

NATÁLIA MOREIRA NUNES

**COMPLEXOS BIOATIVOS FLAVONOIDE-LACTOFERRINA: ENERGÉTICA E
DINÂMICA DE INTERAÇÃO INTERMOLECULAR ENTRE NARINGINA,
NARINGENINA E LACTOFERRINA BOVINA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos,
para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientadora: Ana Clarissa dos Santos Pires

Coorientadores: Luis Henrique Mendes da Silva

Guilherme Max Dias Ferreira

VIÇOSA - MINAS GERAIS

2020

RESUMO

NUNES, Natália Moreira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2020. **Complexos bioativos flavonoide-lactoferrina: energética e dinâmica de interação intermolecular entre naringina, naringenina e lactoferrina bovina.** Orientadora: Ana Clarissa dos Santos Pires. Coorientadores: Luis Henrique Mendes da Silva e Guilherme Max Dias Ferreira.

A incorporação de moléculas bioativas em alimentos, como os flavonoides, tem se mostrado uma estratégia de interesse em tecnologia de alimentos, a fim de promover melhoria na qualidade dos produtos e na saúde dos consumidores. Porém, devido à baixa solubilidade e ao gosto amargo de algumas moléculas, como a naringina (NR) e a naringenina (NG), a incorporação em alimentos é dificultada. Como estratégia para a veiculação dessas moléculas, tem-se a utilização de proteínas como nanocarreadoras, a qual se torna ainda mais atrativa se a proteína em questão apresentar propriedades bioativas, como é o caso da lactoferrina bovina (LF). Neste trabalho, a formação do complexo NR-LF foi estudada por ressonância plasmônica de superfície (SPR) e para estudar formação do complexo NG-LF as técnicas de nanocalorimetria de titulação isotérmica (ITC), *docking* molecular (DC) e dinâmica molecular (MD) foram empregadas. Os resultados demonstraram que a LF forma complexo com ambos os flavonoides, com predominância dos complexos NR/NG-LF em relação aos reagentes livres ($\Delta G_{NR-LF}^{25^\circ\text{C}} = -29,35 \text{ kJ mol}^{-1}$; $\Delta G_{NG-LF}^{25^\circ\text{C}} = -33,42 \text{ kJ mol}^{-1}$). Os valores de K_b encontrados a 25°C foram $1,39 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ e $7,21 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ para os complexos com NR e NG, respectivamente. A esta temperatura, a formação do complexo NR-LF foi entálpicamente dirigida ($\Delta H_{NR-LF}^{25^\circ\text{C}} = -58,27 \text{ kJ mol}^{-1}$; $T\Delta S_{NR-LF}^{25^\circ\text{C}} = -29,91 \text{ kJ mol}^{-1}$), enquanto a formação do complexo NG-LF foi principalmente regida pela entropia ($\Delta H_{NG-LF}^{25^\circ\text{C}} = -2,61 \text{ kJ mol}^{-1}$; $T\Delta S_{NG-LF}^{25^\circ\text{C}} = 30,81 \text{ kJ mol}^{-1}$). Isto evidencia que a ausência do glicosídeo na NG favorece a ocorrência de interações hidrofóbicas com a LF e está de acordo com os resultados de DC, que indicaram que a NG interage em um sítio hidrofóbico da LF. Foi possível determinar também os parâmetros cinéticos de formação do complexo NR-LF, que passa por um estado intermediário no qual um complexo intermediário ($[\text{NR-LF}]^*$) é formado. Sua formação a partir da associação das moléculas de NR e LF livres ocorre em várias etapas, enquanto que a formação do $[\text{NR-LF}]^*$ a partir da dissociação do complexo estável ocorre em uma etapa. Outro resultado importante que corrobora para a utilização da LF como nanocarreador de flavonoides é sua capacidade de reduzir a percepção do gosto amargo da NG, avaliada por análise de tempo-intensidade

realizada por um painel treinado. Portanto, nota-se o grande potencial de utilização dos complexos bioativos NR-LF e NG-LF, que podem ser incorporados em matrizes de interesse tendo como base os resultados aqui apresentados.

Palavras-chave: Nanocarreador. Compostos bioativos. Polifenóis. Proteínas. Interação intermolecular.

ABSTRACT

NUNES, Natália Moreira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2020.
Bioactive flavonoid-lactoferrin complexes: energetics and dynamics of intermolecular interaction between naringin, naringenin, and bovine lactoferrin.
Adviser: Ana Clarissa dos Santos Pires. Co-advisers: Luis Henrique Mendes da Silva and Guilherme Max Dias Ferreira.

The incorporation of bioactive molecules in food, such as flavonoids, has been a strategy of interest in food technology to enhance food quality and also improve health benefits to consumers. However, the low solubility and bitter taste of some molecules, e.g. naringin (NR) and naringenin (NG) difficult the incorporation in food. As a strategy to carry these molecules, the use of proteins as nanocarriers can be performed and became even more attractive if the protein has bioactive properties, such as bovine lactoferrin (LF). Here, the NR-LF complex formation was studied by surface plasmon resonance (SPR) and to study the NG-LF complex formation the techniques isothermal titration nanocalorimetry (ITC), molecular docking (DC) and molecular dynamics (MD) were used. The results showed that LF forms complex with both flavonoids and the complexes NR/NG-LF predominated over the free reagents ($\Delta G_{NR-LF}^{25^\circ\text{C}} = -29.35 \text{ kJ mol}^{-1}$; $\Delta G_{NG-LF}^{25^\circ\text{C}} = -33.42 \text{ kJ mol}^{-1}$). The K_b values at 25°C were $1.39 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ and $7.21 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ for the complexes with NR and NG, respectively. Also at 25°C , the NR-LF formation was enthalpically driven ($\Delta H_{NR-LF}^{25^\circ\text{C}} = -58.27 \text{ kJ mol}^{-1}$; $T\Delta S_{NR-LF}^{25^\circ\text{C}} = -29.91 \text{ kJ mol}^{-1}$), but the NG-LF complex formation was mainly driven by the entropy ($\Delta H_{NG-LF}^{25^\circ\text{C}} = -2.61 \text{ kJ mol}^{-1}$; $T\Delta S_{NG-LF}^{25^\circ\text{C}} = 30.81 \text{ kJ mol}^{-1}$). This indicates that the absence of the glycoside group in NG favors the hydrophobic interactions with LF, and is in accordance with DC results, which indicated that NG binds in a hydrophobic site on LF. It was possible to determine the kinetic parameters of NR-LF formation, which passes through an intermediary state at which an intermediary complex ($[\text{NR-LF}]^*$) is formed. Its formation from the association of free NR and LF is a multi-step process, but the $[\text{NR-LF}]^*$ formation from the dissociation of the stable complex occurs in a single-step. Another important result that corroborates to the LF using as a flavonoids nanocarrier is the LF capacity to reduce the bitterness perception of NG, evaluated by time-intensity analysis carried out by a trained panel. Therefore, it is notable the great potential of the bioactive complexes NR-LF and NG-LF, which can be incorporated in matrices of interest using the results presented here as a guide.

Keywords: Nanocarrier. Bioactive compounds. Polyphenols. Proteins. Intermolecular interaction.

INTRODUÇÃO GERAL	11
REVISÃO DE LITERATURA.....	13
ARTICLE 1	37
Surface plasmon resonance study of interaction between lactoferrin and naringin	
ARTICLE 2	59
Naringenin-lactoferrin binding: impact on naringenin bitterness and thermodynamic characterization of the complex	
CONCLUSÕES GERAIS	79
REFERÊNCIAS	80