

ANA FLÁVIA COELHO PACHECO

**INTERAÇÃO ENTRE β -CASEÍNA E NARINGINA: UM ESTUDO CINÉTICO E
TERMODINÂMICO**

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*.

Orientadora: Ana Clarissa dos Santos Pires

Coorientadora: Marcia Cristina Teixeira Ribeiro
Vidigal

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2019**

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

T

P116i
2019

Pacheco, Ana Flávia Coelho, 1993-
Interação entre β -caseína e naringina : um estudo cinético e
termodinâmico / Ana Flávia Coelho Pacheco. – Viçosa, MG,
2019

58 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Ana Clarissa dos Santos Pires.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Compostos bioativos. 2. Proteínas. 3. Interação
partícula-partícula. 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. 613.282


Bibliotecária responsável
Alice Regina Pinto Pires
CRB6 2523

ANA FLÁVIA COELHO PACHECO

**INTERAÇÃO ENTRE β -CASEÍNA E NARINGINA: UM ESTUDO CINÉTICO E
TERMODINÂMICO**

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: 26 de julho de 2019.



Ana Flávia Coelho Pacheco
Autora



Ana Clarissa dos Santos Pires
Orientadora

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, pela oportunidade oferecida, por estar sempre presente em todos os momentos me dando forças necessárias para alcançar esta vitória.

Aos meus pais, João Carlos Pacheco e Regina Célia Coelho Pacheco, aos meus irmãos Flaviana e Jean por todo amor, apoio, paciência, amizade e incentivo durante esses anos. Vocês são tudo pra mim, amo muito vocês.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realização do curso.

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) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro ao projeto.

À professora Ana Clarissa dos Santos Pires pelos ensinamentos, apoio, diálogo, incentivo e confiança durante esses anos de orientação.

Ao professor Luis Henrique Mendes da Silva pela participação na banca de defesa, ensinamentos, colaboração e assistência na realização desse trabalho, e também à equipe QUIVECOM por toda colaboração. Pela disponibilização do uso de equipamentos do seu laboratório sempre que necessário.

À professora Márcia Cristina Teixeira Ribeiro Vidigal pela coorientação, ensinamentos, colaboração e assistência na realização desse trabalho.

Aos amigos do laboratório de Termodinâmica Molecular Aplicada - THERMA, pela amizade, por me acolherem, me auxiliarem no desenvolvimento do trabalho e por me engrandecer como pessoa e profissional.

A todos, que de alguma forma, foram importantes para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Ana Flávia Coelho Pacheco, filha de João Carlos Pacheco e Regina Célia Coelho Pacheco, nasceu em São João Nepomuceno, Minas Gerais, em 07 de outubro de 1993.

Em maio de 2013, ingressou no curso de Ciência e Tecnologia de Laticínios na Universidade Federal de Viçosa (UFV), graduando-se em julho de 2017.

Em agosto de 2017 iniciou o mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de dissertação em julho de 2019.

RESUMO

PACHECO, Ana Flávia Coelho, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2019. **Interação entre β -caseína e naringina: um estudo cinético e termodinâmico.** Orientadora: Ana Clarissa dos Santos Pires. Coorientadora: Márcia Cristina Teixeira Ribeiro Vidigal.

A naringina (NR) é um flavonóide com importantes propriedades bioativas, mas sua baixa solubilidade em água, baixa biodisponibilidade e seu gosto amargo limitam sua aplicação em diferentes formulações. Uma estratégia para superar essas limitações é o transporte da NR através da interação com β -caseína (β CN), que é uma proteína com alto potencial para carrear compostos bioativos hidrofóbicos. Assim, o presente trabalho teve como objetivo estudar as interações entre β CN e NR utilizando espectroscopia de fluorescência (EF) e ressonância plasmônica de superfície (RPS), em diferentes temperaturas e pH 7,0. A constante de interação (K_b) foi da ordem de $10^4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$ e o complexo β CN/NR apresentou estequiometria 1:1. A variação da energia livre de Gibbs padrão (ΔG°) foi negativa, indicando que o equilíbrio químico favoreceu a formação do complexo β CN/NR. De 20 a 34,15 °C, os valores da variação da entalpia padrão (ΔH°) e da variação da entropia padrão (ΔS°) foram positivos, indicando que o processo de formação do complexo β CN/NR foi regido pelo aumento da entropia. Já acima de 34,15 até 36 °C a complexação foi regida pela entalpia e entropia ($\Delta H^\circ < 0$ e $T\Delta S^\circ > 0$). O valor negativo da variação da capacidade calorífica padrão ($\Delta C_p^\circ = -7,047 \text{ kJ}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$) indicou que interações mais fracas ocorrem no sistema quando o complexo é formado. Os valores de K_b determinados por RPS foram menores que os obtidos por EF, ou seja, da ordem de $10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$, indicando que a interação da NR próxima ao Trp-143 ocorre com uma maior constante de interação do que aquelas que ocorrem longe da região do Trp da β CN. Essas diferenças são explicadas pelos princípios de cada técnica. Por exemplo, na EF a proteína se encontra em solução e na RPS a proteína é imobilizada em um chip sensor. Assim como em EF, na análise de RPS os valores de ΔG° foram negativos, sendo o processo de complexação entropicamente dirigido na faixa de temperatura de 20 a 28 °C, evidenciado pelos valores positivos de ΔH° e ΔS° . Na interação β CN/NR, os valores da constante de associação (k_a) e da constante de dissociação (k_d) aumentaram linearmente com o aumento da temperatura, indicando que tanto a formação como a dissociação dos complexos β CN/NR ocorrem em uma

única etapa. A formação do complexo ativado a partir da associação das moléculas de β CN e NR livres requereu uma energia de ativação mais alta ($E_{\text{act(a)}} = 15,7 \text{ kJ mol}^{-1}$) do que a formação do complexo ativado a partir da dissociação do complexo termodinamicamente estável ($E_{\text{act(d)}} = 8,22 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), sendo $E_{\text{act(a)}}$ e $E_{\text{act(d)}}$ positivos e independentes da temperatura. Os demais parâmetros enérgicos obtidos a partir da associação de β CN e NR livres ou dissociação do complexo β CN/NR termodinamicamente estável foram dependentes da temperatura, sendo positivos os valores de $\Delta G^{\ddagger}_{(a)}$, $\Delta G^{\ddagger}_{(d)}$, $\Delta H^{\ddagger}_{(a)}$ e $\Delta H^{\ddagger}_{(d)}$ e negativos os valores de $T\Delta S^{\ddagger}_{(a)}$ e $T\Delta S^{\ddagger}_{(d)}$. Este estudo forneceu parâmetros termodinâmicos e cinéticos de formação do complexo β CN/NR que podem contribuir para otimizar a aplicação da NR como um ingrediente bioativo nas indústrias de alimentos e farmacêuticas.

Palavras-chave: Naringina. β -caseína. Interação.

ABSTRACT

PACHECO, Ana Flávia Coelho, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2019. **Interaction between β -casein and naringin: a kinetic and thermodynamic study.** Adviser: Ana Clarissa dos Santos Pires. Co-adviser: Márcia Cristina Teixeira Ribeiro Vidigal.

Naringin (NR) is a flavonoid with important bioactive properties, but its low water solubility, low bioavailability and bitter taste limit its application in different formulations. A strategy to overcome these limitations is the transport of NR through interaction with β -casein (β CN), which is a protein with high potential to carry hydrophobic bioactive compounds. Thus, the goal of this work was to study the binding between β CN and NR using fluorescence spectroscopy (FS) and surface plasmon resonance (SPR), at different temperatures and pH 7.0. The binding constant (K_b) was of the order of $10^4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$ and the β CN/NR complex presented 1:1 stoichiometry. The standard Gibbs free energy change (ΔG°) was negative, indicating that chemical equilibrium favored the β CN-NR complex formation. From 20 to 34.15 °C, the standard enthalpy change (ΔH°) and standard entropy change (ΔS°) values were positive, which indicated that the complex formation process was driven by increased entropy. Already above 34.15 to 36 °C the complexation was driven by enthalpy and entropy ($\Delta H^\circ < 0$ and $T\Delta S^\circ > 0$). The negative value of the standard heat capacity change ($\Delta C_p^\circ = -7.047 \text{ kJ}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$) indicated that weaker interactions occur in the system when the complex is formed. The K_b values determined by SPR were lower than those obtained by FS, i.e., on the order of $10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$, indicating that the interaction of NR close to Trp-143 occurs with a greater interaction constant than those which occur far from the Trp region of β CN. These differences are explained by the principles of each technique. For example, in EF the protein is in solution and in RPS the protein is immobilized on a sensor chip. As in EF, in the RPS analysis the ΔG° values were negative, being the entropically driven complexation process in the temperature range of 20 to 28 °C, evidenced by the positive ΔH° and ΔS° values. In the β CN/NR binding, the association constant (k_a) and dissociation constant (k_d) values increased linearly with increasing temperature, indicating that both formation and dissociation of the β CN/NR complexes occur in a single step. Activated complex formation from the association of free β CN and NR molecules required higher activation energy ($E_{\text{act(a)}} = 15.7 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) than activated complex formation from the dissociation of the stable β CN/NR complex ($E_{\text{act(d)}} = 8.22$

$\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), being $E_{\text{act(a)}}$ and $E_{\text{act(d)}}$ positive and independent of temperature. The other energetic parameters obtained from the association of free βCN and NR or dissociation of the thermodynamically stable $\beta\text{CN} / \text{NR}$ complex were dependent on temperature, being positive the values of $\Delta G^\ddagger_{(a)}$, $\Delta G^\ddagger_{(d)}$, $\Delta H^\ddagger_{(a)}$ and $\Delta H^\ddagger_{(d)}$ and negative the values of $T\Delta S^\ddagger_{(a)}$ and $T\Delta S^\ddagger_{(d)}$. This study provided thermodynamic and kinetic parameters of $\beta\text{CN}/\text{NR}$ complex formation that may contribute to optimize the application of NR as a bioactive ingredient in the food and pharmaceutical industries.

Keywords: Naringin. β -casein. Interaction.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figura 1 – Estrutura molecular da naringina. Fonte: site ChemBlink..... 15
- Figura 2 – Representação estrutural da β -caseína. Fonte: Adaptado Pérez-Fuentes et al..... 17
- Figura 3 – Espectros de fluorescência da β CN com a adição de concentrações crescentes de naringina (0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330, e 360 μ M) à 25 °C. Fonte: Figura retirada dos resultados apresentado nessa dissertação... 19
- Figura 4 – Configuração esquemática de um detector RPS. Em um ângulo de incidência definido, o fenômeno de RPS é visto como um mergulho na intensidade da luz refletida, característica do ângulo específico de reflexão. O deslocamento do ângulo de reflexão da posição 1 para a posição 2 revela uma mudança na composição do meio perto do filme de ouro como resultado da ligação entre o ligando e o analito. As variações angulares são registradas em unidades de ressonância (UR) e plotados em função do tempo. Fonte: Adaptado de Brogioni & Berti (2014) 26
- Figura 5 – Sensorgramas obtidos à 25 °C (RU vs tempo) para o fluxo de naringina sobre o chip sensor CM5 imobilizado com β CN. Concentrações de naringina: 100, 110, 120, 130 e 140. Fonte: Figura retirada dos resultados dessa dissertação..... 27

Capítulo 2

- Fig. 1 – Chemical structure of naringin..... 39
- Fig. 2 – (a) Fluorescence emission spectra of Trp-143 in β CN with different concentrations of naringin (0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330, and 360 μ M) and (b) Stern-Volmer plot for β CN-NR binding at 24 °C..... 43
- Fig. 3 – ΔG° (■), ΔH° (□), and $T\Delta S^\circ$ (●) values as a function of temperature for β CN-NR binding..... 45
- Fig. 4 – Sensorgrams obtained at 25 °C for naringin (NR) flux over the CM5 sensor chip with immobilized β -casein. NR concentrations: 100, 110, 120, 130, and 140 μ M..... 47

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Table 1 – Kinetic (k_a and k_d) and thermodynamic (K_b , ΔG° , ΔH° , and $T\Delta S^\circ$) parameters related to the stable complex formation at each experimental temperature (T) obtained by SPR.....	48
Table 2 – Kinetic parameters related to activated complex formation from the association of free β CN and NR molecules and dissociation of the stable complex.....	51

SUMÁRIO

Capítulo 1	12
1. Introdução	12
2. Objetivos	13
2.1. Objetivos gerais.....	13
2.2. Objetivos específicos	13
3. Revisão bibliográfica	14
3.1. Naringina.....	14
3.2. β -caseína (β CN).....	16
3.3. Técnicas experimentais para estudo das interações intermoleculares	18
3.3.1. Espectroscopia de fluorescência.....	18
3.3.2. Ressonância plasmônica de superfície (RPS).....	25
4. Referências	32
Capítulo 2	38
β -Casein-naringin binding: deep thermodynamic and kinetic analyses by fluorescence spectroscopy and surface plasmon resonance.....	38
Abstract.....	38
Keywords:.....	38
1. Introduction.....	38
2. Material and methods	40
2.1. Materials and reagents	40
2.2. Apparatus.....	40
2.3. Thermodynamic analyses of β CN-NR binding by FS.....	40
2.4. Thermodynamic and kinetic studies of β CN-NR binding by SPR	41
3. Results and discussion	42
3.1. Thermodynamically stable β CN-NR complex	42
3.1.1. Thermodynamics of β CN-NR binding close to the Trp residues by FS	42
3.1.2. Kinetics and thermodynamics of the stable β CN-NR complex formation by SPR	47
3.2. Activated β CN-NR complex studied by SPR	50
4. Conclusion.....	52
References	53
Supplementary material	55

Capítulo 1

1. Introdução

A naringina é um importante flavonóide que tem despertado interesse em diversos campos de pesquisa devido aos efeitos biológicos benéficos a saúde humana atribuídos a ela, tais como antioxidantes, anticancerígenas, anti-inflamatórias, antimicrobianas e antivirais (EL-DESOKY et al., 2018a). No entanto, sua baixa solubilidade em meio aquoso impõe consideráveis limitações a sua aplicação nas indústrias alimentícias e farmacêuticas (MELLOU et al., 2005; WILLIAMSON; MANACH, 2005). Além disso, seu gosto amargo é outro fator importante que limita a sua aceitação pelo consumidor (RAO et al., 2017). Com o intuito de superar essas limitações e encontrar um novo sistema estável, estratégias têm sido desenvolvidas para carrear compostos bioativos como a naringina, dentre elas, o transporte da naringina em estruturas proteicas supramoleculares, formadas, por exemplo, por β -caseína (β CN).

A β CN é uma proteína anfifílica intrinsecamente não estruturada, composta por uma região hidrofílica N-terminal e uma região hidrofóbica C-terminal. Tem sido utilizada em diversos estudos como carreadora de compostos bioativos, incluindo flavonoides, uma vez que apresenta em sua estrutura uma região hidrofóbica permitindo que atue como veículo natural de entrega de moléculas bioativas que geralmente também são hidrofóbicas, com a finalidade de melhorar suas propriedades de solubilidade, estabilidade e controlar sua distribuição pelo organismo.

Embora tenham sido relatados alguns estudos sobre a interação da naringina com algumas proteínas (β -lactoglobulina, albumina do soro bovino e humano, amilase e lactoferrina), estes estudos apresentam poucas ou até mesmo ausência de informações discutidas dos parâmetros termodinâmicos e cinéticos de interação. Além disso, essas proteínas são globulares, enquanto a β CN é uma proteína intrinsecamente não estruturada, assim, as diferenças estruturais nas proteínas podem influenciar nos parâmetros termodinâmicos e cinéticos de interação. Por fim, até o momento, não foram encontrados estudos fundamentais sobre a termodinâmica e cinética de interação entre a naringina e a β CN. Portanto, tornam-se relevante o estudo da interação entre naringina e β CN, uma vez que permite obter dados valiosos

sobre a dinâmica molecular no processo de interação entre as duas espécies químicas.

A determinação de parâmetros termodinâmicos e cinéticos do processo de formação de complexo naringina/ β CN em diferentes condições de temperaturas por meio das técnicas de espectroscopia de fluorescência e ressonância plasmônica de superfície serão importantes para a aplicação otimizada de complexos naringina/ β CN no desenvolvimento de diversas formulações, além de contribuir para a compreensão das interações entre diferentes compostos bioativos hidrofóbicos e proteínas.

2. Objetivos

2.1. Objetivos gerais

Estudar a termodinâmica e cinética de interação entre naringina e β CN em pH próximo ao fisiológico (pH 7,0) e em diferentes temperaturas.

2.2. Objetivos específicos

- i. Determinar constante de supressão de Ster-Volmer (K_{SV}), constante da taxa de supressão (K_q), constante de interação (K_b), coeficiente estequiométrico (n), variação de entalpia padrão (ΔH°), variação da energia livre de Gibbs padrão (ΔG°), variação de entropia padrão (ΔS°) e a) e variação da capacidade calorífica padrão (ΔC_p°) de formação do complexo entre naringina e β CN, por meio da técnica de espectroscopia de fluorescência nas temperaturas de 20, 24, 28, 32 e 38 °C;
- ii. Utilizando a técnica de RPS determinar parâmetros cinéticos e energéticos relacionados à formação do complexo ativado entre naringina e β CN, tais como constante cinética de associação (K_a), constante cinética de dissociação (K_d), energias de ativação de associação ($E_{ativ(a)}$) e de dissociação ($E_{ativ(d)}$), variações de entalpia de associação ($\Delta H^\ddagger_{(a)}$) e de dissociação ($\Delta H^\ddagger_{(d)}$), variações de energia livre de Gibbs de associação ($\Delta G^\ddagger_{(a)}$) e de dissociação ($\Delta G^\ddagger_{(d)}$) e variações de entropia de associação ($\Delta S^\ddagger_{(a)}$) e de dissociação ($\Delta S^\ddagger_{(d)}$), além de parâmetros termodinâmicos de interação tais como K_b , ΔH° , ΔG° e ΔS° , nas temperaturas de 12, 16, 20, 24, 25 e 28 °C.

3. Revisão bibliográfica

3.1. Naringina

Os flavonoides são uma classe de compostos que representa 60% de todos os polifenólicos naturais, sendo metabólitos secundários que ocorrem em muitas plantas, como frutas e vegetais, e representam importantes compostos bioativos para dieta humana (MADUNIĆ et al., 2018; MOEINIAFSHARI; ZARRABI; BORDBAR, 2015). Com base na sua estrutura química, os flavonoides podem ser categorizados em subgrupos distintos, que inclui as flavanonas, flavonas, isoflavonas, antocianinas e flavanas (MADUNIĆ et al., 2018). As principais diferenças existentes entre os flavonoides estão associadas aos padrões de hidroxilação, à posição do segundo anel aromático e à saturação do anel heterocíclico (RODRIGUEZ et al., 2017).

Os flavonoides vêm se destacando em função de suas propriedades biológicas e terapêuticas demonstradas tanto em condições experimentais *in vitro* quanto em seres humanos (ZHANG et al., 2008a). Pesquisas recentes mostram que estes compostos exibem atividades farmacológicas significativas, como antiangiogênica, antiviral, antioxidante, anti-inflamatória e protetiva contra doenças cardíacas (LI et al., 2018; RUSSO et al., 2012; YEO; SHAHIDI, 2018). Além disso, atuam como agentes quimiopreventivos e quimioterapêuticos, por conferirem proteção contra vários cânceres comuns em humanos, como câncer de pulmão, de mama, de próstata e de cólon (NEUHOUSER, 2004; PATHAK et al., 2014).

A naringina (4',5,7-trihydroxyflavanone 7-rhamnoglucoside) apresenta uma estrutura molecular $C_{27}H_{32}O_{14}$ e massa molar igual $580.53 \text{ g.mol}^{-1}$ (Figura 1). É um flavonoide da classe das flavanonas formada pela flavanona naringenina e o dissacarídeo neohesperidose, comumente encontrada em frutos cítricos como limão, laranja, uva e acerola (PLEGUEZUELOS-VILLA; MIR-PALOMO; DÍEZ-SALES, 2018). Numerosos estudos têm reportado que a naringina apresenta várias atividades biológicas e farmacológicas, como antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória e anticancerígena (CHANET et al., 2012; CHTOUROU et al., 2016; EL-DESOKY et al., 2018a; JAIN; PARMAR, 2011; SALAS et al., 2011; SEQUETTO et al., 2014).

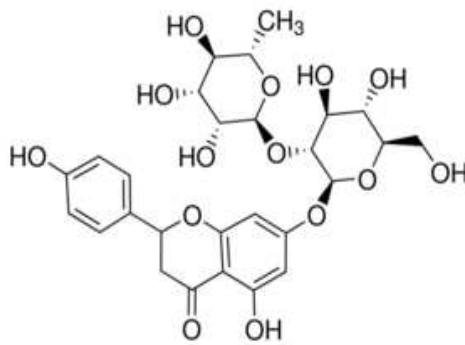


Figura 1 – Estrutura molecular da naringina. Fonte: site ChemBlink.

Apesar da naringina apresentar importantes ações farmacológicas e terapêuticas, as baixas biodisponibilidade e solubilidade em meio aquoso limitam sua eficácia terapêutica e utilização em alimentos (MELLOU et al., 2005; WILLIAMSON; MANACH, 2005). Além disso, seu gosto amargo é outro fator importante que limita sua aceitação pelo consumidor (RAO et al., 2017). Desta forma, o uso moléculas que apresentam em sua estrutura regiões hidrofóbicas para interagir com a naringina, e assim aumentar sua solubilidade aquosa torna-se interessante.

Diversos estudos têm sido feitos para encontrar estratégias de forma a superar as limitações da naringina, os quais incluem a incorporação destas moléculas em β -ciclodextrina (CUI et al., 2012; HUAN et al., 2017), em lipossoma (PLEGUEZUELOS-VILLA; MIR-PALOMO; DÍEZ-SALES, 2018) e diversas proteínas, como β -lactoglobulina (SHPIGELMAN et al., 2014), albumina do soro bovino e humano (ROY et al., 2010; ZHANG et al., 2013, 2008b), amilase (LIU et al., 2017a), lisozima (DAS et al., 2018; ZHANG et al., 2014) e lactoferrina (NUNES et al., 2019). Entretanto, alguns desses estudos não apresentam ou apresentam poucas informações discutidas dos parâmetros termodinâmicos e a maioria deles ausência de informações relativas aos parâmetros cinéticos energéticos. Essas informações sobre os parâmetros termodinâmicos e cinéticos de interação torna fundamental, pois permite um melhor entendimento sobre a magnitude das energias envolvidas e a dinâmica molecular do processo de interação. Além disso, as proteínas usadas nos estudos de interação com a naringina foram todas proteínas globulares, que diferem estruturalmente de proteínas intrinsecamente não estruturadas, como a β CN, dessa forma, as diferenças estruturais das proteínas podem influenciar nos processos moleculares envolvidos na interação entre naringina e essas proteínas. Por fim, não foram encontrados estudos

fundamentais sobre a termodinâmica e cinética de interação entre β CN e naringina, o que se torna ainda mais importante o estudo da interação entre β CN e naringina.

3.2. β -caseína (β CN)

As proteínas do leite são geralmente classificadas como caseínas e proteínas do soro. Essas proteínas distinguem entre si devido às caseínas apresentarem uma estrutura intrinsecamente desordenada, ou seja, conformação aberta, enquanto as proteínas do soro têm uma estrutura globular mais organizada. Essa conformação aberta é devida as caseínas apresentarem um elevado número de resíduos de prolina, especialmente a β CN, que interrompem a formação de α -hélice e β -folha e também a ausência de pontes dissulfeto intramoleculares, fatores que contribuem para sua conformação aberta, evitando o seu dobramento em uma estrutura globular mais organizada (DICKINSON,2001;ORTEGA-REQUENA;REBOUILLAT, 2015).

As caseínas compreendem cerca de 80% da proteína total do leite de vaca (ATAMER et al., 2017). Estão dispersas como complexos hidratados denominados micelas de caseína, com tamanhos que podem variar de 30 a 300 nm de diâmetro. As micelas de caseínas contêm as seguintes frações: α_{S1} -caseína, α_{S2} -caseína, β -caseína e κ -caseína nas proporções de 40, 10, 35 e 15 % (m/m), respectivamente (DAMODARAN et al., 2010).

A β CN representa cerca de 35% das proteínas presentes na micela de caseína (DAUPHAS et al., 2005). A sua massa molar é de aproximadamente 24 kD e o ponto isoelétrico é estimado em pH 5,2. A estrutura primária da β CN é constituída por 209 aminoácidos, dentre os quais o triptofano (Trp 143), principal responsável pela sua fluorescência intrínseca que está localizado no domínio hidrofóbico da cadeia polipeptídica da β CN (SVENSSON;KURUT;SKEPÖ, 2014).

Trata-se de uma proteína anfifílica com dois domínios bem definidos, sendo um domínio hidrofílico N-terminal e um domínio hidrofóbico C-terminal, o que a torna uma molécula suficientemente flexível e facilmente acessível ao solvente. Assim, em solução aquosa, pode formar agregados ou micelas semelhantes a surfactantes. A concentração micelar crítica da β CN é de $1,25 \times 10^{-5} - 2,92 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ e depende do pH, temperatura e força iônica (CHEN et al., 2018; DAUPHAS et al., 2005; GŁĄB; BORATYŃSKI, 2017; LI et al., 2016). Uma única molécula de β CN tem um tamanho de 4,6 nm, enquanto que o tamanho das micelas de β CN está entre 7,3 e 13,5 nm

(MOEINIAFSHARI; ZARRABI; BORDBAR, 2015). Uma representação estrutural da β CN está ilustrada na Figura 2.

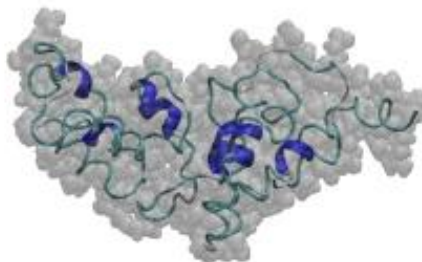


Figura 2 – Representação estrutural da β CN. Fonte: Adaptado Pérez-Fuentes et al. (2017).

As propriedades estruturais e físico-químicas da β CN permitem que esta proteína atue como sistemas nanocarreadores naturais para moléculas bioativas hidrofóbicas. Nos últimos anos, estudos têm demonstrado o potencial da β CN como proteína carreadora de moléculas hidrofóbicas, porque elas podem interagir com essas moléculas através de interações não-covalentes para formar complexos específicos (BAHRI et al., 2019a; CAO et al., 2019a; DEZHAMPANAH; ESMAILI; KHORSHIDI, 2017; HUDSON et al., 2019a; LI et al., 2019; SHAPIRA et al., 2010), melhorando sua biodisponibilidade (FUNCT et al., 2012), promovendo proteção contra a degradação e liberando-os no local de interesse (ELZOGHBY; EL-FOTOH; ELGINDY, 2011; LIVNEY, 2010). Assim, a β CN, tanto na forma de monômeros quanto na forma agregada, pode servir como um carreador para compostos bioativos em diferentes formulações.

CAO et al. (2019a) estudaram a interação entre eriocitrina e β CN por meio de técnicas de espectroscópicas e *docking* molecular, em condições fisiológicas (pH = 7,4). A análise de UV-Vis e espectroscopia de fluorescência (EF) evidenciou a formação de um complexo entre eriocitrina e β -caseína (β CN), sendo o mecanismo de extinção de fluorescência da β CN pela eriocitrina estático. A EF mostrou que a estequiometria do complexo formado foi 1:1 e os valores da constante de interação (K_b) aumentaram com o aumento da temperatura ($1,68 \times 10^5$ a $6,68 \times 10^5$ L mol⁻¹) indicando estabilidade do complexo em temperaturas mais altas. Os valores do ΔG° foram negativos e os valores de ΔH° e da ΔS° indicou que o complexo formado foi principalmente devido a interações hidrofóbicas. A espectroscopia de fluorescência

síncrona mostrou que a polaridade em torno do resíduo de triptofano (Trp) diminuiu, indicando que o microambiente do resíduo de Trp foi alterado pela interação da β CN com eriocitrina. Os resultados da espectroscopia de FTIR e de dicroísmo circular mostraram que a eriocitrina induziu mudanças na estrutura secundária da β CN. Através dos resultados de *docking* molecular e parâmetros termodinâmicos, pode-se inferir que a interação hidrofóbica foi a principal força no processo de interação entre β CN e eriocitrina. Os resultados mostraram que a eriocitrina pode interagir com a β CN, podendo atuar como um transportador da eriocitrina.

3.3. Técnicas experimentais para estudo das interações intermoleculares

3.3.1. Espectroscopia de fluorescência

A espectroscopia de fluorescência é considerada uma técnica eficaz para o estudo de interações intermoleculares entre pequenas moléculas hidrofóbicas e proteínas devido à alta sensibilidade, reprodutibilidade e conveniência (SHAHABADI; HADIDI, 2014). Esta técnica é capaz de fornecer informações para caracterizar as interações de diversos compostos com proteínas, que incluem mecanismos e parâmetros específicos das interações, além de mudanças estruturais da proteína (ABDELHAMEED et al., 2017). As proteínas contêm resíduos de aminoácidos que emitem fluorescência: fenilalanina, tirosina e triptofano. Entre estes aminoácidos, o triptofano (Trp) é o mais sensível às alterações em seu ambiente (GHOSH; RATHI; ARORA, 2016). A β CN apresenta um resíduo de triptofano (Trp 143) localizado na parte hidrofóbica da proteína (DEZHAMPANAH; ESMAILI; KHORSHIDI, 2017).

Quando ocorre a interação entre determinada proteína com pequenas moléculas hidrofóbicas próximos aos fluoróforos a sua fluorescência intrínseca diminui à medida que aumenta a concentração do ligante (LELIS et al., 2017b). Essa supressão de fluorescência refere-se a qualquer processo que diminua o rendimento quântico de fluorescência de um fluoróforo devido a uma variedade de interações moleculares com a molécula supressora (SHAHABADI et al., 2011). Estes incluem interações que ocorrem no estado excitado, rearranjos moleculares, transferência de energia, formação de complexo no estado fundamental ou colisões entre uma molécula e o fluoróforo (HE et al., 2011). Outro fator que pode levar a extinção de fluorescência é o efeito do filtro interno (EFI), na qual o ligante absorve luz no comprimento de onda de emissão e excitação do fluoróforo, assim, menos luz alcança

o centro da amostra, causando uma diminuição na intensidade de fluorescência sem qualquer interação com a proteína. Então, para minimizar este efeito, a intensidade de fluorescência da pode ser corrigida usando a seguinte fórmula:

$$F_{corr} = F_{obs} e^{\frac{(A_{ex} d_{ex} + A_{em} d_{em})}{2}} \quad (1)$$

onde F_{corr} é a intensidade de fluorescência corrigida, A_{ex} e A_{em} são as alterações de absorvância medidas nos comprimentos de onda de excitação e emissão do fluoróforo, respectivamente; e d_{ex} e d_{em} são os percursos da cubeta (cm) nas direções de excitação e emissão, respectivamente.

A Figura 3 ilustra um espectro onde a intensidade de emissão de fluorescência de uma proteína foi extinguida por uma molécula supressora.

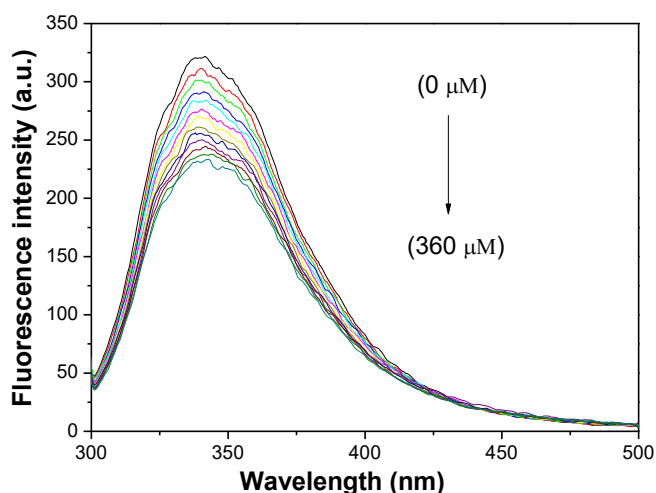


Figura 3 – Espectros de fluorescência da β CN com a adição de concentrações crescentes de naringina (0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330, e 360 μ M) à 25 °C. Fonte: Figura retirada dos resultados apresentado nessa dissertação.

A extinção de fluorescência geralmente ocorre por dois mecanismos, que são classificados como supressão dinâmica ou supressão estática, dependendo do modo de interação entre o supressor e o fluoróforo. Em alguns casos, o efeito do extintor é devido a combinação de supressão dinâmica e estática. Quando a supressão de fluorescência resulta de encontros difusivos entre o ligante (supressor) e o fluoróforo, o fenômeno é denominado supressão dinâmica. Alguns desses encontros fazem com

que o fluoróforo retorne ao seu estado fundamental sem a emissão de um fóton. Por outro lado, quando a supressão é resultado da formação de um complexo não fluorescente entre o supressor e o fluoróforo em seu estado fundamental, é chamada supressão estática (ABDULLAH et al., 2017).

O fenômeno da extinção de fluorescência pode ser analisado pela equação Stern-Volmer (Equação 2).

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} [Q] = 1 + K_q \tau_0 [Q] \quad (2)$$

em que F_0 e F são as intensidades de fluorescência do fluoróforo na ausência e presença de um ligante, respectivamente, K_{SV} é a constante de extinção de Stern-Volmer, $[Q]$ é a concentração do ligante ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), k_q é a constante biomolecular de supressão e τ_0 é o tempo de meia vida do fluoróforo na ausência do ligante (cerca de 10^{-8} s para proteínas). Plotando um gráfico F_0/F versus $[Q]$, a Equação 2 pode ser aplicada para determinar o valor de K_{SV} por regressão linear.

A supressão dinâmica e estática podem ser distinguida pela forma como K_{SV} depende da temperatura. Para o mecanismo dinâmico, temperaturas mais elevadas resultam em difusão mais rápida da molécula supressora e, conseqüentemente, em maior supressão, isto é, maiores valores de K_{SV} . Por outro lado, no caso de o mecanismo de supressão ser estático, os valores de K_{SV} diminuem com o aumento da temperatura. K_{SV} está relacionada com o tempo de meia-vida do fluoróforo e o valor de k_q pode ser obtido a partir da relação $k_q = K_{SV}/\tau_0$, sendo também utilizado para determinar o mecanismo de supressão de fluorescência. Quando a supressão é dinâmica, o valor máximo de k_q é $2,0 \times 10^{10} \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\text{s}^{-1}$. Se os valores de k_q forem superiores a esse, o mecanismo de supressão é classificado como estático, indicando a formação de complexo (MANDAL et al., 2013; SHU et al., 2015).

Outra maneira de verificar o mecanismo de supressão de fluorescência é por meio da medida do tempo de meia vida do fluoróforo, que é o tempo em que 50% da população de fluoróforos retorna do estado excitado para o estado fundamental. Para supressão dinâmica, a diminuição do tempo de meia vida do fluoróforo ocorre devido à diminuição da população do estado excitado por colisão. Já a supressão estática não diminui o tempo de meia vida porque somente moléculas fluorescentes são observadas, ou seja, os fluoróforos não extintos, assim os fluoróforos que não

formaram complexos possuem o mesmo tempo de meia vida (FALCO et al., 2015; LAKOWICZ, 2006).

Por fim, o mecanismo de supressão também pode ser analisado a partir dos espectros de emissão de fluorescência. Ao comparar os espectros de emissão de fluorescência da proteína na ausência e na presença do ligante, se houver deslocamento do comprimento de onda de máxima emissão (λ_{\max}), provavelmente houve formação de complexo (HUDSON et al., 2018; SINHA et al., 2016).

Sendo o mecanismo estático, a constante de interação (K_b) e o coeficiente estequiométrico (n) para o complexo proteína/ligante podem ser obtidos por meio da equação do logaritmo duplo modificado (Equação 3) (KSENOFONTOV; BOCHAROV; ANTINA, 2019).

$$\log \left[\frac{F_0 - F}{F} \right] = \log K_b + n \log \frac{1}{([L] - \frac{F_0 - F}{F_0})[P]} \quad (3)$$

em que F_0 e F são a intensidade de fluorescência da proteína (P) na ausência e presença de ligante (L), respectivamente, K_b é a constante de interação, n é o coeficiente estequiométrico, $[L]$ é a concentração total de ligante, e $[P]$ é a concentração total de proteína. Deste modo, ao ser plotado gráfico de $\log \left[\frac{F_0 - F}{F} \right]$ versus $\log \frac{1}{([L] - \frac{F_0 - F}{F_0})[P]}$, o intercepto da curva é o $\log K_b$ e a inclinação, o n .

A obtenção de K_b é importante pois possui relação direta com a variação da energia livre de Gibbs padrão de formação do complexo (ΔG°) (Equação 4).

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_b \quad (4)$$

Nessa equação, R é a constante universal dos gases ($R = 8,314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$) e T é a temperatura (K).

O valor de ΔG° possui duas componentes, uma entálpica e outra entrópica. A determinação dessas duas componentes fornece informações importantes sobre o tipo e magnitude das forças motrizes que governam a formação do complexo. Quando a variação da entalpia padrão (ΔH°) de formação do complexo é constante na faixa

de temperatura estudada, ou seja, não varia com a temperatura, o valor de ΔH° pode ser determinado por meio da aproximação de van't Hoff (Equação 5).

$$\ln \frac{K_{a1}}{K_{a2}} = -\frac{\Delta H}{R} \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right) \quad (5)$$

Ao fazer um gráfico de $\ln K_b$ versus $1/T$, a inclinação será o valor de $-\Delta H^\circ/R$. Como o R ($8,314 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$) é uma constante conhecida, é possível calcular o valor de ΔH° do processo de formação do complexo.

Quando a ΔH° para a formação do complexo não é constante na faixa de temperatura estudada, então pode ser calculada para cada temperatura, usando a abordagem não linear de Van't Hoff ((Eq. (6) e (Eq. (7)) (DA SILVA et al., 2008; VIEIRA; BASSO; COSTA-FILHO, 2017).

$$\ln K_b = a + b \left(\frac{1}{T} \right) + c \left(\frac{1}{T} \right)^2 + d \left(\frac{1}{T} \right)^3 + \dots + \ln \varphi \quad (6)$$

$$\Delta H^\circ = -R \frac{d \ln K_b}{d \left(\frac{1}{T} \right)} \rightarrow \Delta H^\circ = -R \left[b + 2c \left(\frac{1}{T} \right) + 3d \left(\frac{1}{T} \right)^2 + \dots \right] \quad (7)$$

onde a, b, c, d e $\ln \varphi$ podem ser avaliados a partir dos gráficos $\ln K_b$ versus $1/T$ (gráfico não linear de van't Hoff) usando um procedimento de regressão de mínimos quadrados.

Uma vez que os parâmetros ΔG° e ΔH° foram calculados, a equação fundamental de Gibbs (Equação 8) permite a obtenção do termo entrópico em todas as temperaturas estudadas.

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T \Delta S^\circ \quad (8)$$

Outra propriedade que pode fornecer informações importantes sobre o tipo e magnitude das forças motrizes que governam a formação do complexo é a variação da capacidade calorífica padrão (ΔC_p°), que pode ser determinada a partir da dependência de ΔH° em função da temperatura (T) usando a Equação 9 (BASU; SURESH KUMAR, 2015).

$$\Delta C_p^\circ = \frac{\partial(\Delta H^\circ)}{\partial T} \quad (9)$$

ΔC_p° pode ser expresso pela Eq. 10:

$$\Delta C_p^\circ = C_p^\circ_{Complexo} - (C_p^\circ_{\beta CN} + C_p^\circ_{NR}) \quad (10)$$

onde $C_p^\circ_{Complexo}$ é a capacidade calorífica padrão do complexo β -CN/NR e $C_p^\circ_{\beta CN}$ e $C_p^\circ_{NR}$ são a capacidade calorífica padrão das moléculas livres de β -CN e NR, respectivamente.

SILVA et al., (2018) estudaram a interação entre β -caroteno (β -car) e albumina do soro bovino (BSA) ou β -caseína (β CN), assim como a fotoestabilidade deste bioativo na presença das proteínas. O estudo de fluorescência foi realizado em pH 7,0 em cinco diferentes temperaturas (20, 25, 37, 45 e 55 °C). A intensidade de fluorescência de ambas as proteínas diminuiu gradualmente com o aumento da concentração de β -car, sendo o mecanismo de extinção de fluorescência principalmente estático. O complexo formado (β -car / proteína) apresentou estequiometria de 1:1 para BSA nativa, 1:3 para BSA desnaturada (d-BSA) e 1:2 para β -caseína. Os valores obtidos para ΔG° foram negativos, para todos os sistemas estudados, e seguiu a ordem ΔG° (BSA) < ΔG° (β CN) < ΔG° (d-BSA), indicando que o equilíbrio químico favoreceu a formação do complexo, sendo esses complexos mais estáveis com o aumento da temperatura. Os valores de ΔH° e de ΔS° positivos indicaram que os processos termodinâmicos de formação dos respectivos complexos β -car/proteína foi dirigida pelo aumento da entropia, em todas as condições estudadas. A formação dos complexos β -car/proteína melhorou a fotoestabilidade da molécula de β -car, mas a micela com β CN foi mais eficiente, reduzindo e aumentando quatro vezes, respectivamente, a constante de degradação (K_d) e meia-vida ($t_{1/2}$) do β -car.

WEI et al., (2018) estudaram a interação entre antocianinas (cianidina-3-O-galactosídeo, cianidina-3-O-glicosídeo, amidalina e quercetina) e β -caseína (β CN) por técnicas de espectroscopia de fluorescência, espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e dicroísmo circular (CD) (pH 6,0 e T = 20, 44 e 64

°C). Os resultados de fluorescência revelaram que o aumento da concentração de antocianinas reduziu a intensidade de fluorescência da β CN e o comprimento de onda de máxima emissão (λ_{\max}) teve um desvio para o vermelho, indicando que o microambiente próximo ao resíduo de triptofano (Trp) e tirosina foram expostos a uma região mais hidrofílica. Os valores de K_{sv} diminuíram com o aumento da temperatura para todas as antocianinas, indicando que o mecanismo de extinção é predominantemente estático. Os valores de ΔG° foram negativos para todos os sistemas estudados, indicando que o equilíbrio químico favoreceu a formação do complexo. O ΔH° positivo indicou um processo endotérmico, com a formação do complexo entre β CN e antocianinas regido pelo efeito hidrofóbico ($\Delta H^\circ > 0$ e $\Delta S^\circ > 0$). Os resultados de FTIR e CD mostraram que a interação das antocianinas com β CN induziu a mudança conformacional e a estrutura secundária da proteína. A mudança conformacional da β CN confirmou a maior estabilidade das antocianinas após a ligação com β CN.

HE et al. (2016) estudaram as interações da α -caseína e β -caseína (β CN) com malvidina-3-*O*-glucósido (MG) foram examinadas em pH 6,3 por meio de técnicas de espectroscopia de fluorescência, infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e dicroísmo circular (CD). O dicroísmo circular e os dados de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier mostraram que houve interações de α -caseína e β CN com a molécula MG, principalmente por meio de interações hidrofóbicas e hidrofílicas, causando diferentes alterações nas estruturas secundárias dessas proteínas. Os resultados de fluorescência revelaram que os valores de K_b foi da ordem de $10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$, na qual a α -caseína teve uma interação ligeiramente mais forte com a MG do que a β -caseína, com K_b igual a $0,51 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$ e $0,46 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$, respectivamente. Além disso, o valor de “n” foi de aproximadamente 1, o que indicou que havia pelo menos um sítio de ligação tanto na α -caseína quanto na β CN para uma molécula MG durante as respectivas interações. Os valores de ΔG° para α -caseína e β CN foram todos negativos, indicando que a interação favoreceu a formação de complexos entre α -caseína/MG e β CN/MG. Para a interação α -caseína/MG, $\Delta H^\circ < 0$ e $\Delta S^\circ < 0$, indicando que a formação do complexo foi entalpicamente dirigida. Já para o complexo β CN/MG, $\Delta H^\circ > 0$ e $\Delta S^\circ > 0$ indicaram que a formação do complexo foi dirigida pelo aumento da entropia.

Moeiniafshari et al. (2015) estudaram a interação entre naringenina e β -caseína (β CN) abaixo da concentração micelar crítica ($10 \mu\text{M}$) em pH 7,0 por meio da técnica de espectroscopia de fluorescência. O valor de K_b foi na ordem de $10^5 \text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$ e a estequiometria 1:1. Os valores de ΔG° negativos mostrou que o equilíbrio químico favoreceu a formação do complexo naringenina/ β CN. Os valores de ΔS° ($46,31 \text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$) e de ΔH° ($-17,62 \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) indicaram um processo dirigido entrópica e entalpicamente. Concluiu-se que a naringenina pode suprimir a fluorescência intrínseca do resíduo Trp143, e as forças de van der Waals, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas desempenharam papéis principais no processo de formação do complexo naringenina/ β CN.

3.3.2. Ressonância plasmônica de superfície (RPS)

Apesar da eficiência da análise de extinção de emissão de fluorescência para determinar os parâmetros termodinâmicos de interação entre proteínas e pequenos ligantes, esta técnica fornece informações que são restritas as interações que ocorrem em torno dos resíduos de Trp. Assim, a RPS como técnica complementar para caracterizar os eventos termodinâmicos da complexação de pequenas moléculas-proteínas fornece dados detalhados sobre as interações que ocorrem em todos os locais de ligação de biomoléculas. Portanto, a RPS como técnica livre de marcador é considerada um método muito sensível para estudar a termodinâmica e cinética de interações entre pequenas moléculas e proteínas (LELIS et al., 2017). Além disso, a RPS é uma técnica não destrutiva, ajuda a minimizar o uso da amostra, pois a mesma superfície pode ser reutilizada para vários analitos (VACHALI et al., 2015).

O instrumento RPS (Figura 4) é uma técnica que se baseia nas mudanças do índice de refração do solvente próximo à superfície do chip que ocorre durante a formação do complexo. Para investigar os processos de interação usando RPS, um dos reagentes, referido como ligante, está ligado à superfície de um chip sensor, enquanto que o outro, o analito, está em solução (BAHRI et al., 2019b). Esse chip é composto por uma camada de vidro, uma fina camada de ouro e uma de carboximetildextrana, onde a proteína se ligará.

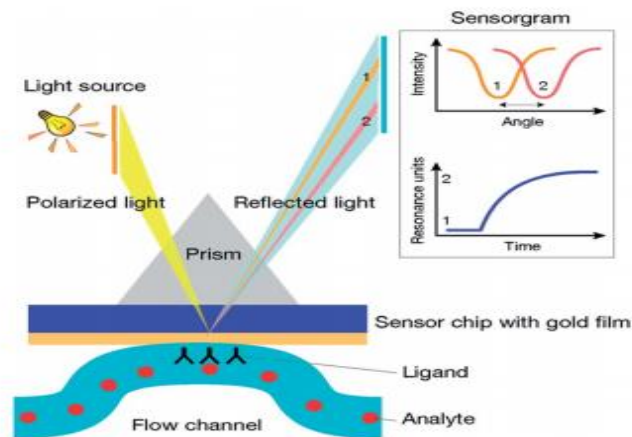


Figura 4 – Configuração esquemática de um detector RPS. Em um ângulo de incidência definido, o fenômeno de RPS é visto como um mergulho na intensidade da luz refletida, característica do ângulo específico de reflexão. O deslocamento do ângulo de reflexão da posição 1 para a posição 2 revela uma mudança na composição do meio perto do filme de ouro como resultado da ligação entre o ligando e o analito. As variações angulares são registradas em unidades de ressonância (UR) e plotados em função do tempo. Fonte: Adaptado de BROGIONI & BERTI (2014).

Após a imobilização do ligante no chip, uma solução tampão é injetada e passará pela superfície desse chip e então o equipamento irá incidir uma luz sobre esse chip, grande parte dessa luz será refletida e voltará ao detector. Uma pequena parte (radiação evanescente) conseguirá ultrapassar a superfície do chip, o equipamento irá buscar um ângulo θ , chamado θ_1 que fará com que os elétrons da camada de ouro entre em ressonância plasmônica com essa radiação evanescente. A partir daí será injetada a solução do analito. Novamente, o equipamento buscará um ângulo θ , agora chamado θ_2 que fará ocorrer a ressonância plasmônica. A diferença entre os dois ângulos θ é o sinal de resposta ressonante RU, que plotado em função do tempo origina os sensogramas (Figura 5) (NGUYEN, PARK, KANG, & KIM, 2015; P. VACHALI, LI, NELSON, & BERNSTEIN, 2012; P. VACHALI, LI, BARTSCHI, & BERNSTEIN, 2015).

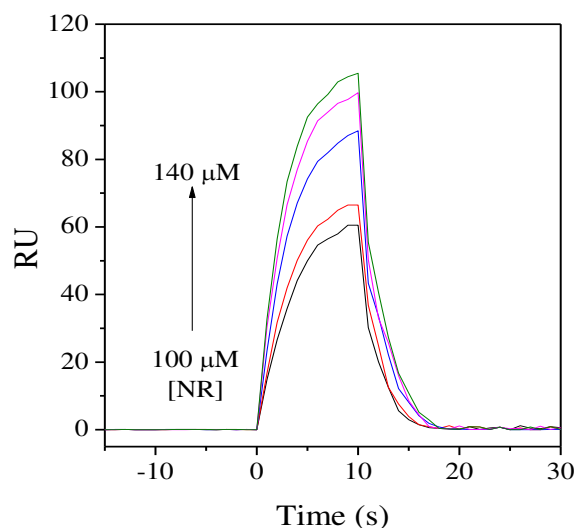


Figura 5 – Sensorgramas obtidos à 25 °C (RU vs tempo) para o fluxo de naringina sobre o chip sensor CM5 imobilizado com β CN. Concentrações de naringina: 100, 110, 120, 130 e 140. Fonte: Figura retirada dos resultados dessa dissertação.

Ao analisar a dependência do sinal RPS (RU) no tempo, é possível obter informações cinéticas e termodinâmicas valiosas sobre as interações moleculares entre proteínas-analito, tais como constante cinética de associação (K_a), constante cinética de dissociação (K_d), energias de ativação de associação ($E_{ativ(a)}$) e de dissociação ($E_{ativ(d)}$), variações de entalpia de associação ($\Delta H^\ddagger_{(a)}$) e de dissociação ($\Delta H^\ddagger_{(d)}$), variações de energia livre de Gibbs de associação ($\Delta G^\ddagger_{(a)}$) e de dissociação ($\Delta G^\ddagger_{(d)}$) e variações de entropia de associação ($\Delta S^\ddagger_{(a)}$) e de dissociação ($\Delta S^\ddagger_{(d)}$), constante de ligação (K_b), variação da energia livre de Gibbs padrão (ΔG°), variação da entalpia padrão (ΔH°) e variação da entropia padrão (ΔS°) (HUDSON et al., 2019b).

A interação entre proteína (P) e analito (A) pode ser expressa usando um modelo biomolecular que pode ser expresso como: $P + A \xrightleftharpoons[K_d]{K_a} P-A$, onde K_a é o número de moléculas de analito que formam complexos com a proteína e K_d é a fração destes complexos que se dissociam por segundo. Todos os sensorgramas foram ajustados às Equações 11 e 12, a partir das quais K_{obs} e K_d foram calculados, respectivamente (HUDSON et al., 2019b).

$$RU(t) = RU_{max}[1 - e^{-K_{obs}(t-t_0)}] \quad (\text{Eq. 11})$$

$$RU(t) = RU_{max}e^{-K_d(t-t_m)} \quad (\text{Eq. 12})$$

em que $RU(t)$ é a resposta ressonante no tempo t , RU_{max} é a resposta ressonante máxima, t_m é o tempo de ressonância (tempo no qual a resposta ressonante é máxima), t_0 é o tempo correspondente ao momento da injeção, K_{obs} é a constante observada e K_d é a constante cinética de dissociação.

Em baixas concentrações de ligante, a constante cinética observada (K_{obs}) pode ser considerada linearmente dependente da concentração do analito ($K_{obs} = K_a [\text{analito}] + K_d$). Assim, os valores de K_a podem ser determinados a partir da inclinação do gráfico K_{obs} *versus* [analito]. A constante de interação (K_b) pode ser determinada a partir da relação entre as constantes da taxa cinética de associação (k_a) e dissociação (k_d) ($K_b = K_a / K_d$), e assim, aplicando-se as Equações 4, 5 e 8, determina-se os parâmetros termodinâmicos ΔG° , ΔH° e ΔS° de formação do complexo proteína-analito, respectivamente (HUDSON et al., 2019b).

As energias de ativação para a formação do complexo ativado por associação ($E_{ativ(a)}$) ou dissociação ($E_{ativ(d)}$) pode ser obtido pela abordagem de Arrhenius ($\ln k_x$ ($x = a$ ou d) vs. $1 / T$), aplicando a Eq. (13).

$$E_{ativ(x)}(T) = -R \left(\frac{d \ln k_x}{dT} \right) \quad (\text{Eq. 13})$$

em que $E_{ativ(x)}(T)$ é a energia de ativação ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), K_x é a constante cinética ($\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ou s^{-1}) e “ x ” subscrito significa “ a ” ou “ d ” para associação e dissociação, respectivamente.

Outros parâmetros energéticos associados a formação do complexo variação da energia livre de Gibbs (ΔG_x^\ddagger), variação da entalpia (ΔH_x^\ddagger) e variação da entropia (ΔS_x^\ddagger) de ativação podem ser obtidos pelas Eqs. (14), (15), (16), respectivamente.

$$\Delta G_x^\ddagger(T) = -RT \ln k_x(T) \quad (\text{Eq. 14})$$

$$\Delta H_x^\ddagger(T) = E_{act(x)}(T) - RT \quad (\text{Eq. 15})$$

$$T\Delta S_x^\ddagger(T) = \Delta H_x^\ddagger(T) - \Delta G_x^\ddagger(T) \quad (\text{Eq. 16})$$

BAHRI et al., (2019) avaliaram a interação entre compostos bioativos (curcumina e a vitamina D3) e β -caseína (β CN) por meio da Espectroscopia de Fluorescência (EF) e da Ressonância Plasmônica de Superfície (RPS). As análises de EF mostraram que o aumento das concentrações de curcumina e da vitamina D3 diminuíram a intensidade de fluorescência da β CN, e o mecanismo de extinção foi principalmente devido ao quenching estático. Os valores de n para os complexos β CN/curcumina e β CN vitamina D3 foram $0,74 \pm 0,05$ e $0,82 \pm 0,04$, respectivamente. Os valores da constante de interação (K_b) mostraram que a curcumina se liga mais fortemente a β CN ($K_b = 23,5 \pm 1,9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) do que a vitamina D3 ($K_b = 5,8 \pm 1,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$). Por RPS, o valor de K_b para o complexo curcumina/ β CN ($K_b = 2,45 \pm 1,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$) foi menor do que a obtida por fluorescência. Essa diferença pode ser atribuída aos diferentes princípios dessas duas técnicas. A extinção de fluorescência é mais precisa para estudar os locais de ligação ao redor dos resíduos de Trp enquanto a técnica RPS é independente do resíduo de Trp, estudando as interações que ocorrem em todos os sítios da proteína. No entanto, ambos os métodos podem ser usados para avaliar as interações entre compostos bioativos e β CN.

REZENDE et al. (2019) estudaram a interação entre lactoferrina bovina (bLF) e epigallocatequina-3-galato (EGCG) por Ressonância Plasmônica de Superfície (RPS) e Espectroscopia de Fluorescência (EF). As análises de RPS e EF mostrou que o equilíbrio químico favoreceu a formação do complexo bLF-EGCG ($\Delta G^\circ_{\text{RPS}} < 0$, $\Delta G^\circ_{\text{EF}} < 0$) e que o processo de complexação entropicamente dirigido ($\Delta H^\circ_{\text{RPS}} > 0$, $\Delta H^\circ_{\text{EF}} > 0$ e $T\Delta S^\circ_{\text{RPS}} > 0$, $T\Delta S^\circ_{\text{EF}} > 0$). A energia de ativação (E_{act}) para a formação do complexo ativado a partir da associação de moléculas livres ($E_{\text{act(a)}} = 49,5 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) e da dissociação do complexo termodinamicamente estável ($E_{\text{act(d)}} = 17,4 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) foram ambos positivos, mostrando que o processo de associação absorveu 1,4 vezes mais energia que o processo de dissociação. Os demais parâmetros energéticos obtidos também foram positivos para ambos os processos ($\Delta G^\ddagger_{\text{(a)}} = 49,1 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\Delta G^\ddagger_{\text{(d)}} = 77,9 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\Delta H^\ddagger_{\text{(a)}} = 47,0 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ e $\Delta H^\ddagger_{\text{(d)}} = 32,8 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), exceto para $T\Delta S^\ddagger$ ($T\Delta S^\ddagger_{\text{(a)}} = -2,10 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ e $T\Delta S^\ddagger_{\text{(d)}} = -45,10 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$). Este estudo fornece informações úteis para otimizar as aplicações práticas do EGCG e da bLF em diferentes formulações.

NUNES et al. (2019) estudaram a interação da naringina (NR) com a lactoferrina (LF) por ressonância plasmônica de superfície (RPS) em diferentes

temperaturas (12, 16, 20, 24, 25 e 28 °C) e pH 7,4. Os resultados de RPS mostraram que com o aumento da temperatura, a constante de associação (k_a) apresentou uma tendência polinomial, enquanto a constante de dissociação (k_d) mostrou um comportamento linear. Os parâmetros cinéticos energéticos resultantes da formação do complexo intermediário a partir da associação das moléculas livres de interação (NR e LF) ou da dissociação do complexo LF/NR estável termodinâmico foram encontrados. Na associação, a $E_{act(a)}$ foi dependente da temperatura enquanto que na dissociação, a $E_{act(d)}$ foi independente da temperatura, o que sugere que a associação de NR e LF para formar o complexo LF/NR intermediário ocorreu em múltiplas etapas, enquanto a dissociação do complexo estável NR e LF para formar o complexo LF/NR intermediário ocorreu em uma única etapa. A formação do complexo intermediário ocorreu com alto nível de solvatação, custo energético e mudança de configuração na LF para sua formação. Os parâmetros termodinâmicos obtidos para a ligação de LF/NR mostraram que até 23 °C, a formação do complexo foi entropicamente dirigida, entretanto, acima dessa temperatura, os complexos LF/NR termodinamicamente estáveis foram formados pela redução de entalpia do sistema. O valor negativo de ΔC_p° indicou as interações que ocorrem quando o complexo LF/NR termodinamicamente estável é formado, é mais fraca do que aquelas que ocorrem antes da formação do complexo. Os resultados mostram que a LF pode ser utilizado como veículo para NR.

SHARIFI et al. (2017) estudaram a interação entre albumina do soro bovina (BSA) e neomicina, usando o *docking* molecular e a ressonância plasmônica de superfície (RPS) em diferentes temperaturas (25, 30, 35 e 40 °C). Os resultados do RPS mostraram que a constante de associação ($4,05 \times 10^2$ para $5,54 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) e a constante de dissociação ($8,96 \times 10^{-3}$ para $2,75 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$) aumentaram com o aumento da temperatura, indicando que tanto a associação das moléculas livres como a dissociação do complexo estável ocorreu em uma única etapa. A constante de equilíbrio (K_D) diminuiu de $2,21 \times 10^{-5}$ para $4,96 \times 10^{-7} \text{ M}$ com o aumento da temperatura, devido aos valores da constante de associação aumentarem cerca de 140 vezes com a temperatura, enquanto, os valores da constante de dissociação aumentarem apenas cerca de 3 vezes com a temperatura. Os valores da energia livre de Gibbs (ΔG°) foram positivos ($3,83 \times 10^2$, $4,33 \times 10^2$, $4,83 \times 10^2$ e $5,34 \times 10^2 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ a 25, 30, 35 e 40 °C, respectivamente) e o valor negativo da variação da

entalpia padrão ($\Delta H^\circ = -1,81 \times 10^2 \text{ KJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) e da variação da entropia padrão ($\Delta S^\circ = -6,97 \times 10^2 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$) indicou que a formação do complexo BSA/neomicina foi dirigida pela entropia. De acordo com o estudo de *docking* molecular, a ligação do hidrogênio tem algumas contribuições na interação da neomicina com a BSA, devido a presença de aminoácidos hidrofílicos como o ácido aspártico.

4. Referências

- ABDELHAMEED, A. S. et al. Spectrochimica Acta Part A : Molecular and Biomolecular Spectroscopy Fluorescence spectroscopic and molecular docking studies of the binding interaction between the new anaplastic lymphoma kinase inhibitor crizotinib and bovine serum albumin. **SAA**, v. 171, p. 174–182, 2017.
- ABDULLAH, S. M. S. et al. A spectroscopic and molecular docking approach on the binding of tinzaparin sodium with human serum albumin. **Journal of Molecular Structure**, v. 1127, p. 283–288, 2017.
- ATAMER, Z. et al. Bovine β -casein: Isolation, properties and functionality. A review. **International Dairy Journal**, v. 66, p. 115–125, 2017.
- BAHRI, A. et al. Binding analysis between monomeric β -casein and hydrophobic bioactive compounds investigated by surface plasmon resonance and fluorescence spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 286, n. February, p. 289–296, 2019a.
- BAHRI, A. et al. Binding analysis between monomeric β -casein and hydrophobic bioactive compounds investigated by surface plasmon resonance and fluorescence spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 286, n. February, p. 289–296, jul. 2019b.
- BASU, A.; KUMAR, G. S. Thermodynamics of the interaction of the food additive tartrazine with serum albumins: a microcalorimetric investigation. **Food chemistry**, v. 175, p. 137–42, 15 maio 2015.
- BROGIONI, B.; BERTI, F. Surface plasmon resonance for the characterization of bacterial polysaccharide antigens: A review. **MedChemComm**, v. 5, n. 8, p. 1058–1066, 2014.
- CAO, X. et al. Elucidating the interaction mechanism of eriocitrin with β -casein by multi-spectroscopic and molecular simulation methods. **Food Hydrocolloids**, v. 94, n. March, p. 63–70, 2019a.
- CHANET, A. et al. Naringin, the major grapefruit flavonoid, specifically affects atherosclerosis development in diet-induced hypercholesterolemia in mice. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 23, n. 5, p. 469–477, 2012.
- CHEN, M. et al. Foam and thin films of hydrophilic silica particles modified by β -casein. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 513, p. 357–366, 2018.
- CHTOUROU, Y. et al. Anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of naringin on cisplatin-induced renal injury in the rat. **Chemico-Biological Interactions**, v. 243, p. 1–9, 2016.
- CUI, L. et al. Effect of β -Cyclodextrin Complexation on Solubility and Enzymatic Conversion of Naringin. p. 14251–14261, 2012.
- DA SILVA, L. H. M. et al. PEO-[M(CN)5NO]_x-(M = Fe, Mn, or Cr) interaction as a driving force in the partitioning of the pentacyanonitrosylmetallate anion in ATPS: Strong effect of the central atom. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 112, n. 37, p. 11669–11678, 2008.

- DAS, S. et al. Binding of naringin and naringenin with hen egg white lysozyme: A spectroscopic investigation and molecular docking study. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 192, p. 211–221, mar. 2018.
- DAUPHAS, S. et al. The supramolecular organisation of β -casein: Effect on interfacial properties. **Food Hydrocolloids**, v. 19, n. 3, p. 387–393, 2005.
- DE PAULA REZENDE, J. et al. Thermodynamic and kinetic study of epigallocatechin-3-gallate-bovine lactoferrin complex formation determined by surface plasmon resonance (SPR): A comparative study with fluorescence spectroscopy. **Food Hydrocolloids**, v. 95, n. April, p. 526–532, 2019.
- DEZHAMPANAH, H.; ESMAILI, M.; KHORSHIDI, A. Milk β -casein as a vehicle for delivery of bis(indolyl)methane: Spectroscopy and molecular docking studies. **Journal of Molecular Structure**, v. 1136, p. 50–58, 2017.
- DICKINSON, E. Milk protein interfacial layers and the relationship to emulsion stability and rheology. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 20, n. 3, p. 197–210, 2001.
- EL-DESOKY, A. H. et al. Anti-inflammatory and antioxidant activities of naringin isolated from *Carissa carandas* L.: In vitro and in vivo evidence. **Phytomedicine**, v. 42, n. March, p. 126–134, 2018a.
- ELZOGHBY, A. O.; EL-FOTOH, W. S. A.; ELGINDY, N. A. Casein-based formulations as promising controlled release drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 153, n. 3, p. 206–216, 2011.
- FALCO, W. F. et al. Interaction between chlorophyll and silver nanoparticles: A close analysis of chlorophyll fluorescence quenching. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 299, p. 203–209, fev. 2015.
- FUNCT, F. et al. Stability and bioavailability of vitamin D nanoencapsulated in casein micelles. **Food & Function**, p. 737–744, 2012.
- GHOSH, K.; RATHI, S.; ARORA, D. Fluorescence spectral studies on interaction of fluorescent probes with Bovine Serum Albumin (BSA). **Journal of Luminescence**, v. 175, p. 135–140, 2016.
- GŁĄB, T. K.; BORATYŃSKI, J. Potential of Casein as a Carrier for Biologically Active Agents. **Topics in Current Chemistry**, v. 375, n. 4, p. 71, 15 ago. 2017.
- HE, L. et al. Study on the interaction between promethazine hydrochloride and bovine serum albumin by fluorescence spectroscopy. **Journal of Luminescence**, v. 131, n. 2, p. 285–290, 2011.
- HE, Z. et al. Interactions of milk α - And β -casein with malvidin-3-O-glucoside and their effects on the stability of grape skin anthocyanin extracts. **Food Chemistry**, v. 199, p. 314–322, 2016.
- HUAN, H. et al. Experimental and computational studies of naringin / cyclodextrin inclusion complexation. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 88, n. 1, p. 15–26, 2017.

HUDSON, E. A. et al. Thermodynamic and kinetic analyses of curcumin and bovine serum albumin binding. **Food Chemistry**, v. 242, p. 505–512, 1 mar. 2018.

HUDSON, E. A. et al. Energetic parameters of β -casein/quercetin activated and thermodynamically stable complex formation accessed by Surface Plasmon Resonance. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 181, n. April, p. 798–805, 2019a.

HUDSON, E. A. et al. Curcumin-micellar casein multisite interactions elucidated by surface plasmon resonance. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 133, p. 860–866, 2019b.

JAIN, M.; PARMAR, H. S. Evaluation of antioxidative and anti-inflammatory potential of hesperidin and naringin on the rat air pouch model of inflammation. **Inflammation Research**, v. 60, n. 5, p. 483–491, 2011.

KSENOFONTOV, A. A.; BOCHAROV, P. S.; ANTINA, E. V. Interaction of tetramethyl-substituted BODIPY dye with bovine serum albumin: Spectroscopic study and molecular docking. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 368, n. September 2018, p. 254–257, jan. 2019.

LAKOWICZ, J. R. Principles of fluorescence spectroscopy. 3rd ed., New York: **Springer**, 954 p, 2006.

LELIS, C. A. et al. Determination of driving forces for bovine serum albumin-Ponceau4R binding using surface plasmon resonance and fluorescence spectroscopy: A comparative study. **Food Hydrocolloids**, v. 70, p. 29–35, 2017a.

LELIS, C. A. et al. Binding thermodynamics of synthetic dye Allura Red with bovine serum albumin. **Food Chemistry**, v. 217, n. 2017, p. 52–58, fev. 2017b.

LI, M. et al. Covalent labelling of β -casein and its effect on the microstructure and physico-chemical properties of emulsions stabilized by β -casein and whey protein. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 504–513, 2016.

LI, M. et al. Bovine beta-casein micelles as delivery systems for hydrophobic flavonoids. **Food Hydrocolloids**, jun. 2019.

LI, T. et al. Comparing the binding interaction between β -lactoglobulin and flavonoids with different structure by multi-spectroscopy analysis and molecular docking. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 2018.

LIU, X. et al. Investigation of the interaction for three Citrus flavonoids and α -amylase by surface plasmon resonance. **Food Research International**, v. 97, p. 1–6, 2017a.

LIVNEY, Y. D. Milk proteins as vehicles for bioactives. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 15, n. 1–2, p. 73–83, 2010.

MADUNIĆ, J. et al. Apigenin: A dietary flavonoid with diverse anticancer properties. **Cancer Letters**, v. 413, p. 11–22, 2018.

MANDAL, S. et al. Interaction of carbon nanoparticles to serum albumin: Elucidation of the extent of perturbation of serum albumin conformations and thermodynamical

- parameters. **Journal of Hazardous Materials**, v. 248–249, n. 1, p. 238–245, 2013.
- MELLOU, F. et al. Biocatalytic preparation of acylated derivatives of flavonoid glycosides enhances their antioxidant and antimicrobial activity. **Journal of Biotechnology**, v. 116, n. 3, p. 295–304, 2005.
- MOEINIAFSHARI, A.-A.; ZARRABI, A.; BORDBAR, A.-K. Exploring the interaction of naringenin with bovine beta-casein nanoparticles using spectroscopy. **Food Hydrocolloids**, v. 51, p. 1–6, 2015.
- NEUHOUSER, M. L. Review: Dietary Flavonoids and Cancer Risk: Evidence From Human Population Studies. **Nutrition and Cancer**, v. 50, n. 1, p. 1–7, 2004.
- NGUYEN, H. et al. Surface Plasmon Resonance: A Versatile Technique for Biosensor Applications. **Sensors**, v. 15, n. 5, p. 10481–10510, 5 maio 2015.
- NUNES, N. M. et al. Surface plasmon resonance study of interaction between lactoferrin and naringin. **Food Chemistry**, v. 297, p. 125022, nov. 2019.
- NZUZA, S.; OWIRA, P. Naringin abrogates HIV-1 protease inhibitors-induced atherogenic dyslipidemia and oxidative stress in vivo. **Journal of Functional Foods**, v. 52, p. 156–164, jan. 2019.
- ORTEGA-REQUENA, S.; REBOUILLAT, S. Bigger data open innovation: Potential applications of value-added products from milk and sustainable valorization of by-products from the dairy industry. **Green Chemistry**, v. 17, n. 12, p. 5100–5113, 2015.
- PATHAK, N. et al. Cancer chemopreventive effects of the flavonoid-rich fraction isolated from papaya seeds. **Nutrition and Cancer**, v. 66, n. 5, p. 857–871, 2014.
- PLEGUEZUELOS-VILLA, M.; MIR-PALOMO, S.; DÍEZ-SALES, O. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces A novel ultradeformable liposomes of Naringin for anti-inflammatory therapy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 162, p. 265–270, 2018.
- RAO, K. et al. Gum tragacanth stabilized green gold nanoparticles as cargos for Naringin loading: A morphological investigation through AFM. **Carbohydrate Polymers**, v. 174, p. 243–252, 2017.
- RODRIGUEZ, A. et al. Metabolic engineering of yeast for fermentative production of flavonoids. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 1645–1654, 2017.
- ROY, A. S. et al. A spectroscopic study of the interaction of the antioxidant naringin with bovine serum albumin. **Journal of Biophysical Chemistry**, v. 01, n. 03, p. 141–152, 2010.
- SALAS, M. P. et al. Antifungal activity of natural and enzymatically-modified flavonoids isolated from citrus species. **Food Chemistry**, v. 124, n. 4, p. 1411–1415, 2011.
- SEQUETTO, P. L. et al. Naringin accelerates the regression of pre-neoplastic lesions and the colorectal structural reorganization in a murine model of chemical

carcinogenesis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 64, p. 200–209, 2014.

SHAHABADI, N. et al. Multispectroscopic studies on the interaction of 2-tert-butylhydroquinone (TBHQ), a food additive, with bovine serum albumin. **Food Chemistry**, v. 124, n. 3, p. 1063–1068, 2011.

SHAHABADI, N.; HADIDI, S. Spectrochimica Acta Part A : Molecular and Biomolecular Spectroscopy Molecular modeling and spectroscopic studies on the interaction of the chiral drug venlafaxine hydrochloride with bovine serum albumin. **Spectrochimica ACTA PART A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 122, p. 100–106, 2014.

SHAPIRA, A. et al. β -casein – based nanovehicles for oral delivery of chemotherapeutic drugs : drug-protein interactions and mitoxantrone loading capacity. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, n. 4, p. 547–555, 2010.

SHARIFI, M. et al. Surface plasmon resonance and molecular docking studies of bovine serum albumin interaction with neomycin: Kinetic and thermodynamic analysis. **BiolImpacts**, v. 7, n. 2, p. 91–97, 2017.

SHPIGELMAN, A. et al. β -Lactoglobulin-naringenin complexes: Nano-vehicles for the delivery of a hydrophobic nutraceutical. **Food Hydrocolloids**, v. 40, p. 214–224, 2014.

SHU, Y. et al. Interaction of erucic acid with bovine serum albumin using a multi-spectroscopic method and molecular docking technique. **Food Chemistry**, v. 173, p. 31–37, 2015.

SILVA, C. E. L. et al. β -Carotene and Milk Protein Complexation: a Thermodynamic Approach and a Photo Stabilization Study. **Food and Bioprocess Technology**, v. 11, n. 3, p. 610–620, 2018.

SINHA, S. et al. Interaction of bovine serum albumin with cationic monomeric and dimeric surfactants: A comparative study. **Journal of Molecular Liquids**, v. 218, p. 421–428, 2016.

SVENSSON, O.; KURUT, A.; SKEPÖ, M. Adsorption of β -casein to hydrophilic silica surfaces. Effect of pH and electrolyte. **Food Hydrocolloids**, v. 36, p. 332–338, 2014.

VACHALI, P. et al. Surface plasmon resonance (SPR) studies on the interactions of carotenoids and their binding proteins. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 519, n. 1, p. 32–37, 2012.

VACHALI, P. P. et al. Surface plasmon resonance (SPR)-based biosensor technology for the quantitative characterization of protein-carotenoid interactions. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 572, p. 66–72, 2015.

VIEIRA, E. D.; BASSO, L. G. M.; COSTA-FILHO, A. J. Non-linear van't Hoff behavior in pulmonary surfactant model membranes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1859, n. 6, p. 1133–1143, jun. 2017.

WEI, J. et al. Analysis of the interaction mechanism of Anthocyanins (Aronia

melanocarpa Elliot) with β -casein. **Food Hydrocolloids**, v. 84, n. April, p. 276–281, 2018.

WILLIAMSON, G.; MANACH, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans.II.Review of 93 intervention studies. **Am J Clin Nutr**, v. 81, p. 243S–255S, 2005.

YEO, J.; SHAHIDI, F. Analysis of Flavonoid-Protein Interactions by Advanced Techniques. **Encyclopedia of Food Chemistry**, p. 539-543, 2018.

ZHANG, L. N. et al. Synthesis and antimicrobial activities of 7-O-modified genistein derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 7, p. 1543–1551, 2008a.

ZHANG, X. et al. Investigation of the Interaction of Naringin Palmitate with Bovine Serum Albumin: Spectroscopic Analysis and Molecular Docking. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. e59106, 20 mar. 2013.

ZHANG, X. et al. Studies on the interaction of naringin palmitate with lysozyme by spectroscopic analysis. **Journal of Functional Foods**, v. 8, n. 1, p. 331–339, 2014.

ZHANG, Y. et al. Investigation of the interaction between naringin and human serum albumin. **Journal of Molecular Structure**, v. 875, n. 1–3, p. 1–8, 2008b.

Capítulo 2

β -Casein-naringin binding: deep thermodynamic and kinetic analyses by fluorescence spectroscopy and surface plasmon resonance

Abstract

Knowledge of the interactions between bioactive small molecules and proteins is a key factor to improve their use in food and health products. Hence, the binding of naringin (NR) with β -casein (β CN) was investigated to elucidate the binding process between these molecules and intrinsically unstructured proteins. The thermodynamics and kinetics of β CN-NR binding were determined by fluorescence spectroscopy (FS) and surface plasmon resonance (SPR). The FS data indicated that NR interacts with β CN close to tryptophan (Trp-143) with a key role of desolvation (ΔH°_{FS} , 107.43 to -5.34 kJ mol⁻¹; $T\Delta S^{\circ}_{FS}$, 131.09 to 22.43 kJ mol⁻¹; temperature range 20–36 °C). However, SPR analysis revealed that NR can also bind far from Trp-143 with small temperature dependencies of ΔH° and $T\Delta S^{\circ}$ ($\Delta H^{\circ}_{SPR} = 8.85$ kJ mol⁻¹; $T\Delta S^{\circ}_{SPR}$, from 27.56 to 29.11 kJ mol⁻¹; 12–28 °C). Stable complex formation comprises an intermediate state at which an activated complex is formed with minimal conformation and desolvation changes (activation energy parameters are near-independent of the temperature). This is probably due to the ease of access of NR to the β CN binding sites. The results from this study provide valuable information on the dynamics of small molecules binding with unstructured proteins.

Keywords: Bioactive molecules; protein binding; activated complex.

1. Introduction

Naringin (NR) is a flavanone glycoside responsible for the bitter taste in lemons and grapefruit and is found in many citrus fruits. Its molecular weight is 580.4 g/mol and its structure comprises two rhamnose units attached to the 7-carbon position (Fig. 1) (ALAM et al., 2014; DAS et al., 2018). NR exhibits antioxidant, anti-inflammatory (EL-DESOKY et al., 2018b), and anti-obesity properties and has also demonstrated potential in mitigating metabolic complications in HIV patients (NZUZA; OWIRA, 2019). Thus, NR activities afford a wide range of applications in the food and health fields.

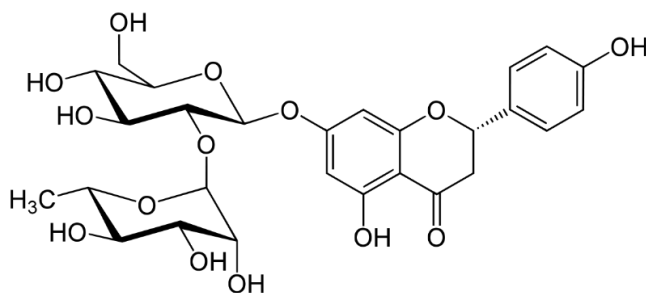


Fig. 1 – Chemical structure of naringin.

To enable the efficient vehiculation of small hydrophobic molecules such as NR, the interactions of such molecules with food proteins have been studied. NR demonstrated complex formation with globular proteins such as hen egg white lysozyme (DAS et al., 2018), α -amylase (LIU et al., 2017b), and bovine lactoferrin (NUNES et al., 2019). However, the molecular processes involving the interaction of NR with globular proteins may be different to those observed with intrinsically unstructured proteins, e.g. β -casein (β CN). β CN is a 24,000 g/mol protein with a high content of proline residues that disrupt the formation of α -helices and β -sheets. β CN presents one tryptophan (Trp) residue (Trp-143) so that alterations occurring close to Trp-143 can be monitored by fluorescence spectroscopy (FS) (BOURASSA; TAJMIR-RIahi, 2012). Due to its amphiphilic characteristic ($>6.8 \times 10^5$ M at 20 °C and pH 7.0), β CN forms classic micelles of ~20 nm diameter (LI et al., 2019). β CN binding with flavonoids has also been reported. Thus, at pH 7.0, β CN binds with naringenin (NG), an aglycone of NR, with a binding constant of 3.2×10^5 M⁻¹ and stoichiometry of ~1 close to the Trp residues at 25 °C. The β CN-NG binding occurs with enthalpic and entropic contributions (MOEINIAFSHARI; ZARRABI; BORDBAR, 2015). β CN also binds with eriocitrin (EC), a flavanone glycoside. FS data demonstrated that the binding constant of β CN-EC binding at 25 °C and pH 7.4 is 1.68×10^5 M⁻¹ and complex formation is an entropy-driven process (CAO et al., 2019b). However, these binding studies were carried out with β CN concentrations above the critical micellar concentration (CMC) and therefore, the available data regards flavonoids binding with micellar structures not β CN monomers. The study of the binding of β CN monomers with small molecules is important to elucidate how these molecules interact with unassembled proteins. These studies become even more relevant when they provide

both thermodynamic and kinetic information on complex formation, giving valuable insight into the dynamics of the binding process. Despite this, to the best of our knowledge, kinetic and thermodynamic data of the binding of β CN monomers with NR has not been reported in the literature to date.

The aim of this study was to provide detailed comprehension of the thermodynamics of β CN–NR binding occurring close to the Trp residues by FS and the kinetics and thermodynamics of β CN–NR binding by surface plasmon resonance (SPR).

2. Material and methods

2.1. Materials and reagents

β CN from bovine milk (>98% wt.) and NR (>95% wt.) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Dimethyl sulfoxide (DMSO; \geq 99.9% wt.) was used to solubilize NR and the buffer solution (pH 7.0) was prepared using dibasic and monobasic potassium phosphate of analytical grade. For SPR analyses, an amine coupling kit with *N*-ethyl-*N'*-(dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDC; >99% wt.), *N*-hydroxysuccinimide (NHS; >99% wt.), and 1.0 M ethanolamine-HCl (pH 8.5) was purchased from the General Electric Healthcare Company (Uppsala, Sweden).

2.2. Apparatus

FS data were recorded on an LS55 fluorescence spectrophotometer (Perkin Elmer, USA), while a Lambda 35 UV-vis Spectrometer (Perkin Elmer, USA) was used to correct the fluorescence results. The SPR binding experiments were carried out using a Biacore X100 instrument (GE Healthcare, USA).

2.3. Thermodynamic analyses of β CN–NR binding by FS

To investigate the NR interactions that occur close to the β CN Trp residue, successive titrations with the NR solution [pH 7.0; 1% (v/v) DMSO] were performed using a quartz cuvette containing 4 μ M β CN dispersion [pH 7.0; 1% (v/v) DMSO]. The NR concentrations in the cuvette were in the range 0.747–7.93 μ M. The samples were excited at the Trp intrinsic fluorescence excitation wavelength (295 nm) and the emission spectra were recorded in the range 296–500 nm. Both the excitation and

emission slits were 5 nm and the binding experiments were conducted at 20, 24, 28, 32, and 36 °C.

The inner filter effect was corrected by collecting the absorbance of the samples at the excitation (295 nm) and emission (340 nm) wavelengths of β CN and applying Eq. 1 to the observed fluorescence intensity (F_{obs}) values (VAN DE WEERT; STELLA, 2011):

$$F_{corr} = F_{obs} e^{\frac{(A_{ex} d_{ex} + A_{em} d_{em})}{2}} \quad (1)$$

where F_{corr} is the corrected fluorescence intensity; A_{ex} and A_{em} are the measured absorbance changes in the absorbance value at 295 and 340 nm, respectively; and d_{ex} and d_{em} are the cuvette pathlengths (cm) in the excitation and emission directions, respectively.

2.4. Thermodynamic and kinetic studies of β CN-NR binding by SPR

To obtain the kinetic and thermodynamic parameters of β CN-NR binding by SPR, a CM5 sensor chip was activated with EDC (0.4 M) and NHS (0.1 M), which were flowed over the CM5 surface for 7 min to allow the reaction between the carboxymethyl-dextran on CM5 and the EDC-NHS. A β CN dispersion (30 μ g/mL) was flowed over the sample channel of the CM5 chip. The protein flow was at pH 4.0 to enhance the reaction. Subsequently, to block the unreacted groups, 0.1 M ethanolamine-HCl (pH 8.5) was flowed over the CM5 chip for 7 min. The signal reading was then recorded and a low density of β CN immobilization (4462.9 RU) was obtained.

NR solutions (100, 110, 120, 130, and 140 μ M) at pH 7.0 were therefore flowed over both the sample and reference channels on the CM5 chip, each characterizing a binding cycle. Between the binding cycles, the baseline was determined by HBS-P buffer (0.01 M HEPES, pH 7.0; 0.15 M NaCl; and 0.005% v/v surfactant P20) injection. The experiments were conducted at 12, 16, 20, 24, 25, and 28 °C and after each experiment HBS-P was flowed twice for 30 s at a flow rate of 30 μ L/min to regenerate the CM5 surface.

3. Results and discussion

3.1. Thermodynamically stable β CN-NR complex

The energetic thermodynamic parameters of β CN-NR complex formation, including the binding constant (K_b), standard Gibbs free energy change (ΔG°), standard enthalpy change (ΔH°), and entropic contribution ($T\Delta S^\circ$) were determined by FS and SPR analyses. In addition, the stoichiometry (n) of the β CN-NR complex and standard heat capacity change of complex formation (ΔCp°) were determined using the data attained by FS, while the association (k_a) and dissociation (k_d) kinetic rate constants related to the thermodynamically stable complex were calculated from the SPR data.

3.1.1. Thermodynamics of β CN-NR binding close to the Trp residues by FS

FS was employed to study the specific NR interactions close to the Trp residue of β CN (Trp-143) located at the hydrophobic domain of the protein (MOEINIAFSHARI; ZARRABI; BORDBAR, 2015). The fluorescence spectra (Fig. 1a) of the samples containing increasing concentrations of NR were obtained upon Trp excitation at 295 nm. When NR was added to the β CN solution, the wavelength of the maximum fluorescence emission remained close to 340 nm, indicating that NR does not induce conformational changes on the Trp microenvironment in the protein (XU et al., 2019). However, NR addition decreased the fluorescence intensity emitted by the protein by ~30%. The fluorescence quenching (Fig. 1a) can be due to various molecular processes including excited-state reactions, molecular rearrangements, energy transfer, molecular collisions, and ground-state complex formation (WANG et al., 2007). The Stern-Volmer equation (Eq. 2) describes the dependence of the fluorescence intensity emitted by the protein on the concentration of the quencher, in this case NR, and is often used to access the quenching mechanism (MIRDHA; CHAKRABORTY, 2019).

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} [NR] = 1 + K_q \tau_0 [NR] \quad (2)$$

where F_0 and F are the fluorescence intensities without and with different concentrations of NR, respectively; K_{SV} and K_q are the Stern-Volmer and biomolecular quenching constants, respectively; τ_0 is the average fluorescence lifetime of the

biomolecule without NR ($\tau_0 = 10^{-8}$ s) (GUO et al., 2017); and $[NR]$ is the concentration of the free NR, which is approximately equal to the total NR concentration due to the presence of excess NR.

Applying Eq. 2, K_{SV} values were determined by linear regression of the F_0/F versus $[NR]$ plots (Fig. 2b) and subsequently, K_q was calculated from the relationship: $K_q = K_{SV}/\tau_0$. The K_{SV} values increased from 1.90×10^4 (20 °C) to 4.46×10^4 M⁻¹ (36 °C), while K_q was in the range 1.90×10^{12} – 4.46×10^{12} M⁻¹ s⁻¹ at the same temperature range. Although K_{SV} increased with increasing temperature, the K_q values were significantly greater than the maximum diffusion collision quenching rate constant (2.0×10^{10} M⁻¹ s⁻¹), thus indicating complex formation between NR and β CN (LIU et al., 2018). The positive relationship between K_{SV} and the temperature suggests that complex formation between NR and β CN is endothermic.

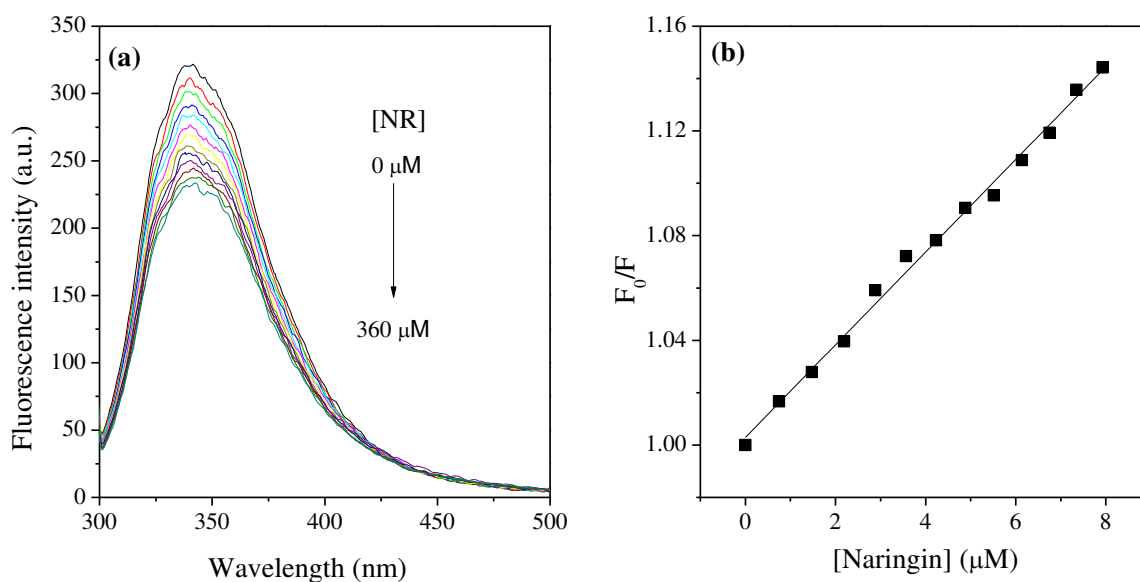


Fig. 2 – (a) Fluorescence emission spectra of Trp-143 in β CN with different concentrations of naringin (0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330, and 360 μ M) and (b) Stern-Volmer plot for β CN-NR binding at 24 °C.

Once the quenching mechanism was established as being static, the thermodynamic parameters of β CN-NR binding were obtained. The K_b and complex stoichiometry were determined from Eq. 3:

$$\log \frac{F_0 - F}{F} = n \log K_b - n \log \left(\frac{1}{[NR_t] - (F_0 - F)[P_t]/F_0} \right) \quad (3)$$

where $[NR_t]$ and $[P_t]$ are the total NR and β CN concentrations, respectively.

The K_b values were 1.90×10^4 , 2.71×10^4 , 3.90×10^4 , 4.70×10^4 , and $4.46 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ at 20, 24, 28, 32, and 36 °C, respectively. These results indicated that more complexes are formed with increasing temperature since $K_b = \frac{[\beta\text{CN-NR}]}{[\beta\text{CN}][\text{NR}]}$. This confirmed that β CN-NR complex formation is an endothermic process, as previously suggested by the K_{SV} results. Additionally, the n values (0.89–0.96) indicate that 1 mol of NR can bind around the Trp residues of 1 mol β CN. β CN binding with EC, a flavanone glycoside with a structure analogous to that of NR but containing one more OH group in one of its benzene rings, was also studied by FS at pH 7.4. The authors reported values of $n = 1.07$ and K_b ~6-fold higher ($1.68 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ at 25 °C) than that observed for β CN-NR binding at 24 °C (CAO et al., 2019b). β CN binding with NG was also reported. The structures of NR and NG are similar but NG does not comprise a glycosidic group. The K_b value of β CN-NG at 25 °C and pH 7.0 was $3.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, which is ~12-fold higher than that for β CN-NR (MOEINIAFSHARI; ZARRABI; BORDBAR, 2015). These results suggest that the carbohydrate groups present in the NR and EC structures reduce the K_b values, probably by steric repulsion. However, the H-bonding between the protein amino acids and the extra OH group in EC probably compensate for this repulsion.

To obtain further information on the β CN-NR binding energetics, ΔG° , ΔH° , and $T\Delta S^\circ$ were next determined. ΔG° was calculated directly from K_b according to the relationship $\Delta G^\circ = -RT \ln K_b$ (R is the universal gases constant and T is the temperature in kelvin). The ΔH° values for each studied temperature were obtained from the non-linear van't Hoff approach (Eq. 4) and finally, the $T\Delta S^\circ$ values were calculated from the fundamental Gibbs equation (Eq. 5). The ΔG° , ΔH° , and $T\Delta S^\circ$ values are presented in Fig. 3.

$$\ln K_b = a + b \left(\frac{1}{T}\right) + c \left(\frac{1}{T}\right)^2 + d \left(\frac{1}{T}\right)^3 + \dots + \ln \varphi \quad (4)$$

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

where a , b , c , d , and φ are constants graphically obtained from the non-linear van't Hoff plots (Fig. S1).

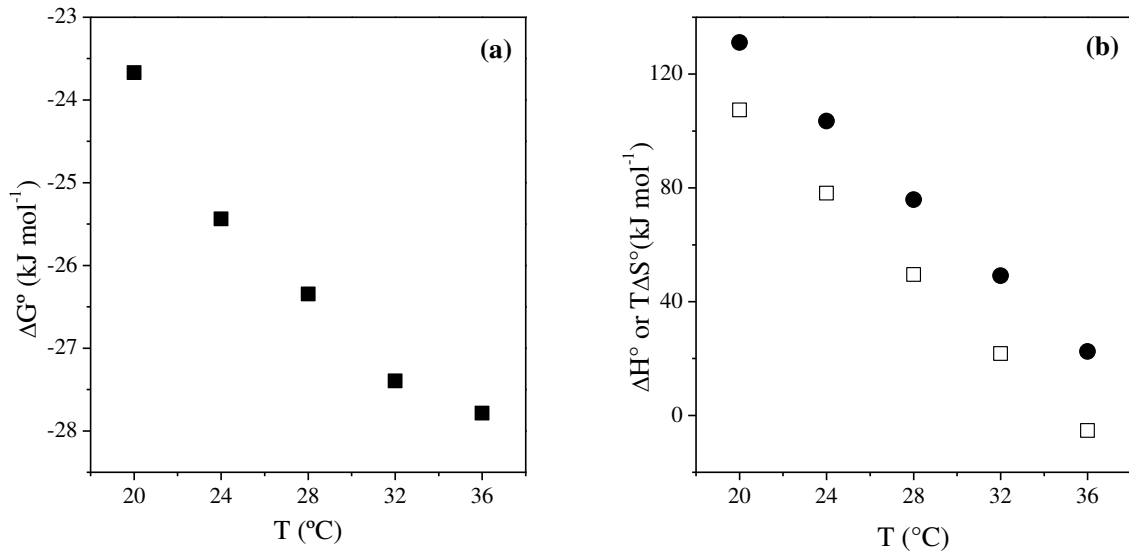


Fig. 3 - ΔG° (■), ΔH° (□), and $T\Delta S^\circ$ (●) values as a function of temperature for β CN-NR binding.

The increase in ΔG° values from -23.67 (20 °C) to -27.79 kJ mol⁻¹ (36 °C) indicated that the complex stability slightly increases with increasing temperature. Moreover, with the increase in temperature, ΔH° decreased from 107.43 to -5.34 kJ mol⁻¹, while $T\Delta S^\circ$ decreased from 131.09 to 22.43 kJ mol⁻¹. Thus, to better understand the ΔH° and $T\Delta S^\circ$ behavior with increasing temperature, the conformational, desolvation, and interaction enthalpy (ΔH_{conf} , ΔH_{des} , ΔH_{int} , respectively) and entropy (ΔS_{conf} , ΔS_{des} , and ΔS_{int} , respectively) changes were next considered (Eq. 6 and 7, respectively):

$$\Delta H^\circ = \Delta H_{conf} + \Delta H_{des} + \Delta H_{int} \quad (6)$$

$$\Delta S^\circ = \Delta S_{conf} + \Delta S_{des} + \Delta S_{int} \quad (7)$$

Notably, ΔH_{conf} is a positive term because of the energy required to break the amino acid-amino acid interactions at the protein binding site and thus, change its conformation. ΔH_{des} is also positive because of the energy required to break the H₂O-NR and H₂O- β CN interactions. Conversely, ΔH_{int} is negative due to the energy release following the interaction between NR and β CN. FS analysis did not detect any conformational changes in the Trp microenvironment and thus, ΔH_{conf} can be neglected. Therefore, at temperatures close to 20 °C, there are high β CN and NR desolvation contributions ($|\Delta H_{des}| \gg |\Delta H_{int}|$). However, with increasing temperature,

the ΔH_{des} contribution decreases, while ΔH_{int} increases. At temperatures >35.14 °C, the ΔH_{int} contribution surpasses the ΔH_{des} contribution and the β CN-NR complex formation process becomes enthalpically favorable. Hence, above this temperature, the energy released from β CN-NR binding overtakes the energy required to desolvate the free NR and β CN molecules (HUDSON et al., 2019c).

Regarding the entropic terms, ΔS_{conf} can be positive or negative, depending on whether the NR interaction leads to more or less structuring of the protein binding site. Additionally, as was the case for ΔH_{conf} , the effect of ΔS_{conf} can be disregarded. On the other hand, ΔS_{des} is positive because the water molecules released from the solvation layers gain a translational degree of freedom when transferred to the bulk. On the other hand, ΔS_{int} is negative due to the loss of the degree of freedom of the interacting partners (NR and β CN). As was discussed for ΔH_{des} , there is a high ΔS_{des} contribution at the lower temperatures. This contribution decreases with increasing temperature; however, $|\Delta S_{int}|$ does not overcome $|\Delta S_{des}|$ and $T\Delta S^\circ$ remains positive [$T\Delta S^\circ$: from 131.09 (20 °C) to 22.43 (36 °C) kJ mol⁻¹]. This implies that the differences between the 3-D structure of the water solvating the free NR and β CN molecules and that in the bulk decrease with increasing temperature. On the other hand, the entropy increase due to the release of the water molecules remains higher than the entropy loss resulting from the β CN-NR interaction (LELIS et al., 2017b). The increase in entropy also plays an important role in β CN binding with the flavonoids NG and EC. $T\Delta S^\circ$ values of 13.80 kJ mol⁻¹ and 117.92 kJ mol⁻¹ were reported for NG and EC, respectively, at 25 °C (CAO et al., 2019b; MOEINIAFSHARI; ZARRABI; BORDBAR, 2015), demonstrating the relevance of the carbohydrates for this parameter when compared to NR ($T\Delta S^\circ_{24^\circ C} = 103.52$ kJ mol⁻¹).

To better understand the role of desolvation in β CN-NR binding, ΔCp° was obtained from the linear fitting of the ΔH° versus T plots (Fig. S2), since $\Delta Cp^\circ = \partial(\Delta H^\circ)/\partial T$. The linearity of such plots yielded a single ΔCp° value: -7.05 kJ mol⁻¹ K⁻¹. ΔCp° expresses the distribution of energy on its potential and kinetic forms, whereby the interactions that occur during the process of complex formation contribute towards the distribution of energy on the potential form. ΔCp° can be expressed by Eq. 8:

$$\Delta Cp^\circ = Cp^\circ_{Complex} - (Cp^\circ_{\beta CN} + Cp^\circ_{NR}) \quad (8)$$

where $Cp^{\circ}_{Complex}$ is the standard heat capacity of the β CN-NR complex and $Cp^{\circ}_{\beta CN}$ and Cp°_{NR} are the standard heat capacity of free β CN and NR, respectively.

The ΔCp° value was negative because $(Cp^{\circ}_{\beta CN} + Cp^{\circ}_{NR}) > Cp^{\circ}_{Complex}$, i.e., the interactions that occurred after complex formation were weaker than those occurring before complex formation. These results corroborate with the previously discussed enthalpic and entropic contributions and also indicate that hydrophobic interactions predominate in the β CN-NR binding process, which occurred to increase the entropy of the system by increasing the degrees of freedom of the water molecules (BASU; KUMAR, 2015).

3.1.2. Kinetics and thermodynamics of the stable β CN-NR complex formation by SPR

SPR assays can be employed to determine the kinetics and thermodynamics of complex formation, regardless of the presence of Trp residues; this allows the study of the interactions without distinguishing the binding sites (LELIS et al., 2017a). The determination of the kinetic rate association (k_a) and dissociation (k_d) constants of the stable complex provides valuable information on the dynamics of complex formation. Further, SPR can be used to attain the k_a and k_d of β CN-NR binding by flowing different NR concentrations over a sensor chip with immobilized β CN. Thus, the change in the response signal (RU) due to NR binding with the protein was registered by SPR and the sensorgrams (RU versus time) were obtained (Fig. 4).

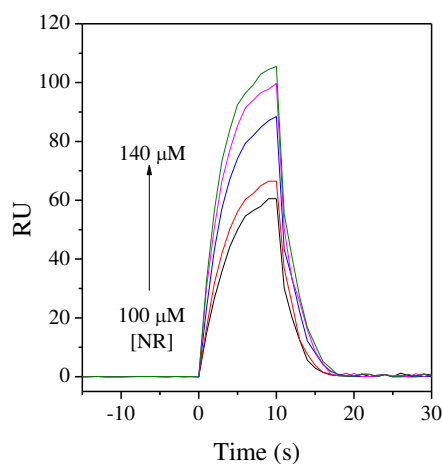


Fig. 4 - Sensorgrams obtained at 25 °C for naringin (NR) flux over the CM5 sensor chip with immobilized β -casein. NR concentrations: 100, 110, 120, 130, and 140 μ M.

The RU signals increased with increasing NR concentration over the protein indicating mainly the association between NR and β CN, as can be seen in the ascendant part of the sensorgrams. At 10 s, the flow of NR solution was stopped, and the buffer was flowed over the CM5 surface. This is characterized in the descendant part of the sensorgram because of the predominance of β CN-NR dissociation. Similar behavior was observed for all the experimental temperatures (Fig. S3).

A pseudo-first-order kinetic model was applied to the sensorgram data to obtain the observed rate constant (k_{obs}) and k_d (Eq. 9 and 10 respectively). Thus, k_a could be determined from plots of k_{obs} vs. $[NR]$ (Eq. 11; Fig. S4). The values of k_a and k_d obtained for each experimental temperature are presented in Table 1.

$$RU(t) = RU_{max}[1 - e^{-k_{obs}(t)}] \quad (9)$$

$$RU(t) = RU(t_m) e^{-k_d(t-t_m)} \quad (10)$$

$$k_{obs} = k_a[NR] + k_d \quad (11)$$

where $RU(t)$, RU_{max} , and $RU(t_m)$ are the response signals at time t , maximum response signal, and response signal at a time when only the buffer flows over CMS (t_m), respectively, and $[NR]$ is the NR concentration.

Table 1 – Kinetic (k_a and k_d) and thermodynamic (K_b , ΔG° , ΔH° , and $T\Delta S^\circ$) parameters related to the stable complex formation at each experimental temperature (T) obtained by SPR.

T (°C)	k_a ($10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_b (10^3 M^{-1})	ΔG°	ΔH° (kJ mol^{-1})	$T\Delta S^\circ$
12	1.93	0.310	6.23	-20.71		27.56
16	2.10	0.323	6.50	-21.11		27.96
20	2.29	0.338	6.78	-21.50	6.85	28.35
24	2.48	0.354	7.01	-21.88		28.73
25	2.55	0.360	7.08	-21.98		28.83
28	2.70	0.372	7.26	-22.26		29.11

The k_a values indicate that, at 25 °C, $2.55 \times 10^3 \text{ M}$ complex was formed per second, which is ~ 360 -fold faster than the complex formation between NR and α -amylase (α -amy), a globular protein. This demonstrates that compared to the globular

protein, this flexible protein (β CN) significantly increases the rate of complex formation, although the dissociation of the β CN-NR complexes is ~ 23 -fold faster than those of the α -amy-NR complexes (LIU et al., 2017b). On the other hand, when NR interacted with lactoferrin (LF), which is also a globular protein, it was able to change the conformation of the protein binding site. Thus, the k_a value at 25 °C was $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, which is ~ 20 -fold higher than that observed for β CN-NR. The k_d value for LF-NR was similar to that obtained for β CN-NR (NUNES et al., 2019), suggesting that the former interaction is stronger than the latter. Additionally, in the β CN-NR binding, the k_a and k_d values increased linearly with increasing temperature (Fig. S5), indicating that both the formation and dissociation of the β CN-NR complexes occur in a single-step (DE PAULA REZENDE et al., 2019).

From the kinetic constants k_a and k_d it is possible to obtain the thermodynamic binding constant K_b (Eq. 12), which in turn can be employed to determine ΔG° (Eq. 13). The K_b and ΔG° values are presented in Table 1. The negative ΔG° values indicate that the equilibrium reaction of β CN + NR \rightleftharpoons β CN-NR shifts towards complex formation. In addition, with increasing temperature more β CN-NR complexes were formed. Notably, the stability of these complexes slightly increased owing to the increase in the K_b and $|\Delta G^\circ|$ values (Eq. 12 and 13, respectively):

$$K_b = k_a/k_d \quad (12)$$

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_b \quad (13)$$

The K_b values determined by SPR ($K_{b \text{ SPR}}$) were smaller than those attained by FS ($K_{b \text{ SPR}(24^\circ\text{C})} = 7.01 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ and $K_{b \text{ FS}(24^\circ\text{C})} = 2.71 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$). This indicates that the binding sites detected by SPR have lower binding constants with NR than that close to Trp-143, since the K_b values are the products of the binding constants for each binding site on β CN available for NR interaction. Thus, $K_b = \prod_1^x K_i$, with the available binding sites for NR ranging from 1 to x (LELIS et al., 2017a).

The enthalpic and entropic components were also determined. ΔH° was obtained from the linear van't Hoff approach (Eq. 14), while the $T\Delta S^\circ$ values were calculated from the fundamental Gibbs equation (Eq. 5).

$$\frac{\ln K_{b2}}{\ln K_{b1}} = - \frac{\Delta H^\circ}{R} \left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1} \right) \quad (14)$$

The complex formation process was entropically driven in the studied temperature range, as evidenced by the positive ΔH° and $T\Delta S^\circ$ values (Table 1). Additionally, SPR analysis revealed that ΔH° was independent of the temperature. The same approach employed for the enthalpic and entropic contributions determined by FS (Eq. 6 and 7) can be used here. Since the positive components of ΔH° are ΔH_{des} and ΔH_{conf} , the ΔH° value was positive because $|\Delta H_{des} + \Delta H_{conf}| > |\Delta H_{int}|$. Thus, the energy cost to desolvate the free molecules and to change the binding site conformation overcomes the energy released from the β CN-NR interaction. Regarding the entropic term, the positive $T\Delta S^\circ$ values evidenced the role of solvation in the β CN-NR binding process and thus, the main contribution of the hydrophobic interactions even in binding sites far from the Trp residues (DE PAULA REZENDE et al., 2019).

3.2. Activated β CN-NR complex studied by SPR

The thermodynamically stable β CN-NR complex formation process passes through an intermediate state in which an activated complex is formed. This state is very unstable and short-lived and therefore it is impossible to quantify the activated complex. However, it is essential to determine the parameters associated with the formation of the activated complex because they yield insight into the molecular energetics and dynamics of the interaction between a protein and ligand (DE PAULA REZENDE et al., 2019; FABINI; DANIELSON, 2017; NUNES et al., 2019).

The activated complex can be formed from the association (*a*) of the free interacting molecules or dissociation (*d*) of the stable complex. The activation parameters comprise the activation energy for the activated complex formation ($E_{act(x)}$), activated enthalpy change (ΔH_x^\ddagger), Gibbs free energy change (ΔG_x^\ddagger), and entropic contribution ($T\Delta S_x^\ddagger$) towards the activated complex formation related to the association ($x = a$) or dissociation ($x = d$) phases. Using the Arrhenius approach, the $E_{act(x)}$ values can be determined from the association or dissociation rate constants (Eq. 15; Fig. S6), while the $E_{act(x)}$ values can be employed to determine ΔH_x^\ddagger (Eq. 16). On the other hand, ΔG_x^\ddagger and $T\Delta S_x^\ddagger$ can be calculated from Eq. 17 and 18, respectively. The kinetic parameters related to both the association and dissociation phases are listed in Table 2.

$$E_{act(x)} = -R \frac{\partial \ln k_x}{\partial \frac{1}{T}} \quad (15)$$

$$\Delta H_x^\ddagger = E_{act(x)} - RT \quad (16)$$

$$\Delta G_x^\ddagger = -RT \ln(k_x h / K_B) \quad (17)$$

$$T\Delta S_x^\ddagger = \Delta H_x^\ddagger - \Delta G_x^\ddagger \quad (18)$$

where R is the universal gas constant, k_x is the kinetic rate constant of association ($x = a$) or dissociation ($x = d$), T is the temperature in kelvin, h is the Planck constant, and K_B is Boltzmann's constant.

Table 2 – Kinetic parameters related to activated complex formation from the association of free β CN and NR molecules and dissociation of the stable complex.

T (°C)	Association phase (a)				Dissociation phase (d)			
	$E_{act(a)}$	ΔH_a^\ddagger	ΔG_a^\ddagger	$T\Delta S_a^\ddagger$	$E_{act(d)}$	ΔH_d^\ddagger	ΔG_d^\ddagger	$T\Delta S_d^\ddagger$
	(kJ mol ⁻¹)				(kJ mol ⁻¹)			
12		12.70	51.79	-39.09		5.85	72.50	-66.65
16		12.67	52.37	-39.70		5.82	73.48	-67.66
20	15.07	12.64	52.90	-40.26	8.22	5.79	74.40	-68.61
24		12.60	53.45	-40.85		5.75	75.33	-69.58
25		12.59	53.57	-40.98		5.74	75.55	-69.81
28		12.57	53.99	-41.43		5.72	76.25	-70.53

Both $E_{act(a)}$ and $E_{act(d)}$ were positive and independent of the temperature (Fig. S6). This indicates that the association of the free interacting partners and dissociation of the stable β CN-NR complex to form the activated complex occur with small conformational changes on β CN and little desolvation; thus, there was no reason for $E_{act(x)}$ to be dependent of the temperature (NUNES et al., 2019). This is reasonable to assume because of the unstructured form of the β CN monomers and was confirmed by the ΔH^\ddagger , ΔG^\ddagger , and $T\Delta S^\ddagger$ values for both the association and dissociation phases, which remained almost constant with increasing temperature. The same molecular processes related to stable complex formation are valid for the activated complex formation process: the changes on the desolvation layers (free interacting partners for

the association phase and the stable complex for the dissociation phase), conformational changes, and β CN-NR interactions. Since the β CN proteins are intrinsically unstructured, minimal conformational and desolvation changes are required in the binding process and thus, ΔH^\ddagger , ΔG^\ddagger , and $T\Delta S^\ddagger$ are almost independent of the temperature. The same does not hold for NR binding with globular proteins, e.g. in LF the more closed structure requires conformational changes on the protein binding sites and thus, the role of desolvation is temperature-dependent (NUNES et al., 2019).

4. Conclusion

This paper reports on the interactions between β CN monomers and NR occurring close and far from Trp-143 at pH 7.0. β CN and NR form a thermodynamically stable complex that predominates over the free binding partners. The β CN-NR binding process occurs with a key role of desolvation of the free molecules, evidencing the occurrence of hydrophobic interactions. It was also verified that the NR binding close to Trp-143 occurs with a higher binding constant than those occurring far from the β CN region. SPR data demonstrated that stable β CN-NR complex formation occurs via an intermediate state at which an activated complex is formed from the association of free β CN and NR or dissociation of the stable complex. The activated complex is formed with small conformational changes on β CN and little desolvation, probably due to the unstructured characteristics of β CN.

The thermodynamic and kinetic data afforded from this study provide valuable information on the dynamics of complex formation between small bioactive molecules and intrinsically unstructured proteins, allowing future applications of similar complexes in the food and health fields.

References

- ALAM, M. A. et al. Effect of Citrus Flavonoids, Naringin and Naringenin, on Metabolic Syndrome and Their Mechanisms of Action. **Advances in Nutrition: An International Review Journal**, v. 5, n. 4, p. 404–417, 2014.
- BASU, A.; KUMAR, G. S. Thermodynamics of the interaction of the food additive tartrazine with serum albumins: a microcalorimetric investigation. **Food chemistry**, v. 175, p. 137–42, 15 maio 2015.
- BOURASSA, P.; TAJMIR-RIahi, H. A. Locating the Binding Sites of Folic Acid with Milk α - and β -Caseins. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 116, n. 1, p. 513–519, jan. 2012.
- CAO, X. et al. Elucidating the interaction mechanism of eriocitrin with β -casein by multi-spectroscopic and molecular simulation methods. **Food Hydrocolloids**, v. 94, p. 63–70, set. 2019.
- DAS, S. et al. Binding of naringin and naringenin with hen egg white lysozyme: A spectroscopic investigation and molecular docking study. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 192, p. 211–221, mar. 2018.
- DE PAULA REZENDE, J. et al. Thermodynamic and kinetic study of epigallocatechin-3-gallate-bovine lactoferrin complex formation determined by surface plasmon resonance (SPR): A comparative study with fluorescence spectroscopy. **Food Hydrocolloids**, v. 95, n. April, p. 526–532, 2019.
- EL-DESOKY, A. H. et al. Anti-inflammatory and antioxidant activities of naringin isolated from *Carissa carandas* L.: In vitro and in vivo evidence. **Phytomedicine**, v. 42, p. 126–134, mar. 2018.
- FABINI, E.; DANIELSON, U. H. Monitoring drug–serum protein interactions for early ADME prediction through Surface Plasmon Resonance technology. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 144, p. 188–194, 2017.
- GUO, M. et al. Comparison of the interaction between lactoferrin and isomeric drugs. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 173, p. 593–607, 2017.
- HUDSON, E. A. et al. Curcumin-micellar casein multisite interactions elucidated by surface plasmon resonance. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 133, p. 860–866, jul. 2019.
- LELIS, C. A. et al. Binding thermodynamics of synthetic dye Allura Red with bovine serum albumin. **Food Chemistry**, v. 217, n. 2017, p. 52–58, fev. 2017a.
- LELIS, C. A. et al. Determination of driving forces for bovine serum albumin-Ponceau4R binding using surface plasmon resonance and fluorescence spectroscopy: A comparative study. **Food Hydrocolloids**, v. 70, n. 2017, p. 29–35, set. 2017b.
- LI, M. et al. Bovine beta-casein micelles as delivery systems for hydrophobic flavonoids. **Food Hydrocolloids**, jun. 2019.

LIU, X. et al. Investigation of the interaction for three Citrus flavonoids and α -amylase by surface plasmon resonance. **Food Research International**, v. 97, p. 1–6, 2017.

LIU, Y. et al. Ovalbumin as a carrier to significantly enhance the aqueous solubility and photostability of curcumin: Interaction and binding mechanism study. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 116, p. 893–900, set. 2018.

MIRDHA, L.; CHAKRABORTY, H. Characterization of structural conformers of κ -casein utilizing fluorescence spectroscopy. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 131, p. 89–96, jun. 2019.

MOEINIAFSHARI, A.-A.; ZARRABI, A.; BORDBAR, A.-K. Exploring the interaction of naringenin with bovine beta-casein nanoparticles using spectroscopy. **Food Hydrocolloids**, v. 51, p. 1–6, 2015.

NUNES, N. M. et al. Surface plasmon resonance study of interaction between lactoferrin and naringin. **Food Chemistry**, v. 297, p. 125022, nov. 2019.

NZUZA, S.; OWIRA, P. Naringin abrogates HIV-1 protease inhibitors-induced atherogenic dyslipidemia and oxidative stress in vivo. **Journal of Functional Foods**, v. 52, p. 156–164, jan. 2019.

VAN DE WEERT, M.; STELLA, L. Fluorescence quenching and ligand binding: A critical discussion of a popular methodology. **Journal of Molecular Structure**, v. 998, n. 1–3, p. 144–150, jul. 2011.

WANG, Y. Q. et al. Interaction of the flavonoid hesperidin with bovine serum albumin: A fluorescence quenching study. **Journal of Luminescence**, v. 126, n. 1, p. 211–218, 2007.

XU, J. et al. Comparative studies of interaction of β -lactoglobulin with three polyphenols. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 136, p. 804–812, set. 2019.

Supplementary material

β -Casein-naringin binding: deep thermodynamic and kinetic analyses by fluorescence spectroscopy and surface plasmon resonance

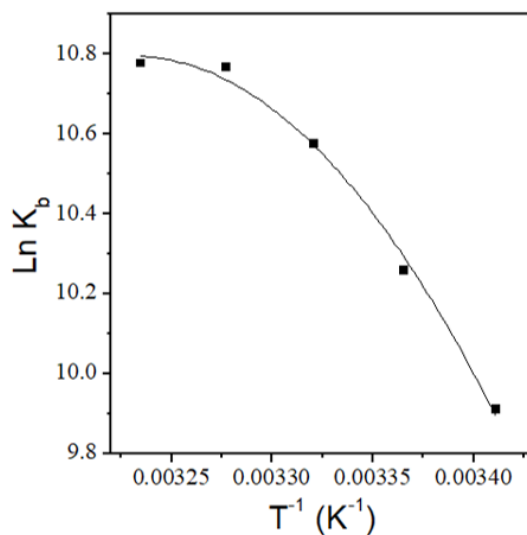


Fig. S1 - Non-linear van't Hoff plots ($\ln K_b$ versus $1/T$) to obtain the ΔH° values. The second-order polynomial model well fits the data ($R^2 = 0.99$).

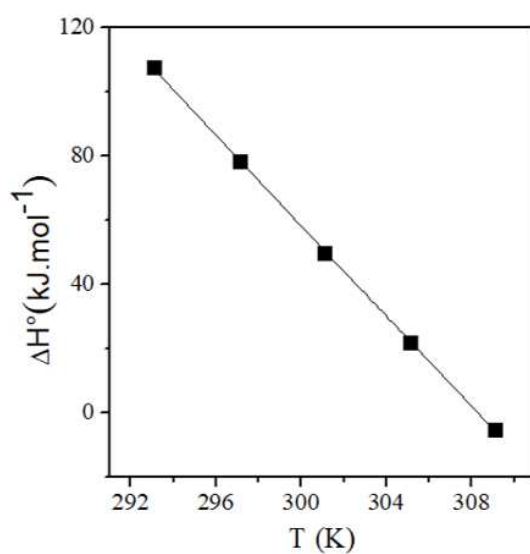


Fig. S2 - ΔH° versus T (K) plots to obtain ΔC_p° . The first-order model was well fitted ($R^2 = 0.99$).

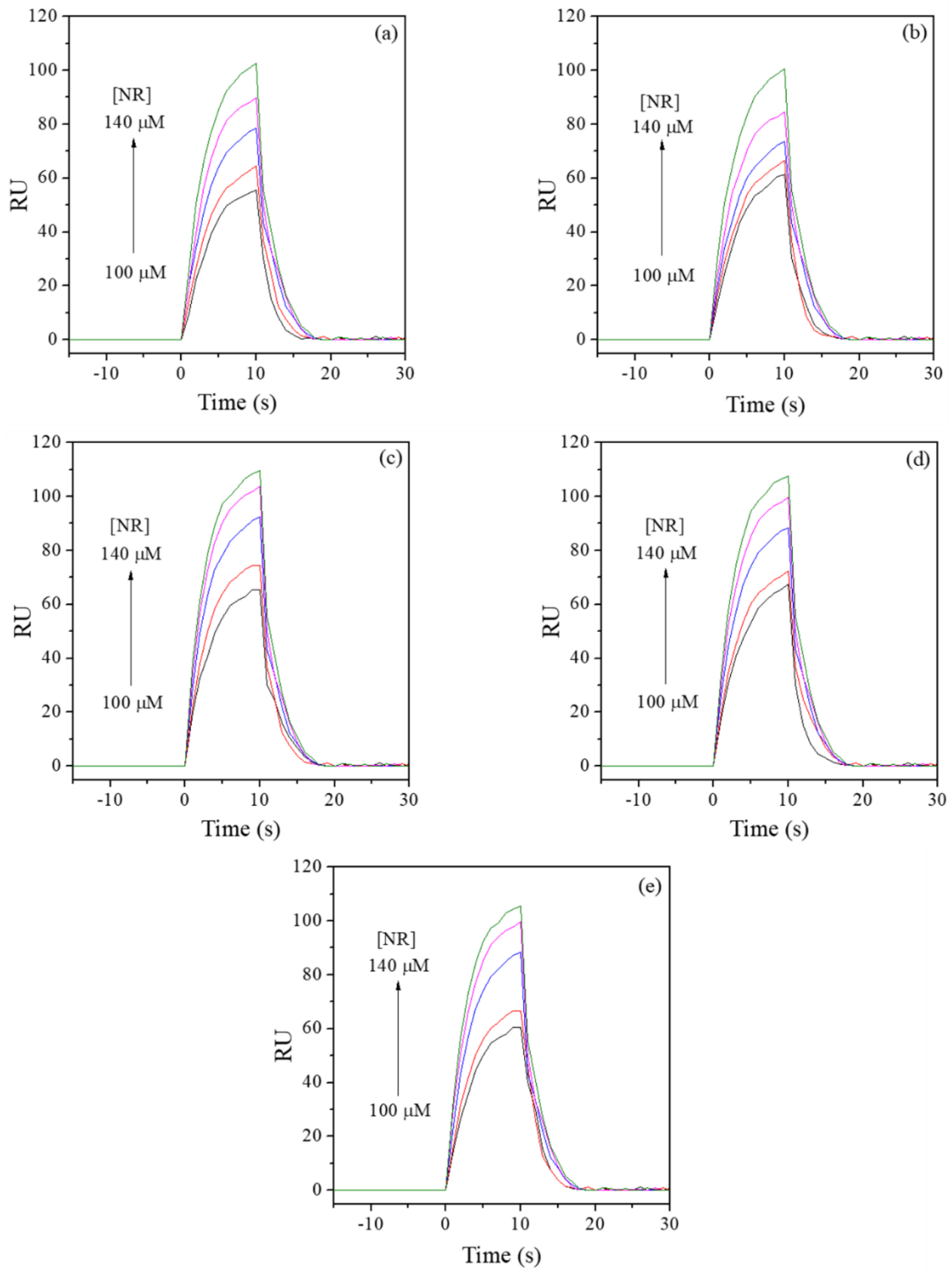


Fig. S3 - Sensorgrams obtained for the β CN-NR binding assays at (a) 12 °C, (b) 16 °C, (c) 20 °C, (d) 24 °C, and (e) 28 °C.

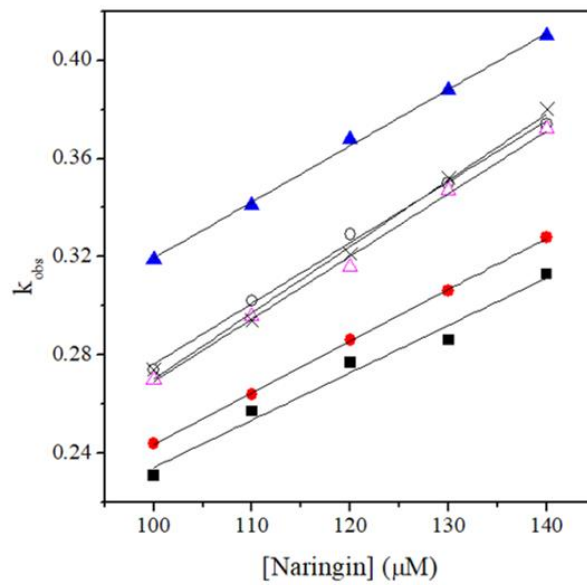


Fig. S4 - Plots of the observed rate constant (k_{obs}) as a function of the naringin concentration to determine the association rate constants at (■) 12 °C, (■) 16 °C, (▲) 20 °C, (○) 24 °C, (△) 25 °C, and (X) 28 °C. $R^2 > 0.972$ for all linear adjustments.

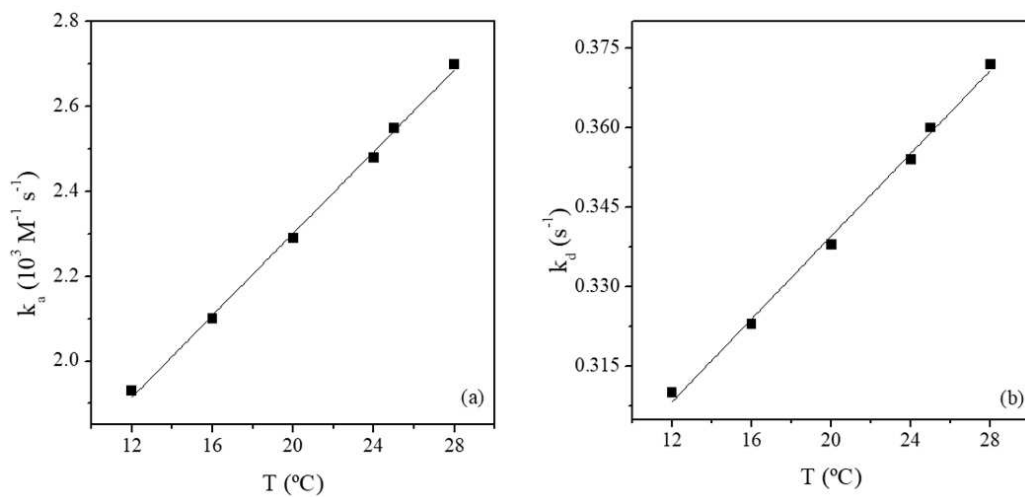


Fig. S5 - (a) Kinetic association (k_a) and (b) dissociation (k_d) rate constants as functions of temperature.

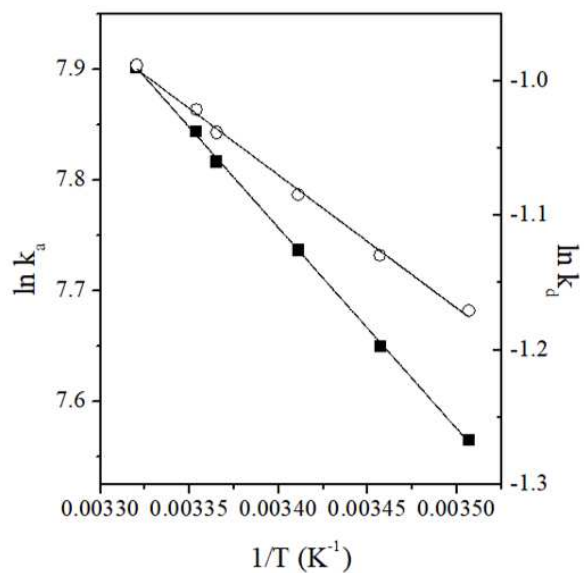


Fig. S6 - Arrhenius approach for the association (■; $\ln k_a$ vs. $1/T$) and dissociation (○; $\ln k_d$ vs. $1/T$) phases to determine the activation energy related to the activated β CN-NR formation process. The linear adjustments were well fitted ($R^2 > 0.99$).