

HAUSTER MAXIMILER CAMPOS DE PAULA

**ESTUDO DA CINÉTICA E DA TERMODINÂMICA DA INTERAÇÃO
INTERMOLECULAR DA ALBUMINA DO SORO BOVINO COM O CORANTE
VERMELHO CONGO**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2017

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

T

P324e
2017
Paula, Hauster Maximiler Campos de, 1989-
Estudo da cinética e da termodinâmica da interação intermolecular
da albumina do soro bovino com o corante vermelho Congo / Hauster
Maximiler Campos de Paula. - Viçosa, MG, 2017.
viii, 53f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Luis Henrique Mendes da Silva.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Proteínas. 2. Fluorescência. 3. Corantes. 4. Termodinâmica.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Química.
Programa de Pós-graduação em Agroquímica. II. Título.

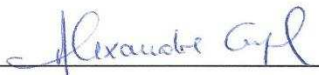
CDD 22 ed. 572.6

HAUSTER MAXIMILER CAMPOS DE PAULA


**ESTUDO DA CINÉTICA E DA TERMODINÂMICA DE INTERAÇÃO
INTERMOLECULAR DA ALBUMINA DO SORO BOVINO COM O CORANTE
VERMELHO CONGO**

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

APROVADA: 19 de julho de 2017.



Alexandre Gurgel



Márcio Santos Rocha



Luis Henrique Mendes da Silva
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

A Deus por me iluminar, abençoar e proteger, pela vida e por me conceder a oportunidade, todos os dias, de melhorar. Deus pai todo poderoso, agradeço e confio em ti. E minha mãe eterna Ave Maria que intercede ao pai por mim e me protege com seu manto sagrado.

À minha mãe Darly Campos, a pessoa mais importante do mundo para mim! Sou muito orgulhoso por Deus ter me concedido uma mãe tão maravilhosa. Só estou aqui, porque te amo muito e sei que podemos contar um com outro por toda vida.

À minha vó, Jacinta Campos, que eu a chamo de mãe. A amo muito e a senhora, com todo seu amor, me ensinou a amar a vida e que trabalhando eu sobrevivo em qualquer lugar do mundo.

Ao meu tio/irmão Erriston, o mais novo, por confiar que eu conseguiria e me aconselhar a cada passo dado em minha jornada. Sou seu fã número um e estamos juntos sempre.

À todos meus tios Nilton, Franklim, Edvaldes e Cely e a toda família (primos e primas). Obrigado por todo apoio, carinho e pelo incentivo, e a toda minha família.

Ao meu orientador professor Luis Henrique Mendes da Silva por todo apoio, companheirismo, ensinamentos, paciência e por acreditar em mim e me incentivar, pelo seu profissionalismo e trabalho, e por fazer parte da minha jornada, me ensinando, na busca do meu sonho.

Às minhas coorientadoras, Ana Clarissa Santos e Maria do Carmo pelo apoio, incentivo e profissionalismo.

À minha namorada Ana Claudia Ruschel, por compartilhar comigo todo carinho e amor, paciência e pelo companheirismo por enfrentar junto comigo os desafios do dia-a-dia.

Aos membros da banca de avaliação, Alexandre Gurgel e Márcio Santos Rocha, pelo aceite do convite e pelas contribuições na correção do trabalho.

Aos meus amigos de coração Ricardo, Juan e Davi pela amizade e companheirismo de sempre, muito obrigado pela força e torcida. E, também, aos novos amigos Alan e Dario.

Ao grupo de pesquisa Quivecom pelo os ensinamentos compartilhados.

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

Ao Instituto Nacional de Ciências e Tecnologias Analíticas Avançadas (INCTAA), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) pelo apoio pelo apoio financeiro.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vii
CAPÍTULO 1	1
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 Corantes	4
3.2 Proteínas	6
3.3 Interação intermolecular de proteína com corantes	10
3.4 Técnicas experimentais para estudo das interações intermoleculares	13
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22
CAPÍTULO 2	29
1 INTRODUCTION	30
2 MATERIALS AND METHODS	32
2.1 Materials	32
2.2 BSA-CR binding followed by surface plasmon resonance (SPR)	32
2.3 BSA-CR binding followed by fluorescence spectroscopy	33
3. RESULTS AND DISCUSSION	34
3.1 Kinetics and thermodynamics for BSA-CR binding determined by surface plasmon resonance (SPR)	34
3.2 Thermodynamic binding parameters for BSA-CR complex formation determined by fluorescence spectroscopy	41
4 CONCLUSIONS	46
SUPPLEMENTARY MATERIALS	47
ACKNOWLEDGMENTS	49
5 REFERENCES	50

RESUMO

PAULA, Hauster Maximiler Campos de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2017. **Estudo da cinética e da termodinâmica da interação intermolecular da Albumina do Soro Bovino com o corante Vermelho Congo**. Orientador: Luis Henrique Mendes da Silva. Coorientadoras: Ana Clarissa dos Santos Pires e Maria do Carmo Hespagnol.

As proteínas enoveladas corretamente fornecem estrutura e função para o nosso corpo e são biodegradáveis. Amiloide são proteínas mal enoveladas que resistem à degradação e como consequência se depositam e se acumulam em tecidos e órgãos. Onde houver um depósito desses amiloides haverá mau funcionamento desse órgão. Algumas doenças provocadas por esses amiloides são *Alzheimer*, *Parkinson*, *Huntington*, dentre outras. O diagnóstico prematuro se faz necessário para que os pacientes possam iniciar os tratamentos disponíveis para cada doença. Um teste confiável para detecção da presença de depósitos de amiloide é a aplicação do corante vermelho congo (CR), na amostra de tecido e devido à presença da amilóide. Muitos estudos foram realizados ao longo desses anos para melhorar o processo de detecção da presença desses amiloides, bem como eliminar os depósitos de amilóide ou inibir o processo de formação das fibrilas. Relatos sobre a utilização de CR em ratos infectados com doença de *Parkinson* sugerem tratamentos prologandos. Para podermos aperfeiçoar a aplicação terapêutica do CR que é um potencial inibidor de agregação de proteínas, a cinética e a termodinâmica das interações entre CR e uma proteína-modelo devem ser compreendidas. Utilizaram-se técnicas de ressonância plasmônica de superfície (SPR) e fluorescência para determinar a dinâmica e os parâmetros termodinâmicos para a formação de complexos entre CR e albumina de soro bovino (BSA). O CR interage com BSA através de um complexo de transição a energia de ativação para associação ($E_{act}(a)$) foi determinada como $35,88 \text{ kJ mol}^{-1}$, enquanto as variações de entalpia de ativação ($\Delta H \ddagger$), entropia ($\Delta S \ddagger$) e energia livre de Gibbs ($\Delta G \ddagger$) foram $33,41 \text{ kJ.mol}^{-1}$, $0,18 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$ e $33,35 \text{ kJ.mol}^{-1}$, respectivamente. Quando este intermediário se transforma no complexo CR-BSA final, a entropia do sistema aumenta e parte da energia absorvida é liberada. Este processo está associado a uma energia de ativação reversa ($E_{act}(d)$) de $20,17 \text{ kJ.mol}^{-1}$ e valores de $\Delta H \ddagger$, $\Delta S \ddagger$ e $\Delta G \ddagger$ de $17,69 \text{ kJ.mol}^{-1}$, $-162,86 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$ e $66,25 \text{ kJ.mol}^{-1}$.

¹, respectivamente. Os parâmetros termodinâmicos de formação do complexo CR-BSA, obtidos pela técnica de SPR, a 298K, foram $\Delta H^\circ = 18,74 \text{ kJ.mol}^{-1}$, $\Delta S^\circ = 49,97 \text{ kJ.mol}^{-1}$ e $\Delta G^\circ = -32,82 \text{ kJ.mol}^{-1}$, já para os ensaios de espectroscopia de fluorescência os parâmetros termodinâmicos de formação do complexo CR-BSA obtidos a 298 K foram $\Delta H^\circ = -91,7 \text{ kJ.mol}^{-1}$, $\Delta S^\circ = -50,4 \text{ kJ.mol}^{-1}$ e $\Delta G^\circ = -41,3 \text{ kJ.mol}^{-1}$. Uma comparação dos resultados de SPR e fluorescência sugere que há mais de um sítio onde a BSA interage com CR.

ABSTRACT

PAULA, Hauster Maximiler Campos de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2017. **Study of the kinetics and thermodynamics of the intermolecular interaction of Bovine Serum Albumin with Red Congo dye.** Adviser: Luis Henrique Mendes da Silva. Co-advisers: Ana Clarissa dos Santos Pires and Maria do Carmo Hespanhol.

Properly-folded impart structure and function alization to our body and are biodegradable. Amyloids are badly-folded proteins that resist degradation and, as a consequence may be deposited and accumulate in tissues and organs. Where there is a deposit of amyloid it will cause malfunction of this organ. Among will occur the diseases caused by these amyloids are Alzheimer's, Parkinson's and Huntington's. Premature diagnosis is necessary in order for patients to be started in the treatments available for each disease. A reliable test to detect the presence of amyloid deposits is the application of congo red dye (CR) in the tissue sample and due to the presence of the amyloid. Many studies have been conducted over the years to improve the process of detection and elimination of amyloids deposits so as to inhibit the process of fibrils formation. There are reports on the use of CR in mice infected with Huntington's disease, suggesty prolonged treatment. In order to optimize the therapeutic application of CR, which is a potential inhibitor of protein aggregation, the kinetics and thermodynamics of the interactions between CR and a model-protein must be understood. We used surface plasmon resonance (SPR) and fluorescence techniques to determine the dynamics and thermodynamic parameters for complex formation between CR and bovine serum albumin (BSA). CR interacts with BSA through a transition complex. An activation energy of association ($E_{act} (a)$) was determined as $35.88 \text{ kJ.mol}^{-1}$, while the variations of enthalpy of activation ($\Delta H \ddagger$), entropy ($\Delta S \ddagger$) and free energy of Gibbs ($\Delta G \ddagger$) were $33, 41 \text{ kJ.mol}^{-1}$, $0.18 \text{ J.mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ and $33.35 \text{ kJ.mol}^{-1}$, respectively. When this intermediate becomes the final CR-BSA complex, th system entropy increases and some of the absorbed energy is released. This phenomenon is associated with a reverse activation energy ($E_{act} (d)$) of $20.17 \text{ kJ.mol}^{-1}$ and values of $\Delta H \ddagger$, $\Delta S \ddagger$ and $\Delta G \ddagger$ of $17.69 \text{ kJ mol}^{-1}$, $-162.86 \text{ J.mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ and $66.25 \text{ kJ mol}^{-1}$, respectively. The thermodynamic parameters of the CR-BSA complex formation obtained with the SPR technique at 298 K were $\Delta H^\circ = 18.74 \text{ kJ.mol}^{-1}$, $\Delta S^\circ = 49.97 \text{ kJ.mol}^{-1}$ and $\Delta G^\circ = -32.82 \text{ kJ.mol}^{-1}$. The thermodynamic parameters obtained, at 298 K with fluorescence spectroscopy were ΔH° , ΔS° and ΔG° of $-91.7 \text{ kJ.mol}^{-1}$, -50.4

$\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ and $-41.3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. A comparison of SPR and fluorescence results suggests that there is more than one site where BSA interacts with CR.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

Proteínas são macromoléculas formadas por aminoácidos ligados entre si por ligações peptídicas. Assim que são codificadas pelo nosso DNA, passam por um processo chamado de enovelamento proteico até atingir a sua conformação nativa. A conformação nativa de uma proteína é sua forma tridimensional no espaço, com a qual desempenha uma certa função biológica no corpo. Funções essenciais para nossa sobrevivência são, por exemplo, implementados por anticorpos, que tornam nossa resposta imune a doenças (ALMEIDA, 2016).

A conformação nativa é o estado mais estável da proteína, ou seja, é a conformação com o estado mínimo de energia livre. Alguns fatores podem afetar esse processo, alterando a função biológica da proteína, tais como: as mutações genéticas no nosso corpo, envelhecimento, mudança de pH do meio, dentre outros. Esses fatores podem levar ao mal enovelamento protéico, chamado de *misfolding*. Quando ocorre esse processo de *misfolding*, nosso corpo é capaz de eliminar essas proteínas, mas quando produzidas em grandes quantidades essas proteínas se agregam e formam fibrilas rígidas e insolúveis, chamadas de fibrilas amiloide.

As fibrilas amiloide podem se agregar em diversos órgãos do corpo, causando doenças. Essas doenças causadas por fibrilas amiloide recebem o nome de amiloidoses e, para alguns casos específicos, de doenças neurodegenerativas. Alguns exemplos são: o diabetes tipo 2, amiloidoses sistêmica, mal de *Alzheimer*, mal de *Parkinson*, e doença de *Huntington*.

Segundo a Associação Brasileira de Alzheimer há aproximadamente 35,6 milhões de pessoas no mundo diagnosticadas com a doença, sendo um milhão de pessoas só no Brasil. Estima-se que até o ano de 2050 haverá 115 milhões de pessoas que receberão o diagnóstico da doença, isso sem mencionar as outras doenças causadas por fibrilas amiloide.

Os números em relação às pessoas portadoras da doença de Alzheimer são alarmantes. Diante disso, ao longo dos anos, esforços são feitos pelos cientistas em busca de uma cura ou um melhor tratamento para essas pessoas. Infelizmente, ainda não há cura, mas há tratamento. Tão importante como o tratamento é também o diagnóstico precoce da doença, para a busca de um tratamento adequado.

Um composto que vem sendo estudado e utilizado atualmente não somente para detectar da presença de fibrilas amiloide, mas também como possível inibidor dessa agregação protéica, é o corante vermelho congo. Há relatos que indicam, que ratos infectados com a doença de *Huntington* tiveram um tratamento prolongado quando tal composto foi utilizado no tratamento (FRID et. al., 2006).

Diversas pesquisas são realizadas estudando a interação do vermelho congo com fibrilas de proteínas como lisozima, insulina e BSA por diferentes técnicas, por exemplo, dicróismo circular e espectrofotometria UV-vis, para obter as constantes termodinâmicas de interação intermolecular do corante com as proteínas. No entanto, não há relatos do uso da técnica de ressonância plasmônica de superfície para a obtenção das constantes de interação e constantes cinéticas de associação e dissociação do vermelho congo com a BSA. Nesse contexto, busca-se nesse trabalho a obtenção dos parâmetros termodinâmicos (ΔH , ΔG e ΔS), e as constantes cinéticas de interação do vermelho congo com a proteína BSA, utilizando as técnicas de ressonância plasmônica de superfície e espectroscopia de fluorescência.

2 OBJETIVOS

Estudar a interação intermolecular entre o corante azo vermelho congo com a proteína Albumina do Soro Bovino (BSA).

- ✓ Determinar a constante de interação entre a BSA com o CR, em diferentes temperaturas;
- ✓ Determinar os parâmetros termodinâmicos ΔG , ΔH e ΔS ;
- ✓ Determinar as constantes cinéticas de associação e dissociação da interação da proteína com o corante;
- ✓ Determinar o mecanismo de interação da BSA com o CR na formação do complex BSA-CR.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Corantes

O uso de corantes se faz em diversas áreas. Inicialmente fez-se o uso de corantes naturais, extraídos de matéria prima vegetal ou animal. Esses corantes, preferencialmente, deveriam ser estáveis a luz e aos processos de lavagem e, também, apresentar fixação uniforme às fibras do substrato. Porém, o processo de extração de corantes é demorado e de elevado custo financeiro. Devido a isso buscou-se desenvolver corantes sintéticos que permitissem manipular suas propriedades, reduzir o tempo de produção e diminuir o custo financeiro (BARCELLOS, 2004).

Corantes sintéticos são compostos orgânicos que possuem várias aplicabilidades, por exemplo, nas indústrias de plásticos, fotográfica, textil, farmacêuticas, alimentícia, dentre outras. Esses corantes contêm centros cromóforos baseados em grupos funcionais e apresentam alta absorvidade, tais como corantes azo (ZANONI, 2016).

Os corantes azo (figura 1), são utilizados em indústrias de alimentos e cosméticos e possuem o grupamento (-N=N-) como grupo cromóforo. De acordo com o número de grupamentos podem ser classificados como monoazo, diazo etc. O vermelho congo, um corante azo, é alvo de muitas discussões em pesquisas, devido a suas aplicabilidades e propriedades (ZANONI, 2000).

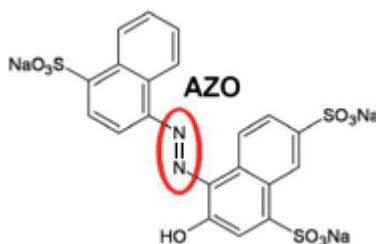


Figura 1. Estrutura do corante amarantho, um corante azo (SILVA, 2008).

3.1.1 Vermelho Congo

O corante vermelho congo (CR) foi sintetizado em 1883 por Paul Böttiger para ser utilizado como indicador de pH, e já em 1886 foi utilizado para verificar se alguns animais produziam ácido em seu trato intestinal (FRID, 2006; STEENSMA, 2001).

O CR foi considerado um corante direto para algodão, ou seja, não tem necessidade do uso de mordente, e obteve grande sucesso comercial. Entretanto é classificado como um corante tóxico e por este motivo a sua aplicabilidade nas indústrias de papel e algodão foi cessada (HOWEI, 2009).

O vermelho congo é um sal dissódico de fórmula estrutural $C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$, com nome IUPAC ácido benzidinodiazó-bis-1-naftilamina-4-sulfônico. Trata-se de uma molécula linear simétrica, com massa molar de $696,66 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, (Figura 2), solúvel em água e em solventes orgânicos como o etanol. A parte aniônica do sal com centro hidrofóbico é constituída por dois anéis fenilo, ligados através de ligações diazo, possuindo dois anéis carregados com ácido sulfônico e grupos amina. Em solução o CR pode ser utilizado como indicador de pH devido a sua mudança de cor de azul para vermelha entre pH 3 e 5,2 (ROMHANYI, 1971; TAPALAD et. al., 2008; WOO et. al., 2003).

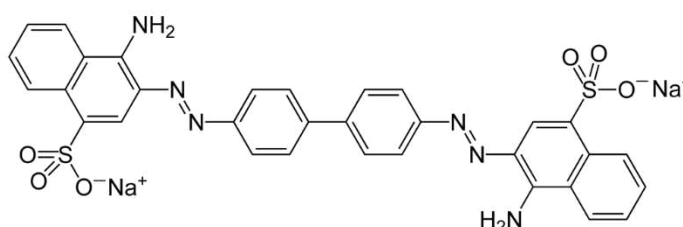


Figura 2. Representação estrutural da molécula de corante vermelho congo.

O espectro de absorção UV-Vis do corante é intenso, aproximadamente em 480 nm, em solução aquosa, e em baixa concentração do corante com absorvidade molar de $45000 \text{ L. mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Possui estabilidade térmica, ótica, a biodegradação e a fotodegradação (REIS, 2009; ZHANG et. al., 2009).

O corante ainda pode ser utilizado nos dias de hoje para a coloração de tecidos, mas apresenta algumas desvantagens como a toxicidade do composto. No entanto, em 1922 Benhold descreveu em um artigo que o composto apresenta uma coloração específica quando interage com fibrilas amiloide (HOWEI, 2009).

O CR é utilizado em análises clínicas, porque apresenta uma birrefringência verde-maçã quando ligado às fibrilas amiloide e devido a essa característica é utilizado também no diagnóstico de carcinoma da tireoide (REIS, 2009).

A interação do CR com as fibrilas amiloide provoca uma mudança na absorvidade molar do corante de 480 nm a 540 nm, mas o mecanismo da interação do CR com as fibrilas amiloide ainda não é bem compreendido (FRID et. al., 2006).

O CR pode se agregar em solução aquosa na concentração de $[\text{CR}] \geq 1,43 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$. Alguns mecanismos sugerem que há uma interação hidrofóbica entre os anéis aromáticos do composto, podendo-se obter agregados de vários tamanhos e formas (AL-THABAITI et. al., 2016; REIS, 2009).

3.2 Proteínas

Proteínas são moléculas compostas por aminoácidos ligados entre si por ligações peptídicas que desempenham diversas funções e estrutura nos processos biológicos da vida. A grande maioria das proteínas são formadas por 20 tipos de aminoácidos diferentes. Os aminoácidos são formados por um grupo amina e um

grupo carboxílico e uma cadeia lateral R (radical), ligadas a um carbono central, esses podem se diferenciar por sua estrutura, tamanho e carga elétrica, apresentando uma característica polar, apolar ou neutra (Figura 3) (ALMEIDA, 2016).

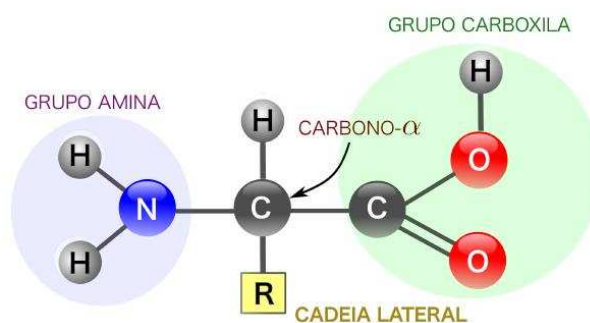


Figura 3. Representação de um aminoácido (ALMEIDA, 2016).

As funções das proteínas são dependentes dos aminoácidos que a compõem e de sua estrutura. Alguns exemplos são os hormônios que auxiliam no nosso crescimento, anticorpos que nos auxiliam no combate a doenças, as enzimas que facilitam a química de nossa célula, o transporte de oxigênio e de substâncias exógenas e endógenas, o fato de podermos ou não digerir determinados alimentos, dentre outras; ou seja, muitas etapas biológicas dependem das proteínas que produzimos ou ingerimos (CAGNIN, 2010).

Assim que são sintetizadas, as proteínas passam por um processo chamado de enovelamento proteico ou *folding*, processo pelo qual a proteína apresenta seu estado mais estável e a energia livre de Gibbs é mínima, garantindo assim sua função biológica. As proteínas podem sofrer alterações em sua estrutura nativa, ou seja, pode ocorrer o enovelamento incorreto ou desnaturação dessa proteína. Isso pode ocorrer devido a alterações genéticas, envelhecimento e por outros diferentes fatores, como temperatura, pH, força iônica, entre outros.

Quando ocorre o enovelamento incorreto ou *misfolding* das proteínas, nosso organismo é capaz de eliminá-las. Em alguns casos, ao eliminar essas proteínas elas se tornam insolúveis no meio extracelular, agregando-se e formando um tipo de fibra chamada de fibrilas amiloide, que podem se depositar em vários órgãos, o que pode acarretar o mal funcionamento do órgão e levar a doenças como o *Alzheimer*, *Parkinson*, diabetes tipo 2, *Huntington*, entre outras. Até o momento, 27 tipos de doenças diferentes causadas pelas fibrilas amiloide. Essas doenças recebem o nome de amiloidoses e em alguns casos de doenças neurodegenerativas (FRID et. al., 2006).

Pesquisas ao longo dos anos foram desenvolvidas para contribuir para um melhor entendimento de como ocorre esse processo de *misfolding* e a busca de alternativas de como inibir essa agregação proteica. Nesse contexto, a proteína albumina do soro bovino e sua interação com alguns compostos vem se destacando nas pesquisas devido às suas propriedades singulares, principalmente como moléculas transportadoras.

3.2.1 Albumina do soro bovino (BSA)

A albumina do soro bovino (BSA) é uma das proteínas mais abundantes do plasma sanguíneo, representando cerca de 60% da proteína total, com uma concentração de aproximadamente 0,05 g.mL⁻¹. É também uma das proteínas mais estudadas devido a sua estabilidade, baixo custo, propriedades de ligação e sua semelhança estrutural de 76 % com a albumina do soro humano (HSA) e as suas diversas funções nos processos biológicos (RAVINDRAN et al., 2010; ZHANG et al., 2012).

A BSA contém 582 aminoácidos, peso molecular de 66 kDa, ponto isoelétrico de 4,8. Apresenta dois resíduos de triptofano na sua estrutura denominados Trp-134 e Trp-212, localizadas no subdomínio IB e IIA (Figura 4), e induz a fluorescência a 280 nm. A BSA é solúvel em água, mas pode precipitar em temperaturas elevadas, 40° a 45° C, devido ao desdobramento parcial da proteína, expondo seus grupos hidrofóbicos e promovendo assim as interações intermoleculares com outros compostos e a HSA possui 585 aminoácidos e tem apenas um resíduo de triptofano, na posição de Trp-214, no subdomínio IIA (MODLER, 2000; MOREIRA, 2014; MORR e HA, 1993).

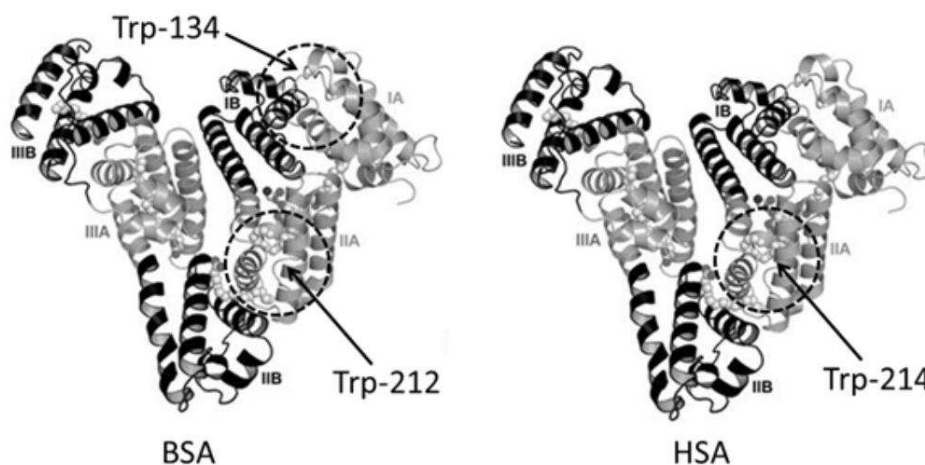


Figura 4. Representação da localização dos resíduos de triptofano nas estruturas da BSA e HSA (MOREIRA, 2014).

A BSA contribui para o transporte e distribuição de ligantes endógenos e exógenos, atuando como carreador de ácidos graxos, os quais são insolúveis no plasma sanguíneo, e também auxilia na manutenção do pH sanguíneo e na pressão osmótica, dentre outras funções (WIT, 1998).

Há estudos sobre sua estrutura, propriedades físico-químicas e sua interação intermolecular com outras moléculas. Tais interações dependem de algumas propriedades do ligante como a massa molar, tamanho, volume e carga superficial. Essas propriedades podem sofrer alterações com a mudança de temperatura do meio, força iônica e a presença de outras moléculas. A BSA pode interagir fortemente com alguns compostos aromáticos, como corantes e fármacos, sofrendo possivelmente alterações conformacionais (COLMENAREJO, 2003; FANALI et. al., 2012; FERREIRA, 2009; KUMAR et. al., 1997; TUNG, 1978).

Os complexos formados da interação da BSA com o corante ou BSA-fármaco devem ser monitorados, porque essa interação pode reduzir a concentração livre de corante disponível e sua ação tóxica (SHAHABADI, et al., 2012; PAN et. al., 2010).

A BSA possui uma característica fundamental que é a capacidade de formar uma ligação reversível com uma grande variedade de ligantes (GOODMAN, 1958; BURKE et al., 1971; JACOBSEN, 1977; RODA et al., 1982).

3.3 Interação intermolecular de proteína com corantes

Diversos estudos foram realizados para investigar quais são os mecanismos de interação dos corantes com as proteínas e as consequências do uso desses corantes em produtos alimentícios (LELIS, 2015).

A interação do corante vermelho congo com as proteínas vem sendo relatada por vários pesquisadores. Segundo Antinomova et. al. (2016) o estudo da interação do vermelho congo com fibrilas proteicas de lisozima, beta2-microglobulina e transtirretina foi investigado utilizando a técnica de espectrofotometria UV-Vis. Verificou-se que houve um deslocamento no espectro de absorção do corante, de 480 nm a 540 nm, característico de ligação com fibrilas amiloides. A titulação da solução

de fibrilas proteicas com quantidade excessiva de CR mostrou que o número de moléculas do corante ligadas a um monômero da proteína dentro das fibrilas de lisozima era próximo a cinco, mas a razão das proteínas beta2-microglobulina e transtirretina foi próxima de quatro moléculas do corante por subunidade protéica.

De acordo com Klunk (1989), ao estudar a interação do CR com as proteínas de insulina e poli-l-lisina, relatou que o corante interage preferencialmente com as proteínas com a conformação de folhas beta-plissadas das fibrilas dessas proteínas, e que a relação para a ligação é de 2 mol de CR por um mol de insulina com uma constante de dissociação (K_D) de $1,75 \cdot 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$.

O corante CR é utilizado para detecção amiloide. A especificidade desta coloração resulta da afinidade do vermelho congo para a ligação às proteínas fibrilares que apresentam um conformação β -folha (FRID et. al., 2007).

Kagan e Rosinova (1974), foram os primeiros a apresentar resultados sobre o efeito terapêutico da utilização de CR para o tratamento de doenças amiloide, observando uma redução das placas de amiloides após o uso do CR no tratamento de ratos contaminados. Já em 1995, Ingrosso e colaboradores relataram que ao utilizar o CR no tratamento de ratos infectados com as doenças das tremuras tiveram seu tratamento prolongado.

De acordo com Frid et. al. (2007), nos últimos anos tem-se pesquisado muito sobre o efeito terapêutico do CR, relatando sobre a interação do corante com as fibrilas amiloide, reduzindo a formação das fibrilas e também da toxicidade amiloide e da sua eficiência no tratamento de doenças neurodegenerativas, como o *Alzheimer*. Como os mecanismos da interação de fibrilas amiloides com o corante e sua influência na conformação protéica e inibição da agregação, esforços são realizados na busca

de guias instrutivos para a concepção de compostos, potencialmente úteis para o monitoramento e tratamento de doenças neurodegenerativas.

Nesse contexto Zhang et. al. (2009) estudou a interação da BSA com vermelho congo, para verificar a capacidade desses complexos de atuarem como sonda molecular, fornecendo informações para o desenvolvimento da ciência, através das técnicas de espectroscopia de fluorescência e de dicroísmo circular e absorção UV-Vis. Obtiveram-se os parâmetros termodinâmicos $\Delta H = -12,67 \text{ kJ.mol}^{-1}$, $\Delta S = 58,6 \text{ J.mol}^{-1}$, e concluíram que a força hidrofóbica e a ligação de hidrogênio são as que conferem a estabilização do complexo da BSA-CR e que a presença de CR provocou uma mudança na estrutura secundária da BSA induzindo um desdobramento dos polipeptídios da proteína.

Vasconcelos e Ximenes (2015), estudaram as propriedades espectrais e as aplicações analíticas do dicroísmo circular induzido (ICD) no CR provocados pela interação intermolecular BSA com CR, verificando que o complexo formado exibe um forte espectro ICD com uma banda positiva a 412 nm e duas bandas negativas a 356 e 490 nm. Eles concluíram que o ICD provocado pela interação do CR à BSA pode representar uma nova técnica espectroscópica para estudar alterações na estrutura da albumina em relação aos seus locais de ligação e à formação de agregados amiloide.

Há várias técnicas e métodos que nos permitem estudar as interações intermoleculares entre proteínas e corante, tendo cada uma com sua característica. A combinação de técnicas como a espectroscopia de fluorescência e ressonância plasmônica de superfície, por exemplo, nos permite uma melhor discussão e análises dos dados para obtenção dos parâmetros termodinâmicos (LELIS, 2015).

3.4 Técnicas experimentais para estudo das interações intermoleculares

O estudo das interações intermoleculares entre as proteínas com os corantes é estratégico para avaliar quais são as contribuições do complexo formado e as energias associadas a este processo de formação.

Para auxiliar esses estudos, utilizam-se técnicas espectroscópicas que permitem avaliar em qual comprimento de onda a molécula em estudo apresenta uma melhor absorvidade molar e qual é a estequiometria entre os compostos. Como o uso da técnica de nanocalorimetria pode-se detectar trocas de energias da ordem 10^{-9} J e calcular as variações de entalpia da mudança conformacional da proteína e do corante em função da temperatura, mantendo a composição dos complexos constante.

Dentre as diversas técnicas e métodos, as técnicas de espectroscopia de fluorescência e ressonância plasmônica de superfície permitem calcular os parâmetros termodinâmicos, ΔG , ΔH e ΔS de interação entre compostos, e calcular as constantes cinéticas de associação e dissociação com auxílio de modelos matemáticos.

3.4.1 Espectroscopia de Fluorescência

O fenômeno da fluorescência acontece quando a absorção dos fótons pelas moléculas promove a transição molecular do nível eletrônico fundamental para um nível eletrônico excitado denominado singlete, no qual o elétron excitado não muda a orientação de *spin*. Quando os elétrons retornam seu estado eletrônico fundamental

ocorre uma emissão de fótons, na forma de fluorescência. Quando a molécula é excitada ao estado de maior energia devido a colisões moleculares a emissão se dará em um maior comprimento de onda devido a perda energética (LAKOWICZ, 1999; MOLLER e DENICOLA, 2002; VAN HOLD et al., 1997).

A técnica de espectroscopia de fluorescência apresenta alta sensibilidade e permite análise em tempo real. As proteínas apresentam fluorescência intrínseca, devido a três diferentes resíduos de aminoácidos que contribuem para emissão de fluorescência: tirosina, triptofano e fenilalanina. Cerca de 90 % da emissão total da fluorescência das proteínas, entretanto, são atribuídos aos resíduos do aminoácido de triptofano, devido ao seu elevado rendimento quântico que nos permite a obtenção de um sinal intenso de emissão de fluorescência (FARRELL et al., 2001; LACKOWICZ, 1983).

Essa técnica permite determinar a constante de interação (K_a), a constante de extinção da fluorescência (*quencher*) e também a estequiometria do complexo do corante com a proteína, por exemplo.

A constante K_a mostra a tendência de um composto em interagir com um sítio da proteína, sendo uma relação proporcional: quanto maior o valor da constante maior será a interação intermolecular do complexo proteína-composto formado. Para auxiliar no cálculo da constante de interação e a estequiometria, tem-se a equação 1:

$$\log \frac{F_0 - F}{F} = \log K_a + n \log [Q] \quad (1)$$

Onde:

F_0 : intensidade de fluorescência da proteína na ausência do corante;

F : intensidade de fluorescência da proteína na presença do corante;

[Q]: concentração do corante;

K_a e n são calculados através do intercepto e da inclinação da reta.

A constante da extinção da fluorescência pode ser calculada utilizando a equação de Stern-Volmer (Eq. 2):

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

Onde:

K_{SV} : é a constante de extinção dinâmica;

K_q : é constante da taxa de extinção;

τ_0 : é o tempo de meia vida da proteína sem a interação com o corante.

A extinção de fluorescência da proteína na presença do corante pode ser dinâmica (K_{SV}) ou estática (K_q). Na extinção estática, o agente de extinção (corante) forma um complexo não fluorescente com a proteína, enquanto que na extinção dinâmica o agente de extinção sofre colisões com o fluoróforo, ocorrendo transferência de energia do fluoróforo para o agente de extinção, com o consequente retorno do fluoróforo para ao seu estado fundamental sem a emissão da fluorescência. Não obstante, tanto na extinção dinâmica ou estática há um contato entre agente de extinção com o fluoróforo. Diante disso, a determinação das constantes de extinção estática e dinâmica é importante para verificar se está ou não havendo a formação de um complexo entre a proteína e o corante (LAKOWICZ, 1999).

A partir da determinação da constante de ligação (K_a) em diferentes temperaturas, pode-se obter a variação da entalpia de interação ($\Delta_{int}H$) (Eq. 3).

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

Onde:

K_{a1} : é a constante de interação na temperatura 1;

K_{a2} : é a constante de interação na temperatura 2;

R: é a constante dos gases ideais ($R = 8,314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \text{K}^{-1}$);

T_1 e T_2 : são as temperaturas de trabalho (K).

3.4.2 Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR)

A determinação dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos da interação entre proteínas e corantes permite compreender os processos moleculares de interação que levam a estabilidade dos agregados formados. Nesse contexto, a técnica de ressonância plasmônica de superfície realiza o monitoramento das interações intermoleculares entre a proteína e o corante em tempo real, permitindo assim obter dados cinéticos, bem como constantes termodinâmicas de afinidade entre o corante e a proteína.

Em 1990 foi lançada comercialmente a técnica de SPR, permitindo o estudo da interação de diferentes sistemas, como proteína-peptídeos, proteína-DNA e proteína-polissacarídeos, dentre outros sistemas, além de permitir o cálculo da cinética e termodinâmica de interação em tempo real de biomoléculas. A técnica

baseia-se nas propriedades ópticas, monitorando a variação do índice de reflexão causado por exemplo pela interação de uma camada orgânica à superfície metálica (CARVALHO, 2003; LIN et. al., 2015; VACHALI et. al., 2015)

A SPR consiste na oscilação da densidade de carga longitudinal ao longo de uma interface com constantes dielétricas com sinais opostos, um composto por metal e o outro por um não-condutor. O metal a ser utilizado deve possuir propriedades de elétrons livres, sendo os mais utilizados o ouro e a prata. Otto (1968) e Kretschmann (1968) desenvolveram, cada um, um sistema experimental para promover a excitação do plasma de superfície. No entanto, a configuração desenvolvida por Kretschmann com a configuração de reflectância total é mais utilizada (GREEN, 2000; HOMOLA, 1999; LUZ, 2014).

A configuração de Kretschmann está baseada no fenômeno de reflexão interna total, (figura 5). O fenômeno ocorre quando se tem uma fina camada de metal, ouro, por exemplo, e a mesma é colocada em contato com uma solução aquosa que contém a espécie química cuja interação com outro composto. Será estudada um feixe de luz polarizada com incide em um ângulo de reflexão interna total em um meio óptico denso, como o vidro, e atinge uma interface entre este meio e um meio de densidade óptica menor, como o ar, sendo refletido de volta para o meio mais denso, permitindo assim que uma onda eletromagnética residual penetre na interface do meio menos denso, até a distância de um comprimento de onda (1λ). O ângulo de incidência da luz polarizada sofre alteração, devido a diferença dos meios de densidade óptica maior com o meio de densidade óptica menor. Em determinado ângulo de incidência, quando o vetor de onda do plasma é igual ao vetor de onda do campo evanescente ($K_{sp} = K_x$), parte da radiação entra em ressonância com os elétrons livres, formando um plasma, no filme metálico, ocorrendo então a chamada ressonância de plasmônica

de superfície. Os plasmons são excitados no filme de ouro, e, em consequência, causam uma diminuição da intensidade da radiação da onda eletromagnética que penetra a solução aquosa. O aparelho mede a diminuição da intensidade da radiação, que é relacionada ao índice de refração da solução que está em contato com o filme de ouro. Esse valor depende da concentração da espécie química presente na solução próximo a interface do ouro (CARVALHO, 2003).

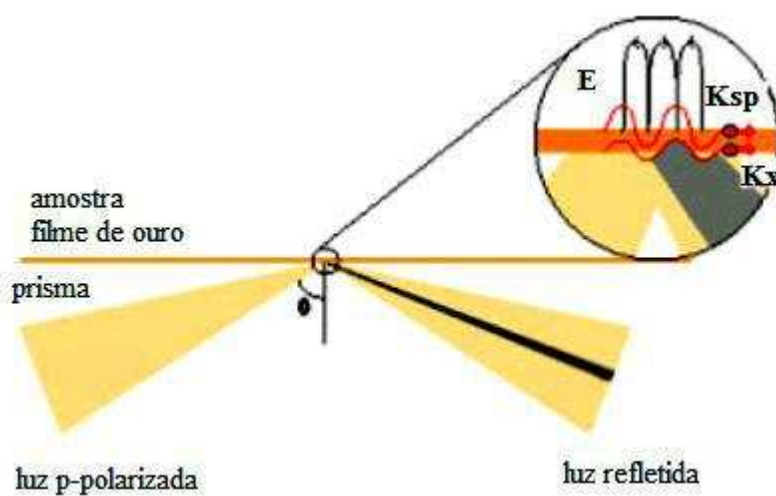


Figura 5. Configuração de Kretschmann aplicada em SPR, E é campo evanescente, Kx é o vetor da luz incidente e Ksp é o vetor do plasma de superfície (MENDES, 2006).

O índice de refração do meio sobre o filme metálico está diretamente relacionado ao Ksp. Quando há uma variação, causada pela adsorção de uma camada protéica, por exemplo, o sistema busca um novo ângulo de incidência para que ocorra a excitação ressonante do plasma de superfície. Monitorando a alteração do ângulo de incidência com o tempo, é possível acompanhar como está ocorrendo a alteração na superfície do sensor. Diante disso, pode-se calcular a velocidade das interações, cinética, e as constantes de associação e dissociação e as constantes de interação (CARVALHO, 2003; JUNG, 1996).

Na figura 6 é apresentado um modelo de configuração de um aparelho de ressonância plasmônica de superfície.

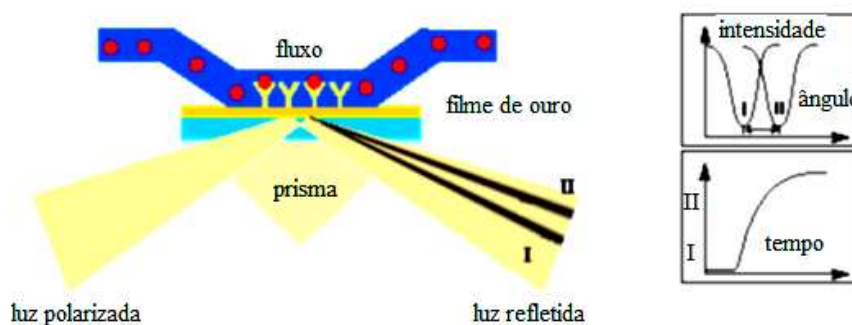


Figura 6. Modelo de aparelho de SPR. Os diferentes ângulos de incidência quando há interação de um ligante com a camada imobilizada na superfície, (I) sem interação e (II) após interação, e uma curva de associação, na qual há um aumento do ângulo de incidência com o tempo (AMARAL, 2011).

A adsorção de uma proteína, por exemplo, sobre uma superfície metálica, nos aparelhos de SPR é exibida na figura 7. A escolha do método de trabalho de imobilização dessa proteína na superfície metálica requer atenção. Um método muito utilizado é o acoplamento amina. Inicialmente, a superfície metálica (*sensorchip*) é preparada com uma solução-tampão para gerar uma linha base sob a curva do SPR. Após um processo de preparação do *chip*, através do método de imobilização escolhido, a proteína a ser imobilizada entra em contato com a superfície, ocorre uma adsorção rápida, a qual resulta em uma variação do ângulo de ressonância do SPR, seguido por um patamar no perfil de adsorção, devido à saturação da superfície com a proteína. Após essa etapa de imobilização da proteína, utiliza-se novamente a solução-tampão removendo o material fracamente ligado. A variação causada no

ângulo de ressonância inicial e o final fornece uma indicação sobre a extensão da adsorção (GREEN, 2000).

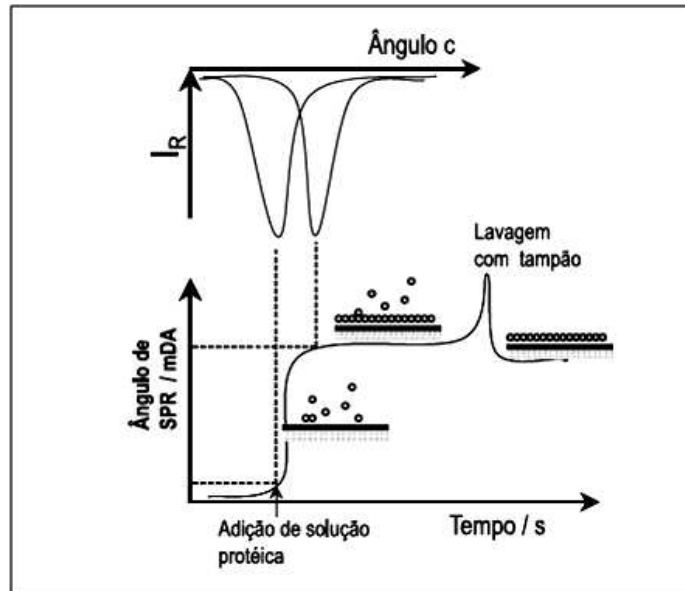


Figura 7. Representação de um perfil de adsorção do SPR para adsorção de uma proteína em um sensorchip. A variação do ocorrido no ângulo de incidência em função do tempo (s) é utilizada para estudar a cinética de adsorção. IR – intensidade da radiação refletida e mDA – milgraus de ângulo (CARVALHO, 2003)

Essa técnica pode ser utilizada para análises quantitativas, análises cinéticas e cálculo de parâmetros termodinâmicos da interação da proteína (A) com um corante (B) através das equações 4,5 e 6:



Onde:

K é a constante de equilíbrio do complexo AB;

K_a é a constante de associação;

K_d é a constante de dissociação.

A constante K_d é calculada a partir da equação:

$$\frac{dRU}{dt} = -k_d RU \quad \text{eq. 5}$$

RU: Unidade de ressonância;

A constante K_a é determinada a partir da inclinação do gráfico da constante de associação observada (K_{obs}) em função da concentração do corante (C).

$$K_{obs} = K_a \cdot C + K_d \quad \text{eq. 6}$$

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-THABAITI, SHAEEL AHMED, et al. "Aggregation of Congo red with surfactants and Ag-nanoparticles in an aqueous solution." *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 156 (2016): 28-35.

ALMEIDA, A. B., Predição de estrutura terciária de proteína com técnicas multiobjectivo no algoritmo de Monte Carlo. Dissertação (Mestrado), Instituto de Informática, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 129 pag, 2016.

AMARAL, H. R., Síntese e caracterização de nanoestruturas peptídicas funcionalizadas com polianilina. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do ABC. Santo André, São Paulo. 112 pag. 2011.

ANTIMONOVA, O.I., GRUDININA, N.A., EGOROV, V.V., POLYAKOV, D.S., IL'IN V.V., SHAVLOVSKII, M.M., 2016, published in *Tsitologiya*, 2016, Vol. 58, Nº. 2, pp. 156–163.

BARCELLOS, I. O., Química Têxtil II. 183 pag. Blumenau, 2004.

BURKE, C. W., LEWIS, B., PANVELIWALLA, D., and TABAQCHALI, S. The Binding of Cholic Acid and its taurine conjugate to serum Proteins. *Clin. Chim. Acta* 32; 207-214, (1971).

CAGNIN, RENATO LUCIANO. Método de Wang-Landau para sequenciamento de aminoácidos em estrutura nativa de proteínas em modelos de rede. 2010. 79 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Geociências e Ciências Exatas, 2010.

CARVALHO, Rosângela M. de et al. SPR: Uma nova ferramenta para biossensores. Química Nova, 2003.

Conscientização sobre amiloidose, Amyloidosis Support Groups. Disponível em: http://amyloidosisupport.org/AmyloidAware_Portuguese.pdf. Acesso: janeiro, 2017.

CRONEY, J. C., JAMENSON, D. M., LEARMONTH, R. P. Fluorescence spectroscopy in biochemistry: teaching basic principles with visual demonstrations, Biochem. Mol. Biol. Educ., v. 29, p. 60–65, 2001.

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

FRID, P., SERGEY, V. ANISIMOV, and NATALIJA POPOVIC. "Congo red and protein aggregation in neurodegenerative diseases." Brain Research Reviews 53.1 (2007): 135-160.

G. COLMENAREJO, Med. Res. Rev. 23 (2003) 275–301.

G. FANALI, A. di MASI, V. TREZZA, M. MARINO, M. FASANO, et al., Human serum albumin: from bench to bedside, *Mol. Aspects Med.* 33 (2012) 209–290.

GOODMAN, D. S. The Interaction of Human Serum Albumin with Long-chain Fatty Acid Anions. *J. Am. Chem. Soc.* 80; 3892-3808, (1958).

GRENN, R. J.; FRAZIER, R. A.; SHAKESHEFF, K. M.; DAVIES, M. C.; ROBERTDS, C. J.; TENDLER, S. J. B., Surface plasmon resonance analysis of dynamic biological interactions with biomaterials. *Biomaterials* 2000, 21 (18), 1823-1835

HOMOLA, J.; YEE, S. S.; GAUGLITZ, G.; *Sens. Actuators, B* 1999, 54, 3.

HOWEI, ALEXANDER J., and DOUGLAS B. BREWER. "Optical properties of amyloid stained by Congo red: history and mechanisms." *Micron* 40.3 (2009): 285-301.

JACOBSEN, J. Studies of the affinity of Human Serum Albumin for binding of bilirubin at different temperatures and ionic strength. *Int. J. Pept. Protein Res.* 9; 235-239 (1977).

JUNG, C. C.; SABAN, S. B.; YEE, S. S.; DARLING, R. B., Chemical electrode surface plasmon resonance sensor. *Sensors and Actuators B: Chemical* 1996, 32 (2), 143-147

KAGAN, D.Z., ROZINOVA, V.N., 1974. Inhibition of amyloidogenesis with Congo red in experimental amyloidosis. *Probl. Tuberk.* 9, 72–74.

KLUNK, W.E., PETTEGREW, J.W., ABRAHAM, D.J., 1989. Quantitative evaluation of Congo red binding to amyloid-like proteins with a beta-pleated sheet conformation. *J. Histochem. Cytochem.* 37, 1273–1281.

KUMAR, C. V., A. BURANAPRAPUK, *ANGEW. Chem. Int. Ed. Engl.* 36 (1997) 2085–2087.

LACKOWICZ, J. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. New York: Kluwer Academy/Plenum Publisher, 1983

LACKOWICZ, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, p. 1–24, 1999

LELIS, C., Caracterização físico-química da interação intermolecular entre o vermelho 40 ou vermelho ponceau 4R e albumina do soro bovino. Dissertação (Mestrado), Departamento de tecnologia de alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 84 pag, 2015.

LUZ, J. G. G., Desenvolvimento de um imonuscensor para detecção de anticorpos anti-Trypanosoma cruzi por meio da espectroscopia de ressonância de superfície. Dissertação (Mestrado). Diamantina, Minas Gerais, 2014. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, 153 p.

MODLER, H.W. Milk Processing. In: Nakai, S.; Modler, H.W. (EGS.), *Food Proteins – Processing Applications*, 2000. Canada: Wiley-CRH, Inc., Cap 1, p.1-88.

MÖLLER, M., DENICOLA, A. Protein tryptophan accessibility studied by fluorescence quenching. *Biochem. Mol. Biol. Educ.*, v. 30, p. 175–178, 2002

MOREIRA, M. B., et al. "Investigação da supressão de fluorescência de soro albumina bovina e humana por complexo de rutênio." *Quim. Nova* 38.2 (2015): 227-232.

MORR, C.V.; HA. E.Y.W. Whey protein concentrates and isolates: Processing and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Orlando, v. 33, n. 6, p. 431-476, 1993.

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

REIS, L. G. T., Degradação do corante vermelho congo em solução aquosa através de plasma obtido por eletrólise de alta tensão. Dissertação (Mestrado), Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 114 pag., 2009.

RODA, A., CAPPELLERI, G., ALDINI, R., RODA, E., and Barbara, L. Quantitative aspects of the interaction of bile acids with human serum albumin. *J. Lipid Res.* 23;2 490-495 (1982).

SILVA, C. P., MARMITT, S.; HAETINGER, C. and STULP, S. Avaliação da degradação do corante vermelho bordeaux através de processo fotoquímico. *Eng. Sanit. Ambient.* [online]. 2008, vol.13, n.1, pp.73-77. ISSN 1413-4152.

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

STEENSMA, D.P., 2001. "Congo" red: out of Africa? Arch. Pathol. Lab. Med. 125, 250-252.

TAPALAD, T.; NERAMITTAGAPONG, A.; NERAMITTAGAPONG, S.; BOONMEE, M. Degradation of congo red dye ozonation. Chiang Mai J. Sci. V. 35, p. 63-68, 2008.

TUMOLO, T. C., Desenvolvimento de biosensores de membrana e caracterização da interação entre o citocromo c e bicamadas hidratadas por ressonância plasmônica de superfície. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo. São Paulo. 2008. 217 p.

TUNG, M. A. Rheology of protein dispersions. J. Texture Stud. 9; 3-31, (1978).

VASCONCELOS, D. N., and XIMENES, V. F., "Albumin-induced circular dichroism in Congo red: Applications for studies of amyloid-like fibril aggregates and binding sites." Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 150 (2015): 321-330.

VAN HOLDE, K. E., JOHNSON W. C., HO P. S., Principles of Physical Biochemistry, Prentice-Hall Inc., USA, 1997.

WOO, S.W; CHO, J. S., HUR, B. K., SHIN, D. H., RYU, K. G., KIM, E. K., Hydrogen peroxide, its measurement and effect during enzymatic decoloring of congo red. Journal of microbiology and biotechnology. V.13., n. 5., p 773-777, 2003.

ZANONI, M. V. B; CLAUDIA C. I. and .Corantes têxteis. Quím. Nova [online]. 2000, vol.23, n.1, pp.71-78

ZANONI, M. V. B; YAMANAKA, H., Corantes: caracterização química, toxicológica, métodos de detecção e tratamento, 1ª Edição, São Paulo: Cultura Acadêmica, 2016.

ZHANG, YE-ZHONG, et al. "Spectroscopic studies on the interaction of Congo Red with bovine serum albumin." Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 72.4 (2009): 907-914.

CAPÍTULO 2

KINETICS AND THERMODYNAMICS OF BOVINE SERUM ALBUMIN INTERACTIONS WITH CONGO RED DYE

ABSTRACT

To optimize the therapeutic applications of Congo red (CR), a potential inhibitor of protein aggregation, the kinetics and thermodynamics of the interactions between CR and a model protein need to be understood. We used surface plasmon resonance (SPR) and fluorescence techniques to determine the dynamics and thermodynamic parameters for the formation of complexes between CR and bovine serum albumin (BSA). CR interacts with BSA through a transition complex; the activation energy for association ($E_{act(a)}$) was determined to be $35.88 \text{ kJ mol}^{-1}$, while the activation enthalpy (ΔH^\ddagger), entropy (ΔS^\ddagger), and Gibbs free energy (ΔG^\ddagger) are $33.41 \text{ kJ mol}^{-1}$, $0.18 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, and $33.35 \text{ kJ mol}^{-1}$, respectively. When this intermediate transforms into the final CR-BSA complex, the entropy of the system increases and part of the absorbed energy is released; this process is associated with a reverse activation energy ($E_{act(d)}$) of $20.17 \text{ kJ mol}^{-1}$, and values of ΔH^\ddagger , ΔS^\ddagger , and ΔG^\ddagger of $17.69 \text{ kJ mol}^{-1}$, $-162.86 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, and $66.25 \text{ kJ mol}^{-1}$, respectively. A comparison of the SPR and fluorescence results suggests that there is more than one site where BSA interacts with CR.

Keywords: Surface plasmon resonance; fluorescence; rate constant; binding constant

1 INTRODUCTION

Congo red (CR) is a sulfonated azo dye with a hydrophobic spacer separating negatively charged sulfonate groups ^[1] (Figure 1).

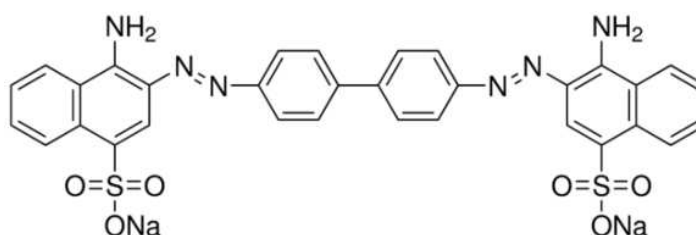


Figure 1. Chemical structure of Congo Red.

CR has been used in the textiles, print, dye, paper, and plastics industries ^[2]. CR has also been extensively studied because of its ability to bind to some proteins, in particular its ability to prevent the aggregation of amyloidogenic proteins ^[3]; hence it has been recognized as a key neurotoxicity inhibitor in Alzheimer's disease through its binding to protofibrils ^[4].

Even with this important potential therapeutic role against amyloid fibril formation in mind, CR use is limited due to its known cytotoxic, genotoxic, hematotoxic, neurotoxic, allergenic, carcinogenic, and mutagenic properties ^[2,3]. Therefore, the investigation of strategies for the protection of blood and tissue compounds from the adverse effects of CR is of interest.

Bovine serum albumin (BSA) is an important blood protein, which acts as a carrier of various molecules, including dyes^[5]. The absorption, distribution, metabolism, and excretion properties, as well as the stabilities and toxicities of dyes can be significantly influenced by their binding to BSA ^[6]. Hence, a fundamental study

into the binding of BSA to CR is essential in order to comprehend the biological effects of this dye.

Some studies demonstrated strong binding between BSA and CR by fluorescence ^[2] and UV-vis analyses ^[7], however to the best of our knowledge no thermodynamic or kinetic data for BSA-CR binding have been obtained by surface plasmon resonance (SPR) spectroscopy. SPR has emerged as a sensitive and label-free technique for the real-time investigation of interactions between biomolecules anchored to substrates and small molecules, such as dyes that are free in solution ^[8]. However, SPR-based thermodynamic parameters often do not match those obtained from solution-based methods ^[9].

In this work, we explored the use of the SPR technique for determining the kinetic and thermodynamic parameters associated with BSA-CR binding. The performance of SPR was compared to that of fluorescence spectroscopy, which is a solution-based technique often used to investigate binding between dyes and proteins.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Materials

Congo red (> 99 wt%), BSA (> 99 wt%), warfarin (reagent grade), ibuprofen (> 98 wt%), digitoxin (> 92 wt%), dibasic sodium phosphate (NaHPO_4) (reagent grade), and monohydrated sodium phosphate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (reagent grade) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Research-grade CM5 sensor chips and coupling reagents (N-ethyl-N',N'-dimethylaminopropylcarbodiimide, EDC; N-hydroxysuccinimide, NHS; and 1 M ethanolamine hydrochloride, pH 8.5) were purchased from GE Healthcare (Pittsburgh, PA, USA).

2.2 BSA-CR binding followed by surface plasmon resonance (SPR)

Kinetic and thermodynamic parameters for the interactions between CR and BSA were obtained by SPR using a Biacore X100 instrument (GE Healthcare, Pittsburgh, PA, USA). Prior to use, BSA was immobilized (3721 RU) on a CM5 sensor chip, using a Biacore Amine Coupling Kit according to the manufacturer's instructions.

Basically, CM5 chips were activated for 7 min with EDC/NHS, after which the excess activated carboxyl groups were blocked with ethanolamine for 7 min. BSA was then immobilized on the chip ($15 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) in 10 mM sodium acetate, pH 4.0). BSA immobilization was performed at low levels (3721 RU) in order to reduce any potential mass transport and crowding artefacts. In experiments with immobilized BSA, one flow

cell was used as a reference surface; this surface was prepared as describe above, but without BSA immobilization ^[10].

The BSA-CR binding experiments were carried out at pH 7.4 at temperatures that ranged from 284 to 298 K. CR solutions at working concentrations (10 to 34 μM) were prepared in flowing buffer. In each binding experiment, the CR solution at the required concentration was injected in order to increase colorant concentration over both sample (immobilized BSA) and reference (without BSA) surfaces, in order to correct for systematic noise and instrument drift. Between each BSA-CR binding cycle, buffer was injected to determine the baseline.

All experiments were carried out in triplicate and the relative errors were between 1 and 3 %.

2.3 BSA-CR binding followed by fluorescence spectroscopy

In order to determine binding parameters, fluorescence spectroscopy was performed on a LS55 spectrofluorometer equipped with a thermostatic bath (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA).

A 2.5 mL sample of BSA solution (2.0 μM), in a 1.0 cm quartz cell, was titrated by successive additions of CR (0–7.69 μM). Fluorescence spectra were obtained over the 293 to 313 K temperature range, at wavelengths between 296 and 450 nm, excited at 295 nm.

In order to identify the binding site for CR on BSA, fluorometric competition experiments were conducted using warfarin, ibuprofen, and digitoxin, which are markers for binding sites I, II, and III of BSA, respectively ^[11]. The BSA fluorescence

quenching experiment followed the procedure described above, with the exception that a solution containing BSA and the marker (1:1 stoichiometry) was used instead of the BSA solution.

All experiments were performed in triplicate and the error associated with each determined parameter was between 1 and 3 %.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Kinetics and thermodynamics for BSA-CR binding determined by surface plasmon resonance (SPR)

For a better molecular understanding of how CR prevents protein aggregation, as observed, for example, in amyloidogenic proteins (making it a key inhibitor for the reduction of neurotoxicity in Alzheimer's disease), it is very important to know, in detail, the energetics and kinetics of CR-protein interactions ^[12]. A standard approach involves the study of CR interactions with a model protein, such as BSA, in order to obtain fundamental knowledge. Such insight is helpful for the development of novel applications of CR in biosystems.

To investigate binding processes using SPR, one of the binding partners (ligand) is fixed onto a surface and the other (analyte) is required to flow over this surface. In this study, BSA was immobilized at a low cover density on a CM5 sensor chip by amine coupling. After immobilization, CR solutions, at concentrations of 10–34 μM , were injected into sample cells and the resonance-response (RU) profiles as functions of time (referred to as “sensorgrams”) were recorded at five different

temperatures. Figure 2 depicts the kinetics results for CR (10–34 μM) binding to BSA immobilized at a low density (3721 RU) on the Biacore CM5 chip surface at 298.15 K.

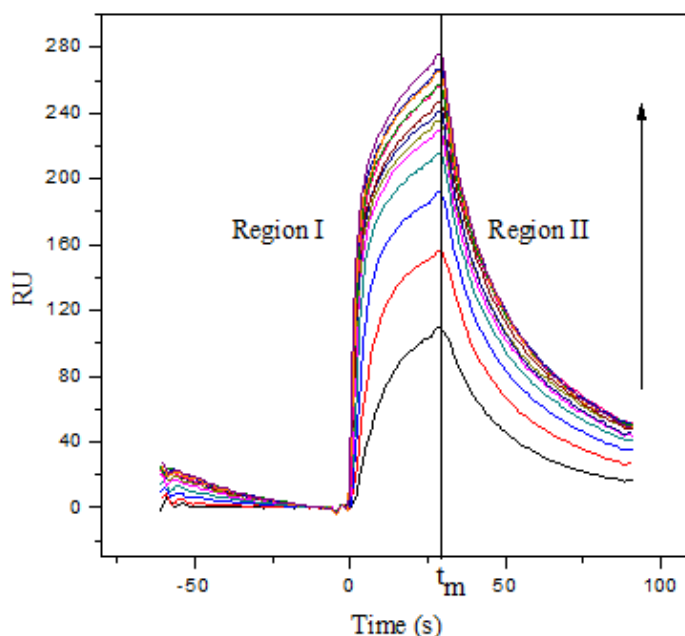


Figure 2. Sensograms (RU vs. Time) for BSA-CR 10 a 34 μM dye solutions flowing over a CM5 low-density BSA-immobilized sensor-chip surface (3721 RU) at 298,15 K. The arrows indicates increasing CR concentration.

A each CR concentration, the sensorgram indicates that RU increases during the association phase (region I) (from the time of injection, t_0), due to simultaneous CR binding and release on the immobilized BSA, with binding occurring at higher rates, eventually reaching a maximum experimental value at the resonance time (t_m). After t_m , the RU value was observed to decrease with increase time (returning to the baseline) due to dissociation (region II, breakage of the CR-BSA interaction) caused by the flow of the buffer over the immobilized BSA. Similar results were found for other temperatures (Figure S2).

The CR-BSA interaction can be considered to be a process described by the scheme: $CR + BSA \rightleftharpoons CR-BSA$, which is a monovalent binding model with forward (k_a) and reverse (k_d) rate constants. Using mass-transport limited analyses, all sensorgrams were fitted to Equations 1 and 2, from which k_{obs} and k_d were calculated, respectively.

$$RU(t) = RU_{max}[1 - e^{-k_{obs}(t-t_0)}] \quad (1)$$

$$RU(t) = RU(t) e^{-k_d(t-t_m)} \quad (2)$$

The observed rate constant, k_{obs} , was linearly dependent on CR concentration ($k_{obs} = k_a[CR] + k_d$), at least for low dye concentrations, allowing k_a to be calculated from the slope of the k_{obs} versus $[CR]$ curve (Figure S3).

Table 1 lists the kinetic parameters for the BSA-CR interaction determined at each temperature.

Table 1. Rate constants for the association (k_a) and dissociation (k_d) of CR-BSA.

Temperature (K)	k_a ($10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_d (s^{-1})
285.15	1.54	0.038
289.15	2.12	0.046
293.15	2.45	0.046
297.15	2.53	0.043
298.15	2.95	0.050
301.15	3.61	0.059

Despite CR molecules being very small in comparison to the biopolymer, values of k_a and k_d obtained for the CR-BSA interaction are in the ranges of those determined for protein-protein interactions ^[13].

Through Arrhenius plots (Figure 2), and by considering that the rate constants associated with CR-BSA interaction kinetics are several orders of magnitude lower than those of diffusion-controlled processes ^[14], thermodynamic parameters (Table 2) associated with possible intermediate complex formation (transition complex), which occurs during the association of free CR and BSA, or during the dissociation of the CR-BSA complex, were obtained.

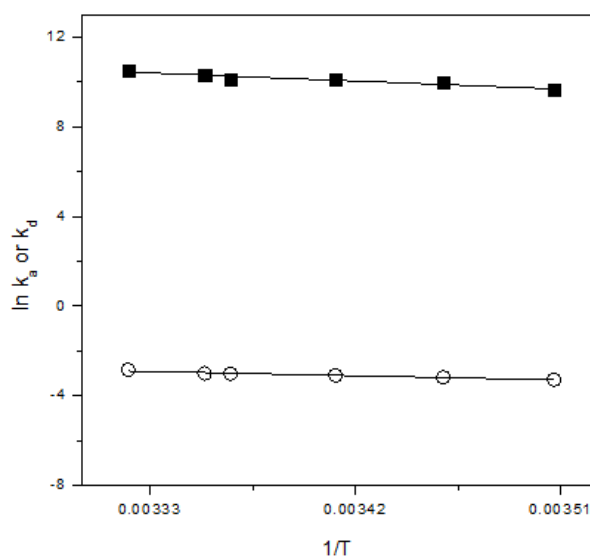


Figure 2. Arrhenius plots of (■) $\ln K_a$ and (○) $\ln K_d$ associated with CR-BSA interaction as functions of reciprocal temperature.

Table 2. Thermodynamic parameters for (a) the formation of the transition complex by CR and BSA association, and (d) dissociation of the CR-BSA complex.

Association phase (a)	Dissociation phase (d)
$E_{act(a)} = 35.88 \text{ kJ mol}^{-1}$	$E_{act(d)} = 20.17 \text{ kJ mol}^{-1}$
$\Delta H^\ddagger = 33.41 \text{ kJ mol}^{-1}$	$\Delta H^\ddagger = 17.69 \text{ kJ mol}^{-1}$
$\Delta S^\ddagger = 0.18 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$	$\Delta S^\ddagger = -162.86 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$
$\Delta G^\ddagger = 33.35 \text{ kJ mol}^{-1}$	$\Delta G^\ddagger = 66.25 \text{ kJ mol}^{-1}$

The linearities observed for the two Arrhenius plots are a good indication that the derived values of k_a and k_d accurately reflect the rate-limiting steps of the full CR-BSA binding mechanism, and that any unobservable faster processes do not contribute appreciably to the association and dissociation processes^[15]. Consequently, the interaction between CR and BSA can be considered to involve a single-step bimolecular process.

Based on the data in Table 2, the formation of the CR-BSA transition complex requires the absorption of a considerable amount of energy, as evidenced by an E_{act} of 35.88 kJ mol⁻¹ (from BSA and CR) or 20.17 kJ mol⁻¹ (from the BSA-CR complex); similar conclusions are drawn from the ΔH^\ddagger data that are both positive. These results potentially reveal a barrier against the initial CR-BSA interaction process, which is probably due to repulsive electrostatic interactions between the negative charges present on the CR and BSA molecules at pH 7.4. In addition, considering that the association step involves only a small entropic gain ($\Delta S^\ddagger = 0.18 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) we conclude that the chemical structure of the transition complex is not very different from that of the linked CR and BSA. We speculate that in the transition complex formed by the association of CR and BSA, the biopolymer structure or/and the desolvated interacting molecules undergo few conformational changes. The large enthalpic increase associated with the small entropic improvement resulting from the formation of the transition complex greatly enhances the Gibbs free energy. After its formation, the CR-BSA transition complex transforms into the final CR-BSA complex releasing some its absorbed enthalpy (17.69 kJ mol⁻¹). However, this interconversion results in a large increase in entropy (162.86 J mol⁻¹ K⁻¹), probably due to the increase in the degrees of freedom of water molecules, as well as possible biopolymer conformational changes.

Using the classic relationship, $K_b = k_a/k_d$, the binding constant for the BSA-CR complex was calculated (Table 3), and by applying Equations 3–5, ΔG^0 , ΔH^0 , and $T\Delta S^0$ (Table 3) were determined.

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_b \quad (3)$$

$$\ln \frac{K_{b2}}{K_{b1}} = -\frac{\Delta H^0}{R} \cdot \left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1} \right) \quad (4)$$

$$T\Delta S^0 = \Delta H^0 - \Delta G^0 \quad (5)$$

where ΔG^0 is the standard Gibbs free energy change ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), T is the temperature (K), R is the universal gas constant ($8.3145 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), ΔH^0 is the standard enthalpy change, and ΔS^0 is the standard entropy change.

Table 3. Standard changes in Gibbs free energy (ΔG^0), enthalpy (ΔH^0), and entropy ($T\Delta S^0$) for the formation of the BSA-CR complex at different temperatures (T) and pH

7.4. Data obtained from SPR measurements.

Temperature K	K_b 10^5 L mol^{-1}	ΔH^0	ΔG^0 kJmol^{-1}	$T\Delta S^0$
285.15	4.09	18.74	-30.52	49.26
289.15	4.60		-31.23	49.97
293.15	5.38		-32.05	50.78
297.15	5.82		-32.67	51.41
298.15	5.91		-32.82	51.56
301.15	6.13		-33.24	51.98

All calculated K_b values are of the order of 10^5 L mol^{-1} and increase with increasing temperature, indicating that the BSA-CR complex is more stable at higher temperatures. The thermodynamic parameters listed in Table 3 indicate that the

chemical equilibrium favors complex formation (negative ΔG° values) and is entropically driven (positive ΔH° and $T\Delta S^\circ$ values). As $\Delta H^\circ \cong \Delta H^\ddagger_{(\text{association})} - \Delta H^\ddagger_{(\text{dissociation})} = 15.72 \text{ kJ mol}^{-1}$, we suggest that the enthalpy change associated with transition complex formation, in both directions, will provide insight into the molecular interactions that determine the magnitude of ΔH° . The high contribution to ΔH° from $\Delta H^\ddagger_{(\text{association})}$, which is associated with a very small entropy gain, suggests that BSA and CR desolvation, or BSA conformational changes, do not contribute significantly to ΔH° , because both processes occur with large entropy changes. Therefore, the main (but not only) contribution to the positive ΔH° comes from direct BSA-CR repulsive electrostatic interactions that are associated with the small entropy increase. Another process that contributes to ΔH° is the dissociation of the transition complex, which occurs with a large entropy increase suggesting that as this complex changes, modifications to the solvation shell of the intermediate species or/and conformational changes increase the entropy of the system. In addition, since $T\Delta S^\circ$ and ΔH° are positive, it is possible to confirm that hydrophobic interactions contribute remarkably to the stability of the BSA-CR complex, indicating that CR probably interacts with the inner hydrophobic sites (I, II or III) of BSA.

Of course, in addition to hydrophobic interactions, hydrogen bonding, London-van der Waals forces, electrostatic repulsion, and π - π stacking interactions between benzene rings of CR and the aromatic amino acids of BSA also contribute to the overall BSA-CR interaction energy.

3.2 Thermodynamic binding parameters for BSA-CR complex formation determined by fluorescence spectroscopy

The fluorescence emitted by BSA is mainly due to the presence of two tryptophan (Trp) moieties, one located in the hydrophilic region (Trp 134), and the other in the hydrophobic region (Trp 212) [16,17]. If interactions between BSA and other molecules occur at sites near to these Trp units, the fluorescence emission of BSA will be quenched. In this way, fluorescence spectroscopy is a convenient technique for studying intermolecular interactions occurring near these amino acid residues. Figure 3a shows the dependence of the BSA fluorescence emission on CR concentration.

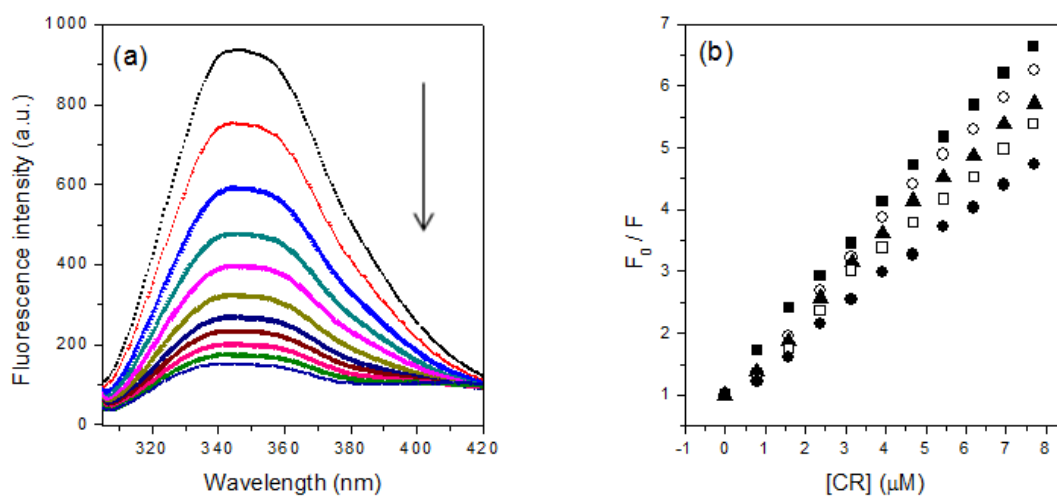


Figure 3. (a) Fluorescence spectra of bovine serum albumin (BSA) in the presence of increasing concentrations of Congo red (CR) at 298K. The arrow indicates CR concentrations ranging from 0 to 7.69 M. (b) Stern-Volmer plots of BSA fluorescence quenching due to BSA-CR binding at different temperatures. (■) 293K; (○) 298K; (▲) 303K; (□) 308K; and (●) 313K.

Fluorescence spectroscopy demonstrated that BSA fluorescence intensity decreases with increasing CR concentration. Furthermore, the maximum emission wavelength was blue-shifted by 6 nm with increasing CR concentration, indicating that the presence of BSA-CR increases the hydrophobicity of the Trp-containing region [18,19]. This BSA fluorescence quenching may be the result of collisions between the protein and CR, or the formation of a complex between the two species. To determine which extinction mechanism is correct, we applied the Stern-Volmer model (Figure 3b, Equation 6):

$$F_0/F = 1 + K_{SV}[Q] \quad (6),$$

where F_0 and F represent the fluorescence intensities of the protein alone and in the presence of a quencher, respectively, K_{SV} is the Stern-Volmer constant, and $[Q]$ is the quencher concentration, in this case [CR]. $K_{SV} = K_q\tau_0$, where K_q is the biomolecular quenching rate constant and τ_0 is the lifetime of fluorophore (3×10^{-9} s) [20].

The K_{SV} values were observed to decrease with increasing temperature (Table 4); and the value of K_q was determined to be of the order of 10^{14} L mol⁻¹ s⁻¹, which is substantially greater than that expected for a biomolecular rate constant (10^{10} mol⁻¹ s⁻¹). These results, along with the blue shift observed in the BSA spectra, clearly indicate that the fluorescence quenching of BSA is caused by BSA-CR complex formation.

Table 4. Stern-Volmer constants (K_{SV}), binding constants (K_{b-F}), stoichiometries (n), standard Gibbs free energy changes (ΔG°_F), standard enthalpy changes (ΔH°_F), and standard entropy changes ($T\Delta S^\circ_F$) during BSA-CR complex formation at different temperatures (T) and pH 7.4. Data obtained from fluorescence measurements.

T (K)	$K_{SV}^{(a)}$	r^2	$K_{b-F}^{(b)}$	n	r^2	$\Delta G^\circ_F^{(c)}$	$\Delta H^\circ_F^{(c)}$	r^2	$T\Delta S^\circ_F^{(c)}$
293	7.52 ± 0.25	0.99	86.3 ± 0.45	1.4	0.99	-44.4 ± 1.7			-47.3 ± 1.9
298	6.94 ± 0.24	0.99	3.70 ± 0.22	1.27	0.99	-41.3 ± 1.9			-50.4 ± 1.8
303	6.53 ± 0.29	0.99	2.09 ± 0.27	1.23	0.99	-40.5 ± 1.9	-91.7 ± 3.7	0.99	-51.1 ± 1.8
308	5.89 ± 0.26	0.99	1.06 ± 0.23	1.15	0.98	-38.8 ± 2.6			-52.9 ± 1.0
313	4.66 ± 0.24	0.99	1.00 ± 0.25	1.05	0.99	-35.7 ± 2.5			-56.0 ± 1.7

Superscripts indicate the units for each parameter: ^(a) 10^5 L mol⁻¹, ^(b) 10^7 L mol⁻¹, and ^(c) kJ mol⁻¹.

Since the Stern-Volmer model confirmed that the fluorescence-quenching mechanism was static and involved BSA-CR complex formation, we calculated the binding constant (K_b) and the stoichiometry (n) of the BSA-CR complex, using Equation 7 (Table 4).

$$\log\left(\frac{F_0-F}{F}\right) = \log K_b + n \log[Q] \quad (7)$$

The K_b values determined by fluorescence (K_{b-F}) ranged from 8.63×10^8 to 1.00×10^7 L mol⁻¹ between 293.15 and 313.15 K, indicating that the interaction between CR and BSA is strong and that the BSA-CR complex is stable at the lower temperatures in this range.

The stoichiometry for BSA-CR complex formation was about one, indicating that there is a BSA binding site for CR. To verify the preferred protein site for

interaction with the dye, competition experiments were performed using warfarin, ibuprofen, and digitoxin at 298.15 K. Warfarin is known to interact at BSA site I, while ibuprofen binds at site II, and digitoxin at another non-specific site [21,22] .

At 298.15 K, K_{b-F} decreased from 3.70×10^7 to 4.68×10^5 L mol⁻¹ in the presence of warfarin, which corresponds to 98.4% reduction, while in the presence of ibuprofen and digitoxin, K_{b-F} values were 1.77×10^6 and 1.77×10^6 L.mol⁻¹, which correspond to 77% and 80% reductions, respectively. These results indicate that CR preferentially competes with warfarin in its binding to BSA [22,23]; however, the strong decreases in K_{b-F} observed when ibuprofen and digitoxin were present suggest that BSA-CR binding occurs in regions close to the ibuprofen and digitoxin binding sites.

Site I has been described as a large hydrophobic cavity that is present in subdomain IIA of BSA, which typically binds to hydrophobic, bulky, heterocyclic, and negatively charged ligands [11]. Site II, located in subdomain IIIA, is similar to the former, the main difference being the packing environment, which enables site I to be larger and more flexible than site II [24]. Site III (the digitoxin site) is also located in subdomain IIIA and is known to be independent to sites I and II (He & Carter, 1992). In addition to binding digitoxin, it is also responsible for interacting with bile acids and cardenolides [26], which are all hydrophobic molecules.

Since CR (Figure S1) contains six aromatic rings, which imparts high hydrophobicity, it also possesses two sulfonic acid groups that can ionize to form anions (CR pK_a = 4.1; at pH 7.4, CR is negatively charged [27]); these characteristics explains why CR can bind to BSA at sites I, II or III.

Dyes interact with proteins like BSA through H-bonding, electrostatic, van der Waals, and/or hydrophobic forces [23,28,29]. In order to gain information about the main forces involved in BSA-RC binding, the thermodynamic parameters for the formation

of the BSA-CR complex (standard Gibbs free energy change (ΔG°), standard enthalpy change (ΔH°), and standard entropy change ($T\Delta S^\circ$)) were calculated using Equations 3–5, the results of which are displayed in Table 4.

The ΔG° values obtained through fluorescence (ΔG°_F) are negative indicating that the equilibrium favors complex formation. However, these values become less negative with increasing temperature, indicating that the BSA-CR complex is more stable at lower temperatures. Analyzing the enthalpic and entropic terms calculated from the fluorescence studies (ΔH°_F and $T\Delta S^\circ_F$, respectively), BSA-CR complex formation is observed to be enthalpically driven with strong energy release ($-91.7 \text{ kJ mol}^{-1}$) and unfavorable entropy. This released energy is larger than most values found for BSA interaction with small dyes [23,28], suggesting that in addition to hydrogen bonding and London-van der Waals forces, there are π - π stacking interactions between the CR benzene rings and the aromatic amino acids present at the BSA binding sites, such as Trp, tyrosine (Tyr), phenylalanine (Phe), and histidine (His) [30].

In order to conciliate the SPR and fluorometric results, an explanation for the differences in the thermodynamic parameters obtained by both techniques is required. Both SPR and fluorescence techniques indicate that when CR interacts with BSA the Gibbs free energy of the system decreases by similar amounts ($\Delta G^\circ_F = -41.3 \text{ kJ.mol}^{-1}$ and $\Delta G^\circ_{SPR} = -31.23 \text{ kJ.mol}^{-1}$), with a stoichiometry of one CR molecule for each BSA site. However, fluorescence measurements indicate that this interaction is exothermic, while SPR indicates that it is endothermic. As is well known, fluorescence spectroscopy can only detect interactions that occur in sites close to tryptophan residues, while SPR detects interactions that occur in all BSA sites. Consequently, the ΔH° , ΔS° , and ΔG° , values obtained by SPR are values that represent the summation of interaction that occur at different sites; i.e., sites with different K_b , ΔH° , and ΔS° values.

4 CONCLUSIONS

Surface plasmon resonance and fluorescence spectroscopy results demonstrate that Congo red interacts with bovine serum albumin, forming a highly stable complex (ΔG° around $-35.00 \text{ kJ mol}^{-1}$). Due to differences between the thermodynamic parameters obtained by these distinct experimental techniques, we suggest that the CR-BSA interaction is multi-site. Our results reveal discrepancies between ΔH° determined by SPR or fluorescence techniques, which is probably the result of multi-site interactions as well the use of the van't Hoff approximation in the SPR and fluorescence methods. Rate-constant dependences on temperature fitted to the Arrhenius equation provided thermodynamic parameters for the formation of the CR/BSA transition complex, and for the dissociation of the CR-BSA complex. These results provide a better understanding of protein-CR interactions; knowledge that is useful when planning new therapeutic applications of CR.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

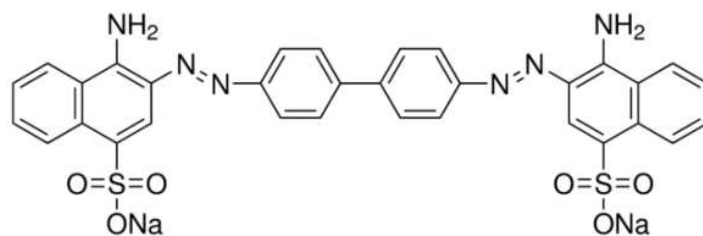
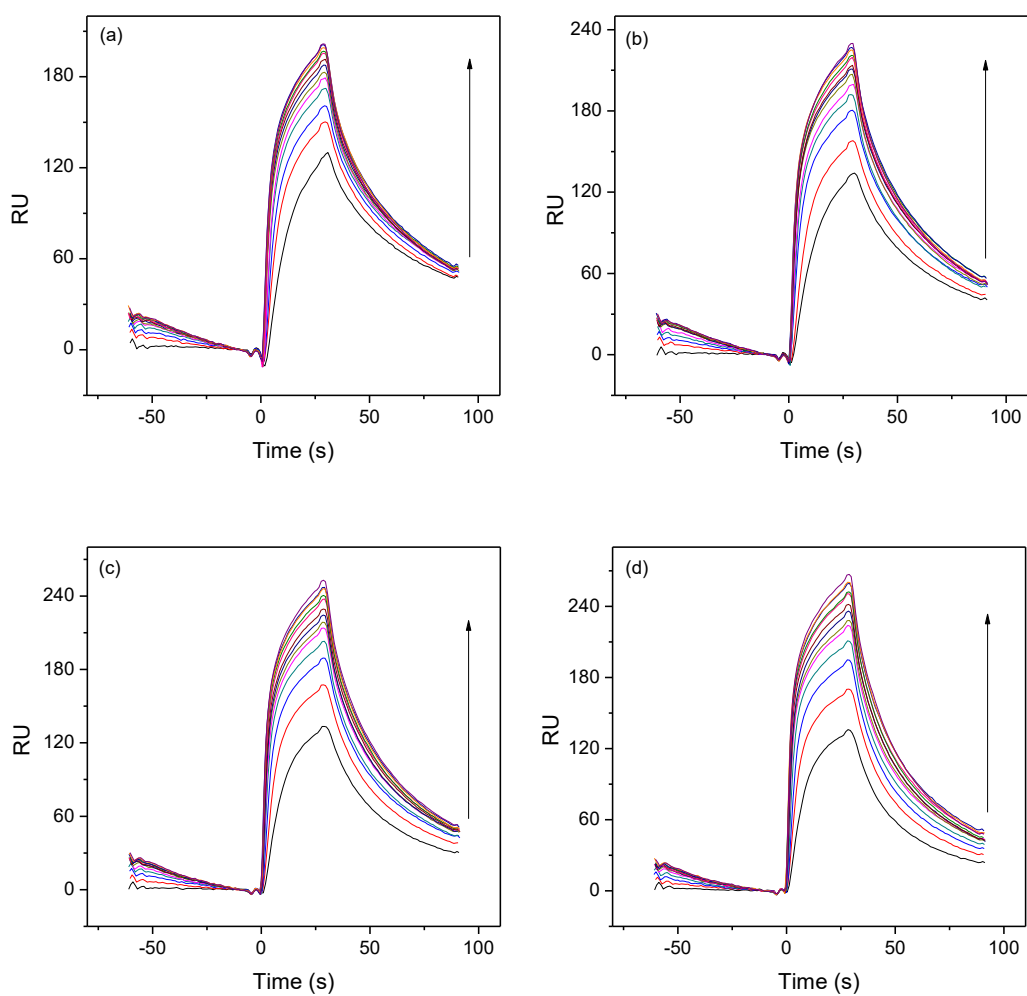


Figure S1. Chemical structure of Congo Red.



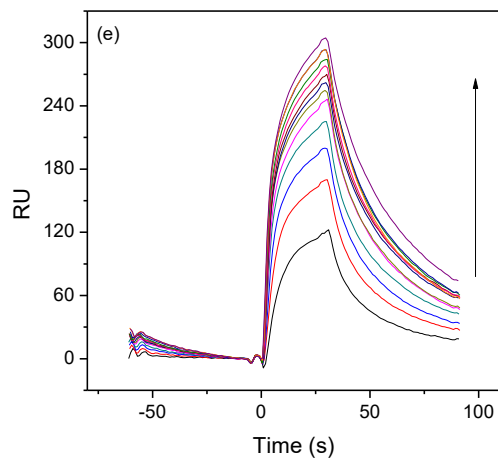


Figure S2. Sensorgrams at temperatures: (a) 285.15 K, (b) 289.15 K, (c) 293.15 K, (d) 297.15 K, (e) 301.15 K. The arrows indicate increasing concentrations of Congo red.

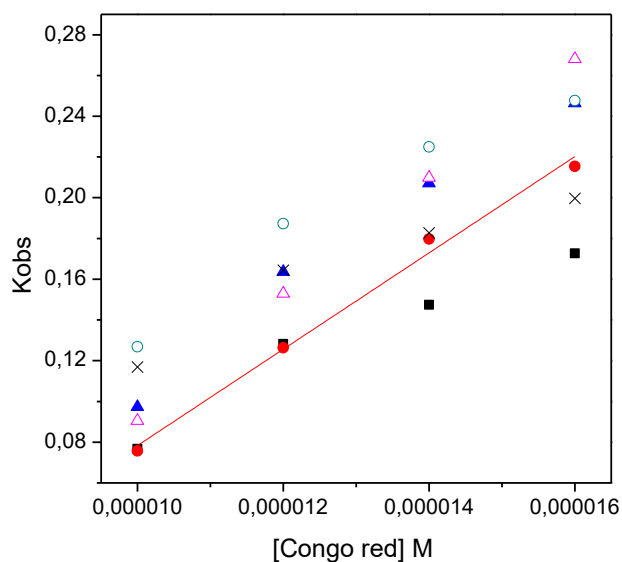


Figure S3. Plot of K_{obs} as a function of Congo red concentration, used to determine K_a at temperatures: (■) 285.15 K, (■) 289.15 K, (▲) 293.15 K, (○) 297.15 K, (△) and (X) 301.15 K.

ACKNOWLEDGMENTS

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

5 REFERENCES

- [1] J. Sereikaite, V.A. Bumelis, Congo red interaction with α -proteins, *Acta Biochim. Pol.*, 53 (2006) 87–91.
- [2] Y. Zhang, X. Xiang, P. Mei, J. Dai, L. Zhang, Y. Liu, Spectroscopic studies on the interaction of Congo Red with bovine serum albumin, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 72 (2009) 907–914.
- [3] O.I. Antimonova, N.A. Grudinina, V. V Egorov, D.S. Polyakov, Interaction of the Dye Congo Red with Fibrils of Lysozyme , Beta2-Microglobulin , and Transthyretin, *Cell Tissue Biol.*, 10 (2016) 468–475.
- [4] A.K. Buell, C.M. Dobson, T.P.J. Knowles, M.E. Welland, Interactions between Amyloidophilic Dyes and Their Relevance to Studies of Amyloid Inhibitors, *Biophys. J.*, 99 (2010) 3492–3497.
- [5] A.S. Abdelhameed, A.M. Alanazi, A.H. Bakheit, H.W. Darwish, H.A. Ghabbour, I.A. Darwish, Fluorescence spectroscopic and molecular docking studies of the binding interaction between the new anaplastic lymphoma kinase inhibitor crizotinib and bovine serum albumin, *Spectrochim. Acta Part A*, 171 (2017) 174–182.
- [6] B. Yang, F. Hao, J. Li, K. Wei, W. Wang, R. Liu, Characterization of the binding of chrysoidine, an illegal food additive to bovine serum albumin, *Food Chem. Toxicol.*, 65 (2014) 227–32.
- [7] J. Rybarska, B. Piekarska, B. Stopa, P. Spólnik, G. Zemanek, L. Konieczny, I. Roterman, In vivo accumulation of self-assembling dye Congo red in an area marked by specific immune complexes : possible relevance to chemotherapy,

- Folia Histochem. Cytobiol., 42 (2004) 101–110.
- [8] S. Santini, A.R. Bizzarri, T. Yamada, C.W. Beattie, S. Cannistraro, Binding of azurin to cytochrome c 551 as investigated by surface plasmon resonance and fluorescence, *J. Mol. Recognit.*, 27 (2014) 124–130.
- [9] Y.S.N. Day, C.L. Baird, R.L. Rich, D.G. Myszka, Direct comparison of binding equilibrium, thermodynamic, and rate constants determined by surface- and solution-based biophysical methods, *Protein Sci.*, 11 (2002) 1017–1025.
- [10] A.W. Drake, M.L. Tang, G.A. Papalia, G. Landes, M. Haak-frendscho, S.L. Klakamp, Biacore surface matrix effects on the binding kinetics and affinity of an antigen/antibody complex, *Anal. Biochem.*, 429 (2012) 58–69.
- [11] I. Goncharova, S. Orlov, M. Urbanová, The location of the high- and low-affinity bilirubin-binding sites on serum albumin: ligand-competition analysis investigated by circular dichroism, *Biophys. Chem.*, 180–181 (2013) 55–65.
- [12] K. Yokoyama, A.D. Fisher, A.R. Amori, D.R. Welchons, R.E. Mcknight, Spectroscopic and calorimetric studies of congo red dye-amyloid B peptide complexes, *J. Biophys. Chem.*, 1 (2010) 153–163.
- [13] P.L. Kastritis, A.M.J.J. Bonvin, On the binding affinity of macromolecular interactions: daring to ask why proteins interact, *J. R. Soc. Interface*, 10 (2012) 20120835–20120835.
- [14] I.W.M. Smith, The temperature-dependence of elementary reaction rates: beyond Arrhenius, *Chem. Soc. Rev.*, 37 (2008) 812–826.
- [15] G.A. Petersson, Perspective on “The activated complex in chemical reactions,” *Theor. Chem. Acc.*, 103 (2000) 190–195.
- [16] J. Lin, Y. Liu, M. Chen, H. Huang, L. Song, Investigation on the binding activities of citalopram with human and bovine serum albumins, *J. Lumin.*, 146 (2014)

114–122.

- [17] P. Bourassa, I. Hasni, H.A. Tajmir-Riahi, Folic acid complexes with human and bovine serum albumins, *Food Chem.*, 129 (2011) 1148–1155.
- [18] S. Ravikumar, T.V.M. Sreekanth, I.-Y. Eom, Interaction studies of greenly synthesized gold nanoparticles with Bovine Serum Albumin (BSA) using fluorescence spectroscopy, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 15 (2015) 9617–9623.
- [19] K. Ghosh, S. Rathi, D. Arora, Fluorescence spectral studies on interaction of fluorescent probes with Bovine Serum Albumin (BSA), *J. Lumin.*, (2016).
- [20] I.J. Arroyo-Maya, J. Campos-Terán, A. Hernández-Arana, D.J. McClements, Characterization of flavonoid-protein interactions using fluorescence spectroscopy: Binding of pelargonidin to dairy proteins, *Food Chem.*, 213 (2016) 431–439.
- [21] A. Bose, Interaction of tea polyphenols with serum albumins: A fluorescence spectroscopic analysis, *J. Lumin.*, 169 (2016) 220–226.
- [22] C.A. Lelis, E.A. Hudson, G.M.D. Ferreira, G.M.D. Ferreira, L.H.M. da Silva, M. do C.H. da Silva, M.S. Pinto, A.C. dos S. Pires, Binding thermodynamics of synthetic dye Allura Red with bovine serum albumin, *Food Chem.*, 217 (2017) 52–58.
- [23] T. Li, Z. Cheng, L. Cao, X. Jiang, Comparison of interactions between three food colorants and BSA, *Food Chem.*, 194 (2016) 740–748.
- [24] A. Sivertsen, J. Isaksson, H.-K.S. Leiros, J. Svenson, J.-S. Svendsen, B.O. Brandsdal, Synthetic cationic antimicrobial peptides bind with their hydrophobic parts to drug site II of human serum albumin, *BMC Struct. Biol.*, 14 (2014) 4.
- [25] X.M. He, D.C. Carter, Atomic structure and chemistry of human serum albumin, *Nature*, 358 (1992) 209–215.

- [26] F. Zsila, Circular dichroism spectroscopic detection of ligand binding induced subdomain IB specific structural adjustment of human serum albumin, *J. Phys. Chem. B*, 117 (2013) 10798–10806.
- [27] Z. Yaneva, N. Georgieva, Insights into Congo Red Adsorption on Agro-Industrial Materials - Spectral, Equilibrium, Kinetic, Thermodynamic, Dynamic and Desorption Studies A Review, *Int. Rev. Chem. Eng.*, 4 (2012) 127–146.
- [28] N. Shahabadi, M. Maghsudi, S. Rouhani, Study on the interaction of food colourant quinoline yellow with bovine serum albumin by spectroscopic techniques, *Food Chem.*, 135 (2012) 1836–41.
- [29] J. He, S. Li, K. Xu, B. Tang, H. Yang, Q. Wang, H. Li, Binding properties of the natural red dye carthamin with human serum albumin: Surface plasmon resonance, isothermal titration microcalorimetry, and molecular docking analysis, *Food Chem.*, 221 (2017) 650–656.
- [30] F.B. Akher, A. Ebrahimi, N. Mostafavi, Characterization of π -stacking interactions between aromatic amino acids and quercetin, *J. Mol. Struct.*, 1128 (2017) 13–20.