

CARINI APARECIDA LELIS

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA INTERAÇÃO INTERMOLECULAR
ENTRE VERMELHO 40 OU VERMELHO PONCEAU 4R E ALBUMINA DO
SORO BOVINO**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2015

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

T

L541c
2015

Lelis, Carini Aparecida, 1989-

Caracterização físico-química da interação intermolecular
entre Vermelho 40 ou Vermelho Ponceau 4R e albumina do soro
bovino / Carini Aparecida Lelis. – Viçosa, MG, 2015.
xv, 67f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Ana Clarissa dos Santos Pires.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

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

CDD 22. ed. 664.06

CARINI APARECIDA LELIS

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA INTERAÇÃO INTERMOLECULAR
ENTRE VERMELHO 40 OU VERMELHO PONCEAU 4R E ALBUMINA DO
SORO BOVINO**

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: 23 de fevereiro de 2015

Frederico Augusto Ribeiro de Barros

Marcio Santos Rocha

Luis Henrique Mendes da Silva
(Coorientador)

Ana Clarissa dos Santos Pires
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade oferecida, pelo conforto nos momentos de angustia e por me iluminar nos momentos de escuridão.

Aos meus pais, José e Lúcia, aos meus irmãos Camila e Mateus por todo apoio, paciência, amizade, amor e incentivo em mais essa etapa.

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. A CNPq, FAPEMIG e Vale S. A. pelo financiamento do projeto.

A professora Ana Clarissa dos Santos Pires, pela orientação, ensinamento, apoio, ensinamentos, dialogo, confiança e amizade proporcionados.

Ao professor Luís Henrique Mendes da Silva pelos ensinamentos, conselhos e colaboração. Pela disponibilização do uso de equipamentos do seu laboratório sempre que necessário, além da participação como coorientador.

A professora Maria do Carmo Hespanhol da Silva pela paciência durante os treinamentos.

Ao professor Nélcio José de Andrade pelos ensinamentos e por disponibilizar o uso de equipamentos do seu laboratório sempre que necessário.

A professora Nilda de Fátima Ferreira Soares por disponibilizar o uso de equipamentos do seu laboratório sempre que necessário.

Aos professores Frederico Augusto de Barros e Marcio Santos Rocha pela participação na banca de defesa.

Aos amigos Jaqueline, Carla, Eliara, Natália, Moisés, Silvania, Luana, Ana Beatriz e Ana Flavia, Lucas e Matheus, pela amizade, pelo auxílio no desenvolvimento do trabalho e pela ótima convivência não só no laboratório, mas em diversos momentos vividos.

À todos do QUIVECOM pela ajuda na realização de análises do experimento.

À minha amiga Mayra pela paciência, conselhos, amizade sincera durante todos esses anos.

Aos amigos Marcos Antônio, Renato e Gustavo pela amizade e convivência agradável.

Aos amigos Patrícia Bernardes e João pelos ensinamentos e incentivos oferecidos.

Aos colegas do Laboratório de Higiene e Microbiologia de Alimentos pela convivência e colaboração.

A todos os colegas de Pós-Graduação pela agradável convivência.

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

BIOGRAFIA

Carini Aparecida Lelis, filha de José Francisco de Oliveira Lelis e Lúcia Eunice do Carmo Lelis, nasceu em Viçosa, Minas Gerais, em 03 de abril de 1989.

Em março de 2008, iniciou o curso de Ciência e Tecnologia de Laticínios na Universidade Federal de Viçosa (UFV), graduando-se em novembro de 2012.

Em abril de 2013 ingressou no Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos na UFV, defendendo dissertação em fevereiro de 2015.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
CAPÍTULO 1	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1. Corantes.....	4
3.1.1. Corantes sintéticos	4
3.2. Proteínas	8
3.2.1. Albumina do Soro Bovino (BSA).....	10
3.3. Interação corante x proteína.....	14
3.4. Técnicas experimentais para avaliação de interações intermoleculares	16
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
CAPÍTULO 2	31
1. Introduction	32
2. Material and Methods	33
2.1. Materials.....	33
2.2. Fluorescence experiment.....	33
2.3. Measurement of excess of Gibbs free surface energy	33
2.4. Determination of diffusion coefficient.....	34
2.5. Determinations of apparent interaction enthalpy change ($\Delta_{app-int}H$) of interaction between BSA and colorants	34
2.6. Statistical analysis	35
3. Results and Discussion	35
3.1. Fluorescence experiments	35
3.2. Excess of superficial Gibbs free energy	49
3.3. Molecular diffusion coefficient of food dyes	53
3.4. Determination of apparent interaction enthalpy change ($\Delta_{app-int}H$) between BSA and colorants	57
4. Conclusion	64

5. References	65
---------------------	----

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1. Amino-azobenzeno. Fonte: PRADO e GODOY, 2003.....	6
Figura 2. Estrutura molecular do corante vermelho 40. Fonte: GOMES, 2012.....	6
Figura 3. Estrutura molecular do vermelho ponceau 4R. Fonte: GOMES, 2012.....	7
Figura 4. Representação da fita de HSA (esquerda) e BSA (direita) e a localização dos domínios de ligação. Estão indicadas as localizações dos sítios de ligações hidrofóbicos (Sudlow I e II). A estrutura secundária da proteína é mostrada como uma fita com os sub-domínios com código de cores da seguinte forma: IA, azul; IB, azul celeste; IIA, verde; IIB, amarelo; IIIA, laranja; IIIB, vermelho. Fonte: KHODARAHMlet al., 2012.....	11
Figura 5. Estrutura da BSA, com resíduos de triptofano mostrados na cor verde. Fonte: LI et al., 2011.....	12
Figura 6. Modelo de preenchimento espacial da molécula de albumina do soro bovino com resíduos básicos coloridos em azul, resíduos ácidos em vermelho e resíduos neutros em amarelo. (A) vista frontal, (B) vista traseira, (C) lado esquerdo e (D) lado direito.....	13
Figura 7. (a) Picos obtidos pela técnica de calorimetria após cada injeção do titulante sobre a amostra. (b) Curva obtida após a integração dos picos.....	20
Figura 8. Figura esquemática de um a gota pendente. Fonte: MORITA.....	21
Figura 9. Esquema da dispersão de um soluto ao longo do tubo em um experimento de Taylor. Fonte: LINO, 1997.....	23

Capítulo 2

Figure 1. Effect of AR on BSA fluorescence at 298 K and pH 7.4 (λ_{ex} = 280 nm and λ_{em} = 346 nm). Arrow indicates an increase in the AR concentration (from 0 to 5.0×10^{-5} mol.l ⁻¹).....	36
---	----

Figure 2. Stern-Volmer plot for BSA at different concentrations of allura red at 298 K; and effect of the food dye on fluorescence ($\lambda_{ex}=280$ nm and $\lambda_{em}=346$ nm) of BSA at pH=3.5.....	37
Figure 3. Schematic representation of complex formation stoichiometry between allura red and BSA.....	38
Figure 4. Plot of $\ln K \times 1/T$ to determine ΔH° value by van't Hoff approximation for data from BSA-AR interaction at 3.5.....	40
Figure 5. Structures of red synthetic food dyes: (a) allura red (AR) and (b) ponceau 4R (P4R).....	45
Figure 6. Interfacial tension of bovine serum albumin (BSA) at concentration 7.57×10^{-3} mol.L ⁻¹ , at 298 K and pH 7.4.....	50
Figure 7. Interfacial tension of bovine serum albumin (BSA) at concentration 7.57×10^{-3} mol.L ⁻¹ , at 298 K and pH 7.4, in different concentrations of allura red (AR): (—) control: 0 mol.L ⁻¹ , (—) 1.2×10^{-6} mol.L ⁻¹ , (—) 3.2×10^{-6} mol.L ⁻¹ , (—) 5.2×10^{-6} mol.L ⁻¹ , (—) 7.2×10^{-6} mol.L ⁻¹ , (—) 9.2×10^{-6} mol.L ⁻¹ , (—) 1.2×10^{-5} mol.L ⁻¹	51
Figure 8. Interfacial tension at thermodynamic equilibrium (σ_{eq}) of BSA (7.57×10^{-3} mol.L ⁻¹) as a function of different concentrations of allura red, at 298 K and pH: (■) 3.5, (●) 5.0 and (▲) 7.4.....	52
Figure 9. Interfacial tension at thermodynamic equilibrium (σ_{eq}) of BSA (7.57×10^{-3} mol.L ⁻¹) as a function of different concentrations of ponceau 4R, at 298 K and pH: (■) 3.5, (●) 5.0 and (▲) 7.4.....	52
Figure 10. Diffusion coefficient of allura red (AR) as a function of different concentrations of BSA, at 298 K and pH: (●) 5.0, (▲) 5.0 with 100 mmol.L ⁻¹ of NaCl, (■) 7.4 and (▼) 7.4. with 100 mmol.L ⁻¹ of NaCl.....	54
Figure 11. Diffusion coefficient of ponceau 4R (P4R) as a function of different concentrations of BSA, at 298 K and pH: (●) 5.0, (▲) 5.0 with 100 mmol.L ⁻¹ of NaCl, (■) 7.4 and (▼) 7.4. with 100 mmol.L ⁻¹ of NaCl.....	55
Figure 12. Fraction of allura red molecules bound to BSA (α) as a function of protein concentration, at 298 K and pH: (▲) 5.0, (▼) 5.0 with 100 mmol.L ⁻¹ of NaCl, (■) 7.4 and (●) 7.4. with 100 mmol.L ⁻¹ of NaCl.....	56

Figure 13. Fraction of ponceau 4R molecules bound to BSA (α) as a function of protein concentration, at 298 K and pH: ($\blacktriangle$) 5.0, ($\blacktriangledown$) 5.0 with 100 mmol.L ⁻¹ of NaCl, ($\blacksquare$) 7.4 and ($\bullet$) 7.4. with 100 mmol.L ⁻¹ of NaCl.....	56
Figure 14. Thermogram of allura red titration on (—) BSA solution (3.01×10^{-4} mol.L ⁻¹) and (—) buffer, at pH 7.4 and 298 K.....	57
Figure 15. Δ app-intH of BSA-colorant interaction as a function of colorant concentration, at 298 K and pH 3.5: ($\blacktriangle$) allura red and ($\blacktriangledown$) ponceau 4R.....	58
Figure 16. Δ app-intH of denatured BSA-colorant interactions as a function of colorant concentration, at 298 K and pH 3.5: ($\blacksquare$) allura red and ($\bullet$) ponceau 4R.....	60
Figure 17. Δ app-intH of BSA-colorant interactions as a function of colorant concentration, at 298 K and pH 5.0: ($\blacksquare$) allura red and ($\bullet$) ponceau 4R.....	61
Figure 18. Δ app-intH of denatured BSA-ponceau 4R interaction as a function of colorant concentration, at 298 K and pH 5.0.....	62
Figure 19. Δ app-intH of BSA-colorant interactions as a function of colorant concentration, at 298 K and pH 7.4: ($\blacksquare$) allura red and ($\bullet$) ponceau 4R.....	63
Figure 20. Δ app-intH of denatured BSA-colorant interactions as a function of colorant concentration, at 298 K and pH 7.4: ($\blacksquare$) allura red and ($\bullet$) ponceau 4R.....	64

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Table 1. Quenching constants (KSV), binding constants (K), number of binding sites (n) associated to AR-BSA interaction at different temperatures, pH=3.5.....	38
Table 2. Enthalpy change (ΔH°), Gibbs free energy change (ΔG°) and entropy change ($T\Delta S^\circ$) associated to AR-BSA interaction at different temperatures, pH=3.5.....	40
Table 3. Enthalpy change (ΔH°), Gibbs free energy change (ΔG°) and entropy change ($T\Delta S^\circ$) associated to AR-BSA interaction at different temperatures, pH=3.5, in the presence of NaCl (100 mmol.L ⁻¹).....	41
Table 4. Enthalpy change (ΔH°), Gibbs free energy change (ΔG°) and entropy change ($T\Delta S^\circ$) associated to AR-BSA interaction at different temperatures, pH=5.0.....	42
Table 5. Enthalpy change (ΔH°), Gibbs free energy change (ΔG°) and entropy change ($T\Delta S^\circ$) associated to AR-BSA interaction at different temperatures, pH=5.0, in the presence of NaCl (100 mmol.L ⁻¹).....	43
Table 6. Enthalpy change (ΔH°), Gibbs free energy change (ΔG°) and entropy change ($T\Delta S^\circ$) associated to AR-BSA interaction at different temperatures, pH=7.4.....	44
Table 7. Enthalpy change (ΔH°), Gibbs free energy change (ΔG°) and entropy change ($T\Delta S^\circ$) associated to AR-BSA interaction at different temperatures, pH=7.4, in the presence of NaCl (100 mmol.L ⁻¹).....	45
Table 8. Enthalpy change (ΔH°), Gibbs free energy change (ΔG°) and entropy change ($T\Delta S^\circ$) at different temperatures, associated to P4R-BSA interaction at different temperatures, pH=3.5.	46
Table 9. Enthalpy change (ΔH°), Gibbs free energy change (ΔG°) and entropy change ($T\Delta S^\circ$) at different temperatures, associated to P4R-BSA interaction at different temperatures, pH=3.5, in the presence of NaCl (100 mmol.L ⁻¹).	47
Table 10. Enthalpy change (ΔH°), Gibbs free energy change (ΔG°) and entropy change ($T\Delta S^\circ$) at different temperatures, associated to P4R-BSA interaction at different temperatures, pH=5.0.	47

Table 11. Enthalpy change (ΔH°), Gibbs free energy change (ΔG°) and entropy change ($T\Delta S^\circ$) at different temperatures, associated to P4R-BSA interaction at different temperatures, pH=5.0, in the presence of NaCl (100 mmol.L ⁻¹).	48
Table 12. Enthalpy change (ΔH°), Gibbs free energy change (ΔG°) and entropy change ($T\Delta S^\circ$) at different temperatures, associated to P4R-BSA interaction at different temperatures, pH=7.4.....	49
Table 13. Enthalpy change (ΔH°), Gibbs free energy change (ΔG°) and entropy change ($T\Delta S^\circ$) at different temperatures, associated to P4R-BSA interaction at different temperatures, pH=7.4, in the presence of NaCl (100 mmol.L ⁻¹).	49
Table 14. Comparison of stoichiometry of BSA-colorant complex obtained by fluorescence and interfacial tension measurements, at 298 K and different pH conditions.....	53

RESUMO

LELIS, Carini Aparecida, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2015. **Caracterização físico-química da interação intermolecular entre vermelho 40 ou vermelho ponceau 4R e albumina do soro bovino.** Orientadora: Ana Clarissa dos Santos Pires. Coorientadores: Luis Henrique Mendes da Silva e Maria do Carmo Hespanhol da Silva.

Corantes alimentícios são aditivos utilizados em alimentos com importância para a aparência e aceitabilidade do produto. A distribuição uniforme dos corantes nos sistemas alimentícios pode ser uma indicação de interações e formação de complexos entre os corantes e um ou mais ligantes existente na matriz alimentícia. O presente trabalho teve como objetivo estudar a nível molecular os mecanismos envolvidos na interação entre os corantes alimentícios (vermelho 40 (V40) e vermelho ponceau 4R (VP 4R)) e a proteína (albumina do soro bovino (BSA)) em diferentes condições de força iônica, pH e temperatura. Os mecanismos envolvidos na interação entre os corantes e a proteína foram investigados utilizando técnicas altamente sensíveis e eficazes como fluorescência, nanocalorimetria de titulação isotérmica, tensão interfacial e coeficiente de difusão. Resultados de fluorescência mostraram que a intensidade de fluorescência da BSA diminuiu à medida que as concentrações de V40 e VP 4R aumentaram. O mecanismo de extinção da fluorescência foi classificado como estático, havendo portanto, a formação de complexos entre a proteína e os corantes em todas as condições termodinâmicas estudadas. Além disso, a variação de energia livre de Gibbs de complexação foi negativa, sendo regida entálpica ou entropicamente dependendo das condições termodinâmicas. A análise do coeficiente de difusão (CD) dos corantes na presença de concentrações crescentes do biopolímero também demonstrou a formação de complexo entre os corantes e a BSA, visto que os CDs de ambos os corantes diminuíram na presença da proteína. Adicionalmente, a porcentagem de moléculas de corantes ligadas à BSA foi maior na presença de eletrólitos nos pHs 5,0 e 7,4. Medidas de tensão interfacial mostraram que os complexos BSA-corante possuem atividade superficial uma vez que houve redução na tensão interfacial água/ar à medida que a concentração de corante aumentou. A partir da inflexão das curvas de tensão interfacial no equilíbrio

termodinâmico versus a concentração de corante foi possível determinar a estequiometria da complexação com valores semelhantes aos obtidos nos experimentos de fluorescência. Experimentos de nanocalorimetria de titulação isotérmica permitiram a determinação da variação da entalpia aparente de interação ($\Delta H_{\text{int-apar}}$) entre corante e proteína. Os valores obtidos foram diferentes daqueles calculados pela aproximação de van't Hoff a partir dos experimentos fluorimétricos e demonstraram complexação regida pela entalpia ou pela entropia dependendo das condições termodinâmicas do sistema. Além disso, a conformação da BSA influenciou nas energias obtidas pela análise de calorimetria. Apesar dos corantes apresentarem estruturas químicas similares, a presença de um anel benzênico e um grupo sulfito a mais no VP4R levou a diferenças consideráveis nos parâmetros termodinâmicos de interação com a BSA comparado com o V40, uma vez que o V40 interage na região hidrofóbica da proteína e o VP4R na superfície. Este estudo contribui para o conhecimento em nível molecular da interação entre a BSA e corantes sintéticos em condições de pH, força iônica e temperatura encontradas em matrizes alimentícias e no sangue.

ABSTRACT

LELIS, Carini Aparecida, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2015. **Physico-chemical characterization of intermolecular interaction between red allura or red ponceau 4R and bovine serum albumin.** Adviser: Ana Clarissa dos Santos Pires. Co-advisors: Luis Henrique Mendes da Silva and Maria do Carmo Hespanhol da Silva.

Food dyes are often used to improve food acceptance and appearance. Uniform food dye distribution in food can be an indication intermolecular interactions and formation of complexes between colorants and other molecules. The present work aimed to study in molecular level the mechanisms involved in bovine serum albumin (BSA) and food dyes, allura red (AR) and ponceau 4R (P4R) at different pH, temperature and ionic force. Fluorimetric spectra analyses showed that BSA fluorescence reduced as AR or P4R concentrations increased. Quenching mechanism of complexation was classified as static quenching, indicating formation BSA-colorant complex in all thermodynamic studied conditions. In addition, the Gibbs free energy change was negative, being complexation driven by enthalpy or entropy depending on thermodynamic conditions. The analyses of colorant diffusion coefficient (DC) in the presence of increasing concentrations of biopolymer also demonstrated BSA-colorant interaction since DCs reduced in the presence of protein. Additionally, the percentage of food dye molecules bound to BSA was higher in the presence of electrolyte at pH 5.0 and 7.4. Interfacial tension (IT) measurements showed that BSA-colorant complexes have surface activity because IT values of water-air interface reduced as colorant concentration increased. Also, by inflexion in the curves of IT at thermodynamic equilibrium versus food dye concentration, complexation stoichiometry was determined with similar values to those obtained by fluorimetric measurements. Isothermal titration calorimetry (ITC) experiments provided the apparent interaction enthalpy change ($\Delta_{app-int}H$) for BSA-colorant interaction. Values determined by calorimetry were different from those calculated by van't Hoff approximation from fluorescence data, and demonstrating that complexation was driven by enthalpy or entropy depending on thermodynamic conditions of the systems. In addition, BSA conformation influenced energy found in calorimetric analyses.

Despite of both colorants show similar chemical structures, the presence of one more benzenic ring and sulphide group in P4R leaded to considerable differences on thermodynamic parameters of interaction with BSA compared to AR. This work contributes to knowledge at molecular level of interaction between BSA and synthetic food dyes in food and blood conditions.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

Grande parte das cores naturalmente presentes nos alimentos são termolábeis e são perdidas durante o processamento. Uma das razões para adicionar corantes artificiais é minimizar a percepção destas perdas pelos consumidores. A utilização dos corantes em diversos alimentos justifica-se principalmente por questões de hábitos alimentares, sendo de grande importância na aparência do produto assim como sua aceitabilidade.

O potencial impacto dos corantes artificiais alimentícios sobre a saúde humana está cada vez mais no centro da atenção da opinião pública de cientistas e de legisladores. Os tipos e a quantidade de corantes artificiais permitidos em diversos países ou regiões são diferentes. Isso devido a um maior ou menor consumo de alimentos presentes na dieta da população, aos quais esses corantes são adicionados. Os corantes azo representam a classe de corantes artificiais mais importante e utilizada em alimentos e é composta pelos seguintes corantes: amarantho, vermelho ponceau 4R, vermelho 40, tartrazina e amarelo crepúsculo.

A distribuição uniforme dos corantes nos sistemas alimentícios pode ser uma indicação de interações e formações de complexos entre os corantes e ligantes existentes na matriz alimentícia durante todo o processamento e armazenamento. Dentre os ligantes que podem estar presentes nos alimentos; as proteínas do soro têm sido muito utilizadas como ingredientes em diversas formulações, atuando no transporte e fixação dos corantes. Além disso, as proteínas apresentam funções biológicas que podem ser afetadas por mudanças conformacionais causadas em sua estrutura devido à interação com os corantes.

As proteínas do soro de leite constituem um grupo bastante diversificado de proteínas com características estruturais bem diferentes. As principais proteínas presentes no soro são a beta-lactoglobulina (β -Lg), alfa-lactoalbumina (α -La), albumina do soro bovino (BSA) e as imunoglobulinas (Ig's), que apresentam propriedades físico-química diferentes. A BSA tem sido largamente estudada devido à sua estabilidade, baixo custo, propriedades de ligação, transporte e em particular à sua homologia estrutural com a albumina

do soro humano (HSA), além de sua natureza solúvel em água, que é importante para estudos de interações.

Apesar dos esforços da comunidade científica, ainda existem poucos trabalhos visando elucidar, a nível molecular, as interações entre proteínas do soro, como a BSA e corantes artificiais alimentícios. Estudos da termodinâmica de interação destes corantes com biopolímeros de interesse, utilizando técnicas experimentais sensíveis, são importantes tanto do ponto vista tecnológico quanto de saúde, uma vez que a formação de complexos estáveis entre os corantes e os biopolímeros pode melhorar a aplicação de corantes em diferentes formulações, bem como alterar as funções de transporte das proteínas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Estudar, a nível molecular, a interação entre os corantes artificiais alimentícios (vermelho 40 e vermelho ponceau 4R) e a proteína (albumina do soro bovino-BSA) em diferentes condições de força iônica, pH e temperatura.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar a constante de interação entre BSA e os corantes vermelho 40 e vermelho ponceau em função da temperatura;
- Determinar o coeficiente de difusão do vermelho ponceau e vermelho 40 em solução de BSA em diferentes concentrações e em diferentes condições pH e força iônica, correlacionando esta propriedade com as interações intermoleculares entre corante-proteína;
- Determinar a variação da entalpia de interação entre a BSA e corantes alimentícios (vermelho ponceau 4R e vermelho 40) em diferentes condições de pH e conformação da BSA;
- Determinar a tensão interfacial da BSA na presença de diferentes concentrações de corantes alimentícios, em diferentes condições de pH.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Corantes

3.1.1. Corantes sintéticos

O uso de aditivos químicos, como os corantes artificiais, é um dos mais polêmicos progressos da indústria de alimentos, visto que seu uso em vários alimentos se explica apenas por questões de hábitos alimentares. Em geral a importância da utilização dos corantes está na aparência do produto para sua aceitabilidade sendo a maior justificativa para o seu emprego (PRADO e GODOY, 2003).

Grande parte das cores naturalmente presentes nos alimentos são termolábeis e são perdidas durante o processamento. Uma das razões para adicionar corantes sintéticos, é remediar essas perdas. Entretanto é possível que os corantes alimentícios sintéticos adicionados aos alimentos e bebidas ultrapassem os níveis autorizados. A agência Nacional de Vigilância em Saúde Pública (ANVISA) emitiu disposições legais (ANVISA, 1999 e ANVISA, 2002), que regula a utilização de corantes alimentícios sintéticos e seus níveis permitidos em todos os alimentos (ANDRADE et al., 2014).

O potencial impacto dos corantes alimentícios sobre a saúde humana está cada vez mais no centro da atenção da opinião pública, cientistas e legisladores. Vários estudos tentaram demonstrar as reações adversas que os corantes podem causar (WARD, 1997; MACKINSKI-JR, 1998; KAPADIA et al., 1998; SASAKI et al., 2002; TANAKA, 2006). Os tipos e a quantidade de corantes permitidos em diversos países ou regiões são diferentes. Isso devido um maior ou menor consumo de alimentos presentes na dieta da população, aos quais esses corantes são adicionados.

Corantes compreendem dois principais componentes: o grupo cromóforo, responsável pela cor que absorve a luz, e o grupo funcional, que está diretamente ligado a fixação. O grupo mais representativo e amplamente aplicado pertence à família dos corantes azóicos que se caracterizam por apresentarem um ou mais grupamentos $-N=N-$ ligados a sistemas aromáticos (KUNZ et al., 2002).

De acordo com os regulamentos da ANVISA um alto consumo de produtos artificiais coloridos está relacionado a doenças ligadas à alergia, tais

como erupções cutâneas, asma brônquica em pessoas suscetíveis, rinite, hiperatividade, danificação cromossômica, tumores, entre outros (ANDRADE et al., 2014 e MARMITT et al., 2010). Todavia, os estudos sobre os efeitos nocivos causados pelos corantes artificiais à saúde são insuficientes e bastante contraditórios (SHIMADA et al., 2010 e MARMITT et al., 2010).

Em 1906, surgiram as primeiras suspeitas da ação cancerígena dos corantes artificiais. Ao injetar um corante azóico (vermelho escarlate) sob a pele da orelha de um coelho observou-se um crescimento celular atípico sob a pele. Em 1924, foi observado que a ingestão desse corante por camundongos podia provocar a formação de adenomas hepáticos (MACKINSKI-JR, 1998). Desde então várias pesquisas sobre a ação tóxica e cancerígena de diversos corantes foram empreendidas.

Por outro lado, Kapadia et al., 1998 estudaram a ação antitumoral *in vitro* de 29 corantes artificiais permitidos pelo FDA (Food and Drug Administration) nos Estados Unidos para alimentos, fármacos e cosméticos sobre o vírus Epstein-Barr (EBV) que produz o indutor de tumores 12-o-tetradecanoilforbol-13-acetato (TBA). Das amostras; 10 foram efetivas a ação antitumoral, sendo 6 substâncias do grupo azo, 2 derivadas da tartrazina e o índigo, com significativa inibição do indutor do EBV, durante ensaios *in vitro*. Efeitos da eritrosina também foram avaliados. Esses três corantes apresentaram atividade quimiopreventiva, apresentando uma redução de até 50% na formação de papiloma em ratos.

Em 1997 pesquisas realizadas em 486 crianças hiperativas, entre 7 e 13 anos, demonstraram que 60% reportavam problemas de aumentos da hiperatividade quando consumiam alimentos e bebidas coloridos artificialmente. Em contraste, de 172 crianças controle apenas 12% apresentavam problemas associados a corantes artificiais (WARD, 1997).

Diante da estrutura química dos corantes azóicos, suspeita-se que a parte da molécula causadora de tumores seja, possivelmente, formada no processo de degradação do corante, com a quebra da dupla ligação azo ($N=N$). Desde o início do século XX tem sido demonstrado que moléculas originadas dos corantes azóicos apresentam ação cancerígena, principalmente pela formação do amino-azobenzeno (Figura 1) (PRADO e GODOY, 2003)

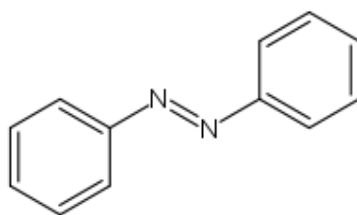


Figura 1. Amino-azobenzeno. Fonte: PRADO e GODOY, 2003.

Os corantes azo utilizados em alimentos é composto pelo: amaranço, vermelho ponceau 4R, vermelho 40, tartrazina e amarelo crepúsculo.

Quimicamente, o vermelho 40 é dissódico 6-hidroxi -5 (2 metoxi-5-metil-4-sulphophenylazo) -2-naftalenossulfonato com um massa molecular de 496,4 g/mol é comercialmente disponível como pó ou grânulo vermelho escuro ou castanho, que é solúvel em água, mas insolúvel em etanol (ABDULLAH et al., 2008). O vermelho 40 (Figura 2) é um corante monoazo e apresenta boa estabilidade a luz a altas temperaturas a ácido, além de ser o corante vermelho mais estável para bebidas na presença de ácido ascórbico e agente redutor. (GOMES, 2012).

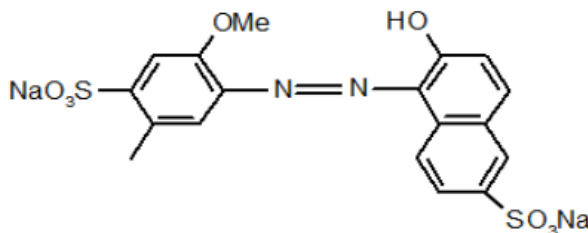


Figura 2. Estrutura molecular do corante vermelho 40. Fonte: GOMES, 2012.

De acordo com Zeiger e Margolin, 2000, o vermelho 40 não apresentou efeito multagênico em quatro diferentes cepas de *Salmonella* estudadas.

Tsuda et al., 2001, também analisaram a genotoxicidade do vermelho 40 em ratas grávidas, o efeito foi positivo para danos causados no DNA retirado do cólon após 3 h de administração do corante, porém não houve danificação do DNA retirado do estômago, fígado, rim, bexiga, cérebro, medula óssea e em órgão do embrião. Os danos causados no cólon ocorreram em doses a partir de 10 mg/Kg.

Poucos trabalhos recentes na literatura avaliam a citotoxicidade e mutagenicidade ou carcinogenicidade do corante vermelho 40. Em 2002, Sasaki et al., determinou a genotoxicidade de 39 aditivos químicos em ratos. De

todos os aditivos, os corantes foram os mais genotóxicos. Entre os corantes analisados encontra-se o vermelho 40 que induziu danos ao DNA com uma dose a partir de 10 mg/Kg, sendo que a dose diária aceitável (ADI) é de 7,0 mg/kg.

Essa escassez de informações sobre o corante alimentício vermelho 40 se torna preocupante porque este aditivo é amplamente utilizado em cereais, doces, sorvetes, iogurtes, geléias, licores, sucos em pó e refrigerantes (PAN et al., 2011). Como já mencionado, os corantes da classe azo são controversos na comunidade científica quanto à sua toxicidade, incluindo a nível celular; contudo quase todos os estudos nessa área se referem à tartrazina, vermelho bordeaux. (OLIVEIRA et al., 2013).Entretanto outros corantes azo como o vermelho 40 e o vermelho ponceau 4R são bastante utilizados na indústria de alimentos.

O corante vermelho ponceau 4R (Figura 3), pertence ao grupo azo-sulfona, é derivado do carbono, obtido por síntese química. Caracteristicamente ele é um pó fino homogêneo de cor vermelho escuro e inodoro(PINTEA, 2007). Como o vermelho 40, apresenta boa estabilidade ao calor, à luz e ao ácido, porém descolore parcialmente na presença de alguns agentes redutores como ácido ascórbico e dióxido de enxofre (SO₂) (DOWNHAM e COLLINS, 2000).

O corante é utilizado em uma diversidade de produtos alimentícios, sendo que alguns exemplos de uso são para colorir açúcares de confeitaria, bebidas, sorvete, gelatina em pó, refrigerantes, sobremesas, pickles, molhos, snacks, geléias, doces em pasta e marmelada, (EFSA, 2009).

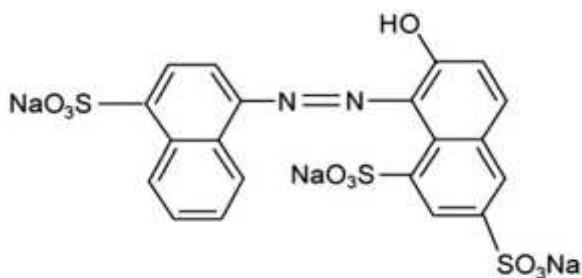


Figura 3. Estrutura molecular do vermelho ponceau 4R. Fonte: CHANLON et al., 2005.

No que se refere a estudos de toxicidade reprodutiva e de desenvolvimento, Meyer e Hansen (1975) descobriram que o corante vermelho

ponceau 4R não induzia nenhum efeito embriotóxico em ratos por gavagem (1000-4000mg/Kg por dia). Em 1981 Momma et al., relataram que o vermelho ponceau 4R utilizados nas dietas (0,05-0,7%) durante a gravidez em ratos, não produziu nenhum efeito teratogênico ou desenvolvimento pós-natal.

Foram encontrados poucos trabalhos recentes na literatura que avaliaram os efeitos adversos do vermelho ponceau 4R á saúde. Em um estudo realizado por Tanaka, 2006 concluiu-se que os níveis de vermelho ponceau 4R administrado na dieta de camundongos com 4 semanas de idade não produziu efeitos adversos sobre a reprodução, porém foi observado efeitos adversos sobre os parâmetros neurocomportamentais. No entanto, os níveis de corantes administrado na dieta que causaram efeitos adversos (aproximadamente 205 mg/Kg por dia) eram superiores à dose diária aceitável (ADI) de ponceau 4R (0-4,0 mg/kg de peso corporal), portanto, acredita-se que o nível de ingestão de ponceau 4R provavelmente não produzirá qualquer efeito adverso reprodutivo ou neurocomportamental em seres humanos.

De acordo com a ANS, 2009 (EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food), algumas reações de sensibilidade foram relatadas após a ingestão de ponceau 4R, principalmente quando o mesmo era administrado com uma mistura de outros corantes sintéticos, porém nenhuma conclusão sobre a sensibilidade pode ser concluída diante da escassez de dados científicos.

A distribuição uniforme dos corantes nos sistemas alimentícios pode ser uma indicação de formações de complexos entre os corantes e diferentes ligantes existentes na matriz alimentícia durante todo o processamento e armazenamento. As proteínas soro, que tem sido muito utilizada como ingredientes pode se ligar a essas moléculas de corante, atuando no transporte e fixação do mesmo. Além disso, as proteínas apresentam funções biológicas que podem ser afetadas por mudanças conformacionais causadas em suas estruturas devido as interação com os corantes.

3.2. Proteínas

O leite bovino contém cerca de 3,5% (m/m) de proteínas. Estas proteínas além de fornecerem aminoácidos, são veículos naturais de micronutrientes essenciais, como o cálcio e fósforo, assim como componentes do sistema imune (imunoglobulinas e lactoferrina), para o recém-nascido. Essas proteínas

são distribuídas em duas grandes classes com características e propriedades muito distintas, sendo 80% de caseína e 20% de proteínas do soro (FARRELL JR et al., 2006).

As proteínas do soro são um grupo de proteínas que permanecem solúveis no soro do leite após a precipitação da caseína em pH 4,6 e temperatura de 20°C. A maioria dessas proteínas são globulares com elevada hidrofobicidade e cadeias peptídicas densamente dobradas (PHADUNGATH, 2005). São as únicas usadas na sua forma nativa em aplicações alimentícias, devido à baixa força iônica, o que as torna solúveis em larga faixa de pH (ANTUNES, 2003).

As proteínas do soro têm sido cada vez mais utilizadas como ingredientes nutricionais e tecno-funcionais em várias formulações de alimentos, particularmente sob a forma de soro de leite em pó, concentrado proteico de soro de leite (WPC) e isolado proteico de soro de leite (WPI). A tecno-funcionalidade dos ingredientes de soro é determinada por alterações nas suas propriedades físico-químicas durante o processamento de alimentos, que normalmente incluem o tratamento térmico, como pré-aquecimentos, a pasteurização ou esterilização (RODRIGUES et al., 2015). Podem ser usadas como espumantes, emulsificantes e são consideradas ingredientes alimentícios potenciais, com capacidade para substituir outros ingredientes de características semelhantes, como a clara de ovo, ovo integral ou leite em pó desnatado em uma ampla variedade de produtos alimentícios, como por exemplo, em produtos de panificação, produtos cárneos, na fortificação de cereais, bebidas nutricionais, queijos, produtos farmacêuticos, na microencapsulação de lipídeos do leite (ZUNIGA, 2003).

Segundo Borges (2000) e Antunes (2003), quando comparadas com outras proteínas, as proteínas do soro apresentam viscosidade baixa, o que permite sua incorporação na produção de produtos dietéticos. Além disso, quando concentradas, são geralmente muito solúveis, e com tratamento térmico são desnaturadas, o que aumenta a sua capacidade de retenção de água, bem como sua viscosidade.

As proteínas do soro de leite constituem um grupo bastante diversificado de proteínas com características estruturais bem diferentes. As principais proteínas presente no soro são a beta-lactoglobulina (β -Lg), alfa-lactoalbumina (α -La), albumina do soro bovino (BSA) e as imunoglobulinas (Ig's), que

apresentam propriedades físico-química diferentes, como ponto isoelétrico, concentração no soro, massa molar e hidrofobicidade. A Massa molar dessas proteínas é de aproximadamente 18,4 KDa para a β -Lg, 14,0 KDa para a α -La, 66,0 KDa para a BSA e 150-1000 KDa para a Ig's. O ponto isoelétrico da β -Lg, α -La, BSA e Ig's é de 5,2, 4,5-4,8, 4,7-4,9, e 5,5-8,3 respectivamente. A β -Lg representa cerca de 50% das proteínas do soro, a α -La 20%, BSA 5% e a Ig's 10% (ANTUNES, 2003, PEREIRA, 2009).

3.2.1. Albumina do Soro Bovino (BSA)

Albumina do soro bovino (BSA) é um dos componentes principais no plasma sanguíneo, representando cerca de 60% da proteína total. É responsável por grande parte (80%) da regulação da pressão osmótica do sangue. A BSA é o principal transportador das mais variadas moléculas no organismo, sejam elas de caráter hidrofóbico (ácidos graxos, hormônios e drogas) ou hidrofílicos (a própria água, Ca^{2+} , Na^+ e K^+) (JORDÃO, 2007; ZHANG et al., 2012).

A BSA é o principal carreador de ácidos graxos, os quais são insolúveis no plasma sanguíneo. Ela também realiza muitas outras funções como, eliminação de radicais livres de oxigênio e desativação de vários metabolitos lipofílicos tóxicos. Apresenta uma alta afinidade por ácidos graxos, hematinas, bilirrubina, e uma grande afinidade por pequenos compostos aromáticos negativamente carregados. Como uma proteína de transporte multifuncional, a albumina é o carreador chave de óxido nítrico, o que tem implicado em vários processos fisiológicos importante, incluindo neurotransmissão (GLODBERG, 1952; FERREIRA, 2009).

Tem sido largamente estudada devido à sua estabilidade, baixo custo, propriedades de ligação e transporte em particular a sua homologia estrutural com a albumina do soro humano (HSA), além de sua natureza solúvel em água, que é importante para estudos de interações. (ZHANG et al., 2012; RAVINDRAN et al., 2010; EDWARDS et al., 2009).

A molécula de BSA apresenta uma homologia estrutural de 76% com a albumina do soro humano. Ambas as moléculas consistem em uma única cadeia polipeptídica, sendo que a BSA apresenta em sua cadeia 583 resíduos de aminoácidos e a HSA 585 resíduos de aminoácidos. Tanto a BSA quanto a HSA possuem apenas um resíduo de cisteína livre, Cys34. Os outros formam

17 pontes dissulfeto ajudando a manter a estrutura terciária. A BSA possui 2 resíduos de triptofano nas posições 134 e 212 e a HSA apenas um, triptofano 214. Apresentam massa molar da ordem de 66,0 KDa. Na faixa de pH entre 4,5 a 8,0, a molécula de HSA tem a forma de coração ($80\text{\AA} \times 80\text{\AA} \times 30\text{\AA}$) apresentando a mesma característica que a BSA. A molécula de HSA é constituída principalmente por α -hélices (~67,0%), já a molécula de BSA apresenta 54% de α -hélices(ESPÓSITO, 2000; ANTUNES, 2003;TANG et al., 2011; KHODARAHMI et al., 2012)

A estrutura secundária da BSA apresenta as cadeias dobradas entre si formando camadas que podem ser desenoveladas por diminuição do pH e novamente enoveladas por elevação do pH. É formada de 54% α -hélices, 40% de estruturas β (folhas e giros β) com três domínios específicos para ligação de íons metálicos, de lipídios e de nucleotídios, respectivamente. A quantidade de estrutura em α -hélice varia com o pH, de 54 a 44 e 35% nos pHs 3,6, 3,9 e 2,7, respectivamente (SGARBIERI, 2005).

As estruturas tridimensionais da BSA em forma de coração ($80\text{\AA} \times 80\text{\AA} \times 30\text{\AA}$) parecem ser mais ou menos semelhantes entre muitas espécies vivas. BSA contém três domínios homólogos helicoidais (I-III) ligados por enovelamento aleatório, cada um dividido em sub-domínios A e B (Figura 4) (KHODARAHMI et al., 2012)

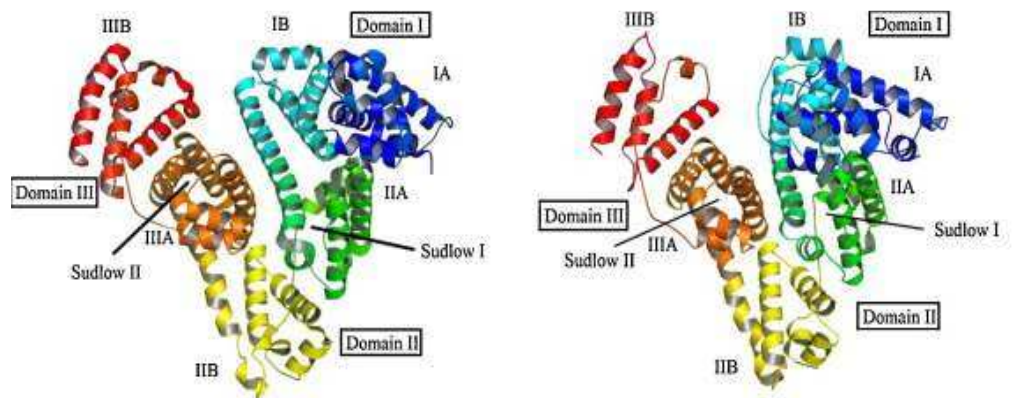


Figura 4. Representação da fita de HSA (esquerda) e BSA (direita) e a localização dos domínios de ligação. Estão indicadas as localizações dos sítios de ligações hidrofóbicos (Sudlow I e II). A estrutura secundária da proteína é mostrada como uma fita com os sub-domínios com código de cores da seguinte forma: IA, azul; IB, azul celeste; IIA, verde; IIB, amarelo; IIIA, laranja; IIIB, vermelho(KHODARAHMI et al., 2012).

O local Sudlow I e o local Sudlow II estão localizados nas cavidades hidrofóbicas dos subdomínios IIA e IIIB, respectivamente (KHODARAHMlet al., 2012).

A BSA apresenta em sua molécula apresenta dois resíduos de triptofano nas posições 134 e 212 que induz a fluorescência intrínseca a cerca de 280 nm (RAVINDRAN et al., 2010; TANG et al., 2011). O triptofano 212 está localizado na região hidrofóbica da proteína e o triptofano 134 está localizado sobre a superfície da molécula (LI et al., 2011), conforme ilustrado na figura 5.

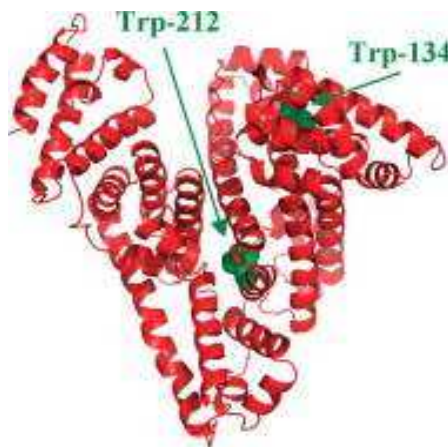


Figura 5. Estrutura da BSA, com resíduos de triptofano mostrados na cor verde.
Fonte: LI et al., 2011.

Duas características estruturais importantes da BSA são: a presença de um grupo sulfidrilo livre do peptídeo N-terminal e a existência de 17 pontes dissulfeto na molécula. O rompimento dessas ligações resulta em modificações de algumas de suas propriedades físico-químicas e estruturais, em especial do perfil de sedimentação na ultracentrifugação, das propriedades imunológicas e do perfil de solubilidade em função do pH. No estado nativo, a proteína apresenta elevada solubilidade na faixa de pH 1,5 a 8,0; entretanto, quando as ligações dissulfeto são rompidas aparece região de solubilidade mínima entre pH 3,5-5,0 que se amplia com o aumento do número de ligações rompidas. (HARAGUCHI et al., 2006).

Em pH abaixo do ponto isoelétrico apresenta alterações em suas propriedades físico-químicas, como aumento da viscosidade intrínseca, volume molecular e redução acentuada de solubilidade em 3 M de KCl (MICHAELIDEOU e STEIJINS, 2006).

A BSA não é carregada uniformemente na sua estrutura primária. Em pH neutro, ela possui uma rede de cargas de -10, -8 e 0 para os três domínios I, II, III. A distribuição de carga superficial é mostrada na Figura 6 (FERREIRA, 2009).

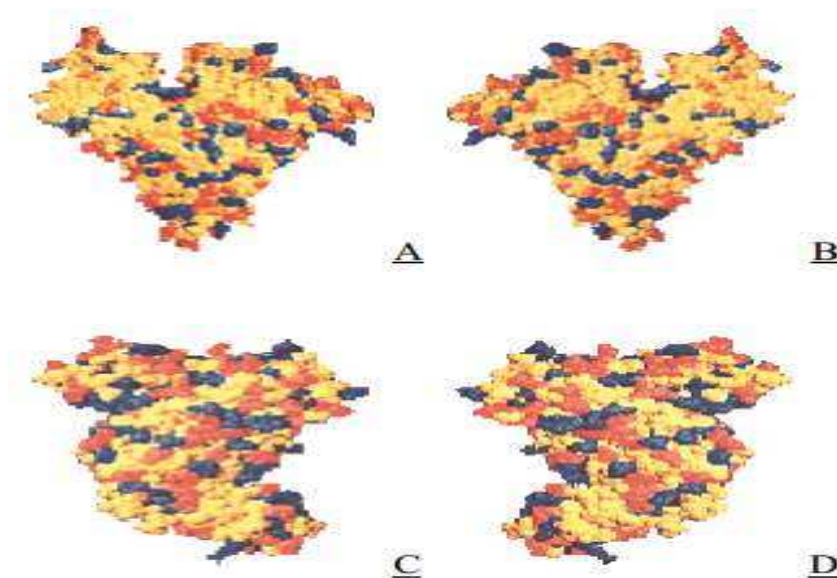


Figura 6. Modelo de preenchimento espacial da molécula de albumina do soro bovino com resíduos básicos coloridos em azul, resíduos ácidos em vermelho e resíduos neutros em amarelo. (A) vista frontal, (B) vista traseira, (C) lado esquerdo e (D) lado direito.

A BSA interage fortemente com pequenos compostos aromáticos negativamente carregados (FERREIRA, 2009). Os corantes artificiais são exemplos de pequenos compostos aromáticos que tem sido muito utilizado na indústria têxtil, papel, farmacêutica, alimentícia, cosméticos e eletrônicos. Esses compostos ao se ligarem a proteína podem causar alterações conformacionais, que, por sua vez, altera a estrutura secundária e terciária das proteínas. A estrutura das proteínas determina as suas importantes funções biológicas, logo as alterações estruturais resultantes das interações com esses ligantes podem influenciar o transporte, metabolismo e a disponibilidade dessas proteínas para outros ligantes no organismo, uma vez que ao interagir com os corantes a BSA pode deixar de interagir e transportar moléculas essenciais ao organismo, como por exemplo, vitaminas. Além disso, a solubilidade desses compostos pode ser aumentada quando os mesmo estão interagindo com as proteínas (PAN et al., 2010). As interações dos corantes

com a BSA pode reduzir a concentração livre disponível do corante e conseqüentemente sua ação tóxica (SHAHABADI, et al., 2012).

3.3. Interação corante x proteína

Proteínas do soro podem interagir com diferentes moléculas, inclusive com corantes alimentícios. Isto é importante tanto do ponto de vista tecnológico quanto nutricional e fisiológico. Alguns estudos têm sido realizados com diferentes corantes, para identificar o mecanismo de interação entre essas moléculas (HU et al., 2005; ABDULLAH 2008; BASU e GOPINATHA, 2015; WU et al., 2015).

Os corantes vermelho 40 e o vermelho ponceau 4R têm sido utilizados pela indústria de alimentos como corante alimentício por décadas, no entanto, a natureza de sua ligação aos componentes dos alimentos ainda não foi completamente investigada. A distribuição uniforme dos corantes em sistemas alimentícios é uma indicação de que existe uma forte interação e a formação de um complexo estável entre o corante e ligantes existentes em todo o processamento e armazenamento de alimentos.

Abdullah et al., 2008 estudou a interação do vermelho 40 com uma variedade de proteínas alimentares, incluindo proteínas do amendoim, farelo de arroz, alho, BSA e uma misturas delas. A formação de complexo entre proteína e vermelho 40 foi ilustrada por espectrofotometria. Além disso, utilizando análise de eletroforese, verificou-se que o vermelho 40 liga-se as proteínas podendo ser usado no processamento de alimentos, a temperaturas elevadas ou baixas. A intensidade da cor não é muito afetada a pH levemente ácidos ou básicos, e o corante pode ser utilizado em diversos alimentos processados, como a maior parte dos sistemas alimentícios são normalmente na gama de pH de 4-7,5 onde ligação de corante é ótima.

A interação entre o corante vermelho 40 e albumina do soro humano (HSA) também foi investigado, utilizando diferentes técnicas ópticas. Os resultados mostraram que o corante vermelho 40 tem a capacidade de extinguir a fluorescência intrínseca da HSA através da formação do complexo proteína-corante. Com base nos parâmetros termodinâmicos e simulações da dinâmica molecular, pode-se verificar que a formação do complexo proteína-

corante foi espontânea, sendo que as principais forças de interações foram às ligações de hidrogênio e as forças de van der Waals (WU et al., 2015).

A formação de complexo entre o azul de metileno um corante aromático policíclico e a albumina do soro humano (HSA) foi verificada por técnicas de espectroscopia de fluorescência e UV-vis. Além disso, observou-se que o efeito da temperatura sobre a constante de interação era pequeno. Assim, azul de metileno pode ser armazenado e transportado por proteínas no organismo (HU et al., 2005).

O complexo formado foi termodinamicamente estável, uma vez que, os valores da variação da energia livre de Gibbs padrão foram negativos nas temperaturas analisadas (292K, 278K, 304K, 310K). A entalpia negativa (ΔH) e entropia positiva (ΔS) indicam que as interações eletrostáticas desempenharam um papel importante na reação de ligação.

Recentemente um estudo realizado por Basu e Gopinatha, 2015 verificou que a interação entre BSA e HSA com tartrazina foi exotérmica. A formação do complexo proteína-corante foi de 1:1 para ambas as proteínas. A reação de ligação com ambas as albuminas do soro foi impulsionada por um grande ΔH° negativo ($-30,01 \text{ KJmol}^{-1}$ e $-45,10 \text{ KJmol}^{-1}$, respectivamente, para BSA e HSA). Pode ser visto também que a contribuição entrópica molar padrão para a interação, embora muito pequena, foi favorável para BSA enquanto, para a HSA, foi desfavorável. Os valores de ΔG° foram calculados como sendo, $-30,16$ e $-28,64$, respectivamente, para BSA e HSA. Assim, a formação do complexo BSA-tartrazina foi favorecida por um adicional de $1,52 \text{ KJ mol}^{-1}$ em comparação com HSA. No mesmo estudo com o aumento da força iônica (20mM $[\text{Na}^+]$, 30mM $[\text{Na}^+]$ e 50 mM $[\text{Na}^+]$) do meio, os valores da constante de interação diminuíram. O valor de K para o complexo BSA-tartrazina ($1,92 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) diminuiu para $1,47 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ (20mM $[\text{Na}^+]$), $1,05 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ (30mM $[\text{Na}^+]$) e $0,92 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ (50 mM $[\text{Na}^+]$). Para o complexo HSA-tartrazina o valor de K diminuiu de $1,04 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ para $0,97 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ (20mM $[\text{Na}^+]$), $0,89 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ (30mM $[\text{Na}^+]$) e $0,73 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ (50mM $[\text{Na}^+]$). Os valores de ΔH° e ΔG° também diminuíram com o aumento da concentração de sal, para ambas as proteínas (BASU e GOPINATHA, 2015).

Através de técnicas de modelagem molecular UV-vis e espectroscopia de fluorescência Lu et al. (2011) analisaram a interação entre o corante azóico Sudão II ($\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}$) e Sudão IV ($\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}$) com BSA. Além disso, as

alterações conformacionais da BSA que ocorreram na presença dos corantes foram analisadas utilizando espectroscopia de dicroísmo circular (CD). Verificou-se que a interação entre os corantes Sudão II e Sudão IV com BSA foi espontâneo e as forças de Van der Waals desempenharam papel fundamental na interação. Através dos espectros obtidos por UV-vis e dicroísmo circular observou-se que a estrutura secundária da molécula de BSA foi alterada quando adicionados de certas quantidades do corante Sudão II. No entanto, a alteração mais grave foi observada para o corante Sudão IV provavelmente devido às características estruturais (apresenta mais grupo metilfenil e grupos azo).

Várias são as técnicas utilizadas em estudos de interações intermoleculares. Algumas técnicas são mais sensíveis, outras mais rápidas e de fácil manuseio. A combinação das diferentes técnicas nos permite um perfil completo dos parâmetros de interações ocorridas entre proteínas e corantes.

3.4. Técnicas experimentais para avaliação de interações intermoleculares

Diversas técnicas são capazes de avaliar a interação intermolecular entre proteínas e corantes. Técnicas espectroscópicas são ferramentas muito úteis para obter informações importantes sobre as interações intermoleculares.

Técnicas como dicroísmo circular (CD), estudo de “docking” de proteínas, espectroscopia Raman, são úteis para identificar alterações ocorridas devido à interação de proteínas com ligante, assim como modificação nos fatores ambientais, como alterações no pH e força iônica.

Associação do ligante com as proteínas normalmente envolve mudanças nas interações intramoleculares e intermoleculares. As mudanças nas interações são refletidas na variação da entalpia e entropia de interação, que por sua vez determinam a variação da energia livre de interação.

Muitas são as técnicas disponíveis para os estudos de interações intermoleculares, porém há uma necessidade de técnicas altamente sensíveis, eficaz na compreensão dos mecanismos de interações e na determinação de parâmetros termodinâmicos de interação, uma vez que detectam variações muito pequenas de energia de interações. Dentre estas técnicas, podemos

citar: a espectroscopia de fluorescência, nanocalorimetria de titulação isotérmica e nanocalorimetria exploratória diferencial, medidas eletrocinéticas.

Fluorescência é a emissão de luz a partir de um estado excitado singlete, no qual o elétron excitado não muda a orientação de spin, continuando desemparelhado. Consequentemente, o retorno ao estado fundamental é permitido e ocorre rapidamente via emissão de um fóton. Logo, se a diferença energética entre o estado excitado e o estado fundamental for relativamente grande, a desativação para o estado fundamental se dá com emissão de radiação na forma de fluorescência (ARAUJO, 2010).

A espectroscopia de fluorescência se caracteriza por ser uma técnica de alta sensibilidade, rápida e que possibilita análise em tempo real. As proteínas apresentam três diferentes resíduos de aminoácidos que contribuem para emissão de fluorescência: tirosina, triptofano e fenilalanina. Cerca de 90% da emissão total de fluorescência das proteínas, no entanto, é de atribuição aos resíduos de triptofano (FARRELL et al., 2001).

A intensidade de fluorescência pode ser diminuída por muitos processos. Esta redução da intensidade de fluorescência é chamada de supressão. Uma grande variedade de interações moleculares pode resultar no fenômeno da supressão. Dentre elas temos as reações de estado excitado, rearranjos moleculares, transferência de energia, formação de complexos no estado fundamental e supressão colisional ou dinâmica. Tanto a supressão estática quanto a supressão dinâmica requerem contato entre o fluoróforo e o agente supressor, pois um fluoróforo isolado não perde sua intensidade de fluorescência espontânea. No caso da supressão colisional, o supressor se difundirá no fluoróforo durante o tempo de vida de seu estado excitado. Em geral, a supressão colisional ocorre sem nenhuma alteração permanente na molécula, ou seja, sem reação fotoquímica. Já na supressão estática um complexo não fluorescente no estado fundamental é formado entre o fluoróforo e o supressor. Contudo, em ambos os casos, estático e dinâmico, para que ocorra o fenômeno de supressão o fluoróforo e o supressor devem estar em contato (MARQUEZIN, 2008)

Na supressão estática, a diminuição da intensidade de fluorescência é descrita pela equação de Stern-Volmer (Equação 1).

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

Em que F_0 e F são a intensidade de fluorescência da proteína na ausência e na presença do ligante, respectivamente, $[Q]$ é a concentração do ligante, K_{SV} é a constante de extinçãodinâmica, K_q é constante de supressão Stern-Volmer e τ_0 é o tempo de vida médio da molécula sem o ligante.

A constante de ligação (K_a) e o número de sítios de ligação (n) podem ser determinados a partir da curva de regressão de logaritmo duplo (Equação 2).

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

A determinação da constante de ligação (K_a) em diferentes temperaturas permite a obtenção da variação da entalpia de interação (ΔH) (Equação 3)

$$\ln \frac{K_{a2}}{K_{a1}} = \frac{\Delta H}{R} \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right) \quad (3)$$

Em que K_a é a constante de ligação na referida temperatura, R é a constante dos gases e T é a temperatura de trabalho.

A proteína albumina do soro bovino apresenta em sua estrutura dois resíduos de triptofano nas posições 134 e 212 e dezenove resíduos de tirosina na molécula que induz a fluorescência intrínseca. (RAVINDRAN et al., 2010; TANG et al., 2011). Quando excitados a um comprimento de onda de 295nm, apenas triptofano emite fluorescência, enquanto ambos triptofano e tirosina emitem quando excitados a 280 nm (LI e SUBIRADE, 2012; GHALANDARI, 2014). Sendo assim a espectroscopia de fluorescência é uma técnica simples que permite a determinação de parâmetros termodinâmicos de interação entre proteínas e moléculas pequenas como os corantes. Através da técnica de espectroscopia de fluorescência, Cheng et al., 2013, verificou que a extinção de fluorescência da BSA e HSA foi devido à formação de complexo entre corante natural indigotina e as proteínas (BSA e HSA). A constante de interação para o complexo indigotina-BSA foram $9,58 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}$ (293K), $8,73 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}$ (298K), $7,61 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}$ (304K) e $5,2 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}$ (310K). Para o complexo indigotina-HSA os valores da constante de interação foram

menores, sendo $7,65 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}$ (293K), $5,84 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}$ (298K), $5,11 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}$ (304K) e $2,88 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}$ (310K).

A nanocalorimetria de titulação isotérmica (nanolTC) é a única técnica experimental que pode fornecer parâmetros termodinâmicos (entalpia, entropia, constante de interação e estequiometria) a partir de uma única análise.

É uma técnica baseada na medição precisa da energia na forma de calor absorvida ou liberada durante o evento em uma sequência de titulações.

O experimento é realizado em um equipamento composto por duas células em seu interior, sendo uma célula de referência. Um dispositivo termoelétrico mede a diferença de temperatura entre as duas células. As soluções de corantes (10 μ L) serão tituladas, com o auxílio de uma seringa, controlada por um software, sobre a célula de amostra contendo (1,8 mL) solução de proteína, sendo que na célula de referência não será titulado nada. As injeções serão realizadas a cada 60min. Um agitador presente no interior da célula de amostra roda a 300r.p.m, homogeneizando a amostra. O fluxo de energia na forma de calor é detectado por um sistema de termopilhas com uma precisão de 10^{-8} J. Antes de começar as medidas é necessário esperar um determinado tempo para que as células entrem em equilíbrio térmico com um banho que fica localizado no interior do calorímetro.

A cada injeção realizada é obtido um pico (Figura 7.a) referente à formação do complexo, através da integração dos picos obtidos será calculado a variação da entalpia de interação.

Durante um único experimento é possível determinar simultaneamente a variação da entalpia de interação (ΔH_{int}) a partir da integração dos picos (equação 4), a constante de ligação (K_a) e o número de sítios de ligação por meio da linearização da curva (Figura 7.b).

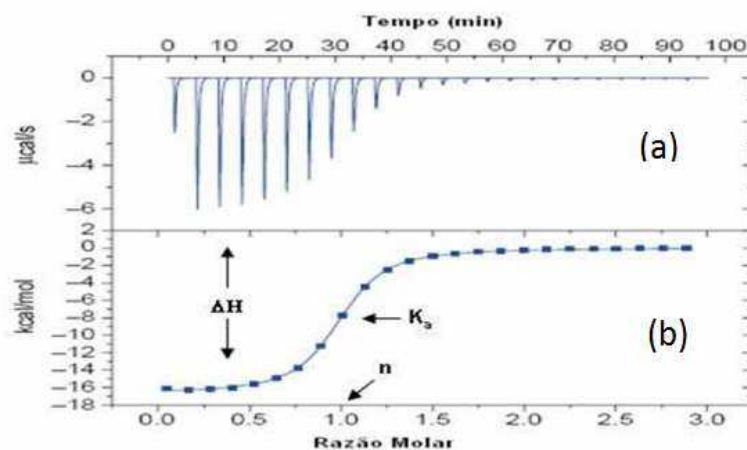


Figura 7. (a) Picos obtidos pela técnica de calorimetria após cada injeção do titulante sobre a amostra. (b) Curva obtida após a integração dos picos.

$$\Delta H = \frac{1}{[Q]_{total} \cdot V_0} \cdot \int_{t=0}^{t=\infty} \frac{dQ(t)}{dt} dt \quad (4)$$

Onde, [Q] é a concentração do corante, V₀ o volume inicial de solução na cela de amostra.

Após a determinação da constante de interação é possível determinar a variação da energia livre de Gibbs de interação (ΔG) utilizando a Equação 5.

$$\Delta G = - RT \ln K_a \quad (5)$$

Em que R é a constante universal dos gases perfeitos (R=8,3145 J.K⁻¹.mol⁻¹) e T a temperatura (K);

Desta forma, é possível assim determinar todos os parâmetros termodinâmicos de interação, com auxílio da Equação 6, proporcionando um perfil completo da termodinâmica de interação.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (6)$$

Em que ΔS é a variação da entropia de interação.

A medida de tensão interfacial também fornece informações sobre o mecanismo de interação entre proteínas e diferentes moléculas, como corantes alimentícios. O princípio da medição da tensão interfacial para detectar interações moleculares é que as interações moleculares geralmente induzem alterações nas propriedades físico-químicas das moléculas envolvidas, por exemplo, proteínas. A maioria das biomoléculas tem algum grau de atividade de superfície, e podem facilmente adsorver em uma interface e, conseqüentemente, modificar as propriedades superficiais. Uma das propriedades mais importantes de superfície é a tensão interfacial. Medidas das variações de tensão interfacial irão então refletir as interações entre as moléculas na região da interface.

A equação de Gibbs é dada pela expressão da Equação 7.

$$d\gamma = -\sum_{i=1}^n \frac{n_i}{A} d\mu_i = -\sum_{i=1}^n \Gamma_i d\mu_i \quad (7)$$

A concentração interfacial ou adsorção (Γ_i), que é obtida por meio da equação fundamental de Gibbs para adsorção (Equação 8), é dada por:

$$\Gamma_i = \frac{n_i}{A} \quad (8)$$

Em que γ é a tensão interfacial, μ_i o potencial químico, n_i o número de moléculas, A a área.

O método para determinação da tensão interfacial consiste na avaliação do perfil de uma gota pendente de um líquido suspenso no ar. Quando em equilíbrio mecânico a gota exibe um perfil resultante do balanço entre a força da gravidade e as forças de superfície, como pode ser visualizado na Figura 7

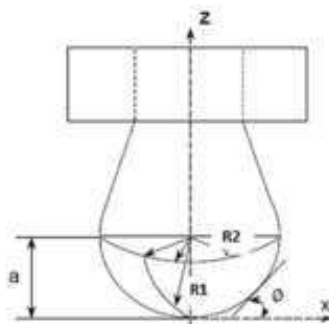


Figura 8. Figura esquemática de uma gota pendente. Fonte: MORITA, 2000.

Em que a é o raio de curvatura da gota no ápice, R_1 é o raio de curvatura no plano da figura, R_2 é o raio de curvatura no plano perpendicular à Figura x e Φ é o ângulo entre o raio de curvatura R_1 e o eixo z (MORITA, 2000).

Esse equilíbrio pode ser descrito por meio das Equações 9 a 11 (equações de Bashforth e Addams):

$$\frac{d\Phi}{ds} = \frac{2}{B} - Z - \frac{\sin \Phi}{x} \quad (9)$$

$$\frac{dx}{ds} = \cos \Phi \quad (10)$$

$$\frac{dz}{ds} = \sin \Phi \quad (11)$$

Em que x e z correspondem às variáveis x e z (eixos das dimensões da figura 8), reduzidas à forma adimensional, dividindo-se as variáveis pelo raio de curvatura no ápice da gota (Figura 8); s corresponde ao comprimento do arco no ponto $(x;y)$, também na forma adimensional; e B é definido pela Equação 12:

$$B = \frac{\Delta\rho \cdot g \cdot a^2}{\gamma} \quad (12)$$

Em que $\Delta\rho$ é a diferença de densidade entre os meios 1 e 2; g é a aceleração da gravidade; e a é o raio de curvatura no ápice da gota e γ a tensão interfacial (SOARES, 2013 e MORITA, 2000).

As interações intermoleculares também podem ser investigadas utilizando a técnica de dispersão de Taylor-Aris. A difusão molecular em líquidos está presente em processos físico-químicos que envolvem transferência de massa. Em um líquido puro, o movimento de moléculas é chamado Browniano, e foi descrito por Einstein, através da relação $\langle Z^2 \rangle = 2Dt$ onde, $\langle Z^2 \rangle$ representa o deslocamento quadrático médio da molécula em uma dimensão, D , o coeficiente de difusão desta molécula, e t , o intervalo de tempo associado (TYRRELL et al., 1984).

Já no caso de uma mistura que apresenta um gradiente de concentração, o fluxo de massa de uma molécula (componente i) na direção z , $J_{i,z}$, é descrito pelas Equações 13 e 14, conhecidas como leis de Fick para difusão, onde i representa o vetor unitário e D_i , é chamado de coeficiente de interdifusão, ou de difusão mútua.

$$J_{i,z} = -D_i \left(\frac{\partial c_i}{\partial z} \right) i \quad (13)$$

$$\left(\frac{\partial c_i}{\partial t} \right) = D_i \left(\frac{\partial^2 c_i}{\partial z^2} \right) \quad (14)$$

Várias técnicas vêm sendo empregadas na determinação dos coeficientes de difusão em líquidos. Entre as mais utilizadas, temos: a técnica interferométrica do Gouy, a de cela de diafragma, a espectroscopia de RMN com eco spin e o método de dispersão de Taylor. Sendo que esta última tem sido bastante utilizada devido à relativa simplicidade dos equipamentos empregados. Esta técnica foi desenvolvida a partir dos estudos realizados por Taylor sobre a dispersão de solutos em um fluido em escoamento no interior de um tubo longo, e complementada por Aris (LOH, 1997).

De acordo com essa técnica, uma pequena quantidade da solução é injetada utilizando um injetor HPLC Rheodyne com volume de amostra de 20 µL no eluente em fluxo laminar em um tubo estreito e longo. O soluto então sofre uma combinação de processos de dispersão, devido ao gradiente de concentração e ao perfil parabólico de velocidade no interior da coluna de 30 m, e raio interno de 0,601x10⁻³m. Ao final da coluna a amostra segue para um detector, espectrofotômetro UV/Vis. Após um pulso de amostra ser injetado no equipamento e entrar na coluna os efeitos de dispersão e difusão molecular fazem com que o pulso se alargue vagarosamente até que um perfil gaussiano seja formado e detectado como a absorbância ao longo do tempo (Figura 9) (LINO, 1997).

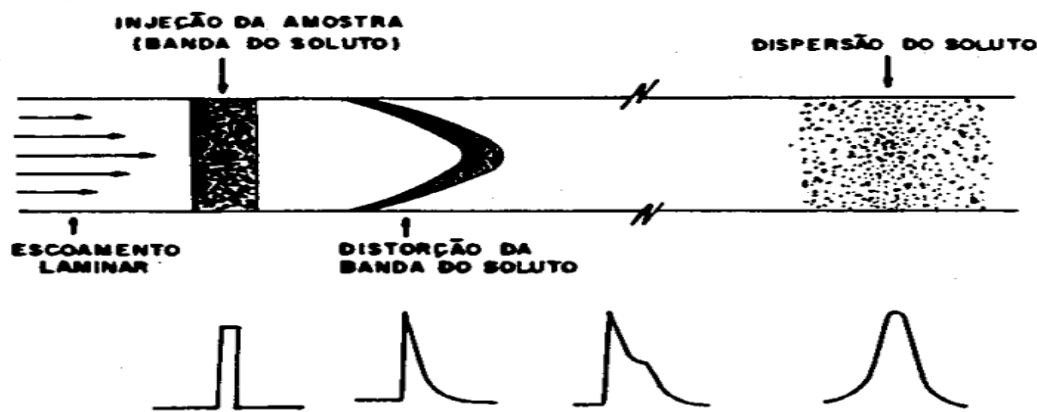


Figura 9. Esquema da dispersão de um soluto ao longo do tubo em um experimento de Taylor. Fonte: LINO, 1997.

O coeficiente de difusão pode ser obtido a partir de parâmetros da curva, utilizando a Equação 17:

$$CD = \frac{r^2 t_r}{24\sigma^2} \quad (15)$$

Onde r^2 é o raio da coluna ao quadrado, t_r o tempo de retenção, e σ^2 o largura do pico na altura média ao quadrado.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLAH, S. U.; BADARUDDIN, M.; SAYEED, S. A.; ALI, R.; RIAZ, M. N. Binding ability of Allura red with food proteins and its impact on protein digestibility. **Food Chemistry**, vol 110, pag. 605-610, 2008.

ANDRADE, F. I.; GUEDES, M. I. F.; VIEIRA, I. G. P.; MENDES, F. N. P.; RODRIGUES, P. A. S.; MAIS, C. S. C.; ÁVILA, M. M. M.; RIBEIRO, L. M. Determinations of synthetic food dyes in commercial soft drinks by Itc and ion-pair HPLC. **Food Chemistry**, vol. 157, pag. 193-198, 2014.

ANTUNES, A. J. **Funcionalidade de proteínas do soro de leite bovino**. 1º Ed. Barueri: Manole, 2003. 137p.

ARAÚJO, L. M. P. **Análise de detecção de fluorescência para aplicação em sistemas de diagnósticos em saúde**. Dissertação (mestrado). Programa de pós-graduação em engenharia elétrica e informática industrial, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

ARAÚJO, E. A.; ANDRADE, N. J.; SILVA, L. H. M.; CARVALHO, A. F.; RAMOS, A. M.; SILVA, C. A. S. Aspectos coloidais da adesão de microrganismos. **Química Nova**, vol. 33, nº 9, pag. 1940-1948, 2010.

BASU, A.; GOPINATHA, S. K. Thermodynamics of the interaction of the food additive tartrazine with serum albumins: A microcalorimetric investigation. **Food Chemistry**, vol. 175, pag. 137-142, 2015.

BORGES, P. Z. **Avaliação nutricional de concentrados protéicos obtidos do leite bovino**. 2000. 97p. Dissertação (Mestre) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

BURSTEIN, E. A.; VEDENKINA, N. S.; IVKOVA, M. N. Fluorescence and the location of tryptophan residues in protein molecules. **Photochem. Photobiol.**, vol.18, pag. 263-279, 1973.

CHANLON, S.; JOLY-POTTUZ, L.; CHATELUT, M.; VITTORI, O.; CRETIER, J. L. Determination of Carmosine, Allura red and Ponceau 4R in sweets and soft drinks by Differential Pulse Polarography. **J. Food Comp. and Analysis**, vol. 18, pag. 503-515, 2005.

CHENG, Z. J.; ZHAO, H. M.; XU, Q. Y.; LIU, R. Investigation of the interaction between indigotin and two serum albumins by spectroscopic approaches. **J. Pharm. Analysis**, vol. 3, n°4, pag. 257-269, 2013.

DA LUZ, J. A. M.; LIMA, R. M. F. Medida de tensão superficial. Centro de Tecnologia Mineral Ministério de Ciência e Tecnologia, cap. 27, pag. 473, 2007.

DE WIT, J. N. Nutritional and functional characteristics if whey proteins in foods products. **Journal Dairy Science**, vol. 81, n° 3, pag. 597-608, 1998.

DOWNHAM, A.; COLLINS, P. Colouring our foods in the last and next Millennium. **International Journal of Food Science and Technology**, vol. 35, pag. 5-22, 2000.

EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS). Scientific Opinion on the re-evaluation of ponceau 4R (E 124) as a food additive on request from the European Commission. **EFSA Journal**, vol. 7, n° 11, pag. 1328, 2009.

ERCELEN, S.; KLYMCHENKO, A. S.; MÉLY, Y.; DEMCHENKO, A. P. The binding of novel two-color fluorescence probe FA to serum albumins of different species. **Intern. Jour. of Biol. Macromolecules**, vol. 35, pag. 231-242, 2005.

ESPÓSITO, B. P. **Interações de complexos de ródio (II) com albumina humana**. Tese (doutorado), Universidade de São Paulo, Instituto de Química, 159 pag., 2000.

FARRELL JR, H. M.; MALIN, E. L.; BROWN, E. M.; QI, P. X. Casein micelle structure: What can be learned from milk synthesis and structural biology? **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 11, pag. 135-147, 2006.

FARRELL JR., H. M.; WICKHAM, E. D.; UNRUH, J. J.; QI, P. X.; HOAGLAND, P. D. Secondary structural studies of bovine caseins: temperature dependence of β -casein structure as analyzed by circular dichroism and FTIR

spectroscopy and correlation with micellization. **Food Hydrocolloids**, vol.15, p.341-354, 2001.

FERREIRA, S. E. **Interação da albumina do soro bovino (BSA) com substratos sintéticos**. Tese (doutorado), Departamento de Física e Matemática, Universidade de São Paulo, São Paulo, 120 pag.,2009.

GHUMAN, J.; ZUNSZAIN, P. A.; PEPITPAS, I.; BHATTACHARUA, A. A.; OTAGIRI, M.; CURRY, S.; Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. **J. Mol. Biol.**, vol. 353, pag. 38-52, 2005.

GLODBERG, R. J. A theory os antibody antigen reactions. Theory for reactions of multivalent antigen with bivalent and univalent antibody.**Journal of the American Chem. Society**, vol. 74, n°22, pag. 5715-5725, 1952.

GOMES, L. M. M. **Inclusão de carotenóides de pimentão vermelho em ciclodextrinas e avaliação da sua estabilidade, visando aplicação em alimentos**. Dissertação (mestrado), Universidade Federal Fluminense. Faculdade de Farmácia. Niterói, 108 p. 2012.

HARAGUCHI, F. K.; ABREU, W. C.; DE PAULA, H. Proteínas do soro de leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista de Nutrição**, vol. 19, n°4, pag. 479-488, 2006.

HU, Y.; LI, W.; LIU, Y.; DONG, J.; QU, S. Fluorometric investigation of the interactions between methylene blue and human serum albumin.**Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. Vol.39, pag. 740-745, 2005.

JORDÃO, C. E. K. M. A. C. **Estudo do equilíbrio de fases em sistemas aquosos contendo albumina de soro bovino e polietileno glicol**. Dissertação (mestrado) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, 83 pag., 2007.

KAPADIA, G. J.; TOKUDA, H.; SRIDHAR, R.; BALASUBRAMANIAN, V.; TAKAYASU, J.; BU, P.; ENJO, F.; TAKASAKI, M.; KONOSHIMA, T.; NISHINO, H. Cancer chemopreventive activity of synthetic colorants used in foods, pharmaceuticals and cosmetic preparations. **Cancer Letters**, vol. 129, pag. 87-95, 1998.

KHAN, A. Y.; HOSSAIN, M.; KUMAR, G. S. Investigations on the interaction of the phototoxic alkaloid coralyne with serum albumins.**Chemosphere**, vol. 87, pag.775-781, 2012.

KHODARAHMI, R.; KARIMI, S. A.; KOOSHK, M. R.A.; GHADAMI, S. A.; GHOBADI, S.; AMANI, M. Comparative spectroscopic studies on drug binding

characteristics an protein surface hydrophobicity of native and modified forms of bovine serum albumin: Possible relevance to change in protein structure/function upon non-enzymatic glycation. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, vol.89, p.177-186, 2012.

KUNZ, A.; PERALTA-ZAMORA, P.; DE MORAES, S. G.; DURÁN. N. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova**, vol. 25, nº 1, pag. 78-82, 2002.

LI, D.; CHEN, T. Z.; XU, C.; JI, B. Effect PF pH on the interaction of vitamin B12 with bovine serum albumin by spectroscopic approaches. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, vol.83, p.598-608, 2011.

LINO, A. C.; **Implementação da técnica de Taylor-Aris, para medidas de coeficiente de difusão em fase líquida e suas aplicações**. Dissertação (mestrado), Universidade Estadual de Campinas, 74p., 1997.

LOH, W. A técnica de dispersão de Taylor para estudos de difusão em líquidos e suas aplicações. **Química Nova**, vol 20, nº 5, pag. 541-545, 1997.

LU, D.; ZHAO, X.; ZHAO, Y.; ZHANG, B.; ZHANG, B.; GENG, M.; LIU, R. binding of Sudan II and Sudan IV to bovine serum albumin: Comparison studies. **Food and Chemical Toxicology**, vol. 49, pag. 3158-3164, 2011.

MACINTOSH, G. H.; REGESTER, G. O.; LE LEU, R. K.; ROYLE, P. J.; SMITHERS, G. W. Dairy proteins protect against dimethylhydrazine-induced intestinal cancers in rats. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, vol. 125, nº4, pag. 809-816, 1995.

MACKINSKI-Jr, M. Estimates of maximum limits of food colors use in brazil through the Danish budget method and the baerand wuertzen-modified method. **Food Additive Contamination**, vol. 15, nº 4, pag. 481-186, 1998.

MARMITT, S.; PIROTTA, L. V.; STULP, S. Aplicação de fotólise direta e UV/H₂O₂ a efluente sintéticos contendo diferentes corantes alimentícios. **Química Nova**, vol. 33, nº 2, pag. 384-388, 2010.

MARQUEZIN, C. A. **“Técnicas de fluorescência no monitoramento de membranas modelo”**. Tese (doutorado), Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 96 pag, 2008.

MEYER, O.; HANSEN, E. A study of the embryotoxicity of the food colour Ponceau 4R in rats. **Toxicology**, vol.5, pag.201-207, 1975.

MICHAELIDEOU, A.; STEIJNS, J. Nutritional and technology aspects of minor bioactive components in milk and whey: growth factors, vitamins and nucleotides. **International Dairy Journal**, vol. 16, pag.1421-1426, 2006.

MILES, A. J.; WALLACE, B. A. Biophysical Characterization of Protein in Developing. **Biopharmaceuticals**, pag.109-137, 2015.

MOMMA, J.; KAWAMATA, K.; TAKADA, K.; HORIUCHI, S.; TOBE, M.A study on teratogenicity of new cocine, Food Red N°.102, in mice. **Bull. Natl. Inst. Hyg. Sci.** Vol.99, pag. 73-78, 1981.

MORITA, A. T.; ZAMBERLAN, R. D. T.; SHIMIZU, R. N.; PALMEZAN, E.; DEMARQUETTE, N. R. **Avaliação do método da gota pendente para determinação da tensão superficial de líquidos de baixos pesos moleculares e polímeros fundidos**. Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, Anais, 14, São Pedro – SP, 2000.

OLIVEIRA, M. V. A.; ALVES, D. D. L.; LIMA, L. H. G. M.; SOUSA, J. M. C.; PERON, A. P. Cytotoxicity of erythrosine (E-127), brilliant blue (E-133) and red 40 (E-129) food dyes in a plant test system. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, vol. 34, n°4, pag.557-562, 2013.

PAGANO, B.; RANDAZZO, A.; FOTTICCHIA, I.; NOVELLINO, E.; PETRACCONI, L.; GIANCOLA, C. Differential scanning calorimetry to investigate G-quadruplexes structural stability. **Methods**, vol. 64, pag.43-51, 2013.

PAN, H.; FENG, J.; CERNIGLIA, C. E.; CHEN, K. Effects of Orange II and Sudan III azo dyes and their metabolites on *Staphylococcus aureus*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, vol.38, n°10, pag. 1729-1738, 2011.

PAN, X.; LIU, R.; QIN, P.; WANG, L.; ZHAO, X. Spectroscopic studies on the interaction of acid yellow with bovine serum albumin. **Journal of Luminescence**, vol. 130, pag 611-617, 2010.

PEREIRA, I. O. **Análise e otimização do processo de ultrafiltração do soro de leite para produção de concentrado protéico**. Dissertação (mestrado), Universidade Federal do Sudoeste da Bahia –UESB, 62 pag., 2009.

PHADUNGATH, C. Casein micelle structure: a concise review. **Journal Science Technology**, v. 27, pag. 201-212, 2005.

PRADO, M. A.; GODOY, H. T. Corantes artificiais em alimentos. **Alimentos e Nutrição**, vol.14, nº2, pag.237-250, 2003.

POPPI, F. A.; COSTA, M. R.; RENSIS, C. M. V. B.; SIVIERI, K. Soro de leite e suas proteínas: composição e atividade funcional. **Unopar Cient., Ciênci. Biol. Saúd**, vol 12, nº2, pag. 31-37, 2010.

RAVINDRAN, A.; SINGH, A.; RAICHUR, A. M.; CHANDRASEKARAN, N.; MUKHERJEE, A. Studies on interaction of colloidal Ag nanoparticles with Bovine Serum Albumin (BSA). **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, vol.76, p.32-37, 2010.

RODRIGUES, R. M.; MARTINS, A. J.; RAMOS, O. L .; MALCATA, F. X.; TEIXEIRA, J. A.; VICENTE, A. A.; PEREIRA, R. N. Influence of moderate eletric fields on gelation of whey protein isolate. **Food Hydrocolloids**, vol. 43, pag. 329-339, 2015.

SALINAS, RD. **Alimentos e Nutrição: Introdução à Bromatologia**. 3ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.

SASAKI, Y. F.; KAWAGUCHI, S.; KAMAYA, A.; OHSHITA, M.; KABASAWA, K.; IWAMA,K.; TANIGUCHI, K.; TSUDA, S. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. **Mutation Research**, vol. 519, pag. 103-119, 2002.

SGARBIERI, V. C. Revisão: Propriedades estruturais e físico-químicas das proteínas do leite. Braz. **J. Food Technol.**, vol.8, nº1, pag. 43-56, 2005.

SHAHABADI, N.; MAGHSUDI, M., ROUHANI, S. Study on the interaction of food colourant quinoline yellow with bovine serum albumin by spectroscopic techniques. **Food Chemistry**, vo.l 135, pag. 1836-1841, 2012.

SHIMADA, C.; KANO, K.; SASAKI, Y. F.; SATO, I.; TSUDA, S. Differential colon DNA damage induced by azo food additives between rats and mice. **The Journal of toxicological Sciences**, vol.35, nº 4, pag. 547-554, 2010.

SOARES, M. P. M. **Avaliação da eficiência de sabonetes com triclosan sobre suspensões bacterianas de Escherichia coli e Staphylococcus aureus aplicadas sobre a superfície das mãos de voluntários**. Dissertação (mestrado), Universidade Federal de Viçosa, 69 pag., 2013.

TANAKA, T.; Reproductive and neurobehavioral toxicity study of ponceau 4R administered to mice in the diet.**Food Chem. Toxicol.**vol.44, pag.1651-1658, 2006.

TAULIER, N.; CHALIKIAN, T. V. Characterization of pH-induced transitions of β -lactoglobulin: Ultrasonic, densimetric, and spectroscopic studies. **J. Mol. Biol.** vol. 314, pag.873-889, 2001.

TYRELL, H. J. V.; HARRIS, K. R.; Diffusion in liquids, Butterworths, London, 1998.

UNITED STATES DAIRY EXPORT COUNCIL, Manual de referencia para produtos de soro dos EUS. Arlington, 1997.

USDEC – U. S. Dairy Export Council. Ingredientes lácteos para uma alimentação saudável. **USDEC News**, vol.2, nº4, pag.1-3, 2002.

WARD, N. I. Assessment of chemical factors in relation to child hyperactivity. **Journal of Nutritional & Environmental Medicine**, vol. 7, pag. 333-342, 1997.

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

ZEIGER, E. and MARGOLIN, B. H.The proportions of mutagens among chemicals in commerce.**Regul. Toxicol. Pharmacol.**, vol. 32, pag. 219-225, 2000.

ZUNIGA, A. D. G. **Estratégia de purificação das proteínas α -lactoalbumina e β -lactoglobulina do soro de queijo**. Tese (doutorado), Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 155 pag, 2003.

CAPÍTULO 2

Binding ability of synthetic red food dyes with bovine serum albumin: a thermodynamic approach

Abstract: The interaction between Allura Red (AR) or Ponceau 4R (P4R) and bovine serum albumin (BSA) was studied, *in vitro*, at pH 3.5, 5.0 and 7.4, at different temperatures, and in the absence or presence of NaCl. Fluorescence spectra showed that BSA fluorescence intensity decreased as AR and P4R concentration enhanced. The fluorescence quenching was classified as static quenching due to formation of food dyes-BSA complexes for all studied conditions, which were driven by enthalpy reduction or entropy increasing. For all analyzed conditions, Gibbs free energy values were negative, indicating that complex formation was more favorable than reactants. AR and P4R diffusion coefficient (DC) at presence of increasing BSA concentration was determined by Taylor-Aris technique and corroborating these results since there was a reduction on colorant DC, which was also affected by salt presence. Interfacial tension (TI) measurements showed that BSA-colorant complexes presented surface activity at all studied pHs, since TI of water-air interface decreased as food dye concentration enhanced. This technique also provided the stoichiometry of complexation similar to those obtained by fluorimetric experiments. Isothermal titration calorimetric (ITC) measurements were carried out to determine apparent interaction enthalpy change ($\Delta_{app-int}H$) between BSA and colorants. Calorimetric results showed that BSA-food dye interactions were driven by enthalpy or entropy, depending on thermodynamic conditions and on BSA conformation. In addition, determined $\Delta_{app-int}H$ values were different from those calculated by van't Hoff analyses. It was also found that electrostatic and hydrophobic interactions occurred in BSA-colorant interaction; and surprisingly a small structural difference in food dye molecules shows a great effect in the interaction P4R-BSA compared to AR-BSA. This work contributes to knowledge about interaction between BSA and synthetic colorants in food (pH 3.5 and 5.0) and blood conditions (pH 7.4).

Keywords: fluorescence; interfacial tension; diffusion coefficient; enthalpy; synthetic food dye

1. Introduction

In spite of the concern about their safety synthetic food dyes, have been widely used in the production of foods for improving their appearance and make them more attractive to consumers (de Andrade et al., 2014; Saeed, Abdullah, Sayeed, & Ali, 2010).

The most used synthetic dyes contain at least one azo ($N=N$) functional groups and two or three aromatic ring structures (Bermúdez-Aguirre, Yáñez, Dunne, Davies, & Barbosa-Cánovas, 2010; Saeed et al., 2010) that can be harmful to human health if excessively consumed (de Andrade et al., 2014; Vieira, Esquerdo, Nobre, Dotto, & Pinto, 2014). Allura Red (E129) and Ponceau 4R (E124) are water-soluble monoazo colorants, and are responsible for giving fascinating red color to different kinds of foods (Soylak, Unsal, & Tuzen, 2011; Wang, Zhang, & Wang, 2014; Zhang, Zhang, Lu, Yang, & Wu, 2010), however they have been related to allergy, toxic effects (Dinç, 2002) and hyper activity in children (McCann et al., 2007) then it is not recommended for children consumption in Europe (Pourreza, Rastegarzadeh, & Larki, 2011; Wang et al., 2014).

The uniform distribution of the colorants such as Allura Red (AR) and Ponceau 4R (P4R) in different food matrices is a real indication that strong interactions and stable complexations between the dye and food molecules such as proteins exist and remain throughout the food processing and storage (Abramsson-Zetterberg & Ilbäck, 2013; Saeed et al., 2010).

Bovine serum albumin (BSA) is the major soluble protein in blood plasma for cows and play an important physiological role mainly in transporting various compounds (Shahabadi, Maghsudi, & Rouhani, 2012). BSA has been extensively studied particularly due to its homology with human serum albumin (HSA) (Bolel, Mahapatra, Datta, & Halder, 2013). The binding between food additives such as food dyes and serum albumins may dramatically affect structure and transport function of these proteins, as well change metabolism, distribution and elimination of food dyes (Shahabadi et al., 2012; Wang et al., 2014). Therefore, the investigation of interaction between food colorants and BSA is important to the point of view of chemistry, life sciences and clinical medicine (Bolel, Mahapatra, & Halder, 2012).

Umer Abdullah, Badaruddin, Asad Sayeed, Ali, & Riaz (2008) studied the interaction between BSA and Allura Red (AR) by evaluating protein digestibility

70 *in vitro*. They found that AR bound to BSA at low and high temperatures and at
71 a wide pH range (4.0 to 7.5); however the interaction did not affect protein
72 digestibility by trypsin and fungal protease. Another work investigated the AR-
73 HSA interaction by using Uv-Vis, fluorescence and circular dichroism
74 spectroscopy to determine AR-HSA binding parameters, and van't Hoff
75 approach to obtain interaction thermodynamic parameters. They found that
76 fluorescence quenching was a static mechanism resulting from the formation of
77 AR-HSA complex, the ΔH° and ΔS° values suggested that complex formation at
78 pH 7.4 was enthalpically and entropically driven by occurrence of hydrogen
79 bounds and hydrophobic interactions (Wang et al., 2014).

80 Despite the efforts of scientific community in the food dye-protein
81 interaction field, to the best of our knowledge, the thermodynamic parameters of
82 AR-BSA and P4R-BSA interactions are not fully and directly determined. In this
83 work, we report a thermodynamic approach of interaction AR x BSA and P4R x
84 BSA, by using fluorescence spectroscopy, interfacial tension measurements,
85 Taylor-Aris diffusion technique, and isothermal titration microcalorimetry (IT μ C).

86

87 **2. Material and Methods**

88 **2.1. Materials**

89 BSA (> 99%), citric acid, sodium citrate, sodium phosphate (reagent
90 grade) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Allura red and
91 ponceau 4R was kindly provided by Gemacom (Juiz de Fora, Brazil).

92 **2.2. Fluorescence experiment**

93 Fluorescence spectra were obtained with a CaryEclipse Fluorescence
94 (Agilent) spectrofluorimeter equipped with a thermostat bath, according to Wang
95 et al., 2014 with some modifications. For fluorescence measurement, 3.0 ml of
96 BSA solution (3.01×10^{-5} mol.L⁻¹) containing different concentrations of AR or
97 P4R (0,0 mol.L⁻¹ to 5×10^{-5} mol.L⁻¹), at pH 3.5; 5.0 or 7.4, was added to a 1.0 cm
98 quartz cell. The fluorescence emission spectra were then measured at five
99 different temperatures (288, 298, 308, 318 and 328 K) in the range of 281–450
100 nm (excitation wavelength 280 nm).

101

102 **2.3. Measurement of excess of Gibbs free surface energy**

103 Interfacial tension of water-air interface was measured by pendant drop
104 method using a goniometer (Easy Drop, Kruss®). Samples of 1 mL of BSA

105 solution ($7.57 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$) prepared in buffer (pH 3.5; 5.0 or 7.4) containing
106 different concentrations of colorant (AR or P4R) ranging from 0 to 1.2×10^{-5}
107 mol.L^{-1} were used. Measurements were carried out at 298 K, in each second
108 during 15 min to establish the equilibrium time required for obtaining a constant
109 interfacial tension (Amine, Dreher, Helgason, & Tadros, 2014).

110 **2.4. Determination of diffusion coefficient**

111 AR solution ($1.6 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) or P4R solution ($2.5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) and
112 BSA solution (concentration range from 0 to $6.8 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) were prepared at
113 different conditions of pH (5.0 and 7.4) and ionic force (0 and 100 mmol.L^{-1} of
114 NaCl). Diffusion coefficient (DC) was determined at 298 K using Taylor-Aris
115 technique, according to (Ye et al., 2012), with some modifications. BSA
116 solutions filled the capillary (30 m of length and $0.601 \times 10^{-3} \text{ m}$) and AR solution
117 ($20 \mu\text{L}$) was injected in laminar flow inside capillary. At the end of capillary, UV
118 detection was recorded at 502 nm. Each sample was analyzed 3 times and DC
119 was obtained by equation 1.

120

$$121 \quad D = \frac{r^2 t_r}{24 \sigma^2} \quad (1)$$

122

123 where “D” is diffusion coefficient, “r” is capillary radii, “ t_r ” is retention time
124 and “ σ ” is peak width at average height.

125 **2.5. Determinations of apparent interaction enthalpy change ($\Delta_{\text{app-}}$ 126 intH) of interaction between BSA and colorants**

127 The energetic analyses were performed on an isothermal titration
128 microcalorimeter (IT μ C) model CSC 4200 (Calorimeter Science Corporation),
129 controlled by ITCRun software. The microreaction system was analyzed on a
130 titration mode with a 1.8-mL stainless steel vessel (sample and reference),
131 containing BSA solution at $3.01 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, which were maintained under
132 constant stirring at 300 rpm. When thermal equilibrium between the vessel and
133 the heat sink was reached, 10- μL aliquots of the AR or P4R solution (3.01×10^{-3}
134 mol.L^{-1}) were titrated with a Hamilton microliter syringe at 3600-s intervals. All
135 calorimetric measurements were performed at pH 3.5; 5.0 or pH 7.4, in
136 triplicate, and the calculated relative standard deviation in the interaction
137 enthalpy was on the order of 0.5 %.

138 **2.6. Statistical analysis**

139 All assays were performed in 3 repetitions. The mean values and standard
140 deviations were evaluated using analysis of variance (ANOVA); all statistical
141 data were processed using Statistical Analysis System (SAS) version 9.1.

142

143 **3. Results and Discussion**

144 **3.1. Fluorescence experiments**

145 Fluorescence spectroscopy is an important tool to investigate interaction
146 between small ligands, such as food colorants and proteins. The absorption of
147 protein at 280 nm and its emission at 345 nm are due to both tyrosine and
148 tryptophan residues. Emission spectrum profile depends on variation of
149 intermolecular interactions between protein and solvent and/or ligand
150 molecules. BSA has two tryptophan residues, Trp 134 and Trp 212, which are
151 located at protein hydrophilic surface and hydrophobic core, respectively
152 (Bourassa, Kanakis, Tarantilis, Pollissiou, & Tajmir-Riahi, 2010). If protein
153 undergoes conformational changes modifying the hydrophobic/hydrophilic ratio
154 in tryptophan micro-environment, often there is a displacing in the maximum
155 emission wavelength. On the other hand, if complexes are formed at
156 fundamental states, directly with Trp or at Trp surroundings, the fluorescence
157 intensity is decreased (quenched), enabling to follow intermolecular interactions
158 by determining the fluorescence dependence on the food dye concentration.

159 To evaluate the food dyes (AR or P4R)-BSA interaction, at different
160 temperatures, we obtained BSA fluorescence spectra at the presence of various
161 food dyes concentrations. Figure 1 shows the fluorescence spectra of BSA at
162 the presence of different concentrations of AR.

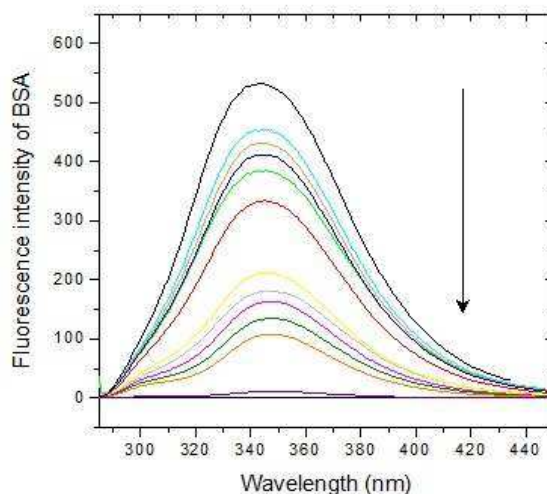


Figure 1 – Effect of AR on BSA fluorescence at 298 K and pH 7.4 ($\lambda_{\text{ex}}=280$ nm and $\lambda_{\text{ex}}=346$ nm). Arrow indicates an increase in the AR concentration (from 0 to 5.0×10^{-5} mol.l⁻¹).

The fluorescence intensity of BSA decreased as AR concentration increased, with small changes in the maximum emission wavelength and shape of peaks, which indicate that AR-BSA did not alter tryptophan BSA site structure, similar to quinoline yellow, another azo food dye (Shahabadi et al., 2012).

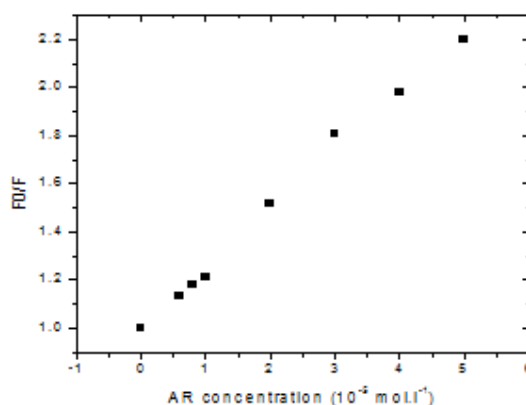
Fluorescence quenching can be classified as dynamic or static process, being the former related to collision between protein and ligand and the second referred to complex formation between them at fundamental state (Bolel et al., 2012).

To determine the mechanism of BSA quenching, we applied Stern-Volmer model (Equation 2).

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

where F_0 and F are fluorescence intensities of fluorophore (BSA) in the absence and in the presence of quencher (allura red) respectively, $[Q]$ is the quencher concentration (mol.L⁻¹), K_{sv} is the Stern-Volmer quenching constant, τ_0 is the average of protein fluorescence lifetime in the absence of quencher ($\tau_0 = 10^{-8}$ s) (Wang et al., 2014) and K_q is the quenching rate constant of protein fluorescence that is equal to K_{sv}/τ_0 .

187 The K_{SV} values were calculated from the slopes of linear curve obtained
 188 by $F_0/F \times [Q]$ plot (Figure 2) at 298 K.
 189



190
 191 **Figure 2** - Stern-Volmer plot for BSA at different concentrations of allura
 192 red at 298 K, pH=3.5.

193
 194 At pH 3.5, the K_{SV} values did not enhanced with increasing temperature,
 195 ranging from 4.59×10^4 to $3.39 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}$ (Table 1). As point out by Chen,
 196 Ma, Zhang, Wang, & Xiang (2008), when K_{SV} values do not rise with
 197 temperature, the quenching mechanism is classified as a static process,
 198 charactering the formation of a complex BSA-AR at fundamental state. In
 199 addition, as $K_{SV} = k_q \tau_0$, where $\tau_0 = 10^{-8} \text{ s}$, the bimolecules quenching rate
 200 constant k_q was estimated and found to be $1.4 \times 10^{13} \text{ mol.L}^{-1} \text{ s}^{-1}$ at 298K. The
 201 observed k_q is much greater than the maximum collision quenching constant of
 202 various kind of quencher to biopolymers (Mandal, Bardhan, & Ganguly, 2010).
 203 Wang et al. (2014) studied the interaction between AR and human serum
 204 albumin, and also obtained K_q values for all temperatures much greater (in
 205 order of $10^{13} \text{ L.mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) than maximum dynamic quenching constant values for
 206 various ligands to proteins. Therefore, it can be concluded that there was a
 207 complexation between BSA and AR and the interaction occurred surrounding
 208 tryptophan residues of BSA. Similar curves were obtained by other
 209 thermodynamic conditions at pH 5.0 and pH 7.4.

210 Since there was a complex formed by AR and BSA, it was possible to
 211 calculate the binding constant (K) and the number of biding sites (n) involved in
 212 complex formation, using Equation 3.

$$\log\left(\frac{F_0-F}{F}\right) = \log K + n \log[Q_t] \quad (3)$$

where F_0 and F are fluorescence intensities of BSA in the absence and in the presence of AR respectively, n is the number of binding sites, K is the binding constant and $[Q_t]$ is the total food dye concentration.

Table 1 presents the values of K and n calculated by Equation 3.

Table 1 – Quenching constants (K_{SV}), binding constants (K), number of binding sites (n) associated to AR-BSA interaction at different temperatures, pH=3.5.

T (K)	K _{sv} (10 ⁴ L.mol ⁻¹)	r ²	K (10 ⁴ L.mol ⁻¹)	r ²	N
288	4.59	0.99	1.74	0.95	1.03
298	3.25	0.98	3.89	0.94	1.06
308	3.24	0.98	5.75	0.94	1.09
318	3.27	0.98	6.76	0.97	1.04
328	3.39	0.98	8.51	0.94	0.93

For all temperatures, K was in order of 10⁴ demonstrating the formation of a complex whose stoichiometry is around 1 (n value) AR molecule to 1 BSA macromolecule (Figure 3).

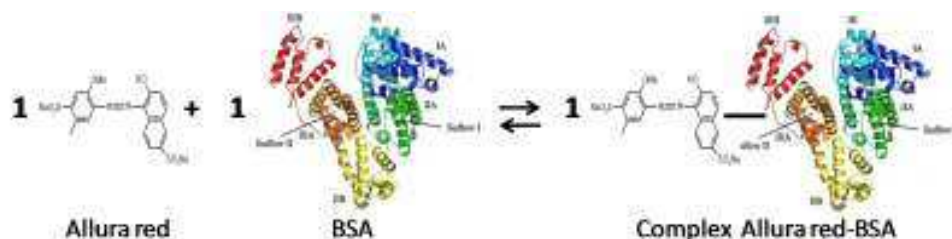


Figure 3 – Schematic representation of complex formation stoichiometry between allura red and BSA.

BSA is a heart shape protein that contains three domains divided in two sub-domains (A and B), being domain I hydrophilic and domains II and III hydrophobic. It has 2 tryptophan residues, one buried in a hydrophobic pocket (Trp-212) at sub-domain IIA and another exposed to solvent and located in

235 hydrophilic sub-domain (IB) of protein surface (Trp-134). The binding sites of
236 BSA for ligands may be in these domains (Bolel et al., 2013); thus AR should be
237 interacting with one of them, forming a complex with BSA.

238 The standard Gibbs free energy (ΔG°) for BSA-colorant complexation
239 could be calculated by Equation 4.

$$240 \quad \Delta G^\circ = -RT \ln K \quad (4)$$

241

242 where R is the universal gas constant ($8.3145 \text{ J.mol}^{-1}\text{K}^{-1}$), T is the
243 temperature (K) and K is binding constant (L.mol^{-1}).

244 The ΔG° values for AR-BSA complex decreased as temperature increased,
245 ranging from -25.74 to $-30.99 \text{ kJ.mol}^{-1}$. This thermodynamic parameter is the
246 resultant of Gibbs free energy of formed complex (G_{complex}) subtracted from
247 Gibbs free energies of reactants (G_{BSA} and G_{colorant}), as shows Equation 5.

248

$$249 \quad \Delta G^\circ = G_{\text{complex}} - G_{\text{BSA}} - G_{\text{colorant}} \quad (5)$$

250

251 A large positive ΔG° value points to the process favors reactants, while a
252 large negative ΔG° value favors products. More precisely, it is $\Delta G^\circ/RT$ and not
253 only ΔG° that determines K . In general, because of the exponential relation
254 between K and ΔG° unless ΔG° lies in the approximate range $-15RT < \Delta G^\circ$
255 $< 15RT$, the equilibrium constant will be very large or very small.

256 Despite of ΔG° be the thermodynamic potential for complex formation, it is
257 important determinate the enthalpic and entropic contributions for the AR-BSA
258 complex formation, by determining ΔH° and $T\Delta S^\circ$ parameters. The enthalpy
259 change was obtained through the dependence of K value on temperature
260 variation, using the van't Hoff equation, being ΔH° value based on slope of
261 linear plot $\ln K \times 1/T$, as shown in Figure 4.

262

263

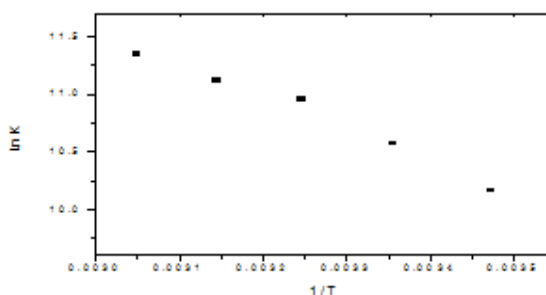


Figure 4 – Plot of $\ln K \times 1/T$ to determine ΔH° value by van't Hoff approximation for data from BSA-AR interaction at 3.5.

Since we had ΔG° and ΔH° values, we could calculate the entropic term ($T\Delta S^\circ$), using Equation 6.

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (6)$$

Thermodynamic parameters for complex formation between AR and BSA at pH 3.5 are presented at Table 2.

Table 2 -Enthalpy change (ΔH°), Gibbs free energy change (ΔG°) and entropy change ($T\Delta S^\circ$) associated to AR-BSA interaction at different temperatures, pH=3.5.

T (K)	ΔH° (kJ.mol ⁻¹)	r^2	ΔG° (kJ.mol ⁻¹)	$T\Delta S^\circ$ (kJ.mol ⁻¹)
288	42.11	0.96	- 24.22	67.83
298	42.11	0.96	- 25.74	66.33
308	42.11	0.96	- 27.10	69.21
318	42.11	0.96	- 29.01	71.10
328	42.11	0.96	- 30.99	73.10

The complex formation process was endothermic with ΔH° value equal 42.11 kJ.mol⁻¹; therefore BSA-AR complexation was thermodynamically determined by the entropic enhance of the system. Molecularly, thermodynamic

processes presenting positive ΔH° and ΔS° values are caused by increasing the translational degree of freedom of water molecules released from solvation layer of interacting molecules (AR and BSA). This process is often called hydrophobic interaction, and probably occurred between AR and BSA due to the presence of hydrophobic regions in AR molecule (benzene rings) and hydrophobic domain IIB in protein structure.

Apart from hydrophobic interactions, attractive electrostatic interactions occurring due to positive charge at protein molecule and negative charge at AR molecule can contribute to ΔH° values in processes driven by hydrophobic interactions.

To determine the relative contribution of hydrophobic and electrostatic interactions to form AR-BSA complex, the experiments were repeated in the presence of NaCl (100 mmol.L⁻¹). The presence of the electrolyte increases the medium ionic force promoting the blindage of protein double electric layer and consequently reducing the contribution of electrostatic interactions on the thermodynamic properties of complex formation process.

The addition of the electrolyte did not avoid complex formation, as was observed by K_{sv} (ranging from 5.56×10^4 to 5.99×10^4 L.mol⁻¹), K (from 5.37 to 1.00×10^8 L.mol⁻¹) and by complex stoichiometry that increased to around two AR molecules for one BSA.

The presence of NaCl became more thermodynamically favorable the complex formation, since ΔG° values were more negative (Table 3).

Table 3 -Enthalpy change (ΔH°), Gibbs free energy change (ΔG°) and entropy change ($T\Delta S^\circ$) associated to AR-BSA interaction at different temperatures, pH=3.5, in the presence of NaCl (100 mmol.L⁻¹).

T (K)	ΔH° (kJ.mol ⁻¹)	r^2	ΔG° (kJ.mol ⁻¹)	$T\Delta S^\circ$ (kJ.mol ⁻¹)
288	-154.18	0.99	- 44.97	-109.22
298	-154.18	0.99	- 47.06	-107.12
308	-154.18	0.99	- 51.54	-102.65
318	-154.18	0.99	- 50.16	-104.02
328	-154.18	0.99	- 50.29	-103.90

309

310 The higher complex stability occurred with an enthalpic reduction
 311 associated to an entropy diminution in the system. The enthalpic decreasing is
 312 caused by releasing of water molecules solvating AR and BSA, which interact
 313 with salt ions present at double electric layer and in the bulk of solution. As
 314 water-ion is more intense than water-water interactions, even those formed near
 315 hydrophobic interface, there was an enthalpic reduction. In addition, water
 316 molecules of ion solvation layer, mainly those located at double electric layer,
 317 will present a smaller translation degree of freedom causing consequently the
 318 entropic reduction.

319 To discuss the relative contribution of electrostatic interaction versus ion
 320 solvation in reducing ΔH° values caused by salt, we conducted the experiments
 321 at pH 5.0, in which the resultant charge of BSA is almost zero due to its
 322 isoelectric point ($pI = 4.9$).

323 At pH 5.0 the AR-BSA complex was also formed and the Stern-Volmer
 324 plots also pointed to a static quenching mechanism. K_{SV} and K values ranging
 325 from 2.25×10^4 to $2.54 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}$ and 1.23 to $4.47 \times 10^7 \text{ L.mol}^{-1}$, respectively. It
 326 is important to emphasize the increasing in complex stoichiometry compared to
 327 pH 3.5 (pH 3.5, $n \approx 1.06$ and pH 5.0, $n \approx 1.75$).

328 The charge reduction at pH 5.0 became the AR-BSA complex formation
 329 process more thermodynamically stable, since ΔG° values diminished (Table 4).

330

331 **Table 4** -Enthalpy change (ΔH°), Gibbs free energy change (ΔG°) and
 332 entropy change ($T\Delta S^\circ$) associated to AR-BSA interaction at different
 333 temperatures, pH=5.0.

T (K)	ΔH° (kJ.mol ⁻¹)	r^2	ΔG° (kJ.mol ⁻¹)	$T\Delta S^\circ$ (kJ.mol ⁻¹)
288	15.36	0.98	- 37.78	53.14
298	15.36	0.98	- 41.52	56.88
308	15.36	0.98	- 45.16	60.52
318	15.36	0.98	- 45.59	60.95
328	15.36	0.98	- 47.21	62.57

334

The decreasing in electrostatic attraction between AR and BSA also reflected in the ΔH° value, which became less endothermic compared to pH 3.5. On the other hand, the entropic gain in the system was almost the same for both pHs; and this behavior could be due to the releasing from water solvation molecules from interacting species (AR and BSA), being the configuration and energy of these molecules independent from protein charge.

To evaluate the effect of electrolyte presence at pH 5.0, the experiments were repeated at pH 5.0 at presence of NaCl (100 mmol.L⁻¹). The AR-BSA complex was formed and the fluorescence quenching of BSA was also a static mechanism. K_{SV} and K values ranging from 2.47 to 3.38 10^4 L.mol⁻¹ and 1.07 to 4.27 10^6 L.mol⁻¹, respectively; and n was around 1.50.

The presence of electrolyte slightly reduced the complex stability, since ΔG° values became less negative, even though ΔH° value was exothermic (Table 5).

Table 5 -Enthalpy change (ΔH°), Gibbs free energy change (ΔG°) and entropy change ($T\Delta S^\circ$) associated to AR-BSA interaction at different temperatures, pH=5.0, in the presence of NaCl (100 mmol.L⁻¹).

T (K)	ΔH° (KJ.mol ⁻¹)	r^2	ΔG° (KJ.mol ⁻¹)	$T\Delta S^\circ$ (KJ.mol ⁻¹)
288	-17.96	0.95	- 34.90	16.94
298	-17.96	0.95	- 35.70	17.74
308	-17.96	0.95	- 39.14	21.18
318	-17.96	0.95	- 39.86	21.90
328	-17.96	0.95	- 37.91	19.95

The decreasing of complex stability occurred due the entropic gain was less pronounced in the presence of electrolyte than in its absence. As it was verified for AR-BSA interaction at pH 3.5 added of NaCl, a negative ΔH° value was due to solution ion solvation by water molecules released from solvation layer of AR and BSA. The enthalpic reduction is much smaller at pH 5.0 than at pH 3.5, comparing both at salt presence because at lower pH besides the presence of ions from salt added to the system, there were ions associated to

the double electric layer of protein, which did not exist at pH 5.0. The system entropy enhanced at pH 5.0 because solvated ions did not belong to protein double electric layer, which allows a higher number of spatial configurations for water molecules interacting with ions.

Aiming to evaluate the effect of negative charge on protein, we repeated the experiments at pH 7.4. By Stern-Volmer plot results it can be concluded that AR-BSA complex was formed in this pH, with K_{SV} varying between 3.08 and $1.63 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}$ and K between 2.29×10^5 and $3.24 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}$; however the number of food dye molecules for one BSA molecule was smaller in this condition ($n \approx 1.0$).

At pH 7.4 protein and AR molecules are negatively charged producing an electrostatic repulsion in AR-BSA interaction. However, despite of this unfavorable force BSA-AR interaction occurred with ΔG° values similar to those obtained in thermodynamic conditions without repulsion contribution (pH 5.0) (Table 6).

376

Table 6 -Enthalpy change (ΔH°), Gibbs free energy change (ΔG°) and entropy change ($T\Delta S^\circ$) associated to AR-BSA interaction at different temperatures, pH=7.4.

T (K)	ΔH° (kJ.mol ⁻¹)	r^2	ΔG° (kJ.mol ⁻¹)	$T\Delta S^\circ$ (kJ.mol ⁻¹)
288	62.94	0.99	- 28.56	91.50
298	62.94	0.99	- 20.05	82.99
308	62.94	0.99	- 23.20	86.14
318	62.94	0.99	- 23.89	86.83
328	62.94	0.99	- 28.48	91.42

380

The interaction is entropically driven with enthalpy change equal 62.94 kJ.mol⁻¹, indicating that electrostatic repulsion is a barrier to complex formation. Again, the entropic change occurred due to desolvation of molecules forming complex leading to an intense hydrophobic interaction.

With addition of NaCl to system at pH 7.4, K and n considerably enhanced, ranging from 4.16×10^6 to 4.46×10^9 L.mol⁻¹ for K value and n value was around 2.0.

Even though there was an increase in ΔH° value (pH 7.4 without salt, $\Delta H^\circ=62.94$ and pH 7.4 with salt, $\Delta H^\circ=104.05$ kJ.mol⁻¹), the number of AR molecules for each BSA molecule doubled due to a higher reduction in ΔG° of AR-BSA interaction (Table 7).

Table 7 -Enthalpy change (ΔH°), Gibbs free energy change (ΔG°) and entropy change ($T\Delta S^\circ$) associated to AR-BSA interaction at different temperatures, pH=7.4, in the presence of NaCl (100 mmol.L⁻¹).

T (K)	ΔH° (kJ.mol ⁻¹)	r^2	ΔG° (kJ.mol ⁻¹)	$T\Delta S^\circ$ (kJ.mol ⁻¹)
288	104.05	0.99	- 35.27	139.32
298	104.05	0.99	- 40.67	144.72
308	104.05	0.99	- 45.81	149.86
318	104.05	0.99	- 54.79	158.84
328	104.05	0.99	- 60.67	164.72

This higher stoichiometry of complex formation also caused a higher entropic gain in the system promoted by releasing additional water molecules which solvated the second AR molecule forming the complex with protein.

Aiming to evaluate the effect of food dye structure on the interaction with BSA, we repeated the fluorimetric experiments using another red synthetic food dye, ponceau 4R (P4R). The structural difference between AR and P4R molecules is the presence of one sulphide group that confers an additional electric charge to the molecule and also one more benzene ring, which promote a higher hydrophobicity to P4R compared to AR molecule (Figure 5).

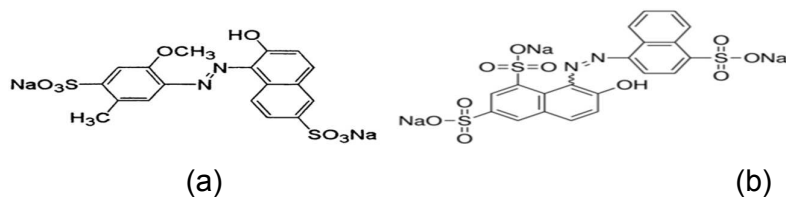


Figure 5 – Structures of red synthetic food dyes: (a) allura red (AR) and (b) ponceau 4R (P4R).

The stability (k values between 10.96 and $3.72 \times 10^6 \text{ L.mol}^{-1}$) and the stoichiometry ($n \approx 1.5$) of P4R-BSA complex were higher than those measured for AR-BSA complex in all temperature range studied for pH 3.5 in the absence of salt. This higher stability is due to an enthalpic stabilization promoting an exothermic process for formation of P4R-BSA complex (Table 8).

Table 8 – Enthalpy change (ΔH°), Gibbs free energy change (ΔG°) and entropy change ($T\Delta S^\circ$) at different temperatures, associated to P4R-BSA interaction at different temperatures, pH=3.5.

T (K)	ΔH° (KJ.mol ⁻¹)	r^2	ΔG° (KJ.mol ⁻¹)	$T\Delta S^\circ$ (KJ.mol ⁻¹)
288	-16.51	0.98	- 37.51	21.00
298	-16.51	0.98	- 39.24	22.73
308	-16.51	0.98	- 41.44	24.93
318	-16.51	0.98	- 41.51	25.00
328	-16.51	0.98	- 41.30	24.79

The ΔH° value equal to $- 16.51 \text{ kJ.mol}^{-1}$ resulted from an attractive electrostatic contribution (due to the additional sulphide group) and also from a contribution of hydrophobic nature (due to the additional benzene group). However the enhance in electrostatic and hydrophobic contributions promoted an entropic gain reduction to form P4R-BSA complex. This reduction in system entropy increase is probably associated to the leak of translational degree of freedom of P4R molecules and also to a smaller number of solvating water molecules released during complex formation.

To evaluate the relative contribution of electrostatic and hydrophobic components to formation of P4R-BSA complex, the thermodynamic parameters were also determined in the presence of NaCl (100 mmol.L^{-1}).

The electrostatic blindage caused by increasing in the ions concentration in the solution resulted in a K decreasing (5.50 to $0.51 \times 10^4 \text{ mol.L}^{-1}$) causing a reduction of the thermodynamic stability of RP-BSA complex, which occurred mainly due to the reduction of entropic gain of the system (Table 9).

Table 9 – Enthalpy change (ΔH°), Gibbs free energy change (ΔG°) and entropy change ($T\Delta S^\circ$) at different temperatures, associated to P4R-BSA interaction at different temperatures, pH=3.5, in the presence of NaCl (100 mmol.L⁻¹).

T (K)	ΔH° (KJ.mol ⁻¹)	r^2	ΔG° (KJ.mol ⁻¹)	$T\Delta S^\circ$ (KJ.mol ⁻¹)
288	- 34.64	0.97	- 25.26	10.38
298	- 34.64	0.97	- 24.96	10.68
308	- 34.64	0.97	- 24.85	10.79
318	- 34.64	0.97	- 23.95	11.69
328	- 34.64	0.97	- 23.33	12.32

The less entropy increase is the cause of the smaller complex stability because the electrostatic blindage caused a higher diminution in the system enthalpy, which is consequence of more intensity of ion-water interaction compared to water-water interaction present on solvation layer of P4R molecule. This more intense ion-water interaction also promoted a smaller enhance in the system entropy, since water molecules from solvation layer of ions are more configurationally structured.

At pH 5.0, where BSA is found near to neutral charge, the complex stoichiometry and stability were almost the same to those found at pH 3.5 (K ranging between 2.29 and 9.77 x 10⁶ L.mol⁻¹ and n is around 1.5); however ΔH° was more negative (Table 10).

Table 10 – Enthalpy change (ΔH°), Gibbs free energy change (ΔG°) and entropy change ($T\Delta S^\circ$) at different temperatures, associated to P4R-BSA interaction at different temperatures, pH=5.0.

T (K)	ΔH° (KJ.mol ⁻¹)	r^2	ΔG° (KJ.mol ⁻¹)	$T\Delta S^\circ$ (KJ.mol ⁻¹)
288	- 39.98	0.94	- 33.89	-6.09
298	- 39.98	0.94	- 37.30	-2.68
308	- 39.98	0.94	- 41.26	1.28
318	- 39.98	0.94	- 42.60	2.62
328	- 39.98	0.94	- 40.01	0.13

Surprisingly, the complex formation caused a slightly entropic variation in the system, either entropy reduction (at 288 and 298 K) either an increasing (308, 318 and 328 K). This small entropy variation and strong enthalpic variation are associated to releasing of few solvation water molecules from during P4R-BSA interaction. This reduced desolvation demands less absorption of enthalpic energy and promotes a slight gain on translational degree of freedom of molecules. Probably, the interaction between P4R and BSA occurred on protein surface, therefore the complete removal of solvation layer from dye and BSA is not necessary. This preference for interacting on BSA surface and not by hydrophobic region may be due to the additional sulphide group negative charged that confers higher hydrophilicity to P4R molecule compared to AR.

In the presence of electrolyte the P4R-BSA interaction occurred with reduction on complex stability due to a decreasing on entropy system, which was partially compensated by enthalpy energy releasing during complex formation. The presence of salt diminished more the entropy because even the few water molecules released from solvation layer of P4R and BSA became coordinated on hydration layer of ions, diminishing the their translational degree of freedom. This ion-water interaction is responsible for reducing system ΔH° , since ion-water interaction is stronger than water-water interaction (Table 11).

Table 11 – Enthalpy change (ΔH°), Gibbs free energy change (ΔG°) and entropy change ($T\Delta S^\circ$) at different temperatures, associated to P4R-BSA interaction at different temperatures, pH=5.0, in the presence of NaCl (100 mmol.L⁻¹).

T (K)	ΔH° (KJ.mol ⁻¹)	r^2	ΔG° (KJ.mol ⁻¹)	$T\Delta S^\circ$ (KJ.mol ⁻¹)
288	- 50.51	0.99	- 25.58	-24.93
298	- 50.51	0.99	- 23.13	-27.38
308	- 50.51	0.99	- 22.37	-28.13
318	- 50.51	0.99	- 21.64	-28.87
328	- 50.51	0.99	- 21.12	-29.38

At pH 7.4, despite the electrostatic repulsion between P4R and BSA (both are negatively charged) complex formation occurred with enthalpy reduction and a slight entropic gain. These results contribute to the model in which the main contribution to thermodynamic parameters is the released solvation water, corroborating to the hypothesis that P4R interacted on BSA surface. The same thermodynamic behavior was observed in the presence of NaCl (100 mmol.L⁻¹) (Tables 12 and 13).

Table 12 – Enthalpy change (ΔH°), Gibbs free energy change (ΔG°) and entropy change ($T\Delta S^\circ$) at different temperatures, associated to P4R-BSA interaction at different temperatures, pH=7.4.

T (K)	ΔH° (KJ.mol ⁻¹)	r^2	ΔG° (KJ.mol ⁻¹)	$T\Delta S^\circ$ (KJ.mol ⁻¹)
288	- 27.06	0.99	- 33.78	6.72
298	- 27.06	0.99	- 34.50	7.43
308	- 27.06	0.99	- 37.49	10.42
318	- 27.06	0.99	- 37.85	10.78
328	- 27.06	0.99	- 38.16	11.09

Table 13 – Enthalpy change (ΔH°), Gibbs free energy change (ΔG°) and entropy change ($T\Delta S^\circ$) at different temperatures, associated to P4R-BSA interaction at different temperatures, pH=7.4, in the presence of NaCl (100 mmol.L⁻¹).

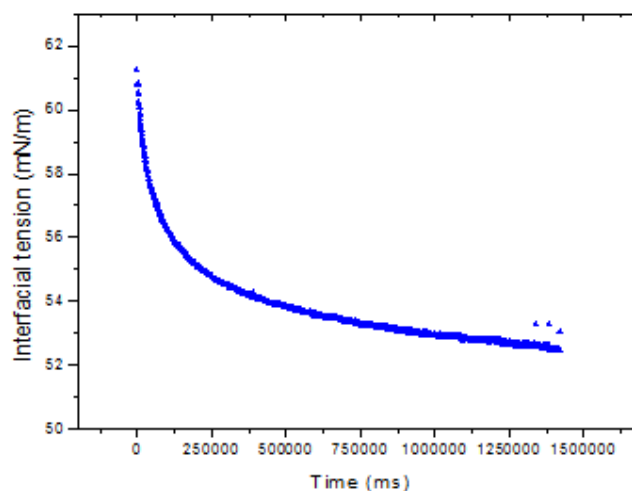
T (K)	ΔH° (KJ.mol ⁻¹)	r^2	ΔG° (KJ.mol ⁻¹)	$T\Delta S^\circ$ (KJ.mol ⁻¹)
278	- 23.42	0.91	- 24.14	0.72
298	- 23.42	0.91	-25.59	2.17
308	- 23.42	0.91	- 26.15	2.73
318	- 23.42	0.91	- 26.09	2.67
328	- 23.42	0.91	- 25.84	2.42

3.2. Excess of superficial Gibbs free energy

As the most proteins, BSA shows surface activity changing interfacial properties as its concentration in the system increases. The most important

506 surface property is the excess of Gibbs free energy by area unit, called as
507 interfacial tension (σ , $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$).

508 The reduction of interfacial tension with BSA concentration increasing is
509 due to protein adsorption on water-air interface promoting favorable
510 intermolecular interactions with molecules present at interface and
511 consequently diminishing energetic content of this region. Figure 5 presents the
512 variation of interfacial tension as a function of time to BSA concentration equal
513 to $7.57 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ at pH 7.4 and at 298 K. Interfacial tension decreased with
514 time due to adsorption kinetics of BSA on system water-air interface.

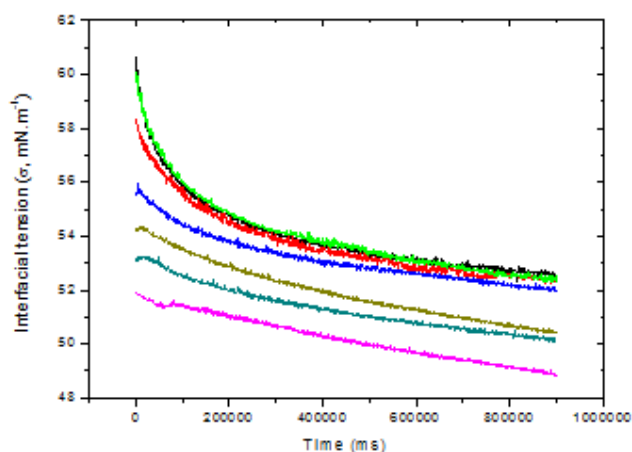


515

516 **Figure 6** – Interfacial tension water/air interface as a function of time for
517 bovine serum albumin (BSA) at concentration $7.57 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, at 298 K and
518 pH 7.4.

519

520 The formation of a new chemical specie resulted from BSA-food dye
521 interaction leads to a variation of the interfacial tension dependence on the time.
522 Figure 7 shows curves of $\sigma \times t$ for BSA concentration equal to $7.57 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$
523 ¹, and different AR concentrations at pH 7.4 and at 298 K.



524

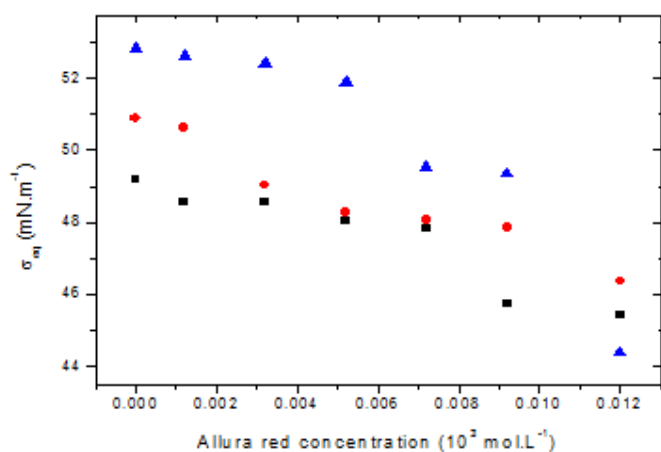
525 **Figure 7** Interfacial tension water/air interface as a function of time for
 526 bovine serum albumin (BSA) at concentration $7.57 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, at 298 K and
 527 pH 7.4, in different concentrations of allura red (AR): (—) control: 0 mol.L^{-1} , (—) $1.2 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$, (—) $3.2 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$, (—) $5.2 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$, (—) 7.2×10^{-6}
 528 mol.L^{-1} , (—) $9.2 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$, (—) $1.2 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$.
 529

530

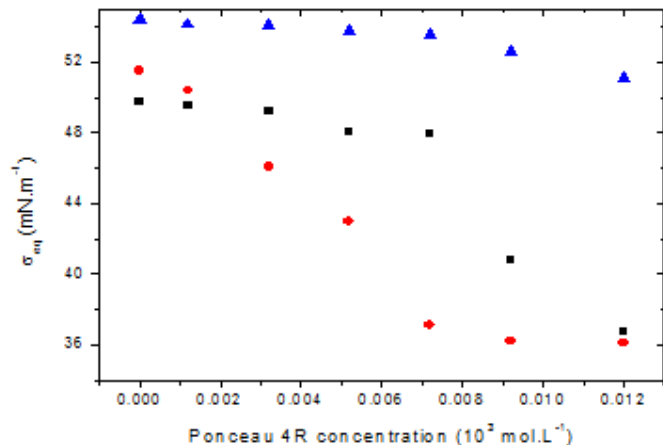
531 As time increased interfacial tension decreased for all studied food dye
 532 concentrations, being the higher food dye concentration the lower the excess of
 533 Gibbs free energy by area during all the time including interfacial tension at
 534 infinite time, i.e., interfacial tension at thermodynamic equilibrium. Similar
 535 results were obtained for other thermodynamic conditions studied.

536 To determine the interfacial tension at equilibrium, the interfacial tension
 537 was calculated at infinite time. To obtain this parameter, experimental data were
 538 adjusted to the exponential model: $\sigma(t) = \sigma_0 e^{\left(\frac{\sigma_t}{A_0}\right)} - \sigma_\infty$, where $\sigma_{(\infty)}$ is the
 539 experimental interfacial tension, σ_0 is the interfacial tension of BSA without
 540 colorant, A_0 is an exponential adjustment parameter and σ_∞ is the interfacial
 541 tension at infinite time.

542 Figures 8 and 9 illustrate the interfacial tension at thermodynamic
 543 equilibrium $\sigma_{(\infty)}$ as a function of AR and P4R concentrations, respectively, at
 544 298 K.



545
 546 **Figure 8** – Interfacial tension at thermodynamic equilibrium (σ_{eq}) of BSA
 547 ($7.57 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) as a function of different concentrations of allura red, at 298
 548 K and pH: (■) 3.5, (●) 5.0 and (▲) 7.4.



549
 550 **Figure 9** – Interfacial tension at thermodynamic equilibrium (σ_{eq}) of BSA
 551 ($7.57 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) as a function of different concentrations of ponceau 4R, at
 552 298 K and pH: (■) 3.5, (●) 5.0 and (▲) 7.4.

553
 554 The reduction of interfacial tension at equilibrium (σ_{eq}) as food dye
 555 concentrations increased demonstrates the intermolecular interaction between
 556 BSA and colorants. This σ_{eq} diminution due to the presence of food dye
 557 molecules is because interfacial activity of BSA-colorant is more intense than
 558 this feature for BSA.

559 For AR, the σ_{eq} occurred at following sequence: pH 7.4 < pH 5.0 < pH 3.5,
 560 while for P4R the sequence was pH 7.4 < pH 3.5 < pH 5.0. This variation on the
 561 behavior of both food dyes demonstrates the formation of complexes BSA-
 562 colorant with different structures and hydrophobic/hydrophilic balance. The

smaller σ_{eq} variation occurred at pH 7.4 probably due to a lower yield in the complexation and/or due to production of more hydrophilic complexes. The equilibrium constants of complex formation obtained in this work by fluorescence were always smaller in pH 7.4, corroborating with hypothesis of forming smaller amount of BSA-colorant complex. However, the second minor σ_{eq} variation occurred at different pH values for AR and P4R. For AR, at pH 5.0 there was more complexation, indicating that the reduction of σ_{eq} is mainly due to the complex is more hydrophilic than that formed at pH 3.5. Also for P4R, the pH in which more complex was formed (pH 3.5) occurred the second minor decrease on σ_{eq} , corroborating with hypothesis that more hydrophilic complexes were formed in this pH. More hydrophobic complexes were formed at pH 3.5 for AR and at pH 5.0 for P4R because in these hydrogenionic concentrations occurred higher σ_{eq} variations.

Interestingly, the curves $\sigma_{eq} \times [\text{food dye}]$ presented abrupt variations in colorant concentration intervals that produce $[\text{food dye}]/[\text{BSA}]$ ratio similar to stoichiometry of complex formation obtained by fluorimetric measurements (Table 14).

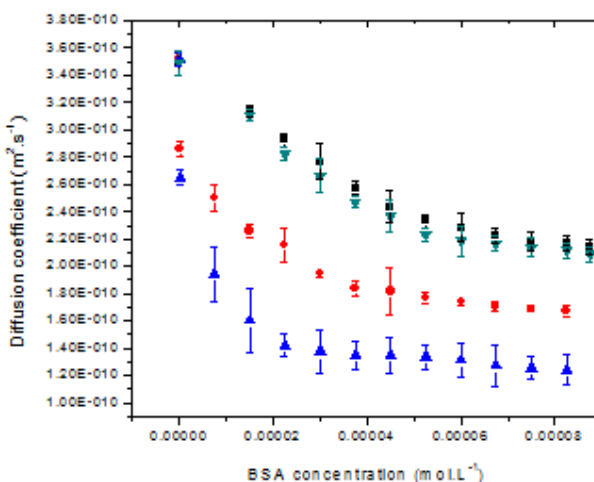
Table 14 – Comparison of stoichiometry of BSA-colorant complex obtained by fluorescence and interfacial tension measurements, at 298 K and different pH conditions.

Food dye/pH	n (fluorescence)	n (interfacial tension measurements)
AR/ pH 3.5	1.06	1.08
AR/ pH 5.0	1.67	1.35
AR/ pH 7.4	0.80	0.82
P4R/ pH 3.5	1.44	1.08
P4R/ pH 5.0	1.42	0.95
P4R/ pH 7.4	1.26	1.11

3.3. Molecular diffusion coefficient of food dyes

Experimental techniques used before determined intermolecular BSA-colorants interactions by measuring the variation of physicochemical properties associated to biopolymer. However, a complete characterization of this

590 interaction should be confirmed by determination of variation of properties
 591 related to colorant molecules. The thermodynamic parameter known as
 592 molecular diffusion coefficient is a property very sensitive to structural changes
 593 occurring to diffusive particle, mainly those associated to intermolecular
 594 interactions. Therefore, the determination of diffusion coefficient (DC) of
 595 colorant molecules in the presence of different BSA concentrations may
 596 express BSA-colorant interaction. Figures 10 and 11 show the dependence of
 597 diffusion coefficient of colorants (AR and P4R, respectively) as a function of
 598 BSA concentration at pH 5.0 and 7.4, in the presence or absence of NaCl (100
 599 mmol.L⁻¹) at 298 K. At pH 3.5 was not possible measure DC due to the
 600 equipment corrosion risk.



601
 602 **Figure 10** – Diffusion coefficient of allura red (AR) as a function of
 603 different concentrations of BSA, at 298 K and pH: (●) 5.0, (▲) 5.0 with 100
 604 mmol.L⁻¹ of NaCl, (■) 7.4 and (▼) 7.4. with 100 mmol.L⁻¹ of NaCl.

605

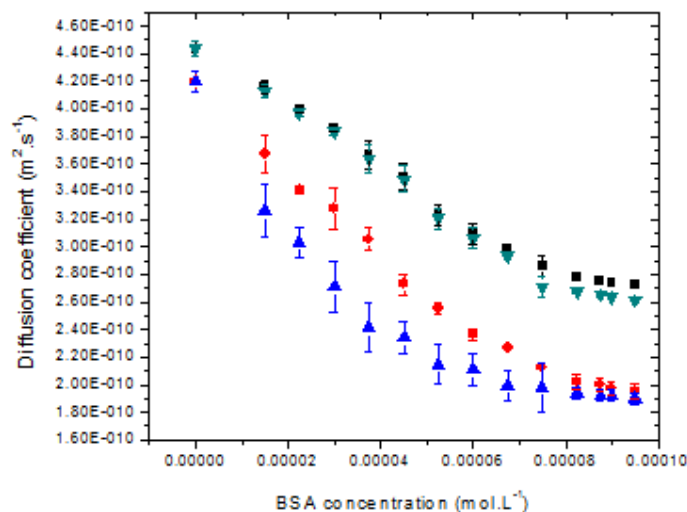


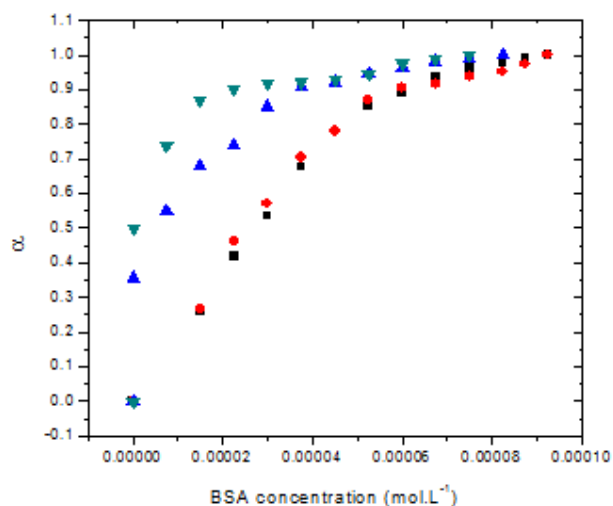
Figure 11 – Diffusion coefficient of ponceau 4R (P4R) as a function of different concentrations of BSA, at 298 K and pH: (●) 5.0, (▲) 5.0 with 100 mmol.L⁻¹ of NaCl, (■) 7.4 and (▼) 7.4. with 100 mmol.L⁻¹ of NaCl.

DC of food dye molecules, measured by Taylor-Aris technique, diminished as BSA concentration increased. Experimental DC is a linear combination between DC of free colorant molecules and DC of food dye molecules bound to protein, pondered by fraction of colorant molecules unbound and bound to BSA, respectively (Equation 7).

$$D_{obs} = \alpha D_{comp} + (1 - \alpha) D_{free} \quad (7)$$

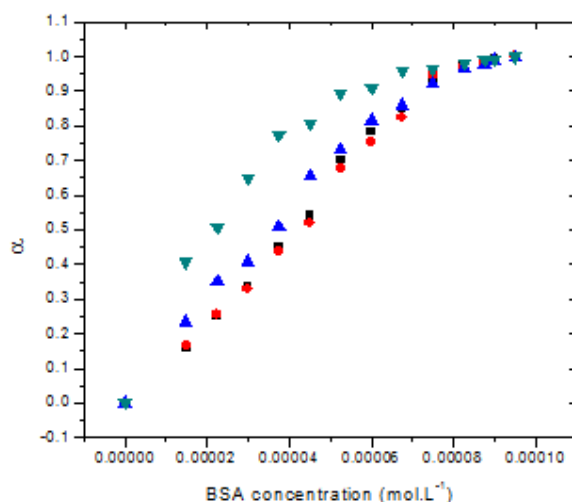
where D_{obs} is experimental diffusion coefficient, α is fraction of colorant molecules bound to protein, D_{comp} is diffusion coefficient of BSA-colorant complex, $(1 - \alpha)$ is fraction of free colorant molecules and D_{free} is diffusion coefficient of free colorant molecules.

By using equation 7 it was possible to determine α values for different BSA concentrations. Figures 12 and 13 shows the relation between α and protein concentration in pH 5.0 and 7.4, in the presence or absence of NaCl (100 mmol.L⁻¹), at 298 K.



627

628 **Figure 12** – Fraction of allura red molecules bound to BSA (α) as a
 629 function of protein concentration, at 298 K and pH: ($\blacktriangle$) 5.0, ($\blacktriangledown$) 5.0 with 100
 630 mmol.L⁻¹ of NaCl, ($\blacksquare$) 7.4 and ($\bullet$) 7.4. with 100 mmol.L⁻¹ of NaCl.



631

632 **Figure 13** – Fraction of ponceau 4R molecules bound to BSA (α) as a
 633 function of protein concentration, at 298 K and pH: ($\blacktriangle$) 5.0, ($\blacktriangledown$) 5.0 with 100
 634 mmol.L⁻¹ of NaCl, ($\blacksquare$) 7.4 and ($\bullet$) 7.4. with 100 mmol.L⁻¹ of NaCl.

635

636 For all thermodynamic conditions, as protein concentration increased the
 637 fraction of colorant molecules bound to BSA (α value) enhanced. The
 638 biopolymer concentration needed to complete complexation with food dyes was
 639 influenced by thermodynamic state of the system, being pH 7.4 (with and
 640 without salt) minor than pH 5.0 (with and without salt) for AR-BSA complex
 641 while for P4R-BSA interaction, the maximum complexation occurred in similar
 642 protein concentration in all conditions.

643 For both colorants, the smaller fraction of food dye bound to protein, for all
644 BSA concentration, occurred at pH 7.4 in the presence or absence of NaCl,
645 pointing to a weaker AR/P4R-BSA interaction in these kinetic conditions. At pH
646 5.0, the percentage of bound colorant enhanced, probably indicating that in
647 these transport conditions there was occurrence of BSA-colorant interaction at
648 multisites on protein surface and/or by distance coupling interactions.

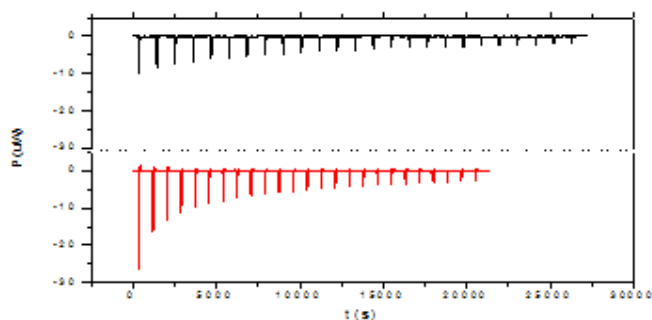
649 At pH 5.0, the electrolyte presence raised α value probably because in this
650 pH, protein shows no result charge ($pI=4.9$), therefore salt ions slow colorant
651 diffusion by long-range interactions, i.e., the salt anion and cation movement
652 step in colorant molecule displacement. This effect was not observed at pH 7.4
653 because in this condition, protein charge interfered more on food dye movement
654 canceling salt effect.

655

656 **3.4. Determination of apparent interaction enthalpy change ($\Delta_{app-int}H$)** 657 **between BSA and colorants**

658 To determine apparent interaction enthalpy change ($\Delta_{app-int}H$) associated
659 to interactions between BSA and AR or P4R, isothermal titration experiments
660 were carried out in a high sensitive calorimeter. Isothermal calorimetric
661 measurements are the most accurate and reproducible determinations of
662 intermolecular interaction energy involving protein and different molecules (Bou-
663 Abdallah & Terpstra, 2012).

664 Figure 14 illustrates a typical ITC thermogram for complex formation
665 between BSA and AR.



666

667 **Figure 14** – Thermogram of allura red titration on ($\rightarrow$) BSA solution
668 ($3.01 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) and ($\rightarrow$) buffer, at pH 7.4 and 298 K.

669

670 The thermogram presents negative peaks in the plot of power versus time,
671 which shows that the BSA-AR complexation was exothermic. Each peak in the

thermogram is related to a single injection of AR into protein solution. The correlation of heats by subtracting those corresponding to dilution heats from the injection of identical amounts of dye into buffer without protein was applied (dilution data are also plotted in Figure 14).

The $\Delta_{app-int}H$ values were calculated applying Equation 8. The enthalpy change value is apparent because the number of moles of food dye bound to protein is unknown.

679

$$\Delta_{app-int}H = \frac{q_{BSA-food dye} - q_{water-food dye}}{n_{food dye}} \quad (8)$$

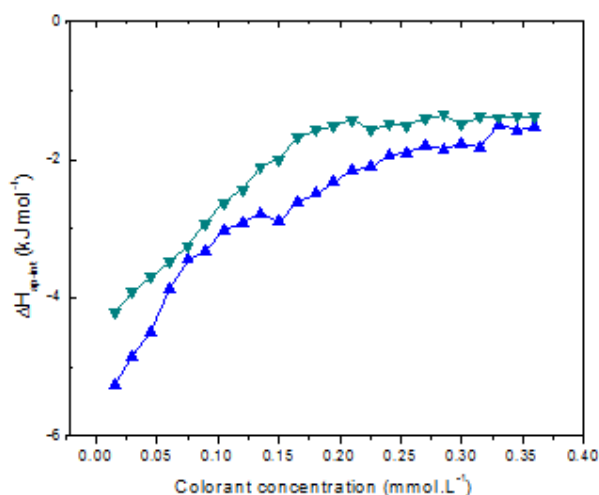
681

where $q_{BSA-food dye}$ is the released energy when food dye is titrated into protein solution, $q_{water-food dye}$ is the released energy when food dye is titrated into buffer and $n_{food dye}$ is the number of moles of food dye in each titration.

685

Figure 15 illustrates the curves of $\Delta_{app-int}H$ as a function of colorant concentration, at 298 K, pH 3.5 and BSA concentration equal $3.01 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$.

689



690

Figure 15 - $\Delta_{app-int}H$ of BSA-colorant interaction as a function of colorant concentration, at 298 K and pH 3.5: (▲) allura red and (▼) ponceau 4R.

693

The $\Delta_{app-int}H$ was exothermic in all range of studied colorant concentration, and its values between -5.0 and -1.0 kJ.mol^{-1} and -4.2 and -1.0 kJ.mol^{-1} for AR and P4R, respectively were obtained. As food dye concentration enhanced $\Delta_{app-int}H$

697 ΔH values became less negative until a plateau was achieved, pointing to a
698 saturation of BSA sites. Calorimetric data show a slight difference between both
699 food dyes in relation to enthalpic contribution to BSA-colorant complexation.
700 However, the P4R concentration needed to reach BSA saturation was smaller
701 (0.20 mmol.L^{-1}) than that verified for AR (0.33 mmol.L^{-1}), suggesting that
702 formation constant of P4R-BSA complex is higher than AR-BSA. Fluorescence
703 results corroborating to this hypothesis since K value was also higher for P4R-
704 BSA complex ($7.41 \times 10^6 \text{ L.mol}^{-1}$) compared to AR-BSA complex (1.74×10^4
705 L.mol^{-1}). This relation between calorimetric and fluorimetric data suggests that
706 energy obtained by calorimetry are driven by interactions occurring in sites near
707 to tryptophan, which is the necessary condition for fluorimetric measurements.

708 At this pH, P4R presented energy values of intermolecular interaction
709 slightly less negative than those found for AR. Interestingly, fluorescence data
710 provided higher different values for variation of BSA-colorant interaction
711 enthalpy (AR= $42.11 \text{ kJ.mol}^{-1}$ and P4R= $-16.51 \text{ kJ.mol}^{-1}$). The discordance
712 between calorimetric values and those calculated by van't Hoff approximation is
713 very common in systems whose intermolecular interactions involving entropic
714 changes associated to multistep states (Freiburger, Auclair, & Mittermaier,
715 2012). However it is recognized by scientific community that calorimetric data
716 represent the real magnitude of intermolecular interactions. Therefore, it can be
717 concluded that enthalpic energy of interaction between BSA and AR or P4R is
718 of order of -4.0 to -5.0 kJ.mol^{-1} . This discrepancy between fluorimetric and
719 calorimetric data may also be associated to the former detect only BSA-colorant
720 complex forming near to tryptophan (up to $5 \text{ \AA}$ of distance of tryptophan), while
721 calorimetric measurements determine interaction energy of food dye with any
722 available site in BSA.

723 To determine the contribution of tertiary structure of BSA to complex
724 formation, isothermal titrations were repeated for denatured protein (Figure 16).

725

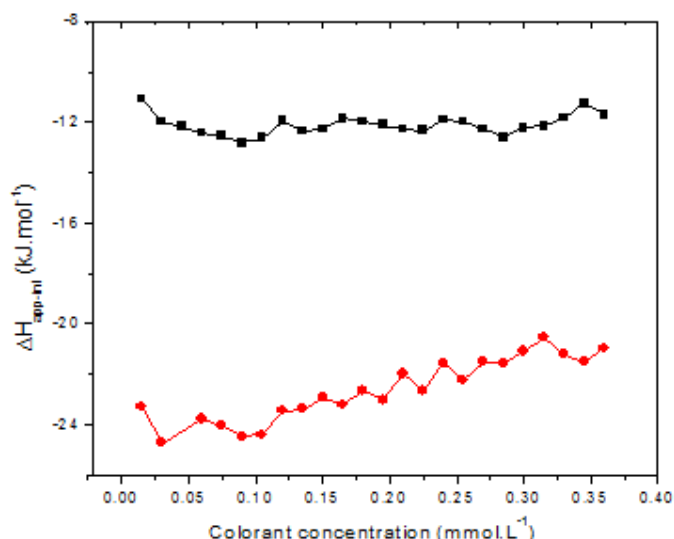


Figure 16 - $\Delta_{app-int}H$ of denatured BSA-colorant interactions as a function of colorant concentration, at 298 K and pH 3.5: (■) allura red and (●) ponceau 4R.

Calorimetric data show that even with denatured protein, BSA-colorant interaction occurred. With BSA denaturation, $\Delta_{app-int}H$ values became more negative (-12.0 and -24.0 kJ.mol⁻¹, for AR and P4R respectively) than those presented for native protein. As discussed before for fluorimetric item, native BSA molecules have hydrophobic domains able to interact with colorant molecules, contributing to positive enthalpic variations mainly due to hydrophobic effect. With denaturation, these hydrophobic sites are lost and intermolecular interaction occurs in multisite mainly due to electrostatic forces, which are exothermic and more intense. The more exothermic values for P4R may be attributed to the presence of one more sulphide group in its structure that provides a more negative residual charge, allowing more intense electrostatic interactions. In addition, the $\Delta_{app-int}H$ values are resulted from contribution of three molecular processes necessary to occurrence of BSA-colorant complexation (Equation 9).

$$\Delta_{app-int}H^0 = \Delta_{BSA-dye}H^0 + \Delta_{BSAconf}H^0 + \Delta_{desol}H^0 \quad (9)$$

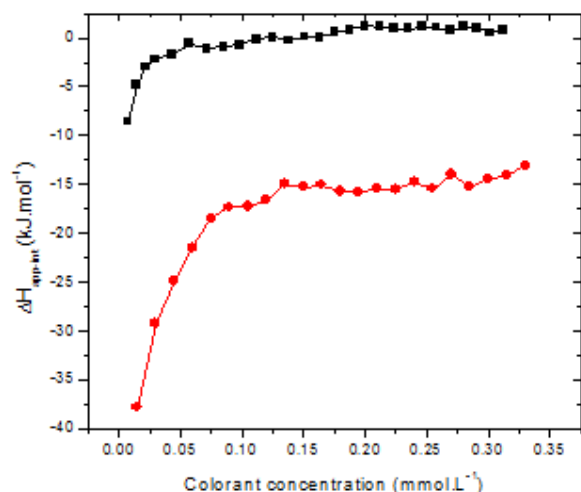
Where $\Delta_{BSA-dye}H^0$ is the enthalpy change for BSA-dye interaction; $\Delta_{BSAconf}H^0$ is the enthalpy change associated to conformational change of BSA

749 and $\Delta_{desol}H^0$ is the enthalpy change related to desolvation of BSA and food dye
750 molecules.

751 The first term of Equation 9 is always exothermic, while the others are
752 endothermic. Therefore, the occurrence of an exothermic $\Delta_{app-int}H$ indicates that
753 first term modulus is higher than the modulus of the sum of both others. In the
754 case of denatured protein, the term $\Delta_{BSAconf}H^0$ is zero since tertiary structure of
755 biopolymer was already destroyed, also contributing to more negative $\Delta_{app-int}H$
756 values.

757 To evaluate the effect of electrostatic interactions on energy of BSA-
758 colorant intermolecular interaction, titration experiments were carried out at pH
759 5.0, in which protein residual charge is almost zero.

760 Figure 17 shows the curves of $\Delta_{app-int}H$ as a function of colorant
761 concentration, at 298 K, pH 5.0 and BSA concentration equal $3.01 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$.
762 1.



763

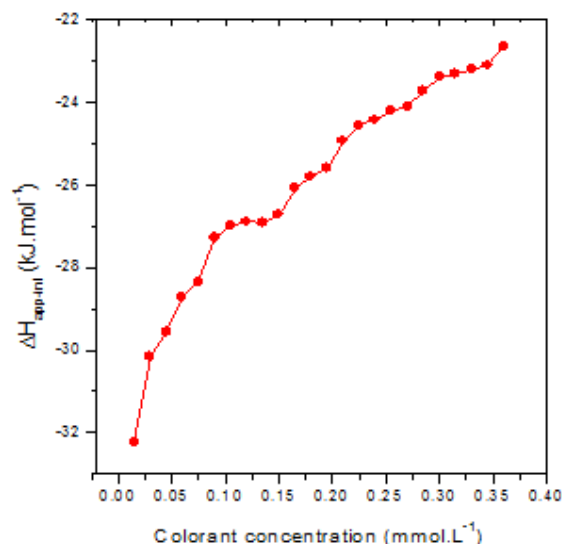
764 **Figure 17** - $\Delta_{app-int}H$ of BSA-colorant interactions as a function of colorant
765 concentration, at 298 K and pH 5.0: (■) allura red and (●) ponceau 4R.

766

767 With pH raising $\Delta_{app-int}H$ values for BSA-AR and BSA-P4R interaction
768 became more negative, suggesting that specific interactions with charged
769 amino acid segments still occurs with energy enough to produce negative
770 interaction enthalpy or the BSA conformational change was smaller due to
771 absence of electrostatic repulsion caused by electric charge present on BSA
772 surface. As colorant concentration increased $\Delta_{app-int}H$ values were less
773 negative, reaching a plateau at 0.22 and 0.15 mmol.L⁻¹, for AR and P4R,

774 respectively. As discussed for pH 3.5, the $\Delta_{app-int}H$ values result from
 775 contribution of three molecular processes (Equation 9). Since the first term is
 776 always exothermic and both other are endothermic, at pH 5.0 endothermic
 777 contributions were smaller than at pH 3.5. The energetic cost to desolvating
 778 protein at pH 3.5 should be higher than at pH 5.0 because charge density on
 779 surface protein is bigger at pH 3.5, leading to more intense protein-water
 780 intermolecular interactions due to ion-dipole interactions. In addition, a higher
 781 contribution of conformational change is expected at pH 3.5 because in this
 782 condition BSA-colorant interaction may promote some conformational changes
 783 that approaching segments of amino acid loaded with the same charge lead to
 784 protein destabilization and change biopolymer conformation. Then, we can
 785 conclude that despite of $\Delta_{BSA-dye}H^0$ is expected to be more exothermic at pH
 786 3.5, $\Delta_{BSA-conf}H^0$ is considered less positive at pH 5.0, producing more negative
 787 $\Delta_{app-int}H$ values.

788 To evaluate the effect of tertiary structure of protein on BSA-colorant
 789 interaction, ITC measurements were conducted for denatured protein, but only
 790 with P4R since denatured BSA-AR complex precipitated, making impossible
 791 $\Delta_{app-int}H$ determination (Figure 18).



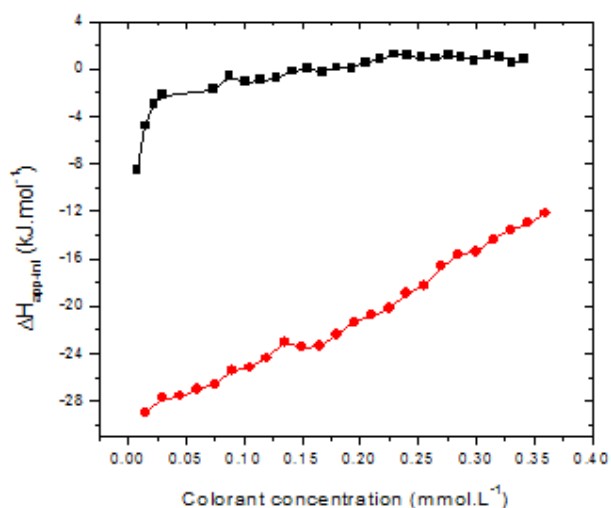
792
 793 **Figure 18** - $\Delta_{app-int}H$ of denatured BSA-ponceau 4R interaction as a
 794 function of colorant concentration, at 298 K and pH 5.0.

795
 796 As occurred at pH 3.5, at pH 5.0 BSA denaturated $\Delta_{app-int}H$ values become
 797 more exothermic, demonstrating again the contribution of hydrophobic

798 interactions and enthalpy change associated with conformational alteration for
 799 interaction between native BSA and food dye. In addition, at denatured state,
 800 $\Delta_{app-int}H$ values for BSA-P4R interaction changed less abruptly pointing to less
 801 intense cooperative process, which is caused by absence of conformational
 802 change that is a cooperative process.

803 Aiming to investigate the contribution of electrostatic repulsions in the
 804 interaction process of BSA and food dyes, calorimetric experiments were
 805 conducted at pH 7.4, in which both BSA and colorant molecules are found
 806 negatively charged producing repulsive electrostatic interactions during complex
 807 formation. ITC measurements were carried out with native and denatured
 808 protein.

809 Figure 19 shows the curves of $\Delta_{app-int}H$ as a function of colorant
 810 concentration, at 298 K, pH 7.4 and BSA concentration equal $3.01 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$.
 811 1.



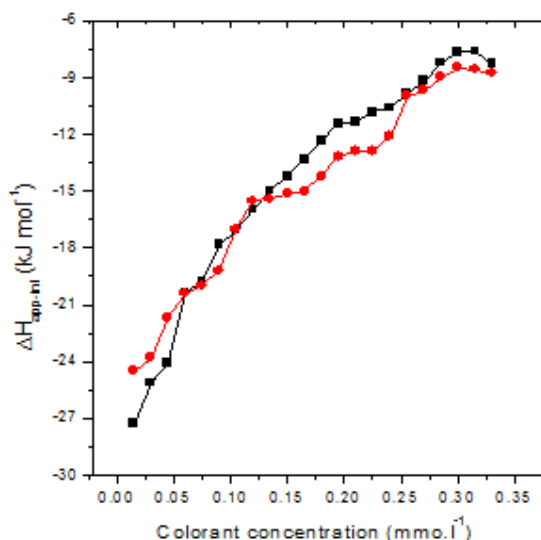
812

813 **Figure 19** - $\Delta_{app-int}H$ of BSA-colorant interactions as a function of colorant
 814 concentration, at 298 K and pH 7.4: (■) allura red and (●) ponceau 4R.

815

816 Despite of repulsive component on BSA-colorant interaction, $\Delta_{app-int}H$
 817 values were more negative at pH 7.4 than at pH 3.5, where electrostatic
 818 interactions are attractive. Based on Equation 9 the more negative enthalpy
 819 change could be attributed to a lower energetic cost to change BSA
 820 conformation at pH 7.4. In addition, to explain this behavior is need to consider
 821 BSA structural changes that provide interaction sites more energetically
 822 favorable. Fluorescence results corroborate to this hypothesis since there was a

823 great variation in constants of complex formation at different pHs. With BSA
 824 denaturation, for BSA-P4R interaction $\Delta_{app-int}H$ values became less negative
 825 mainly due to electrostatic repulsion present in the chain of denatured protein
 826 (Figura 20). On the other hand, for BSA-AR interaction, $\Delta_{app-int}H$ values were
 827 more negative, since for this colorant the main contribution for interaction with
 828 biopolymer comes from conformational change, then with denatured protein this
 829 contribution is canceled and $\Delta_{app-int}H$ becomes more negative.
 830



831
 832 **Figure 20** - $\Delta_{app-int}H$ of denatured BSA-colorant interactions as a
 833 function of colorant concentration, at 298 K and pH 7.4: (■) allura red and (●)
 834 ponceau 4R.
 835

836 4. Conclusion

837 Interaction between AR or P4R and BSA was investigated by different
 838 techniques at different conditions of pH, ionic force and temperature. The
 839 results demonstrated that AR or P4R and BSA formed a complex driving by
 840 enthalpic or entropic contribution depending on thermodynamic condition.
 841 Electrostatic and hydrophobic interactions are presented in the BSA-colorant
 842 interactions but it was showed that BSA conformational change plays an
 843 important role on complexation. Interesting, a small structural difference in food
 844 dye molecules shows a great effect in the interaction P4R-BSA compared to
 845 AR-BSA. This study provided important information about interaction between
 846 AR, P4R, synthetics colorants, and BSA in a food (pH 3.5 and 5.0) and in a
 847 blood (pH 7.4) conditions.

848

849 Acknowledgments

850 The authors thank CNPq, FAPEMIG and Vale S.A. for financial support.

851

852 **5. References**

853 Abramsson-Zetterberg, L., & Ilbäck, N.-G. (2013). The synthetic food
854 colouring agent Allura Red AC (E129) is not genotoxic in a flow cytometry-
855 based micronucleus assay in vivo. *Food and Chemical Toxicology: An*
856 *International Journal Published for the British Industrial Biological Research*
857 *Association*, 59, 86–9. doi:10.1016/j.fct.2013.05.047

858 Amine, C., Dreher, J., Helgason, T., & Tadros, T. (2014). Investigation of
859 emulsifying properties and emulsion stability of plant and milk proteins using
860 interfacial tension and interfacial elasticity. *Food Hydrocolloids*, 39, 180–186.

861 Bermúdez-Aguirre, D., Yáñez, J. A., Dunne, C. P., Davies, N. M., &
862 Barbosa-Cánovas, G. V. (2010). Study of strawberry flavored milk under pulsed
863 electric field processing. *Food Research International*, 43(8), 2201–2207.
864 doi:10.1016/j.foodres.2010.07.021

865 Bolel, P., Mahapatra, N., Datta, S., & Halder, M. (2013). Modulation of
866 Accessibility of Subdomain IB in the pH-Dependent Interaction of Bovine Serum
867 Albumin with Cochineal Red A: A Combined View from Spectroscopy and
868 Docking Simulations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 4606–
869 4613. doi:dx.doi.org/10.1021/jf305395n

870 Bolel, P., Mahapatra, N., & Halder, M. (2012). Optical Spectroscopic
871 Exploration of Binding of Cochineal Red A with Two Homologous Serum
872 Albumins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 3727–3734.
873 doi:dx.doi.org/10.1021/jf205219w

874 Bou-Abdallah, F., & Terpstra, T. R. (2012). The thermodynamic and
875 binding properties of the transferrins as studied by isothermal titration
876 calorimetry. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1820(3), 318–25.
877 doi:10.1016/j.bbagen.2011.07.013

878 Bourassa, P., Kanakis, C. D., Tarantilis, P., Pollissiou, M. G., & Tajmir-
879 Riahi, H. a. (2010). Resveratrol, genistein, and curcumin bind bovine serum
880 albumin. *The Journal of Physical Chemistry. B*, 114(9), 3348–54.
881 doi:10.1021/jp9115996

882 Carneiro-da-Cunha, M. G., Cerqueira, M. a., Souza, B. W. S., Teixeira, J.
883 a., & Vicente, A. a. (2011). Influence of concentration, ionic strength and pH on
884 zeta potential and mean hydrodynamic diameter of edible polysaccharide
885 solutions envisaged for multilayered films production. *Carbohydrate*
886 *Polymers*, 85(3), 522–528. doi:10.1016/j.carbpol.2011.03.001

887 Chen, C., Ma, M., Zhang, J., Wang, L., & Xiang, B. (2008). Spectroscopic
888 investigation of the interaction of bovine serum albumin with a novel cardiac
889 agent V-09. *Spectroscopy*, 22, 43–50. doi:10.3233/SPE-2008-0341

890 De Andrade, F. I., Florindo Guedes, M. I., Pinto Vieira, Í. G., Pereira
891 Mendes, F. N., Salmito Rodrigues, P. A., Costa Maia, C. S., ... de Matos
892 Ribeiro, L. (2014). Determination of synthetic food dyes in commercial soft
893 drinks by TLC and ion-pair HPLC. *Food Chemistry*, 157, 193–8.
894 doi:10.1016/j.foodchem.2014.01.100

895 Dinç, E. (2002). Spectrophotometric multicomponent determination of
896 sunset yellow, tartrazine and allura red in soft drink powder by double divisor-
897 ratio spectra derivative, inverse least-squares and principal component
898 regression methods. *Talanta*, 58(3), 579–594. doi:10.1016/S0039-
899 9140(02)00320-X

900 Freiburger, L. A., Auclair, K., & Mittermaier, A. K. (2012). Van't Hoff global
901 analyses of variable temperature isothermal titration calorimetry data.
902 *Thermochimica Acta*, 527, 148–157.

903 Mandal, G., Bardhan, M., & Ganguly, T. (2010). Interaction of bovine
904 serum albumin and albumin-gold nanoconjugates with L-aspartic acid. A
905 spectroscopic approach. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 81(1), 178–
906 84. doi:10.1016/j.colsurfb.2010.07.002

907 McCann, D., Barrett, A., Cooper, A., Crumpler, D., Dalen, L., Grimshaw,
908 K., ... Stevenson, J. (2007). Food additives and hyperactive behaviour in 3-
909 year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomised, double-
910 blinded, placebo-controlled trial. *Lancet*, 370(9598), 1560–7.
911 doi:10.1016/S0140-6736(07)61306-3

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

915 Saeed, S. M. G., Abdullah, S. U., Sayeed, S. A., & Ali, R. (2010). Food
 916 Protein : Food Colour Interactions and its Application in Rapid Protein Assay,
 917 28(6), 506–513.

918 Shahabadi, N., Maghsudi, M., & Rouhani, S. (2012). Study on the
 919 interaction of food colourant quinoline yellow with bovine serum albumin by
 920 spectroscopic techniques. *Food Chemistry*, 135(3), 1836–41.
 921 doi:10.1016/j.foodchem.2012.06.095

922 Soy lak, M., Unsal, Y. E., & Tuzen, M. (2011). Spectrophotometric
 923 determination of trace levels of allura red in water samples after separation and
 924 preconcentration. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal*
 925 *Published for the British Industrial Biological Research Association*, 49(5),
 926 1183–7. doi:10.1016/j.fct.2011.02.013

927 Umer Abdullah, S., Badaruddin, M., Asad Sayeed, S., Ali, R., & Riaz, M.
 928 N. (2008). Binding ability of Allura Red with food proteins and its impact on
 929 protein digestibility. *Food Chemistry*, 110(3), 605–610.
 930 doi:10.1016/j.foodchem.2008.02.049

931 Vieira, M. L. G., Esquerdo, V. M., Nobre, L. R., Dotto, G. L., & Pinto, L. A.
 932 A. (2014). Glass beads coated with chitosan for the food azo dyes adsorption in
 933 a fixed bed column. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 20(5),
 934 3387–3393. doi:10.1016/j.jiec.2013.12.024

935 Wang, L., Zhang, G., & Wang, Y. (2014). Binding properties of food
 936 colorant allura red with human serum albumin in vitro. *Molecular Biology*
 937 *Reports*, 41(5), 3381–91. doi:10.1007/s11033-014-3200-z

938 Ye, F., Jensen, H., Larsen, S. W., Yagmur, A., Larsen, C., & Østergaard,
 939 J. (2012). Measurement of drug diffusivities in pharmaceutical solvents using
 940 Taylor dispersion analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*,
 941 61, 176–83. doi:10.1016/j.jpba.2011.11.030

942 Zhang, Y., Zhang, X., Lu, X., Yang, J., & Wu, K. (2010). Multi-wall carbon
 943 nanotube film-based electrochemical sensor for rapid detection of Ponceau 4R
 944 and Allura Red. *Food Chemistry*, 122(3), 909–913.
 945 doi:10.1016/j.foodchem.2010.03.035

946