AVALIAÇÃO ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANA, FUNCIONAL E *DOCKING* MOLECULAR DE CONJUGADO PROTEICO-POLIFENÓLICO DE FRAÇÃO DE *STEVIA REBAUDIANA*.

Isaac Ascencio do Nascimento (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Paula Gimenez Milani Fernandes (Orientador). E-mail: pgmfernandes@uem.br.

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

Bioquímica/Química de macromoléculas

Palavras-chave: *Whey Protein* isolado; Extrato polifenólico; Compostos fenólicos.

RESUMO

Neste projeto um suplemento proteico-polifenólico foi desenvolvido, por meio da conjugação entre a proteína de soro do leite isolado (WPI) com compostos fenólicos presentes no extrato da fração polifenólica de *Stevia* (F1), em busca de um produto com aumento de solubilidade e com propriedades funcionais. O conjugado apresentou aumento de cinco vezes a solubilidade, inibição da α-amilase superior a 50% e efetiva atividade antioxidante nos ensaios *in vitro* realizados quando comparados com seus predecessores. Os compostos encontrados majoritariamente pelo UHPLC-MS/MS foram aplicados a métodos de *docking molecular* com a α-amilase, que indicaram interações entre o ácido clorogênico e quercetina com o sítio catalítico da enzima, que conduzem a perfis condizentes ao seu potencial inibitório obtido.

INTRODUÇÃO

A conjugação de proteínas com polifenóis tem demonstrado capacidade de potencializar as propriedades biológicas e tecnofuncionais desses compostos fenólicos, fornecendo maior área de aplicação na indústria de alimentos e bebidas e até farmacêutica. A proteína do soro de leite tem capacidade de formar esses conjugados com os polifenóis por meio de interações químicas, exibindo perfis antioxidantes e antidiabéticos melhorados, este projeto estudou um conjugado de suplemento proteico com atividades bioativas, introduzidas pela fração polifenólica de *Stevia rebaudiana.*

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção de fração polifenólica extrato metanólico de folhas de Stevia (F1) e análises físico-químicas

A obtenção da fração F1 foi realizada de acordo com Milani *et al.*, 2017b. Na F1, foi quantificado esteviosídeos, rebaudiosídeo A e C, compostos fenólicos totais, com os resultados expressos utilizando curva padrão de ácido gálico (10-500 µg/mL). Flavonoides na fração F1 foi determinada utilizando curva padrão (25-500 µg/mL) de acordo com metodologias descritas no trabalho de Milani *et al.*, 2017b. A fração F1 foi submetida a análises usando UHPLC para a identificação e quantificação dos compostos fenólicos e flavonoides: (Shimadzu, modelo Nexera X2).

Conjugação por método alcalino de F1 com whey protein isolado (WPI) para a obtenção de CWPI-F1

A obtenção dos conjugados foi realizada de acordo com algumas adaptações. Após a conjugação foram realizadas, em F1, Whey e CWPI-F1, as análises de solubilidade (Chranioti *et al.*, 2016), capacidade antioxidante, o radical ABTS+ e a atividade de inibição da amilase por (Cabeça, *et al.*, 2023).

Docking molecular

A estrutura tridimensional da α-amilase pancreática humana (PDB ID: 1XD0) foi obtida do Protein Data Bank. Esta estrutura, resolvida por difração de raios X a 2,00 Å de resolução, está cocristalizada com o inibidor acarbose (ACA) em seu sítio ativo. Para análises subsequentes, todos os ligantes foram removidos, e átomos de hidrogênio foram adicionados à cadeia proteica usando o *Discovery Studio* v2025.
Para as simulações de *docking molecular*, uma biblioteca virtual foi construída compreendendo os constituintes das frações do extrato. As estruturas moleculares foram obtidas do banco de dados PubChem e preparadas usando o servidor OpenBabel. A validação do protocolo de *docking* foi realizada através do *redocking* do inibidor ACA usando AutoDock Vina e GOLD v2024.1.0, que renderam valores de Desvio Médio Quadrático (RMSD) de 0,670 ± 0,009 Å e 0,619 ± 0,002 Å, respectivamente.

No AutoDock Vina, o algoritmo padrão de busca e pontuação foi empregado, com uma caixa de busca definida no sítio catalítico da enzima, medindo 13 × 15 × 16 Å ao longo dos eixos x, y e z. No GOLD, o algoritmo de busca padrão e a função de pontuação (scoring function) PLP Fitness foram aplicados, delimitando uma esfera com um raio de 6 Å centrada na posição do inibidor ACA. Os resultados representam a média de três simulações por constituinte da fração em cada programa e são expressos como a pontuação relativa média (MRS).

Análise Estatística

Todos os testes foram realizados em triplicata e foram submetidos à análises de variância ANOVA e teste Tukey com p fixado a 0,05.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 1 lista todos os compostos fenólicos testados, destacando o ácido clorogênico e quercitina, exceto o ácido vanílico e a naringenina, que não foram detectados.

Composto Fenólico	F1 g/100g
Ácido 4-hidroxibenzoico	0,03
Ácido cafeico	0,03
Ácido clorogênico	0,5
Ácido cumárico	0,0005
Ácido gálico	0,0005
Apigenina	0,001
Kaempferol	0,02
Luteonina	0,02
Quercitina	0,1

Tabela 1. Massa dos compostos fenólicos encontrados em g/100g

A quantificação dos glicosídeos de esteviol, rebaudiosídeos A e C, na fração F1, foi inferior a 0,0001%. Esse resultado se deve pelo processo de fracionamento em que o acetato de etila não apresenta concentração considerável de glicosídeos.

A solubilidade do conjugado aumentou 5 vezes em relação ao WPI e 17 vezes em relação a F1. A maior solubilidade do CWPI-F1 ao ser incorporado a fração polifenólica de estévia compara-se a Khalifa *et al.*, 2019, que a adição de polifenóis ao isolado de proteína do soro melhora suas propriedades tecnofuncionais e bioativas.

O potencial antioxidante mostra que fração F1 teve importante inibição de radicais (75,28% para DPPH e 57,25% para ABTS), enquanto o WPI teve desempenho inferior (8,3% e 10,85%, respectivamente). O conjugado não apresentou aumento significativo em relação ao WPI.

As amostras F1 e WPI tiveram uma melhor inibição da enzima amilase (tabela 2) em concentrações menores com diminuição da inibição com o aumento da concentração, enquanto o CWPI-F1 teve uma resposta inibitória melhor na maior concentração testada, corroborando com Milani et al., 2017b, em que a combinação de *Stevia* e WPI potencializou os efeitos antidiabéticos em animais.

Concentração µg/mL	F1	WPI	CWPI-F1
50	41 ± 0.0009^{a}	24 ± 0.004^{a}	11 ± 0.001^{b}
100	39 ± 0.0001^{a}	37 ± 0.01^{a}	5 ± 0.01^{b}
200	36 ± 0.0001^{a}	23 ± 0.0001^{a}	8 ± 0.0009^{b}
300	37 ± 0.001^{a}	26 ± 0.001^{a}	11 ± 0.006^{b}
400	27 ± 0.006^{a}	19 ± 0.004^{a}	11 ± 0.003^{a}
500	35 ± 0.0004^{b}	5 ± 0.003^{c}	55 ± 0.0005^{a}

Tabela 2. Inibição da enzima α-amilase; Letras diferentes representam uma diferença estatística signficante de ($p > 0.05$)

As análises realizadas de *docking molecular* (tabela 3), demonstraram que muitos dos compostos fenólicos encontrados na fração F1 tem altas afinidades com o sítio catalítico da enzima testada, com destaque a quercitina e ácido clorogênico que têm maior afinidade e encontrados em maior quantidade.

Composto	F1 g/100g	LogP*	Gold	Autodock Vina	MRS
Ácido 4-hidroxibenzoico	0,03	1.42	40.97 ± 0.06	-5.50 ± 0.00	0.61
Ácido cafeico	0,03	1.42	47.28 ± 0.46	-6.70 ± 0.00	0.72
Ácido clorogênico	0,5	-0.36	60.09 ± 1.28	-8.13 ± 0.06	0.90
Quercetina	0.1	1.04	65.58 ± 14.82	-9.30 ± 0.00	1.00

Tabela 3. docking da fração polifenólica F1, todos apresentam uma estatística de ($p > 0.05$)

CONCLUSÕES

O conjugado apresentou uma melhoria significativa em diversas propriedades bioativas e tecnofuncionais. Enquanto o *docking molecular* determinou alta afinidade dos principais compostos fenólicos, encontrado na avaliação do UHPLC-MS/MS, que tendem a explicar sua capacidade inibitória.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento e concessão da bolsa.

REFERÊNCIAS

Cabeça, C. L. S. *et al.,* (2023). Microencapsulated antioxidant stevia fraction fortifies Whey protein and enhances its antidiabetic activity. **Journal of Food Science and Technology**.

Chranioti, C. *et al.,* (2016). Comparison of spray, freeze and oven drying as a means of reducing bitter aftertaste of steviol glycosides (derived from *Stevia rebaudiana* Bertoni plant) - Evaluation of the final products. **Food Chemistry,** 1151-1158.

Khalifa I, *et al.,* (2019). Anti-glycation and anti-hardening effects of microencapsulated mulberry polyphenols in highprotein sugar ball models through binding with some glycation sites of whey proteins. **International Journal of Biological Macromolecules**, 123, 10–19.

Milani, P. G. *et al*,. (2017b). Fortification of the whey protein isolate antioxidant and antidiabetic activity with fraction rich in phenolic compounds obtained from

Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni leaves. **J Food Sci Technol**, v.54, n.7, p.2020–2029.