

## DESENVOLVIMENTO DE CONJUGADOS PROTEICOS COM COMPOSTOS FENÓLICOS: AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, TECNOFUNCIONAL E ANTIOXIDANTE

Dayane Cristina Bufalo (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Milena Kazue Enokida, Paulo Leonardo Marotti Siciliano, Cynthia Letícia S. Cabeça, Natani Caroline Nogueira, Paula Milani Gimenez Fernandes (Orientador). E-mail: [pgmfernandes@uem.br](mailto:pgmfernandes@uem.br).

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica, Maringá, PR.

**Área e subárea do conhecimento: Ciências Biológicas / Bioquímica.**

**Palavras-chave:** Obtenção de conjugado proteico-polifenólico; Fração antioxidante de *Stevia*; Solubilidade proteica.

### RESUMO

Este estudo objetivou desenvolver e avaliar conjugados a partir de aminoácidos com ácido clorogênico e quercetina ou isolado proteico de soro de leite (WPI) com compostos fenólicos presentes na fração antioxidante de *Stevia* (FAS). Os conjugados foram obtidos por método alcalino, secos por *spray dryer* ou liofilização, e avaliados quanto à capacidade antioxidante (DPPH, ABTS), inibição de enzimas digestivas ( $\alpha$ -amilase, lipase) e solubilidade. Os resultados demonstraram que a conjugação potencializou a atividade antioxidante e promoveu a inibição enzimática. Um aumento expressivo na solubilidade foi observado para todos os conjugados em relação aos componentes isolados, com destaque para os obtidos por *spray dryer*, que se mostraram mais solúveis que os liofilizados. Conclui-se que a conjugação covalente é uma estratégia eficaz para aprimorar as propriedades físico-químicas e bioativas de sistemas proteína-polifenol, com potencial para aplicação em alimentos funcionais.

### INTRODUÇÃO

A fortificação de alimentos com compostos bioativos, como os polifenóis presentes em frações de plantas como *Stevia rebaudiana*, é uma estratégia promissora para o desenvolvimento de produtos funcionais. Recentemente estudos sobre esta fração antioxidante, rica em compostos fenólicos como ácido clorogênico, e flavonoides como a quercetina, tem sido analisada (Milani *et al.*, 2017A, Cabeça *et al.*, 2023). No entanto, a simples adição de frações antioxidantes de *Stevia* (FAS) em matrizes como o isolado proteico de soro de leite (WPI) pode resultar em problemas tecnofuncionais e sensoriais, como baixa solubilidade e alterações indesejáveis de cor e sabor. Para superar essas barreiras, a conjugação covalente, que forma uma ligação química estável entre proteínas e polifenóis, surge como uma abordagem inovadora (Cabeça *et al.*, 2023). Essa técnica visa não apenas resolver os

problemas de compatibilidade, mas também potencializar as propriedades bioativas e tecnofuncionais dos componentes. Atualmente, a produção de proteínas modificadas com propriedades tecnológicas e biológicas aprimoradas foi identificada como um campo de rápido avanço na ciência e tecnologia de alimentos com muitas aplicações potenciais (*Baba et al.*, 2021). Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo estudar e desenvolver conjugados de aminoácidos com compostos fenólicos e entre WPI-FAS avaliando o impacto da conjugação e dos métodos de secagem (*spray dryer* e liofilização) nas suas propriedades físico-químicas e bioativas.

## MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi conduzido em duas etapas. Primeiramente, conjugados de aminoácidos com ácido clorogênico e quercetina foram sintetizados pelo método alcalino, secos em *spray dryer* e avaliados quanto à atividade antioxidante (DPPH, ABTS) e estrutura (ESI-MS). Na segunda etapa, a Fração Antioxidante de *Stevia* (FAS) foi conjugada com Isolado Proteico de Soro de Leite (WPI) pelo mesmo método, com secagem por liofilização ou *spray dryer*. Estes conjugados complexos foram avaliados quanto à capacidade antioxidante, solubilidade e inibição das enzimas  $\alpha$ -amilase e lipase pancreática. A análise estatística foi realizada por ANOVA e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### *Resultados da Etapa 1*

A etapa inicial demonstrou a eficácia do método alcalino na conjugação de aminoácidos com compostos fenólicos, o que aumentou drasticamente a solubilidade em água em relação aos componentes isolados. Segundo Arifian *et al.*, 2022, os aminoácidos como ácido aspártico, ácido glutâmico e alanina-ácido glutâmico, por exemplo, aumentam as solubilidades em água de seus conjugados de quercetina correspondentes em 45,2, 53,0 e 52,6 vezes, respectivamente. A análise antioxidante, validada pelos ensaios DPPH e ABTS+, demonstrou alta capacidade de sequestro de radicais, atingindo até 83% de inibição. Os conjugados de quercetina com glutamina, ácido aspártico, alanina, leucina e cisteína apresentaram os maiores percentuais de inibição. A formação dos conjugados foi identificada por ESI-MS, no entanto, análises mais complexas são necessárias para a confirmação.

### *Resultados da Etapa 2*

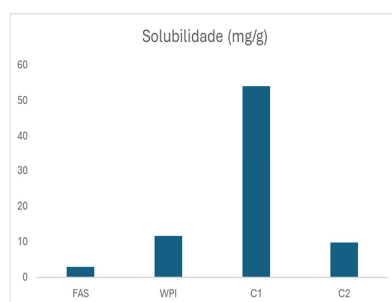
A **Tabela 1**, descreve a quantificação de compostos bioativos e a atividade antioxidante dos conjugados WPI-FAS. O método DPPH, C1 apresentou valores de 3,24 g GAE/100g e 9,81 g Trolox/100g, enquanto C2 obteve valores significativamente menores, de 2,65 g GAE/100g e 7,44 g Trolox/100g, respectivamente. A mesma propensão foi observada no ensaio ABTS, onde C1 (4,48 g Trolox/100g) foi mais de duas vezes mais potente que C2 (2,11 g Trolox/100g). A melhora da atividade antioxidante decorrente da conjugação é um efeito corroborado pela literatura. Nesse contexto, o estudo de Zhu *et al.*, 2025,

evidenciou um efeito sinérgico, no qual o conjugado cafeico-g-polilisina apresentou não apenas elevada capacidade antioxidante, mas também maior eficácia antibacteriana, superando a molécula precursora de ácido cafeico. O avanço mais significativo foi o aumento exponencial da solubilidade dos conjugados WPI-FAS em comparação com seus precursores isolados. Neste aspecto, a secagem por *spray dryer* revelou-se uma tecnologia superior à liofilização, produzindo um pó com propriedades tecnofuncionais otimizadas (**Figura 1**), potencialmente pela formação de microestruturas esféricas. Conforme a **Figura 2A**, a FAS apresentou a maior capacidade de inibição da  $\alpha$ -amilase. O conjugado C1 foi mais efetivo em relação ao conjugado C2. Na inibição da lipase pancreática, demonstrada na **Figura 2B**, o **conjugado** liofilizado (C2) foi mais eficaz, enquanto o *spray dryer* e o WPI isolado não apresentaram efeito significativo.

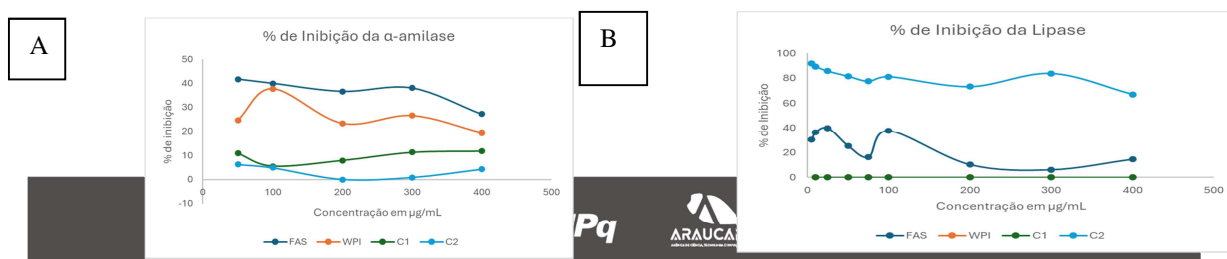
**TABELA 1.** Quantificação de fenólico e flavonoide, capacidade antioxidantes dos conjugados a 1 mg/mL.

| Análise                | C1                           | C2                           |
|------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Fenólico (g/100g)      | 3,0 $\pm$ 0,007 <sup>a</sup> | 2,1 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>   |
| Flavonóides (g/100g)   | 1,6 $\pm$ 0,007 <sup>a</sup> | 1,3 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>   |
| ATIVIDADE ANTIOXIDANTE |                              |                              |
| DPPH                   | C <sub>1</sub>               | C <sub>2</sub>               |
| GAE (g/100g)           | 3,24 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup> | 2,65 $\pm$ 0,05 <sup>c</sup> |
| Trolox (g/100g)        | 9,81 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup> | 7,44 $\pm$ 0,05 <sup>c</sup> |
| ABTS+                  | C <sub>1</sub>               | C <sub>2</sub>               |
| GAE (g/100g)           | 0,39 $\pm$ 0,002             | 0,056 $\pm$ 0,001            |
| Trolox (g/100g)        | 4,48 $\pm$ 0,002             | 2,11 $\pm$ 0,001             |

FAS: Fração polifenólica de estêvia obtida a partir de um extrato metanólico.; WPI: Isolado de proteína do soro de leite; C1: Conjugado de F1 e WPI, seco por *spray drying*; C2: Conjugado de F1 e WPI, liofilizado; GAE: Equivalente de Ácido Gálico; Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ).



**FIGURA 1.** Avaliação da solubilidade dos conjugados proteína com compostos bioativos. FAS: Fração polifenólica de estêvia obtida de extrato metanólico; WPI: Whey Protein isolado; C1: spray FAS + WPI; C 2 : spray; C2: FAS + WPI liofilizado



**FIGURA 2.** Avaliação da Inibição da amilase e lipase. FAS: Fração polifenólica de estévia obtida de extrato metanólico; WPI: Whey Protein isolado; C1: spray FAS + WPI; C 2 : spray; C2: FAS + WPI liofilizado

## CONCLUSÕES

A conjugação demonstrou ser uma estratégia eficaz para aprimorar propriedades tecnofuncionais e bioativas, destacando-se o expressivo aumento da solubilidade nos conjugados WPI-FAS. A secagem por *spray dryer* se mostrou superior à liofilização para maximizar a solubilidade do produto final. A conjugação mais simples, envolvendo aminoácidos, foi fundamental para confirmar que a conjugação potencializa a capacidade antioxidante e melhora a solubilidade, fornecendo base para a compreensão dos resultados no sistema proteico complexo. O estudo valida a conjugação como uma abordagem promissora para agregar valor aos subprodutos da *Stevia* e desenvolver novos ingredientes para a indústria de alimentos funcionais.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) e às agências de fomento, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação Araucária, pelo apoio financeiro essencial para a execução deste projeto

## REFERÊNCIAS

ARIFIAN, Hanggara; MAHARANI, Rani; MEGANTARA, Sandra; GAZZALI, Amirah Mohd; MUCHTARIDI, Muchtaridi .*Amino-Acid-Conjugated Natural Compounds: Aims, Designs and Results*. **Molecules** 27(21), 7631, 2022;

BABA, W.N.; MCCLEMENTS, D.J.; MAQSOOD, S. *Whey protein–polyphenol conjugates and complexes: Production, characterization, and applications*. **Food Chemistry**, vol. 365, 130455, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130455>

CABEÇA, et al. *Microencapsulated antioxidant stevia fraction fortifies whey protein and enhances its antidiabetic activity*. **Journal of Food Science and Technology**. Volume 60, pages 2275–2285, (2023)

MILANI, et al. *New seminal variety of Stevia rebaudiana: obtaining fractions with high antioxidant potential of leaves*. **Anais Da Academia Brasileira de Ciências**, v.89, n.3, p.1841–1850, 2017a. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720170174>

34º Encontro Anual de Iniciação Científica  
14º Encontro Anual de Iniciação Científica Júnior



12 e 13 de novembro de 2025

Zhu J, Lei Z, Tang Y, Lu L, Qiu X, Pan L. *Preparation, characterization, and antibacterial and antioxidant activities of caffeic acid grafted  $\epsilon$ -polylysine*. **Int J Biol Macromol**. 2025. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2024.139276.