

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

INTERAÇÃO INTERMOLECULAR ENTRE CASEÍNAS BOVINAS E LUTEÍNA

Mariana Ishhanuhi da Silva Sismanoglu
Magister Scientiae

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2024**

MARIANA ISHHANUHI DA SILVA SISMANOGLU

INTERAÇÃO INTERMOLECULAR ENTRE CASEÍNAS BOVINAS E LUTEÍNA

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

Orientadora: Ana C Dos Santos Pires

Coorientadores: Luis H Mendes da Silva
Eliara Acipreste Hudson

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

S623i
2024

Sismanoglu, Mariana Ishhanuhi da Silva, 1998-
Interação intermolecular entre caseínas bovinas e luteína /
Mariana Ishhanuhi da Silva Sismanoglu. – Viçosa, MG, 2024.
1 dissertação eletrônica (80 f.): il. (algumas color.).

Texto em português e inglês.

Orientador: Ana Clarissa dos Santos Pires.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Tecnologia de Alimentos, 2024.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.737>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Leite - Proteínas. 2. Carotenóides. 3. Termodinâmica.
4. Análise espectral. 5. Fluorescência. I. Pires, Ana Clarissa dos
Santos, 1981-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento
de Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos. III. Título.

CDD 22. ed. 572.69

MARIANA ISHHANUHI DA SILVA SISMANOGLU

INTERAÇÃO INTERMOLECULAR ENTRE CASEÍNAS BOVINAS E LUTEÍNA

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: 2 de setembro de 2024.

Assentimento:

Mariana Ishhanuhi da Silva Sismanoglu
Autora

Ana Clarissa Dos Santos Pires
Orientadora

Essa dissertação foi assinada digitalmente pela autora em 19/11/2024 às 08:12:58 e pela orientadora em 21/11/2024 às 15:28:34. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **5TM9.7QK2.185D** e clique no botão 'Validar documento'.

*Ofereço com carinho aos meus pais, Maria Francisca e Raffi, e às minhas irmãs,
Ana Beatriz e Raffaella*

Dedico ao grande Amor da minha vida e amigo, João Batista

AGRADECIMENTOS

A meus amados pais, Maria Francisca e Raffi; às minhas queridas irmãs, Ana Beatriz e Raffaella; e à família da minha amada tia “Toninha”, que representam o lar onde encontro incentivos diários, alegria e amor. Muito obrigada por estarem juntos a mim a todo momento. Sem vocês, não teria chegado até aqui e nada teria sido possível.

Ao meu querido e amado namorado, João Batista. Muito obrigada por estar ao meu lado a todo momento e proporcionar minhas alegrias e felicidades mais sinceras. Apesar da grande distância que nos separa, ela fortaleceu ainda mais nosso laço. Seu amor e carinho comigo tornaram a minha caminhada mais leve e feliz, e eu, bem mais forte.

À minha orientadora, Professora Ana Clarissa, assim como aos meus coorientadores, Doutora Eliara e Professor Luis Henrique, pela oportunidade de realizar o Mestrado, pela confiança depositada em mim, e pelos conhecimentos compartilhados. Agradeço, em especial, à Doutora Eliara, por todo acompanhamento e paciência durante esta trajetória percorrida comigo, e pelos grandes ensinamentos e conhecimentos compartilhados.

À Professora Francielle, por aceitar o convite para participar da banca de defesa e pelas contribuições para este trabalho, e à Professora Jaqueline, pelas contribuições para este trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar este curso e por disponibilizar as infraestruturas do Laboratório THERMA e do Restaurante Universitário.

Ao grupo THERMA pelo apoio, amizade, oportunidade e convivência. Em

especial à Letícia, pelo carinho, companhia e conversas desde o início da nossa jornada no Mestrado. Sua amizade certamente foi um presente para mim. Também gostaria de agradecer à Lívia Neves, por prontamente tirar algumas dúvidas relacionadas à técnica de fluorescência que me surgiam, e à Nayara, Renata, Raquel, Alan, e Irene pelo carinho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo e apoio financeiro ao projeto. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro ao projeto. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

A Deus, por me permitir viver e agradecer por todas essas pessoas e por nunca ter se esquecido de mim.

RESUMO

SISMANOGLU, Mariana Ishhanuhi da Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2024. **INTERAÇÃO INTERMOLECULAR ENTRE CASEÍNAS BOVINAS E LUTEÍNA.** Orientadora: Ana Clarissa Dos Santos Pires. Coorientadores: Luis Henrique Mendes da Silva e Eliara Acipreste Hudson.

Devido às funções biológicas das moléculas bioativas, sua ingestão pode contribuir com efeitos benéficos à saúde. No entanto, muitas apresentam baixa biodisponibilidade e estabilidade química, o que é um fator limitante para a aplicação destas moléculas. Uma solução para aumentar a estabilidade consiste na formação de complexos entre proteínas e moléculas bioativas, como as caseínas bovinas (α_s -CNs, β -CN, e κ -CN) e luteína (LUT). Assim, este trabalho determinou os parâmetros termodinâmicos da interação intermolecular entre caseínas bovinas e LUT através da espectroscopia de fluorescência; avaliou o efeito desta interação sobre a atividade antioxidante da LUT utilizando o método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila); e analisou o impacto da formação dos complexos entre caseínas bovinas e LUT sobre a fotodegradação da LUT. Verificou-se que os complexos LUT-caseínas bovinas apresentaram estequiometria 1:1 e a constante de ligação (K_b) foi da ordem de 10^4 mol. L^{-1} . Baseando-se na variação da entalpia padrão de formação do complexo (ΔH°), a formação dos complexos foi entalpicamente conduzida, no qual os complexos α_s -CNs-LUT e κ -CN-LUT inicialmente tinham uma ligação endotérmica, e posteriormente passaram para uma ligação exotérmica (ΔH° diminuiu de $0.24 \text{ kJ. mol}^{-1}$ para $-6.17 \text{ kJ. mol}^{-1}$ e de $5.95 \text{ kJ. mol}^{-1}$ para $-11.20 \text{ kJ. mol}^{-1}$, respectivamente), enquanto o complexo β -CN-LUT apresentou uma ligação exotérmica (ΔH° diminuiu de $-6.03 \text{ kJ. mol}^{-1}$ para $-12.87 \text{ kJ. mol}^{-1}$). As caseínas bovinas mantiveram ou aumentaram a atividade antioxidante da LUT ($IC_{50} = 73.65 \text{ }\mu\text{g/mL}$ para o complexo α_s -CNs-LUT; $IC_{50} = 101.21 \text{ }\mu\text{g/mL}$ para o complexo β -CN-LUT; e $IC_{50} = 88.04 \text{ }\mu\text{g/mL}$ para o complexo κ -CN-LUT), e aumentaram sua estabilidade contra a fotodegradação, diminuindo a constante de degradação da LUT (K_d) para 0.0091 h^{-1} ; 0.0083 h^{-1} ; e 0.0108 h^{-1} , e aumentando seu tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) para 76.17 h ; 83.51 h ; e 64.18 h , respectivamente. Estes resultados contribuem para elucidar o papel das caseínas bovinas na estabilização da LUT em matrizes lácteas e outros sistemas baseados no

complexo LUT-caseínas bovinas, fornecendo estratégias importantes para melhorar a aplicação e eficácia dos complexos α_s -CNs-LUT, β -CN-LUT, e k-CN-LUT em formulações alimentícias e farmacêuticas.

Palavras-chave: proteínas do leite; carotenoides; complexação molecular; espectroscopia de fluorescência; atividade antioxidante; fotodegradação

ABSTRACT

SISMANOGLU, Mariana Ishhanuhi da Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2024. **INTERMOLECULAR INTERACTION BETWEEN THE PROTEINS ALPHA-S-CASEIN, BETA-CASEIN, AND KAPPA-CASEIN AND THE CAROTENOID LUTEIN.** Adviser: Ana Clarissa Dos Santos Pires. Co-advisers: Luis Henrique Mendes da Silva and Eliara Acipreste Hudson.

Due to the biological functions of bioactive molecules, their ingestion can contribute to beneficial health effects. However, many have low bioavailability and chemical stability, which is a limiting factor for the application of these molecules. A solution to increase the stability consists in complexes formation between proteins and bioactive molecules, such as bovine caseins (α_s -CNs, β -CN, and κ -CN) and lutein (LUT). Thus, this work determined the thermodynamic parameters of the intermolecular interaction between bovine caseins and LUT using fluorescence spectroscopy; evaluated the effect of this interaction on the antioxidant activity of LUT using the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) method; and analyzed the impact of the complexes formation between bovine caseins and LUT on the photodegradation of LUT. It was verified that LUT-bovine caseins complexes showed a 1:1 stoichiometry and the binding constant (K_b) was of the order of 10^4 mol. L^{-1} . Based on the standard enthalpy change (ΔH°), the complexes formation was enthalpically driven, where the α_s -CNs-LUT and κ -CN-LUT complexes shifted from an endothermic to an exothermic binding (ΔH° decreased from $0.24 \text{ kJ. mol}^{-1}$ to $-6.17 \text{ kJ. mol}^{-1}$ and from $5.95 \text{ kJ. mol}^{-1}$ to $-11.20 \text{ kJ. mol}^{-1}$, respectively), while the β -CN-LUT complex was an exothermic binding (ΔH° decreased from $-6.03 \text{ kJ. mol}^{-1}$ to $-12.87 \text{ kJ. mol}^{-1}$). Bovine caseins maintained or enhanced the antioxidant activity of LUT ($IC_{50} = 73.65 \text{ }\mu\text{g/mL}$ for the α_s -CNs-LUT complex; $IC_{50} = 101.21 \text{ }\mu\text{g/mL}$ for the β -CN-LUT complex; and $IC_{50} = 88.04 \text{ }\mu\text{g/mL}$ for the κ -CN-LUT complex), and increased its stability against photodegradation, decreasing LUT's degradation constant (K_d) to 0.0091 h^{-1} ; 0.0083 h^{-1} ; and 0.0108 h^{-1} , and increasing its half-life time ($t_{1/2}$) to 76.17 h ; 83.51 h ; and 64.18 h , respectively. These results contribute to elucidate the role of bovine caseins in the stabilization of LUT in dairy matrices and other systems based on LUT-bovine caseins complex, providing important strategies to improve the application and effectiveness of the α_s -CNs-LUT, β -CN-LUT, and κ -CN-LUT complexes in

food and pharmaceutical formulations.

Keywords: milk proteins; carotenoids; molecular complexation; fluorescence spectroscopy; antioxidant activity; photodegradation

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivo geral.....	14
2.2 Objetivos específicos.....	14
CAPÍTULO 1.....	15
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
3.1 Caseínas bovinas.....	15
3.2 Moléculas de caseínas – produtos gênicos.....	18
3.2.1 Alfa _s -caseínas.....	18
3.2.2 Beta-caseína.....	19
3.2.3 Kappa-caseína.....	20
3.3 Luteína.....	21
3.4 Técnica experimental para o estudo de interações intermoleculares.....	25
3.4.1 Espectroscopia de fluorescência.....	25
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
CAPÍTULO 2.....	40
ARTICLE.....	40
1. INTRODUCTION.....	41
2. MATERIAL AND METHODS.....	44
2.1 Materials.....	44
2.2 Extraction of LUT using an Aqueous Biphasic System.....	44
2.3 Fluorescence spectroscopy experiments.....	46
2.4 Assessment of LUT's antioxidant activity with and without caseins.....	47
2.5 Photodegradation of LUT in the absence and presence of the caseins.....	48
3. RESULTS AND DISCUSSION.....	48
3.1 Steady-state fluorescence analysis.....	48
3.1.1 Fluorescence spectra of the caseins in the absence and presence of LUT.....	49
3.1.2 Predominant fluorescence quenching mechanism of the caseins induced by LUT.....	52
3.1.3 LUT-bovine caseins binding and energetic analyses.....	55

3.2 Effect of the caseins on the antioxidant activity of LUT.....	63
3.3 Impact of the caseins on LUT's photodegradation.....	66
4. CONCLUSION.....	69
5. REFERENCES.....	75
6. CONCLUSÕES GERAIS.....	79

1. INTRODUÇÃO

As moléculas bioativas compreendem um amplo grupo de moléculas que causam efeitos benéficos à saúde de quem as consome (FEITOSA et al., 2022; RUIZ RODRÍGUEZ et al., 2021). Dentre eles destacam-se atividade antioxidante, anti-inflamatória, e antitumoral, além de algumas permitirem a redução de doenças cardíacas e do colesterol e a regulação da microbiota intestinal (JIMÉNEZ-MORENO et al., 2019; MALEŠ et al., 2022; PENG et al., 2020; TODARO et al., 2023). Estão abundantemente distribuídas na natureza, sendo encontradas em plantas; sementes e cascas de frutas, legumes e vegetais; grãos integrais e leguminosas; nozes; amêndoas; especiarias e ervas; bem como em bebidas (chás e vinhos, por exemplo), alimentos de origem animal, como peixes e derivados lácteos fermentados; e também são produzidas no organismo humano (hormônios, ácidos graxos e vitaminas, dentre outras).

Atualmente, inúmeras pesquisas relacionadas às propriedades funcionais e tecnológicas das moléculas bioativas são encontradas na literatura. Além disso, são aplicadas nas indústrias de alimentos como ingredientes funcionais, e nas indústrias farmacêuticas como medicamentos e suplementos alimentares em cápsulas. Entretanto, um grande desafio da aplicação das moléculas bioativas, prejudicando diretamente sua veiculação em novos produtos, alimentos, e sistemas, é a baixa biodisponibilidade, devido à baixa solubilidade em água e estabilidade química.

Neste cenário, uma alternativa para aumentar a estabilidade das moléculas bioativas e, conseqüentemente, manter suas propriedades funcionais ao longo da vida útil de alimentos e medicamentos, consiste na formação de complexos com proteínas, como as caseínas bovinas alfa_s-caseínas (α_s -CN_s) (alfa_{s1}-caseína, α_{s1} -CN, e alfa_{s2}-caseína, α_{s2} -CN); beta-caseína (β -CN); e kappa-caseína (κ -CN). É conhecido que a LUT tem a capacidade de formar complexos com diferentes proteínas através de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas.

As caseínas bovinas são proteínas naturalmente presentes no leite, responsáveis pela formação da micela de caseína. Devido à predominância das caseínas bovinas no leite em comparação às demais proteínas, como as proteínas do soro, e à importância da micela de caseína na composição e estabilidade coloidal do leite; no transporte de nutrientes, como cálcio e vitaminas lipossolúveis; e nas propriedades físico-químicas, reológicas, tecnológicas, e sensoriais dos produtos

lácteos, as caseínas bovinas são consideradas as principais proteínas do leite (TIDONA et al., 2014; ZHANG et al., 2024a).

Um exemplo de molécula bioativa que vem sendo estudada com grande interesse nos últimos anos, em virtude de suas propriedades funcionais, é a LUT, um pigmento natural que também é encontrado nos olhos, local em que absorve a luz azul e previne o aparecimento de algumas doenças relacionadas à visão (KAMOSHITA et al., 2016; SOBRAL et al., 2016). As indústrias de laticínios vêm aplicando a LUT na formulação de queijos, como os queijos prato, cheddar, cottage e gouda (DE BARROS et al., 2020; FUSARO et al., 2019; RENES et al., 2018; SHI et al., 2024), em substituição aos corantes artificiais, com a finalidade de não apenas intensificar a coloração, mas contribuir para o enriquecimento nutricional e funcional destes alimentos, em razão de sua alta atividade antioxidante.

Apesar da relevância biológica das caseínas bovinas e LUT e da crescente conscientização do uso de corantes naturais nos alimentos, a LUT é uma molécula facilmente degradada pela luz, oxigênio, temperatura elevada, e variação de pH (JV et al., 2023; KUANG et al., 2015; QV; ZENG; JIANG, 2011; SHU et al., 2023). Como os estudos sobre interação intermolecular, atividade antioxidante, e fotodegradação entre LUT e caseínas bovinas, proteínas abundantes em queijos, ainda não estão estabelecidos, este trabalho permitirá o entendimento dos mecanismos envolvidos na formação dos complexos LUT-caseínas bovinas e o efeito que estes podem provocar nas propriedades funcionais da LUT em queijos. Portanto, informações sobre o potencial de aplicação das caseínas bovinas como carreadores e estabilizadores da LUT, o que pode contribuir para aumentar a estabilidade química da LUT em diferentes sistemas alimentícios e farmacêuticos, serão fornecidas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Determinar no espectrofotômetro de fluorescência os parâmetros termodinâmicos da formação dos complexos entre caseínas bovinas (α_s -CN_s, β -CN, e κ -CN) e luteína, aplicando diferentes valores de temperatura; avaliar a atividade antioxidante da luteína na ausência e na presença das caseínas bovinas; e analisar o efeito protetor das caseínas bovinas contra a fotodegradação da luteína, ambos utilizando espectrofotômetro UV-visível.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a estequiometria (n) e a constante termodinâmica de interação (K_b) dos complexos α_s -CN_s-luteína, β -CN-luteína, e κ -CN-luteína; e a variação da energia livre de Gibbs padrão (ΔG°); da entalpia padrão (ΔH°); da entropia padrão (ΔS°); e da capacidade calorífica padrão a pressão constante (ΔC_p°) associadas à formação destes complexos, por meio da espectroscopia de fluorescência a 20°C, 25°C, 30°C, 35°C e 40°C;
- Avaliar o efeito das interações intermoleculares entre caseínas bovinas e luteína, após a formação dos complexos, sobre a atividade antioxidante da luteína utilizando o método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila);
- Analisar a implicação da formação dos complexos entre caseínas bovinas e luteína sobre a cinética de fotodegradação da luteína.

CAPÍTULO 1

3. REVISÃO DE LITERATURA

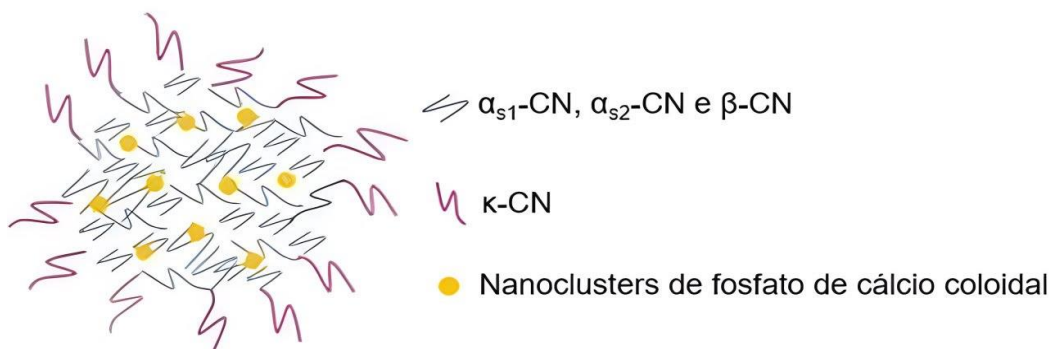
3.1 Caseínas bovinas

O leite e os produtos lácteos são alimentos com elevado teor de nutrientes, tornando-se importantes para a correta manutenção da saúde e funcionalidade do organismo. Dentre eles destacam-se proteínas, lipídeos, açúcar, e minerais, especialmente o cálcio (BOGAHAWATHTHA et al., 2018; SUN et al., 2024). Ainda que alguns nutrientes estejam presentes em maiores quantidades do que outros, como proteínas e lipídeos, todos são responsáveis pela complexa composição e propriedades do leite (ANUSHA SIDDIQUI et al., 2024).

As caseínas são consideradas as principais proteínas do leite (TIDONA et al., 2014; ZHANG et al., 2024a), representando mais de 80% das proteínas totais. São classificadas em quatro tipos: α_{s1} -CN, α_{s2} -CN, β -CN, e κ -CN, (MORAIS et al., 2023; SUN et al., 2024) cada qual com suas características e funções biológicas. Esta classificação, também denominada variante genética, se deve à alteração em um ou mais resíduos de aminoácidos na estrutura primária (FARRELL et al., 2004; HEWA NADUGALA et al., 2024), variação nos graus de fosforilação e glicosilação, formação de polímeros, e proteólise (HUPPERTZ; FOX; KELLY, 2017). Sua massa molecular varia entre 60 kDa e 400 kDa, e seu ponto isoelétrico é aproximadamente 4.8 (CAO et al., 2024; DALGLEISH; CORREDIG, 2012).

A maior parte das caseínas existe na forma de micela de caseína (Figura 1) (SILVA et al., 2019), uma estrutura supramolecular com elevado teor de aminoácidos e minerais (ROY et al., 2022; WANG et al., 2023a). As micelas de caseína são formadas na presença de cálcio, no qual os níveis de fosforilação em α_s -CN_s e β -CN as tornam propensas à precipitação, ainda que o cálcio esteja em baixa concentração. Assim, os grupos fosfatados das α_s -CN_s e β -CN interagem com os nanoaglomerados de fosfato de cálcio (ou nanoclusters de fosfato de cálcio coloidal) e, como estes estão em concentrações acima de sua solubilidade, evita-se a precipitação do fosfato de cálcio (WANG et al., 2023a).

Figura 1 – Representação esquemática da estrutura de uma micela de caseína.



Fonte: Adaptado de DO VALE et al., 2022.

A interação entre os grupos fosfatados das caseínas com os nanoaglomerados de fosfato de cálcio é responsável pela formação das micelas de caseína, agregados amorfos em nanoescala compostos por uma estrutura inorgânica de fosfato de cálcio e uma estrutura biológica de moléculas de caseínas. A κ -CN, por ser menos fosforilada em relação às α_s -CNs e β -CN, torna-se insensível ao cálcio. Ela está localizada na superfície da micela de caseína, proporcionando repulsão estérica e eletrostática, e, consequentemente, prevenindo a agregação (LEI et al., 2024; SATO; NOGUCHI; NAITO, 1986).

A estabilidade e instabilidade das micelas de caseína são importantes para a produção e padronização de leite pasteurizado e esterilizado (leite UHT), queijo, creme de leite, doce de leite, leite condensado, leite fermentado, iogurte, e coalhada (HOLT et al., 2013; SATS; KAART; JÕUDU, 2024; SILVA et al., 2019), afetando as propriedades físico-químicas, tecnológicas e sensoriais destes alimentos.

Dentre algumas funções biológicas das micelas de caseína estão nutrição neonatal, controle e transporte do fosfato de cálcio (SATS; KAART; JÕUDU, 2024) e desenvolvimento infanto-juvenil (devido à presença de peptídeos em sua composição) (SILVA; MALCATA, 2005; ZHANG et al., 2024b). Suas propriedades tecnológicas, como estabilidade térmica e formação de géis, emulsões, e espumas, vêm sendo amplamente estudadas na atualidade (LI et al., 2023; PETIT et al., 2023; QIN et al., 2023; WANG; JIANG; SHI, 2024; YANG et al., 2024), bem como seu potencial em transportar moléculas bioativas, a exemplo de curcumina, antocianinas, resveratrol, naringenina, apigenina, quercetina, vitaminas, fibras, lipídeos, proteínas (lisozima e lactoferrina, por exemplo), minerais, e fármacos (CASANOVA et al., 2021; FAN et al., 2023; SILVA et al., 2019; WANG et al., 2024a; XU et al., 2023).

No estudo conduzido por WANG et al. (2024a), os autores fabricaram nanopartículas de apigenina-caseína (AP-Cas-NP_s) para melhorar a solubilidade em água e a biodisponibilidade da apigenina. Os resultados obtidos por meio de espectroscopia infravermelha com transformada de fourier (FTIR), difração de raios X (XRD), calorimetria diferencial de varredura (DSC), e ressonância magnética nuclear de prótons (HNMR) revelaram que a apigenina foi encapsulada na caseína através de ligação de hidrogênio. O estudo de dissolução in vitro confirmou que as AP-Cas-NP_s aumentaram a solubilidade e a dissolução da apigenina, e que a biodisponibilidade oral de AP-Cas-NP_s também aumentou. Observou-se ainda que as AP-Cas-NP_s melhoraram a estabilidade gastrointestinal e a atividade hipoglicêmica da apigenina. Estas descobertas sugerem que as AP-Cas-NP_s são uma estratégia promissora para melhorar a biodisponibilidade da apigenina.

CUI et al. (2024) desenvolveram um estudo no qual complexos binários e complexos ternários de caseína glicada e carboximetilcelulose (CMC) melhoraram a estabilidade de antocianinas e controlaram sua liberação. Ambos os complexos, antocianinas binários carregados (ACN_s-UGCA) e antocianinas ternários carregados (ACN_s-UGCA-CMC), exibiram uma estrutura mantida por interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio, demonstrando um aumento na estabilidade das antocianinas quando expostos a diferentes estresses ambientais. Observou-se que a inclusão de CMC aos complexos ternários melhorou a eficiência da encapsulação dos conjugados glicosilados (UGCA) e as estabilidades coloidais, além de reduzir a perda de antocianinas. Os complexos ternários demonstraram capacidades superiores no controle da liberação de antocianinas em comparação aos complexos binários, exibindo um tempo de retenção prolongado no trato gastrointestinal de camundongos. Com este estudo, concluí-se que o complexo formado por caseína glicada e CMC apresenta potencial promissor como carreador para antocianinas.

GHAYOUR et al. (2019) desenvolveram dois sistemas de carreamento baseados em caseína, sendo estes micela de caseína remontada (r-CM) e nanopartícula de caseína (CNP), para o encapsulamento de quercetina e curcumina. As características de ligação da quercetina e curcumina ao caseinato de sódio foram determinadas utilizando-se espectroscopia de fluorescência, no qual as estequiometrias de ligação obtidas para a quercetina e para a curcumina foram, respectivamente, 0.96 e 0.78.

Neste mesmo estudo, os autores verificaram que tanto a CNP quanto a r-CM melhoraram a estabilidade química dos compostos fenólicos, onde a solubilidade da

curcumina e da quercetina após carregamento em r-CM foi maior do que a solubilidade das moléculas de curcumina e de quercetina livres. Mudanças na viscosidade relativa durante o processo de remontagem confirmaram a formação de estruturas micelares, e ambos os sistemas de encapsulamento revelaram alta eficiência de aprisionamento e bioproteção. Estes resultados podem contribuir para o desenvolvimento de sistemas de carregamento baseados em proteínas para serem utilizados na incorporação de nutracêuticos hidrofóbicos em bebidas funcionais (GHAYOUR et al., 2019).

3.2 Moléculas de caseínas – produtos gênicos

3.2.1 Alfa_s-caseínas

As α_s -CN_s correspondem a aproximadamente 40% do conteúdo proteico de uma micela de caseína (DARWISH et al., 2023; REHAN; AHMAD; GUPTA, 2019). Possuem duas variantes genéticas, α_{s1} -CN e α_{s2} -CN, sendo que a variante α_{s1} -CN é a que está presente em maior quantidade no leite (representando cerca de 44% do total de caseínas) (SUN; GERRARD; ANEMA, 2024; SWAISGOOD, 2003), enquanto a α_{s2} -CN corresponde a 10% do total de caseínas (SILVA et al., 2019). As cadeias polipeptídicas das α_s -CN_s são caracterizadas por regiões hidrofóbicas carregadas negativamente e possuem poucas estruturas α -helicoidais e estruturas β (KALYANKAR et al., 2015).

As α_s -CN_s possuem epítomos alergênicos, responsáveis por produzir respostas imunes para o organismo (ZHANG et al., 2024c), e suas propriedades conformacionais permitem efeitos funcionais para células e moléculas, como o transporte de nutrientes (ANSELMO et al., 2022). Apresentam solubilidade em soluções ácidas, precipitando em pH neutro e pH alcalino (SILVA et al., 2019).

A α_{s1} -CN é composta por oito resíduos fosfoseril (FARRELL et al., 2004; SUN; GERRARD; ANEMA, 2024) e para a α_{s2} -CN este número varia entre dez a treze resíduos, caracterizando-a como a fração mais hidrofílica das micelas de caseína e a de maior sensibilidade ao cálcio (HUPPERTZ; FOX; KELLY, 2017; KALYANKAR et al., 2015; SILVA et al., 2019). A α_{s1} -CN é representada pela variante genética α_{s1} -CN B-8P, cuja estrutura apresenta massa molecular igual a 23.615 Da, 199 resíduos de aminoácidos, e 2 resíduos do aminoácido triptofano, enquanto a α_{s2} -CN é representada pela variante genética α_{s2} -CN A-11P, que apresenta massa molecular igual a 25.226

Da, 207 resíduos de aminoácidos, e, assim como a α_{s1} -CN, também possui 2 resíduos do aminoácido triptofano (FARRELL et al., 2004; HUPPERTZ; FOX; KELLY, 2017; SILVA et al., 2019).

3.2.2 Beta-caseína

A β -CN corresponde a mais de 35% do conteúdo proteico de uma micela de caseína, sendo representada pela variante genética β -CN A²-5P, cuja estrutura apresenta massa molecular igual a 23.983 Da, 209 resíduos de aminoácidos, e 1 resíduo do aminoácido triptofano (DANILOSKI et al., 2023; HUPPERTZ; FOX; KELLY, 2017; PACHECO et al., 2020; SILVA et al., 2019). Como a β -CN está presente em uma quantidade superior ao conteúdo de α_{s2} -CN e de κ -CN, é considerada a segunda fração mais abundante das micelas de caseína (SUN; GERRARD; ANEMA, 2024).

Treze variantes genéticas da β -CN são identificadas atualmente. Este número pode variar de acordo com diferentes estudos, no entanto, há um consenso de que as variantes A1, A2, e B são as principais (DANILOSKI et al., 2023; HEWA NADUGALA et al., 2022). A variante A1 originou-se de uma mutação genética no aminoácido 67 da cadeia polipeptídica da A2 β -CN, que inicialmente era o aminoácido prolina e que se tornou o aminoácido histidina, caracterizando assim a variante como sendo A1 β -CN. Esta mutação afeta algumas propriedades do leite, como gelificação e solidificação, hidrólise das enzimas digestivas, ponto isoelétrico, carga proteica, e condições gastrointestinais do organismo humano (LUCEY; HORNE, 2018; OSMAN et al., 2021; SUN et al., 2024).

A β -CN forma agregados com lipídeos e fosfato de cálcio, sendo intrinsecamente desordenada e de natureza anfifílica, apresentando diversos resíduos dos aminoácidos prolina e serina fosforilada em sua estrutura (DANILOSKI et al., 2024; PACHECO et al., 2020). A presença dos resíduos de prolina e a ausência de ligações dissulfeto permitem que a β -CN seja a principal fonte de peptídeos bioativos das micelas de caseína (SUN et al., 2024), que desempenham propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras (LIU et al., 2023). Como a β -CN é a fração mais hidrofóbica das micelas de caseína (SILVA et al., 2019), é, portanto, capaz de quelar o cálcio e permitir a formação de agregados micelares de β -CN em solução (LI et al., 2022; MARKOSKA et al., 2021; SUN et al., 2024).

3.2.3 Kappa-caseína

A κ -CN corresponde a 15% do conteúdo proteico de uma micela de caseína (SILVA et al., 2019) e, diferentemente das α_s -CN_s e da β -CN, que estão localizadas no interior da micela, a κ -CN localiza-se em sua superfície (YUN et al., 2023). A presença de um peptídeo C-terminal hidrofílico carregado negativamente na estrutura da κ -CN (KAYIHURA, 2023) a torna responsável pelo impedimento estérico e repulsão eletrostática entre as micelas de caseína, mantendo a estabilidade coloidal e evitando a agregação (LUO et al., 2023; MØLLER; NIELSEN; CORREDIG, 2023; WANG et al., 2024b).

A κ -CN é representada pela variante genética κ -CN A-1P, cuja estrutura apresenta massa molecular igual a 19.052 Da, 169 resíduos de aminoácidos, e 1 resíduo do aminoácido triptofano. Está presente no leite sob a forma de polímeros que variam de dímeros a octâmeros, de natureza anfifílica (FARRELL et al., 2004; HEWA NADUGALA et al., 2023; SILVA et al., 2019). É uma proteína intrinsecamente desordenada e é a única fração das micelas de caseína glicosilada. Dentre algumas de suas funções biológicas, desempenha atividades antimicrobiana, anti-inflamatória, e imunomoduladora (LUO et al., 2023; MALKOSKI et al., 2001). Quatorze variantes genéticas da κ -CN são identificadas na atualidade, cada uma com diferentes graus de fosforilação e glicosilação, sendo as variantes κ -CN A e κ -CN B os principais exemplos (HEWA NADUGALA et al., 2023).

Nas indústrias de laticínios, a κ -CN é importante para a produção de queijos. A desestabilização controlada das micelas de caseína devido à hidrólise enzimática da κ -CN por quimosina, ou devido à acidificação do meio, permite a formação de um coágulo (gel), resultante da agregação ou coagulação das micelas de caseína. Este coágulo definirá as propriedades físico-químicas e sensoriais dos queijos, como rendimento e textura (KAYIHURA, 2023; KELLY; HUPPERTZ; SHEEHAN, 2008).

Durante a coagulação enzimática, a quimosina quebra a ligação peptídica entre os aminoácidos 105 e 106 da κ -CN (fenilalanina e metionina, respectivamente). Após a hidrólise da κ -CN, uma parte é carregada pelo soro na forma de CMP (caseinomacropeptídeo) ou GMP (glicomacropeptídeo). Estes peptídeos mantinham a estabilidade coloidal das micelas de caseína por meio do impedimento estérico e repulsão eletrostática, impedindo que se agregassem. A para- κ -caseína, caracterizada como a região N-terminal da κ -CN, permanece ligada na micela de caseína. Durante

fotossintéticos de plantas. Como os animais não são capazes de sintetizá-los, estes são provenientes da alimentação ou de modificações por meio de reações metabólicas.

A LUT, de coloração amarelo-alaranjado, coexiste com a zeaxantina (KIJLSTRA et al., 2012; PAIVA et al., 2020). Está presente em vegetais folhosos verde escuros, como espinafre, brócolis e couve; cenoura; abóbora; pimentão; manga; melancia; gema de ovos (TAN et al., 2016); milho; e azeite de oliva (ABDEL-AAL et al., 2013; GIUFFRIDA et al., 2011); enquanto a LUT comercial é, geralmente, extraída das flores de calêndula (*Calendula officinalis*) (Figura 3). Nos seres humanos, a LUT é transportada pelo plasma sanguíneo através de proteínas transportadoras, como lipoproteínas de baixa e de alta densidade, e albumina sérica humana (REZENDE et al., 2020). Recomenda-se uma ingestão diária entre 6 mg e 20 mg de LUT (DE PAULA et al., 2022).

Figura 3 - Flores de calêndula utilizadas para a extração da luteína.



Fonte: DONOZEN, 2023.

A LUT é uma molécula bioativa muito estudada nas pesquisas acadêmicas, principalmente devido às suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (OH et al., 2013), além de auxiliar na prevenção de doenças que afetam a retina, como degeneração macular e catarata, pois é um componente da mácula dos olhos, absorvendo a luz azul emitida por aparelhos eletrônicos (KAMOSHITA et al., 2016; SOBRAL et al., 2016). Alguns estudos indicam que a LUT também auxilia na prevenção de doenças cardiovasculares (HOZAWA et al., 2009) e aterosclerose (CHUNG et al., 2017).

Nas indústrias de laticínios, a LUT é utilizada como corante na formulação de queijos, manteigas, requeijões, e bebidas lácteas (DE PAULA et al., 2022). No entanto, alguns fatores dificultam sua aplicação, não apenas nas indústrias de alimentos, como também nas indústrias farmacêuticas, pois a LUT é uma molécula com baixa solubilidade em água e biodisponibilidade e degrada quando exposta à temperatura acima de 40°C, ao oxigênio e à luz (DEY et al., 2019; TAN et al., 2023; YI et al., 2016). Em virtude destas características, uma alternativa que pode permitir o carreamento da LUT em formulações de alimentos e medicamentos consiste na formação de complexos (em condições específicas de pH e temperatura) entre LUT e carreadores solúveis em água, como as caseínas bovinas α_s -CN_s, β -CN, e κ -CN. Desta forma, estes complexos podem manter as propriedades funcionais e a estabilidade química da LUT ao longo do tempo.

SOBRAL et al. (2016) trouxeram importantes contribuições do uso da LUT como forma de substituir corantes em queijos. Neste estudo, os autores avaliaram a atividade antioxidante de duas concentrações de LUT (16 e 32 mg L⁻¹) em queijo prato ao longo de 60 dias de maturação, bem como alterações de cor, pH, textura, maturação, e aceitação sensorial. Observou-se que a atividade antioxidante de ambas as concentrações de LUT se manteve durante toda a maturação dos queijos, e que o queijo prato contendo a maior concentração apresentou cor ligeiramente mais vermelha do que os demais, o que era esperado. Os queijos pratos contendo LUT obtiveram aceitação sensorial semelhante ao queijo prato contendo urucum, e os parâmetros relacionados à maturação, pH, e textura não foram afetados pela adição de LUT. Portanto, o queijo prato mostrou-se um excelente carreador para a LUT, mantendo sua atividade antioxidante, ao passo que a LUT pode substituir o urucum na formulação do queijo prato sem afetar suas propriedades e aceitação sensorial.

Muitas pesquisas evidenciam a elevada atividade antioxidante da LUT. Um destes estudos foi realizado por CAMPOS et al. (2024), que analisaram os efeitos da atividade antioxidante da LUT e do ácido ascórbico (AA) contra o radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila). Observou-se que a capacidade antioxidante da LUT é tão elevada quanto a do AA, que é considerado o principal precursor da vitamina C, uma molécula bioativa amplamente conhecida por sua alta capacidade antioxidante. Entretanto, as razões pelas quais a atividade antioxidante da LUT se mantém ao longo do tempo de maturação do queijo prato, como evidenciado por SOBRAL et al. (2016),

apesar de suas instabilidades físico-químicas citadas anteriormente, ainda não foram completamente esclarecidas.

Neste sentido, como as caseínas bovinas (α_s -CN_s, β -CN, e κ -CN) são as proteínas mais predominantes dos queijos, investigar os efeitos dos complexos formados entre LUT e caseínas bovinas sobre a atividade antioxidante da LUT e a capacidade de proteção das caseínas bovinas contra sua fotodegradação é de grande importância, pois pode contribuir para a compreensão da estabilidade química da LUT em queijos. Desta forma, após a formação dos complexos, é esperado que a estabilidade da LUT aumente ou se mantenha ao longo da vida útil de queijos, o que pode solidificar este alimento como um potencial carreador seguro e eficaz de LUT para o consumo.

CHEN et al. (2024) trouxeram interessantes contribuições acerca de como proteger o éster de LUT contra a fotodegradação causada por irradiação ultravioleta (UV). Neste estudo, os autores determinaram o conteúdo do éster de LUT em emulsões contendo óleos corporais de farelo de arroz (RBOBs) e óleos corporais de farelo de arroz carregados com éster de LUT (LRBOB) durante a fotodegradação, e concluíram que o encapsulamento mais forte do éster de LUT pelos RBOBs apresentou um efeito protetor maior contra a fotodegradação. Observou-se que à medida que a concentração de RBOBs aumentou, os valores da constante de degradação (k) das emulsões LRBOB diminuíram significativamente de 0.0170 para 0.0118 h⁻¹, sugerindo que os RBOBs contribuíram para o atraso da fotodegradação do éster de LUT, e o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) do éster de LUT carregado na emulsão LRBOB contendo 50% de RBOBs aumentou mais de quatro vezes ($t_{1/2} = 58.89$ h) em comparação ao $t_{1/2}$ do éster de LUT livre ($t_{1/2} = 13.81$ h).

Os resultados positivos obtidos neste estudo podem servir para auxiliar na melhor compreensão do possível efeito protetor que pode ser causado pelos complexos LUT-caseínas bovinas contra a fotodegradação da LUT. É esperado que as proteínas α_s -CN_s, β -CN, e κ -CN protejam a molécula de LUT contra a fotodegradação e, conseqüentemente, aumentem ou mantenham sua estabilidade química, assim como as emulsões RBOBs e LRBOB protegeram o éster de LUT contra a fotodegradação (CHEN et al., 2024).

A interação intermolecular entre LUT e demais proteínas do leite (MORAGUTIERREZ et al., 2018; RODRIGUEZ et al., 2023; VIDOTTO; TAVARES, 2022); a

aplicação da técnica de encapsulação (AHMADZADEH; UBEYITOGULLARI, 2024; WANG et al., 2023b; WU et al., 2024) e microencapsulação por spray-drying (ÁLVAREZ-HENAO et al., 2018); e a formação de emulsões (NUNES et al., 2023; WANG et al., 2023c; ZHANG et al., 2024c) são outras alternativas que também podem contribuir para o aumento da biodisponibilidade e estabilidade química da LUT em diferentes sistemas.

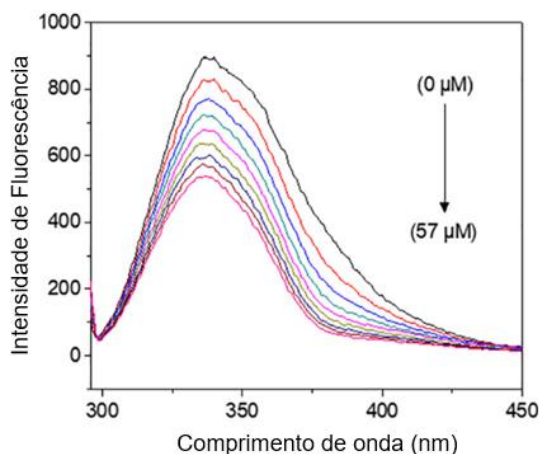
3.4 Técnica experimental para o estudo de interações intermoleculares

3.4.1 Espectroscopia de fluorescência

A espectroscopia de fluorescência (FS) é uma técnica analítica que estuda a formação de complexos entre pequenas moléculas e proteínas no estado fundamental, caracterizando o mecanismo, os parâmetros termodinâmicos das interações intermoleculares, e as alterações conformacionais das moléculas e proteínas decorrentes da formação de complexos (ABDELHAMEED et al., 2017; LELIS et al., 2017).

Por meio dos espectros de emissão de fluorescência de uma espécie química, representados na Figura 4, muitas informações importantes sobre a formação de complexos entre fluoróforo e ligante são obtidas (HE et al., 2016). Assim, esta técnica torna-se útil para estudar a formação de complexos entre ligante e proteínas que contenham fluoróforos. Os espectros de emissão de fluorescência são obtidos no espectrofluorímetro, equipamento onde são definidos o comprimento de onda de excitação, a faixa de comprimento de onda de emissão, e as larguras das fendas de excitação e emissão.

Figura 4 - Espectros de emissão de fluorescência da proteína albumina sérica bovina em concentrações crescentes de LUT em pH 7.4 (25 °C).



Fonte: Adaptado de PAIVA et al., 2020.

Devido à presença de resíduos dos aminoácidos fluoróforos fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr), e triptofano (Trp), proteínas possuem fluorescência intrínseca. Phe e Tyr são capazes de transferir, em uma mesma proteína, a energia absorvida no processo de excitação para o resíduo do Trp. No entanto, a emissão de fluorescência acontece predominantemente pelo Trp, uma vez que ele absorve energia eletromagnética com os comprimentos de onda mais longos, emitindo fluorescência entre 300 e 500 nm, quando excitado a 295 nm (LI et al., 2021).

Como a fluorescência do Trp é sensível, seu espectro de emissão pode ser facilmente alterado quando ocorrem mudanças conformacionais, associações de subunidades, desnaturação, e interação intermolecular com outras moléculas nas estruturas de proteínas (LAKOWICZ, 2006). A interação entre diferentes moléculas diretamente com o Trp ou em regiões próximas aos seus resíduos alteram, portanto, o espectro de fluorescência das proteínas que contenham este fluoróforo. Dado que as caseínas bovinas α_s -CNs, β -CN, e κ -CN possuem Trp em suas estruturas primárias, a FS pode ser utilizada para caracterizar a interação intermolecular entre caseínas bovinas e moléculas bioativas, como a LUT (XIAO et al., 2020), visto que a FS é muito sensível à variações que ocorrem no microambiente do Trp e na estrutura proteica.

O fundamento em estudar a formação de complexos entre LUT e caseínas bovinas baseia-se no fato de que, quando os fluoróforos das caseínas bovinas se complexam com a molécula de LUT, não vão mais para o estado excitado, se mantendo no estado fundamental. Isto reduz a quantidade de fótons que é emitida no retorno dos elétrons do estado excitado para o estado fundamental. Consequentemente, menor será a intensidade da fluorescência captada pelo espectrofluorímetro (YUE et al., 2022).

A extinção ou supressão da fluorescência intrínseca de uma proteína é um mecanismo de redução da intensidade (ou rendimento quântico) da fluorescência causado pela interação intermolecular entre o fluoróforo e o ligante. Em condições fixas de pH, força iônica, e temperatura, a extinção da fluorescência pode ser classificada como dinâmica (colisional) ou estática (LAKOWICZ, 2006).

Na extinção dinâmica, o fluoróforo, no estado excitado, colide com outras moléculas, transferindo a energia absorvida durante a excitação e retornando ao estado fundamental sem emitir fluorescência. Na extinção estática, o fluoróforo interage com a molécula supressora da fluorescência no estado fundamental, formando um complexo não fluorescente (PAIVA et al., 2020).

O mecanismo de extinção da fluorescência pode ser determinado a partir da equação de Stern-Volmer, representada pela Equação 1 (YU et al., 2021).

- Equação 1:

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

Nesta equação, F_0 é a intensidade da fluorescência da proteína na ausência do ligante; F é a intensidade da fluorescência da proteína na presença do ligante; K_{SV} é a constante de extinção dinâmica de Stern-Volmer (mol. L⁻¹); $[Q]$ é a concentração do ligante (mol. L⁻¹); K_q é a constante biomolecular de extinção da fluorescência (mol. L⁻¹ s⁻¹); e τ_0 é o tempo de meia vida da proteína na ausência do ligante (aproximadamente 10⁻⁸ s) (YU et al., 2021).

A temperatura influencia os valores da constante de extinção dinâmica de Stern-Volmer (K_{SV}) e da constante biomolecular de extinção da fluorescência (K_q) de formas diferentes. Enquanto, normalmente, na extinção dinâmica, K_{SV} aumenta com o aumento da temperatura, na extinção estática, K_{SV} diminui com o aumento da temperatura. Para diferenciação do mecanismo através de K_q , o valor máximo da constante biomolecular de extinção da fluorescência é igual a 2.0 x 10¹⁰ mol. L⁻¹ s⁻¹ para o mecanismo dinâmico, e valores superiores caracterizam o mecanismo como estático, indicando, portanto, a formação de complexos (LI et al., 2020).

Quando se tem a confirmação de que o mecanismo de extinção da fluorescência é estático, isto é um indício de que a formação de complexo entre fluoróforo (por

exemplo, os resíduos dos aminoácidos das proteínas α -CNs, β -CN, e κ -CN) e ligante (por exemplo, a molécula de LUT) esteja acontecendo. Neste caso, para o mecanismo de extinção estático, a constante de interação (K_b) e a estequiometria do complexo formado (n) são obtidas por meio de modelos matemáticos, como o modelo de regressão logarítmica dupla modificada, representado pela Equação 2 (PAIVA et al., 2020).

- Equação 2:

$$\log \frac{F_0 - F}{F} = n \log K_b - n \log \frac{1}{([Q_t] - (\frac{F_0 - F}{F})[P])} \quad (2)$$

Nesta equação, n é o valor da inclinação da curva $\log \frac{F_0 - F}{F}$ versus $\log \frac{1}{([Q_t] - (\frac{F_0 - F}{F})[P])}$; K_b é a constante de interação obtida a partir do intercepto da mesma curva (mol. L⁻¹); $[Q_t]$ é a concentração total do ligante (mol. L⁻¹); e $[P]$ é a concentração total da proteína (mol. L⁻¹) (HUDSON et al., 2018).

A partir da determinação de K_b , a variação da energia livre de Gibbs padrão (ΔG°) associada à formação do complexo é obtida pela Equação 3. Valores negativos para ΔG° indicam que a formação do complexo está favorecida em relação aos reagentes livres (LAKOWICZ, 2006).

- Equação 3:

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

A obtenção de K_b em diferentes temperaturas permite o cálculo dos demais parâmetros termodinâmicos de formação do complexo, como a variação da entalpia padrão (ΔH°) de formação do complexo, que é obtida pela aproximação de van't Hoff, representada pela Equação 4 (SANTA ROSA et al., 2021).

- Equação 4:

$$\Delta H^\circ = -R \frac{\partial \ln k_b}{\partial 1/T} \quad (4)$$

Nesta equação, R é a constante universal dos gases (8.3145 J/mol. K) e T é a temperatura, dada em Kelvin (K). É possível obter ΔH° a partir do gráfico de $\ln K_b$ versus $1/T$, no qual a inclinação da curva será dada por $-\Delta H^\circ/R$ para ajustes lineares.

Os dados experimentais de $\ln K_b$ versus $1/T$ podem ser ajustados na Equação 5 para obtenção dos parâmetros a , b , c , e d , que serão utilizados para determinar os valores de ΔH° na Equação 6 (SANTA ROSA et al., 2021). As Equações 5 e 6 também podem ser utilizadas para ajustes não lineares.

- Equação 5:

$$\ln K_b = a + b \left(\frac{1}{T} \right) + c \left(\frac{1}{T} \right)^2 + d \left(\frac{1}{T} \right)^3 + \dots \ln \Phi \quad (5)$$

Nesta equação, a , b , c , d , e $\ln \Phi$ são constantes determinadas graficamente para ajustes polinomiais.

- Equação 6:

$$\Delta H^\circ = -R \left[b + 2c \left(\frac{1}{T} \right) + 3d \left(\frac{1}{T} \right)^2 + \dots \right] \quad (6)$$

A contribuição entálpica e a contribuição entrópica da variação da energia livre de Gibbs padrão (ΔG°) fornecem informações acerca das forças motrizes de formação do complexo e são obtidas por meio da equação fundamental de Gibbs (Equação 7). A obtenção do termo entrópico ($T\Delta S^\circ$) é feita pela substituição dos valores da variação da energia livre de Gibbs padrão (ΔG°) e da variação da entalpia padrão (ΔH°) de formação de complexo obtidos nas equações anteriores.

- Equação 7:

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (7)$$

Valores negativos para ΔH° indicam que a formação do complexo é entalpicamente dirigida, e valores positivos de $T\Delta S^\circ$ indicam que a formação do complexo é entropicamente dirigida. Ambos, ΔH° e $T\Delta S^\circ$, podem ser descritos como o resultado de três processos moleculares distintos: dessolvatação dos ligantes,

mudança conformacional da proteína, e interação intermolecular entre proteína e ligante (LELIS et al., 2020; SANTA ROSA et al., 2021).

Se as caseínas bovinas α_s -CN_s, β -CN, e κ -CN interagirem com uma molécula bioativa que extingue a fluorescência intrínseca destas proteínas, como a LUT, por exemplo, um deslocamento no pico do espectro de emissão máxima da fluorescência será observado, e, se a extinção da fluorescência ocorre sem afetar o máximo espectral, a hidrofobicidade e a polaridade da região no qual situa-se o fluoróforo não são alteradas. Se houver um deslocamento no máximo espectral, é um indicativo de que a hidrofobicidade e a polaridade da região no qual situa-se o fluoróforo foram alteradas (LAKOWICZ, 2006).

No estudo conduzido por VIDOTTO; TAVARES (2022), os autores avaliaram a capacidade das proteínas do soro, β -lactoglobulina e α -lactalbumina, de se ligarem simultaneamente ao ácido fólico (FA) e à LUT utilizando FS. β -lactoglobulina e α -lactalbumina apresentaram comportamento semelhante, observando-se a capacidade de ligação múltipla de ambas ao FA e à LUT. A presença do FA diminuiu a constante de extinção dinâmica de Stern-Volmer (K_{SV}) do complexo LUT- β -lactoglobulina e LUT- α -lactalbumina, em particular para a ligação da LUT na presença de FA. Estes resultados podem contribuir para o desenvolvimento de alimentos funcionais ricos em proteínas.

YI et al. (2016) investigaram a interação do isolado de proteína de soro de leite (WPI) e caseinato de sódio (SC) com LUT utilizando FS para determinar os efeitos do WPI e SC na estabilidade química da LUT. De acordo com os resultados obtidos na FS, WPI e SC interagiram com a molécula de LUT através de interações hidrofóbicas. Com este estudo, os autores concluíram que as proteínas do soro de leite podem atuar como transportadores eficazes para nutraceuticos lipofílicos.

As interações entre caseína bovina e α_s -caseínas caprinas com LUT foram estudadas por MORA-GUTIERREZ et al. (2018) utilizando medidas de turbidez e FS. Os resultados obtidos por FS confirmaram a formação dos complexos caseína α_{s1} -I caprina-LUT, caseína α_{s1} -II caprina-LUT, e caseína bovina-LUT, com altas constantes de ligação (10^7 mol. L⁻¹). As caseínas isoladas do leite de cabra, em comparação com a caseína bovina, melhoraram a estabilidade química da LUT em emulsões enriquecidas com LUT em armazenamento sob condições aceleradas de foto-oxidação a 25°C de 48 horas a 96 horas, no qual os autores atribuíram este resultado à maior afinidade de ligação entre LUT e caseínas caprinas (α_{s1} -I caprina

= $5.7 \times 10^7 \text{ mol. L}^{-1}$; $\alpha_{S1}\text{-II}$ caprina = $5.0 \times 10^7 \text{ mol. L}^{-1}$; caseína bovina = $1.4 \times 10^7 \text{ mol. L}^{-1}$), em particular a $\alpha_{S1}\text{-I}$ caprina.

Infelizmente, este estudo não determinou os parâmetros energéticos envolvidos na formação do complexo caseína bovina-LUT, o que poderia ser útil para explicar as diferenças encontradas no efeito de estabilização. No entanto, uma comparação direta seria desafiadora, uma vez que os autores conduziram os experimentos com estruturas moleculares diferentes (α_s -caseínas caprinas isoladas e caseína bovina não fracionada) das estruturas moleculares das caseínas bovinas ($\alpha_s\text{-CN}_s$, $\beta\text{-CN}$, e $\kappa\text{-CN}$ individuais) que são objeto de estudo deste trabalho.

No estudo conduzido por PAIVA et al. (2020), os autores estudaram a influência do desdobramento da albumina sérica bovina (BSA) e de dois sais de Hofmeister, cloreto de sódio (NaCl), como cosmótopo, e tiocianato de sódio (NaSCN), como caotrópico, no complexo BSA-LUT utilizando FS. Observou-se que a formação do complexo foi conduzida entropicamente, e a molécula de LUT estava preferencialmente ligada ao sítio III da BSA. A constante de interação (K_b) (10^4 mol. L^{-1}), a estequiometria do complexo formado (n) (1:1), e o potencial termodinâmico para ligação BSA-LUT foram independentes da conformação da BSA e dos sais de Hofmeister. Todavia, o componente entálpico e o componente entrópico do complexo na presença de NaSCN diminuíram à medida que a temperatura aumentou, enquanto aumentaram à medida que a temperatura aumentou na presença de NaCl e para o complexo BSA desnaturada-LUT. Como conclusão, tem-se que a conformação da BSA e a estrutura tridimensional da água afetaram a termodinâmica de formação do complexo formado entre BSA e LUT.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-AAL, E. S. M. et al. Dietary sources of lutein and zeaxanthin carotenoids and their role in eye health. **Nutrients**, 9 abr. 2013.
- ABDELHAMEED, A. S. et al. Fluorescence spectroscopic and molecular docking studies of the binding interaction between the new anaplastic lymphoma kinase inhibitor crizotinib and bovine serum albumin. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 171, p. 174–182, 15 jan. 2017.
- AHMADZADEH, S.; UBEYITOGULLARI, A. Lutein encapsulation into dual-layered starch/zein gels using 3D food printing: Improved storage stability and in vitro bioaccessibility. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 266, 1 maio 2024.
- ÁLVAREZ-HENAO, M. V. et al. Microencapsulation of lutein by spray-drying: Characterization and stability analyses to promote its use as a functional ingredient. **Food Chemistry**, v. 256, p. 181–187, 1 ago. 2018.
- ANSELMO, S. et al. α -casein micelles-membranes interaction: Flower-like lipid protein coaggregates formation. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1866, n. 10, 1 out. 2022.
- ANUSHA SIDDIQUI, S. et al. Physicochemical and nutritional properties of different non-bovine milk and dairy products: A review. **International Dairy Journal**, 1 jan. 2024.
- BHATT, T.; PATEL, K. Carotenoids: Potent to Prevent Diseases Review. **Natural Products and Bioprospecting**, 1 jun. 2020.
- BOGAHAWATHTHA, D. et al. In vitro immunogenicity of various native and thermally processed bovine milk proteins and their mixtures. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 10, p. 8726–8736, 1 out. 2018.
- CAO, R. et al. Milk casein hydrolysate peptides regulate starch digestion through inhibition of α -glucosidase: An insight into the active oligopeptide screening, enzyme inhibition behaviors, and oligopeptide-enzyme binding interactions. **Food Hydrocolloids**, v. 152, 1 jul. 2024.
- CAMPOS, A. et al. **Perfil antioxidante da luteína e análise de visualização**. Explorando a vida: uma jornada pelas ciências biológicas. Capítulo 11. São Paulo, SP: Atena Editora, 2024.
- CASANOVA, F. et al. Interactions between caseins and food-derived bioactive molecules: A review. **Food Chemistry**, 15 out. 2021.
- CHEN, W. et al. Physicochemical properties, photostability, and digestive characteristics of natural emulsion system fabricated by recombinant rice bran oil bodies for lutein ester delivery. **Food Hydrocolloids**, v. 156, 5 jun. 2024.
- CHUNG, R. W. S. et al. Lutein exerts anti-inflammatory effects in patients with coronary artery disease. **Atherosclerosis**, v. 262, p. 87–93, 1 jul. 2017.

CUI, H. et al. Complexes of glycated casein and carboxymethyl cellulose enhance stability and control release of anthocyanins. **Food Research International**, v. 176, 1 jan. 2024.

DALGLEISH, D. G.; CORREDIG, M. The structure of the casein micelle of milk and its changes during processing. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 3, n. 1, p. 449–467, abr. 2012.

DANILOSKI, D. et al. Casein micelle with different β -casein phenotypes: Fingerprinting pH-induced structural changes using FTIR and NMR spectroscopies. **Food Hydrocolloids**, v. 143, 1 out. 2023.

DANILOSKI, D. et al. Impact of β -casein phenotype on the physical properties of skim milk powders and their subsequent digestion characteristics. **Food Hydrocolloids**, v. 152, 1 jul. 2024.

DARWISH, A. M. et al. Genetic variations of α -casein and K-casein genes associated with milk composition in goats. **Small Ruminant Research**, v. 229, 1 dez. 2023.

DE BARROS, R. F. et al. Lutein as a functional ingredient in sheep milk yogurt: Development, characterization and extraction recovery. **Food Science and Technology**, v. 40, p. 683–690, 27 jan. 2020.

DE PAULA, J. C. J. et al. Luteína: corante bioativo promissor para a indústria láctea. Indústria de Laticínios, **Milkpoint**, 29 abr. 2022. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/artigos/industria-de-laticinios/luteina-corante-bioativo-promissor-para-a-industria-lactea-229791/>. Acesso em: 14 abr. 2024.

DEY, T. K. et al. Enzymatic synthesis of lipophilic lutein–PUFA esters and assessment of their stabilization potential in EPA–DHA rich fish oil matrix. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, n. 5, p. 2345–2354, 1 maio 2019.

DONOZEN. Harmonia e Equilíbrio com a Natureza. Calêndula: características, significado e como cultivar essa flor, 2023. Disponível em: <https://donozen.com.br/calendula-caracteristicas-significado-e-como-cultivar-essa-flor/>. Acesso em: 21 jun. 2024.

DO VALE, R. T. R. et al. A versatilidade da caseína. Colunas, **MilkPoint**, 7 fev. 2022. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/colunas/thermaufv/a-versatilidade-da-caseina-228894/>. Acesso em: 4 out. 2024.

FAN, H. et al. Fabrication of casein-crocin nanocomplexes: Interaction mechanism, impact on stability and bioavailability of crocin. **Food Hydrocolloids**, v. 136, 1 mar. 2023.

FARRELL, H. M. et al. Nomenclature of the proteins of cows' milk - Sixth revision. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 6, p. 1641–1674, 2004.

FEITOSA, B. F. et al. Beverage composed of fruits and soy: Microbiology, colorimetry and effects of refrigerated storage on physical-chemical parameters. **Food Bioscience**, v. 49, 17 jun. 2022.

FUSARO, I. et al. Fatty acids, health indices and sensory properties of Ricotta cheese from sheep fed three different diets. **International Journal of Dairy Technology**, v. 72, n. 3, p. 427–434, 2019.

GHAYOUR, N. et al. Nanoencapsulation of quercetin and curcumin in casein-based delivery systems. **Food Hydrocolloids**, v. 87, p. 394–403, 1 fev. 2019.

GIUFFRIDA, D. et al. Pigments profile in monovarietal virgin olive oils from various Italian olive varieties. **Food Chemistry**, v. 124, n. 3, p. 1119–1123, fev. 2011.

HE, J. et al. Interaction of inosine with human serum albumin as determined by NMR relaxation data and fluorescence methodology. **Journal of Molecular Liquids**, v. 219, p. 547–553, 1 jul. 2016.

HEWA NADUGALA, B. et al. The effect of casein genetic variants, glycosylation and phosphorylation on bovine milk protein structure, technological properties, nutrition and product manufacture. **International Dairy Journal**, 1 out. 2022.

HEWA NADUGALA, B. et al. The role of glycosylation in amyloid fibril formation of bovine κ -casein. **Current Research in Food Science**, v. 6, 1 jan. 2023.

HEWA NADUGALA, B. et al. Effect of composition, casein genetic variants and glycosylation degree on bovine milk whipping properties. **Food Research International**, v. 179, 1 mar. 2024.

HOLT, C. et al. Invited review: Caseins and the casein micelle: Their biological functions, structures, and behavior in foods 1. **Journal of Dairy Science**, out. 2013.

HOZAWA, A. et al. Circulating carotenoid concentrations and incident hypertension: The Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) study. **Journal of Hypertension**, v. 27, n. 2, p. 237–242, 2009.

HUDSON, E. et al. Thermodynamic and kinetic analyses of curcumin and bovine serum albumin binding. **Food Chemistry**, v. 242, p. 505–512, 18 set. 2018.

HUPPERTZ, T.; FOX, P. F.; KELLY, A. L. The caseins: Structure, stability, and functionality. **Proteins in Food Processing**, Second Edition, p. 49–92, 2017.

JIMÉNEZ-MORENO, N. et al. Valorization of selected fruit and vegetable wastes as bioactive compounds: Opportunities and challenges. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 50, n. 20, p. 2061–2108, 29 nov. 2019.

JV, D.-j et al. The remarkable enhancement of photo-stability and antioxidant protection of lutein coupled with carbon-dot. **Food Chemistry**, v. 405, 6 out. 2023.

KALYANKAR, S. D. et al. Milk: Sources and Composition. **Encyclopedia of Food and Health**, p. 741–747, 2015.

KAMOSHITA, M. et al. Lutein acts via multiple antioxidant pathways in the photo-stressed retina. **Scientific Reports**, v. 6, 22 jul. 2016.

KAYIHURA, J. F. Partitioning of individual caseins between rennet curd and whey: Impact of pre-acidification and pre-salting of reconstituted skim milk. **Food and Humanity**, v. 1, p. 905–911, dez. 2023.

KELLY, A. L.; HUPPERTZ, T.; SHEEHAN, J. J. Pre-treatment of cheese milk: Principles and developments. **Dairy Science and Technology**, jul. 2008.

KIJLSTRA, A. et al. Lutein: More than just a filter for blue light. **Progress in Retinal and Eye Research**, jul. 2012.

KUANG, P. et al. Physicochemical Properties and Storage Stability of Lutein Microcapsules Prepared with Maltodextrins and Sucrose by Spray Drying. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 2, p. 359–369, 24 nov. 2015.

LAKOWICZ, J. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 3rd. ed. Boston, MA: Springer, 2006.

LEI, C. et al. Mechanism analysis of promoting calcium absorption and bone formation of peptides from different casein fractions. **Food Bioscience**, v. 58, 1 abr. 2024.

LELIS, C. A. et al. Determination of driving forces for bovine serum albumin-Ponceau4R binding using surface plasmon resonance and fluorescence spectroscopy: A comparative study. **Food Hydrocolloids**, v. 70, p. 29–35, 1 set. 2017.

LELIS, C. A. et al. Insights into protein-curcumin interactions: Kinetics and thermodynamics of curcumin and lactoferrin binding. **Food Hydrocolloids**, v. 105, 1 ago. 2020.

LI, C. P. et al. A novel electrochemical assay for chymosin determination using a label-free peptide as a substrate. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 3, p. 2511–2519, 1 mar. 2021.

LI, M. et al. Maillard induced glycation of β -casein for enhanced stability of the self-assembly micelles against acidic and calcium environment. **Food Chemistry**, v. 387, 1 set. 2022.

LI, X. et al. Comparative studies on the interaction of nine flavonoids with trypsin. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 238, 5 set. 2020.

LI, X. et al. Effects of homogeneous and ultrasonic treatment on casein/phosphatidylcholine complex-emulsions: Stability and bioactivity insights. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 97, 1 jul. 2023.

LIU, T. et al. Anti-inflammatory effects of dietary β -Casein peptides and its peptide QEPVL in a DSS-induced inflammatory bowel disease mouse model. **Food Bioscience**, v. 56, 1 dez. 2023.

LUCEY, J. A. Formation and physical properties of milk protein gels. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 2, p. 281–294, 2002.

LUCEY, J. A.; HORNE, D. S. Perspectives on casein interactions. **International Dairy Journal**, 1 out. 2018.

LUO, G. et al. Fractionation of κ -casein from caprine micellar caseins using differential precipitation. **International Dairy Journal**, v. 143, 1 ago. 2023.

MØLLER, T. L.; NIELSEN, S. B.; CORREDIG, M. Novel details on the dissociation of casein micelle suspensions as a function of pH and temperature. **Journal of Dairy Science**, v. 106, n. 12, p. 8368–8374, 1 dez. 2023.

MALEŠ, I. et al. The medicinal and aromatic plants as ingredients in functional beverage production. **Journal of Functional Foods**, 1 set. 2022.

MALKOSKI, M. et al. Kappacin, a novel antibacterial peptide from bovine milk. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 8, p. 2309–2315, 2001.

MAOKA, T. Carotenoids as natural functional pigments. **Journal of Natural Medicines**, 1 jan. 2020.

MARKOSKA, T. et al. Structural changes of β -casein induced by temperature and pH analysed by nuclear magnetic resonance, fourier-transform infrared spectroscopy, and chemometrics. **Molecules**, v. 26, n. 24, 1 dez. 2021.

MORA-GUTIERREZ, A. et al. Complexes of lutein with bovine and caprine caseins and their impact on lutein chemical stability in emulsion systems: Effect of arabinogalactan. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 1, p. 18–27, 1 jan. 2018.

MORAIS, A. et al. Impact of physicochemical modifications in casein promoted by UV-C on the peptide profile of gastric digestion and the transepithelial transport of peptides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 71, n. 19, p. 7495-7507, 8 maio. 2023.

NUNES, L. et al. Compartmentalization of lutein in simple and double emulsions containing protein nanoparticles: Effects on stability and bioaccessibility. **Food Research International**, v. 173, 1 nov. 2023.

OH, J. et al. Radical scavenging activity-based and AP-1-targeted anti-inflammatory effects of lutein in macrophage-like and skin keratinocytic cells. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, 2013.

OSMAN, A. et al. Post-weaning A1/A2 β -casein milk intake modulates depressive-like behavior, brain μ -opioid receptors, and the metabolome of rats. **iScience**, v. 24, n. 9, 24 set. 2021.

PACHECO, A. F. C. et al. β -Casein monomers as potential flavonoids nanocarriers: Thermodynamics and kinetics of β -casein-naringin binding by fluorescence spectroscopy and surface plasmon resonance. **International Dairy Journal**, v. 108, 1 set. 2020.

PAIVA, P. H. C. et al. Influence of protein conformation and selected Hofmeister salts on bovine serum albumin/lutein complex formation. **Food Chemistry**, v. 305, 1 fev. 2020.

PENG, M. et al. Effectiveness of probiotics, prebiotics, and prebiotic-like components in common functional foods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 4, p. 1908–1933, 30 mar. 2020.

PETIT, N. et al. Insight into the self-assembly and gel formation of a bioactive peptide derived from bovine casein. **BBA Advances**, v. 3, 1 jan. 2023.

QIN, J. et al. Highly stable emulsion gels with micellar casein based on the jamming transition, for bioactive molecule delivery. **Food Hydrocolloids**, v. 143, 1 out. 2023.

QV, X. Y.; ZENG, Z. P.; JIANG, J. G. Preparation of lutein microencapsulation by complex coacervation method and its physicochemical properties and stability. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 6, p. 1596–1603, 14 jan. 2011.

REHAN, F.; AHMED, N.; GUPTA, M. Casein nanomicelle as an emerging biomaterial - A comprehensive review. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 1 jul. 2019.

RENES, E. et al. Effect of feeding regimen on the fatty acid profile of sheep bulk tank milk. **International Journal of Dairy Technology**, v. 71, n. 4, p. 857–867, 2018.

REZENDE, J. DE P. et al. Temperature modulation of lutein-lysozyme hydrophobic-hydrophilic interaction balance. **Journal of Molecular Liquids**, v. 316, 10 out. 2020.

RODRIGUEZ, M. D. A. et al. Does the protein structure of β -lactoglobulin impact its complex coacervation with type A gelatin and the ability of the complexes to entrap lutein? **Food Hydrocolloids**, v. 140, 1 jul. 2023.

ROY, D. et al. Structural changes in milk from different species during gastric digestion in piglets. **Journal of Dairy Science**, v. 105, n. 5, p. 3810–3831, 1 maio 2022.

RUIZ RODRÍGUEZ, L. G. et al. Fruits and fruit by-products as sources of bioactive compounds. Benefits and trends of lactic acid fermentation in the development of novel fruit-based functional beverages. **Food Research International**, v. 140, 25 out. 2021.

SANTA ROSA, L. N. et al. β -lactoglobulin conformation influences its interaction with caffeine. **Food Bioscience**, v. 44, 1 dez. 2021.

SATO, R.; NOGUCHI, T.; NAITO, H. Casein Phosphopeptide (CPP) Enhances Calcium Absorption from the Ligated Segment of Rat Small Intestine. **Nutr. Sci. Vitaminol**, 1986.

SATS, A.; KAART, T.; JÖUDU, I. Bovine colostrum casein: post-partum dynamics of micelle size, content, and associated traits. **International Dairy Journal**, v. 148, 1 jan. 2024.

SHI, H. et al. Beyond food colouring: Lutein-food fortification to enhance health. **Food Bioscience**, v. 59, 10 abr. 2024.

SHU, X. et al. Nanostructured lipid carriers (NLCs) stabilized by natural or synthetic emulsifiers for lutein delivery: Improved physicochemical stability, antioxidant activity, and bioaccessibility. **Food Chemistry**, v. 403, 27 set. 2023.

SILVA, N. N. et al. Casein micelles: From the monomers to the supramolecular structure. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 22, 2019.

SILVA, S. V.; MALCATA, F. X. Caseins as source of bioactive peptides. **International Dairy Journal**, jan. 2005.

SOBRAL, D. et al. Can lutein replace annatto in the manufacture of Prato cheese? **LWT**, v. 68, p. 349–355, 1 maio 2016.

SUN, X.; GERRARD, J. A.; ANEMA, S. G. The effect of succinylation on the properties of α s1-casein enriched protein. **International Dairy Journal**, v. 154, 1 jul. 2024.

SUN, Y. et al. Recent advances in the bovine β -casein gene mutants on functional characteristics and nutritional health of dairy products: Status, challenges, and prospects. **Food Chemistry**, 15 jun. 2024.

SWAISGOOD, H. E. Chemistry of the Caseins. **Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins**. Springer, Boston, MA, 2003.

TAN, T. B. et al. Forming a lutein nanodispersion via solvent displacement method: The effects of processing parameters and emulsifiers with different stabilizing mechanisms. **Food Chemistry**, v. 194, p. 416–423, 1 mar. 2016.

TAN, X. et al. Enzymatic acylation improves the stability and bioactivity of lutein: Protective effects of acylated lutein derivatives on L-O2 cells upon H2O2-induced oxidative stress. **Food Chemistry**, v. 410, 1 jun. 2023.

TIDONA, F. et al. Protein composition and micelle size of donkey milk with different protein patterns: Effects on digestibility. **International Dairy Journal**, v. 35, n. 1, p. 57–62, mar. 2014.

TODARO, A. et al. Use of concentrated fruit juice extracts to improve the antioxidant properties in a soft drink formulation. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, v. 31, 7 dez. 2023.

VIDOTTO, D. C.; TAVARES, G. M. Simultaneous binding of folic acid and lutein to β -lactoglobulin and α -lactalbumin: A spectroscopic and molecular docking study. **Food Bioscience**, v. 50, 1 dez. 2022.

WANG, K. et al. Decalcification strongly affects in vitro gastrointestinal digestion of bovine casein micelles under infant, adult and elderly conditions. **Food Hydrocolloids**, v. 139, 1 maio 2023a.

WANG, L. et al. Casein nanoparticles as oral delivery carriers for improved bioavailability and hypoglycemic activity of apigenin. **Food Hydrocolloids**, v. 146, 1 jan. 2024a.

WANG, R. et al. Enhanced encapsulation of lutein using soy protein isolate nanoparticles prepared by pulsed electric field and pH shifting treatment. **Food Chemistry**, v. 424, 30 out. 2023b.

WANG, T. et al. Influence of calcium concentration on the re-assembly of sodium caseinate into casein micelles and on their renneting behavior. **Food Research International**, v. 180, 1 mar. 2024b.

WANG, Y. et al. Preparation of lutein nanoemulsion by ultrasonic homogenization method: Stability and in vitro anti-inflammatory activity. **Algal Research**, v. 73, 1 jun. 2023c.

WANG, Y.; JIANG, Y.; SHI, J. Novel Pickering emulsion stabilized by glycated casein embedding curcumin: Stability, bioaccessibility and antioxidant properties. **LWT**, v. 194, 15 fev. 2024.

WU, S. et al. Milk-derived exosome as delivery system for lutein encapsulation in alleviating dry eye disease. **Chemical Engineering Journal**, v. 486, 15 abr. 2024.

XIAO, Q. et al. Investigations of conformational structures and activities of trypsin and pepsin affected by food colourant allura red. **Journal of Molecular Liquids**, v. 319, 1 dez. 2020.

XU, S. et al. Influences and potential mechanisms of zein-fucoidan nanoparticles loaded with and without curcumin on casein before and after thermal treatment. **Food Hydrocolloids**, v. 145, 1 dez. 2023.

YANG, Y. et al. Casein-based hydrogels: Advances and prospects. **Food Chemistry**, p. 138956, jul. 2024.

YI, J. et al. Characterization of milk proteins-lutein complexes and the impact on lutein chemical stability. **Food Chemistry**, v. 200, p. 91–97, 1 jun. 2016.

YU, J. et al. Interaction behavior between five flavonoids and pepsin: Spectroscopic analysis and molecular docking. **Journal of Molecular Structure**, v. 1223, 5 jan. 2021.

YUE, Y. et al. Comparison of the interactions of fanetizole with pepsin and trypsin: Spectroscopic and molecular docking approach. **Journal of Molecular Liquids**, 1 nov. 2022.

YUN, G. et al. Modelling the reaction kinetics of β -lactoglobulin and κ -casein heat-induced interactions in skim milk. **Journal of Food Engineering**, v. 344, 1 maio 2023.

ZHANG, J. et al. The effects of pH, temperature, and buffer concentration on the self-assembling behavior, secondary structure, and surface hydrophobicity of donkey and bovine β -casein. **Food Chemistry**, v. 433, 1 fev. 2024a.

ZHANG, X. et al. Antigenicity of α -casein reduced by hydrolysis function using *Clavispora lusitaniae* DPU-MWFCI-D2 isolated from infant feces combining with alkaline protease. **Food Bioscience**, v. 58, 1 abr. 2024b.

ZHANG, Y. et al. Rheological properties and microstructure of rennet-induced casein micelle/ κ -carrageenan composite gels. **LWT**, v. 178, 15 mar. 2023.

ZHANG, Y. et al. Developing biopolymer-stabilized emulsions for improved stability and bioaccessibility of lutein. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 259, 1 fev. 2024c.

CAPÍTULO 2

ARTICLE

Exploring Lutein and Casein Interactions: Molecular Basis for Stability and Functionality in Complex Systems

This article was submitted to the journal *Food Bioscience*.

ABSTRACT

The interactions between bovine caseins (α_s -CN_s, β -CN, and κ -CN) and lutein (LUT), along with the antioxidant activity of LUT with and without caseins, and the impact of caseins on LUT's photodegradation were investigated. Fluorescence spectroscopy revealed that LUT-bovine caseins complexes exhibited a 1:1 stoichiometry, with binding constants (K_b) on the order of 10^4 mol. L⁻¹. When the temperature varied from 293.15 to 313.15 K, the binding of α_s -CN_s-LUT and κ -CN-LUT transitioned from endothermic to exothermic (ΔH° changed from 0.24 kJ. mol⁻¹ to -6.17 kJ. mol⁻¹ and from 5.95 kJ. mol⁻¹ to -11.20 kJ. mol⁻¹, respectively), while the β -CN-LUT complex consistently exhibited exothermic binding (ΔH° decreased from -6.03 kJ. mol⁻¹ to -12.87 kJ. mol⁻¹). The presence of bovine caseins either maintained or enhanced the antioxidant activity of LUT (IC₅₀ values: 73.65 μ g/mL for α_s -CN_s-LUT; 101.21 μ g/mL for β -CN-LUT; and 88.04 μ g/mL for κ -CN-LUT). Moreover, bovine caseins increased LUT's photostability, reducing LUT's degradation constant (K_d) from 0.0106 h⁻¹ to 0.0091 h⁻¹ for α_s -CN_s-LUT; from 0.0094 h⁻¹ to 0.0083 h⁻¹ for β -CN-LUT; and from 0.0119 h⁻¹ to 0.0108 h⁻¹ for κ -CN-LUT. Correspondingly, LUT's half-life time ($t_{1/2}$) extended from 65 h to 76 h

for α_s -CN_s-LUT; from 73 h to 83 h for β -CN-LUT; and from 58 h to 64 h for κ -CN-LUT. This study provides valuable insights into the stabilizing effects of bovine caseins on LUT's antioxidant activity and photodegradation, offering critical information for developing strategies to enhance the application and efficacy of the LUT-bovine caseins complexes in food products and other complex systems.

Keywords: Milk Proteins; Carotenoids; Molecular complexation; Fluorescence spectroscopy; Antioxidant activity; Photodegradation.

1. INTRODUCTION

In food production, colorants play an important role in influencing consumer preferences and ensuring product success. Stability and shelf-life studies are fundamental for helping developers select colorants that maintain vibrancy throughout the product's lifecycle, evaluating their performance under varied conditions to ensure consistent coloration and mitigate production risks (Salazar-González et al., 2023). As the industry increasingly embraces natural and sustainable practices, there is a significant shift toward natural colorants and bioactive compounds. Consumers are favoring products free from artificial ingredients due to their perceived safety and health benefits. These natural additives not only enhance product appearance, but also contribute nutritional benefits, such as antioxidants, that support overall health (Nabi et al., 2023). The growing demand for natural products is driving research into innovative additives, expanding options and meeting evolving consumer expectations.

The term “bioactive” refers to compounds in foods or supplements that exert specific physiological effects beyond basic nutrition, potentially promoting health or reducing disease risk (Culas et al., 2024). One example is lutein (LUT), a xanthophyll carotenoid widely found in fruits, vegetables and flowers (Cui et al., 2023). LUT acts

as a shield against blue light for the eyes, reducing oxidative stress and potentially preventing eye diseases (Manupa et al., 2023). Beyond its ocular benefits, LUT is a potent antioxidant that neutralizes harmful molecules throughout the body (Shu et al., 2023). In addition to these health benefits, the use of this bioactive molecule as a food colorant has been increasing, particularly in dairy products (Shi et al., 2024).

Despite its significant functional potential, LUT's efficacy is challenged by its instability, as it is highly susceptible to environmental factors, such as light, oxygen, heat, and pH variations (Jv et al., 2023). This degradation can compromise food quality, color, and flavor, limiting its broader application in food processing. Considering the impact of interactions with other compounds, solvents, and environmental conditions on the shelf life of natural colorants, protein-LUT complexation has emerged as a promising strategy to enhance the stability of LUT molecule and extend its use in food products.

Sobral et al. (2016) observed that LUT added to milk during prato cheese production maintained its antioxidant activity over a 60-day ripening period. The authors concluded that the cheese matrix, composed of proteins and lipids, effectively protected LUT molecule during ripening, as no loss of LUT or its antioxidant capacity was detected. Given that the protein fraction in cheese is predominantly composed of caseins, it is inferred that this class of milk proteins played a key role in preserving LUT's stability in prato cheese.

Mora-Gutierrez et al. (2018) investigated the interactions between whole bovine casein, α_s -caseins (α_s -CN_s) from goat milk, and LUT using turbidity and fluorescence spectroscopy (FS). The study confirmed the formation of complexes between the caseins and LUT with high binding constants (10^7 mol. L⁻¹), indicating a strong interaction. In a low-fat dairy-like beverage produced by the authors, α_{s1} -CN_s

derived from goat milk, particularly α_{s1-I} , demonstrated a higher potential to enhance LUT's chemical stability in enriched emulsions under accelerated photo-oxidation at 25 °C for 48 to 96 hours, compared to bovine casein. However, the study did not delve into the molecular basis for these complex formations, which could have provided insights into the stabilization mechanisms. Moreover, the comparison between isolated α_{s1-CN_s} from goats and whole bovine casein may have introduced variability in the results, due to the different molecular structures studied.

Mantovani et al. (2020) explored LUT binding to sodium caseinate and native casein micelles to assess the influence of casein supramolecular structures on the interaction. FS identified a predominantly static mechanism of fluorescence quenching, with binding constants of 10^5 mol. L^{-1} , regardless of the casein supramolecular structure. However, the study did not advance to understand the thermodynamics and energetics of the interactions between casein structures and LUT. Additionally, since both molecular structures studied consist of aggregates of caseins, minerals, and water, the determined parameters should be considered as averages of the interactions between LUT and each individual casein protein. This limitation hampers a detailed understanding of the mechanisms involved in complexation and the resulting stability of LUT.

Given these findings, it is evident that significant gaps still remain in our understanding of how caseins, particularly bovine caseins, which are widely used globally, influence the antioxidant activity and chemical stability of LUT. Key questions that need to be addressed include: Does LUT bind to all major bovine caseins (α_{s1-} , α_{s2-} , $\beta-$, and κ -caseins)? What molecular forces are involved in the formation of LUT-bovine caseins complexes? How does each individual casein affect the antioxidant activity of LUT? Can each of these complexes stabilize LUT against photooxidation?

Answering these questions is essential to advance the understanding of the stabilization mechanisms of LUT in food products, and to develop strategies to enhance the application and efficacy of LUT in dairy products and other LUT-bovine caseins complex-based systems. Therefore, this research aims to elucidate the thermodynamics of LUT-bovine caseins intermolecular interactions at pH 6.0, and assess how bovine caseins impact LUT's antioxidant activity and photostability.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Materials

The proteins α_s -caseins (α_s -CN_s; ≥ 70 wt.%), beta-casein (β -CN; ≥ 98 wt.%) and kappa-casein (κ -CN; ≥ 70 wt.%) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, United States). Sodium citrate ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) (99 wt.%), citric acid ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) (>99.8 wt.%), and dimethyl sulfoxide (DMSO) were purchased from Exodo Científica (Sumaré, SP, Brazil) and Alphatec (Brazil). Polyethylene Oxide (PEO) (1500 g. mol^{-1}), methanol (CH_3OH) (≥ 99.8 wt.%), and lithium sulfate monohydrate ($Li_2SO_4 \cdot H_2O$) (>99 wt.%) were purchased from Synth (Diadema, SP, Brazil). Lutein (5 wt.%) was kindly provided by DSM Nutritional Products Brazil (São Paulo, SP, Brazil). DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (>97 wt.%) was purchased from Tokyo Chemical Industry (Portland, OR, United States).

2.2 Extraction of LUT using an Aqueous Biphasic System

LUT (5 wt.%) underwent purification through an Aqueous Two-Phase System (ATPS) consisting of PEO and $Li_2SO_4 \cdot H_2O$, based on the method outlined by Paiva et al. (2020) with a few adjustments. PEO solution (60 wt.%, superior phase) and

$\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ solution (24 wt.%, inferior phase) with deionized water as solvent were used to prepare the ATPS. The ATPS was kept at 298.15 K for 24 hours to reach equilibrium, and the phases were separated. In the absence of light, LUT (100 mg) was added to a PEO solution and transferred to an ultrasonic bath (Branson, Connecticut, USA) for 40 minutes to achieve a uniform dispersion of LUT in the ATPS. Once the LUT solid particles were dispersed in the PEO solution, 40 g of ATPS (comprising 20 g of the upper phase and 20 g of the lower phase) were added to falcon tubes. The falcon tubes were then placed in an MA-184 ultra-thermostatic bath (Marconi) at 298.15 K for 24 hours. After the ATPS reached thermodynamic equilibrium, the upper and lower phases were separated in the dark, and the LUT-concentrated orange interfaces were collected and transferred to eppendorf tubes. To ensure complete phase separation and removal, the eppendorf tubes containing LUT interfaces were centrifuged (Heraeus Fresco 21 Microcentrifuge, Thermo Fisher Scientific) at $2400 \times g$ for 10 minutes. In the absence of light, the remaining upper and lower phases were separated. The LUT-concentrated orange interfaces were then washed with deionized water and filtered using JP40 cellulose quantitative filters (Quanti, PR, Brazil), which retained particles from 1 to 2 μm in size. This procedure was repeated at least 10 times for each filter to remove all PEO and Li_2SO_4 residues. The filters containing the solid LUT were collected and stored at freezing temperature in the dark, and the samples were lyophilized using an SL-404 lyophilizer (SOLAB Laboratory Equipment, Brazil). Finally, in the absence of light, the lyophilized LUT was scraped from the filters using a spatula and stored at freezing temperature for further use.

The UV–vis and infrared spectra of the extracted LUT were recorded and subsequently compared with those of pure LUT, previously obtained and defined in the

study conducted by Silva et al. (2017) (Figure S1, Supplementary Data). The extracted LUT presented 96% (w/w) of purity.

2.3 Fluorescence spectroscopy experiments

The fluorescence measurements were carried out on an LS55 fluorescence spectrophotometer (PerkinElmer, Waltham, MA, United States) equipped with a thermostatic compartment and a quartz spectroscopy cell (PerkinElmer Instruments) with a path length of 10 mm. To prepare the stock solutions of protein (α_s -CN_s, β -CN, or κ -CN; 1.0×10^{-5} mol. L⁻¹) and LUT (5.0×10^{-4} mol. L⁻¹), the reagents were solubilized in a mixture of sodium citrate and citric acid buffer (pH 6.0) and dimethyl sulfoxide (DMSO) at a ratio of 25:1. The interaction between bovine casein and LUT was probed via fluorescence quenching titration, where 2.0 mL of the casein solution (in the cuvette) were titrated with 30 μ L aliquots of LUT solution, achieving LUT concentrations between 0 and 7.08×10^{-5} mol. L⁻¹. Previously, the absorption spectra of both the caseins and LUT were analyzed (data not shown), and it was observed that LUT does not significantly absorb at the wavelengths corresponding to the casein's emission spectrum. Additionally, there is no overlap between the absorption wavelengths of the caseins and the emission wavelengths of LUT (which are notably low). Consequently, energy transfer between these molecules is unlikely.

The excitation wavelength was set to 295 nm, with both the excitation and emission slit widths adjusted to 3.5 nm for α_s -CN_s and 4.5 nm for β -CN or κ -CN. Emission spectra were recorded over the wavelength range of 296 to 550 nm, at a speed of 700 nm/min, and a gain of 750 V. Fluorescence spectra were obtained at five temperatures: 293.15 K, 298.15 K, 303.15 K, 308.15 K, and 313.15 K (Santa Rosa et

al., 2021). All experimental runs were performed in duplicate, and the results are reported as the mean $\pm$ standard deviation.

2.4 Assessment of LUT's antioxidant activity with and without caseins

The antioxidant capacity of LUT, both in the absence and presence of bovine caseins (α_s -CN_s, β -CN, or κ -CN), was evaluated using the DPPH assay, as described by Azahar et al. (2023). Initially, reaction mixtures were prepared in 5 mL brown glass tubes containing varying volumes of a methanolic LUT solution (20, 40, 60, 80, and 100 μ L), 1.8 mL of DPPH solution (0.1192 mmol. L⁻¹ in methanol), and methanol, to reach a total volume of 2 mL per tube. The tubes were kept in darkness for 30 minutes to allow the reaction to occur, after which absorbance readings were taken at 517 nm (Boroski et al., 2015).

In the second part of the experiment, the same procedure was followed but in the presence of bovine caseins. Stock solutions of α_s -CN_s, β -CN, and κ -CN (1.0×10^{-5} mol. L⁻¹) were prepared, and 0.2 mL of these solutions was added to tubes containing LUT and DPPH solutions, as previously described. After 30 minutes of incubation in darkness, absorbance was measured at 517 nm.

The half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of LUT, in the absence or presence of bovine caseins, was determined by calculating the inhibition of DPPH (Equation 1). IC₅₀ was obtained through linear regression of DPPH inhibition (%) versus extract concentration (μ g/mL), and Y was set to 50 in the line equation to find the IC₅₀ value, which represents the concentration of the extract that inhibits 50% of the DPPH radical. All experiments were carried out in duplicate, and the results are presented as the mean $\pm$ standard deviation.

$$DPPH\ Inhibition\ (\%) = \frac{(Abs_{DPPH} - Abs_{sample})}{Abs_{DPPH}} \times 100 \quad (1)$$

Here, Abs_{DPPH} is the absorbance of DPPH solution in methanol, and Abs_{sample} is the absorbance of the sample after 30 minutes of reaction with DPPH solution, both obtained at 517 nm (de Menezes et al., 2021; Ihsanpuro et al., 2022; Liu et al., 2020).

2.5 Photodegradation of LUT in the absence and presence of the caseins

In the absence of light, a LUT stock solution (4.80×10^{-4} mol. L⁻¹) was prepared in a sodium citrate and citric acid buffer (pH 6.0). Aliquots of 0.5 mL of this solution were added to test tubes, resulting in a LUT concentration of 4.80×10^{-5} mol. L⁻¹ in each tube. Subsequently, 0, 2, 3, and 4 mL of α_s -CNs, β -CN, or κ -CN stock solutions (6.0×10^{-5} mol. L⁻¹) in the same buffer were added to the test tubes containing LUT, achieving final protein concentrations of 0, 2.40×10^{-5} mol. L⁻¹, 3.60×10^{-5} mol. L⁻¹, and 4.80×10^{-5} mol. L⁻¹, respectively. The volume in each test tube was then adjusted to 5 mL with the buffer (pH 6.0). The test tubes were placed inside a light chamber, with two fluorescent lamps simulating daylight, at 298.15 K. Absorbance measurements at 445 nm were taken every 30 minutes for 5 hours (Hudson et al., 2018). Each test was conducted twice, and the results are presented as the mean $\pm$ standard deviation.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Steady-state fluorescence analysis

3.1.1 Fluorescence spectra of the caseins in the absence and presence of LUT

Fluorescence quenching is a powerful method for probing protein structures and their interactions with other molecules, particularly phenolics. This method leverages the inherent fluorescence of tryptophan (Trp) residues in proteins, allowing for detailed monitoring of changes in fluorescence, which can provide valuable insights into the thermodynamics of complex formation (Lakowicz, 2006). In this study, we applied fluorescence quenching to examine the interactions between α_s -CNs, β -CN, or κ -CN, and LUT. The primary structures of α_{s1} -CN and α_{s2} -CN contain two Trp residues (Huppertz et al., 2018), while β -CN and κ -CN each contain one Trp residue (Hewa Nadugala et al., 2023; Pacheco et al., 2020). Specifically, the Trp residue of β -CN is located in the position 143 of the polypeptide chain (Pacheco et al., 2020), found in the main hydrophobic domain (C-terminal end) of β -CN (Divsalar et al., 2015; Zare Karizak et al., 2022), contributing to hydrophobic interactions of this protein in aqueous environments and during micelle formation. The interaction of LUT with these Trp residues, or in regions close to them, can alter the fluorescence spectrum of the bovine caseins, thus allowing the determination of the thermodynamic parameters of the complex formation between LUT and caseins. Since the critical micellar concentration of β -CN is approximately $2.0 \times 10^{-5} \text{ mol. L}^{-1}$ at pH 6.0 and a moderated ionic strength, (Zhang et al., 2024), in this experiment, the β -CN molecules were not in their micellar form.

Figure 1 presents the fluorescence emission spectra of (a) α_s -CNs, (b) β -CN, and (c) κ -CN, all at pH 6.0 (298.15 K), in the presence of increasing concentrations of LUT.

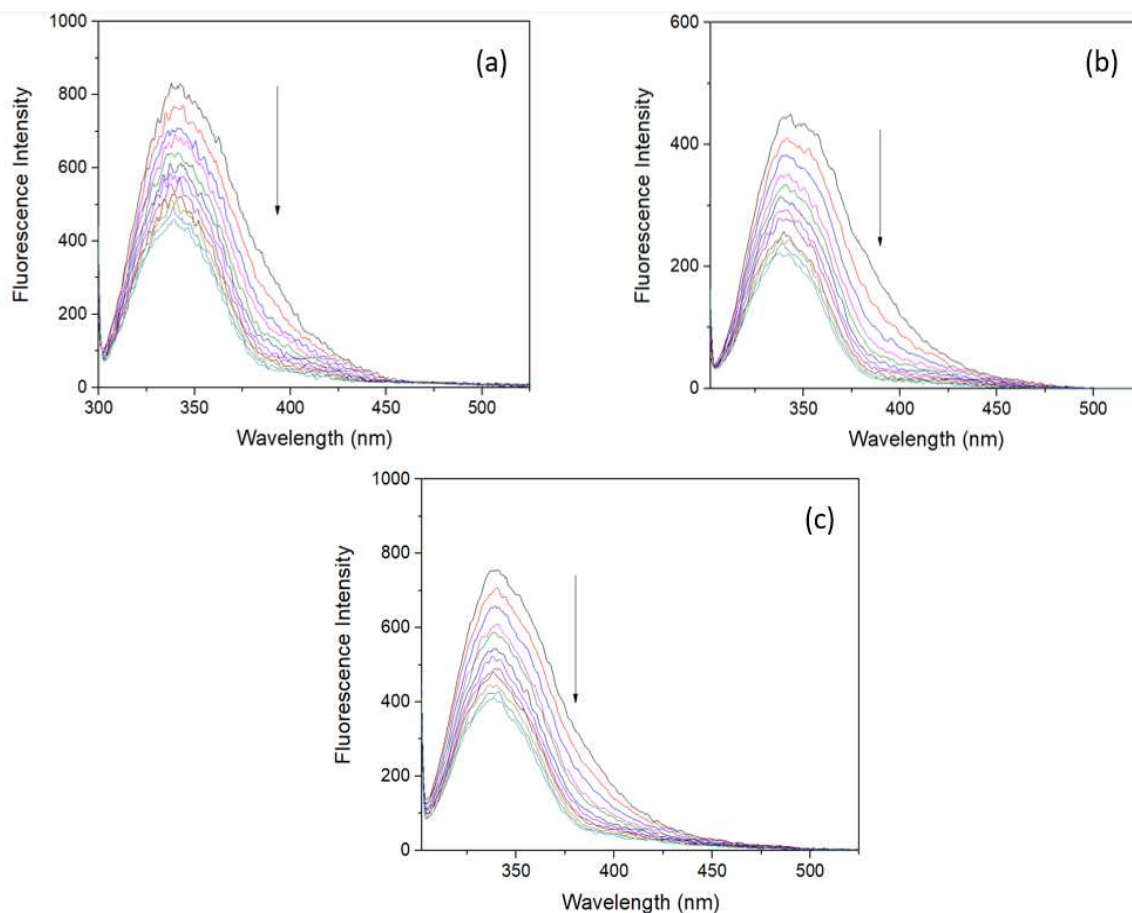


Figure 1. Fluorescence emission spectra of (a) α_s -CN_s, (b) β -CN, and (c) κ -CN (all at 1.0×10^{-5} mol. L⁻¹), quenched by increasing concentrations of LUT at pH 6.0 and 298.15 K. The arrow indicates the increase in LUT concentration from 0 to 7.08×10^{-5} mol. L⁻¹.

It is evident that the intrinsic fluorescence intensities of the bovine caseins differ, with α_s -CN_s showing the highest intensity, followed by κ -CN and β -CN (α_s -CN_s > κ -CN > β -CN). The higher fluorescence intensity of α_s -CN_s can be attributed to the presence of two Trp residues in their primary structure. In contrast, although both κ -CN and β -CN contain one Trp residue each, the variation in their fluorescence intensities can be explained by differences in the Trp microenvironment or distinct Trp quantum yields. Chakraborty & Basak (2007) determined the mean fluorescence lifetime (τ) of the Trp

in the α_{s1} -CN, k-CN, and β -CN at pH 6.2, obtaining values of 4.45, 3.63, and 3.18 nanoseconds, respectively. Since the quantum yield (Φ) is directly proportional to τ (Equation 2) (Lakowicz, 2006), the lower Φ of β -CN contributes to its reduced fluorescence emission.

$$\tau = \frac{1}{k_f + k_{nr}} = \frac{1}{k_f / \Phi} = \frac{\Phi}{k_f} \quad (2)$$

Here, k_f is the emissive rate of the fluorophore, and k_{nr} is the rate of nonradiative decay of the fluorophore to the ground state.

As shown in Figure 1, the increase in LUT concentration induced gradual decreases in the intrinsic fluorescence intensities emitted by the bovine caseins. The relative quenching efficiency (RQE) of the maximal LUT concentration was calculated using Equation 3.

$$RQE (\%) = \frac{F_0 - F_{11}}{F_0} \times 100 \quad (3)$$

Here, F_0 is the fluorescence intensity emitted by bovine caseins in the minimal concentration of LUT (0 mol. L⁻¹), and F_{11} is the fluorescence intensity of bovine caseins at the maximal concentration of LUT (7.08 x 10⁻⁵ mol. L⁻¹).

It is important to note that the absolute value of F_0 for individual molecules does not impact the RQE; what matters is the ratio between the initial intensity (F_0) and the final intensity (F_{11}) for each molecular species within the same sample. The RQE of LUT was similar across the caseins, reducing fluorescence by 44% (± 2.2) for α_s -CN_s;

48% (± 2.4) for β -CN; and 45% (± 2.2) for κ -CN. However, the impact of LUT on the microenvironment of the Trp residues varied among the caseins: when excited at 295 nm, shifts in the maximum fluorescence emission wavelength of Trp ($\Delta\lambda_{em-max}$) were observed. For α_s -CN_s in the absence of LUT, the λ_{em-max} was at 337.5 nm, which increased to 341.5 nm with the highest concentration of LUT, indicating a redshift of 4 nm and suggesting that the Trp residues in α_s -CN_s moved to a slightly more hydrophilic microenvironment. Conversely, a blueshift was observed for β -CN and κ -CN, with the λ_{em-max} shifting from 343.5 to 338 nm for β -CN, and from 341 to 338.5 nm for κ -CN, indicating that the fluorophores in these caseins moved to a more hydrophobic microenvironment.

The observed decrease in fluorescence intensity, along with the blueshift and redshift, suggests the complexation between LUT and bovine caseins. To confirm this, further investigation into the quenching mechanism was conducted.

3.1.2 Predominant fluorescence quenching mechanism of the caseins induced by LUT

Under fixed conditions of pH, ionic strength, and temperature, fluorescence quenching can be classified as either dynamic (collisional) or static. In dynamic quenching, the fluorophore interacts with the quencher (ligand) through collisions, returning to the ground state without emitting fluorescence, and no protein-quencher complex is formed. In contrast, the static quenching mechanism involves the formation of non-fluorescent complex between the fluorophore and the quencher in the ground state (Günel-Köroğlu et al., 2022). To elucidate the quenching mechanisms of α_s -CN_s-

LUT, β -CN-LUT, and κ -CN-LUT complexes formation, the fluorescence data were analyzed using the Stern-Volmer equation (Equation 4).

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q] = 1 + K_q\tau_0[Q] \quad (4)$$

Here, F_0 is the fluorescence intensity of the protein (α_s -CN_s, β -CN, or κ -CN) in the absence of quencher (LUT); F is the fluorescence intensity of the protein (α_s -CN_s, β -CN, or κ -CN) in the presence of quencher (LUT); K_{SV} is the Stern-Volmer quenching constant (mol. L⁻¹); $[Q]$ is the quencher (LUT) concentration (mol. L⁻¹); K_q is the bimolecular quenching constant (mol. L⁻¹ s⁻¹); and τ_0 is the fluorescence average lifetime of the protein (α_s -CN_s, β -CN, or κ -CN) without quencher (LUT) ($\sim 10^{-8}$ s) (Lakowicz, 2006).

The K_{SV} and K_q values were determined from linear regression of the fluorescence intensities and quencher concentrations (F_0/F versus $[Q]$) (Figure S2, Supplementary Data). In dynamic quenching, K_{SV} typically increases with rising temperature, whereas in static quenching, this constant tends to decrease as temperature increases (Lelis et al., 2017; Santa Rosa et al., 2021). The fluorescence quenching mechanism can be also inferred from the K_q value: if the bimolecular quenching constant exceeds 2.0×10^{10} mol. L⁻¹ s⁻¹, which is considered the maximum K_q value of dynamic quenchers, the quenching mechanism is static, thus indicating the formation of a protein-quencher complex (Li et al., 2020). The K_{SV} and K_q values are shown in Table 1.

Table 1 - Fluorescence quenching constant (K_{SV}) and bimolecular quenching constant (K_q) for the α_s -CN_s-LUT, β -CN-LUT, and κ -CN-LUT bindings, measured at five different temperatures and a pH of 6.0.

System	Temperature (K)	K_{SV} ($\times 10^4$ mol. L ⁻¹)	K_q ($\times 10^{12}$ mol. L ⁻¹ s ⁻¹)	R ²
α_s-CN_s-LUT	293.15	1.10 $\pm$ 0.03	1.10 $\pm$ 0.03	0.99
	298.15	1.08 $\pm$ 0.04	1.08 $\pm$ 0.04	0.99
	303.15	1.15 $\pm$ 0.05	1.15 $\pm$ 0.05	0.99
	308.15	1.07 $\pm$ 0.03	1.07 $\pm$ 0.03	0.99
	313.15	1.05 $\pm$ 0.04	1.05 $\pm$ 0.04	0.99
β-CN-LUT	293.15	1.46 $\pm$ 0.07	1.46 $\pm$ 0.07	0.99
	298.15	1.40 $\pm$ 0.04	1.40 $\pm$ 0.04	0.99
	303.15	1.38 $\pm$ 0.05	1.38 $\pm$ 0.05	0.99
	308.15	1.27 $\pm$ 0.06	1.27 $\pm$ 0.06	0.99
	313.15	1.16 $\pm$ 0.03	1.16 $\pm$ 0.03	0.99
κ-CN-LUT	293.15	1.22 $\pm$ 0.04	1.22 $\pm$ 0.04	0.99
	298.15	1.18 $\pm$ 0.05	1.18 $\pm$ 0.05	0.99
	303.15	1.17 $\pm$ 0.03	1.17 $\pm$ 0.03	0.99
	308.15	1.15 $\pm$ 0.04	1.15 $\pm$ 0.04	0.99
	313.15	1.12 $\pm$ 0.05	1.12 $\pm$ 0.05	0.99

R² is the determination coefficient. All K_{SV} and K_q values are means $\pm$ standard deviation for two sets of measurements.

As shown in Table 1, all K_{SV} values decreased when the temperature increased from 293.15 to 313.15 K. Given that the fluorescence average lifetime of biopolymers,

including proteins, is approximately 10^{-8} s (Paiva et al., 2020), the K_q values obtained for the α_s -CN_s-LUT, β -CN-LUT, and κ -CN-LUT complexes (10^{12} mol. L⁻¹ s⁻¹) confirm that the fluorescence quenching of the bovine caseins occurred predominantly due complex formation with LUT molecule.

3.1.3 LUT-bovine caseins binding and energetic analyses

Considering that complexes were formed, the equilibrium binding constant (K_b) and stoichiometry (n) for the α_s -CN_s-LUT, β -CN-LUT, and κ -CN-LUT complexes were determined using the modified Stern-Volmer model (Equation 5) (Ksenofontov et al., 2019) (Figure S3, Supplementary Data).

$$\log \frac{F_0 - F}{F} = n \log K_b - n \log \frac{1}{([Q_t] - (\frac{F_0 - F}{F_0})[P])} \quad (5)$$

Here, $[Q_t]$ is the total LUT concentration (mol. L⁻¹) and $[P]$ is the α_s -CN_s, β -CN, or κ -CN concentration (mol. L⁻¹). The n value corresponds to the slope of the curve $\log \frac{F_0 - F}{F}$ versus $\log \frac{1}{([Q_t] - (\frac{F_0 - F}{F_0})[P])}$, and the K_b value (mol. L⁻¹) is the intercept of the same curve (Hudson et al., 2018).

Using the determined K_b values, the standard Gibbs free energy change (ΔG°) for the formation processes of the α_s -CN_s-LUT, β -CN-LUT, and κ -CN-LUT complexes was calculated using Equation 6.

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_b \quad (6)$$

Here, R is the universal constant of ideal gases ($8.3145 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$); T is the temperature (K); and the measurement unit for ΔG° is kJ. mol^{-1} .

The K_b , n and ΔG° values associated to the α_s -CN_s-LUT, β -CN-LUT, and κ -CN-LUT complexes are listed in Table 2.

Table 2 – Binding constant (K_b) and stoichiometry (n) values for the α_s -CN_s-LUT, β -CN-LUT, and κ -CN-LUT complexes, along with the standard Gibbs free energy change (ΔG°) for their formation processes, measured at five different temperatures and a pH of 6.0.

System	Temperature	K_b	n	R^2	ΔG°	R^2
	(K)	($\times 10^4 \text{ mol. L}^{-1}$)			(kJ. mol^{-1})	
α_s-CN_s-LUT	293.15	1.19 ± 0.03	1.08 ± 0.03	0.99	-22.86 ± 0.6	0.99
	298.15	1.18 ± 0.04	1.00 ± 0.04	0.99	-23.23 ± 0.9	
	303.15	1.17 ± 0.05	0.98 ± 0.04	0.99	-23.59 ± 1.1	
	308.15	1.14 ± 0.03	1.06 ± 0.03	0.99	-23.93 ± 0.7	
	313.15	1.10 ± 0.04	1.01 ± 0.04	0.99	-24.21 ± 0.9	
β-CN-LUT	293.15	1.58 ± 0.07	1.11 ± 0.05	0.99	-23.55 ± 1.1	0.98
	298.15	1.47 ± 0.04	1.10 ± 0.03	0.99	-23.77 ± 0.7	
	303.15	1.43 ± 0.05	1.07 ± 0.04	0.99	-24.10 ± 0.9	
	308.15	1.32 ± 0.06	1.06 ± 0.05	0.99	-24.29 ± 1.2	
	313.15	1.22 ± 0.03	0.99 ± 0.02	0.99	-24.48 ± 0.7	
κ-CN-LUT	293.15	1.26 ± 0.05	1.04 ± 0.04	0.99	-22.99 ± 0.9	0.95
	298.15	1.27 ± 0.06	1.09 ± 0.05	0.99	-23.40 ± 1.1	
	303.15	1.29 ± 0.03	1.16 ± 0.03	0.99	-23.83 ± 0.7	

308.15	1.24 ± 0.04	1.06 ± 0.04	0.99	-24.14 ± 0.9
313.15	1.16 ± 0.05	0.98 ± 0.04	0.99	-24.36 ± 1.2

R^2 is the determination coefficient. All K_b , n and ΔG° values are means $\pm$ standard deviation for two sets of measurements.

The K_b values for all complexes were in the order of 10^4 mol. L^{-1} , indicating that the formation of complexes between LUT and bovine caseins was highly favorable. The relatively high K_b values suggest strong binding affinity. The decrease in K_b values with increasing temperature indicates that the formation process of the complexes was exothermic, except for the complex κ -CN-LUT between 293 K and approximately 299 K. The complexes exhibited a 1:1 stoichiometry across all temperatures studied, indicating that one LUT molecule bound to each α_s -CN_s, β -CN, and κ -CN molecules. The negative ΔG° values for all complexes indicated that the thermodynamic equilibrium favored the formation of the complexes over free LUT, α_s -CN_s, β -CN, and κ -CN molecules. Additionally, the stability of the complexes increased with higher temperatures.

Although the ΔG° values for LUT interacting with all bovine caseins were nearly the same, analyzing the ΔG° components (standard enthalpy change (ΔH°) and standard entropy change (ΔS°) of complex formation) allows to establish the underlying interaction mechanisms. The stability of protein-ligand complexes is governed by various intermolecular forces, including hydrophobic and electrostatic interactions, van der Waals forces, hydrogen bonds, covalent and ionic bonds (Cao et al., 2023; Kabir et al., 2024; Tongkanarak et al., 2024; Wang et al., 2020). Understanding these intermolecular forces in the binding of LUT to bovine caseins could optimize the

thermodynamic conditions for transporting and stabilizing LUT by α_s -CN_s, β -CN, or κ -CN in food or other complex systems.

The ΔH° values for α_s -CN_s-LUT, β -CN-LUT, and κ -CN-LUT complex formation were determined from the nonlinear van't Hoff equation (Equation 7).

$$\Delta H^\circ = -R \frac{\partial \ln K_b}{\partial 1/T} \quad (7)$$

Here, R is the universal gas constant (8.3145 J mol.⁻¹ K⁻¹); K_b is the equilibrium binding constant (mol. L⁻¹); T is the temperature (K); and the measurement unit for ΔH° is kJ. mol⁻¹.

The experimental data of $\ln K_b$ versus $1/T$ were fitted to a polynomial model (Equation 8), yielding the parameters a , b , c , and d . These parameters were then utilized in Equation 9 to determine the ΔH° values for the formation of α_s -CN_s-LUT, β -CN-LUT, and κ -CN-LUT complexes.

$$\ln K_b = a + b \left(\frac{1}{T}\right) + c \left(\frac{1}{T}\right)^2 + d \left(\frac{1}{T}\right)^3 + \dots \ln \Phi \quad (8)$$

$$\Delta H^\circ = -R \left[b + 2c \left(\frac{1}{T}\right) + 3d \left(\frac{1}{T}\right)^2 + \dots \right] \quad (9)$$

In these equations, K_b is the equilibrium binding constant (mol. L⁻¹); a , b , c , d , and $\ln \Phi$ are constants graphically determined using the polynomial adjust; R is the universal constant of ideal gases (8.3145 J mol.⁻¹ K⁻¹); and T is the temperature (K).

Figure 2 presents the nonlinear van't Hoff plots used to determine the standard enthalpy change (ΔH°) for the formation of the α_s -CN_s-LUT, β -CN-LUT, and κ -CN-LUT complexes.

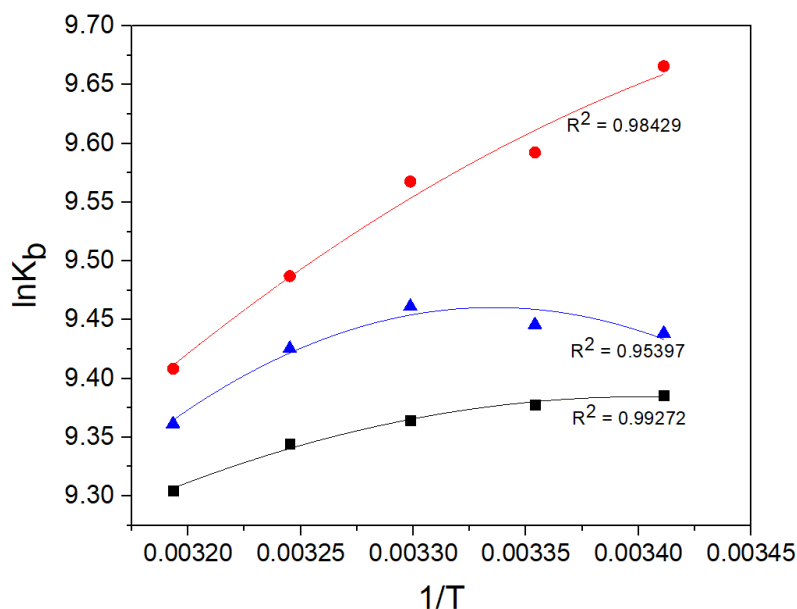


Figure 2. Nonlinear van't Hoff plot for determination of ΔH° of the α_s -CN_s-LUT (■), β -CN-LUT (●), and κ -CN-LUT (▲) complexes formation at pH 6.0.

Using the fundamental Gibbs equation (Equation 10), the $T\Delta S^\circ$ values for the formation of the α_s -CN_s-LUT, β -CN-LUT, and κ -CN-LUT complexes were determined. Figure 3 illustrates the behavior of (a) the ΔH° and (b) the $T\Delta S^\circ$ values, as a function of temperature.

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (10)$$

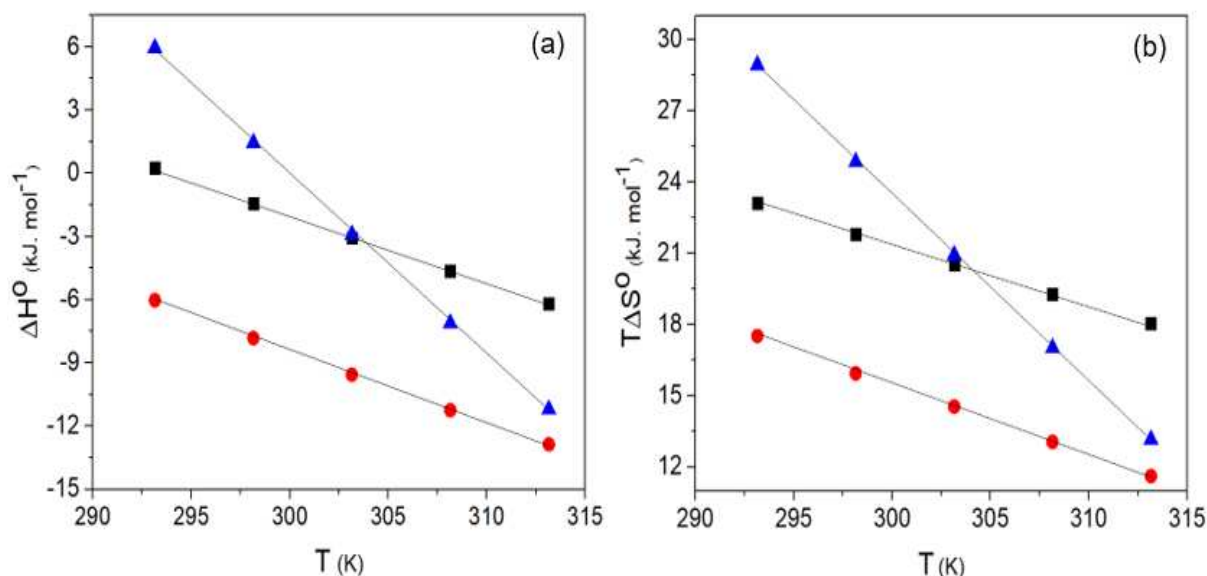


Figure 3. Values of (a) the standard enthalpy (ΔH°) and (b) the entropy ($T\Delta S^\circ$) changes, in relation to temperature, for α_s -CN_s-LUT (■), β -CN-LUT (●), and κ -CN-LUT (▲) complexes.

Negative values for ΔH° indicate that the formation of α_s -CN_s-LUT, β -CN-LUT, and κ -CN-LUT complexes was enthalpically driven. Specifically, as the temperature increased from 293.15 to 313.15 K, the ΔH° values for the α_s -CN_s-LUT binding decreased from 0.24 to -6.17 kJ·mol⁻¹; for β -CN-LUT binding, from -6.03 to -12.87 kJ·mol⁻¹; and for κ -CN-LUT binding, from 5.95 to -11.20 kJ·mol⁻¹.

For the α_s -CN_s-LUT and κ -CN-LUT complexes, the ΔH° values shift from positive to negative as the temperature increases, indicating a transition from endothermic to exothermic binding. Initially, the formation of these complexes absorbs more energy than it releases, but as the temperature rises, the binding interactions between α_s -CN_s and LUT, and between κ -CN and LUT, begin to release more energy than is absorbed. This suggests that, at higher temperatures, the energy released during binding is sufficient to overcome the energy required to disrupt water-protein, water-LUT, and

water-water interactions, as well as to promote the necessary conformational changes in α_s -CN_s and κ -CN molecules.

In contrast, the formation of β -CN-LUT complex consistently exhibits negative ΔH° values across the studied temperature range, indicating an exothermic process. Notably, β -CN has the highest proline (Pro) content among the bovine caseins, with 35 Pro residues, compared to 17 in α_{s1} -CN, 10 in α_{s2} -CN, and 20 in κ -CN. Pro residues have a high affinity for binding with hydroxyl groups, and LUT contains two hydroxyl groups, one at each end of its molecule. Therefore, the more negative enthalpy observed for β -CN could be attributed to a greater number of hydrogen bonds between Pro residues and the hydroxyl groups of LUT. The increasingly negative ΔH° values, observed with rising temperatures for all complexes, suggest that the binding becomes even more enthalpically favorable, releasing more energy as temperature increases.

The relation between ΔH° and temperature (Figure 3a) reveal the standard heat capacity change (ΔC_p°) associated with the formation of the complexes ($\Delta C_p^\circ = \partial(\Delta H^\circ)/\partial T$). This relationship offers valuable insights into the nature and strength of the forces involved in the binding process between bovine caseins and LUT (Ivanov & Kolker, 2023; Pushp et al., 2023; Yagofarov & Solomonov, 2023).

The ΔC_p° values for the formation of the α_s -CN_s-LUT, β -CN-LUT, and κ -CN-LUT complexes represents the difference between the C_p° values of these complexes and the C_p° values of the free molecules (α_s -CN_s, β -CN, κ -CN and LUT). This difference primarily arises from the removal of water molecules (desolvation) from the free α_s -CN_s, β -CN, κ -CN, and LUT, as well as the establishment of new intermolecular interactions within the α_s -CN_s-LUT, β -CN-LUT, and κ -CN-LUT complexes (Hudson et al., 2022). These relations can be described as shown in Equation 11:

$$\Delta C_p^\circ = C_p^\circ_{(\text{CN-LUT})} - (C_p^\circ_{(\text{CN})} + C_p^\circ_{(\text{LUT})}) \quad (11)$$

The ΔC_p° values obtained for the formation of α_s -CN_s-LUT, β -CN-LUT, and κ -CN-LUT complexes were -0.32; -0.34; and -0.86 kJ. mol.⁻¹ K⁻¹, respectively. Negative ΔC_p° values indicate that the intensity and number of intermolecular interactions within α_s -CN_s-LUT, β -CN-LUT, and κ -CN-LUT complexes were lower compared to those when the α_s -CN_s, β -CN, κ -CN, and LUT molecules are free.

The more negative ΔC_p° value observed for the κ -CN-LUT complex can be attributed to specific structural and interactional characteristics inherent to κ -CN when bound with LUT. Although κ -CN is not recognized as the most hydrophobic casein, it may possess unique amino acid sequences or structural motifs that facilitate strong and organized binding interactions with LUT molecule. These interactions likely involve hydrophobic interactions, hydrogen bonding, or other specific intermolecular forces that effectively reduce the heat capacity during complex formation. Additionally, the conformational flexibility of both κ -CN and LUT may be restricted upon complexation, further stabilizing the complex and contributing to the observed more negative ΔC_p° value.

Additional insights into conformational and configurational changes can be gained through the analysis of the entropic term (Figure 3b). Positive $T\Delta S^\circ$ values indicate that the formation of the α_s -CN_s-LUT, β -CN-LUT, and κ -CN-LUT complexes is driven by an increase in entropy, primarily due to the release of water molecules from the hydrophobic regions of bovine caseins and LUT, as well as the associated conformational changes. This desolvation process increases the degrees of freedom of water molecules, making the complexation process entropically favorable (Coelho et al., 2022).

The $T\Delta S^\circ$ values for the formation of α_s -CN_s-LUT, β -CN-LUT, and κ -CN-LUT complexes became less positive as the temperature increased. Specifically, when the temperature rose from 293.15 to 313.15 K, the $T\Delta S^\circ$ values for α_s -CN_s-LUT complex decreased from 23.11 to 18.04 kJ. mol⁻¹; for β -CN-LUT complex, from 17.52 to 11.62 kJ. mol⁻¹; and for κ -CN-LUT complex, from 28.95 to 13.16 kJ. mol⁻¹. This reduction in $T\Delta S^\circ$ with increasing temperature indicates that the entropy gain associated with complex formation is reduced at higher temperatures. As the temperature increases, water molecules in the solvation layer of interacting molecules gain kinetic energy and become less structured compared to lower temperatures. Consequently, the difference in structuring between water molecules in the solvation layer and those in the bulk decreases, reducing the entropic gain typically associated with desolvation (Hudson et al., 2019). Additionally, higher temperatures make the protein's binding site more flexible, further reducing the entropy gain from conformational changes.

It is important to note that the greatest reduction in $T\Delta S^\circ$ with increasing temperature occurred in the κ -CN-LUT complex, corroborating the more negative ΔC_p° value and indicating a reduction in conformational flexibility. This suggests that the binding of LUT to κ -CN results in a more rigid and ordered complex structure, which limits the entropy gain typically associated with increased temperature. The specific interactions within the κ -CN-LUT complex, such as hydrogen bonds or hydrophobic interactions, likely contribute to this rigidity. Consequently, the thermodynamic behavior of the κ -CN-LUT complex underscores the significant role of structural constraints in the binding process.

3.2 Effect of the caseins on the antioxidant activity of LUT

LUT is a bioactive molecule with notable antioxidant capacity, linked to its chemical structure, which includes hydroxyl groups, carbonyl groups, and conjugated double bonds (Jv et al., 2023; Shu et al., 2023; Sindhu et al., 2010). These functional groups allow LUT to neutralize free radicals and prevent oxidative damage (Boroski et al., 2015). However, LUT's antioxidant capacity can be compromised by factors such as atmospheric oxygen, UV light, and high temperatures.

Proteins can protect LUT molecule from oxidation by creating an environment that shields it from oxidizing agents (Manupa et al., 2023). Previous studies, such as the one conducted by Sobral et al. (2016), demonstrated that LUT's antioxidant activity remained stable when added to milk during prato cheese production, suggesting that protein binding may enhance LUT stability. Based on this observation, we evaluated the impact of complexation between LUT and bovine caseins on its antioxidant activity, by determining the half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of LUT, both in the absence and presence of α_s -CN_s, β -CN, and κ -CN.

Figure 4 illustrates the percentage values of DPPH inhibition versus LUT concentration in the absence and presence of α_s -CN_s, β -CN, and κ -CN.

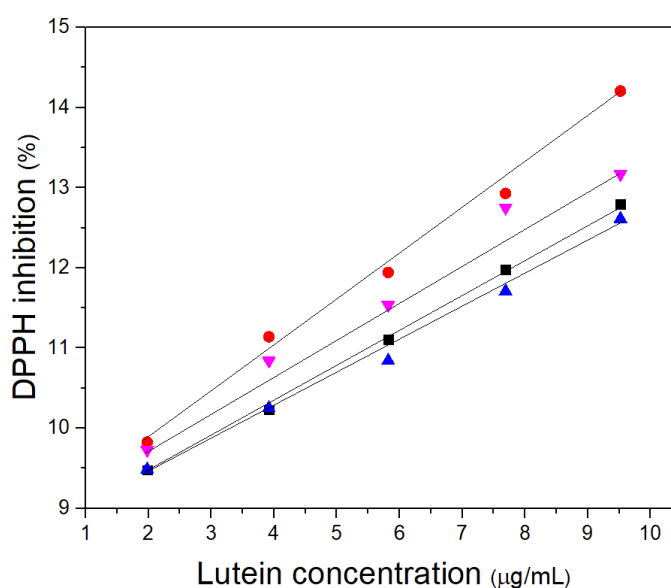


Figure 4. Values of DPPH inhibition (%) versus LUT concentration ($\mu\text{g/mL}$), in the absence (■) and presence of $\alpha_s\text{-CN}_s$ (●), $\beta\text{-CN}$ (▲), and $\kappa\text{-CN}$ (▼).

The DPPH inhibition activity increased in a concentration-dependent manner with rising LUT concentration. In the absence of bovine caseins, DPPH inhibition rose from 9.48 to 12.80%, as LUT concentration increased from 1.98 to 9.52 $\mu\text{g/mL}$. The presence of $\alpha_s\text{-CN}_s$ and $\kappa\text{-CN}$ led to slightly higher DPPH inhibition values, compared to the casein-free system, with inhibition increasing from 9.82 to 14.21% for $\alpha_s\text{-CN}_s$; and from 9.73 to 13.17% for $\kappa\text{-CN}$, as LUT concentration increased. Interestingly, $\beta\text{-CN}$ exhibited a different effect: while DPPH inhibition still increased with LUT concentration (from 9.48 to 12.61%), the overall inhibition was slightly lower than in the casein-free system. This suggests a specific interaction between $\beta\text{-CN}$ and LUT, that may influence the antioxidant capacity of LUT molecule. Table S1 (Supplementary Data) presents the IC_{50} values of LUT in the absence and presence of $\alpha_s\text{-CN}_s$, $\beta\text{-CN}$, and $\kappa\text{-CN}$.

The IC_{50} values of LUT in the presence of $\alpha_s\text{-CN}_s$ and $\kappa\text{-CN}$ were lower than the IC_{50} of LUT in the absence of proteins, indicating enhanced antioxidant activity under these conditions. In contrast, the presence of $\beta\text{-CN}$ resulted in a higher IC_{50} , suggesting that a greater concentration of LUT was required to achieve 50% inhibition of the DPPH radical, indicating reduced antioxidant activity. This difference may be attributed to the higher Pro residues content in $\beta\text{-CN}$. Pro, a unique cyclic amino acid, can strongly bind to hydroxyl groups (Ansari et al., 2015), such as those present in LUT, potentially reducing its availability for electron donation and, thereby, diminishing its antioxidant capacity. The thermodynamic data support this, showing negative ΔH° values for the $\beta\text{-CN}$ -LUT complex, indicative of exothermic interactions. These

interactions likely involve extensive hydrogen bonding between Pro residues and LUT's hydroxyl groups, which could hinder LUT's ability to scavenge DPPH radicals. Despite the inhibitory effect of β -CN, the other bovine caseins (α_s -CN_s and κ -CN) were able to maintain or enhance LUT's antioxidant activity.

3.3 Impact of the caseins on LUT's photodegradation

Given LUT is a bioactive molecule recognized by its photo instability, we explored how LUT-bovine caseins complexes influence the stabilization of LUT against photodegradation. This is essential to understand the role of bovine caseins in stabilizing LUT within dairy matrices, and for potential applications of these complexes in other food systems, especially those exposed to light.

The protective effect of α_s -CN_s, β -CN, and κ -CN on LUT against photodegradation was assessed by determining the degradation constant (K_d) and the half-life time ($t_{1/2}$) of LUT over five hours of light exposure, in the absence or presence of the bovine caseins. This evaluation followed a first-order kinetics (Equation 12), with K_d being obtained from linear regression of $-\ln ABS_f / ABS_0$ versus time of light exposure (where K_d is the slope in the line equation). The $t_{1/2}$ values were subsequently calculated using Equation 13 (Hudson et al., 2018; Silva et al., 2018).

$$-\ln \frac{ABS_f}{ABS_0} = K_d \times t \quad (12)$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{K_d} \quad (13)$$

In these equations, ABS_f is the absorbance of the sample in the time t , and ABS_0 is the absorbance of the sample in the time 0, in the absence or presence of α_s -CN_s, β -CN, and κ -CN, both obtained at 445 nm. K_d is LUT degradation constant (hours^{-1}); t is the storage time (hours) under light exposure; and $t_{1/2}$ is LUT half-life time (hours) in the absence or presence of α_s -CN_s, β -CN, and κ -CN.

Figure S4 (Supplementary Data) shows the plots of $-\ln ABS_f/ABS_0$ versus time of light exposure of LUT, both in the absence and presence of bovine caseins. The behavior of LUT's K_d and $t_{1/2}$ values, at increasing concentrations of bovine caseins, is shown in Figure 5.

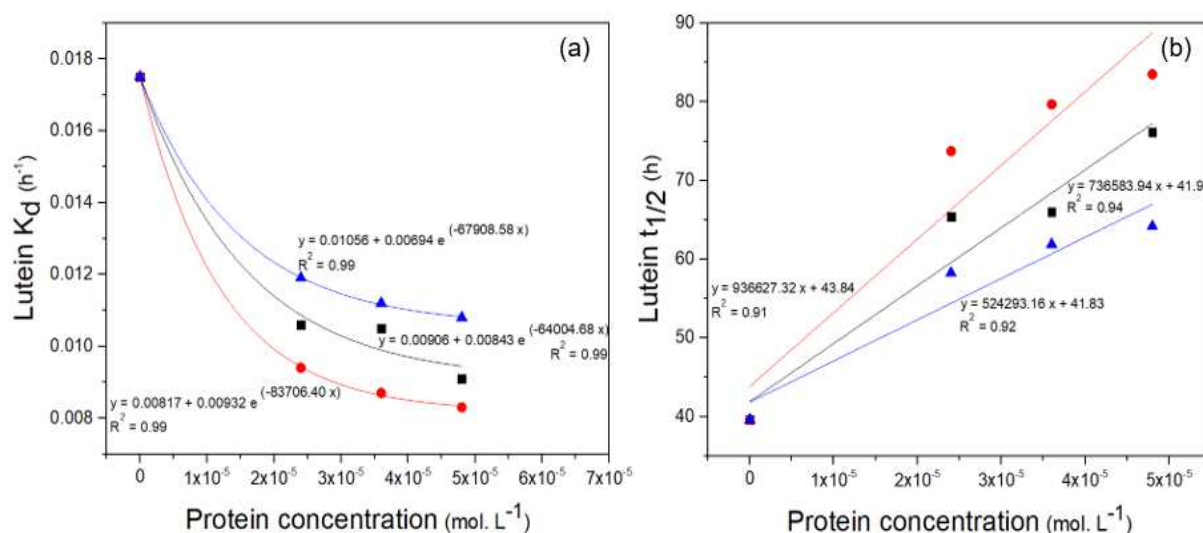


Figure 5. Values of (a) LUT degradation constant (K_d) and (b) LUT half-life time ($t_{1/2}$), previously obtained from linear regression of $-\ln ABS_f/ABS_0$ versus time of light exposure of LUT, in relation to protein concentration, in the absence and presence of α_s -CN_s (■), β -CN (●), and κ -CN (▲).

Increasing the concentration of casein reduced the K_d of LUT and increased its $t_{1/2}$ under light exposure. In the absence of bovine caseins, LUT exhibited a higher K_d ($K_d = 0.0175 \text{ h}^{-1}$). However, in the presence of α_s -CN_s, β -CN, and κ -CN, LUT's K_d

reduced by 48; 53; and 38%, respectively. Correspondingly, LUT's $t_{1/2}$ was 39.61 h without bovine caseins, but increased to 76.17 h with α_s -CN_s; 83.51 h with β -CN; and 64.18 h with κ -CN, representing a significant enhancement in LUT's photostability.

For molecular sensitization to occur, collisions between LUT and oxygen molecules are necessary. Since LUT forms complexes with α_s -CN_s, β -CN, and κ -CN, as confirmed by FS, these complexes likely contribute to LUT's protection against photodegradation. The observed reduction in K_d and the increased $t_{1/2}$ values in the presence of bovine caseins indicates this protective effect. Two main barriers are suggested: physical and chemical. The physical barrier occurs when LUT is entrapped within specific regions of the bovine casein molecules, forming a 'protective cover' that limits direct exposure to oxygen. The chemical barrier arises from the molecular interactions between LUT and bovine caseins, which stabilize LUT's conformational structure, reducing its susceptibility to photodegradation. This stabilization may create a micro-heterogeneous environment around LUT, potentially inducing electronic shielding effects. Furthermore, the chemical binding may alter LUT's reactivity, reducing the formation of reactive excited states, that typically lead to degradation (Jv et al., 2023; Syamila et al., 2019).

Interestingly, the presence of β -CN resulted in lower K_d and higher $t_{1/2}$ values for LUT compared to α_s -CN_s and κ -CN, indicating that β -CN offers superior protection against LUT photodegradation. As the most hydrophobic bovine casein, β -CN provides more hydrophobic regions for LUT binding, which helps entrap LUT molecule in a shielded environment, thereby reducing its exposure to oxygen (Khatun et al., 2022). Additionally, β -CN has a unique ability to form micelles in aqueous solution. At pH 6.0 and a moderated ionic strength, the critical micellar concentration of β -CN is approximately 2.0×10^{-5} mol. L⁻¹ (Zhang et al., 2024). Thus, in this experiment, the β -

CN molecules were likely in their micellar form, which may have created a microenvironment around LUT, isolating it from adverse external conditions. Furthermore, hydrogen bonding between Pro in β -CN and the hydroxyls of LUT, may dissipate absorbed energy non-reactively, thus minimizing oxidative damage to LUT.

Silva et al. (2018) assessed the photostability of β -carotene (β -CAR), a bioactive molecule that shows similar structure of LUT, in the absence and presence of β -CN and bovine serum albumin (BSA). Both proteins enhanced β -CAR's photostability, with β -CN micelles proving more effective than BSA. Specifically, β -CN monomers (at $4.0 \times 10^{-6} \text{ mol. L}^{-1}$) and BSA (at $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol. L}^{-1}$, $3.0 \times 10^{-6} \text{ mol. L}^{-1}$, and $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol. L}^{-1}$) reduced the K_d and increased the $t_{1/2}$ values of β -CAR approximately threefold. Notably, when β -CN self-assembled into micelles, at or above its critical micellar concentration ($2.0 \times 10^{-5} \text{ mol. L}^{-1}$ and $4.0 \times 10^{-5} \text{ mol. L}^{-1}$, respectively), the β -CAR- β -CN complex exhibited K_d values four times smaller ($K_d = 5.44 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ and $5.31 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$, respectively) and $t_{1/2}$ values four times higher ($t_{1/2} = 12.74 \text{ h}$ and 13.06 h , respectively) compared to β -CAR alone ($K_d = 2.23 \times 10^{-1} \text{ h}^{-1}$ and $t_{1/2} = 3.09 \text{ h}$). These results were attributed to the hydrophobic interactions between β -CAR and β -CN, particularly within the highly hydrophobic core of β -CN micelles, which stabilize multiple β -CAR molecules through these interactions.

4. CONCLUSION

This study provides a comprehensive analysis of the thermodynamic parameters governing the intermolecular interaction between lutein (LUT) and bovine caseins (α_s -CNs, β -CN, and κ -CN) using fluorescence spectroscopy (FS). The FS results revealed that LUT-bovine caseins complexes exhibited a stoichiometry 1:1, and

were generally driven by both enthalpy and entropy. Notably, the high proline content of β -CN promoted more negative ΔH° values, due to its binding with the hydroxyl groups of LUT. The formation of LUT-bovine caseins complexes was also favored at higher temperatures, leading to an increased number of complexes formed.

Furthermore, the interaction of LUT and α_s -CN_s, and LUT and κ -CN, enhanced the antioxidant activity of LUT, while β -CN exhibited a slight inhibitory effect on this property; and all bovine caseins contributed to improved photochemical stability of LUT. These findings provide important insights into the stabilization mechanisms of LUT molecule, suggesting potential strategies for enhancing its application and efficacy in dairy matrices and other LUT-bovine caseins complex-based systems.

Funding

This work was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Fundação de Apoio à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG).

CRediT authorship contribution statement

Mariana Ishhanuhi da Silva Sismanoglu: Writing – original draft, Validation, Investigation, Formal analysis, Data curation. **Eliara Acipreste Hudson:** Writing – review & editing, Validation, Investigation, Formal analysis, Data curation. **Jaqueline de Paula Rezende:** Writing – review & editing, Visualization. **Luis Henrique Mendes da Silva:** Writing – review & editing, Visualization, Supervision, Software, Resources, Project administration, Funding acquisition, Conceptualization. **Ana Clarissa dos**

Santos Pires: Writing – review & editing, Visualization, Supervision, Software, Resources, Project administration, Funding acquisition, Conceptualization.

Declaration of generative AI and AI-assisted technologies in the writing process

During the preparation of this work the authors utilized ChatGPT solely to enhance language and text fluency. After its use, the authors reviewed and edited the content, assuming full responsibility for the publication's content.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Supplementary data

The following is the supplementary data to this article.

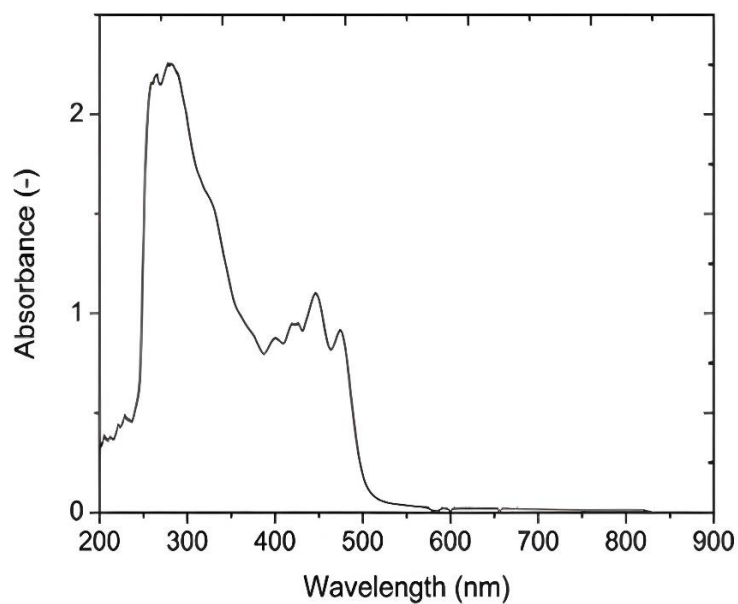


Figure S1. UV-vis spectra for pure LUT, obtained by Silva et al. (2017). It was used in this article to compare to the one we obtained for the extracted LUT (data not shown) using an Aqueous Two-Phase System.

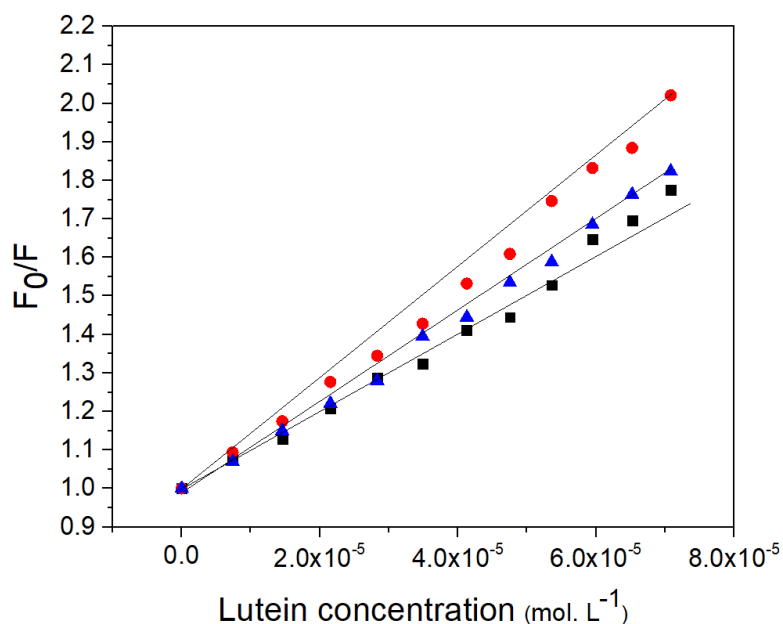


Figure S2. Stern-Volmer plot (F_0/F versus LUT concentration) for fluorescence quenching of α_s -CN_s (■), β -CN (●), and κ -CN (▲), induced by increased concentrations of LUT (298.15 K). F_0 and F correspond to the intrinsic fluorescence intensities of the

bovine caseins (α_s -CN_s, β -CN, or κ -CN) in the absence and presence of the quencher (LUT), respectively.

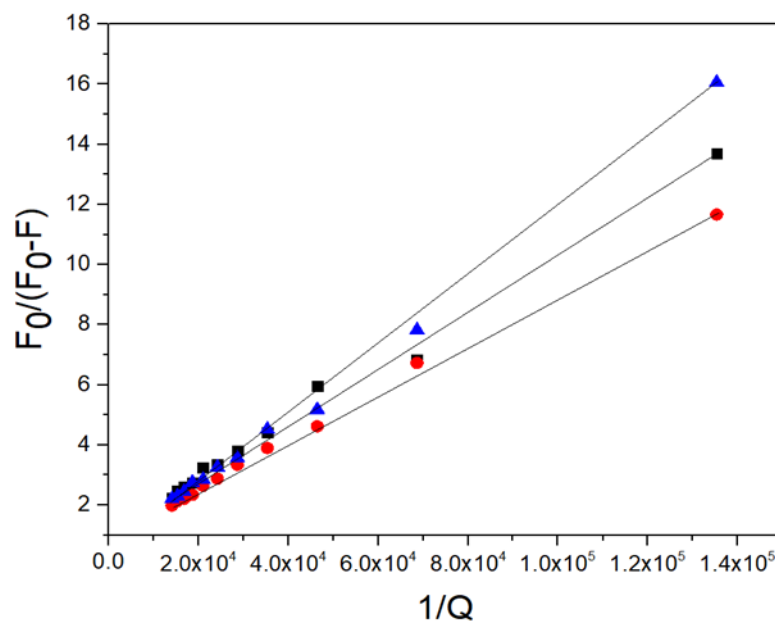


Figure S3. Modified Stern–Volmer plot ($F_0/(F_0 - F)$) versus $1/Q$) for fluorescence quenching of α_s -CN_s (■), β -CN (●), and κ -CN (▲) (298.15 K). F_0 and F correspond to the intrinsic fluorescence intensities of the bovine caseins (α_s -CN_s, β -CN, or κ -CN) in the absence and presence of the quencher (LUT), respectively, and Q is LUT concentration (mol. L⁻¹).

Table S1 – Half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) values of LUT in the absence and presence of the proteins α_s -CN_s, β -CN, and κ -CN.

System	IC ₅₀ in the absence		IC ₅₀ in the presence	
	of protein (μg/mL)	R ²	of protein (μg/mL)	R ²
α_s -CN _s -LUT	93.20 ± 2.7	0.99	73.65 ± 2.2	0.99
β -CN-LUT			101.21 ± 4.0	0.99
κ -CN-LUT			88.04 ± 4.4	0.98

R² is the determination coefficient.

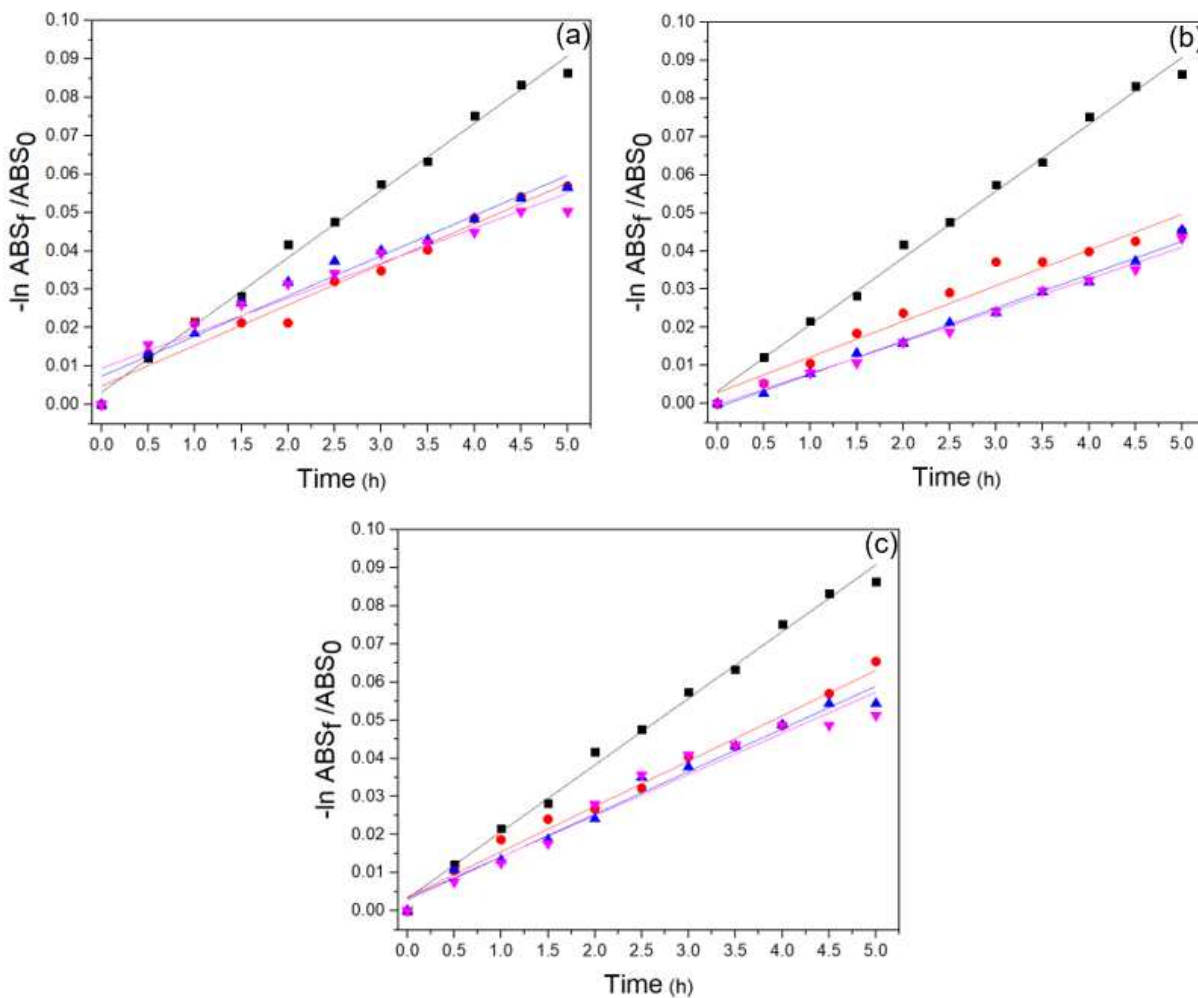


Figure S4. Plots of $-\ln \text{ABS}_f / \text{ABS}_0$ versus time of light exposure of LUT in the absence and presence of bovine caseins for determination of LUT K_d and $t_{1/2}$: (a) in the absence and presence of α_s -CNs; (b) in the absence and presence of β -CN; and (c) in the absence and presence of κ -CN. The absence of bovine caseins is indicated by (■), while the increase of caseins concentration is indicated by (●) ($2.40 \times 10^{-5} \text{ mol. L}^{-1}$), (▲) ($3.60 \times 10^{-5} \text{ mol. L}^{-1}$), and (▼) ($4.80 \times 10^{-5} \text{ mol. L}^{-1}$).

5. REFERENCES

- Ansari, J. A., Naz, S., Tarar, O. M., Siddiqi, R., Haider, M. S., & Jamil, K. (2015). Binding effect of proline-rich-proteins (PRPs) on in vitro antimicrobial activity of the flavonoids. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(1), 183–188. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246120130280>
- Azahar, N. I., Swan, S. Y., Mohd Mokhtar, N., Abd Aziz, M. A., & Arifin, M. A. (2023). Evaluation of antioxidant, antibacterial and anticancer activities of *Ganoderma lucidum* extracts. *Materials Today: Proceedings*. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2023.08.030>
- Boroski, M., Visentainer, J. V., Cottica, S. M., De Moraes, D. R. (2015). *Antioxidantes: princípios e métodos analíticos* (1. ed.). Appris.
- Cao, C., Zhu, Z., Liang, X., Kong, B., Xu, Z., Shi, P., Li, Y., Ji, Y., Ren, Z., & Liu, Q. (2023). Elucidation of interactions between myofibrillar proteins and κ -carrageenan as mediated by NaCl level: Perspectives on multiple spectroscopy and molecular docking. *International Journal of Biological Macromolecules*, 248. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125903>
- Chakraborty, A., & Basak, S. (2007). pH-induced structural transitions of caseins. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 87(3), 191–199. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2007.04.004>
- Coelho, Y. L., das Dores Aguiar, C., de Paula, H. M. C., Marques, I. A., Santa Rosa, L. N., Virtuoso, L. S., Duarte, A., Pires, A. C. dos S., & da Silva, L. H. M. (2022). Exploring the interaction between lactoferrin and CdTe quantum dots: Energetic and molecular dynamic study. *Journal of Molecular Liquids*, 356. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.119005>
- Cui, N., Yang, C., Chen, X., Zhang, J., & Zhang, L. (2023). Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of different lutein isomers in Caco-2 cell model. *Food Bioscience*, 53. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102646>
- Culas, M. S., Popovich, D. G., & Rashidinejad, A. (2024). Recent advances in encapsulation techniques for cinnamon bioactive compounds: A review on stability, effectiveness, and potential applications. *Food Bioscience*, 57. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.103470>
- de Menezes, B. B., Frescura, L. M., Duarte, R., Villetti, M. A., & da Rosa, M. B. (2021). A critical examination of the DPPH method: Mistakes and inconsistencies in stoichiometry and IC₅₀ determination by UV–Vis spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, 1157. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338398>
- Divsalar, A., Razmi, M., Saboury, A. A., Mansouri-Torshizi, H., & Ahmad, F. (2015). Biological Evaluation of a New Synthesized Pt(II) Complex by Cytotoxic and Spectroscopic Studies. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 71(3), 1415–1424. <https://doi.org/10.1007/s12013-014-0364-z>

- Güenal-Köroğlu, D., Yılmaz, H., Turan, S., & Capanoglu, E. (2022). Exploring the lentil protein and onion skin phenolics interaction by fluorescence quenching method. *Food Bioscience*, 50. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.102000>
- Hewa Nadugala, B., Hantink, R., Nebl, T., White, J., Pagel, C. N., Ranadheera, C. S., Logan, A., & Raynes, J. K. (2023). The role of glycosylation in amyloid fibril formation of bovine κ -casein. *Current Research in Food Science*, 6. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2023.100433>
- Hudson, E. A., de Paula, H. M. C., Coelho, Y. L., Glanzmann, N., da Silva, A. D., da Silva, L. H. M., & Pires, A. C. dos S. (2022). The kinetics of formation of resveratrol- β -cyclodextrin-NH₂ and resveratrol analog- β -cyclodextrin-NH₂ supramolecular complexes. *Food Chemistry*, 366. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130612>
- Hudson, E. A., de Paula, H. M. C., Ferreira, G. M. D., Ferreira, G. M. D., Hespanhol, M. do C., da Silva, L. H. M., & Pires, A. C. dos S. (2018). Thermodynamic and kinetic analyses of curcumin and bovine serum albumin binding. *Food Chemistry*, 242, 505–512. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.092>
- Hudson, E. A., Rezende, J. de P., de Paula, H. M. C., Coelho, Y. L., da Silva, L. H. M., & Pires, A. C. dos S. (2019). Energetic parameters of β -casein/queracetin activated and thermodynamically stable complex formation accessed by Surface Plasmon Resonance. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 181, 798–805. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.06.048>
- Huppertz, T., Fox, P. F., & Kelly, A. L. (2018). The caseins: Structure, stability, and functionality. *Proteins in Food Processing, Second Edition*, 49–92. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100722-8.00004-8>
- Ihsanpuro, S. I., Gunawan, S., Ibrahim, R., & Aparamarta, H. W. (2022). Extract with high 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) inhibitory capability from pericarp and seed of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) using microwave-assisted extraction (MAE) two-phase solvent technique. *Arabian Journal of Chemistry*, 15(12). <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2022.104310>
- Ivanov, E. V., & Kolker, A. M. (2023). Some features of heat capacity changes in aqueous solutions of low molecular weight alkanols at $T = 298.15$ K and ambient pressure. *Journal of Chemical Thermodynamics*, 185. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2023.107111>
- Jv, D. jian, Ji, T. hao, Xu, Z., Li, A., & Chen, Z. yi. (2023). The remarkable enhancement of photo-stability and antioxidant protection of lutein coupled with carbon-dot. *Food Chemistry*, 405. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134551>
- Kabir, M. Z., Seng, J., Mohamad, S. B., Gülsüm Bilgiç, M., & Uslu, B. (2024). Exploration of the intermolecular isoproturon–bovine serum albumin combination: Biophysical and computational prospects. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 450. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2024.115464>
- Khatun, S., Appidi, T., & Rengan, A. K. (2022). Casein nanoformulations - Potential biomaterials in theranostics. *Food Bioscience*, 50. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.102200>

- Ksenofontov, A. A., Bocharov, P. S., & Antina, E. v. (2019). Interaction of tetramethyl-substituted BODIPY dye with bovine serum albumin: Spectroscopic study and molecular docking. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 368, 254–257. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2018.10.002>
- Lakowicz, J. (2006). *Principles of fluorescence spectroscopy, Third Edition*. Springer.
- Lelis, C. A., Ferreira, G. M. D., Ferreira, G. M. D., Hespanhol, M. do C., Pinto, M. S., da Silva, L. H. M., & Pires, A. C. dos S. (2017). Determination of driving forces for bovine serum albumin-Ponceau4R binding using surface plasmon resonance and fluorescence spectroscopy: A comparative study. *Food Hydrocolloids*, 70, 29–35. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.03.027>
- Li, X., Peng, Y., Liu, H., Xu, Y., Wang, X., Zhang, C., & Ma, X. (2020). Comparative studies on the interaction of nine flavonoids with trypsin. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 238. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118440>
- Liu, D., Guo, Y., Wu, P., Wang, Y., Kwaku Golly, M., & Ma, H. (2020). The necessity of walnut proteolysis based on evaluation after in vitro simulated digestion: ACE inhibition and DPPH radical-scavenging activities. *Food Chemistry*, 311. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125960>
- Mantovani, R. A., Hamon, P., Rousseau, F., Tavares, G. M., Mercadante, A. Z., Croguennec, T., & Bouhallab, S. (2020). Unraveling the molecular mechanisms underlying interactions between caseins and lutein. *Food Research International*, 138. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109781>
- Manupa, W., Wongthanyakram, J., Jeencham, R., & Sutheerawattananonda, M. (2023). Storage stability and antioxidant activities of lutein extracted from yellow silk cocoons (*Bombyx mori*) in Thailand. *Heliyon*, 9(6). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e16805>
- Mora-Gutierrez, A., Attaie, R., Núñez de González, M. T., Jung, Y., Woldesenbet, S., & Marquez, S. A. (2018). Complexes of lutein with bovine and caprine caseins and their impact on lutein chemical stability in emulsion systems: Effect of arabinogalactan. *Journal of Dairy Science*, 101(1), 18–27. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13105>
- Nabi, B. G., Mukhtar, K., Ahmed, W., Manzoor, M. F., Ranjha, M. M. A. N., Kieliszek, M., Bhat, Z. F., & Aadil, R. M. (2023). Natural pigments: Anthocyanins, carotenoids, chlorophylls, and betalains as colorants in food products. *Food Bioscience*, 52. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102403>
- Pacheco, A. F. C., Nunes, N. M., de Paula, H. M. C., Coelho, Y. L., da Silva, L. H. M., Pinto, M. S., & Pires, A. C. dos S. (2020). β -Casein monomers as potential flavonoids nanocarriers: Thermodynamics and kinetics of β -casein-naringin binding by fluorescence spectroscopy and surface plasmon resonance. *International Dairy Journal*, 108. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104728>
- Paiva, P. H. C., Coelho, Y. L., da Silva, L. H. M., Pinto, M. S., Vidigal, M. C. T. R., & Pires, A. C. dos S. (2020). Influence of protein conformation and selected Hofmeister salts

- on bovine serum albumin/lutein complex formation. *Food Chemistry*, 305. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125463>
- Pushp, M., Arun Chaudhari, O., Vikegard, P., Blomqvist, P., Lönnemark, A., Nejad Ghafar, A., & Hedenqvist, M. (2023). Specific heat and excess heat capacity of grout with phase change materials using heat conduction microcalorimetry. *Construction and Building Materials*, 401. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2023.132915>
- Salazar-González, C., Fuenmayor, C. A., Díaz-Moreno, C., Stinco, C. M., & Heredia, F. J. (2023). Stability and shelf life modeling of natural colorant from bee pollen. *Food Packaging and Shelf Life*, 40. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2023.101169>
- Santa Rosa, L. N., Rezende, J. de P., Coelho, Y. L., Mendes, T. A. O., da Silva, L. H. M., & Pires, A. C. dos S. (2021). β -lactoglobulin conformation influences its interaction with caffeine. *Food Bioscience*, 44. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101418>
- Shi, H., Nolan, J. M., Flynn, R., & Prado-Cabrero, A. (2024). Beyond food colouring: Lutein-food fortification to enhance health. *Food Bioscience*, 59. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.104085>
- Shu, X., Zhang, L., Liao, W., Liu, J., Mao, L., Yuan, F., & Gao, Y. (2023). Nanostructured lipid carriers (NLCs) stabilized by natural or synthetic emulsifiers for lutein delivery: Improved physicochemical stability, antioxidant activity, and bioaccessibility. *Food Chemistry*, 403. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134465>
- Silva, C. E. L., Hudson, E. A., Agudelo, Á. J. P., da Silva, L. H. M., Pinto, M. S., do Carmo Hespanhol, M., Barros, F. A. R., & dos Santos Pires, A. C. (2018). β -Carotene and Milk Protein Complexation: a Thermodynamic Approach and a Photo Stabilization Study. *Food and Bioprocess Technology*, 11(3), 610–620. <https://doi.org/10.1007/s11947-017-2028-7>
- Silva, J. T. do P., Silva, A. C. da, Geiss, J. M. T., de Araújo, P. H. H., Becker, D., Bracht, L., Leimann, F. V., Bona, E., Guerra, G. P., & Gonçalves, O. H. (2017). Analytical validation of an ultraviolet–visible procedure for determining lutein concentration and application to lutein-loaded nanoparticles. *Food Chemistry*, 230, 336–342. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.059>
- Sindhu, E. R., Preethi, K. C., Kuttan, R. (2010). Antioxidant activity of carotenoid lutein in vitro and in vivo. *Indian Journal of Experimental Biology*, 48, 843–848. <https://www.researchgate.net/publication/49855487>
- Sobral, D., Bueno Costa, R. G., Machado, G. M., Jacinto de Paula, J. C., Martins Teodoro, V. A., Nunes, N. M., dos Santos Pires, A. C., & Pinto, M. S. (2016). Can lutein replace annatto in the manufacture of Prato cheese? *LWT*, 68, 349–355. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.12.051>
- Syamila, M., Gedi, M. A., Briars, R., Ayed, C., & Gray, D. A. (2019). Effect of temperature, oxygen and light on the degradation of β -carotene, lutein and α -tocopherol in spray-dried spinach juice powder during storage. *Food Chemistry*, 284, 188–197. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.055>

- Tongkanarak, K., Loupiac, C., Neiers, F., Chambin, O., & Srichana, T. (2024). Evaluating the biomolecular interaction between delamanid/formulations and human serum albumin by fluorescence, CD spectroscopy and SPR: Effects on protein conformation, kinetic and thermodynamic parameters. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 239. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2024.113964>
- Wang, Q., Tang, Y., Yang, Y., Zhao, J., Zhang, Y., Li, L., Wang, Q., & Ming, J. (2020). Interaction between wheat gliadin and quercetin under different pH conditions analyzed by multi-spectroscopy methods. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 229. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117937>
- Yagofarov, M. I., & Solomonov, B. N. (2023). Compensation relationship in thermodynamics of vaporization of aromatic and aliphatic compounds and their heat capacities. *Journal of Molecular Liquids*, 390. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2023.123075>
- Zare Karizak, A., Divsalar, A., Leilabadi Asl, A., Fateminasab, F., Shityakov, S., & Saboury, A. A. (2022). Molecular insights into the interaction of 5-fluorouracil and Fe₃O₄ nanoparticles with beta-casein: An experimental and theoretical study. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 267. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.120538>
- Zhang, J., Vincenzetti, S., Polidori, P., Polzonetti, V., Di Michele, A., Perinelli, D. R., Liu, G., Li, L., & Pucciarelli, S. (2024). The effects of pH, temperature, and buffer concentration on the self-assembling behavior, secondary structure, and surface hydrophobicity of donkey and bovine β -casein. *Food Chemistry*, 433. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137285>

6. CONCLUSÕES GERAIS

Este trabalho trouxe contribuições acerca da interação intermolecular entre o carotenoide luteína (LUT) e caseínas bovinas (α_s -CN_s, β -CN, e κ -CN). Os parâmetros termodinâmicos da interação LUT-caseínas bovinas foram determinados por meio da espectroscopia de fluorescência (FS), buscando-se elucidar os mecanismos de formação destes complexos. Baseando-se nestes parâmetros, como forma de analisar os possíveis efeitos dos complexos LUT-caseínas bovinas sobre a estabilidade química da LUT ao longo do tempo de vida útil de queijos, prosseguiu-se um estudo relacionado à capacidade antioxidante da LUT na ausência e presença das caseínas bovinas, e ao efeito protetor das caseínas bovinas contra a fotodegradação da LUT.

De acordo com a FS, verificou-se que o mecanismo de extinção da fluorescência é estático, e o processo de formação dos complexos é exotérmico, exceto para o complexo κ -CN-LUT em 293 até aproximadamente 299 K. A formação dos complexos

LUT-caseínas bovinas é entalpicamente conduzida, e os complexos apresentam estequiometria 1:1. As análises relacionadas à atividade antioxidante e fotodegradação obtiveram resultados positivos, no qual a interação da LUT com α_s -CNs e κ -CN manteve ou aumentou a atividade antioxidante da LUT contra o radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), enquanto a interação da LUT com β -CN exibiu um leve efeito inibitório nesta propriedade; e todas as caseínas bovinas protegeram a LUT contra a fotodegradação, melhorando sua estabilidade fotoquímica.

Portanto, conclui-se que os complexos formados por LUT e caseínas bovinas podem aumentar a estabilidade química da molécula de LUT. α_s -CNs, β -CN, e κ -CN demonstraram ser potenciais carreadores e estabilizadores da LUT, o que pode contribuir para manter as propriedades funcionais da LUT ao longo da vida útil de queijos, e melhorar a aplicação e eficácia da LUT em outros sistemas alimentícios ou farmacêuticos. Mais pesquisas poderiam investigar as aplicações práticas dessas descobertas e, assim, avaliar o desempenho destes complexos sob as condições termodinâmicas ideais identificadas neste trabalho.