

RAFAELA TEIXEIRA RODRIGUES DO VALE COSTA

**INTERAÇÃO INTERMOLECULAR ENTRE VERMELHO 40 E CASEÍNA
MICELAR**

Dissertação 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 *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2017

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

C837i
2017

Costa, Rafaela Teixeira Rodrigues do Vale, 1990-
Interação intermolecular entre vermelho 40 e caseína
micelar / Rafaela Teixeira Rodrigues do Vale Costa. – Viçosa,
MG, 2017.

x, 40f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Ana Clarissa dos Santos Pires.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Tecnologia de alimentos. 2. Caseína. 3. Proteínas.
4. Corantes em alimentos. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Tecnologia de Alimentos. Programa de
Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. II. Título.

CDD 22. ed. 664.07

RAFAELA TEIXEIRA RODRIGUES DO VALE COSTA

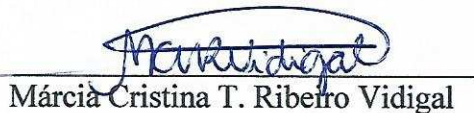
**INTERAÇÃO INTERMOLECULAR ENTRE VERMELHO 40 E CASEÍNA
MICELAR**

Dissertação 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 Magister Scientiae.

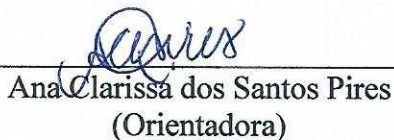
APROVADA: 20 de julho de 2017.



Luis Henrique Mendes da Silva
(Coorientador)



Márcia Cristina T. Ribeiro Vidigal



Ana Clarissa dos Santos Pires
(Orientadora)

Ao meu amado e inesquecível papai, Romeu Rodrigues do Vale (in memoriam), pelo exemplo de pai, homem e amigo. Sou e serei eternamente grata pelos seus ensinamentos e para sempre lembrarei e guardarei em meu coração.

OFEREÇO

A minha amada mamãe Edna Aparecida Teixeira do Vale e ao querido José Marcos Pereira, com todo o meu carinho, respeito, admiração e gratidão.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sua constante presença em minha vida, me dando forças para seguir em frente mesmo quando os obstáculos pareciam grandes e difíceis de serem superados. A minha mãezinha do céu, Nossa Senhora, por sua fiel presença em todos os momentos.

À minha amada mamãe Edna, vovó Terezinha e ao querido José Marcos por toda a dedicação, carinho, amor, compreensão e companheirismo nos momentos mais difíceis.

À minha irmã Juliana, meu cunhado Romualdo e minhas amadas sobrinhas Manuela e Yasmim, fonte de inspiração, carinho, paz e serenidade.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos pela oportunidade em realizar o mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo e à Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro ao projeto.

À querida professora e orientadora Ana Clarissa por ter me recebido de braços abertos e por ter me apoiado nos momentos em que os obstáculos pareciam grandes demais. Ainda que cada letra desta dissertação fosse um diamante, elas não seriam o suficiente para retribuir todos os ensinamentos, apoio, disponibilidade, compreensão, incentivo, carinho e confiança que me foi direcionado.

Ao professor Luis Henrique pela coorientação, ensinamentos, disponibilidade e atenção. À toda equipe do laboratório de Química Verde Coloidal e Macromolecular (QUIVECOM), em especial a Adriana, Dario e Yara Luiza, por toda colaboração e disposição.

À toda equipe do Laboratório de Embalagem (LABEM) pela disponibilidade e atenção.

À professora Márcia pela disponibilidade, atenção e contribuições.

Á todos os professores que tive ao longo de minha formação e em especial, a Tia Carminha, Tia Maria das Graças, Tia Luzia, Adriana Ferreira, Juraci, Morgana Canudo, Estefânia Fernandes, dentre outros que marcam minha vida e que despertou em mim uma nova maneira de ver o mundo. Vocês foram e para sempre serão minhas fontes de inspiração e exemplos de profissionais!

Á todos os amigos e profissionais da nossa querida equipe de Termodinâmica Molecular Aplicada (THERMA), Ana Flávia, Carini, Eliara, Jaqueline, Juninho, Natália, Otávio, Paulo Henrique e Richard, pela receptividade, ensinamentos, companheirismo e agradável convívio. Agradeço também ao professor Luis Antônio Minim e aos amigos do Laboratório de Desenvolvimento e Simulação de Processos (LADESP), Débora Mara, Gabriel, Isabelle Neves, Janaina, Lucidarce, Priscila e Thiago pela amizade e apoio.

Á minhas amadas e preciosas afilhadas Letícia Mirely, Maria Isabelle e Yasmim por todo carinho e amor.

Á todos os membros das famílias Teixeira, Rodrigues e Costa, em especial, á Fabiana Luiza, Juninho, Luciana, Flávio, Tia Rita, Tio Geraldo, Tia Eliane, Valdinei, Roney, Sr. Antônio, D. Sebastiana, D. Bia, Socorro, Vânia, Cilene, Débora Adinair, Micarla, Bárbara, Manoel Júnior e Igor Rafael pelo constante incentivo, carinho e votos de felicidades.

Ás minhas grandes amigas, Adriana Ferreira, Aparecida Jeremias, Conceição, Diana Freitas, Elisângela, Emanuelle Burgos, Jeíce Catrine, Hévila, Louani, Regiane Marcolino, Sandra, Sarah Fernandes, Thaline Pimenta e Tereza por todo carinho, companheirismo, cumplicidade e amizade. Agradeço também a Bruna Mara e a Júnia Cápua pelo incentivo e apoio.

Aos amigos Alisson Trindade, Carlos Romeu, Carlos Henrique, Daniel Rodrigues, Francisco Hevilásio e Marcos Eric pelo constante incentivo, carinho e votos de felicidades.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão deste trabalho.

BIOGRAFIA

RAFAELA TEIXEIRA RODRIGUES DO VALE COSTA, filha de Romeu Rodrigues do Vale e Edna Aparecida Teixeira do Vale, nasceu no dia 06 de dezembro de 1990 na cidade de Viçosa-MG.

Em agosto de 2010, iniciou o curso de Engenharia de Alimentos na Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) onde se graduou em agosto de 2015.

Durante a graduação foi monitora de Cálculo I, atuou em projeto de extensão e foi bolsista de iniciação científica do Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico (CNPq) no período de 2013 a 2015.

Em agosto de 2015, iniciou o mestrado no Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa (UFV), concluindo-o em julho de 2017.

RESUMO

COSTA, Rafaela Teixeira Rodrigues do Vale, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2017. **Estudo da interação intermolecular entre vermelho 40 e caseína micelar**. Orientadora: Ana Clarissa dos Santos Pires. Coorientador: Luis Henrique Mendes da Silva.

A cor de um alimento é uma característica primária de qualidade alimentar responsável por atrair consumidores de qualquer idade ou grupo. A distribuição uniforme dos corantes nos sistemas alimentícios pode ser uma indicação de interações e formação de complexos entre os corantes e um ou mais ligantes existentes na matriz alimentícia. O presente trabalho teve como objetivo estudar a nível molecular os mecanismos envolvidos na interação entre o vermelho 40 (V40) e a caseína micelar em diferentes condições de pH (2.0, 6.6 e 9.0), temperaturas (20, 25, 35, 45 e 55 °C) e força iônica (0.01 a 1.0 mol.L⁻¹). Técnicas sensíveis e eficazes como fluorescência e microcalorimetria de titulação isotérmicas foram utilizadas para investigar a interação entre o corante e a proteína. Resultados de fluorescência mostraram que a intensidade de fluorescência da caseína micelar diminuiu à medida que as concentrações de V40 aumentaram. Para todas as condições termodinâmicas avaliadas, o mecanismo de extinção da fluorescência foi classificado como estático, havendo, portanto, formação de complexos entre o corante e o agregado proteico. Valores negativos da variação da energia livre de Gibbs padrão de formação de complexo indicaram que houve formação de complexo sendo regida, entálpica ou entropicamente dependendo da condição termodinâmica avaliada. Ainda na técnica de fluorescência, dados da constante de ligação (K_b) e da estequiometria de reação (n) foram obtidos e não apresentam grandes variações quando avaliados sob o efeito do pH. Para todos os pHs testados, os valores de K_b foram na ordem de 10^4 e reduziram com o aumento da temperatura. Em relação à estequiometria de formação de complexo (n), os resultados indicaram que houve interação entre o ligante e o agregado de proteína e que, para cada sítio de ligação da molécula de caseína micelar (no sítio do Trp ou próximo ao sítio do Trp), existe uma molécula de V40 ligada. Por outro lado, estudos sobre o efeito do pH mostraram que as cargas influenciaram nas forças de interação entre as moléculas do corante e o agregado de proteína. No pH do leite (pH = 6.6) assim como no pH = 9.0, o processo de formação de complexo foi entropicamente dirigido. Já no pH = 2.0 constatou-se que o processo de formação de complexo foi entálpicamente dirigido. Nos estudos de força iônica, os dados da constante de ligação nas concentrações de 0.5 e 1.0 mol.L⁻¹ de NaCl sugeriram

que quanto maior a força iônica, maior a interação do complexo. Medições no microcalorímetro de titulação isotérmica permitiram a determinação da variação da entalpia aparente de interação ($\Delta H_{\text{int-apar}}$) bem como, da variação da entalpia padrão de formação de complexo (ΔH). Considerando a mesma condição avaliada, pH = 6.6 e temperatura de 25 °C, o alto valor de ΔH° obtido por medições microcalorimétricas indicou que mudanças conformacionais no agregado proteico assim como, a entrada e saída de fosfato de cálcio de dentro da micela influenciam no ganho de energia e são fatores que devem ser considerados. Este trabalho fornece informações importantes, até então ausentes na literatura, a respeito da interação intermolecular entre o V40 e a caseína micelar, em diferentes condições termodinâmicas.

ABSTRACT

COSTA, Rafaela Teixeira Rodrigues do Vale, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2017. **Study of the intermolecular interaction between Allura Red and casein micelle.** Adviser: Ana Clarissa dos Santos Pires. Co-adviser: Luis Henrique Mendes da Silva.

The color of a food is a primary food quality feature responsible for attracting consumers of any age or group. Uniform distribution of dyes in food systems may be an indication of interactions and complex formation between this and one or more other molecules present in the food matrix. The present work aimed to study at molecular level the mechanisms involved in the interaction between Allura Red (AR) and casein micelle in different pH, temperature and ionic strength conditions. Sensitive and effective techniques such as fluorescence and isothermal titration microcalorimetry were used to investigate the interaction between the dye and the protein. Fluorescence results showed that the fluorescence intensity of casein micelle decreased as AR concentrations increased. For all the thermodynamic conditions evaluated, the fluorescence quenching mechanism was classified as static, therefore, complexes were formed between the dye and the protein. Negative values of the standard Gibbs free energy variation of complex formation indicated that there was complex formation being ruled, enthalpic or entropically depending on the thermodynamic condition evaluated. Still in the fluorescence technique, data of the binding constant (K_b) and reaction stoichiometry (n) were obtained and did not present great variations when evaluated under the effect of pH. For all pHs tested, K_b values were on the order of 10^4 and reduced with increasing temperature. In relation to the complex formation stoichiometry (n), the results indicated that there was interaction between the ligand and the protein aggregate and that, for each binding site of the micellar casein molecule (at the Trp site or near the Trp site), There is a bound V40 molecule. On the other hand, studies on the pH effect showed that the loads influenced the interaction forces between the dye molecules and the protein aggregate. At the pH of the milk (pH = 6.6) as well as at pH = 9.0, the complex formation process was entropically driven. Already at pH = 2.0 it was contacted that the process of complex formation was entalpicamente directed. In the ion-strength studies, the binding constant data at concentrations of 0.5 and 1.0 mol.L⁻¹ of NaCl suggested that the higher the ionic strength, the greater the interaction of the complex. Measurements in the isothermal titration microcalorimeter allowed the determination of the variation of the apparent enthalpy of interaction ($\Delta H_{int-apar}$) as

well as of the standard enthalpy change of complex formation (ΔH). Considering the same evaluated condition, pH = 6.6 and temperature of 25 °C, the high ΔH value obtained by microcalorimetric measurements indicated that conformational changes in the protein aggregate as well as, the entry and exit of calcium phosphate from within the micelle influence the Gain and are factors that should be considered. This work provides important information, hitherto lacking in the literature, on the intermolecular interaction between V40 and micellar casein under different thermodynamic conditions.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	3
2.1. Objetivo geral.....	3
2.2. Objetivos específicos.....	3
3. Revisão de literatura.....	4
3.1. Uso de corantes em alimentos.....	4
3.2. Vermelho 40.....	5
3.3. Proteínas do leite.....	7
3.3.1. Caseína micelar.....	9
3.4. Interações entre proteínas do leite e corantes alimentícios.....	11
3.4.1. Técnicas para estudos de interação intermolecular.....	12
4. Referência bibliográfica.....	16
HYDROPHOBIC FORCES DRIVE THE INTERACTION BETWEEN ALLURA RED AND CASEIN MICELLE	
1. Introduction.....	21
2. Material e methods.....	22
2.1. Preparation of the samples.....	22
2.1.1. Preparation of casein micelle dispersion.....	22
2.1.2. Preparation of the solution of Allura Red.....	23
2.2. Fluorescence spectroscopy experiment.....	23
2.3. Isothermal titration microcalorimetry experiments.....	24
3. Results and Discussion.....	24
3.1. Allura Red-casein micelle interaction studied by fluorescences spectroscopy.....	24
3.1.1. Effect of pH on the Allura Red-casein micelle interaction.....	29
3.1.2. Effect of ionic force on the Allura Red-casein micelle interaction.....	31
3.2. Microcalorimetric Analysis of Allura Red-casein micelle binding.....	34
4. Conclusion.....	36
5. References.....	37

1. INTRODUÇÃO

Características como alta estabilidade com relação à luz, oxigênio, pH e uniformidade de cor fazem do corante orgânico sintético, vermelho 40, um aditivo amplamente utilizado na indústria de alimentos.

Alimentos como sucos artificiais, bebidas lácteas, balas, confetes, coberturas, dentre outros podem apresentar em sua composição, moléculas de vermelho 40 que quando ingeridas em excesso, podem vir a desencadear hiperatividade, asma e reações alérgicas em crianças.

De acordo com dados da literatura, os grupos azo e os anéis aromáticos presentes na molécula desse corante são os responsáveis por causarem riscos à saúde bem como, por favorecem sua ligação com diferentes moléculas, por exemplo proteínas de transporte.

As caseínas micelares tratam-se de agregados proteicos presentes em maior proporção no leite, algo em torno de 80%, e que apresenta em sua composição frações de α S1, α S2, β , κ -caseína e nanoagregados de fosfato de cálcio.

Caseínas micelares são utilizadas para carrear minerais como cálcio, corantes como curcumina e demais substâncias que possuem em sua estrutura, grupos capazes de interagir com essa biomolécula.

Atualmente, não existe nenhum estudo que trate da interação entre o vermelho 40 e a caseína micelar. A utilização dessas moléculas de forma associada bem como, de forma isolada tem sido realizada de forma empírica.

O estudo da interação entre vermelho 40 e caseína micelar pretende trazer por meio de ensaios termodinâmicos, a compreensão do mecanismo de interação entre essas duas substâncias bem como, as melhores condições de formação de complexo. Assim, técnicas como espectroscopia de fluorescência e microcalorimetria de titulação isotérmica são importantes para a obtenção de parâmetros termodinâmicos de interação (K , n , ΔG° , ΔH° e ΔS°) que são fundamentais para explicar a interação entre o corante e o agregado proteico.

Desta forma, o estudo das interações intermoleculares trata-se de um estudo fundamental em que se pretende avaliar a formação de complexo bem como fornecer dados que otimizem o uso deste corante não apenas em formulações alimentares mas também, em diferentes ocasiões como a extração de moléculas de vermelho 40 em águas residuais utilizando a caseína micelar como veículo.

Para tanto, é necessários identificar o comportamento da caseína micelar como carreadora desse composto e definir as melhores condições termodinâmicas para que eles sejam veiculados.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Estudar a interação intermolecular entre a caseína micelar e o corante vermelho 40 nas temperaturas de 20, 25, 35, 45 e 55 °C.

2.1. Objetivos específicos

- Determinar a constante de interação (K_b), a estequiometria da formação do complexo (n), a variação da entalpia (ΔH°), a variação da energia livre de Gibbs (ΔG°) e a variação da entropia (ΔS°) padrão de formação do complexo formado entre caseína micelar-corante;
- Avaliar o efeito do pH nos parâmetros termodinâmicos da interação caseína micelar-vermelho 40;
- Avaliar o efeito da força iônica nos parâmetros termodinâmicos da interação caseína micelar-vermelho 40;
- Comparar os parâmetros termodinâmicos da interação caseína-vermelho 40 obtidos pelas técnicas de espectroscopia de fluorescência e microcalorimetria de titulação isotérmica.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Uso de corantes em alimentos

Ao mesmo tempo em que consumidores procuram por alimentos seguros, nutritivos e saudáveis (WILSON et al., 2016), a cor dos alimentos é uma das características sensoriais mais importantes que afeta diretamente na aceitação e na seleção de determinados alimentos em detrimento a outros.

Alterações na cor dos alimentos podem ser diretamente influenciadas por condições externas, tais como intensidade luminosa, presença ou ausência de ar, temperatura, umidade, armazenamento, dentre outros. Assim, a utilização de corantes alimentares tem como objetivos compensar/superar características desagradáveis que podem surgir em decorrência a esses fatores bem como auxiliar na homogeneização da cor por meio da correção de variações de cor e/ou melhoria das cores que ocorrem naturalmente nos alimentos (MARTINS et al., 2016).

Em alimentos pode-se empregar tanto corantes orgânicos sintéticos como corantes naturais. De forma geral, os corantes naturais podem ser derivados de várias matérias-primas alimentares e/ou biologicamente ativas, como fungos ou insetos. Já os corantes sintéticos, embora sejam produzidos por síntese química, não podem ser encontrados naturalmente (AMCHOVA; KOTOLOVA; RUDA-KUCEROVA, 2015).

De acordo com Resolução nº 44 de 1977 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), corantes orgânicos sintéticos são definidos como aqueles que podem ser obtidos por síntese orgânica mediante o emprego de processo tecnológico adequado.

Ao contrário da maioria dos corantes naturais, os corantes sintéticos apresentam alta estabilidade com relação à luz, oxigênio e pH, uniformidade de cor, baixa contaminação microbiológica e baixo custo de produção. Tratam-se de compostos orgânicos que apresentam estrutura química contendo ligações duplas alternadas com ligações simples, anéis aromáticos simples ou conjugados e compostos azo (DE ARAÚJO et al., 2015).

Os compostos azo compreendem a maior classe de corantes alimentares sintéticos que são amplamente utilizados na indústria de alimentos e que se caracterizam pela presença de um ou mais grupamentos $-N=N-$ ligados a grupos aromáticos. Como exemplo de corantes pertencentes a este grupo (Figura 1) pode-se citar a tartrazina

(INS102), a carmosina/azorubina (INS122), o amarelo de quinoleína (INS104) e o vermelho allura/vermelho 40 (V40, INS129) (BASU; KUMAR, 2015).

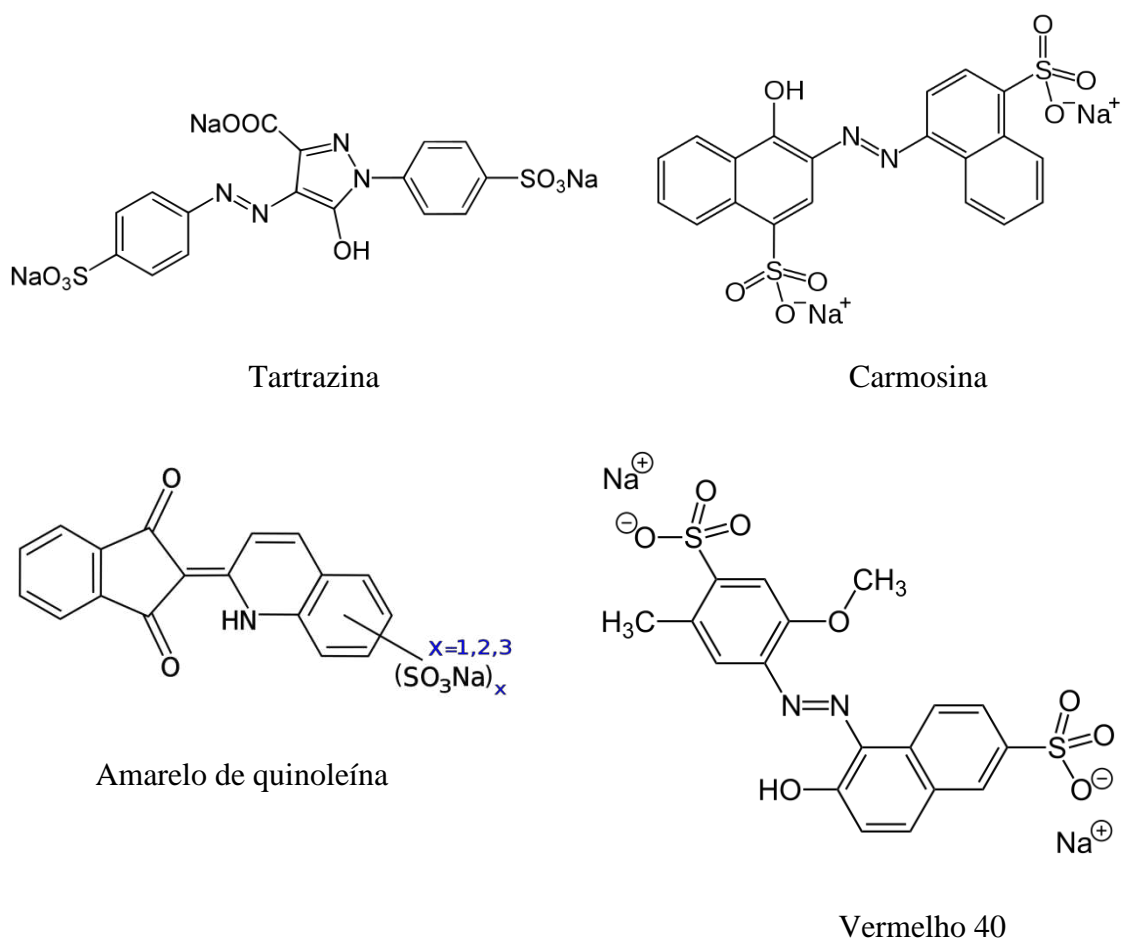


Figura 1. Estrutura química de alguns corantes alimentares sintéticos. Fonte: MASONE; CHANFORAN, 2015, com adaptações.

3.2. Vermelho 40

O Vermelho 40 (V40, INS129) é um corante azo vermelho artificial também referenciado como: Food Red 17, CI 16035 e FD&C Red n°40. Trata-se de um corante que é pertencente à classe monoazo aniônico solúvel em água (22 g/mL), pKa = 11.4 e amplamente utilizado na indústria de alimentos (ESMAEILI et al., 2016), principalmente na produção de balas, confeitos, bebidas, compostos lácteos, dentre outros.

Segundo estudos reportado por Esmaeili et al. (2016), a utilização do vermelho 40 foi introduzida no início de 1980 para substituir o amaranto, um corante proibido

pelo Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos durante esse período.

Na primeira avaliação de segurança, a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) juntamente com o Comitê Conjunto de Especialistas da OMS sobre Aditivos Alimentares, sugeriram que a ingestão diária aceitável do vermelho 40 fosse de $7 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de peso corporal (BORZELLECA; OLSON; RENO, 1991). No entanto, estudos mostram a existência de riscos a saúde que conseqüentemente influenciam na utilização desse corante em diversas regiões do mundo.

Em países como EUA, Japão, Europa e Brasil, a utilização do vermelho 40 é permitida (HONMA, 2015). No entanto, na Europa, mesmo que desde 2008 o Regulamento (CE) n° 1333/2008 determine que todas as embalagens de alimentos adicionados com vermelho 40 apresentem a seguinte informação "pode ter um efeito adverso sobre a atividade e atenção em crianças", a ingestão desse corante de acordo com Abramsson-zetterberg e Ilbäck (2013), não é recomendada para crianças pois pode causar hiperatividade.

No Brasil, embora a utilização do vermelho 40 seja aceita em diferentes alimentos devido a sua alta estabilidade (ESMAEILI et al., 2016), seu uso é limitado (Tabela 1).

Tabela 1. Concentração máxima permitida de vermelho 40 em alimentos.

Alimento	Concentração máxima (g/100 g) no produto final	Fonte
Bala		
Confeito		
Goma de mascar	0,030	Resolução n° 387, de 05 de agosto de 1999.
Cobertura e/ou xarope para o preparo de recheio		
Bebida láctea	0,005	Instrução Normativa n° 28, de 12 de

junho de 2007.		
Composto lácteo	0,033	Instrução Normativa nº 16, de 23 de agosto de 2005.
Sobremesas de Gelatina Pudins e flans	0,015	Resolução nº 388, de 5 de agosto de 1999.
Iogurte Leite fermentado	0,005	Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007.
Preparo para refrescos e refrigerantes	0,010	Resolução nº 389, de 5 de agosto de 1999

Vale ressaltar que mesmo em meio a uma ampla aplicação, o risco que esse corante pode vir a causar a saúde devido à presença de seus grupos azo e dos anéis aromáticos, não pode ser negligenciado (YU et al., 2016).

De acordo Pourreza; Rastegarzadeh e Larki (2011), a utilização em excesso do corante vermelho 40 pode vir a causar efeitos tóxicos, alérgicos e hiperatividade em crianças. Desta forma, levando em consideração que a molécula de vermelho 40 possui grupos que são capazes de ocasionar riscos a saúde bem como, de interagir com outras moléculas, como por exemplo, proteínas (WANG, 2014; WU *et al.*, 2015; LELIS *et al.*, 2017), torna-se necessário compreender como este corante interage com proteínas de transporte, como as caseínas, para posteriormente compreender seu efeito associado.

3.3. Proteínas do leite

O leite é um sistema coloidal constituído de uma fase contínua, que é uma solução de água, lactose, sais minerais, vitaminas hidrossolúveis e várias fases dispersas, como glóbulos de gordura, micelas de caseína e proteínas do soro (GONZÁLEZ; DÜRR; FONTANELI, 2001). O leite constitui uma importante fonte de nutrição para animais e para seres humanos de todas as idades, bem como, de uma importante matéria-prima para a produção de diferentes alimentos.

Embora a composição do leite seja variável entre os ruminantes e não ruminantes, as diferentes variantes de reprodução das mesmas espécies e de animais individuais também podem contribuir para tal questão. No geral, cerca de 87,3% do leite corresponde a fração de água, 3,5% a fração de proteína e 9,2% representa as demais frações, (Tabela 2).

Tabela 2. Principais constituintes do leite bovino

Constituintes	Frações do leite, % (m/v)
Água	87,3
Lipídeos	3,7
Lactose	4,8
Proteínas	3,5 (2,9* e 0,6**)
Cinzas	0,7

*caseína; ** lactoalbumina + globulinas.

Fonte: GONZÁLEZ; DÜRR; FONTANELI, 2001, com adaptações.

Com relação às proteínas do leite, as mesmas apresentam dois tipos de partículas coloidais (Tabela 3). Uma delas é representada pelas caseínas que possuem estruturas desordenadas e a outra, pelas proteínas de soro de leite que apresentam estruturas globulares (ANDOYO et al., 2015).

Tabela 3. Principais proteínas do leite de vaca.

Proteínas do leite	Concentração (g/L)	Concentração (%)
CASEÍNAS	24-28	82,3
α S1 e α S2	12-15	41,5
β	9-11	30,8
κ-caseína	3-4	10,0
PROTEÍNAS DO SORO	5-7	16,6

β -lactoglobulina	2-4	9,2
α -lactoglobulina	1-1,5	3,8
Albumina sérica	0,1-0,4	0,8
Imunoglobulinas	0,6-1,0	2,5
Lactoferrina	~ 0,1	0,3
PROTEÍNA DA MEMBRANA DOS GLÓBULOS DE GORDURA	~0,4	1,2
Total de proteína do leite	30-35	100

Fonte: Citado por BRASIL (2013), com adaptações.

3.3.1 Caseína Micelar

As caseínas, grupo de fosfoproteínas insolúveis em ácidos específicos (FOX; BRODKORB, 2008), são o principal componente proteico do leite de vaca e divide-se em quatro diferentes tipos: α S1, α S2, β e κ -caseína, (Tabela 4).

Tabela 4. Tipos de caseína e suas principais características individuais.

Características	Tipo de caseína			
	α S1	α S2	β -caseína	κ -caseína
Conformação nativa	Estrutura aberta	Estrutura aberta	Estrutura aberta	Estrutura aberta
Quantidade no leite (%)	1,2 – 1,5	0,3 – 0,4	0,9 – 1,1	0,3 – 0,4
Número de resíduo de aminoácido	199	207	209	169
Peso molecular	~ 23000	~ 25000	~ 24000	~19000
Localização no leite a temperatura ambiente	Micela	Micela	Micela	Superfície da micela
Número de resíduos de prolina	17	10	34 – 35	20
Número de grupos fosfato	8	10 -13	5	1

Número de resíduos de cisteína	0	2	0	2
Número de grupos SS	0	1	0	1
Número de grupos SH	0	0	0	0
	(-21)	(-12,2)	(-11,8)	(-2,0)
Carga calculada a pH 6,6 (mV)	–	–	–	–
	(-23,5)	(-17,1)	(-13,8)	(-3,0)

Fonte: Citado por RANADHEERA et al., 2016.

De acordo com Horne (2006), caseínas α S1, α S2, β são fosfoproteínas sensíveis ao cálcio e as κ -caseína são fosfoproteínas insensíveis ao cálcio e, portanto, responsável pela estabilidade da micela de caseína.

As micelas de caseína, Figura 2, apresentam tamanho médio de 50-300 nm de diâmetros (DE SOUZA et al., 2016) e são formadas por agregados de caseína cujo tamanho é limitado pela presença da κ -caseína, estrutura polietrólita presente na superfície da micela e que contribui com repulsões estéricas e eletrostáticas (GONZALEZ-JORDAN et al., 2015).

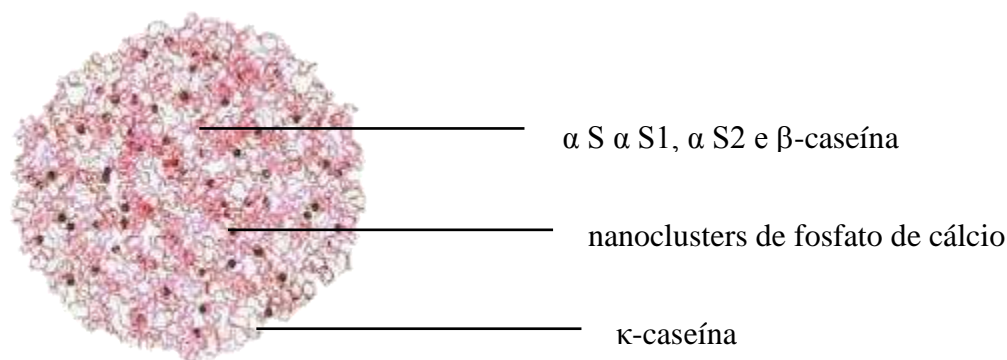


Figura 2. Estrutura da micela de caseína.

Fonte: KOOSHKKA et al., 2013.

A estrutura interna de uma micela de caseína além de ser constituída por submicelas também é composta por uma matriz proteica na qual nano partículas de fosfato de cálcio coloidal (CCP) ou nanoclusters, nanoagregados, de fosfato de cálcio, com raio de aproximadamente 2 nm, estão dispersos a uma distância média de 18,6 nm (DE

KRUIF et al., 2012) e são responsáveis por manter as frações em conjunto (HORNE, 2006).

As micelas de caseína assim como estruturas proteicas não agregadas podem ser encontradas no leite e são alvo de estudos em que sua interação é relacionada, por exemplo, com o corante vermelho 40. Em estudos realizados por Lelis *et al.* (2017), em pH fisiológico, o vermelho 40 pode interagir com a albumina do soro bovino (BSA) e conseqüentemente, influenciar no transporte dessa proteína no sangue, assim como na eliminação do corante pelo organismo.

Desta forma, considerando que a caseína micelar é um agregado de proteína de transporte, o estudo de sua interação com o vermelho 40 também pode ser estabelecido a fim de investigar os mecanismos moleculares que estão envolvidos na interação bem como, tentar entender o comportamento de interação existente entre eles.

3.4 Interação entre proteínas do leite e corantes alimentícios

Os parâmetros de interação entre proteína-corante podem ser determinados por meio de técnicas como espectroscopia de fluorescência, microcalorimetria de titulação isotérmica, medida de tamanho e potencial zeta.

Variáveis termodinâmicas como variação da energia livre de Gibbs padrão (ΔG°), variação da entalpia padrão (ΔH°) e variação da entropia padrão (ΔS°) de formação de complexo são de grande importância para a compreensão do mecanismo de interação (GUERIN et al., 2016).

Valores de ΔG° negativo indicam que o equilíbrio reacional é direcionado para formação de complexos. No entanto, a variação da energia livre de Gibbs padrão apresenta duas componentes sendo uma delas a entrópica (ΔS°) e a outra a entálpica (ΔH°). Valores de ΔH° indicam se o processo de formação de complexo é endotérmico ou exotérmico. Assim, valores de ΔH° positivo e redução da temperatura podem dificultar a interação proteína-corante.

Wang; Zhang and Wang (2014), ao investigarem parâmetros termodinâmicos de interação entre BSA-vermelho 40 utilizando as técnicas de UV-vis, fluorescência e de espectroscopia de dicroísmo circular concluíram que os valores de ΔH° e ΔS° sugerem que a formação do complexo na condição de pH 7,4 foi impulsionada entropicamente e entálpicamente pela ocorrência de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas.

Considerando a força de interação, bem como a concentração de corante na forma livre e complexada, o valor da constante de interação (K_b) se faz importante.

Visando a utilização da caseína micelar como veículo para extrair vermelho 40 de uma água residuária ou, pensando em uma aplicação direta em alimentos, o valor da estequiometria de reação (n) fornece dados sobre a quantidade de moléculas de vermelho 40 que se pode ligar em cada sítio. Assim, o mecanismo de interação pode ser planejado de forma a extrair o máximo de moléculas de vermelho 40 ou de forma a adicionar apenas quantidades específicas do corante que se liguem a proteína, sem que haja excessos e gastos desnecessários.

Estudos realizados por Lelis et al. (2017), ao avaliarem a interação entre BSA-vermelho 40 em diferentes temperaturas (15, 25, 35, 45 e 55 °C) demonstraram que independente da temperatura, a estequiometria de formação de complexo (n) é na ordem de 1:1, o que indica que para cada sítio de ligação disponível na BSA existe na molécula do vermelho 40.

Desta forma, cada técnica proposta nesse projeto tem como objetivo a compreensão do mecanismo de interação bem como das melhores condições de temperatura e pH para a formação de complexos entre caseína micelar-vermelho 40.

3.4.1. Técnicas para estudos de interação intermolecular

A espectroscopia de fluorescência trata-se de uma técnica muito utilizada para o estudo de interações intermoleculares. De acordo com Lakowicz (2006), resíduos de aminoácidos como fenilalanina, tirosina e triptofano são encontrados em diferentes proteínas e ao serem excitados, emitem fluorescência.

Estudos realizados por Stroylova et al. (2011) mostraram que para o caso específico das caseínas micelares tem-se a presença de duas moléculas de triptofano nas frações $\alpha S1$ e $\alpha S2$, uma molécula de triptofano nas frações β e κ -caseína, respectivamente.

Assim, agregados de caseína micelar ao serem excitadas, emitem fluorescência principalmente, devido à presença de triptofano. No entanto, a emissão de fluorescência pode ocorrer de maneira diferente quando as proteínas interagem com algum tipo de ligante, como por exemplo, o corante.

Quando uma proteína interage com um ligante, seja por formação de complexo ou por colisões, a fluorescência da molécula de proteína pode ser totalmente suprimida e

consequentemente, sua intensidade de fluorescência reduzida pelo mecanismo de supressão estático ou dinâmico (LIU et al., 2014).

Em casos de supressão dinâmica, os fluoróforos (triptofano) ao absorverem energia são elevados ao estado excitado onde colidem com o ligante (quencher ou supressor) e transferem sua energia absorvida retornando ao estado fundamental, sem emitir fluorescência. Por outro lado, quando um fluoróforo forma um complexo com o supressor no estado fundamental, ocorre à supressão estática (LAKOWICZ, 2006).

À medida que complexos entre proteína-ligante vão sendo formados, a intensidade da fluorescência tende a decrescer em virtude da menor disponibilidade de proteína livre.

Estudos como o realizado por Guerin et al. (2016), ao trabalharem com a interação entre peptídeos e sais biliares, bem como os realizado por Wu et al. (2015) ao avaliarem a formação de complexo entre a albumina do soro bovino e o vermelho 40, mostraram claramente a extinção da fluorescência a medida em que se aumenta a concentração do ligante e, consequentemente, a formação de complexos que resultam em uma menor disponibilidade de proteína na forma livre.

A redução da intensidade de fluorescência, assim como o tipo de supressão existente na interação, podem ser descritos pela equação de Stern-Volmer, Equação (1).

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q] = 1 + K_q\tau_0[Q] \quad (1)$$

Em que, F_0 e F correspondem às intensidades de fluorescência da proteína na ausência e na presença do supressor, respectivamente; K_{SV} é a constante de supressão de Stern-Volmer, $[Q]$ é a concentração do agente de extinção da fluorescência, k_q é a constante da taxa de supressão e, τ_0 é o tempo de meia-vida da biomolécula na ausência do supressor (cerca de 10^{-8} s para proteínas).

A relação entre F_0/F e $[Q]$ deve ser considerada linear. A constante de supressão de Stern-Volmer (K_{SV}) corresponde à inclinação da reta obtida e está diretamente relacionada com o tempo de meia-vida do fluoróforo.

Uma forma de determinar o tipo de supressão, estática ou dinâmica, é avaliar o valor da constante da taxa de supressão (k_q). Para supressão dinâmica, o valor máximo da constante de taxa de supressão é de $2,0 \times 10^{10} \text{ L.mol}^{-1}\text{s}^{-1}$. Valores superiores a esse

sugerem que a natureza da supressão é estática, indicando a formação de complexos (LI et al., 2016).

Uma vez comprovada a formação de complexos, por exemplo, entre proteína-corante, os dados obtidos pela equação 1 podem ser utilizados como base para calcular a constante de ligação (K_a) e a estequiometria de formação de complexos (n), conforme expresso na Equação (2).

$$\log\left(\frac{F_0 - F}{F}\right) = \log K_a + n \log[Q] \quad (2)$$

Ao obter a constante de ligação K_b expressa pela equação 2, uma relação direta pode ser feita para a obtenção da variação da energia livre de Gibbs padrão (ΔG°) de formação do complexo, Equação (3).

$$\Delta G^\circ = -RT \ln k_b \quad (3)$$

Sendo R a constante universal dos gases ($R = 8,3145 \text{ J/mol.K}$) e T a temperatura em Kelvin (K).

Valor negativo para a energia livre de Gibbs padrão indica que o equilíbrio é direcionado para a formação de complexo e que os demais parâmetros termodinâmicos podem ser encontrados e relacionados de forma direta com a presença de complexos, proteína-ligante (REZENDE et al., 2017).

A entalpia padrão de formação do complexo (ΔH°) pode ser determinada a partir de diferentes constantes de ligação (K_a) calculadas em distintas temperaturas.

Ao fazer um gráfico de $\ln K_a$ versus $1/T$, a inclinação será o valor de $-\Delta H^\circ/R$. Como o R é uma constante conhecida, é possível calcular o valor de ΔH° levando-se em consideração a aproximação de Van't Hoff, Equação (4).

$$\ln\left(\frac{k_1}{k_2}\right) = -\frac{\Delta H^\circ}{R}\left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1}\right) \quad (4)$$

A partir da entalpia padrão de formação do complexo assim como da variação da energia livre de Gibbs padrão, a componente entrópica ($T\Delta S^\circ$) que também rege o processo de formação do complexo pode ser calculada pela equação fundamental de Gibbs, Equação (5).

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (5)$$

Outra técnica que pode ser utilizada para avaliar a formação de complexos é a microcalorimetria de titulação isotérmica (IT μ C). Neste caso, o instrumento é capaz de fornecer de forma rápida, sensível e em apenas uma única análise, todos os parâmetros termodinâmicos que podem estar associados a uma possível formação de complexos, por exemplo entre proteína-corante (BERNACZEK et al., 2016).

Na IT μ C, o perfil termodinâmico de interação molecular é estabelecido levando-se em consideração a condição isotérmica. Assim, a técnica permite determinar de maneira simultânea a variação de entalpia padrão de formação de complexo (ΔH°) e a constante de interação (K_b). A partir do valor de K_b é possível determinar a estequiometria de reação (n) bem como, as mudanças da energia livre de Gibbs padrão de formação de complexo (ΔG°) e, mudança de entropia padrão de formação de complexo (ΔS°) conforme mostrado pelas Equações (3) e (5), respectivamente (BHARMORIA; KUMAR, 2016; BOU-ABDALLAH, 2016).

Vale destacar que neste tipo técnica, a condição isotérmica em que os processos termodinâmicos ocorrem (XU; YU; SHENG, 2016), contribuem para que a variação de entalpia do sistema seja numericamente igual à quantidade de energia transferida na forma de calor entre sistema e vizinhança, Equação (6).

$$\int_{u_i}^{u_f} dU = \int dq - \int_{v_i}^{v_f} pdV$$

$$\Delta U = q - P(V_f - V_i)$$

$$U_f - U_i = q - P_{int}(V_f - V_i)$$

$$(U_f + PV_f) - (U_i + PV_i) = q$$

$$H_f - H_i = q$$

$$\Delta H = q \quad (6)$$

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMSSON-ZETTERBERG, L.; ILBÄCK, N. G. The synthetic food colouring agent Allura Red AC (E129) is not genotoxic in a flow cytometry-based micronucleus assay in vivo. **Food and Chemical Toxicology**, v. 59, p. 86–89, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2013.05.047>>.
- AMCHOVA, P.; KOTOLOVA, H.; RUDA-KUCEROVA, J. Health safety issues of synthetic food colorants. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 73, n. 3, p. 914–922, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.09.026>>.
- ANDOYO, R.; GUYOMARC'H, F.; BUREL, A.; FAMELART, M.-H. Spatial arrangement of casein micelles and whey protein aggregate in acid gels: Insight on mechanisms. **Food Hydrocolloids**, v. 51, p. 118–128, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X15001964>>.
- BASU, A.; KUMAR, G. S. Binding of carmoisine , a food colorant , with hemoglobin : Spectroscopic and calorimetric studies. **FRIN**, v. 72, p. 54–61, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.03.015>>.
- BERNACZEK, K.; MIELAŃCZYK, A.; GRZYWNA, Z. J.; NEUGEBAUER, D. Interactions between fluorescein isothiocyanate and star-shaped polymer carriers studied by isothermal titration calorimetry (ITC). **Thermochimica Acta**, v. 641, p. 8–13, 2016.
- BHARMORIA, P.; KUMAR, A. Thermodynamic investigations of protein's behaviour with ionic liquids in aqueous medium studied by isothermal titration calorimetry. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1860, n. 5, p. 1017–1025, 2016.
- BI, H.; TANG, L.; GAO, X.; JIA, J.; LV, H. Spectroscopic analysis on the binding interaction between tetracycline hydrochloride and bovine proteins β -casein, α -lactalbumin. **Journal of Luminescence**, v. 178, p. 72–83, 2016.
- BORZELLECA, J. F.; OLSON, J. W.; RENO, F. E. Lifetime Toxicity Carcinogenicity Studies of Fd and C-Red No-40 (Allura-Red) in Mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 29, n. 5, p. 313–319, 1991.
- BOU-ABDALLAH, F. Microcalorimetry in the BioSciences—Principles and applications. **BBA - General Subjects**, v. 1860, p. 859–860, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.02.004>>. Acesso em: 19 out. 2016.
- BRASIL, R. B. Estrutura e estabilidade das micelas de caseína do leite bovino. p. 18,

2013.

DE ARAÚJO, W.; BENTO, S.; LIMA, B. P.; PAULA, A.; PAIM, S. Simultaneous determination of synthetic colorants in yogurt by HPLC. **Food Chemistry**, v. 183, p. 154–160, 2015.

DE KRUIF, C. G.; HUPPERTZ, T.; URBAN, V. S.; PETUKHOV, A. V. Casein micelles and their internal structure. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 171-172, p. 36–52, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2012.01.002>>.

DE SOUZA, L. C.; DE PAULA REZENDE, J.; PIRES, A. C. dos S.; DA SILVA, L. H. M.; DA SILVA, M. do C. H.; CASTRILLON, E. D. C.; DE ANDRADE, N. J.

Polydiacetylene/triblock copolymer nanoblend applied as a sensor for micellar casein: A thermodynamic approach. **Food Chemistry**, v. 197, p. 841–847, 2016.

ESMAEILI, S.; ASHRAFI-KOOSHK, M. R.; KHALEDIAN, K.; ADIBI, H.; ROUHANI, S.; KHODARAHMI, R. Degradation products of the artificial azo dye, Allura red, inhibit esterase activity of carbonic anhydrase II: A basic in vitro study on the food safety of the colorant in terms of enzyme inhibition. **Food Chemistry**, v. 213, p. 494–504, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.078>>.

FOX, P. F.; BRODKORB, A. The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 7, p. 677–684, 2008.

GONZÁLEZ, F.; DÜRR, J. W.; FONTANELI, R. S. Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras. **Uso do Leite para Monitorar a Nutrição e o Metabolismo de Vacas Leiteiras**, v. 44, n. 4, p. 72, 2001.

GONZALEZ-JORDAN, A.; THOMAR, P.; NICOLAI, T.; DITTMER, J. The effect of pH on the structure and phosphate mobility of casein micelles in aqueous solution.

Food Hydrocolloids, v. 51, p. 88–94, 2015. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.04.024>>.

GUERIN, J.; KRIZNIK, A.; RAMALANJAONA, N.; LE ROUX, Y.; GIRARDET, J.-M. Interaction between dietary bioactive peptides of short length and bile salts in submicellar or micellar state. **Food Chemistry**, v. 209, p. 114–122, 2016.

HONMA, M. Evaluation of the in vivo genotoxicity of Allura Red AC (Food Red No. 40). **Food and Chemical Toxicology**, v. 84, p. 270–275, 2015. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2015.09.007>>.

HORNE, D. S.; HORNE, D. S. Casein micelle structure: Models and muddles. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 11, n. 2-3, p. 148–153, 2006. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359029405001196>>.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. [s.l: s.n.]

LELIS, C. A.; HUDSON, E. A.; FERREIRA, G. M. D.; FERREIRA, G. M. D.; DA SILVA, L. H. M.; DA SILVA, M. do C. H.; PINTO, M. S.; PIRES, A. C. dos S. Binding thermodynamics of synthetic dye Allura Red with bovine serum albumin. **Food Chemistry**, v. 217, p. 52–58, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.080>>.

LI, T.; CHENG, Z.; CAO, L.; JIANG, X. Comparison of interactions between three food colorants and BSA. **Food Chemistry**, v. 194, p. 740–748, 2016.

LIU, X.; XIA, W.; JIANG, Q.; XU, Y.; YU, P. Binding of a novel bacteriostatic agent??chitosan oligosaccharides??kojic acid graft copolymer to bovine serum albumin: spectroscopic and conformation investigations. **European Food Research and Technology**, v. 240, n. 1, p. 109–118, 2014.

MARTINS, N.; RORIZ, C. L.; MORALES, P.; BARROS, L.; FERREIRA, I. C. F. R. Food colorants: Challenges, opportunities and current desires of agro-industries to ensure consumer expectations and regulatory practices. **Trends in Food Science & Technology**, v. 52, p. 1–15, 2016.

MASONE, D.; CHANFORAN, C. Study on the interaction of artificial and natural food colorants with human serum albumin : A computational point of view. **Computational Biology and Chemistry**, v. 56, p. 152–158, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2015.04.006>>.

POURREZA, N.; RASTEGARZADEH, S.; LARKI, A. Determination of Allura red in food samples after cloud point extraction using mixed micelles. **Food Chemistry**, v. 126, n. 3, p. 1465–1469, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.158>>.

RANADHEERA, C. S.; LIYANAARACHCHI, W. S.; CHANDRAPALA, J.; DISSANAYAKE, M.; VASILJEVIC, T. Utilizing unique properties of caseins and the casein micelle for delivery of sensitive food ingredients and bioactives. **Trends in Food Science & Technology**, v. 57, p. 178–187, 2016.

REZENDE, J. de P.; FERREIRA, G. M. D.; FERREIRA, G. M. D.; DA SILVA, L. H. M.; DO CARMO HEPANHOL DA SILVA, M.; PINTO, M. S.; PIRES, A. C. dos S. Polydiacetylene/triblock copolymer nanosensor for the detection of native and free bovine serum albumin. **Materials Science and Engineering: C**, v. 70, p. 535–543, 2017.

STROYLOVA, Y. Y.; ZIMNY, J.; YOUSEFI, R.; CHOBERT, J.-M.; JAKUBOWSKI,

H.; MURONETZ, V. I.; HAERTLÉ, T. Aggregation and structural changes of α S1-, β - and κ -caseins induced by homocysteinylation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1814, n. 10, p. 1234–1245, 2011.

WANG, L.; ZHANG, G.; WANG, Y. Binding properties of food colorant allura red with human serum albumin in vitro. **Molecular Biology Reports**, v. 41, n. 5, p. 3381–3391, 6 maio 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11033-014-3200-z>>. Acesso em: 30 nov. 2016.

WANG, W.; DING, X.; XU, Q.; WANG, J.; WANG, L.; LOU, X. Zeta-potential data reliability of gold nanoparticle biomolecular conjugates and its application in sensitive quantification of surface absorbed protein. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 148, p. 541–548, 2016.

WILSON, A. L.; BUCKLEY, E.; BUCKLEY, J. D.; BOGOMOLOVA, S. Nudging healthier food and beverage choices through salience and priming. Evidence from a systematic review. **Food Quality and Preference**, v. 51, p. 47–64, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodqual.2016.02.009>>.

WU, D.; YAN, J.; WANG, J.; WANG, Q.; LI, H. Characterisation of interaction between food colourant allura red AC and human serum albumin: Multispectroscopic analyses and docking simulations. **Food Chemistry**, v. 170, p. 423–429, 2015.

XU, J.; YU, H.-Q.; SHENG, G.-P. Kinetics and thermodynamics of interaction between sulfonamide antibiotics and humic acids: Surface plasmon resonance and isothermal titration microcalorimetry analysis. **Journal of Hazardous Materials**, v. 302, p. 262–266, 2016.

YAZDI, S. R.; CORREDIG, M. Heating of milk alters the binding of curcumin to casein micelles. A fluorescence spectroscopy study. **Food Chemistry**, v. 132, p. 1143–1149, 2012.

YU, L.; SHI, M.; YUE, X.; QU, L. Detection of allura red based on the composite of poly (diallyldimethylammonium chloride) functionalized graphene and nickel nanoparticles modified electrode. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 225, p. 398–404, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2015.11.061>>.

1 **Hydrophobic forces drive the interaction between Allura Red and casein micelle**

2

3 **Abstract:** The interaction between Allura Red (AR) and casein micelle was studied in
4 different pH conditions (2.0, 6.6 and 9.0), temperatures (293.15 to 328.15 K) and NaCl
5 concentrations (0.01 to 1.0 mol.L⁻¹). Fluorescence spectra showed that the fluorescence
6 intensity of casein micelle decreased as the concentration of AR increased. The
7 mechanism of extinction of fluorescence that prevailed was the static one where there
8 was formation of complex driven by enthalpic or entropic contributions, depending on
9 the thermodynamic condition studied. For all the conditions analyzed, the Gibbs free
10 energy values of complex formation were negative, indicating complex formation
11 between the AR and the casein micelle. Still in the fluorescence technique, the values of
12 the binding constant (K_b) and reaction stoichiometry (n) were obtained and did not
13 present great variations when evaluated under the effect of pH. On the other hand, the
14 pH effect influenced the interaction forces between the dye molecules and the protein
15 aggregate. For the ionic strength studies, the binding constant data at the concentrations
16 of 0.5 and 1.0 mol.L⁻¹ of NaCl indicated that the higher the ionic strength, the greater
17 the interaction of the complex. Measurements in the microcalorimeter of isothermal
18 titration (μ ITC) were fundamental and showed that the energy gain is not only
19 associated with complex formation but also, to conformational changes in the protein
20 aggregate as well as, the entrance and exit of calcium phosphate from inside the
21 Micelle. This work provides important information, hitherto lacking in the literature, on
22 the intermolecular interaction between Allura Red and micellar casein.

23

24 **Keywords:** Allura Red; casein micelle; Intermolecular interaction; fluorescence;
25 microcalorimetry.

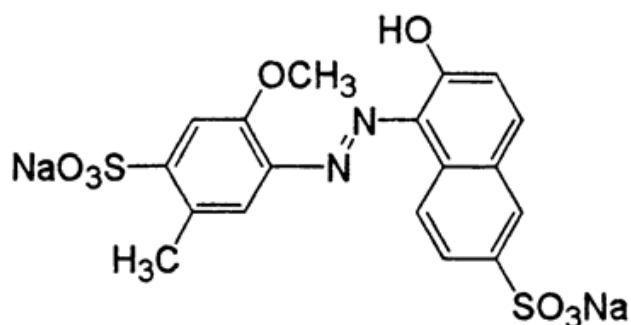
26

27 **1. Introduction**

28 Synthetic dyes are often applied as additives for many foods including dairy
29 products (Bermúdez-Aguirre, Yáñez, Dunne, Davies, & Barbosa-Cánovas, 2010; Wu,
30 Yan, Wang, Wang, & Li, 2015). However, the safety of them has been questioned if
31 they are excessively consumed, especially for children (Pourreza, Rastegarzadeh, &
32 Larki, 2011).

33 Allura Red (E129, Figure 1) is one of most used azo-colorants, because it
34 provides intense and fascinating red color to different types of foods (Lelis et al., 2017).
35 It is approved by Food and Drug Administration (FDA) and is listed for use as in foods
36 since 1971, with Acceptable Daily Intake (ADI) of, at maximum, 7 mg/kg body weight
37 (bw) per day (FDA). However, the intake of Allura Red above this level has been
38 related to behavioural (Abramsson-Zetterberg & Ilbäck, 2013), toxic and carcinogenic
39 (Bastaki, Farrell, Bhusari, Pant, & Kulkarni, 2017) effects to humans.

40



41

42

43 Figure 1 – Chemical structure of Allura Red.

44 The association between Allura Red and proteins such as serum albumins is well
45 known and it is important because this interaction may affect the chemical absorption,
46 distribution and transportation of this artificial synthetic colorant in body (Lelis et al.,
47 2017; L. Wang, Zhang, & Wang, 2014; Wu et al., 2015). Umer Abdullah et al. (2008)
48 found that Allura Red bonded to different proteins, such as including peanut, rice bran,
49 garlic proteins and BSA at different pHs and temperatures, showing a minimum effect
50 on the proteins digestibility. In addition, the interaction between synthetic colorants and
51 proteins is also known to decreasing the toxicity of these molecules (Saeed et al., 2011;
52 Wu et al., 2015).

53 Casein micelles are complex nanoaggregates present in high concentration in
54 milk (Zhao & Corredig, 2016) and dairy products. Each casein micelle contains about
55 10.000 casein molecules, which could bind to different small molecules (Horne, 2017),
56 such as food colorants. Nevertheless, to the best of our knowledge, there is no
57 thermodynamic data on Allura Red-casein micelle binding. These data may be helpful
58 for understanding the mechanism of small molecules-casein binding, as well as
59 technological application of synthetic colorants in dairy food.

60 Thus, our work investigated the thermodynamic of Allura Red-casein micelle
61 binding at different pHs and ionic force, by fluorescence and microcalorimetric
62 techniques.

63

64 **2. Material and Methods**

65 **2.1. Preparation of the samples**

66 *2.1.1 Preparation of casein micelle dispersion*

67 Initially, casein micelle samples were obtained by the Sahu centrifugation
68 method; Kasoju and Bora (2008). To obtain micellar casein, 200 mL of skim milk was

69 centrifuged at $25.000 \times g$ for 30 minutes and at the temperature of 293.15 K. After this
70 procedure, a supernatant and a pellet were obtained. The pellet containing the casein
71 was redispersed in sodium phosphate buffer (0.1 M and pH 7.4) containing 10 mM
72 CaCl_2 . The redispersion process occurred 5 times to remove whey proteins that could be
73 attached to the micelle casein. After centrifugation, the casein micelle was subjected to
74 lyophilization and stored until the analysis.

75 For the analyzes, a solution of sodium phosphate buffer of pH 2.0, 6.6 and 9.0
76 was prepared, micellar casein samples at the concentration of $8.0 \times 10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$.

77 *2.1.2 Preparation of the solution of Allura Red*

78 The allura red was purchased from Sigma-Aldrich (80% w/w). Dye stock
79 solutions were prepared in the presence of sodium phosphate buffer (pH 2.0, 6.6 and
80 9.0) and at the concentration of $3.0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$. In addition to the stock solution,
81 solutions of allura red were prepared in the presence of micellar casein with a
82 concentration of $3.0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$.

83 **2.2. Fluorescence spectroscopy experiments**

84 Fluorescence analyzes were performed with a Fluorescence Spectrophotometer
85 LS 55 (PerkinElmer) coupled to a thermostat bath.

86 For fluorescence measurements, curves with 15 points were prepared, with
87 constant casein micelle concentration and increasing dye concentration with addition of
88 20 by 20 μL . The first fluorescence emission spectrum was from 3 ml of the casein
89 micelle solution ($8.0 \times 10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$) added in the quartz cuvette (4 cm x 1 cm x 1 cm).
90 The other spectra were obtained in response to increasing titration with solution of
91 Allura Red ($3.0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$).

92 The emission spectra were measured at temperatures of 293.15, 298.15, 308.15,
93 318.15 and 328.15 K and in the range of 296 - 900 nm (excitation wavelength, 295 nm).

94 From the data obtained in the fluorescence spectra the Stern-Volmer model was
95 applied and used to determine the mechanism of fluorescence suppression. Once the
96 mechanism was defined as static, the thermodynamic parameters of protein aggregate-
97 dye complex formation were calculated and discussed.

98 **2.3. Isothermal titration microcalorimetry experiments**

99 For this analysis, an isothermal titration microcalorimeter (μ ITC) CSC 4200 (TA
100 Instruments) thermostated and stainless steel cells with a volume of 2.7 mL were used.

101 The standard enthalpy variation (ΔH°), the interaction constant (K_b) and the
102 reaction stoichiometry (n) were measured by the addition of 2.7 ml of the micellar
103 casein dispersion in sample and reference. After the addition of the protein dispersion in
104 the celibate compartment, they were submitted to agitation of 300 rpm to obtain the
105 thermal equilibrium between the cells and the bath. At equilibrium, aliquots of the dye
106 solution were used to titrate the micellar casein dispersion. The titration was performed
107 at intervals of 30 minutes and with the aid of Hamilton syringe.

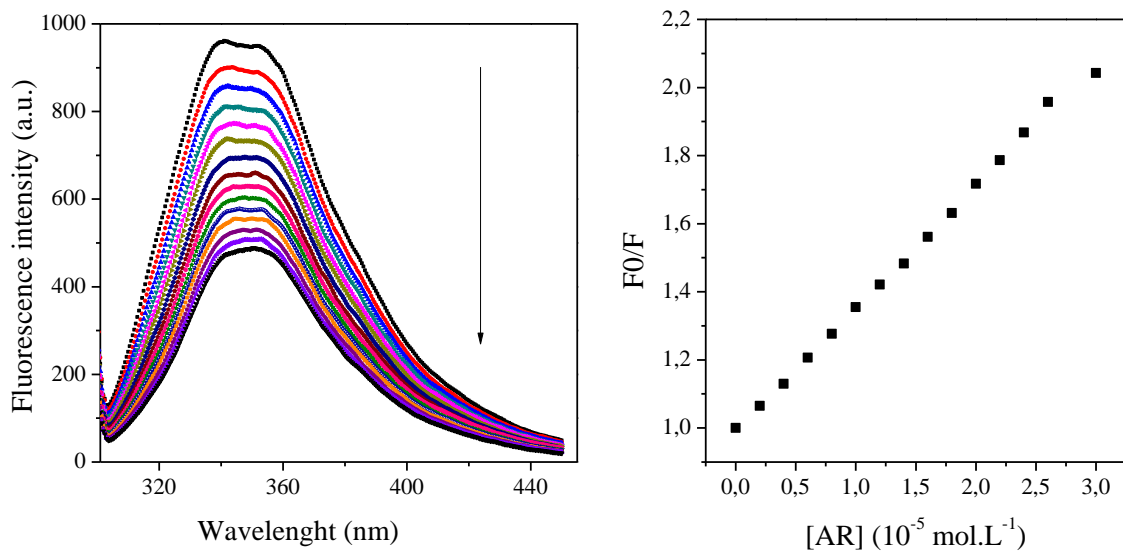
108

109 **3. Results and Discussion**

110 **3.1. Allura Red-casein micelle interaction studied by fluorescence spectroscopy**

111 Casein micelle is a nanoaggregate of about 100 nm, formed by around 10,000
112 casein molecules (α_{s1} , α_{s2} , β and k -casein), nanocluster of calcium phosphate and water
113 (Gonzalez-Jordan, Thomar, Nicolai, & Dittmer, 2015). Each casein molecule contains
114 up to two tryptophan (Trp) residues ($\alpha_{s1} = \alpha_{s2} = 2$ Trp and $\beta = k = 1$ Trp) (Yazdi &

115 Corredig, 2012), thus fluorescence spectroscopy is a useful technique to evaluate
116 binding between small molecules (such as Allura Red) and casein micelle. When small
117 ligands bonds to proteins directly in Trp or near Trp surroundings, the protein
118 fluorescence is quenched (Lakowicz, 2006). Figure 2a shows the fluorescence spectra
119 of casein micelle suspension (excited at 295 nm) added with increasing concentration of
120 Allura Red.



121
122 Figure 2 – (a) Fluorescence spectra and (b) Stern-Volmer plot for spectral data of casein
123 micelle suspension added with increasing concentration of Allura Red at pH 6.6 and
124 298.15 K. The arrow indicates increasing colorant concentration from 0 to 2.8×10^{-5} M.
125 The same behavior was observed for the other temperatures studied.

126
127 The addition of Allura Red led to a remarkable reduction of casein micelle
128 fluorescence intensity. Also, there was a displacement in the maximum emission
129 wavelength (λ_{em-max}) from 342 to 350 nm, characterizing a red-shift, which indicated
130 that the Trp residues were moved to a more hydrophilic environment (Basu & Kumar,

131 2015) probably due to a conformational change on casein molecules caused by Allura
132 Red-casein interaction (He, Chen, Moser, Jones, & Ferruzzi, 2016).

133 The fluorescence quenching may be caused mainly by collisions between
134 ligands and protein aggregate or by the formation of a complex between ligand and
135 protein aggregate. The Stern-Volmer model (Equation 1, Figure 2b) is the main
136 approach used for identifying the major phenomenon responsible for fluorescence
137 quenching of fluorophores (Lakowicz, 2006).

138

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q] = 1 + K_q\tau_0[Q] \quad (1)$$

139

140 where F_0 and F represent the fluorescence intensity in the absence and presence of the
141 quencher (Allura Red), K_q is the quenching rate constant of the biomolecule (casein
142 micelle); K_{sv} is the Stern-Volmer constant; τ_0 is the average lifetime of casein micelle
143 without quencher; and $[Q]$ is the concentration of Allura Red.

144

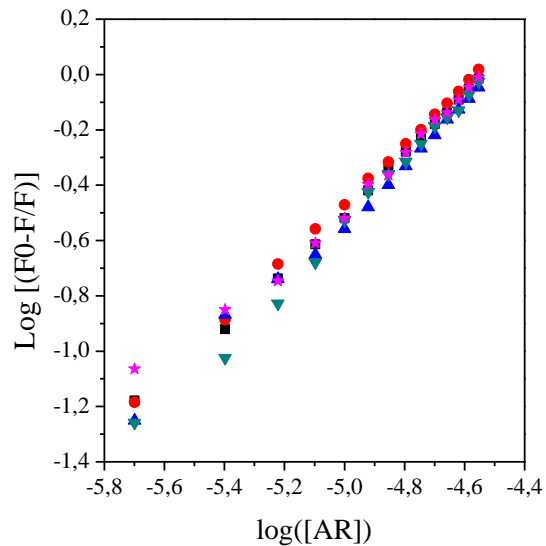
145 The Stern-Volmer plots pointed that K_{sv} reduced with temperature increasing
146 (Table 1) and K_q values were of the order of 10^{12} L.mol⁻¹.s⁻¹, which indicated that
147 complexes between casein and Allura Red were formed at all temperature studied. Thus,
148 binding constant (K_b) and the stiochiometry (n) were determine for the complexes
149 formed (Equation 2, Figure S1).

150

$$\log\left(\frac{F_0 - F}{F}\right) = \log K_b + n\log[Q] \quad (2)$$

151

152 where F_0 and F are the fluorescence intensity in the absence and presence of the
153 quencher, respectively; K_b is the binding constant; n is the stoichiometry of the complex;
154 and $[Q]$ is the concentration of Allura Red.



155
156 Figure S1 – Plot for determination of K_b and n values of the complex between Allura
157 Red and casein micelle, at different temperatures (■ 293.15 K; ● 298.15 K; ▲ 308,15 K;
158 ▼ 318,15 K and ★ 328,15 K) and pH 6.6.

159
160 At all temperatures, the K_b values were of the order of 10^4 L.mol⁻¹ for Allura
161 Red-casein complexes formed with stoichiometry (n) of around 1 (Table 1). These
162 results indicated moderate interaction between ligand and protein aggregate (Grabolle,
163 Pauli, Brehm, & Resch-Genger, 2014) and that for each binding site on casein aggregate
164 (Trp residue or Trp residue surrounding) there is one molecule of Allura Red bonded. As
165 mentioned above, each casein micelle contains 10,000 caseins molecules and it is
166 formed by around 40.16%, 10.20%, 43.70% and 5.94% of α_{s1} , α_{s2} , β and κ -casein,
167 respectively (Ketto et al., 2017). Considering the number of Trp residues of each casein
168 molecule and that all of them are available to bind with the colorant, there are about
169 15.036 Allura Red molecules per casein micelle, independent on temperature.

170 It is well known that colorants bind to proteins by different interaction energy,
171 such as electrostatic and van der Waals forces, H bonding and/or hydrophobic
172 interactions (Wang, Yan, He, Bai, & Li, 2013). The comprehension on predominant
173 interaction mechanism could help the successful application of Allura Red on food
174 containing caseins. Thus, the standard thermodynamic parameters (Gibbs free energy
175 change - ΔG° , enthalpy change - ΔH° , and entropy change - ΔS°) of complex formation
176 were determined following Equations 3, 4 and 5, respectively.

177

$$178 \quad \Delta G^\circ = -RT \ln K_b \quad (3)$$

179

$$180 \quad \ln \frac{K_{b2}}{K_{b1}} = -\frac{\Delta H^\circ}{R} \left(\frac{1}{T_1} + \frac{1}{T_2} \right) \quad (4)$$

181

$$182 \quad \Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (5)$$

183

184 where ΔG° is the standard Gibbs free energy change ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$); ΔH° is the standard
185 enthalpy change ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$); ΔS° is the standard entropy change ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) for the
186 formation of the Allura Red-casein micelle complexes; K_b is the binding constant; T is
187 temperature (K) and R is the universal gas constant ($\text{J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$).

188

189 The thermodynamic parameters for Allura Red-casein micelle interaction
190 occurring at pH 6.6 are shown at Table 1.

191

192 Table 1 - Quenching constants (K_{SV}), binding constants (K_b), number of binding sites
193 (n), Gibbs free energy change (ΔG°), Enthalpy change (ΔH°) and entropy change

194 (TΔS°) associated to Allura Red-casein micelle interaction at diferente temperatures, pH
 195 6.6.

T	K _{SV} ^a	K _b ^a	n	R ²	ΔG ^{ob}	ΔH ^{ob}	R ²	T ΔS ^{ob}
293.15	3.66E+04	5.87E+04	1.0361	0.9975	-26.76			49.67
298.15	3.45E+04	5.06E+04	1.0407	0.9922	-26.85			49.76
308.15	3.44E+04	3.89E+04	1.0198	0,9935	-27.08	22.91	0.9980	49.98
318.15	3.34E+04	2.83E+04	1.1139	0,9942	-27.11			50.02
328.15	3.17E+04	2.16E+04	0.9582	0.9859	-27.23			50.14

196 ^a L.mol⁻¹, ^b kJ.mol⁻¹

197

198 The negative ΔG° values indicated that the equilibrium Allura Red + casein
 199 micelle ⇌ Allura Red-casein micelle favored the complex formation. Positive values of
 200 ΔH° and TΔS° suggest that, considering the average of all sites, the protein aggregate
 201 interacted by hydrophobic interactions (Deng et al., 2016), due to the releasing of water
 202 molecules from solvating layers of Allura Red molecule and casein micelle. In addition,
 203 it is worth considering that positive TΔS° values are directly related to the release of
 204 ions from the electric double layer during the interaction between Allura Red and casein
 205 micelle.

206

207 3.1.1. Effect of pH on the Allura Red-casein micelle interaction

208 As casein micelle is a charged colloidal particle and the residual charge on
 209 protein aggregate surface may affect in its binding with small ligands, we repeated the
 210 fluorescence experiments at pH 2.0 and 9.0, with casein micelle positively and
 211 negatively charged, respectively. Table 2 shows the results for both pHs.

212

213 Table 2 - Quenching constants (K_{SV}), binding constants (K_b), number of binding sites
 214 (n), Gibbs free energy change (ΔG°), Enthalpy change (ΔH°) and entropy change
 215 ($T\Delta S^\circ$) associated to Allura Red-casein micelle interaction at diferente temperatures, pH
 216 2.0 and pH 9.0.

pH	T	K_{SV}^a	K_b^a	n	R^2	$\Delta G^{\circ b}$	$\Delta H^{\circ b}$	R^2	$T\Delta S^{\circ b}$
	293.15	4.85E+04	9.91E+03	0.8808	0.9970	-22.43			-8.24
	298.15	4.60E+04	1.09E+04	0.8225	0.9933	-23.04			-7.62
2.0	308.15	3.39E+04	1.58E+04	0.9018	0.9973	-24.77	-30.67	0.9865	-5.89
	318.15	3.35E+04	2.64E+04	0.7812	0.9898	-26.93			-3.73
	328.15	2.52E+04	3.54E+04	1.0455	0.9825	-28.58			-2.09
	293.15	2.85E+04	1.16E+05	0.9399	0.9918	-28.43			78.35
	298.15	2.44E+04	7.16E+04	0.9826	0.9956	-27.71			77.63
9.0	308.15	2.33E+04	6.40E+04	1.1277	0.9935	-28.35	49.92	0.9394	78.27
	318.15	2.10E+04	1.96E+04	1.1117	0.9947	-26.14			76.06
	328.15	1.98E+04	1.31E+04	1.1119	0.9857	-25.87			75.79

217 ^a L.mol⁻¹, ^b kJ.mol⁻¹

218

219 The pH decreasing (pH 2.0) or increasing (pH 9.0) resulted in small changes in
 220 K_b , and n values, which are mainatined of the order of 10⁴ L.mol⁻¹ and 1.0, respectively.
 221 On the other hand, the pH strongly affected the driven forces for Allura Red-casein
 222 micelle binding.

223 At acid pH, ΔH° became negative, as well as the entropic term, indicating that at
 224 pH 2.0, the complex formation between Allura Red and casein micelle is enthalpically
 225 driven. At isoelectric point (PI = 4.6), casein micelles coagulate due to reduction of

226 electrostatic repulsion caused by negative charges. However, below PI, casein micelle
227 aggregates may be partially disrupted at very low pH due to the presence of positive
228 charge on proteins (Zhang, Zhang, Zou, & McClements, 2016); thus these “new” small
229 casein aggregates could expose different binding sites for interaction with Allura Red,
230 in which the binding process is enthalpically driven.

231 On the other hand, at pH 9.0, the ΔH° and $T\Delta S^\circ$ became more positive than at
232 pH 6.6, pointing to at basic conditions, Allura Red-casein micelle interaction was driven
233 by the entropy gain. It is well established that at high pH, the casein micelle size slightly
234 increases due to negative charges of proteins and aggregate hydration (Nandhakumar,
235 Dhanaraju, Sundar, & Heera, 2017). Probably, the size increment on casein micelle
236 exposed more hydrophobic sites to bind to Allura Red inner the protein aggregated,
237 releasing more water molecules from solvation layers of both interacting chemical
238 species.

239 **3.1.2. Effect of ionic force on the Allura Red-casein micelle interaction**

240 The experiments performed at different pHs provided information about the
241 effect of superficial charge of casein micelles on the interaction between the colorant
242 and the protein aggregates.

243 To complete characterize the role of electrostatic interactions on Allura Red-
244 casein micelle binding, we carried out experiments at pH 6.6 with increasing NaCl
245 concentration (0.01 to 1.0 mol.L⁻¹). The results are presented in Table 3.

246

247 Table 3 - Binding constants (K_b), number of binding sites (n), Gibbs free energy change
248 (ΔG°), Enthalpy change (ΔH°) and entropy change ($T\Delta S^\circ$) associated to Allura Red-
249 casein micelle interaction at different temperatures, pH 6.6 in the presence of NaCl
250 (0.01 to 1.0 mol.L⁻¹).

NaCl	T	K_b^a	n	R^2	ΔG^{ob}	ΔH^{ob}	R^2	$T\Delta S^{ob}$
	293.15	3.90E+04	1.0224	0.9976	-25.76			5.41
	298.15	4.75E+04	0.9914	0.9964	-26.70			6.34
0.01	308.15	6.39E+04	1.1596	0.9965	-28.35	-20.35	0.9912	8.00
	318.15	7.77E+04	1.3297	0.9963	-36.51			16.16
	328.15	9.68E+04	1.1334	0.9954	-31.32			10.97
	293.15	1.40E+04	0.9883	0.9987	-23.26			-6.87
	298.15	1.71E+04	0.9397	0.9967	-24.16			-5.98
0.1	308.15	2.85E+04	1.0884	0.9965	-26.28	-30.14	0.9706	-3.85
	318.15	4.30E+04	1.0436	0.9850	-28.22			-1.92
	328.15	4.83E+04	1.0651	0.9910	-29.43			-0.71
	293.15	2.33E+04	0.9635	0.9960	-24.51			-57.98
	298.15	2.35E+04	0.9721	0.9982	-24.95			-57.54
0.5	308.15	1.95E+05	1.1673	0.9961	-31.21	-82.49	0.9251	-51.28
	318.15	2.02E+05	1.1764	0.9913	-32.19			-50.29
	328.15	8.19E+05	0.9720	0.9927	-37.15			-45.34
	293.15	1.04E+04	1.0972	0.9902	-22.54			-96.60
	298.15	2.20E+04	1.0613	0.9957	-24.79			-94.36
1.0	308.15	5.33E+04	1.0197	0.9953	-27.89	-119.15	0.9602	-91.26
	318.15	2.58E+05	1.0198	0.9951	-32.96			-86.18
	328.15	2.52E+06	1.6867	0.9094	-40.22			-78.93

251 ^a L.mol⁻¹, ^b kJ.mol⁻¹

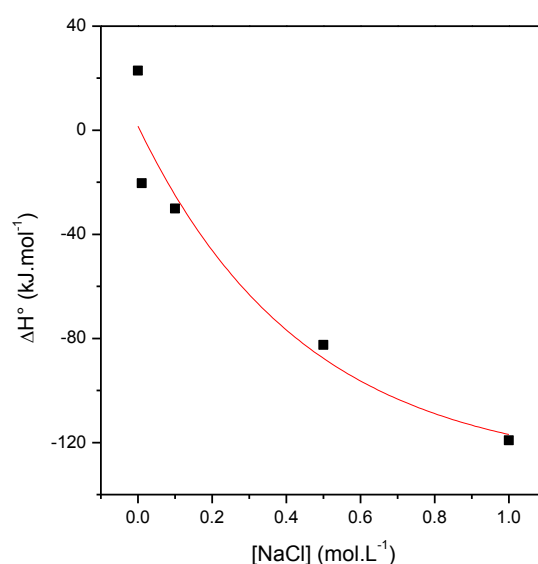
252

253 The increasing of system ionic force did not change the stoichiometry and K_b

254 values for the complexes, except for the higher NaCl concentrations (0.5 and 1.0 mol.L⁻¹)

255 ¹) at higher temperatures ($T > 308.15$ K), in which K_b values were from 5 to 100 times
256 superior and indicated that the higher the ionic force the higher the interaction between
257 Allura Red and casein micelle.

258 Regarding the values of ΔH° and $T\Delta S^\circ$, the increase of the ionic strength of the
259 system showed a remarkable effect. The former became negative when the smaller
260 NaCl concentration (0.01 mol.L^{-1}) was added into the system, and it varied
261 exponentially with the NaCl concentration (Figure S2).



262

263 Figure S2 – Plot of ΔH° versus [NaCl] for Allura Red interacting with casein micelle, at
264 pH 6.6.

265

266 The negative ΔH° values are associated with the presence of NaCl, caotropic
267 salt, disturbs the tertiary structure of water molecules from solvation layers of Allura
268 Red and casein micelle, as well as from the system bulk. Thus, no energy to transfer
269 water molecules from solvation layer to the bulk, and also there is no entropic gain with
270 this transference.

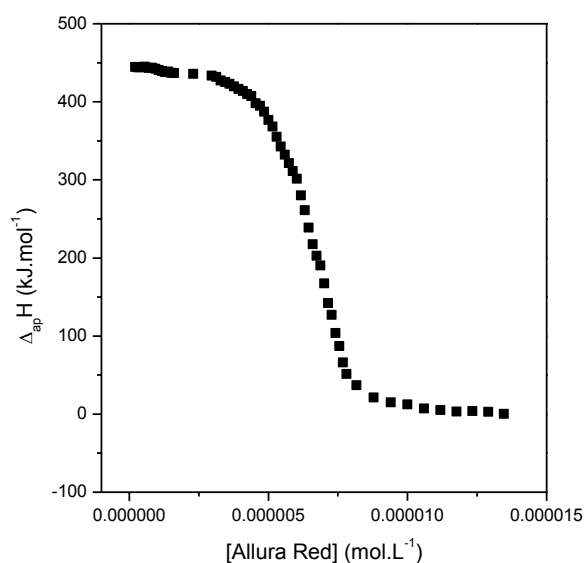
271 On the other hand, negative $T\Delta S^\circ$ values indicated that in the presence of salt an
272 entropy reduction occurs because the configurational entropy of colorant molecules and
273 protein aggregates decreased with the complex formation. In addition, the presence of
274 NaCl in the system contributes to the asymmetry of charges and, consequently,
275 blockage of the electric double layer.

276 Therefore, it can be assumed that, in the presence of NaCl, the release of water
277 molecules from solvation layers of both interacting species mainly contributes for ΔH°
278 values, while the complex formation and the blocking of the double electric layer major
279 impact on $T\Delta S^\circ$ values.

280 **3.2. Microcalorimetric Analysis of Allura Red – casein micelle binding**

281 Fluorimetric experiment provided information about interaction occurring
282 between Allura Red and Trp residues (and/or Trp residues surroundings) of casein
283 micelle; however some colorant molecules may interact with other binding sites present
284 in the protein aggregate. In addition, ΔH° obtained through fluorimetric data is based on
285 van't Hoff approach, which provides approximated values (Lelis et al., 2017).

286 In order to overcome these limitations, we performed microcalorimetric analysis
287 from Allura Red interacting with casein micelle, at pH 6.6, 293.15 K and absence of
288 NaCl. Figure 3 shows the plot of apparent interaction enthalpy change ($\Delta_{ap}H$) of Allura
289 Red–casein micelle binding against [Allura Red].



290

291 Figure 3 - Integrated heat data after correction for the heat of dilution.

292

293 At first injections of Allura Red, when there are many casein micelle available to
 294 bind to the colorant, $\Delta_{ap}H$ values were around 450 kJ.mol^{-1} . As Allura Red
 295 concentration increased, the amount the free binding sites on casein micelle reduced and
 296 thus, the $\Delta_{ap}H$ values also decreases until it reached a plateau near 0 kJ.mol^{-1} . This
 297 behavior indicates that above $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ of the colorant, the casein micelle
 298 binding sites were energetically saturated.

299 The inflection point of the curve (at $6.0 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ of colorant) indicates that
 300 there are about 30.000 Allura Red molecules for each casein micelle. This is a coherent
 301 number, considering that there are around 10.000 casein molecules in a casein micelle,
 302 and since casein micelle is a protein aggregate, some of binding sites on caseins are not
 303 available to interact with colorant molecules.

304 The difference between the superior and the inferior plateau of ΔH_{ap} values
 305 indicated that ΔH° for Allura Red – casein micelle binding is -450 kJ.mol^{-1} . However,
 306 this energy is not only due to colorant-protein aggregate binding, because protein

307 conformational changes and/or ions releasing from casein micelle also contributed for
308 this ΔH° value.

309

310 **4. Conclusion**

311 The interaction between Allura Red and casein micelle was investigated by
312 different techniques under different conditions of pH, ionic strength and temperature.
313 The results demonstrated that AR and micellar casein formed complexes by enthalpic or
314 entropic contribution depending on the thermodynamic condition studied. Changes in
315 pH as well as presence of salt influence the interaction between the dye and the protein
316 aggregate.

317 From the technological point of view, these results are important because they
318 show that the food composition, e.g., salt presence, may change the forces driving
319 colorant-protein interactions; and how the temperature may impact them.

320 From the scientific point of view, these results are important because they provide
321 preliminary information of a protein aggregate that presents high potential carrier of
322 molecules of interest both in food and in the human organism.

323

324 **Acknowledgements**

325

326 The authors thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
327 Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
328 (CNPq), and Fundação de Apoio à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) for the
329 financial support.

330

331

332 **References**

- 333 Abramsson-Zetterberg, L., & Ilbäck, N. G. (2013). The synthetic food colouring agent
334 Allura Red AC (E129) is not genotoxic in a flow cytometry-based micronucleus
335 assay in vivo. *Food and Chemical Toxicology*, *59*, 86–89.
336 <http://doi.org/10.1016/j.fct.2013.05.047>
- 337 Bastaki, M., Farrell, T., Bhusari, S., Pant, K., & Kulkarni, R. (2017). Lack of
338 genotoxicity in vivo for food color additive Allura Red AC. *Food and Chemical*
339 *Toxicology*, *105*, 308–314. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2017.04.037>
- 340 Basu, A., & Kumar, G. S. (2015). Binding of carmoisine , a food colorant , with
341 hemoglobin : Spectroscopic and calorimetric studies. *FRIN*, *72*, 54–61.
342 <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.03.015>
- 343 Bermúdez-Aguirre, D., Yáñez, J. A., Dunne, C. P., Davies, N. M., & Barbosa-Cánovas,
344 G. V. (2010). Study of strawberry flavored milk under pulsed electric field
345 processing. *Food Research International*, *43*(8), 2201–2207.
346 <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.07.021>
- 347 Deng, H.-H., Wang, F.-F., Shi, X.-Q., Peng, H.-P., Liu, A.-L., Xia, X.-H., & Chen, W.
348 (2016). Water-soluble gold nanoclusters prepared by protein-ligand interaction as
349 fluorescent probe for real-time assay of pyrophosphatase activity. *Biosensors and*
350 *Bioelectronics*, *83*, 1–8. <http://doi.org/10.1016/j.bios.2016.04.031>
- 351 Gonzalez-Jordan, A., Thomar, P., Nicolai, T., & Dittmer, J. (2015). The effect of pH on
352 the structure and phosphate mobility of casein micelles in aqueous solution. *Food*
353 *Hydrocolloids*, *51*, 88–94. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.04.024>
- 354 Grabolle, M., Pauli, J., Brehm, R., & Resch-Genger, U. (2014). Structural control of

355 dye–protein binding, aggregation and hydrophilicity in a series of asymmetric
356 cyanines. *Dyes and Pigments*, *103*, 118–126.
357 <http://doi.org/10.1016/j.dyepig.2013.11.027>

358 He, Z., Chen, J., Moser, S. E., Jones, O. G., & Ferruzzi, M. G. (2016). Interaction of b -
359 casein with (Å) -epigallocatechin-3-gallate assayed by fluorescence quenching :
360 effect of thermal processing temperature. *International Journal of Food Science*
361 *and Technology*, *51*, 342–348. <http://doi.org/10.1111/ijfs.12977>

362 Horne, D. S. (2017). A balanced view of casein interactions. *Current Opinion in Colloid*
363 *& Interface Science*, *28*, 74–86. <http://doi.org/10.1016/j.cocis.2017.03.009>

364 Ketto, I. A., Knutsen, T. M., Øyaas, J., Heringstad, B., Ådnøy, T., Devold, T. G., &
365 Skeie, S. B. (2017). Effects of milk protein polymorphism and composition, casein
366 micelle size and salt distribution on the milk coagulation properties in Norwegian
367 Red cattle. *International Dairy Journal*, *70*, 55–64.
368 <http://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.10.010>

369 Lakowicz, J. R. (2006). *Principles of fluorescence spectroscopy. Principles of*
370 *Fluorescence Spectroscopy*. <http://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4>

371 Lelis, C. A., Hudson, E. A., Ferreira, G. M. D., Ferreira, G. M. D., da Silva, L. H. M.,
372 da Silva, M. do C. H., ... Pires, A. C. dos S. (2017). Binding thermodynamics of
373 synthetic dye Allura Red with bovine serum albumin. *Food Chemistry*, *217*, 52–58.
374 <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.080>

375 Nandhakumar, S., Dhanaraju, M. D., Sundar, V. D., & Heera, B. (2017). Influence of
376 surface charge on the in vitro protein adsorption and cell cytotoxicity of paclitaxel
377 loaded poly(ε-caprolactone) nanoparticles. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo*
378 *University*. <http://doi.org/10.1016/j.bfopcu.2017.06.003>

379 Pourreza, N., Rastegarzadeh, S., & Larki, A. (2011). Determination of Allura red in
380 food samples after cloud point extraction using mixed micelles. *Food Chemistry*,
381 *126*(3), 1465–1469. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.158>

382 Saeed, S. M. G., Sayeed, S. A., Ashraf, S., Batool, F., Ali, R., Naz, S., & Siddiqi, R.
383 (2011). Investigations of In vitro Digestibility of Proteins Bound to Food Colors.
384 *Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences*, *1*, 34–40.

385 Umer Abdullah, S., Badaruddin, M., Asad Sayeed, S., Ali, R., & Riaz, M. N. (2008).
386 Binding ability of Allura Red with food proteins and its impact on protein
387 digestibility. *Food Chemistry*, *110*(3), 605–610.
388 <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.02.049>

389 Wang, L., Zhang, G., & Wang, Y. (2014). Binding properties of food colorant allura red
390 with human serum albumin in vitro. *Molecular Biology Reports*, *41*(5), 3381–
391 3391. <http://doi.org/10.1007/s11033-014-3200-z>

392 Wang, Q., Yan, J., He, J., Bai, K., & Li, H. (2013). Characterization of the interaction
393 between 3-Oxotabersonine and two serum albumins by using spectroscopic
394 techniques. *Journal of Luminescence*, *138*, 1–7.
395 <http://doi.org/10.1016/j.jlumin.2013.01.035>

396 Wu, D., Yan, J., Wang, J., Wang, Q., & Li, H. (2015). Characterisation of interaction
397 between food colourant allura red AC and human serum albumin:
398 Multispectroscopic analyses and docking simulations. *Food Chemistry*, *170*, 423–
399 429. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.088>

400 Yazdi, S. R., & Corredig, M. (2012). Heating of milk alters the binding of curcumin to
401 casein micelles. A fluorescence spectroscopy study. *Food Chemistry*, *132*, 1143–
402 1149. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.019>

403 Zhang, Z., Zhang, R., Zou, L., & McClements, D. J. (2016). Protein encapsulation in
404 alginate hydrogel beads: Effect of pH on microgel stability, protein retention and
405 protein release. *Food Hydrocolloids*, 58, 308–315.
406 <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.03.015>

407 Zhao, Z., & Corredig, M. (2016). Colloidal properties of casein micelles suspensions as
408 a function of pH during concentration by osmotic stressing. *Food Hydrocolloids*,
409 60, 445–452. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.04.016>