

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

OTÁVIO FERNANDES MAGALHÃES

**INTERAÇÃO ENTRE β -CAROTENO E LISOZIMA DETERMINADA POR
ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA E RESSONÂNCIA PLASMÔNICA DE
SUPERFÍCIE: COMPARAÇÃO TERMODINÂMICA E ANÁLISE CINÉTICA**

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2020**

OTÁVIO FERNANDES MAGALHÃES

INTERAÇÃO ENTRE β -CAROTENO E LISOZIMA DETERMINADA POR ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA E RESSONÂNCIA PLASMÔNICA DE SUPERFÍCIE: COMPARAÇÃO TERMODINÂMICA E ANÁLISE CINÉTICA

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
2020**

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

T

M188i
2020

Magalhães, Otávio Fernandes, 1994-
Interação entre [beta]-caroteno e lisozima determinada por espectroscopia de fluorescência e ressonância plasmônica de superfície: comparação termodinâmica e análise cinética / Otávio Fernandes Magalhães. – Viçosa, MG, 2020.
1 dissertação eletrônica (74 f.): il. (algumas color.).

Inclui anexos.

Orientador: Ana Clarissa dos Santos Pires.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Tecnologia de Alimentos, 2020.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2021.014>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Caroteno. 2. Lisozima. 3. Espectrometria de fluorescência. 4. Ressonância Plasmônica de Superfície. I. Pires, Ana Clarissa dos Santos. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Tecnologia de Alimentos. Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. III. Título.

CDD 22. ed. 664.07

Bibliotecário(a) responsável: Renata de Fátima Alves x

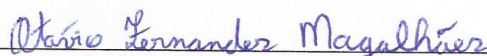
OTÁVIO FERNANDES MAGALHÃES

INTERAÇÃO ENTRE β -CAROTENO E LISOZIMA DETERMINADA POR
ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA E RESSONÂNCIA PLASMÔNICA DE
SUPERFÍCIE: COMPARAÇÃO TERMODINÂMICA E ANÁLISE CINÉTICA

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: 22 de outubro de 2020.

Assentimento:



Otávio Fernandes Magalhães
Autor



Ana Clarissa dos Santos Pires
Orientadora

Declaração COVID (COVID Statement)

Diante de todas as consequências causadas pela pandemia do COVID 19, este trabalho sofreu atrasos em seu cronograma de execução e não pôde ser completamente terminado.

Aos meus pais Jairo e Alessandra, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder a vida, pelas oportunidades e por me manter focado em alcançar meus objetivos.

À Professora Ana Clarissa dos Santos Pires, por todos os anos de orientação, apoio, confiança e ensinamentos.

À minha querida mãe (Alessandra), por sempre acreditar em meus sonhos e apoiar minhas decisões, dando exemplos de ética, perseverança e honestidade, com muito amor.

Ao meu querido pai (Jairo), por ser meu grande exemplo de trabalho, perseverança, honestidade e foco, e por fazer o máximo pelo meu crescimento.

Aos meus avós, por sempre me inspirarem, pelo apoio, afeto e por participarem da minha formação pessoal e profissional.

À minha querida irmã (Alice) e ao meu primo (Douglas), por sempre estarem comigo, pela amizade e apoio constantes em toda minha caminhada.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realizar o curso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro ao projeto.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao professor Dr. Luis Henrique Mendes da Silva, pela coorientação, ensinamentos, assistência e colaboração para a condução deste trabalho, estendendo-se os agradecimentos à sua equipe: QUIVECOM.

À Dra. Jaqueline de Paula Rezende, pela disponibilidade de participação na banca, pelos ensinamentos, parceria e colaboração para a condução deste trabalho.

Aos amigos do laboratório de Termodinâmica Molecular Aplicada – THERMA, pelo acolhimento, ensinamentos, e por me auxiliarem na condução deste trabalho.

A todos, muito obrigado!

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível”

(Charles Chaplin)

BIOGRAFIA

Otávio Fernandes Magalhães, filho de Jairo Carneiro Magalhães e Alessandra Fernandes Magalhães, nasceu em Ponte Nova, Minas Gerais, em 05 de abril de 1994.

Em março de 2014, ingressou no curso de graduação em Ciência e Tecnologia de Laticínios pela Universidade Federal de Viçosa, concluindo em julho de 2018.

Em agosto de 2018 ingressou no mestrado pelo programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, no Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de dissertação em 22 de outubro de 2020.

RESUMO

MAGALHÃES, Otávio Fernandes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2020. **Interação entre β -caroteno e lisozima determinada por espectroscopia de fluorescência e ressonância plasmônica de superfície: comparação termodinâmica e análise cinética.** Orientadora: Ana Clarissa dos Santos Pires.

O β -caroteno (β CAR) é um carotenoide precursor da vitamina A, com poderosa capacidade antioxidante. Além disso, esse carotenoide fornece proteção ao organismo humano de doenças como carcinoma, arteriosclerose, cataratas e úlcera. Entretanto, a sua baixa solubilidade aquosa, sua instabilidade à luz e à elevada temperatura e a baixa biodisponibilidade limitam o seu uso pelas indústrias alimentícias. Uma alternativa para superar essas limitações é o carreamento e proteção do β CAR ao formar complexo com a lisozima (LYS), que apresenta capacidade de carrear moléculas hidrofóbicas. Logo, este trabalho objetivou estudar a interação LYS- β CAR, em diferentes temperaturas e pH 7,4 por meio das técnicas de espectroscopia de fluorescência (FS) e ressonância plasmônica de superfície (SPR). Os resultados encontrados pela técnica de FS indicaram que a formação do complexo LIS- β CAR ocorreu com um coeficiente estequiométrico de 1:1, constante de ligação (K_b) na ordem de 10^5 L mol^{-1} , dirigida pelo aumento da entropia do sistema e mantida por interações hidrofóbicas devido os valores positivos de ΔH° e $T\Delta S^\circ$. Os valores de ΔG° foram negativos e reduziram com o aumento da temperatura, indicando que no equilíbrio químico $\text{LYS} + \beta\text{CAR} \rightleftharpoons \text{LYS-}\beta\text{CAR}$ o complexo predominou em relação as espécies químicas livres, e a estabilidade do complexo LYS- β CAR foi aumentou ligeiramente com o aumento da temperatura. Os valores de K_b encontrados pela técnica de SPR foram da ordem de 10^3 L mol^{-1} , ou seja, menor que os encontrados por FS, indicando que o β CAR interage próximos aos Trp62 e Trp108 com constante de ligação maior que ao interagir nos demais sítios da LYS. A análise de SPR também mostrou que os valores de ΔG° foram negativos e com processo de formação do complexo LYS- β CAR entropicamente dirigido. A formação e a dissociação do complexo LYS- β CAR ocorreu em várias etapas, já que as constantes de associação (k_a) e dissociação (k_d) tiveram um comportamento polinomial de segundo grau ($R^2 = 0,989$ e $R^2 = 0,997$, respectivamente) com o aumento da temperatura. A formação do complexo intermediário a partir da

associação entre as moléculas livres requereu valores de energia de ativação superiores aos necessários para formar o complexo intermediário a partir da dissociação do complexo termodinamicamente estável em todas as temperaturas estudadas. Os demais parâmetros energéticos para associação das moléculas livres e para a dissociação do complexo termodinamicamente estável foram dependentes da temperatura, sendo os valores de ΔG^{\ddagger}_a , ΔG^{\ddagger}_d , ΔH^{\ddagger}_a , positivos para todas as temperaturas estudadas. Entre 12 e 20 °C os valores de $T\Delta S^{\ddagger}_a$ e ΔH^{\ddagger}_d foram negativos e entre 24 e 28 °C os valores de $T\Delta S^{\ddagger}_a$ e ΔH^{\ddagger}_d foram positivos, já os valores de $T\Delta S^{\ddagger}_d$ foram negativos para todas as temperaturas estudadas. Assim, este estudo obteve os parâmetros termodinâmicos e cinéticos de formação do complexo LYS- β CAR, possibilitando um melhor entendimento de como a LYS pode ser utilizada para proteger e carrear o β CAR, melhorando o uso desse carotenoide pelas indústrias alimentícias e relacionadas.

Palavras-chave: β -caroteno. Lisozima. Formação de complexo. Espectroscopia de fluorescência. Ressonância plasmônica de superfície.

ABSTRACT

MAGALHÃES, Otávio Fernandes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2020. **Interaction between β -carotene and lysozyme determined by fluorescence spectroscopy and surface plasmon resonance: thermodynamic comparison and kinetic analysis.** Adviser: Ana Clarissa dos Santos Pires.

β -carotene (β CAR) is a pro-vitamin A carotenoid with powerful antioxidant capacity. Besides, protects the human organism against diseases such as carcinoma, arteriosclerosis, cataracts, and ulcer. However, the low water solubility, light and high temperature instability, and low bioavailability limit the use of β CAR by food industries. An alternative to overcome these limitations is to protect and carrier the β CAR, forming complex with the lysozyme (LYS), which may carrier hydrophobic molecules. Therefore, this work aimed to study LYS- β CAR interaction, at different temperatures and pH 7.4, using fluorescence spectroscopy (FS) and surface plasmon resonance (SPR) methods. FS showed that the LYS- β CAR complex formation occurred with stoichiometric coefficient of 1:1, binding constant (K_b) in the order of 10^5 L mol^{-1} , driven by the increase in system entropy and hydrophobic interaction were the main involved in this complex due to positive values of ΔH° and $T\Delta S^\circ$. ΔG° values were negative and decreased as increasing temperature, indicating that in the chemical equilibrium $\text{LYS} + \beta\text{CAR} \rightleftharpoons \text{LYS-}\beta\text{CAR}$ the complex predominated over free chemical species and the stability of the complex LYS- β CAR slightly increased as temperature increased. The K_b values found by SPR technique were in the order of 10^3 L mol^{-1} , which is less than those found by FS, indicating that β CAR interacts close to Trp62 and Trp108 with a higher binding constant than when interacting in other LYS sites. SPR analysis also showed ΔG° values negative and the LYS- β CAR complex formation entropically driven. The formation and dissociation of the complex LYS- β CAR occurred in multi-step since the association (k_a) and dissociation (k_d) constants had a second-order polynomial behavior ($R^2 = 0.989$ and $R^2 = 0.997$, respectively) as temperature increasing. Intermediary complex formation from the association between free molecules required activation energy values higher than those required to form the intermediary complex from the dissociation of the thermodynamically stable at all temperatures studied. The other energetic parameters for the association of free molecules and the dissociation of the thermodynamically stable complex were

temperature-dependent, with the values of ΔG^{\ddagger}_a , ΔG^{\ddagger}_d , ΔH^{\ddagger}_a , positive for all temperatures studied. Between 12 and 20 °C the values of $T\Delta S^{\ddagger}_a$ and ΔH^{\ddagger}_d were negative, and between 24 and 28 °C the values of $T\Delta S^{\ddagger}_a$ and ΔH^{\ddagger}_d were positive, whereas the values of $T\Delta S^{\ddagger}_d$ were negative for all studied temperatures. Thus, this study obtained the thermodynamic and kinetic parameters of the LYS- β CAR complex formation, allowing a better understanding of how the LYS can be used to protect and carrier β CAR molecule, improving the use of this carotenoid by food industries.

Keywords: β -carotene. Lysozyme. Complex formation. Fluorescence spectroscopy. Surface plasmon resonance.

SUMÁRIO

Capítulo 1	14
1. Introdução	14
2. Objetivos	16
2.1. Objetivo Geral	16
2.2. Objetivos Específicos	16
3. Referencial teórico	16
3.1. Carotenoides	16
3.1.1 β -caroteno	18
3.2. Lisozima	22
3.3. Técnicas usadas para o estudo das interações intermoleculares	25
3.3.1. Espectroscopia de fluorescência.....	25
3.3.2. Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR)	29
4. Bibliografia.....	34
Capítulo 2	45
Lysozyme/ β -carotene interaction determined by surface plasmon resonance and fluorescence spectroscopy: Kinetic analysis and comparative thermodynamics	45
Abstract	45
1. Introduction.....	46
2. Materials and methods	47
2.1. <i>Materials</i>	47

2.2. Thermodynamic study of LYS – β CAR ^o binding close to Trp residues by FS47	
2.3. Kinetic and thermodynamic studies of LYS and β CAR binding by SPR.....	48
3. Results and discussion.....	49
3.1. Thermodynamics of LYS – β CAR ^o formation via FS.....	49
3.1.1. Fluorescence quenching analyses and binding constant determination.	49
3.1.2. Thermodynamic potential and It's components for LYS – β CAR ^o formation	52
3.2. Kinetic and thermodynamic parameter determination using SPR	54
3.2.1. Kinetics of LYS – β CAR ^o complex formation	54
3.2.2. Thermodynamics of LYS – β CAR ^o complex formation obtained by SPR	58
3.2.3. Kinetic energetic parameters related to the formation of the LYS – β CAR ‡ intermediate.....	60
4. Conclusion.....	63
References	65
Supplementary materials.....	70

Capítulo 1

1. Introdução

À medida em que o acesso à informação aumenta, a sociedade se preocupa cada vez mais com a saúde. Logo, procuram consumir alimentos que contêm compostos com propriedades funcionais.

Os carotenoides pertencem ao grupo dos compostos que apresentam essas características requeridas pelos consumidores atuais, já que desempenham funções benéficas à saúde. Eles pertencem a uma classe de isoprenoides que ocorrem em diversas fontes na forma de pigmentos naturais (ALLAHDAD et al., 2018), cuja intensidade da cor varia de amarelo a vermelho (RODRIGUEZ-AMAYA, 2019). Podem ser classificados em carotenos, quando são hidrocarbonetos e xantofilas, quando contêm um ou mais átomos de oxigênio (EROGLU; HARRISON, 2013).

Dentre os carotenoides existentes, já foram identificados mais de 700 tipos na natureza, sendo que 60 desses podem ser encontrados naturalmente em alguma fonte alimentícia (FELTL et al., 2005; HORNERO-MÉNDEZ; BRITTON, 2002). O β -caroteno (β CAR), pertencente à classe dos carotenos, é encontrado em diferentes fontes de origem vegetal como: damasco, cenoura, abóbora, beterraba, mamão, manga e batata doce (RODRIGUEZ-AMAYA, 2016). Trata-se de um importante precursor da vitamina A (EROGLU; HARRISON, 2013; HORNERO-MÉNDEZ; BRITTON, 2002), que desempenha atividades antioxidantes e ajuda na redução de inflamações e do estresse oxidativo. Além disso, ajuda fortalecer o sistema imunológico, reduzindo assim o risco de desenvolvimento das doenças degenerativas, incluindo o câncer (YONEKURA; NAGAO, 2007).

Apesar dos benefícios previamente citados, os carotenoides apresentam baixa solubilidade aquosa em temperatura ambiente e baixa estabilidade química à luz e à temperatura elevada (SAINI; KEUM, 2018). Diante disso, é importante encontrar uma alternativa eficaz para a sua utilização em formulações alimentícias e farmacêuticas, melhorando sua solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade. Normalmente, nos tecidos vivos, os carotenoides estão associados a proteínas de estruturas terciárias (LI et al., 2015a). Por isso, o uso de proteínas globulares como agentes carreadores do β CAR é uma boa alternativa para potencializar a sua utilização.

A lisozima (LYS) é uma proteína globular, de massa molar igual a 14,3 kDa, encontrada principalmente na clara de ovos de aves e formada por 129 resíduos de aminoácidos (CAO et al., 2015; CHEN et al., 2005). Apresenta dentre as suas propriedades biológicas a atividade antimicrobiana (CROGUENNEC et al., 2000). Além disso, a LYS apresenta uma região hidrofóbica que possibilita a interação com compostos hidrofóbicos, como o β CAR (BEVERUNG; RADKE; BLANCH, 1999; LESNIEROWSKI; STANGIERSKI, 2018). Logo, essa proteína pode ser utilizada para proteger e carrear o β CAR, por meio da formação de um complexo.

LI et al. (2016) estudaram a termodinâmica de interação entre a LYS e o β CAR utilizando espectroscopia de fluorescência e verificaram que interações hidrofóbicas foram as principais forças responsáveis pela formação do complexo entre essas moléculas, já que os valores de ΔH° e ΔS° foram positivos (27,48 kJ mol⁻¹ e 222,47 kJ mol⁻¹, respectivamente a 293 K). Os autores também explicaram que o processo de interação LYS- β CAR é endotérmico pois ocorre com a liberação de água da camada de solvatação dessas moléculas e com o β CAR se inserindo na cavidade hidrofóbica da LYS após uma alteração da estrutura dessa proteína.

Apesar desse trabalho ter iniciado os estudos relacionados a formação de complexo entre essas moléculas, a ausência de discussões dos parâmetros cinéticos de formação de complexo entre elas tornou fundamental o estudo cinético por meio da técnica de ressonância plasmônica de superfície, a qual também fornece os parâmetros termodinâmicos. Além disso, a técnica experimental sensível de espectroscopia de fluorescência foi utilizada para a obtenção dos parâmetros termodinâmicos de interação, sendo realizada a correção do efeito do filtro interno usando a técnica de espectroscopia de UV-vis. Com isso, também foi possível comparar os parâmetros termodinâmicos obtidos neste estudo pelas duas técnicas empregadas.

O estudo das propriedades termodinâmicas e cinéticas de formação dos complexos entre a LYS e o β CAR é importante para um melhor entendimento de como ocorre a interação entre estas duas espécies químicas, pois permite o conhecimento da energia e da dinâmica molecular envolvidas na formação desses complexos.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Estudar a termodinâmica e a cinética de interação intermolecular entre a LYS e o β CAR, em pH 7,4, em diferentes temperaturas.

2.2. Objetivos Específicos

- Determinar a constante de interação (K_b) e a estequiometria de formação do complexo (n).
- Determinar a variação da energia livre de Gibbs padrão (ΔG°), a variação da entalpia padrão (ΔH°) e a variação da entropia padrão ($T\Delta S^\circ$) de formação do complexo LYS- β CAR, em diferentes temperaturas, utilizando as técnicas de Espectroscopia de Fluorescência (FS) e Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR).
- Determinar a constante cinética de associação (k_a) entre a LYS e o β CAR e a constante cinética de dissociação (k_d) do complexo LYS- β CAR por SPR.
- Calcular os parâmetros energéticos cinéticos de formação do complexo ativado LYS- β CAR formado a partir da associação das moléculas livres e a partir da dissociação do complexo termodinamicamente estável: energia de ativação (E_{act}), variação da entalpia de ativação (ΔH^\ddagger), variação da entropia de ativação (ΔS^\ddagger) e variação da energia livre de Gibbs de ativação (ΔG^\ddagger), por SPR.

3. Referencial teórico

3.1. Carotenoides

Os carotenoides são pigmentos lipofílicos responsáveis pela cor amarela, laranja e vermelha em vegetais e frutas, sintetizados por plantas e microrganismos, são encontrados na natureza (VARELA et al., 2015) em plantas, fungos e bactérias (HORNERO-MÉNDEZ; BRITTON, 2002). Apresentam uma estrutura de cadeia linear com 40 carbonos, oito unidades de isopropeno (ALWIS; CHANDRIKA; JAYAWEERA, 2015; FELTL et al., 2005) e duplas ligações alternadas, as quais atuam como cromóforos e garantem as suas múltiplas funções (RODRIGUEZ-AMAYA, 2019; YE; JIANG; WU, 2008), dentre elas a capacidade antioxidante (YONEKURA; NAGAO, 2007). Essas ligações duplas conjugadas também permitem que os carotenoides

absorvam luz na região do visível e ultravioleta, com o máximo de absorção em um comprimento de onda entre 450 e 570 nm (EROGLU; HARRISON, 2013).

Esses compostos são classificados como: carotenos e xantofilas, sendo os carotenos hidrocarbonetos e as xantofilas derivadas dos hidrocarbonetos, contendo em suas estruturas grupos funcionais como a hidroxila, ou seja, um ou mais oxigênios, os quais ficam localizados nos anéis das extremidades da cadeia linear (APRODU; DUMITRAȘCU; STĂNCIUC, 2018; FELTL et al., 2005).

Dos 700 carotenoides identificados, cerca de 60 ocorrem comumente na dieta dos humanos e no sangue em quantidades mensuráveis, dentre os quais o β CAR, que é conhecido por ser um agente pro vitamina A para o organismo humano (ALLAHDAD et al., 2018; EROGLU; HARRISON, 2013). Normalmente, apresentam coloração amarela, laranja ou vermelha, e são encontrados na natureza em fontes diversas (SASSO et al., 2012; VARELA et al., 2015), como: vegetais de folha escuras, frutas coloridas e microrganismos unicelulares (algas) (SAINI; KEUM, 2018). Alguns exemplos de suas fontes são: cenouras, mamão, tomates, melancia, peixes (salmão) e crustáceos (lagostas, caranguejos e camarão) (RODRIGUEZ-AMAYA, 2019).

Os carotenoides têm recebido cada vez mais atenção, por parte dos pesquisadores e dos consumidores, já que apresentam propriedades que os classificam como benéficos à saúde, com destaque para as funções de serem precursores de vitamina A, desempenhar a atividade antioxidante, melhorar a imunidade (EROGLU; HARRISON, 2013; FERNÁNDEZ-GARCÍA; PÉREZ-GÁLVEZ, 2017; MUTSOKOTI et al., 2017), possuírem propriedades de prevenção e tratamento de doenças como as cardiovasculares (SHAISH et al., 2006), cataratas (GUPTA et al., 2003) e câncer (SAINI; NILE; PARK, 2015). Com isso, as indústrias farmacêuticas e de alimentos têm ampliado os seus interesses por esse grupo de compostos bioativos.

A atividade antioxidante dos carotenoides é limitada quando expostos à luz, ácidos, temperaturas elevadas (RODRIGUEZ-AMAYA, 2016; SAINI; KEUM, 2018), a agentes oxidantes, como espécies reativas de oxigênio (FERNÁNDEZ-GARCÍA; PÉREZ-GÁLVEZ, 2017) e por apresentar baixa solubilidade em meio aquoso (FELTL et al., 2005). Por isso, é justificada e necessária a utilização de estratégias que visam a preservação de sua estabilidade química e melhoria de sua solubilidade. Por serem compostos hidrofóbicos, o uso de moléculas com sítios hidrofóbicos para formar complexos com os carotenoides é uma alternativa que pode ser considerada, já que

possibilita a proteção e, conseqüentemente, a melhor aplicação desses compostos bioativos.

Nos tecidos vivos, os carotenoides se encontram associados com proteínas de estruturas terciárias (CHANG et al., 2016), permitindo a inserção desses compostos hidrofóbicos em um ambiente com resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (ALLAHDAD et al., 2018). Ainda assim, existe a necessidade de mais estudos que busquem informações acerca de moléculas eficazes para carrear e proteger esses compostos bioativos.

3.1.1 β -caroteno

O β CAR (Figura 1) é um composto laranja formado por uma cadeia de hidrocarboneto polieno com 11 ligações duplas conjugadas e um anel em cada uma de suas extremidades (APRODU; DUMITRAȘCU; STĂNCIUC, 2018). Essas ligações duplas conjugadas são responsáveis por atuar como cromóforo absorvedor de luz, conferindo as cores brilhantes dessas moléculas, já que os carotenoides são pigmentos naturais multifuncionais (ALWIS; CHANDRIKA; JAYAWEERA, 2015).

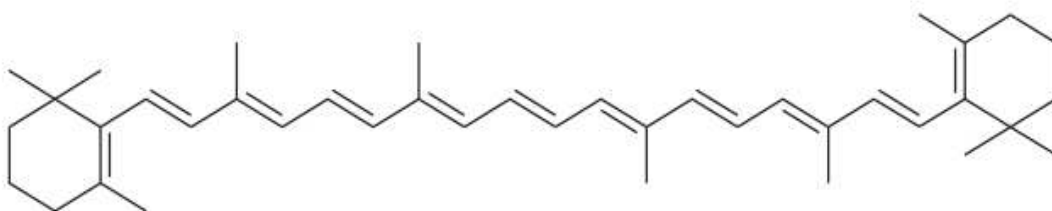


Figura 1 Estrutura do β -caroteno. Fonte: ALWIS; CHANDRIKA; JAYAWEERA (2015)

O β -caroteno é um carotenoide muito importante para a dieta humana, por ser um precursor eficaz da vitamina A, apresentando uma alta taxa de conversão para retinol. Encontrado principalmente em frutas e vegetais, exerce uma forte atividade antioxidante, protegendo o organismo humano de muitas doenças, como carcinoma, arteriosclerose, catarata, doenças cardiovasculares, e outras relacionadas, inibindo também a úlcera (JAIN et al., 2016; KNOCKAERT et al., 2012; MEHMOOD et al., 2018).

Diante de todas as propriedades benéficas que o β CAR tem a oferecer para o organismo humano, as indústrias de alimentos e farmacêuticas visam incorporar esse composto em diferentes matrizes. Entretanto, por ser: pouco solúvel em água; instável em temperaturas elevadas, na presença de oxigênio e de luz; e por se apresentar em estado cristalino à temperatura ambiente, sua aplicação fica limitada, já que sua

biodisponibilidade fica reduzida (MATTEA et al., 2009; SAINI; KEUM, 2018; YI et al., 2015).

O caráter lipofílico do β CAR faz com que sua incorporação em alimentos sem gordura ou com baixo teor de gordura seja um grande desafio. Logo, o papel de proteínas como portadores não lipídicos para a proteção e entrega desse composto é de grande importância para as indústrias alimentícias e farmacêuticas (ALLAHDAD et al., 2018). Diante disso, novas tecnologias que aumentem a estabilidade e a solubilidade dessas moléculas bioativas devem ser utilizadas para se obter um melhor aproveitamento desses compostos nas diversas formulações de interesse das indústrias.

Uma maneira conveniente de incorporar o β CAR em formulações alimentícias, de fármacos ou cosméticos, melhorando a sua solubilidade aquosa é por meio da formação de complexos entre esse composto e proteínas (PILBROW; GARAMA; CARNE, 2012). Sabendo que os carotenoides se encontram associados às proteínas globulares nos tecidos vivos (ALLAHDAD et al., 2018), alguns estudos têm demonstrado que essas proteínas de estruturas terciárias podem ser utilizadas como moléculas de proteção e carreamento do β CAR, possibilitando uma melhora de sua biodisponibilidade.

Um estudo de DU et al. (2019) demonstrou que a proteína globular α -lactoalbumina (α -lac), homóloga à LYS, apresentou um grande potencial para ser empregada no carreamento de moléculas bioativas. O uso de micelas de α -lac para encapsular o β CAR melhorou: sua solubilidade aquosa, já que passou de 0 para 0,18 mg/mL; sua estabilidade ao aquecimento, pois manteve 40% de suas moléculas após uma exposição a 60 °C por 24 h, enquanto não encapsulado chegou a 0% após 10 h; sua estabilidade à exposição à luz UV, já que manteve 40% de suas moléculas após 24 h de exposição a luz UV a 245 nm, enquanto não encapsulado reduziu para 0% após 7 h; sua atividade antioxidante celular (AAC), já que passou de 10 para 50 unidades de AAC. Esses resultados mostraram que o encapsulamento do β CAR em micelas de α -lac melhora a absorção e a biodisponibilidade desse composto no organismo humano.

Já o estudo de ALLAHDAD et al. (2019) avaliou a interação entre o β CAR e proteínas do soro: isolado proteico do soro, β -lactoglobulina (β -lg), α -lactoalbumina (α -lac) e a albumina do soro bovino (BSA). As análises de fluorescência demonstraram

que a interação entre o isolado proteico do soro e o β CAR aumentou com o aumento do pH, da temperatura e da força iônica. O processo de formação de complexo foi regido entropicamente ($\Delta H^\circ = 153,61 \text{ kJ mol}^{-1}$ e $\Delta S^\circ = 0,59 \text{ kJ/mol K}$) e envolvendo, principalmente, interações hidrofóbicas. Entre as três proteínas estudadas, a interação com a β -Ig apresentou maior constante de ligação, $K_b = 1,31 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, por apresentar uma cavidade com maior número de aminoácidos hidrofóbicos comparado à cavidade da BSA, com $K_b = 4,51 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ e, por fim, a α -lac com $K_b = 1,80 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, já que o local de ligação do β CAR é na superfície desta proteína.

SILVA et al. (2018) estudaram a interação entre o β CAR e a BSA (nativa e desnaturada), por espectroscopia de fluorescência. Por este estudo foi possível notar que a conformação da proteína influencia na interação, já que os valores da constante de ligação (K_b) foram da ordem de 10^5 e 10^2 L.mol^{-1} para a BSA nativa e desnaturada, respectivamente, sendo observado um aumento dos valores de K_b com o aumento da temperatura, ocorrendo a formação de mais complexos em temperaturas mais elevadas. Além disso, houve uma melhora da fotoestabilidade do carotenoide ao formar complexo com a BSA na sua estrutura terciária, reduzindo e aumentando em três vezes, respectivamente, sua constante de degradação e o seu tempo de meia vida quando exposto à luz. Os parâmetros termodinâmicos mostraram que o processo de formação do complexo foi regido entropicamente ($\Delta H^\circ = 8,62$ e $32,20 \text{ kJ mol}^{-1}$ e $T\Delta S^\circ = 37,02$ - $41,35$ e $43,44$ - $48,70 \text{ kJ mol}^{-1}$ para a BSA nativa e desnaturada, respectivamente).

LI; YAN, (2017) estudaram a termodinâmica de interação entre a ovalbumina (proteína predominante da clara de ovos de aves) e o β CAR em pH 7.4 por espectroscopia de fluorescência. Os valores de K_b cresceram de $1,892 \times 10^5$ para $5,659 \times 10^6 \text{ L mol}^{-1}$ quando a temperatura variou de 20 a 37 °C e os valores de n foram próximos de 1 para o complexo formado. Os autores concluíram que as interações hidrofóbicas foram as principais forças responsáveis pela interação entre essas moléculas, uma vez que os valores de ΔH° e ΔS° foram $150,66 \text{ kJ mol}^{-1}$ e $615,19 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, respectivamente.

CHANG et al. (2016) também estudaram a interação do β CAR com a BSA por espectroscopia de fluorescência. Os autores determinaram valores de K_b na ordem de 10^5 L.mol^{-1} e concluíram que a formação de complexo entre a BSA e o β CAR apresentou alta afinidade, protegendo o carotenoide contra a foto-oxidação e também

da oxidação desencadeada por radicais livres. Segundo os autores, essa proteção ocorreu devido à formação de uma interação hidrofóbica com a proteína globular e pela redução da reatividade do β CAR no estado tripleto, sendo a energia de excitação dissipada pela matriz da proteína em vez de conduzir uma reação fotoquímica. Os parâmetros termodinâmicos encontrados por esses autores indicaram uma interação endotérmica, hidrofóbica e entropicamente dirigida ($\Delta H^\circ = 17,1 \text{ kJ mol}^{-1}$ e $\Delta S^\circ = 142,2 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$).

LI; LI (2016) estudaram a interação do β CAR com a tripsina e a pepsina por espectroscopia de fluorescência. Os autores encontraram K_b da ordem de 10^5 L.mol^{-1} para ambos os complexos, sendo que para tripsina- β CAR o K_b apresentou valores maiores. Os parâmetros termodinâmicos encontrados indicaram que o equilíbrio químico se deslocou no sentido de formação dos complexos ($\Delta G^\circ < 0$), sendo o processo de formação dos complexos exotérmico, e com valores positivos de ΔS° ($\Delta H^\circ = -6,352$ e $-1,818 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\Delta S^\circ = 82,15$ e $95,17 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, para a tripsina e pepsina, respectivamente), indicando a ocorrência de interações hidrofóbicas e eletrostáticas e um processo entálpicamente e entropicamente dirigido.

LI et al. (2015a) estudaram a interação do β CAR com a BSA e com a albumina do soro humano (HSA). Os valores de K_b para os complexos BSA- β CAR e HSA- β CAR foram da ordem de 10^5 . Os autores sugeriram que essa afinidade entre o carotenoide e as proteínas favorece a difusão dele na circulação sanguínea e a sua liberação no local alvo. Os parâmetros termodinâmicos encontrados indicaram que o equilíbrio químico se deslocou no sentido de formação do complexo ($\Delta G^\circ < 0$), que o processo de formação do complexo foi exotérmico, entálpicamente e entropicamente dirigido ($\Delta H^\circ = -1,656$ e $-1,630 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\Delta S^\circ = 98,18$ e $98,75 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ para a BSA e HSA, respectivamente), sendo as forças hidrofóbicas e eletrostáticas as responsáveis pela interação desses complexos.

Diante dos resultados encontrados por esses autores, fica comprovada a capacidade de proteínas com estrutura terciária em formar complexos com o β CAR. Além disso, alguns desses estudos evidenciaram a capacidade dessas proteínas em melhorar a solubilidade em meio aquoso e a estabilidade desse carotenoide. Por isso, é importante estudar a interação entre o β CAR e a proteína globular, LYS. Assim, é possível compreender melhor a dinâmica molecular e a energia envolvidas na

formação de complexos entre essas moléculas, permitindo avaliar o uso da LYS como uma molécula estratégica para carrear e potencializar o uso do β CAR.

3.2. Lisozima

A LYS, também conhecida por muramidase ou hidrolase N-acetilmurâmica, é uma pequena proteína globular, extraída principalmente da clara de ovo de aves, e estabilizada por quatro ligações dissulfeto entre os oito resíduos de cisteína de sua cadeia peptídica (WU et al., 2019). Essa proteína possui uma massa molar em torno de 14 kDa, raio de giro de 15 Å e um ponto isoelétrico em $\text{pH} \approx 10,7$ (LI et al., 2015b). Ela ainda está presente em vários fluidos do corpo humano como: saliva, lágrimas, muco, urina, tecidos linfáticos e leite (DAS et al., 2018; LI et al., 2016).

A descoberta da LYS é atribuída a Alexander Fleming, que durante seus trabalhos percebeu que ao deixar uma gota de sua mucosa nasal cair em uma placa bacteriana houve uma lise de bactérias presentes nessa placa. Com isso, ele assumiu que nesse muco nasal havia um elemento bacteriolítico notável, o qual denominou: lisozima (FLEMING; 1922). Com o avanço de pesquisas foram descobertas LYS em grandes quantidades em órgão, tecidos e secreções de humanos, e enzimas líticas semelhantes às LYS em fontes como secreções de vários vertebrados, invertebrados, bactérias e também em plantas, como látex da papaia (HOWARD; GLAZER, 1969), demonstrando que a LYS é uma proteína bastante distribuída e disponível na natureza.

De acordo com as suas características de estrutura, catálise e imunização, por exemplo, as LYS estão divididas em três grupos principais, são eles: Tipo C (galinha), Tipo G (de ganso) e Tipo I (de invertebrados). Além desses principais grupos, também foram descobertos outros tipos de LYS, como Tipo Bacteriano, Tipo Planta e Tipo Fago (CAO et al., 2015).

Quanto a sua estrutura a LYS é conhecida por ser uma proteína globular que pode ser desnaturada dependendo de algumas condições. Proteínas globulares podem ter a sua estrutura terciária alterada em condições específicas de pH, temperatura, força iônica ou quando interagem com outras moléculas (ARAI, 2018).

Entre as propriedades da LYS, no seu estado globular ou desnaturada, destacam-se suas funções fisiológicas e farmacêuticas antitumoral, antiviral, e, principalmente, a antimicrobiana (GORBENKO; IOFFE; KINNUNEN, 2007; TAKAHASHI et al., 2018). Além disso, a LYS é reconhecida por melhorar a circulação

sanguínea, a imunidade humana, e realizar funções ligadas ao transporte e ao depósito de ácidos graxos, hormônios e medicamentos (LI et al., 2016).

A LYS é uma proteína constituída por 129 resíduos de aminoácidos, caracterizada por possuir uma estrutura relativamente rígida (BLAKE et al., 1965) em forma de elipsoide de 4,5 x 3,0 x 3,0 nm, e com o interior altamente hidrofóbico (LESNIEROWSKI; STANGIERSKI, 2018), sendo a lisina a molécula N-terminal e a leucina a molécula C-terminal. Além disso, possui ligações dissulfeto entre quatro pares de resíduos de cisteínas (6-127; 30-115; 54-80; 76-94), apresentando seis resíduos de triptofano, três de tirosinas e três de fenilalaninas. Entre os seis triptofanos presentes na estrutura da LYS, os resíduos localizados nas posições 62 e 108 são considerados os principais fluoróforos dessa proteína (IMOTO et al., 1972; WU et al., 2019; ZHANG et al., 2011), (Figura 2).

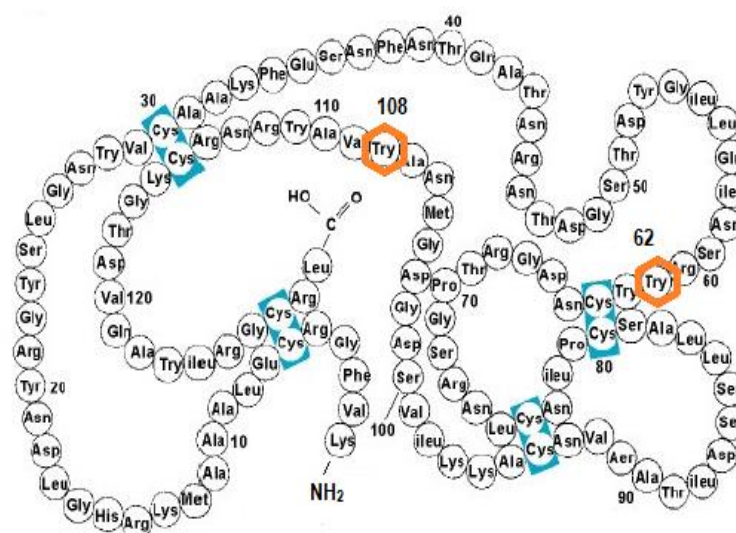


Figura 2 Estrutura da Lisozima. Fonte: Adaptado de BLAKE et al. (2017).

A LYS do tipo C é homóloga à LYS humana, sendo a humana responsável pela formação de fibrilas amiloides. O depósito dessas fibrilas resultam em doenças degenerativas, por exemplo, Alzheimer e Parkinson (MOHAMMADI et al., 2016). Algumas pesquisas na área farmacêutica têm verificado a eficiência de algumas moléculas interagindo com essa LYS na prevenção da formação de fibrilas amiloides em humanos (BORANA et al., 2014; MOHAMMADI et al., 2016; WANG; LIU; LEE, 2009).

Diante de todas as características supracitadas, a LYS tem sido amplamente utilizada como molécula que auxilia no combate de doenças virais e inflamatórias. Devido à sua abundância, estabilidade, tamanho pequeno e capacidade de se ligar à diversas moléculas, a LYS tem sido usada para interagir com diferentes moléculas de tamanho pequeno, incluindo nanopartículas (WU et al., 2008), íons metálicos (WANG et al., 2009), corantes (PENG et al., 2013), carotenoide (REZENDE et al., 2020) e drogas farmacêuticas (DING et al., 2009).

Estudos têm demonstrado a capacidade da LYS em interagir com diferentes moléculas. Por ser muito disponível e apresentar as propriedades de interesse já citadas, estudar a interação entre a LYS e moléculas bioativas é importante, já que é uma alternativa interessante para a melhoria da biodisponibilidade das molécula bioativas.

Rezende et al. (2020) estudaram a termodinâmica e a cinética de interação entre a LYS e a luteína (carotenoide da classe das xantofilas), em pH 7,4 por meio da técnica de ressonância plasmônica de superfície. O complexo predominou em relação às moléculas livres ($\Delta G^\circ < 0$). Para baixas temperaturas a formação do complexo foi entropicamente dirigida, prevalecendo interações hidrofóbicas. Para as temperaturas mais elevadas a formação do complexo foi entálpica dirigido e entropicamente desfavorável, predominando interações hidrofílicas. As constantes de associação e de dissociação foram da ordem de 10^3 M s^{-1} e 10^{-1} s^{-1} , respectivamente e o complexo ativado foi formado mais rápido a partir das moléculas livres que a partir do complexo termodinamicamente estável.

LI et al. (2016) realizaram o estudo da termodinâmica de interação de cinco moléculas antioxidantes, incluindo o β CAR, com a LYS. Verificaram que a intensidade de fluorescência da LYS foi reduzida com o aumento da concentração do β CAR, ocorrendo um deslocamento do pico da intensidade de fluorescência para região do vermelho. Logo, os autores sugeriram que o fluoróforo da LYS é colocado num ambiente mais hidrofílico quando ocorre a adição do β CAR. Neste estudo também foram determinados os valores de $\Delta G^\circ < 0$, $\Delta H^\circ = 27,48 \text{ kJ mol}^{-1}$ e $\Delta S^\circ = 222,47 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, indicando que o equilíbrio se desloca no sentido de formação do complexo, e que as forças hidrofóbicas são as responsáveis por manter esse complexo.

Contudo, não existem na literatura trabalhos que relatem o estudo cinético do processo de formação de complexo entre a LYS e o β CAR. A compreensão da cinética

de formação de complexos é complementar e tão importante quanto à termodinâmica, uma vez que nem sempre os complexos mais estáveis termodinamicamente são aqueles viáveis do ponto de vista de aplicação. Desta forma, compreender, a velocidade com que os complexos são formados e, também dissociados é vital para a aplicação bem sucedida dessas estruturas supramoleculares. Adicionalmente, a partir dos dados cinéticos é possível determinar a energética da dinâmica molecular, o que auxilia no entendimento sobre os mecanismos de formação do complexo termodinamicamente estável.

3.3. Técnicas usadas para o estudo das interações intermoleculares

3.3.1. Espectroscopia de fluorescência

Algumas técnicas experimentais importantes podem ser utilizadas para estudar a interação intermolecular entre a LYS e o β CAR, dentre elas a espectroscopia de fluorescência.

A fluorescência é a emissão de luz a partir de um estado excitado singlete, no qual o elétron excitado não muda a orientação de spin, ou seja, não faz transição de um estado singlete para um estado tripleto, continuando desemparelhado. Conseqüentemente, o retorno ao estado fundamental é permitido e ocorre rapidamente via emissão de um fóton (KAROUI; BLECKER, 2011).

A supressão de fluorescência resulta do contato entre um fluoróforo e um supressor durante o período em que o fluoróforo se encontra no seu estado excitado, podendo causar uma redução do rendimento quântico de fluorescência dos fluoróforos quando ocorre interações com moléculas supressoras (KAROUI; BLECKER, 2011). A partir dos valores de intensidade de fluorescência de uma molécula no seu comprimento de onda de máxima emissão antes e após a presença do supressor, podem ser obtidos importantes parâmetros termodinâmicos.

As medidas de fluorescência são consideradas eficazes para o estudo de interações intermoleculares entre moléculas de interesse e proteínas em diferentes estados de conformação (HUDSON et al., 2018), fornecendo parâmetros que permitem caracterizar a interação entre as moléculas estudadas (parâmetros termodinâmicos de ligação), devido à alta sensibilidade e reprodutibilidade (LELIS et al., 2017; WU et al., 2019).

A fluorescência intrínseca das proteínas está relacionada à presença dos resíduos de aminoácidos: fenilalanina, tirosina e triptofano (Figura 3). Entre esses aminoácidos o triptofano é o que apresenta maior sensibilidade às alterações que ocorrem no seu ambiente (GHOSH; RATHI; ARORA, 2016).

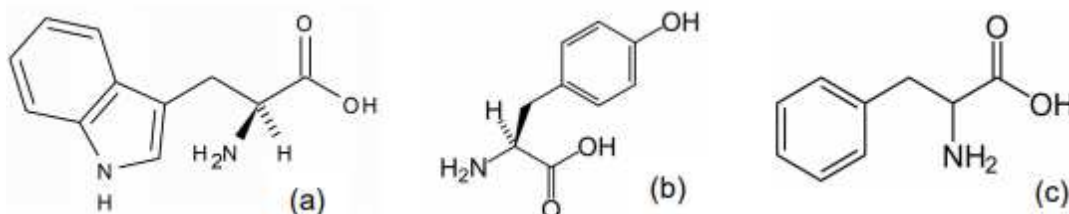


Figura 3 Estrutura química de resíduos de aminoácidos: (a) triptofano, (b) tirosina e (c) fenilalanina.

O princípio da técnica de espectroscopia de fluorescência é baseado em medidas de fluorescência de proteínas após uma adição de moléculas supressoras, ocorrendo assim uma supressão da fluorescência medida (SURYAWANSHI et al., 2016). Essa extinção de fluorescência está relacionada a qualquer processo que diminua o rendimento quântico de fluorescência de um fluoróforo devido às variadas formas de interação que ocorrem com a molécula supressora (HUDSON et al., 2018). A Figura 4 mostra os espectros de fluorescência da LYS na ausência e na presença de concentrações crescentes de β CAR.

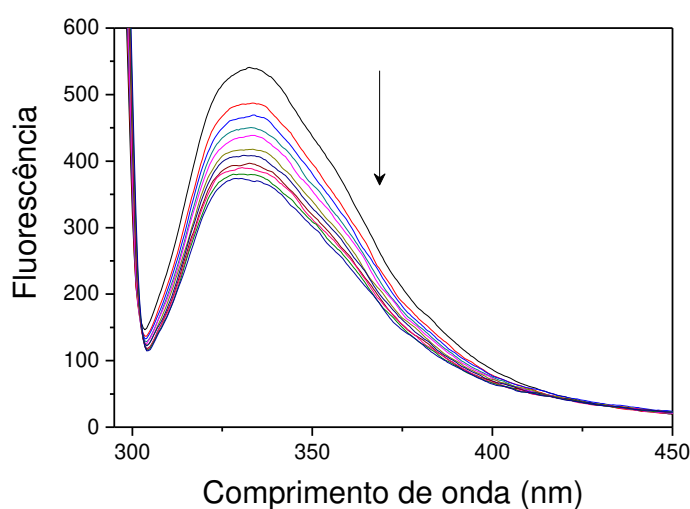


Figura 4 Espectros de emissão de fluorescência da LYS (0,6 μ M) na presença de concentrações crescentes de β CAR em pH 7,4 e a 25 °C. A seta indica o aumento na concentração do β CAR (0 μ M – 1,36 μ M). Fonte: Obtida dos resultados apresentados nesta dissertação.

A supressão de fluorescência pode ocorrer por dois mecanismos, os quais são classificados como supressão dinâmica ou estática, de acordo com o modo em que ocorre a interação entre o supressor e o fluoróforo. Quando a supressão de fluorescência é resultante da ocorrência de colisões entre o supressor e o fluoróforo significa que o mecanismo de supressão é dinâmico. Porém, quando a supressão de fluorescência é resultante da formação de complexo não fluorescente entre o supressor e o fluoróforo no estado fundamental, é chamada de estática (HUDSON et al., 2018; WU et al., 2019).

O fenômeno de extinção de fluorescência pode ser analisado pela equação de Stern-Volmer (Equação 1).

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

Em que F_0 e F representam as intensidades de fluorescência, do fluoróforo no estado estacionário, na ausência e na presença da molécula supressora, respectivamente. K_{sv} é a constante de supressão dinâmica de Stern-Volmer, $[Q]$ é a concentração do ligante (mol.L^{-1}), k_q é a constante biomolecular de supressão e τ_0 é o tempo de meia vida do fluoróforo na ausência do ligante (cerca de 10^{-8} para proteínas) (LELIS et al., 2017; WANG et al., 2011).

Espera-se que $\frac{F_0}{F}$ tenha uma dependência linear com $[Q]$ e, K_{sv} é a inclinação da reta obtida. Se ao aumentar a temperatura, o K_{sv} diminuir, o mecanismo de supressão de fluorescência é, predominantemente, estático, indicando a formação de complexo. O K_{sv} também está relacionado com o tempo de meia vida do fluoróforo, sendo o valor de k_q obtido pela relação $k_q = K_{sv}/\tau_0$. É possível avaliar essa dependência do mecanismo de supressão com a temperatura pela relação existente entre k_q do fluoróforo e a temperatura, pois com o aumento da temperatura o valor dessa constante aumenta para a supressão dinâmica. O contrário também é válido, já que na supressão estática, a constante biomolecular de supressão diminui com o aumento da temperatura. Além disso, quando a supressão é dinâmica o valor máximo de k_q é $2,0 \times 10^{10} \text{ L.mol}^{-1}\text{s}^{-1}$. Logo, para valores de k_q superiores a este a supressão é estática, indicando a formação de complexo (HUDSON et al., 2018; WANG et al., 2011).

Uma outra forma de diferenciar o mecanismo de extinção de fluorescência é por meio da medida do tempo de meia vida do fluoróforo. No caso da supressão

estática o valor do tempo de meia vida do fluoróforo não varia, pois ocorre a formação de complexos não fluorescentes no estado fundamental entre molécula supressora e proteína (fluoróforo). Os fluoróforos que vão para o estado excitado retornam para o estado fundamental com o mesmo tempo de meia vida, independente de irem em maior ou menor número ao estado excitado. Quando ocorre supressão dinâmica o tempo de meia vida do fluoróforo é reduzido, já que as moléculas sofrem colisões que fazem elas retornarem ao estado fundamental em um tempo menor, diminuindo, assim, o tempo de meia vida desses fluoróforos (CHENG, 2012; YILDIRIM-ELIKOGLU; ERDEM, 2018).

Por fim, o mecanismo de supressão também pode ser analisado pelos espectros de emissão de fluorescência. Caso haja um deslocamento do comprimento de onda de máxima emissão de fluorescência quando se compara os espectros da proteína na ausência e na presença do ligante, provavelmente houve formação de complexo, o qual emite fluorescência em um comprimento de onda diferente da proteína pura (HUDSON et al., 2018; LI et al., 2015a).

Sendo confirmado o mecanismo de supressão estático, ou seja, a formação de complexo entre a proteína e a molécula supressora, a constante de ligação (K_b) e a estequiometria do complexo formado (n) podem ser determinadas por meio da equação de regressão linear dupla modificada (Equação 2) (HUDSON et al., 2018; REZENDE et al., 2019a).

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

Em que F_0 e F são as intensidades de fluorescência na ausência e na presença da molécula supressora, $[Q]$ 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, ΔG° , por meio da equação 3 (HUDSON et al., 2018).

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

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

As forças que mantêm pequenas moléculas interagindo com macromolécula são geralmente ligações de hidrogênio, forças de Van der Waals, forças eletrostáticas e interações hidrofóbicas. O valor de ΔG° possui duas componentes, uma entálpica (ΔH°) e outra entrópica ($T\Delta S^\circ$) (Equação 4). A determinação do sinal e da magnitude dessas duas componentes fornece informações importantes acerca das principais forças envolvidas na formação do complexo. Para determinar o termo entálpico é utilizada a equação de Van't Hoff (Equação 5), com os dados de um experimento de fluorescência realizado em diferentes temperaturas. Ao fazer um gráfico de $\ln K_b$ versus $1/T$, a inclinação será o valor de $-\frac{\Delta H^\circ}{R}$. Como o R é uma constante e T é a temperatura estudada (K), é possível então obter o valor de ΔH° . Por fim, o termo entrópico pode ser obtido pela equação 4 (CHENG, 2012; HUDSON et al., 2018).

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (4)$$

$$\frac{\ln K_{b2}}{\ln K_{b1}} = -\frac{\Delta H^\circ}{R} \left(\frac{1}{T_1} + \frac{1}{T_2} \right) \quad (5)$$

Em que ΔH° (kJ/mol) é a variação da entalpia padrão de formação de complexo, ΔS° (kJ/mol) é a variação de entropia padrão de formação de complexo, K_b (L.mol⁻¹) é a constante de ligação, T é a temperatura em Kelvin e R (8,314 J/mol K) é a constante universal dos gases.

Os parâmetros termodinâmicos de interação entre o β CAR e a LYS foram determinados por meio da técnica de espectroscopia de fluorescência por LI et al. (2016). Contudo, não existe na literatura estudos que determinem os parâmetros cinéticos de interação entre o β CAR a LYS e que comparam os parâmetros termodinâmicos obtidos por diferentes técnicas para a interação entre essas duas moléculas. Por isso, o uso de outra técnica experimental, como a ressonância plasmônica de superfície é importante, já que ela permite obter os parâmetros termodinâmicos, sendo possível comparar com os obtidos pela técnica de espectroscopia de fluorescência. Além disso, essa técnica também permite obter os parâmetros cinéticos de interação entre essas duas espécies químicas.

3.3.2. Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR)

A técnica de SPR tornou-se uma das técnicas mais importantes para o estudo de interação intermolecular entre várias biomoléculas, desde proteínas a pequenas estruturas, como fagos e células, em virtude da associação e dissociação molecular.

Por meio dela parâmetros cinéticos, termodinâmicos e cinéticos podem ser determinados. Esta técnica pode ser empregada para o estudo da caracterização de interações entre proteínas e carotenoides (VACHALI et al., 2015), tornando válida a sua aplicação neste estudo. É uma técnica que apresenta vários aspectos positivos, sendo sua principal vantagem a capacidade de caracterizar a interação em tempo real sem a necessidade do uso de marcadores. Além disso, a alta sensibilidade dessa técnica permite o uso de pequenas quantidades de amostras, sendo a medida direta, rápida e fácil (HOMOLA; YEE; GAUGLITZ, 1999; PATCHING, 2014; SHEPHERD; HOPKINS; NAVRATILOVA, 2014).

O princípio desta técnica é baseado na alteração dos valores do índice de refração na vizinhança da camada de metal de um chip sensor, em resposta às interações que ocorrem entre as moléculas estudadas (NGUYEN et al., 2015). Em um experimento de interação entre uma proteína e um analito de interesse, a proteína é imobilizada em um chip sensor composto por uma camada de ouro, enquanto o analito se encontra em solução. Primeiro ocorre a passagem da solução tampão, para retirar o efeito do tampão utilizado. Em seguida, um fluxo de soluções com concentrações distintas do analito entra em contato com a proteína no chip sensor, permitindo que a interação ocorra. Por fim, ocorre a passagem da solução tampão após a passagem de cada concentração do analito (HUDSON et al., 2019).

Um sinal de resposta ressonante (RU) em função do tempo, é utilizado para expressar a mudança no índice de refração, após cada injeção da solução contendo a molécula de interesse sobre o chip sensor, sendo obtido um sensograma (Figura 5) (REZENDE et al., 2019a).

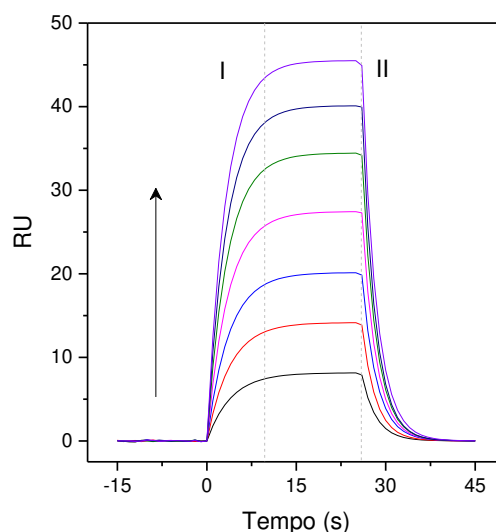


Figura 5 Sensogramas (RU x Tempo) da interação LYS-βCAR, com a seta indicando o aumento da concentração do βCAR (60-120 μM). Fonte: Obtida dos resultados apresentados nesta dissertação.

Um gráfico que apresenta os sensogramas da interação monovalente entre a proteína e o analito, apresenta duas regiões importantes para entender o comportamento dessas moléculas envolvidas na interação, essas regiões estão demarcadas na figura 5. Na região I, RU cresce durante a fase de associação (desde o momento da injeção $t_0 = 0$ s), devido à ligação e liberação simultânea do analito sobre a proteína imobilizada, com as interações intermoleculares ocorrendo em taxas mais elevadas, atingindo um valor máximo de sinal ressonante no tempo t_m . Entre as regiões I e II, as taxas de associação e dissociação entre a proteína e o ligante ocorrem na mesma proporção. Após esse tempo, os valores de RU decrescem com o aumento do tempo já que a dissociação prevalece, isso ocorre devido o fluxo do tampão sobre a proteína imobilizada (região II) (HUDSON et al., 2019; REZENDE et al., 2019).

A interação que ocorre entre uma proteína (P) e um analito (A) pode ser considerada uma interação monovalente, $P + A \xrightleftharpoons[k_d]{k_a} P - A$, em que k_a representa o quanto de complexo é formado por segundo e k_d representa a fração desses complexos formados que se dissociam por segundo. Para obter a constante observada (k_{obs}) e a k_d os sensogramas obtidos podem ser ajustados às equações 6 e 7 (DE PAULA et al., 2017).

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

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

Sendo $RU_{m\acute{a}x}$ a resposta ressonante maxima, t e o tempo total e t_m o tempo em que a ressonncia  mxima, ou seja, a partir desse tempo passa prevalecer a dissociaao.

Em baixas concentraoes do analito o valor de k_{obs} (equaao 8)  linearmente dependente da concentraao do analito ([analito]), permitindo o clculo de k_a pela inclinaao da curva do grfico de k_{obs} versus [analito].

$$k_{obs} = k_a[\text{analito}] + k_d \quad (8)$$

Realizando-se este experimento em diferentes temperaturas,  possvel a construao do grfico de Arrhenius, plotando-se $\ln k_a$ ou $\ln k_d$ versus $1/T$. Por meio deste grfico  determinada a energia de ativaao ($E_{a(y)}$) de associaao ou dissociaao, para o processo de formaao de complexo ativado, por meio da equaao 9.

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

Em que o “y” subscrito poder significar a fase de associaao ou de dissociaao, sendo substituído por “a” ou “d”, respectivamente. $E_{a(y)}(T)$  a energia de ativaao (kJ/mol), R  a constante universal dos gases (8,3145 J/mol.K) e k_y  a constante de associaao (k_a) ($M^{-1} \cdot s^{-1}$) ou dissociaao (k_d) (s^{-1}).

A partir da determinaao do valor da $E_{a(y)}$, so determinados os valores da variaao da energia livre de Gibbs de ativaao, $\Delta G_y^\ddagger(T)$, a variaao da entalpia de ativaao $\Delta H_y^\ddagger(T)$ e a variaao da entropia de ativaao $T\Delta S_y^\ddagger(T)$ para formaao de complexo ativado a partir da associaao de molculas livres ($y = a$) ou da dissociaao do complexo ($y = d$), por meio das equaoes 10, 11 e 12, respectivamente.

$$\Delta G_x^\ddagger = -RT \ln \left(\frac{k_x h}{k_B T} \right) \quad (10)$$

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

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

Conhecendo os valores da k_a e da k_d os parâmetros termodinâmicos também podem ser determinados. A constante de ligação K_b pode ser obtida por $K_b = k_a/k_d$ e assim os parâmetros: variação da energia livre de Gibbs (ΔG°), da entalpia (ΔH°) e da entropia ($T\Delta S^\circ$) padrão de formação do complexo podem ser determinados por meio das equações 3, 4 e 5. Os valores dos parâmetros termodinâmicos obtidos pela técnica de SPR podem, então, ser comparados aos obtidos pela técnica de espectroscopia de fluorescência.

4. Bibliografia

ALLAHDAD, Z. et al. Spectroscopic and docking studies on the interaction between caseins and β -carotene. **Food Chemistry**, v. 255, n. September 2017, p. 187–196, 2018.

ALLAHDAD, Z. et al. Binding of β -carotene to whey proteins: Multi-spectroscopic techniques and docking studies. **Food Chemistry**, v. 277, p. 96–106, 2019a.

ALLAHDAD, Z. et al. Binding of β -carotene to whey proteins: Multi-spectroscopic techniques and docking studies. **Food Chemistry**, v. 277, p. 96–106, 30 mar. 2019b.

ALTSCHUH, D. et al. Determination of kinetic constants for the interaction between a monoclonal antibody and peptides using surface plasmon resonance. **Biochemistry**, v. 31, n. 27, p. 6298–6304, jul. 1992.

ALWIS, D. D. D. H.; CHANDRIKA, U. G.; JAYAWEERA, P. M. Spectroscopic studies of neutral and chemically oxidized species of β -carotene, lycopene and norbixin in CH_2Cl_2 : Fluorescence from intermediate compounds. **Journal of Luminescence**, v. 158, p. 60–64, 2015.

APRODU, I. et al. Thermal stability of the complex formed between carotenoids from sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) and bovine β -lactoglobulin. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 173, p. 562–571, fev. 2017.

APRODU, I.; DUMITRAȘCU, L.; STĂNCIUC, N. Thermal Stability of Carotenoids- α -Lactalbumin Complex. In: **Encyclopedia of Food Chemistry**. [s.l.] Elsevier, 2018. v. 2p. 583–588.

ARAI, M. Unified understanding of folding and binding mechanisms of globular and intrinsically disordered proteins. **Biophysical Reviews**, v. 10, n. 2, p. 163–181, 6 abr. 2018.

BAHRI, A. et al. Binding analysis between monomeric β -casein and hydrophobic bioactive compounds investigated by surface plasmon resonance and fluorescence spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 286, n. February, p. 289–296, 2019.

BAKAR, K. A.; FERROZ, S. R. A critical view on the analysis of fluorescence quenching data for determining ligand–protein binding affinity. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 223, p. 117337, 5 dez. 2019.

BEVERUNG, C. J.; RADKE, C. J.; BLANCH, H. W. Protein adsorption at the oil/water interface: characterization of adsorption kinetics by dynamic interfacial tension measurements. **Biophysical Chemistry**, v. 81, n. 1, p. 59–80, set. 1999.

BLAKE, C. C. F. et al. Structure of Hen egg-white lysozyme. **Nature**, v. 206, n. 986, p. 757–761, 1965.

BORANA, M. S. et al. Curcumin and kaempferol prevent lysozyme fibril formation by modulating aggregation kinetic parameters. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1844, n. 3, p. 670–680, 2014.

CAO, D. et al. Expression of recombinant human lysozyme in egg whites of transgenic hens. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, p. 1–15, 2015.

CHANG, H. et al. Binding to Bovine Serum Albumin Protects β - Carotene against Oxidative Degradation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, p. 5951–5957, 2016.

CHEN, X. et al. Synergistic effect of antibacterial agents human β -defensins, cathelicidin LL-37 and lysozyme against and. **Journal of Dermatological Science**, v. 40, n. 2, p. 123–132, nov. 2005.

CHENG, Z. Studies on the interaction between scopoletin and two serum albumins by spectroscopic methods. **Journal of Luminescence**, v. 132, n. 10, p. 2719–2729, 2012.

CROGUENNEC, T. et al. Iron and citrate interactions with hen egg white lysozyme. **Food Chemistry**, v. 68, n. 1, p. 29–35, jan. 2000.

DAS, S. et al. Binding of naringin and naringenin with hen egg white lysozyme: A spectroscopic investigation and molecular docking study. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 192, n. November, p. 211–221, 2018.

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, 2017.

DEBOTTON, N. et al. A quantitative evaluation of the molecular binding affinity between a monoclonal antibody conjugated to a nanoparticle and an antigen by surface plasmon resonance. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 74, n. 2, p. 148–156, fev. 2010.

DI LENA, G. et al. Carotenoid profiling of five microalgae species from large-scale production. **Food Research International**, v. 120, p. 810–818, 2018.

DING, F. et al. Fluorescence spectroscopic investigation of the interaction between chloramphenicol and lysozyme. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 10, p. 4083–4089, 2009.

DU, Y. et al. Improved stability, epithelial permeability and cellular antioxidant activity of β -carotene via encapsulation by self-assembled α -lactalbumin micelles. **Food Chemistry**, v. 271, p. 707–714, jan. 2019.

DUMITRAȘCU, L. et al. Studies on binding mechanism between carotenoids from sea buckthorn and thermally treated α -lactalbumin. **Journal of Molecular Structure**, v. 1125, p. 721–729, 2016.

EROGLU, A.; HARRISON, E. H. Carotenoid metabolism in mammals, including man: formation, occurrence, and function of apocarotenoids. **Journal of Lipid Research**, v. 54, n. 7, p. 1719–1730, jul. 2013.

FABINI, E.; DANIELSON, U. H. Monitoring drug–serum protein interactions for early ADME prediction through Surface Plasmon Resonance technology. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 144, p. 188–194, set. 2017.

FATHI, F. et al. Kinetic and thermodynamic studies of bovine serum albumin interaction with ascorbyl palmitate and ascorbyl stearate food additives using surface plasmon resonance. **Food Chemistry**, v. 246, p. 228–232, 2018.

FELTL, L. et al. Reliability of Carotenoid Analyses: A Review. **Current Analytical**

Chemistry, v. 1, n. 1, p. 93–102, 1 jan. 2005.

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

FLEMING, A. On a Remarkable Bacteriolytic Element Found in Tissues and Secretions. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 93, n. 653, p. 306–317, 1922.

GHOSH, K.; RATHI, S.; ARORA, D. Fluorescence spectral studies on interaction of fluorescent probes with Bovine Serum Albumin (BSA). **Journal of Luminescence**, v. 175, p. 135–140, 2016.

GORBENKO, G. P.; IOFFE, V. M.; KINNUNEN, P. K. J. Binding of Lysozyme to Phospholipid Bilayers : Evidence for Protein Aggregation upon Membrane Association. **Biophysical Journal**, v. 93, n. 1, p. 140–153, 2007.

GUO, Y. et al. Locating the binding domains of lysozyme with ionic liquids in aqueous solution via spectroscopic studies. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 214, p. 239–245, 5 maio 2019.

GUPTA, S. K. et al. Lycopene attenuates oxidative stress induced experimental cataract development: an in vitro and in vivo study. **Nutrition**, v. 19, n. 9, p. 794–799, set. 2003.

HAMDANI, A. M. et al. Effect of guar gum conjugation on functional, antioxidant and antimicrobial activity of egg white lysozyme. **Food Chemistry**, v. 240, p. 1201–1209, 2018.

HOMOLA, J.; YEE, S. S.; GAUGLITZ, G. Surface plasmon resonance sensors: review. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 54, n. 1, p. 3–15, 1999.

HORNERO-MÉNDEZ, D.; BRITTON, G. Involvement of NADPH in the cyclization reaction of carotenoid biosynthesis. **FEBS Letters**, v. 515, n. 1–3, p. 133–136, 27 mar. 2002.

HORNOK, V. et al. Thermodynamic and kinetic insights into the interaction of kynurenic

acid with human serum albumin: Spectroscopic and calorimetric approaches. **Journal of Molecular Liquids**, v. 313, p. 112869, set. 2020.

HOWARD, J. B.; GLAZER, A. N. Papaya lysozyme. Terminal sequences and enzymatic properties. **Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n. 6, p. 1399–1409, 1969.

HUDSON, E. A. et al. Thermodynamic and kinetic analyses of curcumin and bovine serum albumin binding. **Food Chemistry**, v. 242, n. September 2017, p. 505–512, 2018.

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

IMOTO, T. et al. Fluorescence of lysozyme: emissions from tryptophan residues 62 and 108 and energy migration. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 69, n. 5, p. 1151–1155, 1972a.

IMOTO, T. et al. Fluorescence of Lysozyme: Emissions from Tryptophan Residues 62 and 108 and Energy Migration. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 69, n. 5, p. 1151–1155, 1 maio 1972b.

JAIN, A. et al. Characterization of microcapsulated β -carotene formed by complex coacervation using casein and gum tragacanth. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 87, p. 101–113, 2016.

KAROUI, R.; BLECKER, C. Fluorescence Spectroscopy Measurement for Quality Assessment of Food Systems-a Review. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 3, p. 364–386, 2011.

KNOCKAERT, G. et al. Carrot β -carotene degradation and isomerization kinetics during thermal processing in the presence of oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 41, p. 10312–10319, 17 out. 2012.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. Boston, MA: Springer US, 2006.

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

LELIS, C. A. et al. Insights into protein-curcumin interactions: Kinetics and thermodynamics of curcumin and lactoferrin binding. **Food Hydrocolloids**, v. 105, n. June 2019, p. 105825, ago. 2020.

LESNIEROWSKI, G.; STANGIERSKI, J. What's new in chicken egg research and technology for human health promotion? - A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 71, n. November 2017, p. 46–51, 2018.

LI, X.-R. et al. Comparative studies on interactions of -ascorbic acid, α -tocopherol, procyanidin B3, β -carotene, and astaxanthin with lysozyme using fluorescence spectroscopy and molecular modeling methods. **Journal of Food Biochemistry**, v. 41, n. 2, p. e12338, abr. 2016.

LI, X. et al. β -Carotene and astaxanthin with human and bovine serum albumins. **Food Chemistry**, v. 179, n. january, p. 213–221, 2015a.

LI, X.; LI, P. Study on the interaction of β -carotene and astaxanthin with trypsin and pepsin by spectroscopic techniques. **Luminescence**, v. 31, n. 3, p. 782–792, 2016.

LI, X.; YAN, Y. Comparative Study of the Interactions between Ovalbumin and five Antioxidants by Spectroscopic Methods. **Journal of Fluorescence**, v. 27, n. 1, p. 213–225, 8 jan. 2017.

LI, Z. et al. Curcumin encapsulated in the complex of lysozyme/carboxymethylcellulose and implications for the antioxidant activity of curcumin. **Food Research International**, v. 75, n. 27 may, p. 98–105, 2015b.

MATTEA, F. et al. Supercritical antisolvent precipitation from an emulsion: β -Carotene nanoparticle formation. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 51, n. 2, p. 238–247, 2009.

MEHMOOD, T. et al. Optimization of mixed surfactants-based β -carotene nanoemulsions using response surface methodology: An ultrasonic homogenization approach. **Food Chemistry**, v. 253, n. October 2017, p. 179–184, 2018.

MOHAMMADI, F. et al. Inhibition of amyloid fibrillation of hen egg-white lysozyme by the natural and synthetic curcuminoids. **RSC Advances**, v. 6, n. 28, p. 23148–23160, 2016.

MUTSOKOTI, L. et al. Carotenoid bioaccessibility and the relation to lipid digestion: A kinetic study. **Food Chemistry**, v. 232, p. 124–134, out. 2017.

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

O'SHANNESY, D. J. et al. **Determination of rate and equilibrium binding constants for macromolecular interactions by surface plasmon resonance** *Methods in Enzymology*, 1994.

PAIVA, P. H. C. et al. Influence of protein conformation and selected Hofmeister salts on bovine serum albumin/lutein complex formation. **Food Chemistry**, v. 305, n. May 2019, p. 125463, 2020.

PAN, A. et al. Enthalpy–Entropy Compensation (EEC) Effect: A Revisit. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 119, n. 52, p. 15876–15884, 31 dez. 2015.

PATCHING, S. G. Surface plasmon resonance spectroscopy for characterisation of membrane protein-ligand interactions and its potential for drug discovery. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1838, n. 1 PARTA, p. 43–55, 2014.

PATIL, S.; SISTLA, S.; JADHAV, J. Interaction of small molecules with human tyrosinase: A surface plasmon resonance and molecular docking study. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 1123–1129, 1 nov. 2016.

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

PENG, W. et al. Binding patterns and structure-affinity relationships of food azo dyes with lysozyme: A multitechnique approach. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 50, p. 12415–12428, 2013.

PILBROW, J.; GARAMA, D.; CARNE, A. Carotenoid-binding proteins; accessories to

carotenoid function. **Acta Biochimica Polonica**, v. 59, n. 1, p. 163–165, 2012.

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, n. April, p. 526–532, 2019.

REZENDE, J. DE P. et al. Temperature modulation of lutein-lysozyme hydrophobic-hydrophilic interaction balance. **Journal of Molecular Liquids**, v. 408, jan. 2020.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Nomenclature, structures, and physical and chemical properties. In: **Food carotenoids : chemistry, biology and technology**. first ed. Pondicherry: John Wiley & Sons, Ltd, 2016. p. 1–19.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Update on natural food pigments - A mini-review on carotenoids, anthocyanins, and betalains. **Food Research International**, v. 124, n. 2017, p. 200–205, 2019.

SAHA, S.; CHOWDHURY, J. Binding Interaction of Juglone with Lysozyme: Spectroscopic Studies Aided by In Silico Calculations. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 193, p. 89–99, 1 abr. 2019.

SAINI, R. K.; KEUM, Y. S. Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. **Food Chemistry**, v. 240, n. April 2017, p. 90–103, 2018.

SAINI, R. K.; NILE, S. H.; PARK, S. W. Carotenoids from fruits and vegetables: Chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities. **Food Research International**, v. 76, p. 735–750, out. 2015.

SASSO, S. et al. Microalgae in the postgenomic era: A blooming reservoir for new natural products. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 4, p. 761–785, 2012.

SCHNEIDER, C. S. et al. Surface plasmon resonance as a high throughput method to evaluate specific and non-specific binding of nanotherapeutics. **Journal of Controlled Release**, v. 219, p. 331–344, 2015.

SHAISH, A. et al. 9-cis β -carotene-rich powder of the alga *Dunaliella bardawil* increases plasma HDL-cholesterol in fibrate-treated patients. **Atherosclerosis**, v. 189,

n. 1, p. 215–221, 2006.

SHEPHERD, C. A.; HOPKINS, A. L.; NAVRATILOVA, I. Fragment screening by SPR and advanced application to GPCRs. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 116, n. 2–3, p. 113–123, 2014.

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

SURYAWANSHI, V. D. et al. Spectroscopic analysis on the binding interaction of biologically active pyrimidine derivative with bovine serum albumin. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n. 1, p. 56–63, 2016.

SYAMILA, M. et al. Effect of temperature, oxygen and light on the degradation of β -carotene, lutein and α -tocopherol in spray-dried spinach juice powder during storage. **Food Chemistry**, 2019.

TAKAHASHI, M. et al. Heat-denatured lysozyme could be a novel disinfectant for reducing hepatitis A virus and murine norovirus on berry fruit. **International Journal of Food Microbiology**, v. 266, n. November 2017, p. 104–108, 2018.

VACHALI, P. P. et al. Carotenoids as possible interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP) ligands: A surface plasmon resonance (SPR) based study. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 539, n. 2, p. 181–186, nov. 2013.

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

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, 2011.

VAN ELZEN, R. et al. Ligand-induced conformational changes in prolyl oligopeptidase: a kinetic approach. **Protein Engineering Design and Selection**, v. 30, n. 3, p. 219–226, 5 jan. 2017.

VARELA, J. C. et al. Production of carotenoids by microalgae: Achievements and challenges. **Photosynthesis Research**, v. 125, n. 3, p. 423–436, 2015.

WANG, B. et al. Integrating Structural Information to Study the Dynamics of Protein-Protein Interactions in Cells. **Structure**, v. 26, n. 10, p. 1414- 1424.e3, 2 out. 2018.

WANG, G. et al. Binding of quercetin to lysozyme as probed by spectroscopic analysis and molecular simulation. **Journal of Fluorescence**, v. 21, n. 5, p. 1879–1886, 2011.

WANG, S. S. S.; LIU, K. N.; LEE, W. H. Effect of curcumin on the amyloid fibrillogenesis of hen egg-white lysozyme. **Biophysical Chemistry**, v. 144, n. 1–2, p. 78–87, 2009.

WANG, Z. et al. Study on the binding behavior of lysozyme with cephalosporin analogues by fluorescence spectroscopy. **Journal of Fluorescence**, v. 19, n. 5, p. 801–808, 2009.

WU, T. et al. What is new in lysozyme research and its application in food industry? A review. **Food Chemistry**, v. 274, p. 698–709, fev. 2019.

WU, Y. L. et al. Spectroscopic studies on the interaction between CdTe nanoparticles and lysozyme. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 71, n. 4, p. 1199–1203, 2008.

YE, Z.-W.; JIANG, J.-G.; WU, G.-H. Biosynthesis and regulation of carotenoids in *Dunaliella*: Progresses and prospects. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 4, p. 352–360, jul. 2008.

YI, J. et al. Beta-carotene encapsulated in food protein nanoparticles reduces peroxyl radical oxidation in Caco-2 cells. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 31–40, 2015.

YILDIRIM-ELIKOGLU, S.; ERDEM, Y. K. Interactions between milk proteins and polyphenols: Binding mechanisms, related changes, and the future trends in the dairy industry. **Food Reviews International**, v. 34, n. 7, p. 665–697, 3 out. 2018.

YONEKURA, L.; NAGAO, A. Intestinal absorption of dietary carotenoids. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 51, n. 1, p. 107–115, jan. 2007.

ZHANG, H. M. et al. Investigation of the interaction between chlorophenols and

lysozyme in solution. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 104, n. 3, p. 405–413, 2011.

Capítulo 2

Lysozyme/ β -carotene interaction determined by surface plasmon resonance and fluorescence spectroscopy: Kinetic analysis and comparative thermodynamics

Abstract

β -Carotene (β CAR) is a pro-vitamin A carotenoid with powerful antioxidant properties. However, it has low aqueous solubility, light and heat stability, and bioavailability. An interesting strategy to improve β CAR incorporation in food matrices while preserving its properties is the use of proteins as nanocarriers. Lysozyme (LYS) is a protein capable of carrying bioactive molecules and has antitumor, antiviral, and antimicrobial activities. To enable the use of LYS with β CAR, it is important to understand the dynamics of LYS- β CAR binding. Here, a thermodynamic and kinetic investigation of LYS- β CAR complex formation at physiological pH was carried out using fluorescence spectroscopy (FS) and surface plasmon resonance (SPR). These techniques are complementary because FS can be used to detect binding occurring close to tryptophan (Trp) residues in lysozyme, whereas SPR can be used to detect the binding events occurring at every binding site in a protein. Using these techniques, the binding constants were found to be on the order of 10^5 to 10^3 L mol⁻¹ by FS and SPR, respectively. Both techniques reveal that the interaction between LYS and β CAR is entropically driven. In addition, kinetic parameters related to intermediate complex formation were obtained, and we found that the rate of intermediate complex association was greater than that of dissociation based on the lower ΔG^\ddagger_a values than ΔG^\ddagger_d . In addition, the occurrence of an isokinetic relationship indicates that intermediate complex formation results in changes in LYS binding sites, and both desolvation of the free molecules and conformational changes are temperature dependent. Thus, we have elucidated the dynamics of LYS- β CAR complex formation and provided important evidence that LYS can be used to carry β CAR, which will improve its application and functionality in food.

Keywords: Thermodynamic parameters; kinetic parameters; β -carotene; lysozyme; fluorescence spectroscopy; surface plasmon resonance

1. Introduction

In recent years, the demand for carotenoids as natural colorants and functional molecules has increased (DI LENA et al., 2018). β -Carotene (β CAR) is a hydrophobic carotenoid that exhibits a wide range of biological effects, especially as a pro-vitamin for vitamin A, via which it exerts powerful antioxidant effects and protection against health problems, including cancer, arteriosclerosis, cardiovascular diseases, and ulcers (KNOCKAERT et al., 2012; SYAMILA et al., 2019). However, the use of β CAR in food matrices and related areas is limited because of its poor aqueous solubility, low stability, and low bioavailability (DU et al., 2019). Fortunately, complex formation with globular proteins can be used to overcome these limitations. This is possible because, in living tissues, β CAR and carotenoids are associated with the tertiary structure of proteins (ALLAHDAD et al., 2018).

Lysozyme (*LYS*) is a small globular protein comprising 129 amino acid residues and is stabilized by four disulfide linkages between its eight cysteine residues (HAMDANI et al., 2018; PENG et al., 2013). *LYS* has some biological properties, for example, antitumor, antiviral, and antimicrobial activities (GORBENKO; IOFFE; KINNUNEN, 2007; TAKAHASHI et al., 2018). In addition, *LYS* has a hydrophobic region that allows its interaction with hydrophobic compounds (BEVERUNG; RADKE; BLANCH, 1999). Therefore, *LYS* can be used to protect and carry β CAR by forming a complex, and this has the potential to increase the applications of β CAR, especially its health and food applications.

Thus, knowledge of the kinetic and thermodynamic parameters related to complex formation between *LYS* and β CAR is important for the food industry and science in general (FABINI; DANIELSON, 2017). The kinetic constants provide information about the speed of association between free molecules, the speed of dissociation of the complex, and kinetic energies related to the formation of the intermediate complex (ALTSCHUH et al., 1992; HORNOK et al., 2020). In contrast, thermodynamic binding parameters provide information about the thermodynamic stability of the complex and its formation (PAULA et al., 2017).

Some previous studies have evaluated the thermodynamic parameters related to the interaction of β CAR with globular proteins, such as whey protein isolate (ALLAHDAD et al., 2019), bovine serum albumin (*BSA*) (CHANG et al., 2016; SILVA et al., 2018), and ovalbumin (LI; YAN, 2017), and the results indicate that complex

formation is entropically driven. Moreover, the complexation of β CAR with α -lactalbumin (α LA) (DU et al., 2019) or BSA (CHANG et al., 2016; SILVA et al., 2018) has been shown to improve its aqueous solubility and photostability, respectively.

Li, Jia, Yan, & Ni (2016) studied the thermodynamics of the interaction between LYS and β CAR in pH 7.4 buffer using fluorescence spectroscopy (FS). However, the kinetic and thermodynamic parameters of this system obtained using surface plasmon resonance (SPR) have not been reported. SPR is a powerful analytical technique that relies on changes in the refractive index at the surface of gold nanoparticles because of ligand–analyte interactions. SPR is an important technique because it allows both kinetic and thermodynamic parameters to be obtained, uses small quantities of reagents, and enables real-time monitoring (NGUYEN et al., 2015; PATIL; SISTLA; JADHAV, 2016; SCHNEIDER et al., 2015).

In this study, we selected LYS and β CAR as ligand and analyte, respectively, and investigated the kinetics and thermodynamic parameters of the (LYS – β CAR) $^\circ$ complex formation using SPR. Additionally, the thermodynamic data obtained by SPR were compared with those obtained by the FS.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Lysozyme from chicken egg white (> 90 wt.%) and β -carotene (> 93 wt.%) were purchased from Sigma–Aldrich (USA). Ethanol (research grade) was acquired from Alphatec Ltda. (Brazil) and used to improve β CAR solubilization. To prepare LYS and β CAR solutions, a pH 7.4 buffer was prepared using monobasic potassium phosphate (KH_2PO_4) and dibasic potassium phosphate (K_2HPO_4), both research grade, obtained from Lab Impex Ltd. (USA). For the SPR measurements, a carboxymethyl-dextran (CM5) sensor chip and amine coupling reagent (*N*-hydroxysuccinimide (NHS), > 99 wt.%), [*N*-ethyl-*N*,*N'*-(dimethylaminopropyl) carbodiimide (> 99 wt.%; EDC), and 1.0 M ethanolamine/HCl (pH 8.5) were purchased from General Electric Healthcare Company (USA).

2.2. Thermodynamic study of (LYS – β CAR) $^\circ$ binding close to Trp residues by FS

All fluorescence spectra were recorded with an LS55 fluorescence spectrophotometer (Perkin Elmer Inc., Waltham, USA) in a thermostatic bath. The experiments were conducted at 293.15, 298.15, 303.15, 308.15, and 313.15 K. LYS

solutions (0.6 μM) and βCAR stock solutions (15 μM) were prepared with a phosphate pH 7.4 buffer and the concentration of ethanol remained constant at 3% (v/v) in all samples. First, 2 mL of the *LYS* solution was added to a quartz cell having a path length of 1 cm; then, 10 aliquots (20 μL each) of the βCAR stock solution were titrated into the protein solution. The βCAR concentration in the quartz cell ranged from 0.149 to 1.36 μM . After each titration, the Trp residues in *LYS* were excited at 295 nm using emission and excitation slits of 7.0 nm and 775 V for the photomultiplier tube voltage, and a scan rate of 500 nm/min. The emission spectra ranged from 296 to 500 nm.

The βCAR solutions had high absorption values at the excitation (295 nm) and emission (333 nm) wavelengths; thus, an experiment was conducted to correct for the inner filter effect. A Lambda 35 UV–Vis spectrophotometer (Perkin Elmer Inc., Waltham, USA) was used to obtain the absorbance of the samples containing *LYS* 0.6 μM and *LYS* 0.6 μM with increasing βCAR concentrations (0.149–1.36 μM). The fluorescence intensities were corrected using Eq. 1 (BAKAR; FERROZ, 2019; VAN DE WEERT; STELLA, 2011).

$$F_c = F_m 10^{(A_{ex} + A_{em})/2} \quad (1)$$

Here, F_c and F_m are the corrected and measured fluorescence intensities, respectively, and A_{ex} and A_{em} represent the differences in the absorbance values upon addition of βCAR at the excitation (295 nm) and emission (333 nm) wavelengths, respectively.

2.3. Kinetic and thermodynamic studies of *LYS* and βCAR binding by SPR

SPR analysis was used to obtain the kinetic and thermodynamic parameters of (*LYS* – βCAR)^o complex formation. For this purpose, a Biacore X100 instrument from the General Electric Healthcare Company (USA) was used. To obtain the kinetic and thermodynamic parameters, *LYS* was immobilized on a CM5 sensor chip using amine coupling reagents. First, the chip was activated using EDC (0.4 M) and NHS (0.1 M), which were flowed over the CM5 for 7 min and reacted with carboxymethyl-dextran on CM5. Then, a *LYS* solution (0.6 μM) at pH 4.0 (to improve *LYS* immobilization) was flowed over the CM5 sample channel, thus permitting the formation of covalent bonds between the carboxylic groups of carboxymethyl-dextran and the NH_2 groups of *LYS*. Finally, ethanolamine-HCl was flowed over the CM5 chip for 7 min to block the unreactive groups. The signal was then recorded, which indicated a low density of immobilized *LYS* (1280 RU, where RU is the binding response).

After LYS immobilization, β CAR solutions (60, 70, 80, 90, 100, 110, and 120 μ M) were flowed over both the sample and reference channels of CM5. A sensorgram was generated for each β CAR concentration, which characterized a binding cycle. Between the cycles, the baseline was reached by injection of pH 7.4 buffer. This experiment was conducted at six different temperatures (285.15, 289.15, 293.15, 297.15, 289.15, and 301.15 K).

3. Results and discussion

3.1. Thermodynamics of $(LYS - \beta CAR)^\circ$ formation via FS

3.1.1. Fluorescence quenching analyses and binding constant determination

The steady-state FS technique is widely used to provide valuable information about the thermodynamics of the interactions that occur close to the Trp residues of the proteins. This is possible because the fluorescence intensity emitted by Trp may be reduced when the concentration of the ligand molecules increases. *LYS* has six Trp residues, and the main residues responsible for its fluorescence are found at positions 62 and 108 of its amino acid sequence (GUO et al., 2019; IMOTO et al., 1972). Fig 1A shows the fluorescence spectra of *LYS* (0.6 μ M) in the presence of an increasing concentration of β CAR (0.149–1.36 μ M) at 298.15 K and pH 7.4. The arrow indicates the reduction in the fluorescence intensity on the *y*-axis as the β CAR concentration increases.

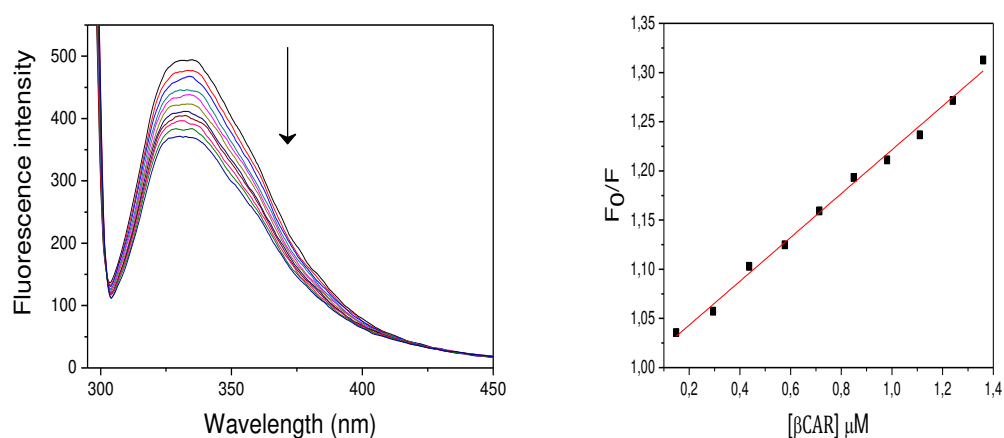


Fig. 1 - Fluorescence emission spectra (A) of *LYS* (0.6 μ M). The arrow indicates the reduction in the fluorescence intensity in the presence of increasing concentrations of β CAR (0.149–1.36 μ M), and Stern–Volmer plot (B) of the $(LYS - \beta CAR)^\circ$ interaction at

298.15 K and pH 7.4. The fluorescence spectra obtained for other temperatures are shown in Fig. S1 (Supporting information).

Upon excitation at 295 nm, the *LYS* fluorescence spectra did not show any shifts in the emission wavelength after the addition of β *CAR*, indicating that β *CAR* does not induce conformational changes in the Trp microenvironment of *LYS* (SAHA; CHOWDHURY, 2019). On the other hand, the intensity of the fluorescence emitted by *LYS* decreased by around 25% after titration with 1.36 μ M β *CAR*, confirming the quenching of the intrinsic fluorescence of *LYS* by β *CAR*. A variety of processes can lead to fluorescence quenching, including complex formation, dynamic quenching, and the inner-filter effect (BAKAR; FERROZ, 2019; VAN DE WEERT; STELLA, 2011). In this study, the potential magnitude of the inner filter effect of β *CAR* was corrected using the UV absorption spectra of this quencher. Therefore, to establish which quenching mechanism is prevalent when *LYS* binds with β *CAR*, all corrected fluorescence data were analyzed using the Stern–Volmer model (Eq. 2).

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[\beta CAR] = 1 + k_q\tau_0[\beta CAR] \quad (2)$$

Here, F_0 and F are the fluorescence intensities in the absence and presence of the quencher (β *CAR*), respectively; K_{SV} is the Stern–Volmer quenching constant; $[\beta CAR]$ is the quencher concentration; k_q is the biomolecular quenching constant; and τ_0 is the lifetime of the *LYS* fluorescence in the absence of a quencher equal to approximately 1.749 ns (Li et al., 2016).

From the fluorescence intensity dependence on $[\beta CAR]$, it was possible to determine K_{SV} values using linear regression of the Stern–Volmer plot (F_0/F versus $[\beta CAR]$) (Fig 1B), and it ranged from 2.37×10^4 to 1.72×10^4 M⁻¹ when the temperature increased from 293.15 to 313.15 K. The k_q values were obtained using Eq. 3, and the results are listed in Table 1. The smallest bimolecular quenching rate constant (0.98×10^{13} M⁻¹ s⁻¹) was almost 500-fold higher than the maximum diffusion collision quenching constant (2×10^{10} M⁻¹ s⁻¹) (LAKOWICZ, 2006). This indicates that static quenching was the main mechanism involved in the formation of the thermodynamically stable (*LYS* – β *CAR*)^o complex.

$$K_q = \frac{K_{SV}}{\tau_0} \quad (3)$$

The thermodynamic binding parameters, binding constant (K_b), and stoichiometry coefficients of the formed complexes (n) were determined using the double log regression curve equation (Eq. 4). The corresponding values were obtained from the intercept and slope of the plot $\log \frac{F_0-F}{F}$ versus $\log \frac{1}{[\beta CAR] - \frac{(F_0-F)}{F}[LYS]}$, respectively, and are listed in Table 1.

$$\log \frac{F_0-F}{F} = n \log K_b - n \log \frac{1}{[\beta CAR] - \frac{(F_0-F)}{F}[LYS]} \quad (4)$$

Here, F_0 and F are the fluorescence intensities in the absence and presence of a quencher molecule, respectively; n is the stoichiometry number of formed complexes; K_b is the binding constant; $[\beta CAR]$ is the analyte concentration, and $[LYS]$ is ligand concentration.

Table 1 k_q , K_b , and n values for $(LYS - \beta CAR)^\circ$ complex formation.

T (K)	k_q ($\times 10^{13} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	K_b ($\times 10^5 \text{ L mol}^{-1}$)	n	R^2
293.15	1.35	2.04	0.70	0.98
298.15	1.06	2.19	0.95	0.99
303.15	1.23	2.28	0.84	0.90
308.15	1.05	2.33	0.91	0.99
313.15	0.98	2.43	0.95	0.98

For all parameters, the relative deviation was less than 5%.

The K_b values of the $(LYS - \beta CAR)^\circ$ complexes increased from 2.04×10^5 to $2.43 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1}$ (about 1.2 times) when the temperature was increased from 293.15 to 313.15 K. Consequently, at higher temperatures, more complexes were formed, indicating that complex formation was an endothermic process (PAIVA et al., 2020). Additionally, the n values were all approximately equal to 1, which indicates that 1 mol of βCAR interacts with 1 mol of LYS . Therefore, there is at least one binding site for βCAR in LYS . Similar stoichiometries have also been found by FS for the interaction of βCAR with globular proteins such as whey proteins and their fractions, αLA , and BSA (ALLAHDAD et al., 2019), native BSA (SILVA et al., 2018), ovalbumin (LI; YAN, 2017), and αLA (DUMITRAȘCU et al., 2016). Li et al. (2016) also studied the $(LYS - \beta CAR)^\circ$ interaction using FS in pH 7.4 phosphate buffer; however, they excited

the *LYS* at 280 and 295 nm and used acetone as a solvent instead of ethanol. They found that n was approximately equal to 1, but the K_b values were on the order of 10^6 L mol⁻¹, which can be attributed to the different solvents used to dissolve β *CAR*.

3.1.2. Thermodynamic potential and its components for (*LYS* – β *CAR*)° formation

To gain more insight into the formation of the (*LYS* – β *CAR*)° complex, the standard Gibbs free energy change (ΔG°), standard enthalpy change (ΔH°), and standard entropy change ($T\Delta S^\circ$) were calculated, and the results are listed in Table 2. The ΔG° values were calculated directly using the well-known relationship $\Delta G^\circ = -RT\ln K_b$. The ΔH° values were determined by plotting the $\ln K_b$ versus $1/T$ at each temperature studied (Fig. S2). Then, a polynomial model was used to determine the values of the constants a , b , and c (Eq. 5). Knowing these constants, the ΔH° values were found using the nonlinear van't Hoff model (Eq. 6). Finally, the $T\Delta S^\circ$ values were obtained using the fundamental Gibbs equation (Eq. 7).

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

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

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

Table 2 Thermodynamics parameters ΔG° , ΔH° , and $T\Delta S^\circ$ for (*LYS* – β *CAR*)° complex formation at pH 7.4 using FS.

T (K)	ΔG° (kJ mol ⁻¹)	ΔH° (kJ mol ⁻¹)	$T\Delta S^\circ$ (kJ mol ⁻¹)	R^2
293.15	-29.79	9.07	38.86	
298.15	-30.46	7.58	38.04	
303.15	-31.08	6.13	37.21	0.98
308.15	-31.65	4.73	36.38	
313.15	-32.27	3.38	35.65	

For all parameters, the relative deviation was less than 5%.

The $(LYS - \beta CAR)^\circ$ complex is a thermodynamically stable nanostructure, as indicated by its negative ΔG° values. The reduction in ΔG° from -29.79 to -32.27 kJ mol⁻¹ with increase in temperature from 293.15 to 313.15 K indicates that in the chemical equilibrium $(LYS)_f + (\beta CAR)_f \rightleftharpoons (LYS - \beta CAR)^\circ$, the $(LYS - \beta CAR)^\circ$ complex is more stable than the free LYS and βCAR ($(LYS)_f$ and $(\beta CAR)_f$, respectively) molecules, and this stability slightly increases as temperature increases (SILVA et al., 2018). The ΔH° and $T\Delta S^\circ$ values were positive and decreased as temperature increased. These parameters are generally considered a result of three molecular processes: a) desolvation, b) conformational change, and c) interaction enthalpy (ΔH°_{des} , ΔH°_{conf} , and ΔH°_{int} , respectively) and entropy ($T\Delta S^\circ_{des}$, $T\Delta S^\circ_{conf}$, and $T\Delta S^\circ_{int}$, respectively), as represented by Eqs. (8) and (9), respectively:

$$\Delta H^\circ = \Delta H^\circ_{des} + \Delta H^\circ_{conf} + \Delta H^\circ_{int} \quad (8)$$

$$T\Delta S^\circ = T\Delta S^\circ_{des} + T\Delta S^\circ_{conf} + T\Delta S^\circ_{int} \quad (9)$$

The ΔH°_{des} contribution is always positive because the water–water interactions near hydrophobic regions are stronger than the water–water interactions in the bulk. Hence, to form interactions between LYS and βCAR , the system must gain energy. In addition, the $T\Delta S^\circ_{des}$ term is also always positive because the water molecules in the solvation layers are more structured than those in the bulk. On the other hand, ΔH°_{int} and $T\Delta S^\circ_{int}$ are always negative because of the energy released and the entropy loss when LYS interacts with βCAR . As discussed before, the FS data did not show any conformational changes at sites surrounding the Trp residues of LYS . Furthermore, βCAR has a rigid structure caused by the presence of methyl groups and double bonds conjugated along its long carbon chain (APRODU et al., 2017); as a consequence, ΔH°_{conf} and $T\Delta S^\circ_{conf}$ make a small contribution to the total enthalpy and entropy.

Therefore, the desolvation and interaction processes are the dominant factors affecting ΔH° and $T\Delta S^\circ$. The values of ΔH° and $T\Delta S^\circ$ were positive, indicating that the hydrophobic effect was the main factor responsible for $(LYS - \beta CAR)^\circ$ complex formation. However, the hydrophobic effect decreased as increasing temperature because of the decrease in the organization of the water 3D structure, which diminished the contributions of ΔH°_{des} and $T\Delta S^\circ_{des}$.

Silva et al. (2018) studied the interaction between the β CAR and the globular protein BSA in phosphate pH 7.0 buffer using FS and found $\Delta G^\circ = -28.96 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\Delta H^\circ = 8.62 \text{ kJ mol}^{-1}$, and $T\Delta S^\circ = 37.61 \text{ kJ mol}^{-1}$ at 298.15 K, which are similar to our results ($\Delta G^\circ = -30.46 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\Delta H^\circ = 7.58 \text{ kJ mol}^{-1}$ and $T\Delta S^\circ = 38.04 \text{ kJ mol}^{-1}$). This similarity is probably because the interaction between β CAR and both globular proteins occurs in preferential binding sites with similar hydrophobicities. Li et al. (2016) and Li & Yan (2017) used FS and pH 7.4 phosphate buffer to study the interaction between β CAR and LYS and ovalbumin, respectively (two hen egg-white proteins). Despite the primary structural difference between LYS (129 amino acid) and ovalbumin (385 amino acids), the results of both these earlier works and the current work indicate that the formation of these complexes is entropically driven.

3.2. Kinetic and thermodynamic parameter determination using SPR

Despite the potential of FS for the study of intermolecular interactions between proteins and bioactive molecules, this method is restricted to the determination of binding around the Trp residues (Lakowicz, 2006). Hence, to overcome this limitation, the SPR technique was used to provide thermodynamic information related to interactions at all possible sites (LELIS et al., 2017). Moreover, SPR allows us to obtain kinetic information related to complex formation. However, this is the first time that this method has been used to provide information related to the kinetic and thermodynamic parameters of $(\text{LYS} - \beta\text{CAR})^\circ$ complex formation.

3.2.1. Kinetics of $(\text{LYS} - \beta\text{CAR})^\circ$ complex formation

The association (k_a) and dissociation (k_d) kinetic binding parameters express the rates of association of the free molecules and the dissociation of a thermodynamically stable complex, which is very important for protein-small molecule binding experiments and their application in food science and related areas (BAHRI et al., 2019). The SPR analysis allowed us to obtain the k_a and k_d constants of $(\text{LYS} - \beta\text{CAR})^\circ$ complex formation and, thus, to understand the dynamics of complex formation (FATHI et al., 2018).

To obtain the kinetic parameters, solutions of different β CAR concentrations were applied to a CM5 sensor chip with immobilized LYS. The response signal obtained for each interaction cycle was plotted versus time, and the sensorgrams were obtained, as shown in Fig. 2.

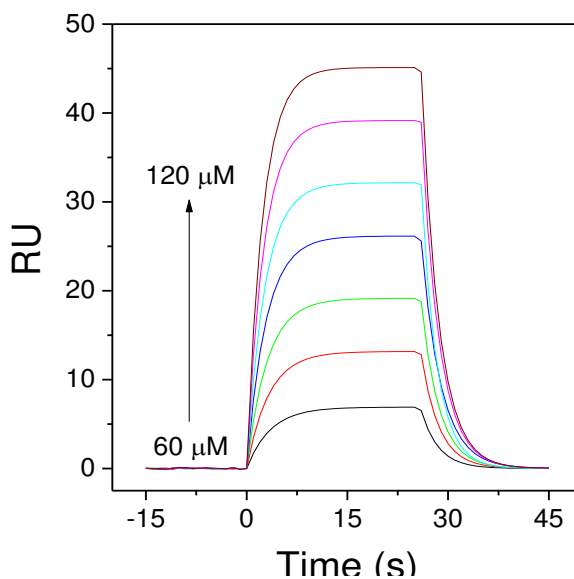
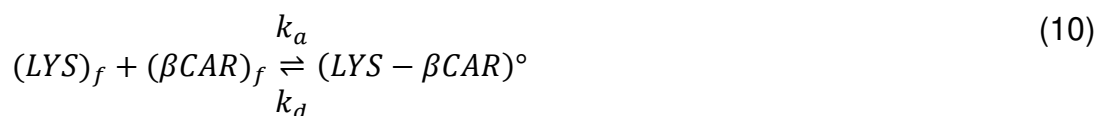


Fig. 2 - Sensorgrams (RU versus time) obtained during βCAR flow (60–120 μM) over a CM5 surface with immobilized LYS (1280 RU) at 298.15 K. The arrow indicates increasing βCAR concentration. The same behavior was observed at 285.15, 289.15, 293.15, 297.15, and 301.15 K (Fig. S3).

The sensorgrams obtained at 298.15 K show an increase in the signal (from 5 to 45 RU) from 0 to 15 s at each βCAR concentration (60, 70, 80, 90, 100, 110, and 120 μM). This characterizes the association phase, that is, $(LYS - \beta CAR)^\circ$ complex formation via interactions between free molecules. At the end of the association phase, the RU versus time signal reached a plateau, where association and dissociation processes occur at the same rate. As soon as the analyte flow stopped and the buffer was injected, the dissociation of the $(LYS - \beta CAR)^\circ$ complex occurred, resulting in a reduction in RU between 26 and 37 s. This characterizes the dissociation phase.

The equation for the association and dissociation processes is shown in Eq. 10 and represents the free molecules $(LYS)_f$ and $(\beta CAR)_f$ in equilibrium with the thermodynamically stable $(LYS - \beta CAR)^\circ$ complex.



Here, k_a represents the number of complexes formed per second, and k_d is the fraction of the complexes that dissociate per second.

k_a and k_d can be obtained by solving differential equations (Eqs. (11) and (12)) (Debotton et al., 2010; O'Shannessy et al., 1994).

$$\text{Association: } \frac{d[LYS - \beta CAR]^\circ}{dt} = k_a[LYS]_f * [\beta CAR]_f - k_d[LYS - \beta CAR]^\circ \quad (11)$$

$$\text{Dissociation: } -\frac{d[LYS - \beta CAR]^\circ}{dt} = k_d[LYS - \beta CAR]^\circ \quad (12)$$

Here, $[LYS - \beta CAR]^\circ$ is the concentration of the thermodynamically stable complex, $[LYS]_f$ and $[\beta CAR]_f$ are the concentrations of free $(LYS)_f$ and $(\beta CAR)_f$ molecules, respectively, $[LYS]_f$ and represents the fraction of the total protein that does not form complexes with βCAR . The terms $[LYS]_f * [\beta CAR]_f$ can be replaced by $(RU_{max}(t_\infty) - RU(t)) * [\beta CAR]_f$. The term $[LYS + \beta CAR]^\circ$ is proportional to the RU signal and, thus, can be replaced by $RU(t)$. Therefore, Eqs. 11 and 12 can be rewritten terms of the RU signal:

$$\frac{dRU(t)}{dt} = k_a(RU_{max}(t_\infty) - RU(t)) * [\beta CAR]_f - k_dRU(t), \quad (13)$$

$$-\frac{dRU(t)}{dt} = k_dRU(t), \quad (14)$$

Where $RU_{max}(t_\infty)$ represents the SPR signal when the ligand is saturated by the analyte and the association occurs at the same speed as dissociation. $RU(t)$ is the SPR signal at time t (s).

The pseudo-first-order (PFO) kinetic model was applied to the sensorgrams and, in this case, we may consider $[\beta CAR]_f$ as constant. Under PFO conditions, the observed rate constants (k_{obs}) and k_d were obtained using Eqs. 15 and 16, respectively. The plots of k_{obs} versus $[\beta CAR]$ were linear (Fig. S4), and the k_a values were obtained from the slope of these curves using Eq. 17. The changes in k_a and k_d values with temperature are shown in Fig. 3.

$$RU(t) = RU_{max}(t_\infty)[1 - e^{-k_{obs}(t)}] \quad (15)$$

$$RU(t) = RU(t_m)e^{-k_d(t - t_m)} \quad (16)$$

$$k_{obs} = k_a * [\beta CAR] + k_d \quad (17)$$

Here, $RU(t_m)$ is the SPR signal obtained at time t_m , which represents the beginning of dissociation, and $[\beta CAR]$ is the concentration of the analyte.

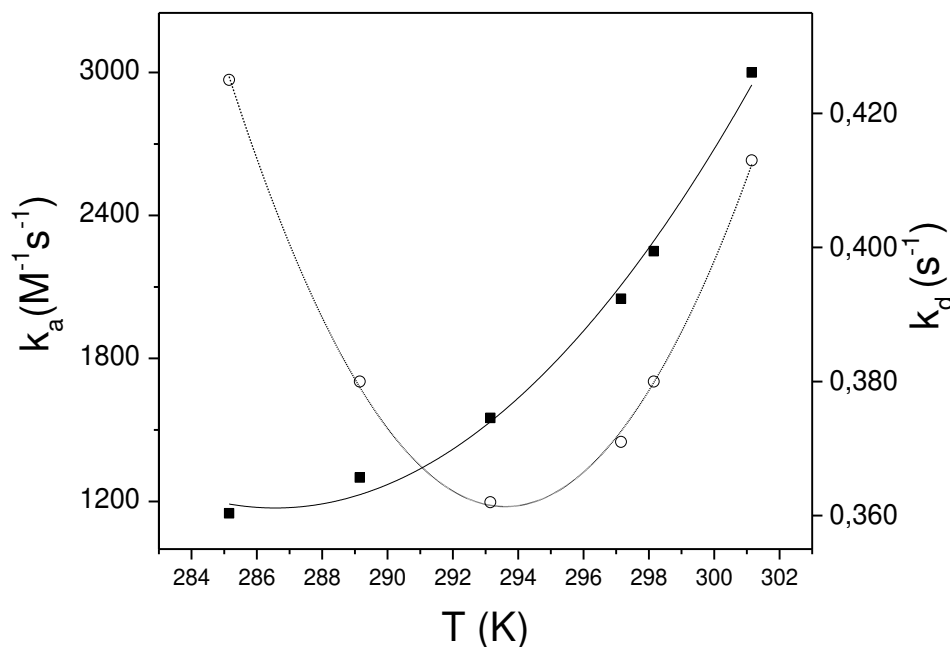


Fig. 3 - Plots of the association rate constant (k_a ; ■) of $(LYS)_f$ and $(\beta CAR)_f$ molecules, and of dissociation rate constant (k_d ; ○) of the $(LYS - \beta CAR)^\circ$ complex versus temperature. The polynomial equations for the association and dissociation processes are $k_a = 8.342(T)^2 - 223.772(T) + 2673.075$ and $k_d = 8.870 \times 10^{-4}(T)^2 - 0.037(T) + 0.737$, respectively.

Both k_a and k_d values showed a second-order polynomial trend in the studied temperature range ($R^2 = 0.989$ and 0.997 , respectively), indicating that the formation and dissociation of the complex are multi-step processes (Van Elzen et al., 2017). Between 285.15 and 293.15 K, the k_d values decreased, reaching a minimum point at 293.15 K. On the other hand, the k_a values increased from the minimum point. These differences show that changes in the structure of LYS may occur when the $(LYS - \beta CAR)^\circ$ complex dissociates or that the changes occurring during association are not completely reversed when the dissociation process occurs (LELIS et al., 2020). Furthermore, the number of thermodynamically stable complexes formed per second increased from 1150 to 3000 M, whereas the maximum and minimum degrees of

dissociation of these complexes per second were approximately 42% and 36% at 285.15 and 293.15 K, respectively.

Vachali et al. (2013) evaluated the kinetics of the interaction between βCAR and the interphotoreceptor retinoid-binding protein ($IRBP$) by SPR. They reported that $IRBP$ plays an important role in vision by binding and protecting retinoids. The k_a and k_d values for $(IRBP - \beta CAR)^\circ$ formation were $1.22 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ and 0.110 s^{-1} , respectively, at 298.15 K and pH 7.4. These results are approximately 62-times higher and 4-times smaller than the $k_a = 2.25 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ and $k_d = 0.380 \text{ s}^{-1}$ for $(LYS - \beta CAR)^\circ$ complex formation. This is probably due to the differences between the structures of $IRBP$ and LYS , which can also bind different sites in βCAR .

The interaction between LYS and lutein (LUT), a carotenoid of the xanthophyll class, was studied by Rezende et al. (2020). They evaluated the kinetics of interaction between these molecules using SPR at pH 7.4. The k_a and k_d values for $(LYS - LUT)^\circ$ complex formation were $1.96 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ and 0.400 s^{-1} , respectively, at 298.15 K. These results are similar to those found for $(LYS - \beta CAR)^\circ$ complex formation, indicating that the structural difference between LUT and βCAR , i.e., the presence of two oxygen atoms in the LUT molecule, did not affect the association and dissociation processes.

3.2.2. Thermodynamics of $(LYS - \beta CAR)^\circ$ complex formation obtained by SPR

Using SPR, it was possible to obtain the energetic thermodynamic parameters for $(LYS - \beta CAR)^\circ$ complex formation at all binding possible sites for comparison with the results obtained by FS. Therefore, the thermodynamic parameters, binding constant (K_{b-SPR}), standard Gibbs free energy change (ΔG°_{SPR}), standard enthalpy change (ΔH°_{SPR}), and standard entropy change ($T\Delta S^\circ_{SPR}$) were obtained from the relationships $K_{b-SPR} = k_a/k_d$ and $\Delta G^\circ_{SPR} = -RT \ln K_{b-SPR}$, as well as the linear van't Hoff equation (Fig. S4) (Eq. 18), and the fundamental Gibbs equation (Eq. 7), respectively. Table 3 shows the thermodynamic parameters for $(LYS - \beta CAR)^\circ$ complex formation obtained from SPR experiments.

$$\frac{\ln K_{b2}}{\ln K_{b1}} = - \frac{\Delta H^\circ}{R} \left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1} \right) \quad (18)$$

Table 3 Binding constant (K_{b-SPR}), standard changes in Gibbs free energy (ΔG°_{SPR}), enthalpy (ΔH°_{SPR}), and entropy ($T\Delta S^{\circ}_{SPR}$) for ($LYS - \beta CAR$) $^{\circ}$ complex formation at pH 7.4 obtained using SPR.

Temperature	K_{b-SPR}	ΔG°_{SPR}	ΔH°_{SPR}	$T\Delta S^{\circ}_{SPR}$
K	10^3 L mol^{-1}		kJ mol^{-1}	
285.15	2.71	-18.74		62.45
289.15	3.42	-19.56		63.28
293.15	4.28	-20.38	43.72	64.10
297.15	5.53	-21.29		65.00
298.15	5.92	-21.53		65.25
301.15	7.26	-22.26		65.98

For all parameters, the relative deviation was less than 5%.

The K_{b-SPR} values increased as the temperature increased, as also found by FS. This confirms that at higher temperatures, more complexes are formed. However, the K_{b-SPR} values were smaller than K_{b-FS} (K_{b-SPR} 97.3% smaller than K_{b-FS} at 298.15 K). This difference probably occurred because SPR detects the interactions in all binding sites of the LYS , whereas FS only detects the interactions occurring near Trp62 and Trp108 of LYS . The smaller K_{b-SPR} may arise because the binding sites in LYS have a lower binding affinity for βCAR and are located far from the Trp residues, thus reducing the average K_{b-SPR} value. Regarding the Gibbs free energy change, both ΔG°_{FS} and ΔG°_{SPR} became more negative when the was temperature increased, which means that the complex predominated over the free molecules and became more stable as the temperature increased.

ΔG°_{SPR} is a result of contributions from the enthalpy (ΔH°_{SPR}) and entropy ($T\Delta S^{\circ}_{SPR}$). As suggested by the FS technique, desolvation, conformational changes, and interactions are the three main molecular processes related to ($LYS - \beta CAR$) $^{\circ}$ complex formation, with a smaller contribution from the conformational changes. However, the nonlinear temperature dependence of k_a and k_d suggest the importance of the conformational changes in LYS in ($LYS - \beta CAR$) $^{\circ}$ complex formation. The positive contributions ($|\Delta H^{\circ}_{des} + \Delta H^{\circ}_{conf}|$ and $|T\Delta S^{\circ}_{des} + T\Delta S^{\circ}_{conf}|$) overcome the negative contributions (ΔH°_{int} and $T\Delta S^{\circ}_{int}$). Hence, as found by FS, the complex

formation was entropically driven, and the hydrophobic interactions played a major role.

The thermodynamic parameters for the interaction of *LYS* and *LUT* obtained by Rezende et al. (2020) were very close to those found here. At 298.15 K and pH 7.4, the ΔG°_{SPR} was $-21.24 \text{ kJ mol}^{-1}$, and the K_{b-SPR} value was $5.29 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$. However, there were discrepancies in the ΔH°_{SPR} and $T\Delta S^\circ_{SPR}$ values. These ΔH°_{SPR} ranged from 11.72 to $-36.71 \text{ kJ mol}^{-1}$ and the $T\Delta S^\circ_{SPR}$ values ranged from 32.11 to $-15.54 \text{ kJ mol}^{-1}$ between 285.15 and 301.15 K. According to Rezende et al. (2020), the trends in ΔH°_{SPR} and $T\Delta S^\circ_{SPR}$ indicate changes in the contribution of hydrophobic/hydrophilic interactions. The presence of two hydroxyl groups in *LUT* leads to a predominance of hydrophilic interactions at higher temperatures.

3.2.3. Kinetic energetic parameters related to the formation of the $(LYS - \beta CAR)^\ddagger$ intermediate

The intermediate $(LYS - \beta CAR)^\ddagger$ complex is a transition state complex between free $(LYS)_f$ and $(\beta CAR)_f$ molecules and the thermodynamically stable $(LYS - \beta CAR)^\circ$ complex. The formation of the $(LYS - \beta CAR)^\ddagger$ complex is rapid, and it is impossible to quantify this state. Despite this, the determination of the parameters related to $(LYS - \beta CAR)^\ddagger$ formation is important because it provides insights into the dynamics and molecular energy related to the interaction between $(LYS)_f$ and $(\beta CAR)_f$ molecules (REZENDE et al., 2019; WANG et al., 2018). From the relationship between $\ln k_a$ or $\ln k_d$ with $1/T$ (Fig. 4), the activation energy $E_{act(X)}$ was determined using Eq. 16.

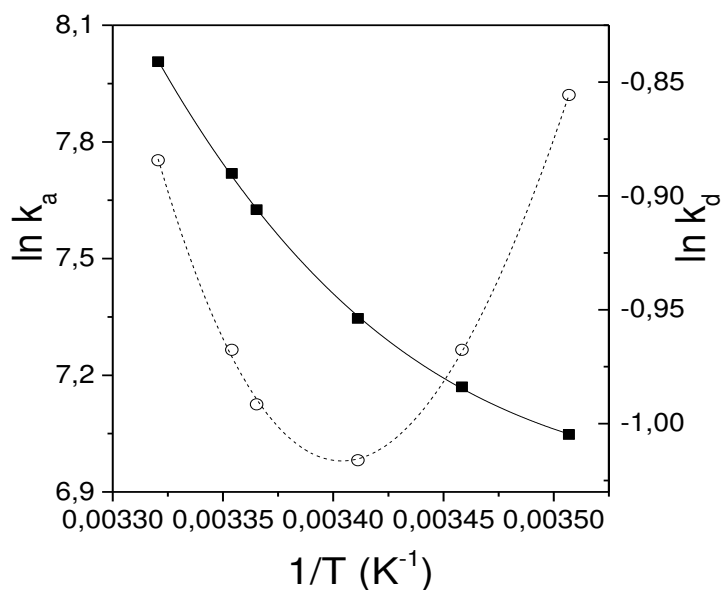


Fig. 4 - Arrhenius plots of $\ln k_a$ (■) and $\ln k_d$ (○) associated with interactions between *LYS* and β *CAR*. The plots show the temperature effect on the association and dissociation rate constants at 285.15, 289.15, 293.15, 297.15, 298.15, and 301.15 K.

$$E_{act}(x) = -R \frac{\partial \ln k_x}{\partial \left(\frac{1}{T}\right)} \quad (16)$$

Here k_x is the rate constant for $x = a$ or d (association or dissociation, respectively) at T (K), $E_{act}(x)$ is the corresponding activation energy for a or d (kJ mol⁻¹), and R is the universal gas constant (8.3145 J mol⁻¹ K⁻¹).

The formation of the intermediate complex only occurs when the activation energy barrier (E_{act}) is overcome. From the $E_{act}(x)$ values, the activation Gibbs free energy change (ΔG_x^\ddagger), the activation enthalpy change (ΔH_x^\ddagger), and the activation entropy change ($T\Delta S_x^\ddagger$) related to $(LYS - \beta CAR)^\ddagger$ complex formation were obtained using Eqs. (17–19), and their values are listed in Table 4.

$$\Delta G_x^\ddagger = -RT \ln\left(\frac{k_x h}{k_B T}\right) \quad (17)$$

$$\Delta H_x^\ddagger = E_{act}(x) - RT \quad (18)$$

$$T\Delta S_x^\ddagger = \Delta H_x^\ddagger - \Delta G_x^\ddagger \quad (19)$$

Here, h is Planck's constant ($6.62608 \times 10^{-34} \text{ J K}^{-1}$), and k_B is Boltzmann's constant ($1.38066 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$).

Table 4 Energetic parameters for $(LYS - \beta CAR)^\ddagger$ intermediate complex formation via association of $(LYS)_f$ and $(\beta CAR)_f$ molecules and dissociation of the $(LYS - \beta CAR)^\circ$ complex at pH 7.4.

T	Association (a)				Dissociation (d)			
	E_{act}	ΔG^\ddagger	ΔH^\ddagger	$T\Delta S^\ddagger$	E_{act}	ΔG^\ddagger	ΔH^\ddagger	$T\Delta S^\ddagger$
K	kJ mol ⁻¹							
285.15	15.23	53.02	12.86	-40.16	-24.12	71.76	-26.49	-98.24
289.15	25.70	53.50	23.30	-30.21	-14.17	73.07	-16.57	-89.64
293.15	40.67	53.85	38.23	-15.61	-2.10	74.23	-4.54	-78.77
297.15	59.77	53.93	57.30	3.38	11.91	75.21	9.44	-65.78
298.15	65.15	53.88	62.67	8.79	15.69	75.42	13.21	-62.20
301.15	82.66	53.73	80.16	26.43	27.69	75.99	25.18	-50.81

For all parameters, the relative deviation was less than 8%.

The $E_{act}(x)$, ΔH_x^\ddagger , and $T\Delta S_x^\ddagger$ values increased with increase in temperature for both association and dissociation. These values result from the desolvation of the binding partners (> 0), the LYS and βCAR conformational change (> 0), and the interaction between $(LYS)_f$ and $(\beta CAR)_f$ (< 0). The $E_{act}(a)$ values were higher than $E_{act}(d)$, indicating that the formation of $(LYS - \beta CAR)^\ddagger$ from the free molecules required a higher activation energy than the dissociation of the $(LYS - \beta CAR)^\circ$ complex. This also indicates that the conformational changes at LYS binding sites and the desolvation of the ligands absorbed more energy during association than during dissociation. Despite the higher $E_{act}(a)$ values, the rate of $(LYS - \beta CAR)^\ddagger$ association was faster than that of dissociation, as shown by the smaller ΔG_a^\ddagger values than those of ΔG_d^\ddagger .

The association period was characterized by an entropically favorable binding process above 296.18 K, as shown by the positive $T\Delta S_a^\ddagger$ values, contributing to a

decrease in the ΔG_a^\ddagger values above 299.18 K. Furthermore, during dissociation, the formation of the $(LYS - \beta CAR)^\ddagger$ complex was enthalpically favorable up to 293.97 K and entropically unfavorable between 285.15 and 301.15, resulting in an increase in ΔG_d^\ddagger .

Table 4 shows a small ΔG^\ddagger change with temperature and larger changes in its components in the same temperature range, which is characteristic of an isokinetic relationship (IKR). To verify the occurrence of an IKR in both association and dissociation, the $T\Delta S^\ddagger$ values were plotted against the ΔH^\ddagger values (Fig. 5). The linearity of these plots ($R^2 = 0.999$), having slopes close to 1 for the association and dissociation processes (0.990 and 0.918, respectively), confirms the IKR (Pan et al., 2015). Interestingly, the occurrence of an IKR indicates that the conformational changes at *LYS* binding sites and the desolvation of the free molecules are temperature dependent.

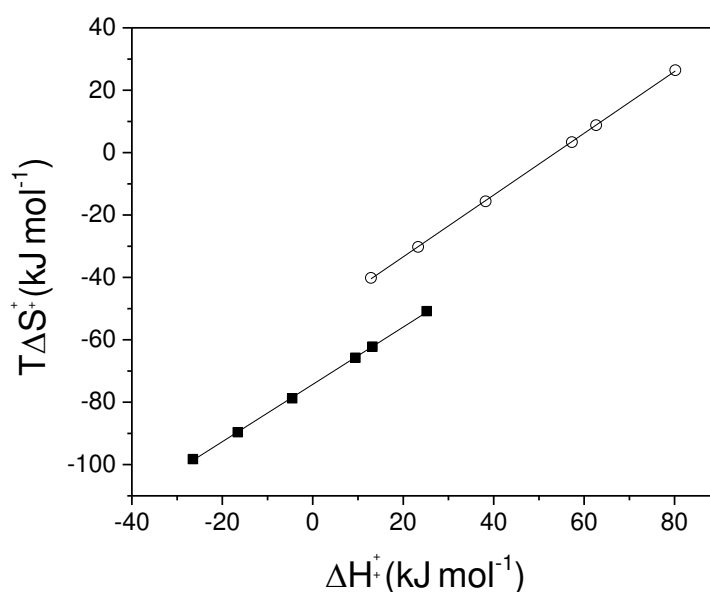


Fig. 5 - Plots of $T\Delta S^\ddagger$ versus ΔH^\ddagger for the formation of the $(LYS - \beta CAR)^\ddagger$ complex via the association between $(LYS)_f$ and $(\beta CAR)_f$ molecules (■) and the dissociation of the $(LYS - \beta CAR)^\circ$ complex (○).

4. Conclusion

Fluorescence and SPR measurements reveal that aqueous *LYS* and *βCAR* mixtures at $(285.15 \leq T \leq 301.15)$ K undergo spontaneous $(LYS - \beta CAR)^\circ$

complexation driven by an system entropy increase ($\Delta G_{FS}^{\circ} = -29.79$ to -32.27 kJ mol⁻¹; $\Delta H_{FS}^{\circ} = 9.07$ to 3.38 kJ mol⁻¹, and $T\Delta S_{FS}^{\circ} = 38.86$ to 35.65 kJ mol⁻¹). The hydrophobic effect played a major role in the LYS- β CAR interaction, probably because of the high hydrophobicity of β CAR. Kinetic SPR measurements show that, in the formation of the $(LYS - \beta CAR)^{\circ}$ complex, the intermediate $(LYS - \beta CAR)^{\ddagger}$ complex formed faster via the association of $(LYS)_f$ and $(\beta CAR)_f$ than the dissociation of $(LYS - \beta CAR)^{\circ}$. An IKR was observed for $(LYS - \beta CAR)^{\ddagger}$ complex formation with the association and dissociation processes occurring in multiple steps with conformational changes at LYS binding sites. The thermodynamic and kinetic parameters determined in this work provide a better understanding of the dynamics of $(LYS - \beta CAR)^{\circ}$ complex formation and will guide the use of proteins as carriers of small bioactive compounds.

References

ALLAHDAD, Z. et al. Spectroscopic and docking studies on the interaction between caseins and β -carotene. **Food Chemistry**, v. 255, n. September 2017, p. 187–196, 2018.

ALLAHDAD, Z. et al. Binding of β -carotene to whey proteins: Multi-spectroscopic techniques and docking studies. **Food Chemistry**, v. 277, p. 96–106, 30 mar. 2019.

ALTSCHUH, D. et al. Determination of kinetic constants for the interaction between a monoclonal antibody and peptides using surface plasmon resonance. **Biochemistry**, v. 31, n. 27, p. 6298–6304, jul. 1992.

APRODU, I. et al. Thermal stability of the complex formed between carotenoids from sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) and bovine β -lactoglobulin. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 173, p. 562–571, fev. 2017.

BAHRI, A. et al. Binding analysis between monomeric β -casein and hydrophobic bioactive compounds investigated by surface plasmon resonance and fluorescence spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 286, n. February, p. 289–296, 2019.

BAKAR, K. A.; FERROZ, S. R. A critical view on the analysis of fluorescence quenching data for determining ligand–protein binding affinity. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 223, p. 117337, 5 dez. 2019.

BEVERUNG, C. J.; RADKE, C. J.; BLANCH, H. W. Protein adsorption at the oil/water interface: characterization of adsorption kinetics by dynamic interfacial tension measurements. **Biophysical Chemistry**, v. 81, n. 1, p. 59–80, set. 1999.

CHANG, H. et al. Binding to Bovine Serum Albumin Protects β - Carotene against Oxidative Degradation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, p. 5951–5957, 2016.

DEBOTTON, N. et al. A quantitative evaluation of the molecular binding affinity between a monoclonal antibody conjugated to a nanoparticle and an antigen by surface plasmon resonance. **European Journal of Pharmaceutics and**

Biopharmaceutics, v. 74, n. 2, p. 148–156, fev. 2010.

DI LENA, G. et al. Carotenoid profiling of five microalgae species from large-scale production. **Food Research International**, v. 120, p. 810–818, 2018.

DU, Y. et al. Improved stability, epithelial permeability and cellular antioxidant activity of β -carotene via encapsulation by self-assembled α -lactalbumin micelles. **Food Chemistry**, v. 271, p. 707–714, jan. 2019.

DUMITRAȘCU, L. et al. Studies on binding mechanism between carotenoids from sea buckthorn and thermally treated α -lactalbumin. **Journal of Molecular Structure**, v. 1125, p. 721–729, 2016.

FABINI, E.; DANIELSON, U. H. Monitoring drug–serum protein interactions for early ADME prediction through Surface Plasmon Resonance technology. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 144, p. 188–194, set. 2017.

FATHI, F. et al. Kinetic and thermodynamic studies of bovine serum albumin interaction with ascorbyl palmitate and ascorbyl stearate food additives using surface plasmon resonance. **Food Chemistry**, v. 246, p. 228–232, 2018.

GORBENKO, G. P.; IOFFE, V. M.; KINNUNEN, P. K. J. Binding of Lysozyme to Phospholipid Bilayers : Evidence for Protein Aggregation upon Membrane Association. **Biophysical Journal**, v. 93, n. 1, p. 140–153, 2007.

GUO, Y. et al. Locating the binding domains of lysozyme with ionic liquids in aqueous solution via spectroscopic studies. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 214, p. 239–245, 5 maio 2019.

HAMDANI, A. M. et al. Effect of guar gum conjugation on functional, antioxidant and antimicrobial activity of egg white lysozyme. **Food Chemistry**, v. 240, p. 1201–1209, 2018.

HORNOK, V. et al. Thermodynamic and kinetic insights into the interaction of kynurenic acid with human serum albumin: Spectroscopic and calorimetric approaches. **Journal of Molecular Liquids**, v. 313, p. 112869, set. 2020.

IMOTO, T. et al. Fluorescence of Lysozyme: Emissions from Tryptophan Residues 62

and 108 and Energy Migration. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 69, n. 5, p. 1151–1155, 1 maio 1972.

KNOCKAERT, G. et al. Carrot β -carotene degradation and isomerization kinetics during thermal processing in the presence of oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 41, p. 10312–10319, 17 out. 2012.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. Boston, MA: Springer US, 2006.

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

LELIS, C. A. et al. Insights into protein-curcumin interactions: Kinetics and thermodynamics of curcumin and lactoferrin binding. **Food Hydrocolloids**, v. 105, n. June 2019, p. 105825, ago. 2020.

LI, X.-R. et al. Comparative studies on interactions of α -ascorbic acid, α -tocopherol, procyanidin B3, β -carotene, and astaxanthin with lysozyme using fluorescence spectroscopy and molecular modeling methods. **Journal of Food Biochemistry**, v. 41, n. 2, p. e12338, abr. 2016.

LI, X.; YAN, Y. Comparative Study of the Interactions between Ovalbumin and five Antioxidants by Spectroscopic Methods. **Journal of Fluorescence**, v. 27, n. 1, p. 213–225, 8 jan. 2017.

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

O'SHANNESY, D. J. et al. **Determination of rate and equilibrium binding constants for macromolecular interactions by surface plasmon resonance** *Methods in Enzymology*, 1994.

PAIVA, P. H. C. et al. Influence of protein conformation and selected Hofmeister salts on bovine serum albumin/lutein complex formation. **Food Chemistry**, v. 305, n. May 2019, p. 125463, 2020.

PAN, A. et al. Enthalpy–Entropy Compensation (EEC) Effect: A Revisit. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 119, n. 52, p. 15876–15884, 31 dez. 2015.

PATIL, S.; SISTLA, S.; JADHAV, J. Interaction of small molecules with human tyrosinase: A surface plasmon resonance and molecular docking study. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 1123–1129, 1 nov. 2016.

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

PENG, W. et al. Binding patterns and structure-affinity relationships of food azo dyes with lysozyme: A multitechnique approach. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 50, p. 12415–12428, 2013.

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, n. May, p. 526–532, 2019.

REZENDE, J. DE P. et al. Temperature modulation of lutein-lysozyme hydrophobic-hydrophilic interaction balance. **Journal of Molecular Liquids**, v. 408, jan. 2020.

SAHA, S.; CHOWDHURY, J. Binding Interaction of Juglone with Lysozyme: Spectroscopic Studies Aided by In Silico Calculations. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 193, p. 89–99, 1 abr. 2019.

SCHNEIDER, C. S. et al. Surface plasmon resonance as a high throughput method to evaluate specific and non-specific binding of nanotherapeutics. **Journal of Controlled Release**, v. 219, p. 331–344, 2015.

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

SYAMILA, M. et al. Effect of temperature, oxygen and light on the degradation of β -carotene, lutein and α -tocopherol in spray-dried spinach juice powder during storage.

Food Chemistry, 2019.

TAKAHASHI, M. et al. Heat-denatured lysozyme could be a novel disinfectant for reducing hepatitis A virus and murine norovirus on berry fruit. **International Journal of Food Microbiology**, v. 266, n. November 2017, p. 104–108, 2018.

VACHALI, P. P. et al. Carotenoids as possible interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP) ligands: A surface plasmon resonance (SPR) based study. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 539, n. 2, p. 181–186, nov. 2013.

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, 2011.

VAN ELZEN, R. et al. Ligand-induced conformational changes in prolyl oligopeptidase: a kinetic approach. **Protein Engineering Design and Selection**, v. 30, n. 3, p. 219–226, 5 jan. 2017.

WANG, B. et al. Integrating Structural Information to Study the Dynamics of Protein-Protein Interactions in Cells. **Structure**, v. 26, n. 10, p. 1414- 1424.e3, 2 out. 2018.

Supplementary materials

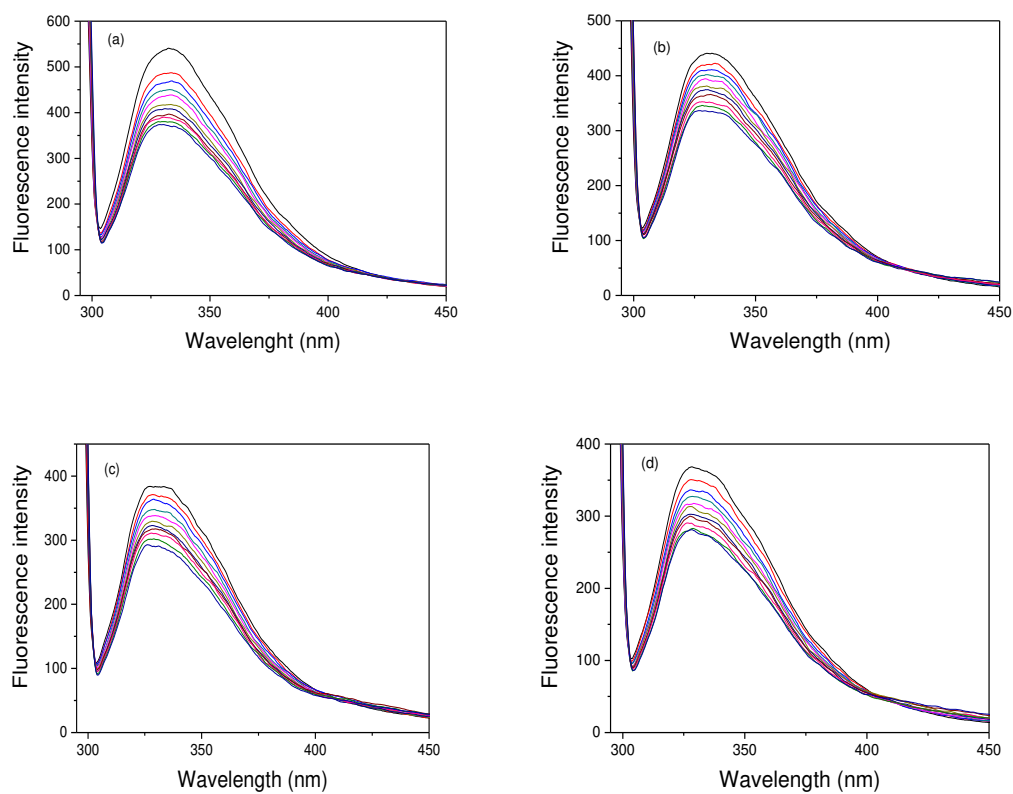


Fig. S1 - Fluorescence intensities of *LYS* with different concentrations of β *CAR* at (a)–(d) 293.15, 303.15, 308.15, and 313.15 K, respectively.

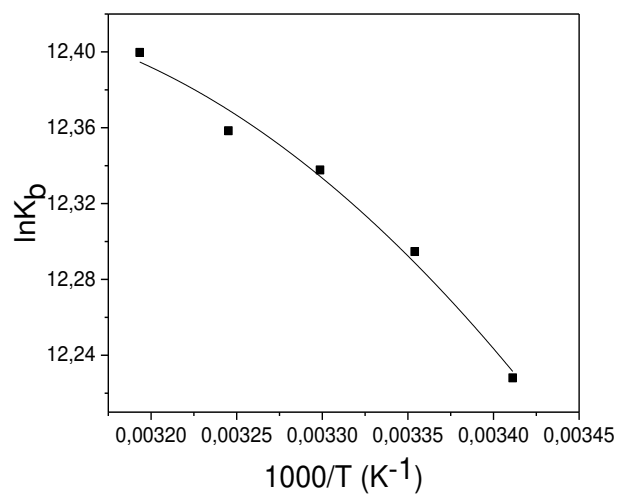


Fig. S2 - Nonlinear van't Hoff plots ($\ln K_b$ versus $1000/T$, $R^2 = 0.976$) for $(LYS - \beta CAR)^\circ$ complex formation as a function of reciprocal temperature. This plot was used to find ΔH° values and the data were obtained using the FS method.

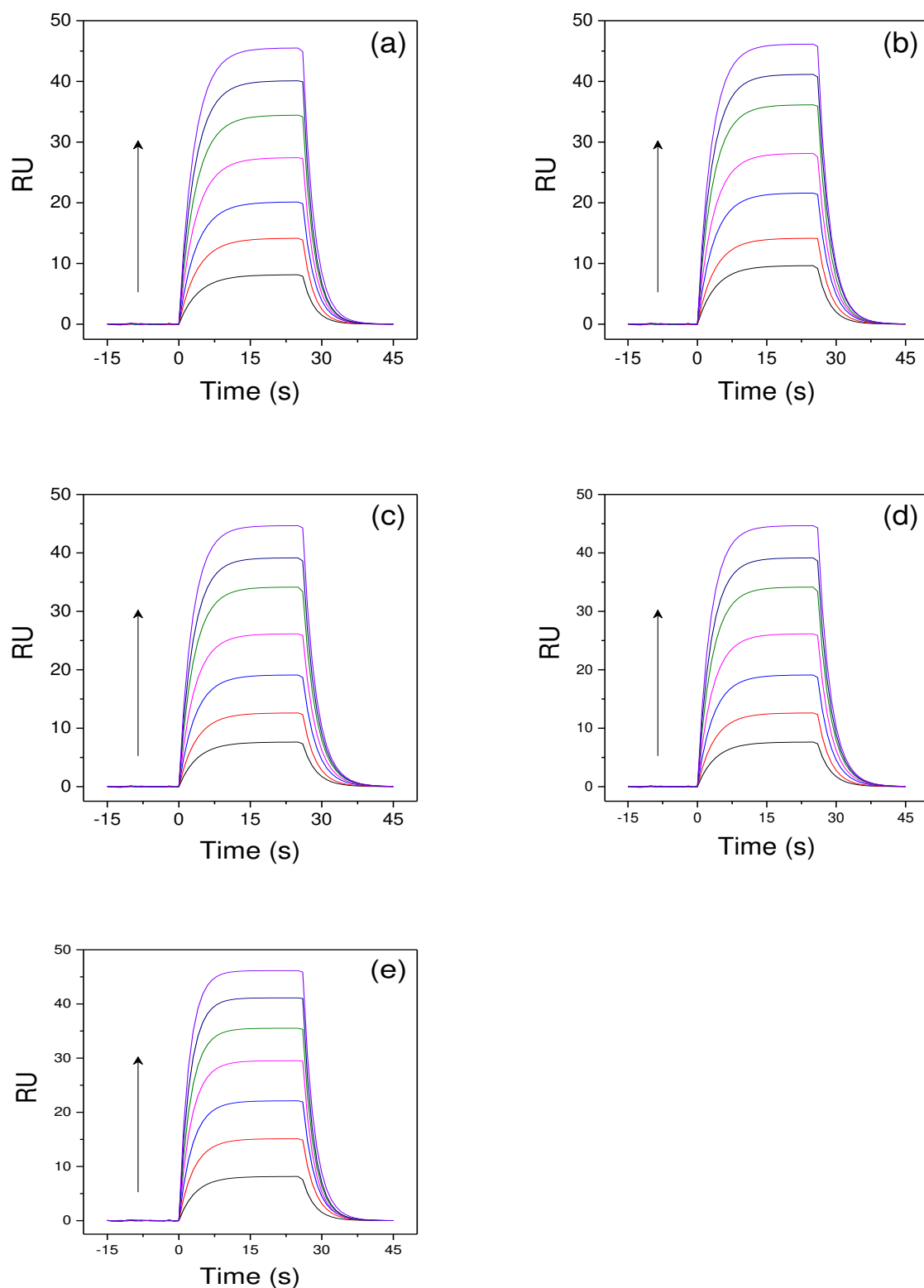


Fig. S3 - Sensorgrams (RU versus time) for $(LYS - \beta CAR)^{\circ}$ binding, 60–120 μM βCAR solutions were flowed over a CM5 low-density LYS -immobilized sensor-chip surface (1280 RU) at (a–e) 285.15, 289.15, 293.15, 297.15, and 301.15 K, respectively.

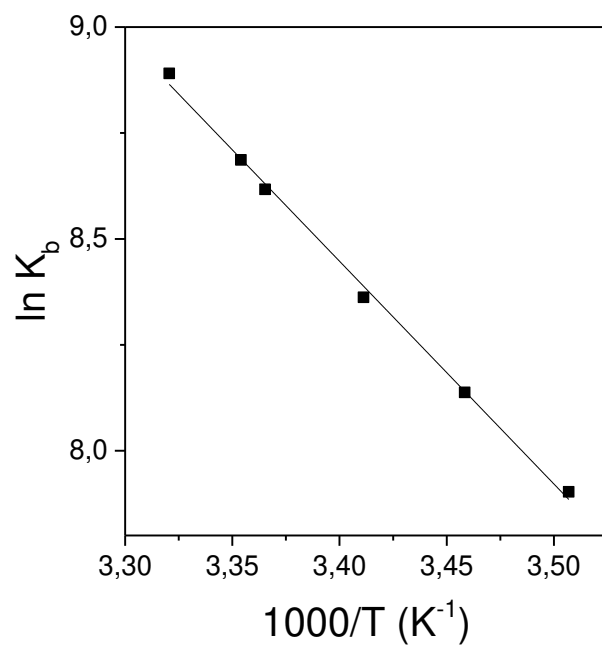


Fig. S4 - Linear van't Hoff plot ($\ln K_b$ versus $1000/T$, $R^2 = 0.996$) for $(LYS - \beta CAR)^\circ$ complex formation as a function of reciprocal temperature. This plot was used to find the ΔH° values, and the data were obtained using the SPR method.

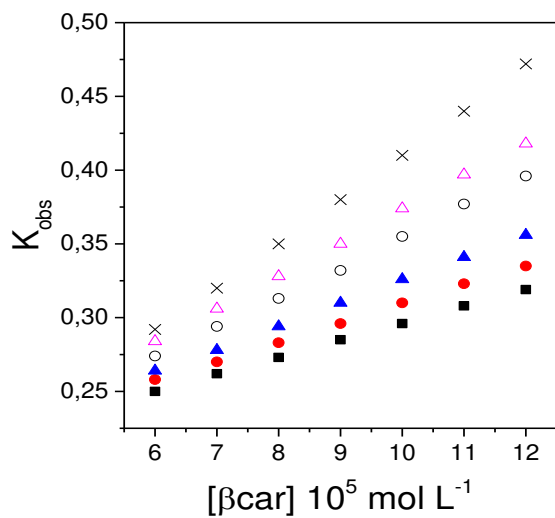


Fig. S5 - A plot of k_{obs} as a function of β CAR concentration used to determine k_a at temperatures of (■) 285.15 K, (●) 289.15 K, (▲) 293.15 K, (○) 297.15 K, (△) 298.15 K, and (X) 301.15 K.