

**LÍVIA NEVES SANTA ROSA**

**TERMODINÂMICA E CINÉTICA DE FORMAÇÃO DE COMPLEXOS  
SUPRAMOLECULARES SINTETIZADOS A PARTIR DA INTERAÇÃO ENTRE  
COMPOSTOS BIOATIVOS E BIOPOLÍMEROS**

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

Orientadora: Ana Clarissa dos Santos Pires

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2021**

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

T

Rosa, Livia Neves Santa, 1995-

R788t  
2021

Termodinâmica e cinética de formação de complexos supramoleculares sintetizados a partir da interação entre compostos bioativos e biopolímeros / Livia Neves Santa Rosa. – Viçosa, MG, 2021.

1 dissertação eletrônica (77 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Ana Clarissa dos Santos Pires.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2021.089>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Compostos bioativos. 2. Calorimetria. 3. Espectrometria de Fluorescência. 4. Termodinâmica. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. II. Título.

CDD 22. ed. 664.07

Bibliotecário(a) responsável: Renata de Fátima Alves CRB6/2578


LÍVIA NEVES SANTA ROSA

**TERMODINÂMICA E CINÉTICA DE FORMAÇÃO DE COMPLEXOS  
SUPRAMOLECULARES SINTETIZADOS A PARTIR DA INTERAÇÃO ENTRE  
COMPOSTOS BIOATIVOS E BIOPOLÍMEROS**

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: 19 de julho de 2021.

Assentimento:



---

Lívia Neves Santa Rosa  
Autora



---

Ana Clarissa dos Santos Pires  
Orientadora

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por me conduzir ao longo destes anos de estudo e pelo sustento em todos os momentos.

À minha família que torceu e rezou por mim, me incentivando sempre a continuar. Aos meus pais Vicente e Maria Aparecida, pelos sacrifícios que fizeram para que eu e meus irmãos tivéssemos uma boa educação e por todo o amor e confiança depositados em mim durante toda minha vida. Agradeço aos meus irmãos Hélder, Lílian e Liliane por todo o apoio e carinho dado. Em especial, agradeço à Liliane por se preocupar com minhas atividades do mestrado mesmo nos momentos mais difíceis. À minha sobrinha Helena, poder deixar meus dias mais leves e felizes.

À professora Ana Clarissa, pela orientação e conhecimentos compartilhados, pela amizade e pela compreensão dada nos momentos difíceis.

Ao professor Luis Henrique, pela coorientação, pelos conhecimentos compartilhados e por estar sempre disponível para ajudar no que fosse preciso.

À Dra. Jaqueline, por aceitar o convite para participar da banca de defesa e pelas valiosas contribuições para este trabalho

À Universidade Federal de Viçosa por me acolher como estudante e proporcionar o meu desenvolvimento profissional.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo. 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 CAPES – Brasil – Código de Financiamento 001.

Aos amigos do laboratório THERMA, pela amizade, por me acolherem e me auxiliarem no desenvolvimento do trabalho. Em especial agradeço à Jaqueline, Nayara, Rafaela e Talma por todo o apoio que me foi dado.

Ao grupo QUIVECOM, pela parceria nos trabalhos e disponibilização de equipamentos e reagentes.

Houve um atraso de 04 meses na defesa da dissertação devido às limitações impostas pela pandemia da COVID-19. Este atraso foi regulamentado pelo Ministério da Educação por meio da Portaria nº 544, de junho de 2020.

## RESUMO

ROSA, Livia Neves Santa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2021.  
**Termodinâmica e cinética de formação de complexos supramoleculares sintetizados a partir da interação entre compostos bioativos e biopolímeros.**  
Orientadora: Ana Clarissa dos Santos Pires.

A incorporação de compostos bioativos em formulações alimentares tem ganhado destaque na indústria devido às diversas funções que são capazes de desempenhar. Em geral, estes ativos são antioxidantes, antimicrobianos, anticancerígenos, pigmentam os alimentos ou são moléculas necessárias ao organismo humano. Dentre estes compostos de interesse se destacam a cafeína (CAF), a luteína (LUT) e o  $\beta$ -caroteno (BCR). Porém, apesar de seus inúmeros benefícios tecnológicos e na saúde humana, o uso destas moléculas é limitado na indústria de alimentos pois são moléculas de baixa solubilidade em meio aquoso ou sensíveis a degradação pela luz, calor e oxigênio como no caso da LUT e do BCR. Para que seja possível a veiculação destes ativos em alimentos, é necessário o uso de estratégias como a formação de complexos. Um complexo é formado por uma molécula de carreadora, que pode ser uma proteína como a  $\beta$ -lactoglobulina (BLG) ou um carboidrato como a  $\beta$ -ciclodextrina (BCD), e a molécula de interesse. Assim, uma abordagem interessante para o estudo destes complexos é a elucidação parâmetros cinéticos e termodinâmicos da formação de complexos. Neste trabalho a formação do complexo BLG-CAF foi elucidada pelas técnicas de espectroscopia de fluorescência (FS), calorimetria de titulação isotérmica (ITC) e docking molecular (MD). Os resultados obtidos mostraram que o complexo foi formado e que as diferenças entre as técnicas FS e ITC geram uma diferença na estequiometria do complexo (FS - 1:1, ITC - 1:3), enquanto que os modelos obtidos pelo docking molecular demonstram que o melhor modelo  $\Delta G_{MD}^{\circ} = (-20.38 \text{ kJ.mol}^{-1})$  está em concordância com a FS, mas que os dados obtidos pelo ITC também são válidos. Os resultados obtidos pela FS mostram ainda que a conformação da BLG altera a termodinâmica de interação com a CAF. Já a formação dos complexos BCD-BCR e BCD-LT foi avaliada pela técnica de ressonância plasmônica de superfície (SPR), em que foi verificada a formação de um complexo termodinamicamente estável entre o BCD e os carotenoides BCR e LT, com predominância da forma complexada sobre as formas livres ( $\Delta G_{SPR}^{\circ} < 0$ ). A taxa de associação para BCD-BCR foi mais rápida do que o complexo BCD-LT. Além disso, a formação do complexo BCD-BCR

foi entropicamente dirigida sugerindo que a interação ocorre por forças hidrofóbicas enquanto a formação do complexo BCD-LT foi conduzida entalpicamente principalmente devido à formação de ligações de hidrogênio. Um complexo intermediário é formado pela associação de ligantes livres ou dissociação do complexo estável para ambos os complexos. A partir dos resultados obtidos, nota-se que os complexos estudados podem ser utilizados para a incorporação destes compostos bioativos em matrizes de interesse e parâmetros cinéticos e termodinâmicos apresentados neste estudo podem contribuir para otimizar estas aplicações.

Palavras-chave: Nanocarreador. Compostos bioativos. Carotenoides. Cafeína. Proteína. Interação intermolecular.

## ABSTRACT

ROSA, Livia Neves Santa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2021. **Thermodynamics and kinetics of formation of supramolecular complexes synthesized from the interaction between bioactive compounds and biopolymers.** Adviser: Ana Clarissa dos Santos Pires.

The incorporation of bioactive compounds in food formulations has gained prominence in the industry due to the various functions they are capable of performing. In general, these actives are antioxidants, antimicrobials, anticancers, pigments in food or are molecules necessary for the human body. Some of these compounds of interest are caffeine (CAF), lutein (LUT) and  $\beta$ -carotene (BCR). However, despite their numerous technological and human health benefits, the use of these molecules is limited in the food industry as they are molecules of low solubility in aqueous systems or sensitive to degradation by light, heat and oxygen as in the case of LUT and BCR. In order to be able to apply these actives in food, it is necessary to use strategies such as the formation of complexes. A complex is formed by a carrier molecule, which can be a protein such as  $\beta$ -lactoglobulin (BLG) or a carbohydrate such as  $\beta$ -cyclodextrin (BCD), and the molecule of interest. Thus, an interesting approach to the study of these complexes is the elucidation of kinetic and thermodynamic parameters of complex formation. In this work, the formation of the BLG-CAF complex was elucidated by the techniques of fluorescence spectroscopy (FS), isothermal titration calorimetry (ITC) and molecular docking (MD). The results obtained showed that the complex was formed and that the differences between the FS and ITC techniques generate a difference in the stoichiometry of the complex (FS - 1:1, ITC - 1:3), while the models obtained by molecular docking demonstrate that the best model  $\Delta G_{MD}^{\circ} = (-20.38 \text{ kJ.mol}^{-1})$  is in agreement with the FS, but the data obtained by the ITC are also valid. The results obtained by FS also shows that the conformation of the BLG alters the thermodynamics of interaction with the CAF. The formation of BCD-BCR and BCD-LT complexes was evaluated by the surface plasmonic resonance (SPR) technique, in which the formation of a thermodynamically stable complex between BCD and the carotenoids BCR and LT was verified, with a predominance of the form complexed over free forms ( $\Delta G_{SPR}^{\circ} < 0$ ). The association rate for BCD-BCR was faster than for the BCD-LT complex. Furthermore, the formation of the BCD-BCR complex was entropically driven suggesting that the interaction occurs by hydrophobic forces while

the formation of the BCD-LT complex was driven enthalpically mainly due to the formation of hydrogen bonds. An intermediate complex is formed by the association of free ligands or dissociation of the stable complex for both complexes. From the results obtained, it is noted that the studied complexes can be used for the incorporation of these bioactive compounds in matrices of interest and kinetic and thermodynamic parameters presented in this study can contribute to optimize these applications.

Keywords: Nanocarrier. Bioactive compounds. Carotenoids. Caffeine. Protein. Intermolecular interaction.

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	9
REVISÃO DE LITERATURA.....	11
1. Beta-lactoglobulina (BLG).....	11
2. Cafeína (CAF).....	13
3. $\beta$ -ciclodextrina (BCD).....	14
4. $\beta$ -caroteno (BCR).....	16
5. Luteína (LT).....	17
6. Técnicas experimentais para o estudo das interações intermoleculares.....	19
6.1. Espectroscopia de Fluorescência (FS).....	19
6.2. Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR).....	22
6.3. Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC).....	25
6.4. Docking Molecular.....	27
7. Referências Bibliográficas.....	28
ARTICLE 1.....	33
ARTICLE 2.....	61
CONCLUSÕES GERAIS.....	76

## INTRODUÇÃO GERAL

Atualmente, compostos bioativos vêm ganhando destaque em indústrias como a alimentar e a farmacêutica, devido às suas inúmeras funções benéficas no organismo humano. Em geral, estes compostos possuem aplicação limitada pois, em sua maioria, são moléculas de baixa solubilidade em meio aquoso e sensíveis à degradação pela luz, oxigênio e temperaturas elevadas. Para que seja possível a veiculação destes ativos em alimentos e fármacos, é necessário o uso de algumas estratégias como a formação de complexos. Um complexo é formado por uma molécula carreadora, que pode ser uma proteína ou um carboidrato por exemplo, e a molécula de interesse.

Este projeto de mestrado fez uma ampla abordagem sobre a interação  $\beta$ -lactoglobulina-cafeína e sobre as interações  $\beta$ -ciclodextrina-luteína e  $\beta$ -ciclodextrina- $\beta$ -caroteno, para obter os parâmetros termodinâmicos relativos à formação dos respectivos complexos, além dos parâmetros cinéticos para o segundo e o terceiro sistema. O conhecimento a respeito das interações envolvidas na formação destes complexos é importante para a aplicação otimizada da cafeína, do  $\beta$ -caroteno e da luteína nas indústrias de alimentos e farmacêutica, tendo como objetivo manter suas propriedades funcionais ao longo da vida útil dos produtos e sua qualidade.

A cafeína é um derivado metilado da xantina, considerada uma molécula pequena, com propriedades hidrofílicas e lipofílicas fracas. Diversos estudos apontam que a cafeína possui atividade biológica, farmacológica e tecnológica. Ela é conhecida por sua ação como dilatadora de vasos sanguíneos e por excitar os nervos, aliviando enxaquecas, é responsável por efeitos como aumento do estado mental de alerta, clareza no pensamento, redução do sono e estímulo do músculo cardíaco. Além disso, tem sido utilizada como suplemento alimentar por atletas pois a cafeína melhora o desempenho em atividades físicas, permitindo a adaptação das células ao estresse causado pelo exercício. Sua solubilidade é limitada devido à auto associação de monômeros de cafeína por meio de interações hidrofóbicas em altas concentrações de cafeína. Assim, uma estratégia para aumentar a solubilidade da mesma é a formação de complexos com biomoléculas, como proteínas.

As proteínas do leite são amplamente utilizadas na indústria de alimentos devido à suas propriedades funcionais e qualidade nutricional. A  $\beta$ -lactoglobulina é uma proteína encontrada naturalmente no leite e é considerada a principal entre as

proteínas do soro. Ela pertence à classe das lipocalinas, proteínas que possuem a função de transporte, sendo capaz de interagir e transportar diversos ligantes hidrofóbicos e anfifílicos.

Apesar de haver um estudo que aborda a interação entre nanopartículas de  $\beta$ -lactoglobulina e a cafeína, não foram encontrados estudos a respeito termodinâmica de formação de complexo  $\beta$ -lactoglobulina-cafeína.

A luteína é um pigmento amarelo-laranja natural da classe das xantofilas. Ela se acumula em uma região pigmentada do olho chamada mácula, absorvendo a luz azul que atinge o olho, sendo efetiva no retardo da degeneração macular relacionada ao envelhecimento e no retardo da formação de catarata. O  $\beta$ -caroteno é um pigmento laranja-avermelhado da classe dos carotenos que possui função precursora da vitamina A. Ambos carotenoides possuem atividade antioxidante e efeito anti-inflamatório.

No entanto, as moléculas de luteína e  $\beta$ -caroteno possuem baixa solubilidade em meio aquoso, sendo necessário o uso de estratégias para sua utilização. Uma dessas possibilidades é formar um complexo com um carreador solúvel em água, como a  $\beta$ -ciclodextrina, que é capaz de receber e estabilizar moléculas hidrofóbicas em seu interior.

## REVISÃO DE LITERATURA

### 1. Beta-lactoglobulina (BLG)

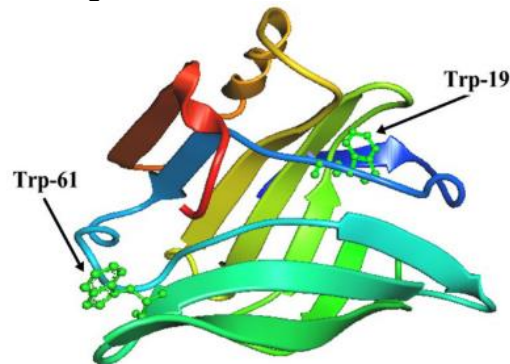
O leite é um alimento rico em macronutrientes, dentre os quais se destacam as proteínas. As proteínas presentes no leite geralmente são classificadas como caseínas e proteínas do soro, sendo o principal fator de diferenciação das mesmas o fato de as caseínas apresentarem estruturas flexíveis e desordenadas enquanto as proteínas do soro possuem estruturas globulares compactas (DICKINSON, 2001).

O grupo de proteínas do soro é constituído pela  $\alpha$ -lactoalbumina,  $\beta$ -lactoglobulina, albumina do soro, lactoferrina e algumas imunoglobulinas. A  $\beta$ -lactoglobulina (BLG) apresenta massa molar de aproximadamente 18,3 kDa, formada por 162 aminoácidos em sua estrutura primária, cujo ponto isoelétrico ocorre em  $\text{pH} \approx 5,35$  e é considerada a principal entre as proteínas do soro (FARRELL et al., 2004). Em pH fisiológico, a BLG encontra-se na forma de dímero (CROGUENNEC; O'KENNEDY; MEHRA, 2004).

A estrutura secundária da BLG é formada por 15% de  $\alpha$ -hélice, 50% de folhas  $\beta$  antiparalelas e 20% de estruturas em curvas (*reverse turn*). Em sua estrutura terciária possui um padrão estrutural central formado por uma  $\alpha$ -hélice e oito filamentos de folha  $\beta$  antiparalelas (VETRI; MILITELLO, 2005). Cinco cisteínas estão presentes na estrutura da BLG, havendo a formação de duas pontes dissulfeto (66-160 e 106-119) e de um grupo tiol livre (Cys121), que possuem papel na agregação e na desnaturação da proteína. Além da cisteína, outro aminoácido importante na estrutura da BLG é o triptofano, que se encontra presente nas posições 19 e 61 da cadeia peptídica, localizando-se na cavidade hidrofóbica e na superfície da proteína, respectivamente (SHAFAEI et al., 2017).

A Figura 1 mostra uma representação esquemática da molécula de  $\beta$ -lactoglobulina (3D):

Figura 1 - Estrutura 3D da  $\beta$ -lactoglobulina.



Fonte: KANAKIS et al. (2011)

Existem diversas variantes genéticas dessa proteína, mas as mais comuns são as variantes A e B. Elas diferem entre si apenas pela substituição de dois aminoácidos: o aminoácido 64, que para a variante A é um ácido aspártico, enquanto para a variante B é a glicina e o aminoácido 118, que se trata de uma valina para a variante A e uma alanina para a variante B (FARRELL et al., 2004). Essa pequena diferença estrutural é capaz de conferir diferentes características funcionais entre as duas variantes como, por exemplo, uma maior hidrofobicidade e uma maior eletronegatividade para a variante A (QIN et al., 1998).

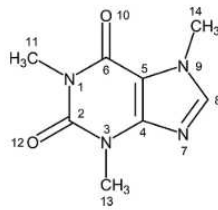
A BLG pertence à classe das lipocalinas, proteínas que possuem a função de transporte (SAWYER; KONTOPIDIS, 2000). É capaz de interagir e transportar diversos ligantes hidrofóbicos e anfífilos, como polifenóis, fosfolípidos, curcumina, vitamina D, colesterol, ácido fólico, retinol, entre outros (CHO; BATT; SAWYER, 1994; KANAKIS et al., 2011; LEFÈVRE; SUBIRADE, 2000; LIANG; SUBIRADE, 2010; MOHAMMADI et al., 2009; WANG; ALLEN; SWAISGOOD, 1997).

Uma das formas de se estudar a interação entre proteínas e moléculas ligantes é por meio da técnica de espectroscopia de fluorescência, na qual pode ser observada a supressão da intensidade de fluorescência a partir da adição de ligantes. Essa fluorescência que algumas proteínas apresentam é devida à fluorescência intrínseca de aminoácidos como o triptofano, a tirosina e a fenilalanina (LAKOWICZ, 2006). O Trp-19 é o principal responsável pela fluorescência intrínseca da proteína (SHAFAEI et al., 2017).

## 2. Cafeína (CAF)

A cafeína (CAF) é uma purina alcaloide, sendo um dos três derivados metilados da xantina, de massa molar é 194,2 g/mol cuja estrutura química é apresentada na Figura 2 (IBRAHIM et al., 2006; YOON; DANESH-MEYER, 2019). É considerada uma molécula pequena, com propriedades hidrofílicas e lipofílicas fracas (YOON; DANESH-MEYER, 2019).

Figura 2 - Estrutura química da molécula de cafeína.



Fonte: WANG et al. (2013).

A molécula de CAF possui grupos  $-CH_3$  e grupos capazes de realizar ligações de hidrogênio, fazendo com que sua termodinâmica de solução seja complexa. Sua estrutura limita a sua solubilidade em água devido à auto associação de monômeros por meio de interações hidrofóbicas em altas concentrações de CAF. Em soluções diluídas há interação CAF-água por meio de ligações de hidrogênio entre a água e grupos polares da molécula de cafeína, como o átomo de nitrogênio ou os grupos carbonil exocíclicos (IZA et al., 1988; MEJRI et al., 2009).

Essa auto agregação dos monômeros de CAF pode ser verificada por meio de espectroscopia no UV-vis e outras técnicas experimentais. Em pH 7,0, em soluções de concentração entre  $2,0 \times 10^{-4}$  M e  $1,0 \times 10^{-3}$  M há a formação de dímeros de CAF e acima desta faixa, há formação de polímeros devido à interação entre os dímeros de CAF (IZA et al., 1988).

A CAF está naturalmente presente em mais de 60 plantas e é encontrada em chás, café, guaraná, cacau e seus derivados (HARLAND, 2000; YANG et al., 2018). Ela é conhecida por seu gosto amargo característico (POOLE; TORDOFF, 2017).

Diversos estudos apontam que a CAF possui atividade biológica, farmacológica e tecnológica. Na farmacologia, a CAF é conhecida por sua ação como dilatadora de vasos sanguíneos e por excitar os nervos, aliviando enxaquecas. Mais recentemente tem-se estudado sobre o efeito anticâncer da cafeína (YANG et al., 2018). Além disso,

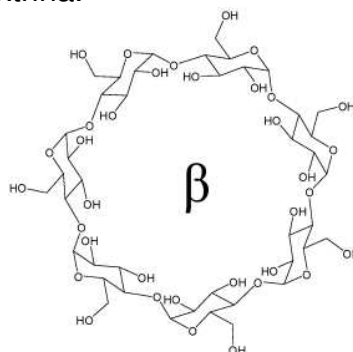
o consumo da CAF é responsável por efeitos como aumento do estado mental de alerta, clareza no pensamento, redução do sono e estímulo do músculo cardíaco (HARLAND, 2000). A CAF pode ser utilizada como suplemento alimentar para atletas pois possui a propriedade de aumentar a capacidade de trabalho físico e retardar a fadiga devido aumento da produção de catecolaminas plasmáticas, hormônios de resposta ao estresse físico, provocado após a sua ingestão, permitindo ao organismo se adaptar ao estresse causado pelo exercício físico (GUERRA; COELHO; GUTIÉRREZ, 2000).

Apesar de a molécula de CAF apresentar certa solubilidade em meio aquoso, uma estratégia para aumentar a solubilidade da mesma é a formação de complexos com biomoléculas, como proteínas. Além de contornar os problemas de solubilidade, a complexação com biomoléculas é capaz de reduzir a intensidade de percepção do gosto amargo da CAF. Apesar de haver um estudo que aborda a interação entre nanopartículas de BLG e a CAF (GUO et al., 2017), não foram encontrados estudos sobre a termodinâmica de interação entre a proteína e a cafeína. Assim, faz-se importante realizar a caracterização termodinâmica de formação do complexo BLG-CAF com o intuito de compreender os mecanismos pelos quais o complexo é formado.

### 3. $\beta$ -ciclodextrina (BCD)

A  $\beta$ -ciclodextrina (BCD) é um produto da digestão enzimática bacteriana do amido, descoberta em 1891 pelo cientista francês A. Villiers. É um oligossacarídeo cíclico constituído por unidades de D-glicopiranoose, ligadas através de ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$ -(1,4). A  $\beta$ -CD possui 7 unidades de glicose em sua estrutura, como observado na Figura 3 (BREWSTER; LOFTSSON, 2007).

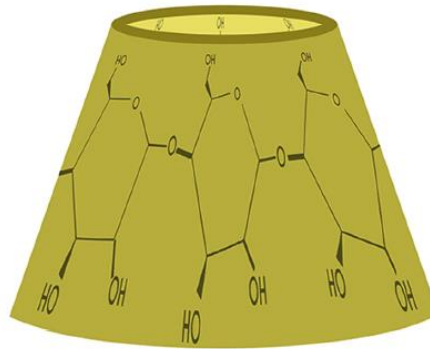
Figura 3 - Estrutura da  $\beta$ -ciclodextrina.



Fonte: MANAKKER et al. (2009)

Devido à conformação de cadeira da glicopiranosose, a BCD possui a forma de um cone truncado (um intermediário entre cone e cilindro, cuja representação pode ser visualizada na Figura 4). Os grupos hidroxilas orientados para o exterior do cone conferem características hidrofílicas à BCD. A cavidade central da molécula de ciclodextrina é constituída por grupos CH e um anel de átomos de oxigênio, conferindo ao seu interior características lipofílicas (BREWSTER; LOFTSSON, 2007).

Figura 4 - Representação da estrutura de cone truncado das ciclodextrinas.

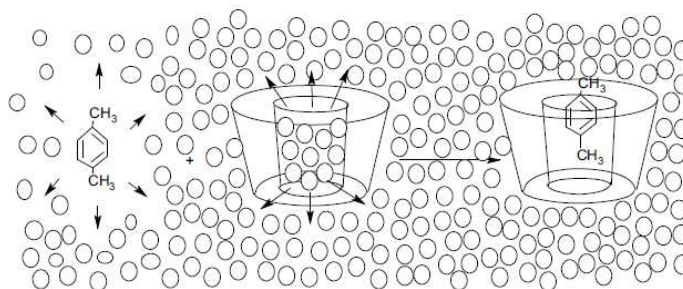


Fonte: VARAN et al. (2017)

Essa cavidade hidrofóbica fornece para a ciclodextrina a capacidade de receber moléculas hospedeiras, formando complexos de inclusão. Estas moléculas são de caráter hidrofóbico e seu tamanho deve ser pequeno o suficiente para caber no interior da cavidade (LI et al., 2014; VARAN et al., 2017). As ciclodextrinas podem ser utilizadas para veicular substâncias hidrofóbicas, fármacos que necessitam de liberação controlada no organismo, compostos bioativos sensíveis à degradação (ocasionada pela ação do oxigênio e luz, por exemplo), entre outros (VYAS; SARAF; SARAF, 2008).

A força motriz da complexação não é completamente compreendida, mas acredita-se que ela seja resultado de diversos efeitos: (a) substituição de uma interação energeticamente não favorável polar-apolar entre água e cavidade hidrofóbica, por uma interação apolar-apolar entre cavidade e hóspede, como apresentado na Figura 5; (b) interações de Van der Waals e ligações de hidrogênio entre a molécula e a cavidade (ASTRAY et al., 2009).

Figura 5 - Esquema da inclusão de p-xileno em ciclodextrina.



Fonte: ASTRAY et al. (2009)

Interações de Van der Waals, interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio são responsáveis por manter a ciclodextrina e seu hóspede unidos. Apesar das interações de Van der Waals terem papel importante na manutenção do complexo, acredita-se que seus efeitos são menores comparadas as outras interações. As ciclodextrinas possuem grandes momentos de dipolo, o que implica no fato de a força de indução não ser muito forte na complexação (LIU; GUO, 2002).

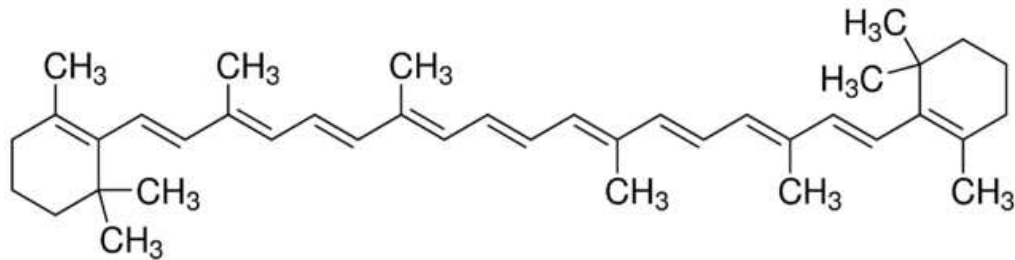
A maior evidência das interações hidrofóbicas entre as ciclodextrinas e as moléculas hóspedes é o fato de a maior parte apolar destas moléculas estar inclusa na cavidade hidrofóbica das ciclodextrinas (LIU; GUO, 2002).

O papel das ligações de hidrogênio na formação do complexo não é bem esclarecido, visto que algumas moléculas que podem complexar com ciclodextrinas não são capazes de formar ligações de hidrogênio, como é o caso do benzeno (ASTRAY et al., 2009).

#### 4. $\beta$ -caroteno (BCR)

O  $\beta$ -caroteno (BCR) é um carotenoide da classe dos carotenos, de pigmento laranja-avermelhado e massa molar igual a 536,83 g/mol, cuja estrutura química, apresentada na Figura 6, é composta por uma cadeia de hidrocarboneto com 11 ligações duplas conjugadas e um anel em cada uma de suas extremidades (APRODU; DUMITRAȘCU; STĂNCIUC, 2018; GRUNE et al., 2010).

Figura 6 - Estrutura química do  $\beta$ -caroteno.



Fonte: A autora

O BCR é o carotenoide mais importante da classe dos carotenos devido ao fato de ser um precursor da vitamina A e de retinol com alta taxa de conversão nestes compostos (GRUNE et al., 2010). Devido à sua conversão em vitamina A, está associado a uma redução significativa de mortalidade em crianças devido à deficiência da vitamina. Por meio de sua estrutura única com onze ligações duplas conjugadas, o BCR tem um alto potencial para eliminar espécies reativas de oxigênio, como radicais peróxidos ou moléculas de oxigênio singlete, sendo considerado um poderoso antioxidante. Parte deste carotenoide consumido em uma dieta normal se acumula na pele e a protege de forma eficiente dos danos induzidos pela luz ultravioleta, queimaduras solares e envelhecimento. Devido à sua condição de antioxidante, o BCR é capaz de proteger o organismo humano de outras doenças como o câncer e doenças cardíacas (EGGERSDORFER; WYSS, 2018; GRUNE et al., 2010).

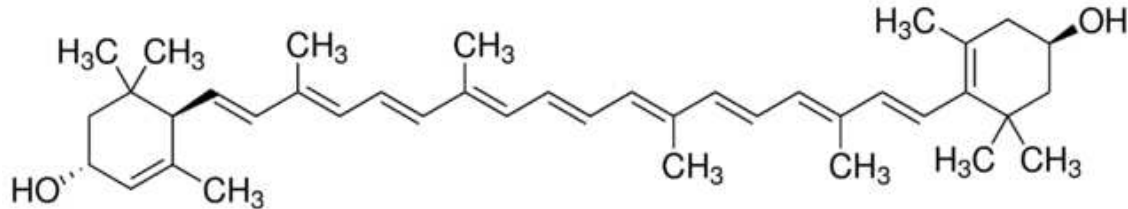
Apesar de ser uma molécula cuja aplicação é interessante em diversos sistemas alimentares, o fato de ser pouco solúvel em água, instável ao calor, oxigênio e luz, sua aplicação torna-se limitada, já que sua biodisponibilidade fica reduzida (FERNÁNDEZ-GARCÍA; PÉREZ-GÁLVEZ, 2017). Assim, tecnologias que aumentam a estabilidade e a solubilidade do BCR devem ser utilizadas para a aplicação do mesmo em formulações alimentares. Uma maneira eficiente de facilitar a incorporação é por meio da formação de complexos com moléculas carreadoras como as ciclodextrinas.

## 5. Luteína (LT)

A luteína (LT), um pigmento amarelo-laranja natural da classe das xantofilas (carotenoides oxigenados), cuja estrutura química é apresentada na Figura 7, apresenta massa molar de 568,87 g/mol (BOONNOUN et al., 2013). A LT geralmente

coexiste com a zeaxantina, outro carotenoide da classe das xantofilas do qual se difere pela posição das ligações duplas no anel hexenil e pela posição dos grupos metil na cadeia carbônica (KIJLSTRA et al., 2012).

Figura 7 - Estrutura química da luteína.



Fonte: A autora.

A luteína é naturalmente encontrada em flores de calêndula, gema de ovo e derivados, vegetais verdes folhosos, batata e milho (STEINER; MCCLEMENTS; DAVIDOV-PARDO, 2018). Apesar de ser sintetizada exclusivamente por espécies vegetais, a luteína é encontrada em humanos, devendo obrigatoriamente ser ingerida através de dieta (EGGERSDORFER; WYSS, 2018; GIORDANO; QUADRO, 2018; KIJLSTRA et al., 2012; STEINER; MCCLEMENTS; DAVIDOV-PARDO, 2018). O olho é a região do corpo humano em que há maior concentração de luteína. Ela se acumula em uma região pigmentada chamada mácula, absorvendo a luz azul que atinge o olho. Ela é efetiva no retardo da degeneração macular relacionada ao envelhecimento e no retardo da formação de catarata (KIJLSTRA et al., 2012; STEINER; MCCLEMENTS; DAVIDOV-PARDO, 2018).

Além de desempenhar funções na saúde ocular, a luteína também possui atividade antioxidante, sendo capaz de agir contra radicais livres e ser benéfica para a saúde humana como um todo (STEINER; MCCLEMENTS; DAVIDOV-PARDO, 2018). Devido à suas propriedades antioxidantes, a luteína também possui efeito anti-inflamatório (KIJLSTRA et al., 2012). Outra importante contribuição da luteína para a saúde humana é na fertilidade, no desenvolvimento fetal e infantil (EGGERSDORFER; WYSS, 2018; GIORDANO; QUADRO, 2018).

Existem evidências de que as moléculas de luteína formem agregados na presença de água devido à sua baixa solubilidade em meio aquoso. Estudos indicam que as moléculas de luteína interajam entre si, por meio de ligações de hidrogênio, formando dímeros ou oligômeros (ZSILA et al., 2001).

Devido à sua baixa solubilidade em meio aquoso, sua biodisponibilidade também se torna reduzida, sendo necessário o emprego de tecnologias que permitam a utilização da luteína em formulações alimentícias e fármacos. Uma dessas possibilidades é a formação um complexo entre a luteína e um carreador solúvel em água. As ciclodextrinas são muito utilizadas para este fim, visto que conseguem receber e estabilizar moléculas em seu interior (STEINER; MCCLEMENTS; DAVIDOV-PARDO, 2018).

Apesar de existirem diversos trabalhos que avaliam os efeitos da inclusão de luteína em  $\beta$ -ciclodextrina e seus derivados em parâmetros como por exemplo a solubilidade em água, não foram encontrados trabalhos que investigam a termodinâmica e a cinética da formação destes complexos.

## **6. Técnicas experimentais para o estudo das interações intermoleculares**

### **6.1. Espectroscopia de Fluorescência (FS)**

Diversas técnicas podem ser utilizadas para o estudo da interação entre proteínas e outras moléculas, dentre as quais se destaca a espectroscopia de fluorescência (FS). Esta é uma técnica efetiva para estudar interação entre proteínas e pequenas moléculas devido à sua sensibilidade, reprodutibilidade e conveniência. Os resultados obtidos revelam a afinidade entre as moléculas e as proteínas e ajudam a esclarecer os mecanismos através dos quais a interação ocorre (SHAHABADI; HADIDI, 2014).

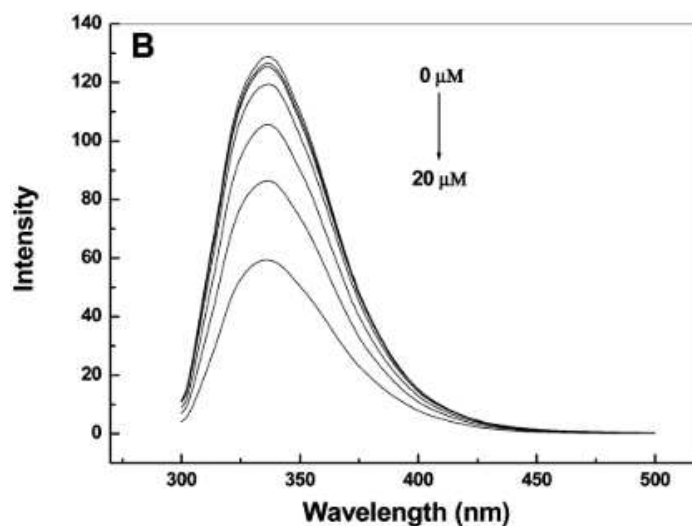
A FS pode ser utilizada para a caracterização termodinâmica da interação entre a BLG e a CAF pois a BLG apresenta uma fluorescência intrínseca, devido à presença de aminoácidos fluoróforos, como o triptofano (SHAFAEI et al., 2017; ZHANG et al., 2014).

A emissão de fluorescência é verificada quando elétrons que estão no estado singleto são excitados, mas não alteram sua orientação de spin, ou seja, continuam desemparelhados e não passam do estado singleto para um estado tripleto. Consequentemente, o retorno ao seu estado fundamental é permitido e ocorre via emissão de um fóton (LAKOWICZ, 2006).

A supressão da fluorescência se refere a qualquer processo que resulte em uma redução do rendimento quântico de fluorescência de um fluoróforo. A Figura 8

ilustra a supressão da intensidade de fluorescência de uma proteína com a adição de um ligante. Essa supressão ocorre por meio de uma variedade de interações com a molécula supressora. Em condições fixas de pH, força iônica e temperatura, a supressão da fluorescência pode ocorrer devido a formação de complexo entre o fluoróforo em seu estado fundamental e a molécula supressora (supressão estática) ou devido a uma extinção colisional (supressão dinâmica) (SHAHABADI; HADIDI, 2014; VAN DE WEERT; STELLA, 2011).

Figura 8 - Espectro de emissão de fluorescência de 10  $\mu\text{M}$  de BLG, excitada a 295 nm, na presença crescente de ácido fólico.



Fonte: LIANG; SUBIRADE (2010)

Outra possibilidade para a diminuição da intensidade de fluorescência é o efeito do filtro interno, no qual há absorção de luz no comprimento de onda de excitação ou emissão pelos compostos presentes na solução analisada. No caso de absorver no comprimento de excitação, menos luz atinge o centro da amostra e, portanto, a fluorescência do fluoróforo é diminuída. Quando a absorção ocorre no comprimento de emissão, há redução da luz emitida que atinge o detector, reduzindo assim a intensidade de fluorescência (VAN DE WEERT; STELLA, 2011). Este efeito deve ser corrigido para que a análise seja realizada da maneira correta.

Os mecanismos de supressão podem ser diferenciados pela sua dependência em relação a temperatura. Para a supressão dinâmica, temperaturas mais altas resultam em um alto coeficiente de difusão e há maior supressão colisional, portanto, os valores da constante de supressão biomolecular ( $K_q$ ) aumentam com o aumento da temperatura e o efeito inverso seria observado na supressão estática (ZHANG et

al., 2012). Para a constante de Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ), ou constante de taxa de supressão, os valores diminuem com o aumento da temperatura para a supressão estática e o efeito inverso ocorre para a supressão dinâmica (CHEN et al., 2008; NUNES et al., 2017).

Outra forma de identificar o mecanismo de supressão da fluorescência é por meio da análise do tempo de meia vida ( $\tau_0$ ). Para a supressão estática o tempo de meia vida não varia com tempo e decresce para a supressão dinâmica (PARAMAGURU et al., 2010). O mecanismo pode ainda ser identificado através do cálculo de  $K_q$ . Se este apresentar valores acima de  $2,0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , há indícios de que a supressão ocorra através da formação de complexos, pois este é o maior valor de  $K_q$  conhecido para a supressão dinâmica de fluorescência de biopolímeros (CHEN et al., 2008; NUNES et al., 2017).

A supressão da fluorescência pode ser descrita pela relação de Stern-Volmer, apresentada na Equação 1 (PARAMAGURU et al., 2010):

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

em que  $F_0$  e  $F$  representam as intensidades de fluorescência na ausência e presença da molécula supressora,  $K_q$  é a constante de taxa de supressão biomolecular,  $K_{SV}$  é a constante de supressão dinâmica de Stern-Volmer,  $\tau_0$  é o tempo de meia vida do fluoróforo na ausência da molécula supressora, sendo aproximadamente  $10^{-8} \text{ s}$  para proteínas, e  $[Q]$  é a concentração total da molécula supressora (NUNES et al., 2017).

Caso a formação de complexo entre a proteína e a molécula supressora seja confirmada, a constante de ligação ( $K_b$ ) e a estequiometria de formação de complexo ( $n$ ) podem ser determinadas por meio da curva de regressão logarítmica dupla modificada, Equação 2 (HUDSON et al., 2018; REZENDE et al., 2019).

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

em que  $F_0$  e  $F$  são as intensidades de fluorescência na ausência e presença da molécula inibidora,  $[Q]$  é a concentração total da molécula supressora e  $[P]$  é a concentração total da proteína. O valor de  $n$  corresponde à inclinação da curva log

$\frac{F_0 - F}{F}$  versus  $\log \frac{1}{([Q] - \frac{F_0 - F}{F_0})[P]}$ , e o valor de  $K_b$  é o antilogaritmo da razão intercepto/inclinação.

Com o valor de  $K_b$  é possível obter a variação da energia livre de Gibbs padrão de formação de complexo,  $\Delta G^\circ$ , por meio da Equação 3 (NUNES et al., 2017):

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

sendo R a constante universal dos gases (8,314 J/mol K) e T é a temperatura (K).

Para a determinação do termo entálpico é utilizada a equação de Van't Hoff (Equação 4), com os dados experimentais de intensidade de fluorescência realizado em diferentes temperaturas, seguido da análise do gráfico de  $\ln K_b$  versus  $1/T$ . O termo entrópico é então obtido por meio da Equação 5 (NUNES et al., 2017).

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

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

em que  $\Delta H^\circ$  (kJ/mol) é a variação da entalpia padrão de formação de complexo,  $\Delta S^\circ$  (kJ/mol) é a variação da entropia padrão de formação de complexo,  $K_b$  (L/mol) é a constante de ligação, T é a temperatura e R (8,314 J/mol K) é a constante universal dos gases.

Como a FS é uma técnica baseada na fluorescência dos resíduos de aminoácidos da proteína (triptofano, tirosina e fenilalanina), esta técnica é limitada a interações intermoleculares ocorrendo na vizinhança destes fluoróforos.

## 6.2. Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR)

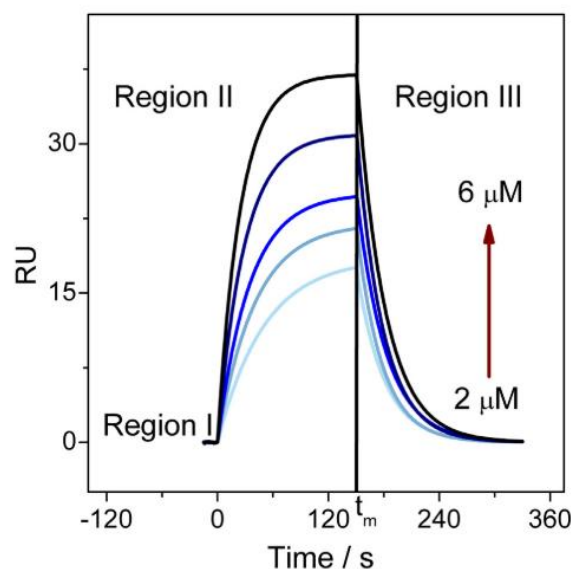
Desde que foi introduzida pela primeira vez no início dos anos 90, o SPR demonstrou ser uma das metodologias mais poderosas para determinar especificidade, afinidade e parâmetros cinéticos de interação de macromoléculas em diversos tipos de interações (incluindo proteína-proteína, DN-proteína, receptor-medicamento, polissacarídeo-proteína, entre outros) (NGUYEN et al., 2015).

Esta técnica óptica mede as alterações do índice de refração na vizinhança de finas camadas de metal (filmes de ouro, prata ou alumínio) em resposta a interações biomoleculares. As alterações no ângulo de refletividade mínima, podem ser determinadas variando o ângulo de incidência e registrando a intensidade da luz refletida durante a formação de interações entre várias biomoléculas (NGUYEN et al., 2015).

Antes que uma solução de amostra flua pela superfície de um chip sensor, agentes receptores são imobilizados em sua superfície (NGUYEN et al., 2015). Em um chip sensor CM5, cujo metal presente é o ouro, a imobilização da molécula carreadora ocorre através de um grupo amina (FATHI et al., 2016). Para moléculas carreadoras que não possuem grupo amina, como a BCD, deve ser realizada uma modificação em sua estrutura química (HAYASHI et al., 2010).

Em experimentos de SPR, unidades de ressonância ou de resposta (RU) são usadas para descrever a alteração do sinal, onde 1 RU é equivalente a uma mudança de ângulo crítico de  $10^{-4}$  graus. No início do experimento, enquanto as interações entre as moléculas não ocorreram, o valor inicial de RU corresponde ao ângulo crítico inicial. O sinal de resposta ressonante (RU), obtido em função do tempo após cada injeção da solução de moléculas bioativas sobre o chip sensor, origina um sensorgrama (NGUYEN et al., 2015). Um sensorgrama é apresentado na Figura 9.

Figura 9 - Sensorgrama para a interação  $\beta$ -lactoferrina-azul de metileno com a concentração variando de 2-6  $\mu$ M para o corante.



Fonte: COELHO et al. (2019).

A curva de um sensorgrama pode ser dividida em três regiões, como ilustrado na Figura 9. Na região 1, RU cresce durante a fase de associação devido à ligação e liberação simultânea do ligante sobre a molécula carreadora, com as interações intermoleculares ocorrendo em taxas mais elevadas. Na região 2, a associação e a dissociação das moléculas ocorrem em taxas semelhantes e as interações intermoleculares atingem um valor experimental máximo no tempo de ressonância ( $t_m$ ). Após este tempo, os valores de RU decrescem devido, principalmente, à dissociação do ligante com a molécula carreadora, causada pelo fluxo do tampão sobre o chip (região 3) (COELHO et al., 2019).

A interação pode ser considerada um processo descrito pelo esquema MC + L  $\leftrightarrow$  MC-L (em que MC se trata da molécula carreadora e L do ligante), que é um modelo de ligação monovalente com taxa de associação ( $K_a$ ) e taxa de dissociação ( $K_d$ ) (DE PAULA et al., 2017).

Para calcular a constante observada ( $K_{obs}$ ) e  $K_d$ , os sensorgramas obtidos podem ser ajustados às equações 6 e 7.

$$RU(t) = RU_{m\acute{a}x}(t_{\infty})[1 - e^{-K_{obs}(t)}] \quad (6)$$

$$RU(t) = RU(t_m) e^{-K_d(t-t_m)} \quad (7)$$

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

Em concentrações baixas de ligante, o valor de  $K_{obs}$  é linearmente dependente da concentração do ligante ( $[L]$ ), permitindo o cálculo de  $K_a$  pela inclinação da curva do gráfico de  $K_{obs}$  versus ( $[L]$ ), por meio da equação 8.

$$K_{obs} = K_a [L] + K_d \quad (8)$$

É possível a construir o gráfico de Arrhenius, plotando-se  $\ln K_a$  ou  $\ln K_d$  versus  $1/T$ , realizando-se este experimento em várias temperaturas. Por meio dele é determinada a energia de ativação ( $E_a$ ) de associação ou dissociação, para o processo de formação de complexo ativado (equação 9).

$$E_{a(y)}(T) = -R \left( \frac{d \ln K_{(y)}}{dT} \right) \quad (9)$$

em que “y” subscrito pode significar a fase de associação ou de dissociação.  $E_{a(y)}(T)$  é a energia de ativação (kJ/mol), R é a constante universal dos gases (8,3145 J/mol.K) e  $K_y$  é a constante de associação ( $K_a$ ) ( $M^{-1}.s^{-1}$ ) ou dissociação ( $K_d$ ) ( $s^{-1}$ ).

A partir da determinação do valor da  $E_{a(y)}$  são determinados os valores da variação da energia livre de Gibbs de ativação,  $\Delta G_y^\ddagger(T)$ , a variação da entalpia de ativação  $\Delta H_y^\ddagger(T)$  e a variação da entropia de ativação o  $T\Delta S_y^\ddagger$  para formação de complexo ativado a partir da associação de moléculas livres ou da dissociação do complexo, por meio das equações 10, 11 e 12, respectivamente.

$$\Delta G_y^\ddagger(T) = -RT \ln(k_y h / k_B T) \quad (10)$$

$$\Delta H_y^\ddagger(T) = E_{a(y)}(T) - RT \quad (11)$$

$$T\Delta S_y^\ddagger(T) = \Delta H_y^\ddagger(T) - \Delta G_y^\ddagger(T) \quad (12)$$

em que “y” subscrito pode significar a fase de associação ou de dissociação, h é a constante de Planck ( $6,62608 \times 10^{-34}$  J s) e  $k_B$  é a constante de Boltzmann ( $1,38066 \times 10^{-23}$  J K<sup>-1</sup>).

Os parâmetros termodinâmicos também podem ser determinados. A constante de interação ( $K_b$ ) é obtida por meio da equação 13:

$$K_b = \frac{K_a}{K_d} \quad (13)$$

A variação da energia livre de Gibbs padrão ( $\Delta G^\circ$ ), da entalpia padrão ( $\Delta H^\circ$ ), e da entropia padrão ( $T\Delta S^\circ$ ) de formação de complexo, pode ser calculada através das equações 3, 4 e 5.

### 6.3. Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC)

A ITC é uma das técnicas mais utilizadas para obter informações sobre a termodinâmica de formação de complexos pois ela permite obter diretamente a  $\Delta H^\circ$  de formação de complexo, eliminando o uso da equação de Van't Hoff que poderia

gerar incertezas no valor deste parâmetro (COELHO et al., 2019). Além disso, uma das principais características dos instrumentos modernos usados nesta técnica é a capacidade de medir fluxos de energia muito baixos, na ordem de  $0,1 \mu\text{J}\cdot\text{s}^{-1}$  (BURNOUF et al., 2012). Assim, a ITC pode ser considerado uma técnica sensível e confiável para descrever a termodinâmica de interações intermoleculares. A ITC é frequentemente utilizada para estudar as interações entre proteínas e ligantes mas pode ser utilizada também para o estudo de interações de diversos compostos bioquímicos como ácidos nucleicos, lipídios, carboidratos e outros compostos orgânicos (LINKUVIENĖ et al., 2016).

O experimento de ITC ocorre em duas etapas. Primeiramente uma solução aquosa contendo a molécula carreadora é preparada, degaseificada e adicionada à cela de amostra. A solução titulante, que contém o ligante, também é degaseificada e então carregada na seringa de injeção. Alíquotas desta solução são adicionadas à solução que está na cela de amostra. A cada injeção realizada, um pico é obtido, e a integração de todos os picos obtidos fornece a variação da entalpia observada ( $\Delta H_{obs}$ ). Na segunda etapa, é realizado um experimento de diluição substituindo a solução que contém o carreador pelo tampão que foi utilizado em seu preparo. A integração dos picos obtidos nesta etapa resulta na variação da entalpia de diluição ( $\Delta H_{dil}$ ). A variação da entalpia de interação aparente ( $\Delta H_{ap-int}$ ) é então calculada de acordo com a equação 14 (HUDSON et al., 2018):

$$\Delta H_{ap-int} = \frac{1}{n_i} (\Delta H_{obs} - \Delta H_{dil}) \quad (14)$$

em que  $n_i$  é o número de mols de ligante adicionado à cela de amostra em cada injeção.

Os valores de  $\Delta H_{ap-int}$  são plotados em função da razão molar entre carreador e ligante e os dados são então ajustados a um modelo matemático, descrito pela equação 15, para obter a constante de interação ( $K_b$ ), a estequiometria ( $n$ ) e a variação da entalpia padrão calorimétrica ( $\Delta H_{cal}^\circ$ ) de formação do complexo.

$$Q = \frac{V_c \Delta H_{cal}^\circ}{2K_b} \left[ 1 + K_b [CAF]_T + nK_b [BLG]_T - \sqrt{(1 + K_b [CAF]_T + nK_b [BLG]_T)^2 - 4nK_b^2 [CAF]_T [BLG]_T} \right] \quad (15)$$

Os demais parâmetros termodinâmicos podem ser obtidos usando as equações 3 e 5.

Além do fato de não utilizar a equação de Van't Hoff, outra vantagem da ITC em relação técnica de espectroscopia de fluorescência é o fato de que a supressão da fluorescência expressa apenas a interação entre um ligante e uma molécula carreadora ocorrendo próxima à região do fluoróforo, enquanto que a técnica de ITC contempla todas as interações que ocorrem nos sítios de interação da molécula carreadora. No caso de interação com proteínas, a supressão da fluorescência irá ocorrer apenas na presença de interações que ocorrem na região dos aminoácidos fluoróforos, como o triptofano (LELIS et al., 2017).

#### **6.4. Docking Molecular**

As técnicas de ITC, SPR e FS não oferecem informações a respeito de qual sítio de interação da proteína o ligante interage. Esse tipo de informação pode ser obtido através de predições moleculares, entre as quais se destaca o docking molecular (MD). Outra vantagem dessa simulação é a possibilidade de se obter parâmetros termodinâmicos sem a necessidade de realizar a interação, evitando os custos com reagentes e realização experimental da interação (MOBLEY; GILSON, 2017).

O MD se baseia na geração de milhares de possíveis posições em que pode ocorrer a interação entre carreador e ligante que são avaliadas por funções de scoring, responsáveis por guiar e determinar a posição do ligante. Isto é feito a partir da estrutura tridimensional da proteína e do ligante, que pode ser encontrada em banco de dados. Além de determinar o modo e local de ligação de um ligante a uma proteína, outro objetivo das funções de scoring é prever a afinidade de interação entre a proteína e o ligante (LI; FU; ZHANG, 2019).

Essas simulações podem ser realizadas por diferentes softwares, sendo os mais comuns o AutoDock, DOCK, FlexX, ICM, Sluflex, Affinity e o AutoDock Vina. Eles são baseados em diferentes métodos de avaliação e velocidade. Para interações entre proteínas e pequenos ligantes, o software AutoDock Vina se destaca por possuir elevada acurácia (78 %), alta velocidade de execução e isso gratuito. Este software é indicado para docking semiflexível, um dos três tipos de MD.

A flexibilidade do carreador é crucial durante o processo de MD, assim o MD pode ser dividido em três tipos de acordo com o grau de flexibilidade: docking rígido, docking semiflexível e docking flexível. O docking rígido significa que a conformação do sistema de docking (carreador e ligante) não muda. É adequado para grandes sistemas, como proteína-proteína e não requer cálculos múltiplos, tornando-o o método mais simples. No docking semiflexível, a conformação do carreador permanece fixa enquanto a conformação do ligante é alterada. É adequado para o docking de pequenas moléculas com macromoléculas, como proteínas. Já o docking flexível permite que a conformação do sistema de docking (receptor e ligante) seja prontamente modificada. Dado que as variáveis do receptor e do ligante aumentam em conjunto com o número de átomos, é necessário considerar vários fatores adicionais, assim o cálculo é substancial e o processo de encaixe é muito complicado (TAO et al., 2020).

Por ser uma técnica preditiva, o MD não substitui técnicas experimentais, devendo ser realizado em conjunto com estas técnicas para obter dados confiáveis sobre a localização e modo em que as interações intermoleculares ocorrem.

## 7. Referências Bibliográficas

APRODU, I.; DUMITRAȘCU, L.; STĂNCIUC, N. Thermal Stability of Carotenoids- $\alpha$ -Lactalbumin Complex. **Encyclopedia of Food Chemistry**, v. 2, p. 583–588, 2018.

ASTRAY, G. et al. A review on the use of cyclodextrins in foods. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 7, p. 1631–1640, 1 out. 2009.

BOONNOUN, P. et al. Supercritical anti-solvent micronization of chromatography purified marigold lutein using hexane and ethyl acetate solvent mixture. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 80, p. 15–22, 1 ago. 2013.

BREWSTER, M. E.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 7, p. 645–666, jul. 2007.

BURNOUF, D. et al. KinITC: A new method for obtaining joint thermodynamic and kinetic data by isothermal titration calorimetry. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, n. 1, p. 559–565, 2012.

CHEN, C. et al. Spectroscopic investigation of the interaction of bovine serum albumin with a novel cardiac agent V-09. **Spectroscopy**, v. 22, n. 1, p. 43–50, 2008.

CHO, Y.; BATT, C. A.; SAWYER, L. Probing the retinol-binding site of bovine  $\beta$ -lactoglobulin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 15, p. 11102–11107, 1994.

COELHO, Y. L. et al. Lactoferrin-phenothiazine dye interactions: Thermodynamic and kinetic approach. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 136, p. 559–569, 2019.

CROGUENNEC, T.; O'KENNEDY, B. T.; MEHRA, R. Heat-induced denaturation/aggregation of  $\beta$ -lactoglobulin A and B: kinetics of the first intermediates formed. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 5, p. 399–409, 1 maio 2004.

de PAULA, H. M. C. et al. Kinetics and thermodynamics of bovine serum albumin interactions with Congo red dye. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 159, p. 737–742, 1 nov. 2017.

DICKINSON, E. Milk protein interfacial layers and the relationship to emulsion stability and rheology. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 20, n. 3, p. 197–210, 1 mar. 2001.

EGGERSDORFER, M.; WYSS, A. Carotenoids in human nutrition and health. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 652, p. 18–26, 15 ago. 2018.

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, 1 jun. 2004.

FATHI, F. et al. Kinetic studies of bovine serum albumin interaction with PG and TBHQ using surface plasmon resonance. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 1045–1050, 1 out. 2016.

FERNÁNDEZ-GARCÍA, E.; PÉREZ-GÁLVEZ, A. Carotenoid: $\beta$ -cyclodextrin stability is independent of pigment structure. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1317–1321, 2017.

GIORDANO, E.; QUADRO, L. Lutein, zeaxanthin and mammalian development: Metabolism, functions and implications for health. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 647, p. 33–40, 1 jun. 2018.

GRUNE, T. et al. Betacarotene is an important vitamin A source for Humans. **The Journal of Nutrition**, v. 140, p. 2268S–2285S, 2010.

GUERRA, R. O.; COELHO, G. B.; GUTIÉRREZ, C. V. Archivos de Medicina del Deporte - Cafeína e esporte. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 6, p. 60–62, 2000.

GUO, Y. et al. Characterisation of  $\beta$ -lactoglobulin nanoparticles and their binding to caffeine. **Food Hydrocolloids**, v. 71, p. 85–93, 1 out. 2017.

HARLAND, B. F. Caffeine and nutrition. **Nutrition**, v. 16, n. 7–8, p. 522–526, 1 jul. 2000.

HAYASHI, N. et al.  $\beta$ -cyclodextrin/surface plasmon resonance detection system for sensing bitter-Astringent taste intensity of green tea catechins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 14, p. 8351–8356, 2010.

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

IBRAHIM, S. A. et al. Application of caffeine, 1,3,7-trimethylxanthine, to control *Escherichia coli* O157:H7. **Food Chemistry**, v. 99, n. 4, p. 645–650, 1 jan. 2006.

IZA, N. et al. Self-association of caffeine in aqueous solution. Study of dilute solutions by normal and second derivative UV absorption spectroscopy. **Journal of Molecular Structure**, v. 175, p. 25–30, 1 maio 1988.

KANAKIS, C. D. et al. Milk  $\beta$ -lactoglobulin complexes with tea polyphenols. **Food Chemistry**, v. 127, n. 3, p. 1046–1055, 1 ago. 2011.

KIJLSTRA, A. et al. Lutein: More than just a filter for blue light. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 31, n. 4, p. 303–315, 1 jul. 2012.

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

LEFÈVRE, T.; SUBIRADE, M. Interaction of  $\beta$ -lactoglobulin with phospholipid bilayers: a molecular level elucidation as revealed by infrared spectroscopy. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 28, n. 1, p. 59–67, 10 out. 2000.

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.

LI, J.; FU, A.; ZHANG, L. An Overview of Scoring Functions Used for Protein–Ligand Interactions in Molecular Docking. **Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences**, v. 11, n. 2, p. 320–328, 2019.

LI, Z. et al. Alpha-cyclodextrin: Enzymatic production and food applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 35, n. 2, p. 151–160, 1 fev. 2014.

LIANG, L.; SUBIRADE, M.  $\beta$ -lactoglobulin/folic acid complexes: Formation, characterization, and biological implication. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, n. 19, p. 6707–6712, 2010.

LINKUVIENĖ, V. et al. Isothermal titration calorimetry for drug design: Precision of the enthalpy and binding constant measurements and comparison of the instruments. **Analytical Biochemistry**, v. 515, p. 61–64, 2016.

LIU, L.; GUO, Q. X. The driving forces in the inclusion complexation of cyclodextrins. **Journal of Inclusion Phenomena**, v. 42, n. 1–2, p. 1–14, 2002.

MANAKKER, F. VAN DE et al. Cyclodextrin-Based Polymeric Materials : Synthesis, Properties and Pharmaceutical/Biomedical Applications. **Bio Macromolecules**, v. 10, n. 12, 2009.

MEJRI, M. et al. Hydration and self-association of caffeine molecules in aqueous solution: Comparative effects of sucrose and  $\beta$ -cyclodextrin. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 73, n. 1, p. 6–10, 1 jul. 2009.

MOBLEY, D. L.; GILSON, M. K. Predicting Binding Free Energies: Frontiers and Benchmarks. **Annual Review of Biophysics**, v. 46, p. 531–558, 2017.

MOHAMMADI, F. et al. Interaction of curcumin and diacetylcurcumin with the lipocalin member  $\beta$ -lactoglobulin. **Protein Journal**, v. 28, n. 3–4, p. 117–123, 2009.

NGUYEN, H. H. et al. Surface plasmon resonance: A versatile technique for biosensor applications. **Sensors (Switzerland)**, v. 15, n. 5, p. 10481–10510, 2015.

NUNES, N. M. et al. Interaction of cinnamic acid and methyl cinnamate with bovine serum albumin: A thermodynamic approach. **Food Chemistry**, v. 237, p. 525–531, 15 dez. 2017.

PARAMAGURU, G. et al. Interaction of anthraquinone dyes with lysozyme: Evidences from spectroscopic and docking studies. **Journal of Hazardous Materials**, v. 175, n. 1–3, p. 985–991, 15 mar. 2010.

POOLE, R. L.; TORDOFF, M. G. The Taste of Caffeine. **Journal of Caffeine Research**, v. 7, n. 2, p. 39–52, 2017.

QIN, B. Y. et al. Functional implications of structural differences between variants A and B of bovine  $\beta$ -lactoglobulin. **Protein Science**, v. 8, n. 1, p. 75–83, 1998.

REZENDE, J. DE P. et al. Thermodynamic and kinetic study of epigallocatechin-3-gallate-bovine lactoferrin complex formation determined by surface plasmon resonance (SPR): A comparative study with fluorescence spectroscopy. **Food Hydrocolloids**, v. 95, p. 526–532, 1 out. 2019.

SAWYER, L.; KONTOPIDIS, G. The core lipocalin, bovine  $\beta$ -lactoglobulin. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1482, n. 1–2, p. 136–148, 18 out. 2000.

SHAFAEI, Z. et al.  $\beta$ -Lactoglobulin: An efficient nanocarrier for advanced delivery systems. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 13, n. 5, p. 1685–1692, 1 jul. 2017.

SHAHABADI, N.; HADIDI, S. Molecular modeling and spectroscopic studies on the interaction of the chiral drug venlafaxine hydrochloride with bovine serum albumin. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 122, p. 100–106, 25 mar. 2014.

STEINER, B. M.; MCCLEMENTS, D. J.; DAVIDOV-PARDO, G. Encapsulation systems for lutein: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 82, p. 71–81, 1 dez. 2018.

TAO, X. et al. Recent developments in molecular docking technology applied in food science: a review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 1, p. 33–45, 2020.

VAN DE WEERT, M.; STELLA, L. Fluorescence quenching and ligand binding: A

critical discussion of a popular methodology. **Journal of Molecular Structure**, v. 998, n. 1–3, p. 144–150, 13 jul. 2011.

VARAN, G. et al. Amphiphilic cyclodextrin nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 531, n. 2, p. 457–469, 15 out. 2017.

VETRI, V.; MILITELLO, V. Thermal induced conformational changes involved in the aggregation pathways of beta-lactoglobulin. **Biophysical Chemistry**, v. 113, n. 1, p. 83–91, 1 jan. 2005.

VYAS, A.; SARAF, S.; SARAF, S. Cyclodextrin based novel drug delivery systems. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 62, n. 1–2, p. 23–42, 2008.

WANG, Q.; ALLEN, J. C.; SWAISGOOD, H. E. Binding of Vitamin D and Cholesterol to  $\beta$ -Lactoglobulin. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 6, p. 1054–1059, 1 jun. 1997.

WANG, W. et al. Investigation of the binding sites and orientation of caffeine on human serum albumin by surface-enhanced Raman scattering and molecular docking. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 115, p. 57–63, 1 nov. 2013.

YANG, H. et al. Synergistic cytotoxicity and mechanism of caffeine and lysozyme on hepatoma cell line HepG2. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 193, p. 169–174, 15 mar. 2018.

YOON, J. J.; DANESH-MEYER, H. V. Caffeine and the eye. **Survey of Ophthalmology**, v. 64, n. 3, p. 334–344, 1 maio 2019.

ZHANG, G. et al. Multispectroscopic studies on the interaction of maltol, a food additive, with bovine serum albumin. **Food Chemistry**, v. 133, n. 2, p. 264–270, 15 jul. 2012.

ZHANG, H. et al. Interaction of milk whey protein with common phenolic acids. **Journal of Molecular Structure**, v. 1058, p. 228–233, 24 jan. 2014.

ZSILA, F. et al. Investigation of the self-organization of lutein and lutein diacetate by electronic absorption, circular dichroism spectroscopy, and atomic force microscopy. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 105, n. 39, p. 9413–9421, 2001.

## ARTICLE 1

### $\beta$ -lactoglobulin conformation influences its interaction with caffeine

Article submitted to the journal *Food Bioscience*

#### **Abstract**

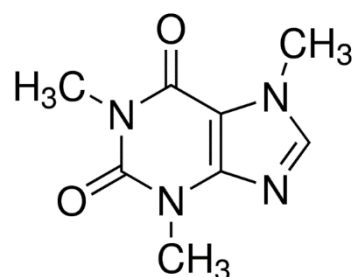
Caffeine is a molecule with bioactive properties related to increased mental performance. Its use in food products is limited by its bitterness and self-association behavior. The complex formed by  $\beta$ -lactoglobulin and caffeine was characterized by fluorescence spectroscopy, isothermal titration calorimetry, and molecular docking. Fluorescence spectroscopy revealed that  $\beta$ -lactoglobulin interacted with caffeine to form a 1:1 stoichiometric complex. Isothermal titration calorimetry characterization of  $\beta$ -lactoglobulin-caffeine binding revealed a different stoichiometry (1:3). Molecular docking analysis confirmed the information obtained by the two thermodynamic evaluation techniques, showing that the best interaction occurred in the hydrophobic cavity of  $\beta$ -lactoglobulin. The effect of protein conformation was also evaluated by fluorescence spectroscopy. The complex stoichiometry and binding constants were from the same order as those obtained for native  $\beta$ -lactoglobulin. However, in contrast to the complex formation with native protein, the flexibility increase observed in the thermal unfolded protein promoted a great temperature effect on the standard enthalpy and entropy changes of interaction, indicating the presence of a balance between hydrophobic and hydrophilic forces.

## Keywords

Bioactive compounds; protein thermodynamic binding; fluorescence spectroscopy; isothermal titration calorimetry; molecular docking.

## Introduction

Demand for natural and functional ingredients that contribute to increased mind alertness has increased recently. Caffeine (CAF, *Figure S1*), a methylated derivative of xanthine, is a small molecule (molar mass  $\approx 194.2 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) with weak hydrophilic and lipophilic properties. It is one of the most consumed bioactive agents in the world and is renowned for its ability increase mental performance (Seyedabadi et al., 2021; Yoon & Danesh-Meyer, 2019).



**Figure S1.** Chemical structure of caffeine.

Although CAF is soluble in aqueous systems, its solubility is limited due to the self-association of CAF monomers via hydrophobic interactions at high concentrations (between  $2.0 \times 10^{-4}$  and  $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) (Iza et al., 1988; Mejri et al., 2009). In addition, CAF has a bitter taste and excessive consumption may have adverse health effects on the nervous and cardiovascular systems (Seyedabadi et al., 2021). One way to overcome solubility problems, reduce the intensity of bitter taste perception, and promote slow release of CAF involves the formation of complexes with biomolecules, such as proteins. Nunes et al., (2020) evaluated the complex formed between bovine

lactoferrin and naringenin, a molecule with limited solubility in water and has a bitter taste, and found that the formation of the complex is capable of reducing bitterness and improving the solubility of naringenin.

$\beta$ -lactoglobulin (BLG) is a protein found naturally in milk. The molar mass of BLG is approximately 18,300 g.mol<sup>-1</sup>. It is comprised of antiparallel  $\beta$ -sheets and an internal core called the calyx (Ersöz & Dudak, 2020). BLG is a lipocalin. This class of proteins has transport functions. BLG can interact with and transport various hydrophobic and amphiphilic ligands, such as polyphenols, phospholipids, curcumin, cholesterol, folic acid, retinol, fatty acids, and quercetin (Ersöz & Dudak, 2020; Lefèvre & Subirade, 2000; Liang & Subirade, 2010; Mohammadi et al., 2009; Zhang et al., 2021).

Several techniques can be used to study the interactions between proteins and bioactive small molecules, such as the interaction between BLG and CAF. Fluorescence spectroscopy (FS) is a technique widely used to study the interactions that influence the fluorescence emission of a protein, thus allowing the determination of thermodynamic parameters of complex formation between molecules. However, its specificity can be a limiting factor, because it only assesses interactions that occur in the fluorophore region. For a broader binding analysis, it is important to compare the results obtained by FS with those obtained by other less restrictive techniques, such as isothermal titration calorimetry (ITC). Unfortunately, none of these techniques provide specific information about the binding site, such as the amino acid involved in the binding. Computational methods, such as molecular docking (MD), can provide this information very accurately (Nunes et al., 2020).

To the best of our knowledge, only one study to date has addressed the binding between BLG nanoparticles and CAF using FS (Guo et al., 2017). However, the study

did not evaluate the interaction thermodynamics or the effect of protein conformation on the BLF/CAF interaction.

Since knowledge of binding thermodynamics is fundamental to the development of efficient bioactive complexes, the aim of this study was to investigate the BLG/CAF binding process at pH 7.0. The BLG/CAF interaction was also evaluated using ITC and MD. We also evaluated the effect of conformational changes in BLG on its interaction with CAF by FS because protein conformation can play an important role in complex formation. Paiva et al. (2020) studied the binding of lutein with bovine serum albumin (BSA) and concluded that the conformation of BSA affected the interaction because, with protein denaturation, there was a greater exposure of hydrophobic groups, which allowed BSA to carry more lutein when compared to the native protein. Nunes et al. (2017), studied the interaction between cinnamic acid and methyl cinnamate with bovine serum albumin and found that the protein conformation can affect interactions as the formation of the complex became less favorable after the BSA denaturation. Hudson et al (2018), investigated the BSA/curcumin binding process. The enthalpy change values were more negative for the unfolded BSA/curcumin complex. This result can be attributed to the greater availability of OH groups in the protein when it is unfolded, as these groups can bind to the OH groups of curcumin by hydrogen bonds, and/or to a lower degree of desolvation associated with unfolded BSA/curcumin compared to the BSA/native curcumin interaction.

## Methods

### *Materials*

To prepare CAF and BLG solutions, a buffer solution (pH 7.0) was prepared with dibasic sodium phosphate and mono-hydrated sodium phosphate. BLG ( $\geq 90$  wt.%) and CAF ( $\geq 99$  wt.%) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

### *Fluorescence Spectroscopy (FS)*

The fluorescence measurements were carried out on an LS55 fluorescence spectrophotometer (Perkin Elmer Inc., Waltham, MA, USA) equipped with a thermostat bath, using quartz cells with a path length of 1 cm. In each cell, 2 mL of the BLG solution ( $5 \times 10^{-6}$  mol.L<sup>-1</sup>) at pH 7.0 was titrated by the addition of successive CAF aliquots to achieve CAF concentrations between 0 and  $7.25 \times 10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup>. Fluorescence spectra were obtained over a temperature range of 293–313 K. The excitation wavelength was 295 nm, and the emission spectra were recorded in the wavelength range of 296–500 nm. All experiments were performed in triplicate; the data were analyzed using the Stern-Volmer, van't Hoff, and Gibbs equations. The results are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation (Hudson et al., 2018; Paiva et al., 2020).

### *Isothermal Titration Calorimetry (ITC)*

ITC experiments were performed at 298 K using a TAM III microcalorimeter controlled by ITCRun software (TA Instruments, New Castle, DE, USA). All ITC experiments used the same buffer solutions (pH 7.0) previously used in fluorescence experiments. An aqueous BLG solution (pH 7.0,  $1 \times 10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup>) was prepared, degassed, and placed into the sample cell. The titration solution (CAF,  $1 \times 10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>) was loaded into the injection syringe. Fifty 10- $\mu$ L aliquots of CAF were added, at 30 min intervals, to the BLG solution (2.7 mL), with constant stirring at 180 rpm during addition of the aliquots. A similar procedure was performed for the dilution experiment. However, in this case, BLG was titrated with a pH 7.0 buffer lacking CAF. In addition, the buffer was titrated into the CAF solution to verify the thermal effect of the CAF dilution process.

The raw data obtained from a plot of heat flow vs. injection number were transformed using the instrument software to construct a plot of enthalpy change ( $\Delta H_{obs}$ ) vs. molar ratio. A similar curve was obtained in the dilution experiment, from which the dilution enthalpy change ( $\Delta H_{dil}$ ) was derived. Applying the  $\Delta H_{obs}$  and  $\Delta H_{dil}$  values to Equation 1, it was possible to obtain the apparent interaction enthalpy change ( $\Delta H_{ap-int}$ ):

$$\Delta H_{ap-int} = \frac{1}{n_i} (\Delta H_{obs} - \Delta H_{dil}) \quad (1)$$

where  $n_i$  is the number of moles of CAF added to the sample cell during each injection.

All experiments were carried out in triplicate and the relative errors were smaller than 3%.

#### *Molecular Docking (MD) analysis*

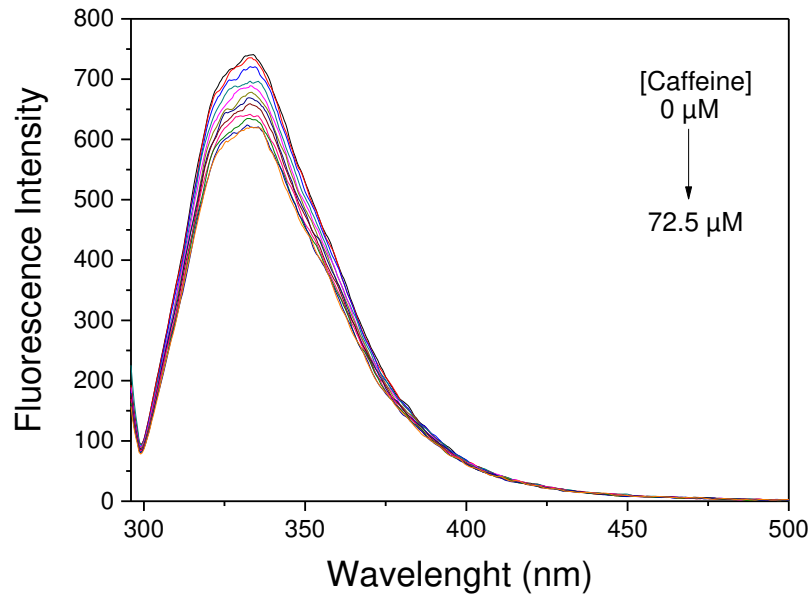
The X-ray diffraction structure of bovine BLG at a resolution of 2.50 Å (Wu et al., 1999) was retrieved from the RCSB Protein Data Bank (Burley et al., 2021) under accession number 1B0O. The mol2 file containing the three-dimensional structure of CAF with accession number ZINC1084 was recovered from the ZINC 15 database

(<https://zinc.docking.org/>) (Sterling & Irwin, 2015). The protein receptor and ligand were prepared using the AutoDockTools program (Morris et al., 2009) from the MGLTools release 1.5.6 package (<http://mgltools.scripps.edu/>) implemented in the PyRx–Virtual Screening Platform (Dallakyan & Olson, 2015). In this step, hydrogen atoms were added and the molecular charges were computed. The AutoGrid program from MGLTools was used to compute the grid maps based on the total structure of the protein. MD was performed using the AutoDock Vina program (Trott & Olson, 2009) with default parameters. Nine predicted binding models were produced and analyzed using Pymol version 2.4 (Rigsby & Parker, 2016). The electrostatic potential of BLG was calculated using the eF-surf web service (<https://pdj.org/eF-surf/top.do>) (Kinoshita & Nakamura, 2004).

## **Results and Discussion**

### *Thermodynamic binding parameters for BLG-CAF complex formation determined by FS*

Proteins are biopolymers that mostly show intrinsic fluorescence due to the presence of amino acid fluorophores in their structure, such as tryptophan (Trp), tyrosine, and phenylalanine (Zhang et al., 2014). FS enables the acquisition of information about the thermodynamic parameters of the interaction between molecules and the region of the protein in which the fluorophore is located. This occurs because the interaction can suppress the protein fluorescence intensity in a process called fluorescence quenching (Shahabadi & Hadidi, 2014). We observed that the fluorescence intensity of BLG decreased with the gradual addition of CAF (*Figure 1*).



**Figure 1.** Fluorescence emission spectra of BLG titrated with CAF ( $0\text{--}7.25 \times 10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup>) at pH 7.0 and 298 K.

BLG fluorescence occurs mainly because of Trp-19 (Albani et al., 2014). When excited at 295 nm, the fluorescence maximum emission peak ( $\lambda_{em-max}$ ) was approximately 333 nm at all CAF concentrations, indicating that the BLG-CAF interactions did not affect the microenvironment around Trp-19.

The process of fluorescence quenching can be classified according to its quenching mechanism. Dynamic quenching occurs due to collisions between the fluorophore and the quencher. In contrast, static quenching occurs via the formation of a non-fluorescent complex (Lakowicz, 2006). To elucidate the quenching mechanism, fluorescence data were analyzed using the Stern-Volmer equation (Equation 2):

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

where  $F_0$  and  $F$  are the fluorescence intensities of BLG before and after the addition of CAF, respectively,  $[Q]$  is the CAF concentration ( $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $K_{SV}$  is the Stern-Volmer constant,  $\tau_0$  is the average fluorescence lifetime of the quencher, and  $K_q$  is the biomolecular quenching constant.

The  $K_{SV}$  were determined by linear regression of the fluorescence intensities ( $F_0/F$  vs.  $[Q]$ ). Because  $\tau_0$  for biopolymers is  $\sim 10^{-8}$  s, the  $K_q$  values obtained were higher than  $2.0 \times 10^{11}$   $\text{L}\cdot\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$  at all the temperatures studied. For biopolymers, the maximum  $K_q$  value of various dynamic quenchers was  $2.0 \times 10^{10}$   $\text{L}\cdot\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$  (Chen et al., 2008), indicating that fluorescence quenching occurs via complexation between BLG and CAF. This conclusion is supported by the temperature dependence of  $K_{SV}$ . For static quenching, the Stern-Volmer constant decreases with increasing temperature (Lelis et al., 2017). The  $K_{SV}$  and  $K_q$  values for all the temperatures are listed in Table S1.

**Table S1.**  $K_{SV}$  and  $K_q$  values obtained by fluorescence studies for the formation of BLG-CAF complexes at five different temperatures and pH 7.0

T (K)	$K_{SV}$ ( $\times 10^3$ $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$ )	$K_q$ ( $\times 10^{11}$ $\text{L}\cdot\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$ )	$R^2$
293	2.97	2.97	0.99
298	2.74	2.74	0.98
303	2.74	2.74	0.99
308	2.37	2.37	0.97
313	2.06	2.06	0.98

Considering that a BLG-CAF complex was formed, the binding constants ( $K_b$ ) and stoichiometry ( $n$ ) of the complex were determined using the modified Stern-Volmer model (Equation 3):

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

where  $F_0$  and  $F$  are the fluorescence intensities of BLG before and after the addition of CAF, respectively,  $[Q_t]$  is the total CAF concentration ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), and  $[P]$  is the BLG concentration ( $\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ ). From the slope and intercept of the curve  $\log \frac{F_0 - F}{F}$  versus  $n \log \frac{1}{([Q_t] - \frac{F_0 - F}{F_0})[P]}$ , the  $n$  and  $K_b$  values, respectively, were obtained.

From the  $K_b$  values, the standard Gibbs free energy change ( $\Delta G_F^\circ$ ) values were determined as follows (Equation 4):

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

The  $K_b$ ,  $n$  and  $\Delta G_F^\circ$  values are listed in Table 1.  $K_b$  values ranged from 3.3 to  $2.45 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$  as the temperature increased from 293 to 313 K. These findings indicated that the BLG-CAF complex formation was an exothermic process and that fewer complexes were formed at higher temperatures. The complex stoichiometry for BLG-CAF was  $\sim 1.0$  for all temperatures studied, indicating that one CAF molecule bound to each BLG. The negative  $\Delta G_F^\circ$  showed that, in the equilibrium, there were more complexes than the free CAF and BLG molecules. In addition, it was possible to affirm

that BLG-CAF complex formation improves the stability of both molecules (Rezende et al., 2019).

**Table 1.** Thermodynamic parameters obtained by FS for the formation of BLG-CAF complex at five different temperatures and pH 7.0

T	$K_b$ <sup>a</sup>	$n$	R <sup>2</sup>	$\Delta G_F^\circ$ <sup>b</sup>	$\Delta H_F^\circ$ <sup>b</sup>	$T\Delta S_F^\circ$ <sup>b</sup>	$\Delta C_p^\circ$	R <sup>2</sup>
293	3.30	0.99	0.98	-19.74	-14.79	4.94	-0.21	
298	2.90	0.98	0.99	-19.76	-15.06	4.70	0.22	
303	2.78	0.99	0.99	-19.97	-12.78	7.19	0.64	0.94
308	2.46	0.97	0.97	-20.00	-8.21	11.79	1.07	
313	2.45	0.98	0.98	-20.31	-1.56	18.75	1.50	

<sup>a</sup>  $10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$

<sup>b</sup>  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$

Several types of intermolecular forces are involved in complex formation between proteins and small ligands. These include hydrophobic, van der Waals, hydrogen bonds, and electrostatic interactions (Shahabadi & Hadidi, 2014). An understanding of the main forces driving the BLG-CAF complex formation can help to optimize the conditions for the use of the complex in food, cosmetic, and pharmaceutical formulations. To determine the driving forces for the BLG-CAF complex formation, the  $\Delta G_F^\circ$  components of standard enthalpy change ( $\Delta H_F^\circ$ ), and standard entropy change ( $\Delta S_F^\circ$ ) were determined.

The standard enthalpy change for complex formation was calculated at each studied temperature using the non-linear van't Hoff approach (Equation 5). The experimental data of  $\ln K_b$  vs.  $1/T$  were fit in Equation 6 to obtain the parameters a, b,

c, and d. These parameters were used to determine the  $\Delta H^\circ$  values using Equation 7. Finally, the standard entropy change was calculated using the fundamental Gibbs equation (Equation 8):

$$\Delta H^\circ = -R \frac{\partial \ln K_b}{\partial 1/T} \quad (5)$$

$$\ln K_b = a + b(1/T) + c(1/T)^2 + d(1/T)^3 + \dots + \ln \varphi \quad (6)$$

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

$$\Delta G_F^\circ = \Delta H_F^\circ - T\Delta S_F^\circ \quad (8)$$

where  $a$ ,  $b$ ,  $c$ ,  $d$  and  $\ln \varphi$  are constants graphically determined by polynomial adjustment,  $\Delta H_F^\circ$  (kJ.mol<sup>-1</sup>) is the standard enthalpy change,  $\Delta S_F^\circ$  (kJ.mol<sup>-1</sup>) is the standard entropy change,  $K_b$  (L.mol<sup>-1</sup>) is the binding constant, and  $T$  is the temperature.

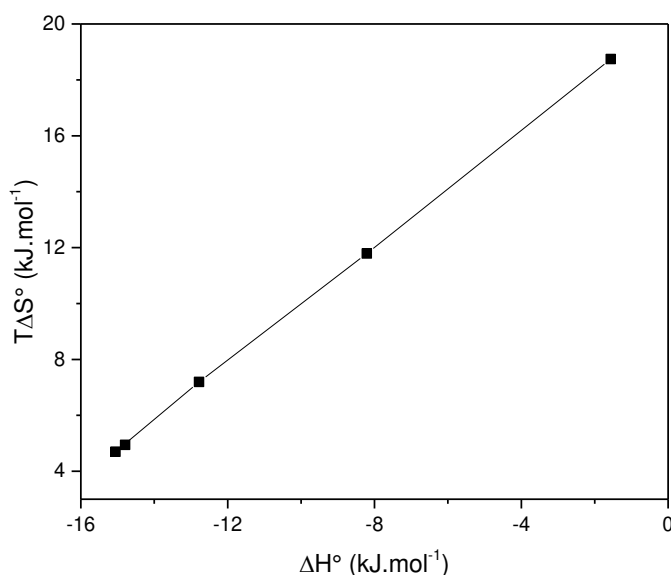
The negative values of  $\Delta H_F^\circ$  and positive values of  $T\Delta S^\circ$  indicated that complex formation was entropically and enthalpically driven, respectively. Both  $\Delta H_F^\circ$  and  $\Delta S_F^\circ$  can be described as the result of the contribution of three molecular processes: desolvation of interacting molecules, conformational change of the protein, and interaction between protein and ligand (Lelis et al., 2020). Negative  $\Delta H_F^\circ$  values indicate that more energy was released during the BLG-CAF interaction process than was absorbed during breaking of H<sub>2</sub>O-BLG and H<sub>2</sub>O-CAF interactions and during BLG and CAF conformational changes. However, with increasing temperature, the  $\Delta H_F^\circ$  values became less negative, indicating that desolvation and/or conformational changes may

overcome BLG-CAF interactions. Since the fluorescence spectra indicate that conformational changes were negligible, we could conclude that water desolvation from the BLG and CAF layers became relevant at higher temperatures.

The entropic gain can be explained by the increased degree of freedom of water molecules that were released from the solvation of protein and CAF molecules during the interaction. Interestingly, the  $T\Delta S_F^\circ$  values increased with increasing temperature, corroborating the fact that the desolvating effect increased with increasing temperature.

Although  $\Delta H_F^\circ$  and  $T\Delta S_F^\circ$  values changed at approximately the same rate as the temperature increased, the  $\Delta G_F^\circ$  values were almost independent of temperature, suggesting the existence of an enthalpy-entropy compensation (EEC) for BLG-CAF complexes. EEC is a way to optimize the thermodynamic process by minimizing the Gibbs free energy. The plot of  $T\Delta S_F^\circ$  vs.  $\Delta H_F^\circ$  (*Figure S2*) provided a slope close to unity ( $\alpha = 1.039$ ;  $R^2 = 0.9999$ ), indicating the occurrence of the EEC phenomenon. EEC in a complex formation process is generally related to the desolvation of free molecules and conformational changes induced by intermolecular interactions (Nunes et al., 2019). In this study, there was no evident conformational change in the microenvironment around Trp-19, because no displacement was found in the  $\lambda_{em-max}$  (333 nm). The increasing  $\Delta H_F^\circ$  and the  $T\Delta S_F^\circ$  values indicated the role of desolvation in the BLG-CAF complex formation. Therefore, in this case, EEC was caused by desolvation instead of conformational changes. The binding between water molecules and BLG and CAF was broken, consuming energy. However, the released water molecules gained a high degree of freedom, increasing the entropy (Coelho et al., 2019). Hence, for the BLG-CAF complex formation, the entropic term becomes more

positive, while the enthalpic term becomes less negative, with a compensation that guarantees the lowest Gibbs free energy for the process.



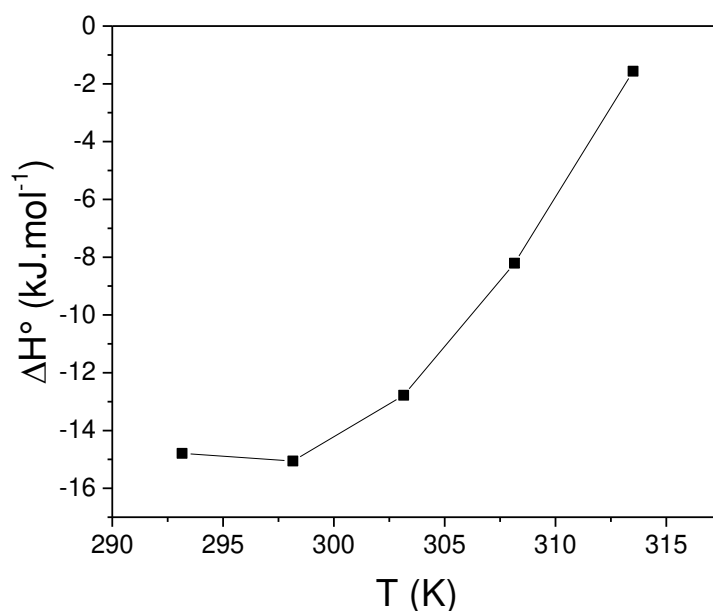
**Figure S2.** Plot of  $T\Delta S^\circ$  vs.  $\Delta H^\circ$  for the formation of BLG-CAF complexes.

From the slope of the  $\Delta H_F^\circ$  versus  $T$  plot (*Figure S3*), the standard heat capacity change ( $\Delta C_p^\circ$ ) values for the process of BLG-CAF complex formation were calculated, and the values are listed in Table 2.  $\Delta C_p^\circ$  is the difference between the  $C_p^\circ$  values of the free molecules and the BLG-CAF complex (Equation 9):

$$\Delta C_p^\circ = C_p^\circ(\text{BLG-CAF}) - (C_p^\circ(\text{BLG}) + C_p^\circ(\text{CAF})) \quad (9)$$

The  $\Delta C_p^\circ$  values arise from the contribution of two molecular processes: the desolvation of BLG and uncomplexed CAF and the new intermolecular interaction present in the complex. The negative values of  $\Delta C_p^\circ$  at 293 K indicated that the intensity and number of intermolecular interactions resulting from BLF-CAF complex formation

are lower than those of the intermolecular interactions present in the free interacting molecules. This decrease in intermolecular interaction potential energy could be attributed to the domination of the desolvation process. At low temperatures, water molecules solvating free interacting molecules are more structured than water molecules in the bulk, producing H<sub>2</sub>O-H<sub>2</sub>O intense H bonds on the solvation shell. The difference in the structuration of water molecules in the solvation shell of the interacting molecules and in the bulk was greater than at higher temperatures. In contrast, above 298 K, new intermolecular interactions formed in the BLG-CAF complex dominated the potential energy of the system, making the  $\Delta C_p^\circ$  values positive.



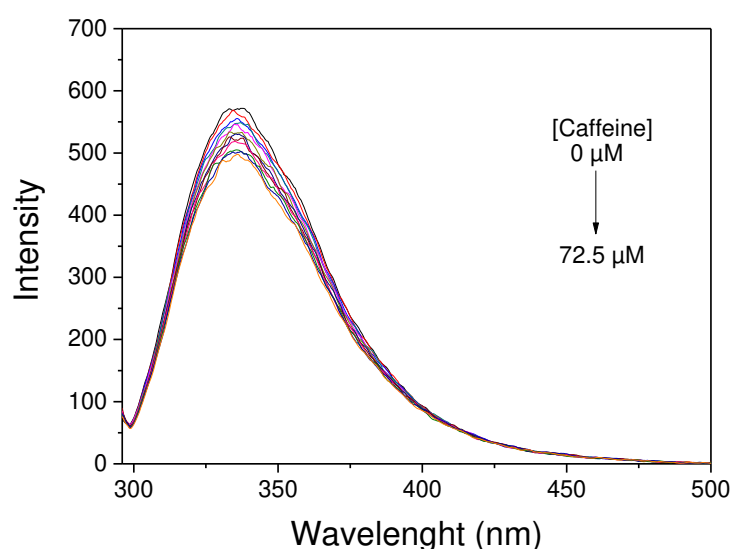
**Figure S3.** Relationship between  $\Delta H^\circ$  and T for the BLG-CAF complex at pH 7.0.

#### *Influence of protein conformation on BLG/CAF binding*

Thermal treatment, which is extensively used in the food industry, can cause loss of tertiary and secondary structures (Croguennec et al., 2004). The protein structure is responsible for the functional properties of biopolymers. Hence, it is

fundamentally important to study the binding properties of unfolded BLG (BLG<sub>den</sub>) and bioactive molecules, such as CAF.

The fluorescence maximum emission peak of the pure denatured BLG solution, as well as in the BLG-CAF mixture, was ~334 nm (*Figure S4*), similar to that of the native protein  $\lambda_{em-max}$ . This finding indicated that the Trp-19 microenvironment was not changed, despite protein unfolding or interaction with CAF.

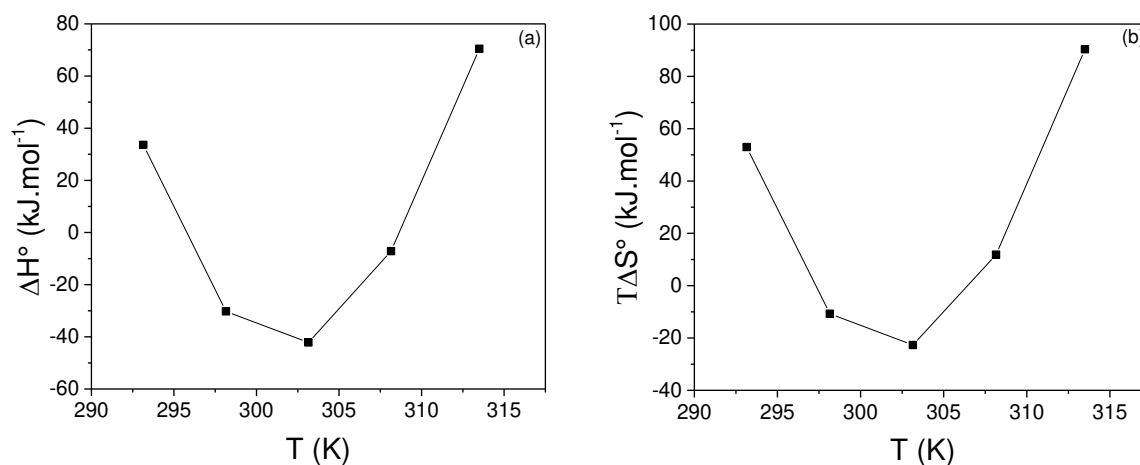


**Figure S4.** Fluorescence emission spectra of unfolded BLG titrated with CAF (0–7.25  $\times 10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup>) at pH 7.0 and 298 K.

The intrinsic fluorescence intensity of BLG<sub>den</sub> was quenched by the progressive addition of CAF (Fig. S4). The  $K_q$  values obtained were 12–13 times higher than  $2.0 \times 10^{10}$  L.mol.s<sup>-1</sup>, indicating that the fluorescence quenching was due to BLG<sub>den</sub>-CAF complex formation. The  $K_b$  values were of the same order as those obtained for the interaction between BLG-CAF, ranging from 2.86 to  $2.12 \times 10^3$  L.mol<sup>-1</sup>. The BLG<sub>den</sub>-CAF complex stoichiometry was also maintained at ~1.0 at all the studied

temperatures, indicating that the influence of protein conformation on the stoichiometry was almost negligible.

The negative  $\Delta G_{den,F}^{\circ}$  values indicate that equilibrium  $BLG_{den} + CAF \rightleftharpoons BLG_{den}-CAF$  favored complex formation. However, unlike the formation of BLG-CAF complexes, which was enthalpically and entropically driven at all the studied temperature ranges, the BLGden-CAF complex formation showed a second-order polynomial behavior in terms of  $\Delta H_{den,F}^{\circ}$  and  $T\Delta S_{den,F}^{\circ}$  values (Figure S5). This finding indicated that there was a balance between the hydrophobic and hydrophilic forces as the temperature changed.



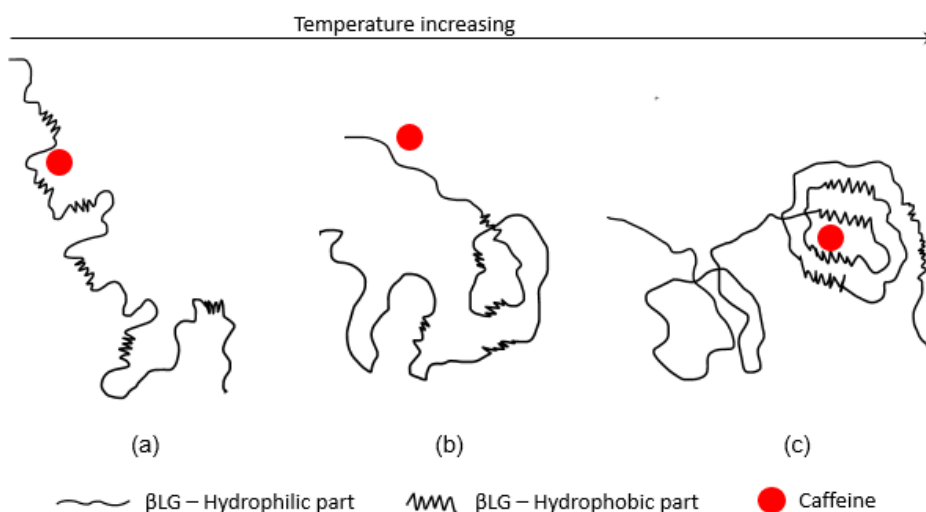
**Figure S5.** Relationship of (a)  $\Delta H_{den,F}^{\circ}$  versus T and (b)  $T\Delta S_{den,F}^{\circ}$  versus T for the  $BLG_{den}-CAF$  complex at pH 7.0.

At low temperatures up to 294.2 K, the system contains less energy. Hence, the flexible unfolded protein tended to organize itself in a linear manner (Figure S6a) because most of its C-C bonds are in the *trans* conformation (da Silva & Loh, 2000). As a result of this linear form, there was more exposure to hydrophobic amino acids. Additionally, at low temperatures, the water molecules are more structured in the bulk

and the solvation layers of the interacting molecules. Therefore, under these conditions, CAF interacted with the hydrophobic regions of BLG<sub>den</sub> (Figure S6a), increasing the  $\Delta H_{den,F}^{\circ}$  and  $T\Delta S_{den,F}^{\circ}$  values. This allowed the hydrophobic forces to overcome the hydrophilic forces.

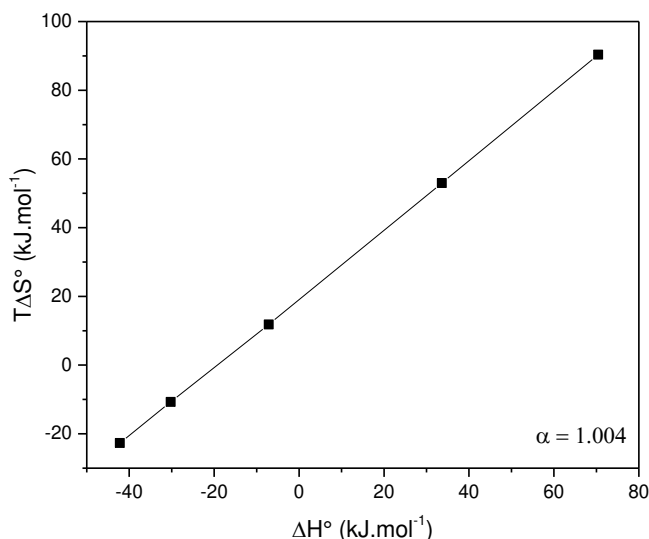
When the temperature increased from 294.3 to 310.6 K, many C-C bonds were converted from the *trans* to *cis* form. Thus, the hydrophobic BLG<sub>den</sub> region was partially folded *via* intramolecular interactions, making hydrophobic sites unavailable for interaction with CAF. Therefore, CAF interacted with the BLG<sub>den</sub> hydrophilic sites (Figure S6b; negative  $\Delta H_{den,F}^{\circ}$  and  $T\Delta S_{den,F}^{\circ}$  values). Consequently, the hydrophilic forces dominated the hydrophobic forces.

Finally, at  $T > 310.7$  K, more C-C was converted to the *cis* form, resulting in partial folding that also comprises the hydrophilic part of the protein. In the hydrophilic regions, intramolecular H-bonds were formed. In the hydrophobic regions, a hydrophobic cavity capable of binding CAF was formed (Figure S6c). Therefore, the hydrophobic forces prevailed again.



**Figure S6.** Schematic of the interaction of the CAF molecule with the BLG molecule in (a) the hydrophobic region of the protein, (b) the hydrophilic region of the protein, and (c) in the hydrophobic cavity formed in the protein.

As observed for BLG-CAF complex, ECC for the BLG<sub>den</sub>-CAF complex formation was evident (*Figure S7*). This finding indicated that for each gain/release enthalpic there was a gain/release of entropy in the same magnitude in order to minimize the thermodynamic potential (Pan et al., 2015).



**Figure S7.** Plot of  $T\Delta S^\circ$  versus  $\Delta H^\circ$  for the formation of BLG<sub>den</sub>-CAF complexes.

The  $\Delta C_p^\circ$  obtained when the protein was unfolded ( $\Delta C_{p(den)}^\circ$ ) ranged from  $-16.37$  to  $19.68$   $\text{kJ.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$  (*Figure S5a*). At temperatures below 302 K, the  $\Delta C_{p(den)}^\circ$  values were negative because  $(C_{p(\beta LGden)}^\circ + C_{p(CAF)}^\circ) > C_{p(CAF-\beta LGden)}^\circ$ . This is because of the desolvation effect induced by hydrophobic interactions occurring at low temperatures (Rezende et al., 2020). However,  $\Delta C_{p(den)}^\circ$  became less negative with increasing temperature because more hydrophilic interactions occurred. At 302 K,  $\Delta C_{p(den)}^\circ$  became positive because more BLG intramolecular interactions occurred, changing the protein conformation, and consequently, providing more potential energy to the system (Rezende et al., 2020).

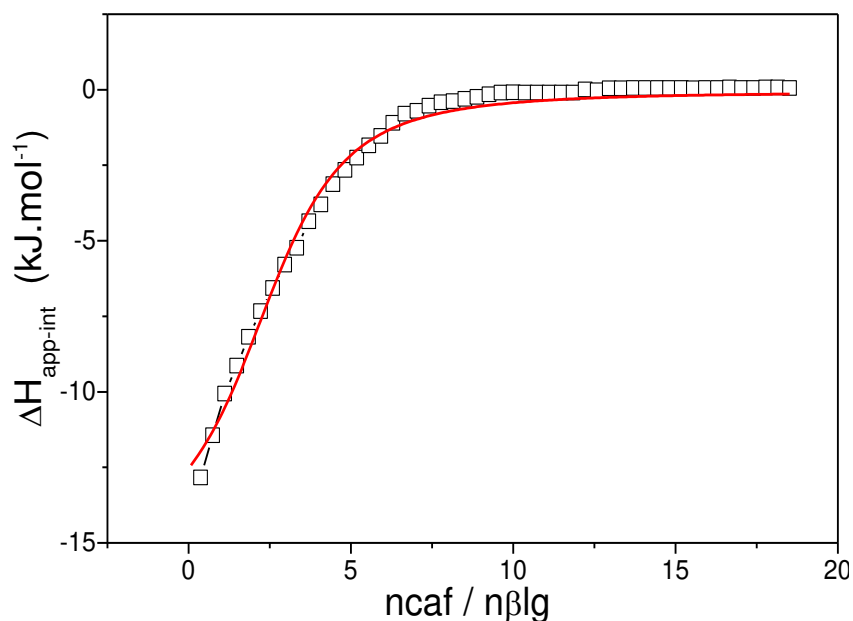
*Thermodynamic binding parameters for BLG-CAF complex formation studied by ITC*

ITC is the most sensitive and reliable technique that can be used to study the thermodynamic parameters of the interaction between proteins and small molecules. This is because calorimetry is the only technique capable of measuring the standard enthalpy change, eliminating the use of the van't Hoff equation, which generates uncertainties in the value of this parameter (Coelho et al., 2019). Another advantage of this method over FS is that calorimetry evaluates the interactions that occur in all the regions of the protein, as well as those that occur in the fluorophore amino acid regions (Lelis et al., 2017). Due to these advantages and differences between both techniques, the interaction between BLG and CAF was also elucidated by ITC.

In *Figure 2*, the apparent molar enthalpy change ( $\Delta H_{app-int}$ ) values for the interaction of BLG-CAF at 298 K and pH 7.0 are plotted as a function of the molar ratio  $r = CAF/BLG$ .  $K_b$ ,  $n$ , and standard enthalpy change ( $\Delta H_{cal}^\circ$ ) values given by the ITC were calculated by fitting the  $\Delta H_{app-int}$  versus  $r$  curve with the mathematical model described by Equation 10).

$$Q = \frac{V_c \Delta H_{cal}^\circ}{2K_b} \left[ 1 + K_b [CAF]_T + nK_b [BLG]_T - \sqrt{(1 + K_b [CAF]_T + nK_b [BLG]_T)^2 - 4nK_b^2 [CAF]_T [BLG]_T} \right] \quad (10)$$

where  $Q$  is the total heat content,  $V_c$  is the cell volume,  $\Delta H_{cal}^\circ$  the standard enthalpy change,  $K_b$  is the binding constant,  $[CAF]_T$  and  $[BLG]_T$  are the total CAF and BLG concentrations, and  $n$  is the complex formation stoichiometry.



**Figure 2.**  $\Delta H_{\text{app-int}}^{\circ}$  versus molar ratio plot for the BLG-CAF complex at pH 7.0, and 298 K. Data points reflect the experimental injection heat, while the solid line represents the calculated fit of the data.

The  $K_b$  values obtained by ITC analysis for the interaction ( $1.51 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) was almost 52 times greater than the value obtained by FS at 298 K. The stoichiometry of the BLG-CAF complex formation determined by calorimetry was three times greater than that determined by FS. As mentioned before, these differences arise because the fluorescence technique can only analyze the interactions that occur near the Trp region, neglecting other interaction sites in the BLG molecule. Therefore, ITC results showed that BLG can carry CAF molecules other than the Trp region.

Through the  $K_b$  and  $\Delta H_{\text{cal}}^{\circ}$  ( $-15.17 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) values,  $\Delta G_{\text{cal}}^{\circ}$  ( $-29.54 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) and  $T\Delta S_{\text{cal}}^{\circ}$  ( $14.37 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) were obtained using Equations 4 and 8, respectively. The  $\Delta H_F^{\circ}$  (298 K) and  $\Delta H_{\text{cal}}^{\circ}$  values were almost the same, indicating that there was an enthalpic predominance of the Trp site or that the enthalpic energy of the other two sites for CAF on BLG canceled themselves out. The  $\Delta G_{\text{cal}}^{\circ}$  value is more negative than  $\Delta G_F^{\circ}$ ,

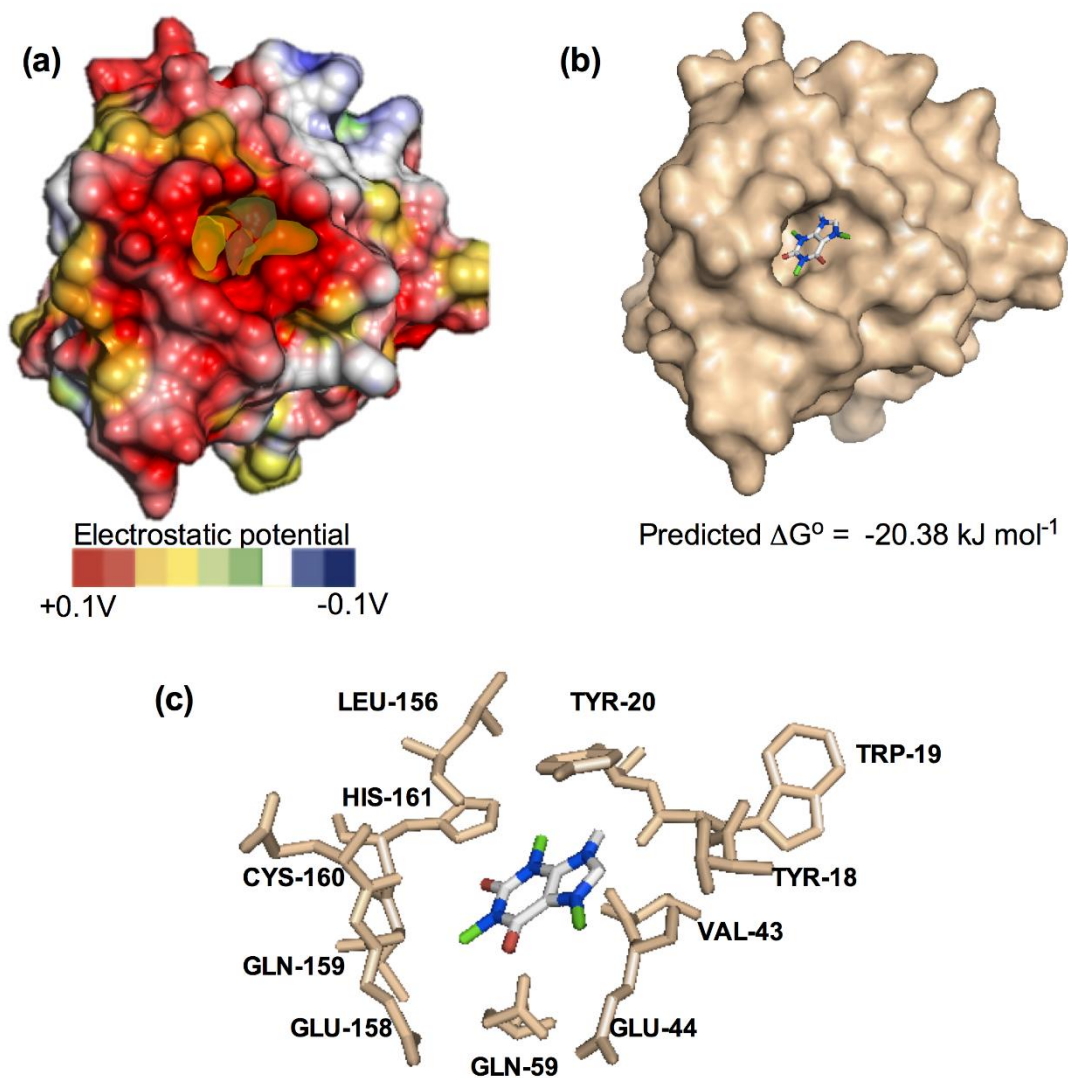
indicating that the two more molecules present in other sites of BLG played an important role in increasing the entropic term of the complex. This result was verified by the  $T\Delta S_{cal}^{\circ}$ , which is three-fold greater than that found by fluorescence.

#### *Prediction of BLG-CAF interaction by MD*

To predict the binding mode between BLG-CAF, a total of 9 models were generated by MD using AutoDock Vina program (*Figure 6*), with the predicted docking binding affinity ranging from  $-20.38$  to  $-11.80$   $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  and root mean square deviation (RMSD) ranging from  $1.478$  to  $23.974$  Å. The six models with lower energies (ranging from  $-20.38$  to  $-18.59$   $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) showed that ligand was predicted to bind in same protein site (RMSD from  $1.478$  to  $1.849$ ). The protein surface close to the predicted binding site showed variable electrostatic potential with predominance of hydrophobic regions in the protein cavity with ligand interaction and positively charged regions around the best binding site (*Figure 6a*).

The best model of interaction suggested that CAF binds to a hydrophobic site of the protein with a docking binding affinity of  $-20.38$   $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  (*Figure 6B*). The binding affinities predicted by MD were almost identical to those obtained using the  $\Delta G^{\circ}$  values obtained by FS. This site is enriched by hydrophobic amino acids, including aliphatic non-polar amino acids, such as glycine, valine, and leucine, as well as aromatic amino acids, such as tyrosine and tryptophan 19, which are hypothesized to produce fluorescence (*Figure 6C*). Therefore, the presence of this tryptophan residue in the predicted binding site indicates that FS is a suitable technique for studying the interactions between these molecules. On the other hand, the predicted models suggest that interaction with low affinity (predicted energy ranges from  $-13.26$  to

$-11.80 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) may occur in other sites of the protein in accordance with the results obtained by ITC analysis.



**Figure 3.** Predicted binding model for BLG-CAF complex by molecular docking. A) Surface electrostatic potential of BGL. B) The best binding mode of BLG (beige surface) and CAF (carbon in green, nitrogen in blue and oxygen in red). C) BLG amino acids in the interaction interface with CAF.

## **Conclusion**

The self-association of monomers and bitterness of CAF can hinder its incorporation into food systems. Complex formation with BLG could overcome these problems. When evaluated using FS, BLG interacted with CAF to form a complex with 1:1 stoichiometry. The formation of this complex was demonstrated to be entropically and enthalpically directed, in which enthalpic-entropic compensation occurs. Characterization of BLG-CAF binding by ITC presented different results (1:3 stoichiometry), showing that CAF can interact with BLG at interaction sites away from the fluorophore. MD analysis confirmed the information obtained by the two thermodynamic evaluation techniques, showing that the best interaction model occurred in the hydrophobic cavity of the BLG where the fluorophore was located. Other prediction models showed interaction with low affinity of CAF in other interaction sites of the protein. Comparing the results obtained for native and denatured BLG evaluated by FS, we can conclude that the protein structure affects the thermodynamics of interaction with CAF.

The results presented in this paper help elucidate the mechanism of BLG-CAF complex formation. This information is useful for a better understanding of the binding process between proteins and bioactive molecules and for improving the application of the BLG-CAF complex in food systems.

## **Acknowledgements**

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

## References

- Albani, J. R., Vogelaer, J., Bretesche, L., & Kmiecik, D. (2014). Tryptophan 19 residue is the origin of bovine  $\beta$ -lactoglobulin fluorescence. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 91, 144–150.
- Burley, S. K., Bhikadiya, C., Bi, C., Bittrich, S., Chen, L., Crichlow, G. V., Christie, C. H., Dalenberg, K., Di Costanzo, L., Duarte, J. M., Dutta, S., Feng, Z., Ganesan, S., Goodsell, D. S., Ghosh, S., Green, R. K., Guranović, V., Guzenko, D., Hudson, B. P., Zhuravleva, M. (2021). RCSB Protein Data Bank: powerful new tools for exploring 3D structures of biological macromolecules for basic and applied research and education in fundamental biology, biomedicine, biotechnology, bioengineering and energy sciences. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D437–D451.
- Chen, C., Ma, M., Zhang, J., Wang, L., & Xiang, B. (2008). Spectroscopic investigation of the interaction of bovine serum albumin with a novel cardiac agent V-09. *Spectroscopy*, 22(1), 43–50.
- Coelho, Y. L., de Paula, H. M. C., Agudelo, A. J. P., de Castro, A. S. B., Hudson, E. A., Pires, A. C. S., & Silva, L. H. M. (2019). Lactoferrin-phenothiazine dye interactions: Thermodynamic and kinetic approach. *International Journal of Biological Macromolecules*, 136, 559–569.
- Croguennec, T., O’Kennedy, B. T., & Mehra, R. (2004). Heat-induced denaturation/aggregation of  $\beta$ -lactoglobulin A and B: kinetics of the first intermediates formed. *International Dairy Journal*, 14(5), 399–409.
- Dallakyan, S., & Olson, A. J. (2015). Small-Molecule Library Screening by Docking with PyRx BT - *Chemical Biology: Methods and Protocols* (J. E. Hempel, C. H. Williams, & C. C. Hong (eds.); pp. 243–250). Springer New York.
- da Silva, L. H. M., & Loh, W. (2000). Calorimetric Investigation of the Formation of Aqueous Two-Phase Systems in Ternary Mixtures of Water, Poly(ethylene oxide) and Electrolytes (Or Dextran). *The Journal of Physical Chemistry B*, 104(43), 10069–10073.
- Ersöz, N., & Dudak, F. C. (2020). The interaction between  $\beta$ -Lactoglobulin and allyl-isothiocyanate. *Food Bioscience*, 36, 100600.
- Guo, Y., Harris, P., Kaur, A., Pastrana, L., & Jauregi, P. (2017). Characterisation of  $\beta$ -lactoglobulin nanoparticles and their binding to caffeine. *Food Hydrocolloids*, 71,

85–93.

- 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.
- Iza, N., Gil, M., Montero, J. L., & Morcillo, J. (1988). Self-association of caffeine in aqueous solution. Study of dilute solutions by normal and second derivative UV absorption spectroscopy. *Journal of Molecular Structure*, 175, 25–30.
- Kinoshita, K., & Nakamura, H. (2004). eF-site and PDBjViewer: Database and viewer for protein functional sites. *Bioinformatics*, 20(8), 1329–1330.
- Lakowicz, J. (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (3rd ed.). New York: Springer. ISBN: 978-0-387-46312-4.
- Lefèvre, T., & Subirade, M. (2000). Interaction of  $\beta$ -lactoglobulin with phospholipid bilayers: a molecular level elucidation as revealed by infrared spectroscopy. *International Journal of Biological Macromolecules*, 28(1), 59–67.
- Lelis, C. A., Hudson, E. A., Ferreira, G. M. D., Ferreira, G. M. D., da Silva, L. H. M., da Silva, M. do C. H., Pinto, M. S., & Pires, A. C. dos S. (2017). Binding thermodynamics of synthetic dye Allura Red with bovine serum albumin. *Food Chemistry*, 217, 52–58.
- Lelis, C. A., Nunes, N. M., de Paula, H. M. C., Coelho, Y. L., da Silva, L. H. M., & Pires, A. C. dos S. (2020). Insights into protein-curcumin interactions: Kinetics and thermodynamics of curcumin and lactoferrin binding. *Food Hydrocolloids*, 105, 105825.
- Liang, L., & Subirade, M. (2010).  $\beta$ -lactoglobulin/folic acid complexes: Formation, characterization, and biological implication. *Journal of Physical Chemistry B*, 114(19), 6707–6712.
- Mejri, M., BenSouissi, A., Aroulmoji, V., & Rogé, B. (2009). Hydration and self-association of caffeine molecules in aqueous solution: Comparative effects of sucrose and  $\beta$ -cyclodextrin. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 73(1), 6–10.
- Mohammadi, F., Bordbar, A. K., Divsalar, A., Mohammadi, K., & Saboury, A. A. (2009). Interaction of curcumin and diacetylcurcumin with the lipocalin member  $\beta$ -lactoglobulin. *Protein Journal*, 28(3–4), 117–123.
- Morris, G. M., Ruth, H., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., &

- Olson, A. J. (2009). Software news and updates AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30(16), 2785–2791.
- Nunes, N. M., Coelho, Y. L., Castro, J. S., Vidigal, M. C. T. R., Mendes, T. A. O., da Silva, L. H. M., & Pires, A. C. S. (2020). Naringenin-lactoferrin binding: Impact on naringenin bitterness and thermodynamic characterization of the complex. *Food Chemistry*, 331(March), 127337.
- Nunes, N. M., de Paula, H. M. C., Coelho, Y. L., da Silva, L. H. M., & Pires, A. C. S. (2019). Surface plasmon resonance study of interaction between lactoferrin and naringin. *Food Chemistry*, 297, 125022.
- Nunes, Natália Moreira, Pacheco, A. F. C., Agudelo, Á. J. P., da Silva, L. H. M., Pinto, M. S., Hespanhol, M. do C., & Pires, A. C. dos S. (2017). Interaction of cinnamic acid and methyl cinnamate with bovine serum albumin: A thermodynamic approach. *Food Chemistry*, 237, 525–531.
- Paiva, P. H. C., Coelho, Y. L., Silva, L. H. M., Pinto, M. S., Vidigal, M. C. T. R., & Pires, A. C. S. (2020). Influence of protein conformation and selected Hofmeister salts on bovine serum albumin/lutein complex formation. *Food Chemistry*, 305.
- Pan, A., Biswas, T., Rakshit, A. K., & Moulik, S. P. (2015). Enthalpy–Entropy Compensation (EEC) Effect: A Revisit. *The Journal of Physical Chemistry B*, 119(52), 15876–15884.
- Rezende, J. de P., Coelho, Y. L., de Paula, H. M. C., da Silva, L. H. M., & Pires, A. C. dos S. (2020). Temperature modulation of lutein-lysozyme hydrophobic-hydrophilic interaction balance. *Journal of Molecular Liquids*, 316, 113887.
- Rezende, J. de P., Hudson, E. A., de Paula, H. M. C., Coelho, Y. L., da Silva, L. H. M., & Pires, A. C. dos S. (2019). Thermodynamic and kinetic study of epigallocatechin-3-gallate-bovine lactoferrin complex formation determined by surface plasmon resonance (SPR): A comparative study with fluorescence spectroscopy. *Food Hydrocolloids*, 95, 526–532.
- Rigsby, R., & Parker, A. (2016). Using the PyMOL application to reinforce visual understanding of protein structure: PyMOL Application to Understand Protein Structure. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 44.
- Seyedabadi, M. M., Rostami, H., Jafari, S. M., & Fathi, M. (2021). Development and characterization of chitosan-coated nanoliposomes for encapsulation of caffeine. *Food Bioscience*, 40, 100857.

- Shahabadi, N., & Hadidi, S. (2014). Molecular modeling and spectroscopic studies on the interaction of the chiral drug venlafaxine hydrochloride with bovine serum albumin. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 122, 100–106.
- Sterling, T., & Irwin, J. J. (2015). ZINC 15 - Ligand Discovery for Everyone. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 55, 2324–2337.
- Trott, O., & Olson, A. J. (2009). AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31(2), 455-461.
- Wu, S. Y., Pérez, M. D., Puyol, P., & Sawyer, L. (1999).  $\beta$ -Lactoglobulin binds palmitate within its central cavity. *Journal of Biological Chemistry*, 274(1), 170–174.
- Yoon, J. J., & Danesh-Meyer, H. V. (2019). Caffeine and the eye. *Survey of Ophthalmology*, 64(3), 334–344.
- Zhang, H., Yu, D., Sun, J., Guo, H., Ding, Q., Liu, R., & Ren, F. (2014). Interaction of milk whey protein with common phenolic acids. *Journal of Molecular Structure*, 1058, 228–233.
- Zhang, Y., Lu, Y., Yang, Y., Li, S., Wang, C., Wang, C., & Zhang, T. (2021). Comparison of non-covalent binding interactions between three whey proteins and chlorogenic acid: Spectroscopic analysis and molecular docking. *Food Bioscience*, 41, 101035.

## ARTICLE 2

### Surface plasmon resonance (SPR) studies on the interactions of carotenoids and a modified $\beta$ -cyclodextrin

#### Abstract

$\beta$ -carotene (BCR) and lutein (LUT) are bioactive molecules of interest in food and pharmaceutical industry due to their benefits on human health, but these bioactive compounds are sensitive to light, high temperature and other oxidizing agents. One strategy to overcome these limitations is the formation of complexes with  $\beta$ -cyclodextrin (BCD). In order to have a complete understanding of the interactions that allow the complexation of these molecules, it is necessary to perform the thermodynamic and kinetic characterization, which can be done using the surface plasmonic resonance (SPR) technique. The formation of the BCD-BCR complex is spontaneous and entropically driven ( $\Delta G^\circ < 0$ ;  $\Delta S^\circ = 51.825$  to  $54.746$   $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ), while the formation of the BCD-LT complex, despite being spontaneous ( $\Delta G^\circ < 0$ ), is enthalpically driven ( $\Delta H^\circ = -24.33$  to  $41.40$   $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). The kinetic parameters showed that the reaction occurs through an activated complex and that the BCD-BCR complex formation is approximately 4.7- to 20.8-fold faster than the BCD-LT complex. Both kinetic parameters and activation energy ( $E_{a(a), \text{BCD-BCR}} = +40.77$   $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  and  $E_{a(a), \text{BCD-LT}} = -25.57$   $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) are affected by structural differences between molecules.

#### Keywords

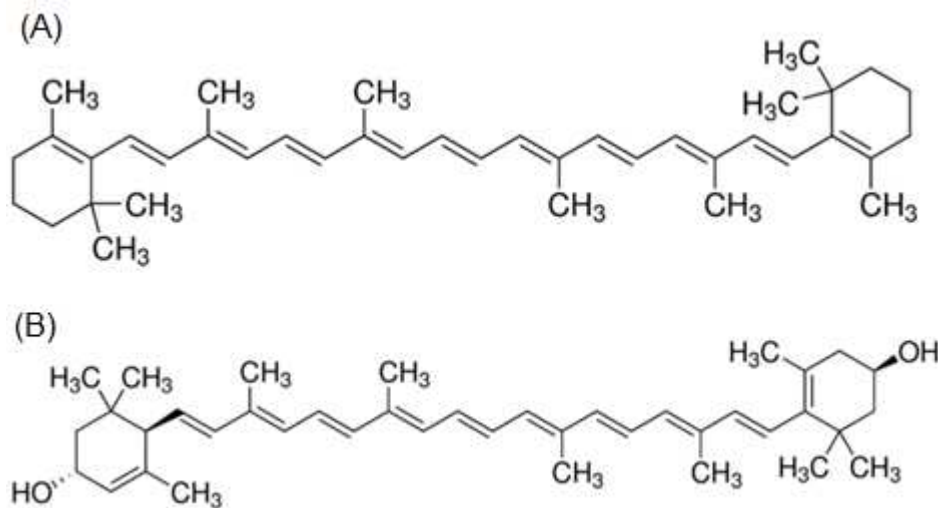
Bioactive compounds; protein thermodynamic binding; surface plasmon resonance.

#### 1. Introduction

Carotenoids are bioactive molecules of interest in food and pharmaceutical industry due to their benefits on human health. The positive impacts of carotenoids are related to their antioxidant activity, which has a protective effect against cancer, heart

disease and degenerative eye diseases (Fernández-García & Pérez-Gálvez, 2017; Zsila et al., 2001).

Carotenoids can be classified into two classes: carotenes, consisting of a chain of carbons and hydrogens, and xanthophylls, that have hydroxyl groups in their chain. Lutein (LT) is a carotenoid that is part of the xanthophyll class, known for filtering blue light, which has been effective at retarding the development of age-related macular degeneration (Kijlstra et al., 2012; Steiner et al., 2018).  $\beta$ -carotene (BCR) is a carotene that acts as a vitamin A precursor and enhances the immune system (Fernández-García & Pérez-Gálvez, 2017; Grune et al., 2010). The molecular structure of the two carotenoids is shown in Figure 1.



**Figure 1.** Structure of: (A) BCR and (B) LT.

These bioactive compounds are sensitive to light, high temperature and other oxidizing agents. Carotenoids degradation implies the loss of their functions. Furthermore, their application may be limited due to its low solubility in aqueous systems. To increase the stability of these molecules and facilitate their incorporation into hydrophilic matrices, the formation of complexes with cyclodextrins can be a strategy (Fernández-García & Pérez-Gálvez, 2017).

$\beta$ -cyclodextrin (BCD) is a product of bacterial enzymatic digestion of starch, discovered in 1891 by the French scientist A. Villiers. It is a cyclic oligosaccharide containing seven ( $\alpha$ -1,4)-linked  $\alpha$ -D-glucopyranose units. Due to the chair conformation of the glucopyranose chair, BCD has the shape of a truncated cone. The

hydroxyl groups oriented to the outside of the cone confer hydrophilic characteristics to the BCD, while the central cavity constituted by CH groups and a ring of oxygen atoms, has lipophilic characteristics (Brewster & Loftsson, 2007). This hydrophobic cavity provides to BCD the ability to receive host molecules, forming inclusion complexes. These molecules are hydrophobic and their size must be small enough to fit inside the cavity (Li et al., 2014; Varan et al., 2017). BCD can be used to carry hydrophobic substances, drugs that need controlled release in the body and bioactive compounds sensitive to degradation caused by the action of oxygen and light (Vyas et al., 2008).

In order to optimize the industrial application of nanocarrier systems, it is important to understand the interaction mechanisms through the thermodynamic and kinetic parameters of complex formation. These parameters can be investigated using surface plasmon resonance (SPR). SPR is a label-free technique that presents real-time data. Its principle is related to the detection of changes in the refractive index close to metal surfaces (Sharifi et al., 2017).

To the best of our knowledge, the interaction of BCD with BCR and LT using the SPR technique has not been reported. In the current study, kinetic and thermodynamic of complex formation of these two carotenoids with BCD were investigated by SPR.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Materials**

$\beta$ -cyclodextrin. Lutein was provided by DSM.  $\beta$ -carotene. Dibasic sodium phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) and monohydrated sodium phosphate ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) (both analytical grade) were purchased from Sigma-Aldrich (USA) to prepare buffer pH 7.4. Dimethyl sulfoxide (4%) was added to the buffer to improve the carotenoids solubility. CM5 sensor chips and coupling reagents (N-ethyl-N',N'-dimethylaminopropylcarbodiimide, EDC; N-hydroxysuccinimide, NHS; and 1-M ethanolamine hydrochloride, pH = 8.5) were purchased from GE Healthcare (USA).

### **2.2. Surface plasmon resonance (SPR) analysis**

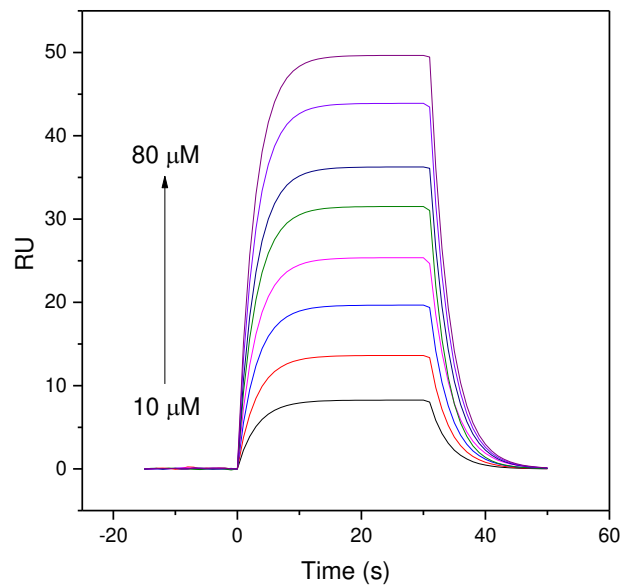
The study of the kinetic and thermodynamic parameters of the interaction between BCD and BCR and the interaction BCD and LT was performed using the SPR technique with a Biacore X100 instrument (GE Healthcare, Pittsburgh, PA, USA).

A modified BCD was immobilized on a CM5 sensor chip (GE Healthcare Company) by amine coupling. First the CM5 chip was activated for 7 minutes with EDC and NHS. Subsequently, BCD was immobilized on the chip, at a pH of 4.0, resulting in low-density BCD immobilization (2000 RU), which decreases mass transport and crowding artifacts (de Paula et al., 2017).

After the chip preparation, the BCR or LT solutions prepared in potassium phosphate buffer with 4% DMSO at pH 7.4 flowed over the channel with immobilized BCD (sample) and the channel without BCD (reference). The BCR concentration ranged from 10 to 35  $\mu\text{M}$  and the LT concentration ranged from 10 to 80  $\mu\text{M}$ . After each BCD-analyte binding cycle, buffer was injected to determine the baseline. The experiments were carried out at six temperatures (from 285.15 K to 301.15 K).

### **3. Results and discussion**

For kinetics studies it is necessary to obtain a physical signal which depends on the time with value modification in the time scale much lower than the half-time of the phenomena. Surface plasmon resonance (SPR) is a technique that measures temporal changes in refractive index near to metal surfaces in a time which is enough to determine the interaction kinetics of the majority of supramolecular systems. This real-time response generally expressed as resonance unit (RU) as a function of time in a graph called sensorgram. Figure 2 shows the sensorgram of  $\beta$ -cyclodextrin-lutein (BCD-LT) interaction at concentrations ranging from 10-80  $\mu\text{M}$  in a CM5-chip surface at 298.15 K.



**Figure 2.** Sensorgram for BCD-LT. 10-80  $\mu\text{M}$  LT solutions flowing over a CM5 low-density (1200 RU) BCD - immobilized sensor-chip surface at 298.15 K. The arrow indicates increasing LT concentration.

Based on sensorgram data it is possible to conclude that lutein interacts with adsorbed BCD because as the contact time of the LT solution flowing over CM5-chip surface increase the RU values increases exponentially until a pathamar was obtained. This RU signal increase occurs because time increase promotes more BCD-LT complex formation generating an enhancement of LT concentration close to the chip surface causing refraction index change which results in a RU signal enhancement. Until the pathamar is formed the association rate is larger than the dissociation rate and in the pathamar the association and the dissociation occur at the same rate. The RU values of the pathamar increase with the increasing concentrations of LT solutions because more lutein molecules are near to the surface chip changing the refraction index. After the pathamar the RU values decrease exponentially because of the LT solution flow stop and a flow of buffer across the chip surface causes the dissociation of the BCD-LT complex formed.

Kinetic parameters of complex formation provide information about the rate of association and dissociation of molecules. The reversible association and dissociation occurring in a chemical equilibrium can be described according to the equation (Fathi et al., 2016):



where A is the immobilized  $\beta$ -cyclodextrin, B is the analyte,  $k_a$  is the association rate constant and  $k_d$  is the dissociation constant. Table 1 shows values of kinetics parameters at six different temperatures for complexes BCD-BCR and BCD-LT. These parameters are obtained through the treatment of data explained in Rezende et al. (2020) study.

**Table 1.** Rate constants for the association ( $k_a$ ) and dissociation ( $k_d$ ) of BCD-BCR or BCD-LT.

T	BCD-BCR		BCR-LT	
	$k_a$	$k_d$	$k_a$	$k_d$
K	$10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$\text{s}^{-1}$	$10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$\text{s}^{-1}$
285.15	0.50	0.307	1.06	0.308
289.15	0.65	0.331	0.90	0.302
293.15	0.78	0.356	0.78	0.300
297.15	1.00	0.378	0.68	0.307
298.15	1.08	0.386	0.65	0.313
301.15	1.25	0.400	0.60	0.332

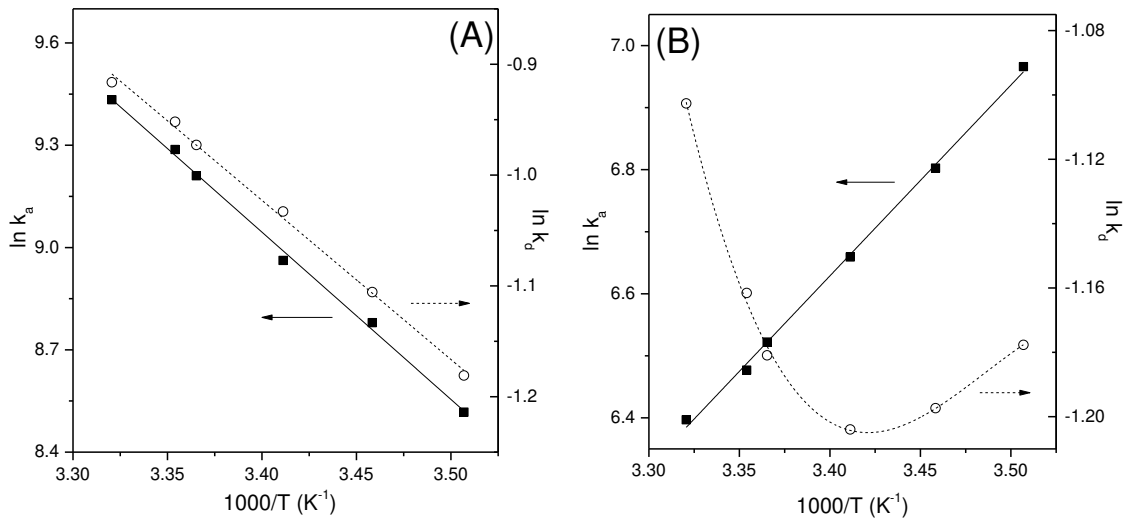
$k_a$  and  $k_d$  values were different for BCD-BCR and BCD-LT complexes. The BCD-BCR complex formation is approximately 4.7- to 20.8-fold faster than the BCD-LT complex formation. This difference in the rate constant of complex formation can be explained by the presence of two hydroxyl groups in the LT structure. It is possible that these groups initially interact with hydroxyl groups on the surface of the BCD and these interactions would need to be broken before the inclusion of the analyte in the cavity of the BCD, reducing the association rate when compared to the BCD-BCR interaction (Hudson et al., 2022).  $k_d$  values are similar at 285.15 K. For temperatures above 285.15 K the rate constants for the dissociation are about 1.1- to 1.3-fold higher for the BCD-BCR complex. This result indicates that the kinetics of the interaction is dependent on the chemical structure of the carotenoid.

There are few kinetic data on carotenoids-macromolecules interactions in the literature. To the best of our knowledge there are no studies reporting the kinetic

parameters of complex formation between carotenoids and polysaccharides. Vachali et al. (2013) obtained  $k_a$  and  $k_d$  for BCR and LT interacting with interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP) at 298,15 K. The  $k_a$  values for IRBP-BCR and IRBP-LT were  $1.22 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  and  $4.9 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  respectively. The IRBP-BCR complex formation is 11.3-fold faster than BCD-BCR interaction process, while the IRBP-LT association is 75.4-fold faster than the formation of BCD-LT complexes. The dissociation of the IRBP-BCR complex ( $0.11 \pm 0.8 \text{ s}^{-1}$ ) is about 3.5-fold slower than the BCD-BCR and the IRBP-LT complex dissociation ( $0.05 \pm 0.4 \text{ s}^{-1}$ ) is about 6.3-fold slower than the BCD-LT complex. The difference in magnitude between  $k_a$  and  $k_d$  values for these complexes can be attributed to differences in the chemical structure of macromolecules immobilized (IRBP is a protein that can have conformational changes and BCD is a rigid cyclic polysaccharide).

For BCD-BCR complex  $k_a$  and  $k_d$  values increased with increasing values of temperature. These values indicate that with the increase in the average molecular kinetic energy, a greater number of complexes is formed per second and a greater fraction of complexes is dissociated, respectively. For BCD-LT complex  $k_a$  and  $k_d$  values decreased and increased respectively with increasing values of temperature. These values indicate that with the increase in the average molecular kinetic energy, a lower number of complexes is formed per second and a greater fraction of complexes is dissociated, respectively.

The dependence of  $k_a$  and  $k_d$  on temperature provides information about energetic parameters of association and dissociation of activated complexes. These activation parameters can be obtained using the Arrhenius plots. Figure 3 shows the Arrhenius plots of  $\ln k_a$  and  $\ln k_d$  associated with BCD-BCR and BCD-LT interactions.



**Figure 3.** Arrhenius plots of  $\ln k_a$  (■) and  $\ln k_d$  (○) associated with BCD-BCR and BCD-LT interactions as functions of reciprocal temperature. (A) BCD-BCR and (B) BCD-LT.

The curves of Arrhenius plots for BCD-BCR shows linearity. This indicates that both the complex association process and the dissociation process occur in a single stage. The same is true for the BCD-LT complex association process. For the BCD-LT dissociation process, the curve is non-linear. This implies that the dissociation of the complex occurs through multiple steps, at least one of which is faster than the others (Wang & Roberts, 2013).

The activation energy ( $E_{a(y)}$ ) of association or dissociation were obtained using the equation 2. From the determination of the value of  $E_{a(y)}$  the values of the activation free energy,  $\Delta G_y^\ddagger(T)$ , the activation enthalpy,  $\Delta H_y^\ddagger(T)$ , and the activation entropy,  $T\Delta S_y^\ddagger$ , changes for the formation of an activated complex from the association of free molecules or from the dissociation of the complex were calculated using equations 3, 4 and 5, respectively. These values are presented in the Table 2 and Table 3.

$$E_{a(y)}(T) = -R \left( \frac{d \ln K(y)}{dT} \right) \quad (2)$$

$$\Delta G_y^\ddagger(T) = -RT \ln(k_y h / k_B T) \quad (3)$$

$$\Delta H_y^\ddagger(T) = E_{a(y)}(T) - RT \quad (4)$$

$$T\Delta S_y^\ddagger(T) = \Delta H_y^\ddagger(T) - \Delta G_y^\ddagger(T) \quad (5)$$

where "y" subscribed means the association or dissociation phase,  $h$  is the Planck constant ( $6.62608 \times 10^{-34}$  J s) and  $k_B$  is the Boltzmann constant ( $1.38066 \times 10^{-23}$  J K<sup>-1</sup>).

**Table 2.** Energetic parameters related to BCD-BCR activated complex formation.

T	BCD - BCR							
	Association phase (a)				Dissociation phase (d)			
	$E_{act}$	$\Delta H^\ddagger$	$\Delta G^\ddagger$	$T\Delta S^\ddagger$	$E_{act}$	$\Delta H^\ddagger$	$\Delta G^\ddagger$	$T\Delta S^\ddagger$
K	kJ.mol <sup>-1</sup>							
285.15		38.40	49.54	-11.13		9.57	72.53	-62.96
289.15		38.37	49.63	-11.27		9.53	73.40	-63.86
293.15	40.77	38.33	49.91	-11.57	11.94	9.50	74.27	-64.77
297.15		38.30	50.01	-11.71		9.47	75.17	-65.70
298.15		38.29	50.00	-11.70		9.46	75.38	-65.92
301.15		38.27	50.16	-11.89		9.44	76.07	-66.64

**Table 3.** Energetic parameters related to BCD-LT activated complex formation.

T	BCD - LT							
	Association phase (a)				Dissociation phase (d)			
	$E_{act}$	$\Delta H^\ddagger$	$\Delta G^\ddagger$	$T\Delta S^\ddagger$	$E_{act}$	$\Delta H^\ddagger$	$\Delta G^\ddagger$	$T\Delta S^\ddagger$
K	kJ.mol <sup>-1</sup>							
285.15		-27.94	53.21	-81.15	-3.12	-5.50	72.52	-78.02
289.15		-27.97	54.39	-82.36	-2.91	-5.31	73.62	-78.93
293.15	-25.57	-28.00	55.52	-83.52	1.21	-1.22	74.69	-75.91
297.15		-28.04	56.65	-84.69	8.93	6.46	75.68	-69.22
298.15		-28.04	56.96	-85.01	11.39	8.91	75.90	-66.99
301.15		-28.07	57.76	-85.83	19.95	17.45	76.54	-59.09

The activation energy is interpreted as an energy barrier that needs to be overcome to occur any chemical process. The association of free ligands or the dissociation of thermodynamically stable complexes implies overcoming this barrier, producing the activated complex (Smith, 2008). The activation energy for the association can be attributed to two factors: a) desolvation of the ligands; b) BCD-analyte interaction. The first process needs to absorb energy to happen and the interaction release energy (Nunes et al., 2019). The BCD-BCR complex shows  $E_{a(a)}$  (+40.77 kJ.mol<sup>-1</sup>). This indicates that the energy released during the interaction process is lower than the energy absorbed in desolvation. The opposite is true for the system BCD-LT, which showed a negative value for activation energy in the

association phase ( $-25.57 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ). The positive activation energy positive for the association process for the BCD-BCR complex and negative for the BCD-LT complex can be explained through a hypothesis based on structural differences between BCR and LT. The structure of LT has two hydroxyl groups and, due to the presence of these groups, the intermediate complex can occur through hydrogen bonds between these hydroxyl groups with those present on the external surface of the BCD.

In the case of dissociation phase, the activation energy is related to: a) solvation of BCD and the analyte after becoming a stable complex; b) BCD-analyte interactions involved in the formation of the activated complex. The  $E_{a(d)}$  was positive for BCD-BCR complex ( $+11.94 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ) indicating that the energy resulting from intermolecular interactions between BCD and BCR is bigger than the energy released in the solvation process. The  $E_{a(d)}$  is temperature dependent for BCD-LT complex. The activation energy values increased with temperature increase. At low temperatures,  $E_{a(d)}$  was negative because of the solvating energy and with the increase in the temperature became positive because the intermolecular interactions between  $\beta$ -cyclodextrin and lutein involved in activated complex formation.

The activation free energy was higher in the association phase than in the dissociation for the BDC-BCR complex. This suggests that the formation of activated complex was faster for the dissociation of the thermodynamic stable complex than for the association of free molecules. The opposite occurs for BCD-LT complex formation.

For the BCD-BCR complex, the activation enthalpy values were positive for association and dissociation processes, suggesting that the formation of the activated complex is enthalpically unfavorable. As the activation entropy values were negative, the formation of the intermediate complex was an entropically unfavorable process. Both, activation enthalpy and entropy, contributed to the positive free energy.

The BCD-LT complex showed activation enthalpy and entropy values positive for association process, implying that the free molecules association was an entropically favored process. The dissociation process of the stable complex resulted in an activation enthalpy temperature dependent and a negative activation entropy. At low temperatures,  $\Delta H_d^\ddagger$  was negative and with the increase in the temperature became positive. This behavior can be explained with the same arguments proposed for the activation energy. The activated complex formation by dissociation of the thermodynamically stable complex was enthalpically favorable at low temperatures and entropically unfavorable over the entire temperature range studied.

In addition to the kinetic parameters, it is important to study the thermodynamic parameters. While the kinetic parameters provide information about how fast the complex association or the dissociation occur, the thermodynamic parameters can inform about the types of interactions that govern the complex formation between the BCD and the analyte.

From the relationship between the kinetic rate constants, the binding constant ( $K_b$ ) was obtained (eq. 6). The relationship presented in equation 7 determined the standard Gibbs free energy change ( $\Delta G^\circ$ ). The standard entropy change ( $\Delta S^\circ$ ) for the formation of the stable complex was obtained (eq. 8). The standard enthalpy change ( $\Delta H^\circ$ ) was obtained using the linear and non-linear van't Hoff approach (eq. 9 and eq.10). These parameters are presented in Table 4.

$$K_b = k_a/k_d \quad (6)$$

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_b \quad (7)$$

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

$$\frac{\ln K_{b2}}{\ln K_{b1}} = -\frac{\Delta H^\circ}{R} \left( \frac{1}{T_1} + \frac{1}{T_2} \right) \quad (9)$$

$$\ln K_b = a + b(1/T) + c(1/T)^2 + d(1/T)^3 + \ln \phi \quad (10)$$

where  $a$ ,  $b$ ,  $c$ ,  $d$  and  $\ln \phi$  are constants graphically determined by the polynomial adjust of van't Hoff approach.

**Table 4.** Thermodynamic parameters of interaction between BCD and BCR or LT at pH 7.4 and different temperatures.

T	BCD - BCR				BCD - LT			
	$K_b$	$\Delta H^\circ$	$\Delta G^\circ$	$T\Delta S^\circ$	$K_b$	$\Delta H^\circ$	$\Delta G^\circ$	$T\Delta S^\circ$
K	$10^4 \text{ L.mol}^{-1}$		$\text{kJ.mol}^{-1}$		$10^3 \text{ L.mol}^{-1}$		$\text{kJ.mol}^{-1}$	
285.15	1.63	28.83	-22.99	51.825	3.44	-24.33	-19.31	-5.02
289.15	1.96		-23.76	52.597	2.98	-24.09	-19.23	-4.86
293.15	2.19		-24.36	53.193	2.60	-27.03	-19.16	-7.86
297.15	2.65		-25.16	53.991	2.21	-32.87	-19.03	-13.84
298.15	2.80		-25.38	54.214	2.08	-34.76	-18.93	-15.83
301.15	3.13		-25.91	54.746	1.81	-41.40	-18.78	-22.62

The  $K_b$  values were in the order of  $10^4$  for the BCD-BCR complexes and  $10^3$  for BCD-LT complexes. The temperature dependence of  $K_b$  indicates that at higher temperatures the formation of a complex between BCD and BCR was favored. The opposite is observed for the BCD-LT complex. The negative  $\Delta G^\circ$  values for both complexes indicates that equilibrium favors the complex formation.

Liu & Guo (2002) says that the interactions of Van der Waals, hydrophobic interactions and hydrogen bonds are responsible for keeping the CD complexed with its guest molecules. The process of BCD-BCR complex formation was entropically driven. The entropic gain due to the desolvation of both molecules and the consequent release of water molecules probably contributes more to the positive values of  $T\Delta S^\circ$  than the reduction in entropy caused by the loss of translational entropy of these molecules when interacting with each other. The positive values for  $\Delta H^\circ$  and  $\Delta S^\circ$  suggest that the interaction of BCR with BCR occurs mostly by hydrophobic forces. The process of BCD-LT binding was enthalpically driven, as shown by the negative values obtained for  $\Delta H^\circ$  and  $\Delta S^\circ$ , probably due to the formation of hydrogen bonds. The value of  $\Delta H^\circ$  is the result of the enthalpic change of different processes, such as: desolvation of BCR and LT molecules, BCR-LT interaction and water-water interaction. Thus, it can be considered that the change in the enthalpy of desolvation is less than the change in the enthalpy of BCR-LT and water-water interactions.

#### 4. Conclusion

Through the SPR technique, the formation of a thermodynamically stable complex was verified between the BCD and the BCR and LT carotenoids, with predominance of the complexed form over the free forms.

The association rate for BCD-BCR was faster than the BCD-LT complex. The number of BCD-BCR complexes dissociated per second was higher than the BCD-LT complexes at temperatures above 285.15 K. This result indicates that the kinetics of the interaction was dependent on the chemical structure of the carotenoid.

The BCD-BCR complex formation was entropically driven suggesting that the interaction of BCD with BCR occurs by hydrophobic forces while the BCD-LT complex formation was enthalpically driven mainly due to the formation of hydrogen bonds. An intermediate complex is formed from association of free ligands or dissociation of stable complex for both complexes. The intermediate complex formation was a single-

step process for BCD-BCR complex. The intermediate complex formation occurred in multiple-steps for the dissociation of BCD-LT stable complex.

From our results, we can conclude that BCD can be used as a vehicle for BCR and LT and the kinetic and thermodynamic parameters presented in this study can contribute to optimize future applications.

## 5. References

- Brewster, M. E., & Loftsson, T. (2007). Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(7), 645–666. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.05.012>
- de Paula, H. M. C., Coelho, Y. L., Agudelo, A. J. P., Rezende, J. de P., Ferreira, G. M. D., Ferreira, G. M. D., Pires, A. C. dos S., & da Silva, L. H. M. (2017). Kinetics and thermodynamics of bovine serum albumin interactions with Congo red dye. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 159, 737–742. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2017.08.036>
- Fathi, F., Ezzati Nazhad Dolatanbadi, J., Rashidi, M. R., & Omid, Y. (2016). Kinetic studies of bovine serum albumin interaction with PG and TBHQ using surface plasmon resonance. *International Journal of Biological Macromolecules*, 91, 1045–1050. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.06.054>
- Fernández-García, E., & Pérez-Gálvez, A. (2017). Carotenoid:β-cyclodextrin stability is independent of pigment structure. *Food Chemistry*, 221, 1317–1321. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.024>
- Grune, T., Lietz, G., Palou, A., Ross, A. C., Stahl, W., Tang, G., Thurnham, D., Yin, S., & Biesalski, H. K. (2010). Grune T, Lietz G, Palou A, Ross AC, Stahl W, Tang G, et al. Betacarotene is an important vitamin A source. *American Society for Nutrition. The Journal of Nutrition*. 2010:2268S-85S. <https://doi.org/10.3945/jn.109.119024.ants>
- 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-NH<sub>2</sub> and resveratrol analog-β-cyclodextrin-NH<sub>2</sub> supramolecular complexes. *Food Chemistry*, 366(July 2021), 130612. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130612>

- Kijlstra, A., Tian, Y., Kelly, E. R., & Berendschot, T. T. J. M. (2012). Lutein: More than just a filter for blue light. *Progress in Retinal and Eye Research*, *31*(4), 303–315. <https://doi.org/10.1016/J.PRETEYERES.2012.03.002>
- Li, Z., Chen, S., Gu, Z., Chen, J., & Wu, J. (2014). Alpha-cyclodextrin: Enzymatic production and food applications. *Trends in Food Science & Technology*, *35*(2), 151–160. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2013.11.005>
- Liu, L., & Guo, Q. X. (2002). The driving forces in the inclusion complexation of cyclodextrins. *Journal of Inclusion Phenomena*, *42*(1–2), 1–14. <https://doi.org/10.1023/A:1014520830813>
- Nunes, N. M., de Paula, H. M. C., Coelho, Y. L., da Silva, L. H. M., & Pires, A. C. S. (2019). Surface plasmon resonance study of interaction between lactoferrin and naringin. *Food Chemistry*, *297*, 125022. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2019.125022>
- Rezende, J. de P., Coelho, Y. L., de Paula, H. M. C., da Silva, L. H. M., & Pires, A. C. dos S. (2020). Temperature modulation of lutein-lysozyme hydrophobic-hydrophilic interaction balance. *Journal of Molecular Liquids*, *316*, 113887. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.113887>
- Sharifi, M., Dolatabadi, J. E. N., Fathi, F., Zakariazadeh, M., Barzegar, A., Rashidi, M., Tajalli, H., & Rashidi, M. R. (2017). Surface plasmon resonance and molecular docking studies of bovine serum albumin interaction with neomycin: kinetic and thermodynamic analysis. *BioImpacts*, *7*(2), 91–97. <https://doi.org/10.15171/bi.2017.12>
- Smith, I. W. M. (2008). The temperature-dependence of elementary reaction rates: Beyond Arrhenius. *Chemical Society Reviews*, *37*(4), 812–826. <https://doi.org/10.1039/b704257b>
- Steiner, B. M., McClements, D. J., & Davidov-Pardo, G. (2018). Encapsulation systems for lutein: A review. *Trends in Food Science & Technology*, *82*, 71–81. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2018.10.003>
- Vachali, P. P., Besch, B. M., Gonzalez-Fernandez, F., & Bernstein, P. S. (2013). Carotenoids as possible interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP) ligands: A surface plasmon resonance (SPR) based study. *Archives of*

*Biochemistry and Biophysics*, 539(2), 181–186.  
<https://doi.org/10.1016/J.ABB.2013.07.008>

Varan, G., Varan, C., Erdoğar, N., Hincal, A. A., & Bilensoy, E. (2017). Amphiphilic cyclodextrin nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 531(2), 457–469. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2017.06.010>

Vyas, A., Saraf, S., & Saraf, S. (2008). Cyclodextrin based novel drug delivery systems. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 62(1–2), 23–42. <https://doi.org/10.1007/s10847-008-9456-y>

Wang, W., & Roberts, C. J. (2013). *Non-Arrhenius Protein Aggregation*. 15(3), 840–851. <https://doi.org/10.1208/s12248-013-9485-3>

Zsila, F., Bikádi, Z., Keresztes, Z., Deli, J., & Simonyi, M. (2001). Investigation of the self-organization of lutein and lutein diacetate by electronic absorption, circular dichroism spectroscopy, and atomic force microscopy. *Journal of Physical Chemistry B*, 105(39), 9413–9421. <https://doi.org/10.1021/jp011626u>

## CONCLUSÕES GERAIS

O presente trabalho tratou do estudo das interações intermoleculares presentes em diferentes complexos supramoleculares.

A auto associação de monômeros de cafeína e seu amargor podem dificultar sua incorporação em diversos alimentos e a formação de complexos com a  $\beta$ -lactoglobulina, uma proteína do soro do leite, pode superar esses problemas. Quando avaliadas usando a técnica de fluorescência, estas moléculas interagiram e formaram um complexo de estequiometria 1:1, através de uma compensação entálpico-entrópica, sendo a formação deste complexo entropicamente e entalpicamente dirigida. A caracterização da interação pela técnica de calorimetria de titulação isotérmica apresentou estequiometria 1:3, mostrando que a cafeína pode interagir em regiões da proteína distantes do fluoróforo. O docking molecular confirmou as informações obtidas pelas duas técnicas de avaliação termodinâmica, mostrando que o melhor modelo de interação ocorreu na cavidade hidrofóbica da proteína onde o fluoróforo se localiza. A estrutura da  $\beta$ -lactoglobulina afeta a termodinâmica da interação com a cafeína.

Carotenoides como o  $\beta$ -caroteno e a luteína são sensíveis à luz, alta temperatura e outros agentes oxidantes e sua degradação implica na perda de suas funções. Para aumentar a estabilidade dessas moléculas e facilitar sua incorporação em sistemas alimentares, a formação de complexos com ciclodextrinas pode ser uma estratégia. Por meio da técnica de SPR, foi verificada a formação de um complexo termodinamicamente estável entre a  $\beta$ -ciclodextrinas e estes carotenóides. A taxa de associação para o complexo formado com o  $\beta$ -caroteno foi mais rápida do que o complexo formado com a luteína. Um complexo intermediário é formado pela associação de ligantes livres ou dissociação do complexo estável para ambos os complexos. A formação do complexo intermediário foi um processo de etapa única para o complexo contendo o  $\beta$ -caroteno e ocorreu em etapas múltiplas para a dissociação do complexo estável contendo luteína. Estes resultados indicam que a cinética e a energética da interação foram dependentes da estrutura química do carotenoide.

Portanto, pode-se concluir que estes complexos possuem potencial para serem aplicados em alimentos ou em outras áreas de interesse, como as indústrias farmacêutica e de cosméticos. Os parâmetros energéticos e termodinâmicos de

interação intermolecular apresentados neste trabalho constituem uma base fundamental para a definição posterior de parâmetros de incorporação destes complexos em diferentes matrizes.