é possível obter informações sobre a influência da substância a ser testada ao nível de sua citotoxicidade, efeitos sobre a progressão/bloqueio do ciclo celular, apoptose e indução ou proteção contra formação de mutações cromossômicas.

Assim, por meio dessa pesquisa foi verificar a ação do whey protein sobre o ciclo célula *in vivo*, esclarecendo seus possíveis efeitos sobre as células e cromossomos, fornecendo informações a respeito dos riscos ou segurança em seu consumo.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Tratou-se de um estudo quantitativo com as variáveis analisadas de maneira experimental. O experimento foi conduzido no laboratório de Microscopia I, localizado no Unicesumar – Centro Universitário Cesumar.

Para o teste do *Allium cepa* foi utilizada a metodologia proposta por Fiskesjo (1985), com modificações. Foram utilizados 5 bulbos de cebolas por tratamento, com os caules raspados, e estes tiveram o crescimento das raízes estimulados em água destilada por 24 horas com fotoperíodo luz/escuro para promover a sincronização da divisão celular das células meristemáticas. Em seguida, conduzidos os tratamentos com Power Whey Pro® concentrado com diluições que foram determinadas baseadas nas indicações de consumo do fabricante. A água destilada será utilizada como controle negativo (CN) e o sulfato de cobre (6×10^{-7} g/mL) como controle positivo (CP). As raízes permaneceram sobre tratamento nas concentrações de estudo durante 24 horas, caracterizando o teste para avaliação de efeito agudo.

Em seguida essas raízes foram medidas (mm) com paquímetro para determinação da citotoxicidade, ou seja, verificação de inibição de proliferação. Após esta análise, essas raízes, aleatoriamente cortadas, lavadas em água destilada e fixadas em Carnoy (álcool etílico-ácido acético, 3:1) durante 24 horas. Após este período as raízes de cada tratamento foram hidrolisadas com HCL 0,1M, durante 10 minutos à 60°C. Em seguida lavadas, coradas com azul de metileno e fixadas em chama.

Para análise citogenética foi empregado o método de esmagamento, onde a leitura das lâminas será realizada em microscópio óptico com aumento de objetiva 100x através da técnica de varredura. Foi realizada a leitura de 100 células por lâmina, totalizando 500 células analisadas por tratamento. Os parâmetros analisados foram o índice mitótico, índice de fases, além de quantificação de mutações cromossômicas. O cálculo de índice mitótico e índice de fase foi realizado segundo as fórmulas (Roa et al., 2012):

Índice Mitótico (%) = Número de células em mitose x 100/ número total de células

Índice de cada Fase (%) = Número de células em cada fase x 100/número total de células em mitose.

Todos os resultados foram expressos como média e desvio padrão, sendo submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparados pelo teste de Tukey ($p > 0,05$), utilizando o programa SISVAR, 7.0.

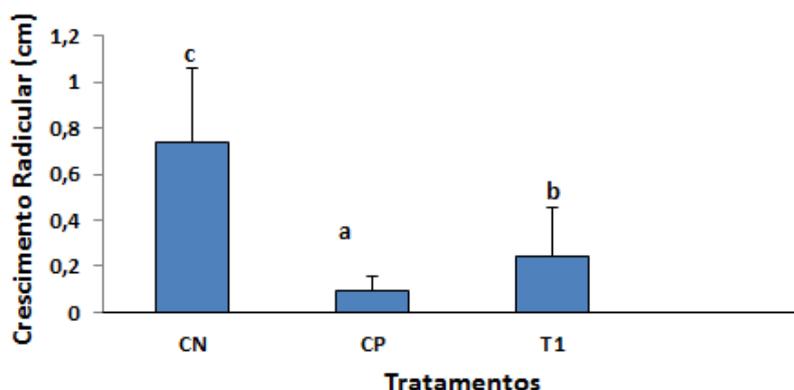
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO



Neste estudo foram analisados os efeitos biológicos promovidos por Whey Protein sobre o sistema teste do *Allium cepa*. Para tanto foram analisados os parâmetros de citotoxicidade, Índice Mitótico, Índice de Fases e presença de mutações cromossômicas.

A potencial citotoxicidade do Whey Protein foi analisado por meio da estimativa do crescimento radicular de *Allium cepa* tratado por um período de 24 horas (Figura 1).

Figura 1. Crescimento Radicular (cm) de *Allium cepa*.



Legenda: Tratamento com Whey Proteín (T1), Controles Negativo (CN) e Positivo (CP). Valores representados com Média \pm Desvio Padrão. Significativo pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Foi possível observar que o tratamento com tratamento com Whey Protein na concentração recomendada pelo fabricante promove a inibição do crescimento radicular de *Allium cepa* de maneira significativa ($p > 0,05$). E esta inibição pode estar diretamente relacionada à inibição da proliferação celular indicando o potencial citotóxico de uma substância testada. Os resultados obtidos nos estudo realizado por Silva e Bohm (2012) e Oliveira (2015) mostraram uma redução no comprimento das raízes de cebola com o tratamento do chá de cogumelo de Sol e Cranberry indicando a redução do número de divisões celulares e o comprimento das raízes.

Para a confirmação se o Whey Protein tem efeito citotóxico como sugerido pelo crescimento radicular de *Allium cepa* foram analisados o índice mitótico e o de fases (Tabela 1). E neste caso, foi possível verificar que não houve diferenças significativas entre o índice mitótico do controle negativo e Whey Protein. Segundo Queiroz et al. (2016) o índice mitótico reflete o número total de células em mitose e geralmente é utilizado para indicar efeito antiproliferativo e citotóxico de compostos quando este índice no tratamento é inferior ao controle negativo. Neste estudo, não foi observado esta diferença e possíveis justificativas podem estar relacionados aos mecanismos moleculares de ação de Whey Proteín sobre o ciclo celular, no entanto o teste do *Allium cepa* não tem cobertura para tal análise, sendo sugerido testes moleculares para se verificar tal ação.

A partir do resultado do índice mitótico foi analisado o índice de fases, ou seja, a porcentagem de células encontradas em cada fase da divisão celular. Ao verificar as fases da mitose foi possível observar no tratamento que não existe um padrão na distribuição de células durante a mitose, onde o maior número de células em divisão celular é encontrado em prófase e progressivamente este número diminui até a telófase (Tabela 1). Este padrão de diminuição de células apenas nos controles.

Tabela 1. Efeito do Whey Protein sobre o ciclo celular de *Allium cepa*.

| | Fases da Mitose | | | | |
|-----------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| | IM | Prófase | Metáfase | Anáfase | Telófase |
| CN | 2,8 \pm 1,92 ^a | 2,8 \pm 3,70 ^a | 0,2 \pm 0,44 ^a | 1,0 \pm 1,0 ^a | 1,4 \pm 0,54 ^a |
| CP | 1,82 \pm 5,02 ^b | 1,4 \pm 1,34 ^b | 0,00 \pm 0,00 ^a | 0,00 \pm 0,00 ^b | 0,1 \pm 0,14 ^b |



T1 $3,0 \pm 0,70^a$ $1,4 \pm 1,14^b$ $0,4 \pm 0,54^a$ $0,2 \pm 0,44^b$ $0,9 \pm 0,31^b$

Legenda: Whey Protein (T1), Controles Negativo (CN) e Positivo (CP). Valores representados com Média \pm Desvio padrão. Significativo pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Em relação a presença de mutações cromossômicas em *A. cepa* devido ao tratamento com Whey Protein foi possível observar o aparecimento de pontes cromossômicas e alterações nucleares, no entanto não é possível afirmar o potencial genotóxico devido a possibilidade de serem estas mutações espontâneas devido a significância estatística (Tabela 2).

Tabela 2: Alterações cromossômicas observadas em células meristemáticas de *Allium cepa*

| | Atrasos | Pontes | Alterações Nucleares |
|-----------|------------------|------------------|----------------------|
| CN | $0,2 \pm 0,44^a$ | - | $0,2 \pm 0,44^a$ |
| CP | - | - | $1,8 \pm 1,48^a$ |
| T1 | - | $0,2 \pm 0,44^a$ | $0,2 \pm 0,44^a$ |

Legenda: Whey Protein (T1), Controles Negativo (CN) e Positivo (CP). Valores representados com Média \pm Desvio Padrão. Significativo pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Neste estudo foi analisado os efeitos biológicos de Whey Protein sobre o ciclo celular de *A. cepa*. Foi verificado que embora o tratamento o Whey Protein tenha diminuído o crescimento radicular de *A. cepa* este efeito não pode ser comparado de maneira paralela a redução do índice mitótico, assim não é possível afirmar que este composto tenha efeito antiproliferativo ou citotóxico sobre células. E com relação a presença de mutações cromossômicas é possível afirmar que a exposição ao Whey Protein quanto ao potencial mutagênico é seguro pelo teste do *A. cepa*, pois as mutações encontradas no estudo estão de acordo com o padrão para mutações espontâneas.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo foi verificado que a exposição celular ao Whey Protein pode ser considerada segura pelo teste do *Allium cepa*, pois o composto não conduziu a alterações no ciclo celular ou apresentou caráter mutagênico. Assim, é sugerido estudos posteriores ao nível molecular analisem a ação deste composto ao nível de DNA para verificar possível mecanismos de ação não observados neste estudo e que possam contribuir com informações sobre a segurança no consumo do Whey Protein.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, L. R.; ANDREOLO, Jesuíno; SILVA, Maria Sebastiana. Utilização de suplemento alimentar e anabolizante por praticantes de musculação nas academias de Goiânia-GO. **Rev. Bras. Ciên. e Mov. Brasília** v. 10, n. 3, 2002.

BAGATINI, Margarete Dulce; SILVA, Antonio Carlos Ferreira da; TEDESCO, Solange Bosio. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Rev Bras Farmacogn**, v. 17, n. 3, p. 444-7, 2007.

BIESEK, Simone; ALVES, Leticia Azen; GUERRA, Isabela. Estratégias de nutrição e suplementação no esporte. 3^o edição, 2015, p. 138.



FISKESJO, G. The Allium test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v.102, p. 99-112, 1985.

LOVATO, Frederico et al. Avaliação da conformidade de suplementos alimentares frente à legislação vigente. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**, v. 8, n. 47, p. 7, 2014.

OLIVEIRA, Juliana Tainara de Andrade. **Efeito citotóxico, antiproliferativo e antimutagênico de Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) em *Allium cepa***. Monografia. 27 f. (Trabalho de Conclusão de Curso) – Centro Universitário Cesumar, UniCesumar, Maringá, 2015.

ROA, O; YEBER, M.C.; VENEGAS, W. Genotoxicity and toxicity evaluations of ECF cellulose bleaching effluents using the *Allium cepa* L. Test. **Braz J Biol**, v.72, n.3, p. 471-7, 2012.

SGARBIERI, Valdemiro Carlos et al. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, 2004.

QUEIROZ, Taiane Caroline; GUEDES, Jovana Silva; QUICHABA, Michely Bião; JUNIOR, Eidilson Soares dos Reis; REIS, Ana Rosa Muniz, REIS, Marcela Funaki dos Reis. Composição Química e Atividade Antioxidante de *Agaricus blazei* e seu Efeito Sobre a Modulação da Mitose, **J Health Sci**, v. 18, n.2, p. 134-8, 2016.

TUMA, Maria Angela Figueiredo et al. HIPERTENSÃO ARTERIAL, CONSUMO DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES E ESTERÓIDES ANABÓLICOS ANDROGÊNICOS EM ALUNOS DE CURSO DE EDUCAÇÃO FÍSICA. **FUNDAÇÃO PADRE ALBINO**, p. 17.