



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**HIDRÓLISE ÁCIDA DE ACETAIS EM MISTURAS FORMADAS POR ALBUMINA DO SORO
BOVINO E DODECILSULFATO DE SÓDIO (SDS) E POLI(OXIETILENO) E SDS: MEDIDAS DOS
PARÂMETROS DE LIGAÇÃO POR TENSÃO SUPERFICIAL, CONDUTIVIDADE ELÉTRICA E
ESPALHAMENTO DE RAIOS-X A BAIXO ÂNGULO**

Sônia de F. Santos

TESE DE DOUTORADO

Orientador: Prof. Dr. Dino Zanette

Florianópolis/SC, Maio de 2001.

“Hidrólise ácida de aceitais em misturas formadas por albumina do soro bovino e dodecilsulfato de sódio (sds) e poli(oxietileno)e sds: medidas dos parâmetros de ligação por tensão superficial, condutividade elétrica e espalhamento de raio-x a baixo ângulo”

SÔNIA DE FÁTIMA SANTOS

ESTA TESE FOI JULGADA E APROVADA NA SUA FORMA FINAL PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM QUÍMICA PELO ORIENTADOR E MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Dino Zanette

Orientador

Prof. Dr. Valdir Soldi

Coordenador

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Rosângela Itri

Universidade de São Paulo - Instituto de física/USP

Prof. Dr João Pedro Simon Farah

Universidade de São Paulo - Instituto de Química/USP

Prof^a. Dr^a. Maria da Graça do Nascimento

Universidade Federal de Santa Catarina- UFSC

Prof. Dr. Valdir Soldi

Universidade Federal de Santa Catarina- UFSC

Prof. Dr. Nito Ângelo Debacher

Universidade Federal de Santa Catarina- UFSC

Prof. Dr. Dino Zanette

Universidade Federal de Santa Catarina- UFSC

DEDICATÓRIA

*Especialmente aos meus pais,
Maurício Gonçalves dos Santos & Maria de Lourdes Santos,
pelo carinhoso e imensurável apoio.*

AGRADECIMENTOS

“No que se refere às cousas sacrificadas a ídolos, reconhecemos que todos somos senhores do saber. O saber ensorbece, mas o amor edifica. Se alguém julga saber alguma coisa, com efeito, não aprendeu ainda como convém saber.” I Coríntios 8:1-2

Sou grata primeiramente ao Senhor Jesus que permitiu que tudo isso fosse possível, desde o ar que respiro até as mais instigantes interações entre proteínas e anfifílicos.

Gostaria de agradecer ao prof. Dr. Dino Zanette pela orientação durante estes anos de convívio, pelos conhecimentos transmitidos e feitura deste trabalho.

Quero expressar minha gratidão a todos os professores do Departamento de Química pelos conhecimentos adquiridos e amizade. Agradeço também aos colegas do 303 e 305 pelo auxílio e companheirismo e aos demais colegas do curso de graduação e pós-graduação.

Gostaria de agradecer a participação de todas as alunas de IC, que tive a oportunidade de orientar, em especial à Patrícia de Carvalho Huttl por sua dedicação, colaboração e amizade.

Um agradecimento especial a Tânia e Selma, Jacir e Graça pela amizade e serviços prestados.

Agradeço a professora Rosângela Itri, do Departamento de Física Aplicada do Instituto de Física da USP, pela colaboração e ao Laboratório Nacional de Luz Síncroton (LNLS) -Campinas/ SP.

Aos membros da banca examinadora pelas sugestões.

Um agradecimento carinhoso aqueles queridos e inefáveis amigos que sempre me apoiaram e nos meus afãs me aconselharam com amor.

Um agradecimento especial à toda minha família (Gonçalves dos Santos e Ribeiro da Silva) que sempre se mostraram ávidos ao meu trabalho, me incentivando, apoiando e confiando.

À CAPES e CNPq pelo suporte financeiro.

ÍNDICE GERAL

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO		1
1.	Proteínas	1
1.1.	Albumina do soro bovino (BSA)	1
1.1.1.	Conformação e composição de aminoácidos da BSA	4
1.1.2.	Flexibilidade conformacional: efeito do pH e temperatura	9
2.	Micelização	10
2.1.	Associação de surfatantes: micelas	10
2.2.	Estrutura da micela	12
2.3.	Reações em meio micelar	14
3.	Proteínas em solução e em interfaces	17
3.1.	Relevância da associação: aplicações	17
3.1.1.	Interação da albumina do soro bovino com surfatantes	19
3.1.2.	Por que moléculas de proteínas interagem? Quais as forças envolvidas neste processo?	20
3.1.3.	Termodinâmica de ligação	21
3.2.	Evidências da formação de complexos	24
3.2.1.	Tensão superficial	24
3.2.2.	Condutividade elétrica	27
3.2.3.	Catálise micelar	29
3.2.4.	Modelos propostos para os complexos formados por proteínas e surfatantes	33
3.2.5.	Espalhamento de raio-X a baixo ângulo (SAXS)	36
3.2.5.1.	Sistemas não integrantes: função de distribuição de distância $p(r)$	36
3.2.5.2.	Espalhamento de proteínas em solução a partir das coordenadas atômicas	39
3.2.5.3.	Complexo proteína/surfatante: o modelo do “colar de pérolas”	39
3.2.5.4.	Forma da curva de espalhamento para polímeros naturais	42
4.	OBJETIVOS	44

CAPÍTULO 2 – PARTE EXPERIMENTAL		45
2.1.	Materiais	45
2.2.	Métodos	45
2.2.1.	Preparação dos substratos	45
2.2.2.	Preparação das soluções	46
2.2.3.	Tensão superficial	46
2.2.4.	Condutividade elétrica	47
2.2.5.	Medidas cinéticas	49
2.2.6.	Determinação do pHaparente (pHap)	49
2.2.7.	Medidas de fluorescência: determinação do número de agregação	50
2.2.8.	Medidas de espalhamento de raio-X a baixo ângulo (SAXS) – Laboratório Nacional de Luz Síncrotron-Brasil	59
CAPÍTULO 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO		52
3.1.	Hidrólise do 2-ND em presença de SDS	53
3.2.	Estimativa da constante de ligação do 2-ND	57
3.2.1.	Considerações sobre o valor de K_S estimado	60
3.3.	Hidrólise de acetais	61
3.3.1.	Hidrólise ácida do di-terc-butilbenzaldeído (BTBA)	61
3.4.	Hidrólise ácida do 2-naftaleno-1,3-dioxolano (2-ND) na presença de BSA	68
3.5.	Significado dos perfis cinéticos k_{obs} vs [SDS]	72
3.6.	Evidências cinéticas em domínios diluídos de SDS	74
3.7.	Sistemas PEO-SDS versus BSA-SDS na <i>cac</i>	84
3.8.	Hidrólise ácida do 2-ND sob contexto dos perfis de condutividade elétrica e tensão superficial no intervalo de [SDS] <i>cac-psp</i>	85
3.9.	Perfis de condutividade elétrica e tensão superficial vs. cinéticos	86
3.10.	O aspecto linearidade na faixa <i>cac-psp</i> em perfis de condutividade	86

3.11.	O significado do primeiro platô nas curvas de tensão superficial	87
3.12.	Efeito salino sobre c_{ac} e c_f	89
3.13.	Uma interpretação do intervalo c_f - p_{sp}	93
3.14.	Grau de ionização a partir dos gráficos de condutividade elétrica	94
3.14.1.	Grau de ionização para complexos PEO-SDS	94
3.14.2.	Grau de ionização para complexos BSA-SDS	96
3.15.	Tamanho dos complexos BSA/SDS	98
3.16.	Efeito da [BSA] e de [PEO] sobre o pH aparente (pH_{ap}) do PADA	103
3.17.	Sistema BSA/SDS e PEO/SDS no p_{sp}	110
3.18.	Espalhamento de raio-X a baixo ângulo (SAXS)	112
3.18.1.	Espalhamento de raios-X a baixo ângulo para soluções de BSA/SDS	112
3.18.2.	Ajuste das curvas para o sistema BSA/SDS	115
3.18.3.	Ajuste das curvas para o sistema PEO/SDS	122
3.19.	Uma nova interpretação sobre a saturação da proteína por surfatante	124
4.	CONCLUSÕES	126
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	128
6.	APÊNDICES	138

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-	Sequência de alguns aminoácidos para formar um tetrapeptídeo	1
Figura 2-	Representação de uma membrana plasmática formada por uma bicamada lipídica	2
Figura 3-	Ilustração dos “loops”, numerados de 1 a 9, da estrutura primária da albumina do soro bovino, e também os três domínios (I,II,III)	6
Figura 4-	Modelo estrutural proposto para a albumina do soro bovino através de estudos de espalhamento por raio-X a baixo ângulo	8
Figura 5-	Processo de Micelização do Surfatante	11
Figura 6-	Estrutura da micela proposto por Gruen	13
Figura 7-	Representação esquemática de uma isoterma de ligação de proteína/surfatante	23
Figura 8-	Variação da tensão superficial em função da [surfatante] na ausência e presença de polímero ou proteína	26
Figura 9-	Condutividade elétrica em função da [SDS] na presença de polímero	28
Figura 10-	Efeito da adição de SDS sobre a constante de velocidade para a reação de hidrólise ácida do 2-(p-nanoxifenil)-1,3-dioxolano na ausência e presença de PEO	32
Figura 11-	Representação esquemática de modelos estruturais de complexo formado por proteína/surfatante.	34
Figura 12-	Representação esquemática de modelo proposto por Turro para complexo Formado por proteína/surfatante	35
Figura 13-	A função de distribuição de distância $p(r)$	38
Figura 14-	(a) Modelo micelar mostrando os parâmetros do ajuste v , σ e ρ_{pol} (b) Modelo para uma micela elipsoidal	40
Figura 15-	(a) Curva de Intensidade de espalhamento (I) versus o ângulo de espalhamento (2θ) para solução polimérica (b) Curva de $I(2\theta)^2$ versus 2θ fornecendo o “Tamanho de persistência P”	43
Figura 16-	Gráfico da tensão superficial versus concentração de SDS em 20 mM de tampão succinato de sódio, pH=5,6 medido a temperatura ambiente	48

Figura 17-	Gráfico da condutividade elétrica de uma solução de SDS em 20 mM de tampão succinato de sódio, pH=5,4, à 25,0 °C	48
Figura 18-	Estação experimental de SAXS do LNLS	51
Figura 19-	Gráfico da constante de velocidade observada (k_{obs}) versus [SDS] na reação de hidrólise ácida do 2-ND em tampão succinato, pH=5,40 à 30,0 °C.	55
Figura 20-	Valores da constante de velocidade observada (k_{obs}) vs. [SDS] para a reação de hidrólise do BTBA, em 20 mM de succinato de sódio, pH=6,00 na presença de 0,025 (●) e 0,1% (■) de BSA. Os valores representados por (○) foram obtidos em 100 mM (0,4%) de PEO.	62
Figura 21-	Efeito da concentração de SDS na velocidade observada (k_{obs}) para a reação de Hidrólise do BTBA, em 20 mM de succinato de sódio, pH=6,00, a 25°C.	62
Figura 22-	Efeito da concentração de BSA sobre k_{obs} para a reação de hidrólise do BTBA, em 20 mM de tampão succinato, pH=6,00, na presença de (A) 4,0 mM e (B) 20 mM de SDS, a 25 °C.	63
Figura 23-	Efeito da [SDS] sobre a constante de velocidade observada (k_{obs}) para a reação de hidrólise do acetal 2-ND, em 20 mM de tampão succinato pH=5,40, na ausência (●) e presença de (○) 0,2%, (■) 0,8% e (□) 1,0% de BSA à 30,0 °C. A Figura inserida representa a reação em 0,2% de BSA em regime de diluição.	66
Figura 24-	(A) Efeito da concentração de BSA sobre k_{obs} para a reação de hidrólise do 2-ND, em (●) 7,0, (■) 45, e (□) 80 mM de SDS. (B) Efeito da adição de PEO para a mesma reação em (○) 10, (▲) 45 e (□) 80 mM de SDS.	67
Figura 25-	Valores de k_{OBS} vs. [SDS] para a reação de hidrólise do 2-ND na ausência de BSA (□), e em 0,2 (▲), 0,5 (○) e (■) 1,0% de BSA. Em 20 mM de succinato de sódio, pH=4,00 a T=30,0 °C.	69
Figura 26-	Valores de k_{OBS} vs. [SDS] para a reação de hidrólise do 2-ND em (▲) 0,2, (○) 0,5 e (■) 1,0% de BSA. Em 20 mM de succinato de sódio, pH=4,70 a T=30,0 °C.	69
Figura 27-	Valores de k_{OBS} vs. [SDS] para a reação de hidrólise do 2-ND em 1,0% de BSA, nas condições experimentais de 20 mM de succinato de sódio, em pH 4,00; 4,70 e 5,40 a T=30,0 °C.	70

Figura 28-	Valores de k_{OBS} vs. [SDS] para a reação de hidrólise do 2-ND em 1,0% de (○) BSA e (●) 1,0 % de PEO em (A) pH=4,00 e (B) pH=4,70, em 20 mM de succinato de sódio a T=30,0 °C.	71
Figura 29-	(A) Tensão superficial versus [SDS] na presença das seguintes concentrações de BSA: (■) ausência, (○) 0,1%, (▲) 0,5% e (□) 0,9%. A Figura (B) o valor obtido em 1,0% de albumina, em tampão succinato de sódio pH= 5,4, a 25°C.	76
Figura 30-	(A) Curvas de condutividade elétrica vs. [SDS] em 20 mM de tampão succinato pH=5,40, na presença de 0,1 e 1,0% de BSA. (B) Gráfico ampliado da figura (A) para enfatizar as regiões de baixas concentrações de SDS.	79
Figura 31-	Curvas de condutividade elétrica vs. [SDS] (em escala relativa) na presença das seguintes concentrações: 0,2 e 0,8% de PEO. Todas as experiências foram feitas em 20 mM de tampão succinato de sódio, pH=5,40 a 25,0 °C.	80
Figura 32-	Efeito da concentração de BSA na cac obtidos por (■) condutividade e (▲) tensão superficial e α (●) obtida também por condutividade em 20 mM de tampão succinato pH=5,40, a 25,0 °C. A figura inserida representa os valores de cac para o sistema em PEO.	83
Figura 33-	(A) Curvas de condutividade vs. [SDS], para solução de 1% de BSA a 25,0 °C na presença de 10, 30 e 50 mM de NaCl, definidas de baixo para cima, respectivamente. (B) Representa a ampliação de (A) em 10 mM de sal e a figura inserida 10 mM de NaCl.	91
Figura 34-	Log da cac vs. log da concentração total de contra-íons nos seguintes pontos de inflexão: (■) cac e (●) α .	92
Figura 35-	Modelo sugerido para as eventuais etapas de ligação do surfatante na cadeia macromolecular da proteína.	93
Figura 36-	(A) Gráficos de $\ln(I_0/I)$ vs. concentração do supressor em 12,3; 22,3; 32,3, 52,3, 82,3 e 110,3 mM de SDS, definidas no gráfico de cima para baixo. (B) Número de agregação vs. [SDS] em 1,0% de BSA, 20 mM de succinato de sódio, pH=5,40 a 30,0 °C.	99

Figura 37-	Efeito da concentração de (A) BSA e (B) PEO sobre o espectro de absorção da PADA em 30 mM de SDS e 20 mM de tampão succinato, pH=5,40 à 30,0 °C. As concentrações utilizadas de BSA e PEO variaram de 0,2 – 1,0%.	104
Figura 38-	(A) Efeito da concentração de BSA nos valores de pH _{app} na (●) ausência de e em (■) 7 e (▲) 15 mM SDS. (B) Mostra a variação do pH _{app} para o sistema contendo PEO na ausência (○) e em (□) 7 e (Δ) 25 mM SDS, em 20 mM de tampão succinato, pH=5,40 a 30,0° C.	106
Figura 39-	(A) Efeito da adição de SDS na determinação dos valores do pH _{app} , em 20 mM De succinato de sódio, pH=5,40, na presença de (○) 1,0 e (●) 0,5% de BSA, a 30°C. A Figura inserida mostra os valores de pH _{app} para o SDS. (B) Mostra os valores para o sistema PEO/SDS.	107
Figura 40-	Esquema de uma seção parcial da região próxima da interface de agregados micelares e BSA/SDS e/ou PEO/SDS. A figura mostra a pseudofase micelar e aquosa separada pela camada de Stern.	109
Figura 41-	Mudanças no <i>psp</i> com a concentração de polímero: (●) BSA e (○) PEO em solução contendo SDS e 20 mM de tampão succinato, pH=5,40. A figura foi construída com os dados da tabela 5.	111
Figura 42-	Curvas de espalhamento de raios-X a baixos ângulos em (a) 10, (b) 30 e (c) 50 mM de SDS, em 20 mM de tampão succinato, pH=5,40.	113
Figura 43-	Curvas de SAXS para soluções de (A) 1,0% de BSA, e (B) 1,0% de PEO em várias concentrações de SDS. As curvas foram deslocadas na escala Jobs para melhor efeito de visualização.	114
Figura 44-	(A) Ajuste da forma monomérica da HSA nas curvas de SAXS de 1,0% de BSA na ausência e presença de 2,0 mM de SDS (b), em 20 mM de tampão succinato, pH=5,4. (B) Ajuste para o sistema em 5 mM de SDS. A linha vermelha mostra o ajuste com a forma monomérica e a preta o ajuste pelo programa Crystol.	117
Figura 45-	(A) Funções <i>p(r)</i> obtidas para: (a) 1,0 % de BSA em pH=5,40 com $D_{\text{máx}}= 100 \text{ \AA}$ e $R_g= 32,1 \pm 0,2 \text{ \AA}$ e (b) 1,0 % de BSA em 5,0 mM de SDS com $D_{\text{máx}}= 130 \text{ \AA}$ e $R_g= 39,2 \pm 0,5 \text{ \AA}$. (B) Variação da <i>p(r)</i> versus λ (Å) mostrando a forma da molécula.	118

Figura 46-	Curvas da intensidade de espalhamento obtidos para amostras de 1,0% de BSA em diferentes concentrações de SDS, em pH=5,4.	121
Figura 47-	Curvas da intensidade versus ângulo de espalhamento para amostras de 1,0 % de PEO em diferentes concentrações de SDS, em pH=5,40. Curvas de $J_{obs} \times q^2$ versus q obtidos para amostras de 1,0% de PEO, em pH=5,4.	123
Figura 48-	Quadro de resumo das técnicas empregadas no estudo da interação entre o dodecilsulfato de sódio e a albumina do soro bovino.	125

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1-	Propriedades físicas da albumina bovina e humana	4
Tabela 2-	Composição dos aminoácidos de três tipos de albumina soro	7
Tabela 3-	Valores de α para os sistemas PVP/SDS e PEO/SDS.	28
Tabela 4-	Parâmetros cac , α e psp para soluções de SDS em 20 mM de tampão succinato de sódio pH=5,60, em diferentes concentrações de BSA.	77
Tabela 5-	Parâmetros de ligação para os sistemas BSA/SDS e PEO/SDS, obtidos a partir das Figuras 30 e 31. S_1 , S_2 e S_3 referem-se às inclinações das regiões lineares dos gráficos em $[SDS] < cac$, $[SDS] > \alpha < psp$ e $[SDS] > psp$.	81
Tabela 6-	Valores dos parâmetros de ligação para solução de SDS contendo 1,0% de BSA em diferentes concentrações de cloreto de sódio. S_1 , S_2 e S_3 são expressos em $\mu S/cm$.	90
Tabela 7-	Valores de grau de ionização, α , para complexos BSA/SDS e PEO/SDS.	97
Tabela 8-	Número de agregação (\bar{N}) em misturas de BSA e SDS, em estimados 20 mM de tampão succinato, pH=5,40, 30 °C.	102
Tabela 9-	Parâmetros estruturais obtidos pelo ajuste das curvas supondo o modelo do “colar de pérolas”. Onde R_{par} é o raio parafínico, s a espessura da camada polar, ρ_{pol} a densidade eletrônica polar, v é a anisometria (razão entre o eixo maior e menor), D dimensão fractal ($D=3$ para esferas em arranjo compacto e $D=1$ para esferas num arranjo linear) e e é o tamanho de correlação.	120

RESUMO

A reação de hidrólise do 2-Naftaleno-1,3-dioxolano (2-ND) e do di-terc-butil benzaldeído (BTBA) foi investigada em solução contendo albumina do soro bovino (BSA) e dodecilsulfato de sódio (SDS). A hidrólise do 2-ND foi seguida em tampão succinato pH 5,40, próximo do ponto isoelétrico da proteína. Por comparação, a hidrólise foi também monitorada na presença de um polímero hidrofílico, poli (oxietileno) (PEO). O perfil da constante de velocidade de primeira ordem versus [SDS] foi obtida em diferentes concentrações de BSA e PEO. Foi observado que ambos polímeros inibem fortemente a reação e a inibição dependia da concentração de polímero e de SDS. Esta inibição foi interpretada pelos valores de pH aparente obtidos com o indicador piridina-2-azo-dimetilanilina (PADA) nas mesmas condições experimentais em que foram feitas as medidas cinéticas. O efeito da concentração de BSA na velocidade foi interpretada assumindo uma diminuição da concentração de H^+ interfacial, um fato suportado pelo modelo de pseudofase de troca iônica (PIE) aplicado para as reações bimoleculares.

Por outro lado, foi verificada catálise da reação em 1,0% de BSA próximo de 20 mM de SDS, que corresponde ao ponto de saturação clássico. Porém, esse resultado não coincidiu com o segundo platô do gráfico de tensão superficial (20 mM de SDS/g BSA), que segundo a literatura representa a formação adicional de micelas. Além disso, a literatura define a saturação por diálise em 45 mM de SDS / g BSA.

Os resultados obtidos por espalhamento de raio-X a baixos ângulos (SAXS) indicaram que para o sistema mais concentrado com SDS, os dados foram analisados via modelo do "colar de pérolas" onde a cadeia polipeptídica torna-se mais flexível e agregados micelares são distribuídos ao longo da cadeia desnaturada. Nesse contexto, foi verificado que micelas estão presentes em concentrações de 20 mM e que os agregados crescem até 50 mM. Portanto, a saturação definida na literatura em 45 mM está numa região tal que os agregados formados por proteínas e surfatantes apresentam um tamanho constante e que a saturação obtida por condutividade elétrica é a que representa a situação mais apropriada para definir o ponto de saturação.

Finalmente, a reação de hidrólise acompanhada de misturas de BSA e SDS apresentou um comportamento parecido com aquelas misturas formadas por PEO/ SDS. Em princípio, misturas de PEO/SDS poderiam ser usadas como um modelo adequado para complexos proteína/surfatante em reações químicas.

ABSTRACT

The acid-catalyzed hydrolysis of 2-naphthalene-1,3-dioxolane (2-ND) and di-tert-butyl benzaldehyde acetal (BTBA) has been studied in solutions containing bovine serum albumin (BSA) and sodium dodecyl sulfate (SDS). The hydrolysis of 2-ND was performed in succinate buffer, pH 5.40, near the protein isoelectric point. For comparison purposes, the hydrolysis was also monitored in the presence of the hydrophilic polymer poly(ethylene oxide) (PEO). First-order rate constant-[SDS] profiles were obtained at several BSA concentrations and PEO. It was found that both polymers strongly inhibit the reaction and that this inhibition depends on the polymer and SDS concentrations. The inhibition is supported by values of apparent pH obtained by means of the pH indicator, pyridine-2-azo-p-dimethylaniline (PADA), under the same experimental kinetic conditions. The effect of BSA concentration on the rate was interpreted by assuming a decrease in the interfacial H⁺ concentration, a fact which was supported by the pseudophase ion exchange (PPIE) model concepts applied to bimolecular reactions.

On the other hand, it was investigated the catalysis of the reaction in 1.0% of BSA next of 20 mM, which corresponds to the classic point of saturation. However, this result did not conform to the second surface tension-[surfactant] plateau. Those results found on current literature set the definitions for the additional formation of free micelles. Moreover, the literature assumes that the saturation binding of SDS to BSA occurred in 47 mM SDS/g BSA.

The results of small-angle scattering (SAXS) have shown that for more concentrated SDS systems, the data were analysed via the necklace model. In such a state, the polipeptidic chains become more flexible and aggregates to the surfactant monomers, micelles-like, distributed along the unfold chain.

In this context, it was verified that those micelles were formed in 20 mM concentration and grew, in the presence of BSA, until 50 mM of SDS. Therefore, such saturation point specified by the current literature in 45 mM was in a such a region where the aggregates formed had a constant size. On that case, the saturation point obtained by electric conductivity was the one that represented the most appropriate condition.

Finally, it was concluded that, ketal acid hydrolysis while in presence of mixtures of BSA/SDS behaved like SDS and PEO mixtures. In principle, PEO/SDS mixtures could be used as an adequate model for interactions between anionic surfactants and proteins.

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

α	Grau de ionização
BSA	Albumina do soro bovino
BTBA	Acetal do di-t-butilbenzaldeído
cac	Concentração de agregação crítica
σ_f	Concentração do fim do primeiro platô de tensão superficial para BSA/SDS
cmc	Concentração micelar crítica
CRY SOL	Programa computacional para modelagem da estrutura cristalográfica da HSA
Dmáx	Dimensão máxima
GNOM	Programa Computacional para a função de distribuição de distância $p(r)$
HSA	Albumina do Soro Humano
I	Intensidade de fluorescência na presença do supressor
I_0	Intensidade de fluorescência na ausência do supressor
$I(q)$	Intensidade de espalhamento
K_{2m}	Constante de segunda ordem em meio micelar
K_{2w}	Constante de segunda ordem em meio aquoso
kobs	Constante de velocidade observada
K_p	Constante de segunda ordem em meio polímero/surfatante
mM	Milimolar
n	Número de monômeros
\bar{N}	Número de agregação
n_i	Número máximo de sítios disponíveis da proteína
np	Densidade numérica de partículas
2-ND	2-naftaleno-1,3-dioxolano
PADA	Piridina-2-azo-p-dimetilanilina
PEO	Poli(oxietileno)
pHap	pH aparente
PVP	Polivinilpirrolidona
P.I.	Ponto isoelétrico

P.I.E.	Modelo de Pseudo Fase de Troca Iônica
psp	Ponto de saturação
$P(q)$	Fator de forma da partícula
$P(r)$	Distribuição de distância
q	Vetor de espalhamento
$S(q)$	Função de interferência entre partículas
%	Porcentagem em peso
$R(g)$	Raio de giro
R_m	Raio micelar equivalente
RMN ^{13}C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN 1H	Ressonância magnética nuclear de próton
R	Constante dos gases ($1,98 \times 10^{-3} \text{ Kcal.mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$)
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SAXS	Espalhamento de raio X a baixos ângulos
σ	Tensão interfacial
S_1, S_2 e S_3	Coefficientes angulares das curvas de condutividade elétrica vs. [SDS], acima e abaixo do psp .
S_w	Substrato em meio aquoso
S_m	Substrato em meio micelar
ρ_{pol}	Densidade eletrônica polar
2θ	Ângulo de espalhamento
T	Temperatura absoluta, em graus Kelvin
Γ	Excesso de superfície
γ	Tensão superficial
V_{par}	Volume da região parafínica
V_{pol}	Volume total da partícula
UV	Ultravioleta
∇	Número médio de surfatante ligado por molécula de proteína
ν	Anisometria (razão entre eixo maior e menor da elipse)
ξ	Alcance de correlação micela-micela

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO

1. PROTEÍNAS

Todas as membranas biológicas apresentam uma estrutura geral comum: um filme muito fino de lipídeos e de proteínas mantidos juntos principalmente por interações não covalentes. As proteínas são as macromoléculas mais versáteis, estrutural e funcionalmente, e são os principais instrumentos de reconhecimento molecular e catálise. As proteínas participam de quase todos os processos biológicos, já que incluem as enzimas que catalisam reações químicas extraordinariamente diversas [1,2,3].

Apresentam importantes funções biológicas tais como: função de defesa (anticorpos), hormonal e de transporte e ainda são responsáveis pela contração muscular. Elas são formadas por resíduos de aminoácidos que se arranjam entre si por ligações amídicas ou peptídicas para formar a seqüência de aminoácidos ao longo da cadeia polipeptídica (estrutura primária) [1,2,3].

Os aminoácidos tem como estrutura básica um grupo amino e carboxílico com exceção da prolina, que contém um grupo imino no lugar do grupo amino. A Figura 1 representa a estrutura de um tetrapeptídeo.

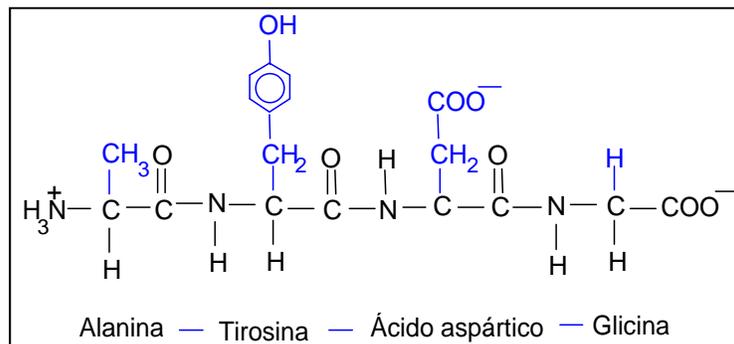


Figura 1- Seqüência de alguns aminoácidos para formar um tetrapeptídeo.

Nas membranas biológicas, as proteínas encontram-se rearranjadas de várias conformações caracterizando as proteínas integradas e as periféricas, como mostra a Figura 2. As proteínas integradas estão associadas na matriz da camada lipídica e podem atravessar a membrana graças à sua natureza anfipática. As partes da cadeia polipeptídica ricas em aminoácidos apolares (valina, metionina, fenilalanina, etc.) estendem-se através dos domínios hidrofóbicos da bicamada (como gotas de óleo que se juntam após terem sido dispersas mecanicamente na água), e os segmentos ricos em aminoácidos polares (arginina, histidina, ácido aspártico, etc.) projetam-se para fora da bicamada, interagindo com a água ao redor da membrana.

A extensão da cadeia polipeptídica que fica incluída na bicamada ou projetada para fora, está intimamente relacionada com a função da proteína [1,3].

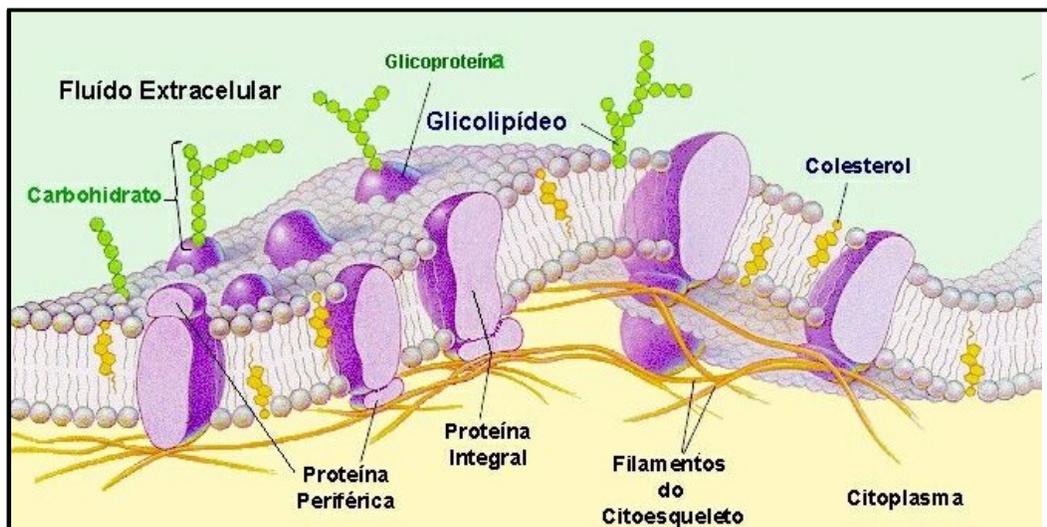


Figura 2- Representação de uma membrana plasmática formada por uma bicamada lipídica. As proteínas integradas encontram-se embutidas na bicamada, enquanto as periféricas interagem com a água ao redor da membrana [3, 4].

Desde que as ligações peptídicas sejam polares, elas tendem a interagir tanto com elas próprias, como com cadeias laterais polares, para formar pontes de hidrogênio, exercendo um importante papel na manutenção de diferentes regiões da cadeia polipeptídica numa molécula de proteína dobrada [2].

As proteínas periféricas estão associadas às membranas por interações eletrostáticas ou ligações covalentes dentro da cadeia. Por exemplo, as ligações de dissulfeto (ligações S—S) entre dois grupos —SH de resíduos de cisteínas vizinhos numa cadeia polipeptídica dobrada, comumente servem para estabilizar a estrutura tridimensional das proteínas extracelulares. A cadeia polipeptídica pode difundir-se lateralmente na bicamada lipídica com estruturas em α -hélice [2,3].

Ao descrever a estrutura de uma proteína, é importante distinguir os vários níveis de organização [2,3,5]. A seqüência de aminoácidos, ao longo da cadeia polipeptídica, é chamada de *estrutura primária*. Esta seqüência de aminoácidos irá determinar o tipo de interação entre os grupos que apresentam distintas reatividades com água. A organização tridimensional de uma proteína, iniciado pela seqüência dos aminoácidos, passando pelo enrolamento da cadeia polipeptídica até a associação de várias cadeias, origina estruturas complexas que são descritas pelas várias ligações que as estabilizam. As ligações por pontes de hidrogênio, dentro dos segmentos das cadeias polipeptídicas adjacentes, originam dois arranjos espaciais particularmente estáveis denominados de α -hélice e folhas β -pregueadas, constituindo assim a *estrutura secundária* da proteína. Certas interações de regiões com estrutura regular (α -hélice e folhas β -pregueadas) ou de regiões sem estrutura definida formam unidades globulares compactamente dobradas. Elas são estabilizadas por pontes de hidrogênio, ligações eletrostáticas ou iônicas e interações hidrofóbicas, descrevendo, neste caso, a *estrutura terciária*.

Finalmente, a *estrutura quaternária* descreve a associação de duas ou mais cadeias polipeptídicas para compor uma proteína funcional (fibrosas e globulares) [3,5]. As proteínas fibrosas são alongadas, insolúveis em água, e desempenham papel estrutural nos sistemas biológicos.

As proteínas globulares, ao contrário, são compactas e solúveis em água. São também responsáveis pelas funções vitais do organismo vivo e, em condições fisiológicas, uma molécula de proteína natural apresenta uma estrutura regular altamente organizada [2,5,6]. As proteínas globulares podem perder estas características quando na presença de ácidos ou bases, solventes, detergentes, aquecimentos etc; o que ocasiona a perda de sua função biológica. Quando ela é desnaturada, ocorre um desdobraimento e uma deslindação da estrutura, o que corresponde a um aumento de entropia [6].

1.1. ALBUMINA DO SORO BOVINO (BSA)

“Albus”, do latim, significa o diminutivo de “albumén” devido à cor esbranquiçada de um precipitado floculento produzido pela coagulação da proteína. Foi reconhecida por Ansel, em 1839, como a principal proteína constituinte do sangue [7]. A soro albumina é a maior proteína globular do plasma, sua concentração média é de 5g/100mL e contribui com 80% da pressão sanguínea osmótica do sistema circulatório. Além disso, foi determinado que albumina é a principalmente responsável na manutenção de pH do sangue [6,7]. As interações intensas da cadeia lateral tendem a se enovelar em densas configurações globulares que conferem algumas características físicas pertinentes a esta proteína.

A Tabela I mostra algumas propriedades físicas de duas albuminas: (a) do soro bovino (BSA), estudada neste trabalho, e (b) e do soro humana (HSA) [7,8].

Os resíduos polares da albumina do soro conferem-lhe alta solubilidade em água e favorecem a ligação com vários compostos orgânicos e inorgânicos. A constante de associação típica assume valores entre 10^4 e 10^8 M^{-1} [7]. É aceito na indústria farmacêutica que toda distribuição, metabolismo e eficiência de muitas drogas podem ser alterados baseados na sua afinidade com a albumina [8].

Alguns trabalhos têm sugerido que a albumina do soro bovino modificada pode ser usada como agente de contraste seletivo na detecção de tumores. Tonsgard estudou a ligação de ácidos carboxílicos nos sítios de ligação da BSA, para entender o efeito do potencial de drogas e outros ligantes, como por exemplo os ácidos altamente tóxicos, nos processos celulares [9].

Em função destas importantes propriedades, a albumina é veículo de transporte de moléculas pouco solúveis no organismo e em concentrações elevadas é usada no tratamento traumático e choques hemorrágicos, em queimaduras muito extensas e nos casos de perdas contínuas de proteínas [7,10].

Tabela I- Propriedades Físicas da Albumina Bovina (BSA) e Humana (HSA)

Propriedade	Bovina	Humana
Peso Molecular (daltons)	66,267	66,439
Ponto Isoelétrico, pH=5,3	4,7	
Absorbância Específica, L/gcm	0,667	0,51
Viscosidade intrínseca	0,041	0,042
Dimensão global, Å	41,6 x 140,9	38 x 150

1.1.1. Conformação e Composição de Aminoácidos da BSA

Muitas ligações numa longa cadeia polipeptídica permitem a rotação livre dos átomos conferindo à estrutura da proteína uma grande flexibilidade, podendo adotar um número ilimitado de conformações.

No caso particular das albuminas, os estudos de cristalografia de raio-X mostraram que a estrutura da albumina é predominantemente em α -hélice. O restante dos polipeptídeos estão estendidos ou entre regiões flexíveis [7,8]. Esta estrutura também foi definida por espectroscopia RAMAN [11], cujos modos vibracionais das linhas de amida III indicavam que a estrutura da BSA apresentava cerca de 60 % do conteúdo em α -hélice. Por técnica de infravermelho, os autores mostraram que um aumento na região de 1235 cm^{-1} e uma diminuição em 940 cm^{-1} para BSA, fornecia um forte argumento de que a estrutura principal em hélice da proteína estava desaparecendo, enquanto outras conformações estavam se formando, neste caso, um maior conteúdo da conformação β (folha pregueada) foi observado [11].

Na molécula da albumina foram incluídos o alinhamento de 17 pontes (ligações) de dissulfetos organizados dentro de uma série de nove "loops" (laços) (L1-L9). Na observação desses laços, foi deduzido que a albumina era o produto de três domínios homólogos (I,II,III). Os laços se repetem num triplete que obedece à seqüência formada por laços grande-pequeno-grande. Cada domínio é o produto de dois subdomínios (IA, IB, etc.) e pode ainda ser dividida em 10 segmentos helicoidais, de 1-6 para o subdomínio A e 7-10 para o subdomínio B, criando duas grandes hélices na albumina.

A Figura 3 mostra uma representação simplificada da disposição dos laços da estrutura primária da albumina.

Uma das características principais da composição das albuminas é a sua baixa concentração de triptofano e metionina e altas concentrações de cisteína e grupos carregados de aminoácidos como ácido aspártico, glutâmico, lisina e arginina. A Tabela 2 mostra a composição dos aminoácidos característicos para a albumina do soro bovino, do soro humano e do soro de rato [10].

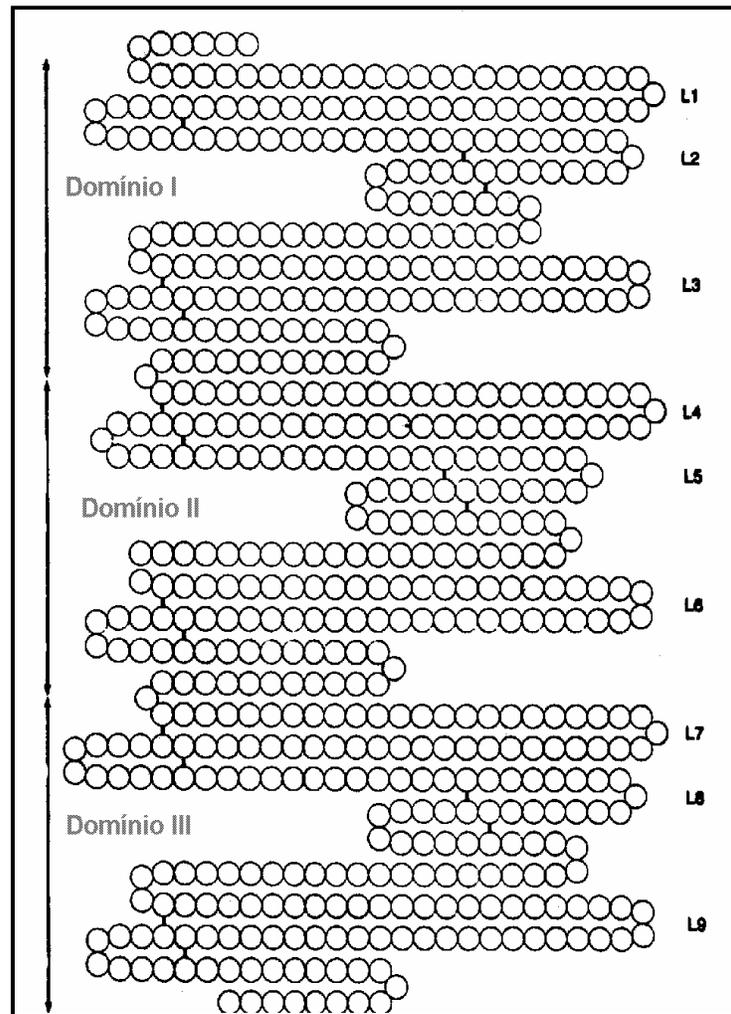


Figura 3- Ilustração simplificada dos “loops”, numerados de 1 a 9, da estrutura primária da albumina do soro bovino, e também os três domínios (I,II,III).

Tabela 2- Composição dos aminoácidos de três tipos de Albumina [7,10].

Aminoácido	Bovina	Humana	Rato
Ácido aspártico	41	36	32
Asparagina	13	17	20
Treonina	34	28	33
Serina	28	24	24
Ácido glutâmico	59	62	57
Glutamina	20	20	25
Prolina	28	24	30
Glicina	16	12	17
Alanina	46	62	61
Valina	36	41	35
1/2- Cistina	35	35	35
Metionina	4	6	6
Isoleucina	14	8	13
Leucina	61	61	56
Tirosina	19	18	21
Fenilalanina	27	31	26
Lisina	59	59	53
Histidina	17	16	15
Triptofano	2	1	1
Arginina	23	24	24
Total	582	585	584
Número átomos de Nitrogênio	779	786	785
Carga residual calculada, pH=7	-18	-15	-12
Média dos pesos dos resíduos	113.86	113.57	112.79

Informações sobre a estrutura da albumina foram propostas por Hughes (1954), Squire (1968) e Thompson (1975), baseados em experimentos hidrodinâmicos (equilíbrio de sedimentação e microscopia eletrônica,) e Bloomfield (1966) por estudos de espalhamento de raio-X a baixo ângulo, citados por Carter [7].

Todos os trabalhos concordavam que a albumina teria a forma de uma elipsóide oblata, tendo dimensões da ordem de $140 \times 40 \text{ \AA}$, com base nas análises cristalográficas da albumina do soro humano.

Brow e Shockley em 1982, citados também por Carter [7], compilaram uma variedade de dados e construíram um modelo para a albumina do soro bovino na forma de um “charuto” [7,10], que suportava as dimensões já sugeridas. A Figura 4 mostra um modelo clássico para a albumina do soro bovino.

Estudos subseqüentes de Hagag (1983), utilizando sonda fluorescente ligada covalentemente no grupo Cis-34 puderam avaliar que os resíduos de aminoácidos Cis-34, Trp-214 e Tir-411 apresentaram distâncias próximas uns dos outros ($\sim 25 \text{ \AA}$) e que a estrutura da albumina estava de acordo com uma forma tipo “coração” [6].

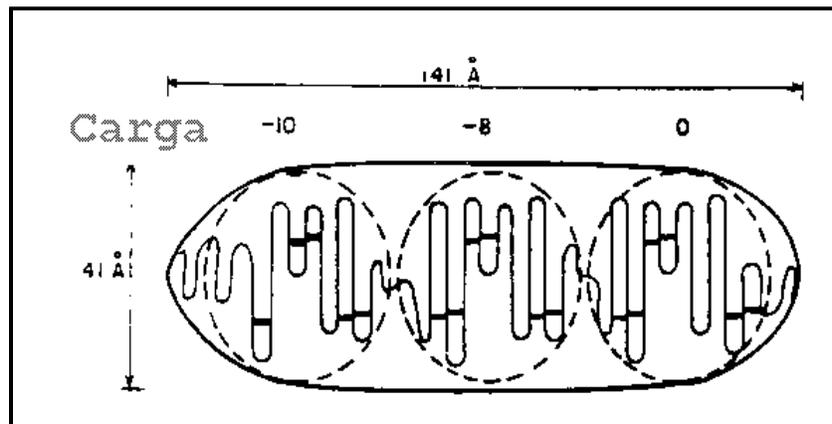


Figura 4- Modelo estrutural proposto para a albumina do soro bovino através de estudos de espalhamento por raios X a baixos ângulos [7].

1.1.2. Flexibilidade Conformacional: Efeito do pH e temperatura

A albumina resiste à isomerização conformacional reversível com mudanças da concentração hidrogeniônica [7] e adquire pelos menos três tipos básicos de formas que foram definidas por Foster numa “série elegante” de estudos conformacionais. A forma normal “N” é predominante em pH neutro, onde preserva-se a neutralidade elétrica. Os grupamentos carboxílicos são envolvidos em pares iônicos com os grupamentos laterais básicos, devidamente protonados. Em pH < 4,0, os pares iônicos são destruídos e a forma “F” é alcançada. Esta mudança na estrutura acarreta um aumento na viscosidade e uma redução na solubilidade, favorecendo perda significativa na estrutura de α -hélice. Portanto, a isomerização *N-F* ocorre em pH ácido e envolve um desdobramento do domínio III.

Em pH menor que 4,0, a albumina torna-se totalmente expandida (desnaturada). Esta expansão é conhecida como forma “E” que apresenta um aumento da viscosidade intrínseca, e conseqüente aumento do raio axial hidrodinâmico .

Em meio alcalino, as mudanças conformacionais da forma “N” passam para a forma altamente protonada “B”. Se a solução de albumina for mantida em pH=9,0 por 4 dias e com baixa força iônica em torno de 3°C, ocorrerá outra forma de isomerização definida como forma envelhecida “A” [7,10,12]. O Esquema 1 mostra as relações das formas isoméricas da soro albumina [10].

Quando a BSA é tratada por aquecimento, ela passa por dois estágios estruturais. O primeiro é um estágio reversível e o segundo é irreversível (desdobramento de núcleos expondo grupos Cis-34, que imediatamente formam ligações covalentes por pontes de dissulfeto), estes estágios não resultam necessariamente na destruição da estrutura ordenada. Desta forma, foi encontrado que a 58,1 °C a albumina sofre mudança conformacional, e a 62 °C desnaturação [10].

	<i>E</i> ↔	<i>F</i> ↔	<i>N</i> ↔	<i>B</i> ↔	<i>A</i>
pH de transição	2,1	4,3		8,0	10,0
Designação	expandida	rápida	normal	básica	envelhecida
% hélice	35	45	55	48	48

Esquema 1- Relações isoméricas da albumina em função do pH.

2. MICELIZAÇÃO

2.1. Associações de Surfatantes: Micelas

Agregados supramoleculares; juntamente com associações coloidais, membranas biológicas, vesículas compostas por fosfolipídeos sintéticos e naturais, surfatantes, proteínas, DNA, polieletrólitos e outras associações, todas apresentam um aspecto estrutural importante. Estas são: uma região hidrofóbica e outra hidrofílica [13]. Tal propriedade torna-se relevante no estudo de adsorção de substâncias em interfaces.

Neste trabalho, dar-se-á ênfase a classe de misturas dos surfatantes e proteínas.

Surfatantes são moléculas cujas estruturas formam-se por duas partes de distintas solubilidades: uma parte que consiste numa longa cadeia hidrocarbônica solúvel em óleo (hidrofóbica), e outra que consiste em grupos polares que interagem fortemente com a água (hidrofílica) [14].

De acordo com a natureza do grupo hidrofílico do surfatante, eles podem ser classificados como aniônicos (dodecilsulfato de sódio), catiônicos (brometo de dodeciltrimetilamônio), zwitteriônicos (n-dodecil-n,n-dimetil betaína) e não-iônicos (éter poli(oxietileno) p-octilfenil).

Dois características significativas dos surfatantes, também chamados de anfifílicos, são: (i) a formação de agregados micelares e (ii) a tendência para adsorver em interfaces carregadas.

A agregação de monômeros, em solução aquosa, é denominada de micelização. Este processo espontâneo e altamente cooperativo, é mostrado na Figura 5. A concentração na qual as micelas são formadas é chamada de *concentração micelar crítica (cmc)*. Experimentalmente, a *cmc* é determinada pelo ponto de inflexão de um gráfico de alguma propriedade física da solução em função da concentração do surfatante. Uma ampla variedade de técnicas envolve medidas de tais propriedades físicas como condutividade elétrica, tensão superficial, fluorescência, viscosidade, espalhamento de luz, etc [15].

Uma das mais importantes conseqüências da micelização, do ponto de vista farmacêutico, é que as micelas são capazes de solubilizar drogas com os mais variados tipos de solubilidades. Outras aplicações ocorrem nas áreas de cosméticos, tais como os agentes de limpeza [15,16].

A *cmc* de surfatante iônico é influenciada por diferentes fatores, tais como:

- (i) A natureza do grupo hidrofóbico, cujo um aumento no número de átomos na cadeia hidrocarbônica conduz à diminuição da *cmc*;
- (ii) A natureza do grupo hidrofílico, cujo um aumento do número de grupos hidrofílicos acarretam um aumento da solubilidade do surfactante e portanto, um aumento da *cmc*;
- (iii) A natureza do contra-íon de surfatantes iônicos, que causa uma grande polarizabilidade; conduzindo à diminuição da *cmc* e a um aumento no número de agregação, isto é, contra-íons grandes causam diminuição da *cmc*. Este fato é atribuído ao menor grau de hidratação para íons maiores o que torna menor o trabalho elétrico para formar a camada de Stern ^[15];
- (iv) A adição de aditivos, como por exemplo sal, que induzem redução na espessura da atmosfera iônica ao redor dos grupos polares e conseqüentemente repulsão entre eles, diminuindo a *cmc*;
- (v) Variação da temperatura que pode influenciar na formação de agregados micelares, isto é, um aumento da temperatura favorece uma maior solubilidade do surfatante em água e isso faz aumentar a *cmc* ^[15,16,17].

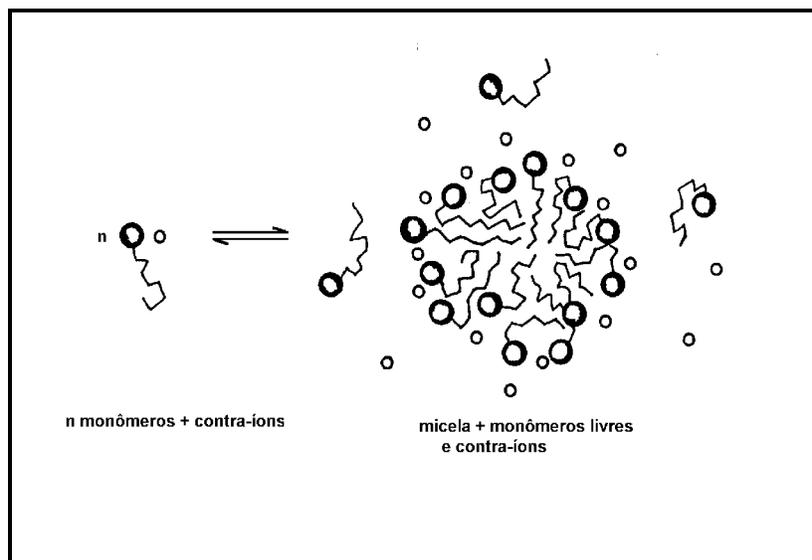


Figura 5- Processo de Micelização do Surfatante ^[15].

2.2. Estrutura da Micela

A estrutura de uma micela iônica típica que apresenta diâmetro entre 30 a 40 Å, em meio aquoso, e que contém 50-100 monômeros de surfatante, é aproximadamente esférica. As micelas se organizam de tal modo que a parte hidrofóbica fica voltada para o núcleo e a parte hidrofílica projetada para a periferia interagindo com a água e os íons de carga oposta (contra-íons) [14,18].

Imediatamente, ao redor do núcleo está a camada de Stern, que é uma região extremamente anisotrópica, onde as moléculas se encontram num arranjo ordenado, e com propriedades intermediárias entre a água e o álcool, por exemplo. Nela estão a parte hidrofílica e também os $(1-\alpha)n$ contra-íons.

Os αn contra-íons remanescentes estão localizados em uma camada mais difusa, chamada camada de Gouy-Chapman. Na superfície externa da camada de Stern está a camada periférica hidrodinâmica da micela [15]. A estrutura deste modelo foi proposta por Stigter a qual é usada para deduzir o tamanho e a concentração de carga na superfície da micela [18]. A Figura 6 representa a forma de uma micela iônica; proposta por Gruen [19]. Existem muitos modelos conflitantes na literatura sobre a estrutura de uma micela. Como não há evidências sobre efeitos de estrutura em reatividade micelar, é aceito que a micela apresente uma forma aproximadamente esférica, desde que não exceda a *cmc* do surfatante, onde podem existir outras conformações causadas pelo excesso de surfatante.

Então, as micelas iônicas apresentam estrutura aproximadamente esféricas com os grupos iônicos na superfície e os contra-íons ao redor que neutralizam parcialmente a carga residual.

Entretanto, em concentrações elevadas de surfatante, as micelas podem assumir formas flexíveis de agregados alongados tipo elipsóide, passando para uma nova mesofase e, posteriormente, para a forma de um cristal líquido [18,19,20]. O comprimento da cadeia estendida do dodecilsulfato de sódio para uma micela esférica é de 1,657 nm [15].

Estes agregados micelares são termodinamicamente estáveis, pois se formam com diminuição de energia livre, resultado da desorganização da água ao redor das cadeias hidrocarbônicas para formar o núcleo hidrofóbico. Sendo assim, a forma, o tamanho e a estabilidade das micelas são resultantes de um delicado balanço entre a parte hidrofóbica e a forte solvatação dos grupos hidrofílicos em contato com o meio aquoso [21,22].

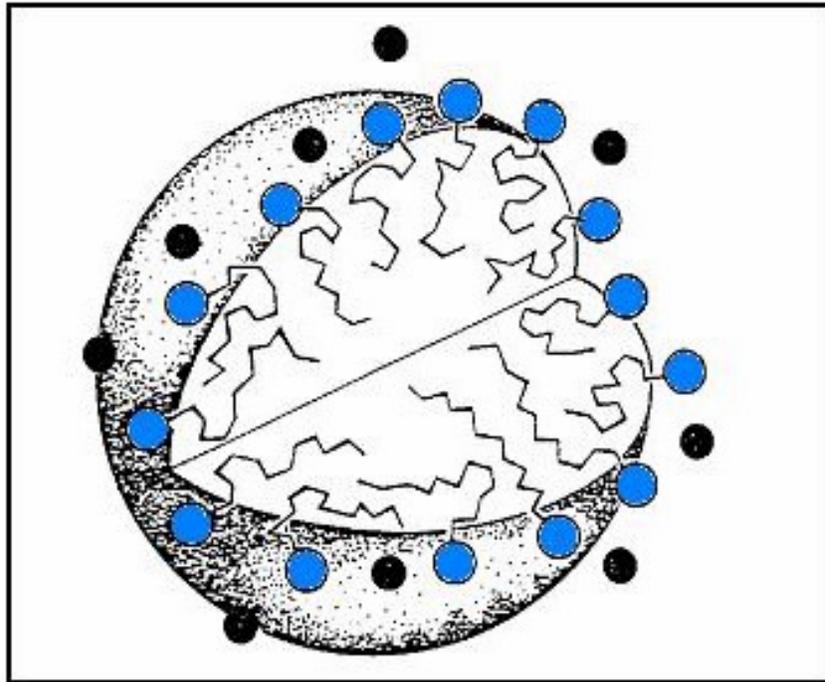


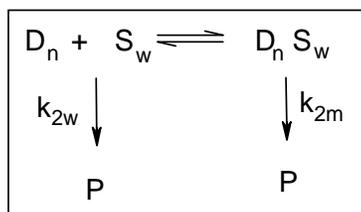
Figura 6- Estrutura da micela proposto por Gruen. A camada de Stern contém os grupamentos hidrofílicos (○) e os contra-íons (●).

2.3. Reações em Meio Micelar

Reações químicas que ocorrem em meio micelar podem sofrer tanto um efeito catalítico como inibitório, que é atribuído às mudanças de reatividade ou mudanças relacionadas a concentração local dos reagentes [16,20]. A adição suficiente de um surfatante iônico numa reação química cuja concentração do substrato permanece constante, favorece a formação de micelas e frequentemente produz mudanças no valor da constante de velocidade observada (k_{obs}).

Menger e Portnoy, propuseram o primeiro modelo cinético para simular reações enzimáticas na esperança de que micelas pudessem funcionar como modelos simples de reações catalisadas por enzimas.

O modelo considera a solução contendo o surfatante (S) e o substrato (D) mostrado no esquema 2 [16,23]:



Esquema 2

na qual, P é o produto da reação, e k_w e k_m são as constantes de velocidade de primeira ordem do substrato em água (w) e na micela (m), respectivamente. A constante de ligação (K_S) é dada por:

$$K_S = \frac{[D_n S_w]}{[D_n][S_w]} \quad (1)$$

$[D_n]$ corresponde a quantidade de surfatante micelizado que é dado por:

$$[D_n] = [D] - cmc \quad (2)$$

Embora esse modelo se adapte para reações espontâneas, ele não poderia simular a velocidade máxima característica do aumento do conteúdo micelar de reações [24].

Berezin e colaboradores propuseram um tratamento baseado no modelo de pseudofase no qual o substrato se encontra particionado entre as pseudofases aquosa e micelar [25,26]. O modelo de pseudofase expressa a reatividade em solução de reações entre um substrato orgânico neutro (S) e um íon hidrofílico (N), pela soma das velocidades das reações que acontecem na fase aquosa e micelar, conforme Equação 3:

$$Velocidade = k_{obs}[S_T] = k_{2m}[S_m][N_m] + k_{2w}[S_w][N_w] \quad (3)$$

Em que k_{obs} é a constante de velocidade observada de primeira ordem, e os subscritos “w” e “m” indicam a fase aquosa e micelar, respectivamente. As constantes de velocidade de segunda ordem em cada pseudofase são representadas por: k_{2w} e k_{2m} .

Da combinação dos princípios básicos dos tratamentos que levam em consideração a pseudofase e a admissão da troca iônica entre as fases, surgiu o modelo da *pseudofase de troca iônica (PIE)* elaborado por Quina e Chaimovich [20,26,27]. As principais aplicações do *PIE* estão relacionadas abaixo.

- (a) A ligação de um íon reativo na micela; na presença ou ausência de sal e de tampão,
- (b) Avaliar as constantes de velocidade de substratos neutros e de carga oposta à micela,
- (c) Interpretar a reatividade de sistemas mais complexos na presença de polímeros.

O modelo de pseudofase de troca iônica considera que um equilíbrio do substrato nas fases aquosa e micelar, conforme a Equação 4:



Na qual X e Y representam o íon adicionado e o contra-íon original, e são representados pela concentração analítica em mol/L. Os subscritos “w” e “m” referem-se aos íons ligados (meio micelar) e livres (meio aquoso), respectivamente. A constante $K_{X/Y}$ corresponde à constante de troca iônica entre os íons na fase micelar e na aquosa.

O modelo considera ainda que:

- (i) O grau de ionização (α) das micelas é constante e independe da concentração do surfatante e da força iônica;
- (ii) As interações íon-íon e íon-região hidrofílica não são cooperativas, o que permite supor que a velocidade de troca iônica depende somente dos contra-íons ligados na micela e também da concentração dos íons livres;
- (iii) A velocidade de troca iônica é muito rápida em relação ao tempo de vida da micela [26,27].

O modelo de *pseudofase de troca iônica (PIE)*, apesar de solucionar o problema de sistemas tamponados e na descrição dos efeitos observados em reações bimoleculares de íons uni e bivalentes com substratos orgânicos em solução micelar, ignora detalhes da estrutura micelar em reações bimoleculares em que o surfatante é do tipo que possui contra-íon reativo hidrofílico, como por exemplo, CTAOH [20].

Romsted [26] estudou o efeito de contra-íons na catálise ácida da hidrólise de um acetal hidrofóbico em micelas catiônicas em alta concentração salina, e racionalizou que a concentração de contra-íons na interface é igual à concentração inicial efetiva de contra-íons mais os contra-íons da pseudofase aquosa.

O modelo *PIE* tem sido, dessa forma, sujeito a tratamentos quantitativos que admitem variações no grau de dissociação [27,28]. A aplicação do modelo de pseudofase na velocidade de reações químicas e na estimativa da constante de equilíbrio em sistemas micelares, ignora alguns parâmetros de grande importância como por exemplo a fração de contra-íons ligados, aspectos termodinâmicos e geométricos e de forças que atuam significativamente nos agregados.

3. PROTEÍNAS EM SOLUÇÃO E EM INTERFACES

3.1. Relevância da Associação: Aplicações

Muitos sistemas de importância comercial e tecnológica contêm misturas de proteínas e surfatantes. As proteínas em solução aquosa contêm uma variedade de grupos químicos com características polares e apolares que interagem fortemente com surfatantes [29,30]. A ligação do surfatante na proteína pode mudar a energia de adsorção da proteína na interface, o que afeta a carga residual e a hidrofobicidade da macromolécula. O contato dos surfatantes aniônicos (SDS) com as cargas residuais provocam inativação biológica da proteína como resultado da forte ligação entre as duas espécies.

A desnaturação é provocada pelo desdobramento da estrutura da macromolécula. Isso acarreta um aumento na entropia e, como consequência, a proteína pode apresentar diferentes configurações no meio em que se encontra [6,31].

Essa condição oferece um vasto campo de pesquisa com especial interesse nas indústrias de alimentos e cosméticos. Na primeira, as emulsões utilizadas em produtos comestíveis como molhos de saladas ou sorvetes, por exemplo, contêm proteínas e emulsificantes na interface água/óleo fator importante na formação, reologia e estabilidade do sistema [29,32,33]. Em aplicações cosméticas, existe a necessidade de se obterem emulsões altamente estáveis ou que sejam completamente transparentes [34].

Em bioquímica, muitos surfatantes têm sido estudados para quantificar sua utilidade como agente solubilizante dos componentes de membranas. Na odontologia, os agentes antiplacas são formulados com surfatantes e usados neste tratamento [1,3 15,35].

Portanto, o estudo envolvendo interação entre uma proteína globular, tal como BSA, com interfaces carregadas promovidas pelo surfatante, é de extrema importância comercial e tecnológica.

Outro aspecto de grande importância é o da dermatologia, que trata dos efeitos causados pelas reações de irritação do surfatante quando em contato com a pele humana. Os surfatantes utilizados para limpeza podem ser agressivos e produzir aspereza, inchaço e vermelhidão quando em contato com a pele.

Alguns surfatantes podem promover a perda da permeabilidade e hidratação da pele e também favorecer a penetração de outros materiais aumentando a irritabilidade. É importante entender que os processos de irritação, formação de espumas, emulsões e propriedades de biocidas estão relacionados à concentração monomérica.

Esse fenômeno pode estar associado particularmente às diferentes formas da micela. A forma da micela globular pode ser alterada para a forma cilíndrica pelo aumento das concentrações de surfatante, de sal e até mesmo de um co-surfatante. A mesma concentração global do surfatante pode acontecer como micelas globulares e alto conteúdo de monômeros ou como micelas cilíndricas e baixo conteúdo de monômeros [36]. Esse efeito é relevante no processo de diminuição da irritação causada em xampus por diminuição da *cmc*, como adição de sais quaternários de amônio ou misturas de micelas [34,36].

Os efeitos causados pelos surfatantes no transporte através da pele pode alterar profundamente a sua permeabilidade. Estas alterações são correlacionadas a mudanças na conformação das proteínas e, como consequência, o inchaço na epiderme.

Em 1960, Bettley e Donoghue [37] demonstraram que surfatantes aumentavam a velocidade de transporte de água através da epiderme humana. Mais tarde, eles propuseram que surfatantes alteravam a permeabilidade da pele por desnaturação da proteína “extratum corneum”.

O mecanismo de irritação causada por vários surfatantes depende de como eles entram em contato com a pele. Os surfatantes aniônicos, por exemplo, causam danos na barreira funcional da “extratum corneum”, porque têm a capacidade de desnaturar proteínas [38,39,40,41].

Imokauwa e colaboradores [39,41], sugeriram que a interação de surfatante com BSA reflete, em parte, a interação destas substâncias com a pele. Eles estudaram o potencial de desnaturação da albumina do soro bovino, utilizando medidas de rotação específica. Os resultados obtidos foram correlacionados com a intensidade da aspereza da pele “in vivo” causadas pela formação de “complexos proteína/surfatante”. Por outro lado, sabe-se que o dodecilsulfato de sódio reduz a capacidade do tecido em reter grande quantidade de água. Se surfatantes influenciam na hidratação de proteínas, alguns sistemas modelos, tais como BSA, podem ser usados para avaliar as interações de surfatantes com a pele humana [37].

3.1.1. Interação da Albumina do Soro Bovino com Moléculas de Surfatantes

Surfatantes são fortes agentes desnaturantes de proteínas. A baixa estabilidade conformacional de proteínas provoca susceptibilidade à desnaturação por alteração do balanço das forças que mantêm sua conformação.

Quando uma proteína é aquecida, suas propriedades conformacionais mudam, conforme já mencionado no item 1.1, e podem ser identificadas por medidas como rotação ótica, viscosidade, absorção no ultra-violeta, etc. Outros fatores como pH, adição de aditivos orgânicos e uréia também provocam mudanças na estrutura da proteína. As moléculas de surfatante induzem mudanças até mesmo em baixas concentrações (1×10^{-6} mol/L), assumindo uma conformação tipo bastão [29,31] .

A interação entre surfatantes e proteínas ocorre envolvendo a formação de um complexo proteína-surfatante, o qual apresenta propriedades diferentes da proteína pura. Além disso, a ligação do surfatante na proteína reduz a concentração de monômeros disponíveis para a interação com a proteína na interface aquosa [35].

Como interação entre polímeros sintéticos e surfatantes, muitos estudos têm sido feitos para elucidar o verdadeiro mecanismo de interação entre as espécies, já que este modelo é utilizado para mimetizar interações entre proteínas e membranas biológicas. Devido à grande variedade de proteínas, vários tipos de transições são esperadas. Nesse contexto, vários trabalhos têm sido desenvolvidos para justificar a natureza real das forças envolvidas nesta interação, bem como apresentar propriedades físico-químicas que possam sugerir modelos que visualizem melhor o tipo do agregado formado.

A formação de complexos, proteína-surfatante e polímero-surfatante em solução aquosa, é investigada por várias técnicas físicas, como é feito com as medidas de *cmc* para soluções de surfatantes puros. Algumas delas são a tensão superficial, viscosidade, condutividade elétrica, e técnicas espectroscópicas [42,43,44,45].

3.1.2. Por que Moléculas de Proteínas Interagem? Quais as Forças Envolvidas neste Processo?

O comportamento de macromoléculas biológicas em solução é regido por três principais fatores: (a) elas são grandes, (b) podem interagir fortemente com o solvente ou entre si, e (c) são freqüentemente portadoras de cargas elétricas [6]. As forças que regem as interações que ocorrem em solução e que orientam as moléculas para uma interface são de natureza entrópicas e energéticas (entálpicas). Quando surfatantes são envolvidos, a tendência entrópica para expelir os hidrocarbonetos da fase aquosa representam um papel importante [46].

Os fenômenos interfaciais em sistemas biológicos, estudados por Kondo [47], também apresentam propriedades elétricas na superfície celular. A metástase das células cancerígenas ou a fagocitose de células brancas, por exemplo, envolvem propriedades elétricas no estágio inicial e final do processo. Por outro lado, as células vermelhas são afetadas pela adsorção de polímeros carregados positivamente, tal como polilisina. As glicoproteínas localizadas na região periférica das membranas são capazes de exercer uma atração específica por outra molécula numa distância menor que 5×10^{-7} cm, e a interação entre glicoproteína- glicoproteína é excepcionalmente eletrodinâmica [47].

Em 1948, Foster [48]; em seu trabalho sobre interação com a proteína vegetal denominada Zeina (insolúvel em água) e dodecilbenzeno sulfonato de sódio, sugeriu a participação de ligações iônicas. Surfatantes iônicos aumentam a solubilidade de Zeina, e este fato se correlaciona intrinsecamente com o processo de irritabilidade da pele [49]. Love e colaboradores [50] estudaram a conformação nativa da albumina do soro humano na presença de uréia, e observaram que a proteína era estabilizada pela ligação com as moléculas de surfatantes estendidas entre os resíduos apolares e os grupos carregados positivamente em diferentes "laços" da cadeia polipeptídica.

As interações entre a albumina do soro bovino com surfatantes catiônicos também resultaram em mudanças conformacionais. Em altas concentrações do surfatante catiônico, a desnaturação para uma forma estendida é acompanhada por ligações cooperativas semelhantemente aos surfatantes aniônicos [51]. Da mesma forma, Jones propôs uma interação cooperativa do dodecilsulfato de sódio com a proteína globular tripsina [52].

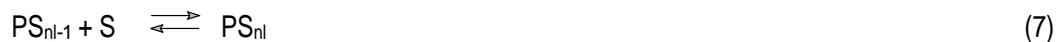
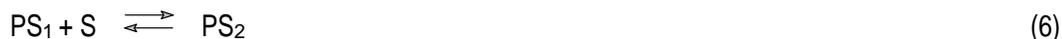
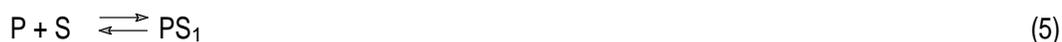
De uma maneira geral, a superfície das proteínas são muito heterogêneas pois possuem grupos carregados, grupos com habilidades de fazer ligações de hidrogênio e grupos hidrofóbicos.

Devido à complexidade na superfície dos diferentes tipos de proteínas, elas podem interagir com outras moléculas ou superfícies pelos mais variados caminhos. Há possibilidade de interações iônicas (atrativas ou repulsivas), ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, forças de hidratação, interações ácido-base e interações de Van der Waals. Porém, as forças mais importantes que orientam as interações das proteínas são freqüentemente as hidrofóbicas e iônicas que combinadas com um ganho de entropia causam mudanças conformacionais durante a adsorção [2,3,46,53].

3.1.3. Termodinâmica da Ligação

Uma macromolécula, sendo grande e complexa, pode dispor de diversos sítios para interação com pequenas moléculas. Muitas dessas interações envolvem ligação reversível e são estudadas em termos de *múltiplos equilíbrios*. Os múltiplos equilíbrios são aplicados, por exemplo, na ligação do oxigênio pela hemoglobina, ligação de prótons nas cadeias macromoleculares, ligação de íons magnésio pelo DNA, e no transporte de ácidos graxos pelo sangue no sistema circulatório. Para várias proteínas globulares, a interação com n-dodecilsulfato de sódio ocorre com ligações cooperativas quando a concentração do surfatante livre é aproximadamente 1-3 mM [5,6,30,53,54].

A ligação depende do múltiplo equilíbrio termodinâmico com a ligação estequiométrica dos componentes em solução. Considerando-se uma proteína (P), que supõe-se ter “n” sítios de ligação que interage com um surfatante (S), o equilíbrio em cada sítio será definido por uma série de etapas:



Considere-se n o número máximo de sítios disponíveis da proteína.

Se a constante de equilíbrio K for a mesma para cada etapa da ligação, obtém-se a seguinte Equação:

$$K^{n_l} = \frac{[PS_{n_l}]}{[P][S]^{n_l}} \quad (8)$$

O número médio de surfatantes ligados por molécula de proteína (∇) [5,6,29] é dado por:

$$\nabla = \frac{n_l(K[S]^{n_l})}{\{1 + (K[S]^{n_l})\}} \quad (9)$$

A Equação 9 corresponde àquela situação na qual os sítios de ligação da macromolécula são idênticos e independentes.

Mais realisticamente, o ligante que se liga em um sítio pode conduzir um aumento ou diminuição da afinidade de outros sítios [6,29,30]. A aproximação da Equação 9 pode ser escrita pela equação de Scatchard:

$$\frac{\nabla}{[S]} = K(n_l - \nabla) \quad (10)$$

Esta pode ser arranjada para a Equação 11:

$$\frac{1}{\nabla} = \frac{1}{n_l} + \frac{1}{(n_l K)\{1/S\}} \quad (11)$$

Através do gráfico de $1/\nabla$ versus $1/[S]$, pode-se determinar ∇ bem como K . A ligação do surfatante num sítio da proteína pode conduzir um aumento ou diminuição da afinidade por outros sítios. Isso pode ser cooperativamente positivo ou negativo. Para uma ligação positivamente cooperativa ($n > 1$), têm-se que a presença de ligantes "ligados" facilita a ligação adicional do outro.

Por outro lado, a ligação será cooperativamente negativa ($n < 1$) se os ligantes previamente ligados ajudarem a manter os outros afastados [6,29,30,55]. A interação entre proteínas e surfatantes é função da razão da concentração surfatante/proteína.

A Figura 7 mostra uma isoterma de ligação do surfatante com a albumina do soro bovino [49]. O número de moléculas de surfatante ligado por molécula de proteína pode ser determinado diretamente por técnicas de equilíbrio de diálise e cromatografia em gel [5,49,51].

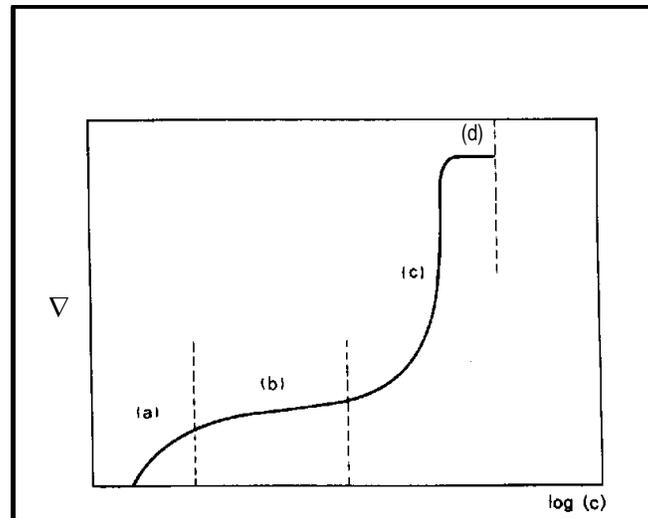


Figura 7- Representação esquemática da interação proteína/surfatante, onde ∇ é o número de surfatante ligado por molécula de proteína como função do logaritmo da concentração do surfatante livre.

Conforme se observa, a isoterma de ligação exibe três regiões distintas que podem ser definidas pela seguinte sequência de etapas [49,51,54,56]: (a) região em baixa concentração de surfatante, na qual ocorre *ligação específica* dos monômeros com sítios da proteína de alta afinidade.

Na ligação específica ocorrem interações eletrostáticas e hidrofóbicas. Esta região é muitas vezes seguida por um platô que define a ida para região (b) e nenhuma mudança conformacional da proteína é observada pela ligação dos ligantes; (b) Ligação de um número grande de monômeros que provoca uma expansão da macromolécula, neste caso, têm-se *ligação não-cooperativa*.

Entretanto, ainda não está claro se todas as proteínas passam direto desta região para a região (c); (c) À medida que a concentração de surfatante aumenta, observa-se um aumento da ligação devido às intensas ligações dos outros sítios ativos que são imediatamente preenchidos. O desdobramento estrutural da proteína provavelmente ocorre nesta região. (d) Finalmente, uma região de *saturação* é alcançada pelo excesso de surfatante adicionado. Provavelmente, pode acontecer um alongamento na cadeia macromolecular com um conseqüente aumento da viscosidade.

O ponto de saturação, em que todos os sítios de ligação da proteína estariam ocupados por moléculas de surfatantes, ocorre com 1-2 g de surfatante por grama de proteína [29,51].

A definição para a associação de surfatante e macromolécula chama-se de complexos. São assim definidos, porque ainda não se tem idéia do tipo de ligação, apenas sabe-se que as forças dirigentes são de natureza elétrica e hidrofóbica e que apresentam características distintas daquelas em que somente o surfatante está presente em solução. Nesse contexto, existem muitas técnicas que têm sido amplamente empregadas para determinar a composição desses complexos, bem como para evidenciar o início e o fim dessa intrigante associação.

3.2. Evidências da Formação de Complexos: Métodos de Investigação

Evidências da existência dos complexos de proteínas-surfatantes e de polímeros sintético-surfatantes têm sido identificadas por diversos métodos experimentais tais como, tensão superficial, condutividade elétrica, fluorescência, espalhamento de raio-X a baixos ângulos e $^1\text{H-NMR}$, etc [30,57].

3.2.1. Tensão Superficial

A tensão superficial de um líquido é a medida da energia livre interfacial por unidade de área da interface limite entre o líquido e o ar. A energia livre interfacial é a quantidade mínima de trabalho requerido para criar uma interface. Assim, a tensão interfacial pode ser definida como a quantidade mínima de trabalho requerido para criar uma unidade de área de interface ou para expandi-la por unidade de área.

Embora referenciada como energia por unidade de área, a tensão superficial pode ser expressada como força por unidade de comprimento. As unidades típicas são erg/cm^2 ou dyna/cm , dimensionalmente idênticas. As correspondentes em unidades SI são J/m^2 ou mN/m [58,59].

Moléculas de surfatantes orientam as cadeias hidrocarbônicas para um meio não aquoso. Esta orientação promove adsorção na interface conduzindo, portanto, à uma redução da tensão superficial (Figura 8). Quando a adsorção torna-se constante, devido ao aparecimento de agregados micelares, têm-se valores constantes na curva de tensão superficial. O ponto de intersecção da curva é chamado concentração micelar crítica (*cmc*), como já anteriormente definido [18,58,59,60].

A maior característica do fenômeno de adsorção é a carga elétrica da interface, pois a adsorção reduz o desequilíbrio das forças atrativas que existem na superfície, e portanto a energia livre superficial de um sistema heterogêneo. O valor da tensão superficial (γ) pode ser reduzido pela adsorção como define a lei de Gibbs, na qual relaciona o excesso de superfície (Γ) com as variações da tensão interfacial (σ) e a atividade do surfatante (c) [46,59].

$$\frac{d\gamma}{c} = d \ln \sigma \cdot c = -R.T.\Gamma \quad (12)$$

Em que R é a constante dos gases ($1,98 \times 10^{-3}$ Kcal.mol⁻¹.K⁻¹) e T é a temperatura absoluta, em graus Kelvin.

Para os sistemas complexos em que um polímero e/ou uma proteína estejam dissolvidos numa solução de surfatante, observa-se mais uma região constante num típico gráfico de γ vs. Log [surfatante].

Para o sistema PEO-SDS foram verificadas duas transições características: (i) uma é denominada *concentração de agregação crítica, cac*, e a outra (ii) de *ponto de saturação, psp*. A *cac* ocorre em baixas concentrações de surfatantes, que inicialmente foi definida por Jones, como T_1 [61].

A Figura 8 mostra que a tensão superficial é diminuída até chegar à *cac*, quando uma macromolécula está presente. Este ponto define o início da ligação dos monômeros do surfatante na cadeia polimérica do polímero ou proteína. O *psp* ocorre em concentrações mais elevadas de surfatante e corresponde ao ponto T_2 , definido também por Jones [42,49,61]. Este ponto representa a saturação da cadeia polimérica pelos agregados micelares.

Outros sistemas já definidos na literatura, como por exemplo, gelatina/SDS [62], PVP/SDS [57] e proteína/SDS [49] apresentam os dois pontos de transição nos gráficos obtidos por tensão superficial.

Schwuger e Bartnik [49] definiram que complexos formados por proteína/surfatante, mais exatamente BSA/SDS, apresentavam certo grau de atividade interfacial em concentrações baixas de surfatante. A diminuição da tensão superficial alcançava uma região horizontal quando a proteína estava presente. Estes pesquisadores definiram que o primeiro platô do gráfico de γ vs. Log [surfatante] era característico de saturação e que o segundo representava a formação adicional de micelas no meio. Os valores de *cac* e *psp* apresentam algumas características pertinentes às soluções em que complexos polímero/surfatante estão presentes em solução: (i) Da mesma forma que a *cmc*, o valor de *cac* é dependente do comprimento da cadeia hidrofóbica do surfatante e da força iônica, a presença de sal provoca a diminuição da *cac*.

Por outro lado, o ρ_{sp} aumenta na presença de sal; (ii) Os valores de ρ_{sp} aumentam linearmente com a concentração do polímero, enquanto que cac varia muito pouco; (iii) Um aumento na temperatura aumenta os valores de cac , o que torna a interação menos favorável [49,57,61].

A magnitude destes efeitos depende do balanço de solubilidade entre as partes hidrofílica e hidrofóbica das moléculas ou íons, que conduz por exemplo, a redução da tensão superficial. Esta característica influencia diretamente nas propriedades da solução como: emulsificação, dispersão, umectante, espumante, antiespumante, solubilizante, etc. Estas são algumas propriedades que proporcionam a aplicação dos surfatantes e complexos surfatantes/polímeros em formulações industriais de detergentes, têxteis, agroquímicas, cosméticas, farmacêuticas, de tintas e vernizes, processamento e tratamento de papéis, metais, petróleo, etc [45,47,49,50,58,60,61,62].

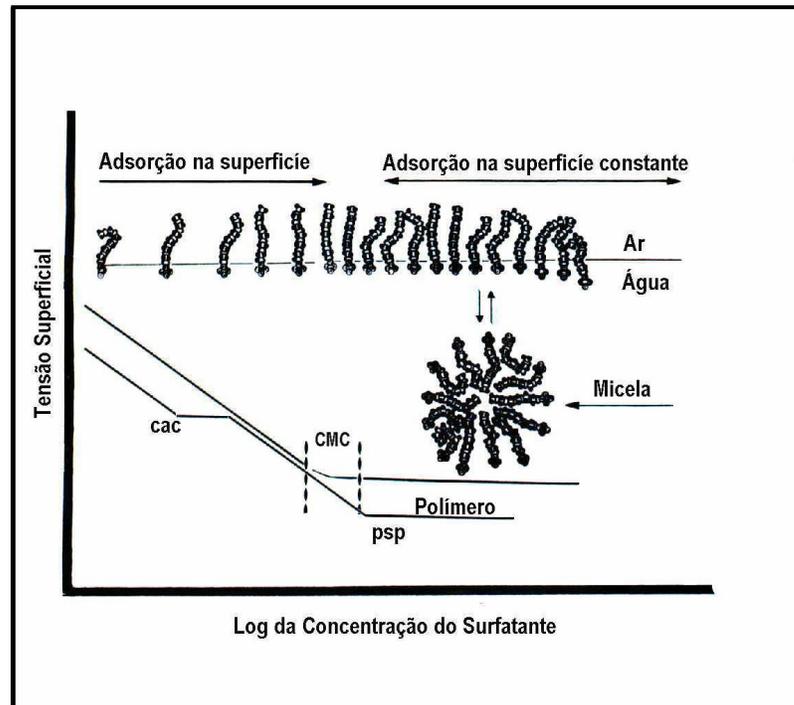


Figura 8- Variação da tensão superficial em função da concentração do surfatante na ausência (onde se observa o valor da cmc) e na presença de polímero e/ou proteína (onde se observam os valores de cac e psp).

3.2.2. Condutividade Elétrica

Medidas de condutividade fornecem informações sobre a concentração dos carregadores de carga elétrica e sua mobilidade para misturas de surfatantes. Também fornecem informações sobre a densidade de carga das micelas e seu grau de dissociação [47,49,58,59].

A técnica baseia-se na medida da resistência elétrica de soluções, já que surfatantes, quando em soluções diluídas, comportam-se como eletrólitos fortes [63]. Portanto, através do clássico perfil de condutividade versus concentração do surfatante, pode-se determinar o valor da *cmc* e o grau de ionização (α) (Figura 9).

Utilizando essa técnica também para complexos, Jones [61] investigou as mudanças na condutividade elétrica da solução de SDS provocadas pela presença de Poli(oxietileno) (PEO). O gráfico de condutividade versus concentração de surfatante em presença de polímero, exibe duas descontinuidades que estão relacionadas com o começo (*cac*) e o fim (*psp*) da ligação do surfatante na cadeia polimérica cujas definições são semelhantes às aquelas obtidas por tensão superficial na região entre o *cac* e o *psp*. Assumiu-se que agregados micelares se formam em solução, conforme é observado no perfil dos gráficos de tensão superficial e condutividade (Figura 9) [42,44,61,63].

Do gráfico de condutividade, pode-se estimar o valor do grau de ionização (α), que é definido pela razão dos coeficientes angulares da região linear do gráfico de condutividade elétrica versus [SDS], acima e abaixo da *cmc*, no caso de soluções contendo surfatante puro. Para os sistemas na presença de polímeros, o α é estimado pela razão dos coeficientes angulares da curva abaixo do *cac* e acima do *psp* [63]. O valor de α calculado por este método é geralmente grande, porque na contribuição micelar para o valor observado de condutância considera-se o mesmo número equivalente ao de íons monoméricos [64]. Outro método empregado para estimar o valor do grau de ionização é proposto por Evans [65].

Os valores de α [64,66,67,68,69,70] para dois sistemas foram calculados por diferentes processos e estão listados na Tabela 3. Os polímeros estudados foram a polivinilpirrolidona (PVP) e poli(oxietileno) (PEO) [64,67]. A Tabela 3 mostra que os complexos formados por polímero e surfatante são mais ionizados que os micelares de SDS.

Tabela 3- Valores de α para os sistemas PVP/SDS e PEO/SDS.

Sistema	Grau de Ionização	
	(a)	(b)
SDS	0,35	0,37
PEO/SDS	0,65	0,58
PVP/SDS	0,85	0,74

Referências 64 (a) e 67 (b).

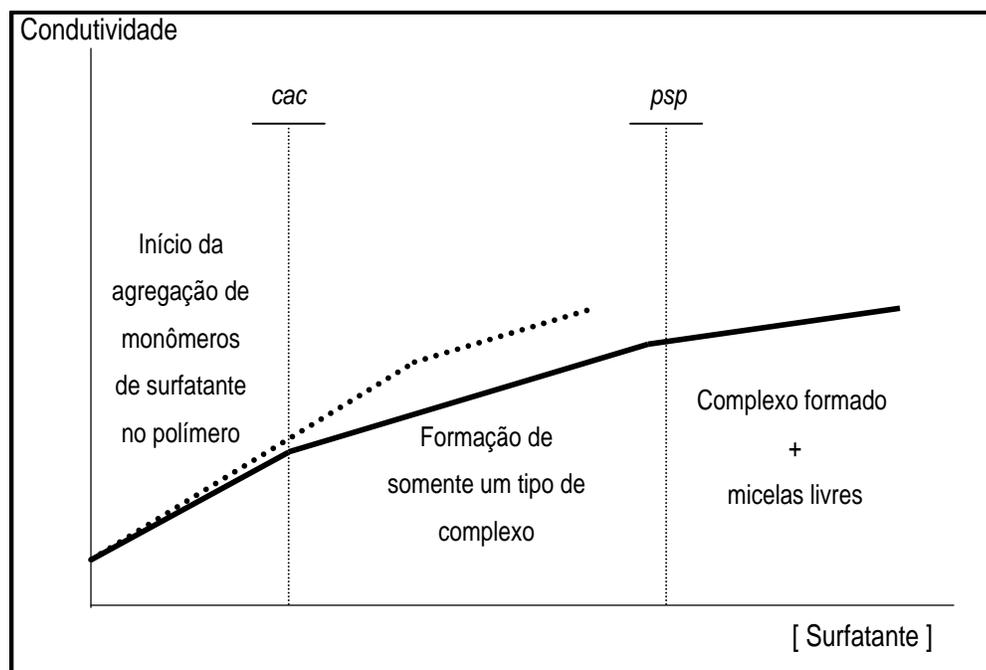
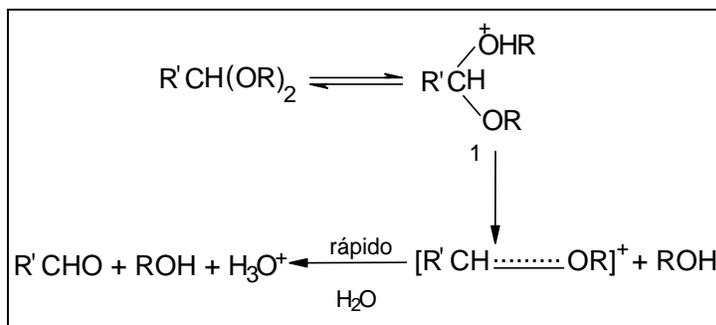


Figura 9- Representação esquemática de uma curva de Condutividade elétrica em função de [SDS] na ausência (curva tracejada) e na presença de polímero (curva cheia).

3.2.3. Catálise Micelar

Muitos acetais são hidrolisados em solução aquosa onde o mecanismo está associado à transferência do íon hidrônio no estado de transição. Nestas reações, o mecanismo é denominado de catálise específica pelo íon hidrônio (Esquema 3).



Esquema 3

Numa descrição simples a etapa determinante é a decomposição do substrato protonado 1 para formar o carbocátion e o álcool correspondente. É possível observar catálise ácida geral dessa reação de hidrólise alterando a formação do equilíbrio e acelerando a decomposição do produto. Geralmente micelas iônicas apresentam a habilidade de controlar a velocidade de reações e equilíbrios. Essas micelas aumentam a velocidade da reação catalisadas por ácido e são tratadas quantitativamente em termos da concentração dos reagentes (substratos e água) na região de interface na superfície micelar [68,70].

Em sistemas contendo micelas iônicas e complexos polímeros/surfatantes, a reação de hidrólise ácida de acetais é usada como um argumento para investigar a concentração de próton interfacial.

As reações de hidrólise de acetais em solução de SDS apresentam um rápido aumento no valor de k_{obs} e atinge um máximo da curva, o qual é consistente com a forte ligação do acetal em micelas de SDS, desde que o acetal seja suficientemente hidrofóbico. A adição posterior de mais SDS aumenta a quantidade da pseudofase micelar e isso proporciona uma diluição do acetal e dos prótons, diminuindo o valor de k_{obs} [67].

Na presença de polímeros, o perfil da curva k_{obs} versus [SDS] é diferente daquela na presença de SDS somente. A adição de polímero inibe fortemente a reação de hidrólise e as mudanças nos valores de k_{obs} dependem da concentração do polímero. O máximo da curva de k_{obs} é deslocado para concentrações mais elevadas de surfatante, sugerindo que outros agregados, além das micelas, se formam em solução.

A hidrólise de acetais, na presença de polímeros, pode ser também tratada pelo modelo *PPIE*, para uma reação bimolecular catalisada por ácido, entre um substrato neutro (S) e o próton (H^+).

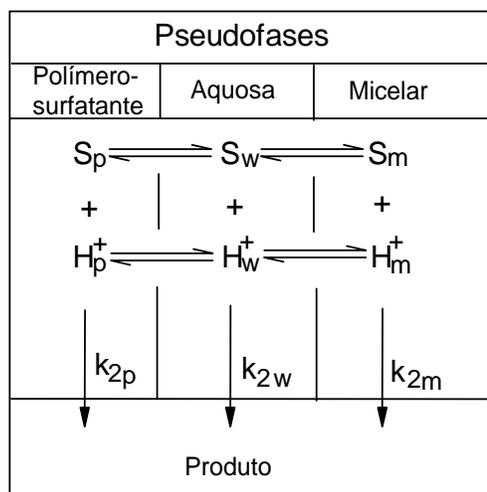
Nesse modelo assume-se que os reagentes estão em equilíbrio dinâmico entre as pseudofases aquosa, micelar e polímero/surfatante ^[27,66,71], conforme definido pelo esquema 4.

A velocidade observada é, então, a soma de cada pseudofase e é dada por:

$$k_{obs} = k_{2w}[S]_w[H^+]_w + k_{2m}[S]_m[H^+]_m + k_{2p}[S]_{2p}[H^+]_{2p} \quad (13)$$

Em que os subscritos “w”, “m” e “p” definem as pseudofases aquosa, micelar e polímero/surfatante, respectivamente. k_{2w} , k_{2m} e k_{2p} são as constantes de segunda ordem em cada pseudofase.

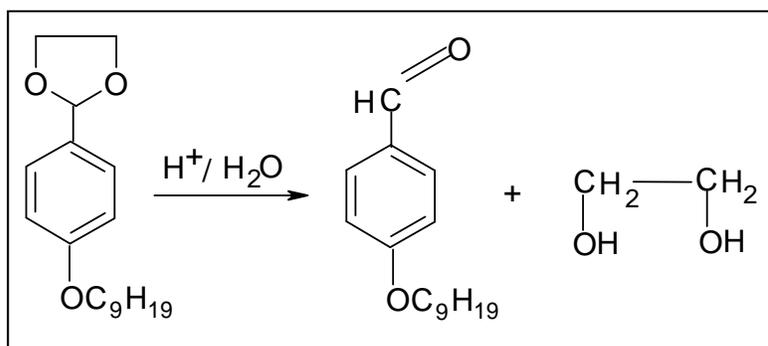
As mudanças nos valores de k_{obs} na presença de polímero são explicadas assumindo que uma fração da reação ocorre no complexo polímero/micela (Esquema 4).



Esquema 4

A inibição é induzida pelo aumento da concentração de polímero e isso é explicado assumindo deslocamento de H^+ da superfície micelar, onde está localizado o substrato, para a superfície do polímero ou para a água [71]. Por outro lado, num caso particular, pode haver formação de pré-agregados como pode ser visto na Figura 10. A Figura mostra o perfil obtido para a reação de hidrólise catalisada por ácido do substrato hidrofóbico 2-(*p*-nanoxifenil)-1,3-dioxolano [67] (Esquema 5).

Esse acetal funciona como uma “sonda cinética”, isto é, de um substrato altamente sensível às mudanças no microambiente da reação e que, portanto, consegue captar as mudanças que ocorrem nas proximidades da *cac* e do *psp*, quando estão presentes complexos polímero/surfatantes.



Esquema 5- Reação de hidrólise do 2-(*p*-nanoxifenil)-1,3-dioxolano.

É interessante observar que o valor de k_{obs} começa a aumentar próximo à *cac*. Nesse caso, a reação ocorre somente na pseudofase polímero/surfatante e também na pseudofase micelar, quando a [SDS] é grande e chega aos limites do *psp*. O valor k_{obs} diminui devido ao processo de diluição dos reagentes na pseudofase micelar. O substrato usado pode ser considerado como uma “sonda cinética” que acompanha mudanças na composição do sistema, indicando os parâmetros de ligação *cac* e *psp* [67,71,72].

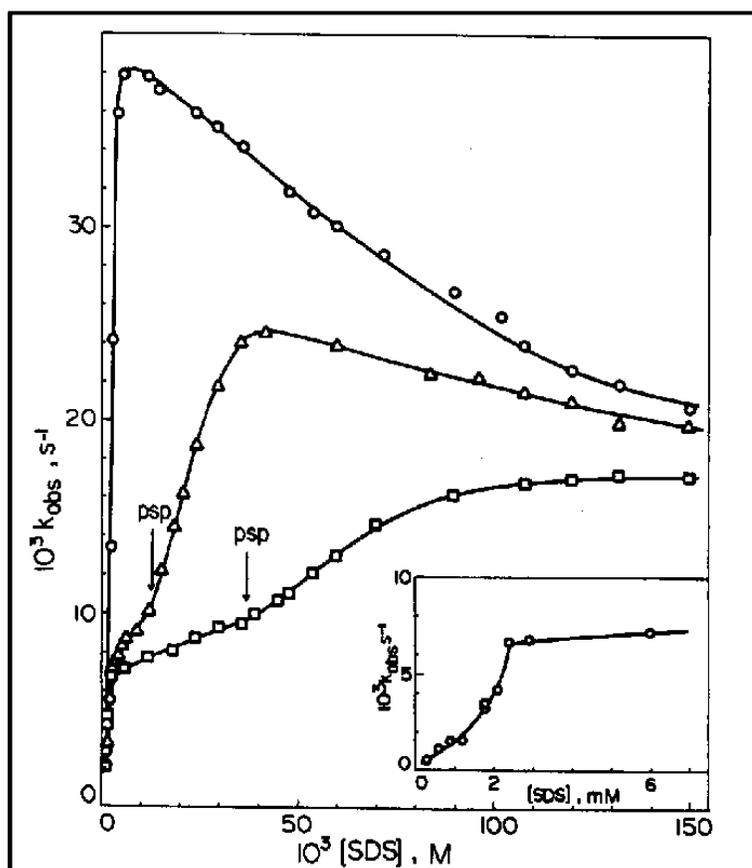


Figura 10- Efeito da adição de SDS sobre a constante de velocidade para a reação de hidrólise ácida do 2-(p-nitrofenil)-1,3-dioxolano na ausência (O) e na presença de 35 mM (Δ) e de 105 mM (□) de PEO [67].

3.2.4. Modelos Propostos para Complexos Formados por Proteína e Surfatante

Surfatantes iônicos ligam-se aos sítios ativos de proteínas e causam desdobramento da estrutura terciária. Usualmente, a perda da estrutura terciária da proteína ocorre na região “c” da isoterma de ligação (Figura 7) onde existe um significativo aumento da ligação do surfatante ocasionado pelas interações cooperativas [30].

As forças que são responsáveis pela desnaturação [29,30,45,48,50,51] de proteínas ainda são objeto de muitas investigações. No entanto, tem sido aceito que: (a) as repulsões eletrostáticas devido às cargas oriundas do ligante provocam aumento das repulsões com eventual abertura da estrutura e (b) interação da parte hidrofóbica do surfatante nas regiões apolares da proteína, o qual resulta na substituição de interações hidrofóbicas dos segmentos da proteína por interações proteína-surfatante. Então, com base nos conceitos aceitos para as forças dirigentes do processo de interação muitos modelos foram elaborados para elucidar a estrutura destes complexos proteína/surfatante em solução.

Em 1945, Lundgren e colaboradores sugeriram que o grupo fortemente polar do surfatante interage com os grupos carregados positivamente da albumina do ovo [73]. Trinta anos mais tarde, Oakes com base nos resultados de RMN, argumentou em favor de agregados tipo micelares ligados à cadeia polipeptídica da proteína [45].

Reynolds e Tanford, com base em seus resultados de viscosidade intrínseca de vários complexos proteína/surfatante, propuseram que o complexo na presença de um excesso de surfatante assemelha-se a uma longa elipsóide prolata (“rod-like”), mostrado na Figura 11(b) [74].

Shirahama e colaboradores sugeriram um modelo alternativo tipo “colar de pérolas” (necklace model), para o complexo PVP/SDS [75]. Lundahl e colaboradores propuseram que micelas cilíndricas são ligadas nos segmentos hidrofóbicos da cadeia polipeptídica arranjando-se numa estrutura flexível helicoidal. Esta ligação seria estabilizada principalmente por pontes de hidrogênio entre as espécies (Figura 11(c)) [76].

Recentemente, Teixeira e colaboradores [77], utilizando espalhamento de nêutrons a baixos ângulos, apoiaram o modelo “colar de pérolas” para complexos formados por proteínas e surfatantes em solução aquosa (Figura 11).

Turro e colaboradores propuseram um modelo para a desnaturação da albumina do soro bovino baseado em técnicas espectroscópicas e nas isotermas de ligação [56]. O modelo de Turro considera o seguinte mecanismo de desnaturação: (a) uma etapa inicial considerando a molécula de proteína no seu estado natural, (b) moléculas de surfatantes ligam-se especificamente na proteína por ligações iônicas ou hidrofóbicas, (c) ocorrência ligação cooperativa e formação de estruturas do tipo “colar de pérolas”, como o esquema estrutural da Figura 12(a), que indica uma abertura da estrutura da proteína induzida pela presença de micelas e (d) neste estágio ocorre um crescimento do agregado proteína-surfatante, com a proteína desnaturada em solução. Este modelo é observado na Figura 12.

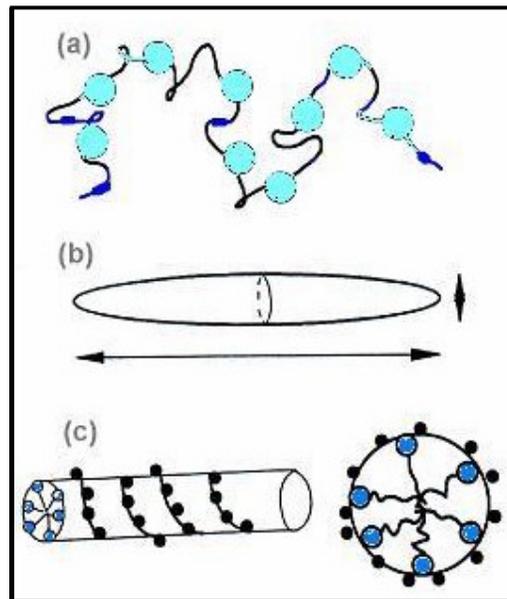


Figura 11- Representação esquemática de modelos de complexo; formado por proteína/surfatante nas seguintes estruturas: (a) modelo necklace and bead, (b) modelo rod-like, (c) modelo da hélice flexível .

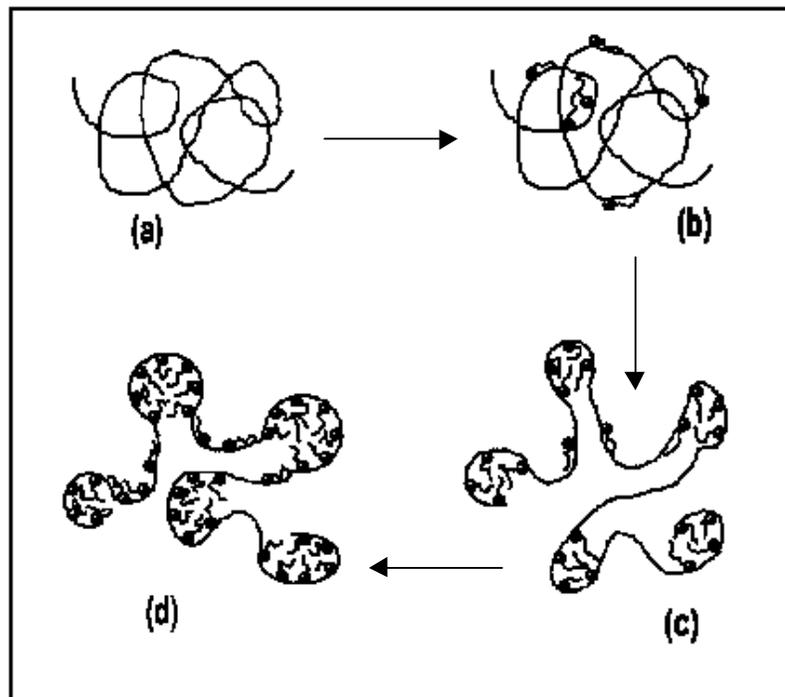


Figura 12- Representação esquemática de modelo proposto por Turro e colaboradores para complexo formado por proteína/surfatante. As letras indicam a sequência do evento de desnaturação e consiste em: (a) proteína no seu estado nativo, (b) ligação específica, (c) ligação cooperativa e (d) saturação [56].

3.2.5. Espalhamento de Raios-X a Baixos Ângulos (SAXS)

As medidas de espalhamento de raios -X a baixos ângulos fornecem valiosos detalhes sobre a estrutura de macromoléculas, tais como raio de giro, tamanho de persistência, forma e tamanho do objeto espalhador [77,78].

As curvas de SAXS de soluções de proteína na ausência e na presença de pequenas quantidades de surfatantes serão analisadas a partir da estrutura cristalográfica da albumina do soro humano (os dados da albumina do soro bovino não estão disponíveis no banco de dados-protein data bank) e da função de distribuição de distâncias $\rho(r)$ que fornece indicações do envelope (forma e tamanho) do objeto espalhador). Por outro lado, as curvas de SAXS de complexos proteína/surfatante serão analisadas através de ajuste da curva experimental ao modelo de “colar de pérolas”, conforme descrito abaixo [77].

3.2.5.1. Sistemas não interagentes: Função de distribuição de distâncias $\rho(r)$

A intensidade de espalhamento $I(q)$ de uma solução isotrópica de partículas esféricas ou esferóides de baixa anisometria (razão entre os eixos maior e menor da elipsóide) é fornecida pela equação [77,78,79]:

$$I(q) = n_p P(q) \cdot S(q) \quad (14)$$

Em que n_p é a densidade numérica de partículas (número de partículas, n , por volume V); $P(q)$ é o fator de forma da partícula e $S(q)$ é a função de interferência entre partículas; q é o vetor de espalhamento de módulo $4\pi/\lambda \sin\theta$ (λ é o comprimento de onda da radiação e 2θ é o ângulo de espalhamento).

Nesse parte, será apresentada uma breve descrição da metodologia empregada na análise dos dados. Para um maior detalhamento ver referências 80,81,82 e 83.

Para sistemas que não interagem $S(q) = 1$ a intensidade de espalhamento é relacionada diretamente à forma de partícula espalhadora. Serão estudados inicialmente sistemas não interagentes monodispersos.

Estes sistemas são caracterizados pela presença de partículas com a mesma forma, tamanho e estrutura interna.

Estas condições são normalmente encontradas em soluções de macromoléculas biológicas a diluições infinitas, nas quais a intensidade total de espalhamento é o somatório do espalhamento de cada uma das “n” partículas existentes na amostra irradiada. Variações na forma, tamanho e estrutura das partículas do sistema analisado são refletidas na função de forma do objeto espalhador $P(q)$ e conseqüentemente na função intensidade de espalhamento $I(q)$.

Nesste contexto, pode ser mostrado que a intensidade de espalhamento $I(q)$ está relacionada com a função de distribuição de distâncias $p(r)$ da partícula, tal que:

$$I(q) = 4\pi \int_0^{D_{\text{máx}}} \frac{p(r) \text{sen}(qr) dr}{qr} \quad (15)$$

A função $p(r)$ fornece informação sobre a forma da partícula espalhadora (ver exemplo na Figura 13) e da dimensão máxima, $D_{\text{máx}}$, da mesma, uma vez que $p(r) = 0$ para $r = 0$ e $r = D_{\text{máx}}$. A função $p(r)$ pode ser obtida da Equação 16 através de uma transformada indireta de $I(q)$, tal que:

$$p(r) = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^{\infty} I(q)(qr) \text{sen}(qr) dq \quad (16)$$

Na prática a função de espalhamento não pode ser determinada em todo o espaço recíproco, mas é conhecida apenas dentro de um intervalo $q_{\text{mín}} \leq q \leq q_{\text{máx}}$, o que gera efeitos de truncamento no cálculo de $p(r)$ (Eq. 16). Além disso, as flutuações estatísticas geram instabilidades na antitransformada de Fourier. Para solucionar esses problemas, existem na literatura alguns métodos de transformação indireta [80,82]. Para estimar a $p(r)$, neste trabalho foi utilizado um programa computacional chamado GNOM, desenvolvido por D.I. Svergun e colaboradores [84].

Assim, a partir da função $p(r)$ pode-se estimar a dimensão máxima da partícula e sua forma. Além disso, o raio de giro eletrônico, R_g , do objeto espalhador pode ser obtido através da relação 17:

$$R_g = \sqrt{\frac{1}{2} \int_0^{D_{\text{máx}}} p(r) \cdot r^2} \quad (17)$$

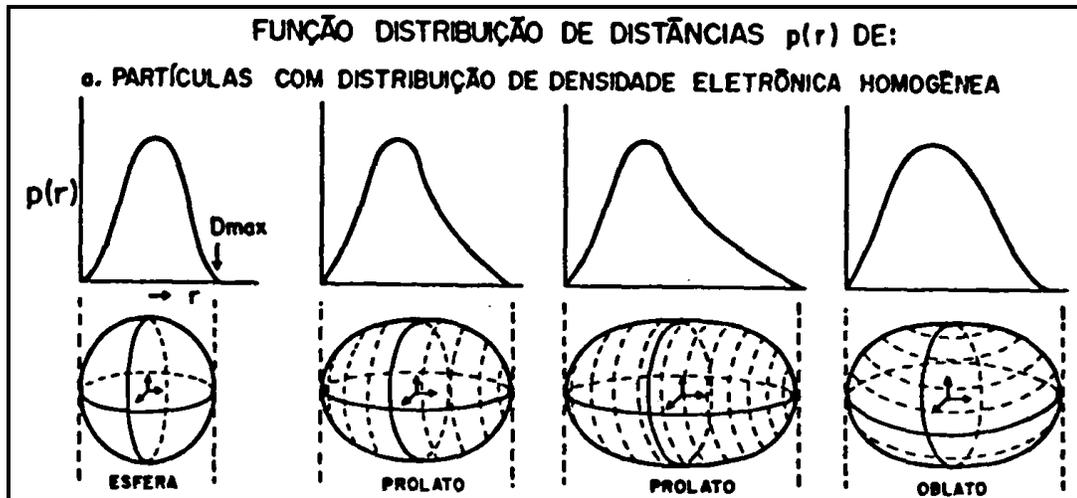


Figura 13 – As funções de distribuição obtidas estão relacionadas intrinsecamente com a estrutura do objeto espalhador (eq. 28). A curva de distribuição perfeitamente simétrica se correlaciona com uma esfera; já a curva de distribuição não-simétrica e alongada corresponde à forma elipsóide prolata^[80]. Quanto mais anisométrico for o objeto espalhador, mais alongada é a função $p(r)$. O diâmetro máximo da partícula ($D_{máx}$), é obtido quando $p(r) \rightarrow 0$ para $r \geq D_{máx}$.

3.2.5.2 Espalhamento de Proteínas em Solução a partir das Coordenadas Atômicas

Neste trabalho será utilizado um programa de computador (CRYSOL) desenvolvido por Svergun e colaboradores [85], que calcula o espalhamento de macromoléculas a partir da estrutura cristalográfica conhecida. Dadas as coordenadas atômicas (provenientes do banco de dados da proteína -PDB), o programa gera a correspondente curva de espalhamento da proteína em solução que pode ser comparada à curva experimental de SAXS. Para maiores detalhes ver referência [85].

3.2.5.3. Complexos Proteína-Surfatante: O Modelo do “Colar de Pérolas”

Tem sido sugerido que a estrutura de agregados de complexos formados por proteínas e surfatantes é consistente com o modelo de “colar de pérolas”, no qual as cadeias polipeptídicas, sob a ação da interação com o surfatante, tomam-se mais flexíveis e os agregados de monômeros, tipo micelas, distribuem-se ao longo da proteína estendida, conforme Figura 11(a) [77].

A partir da equação 28, o fator $P(q)$ pode ser modelado de acordo com a geometria da partícula.

Nesse caso, a micela será modelada numa forma elipsoidal e prolata com dois níveis de densidade eletrônica diferentes em relação ao solvente, $\rho_{\text{par}} = 0,275$ (parâmetro fixo) que representa a densidade eletrônica da cadeia parafínica (cuja unidade é dada por $e/\text{Å}^3$) e ρ_{pol} (primeiro parâmetro livre), densidade eletrônica da camada polar em relação ao solvente. Para a água $\rho_0 = 0,327 e/\text{Å}^3$ (parâmetro fixo). O modelo micelar para $P(q)$ é mostrado na Figura 14(a).

Para micelas de SDS o semi-eixo menor do elipsóide, que corresponde ao tamanho da cadeia estendida [86], fornece $R_{\text{par}} = 16,7 \text{ Å}$. Tem-se ainda, como segundo parâmetro v , correspondente à anisometria da micela. O terceiro parâmetro de ajuste é σ , correspondendo à espessura de região polar (incluindo as cabeças polares mais a água de hidratação).

Quando se usa o modelo de esferóide de revolução de semi-eixos R_{par} (Figura 14(b)), $P(q)$ é definido pela Equação 18 [77]:

$$P(q) = \int_0^{\pi/2} \left[(\rho_{par} - \rho_{pol}) V_{par} \wp(R_{par} q g_1(\theta)) + (\rho_{pol} - \rho_0) V_{pol} \wp((R_{par} + \sigma) g_2(\theta)) \right]^2 \cos \theta d\theta$$

Onde: $\wp(u) = 3[(\sin u - u \cos u)] / u^3$ (18)

V_{par} é o volume da região parafínica e V_{pol} é o volume total da partícula, e $g_1(\theta) = (\cos^2 \theta + v^2 \sin^2 \theta)^{1/2}$ e $g_2(\theta) = (\cos^2 \theta + v'^2 \sin^2 \theta)^{1/2}$. O parâmetro v' é a razão axial da partícula inteira (incluindo a região polar de espessura σ), definida por $v' = (vR_{par} + \sigma) / (R_{par} + \sigma)$.

Da Equação 18 observa-se que $P(q)$ depende essencialmente dos três parâmetros, σ , ρ_{pol} e v . O parâmetro v está relacionado com número de agregação médio \bar{n} que, para um prolato, é computado diretamente da relação de volume $\bar{n} v = 4\pi v R_{par}^3 / 3$, onde $v = 350 \text{ \AA}^3$ é definido como sendo o volume máximo por cadeia dodecânica relacionada com o volume específico da cadeia hidrocarbônica.

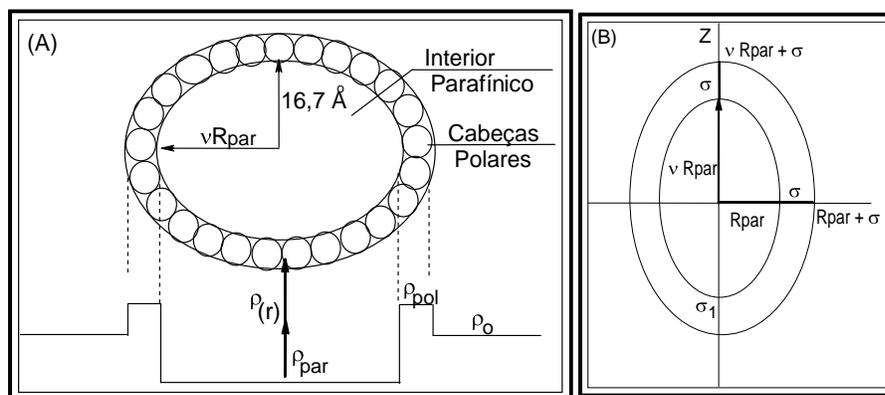


Figura 14— (a) Modelo micelar esquemático mostrando os parâmetros do ajuste v , σ e ρ_{pol} e (b) Modelo para uma micela elipsoidal. O eixo de revolução é z , e a espessura σ da região polar é quase constante.

No modelo de “colar de pérolas”, o fator $S(q)$ (Eq 14) é definido em analogia com o “modelo fractal” [77,87]. Esse assume que complexos formados por proteína/surfatante apresentam uma estrutura consistente de um “colar” de agregados micelares, aleatoriamente distribuídos ao longo da cadeia polipeptídica.

Assim, $S(q)$ pode ser definido em termos de uma função de correlação de pares $g(r)$ dada por:

$$S(q) = 1 + n_p \int_0^{\infty} dr 4\pi r^2 \frac{\sin qr}{qr} g(r) \quad (19)$$

Em que $g(r) = (D / 4\pi n_p) (1 / R_m^D) r^{D-3}$. Num espaço dimensional D , o número de espalhadores individuais $N(r)$ dentro de uma esfera de raio r é dado por $N(r) = (r / R_m)^D$. Então, D é a dimensão fractal do agregado micelar. Se $D=3$, têm-se esferas num arranjo compacto. Em geral, D pode ser um número fracional < 3 para empacotamento com estruturas abertas ($D \approx 1$, arranjo quase linear). Além disso, no modelo espera-se que a correlação entre micelas tenha um alcance limitado.

Portanto, assume-se que a correlação micela-micela tem alcance finito ξ , que é uma medida da extensão da cadeia polipeptídica desnaturada [77]. Assim, a Equação 19 pode ser escrita como:

$$S(q) = 1 + n_p \int_0^{\infty} dr 4\pi r^2 \frac{\sin qr}{qr} g(r) \exp(-r / \xi) \quad (20)$$

Substituindo por $g(r)$ na Equação 20, tem-se:

$$S(q) = 1 + \frac{1}{(QRm)^D} \frac{D\Gamma(D-1)}{[1 + (Q\xi)^{-2}] [(D-1)/2] \text{sen}[(D-1) \tan^{-1}(Q\xi)]} \quad (21)$$

Na qual R_m é o raio micelar equivalente de mesmo volume da elipsóide modelado por $P(q)$. Neste contexto, os parâmetros de ajuste da função $S(q)$ são D e ξ , que correspondem a dimensão fractal e o tamanho de correlação, respectivamente.

3.2.5.4. Forma da Curva de Espalhamento para Polímeros Naturais

Um importante modelo relacionado com a estrutura de soluções macromoleculares é denominado de “Wormlike chain”. Ele considera uma cadeia cujo eixo é submetido à contínua e completa mudança aleatória da direção de todos os pontos ao longo do eixo. O grau de espiral é caracterizado por um “tamanho de persistência P ”, que está relacionado com a conformação do polímero em solução [82].

A curva de espalhamento a baixos ângulos de cadeia da macromolécula “dissolvida”, freqüentemente atribui-se à curva Gaussiana consistente com três regiões (Figura 15). A parte mais interna da curva segue, aproximadamente, uma curva Gaussiana, devido a forma total da partícula globular. Portanto, um gráfico de Guinier [87] desta parte da curva fornece o raio de giro da partícula toda. Devido à reciprocidade entre o ângulo de espalhamento e a dimensão da região de espalhamento, a forma da curva espalhada em valores altos de ângulos será dominada por elementos estruturais. Tamanho destas estruturas diminui com o aumento do ângulo de espalhamento.

A região externa da curva, correspondente a parte final da curva de espalhamento (altos ângulos), é consistente com a forma de “agulhas”, pois $I \approx 1 / 2 \theta$, uma vez que nesta região têm-se uma maior resolução da estrutura que apresenta-se aproximadamente linear quando comparada ao diâmetro da cadeia que parece ser consistente para polímeros naturais. Porém, como esse corte transversal é de área finita, têm-se para uma molécula “coil” (encaracolada) e a intensidade é dada por:

$$I = \frac{I_c x l}{2\theta} \quad \text{e} \quad I_c = I x 2\theta \quad (22)$$

Na qual I_c é o fator da seção transversal a qual é determinada pela dimensão da seção transversal.

A parte intermediária da curva I versus 2θ , originando as subseções maiores da molécula na qual pode-se visualizar como arranjos aleatórios da estrutura polimérica, segue uma relação definida por $I \times (2\theta)^2$. Construindo-se um gráfico de $I \times (2\theta)^2$ versus 2θ , esta região torna-se horizontal (Figura 15(b)), e a parte final da curva segue uma linha ascendente, cuja extrapolação passa pela origem.

O valor da abscissa $(2\theta)^*$ do ponto de interseção P das duas linhas de extrapolação, é um importante parâmetro característico relacionado com a forma da macromolécula.

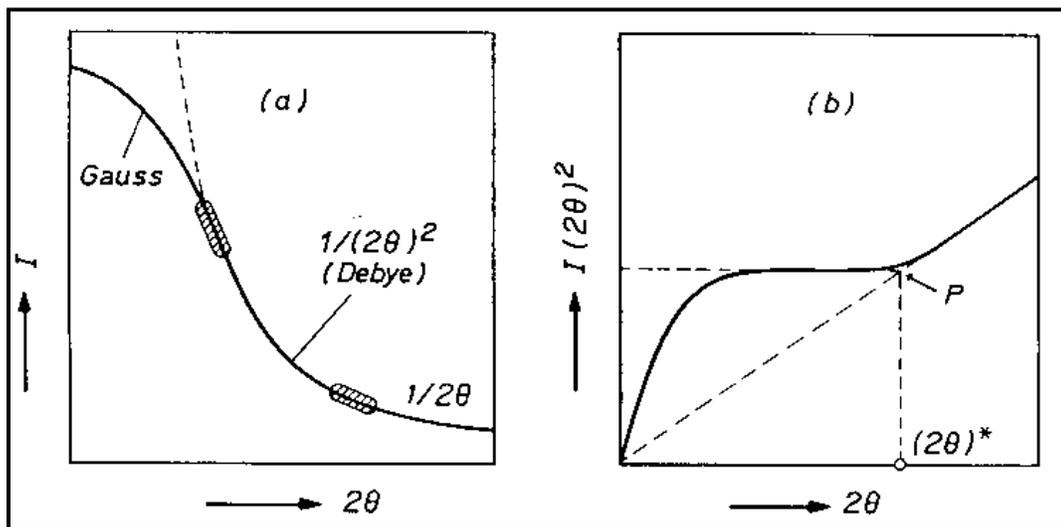


Figura 15- A figura (a) mostra uma curva de Intensidade de espalhamento versus o ângulo de espalhamento para uma solução polimérica. A figura (b) mostra o tratamento matemático da figura (a) que considera a curva de $I(2\theta)^2$ versus 2θ fornecendo o "Tamanho de persistência P".

4. Objetivos

As propriedades químicas de uma molécula de proteína dependem exclusivamente de seus grupos expostos na superfície, que são capazes de formar ligações com moléculas de surfatantes, por exemplo. Com isso uma variedade de pesquisas tentam elucidar esse mecanismo e a estrutura destes agregados em solução. Com isso, chega-se às idéias do tipo de equilíbrio que acontece em concentrações abaixo e acima da *cmc*, e o quanto de surfatante está ligado na molécula de proteína, e o quanto isso afeta as propriedades da solução. Em alguns casos, esses sistemas complexos causam inibição da velocidade de reações de hidrólise de acetais [67].

Então, conforme apresentado na Introdução, o principal objetivo deste trabalho é estudar a influência de agregados formados por uma proteína globular, tipo albumina do soro bovino, com o dodecilsulfato de sódio na reação de hidrólise ácida dos acetais 2-naftaleno-1,3-dioxolano (2-ND) e o di-*tert*-butilbenzaldeído (BTBA).

A utilização das técnicas físico-químicas é relevante nos estudos de interação entre polímeros neutros hidrossolúveis e surfatantes, bem como, as interações entre biomoléculas.

Considerando o grande interesse industrial exemplificado no item 3.2.1 destes complexos, pretende-se:

- (i) Estudar o comportamento na superfície dos complexos BSA/SDS e também PEO/SDS, por medidas da tensão superficial, determinando os parâmetros de ligação *cac* e *psp*. O que são definições importantes, pois tratam das mudanças estruturais que ocorrem em solução;
- (ii) Observar as mudanças que ocorrem nas propriedades da solução, por medidas de condutividade elétrica, determinando também os valores de *cac* e *psp* e do grau de ionização dos complexos;
- (iii) Conhecer a reatividade química dos complexos BSA/SDS e PEO/SDS na reação de hidrólise dos acetais 2-ND e BTBA, e avaliar os fatores responsáveis pela modificação da constante de velocidade observada com efeitos de concentração e mudanças do pH aparente;
- (iv) investigar a estrutura dos complexos através de medidas de espalhamento de raio-X a baixos ângulos, obtendo informações sobre o raio de giro e parâmetros relacionados com a forma da micela e modificação estrutural dos complexos. Finalmente, comparar os dados obtidos por cinética, condutividade elétrica e SAXS com modelo do “colar de pérolas” definido na literatura para os complexos BSA/SDS.

CAPÍTULO II

PARTE EXPERIMENTAL

CAPÍTULO II: EXPERIMENTAL

2.1. MATERIAIS

Os ácidos utilizados para preparar os tampões foram, o succínico proveniente da General Purpose Reagent e bórico proveniente da Química Fina, ambos com grau P.A. O ácido clorídrico, hidróxido de sódio e cloreto de sódio foram obtidos da Merck e Sigma, respectivamente.

A sonda de pH, piridina-2-azo-p-dimetilanilina (PADA), foi proveniente da Aldrich. O rutênio bipyridíneo ($Ru(bipy)_3^{+2}$) e o 9-metilantraceno foram obtidos da Aldrich.

O dodecilsulfato de sódio foi procedente da Sigma com 98% de pureza. O perfil de tensão superficial do SDS, não apresentou nenhum mínimo referente à presença de impurezas.

A proteína, albumina do soro bovino (BSA) foi obtida pela Sigma da fração V (Lot 56H0659) com 98-99% de pureza, apresentando principalmente as globulinas. O poli(oxietileno) (PEO) foi obtido da Aldrich, com peso molecular médio 10.000 daltons. Ambos foram utilizados sem prévia purificação.

2.2. MÉTODOS

2.2.1. Preparação dos substratos

O substrato, acetal di-terc-butil benzaldeído (BTBA) foi preparado de acordo com metodologias já descritas [70,89].

O 2-naftaleno-1,3-dioxolano foi preparado segundo Fife, reagindo 2-naftaldeído com etileno glicol na presença de ácido p-tolueno sulfônico, utilizando benzeno como solvente [80].

Num balão de fundo redondo de 50 mL foram adicionados 10 mmoles do dioxolano, 6,2 g de etileno glicol (excesso), 1 mmol de ácido p-tolueno sulfônico e 75 ml de benzeno seco. Adaptou-se ao balão um aparelho de Dean-Stark. Foram adicionados um agente secante (carbonato de sódio). A reação permaneceu em refluxo por 5 dias à temperatura de 50°C. O produto sólido foi recristalizado com metanol à quente e seco à vácuo, onde obteve-se um rendimento de 60%. Inicialmente foi caracterizado por (i) infravermelho, no qual se observou o completo desaparecimento da banda em 1665 cm^{-1} referente ao grupamento C=O do aldeído.

(ii) O espectro de RMN ^1H (referência interna TMS e CDCl_3 como solvente), que mostra um pico em $\delta = 6,0$ e $4,1$ ppm referente ao próton do carbono ligado ao oxigênio e os prótons dos grupamentos CH_2 do dioxolano, respectivamente. (iii) ^{13}C na qual mostra um pico em $\delta = 104$ ppm referente ao átomo de carbono entre os anéis (apêndices 1, 2 e 3).

2.2.2. Preparação das Soluções

As soluções estoques da BSA e do PEO foram preparadas pesando quantidades em massa e submetidas à uma suave agitação por 12h para completa solubilização.

As soluções estoques 0,10 M de SDS, em tampão succinato 0,020 M, foram preparadas titulando com hidróxido de sódio misturas apropriadas de ácido succínico, na presença da BSA ou de PEO, até atingir o pH desejado.

Todas as soluções foram preparadas com água destilada e desmineralizada através de um sistema do tipo Milli-Q Water System.

As medidas de pH foram feitas utilizando um eletrodo combinado de vidro acoplado num pHmetro Beckman modelo $\Phi 71$, calibrado com padrões pH 4 e 7 para as soluções de SDS e pH 7 e 10 para as soluções de SDoD, na temperatura desejada.

2.2.3. Tensão Superficial

As medidas de tensão superficial foram feitas utilizando o tensiômetro da Microquímica Modelo MQ-STI conectado numa bomba de injeção de fluxo de marca Orion, modelo 352.

O método utiliza o peso ou o volume da gota ^[58,59], e consiste em medir o volume da gota de um líquido que se desprende livremente na extremidade inferior de um tubo de vidro estreito, mantido na vertical, colocado entre um sensor fotovoltáico. O valor da tensão superficial foi feito pela média do volume de cinco gotas ^[58,59,89].

Todas as medidas foram efetuadas à temperatura ambiente utilizando um fluxo de vazão da solução titulante de 10mL/h. As soluções diluídas foram preparadas a partir de misturas de uma solução estoque de 0,1 M de SDS e de tampão (com ou sem polímero) no pH desejado. Após a preparação, elas eram filtradas com filtro de nylon de porosidade 0,22 μm . A Figura 16 mostra a curva de tensão superficial para o SDS. O valor *cmc* foi dado pelo ponto de interseção das retas e para este medida foi encontrado com sendo de 3,98 mM.

2.2.4. Condutividade Elétrica

As medidas de condutância foram feitas em uma cela de diluição termostaticada conectada em um condutímetro Analion Modelo C-170 equipado com eletrodo de platina, acoplado em um computador através de uma interface MQ 12 bits A/D. A técnica consistia em adicionar o eluente (solução do surfatante) através de uma seringa de 20 mL conectada numa bomba de fluxo da marca Orion modelo 352, que foi interfaciada ao computador. Os dados de condutividade foram armazenados no computador e graficados versus a concentração molar do surfatante.

Utilizou-se também um condutímetro ATI-ORION, Modelo 170. As titulações foram feitas adicionando pela adição de alíquotas da solução 0,1 M do surfatante em 12 mL da solução tampão, previamente termostaticada à temperatura desejada e agitada suavemente. A adição da solução estoque foi feita através de uma bureta Metrohm Herisau Multi-Burete E 485. Os dados de condutividade foram transportados manualmente para o programa ORIGIN 3.0 que fornecia um gráfico de condutividade elétrica versus concentração do surfatante. A Figura 17 mostra a curva de condutividade para a solução de SDS em tampão succinato de sódio, o valor da *cmc* foi encontrado pela interseção das retas foi 3,40 mM.

A *cmc* do SDS em água foi 8,35 mM e está de acordo com o valor de 8,32 mM [90,91,92].

Para os sistemas onde há formação de complexos na presença da proteína ou do polímero, os parâmetros de ligação *cac* e *psp* foram calculados a partir do final da região linear abaixo da *cmc* e do começo da região linear em valores maiores que a *cmc* do surfatante puro, respectivamente.

O grau de ionização (α) para micelas de dodecilsulfato de sódio foi estimado utilizando a definição de Lianos e Lang [91] $\alpha = S_2 / S_1$, onde S_1 e S_2 correspondem aos coeficientes angulares das retas obtidas através dos gráficos de condutividade elétrica [91,92].

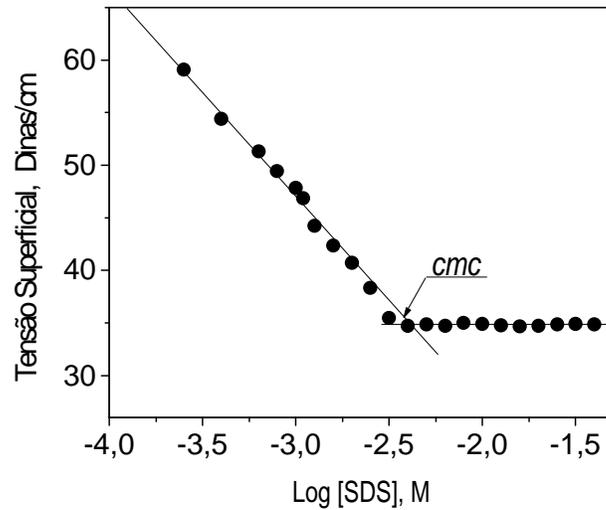


Figura 16- Gráfico da tensão superficial versus concentração de SDS em 20 mM de tampão succinato de sódio, pH=5,6 à temperatura ambiente (25 °C).

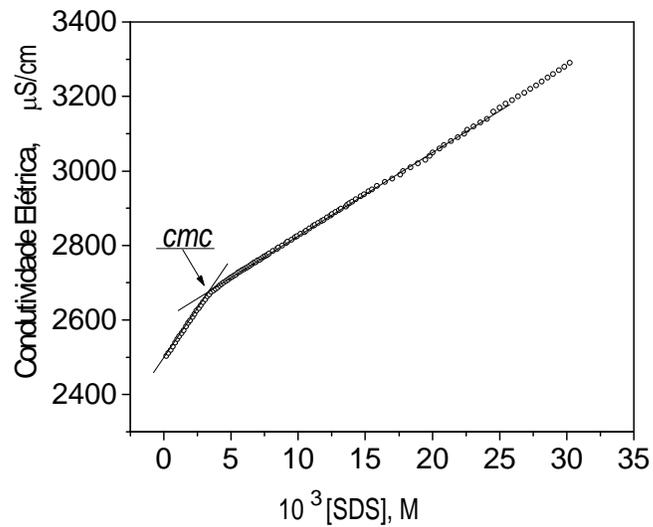


Figura 17- Gráfico da condutividade elétrica de uma solução de SDS em 20 mM de tampão succinato de sódio, pH=5,4, à 25,0 °C. O ponto de interseção é definida pela concentração micelar crítica (cmc).

2.2.5. Medidas Cinéticas

As reações de hidrólise do BTBA e do 2-ND foram feitas pela adição de 10 μL da solução estoque do acetal (3×10^{-2} M em acetonitrila seca) em 2,5 mL da mistura da solução tampão de succinato, 20 mM pH=5,4 com a solução estoque do surfatante, a 30,0 °C. A formação dos produtos, benzaldeído e β -naftaldeído, foram seguidos espectroscopicamente em 252 e 340 nm, respectivamente. Foram utilizados os espectrofotômetros HP UV 8452-A e Ultra VGA 1280 Hewlett Packard Vectra XA 8453. As medidas foram feitas numa cubeta de quartzo de caminho ótico de 1 cm.

As reações de hidrólise foram realizadas em condições cinéticas de pseudo-primeira ordem. Os valores de absorbância obtidos em função do tempo foram coletados num computador, e os valores da constante de velocidade foram estimados através de um programa HP 89532K. O desvio padrão sobre os valores de $\text{Log}(A_{\infty} - A)$ versus tempo foi menor que 10^{-5} .

2.2.6. Determinação do pH aparente (pHapp)

O pHapp interfacial das soluções aquosas contendo SDS e misturas de BSA/SDS e PEO/SDS, em 20 mM de tampão succinato de sódio pH= 5,4 à 30 °C; foi estimado utilizando a sonda indicadora de pH, piridina-2-azo-p-dimetilanilina (PADA) [71], determinada por espectrofotometria de absorção através das Equações 23 e 24:

$$pKa = pHapp + \text{Log} \left(\frac{[AH^+]}{[A]} \right) \quad (23)$$

$$\frac{[AH^+]}{[A]} = \frac{(A - A_{\min})}{(A_{\max} - A)} \quad (24)$$

Os valores de A_{\max} e A_{\min} representam as absorbâncias das espécies protonada e desprotonada, respectivamente, enquanto A é a absorbância na presença de BSA, ou PEO ou ainda de SDS somente. As medidas das absorbâncias foram feitas seguindo a variação da banda de absorção no comprimento de onda $\lambda_{\max} = 555$ nm, utilizando o espectrofotômetro Ultra VGA 1280 Hewlett Packard Vectra XA 8453. As soluções foram feitas na cubeta através de misturas de soluções tamponadas (com ou sem polímero) e solução contendo o surfatante.

As soluções foram preparadas fixando-se as concentrações de polímeros (0,1-1,0 %) e variando as concentrações de SDS. A seguir, adicionava-se um volume de 10 μL de uma solução de PADA (1×10^{-3} M em acetonitrila) em um volume de 2,0 mL da solução a ser analisada. A concentração final de PADA foi de 5×10^{-6} M. O valor de pH_{app} foi calculado a partir das equações 23 e 24 utilizando o valor de pK_a do PADA como sendo 4,5 [71]. Os espectros de absorção foi registrado logo após adição de PADA. Os valores de A_{max} e A_{min} foram obtidos com soluções de 0,10 M de NaOH e de HCl, respectivamente.

2.2.7. Medidas de Fluorescência: Determinação do Número de Agregação

As medidas de intensidade de fluorescência foram feitas num espectrofotômetro Hitachi modelo F-4500 equipado com uma cela termostatizada a 30 $^{\circ}\text{C}$. Os dados de fluorescência estática foram usados para determinar o número de agregação (\bar{N}) de misturas de SDS e de BSA, em tampão succinato de sódio $\text{pH}=5,4$.

A técnica utilizada compreende a supressão da fluorescência do cloreto rutênio tris(2,2-bipiridil), íon $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{+2}$, pelo supressor 9-metilantraceno (5×10^{-3} M). Inicialmente, o supressor ficou em contato com as diferentes soluções de SDS por duas horas. A concentração molar de micelas associadas a proteína [M] foi determinada a partir dos gráficos do logaritmo das razões de intensidade de uma solução $5,0 \times 10^{-6}$ M de $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{+2}$, $\ln \left(\frac{I_0}{I} \right)$ versus a concentração molar do supressor [MA] e \bar{N} foi estimado a partir das inclinações, $\frac{\bar{N}}{C_T - c_{ac}}$, onde C_T é a concentração total do surfatante [66].

As fendas selecionadas foram de 5 nm para excitação e 20 nm para emissão, respectivamente. Todo o experimento foi conduzido em uma cela de 10 mm de comprimento, e as amostras excitadas em 450 nm.

2.2.8. Medidas de Espalhamento de Raio-X a Baixos Ângulos (SAXS)

Os experimentos de SAXS foram feitos em colaboração com o Instituto de Física da USP (IFUSP) e os dados foram obtidos na linha de Espalhamento de Raios X a Baixos Ângulos do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Campinas, SP/Brasil. O esquema da estação experimental do LNLS está representado pela Figura 18. As medidas foram feitas à temperatura ambiente por intervalos de 15 minutos, alternando-se amostras de proteína e solução tampão (branco). O comprimento de onda foi de $1,608 \text{ \AA}$ e a distância da amostra ao detector de 723 mm . Os experimentos foram repetidos após 4-8 horas e os resultados foram reprodutíveis.

As amostras de SDS em tampão succinato de sódio pH= 5,4 (com e sem proteína) foram acondicionadas numa cela plana especial de teflon revestida por duas janelas de "Mylar" (plástico impermeável e de baixa atenuação do feixe de raios-X). As amostras foram colocadas no porta-amostra com auxílio de microseringas descartáveis. As curvas de espalhamento de cada amostra foram corrigidas pelo espalhamento do tampão, pela sua atenuação, normalizada pela intensidade de feixe direto monitorado ao longo de medida e, finalmente corrigida pela homogeneidade do detector linear sensível à posição.

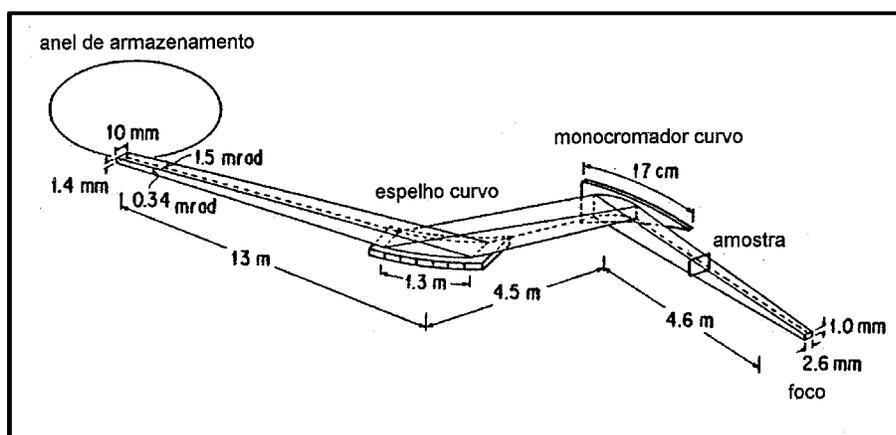


Figura 18- Estação experimental de SAXS do LNLS. Em geral, a linha de SAXS é formada por: (a) conjunto de fendas de entrada que define o feixe vindo da fonte, (b) espelho de raio-X, (c) monocromador, (d) caminhos de vácuo para o feixe incidente e para o feixe espalhado, (e) conjunto de fendas anti-parasíticas, (f) porta amostras e (g) detector de raio-X.

CAPÍTULO III

RESULTADOS E DISCUSSÃO

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Desde que o modelo de complexos formados entre o SDS e a BSA foi sugerido como constituído de um arranjo de agregados, ao longo da cadeia proteica [56,77], tipicamente de estruturas micelares, aplicaram-se os fundamentos e características catalíticas que as micelas iônicas exercem sobre reações químicas para investigar as características cinéticas e catalíticas em misturas de proteína e surfatante iônico. O sistema SDS-BSA foi escolhido porque é o que tem sido mais utilizado como modelo em diferentes estudos já que, os inúmeros resultados e interpretações estruturais; que a literatura acumulou nas últimas três décadas, poderão servir como base para uma ampla discussão sobre a relação estrutura- propriedades e resultados cinéticos.

Acetais são substratos que têm sido usados, extensivamente, em nosso laboratório para verificar os efeitos catalíticos exercidos por sistemas tipicamente micelares com interfaces carregadas. A vantagem do uso destes substratos é de que eles facilitam a interpretação quantitativa dos dados cinéticos com o uso da teoria de catálise micelar e, principalmente, com a aplicação do formalismo do modelo da pseudofase de troca iônica (PPIE) [27,28,67,92,93]. Além disso, a velocidade da reação depende das concentrações de H^+ e do substrato em ambas as pseudofases. Por outro lado, a interpretação de reações bimoleculares tem sido amplamente feita com sucesso [67,70] facilitando, neste caso, o seu uso em sistemas micelares para monitorar o comportamento desses sistemas organizados com relação à habilidade de concentrar próton e substrato.

Assim, neste trabalho, foram usados dois substratos diferentes, o di-terc-butilbenzaldeído (BTBA) e o 2-naftaleno-1,3-dioxolano (2-ND). O sucesso do uso do BTBA, tanto na ausência [70] como em presença de PEO e PVP [67], ficou limitado pela condições experimentais relativas ao acompanhamento cinético da formação do benzaldeído, em 252 nm.

Neste comprimento de onda; diferentes segmentos de amino ácidos da proteína, como o triptofano; absorvem fortemente na região 282 nm, competindo com a contribuição a absorção do benzaldeído. Dessa forma, o trabalho cinético com este substrato ficou limitado somente a baixas concentrações de BSA.

Para expandir a faixa de concentração de BSA que pudesse ser estudada, preparou-se um acetal derivado do 2-naftaldeído e, assim, devido à sua estrutura cromofórica, foi possível monitorar o aparecimento do produto de hidrólise em 340 nm, evitando a da interferência espectral da proteína.

Pôde-se, assim, monitorar o efeito da concentração em concentração de BSA até 1 %. Será dada ênfase na discussão dos resultados cinéticos obtidos com o 2-ND, embora ambos com os substratos exibem equivalentes comportamentos dos perfis cinéticos como veremos adiante.

Discutiremos inicialmente como pode ser caracterizada a fase de agregação, isto é, identificar o início e o final da ligação do surfatante na cadeia macromolecular da proteína e, em seguida, discutiremos os efeitos cinéticos da reação de hidrólise do 2-ND em presença de SDS e em misturas de BSA/SDS, em idênticas condições experimentais, isto é, em tampão succinato, pH 5,40, a 30 °C.

3.1. Hidrólise do 2-ND na Presença de SDS

A maioria dos acetais hidrolisam-se por um mecanismo de transferência do íon hidrônio no estado de transição e a reação é catalisada especificamente pelo íon hidrogênio. Alguns acetais, no entanto, como o acetal do di-*tert*-butilbenzaldeído (BTBA), com estruturas estericamente impedidas, alteram o mecanismo da reação hidrolisando-se também via catálise ácida geral [17,26,70]. A hidrólise do 2-ND, numa simples descrição, ocorre numa primeira etapa da reação de hidrólise que envolve um pré-equilíbrio dirigido pela protonação do átomo de oxigênio, e uma etapa lenta que consiste na decomposição unimolecular do intermediário protonado (Esquema 6).

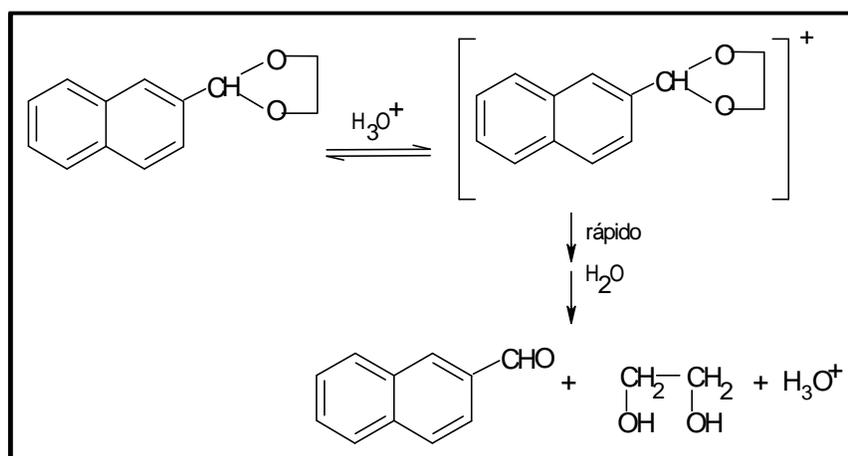
Na ausência de BSA, o perfil cinético; apresentado na Figura 19, é semelhante a outros já publicados para reações bimoleculares de substratos hidrofóbicos, tais como *p*-nitrofenil octanoato de sódio [24,26,28,67,70].

Assim, o aumento de k_{obs} , até atingir o máximo em $\approx 0,030$ mM de SDS, é consistente com o comportamento de um substrato pouco hidrofóbico. Os valores da constante de ligação aumentam com a hidrofobicidade do substrato, isto é, com o comprimento da cadeia alquílica. Por exemplo, o valor de K_s para o acetato de 2,4-dinitrofenila e do octanoato de 2,4-dinitrofenila foi estimado por Frescura e colaboradores como sendo 50 M^{-1} e 1550 M^{-1} , respectivamente [94]. Os valores de k_{obs} estão no apêndice 5.

O valor estimado da constante de ligação do BTBA, substrato usado neste trabalho, foi estimado ser 70 M^{-1} [70], portanto, um típico valor de um substrato pouco hidrofóbico. Em tratamento cinético pela aplicação da teoria de pseudofase de troca iônica para misturas de SDS e PEO, nas

nas simulações dos perfis cinéticos, assumiu-se que o parâmetro K_s é o mesmo tanto quanto na presença de micelas de SDS como para agregados PEO-SDS. É possível supor que o substrato estava estatisticamente distribuído entre as pseudofases micelar e pseudofases complexo polímero/surfatante [71,93,94,95].

Uma característica dos perfis cinéticos de substratos hidrofóbicos é de que o máximo da curva k_{obs} vs. [Surf.] ocorre em concentrações muito próximas da *cmc*. Um caso típico de perfil de um substrato hidrofóbico é o já documentado para a hidrólise do acetal 2-(*p*-nonoxifenil)-1,3-dioxolano (*p*-NPD) em presença de SDS [67].



Esquema 6- Mecanismo da reação de hidrólise do 2-ND.

Portanto, nos tratamentos de dados cinéticos, assumiu-se que o substrato está termodinamicamente em equilíbrio entre as pseudofases na escala de tempo em que ocorre a reação de hidrólise, e sua distribuição é definida por uma constante de ligação (K_s) (item 1.2.3), conforme o equilíbrio [15,23,27]: $S_w + Cd \Leftrightarrow S_m$

Desta forma,
$$K_s = \frac{S_m}{S_w Cd} \quad (25)$$

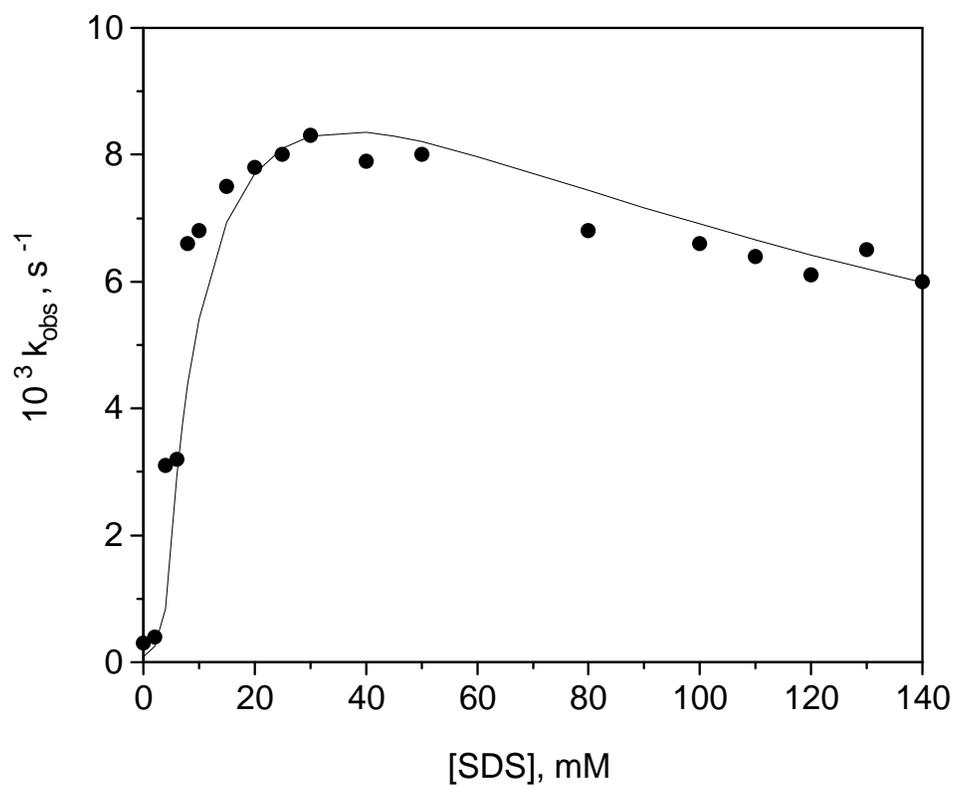


Figura 19- Constante de velocidade observada (k_{obs}) versus [SDS] na reação de hidrólise ácida do 2-ND em tampão succinato de sódio 20 mM, pH=5,40 à 30,0 °C. Os valores representados por (●) são resultados experimentais e os valores representados por (—) o ajuste teórico a partir do modelo de pseudofase de troca iônica.

Os termos S_w e S_m indicam o substrato nas pseudofases aquosa e micelar, respectivamente; C_d é a concentração estequiométrica de surfactante micelizado relacionado com a concentração total em solução (C_t) através Equação (40).

$$C_d = C_t - cmc \quad (26)$$

Observa-se que a cmc , nas condições da experiência com o 2-ND, é de 3,40 mM. Assim, qualitativamente, o máximo da curva, que aparece em algumas ordem de magnitude acima da cmc , é interpretado como sendo uma combinação ideal de concentrações máximas naquele ponto, tanto do substrato como do reagente.

Entende-se, então, que o agregado catalisa a reação porque tem a habilidade de concentrar os reagentes num pequeno volume da interface micelar. Assim, se ocorrer a diluição de um deles na pseudofase micelar, ocorre diminuição de k_{obs} . Esta última observação é relevante porque, embora seja o tema principal de discussão deste trabalho, antecipamos que, provavelmente, a inibição da velocidade provocada pela proteína, que veremos adiante, também pode estar relacionada com um fenômeno de diluição de um dos reagentes na interface do complexo BSA-SDS. A diminuição de k_{obs} , no entanto, acima de 0,030 M SDS é, basicamente, atribuída a dois fatores: (i) o efeito salino devido ao aumento progressivo da concentração de íons sódio na fase aquosa com o aumento da concentração de SDS e (ii) a diluição do substrato na fase micelar devido também ao seu aumento com a [SDS].

A catálise micelar em soluções aquosas, interpretada pelo modelo de pseudofase, considera que a reação ocorre em fases separadas, denominadas de pseudofases aquosa e micelar. Em soluções micelares, os reagentes distribuem-se rapidamente entre as fases induzidos por um equilíbrio resultante de intrincadas forças hidrofóbicas e/ou hidrofílicas, eletrostáticas e polares. Por outro lado, agregados micelares são anisotrópicos, têm regiões de diferentes polaridades podendo localizar reagentes preferencialmente em diferentes meios do agregado [78].

3.2. Estimativa da constante de ligação do 2-ND

Embora, qualitativamente, o perfil cinético da Figura 19 indique que o substrato é só moderadamente hidrofóbico, é importante, para posterior discussão, estimar o valor, mesmo aproximado, de um parâmetro de ligação do 2-ND às micelas de SDS. Uma aproximação, embora sendo uma medida indireta, é o uso de uma técnica de simulação teórica por aplicação de uma teoria. A teoria de pseudofase para catálise micelar é a mais adequada e tem sido amplamente testada tanto para reações mono como bimoleculares [95,96,97,98].

A premissa da teoria é a de que a velocidade total da reação é fornecida pela soma das velocidades nas duas pseudofases (Esquema 4). Assim, para uma reação bimolecular, como para a hidrólise ácida do 2-ND, a velocidade da reação na solução é expressa por:

$$Vel = k_w [2 - ND]_w [H^+]_w + k_m [2 - ND]_m [H^+]_m \quad (27)$$

Em que os subscritos “w” e “m” representam as quantidades estequiométricas do substrato nas pseudofases aquosa e micelar, respectivamente e k_w e k_m representam as constantes de velocidade de segunda ordem em cada pseudofase. Os colchetes definem a modalidade de concentração tida em moles por litro de solução. Os termos na Equação 27 são considerados como concentrações “locais” em cada pseudofase.

Assim, a ligação do substrato orgânico na micela é governada principalmente por forças hidrofóbicas. A equação cinética adequada para interpretar o perfil de k_{obs} vs [SDS] e estimar a constante de segunda ordem na pseudofase micelar, k_m , é dada pela Equação 28 [27]:

$$k_{obs} = \frac{[H^+]_w \{ (k_{2m}/V_m) K_s K_{H^+/Na^+} ([Na^+]_m/[Na^+]_w) + k_{2w} \}}{1 + K_s C_d} \quad (28)$$

Em que C_d é a concentração estequiométrica do surfatante micelizado relacionada com a concentração total do surfatante (C_t) por $C_d = C_t - cmc$. O termo V_m é o volume molar efetivo por mol de surfatante micelizado ($V_m = 0,25 \text{ mL/Mol}$) [70] e K_s representa a constante de ligação do 2-ND definida pela Equação 15.

A concentração do reagente H^+ (ou H_3O^+) na interface micelar do SDS, é estimada a partir do controle da transferência de H^+ e Na^+ entre as pseudofases que dependem dos parâmetros de equilíbrio, como da constante de troca-iônica $K_{H/Na}$, conforme equilíbrio:



Assim, a partir de Eq. 29, a constante de troca iônica é definida pela expressão 30:

$$K_{H/Na} = \frac{[H^+_m][Na^+_w]}{[H^+_w][Na^+_m]} \quad (30)$$

Assumindo que $K_{H/Na} = 1,0$ [93] tanto para micelas de SDS quanto para complexos BSA/SDS, têm-se que:

$$[H^+_m][Na^+_w] = [H^+_w][Na^+_m] \quad (31)$$

A Equação 31 pode ser resolvida para estimar $[H^+]_m$ utilizando equações adequadas de balanço de massa tais como:

$$[Na^+_m] = (1 - \alpha)Cd - [H^+_m] \quad (32)$$

$$[Na^+_w] = \alpha Cd + cmc + [Na^+]_T + [H^+_m] \quad (33)$$

onde $[Na^+]_T$ é a concentração de íons sódio de origem do tampão. Assim, a concentração de íons H^+ na fase micelar pode ser estimada, então, a partir da relação 31, considerando as Equações 32 e 33.

$$[H^+_m] = \frac{[H^+_w](1 - \alpha)Cd}{\alpha Cd + cmc + [Na^+]_{tampão}} \quad (34)$$

Uma facilidade na interpretação cinética do perfil de k_{obs} vs [SDS] (Fig. 19), na ausência de BSA, reside no fato de que as cinéticas são executadas em faixas de pH entre 4 e 6 de tal forma que a concentração hidrogeniônica na fase micelar é muito menor do que a de contra-íons ligados. Assim, usualmente, $[\text{H}^+]_m \ll (1-\alpha)C_d$ (Eq. 32) e, portanto, $[\text{Na}^+]_m \gg [\text{H}^+]_m$ [95]. Dessa forma, levando-se em consideração que as experiências cinéticas foram feitas sem adição de sal para controlar a força iônica e, ainda, que a concentração utilizada de tampão era de apenas 0,02 M, então a contribuição de Na^+ na fase aquosa pela micela de SDS, isto é, o termo αC_d da Equação 33, torna-se importante na estimativa da quantidade total de $N a_w^+$. Aproveitamos para relacionar o primeiro fator importante que o formalismo PPIE usa como um argumento para interpretar a diminuição de k_{obs} acima da [SDS] representada pelo máximo no perfil da Figura 19. Isto é, à medida que a [SDS] aumenta, a micela contribui para o aumento da concentração de Na^+ na fase aquosa e, portanto, desloca mais íons H^+ da superfície micelar. Por isso, este fato é observado com diminuição de k_{obs} .

Um segundo ponto relevante, já mencionado acima e a ser reconsiderado aqui, é decorrente da contribuição do α para a concentração total de Na^+ na fase aquosa. Portanto, o termo αC_d (Eq. 33) torna-se mais importante em agregados micelares mais ionizáveis. Diferenças em valores de α podem interpretar as diferenças em catálise de acetais entre dois agregados micelares tais como quando coexistem em solução micelas regulares de SDS e complexos PEO-SDS, tema que será visto adiante.

Uma outra forma de apresentar o problema é a de considerar para este tipo de reação, agregados aniônicos com cobertura micelar (de contra-íons sódio) grande, e então o termo $(1-\alpha)C_d$ grande (Eq. 33) têm maior capacidade de concentrar íons H^+ na interface.

A Figura 19 mostra o melhor resultado da simulação teórica prevista pela Equação 28. A técnica de simulação consiste em estimar os valores da k_{2m}/V_m mais reprodutíveis possíveis, aplicando a equação para cada valor de k_{obs} da Fig. 19. O termo da Eq. 28 no qual reside a maior incerteza é na razão k_{2m} / \bar{V} . A constante k_{2m} , quando dividida por \bar{V} tem unidades em M^2s^{-1} e, portanto, é uma constante de segunda ordem para a reação de hidrólise na pseudofase micelar. A melhor simulação foi conseguida usando um K_S estimado em 110 M^{-1} e um valor da constante de segunda ordem na fase micelar, k_{2m} , de $3,50 \text{ M}^2\text{s}^{-1}$. Nesta simulação foram usados os parâmetros $cmc = 3,40 \text{ mM}$ e $k_w = 2,56 \text{ M}^2\text{s}^{-1}$, $K_{\text{H}/\text{Na}} = 1,0$ [70] e considerada a contribuição em íons sódio proveniente da tampão, 0,020 M de succinato, pH = 5,40, aproximadamente 0,028 M. A constante de velocidade de segunda ordem em água (K_{2w}) do 2-ND foi obtida por um gráfico de k_{obs} vs. $[\text{H}^+]$, no qual o coeficiente angular corresponde à constante k_{2w} cujos valores são mostrados no Apêndice 4 e 5.

Portanto, considerando a expressão geral da hidrólise ácida do 2-ND em tampão succinato de sódio, pH= 5,4 e a 30 °C, a linha cheia representa o ajuste teórico dos dados experimentais, utilizando $k_{2m/vm}= 14$ e $K_s= 110$.

Como o K_s do 2-ND é característico de substrato moderadamente hidrofóbico, é necessário considerar a contribuição, embora pequena, da reação de hidrólise do 2-ND na fase aquosa. O 2-ND mostra uma baixa reatividade na pseudofase micelar tanto quanto em água, tal como é verificado para o BTBA [95]. Esta observação é concordante com os valores documentados da literatura [26,67,68].

3.2.1. Considerações sobre o valor de K_s estimado

O valor de $K_s=110$ indica que o substrato 2-ND é somente moderadamente hidrofóbico. A escolha do substrato 2-ND para monitorar os efeitos de complexos proteína-surfatante sobre a cinética de hidrólise tem como deficiência o fato que, na análise qualitativa de um perfil cinético, deve-se levar em conta a concentração do surfactante ao longo de todo o perfil. O substrato particiona-se entre as pseudofases e depende da concentração do surfatante, conforme Equações 27-31, e as contribuições nas fases aquosa e micelar variam a cada incremento da concentração de SDS no perfil da Figura 19.

A estimativa da razão de substrato ligado e livre pode ser feita a partir da Equação 35, assim:

$$\frac{[S]_m}{[S]_w} = K_s.Cd = K_s.(Ct - cmc) \quad (35)$$

Portanto, considerando; em condições de k_{obs} máxima na Figura 19, isto é $[SDS] = 0,03$ M, e a concentração de 2-ND usada nas cinéticas (veja Materiais e Métodos), $[2-ND] = 1,2 \times 10^{-5}$ M, isto significa que cerca de 77 % de todo substrato adicionado reage na fase micelar, enquanto que o restante na fase aquosa. Portanto, observa-se que, embora k_{obs} máximo ocorra em uma $[SDS]$ perto de 10 vezes a cmc , ainda um pouco mais de 20 % reage na água e somente no ponto de mais alta concentração, ou seja, em $[SDS] = 0,140$ M, é que 95 % do substrato está reagindo na fase micelar.

$$\frac{[S]_m}{[S]_w} = 110M^{-1}(0,030 - 0,0034M) = 2,93$$

3.3. Hidrólise de Acetais

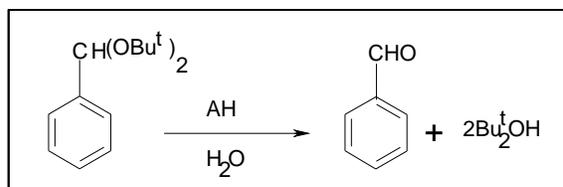
Reações químicas que são catalisadas por sistemas que contêm surfatantes têm sido utilizadas como modelo para estudo da estabilidade química de compostos com atividade biológica em diferentes meios [26,92,95,96,97,98]. Assim, nestas simulações, um dos objetivos é o de escolher a formulação e composições apropriadas tanto do surfatante como de aditivos, que possam eliminar e/ou aumentar a estabilidade do componente ativo.

As reações de hidrólise de acetais são sensíveis às mudanças do meio e em diversas situações experimentais, têm a capacidade de monitorar a habilidade de agregados micelares em ligar prótons e o próprio substrato. Essa habilidade está estritamente relacionada com as estruturas e as propriedades interfaciais estudadas para os acetais 2-ND e BTBA.

3.3.1. Hidrólise Ácida do Acetal di-terc-butilbenzaldeído (BTBA)

Como foi mencionado, o uso do acetal BTBA, ficou limitado pela interferência espectral da proteína que absorve fortemente no ultravioleta, e portanto, inviabilizava o processo de acompanhamento cinético da formação do benzaldeído em concentrações de BSA acima de 0,1 %.

No entanto, a Figura 20 mostra perfis de k_{obs} vs [SDS] em 0,025 e em 0,1 % de BSA e, em ambos os casos, a velocidade de reação de hidrólise (Esquema 7) aumentou com a [SDS] até atingir um máximo em 35 mM que depende da quantidade de BSA presente. Na figura inserida (Figura 21), é apresentado o perfil na ausência de proteína. Note-se que os perfis apresentam formas similares mas, é relevante observar o fato de que k_{obs} , à [SDS] constante, claramente diminui com o aumento da [BSA] (os valores de k_{obs} estão no apêndice 6). Essa reação foi estudada por Lima [92] na presença de 0,4% (100 mM) de PEO e também foi verificada inibição de k_{obs} .



Esquema 7- Reação de hidrólise do BTBA [92].

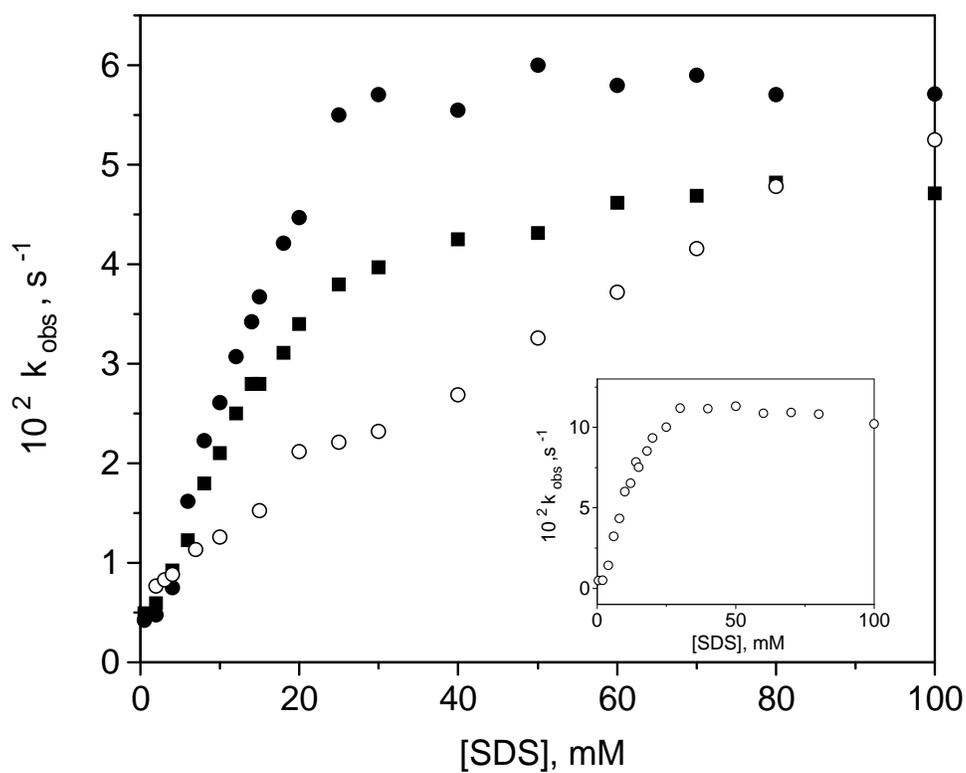


Figura 20- Valores da constante de velocidade observada (k_{obs}) vs. $[SDS]$ para a reação de hidrólise do BTBA, em 20 mM de succinato de sódio, pH=6,00 em presença de 0,025 (●) e 0,1% (■) de BSA. Os valores representados por (○) foram obtidos em 100 mM (0,4%) de PEO [92]. A figura 21 inserida mostra a hidrólise em SDS, nas mesmas condições experimentais, a 25 °C.

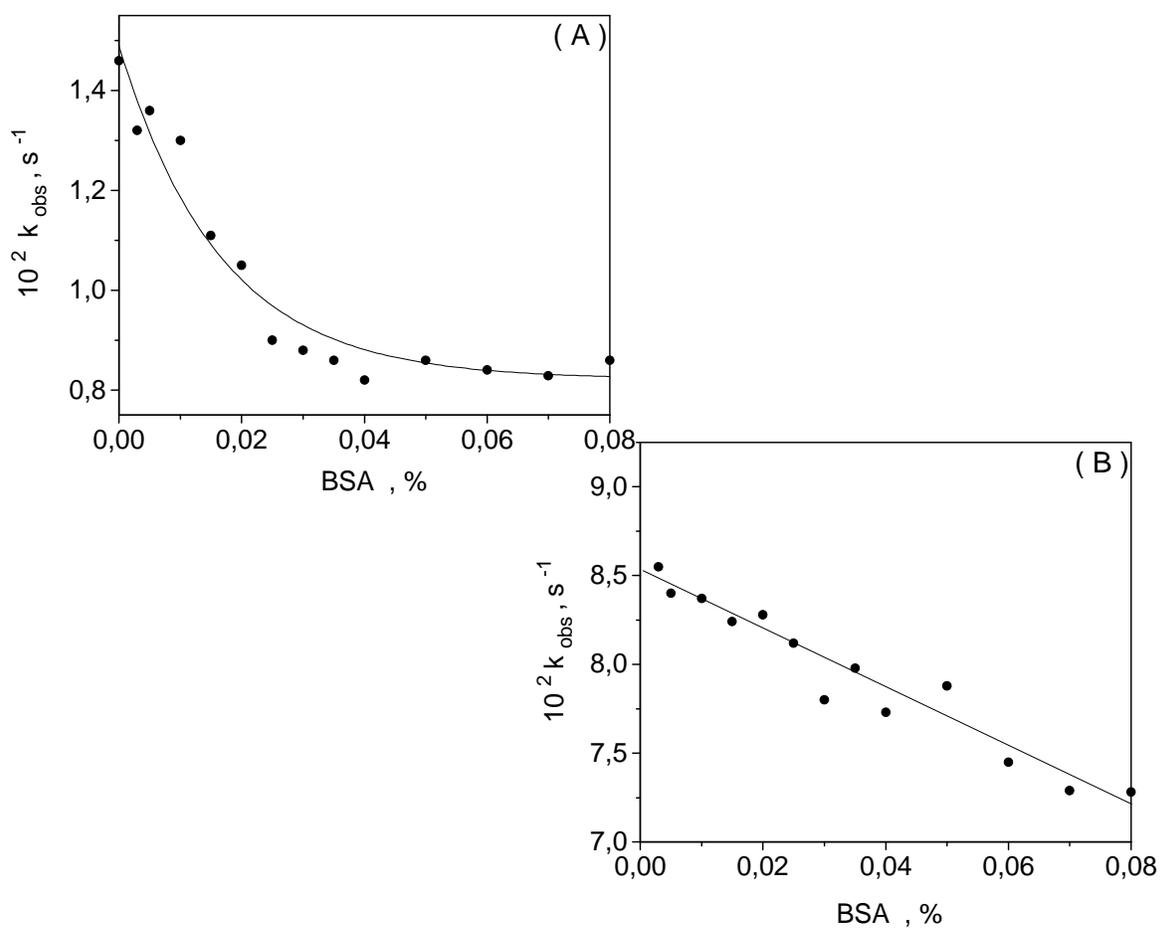


Figura 22- Efeito da concentração de BSA sobre k_{obs} para a reação de hidrólise do BTBA, em tampão succinato de sódio 20 mM, pH=6,00, em presença de (A) 4,0 mM e (B) 20 mM de SDS, na temperatura de 25 °C.

A inibição da velocidade da reação de hidrólise será melhor discutida adiante para o substrato 2-ND. Esse fenômeno, de certa forma *complexo*, já tem sido observado também para complexos formados em misturas de PEO e PVP e SDS [68,71] e em misturas de PEO e NaDeP [89,92]. O modelo apresentado para interpretar a inibição nestes sistemas, ficou fundamentado no fato de que a cadeia polimérica pode estar ligando prótons e, em conseqüência, diluindo-o na região da interface (camada de Stern) onde o substrato reage.

3.3.2. Hidrólise Ácida do 2-Naftaleno-1,3-Dioxolano (2-ND) em Presença de BSA

A Figura 23 mostra o efeito da [SDS] sobre a velocidade da reação em diferentes concentrações de BSA. Observou-se que em 0,2 % de BSA, os valores de k_{obs} são menores do que aqueles quando na ausência de BSA. Neste caso, k_{obs} aumenta com a concentração de surfatante, e alcança um k_{obs} máximo em 40 mM. Esse valor desloca-se para ~ 60 mM quando a concentração de BSA é de 0,80 %.

No entanto, o valor de k_{obs} começou a aumentar próximo de 16 mM de SDS, cuja faixa de concentração coincide com aquela estimada como sendo o *psp* em 0,80 % de BSA (veja mais adiante Tabela 5). Os resultados das constantes de velocidade, observado para as demais concentrações de albumina empregada e de polímero (PEO), estão no Apêndice 7.

O efeito de inibição da velocidade da reação de hidrólise induzida pela concentração de polímero é melhor exemplificada nas Figuras 24A e 24B, para misturas de BSA/SDS e SDS/PEO, respectivamente, monitorando em diferentes faixas de [SDS]. Nota-se que, tanto em presença de BSA como de PEO, o valor k_{obs} diminuiu com o aumento da concentração de polímero. É importante ainda observar que a inibição é mais acentuada nos perfis de [SDS] menores. Este fato pode ser visto comparando os perfis em 7,0 e 80,0 mM de SDS, Figura 24A.

Por outro lado, questiona-se ainda, se a proteína monomérica possa participar também da reação de hidrólise por qualquer adicional mecanismo. Sabe-se que a proteína tem a capacidade de ligar substratos neutros porque tem domínios hidrofóbicos. Aliás, no plasma a função de transporte de lipídeos e outros componentes traduz a função biológica mais importante da albumina [99].

No entanto, o efeito da BSA sobre reações químicas têm sido apenas discretamente documentadas. Taylor e colaboradores [100] apresentaram a BSA como um eficiente catalisador. Eles observaram que a BSA na forma nativa atua como catalisador na decomposição de complexos do tipo

Meisenheimer, e justificaram usando o argumento de que, quando na presença de 8 M de uréia, os complexos eram estáveis. Por outro lado, nesta concentração de uréia a albumina do soro bovino deve estar desnaturada ^[100].

Em outro trabalho, Kikuchi e colaboradores ^[101] encontraram uma maior efetividade catalítica da BSA na desprotonação do composto 5-nitrobenzisoazol. Outra evidência de catálise foi constatada por Means e Bender ^[102] que concluíram que a albumina do soro humano reage com o acetato de p-nitrofenila tão eficientemente quanto qualquer outro agente acilante e que a reação é devida aos grupos altamente reativos da proteína.

Antecipamos, no entanto, que não é o nosso assunto neste trabalho. Tanto assim que, em tampão succinato, a velocidade de reação de hidrólise, quando somente em presença de proteína, praticamente não é afetada pelo aumento da concentração de BSA. Ainda, resultados de pH aparente, que usaremos adiante como argumento para interpretar o fenômeno de inibição, mostraram que também são constantes na faixa de concentração de BSA entre 0,2 e 1,0 % (Fig. 38A). A mesma conclusão obtém-se em soluções de PEO (Fig. 38B) na página 107.

Deve-se enfatizar, como um resultado relevante, que a invariância de k_{obs} e do pH aparente, tanto para a BSA como para o PEO, demonstra que a reação de hidrólise observada em misturas de polímero e SDS está ocorrendo somente em interfaces de agregados micelares, isto é, de qualquer agregado que tiver presentes micelas de SDS ou complexos polímero-surfactante, e de que a inibição é um fenômeno que ocorre nestas interfaces.

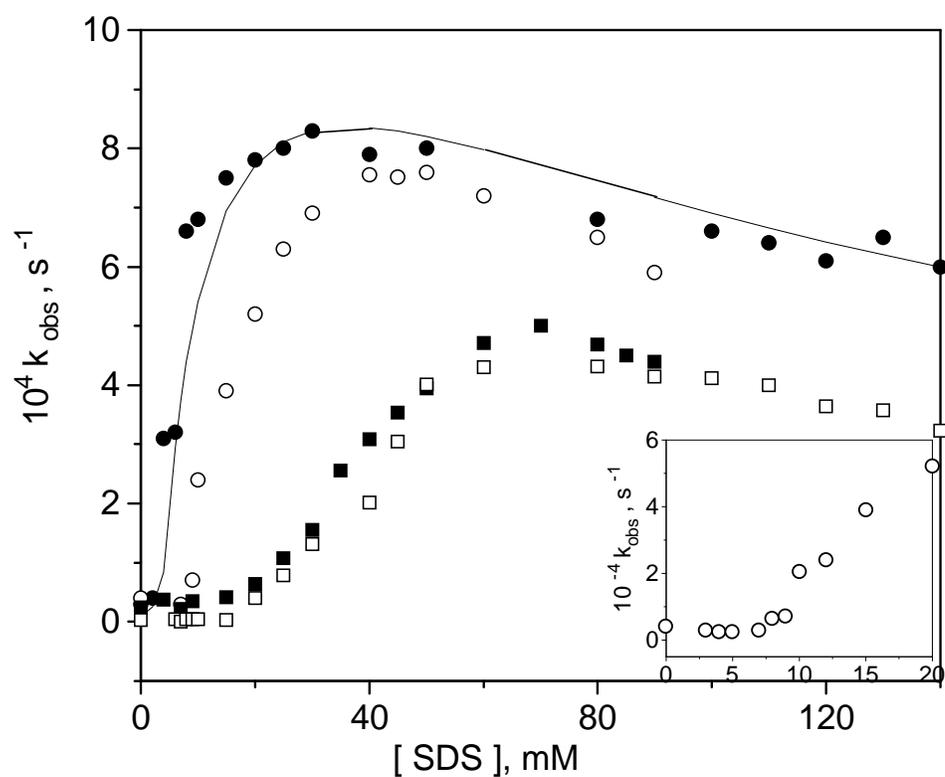


Figura 23- Efeito da [SDS] sobre a constante de velocidade observada (k_{obs}) para a reação de hidrólise do acetal 2-ND, em 20 mM de tampão succinato, pH=5,40, na ausência (●) e na presença de (○) 0,2; (■) 0,8 e (□) 1,0 % de BSA, a 30 °C . A Figura inserida representa uma ampliação da reação em 0,2% de BSA em regime de diluição.

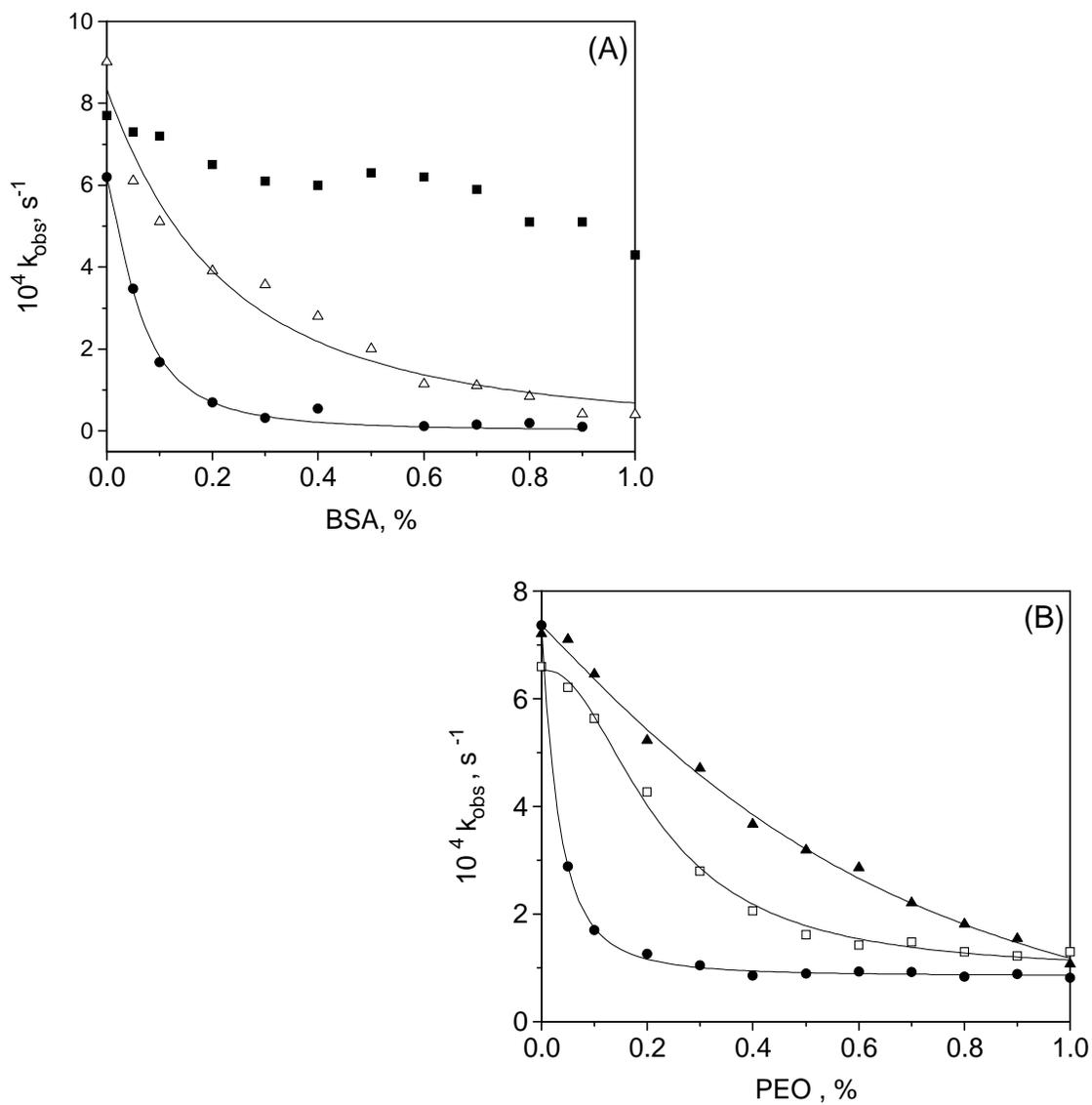


Figura 24- Efeito da concentração de BSA: (A) sobre k_{obs} para a reação de hidrólise do 2-ND, em (●) 7,0, (△) 20, e (■) 80 mM de SDS, e (B) efeito da adição de PEO (B) para a mesma reação em (○) 10, (▲) 45 e (△) 80 mM de SDS. Tampão succinato de sódio 20 mM de succinato, pH=5,40, T= 30,0 °C.

3.2.3. Hidrólise Ácida do 2-Naftaleno-1,3-Dioxolano (2-ND) em Misturas BSA/SDS e PEO/SDS em Diferentes valores de pH

Os perfis de k_{obs} vs. [SDS] para esta reação estudada são sensíveis a pequenas mudanças do pH da solução. Em pH = 4,0, com [SDS] < 20 mM, predominava um sistema bifásico, a redissolução da proteína ocorria em 10 mM de SDS para 0,2 % de BSA; em 15 mM de SDS para 0,5% e em 25 mM de SDS para 1,0% de BSA. Neste valor de pH existe uma grande contribuição dos íons H^+ no aumento de k_{obs} , entretanto, este valor diminui com o aumento da concentração de BSA (Figura 25).

A reação em pH=4,7 (Figura 26) é aproximadamente 20 vezes mais lenta que em pH=4,0, e foi observada precipitação em [SDS] < 10 mM. Semelhantemente, o perfil em pH=5,40 k_{obs} diminui à medida que a quantidade de BSA é aumentada. O efeito de carga na sua solubilidade é demonstrada no caso de sua precipitação em pH < 4,7 (ponto isoelétrico) [29].

A Figura 27 mostra a comparação da reação nos três valores de pH estudados em 1,0 % de proteína. Observa-se que a reação em pH=4,0 apresenta valores muito altos de k_{obs} , em todos os casos verifica-se que a velocidade aumenta em [SDS] ~ 20 mM. Isto é consistente com os resultados de condutividade elétrica ($\rho_{sp} = 20$ mM em 1,0% de BSA).

A Figura 28 mostra a influência do pH também para o sistema contendo PEO. Em todos os casos, o efeito catalítico ocorre em menor proporção quando comparado com BSA/SDS, e o perfil mostra um patamar em 10 mM de SDS, o que não é verificado quando a proteína está presente.

De acordo com o esquema 1, a albumina suporta isomerização conformacional reversível com mudanças de pH. Sendo assim, em pH 4,0 predomina a transição N-F que envolve o desdobramento do domínio III com perda do conteúdo em hélice. Esta “abertura” da proteína facilidade a reação de hidrólise do 2-ND quando comparado àquela situação quando o pH= 5,4, na qual predomina a forma “N”, mais compacta [7].

Os demais valores de k_{obs} versus [BSA] em distintas concentrações de surfatante estão registrados no Apêndice 8.

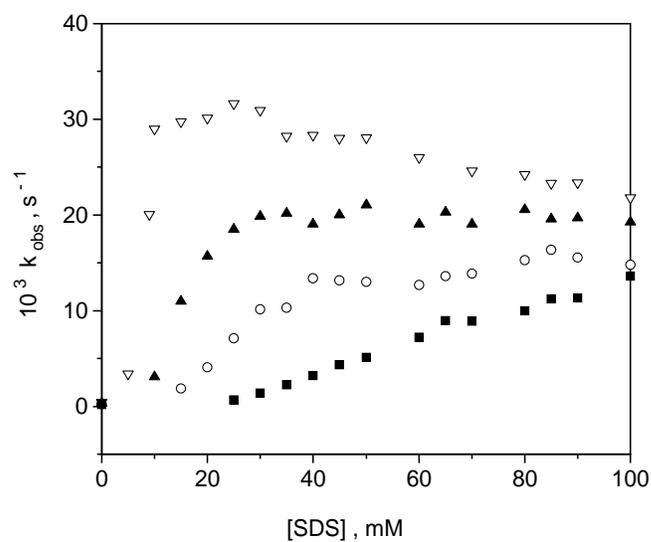


Figura 25- Valores de k_{obs} vs. [SDS] para a reação de hidrólise do 2-ND na ausência de proteína (∇), 0,2 (\blacktriangle), 0,5 (O) e 1,0% de BSA (\blacksquare). Em tampão succinato de sódio 20 mM, pH= 4,0 a $T=30,0^\circ\text{C}$.

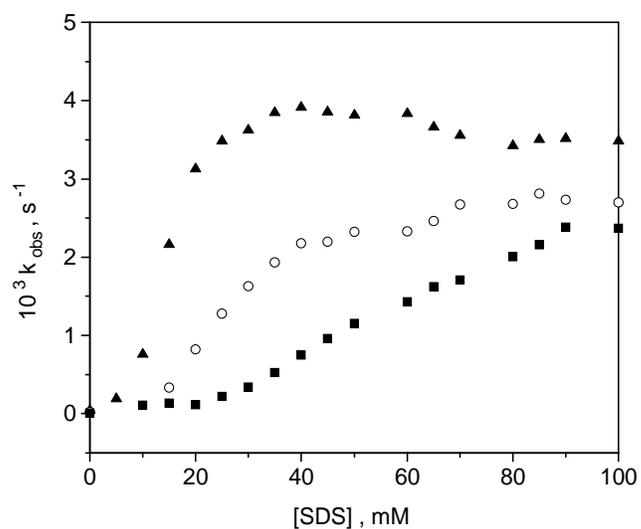


Figura 26- Valores de k_{OBS} vs. [SDS] para a reação de hidrólise do 2-ND em 0,2 (\blacktriangle), 0,5 (O) e 1,0% de BSA (\blacksquare). Em tampão succinato de sódio 20 mM, pH=4,70 a $T=30,0^\circ\text{C}$.

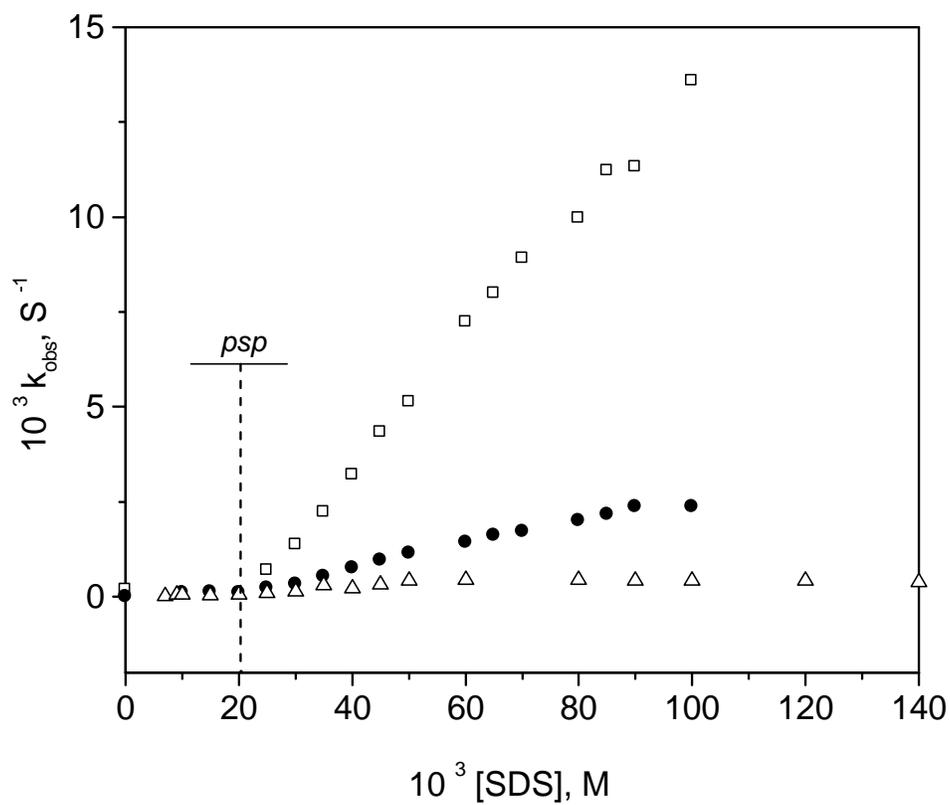


Figura 27- Valores de k_{obs} vs. $[SDS]$ para a reação de hidrólise do 2-ND em 1,0% de BSA, em diferentes valores de pH: (□) 4,0; (●) 4,7 e (△). Em tampão succinato de sódio 20 mM de succinato de sódio, $T=30,0$ °C.

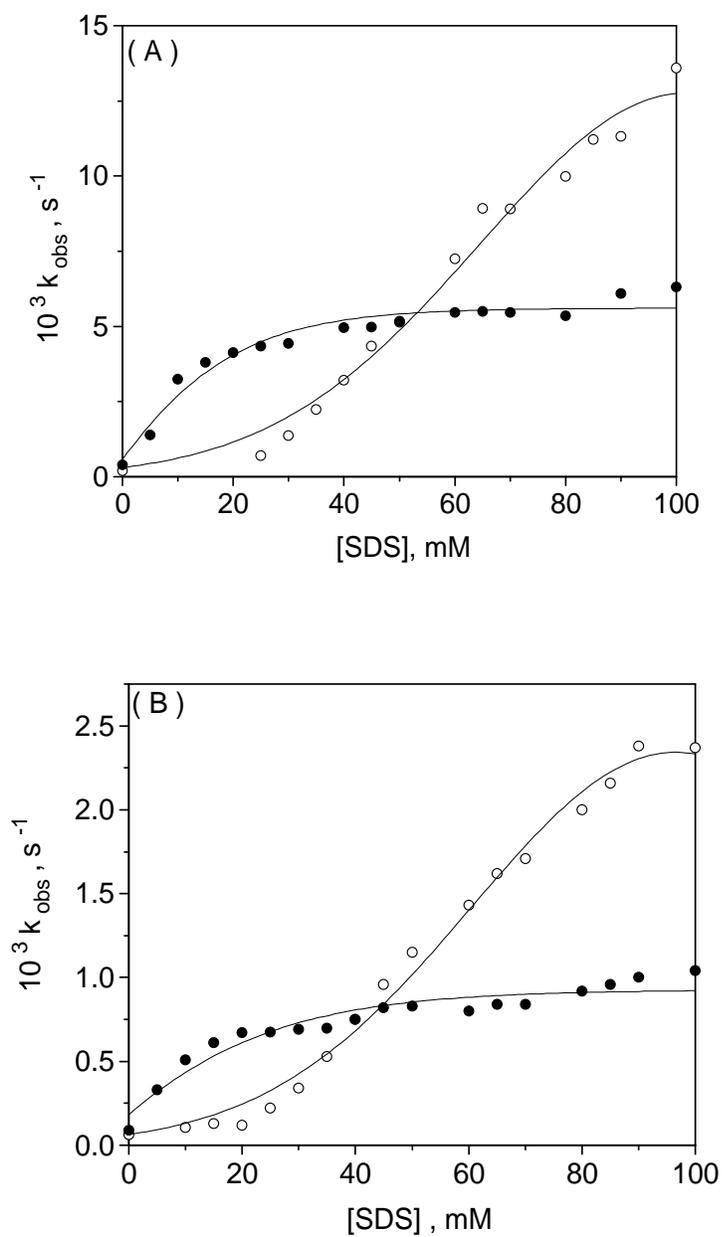


Figura 28- Valores de k_{OBS} vs. [SDS] para a reação de hidrólise do 2-ND em (O) 1,0% de BSA e (●) 1,0 % de PEO em pH=4,00 (A) e pH=4,70 (B), a $T=30,0$ °C.

3.5. Significado dos perfis cinéticos k_{obs} vs [SDS]

A interpretação do perfil cinético, na ausência de polímero, já foi feita anteriormente (veja item 3.1). O perfil corresponde a uma interpretação de reação, tipicamente bimolecular, em que a velocidade da reação depende da habilidade do agregado micelar em concentrar os reagentes numa pseudofase que, em volume, é muito pequena quando comparada ao volume da solução micelar.

Assim, relacionamos os seguintes pontos relevantes necessários para discutir os dados cinéticos:

(i) A tendência do substrato em se incorporar no agregado micelar, portanto sua hidrofobicidade, representada e já discutida (veja item 3.1.1) pelo parâmetro K_s estimado em 110 M^{-1} já citado. Foi considerado para este substrato que a fração de substrato ligado-livre, $[S]_m / [S]_w$, depende da concentração de SDS, mais propriamente da concentração de detergente micelizado, C_d , que por sua vez, está relacionado com parâmetros como cmc e/ou cac . Note que C_d está relacionado com a concentração total de surfatante (C_t) como, $C_d = C_t - cmc$, quando para micelas e então, $C_d = C_t - cac$, para misturas de polímero e/ou proteína e surfatante ^[70,98].

(ii) A habilidade dos agregados micelares presentes em solução de concentrar íons H^+ na região da interface micelar (Ao longo do texto, falaremos em “*interface micelar*” sem a preocupação de reconsiderar se é de uma micela normal ou de um complexo polímero surfactante).

Esse controle é a parte mais complicada, no sentido de como prever em todos os intervalos dos perfis cinéticos quais os tipos de agregados em desenvolvimento, e como qualitativamente e, com muito maior dificuldade, como quantitativamente a concentração “local” de H^+ na interface varia.

(iii) Como a proteína interage com o SDS, em todas as etapas do perfil cinético, este questionamento é, sem dúvida, o mais relevante. Os itens (i) e (ii) dependem desta etapa de solução e somente terão algum significado se os resultados das interações do SDS com a BSA forem interpretados, também ao longo de todos os perfis cinéticos.

Finalmente, o fenômeno de inibição cinética da hidrólise ácida dos acetais aqui apresentado, com toda certeza, somente será esclarecido se a interação no agregado micelar for modelada, porém, lá no local da interface onde a reação química ocorre. Apresentaremos, então, diferentes técnicas que objetivam compreensão e caracterização do tamanho e da forma dos complexos, quantidade de surfactante ligado à proteína e tipos de agregados micelares possivelmente presentes nas diferentes fases do perfil cinético.

Para que o leitor tenha um melhor acompanhamento, enfatizaremos os dois perfis cinéticos, em 0,2 e 1,0 % de BSA (Figura 23), com o objetivo de comparar o efeito da concentração de proteína e relacionar os detalhes dos perfis ao longo da discussão. Com mais detalhes, enfatizaremos o perfil cinético em 1 % de BSA porque os trabalhos mais citados sobre estudos de interação proteína-SDS, Reynolds e Tanford ^[51], Chen e Turro e colaboradores ^[56] e por Teixeira ^[77] usaram esta mesma concentração de BSA.

Lembramos, inicialmente, que três tipos básicos de interações têm sido sugeridos e observados em sistemas contendo surfatante e proteínas ^[35,51]:

(i) A primeira é ligação do surfatante que se processa induzida por interações eletrostáticas e hidrofóbicas em sítios específicos da cadeia proteica. Esta interação específica é observada em domínios diluídos de surfactante. Nesta etapa, têm sido sugerido que monômeros de surfactante ligam-se em sítios reativos da proteína eletrostaticamente e /ou hidrofobicamente induzidos ^[35,56,103].

(ii) Ligação cooperativa do surfatante na proteína sem mudanças conformacionais. Este tipo de interação é observado em sistemas formados por proteínas e alquil sulfatos e sulfonatos de cadeia hidrocarbônica curta ^[6,51,56].

(iii) Ligação cooperativa seguida por mudanças conformacionais. Deste modo, muitos modelos têm sido sugeridos com o intuito de caracterizar a estrutura dos agregados. Alguns definem que a ligação de moléculas de surfatantes ligam-se na cadeia de polipeptídeos formando agregados do tipo “haste rígida”, “colar de pérolas” e modelo da “hélice flexível”. Basicamente, a estrutura nativa da proteína é destruída e substituída por uma conformação mais estendida e com moderada estrutura α -hélice, com seus resíduos hidrofóbicos que interage com surfatante. Este é o tipo de interação mais comum entre proteínas globulares e surfatantes.

3.6. Evidências cinéticas em domínios diluídos de SDS

A ligação específica de SDS à proteína é documentada por tensão superficial. A Figura 29(A) representa um gráfico de tensão superficial típico para as diferentes concentrações de BSA. A adição da proteína produziu diminuição da tensão e a forma da curva para o complexo BSA/SDS exibiu dois platôs. O primeiro, ocorre em baixas concentrações de SDS, em torno de 47 dinas/cm, e caracteriza o início de uma ligação cooperativa denominada de *concentração de agregação crítica (cac)* [44,57,61,63]. O c_c corresponde ao daquela concentração do final do primeiro platô do gráfico de tensão superficial. O segundo platô é definido como *ponto de saturação (psp)* [49,57,61,63], e ocorre em concentrações mais elevadas de SDS. Convém notar que a tensão superficial assume o valor constante de 35 dinas/cm no começo da *cmc* e, na presença de proteína, no *psp*. Os valores da tensão para as concentrações de BSA aumentam de 0,1% para 0,9%.

A Figura 29A mostra ainda que, em baixas concentrações de SDS (abaixo da *cac*), a tensão superficial aumenta proporcionalmente com a concentração de BSA. Esse fato também é interpretado em termos de ligação de monômeros de SDS à proteína. Isto é, a adição de incrementos de BSA à solução diminui a concentração de monômeros na interface água/ar o que reflete em mudanças da tensão superficial.

A Figura 29(B) representa os resultados feitos com 1,0% de BSA. Em todos os casos, observou-se que a *cac*, c_c e o *psp* aumentam com a concentração de BSA. A Tabela 4 mostra os valores dos parâmetros para as demais concentrações de BSA, obtidos dos gráficos de tensão superficial versus log da concentração de SDS.

Tornam-se relevante as observações de mudança do perfil do gráfico de tensão superficial quando a proteína está presente. Tal comportamento é explicado pelos tipos de ligações que ocorrem entre monômeros e macromoléculas. Veja a Figura 7 (página 23) que corresponde à isoterma de ligação de SDS à proteína, generalizadamente apresentada por diferentes autores [5,29,49,52,54,55,57] para relacionar as várias regiões de concentração de surfatante com ligação. Reitera-se que, em baixas concentrações de SDS (região (a)), o diagrama aponta para uma região de ligação específica.

Turro e colaboradores [56] enfatizam que, ainda logo abaixo de 0,01 mM de SDS, parece existir uma relação de cerca de seis sítios de ligação na proteína. Para a maioria das proteínas, a região (a) é seguida de um platô ou de apenas um pequeno aumento de ligação, denominada de região (b), antecedendo uma intensa região de ligação (região (c)) que é atribuída ao processo cooperativo.

Inicialmente será discutido, como pode ser caracterizado o começo da ligação específica (não cooperativa). Esta etapa é importante em domínios diluídos de SDS (item i).

Evidências de interação SDS-BSA em baixas concentrações de SDS têm sido amplamente documentadas. Por medidas de diálise, Reynolds e Tanford^[51] sugeriram que o SDS induz mudanças na estrutura da proteína em concentrações de monômero na ordem de 5×10^{-4} M e afirmam que a ligação independe da força iônica, mas que é induzida por forças hidrofóbicas.

Outros estudos, Oake 1972^[45], Love^[50] e Jones^[54] indicaram que o início da interação é predominantemente iônica. Turro e colaboradores^[48], no entanto, por técnicas fluorescentes, sugerem que as forças que induzem ligação são tanto hidrofóbicas como eletrostáticas. Assim, em baixas concentrações de SDS, utilizando o pireno como sonda fluorescente, os resultados mostraram que são idênticos com os obtidos com a sonda hidrofílica sonda 2-p-toluidinilnaftaleno sulfonato (TNS).

Como esta não se associa, não é sensível a variações de fluorescência na presença de SDS. Os autores então concluíram que a fluorescência exibida, na presença da proteína, é induzida inicialmente por efeito eletrostático por interação específica do ânion sulfonato em sítios positivos da proteína e posteriormente pela sonda em região hidrofóbica da proteína.

Logo, a Figura 23 mostra que, tanto em 0,2 como em 1% de BSA, em baixas concentrações de SDS, k_{obs} é constante e similar ao valor em água, e só inicia a aumentar em regiões de concentração bem acima da região (a). Sem dúvida, a ausência de catálise indica que no processo de ligação de SDS à proteína não há formação de núcleos de monômeros de SDS que possam estar concentrando os reagentes numa pequena fase, tipicamente micelar.

Este fato cinético é concordante com os resultados de fluorescência^[56,77] que também indicam que somente entre 2,4 a 2,7 mM é que inicia uma forte associação cooperativa. Esta faixa de valores de SDS é consistente com valores de $cac_1 = 2,5$ mM em 1 % de BSA e $\approx 1,0$ mM para 0,1 % de BSA observados por tensão superficial (Tabela 4) e de 3,0 mM e 1,3 mM observados por condutividade (Tabela 5), ver mais adiante.

Deve-se enfatizar que a proteína, nas condições desta experiência, não contribui na velocidade da reação observada e, portanto, em todos os comentários ao longo deste texto sobre catálise estão relacionados apenas a agregados micelares ou tipicamente micelares capazes de ligar e concentrar em interfaces tanto o substrato como íons H^+ .

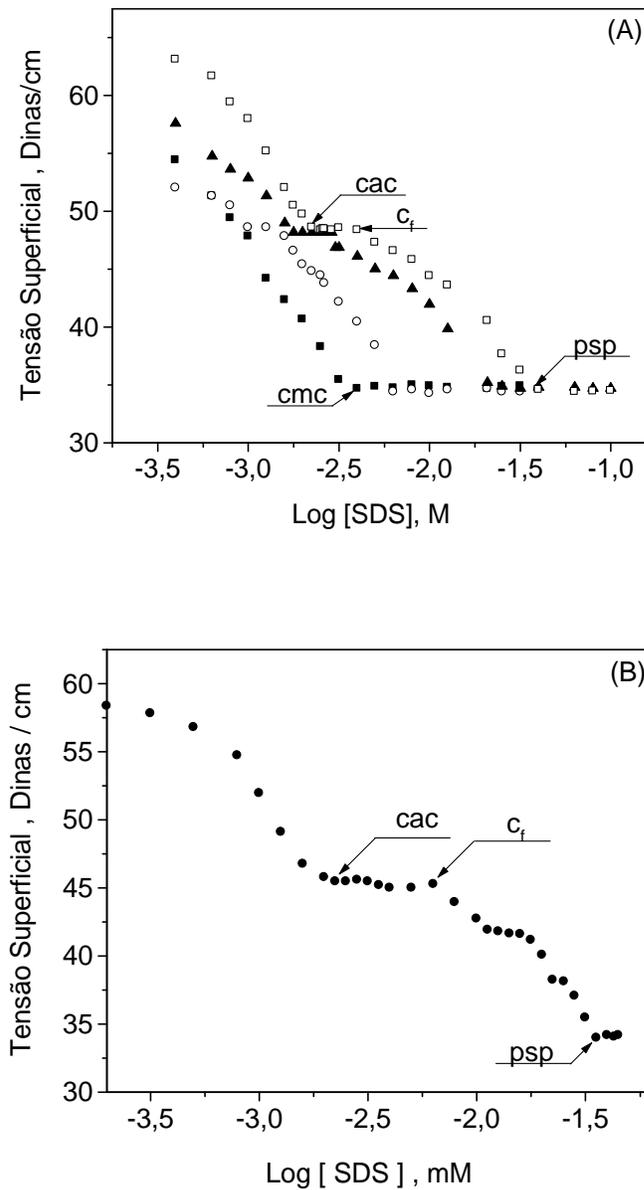


Figura 29- (A) Tensão superficial versus [SDS] na presença das seguintes concentrações de albumina (■) na ausência, (O) em 0,1%, (▲) 0,5% e (□) 0,9%. A Figura (B) representa os resultados de tensão versus [SDS] em 1,0% de albumina, em tampão succinato 20 mM, pH=5,60, t=25,0 °C.

Tabela 4- Valores de cac , c_i e psp para soluções de SDS em 20 mM de tampão succinato de sódio pH=5,60, em diferentes concentrações de BSA.

BSA, %	$10^3 cac, M$	$10^3 c_i, M$	$10^3 psp, M$
0,10	1,0	1,5	6,3
0,25	1,0		10,0
0,30	1,5	2,4	13,5
0,50	1,8	2,8	22,4
0,90	2,2	4,0	37,2
1,00	2,5	6,3	39,00

A ligação específica também foi interpretada por condutividade elétrica. As titulações condutivimétricas de soluções de SDS em presença de proteína revelam pontos de descontinuidade nas curvas de condutividade que são correspondentes aos parâmetros de ligação, cac e psp . O primeiro ocorre em valores menores do que a cmc do surfatante puro e o segundo ponto ocorre em concentrações mais elevadas de SDS e caracteriza o início de uma região linear que pode corresponder à saturação da cadeia macromolecular pelas micelas de SDS.

Para todas as concentrações de proteína estudadas, foram observados semelhanças nos perfis de condutividade elétrica.

Assim, tanto acima do psp como abaixo da cac , a condutividade elétrica varia linearmente com a $[SDS]$ conforme é mostrado na Figura 30A. Porém, em regiões intermediárias de concentração não se observou linearidade. Observou-se ainda que a inclinação das retas definidas variam com a concentração de BSA. A diminuição da inclinação está associada ao fato de que, para uma determinada concentração de SDS, a condutividade elétrica diminui porque parte dos monômeros estão ligando-se à proteína e, assim, não contribuem para a condutividade elétrica total medida.

A Figura 30B apresenta os detalhes da variação da condutividade vs. $[SDS]$ em regime de diluição, indicando um ponto de inflexão intermediário que corresponde ao α identificado no final do primeiro platô, observado nas curvas de tensão superficial (Fig.29). Na verdade, a definição deste ponto de descontinuidade não é muito clara em todas as curvas de condutividade elétrica apresentadas.

Os valores de S_1 , S_2 e S_3 são os coeficientes angulares calculados a partir da região linear do gráfico de condutividade elétrica abaixo e acima dos pontos de inflexão das curvas experimentais.

A partir destes resultados, observa-se que os valores de psp dependem da concentração de BSA, muito semelhante aos resultados obtidos para o sistema contendo poli(óxido etileno) (PEO), como pode ser observado na Figura 31 e concordante com a literatura ^[57,61]. Por outro lado, as curvas de condutividade para PEO/SDS apresentam a região de linearidade para as concentrações intermediárias de SDS.

É interessante observar que os valores de cac dependem da concentração da proteína, contrariando os resultados obtidos para o sistema PEO/SDS, em que os valores da cac são praticamente independentes da concentração do polímero. Os valores dos parâmetros de ligação estão na Tabela 5, página 81.

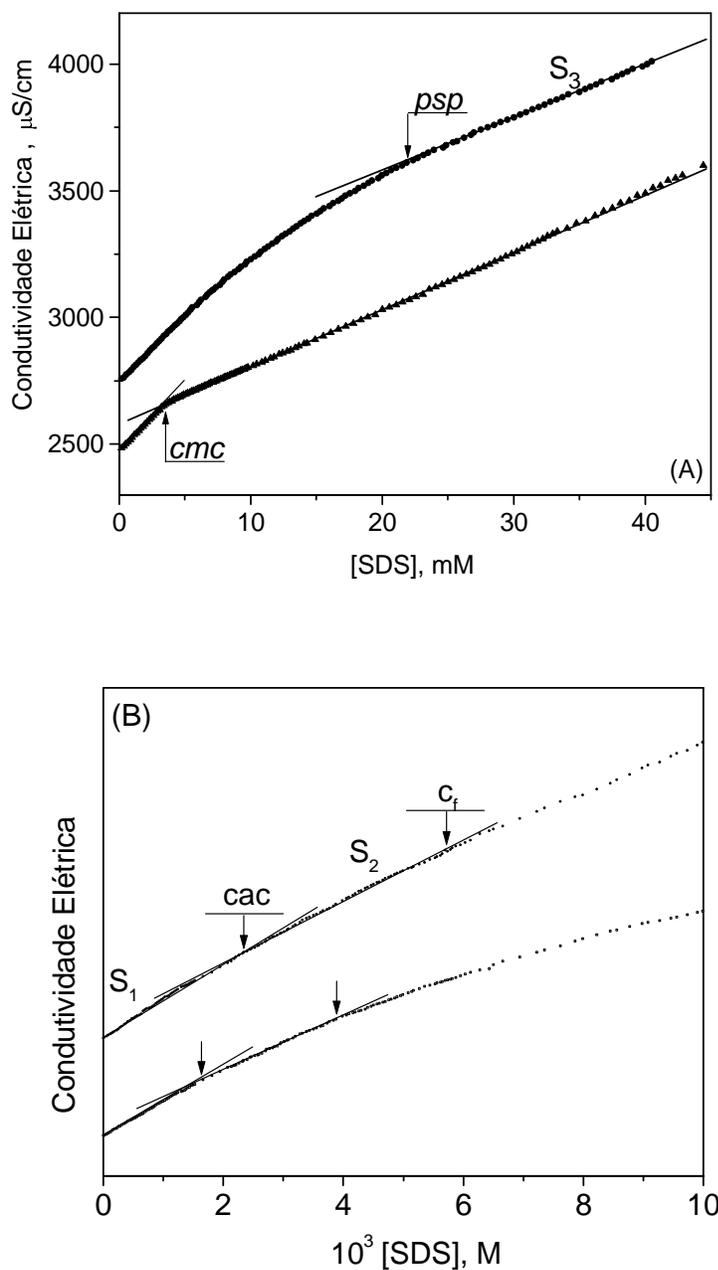


Figura 30- (A) Curvas de condutividade elétrica vs. [SDS] em de tampão succinato 20 mM pH=5,40, na ausência e em presença de 1,0% de BSA; (B) Gráfico ampliado da figura (A) para enfatizar as regiões de baixas concentrações de SDS, em 0,1 e 1,0% de BSA (definidas no gráfico de baixo para cima, respectivamente).

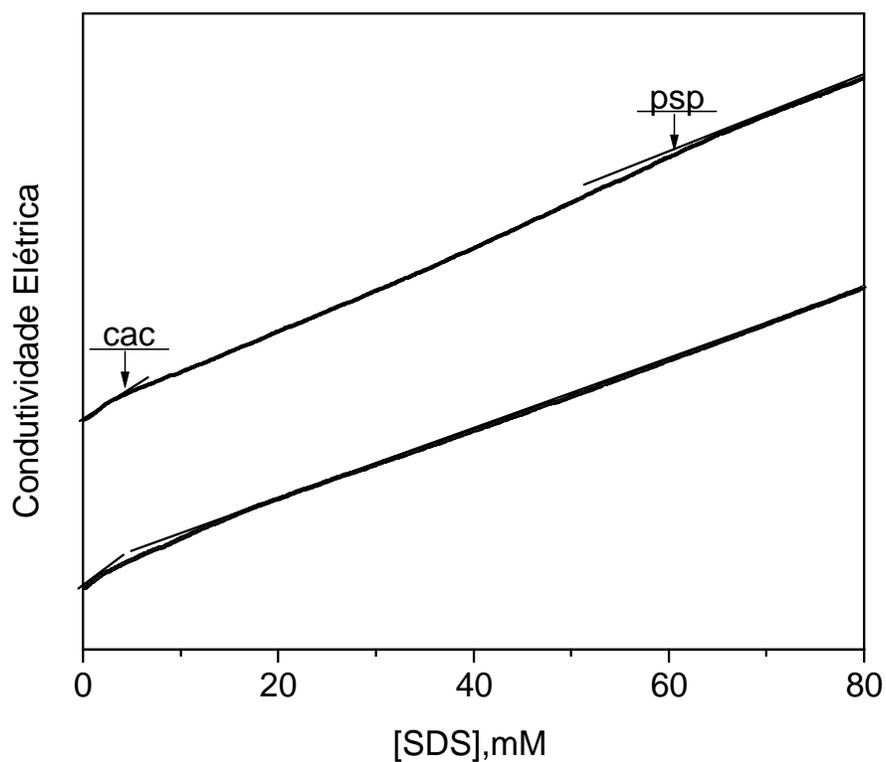


Figura 31- Curvas de condutividade elétrica vs. [SDS] (em escala relativa) em presença das seguintes concentrações: 0,2 e 0,8% de PEO, definidas no gráfico de baixo para cima, respectivamente. Todas as experiências foram feitas em tampão succinato de sódio 20 mM de, pH=5,40 a 25,0 °C.

Tabela 5- Parâmetros de ligação para o sistema BSA/SDS e PEO/SDS obtidos a partir das Figuras 30 e 31. S_1 , S_2 e S_3 referem-se às inclinações das regiões lineares dos gráficos em $[\text{SDS}] < c_{ac}$, $[\text{SDS}] > c < p_{sp}$ e $[\text{SDS}] > p_{sp}$. O valor da cmc na ausência de polímero foi 3,40 mM.

Polímero, %	$10^3 c_{ac}$, M	$10^3 c_f$, M	$10^3 p_{sp}$, M	S_1	S_2	S_3
0,05	1,0	3,7	5,3	60	33	18
	2,3		7,1	48	29	22
0,10	1,3	4,0	6,9	62	48	25
	2,3		12,4	56	27	22
0,20	1,6	4,2	7,9	60	48	23
	2,7 ^b	5,8 ^b	9,3 ^b	65	50	23
	2,0		17,1	50	27	21
0,30	1,8	5,2	8,6			
	2,0		24,6	51	28	23
0,40	2,2	5,6	10,8	63	48	22
	3,0 ^b	6,1 ^b	12,8 ^b	66	54	24
	2,2		30,7	51	28	23
0,50	2,6	6,0	12,6	58	45	22
	3,5 ^b	6,4 ^b	13,6 ^b	65	53	23
	2,4		39,8	53	26	22
0,60	2,7	6,6	14,1	61	50	22
	4,0 ^b	7,3 ^b	14,8 ^b	65	56	25
	2,2		50,0	51	26	21
0,70	2,8	6,6	14,9	64	52	26
	2,4			46	26	
0,80	2,8	6,7	18,0	65	48	23
	4,8 ^b	9,7 ^b	19,6 ^b	62	49	24
	2,3		64,5	50	25	23
0,90	2,9	6,8	19,8		52	21
1,0	3,0	6,9	20,0	59	52	21
	5,1 ^b	11,4 ^b	22,2 ^b	67	52	25
	2,4		65,0	55	29	24
5,0	5,0 ^b	13,0 ^b	~30,0 ^b	56	44	

^a Unidade em $mScm^{-1}$, ^b valores em obtidos a 30,0 °C e ^c valor da cmc do SDS. Valores sombreados correspondem ao sistema PEO/SDS.

Uma forte evidência que interpreta ligação específica de SDS à proteína é, sem dúvida, o comportamento do parâmetro cac com a [BSA]. Assim, a Figura 32 apresenta um gráfico de cac_1 em função da [BSA] obtidos por tensão superficial (Tabela 4) e por condutividade elétrica (Tabela 5).

Desde que a concentração crítica de agregação seja interpretada em analogia à concentração crítica micelar, ela ocorre numa particular condição experimental dirigida pela concentração de monômero de SDS.

A definição da concentração de agregação crítica (cac) é tomada como analogia ao processo de micelização do surfatante puro, e o processo de ligação é considerado fortemente cooperativo. Se existe essa similaridade, então, as forças dirigentes dos processos de micelização e ligação devem ser idênticas.

A primeira aproximação adotada, levando em consideração o modelo de separação de fases, já definido [17,24,26,28], para a formação de agregados micelares, é dada pela definição da energia livre conforme Equação 36 [103]:

$$\Delta G_{micelização} = RT \ln cmc \quad (36)$$

De modo análogo, a energia livre de ligação dos monômeros do surfatante no polímero é expressa pela Equação 37 [103]:

$$\Delta G_{ligação} = RT \ln cac \quad (37)$$

Espera-se, então, que qualquer efeito de alteração da concentração monomérica reflita sobre o primeiro ponto de inflexão cac_1 observados nos perfis de condutividade e de tensão superficial.

Assim, a ligação específica de monômeros à cadeia proteica é mais intensa à medida que se aumenta a quantidade de BSA. Logo, para uma determinada concentração de SDS, a concentração de monômeros livres depende da [BSA]. O aumento de cac observado na Figura 32 é consequência da influência da concentração de proteína.

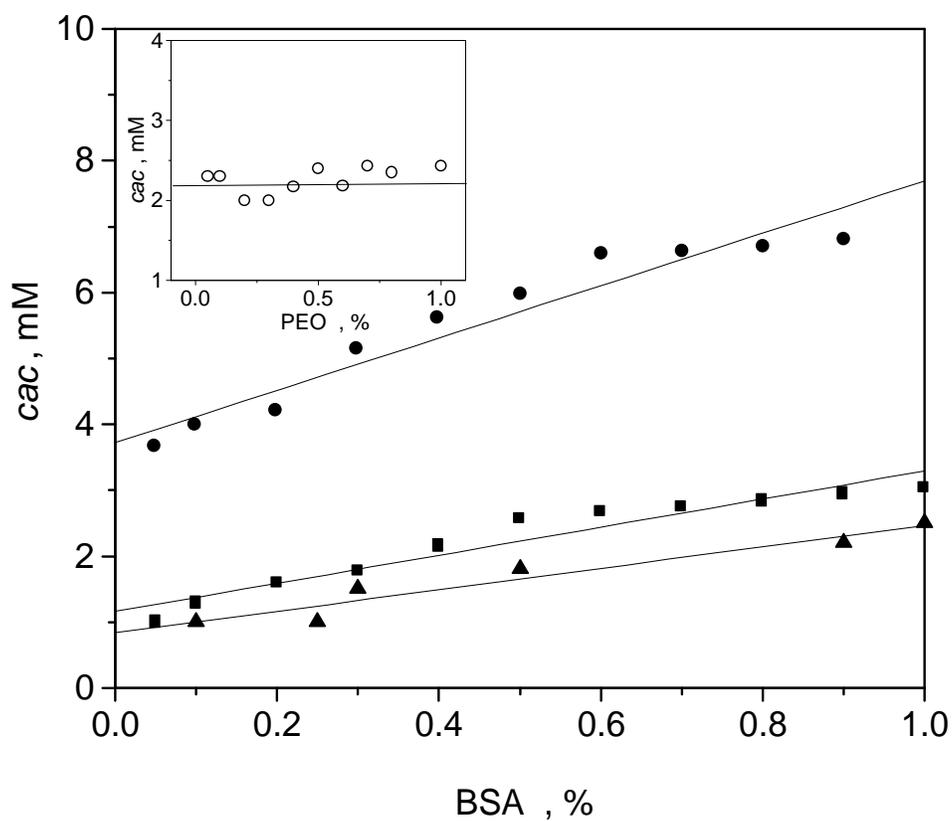


Figura 32- Efeito da concentração de BSA na *cac* obtidos por (■) condutividade e (▲) tensão superficial e (●) obtida por condutividade elétrica em tampão succinato de sódio 20 mM, pH=5,40 e T= 25,0 °C. A figura inserida representa os valores de *cac* para o sistema com PEO.

3.7. Sistemas PEO-SDS versus BSA-SDS na *cac*

Sistemas de polímeros neutros hidrossolúveis, tais como o PEO, têm sido amplamente estudados e a literatura é rica em resultados obtidos utilizando as mais variadas técnicas [44,57,69,104].

No que se refere à interpretação do parâmetro *cac*, têm sido apresentado como um parâmetro que depende de fatores, como força iônica: o efeito salino causa diminuição da *cac*, interpretado analogamente ao efeito sobre a *cmc* [63]. No entanto, embora alguns autores apresentem o efeito da concentração do polímero sobre a *cac* como sendo *ligeiramente dependente* da [polímero] [61], Zanette e Col.[67] mostraram, tanto para o PEO como para o PVP, como sendo independente da concentração dos polímeros na faixa de concentração entre 0 a 150 mM.

Titulações condutivimétricas foram aqui refeitas com PEO na presença de SDS, nas mesmas condições experimentais daquelas com BSA, com o objetivo de usar os resultados para fins comparativos tendo em vista que é um sistema amplamente estudado, com interpretações estruturais bastante definidas, além de que hidrólise de acetais têm sido também testada nestes sistemas [67,71,92].

Assim, a Figura 31 mostra as características dos perfis condutivimétricos e a Tabela 5 relaciona parâmetros obtidos em diferentes concentrações de PEO. Finalmente, usando os resultados da Tabela 5, a Figura inserida na Fig.32 representa graficamente a variação da *cac* em função da [PEO] e, sem dúvida, os resultados são coerentes com as conclusões já então obtidas por Zanette e colaboradores [67].

A conclusão óbvia é a de que, tanto por condutividade elétrica como por tensão superficial, os perfis indicam que, para o sistema BSA-SDS, *cac* aumenta com o aumento da [BSA], enquanto que no sistema PEO-SDS é independente da [PEO]. O óbvio ainda é concluir que PEO ou PVP não induzem ligação específica enquanto proteínas, e em misturas de polieletrólitos e surfatante de cargas opostas a *cac* depende da concentração do polímero [72,105,106,107].

Sendo assim, a correlação obtida do gráfico *cac* vs. [BSA] da Fig. 32 é fornecida pela Eq. 38:

$$[SDS]_{cac} = 1,16 + 2,31[BSA] \quad (38)$$

Esta equação representa incrementos de SDS necessários para saturar a cada quantidade de BSA adicionada à solução.

3.8. Hidrólise Ácida do 2-ND e BTBA Sob Contexto dos perfis de Condutividade Elétrica e Tensão Superficial no Intervalo de [SDS] *cac- ψ sp*

A interpretação dos perfis cinéticos na faixa de concentração, compreendida entre os pontos de descontinuidades, *cac* e *ψ sp*, identificados nos perfis de tensão superficial (Fig. 29A e 29B) e de condutividade elétrica (Fig. 30A e 30B), apresentam uma série de pontos a ser considerados que, indiscutivelmente, caracterizam o sistema como “complexo” e ainda “indefinido”.

Assim, numa análise qualitativa dos perfis da Figura 20, para a hidrólise do BTBA, observou-se que eles dependem fortemente da concentração de BSA. Portanto, enquanto a forma do perfil na menor [BSA] é muito semelhante àquela quando da ausência da proteína (comparar com a Figura 21 inserida), em concentrações maiores os perfis indicam que a velocidade da reação é inibida. De modo análogo, ocorre com a hidrólise do 2-ND (Figura 23). Os efeitos inibitórios podem ser melhor analisados nas figuras 22A e 22B para o BTBA e na Figura 24 para o 2-ND. O efeito inibitório é mais pronunciado em concentrações menores de SDS com ambos substratos.

Note, ainda, que os k_{obs} máximos de cada perfil são deslocados para maiores concentrações de SDS. Enfatiza-se que o k_{obs} máximo num perfil para uma reação bimolecular corresponde a uma concentração particular de SDS na qual convergem as ações dos fatores que catalisam e dos que inibem a reação. Na verdade, é o resultado do somatório de efeitos, positivos e negativos, sobre a velocidade da reação, e o k_{obs} máximo é a contribuição de “equilíbrio” destes efeitos, somados às mudanças que ocorrem na estrutura do agregado formado, desde as ligações específicas até às cooperativas definidas pelos platôs *cac* e *ψ sp*.

1) São efeitos positivos: hidrofobicidade do substrato, concentração de íons H^+ na interface de agregados micelares, grau de ionização micelar pequeno e aumento da pseudofase micelar Cd.

2) São efeitos negativos: hidrofilicidade do substrato, aumento da concentração de contra-íon que compete com a ligação de íons H^+ na interface (efeito salino), aumento da contribuição em contra-íons sódio na fase aquosa, αCd , proveniente do aumento da $[SDS] = Ct$.

Sem dúvida, os efeitos listados em (1) e (2) são também antagônicos e são os que precisam, necessariamente, ser considerados ao analisar as reações de hidrólise ácida em micelas iônicas.

Comentários sobre estes efeitos e a interpretação do perfil cinético na presença de micelas de SDS já foram feitos no início desta *Discussão*.

Chamamos ainda para esta discussão os pontos (i), (ii) e (iii) relacionados e comentados acima em *Significado dos perfis cinéticos k_{obs} vs [SDS]*, item 3.4. As soluções para resolução dos pontos questionados, sem dúvida, estão limitadas pelo conhecimento da ligação do surfactante à cadeia protéica, variação e interpretação estrutural da proteína e da identificação das propriedades interfaciais em diferentes fases dos perfis cinéticos.

3.9. Perfis de condutividade elétrica e tensão superficial vs. cinéticos

Assim como nos perfis cinéticos, os perfis de tensão superficial (Figura 29A) e condutividade elétrica (Figura 30A), em mistura de BSA e SDS, dependem da concentração de albumina.

Os diferentes parâmetros obtidos a partir dos perfis, em particular, os pontos de inflexões *cac* e *psp*, estão listados nas Tabelas 4 e 5 e indicam o início de uma associação cooperativa do surfactante ao polímero na *cac* e o término, ou saturação do polímero, no *psp*. Acima do *psp*, tem-se assumido que somente micelas regulares são formadas.

3.10. O aspecto linearidade na faixa *cac-psp* em perfis de condutividade

A Figura 31 mostra os perfis de condutividade elétrica em concentrações de PEO idênticas àquelas com BSA (Figura 30A). Qualitativamente, a diferença relevante é a falta de linearidade na região *cac-psp*, quando em presença de BSA, enquanto que nos casos com PEO os perfis nesta faixa são lineares. Este fato tem possibilitado o uso desse argumento para postular a formação de somente complexo PEO-SDS ao longo desta faixa [67]. Com isso, foi possível usar a região de variação para determinar propriedades relevantes dos complexos como o grau de ionização (α) e número de agregação (\bar{N}) [64,107]. Para misturas de PEO e SDS, Minatti e Zanette [63] verificaram que a linearidade dependia da concentração de PEO e estava aproximadamente limitada por 0,05 M de PEO. Isto é, abaixo desta concentração, a faixa do perfil deixava de ser linear. Os autores postularam a formação de micelas regulares de SDS e complexos PEO/SDS simultaneamente em todos os casos cuja concentração de polímero fosse $<0,05$ M.

A premissa desta conclusão, entre outras, é baseada no fato de que complexos PEO-SDS são mais estáveis do que micelas de SDS [67,68,70].

Note que na Figura 31, apenas no perfil cuja concentração é $0,1\% \approx 0,023\text{ M}$, a faixa *cac- ψ* é tipicamente não linear. Levando estas considerações para os perfis em presença de BSA, Figura 30A, e depois observando atentamente a Figura 30B ampliada, dificilmente observa-se completa linearidade ao longo da faixa *cac- ψ* , salvo na primeira região logo acima do *cac*. Na Figura 30B, seguramente a inclinação do gráfico de condutividade vs [SDS] muda em relação às condições mais diluídas significando, então, que agregados tipicamente micelas estão se formando. Esta região, então, é graficada como linear e estes fatos serão justificados com os resultados de tensão superficial.

3.11. O significado do primeiro platô nas curvas de tensão superficial

O início de uma ligação cooperativa do surfactante à proteína é indicado pelo começo do primeiro platô, em concentrações abaixo da *cmc* ($= 3,5\text{ mM}$) e em valores constantes de tensão superficial. Este ponto, definido aqui como *cac*, determina o início de um patamar no perfil. Nestas condições de tensão superficial constante, a todo incremento de SDS, presumivelmente, entende-se que os monômeros são deslocados para o interior da solução para formar somente complexo BSA/SDS. Em termos de energia livre, este processo é favorável para a ligação cooperativa dos monômeros de SDS na superfície da BSA.

O SDS desloca competitivamente a BSA da interface ^[108], este efeito provavelmente ocorre devido ao aumento da densidade de carga local na interface por adsorção das moléculas de proteína, que evidencia a existência de interação entre eles ^[108,109,110,111].

Schwuger e Bartnik ^[49], em análise de uma curva de tensão superficial para misturas de BSA e SDS, interpretou o primeiro platô como sendo a saturação do polímero com surfatante. Estendiam este argumento para o segundo platô como representando a formação adicional de micelas regulares de SDS. O segundo argumento é compreensível porque a tensão superficial é a mesma daquela quando estiver ausente BSA. A Figura 29A é concordante com a observação de Schwuger e Bartnik ^[49].

Quanto ao primeiro platô, em analogia com o segundo, que considera o início da formação de micelas no interior da solução, se o interpretarmos como o desenvolvimento somente de complexos BSA-SDS, o final dele definiria algo como o início de um adicional deslocamento do equilíbrio de monômeros concentrando-os na interface ar/água. Nesta etapa, devem existir multi-equilíbrios dos monômeros que se deslocam para a interface e para a formação de complexos BSA-SDS.

Esta previsão é provável, porque, seguramente, a taxa de variação da tensão superficial entre c_f e psp é menor do que em condições diluídas de SDS, isto é, em $[SDS] < cac$ (Comparar os perfis em 0.9 % e na ausência de BSA, Figura 29A). Assim, a Figura 29A mostra a dependência do final do primeiro platô, c_f da concentração de BSA, indicando que a reconcentração da interface por monômeros está condicionada à quantidade de BSA em solução, fato que infere o multi-equilíbrio acima proposto.

A equação 39 define uma correlação linear para a concentração de SDS na relação c_f vs [BSA].

$$[SDS]_{c_f} = 3,83 + 3,60[BSA] \quad (39)$$

Comparando-se os coeficientes angulares das Equações 38 e 39, observa-se que c_f depende mais fortemente da concentração de BSA do que o ponto de descontinuidade cac . O fato de que a extensão do patamar depende da quantidade de BSA em solução, caracteriza um processo que depende da concentração de monômeros livres de SDS. Como já mostramos, a cac também aumenta porque está relacionada com a extensão da ligação específica de monômeros à cadeia protéica, e porque o processo cooperativo ocorre numa definida concentração de monômero, c_f define uma concentração crítica de SDS, que depende também da [BSA], quando começa a predominar a concentração de monômeros na interface ar/água (veja também discussão abaixo em 3.10).

Na verdade, Takeda e col. ^[112] na interpretação de perfis de condutividade elétrica vs [SDS], obtidos em tampão fosfato pH=7,00, já haviam sugerido dois pontos adicionais de descontinuidade, além dos correspondentes cac e psp . Associados com resultados de dicroísmo circular, estes pontos foram tratados como discretas etapas da natureza de desnaturação da BSA pelo SDS. O primeiro ponto de descontinuidade I (notação dos autores) foi relacionado como a primeira ligação cooperativa seguida de mudança conformacional. Os pontos de descontinuidade II e IV corresponderiam ao começo e ao final da segunda fase de ligação e mudança conformacional, respectivamente. O terceiro ponto de descontinuidade é tratado também como uma mudança estrutural.

Embora em nossos inúmeros perfis de condutividade elétrica, em diferentes concentrações de BSA, nunca tenha ficado claro o terceiro ponto de descontinuidade sugerido pelos autores, seguramente c_f tem aqui significado experimental, podendo caracterizar mais algum tipo de agregado que se forma na solução.

Assim, nossos resultados são concordantes com os deles, considerando que os gráficos em função da [BSA] são lineares e os valores de [SDS] onde ocorrem são aproximados. Por exemplo, em 0,5 % de BSA os autores encontraram o ponto II em ≈ 6 mM de SDS e, em 0,1 %, em ≈ 4 mM. Neste trabalho, também encontramos valores de 6,0 e 4,0, respectivamente.

Finalmente, na Figura 32, estão também graficados os valores de α_f definidos nas curvas de condutividade, assumindo como linear a região, $cac-\alpha_f$, dos gráficos da Figura 30B cujos valores são concordantes com 29A.

As condições de mudanças estruturais da proteína, vinculadas ao platô, no intervalo de [SDS] entre cac e α_f , dos perfis de tensão superficial e relacionadas à região linear nos perfis de condutividade elétrica, nos mesmos intervalos de concentração de SDS, indicam que estão desenvolvendo um tipo de complexo BSA-SDS cuja estrutura deve ser estável e constante porque as propriedades analisadas também são constantes.

3.12. Efeito Salino sobre cac e α_f .

O efeito cooperativo de ligação de SDS a polímeros neutros como PEO tem sido já documentado [63,92,104]. O efeito de sal sobre a cac obedece ao mesmo comportamento da cmc de micelas iônicas, isto é, diminui acentuadamente indicando que a associação começa em concentrações de surfatante bem mais baixas. Assim, efeito salino sobre a cac pode ser encarado como um método para testar o comportamento de interfaces micelares, porque a interpretação está fundamentada no fato de que o aumento da força iônica suprime as cargas e reduz o potencial superficial, e/ou devido à compressão da dupla camada elétrica resultando em diminuição da cac e da cmc , [30,72], tomando os agregados termodinamicamente mais estáveis.

Recentemente, Zanette e Minatti [63] demonstraram que os gráficos log-log, tanto para a cmc do SDS como para a cac para complexos PEO-SDS em função da concentração de sal, obedeciam a uma relação linear cujas diferenças de inclinação eram da ordem de apenas 20%. Os comportamentos dos gráficos são tipicamente de agregados micelares iônicos, porém as diferentes inclinações estão diretamente relacionadas com diferenças em propriedades das interfaces dos agregados. Uma delas é em grau de ionização (α).

O efeito da concentração de NaCl no processo de ligação do SDS com a BSA pode ser observado na Figura 34A que mostra o gráfico de condutividade versus [SDS] em diferentes concentrações de cloreto de sódio. Foi observada diminuição do valor do ρ_{sp} à medida que a concentração de sal aumenta. Para o sistema PEO/SDS [63] foi observado um comportamento semelhante, porém em [PEO] < 35 mM. As regiões lineares abaixo da cac e acima do ρ_{sp} também foram observadas.

A Figura 33B, ampliação da Fig.33, mostra o comportamento dos parâmetros cac_1 e c_f em concentrações de 10 e 60 mM de NaCl, no qual observou-se uma sensível diminuição destes valores com o aumento da [sal].

A Tabela 6 abaixo reúne os valores de cac e a c_f que, claramente, diminuem com o aumento da concentração de sal e, o que é mais importante, indicando que, assim como cmc e cac , também a c_f deve representar uma fase do processo cooperativo de ligação de SDS à proteína porque também diminui com o aumento da concentração de NaCl.

Tabela 6- Valores dos parâmetros de ligação para solução de SDS contendo 1,0% de BSA em diferentes concentrações de cloreto de sódio. S_1 , S_2 e S_3 são expressos em $\mu\text{S}/\text{cm}$.

$10^3[\text{NaCl}], \text{M}$	$10^3 cac, \text{M}$	$10^3 c_f, \text{M}$	$10^3 \rho_{sp}, \text{M}$	S_1	S_2	S_3
0	3,5	8,2	24,3	64	44	24
10	3,2	6,9	24,0	56	38	22
20	3,0	6,2	21,3	53	38	22
30	2,1	5,1	17,8	61	35	22
40	2,4	5,3	14,8	65	33	21
50	2,2	4,8	13,9	61	34	20
60	1,5	3,8	13,3	61	30	18
80	1,3	3,5	10,6	61	37	20

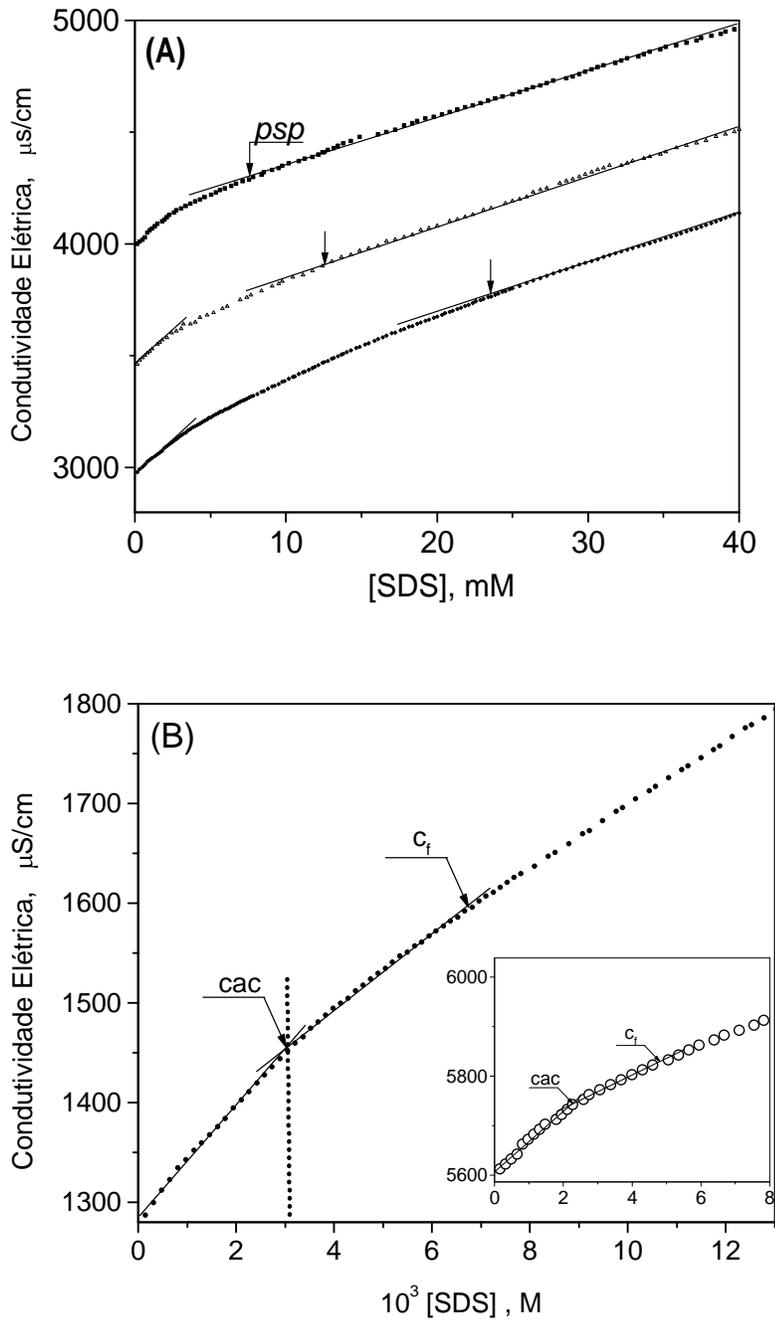


Figura 33 - (A) Curvas de condutividade vs. [SDS] em solução contendo 1% de proteína a 25,0 °C nas seguintes concentrações de NaCl: 10, 30 e 60 mM definidas de baixo para cima, respectivamente. (B) representa uma ampliação da figura 34A em presença de 10 mM de sal, e a figura inserida representa o sistema o sistema em regime de diluição.

A Figura 34 mostra os gráficos da variação do log da cac e o da c_f versus o log da $[sal]$ representados pelas Equações 40 e 41.

$$\log cac = -0,48 \log(cac + [NaCl]) - 3,35 \quad (40)$$

$$\log c_f = -0,36 \log(c_f + [NaCl]) - 2,81 \quad (41)$$

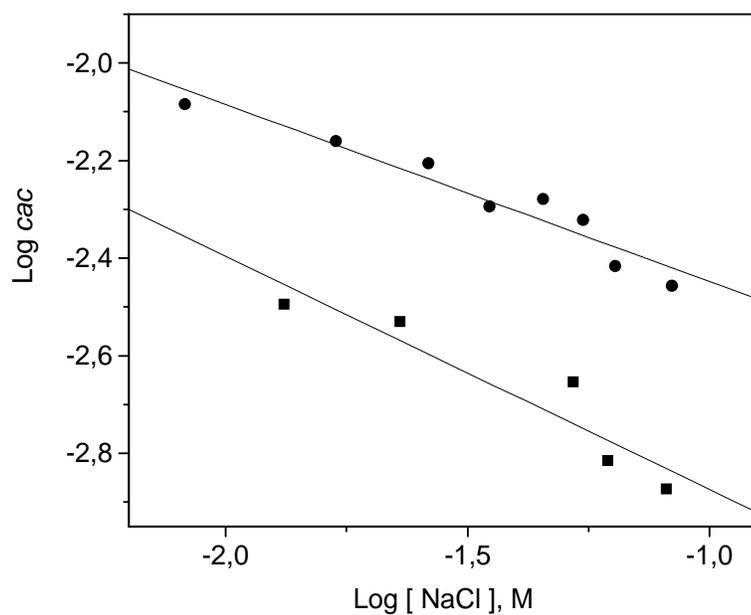


Figura 34- Log da cac vs. log da concentração total de contra-íons nos seguintes pontos de inflexão: (■) cac e (●) c_f .

3.13. Uma Interpretação do Intervalo cac_2 - psp

Com base no que foi discutido, podem-se supor os tipos de equilíbrios que se formam na solução, considerando as definições do c_f e o que define o “real” psp .

Consideramos, para fins de melhor compreensão, os perfis de tensão superficial e condutividade elétrica em 1 % de BSA. Assim, a Figura 30A mostra que nesse intervalo de [SDS] a inclinação do gráfico muda a cada incremento de SDS. Esse fato tem duas interpretações:

(i) Desenvolvimento de um tipo de agregado (complexo BSA-SDS) que continuamente muda de tamanho e mudam as suas propriedades interfaciais, principalmente o grau de ionização. Neste caso, espera-se a formação de agregados que crescem modificando as propriedades interfaciais até culminar com o ponto de descontinuidade psp (por condutividade), quando a partir daí, o gráfico corresponde a uma grande reta.

(ii) Desenvolvimento de agregados mistos, complexos BSA-SDS e agregados tipicamente micelas normais, as quais ignoram a proteína, e por terem grau de ionização, dissociam-se menos e contribuem com uma taxa menor para a condutividade da solução. Assim, a cada incremento da [SDS], menos importante torna-se a contribuição destes agregados para a condutividade da solução.

Já a Figura 29B, entre c_f e psp , mostra que a tensão superficial diminui semelhantemente àquelas condições abaixo da cac , indicando que monômeros de SDS concentram-se na interface água/ar mas, claramente, com uma taxa de variação menor do que na região diluída do perfil. Uma possibilidade é a de que a formação de complexos BSA-SDS ocorra paralelamente à reconcentração monomérica na interface. A Figura 35 ilustra a interpretação dos dados de tensão superficial.

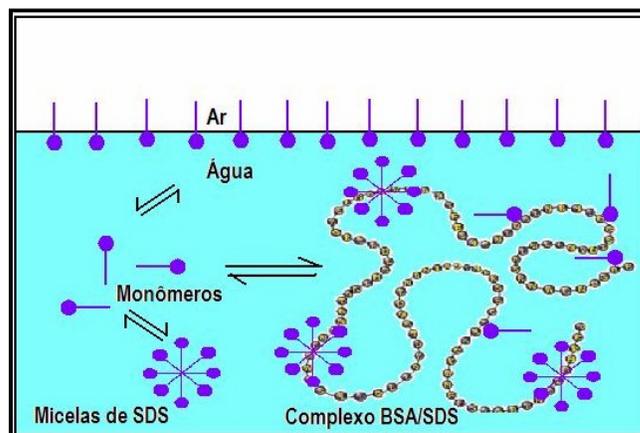


Figura 35- Modelo sugerido para as eventuais etapas de ligação do surfatante na cadeia macromolecular da proteína.

3.14. Grau de ionização a partir dos gráficos de condutividade elétrica

O método da condutividade elétrica pode ser utilizado para determinar o grau de ionização de micelas iônicas (α), parâmetro relevante na interpretação de catálise micelar [66,68,96,97]. Como já foi enfatizado e definido acima 3.1.1; o modelo de catálise, pseudofase de troca iônica (PPIE) em tratamentos de dados cinéticos em presença de micelas de SDS, inclui nos balanços de massa das espécies $[\text{Na}^+]_m$ e $[\text{Na}^+]_w$ os termos $(1-\alpha)\text{Cd}$ e αCd , Equações 32 e 33, respectivamente. Portanto, a forma dos perfis cinéticos das Figuras 20 e 23 também dependem dos valores de α dos complexos BSA/SDS e de micelas regulares de SDS que, porventura, formam-se em determinadas condições, ao longo dos perfis cinéticos.

Comparando os perfis em presença de complexos PEO/SDS e PVP-SDS e de micelas de SDS, Zanette e col. [67,70,71], concluíram que as diferenças catalíticas de hidrólise ácida de acetais observadas dependiam também das diferenças em α . Isto é, complexos PEO-SDS e PVP-SDS são mais ionizados do que micelas de SDS, portanto, proporcionalmente eles contribuem mais no termo αCd (Equação 33) deslocando mais íons H^+ da superfície dos agregados do que da superfície micelar de SDS, embora, enfatizamos, os diferentes perfis na Figura 23 não dependem somente deste fator.

Discutiremos adiante o efeito da concentração de BSA sobre a velocidade de reação de hidrólise do 2-ND, assim como para os casos com PEO e PVP, o fator principal da inibição observada (Figura 23).

3.14.1. Grau de ionização para complexos PEO-SDS

O grau de ionização dos agregados em solução pode ser estimado pela razão dos coeficientes angulares das regiões lineares dos gráficos de condutividade elétrica vs. $[\text{SDS}]$, estimado conforme metodologia de Lianos e Lang [91]. Neste caso, a razão das inclinações acima (S_2) e abaixo da *cac* (S_1) é atribuída como o grau de ionização de complexos polímero/surfatante ($\alpha_1 = S_2 / S_1$) e acima do *psp* (S_3) e abaixo da *cac* é relacionada com micelas livres que se formam em solução ($\alpha_2 = S_3 / S_1$). Zanette e col. usaram essa metodologia em diferentes trabalhos para determinar α_1 [63,67], mas também adaptaram a eq. de Evans [65], tanto para o sistema PEO-SDS como para o sistema PVP-SDS. Nos dois casos, determinaram valores de 0,41 e 0,38, respectivamente.

A confiabilidade do adaptado método de Evans é suportada pelo fato de que, a partir dos mesmos gráficos de condutividade, os valores de α_2 , para micelas de SDS, obtidos nos dois casos, foram de 0,26 e de 0,23, respectivamente, que interessantemente, são muito próximos dos relacionados na literatura por condutância [97,113,114,115].

A condição essencial para aplicar a metodologia para estimar α_1 (para complexos PEO-SDS) é a de que deva existir linearidade no intervalo de [SDS] compreendida entre *cac*-*psp*. Esta condição é satisfeita nas condições experimentais dos gráficos mostrados na Figura 31 e já foi enfatizada nas referências [63,67,71]. No entanto, para misturas de BSA-SDS, somente pode ser aplicada na região de SDS compreendida entre *cac* e α_c . Os argumentos já foram apresentados acima em 3.7.2.

A estimativa de α é melhor interpretada, considerando o ponto de vista dos valores de condutância equivalente (λ). S_1 representa a contribuição de λ das espécies iônicas Na^+ e SD^- (dodecilsulfato) presentes na solução, isto é, $S_1 = \lambda_{\text{Na}} + \lambda_{\text{SD}}$. Considerando que entre a *cac* e *psp* formam-se somente complexos PEO-SDS, $S_2 = \alpha_1(\lambda_{\text{Na}} + \lambda_{\text{SD}})$. Como acima do *psp* pode-se assumir que a variação da condutividade elétrica é atribuída somente ao desenvolvimento de micelas regulares de SDS, define-se S_3 como sendo, $S_3 = \alpha_2(\lambda_{\text{Na}} + \lambda_{\text{SD}})$ [107]. Assim, as razões S_2/S_1 e S_3/S_1 representam α_1 e α_2 , respectivamente.

Refizemos os cálculos de α nos perfis de condutividade vs. [SDS] para misturas de PEO-SDS nestas condições experimentais, como uma forma de um monitoramento do sistema BSA-SDS e, assim, usá-los como padrão de comparação. Os resultados das inclinações S_1 , S_2 e S_3 estão relacionados na Tabela 5 e na Tabela 6 cujos valores estão listados de α_1 e α_2 estimados em diferentes concentrações de PEO. É importante observar que os valores, tanto para α_1 como para α_2 , são idênticos aos já obtidos anteriormente em nosso laboratório [63,67,72].

Da Tabela 7, abaixo, as seguintes conclusões são pertinentes: (i) Os altos valores de α para os complexos são resultados da interação com o polímero; (ii) Complexos PEO/SDS são mais ionizados que micelas regulares de SDS; (iii) os valores de α para complexos são característicos de agregados pequenos [68]; (iv) A magnitude média dos valores de α suporta que, acima do *psp*, ocorre a formação de micelas regulares de SDS. Note que, em média, α_2 é semelhante ao valor obtido na ausência do polímero e, ainda, é independente da concentração do polímero.

3.14.2. Grau de ionização para complexos BSA-SDS

A semelhança entre o comportamento da proteína frente ao SDS, quando comparado com o sistema PEO-SDS, é mais uma vez enfatizado na interpretação do p_{sp} e também acima dele. Note que, além das correlações lineares obtidas nos gráficos de p_{sp} vs [polímero], tanto para o PEO como para a BSA (veja mais adiante, em Fig. 41), os valores médios de α_2 , obtidos nas diferentes concentrações de PEO e BSA avaliados nas [polímeros] investigadas, são semelhantes. As médias aritméticas (Tabela 7) fornecem valores de α_2 iguais a 0,38 e 0,42, respectivamente, que, levando em consideração as complexidades dos sistemas em termos de variações dos conteúdos iônicos que contribuem para a condutividade das soluções, em presença de PEO e/ou BSA, pode-se concluir que estes valores são bem aproximados. Em conclusão, os comportamentos dos sistemas no p_{sp} e acima dele levam a interpretações semelhantes.

No entanto, não é a mesma coisa na região de concentração $cac-p_{sp}$. Levando em consideração, agora, todas as interpretações e comentários dos perfis de tensão superficial e de condutividade elétrica desenvolvidas no tópico 3.7.1 (Perfis de condutividade elétrica e tensão superficial vs. cinéticos), conclui-se que a avaliação do grau de ionização de complexos de BSA-SDS resume-se apenas na aplicação da metodologia na região de [SDS] compreendida entre a cac e a c_f .

Entre c_f e p_{sp} o comportamento não linear nos perfis de condutividade é contrário à premissa suportada aqui e em outros trabalhos [67,68] na aplicação da metodologia.

A Tabela 7 resume os valores de α_1 estimados, considerando a região linear entre cac e c_f . Note que os valores, embora não muito reprodutivos, são sempre maiores do que 0,75 e apresentam uma nítida tendência em aumentar com os incrementos na concentração de proteína.

Em resumo, valores altos de α implicam agregados pequenos, com números de agregação pequenos e, sob o ponto de vista cinético, em agregados que não concentram íons H^+ . Importante, comparativamente, são funcionalmente menos catalisadores do que os complexos formados por PEO-SDS, cujo valor $\alpha_1 \approx 0,53$ (Tabela 7). Estes últimos fatos (dois) justificam, em parte, o perfil cinético em 1 % de BSA (Figura 23). Note que, enquanto em 1% de BSA, α_1 é ao redor de 0,90, característica de um agregado quase 100 % dissociado, a Figura 23 mostra que k_{obs} , na região de cac_1-p_{sp} , apresenta valores idênticos àqueles quando $SDS < cac_1$, aos valores da reação em água, e começa a aumentar somente nas proximidades do p_{sp} condutivimétrico quando a catálise é induzida por agregados *tipicamente* micelares.

Esta relevante conclusão cinética é inferida na análise dos resultados cinéticos da Figura 27.

Esses resultados foram obtidos em três diferentes pH: 4,00, 4,70 e em 5,40, em 1% de BSA.

Observa-se que k_{obs} depende do pH do meio, no entanto, todos os perfis cinéticos (Figuras 25-27) mostram um aumento expressivo, ênfase ao perfil em pH 4,00, somente a partir de ≈ 20 mM de SDS, nas proximidades, então, do ponto de descontinuidade da curva de condutividade elétrica (p_{sp}).

Finalmente, esse texto deve ser bem claro, enfatizando que estes resultados cinéticos indicam que os complexos BSA-SDS formados abaixo de p_{sp} em 1 % de proteína não tem a capacidade de concentrar, ao mesmo tempo, o substrato (2-ND) e íons H^+ . Embora a constante de ligação do substrato é somente $110 M^{-1}$, portanto, é relativamente hidrofílico, seguramente, com base nos valores de α , a ausência de catálise em $[SDS] < p_{sp}$, é devido à ineficiência destes complexos na ligação de íons H^+ .

Tabela 7- Valores de grau de ionização, α , para complexos BSA/SDS e PEO/SDS.

Polímero, %	BSA		PEO	
	α_2	α_1	α_2	α_1
0,00	0,41		0,41	
0,10	0,40	0,77	0,40	0,48
0,20	0,40	0,79	0,42	0,54
0,30			0,45	0,55
0,40	0,36	0,76	0,45	0,55
0,50	0,38	0,78	0,42	0,50
0,60	0,36	0,83	0,41	0,51
0,70	0,40	0,81		0,57
0,80	0,36	0,75		
0,90	0,37	0,90		
1,0	0,35	0,88	0,44	0,53

Retornando aos perfis cinéticos das figuras 20 e 23, as observações (ii) e (iv) (veja em “Uma Interpretação do Intervalo $\alpha_r p_{sp}$), interpretam parcialmente o deslocamento dos k_{obs} máximos com o aumento da concentração de BSA para maiores $[SDS]$, porque micelas são melhores catalisadores do que complexos PEO-SDS, elas concentram mais eficientemente íons H^+ porque têm grau de ionização menor, e o p_{sp} , onde na prática iniciaria a formação de micelas regulares, aumenta com a $[BSA]$.

3.15. Tamanho dos Complexos BSA/SDS

Determinar o número de agregação dos agregados micelares presentes em solução estaria aqui apresentado como uma possibilidade adicional para monitorar o tamanho das micelas regulares e, então, relacioná-los com o tipo de agregado presente em cada fase da interpretação dos perfis condutivimétrico e tensiométrico, para depois também relacioná-los com os resultados cinéticos. Esta discussão tem sido enfatizada no decorrer deste trabalho.

O número de agregação micelar médio (\bar{N}) indica o número de monômeros de surfatante por unidade micelar podendo informar sobre o tamanho de agregados presentes em solução [64,65,66].

O método foi originalmente descrito por Turro e Yekta que empregam o pireno como sonda luminescente e benzofenona como supressor [66]. Neste trabalho, foi utilizado o método das mudanças de intensidade de fluorescência do rutênio bipyridíneo ($Ru(bipy)_3^{+2}$) seguindo a supressão da fluorescência por adição do 9-metilantraceno (MA) [66,96].

A distribuição da sonda e do supressor entre a micela é dada pela equação de distribuição de estatística de Boltzmann, definida pela Equação 42.

$$I_0 / I = \exp\left(-\frac{[Q]}{[M]}\right) \quad (42)$$

Em que o termo I_0 / I representa a intensidade de fluorescência na ausência e presença do supressor, $[Q]$ é a concentração molar do supressor, e a concentração molar de micelas associadas a BSA $[M]$ é definida por:

$$[M] = \left(\frac{[D]_T - cac}{\bar{N}}\right) \quad (43)$$

O termo $[D]_T$ define a concentração total do surfatante.

Da combinação das Equações 42 e 43 e inserindo a definição $[M] = [D_n] / \bar{N}$, sendo que D_n é a concentração do surfatante micelizado, temos:

$$\ln\left(\frac{I_0}{I}\right) = \bar{N} \frac{[Q]}{[D_n]} \quad (44)$$

O valor de $[M]$ foi determinado pela construção de um gráfico de I_0 / I versus a $[Q]$. A Figura 36(A) mostra o comportamento linear de $\ln (I_0 / I)$ vs. $[M]$ em várias concentrações de SDS na presença de 1,0% de BSA. Todos os gráficos apresentaram uma correlação de 0,998. O número de agregação médio foi calculado a partir das inclinações, $\bar{N} / C_t - cac$.

Finalmente, a Figura 36(B) mostra os valores de \bar{N} versus $[SDS]$ para a solução de 1,0 % de BSA. Observa-se um progressivo aumento de \bar{N} com o aumento de $[SDS]$.

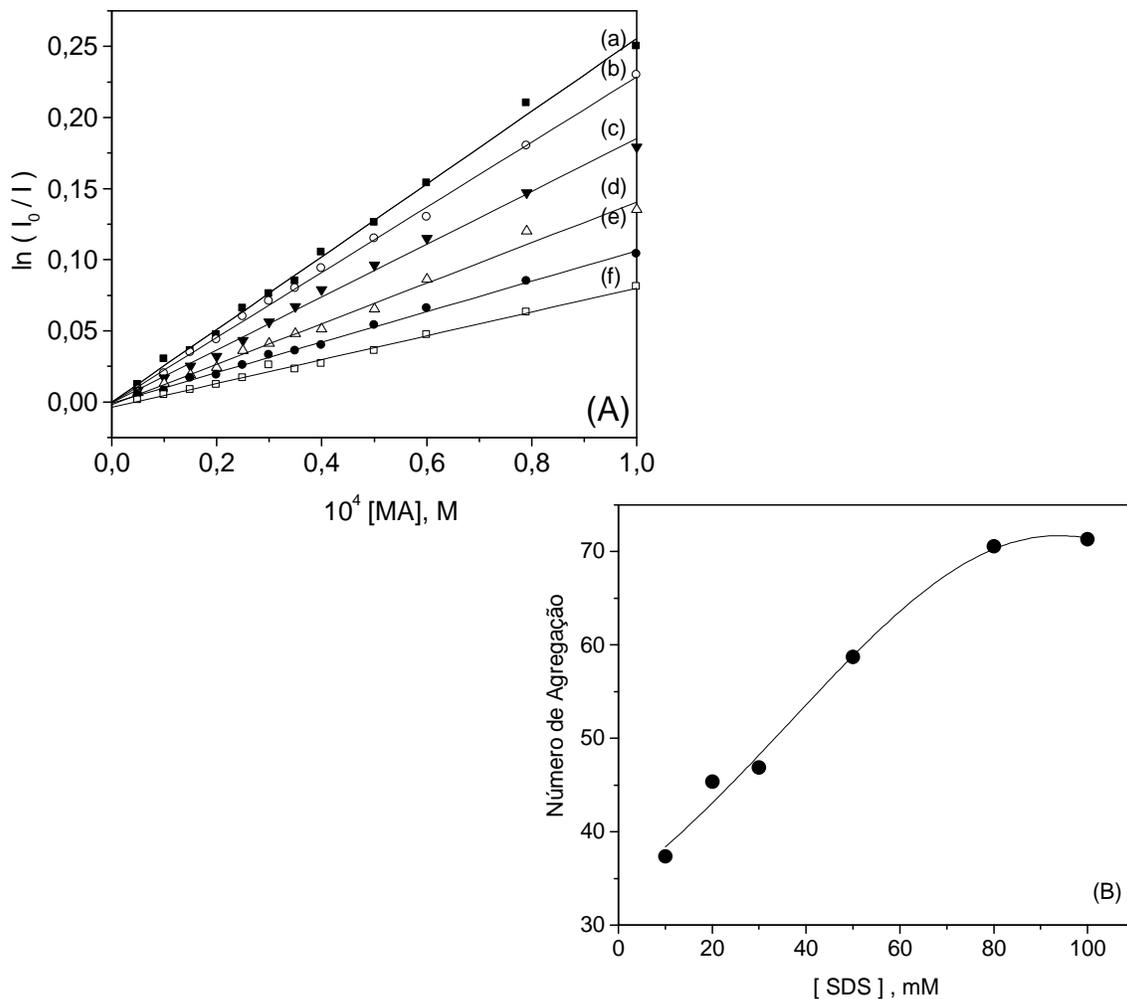


Figura 36- (A) Gráficos de $\ln (I_0 / I)$ vs. concentração do supressor MA em (a) 10; (b) 22; (c) 30; (d) 50; (e) 80 e (f) 100mM de SDS, (B) Número de agregação vs. $[SDS]$. Todos os dados foram obtidos na presença de 1,0% de BSA, em tampão succinato de sódio 20 mM, pH=5,40 a 30,0 °C e $[Ru(bipi)_3^{+2}] = 1,0 \times 10^{-6}$ M.

Turro e col. [56] usaram o mesmo critério com o intuito de estabelecer uma correlação entre a formação e desenvolvimento do processo de ligação SDS à BSA e, em consequência, discutir as etapas de desnaturação da proteína, até a saturação e o suposto aparecimento de micelas regulares de SDS. Nesta etapa da discussão, com os resultados medidos de número de agregação, os autores associaram o ponto de saturação em 1 % de BSA, ao valor determinado por Reynolds e Tanford, \approx 0,4g de SDS/ g de BSA, e 1,4g de SDS/g de BSA [51,74], como um ponto de referência para relacionar o aparecimento de micelas regulares.

Por outro lado, Shinagawa e colaboradores [116] apontaram para a “crença” do valor fixo da quantidade de 1,4g / g proteína ter sido erradamente atribuído. Eles estudaram a variação da concentração de sal proveniente do tampão na faixa de 0 a 500 mM para o sistema BSA/SDS, e verificaram que a quantidade de SDS ligado aumenta de 1,0 para 2,2 g/g, tal como Teixeira e col. também sugeriram [77]. Eles também determinaram o número de agregação (\bar{N}) através de medidas por SANS para complexos formados por dodecilsulfato de lítio e BSA e encontraram valores de \bar{N} muito baixos, tanto quanto aqueles encontrados por Turro e col. [56], e por Holmberg [117], através do método de supressão por fluorescência.

Turro sugeriu que as diferenças encontradas poderiam ser devido ao contra-íon, que a saber, sódio liga mais que o lítio e seria consistente com tamanhos de micelas menores. Entretanto, o ponto principal da técnica foi o de indicar a formação de agregados “micela-like”, sugerindo também que o modelo de complexos proteína-surfante, também é do tipo “colar de pérolas”.

Recentemente, Vasilescu e col., também estudando interação entre proteínas globulares com surfatantes, concluíram que \bar{N} é de fato tão pequeno quanto o tamanho de uma micela regular e que não depende do pH e nem da força iônica [118].

A Figura 36A mostra o efeito do supressor em diferentes concentrações de SDS em 1,0% de BSA. Observa-se que as inclinações mudam indicando variação de tamanho a cada concentração de SDS. A Tabela 8 apresenta os resultados e indica que o número de agregação aumenta com o aumento da [SDS]. Na verdade, tanto Turro e col. [56] como Teixeira e col. [77] observaram semelhantes comportamentos. A dificuldade de interpretação destes resultados (Tabela 8), assim como os de Turro e col. [56] está restrita à metodologia empregada. Se na Equação 28 for usado o parâmetro cac para estimar a concentração total de surfatante micelizado, isto é, $C_t = C_f - cac$, para quaisquer [SDS] empregadas, logo está assumindo-se que, ao longo de toda concentração de surfatante utilizada no sistema, forma-se um tipo apenas de agregado e este deve estar realmente crescendo.

No entanto, estaríamos contradizendo toda a discussão deste trabalho em termos dos dados de tensão superficial, condutividade elétrica e outros.

Embora Turro e col. [56] também assumam dificuldades na interpretação e atribuição do aumento de \bar{N} à mera formação de complexos BSA-SDS, eles ainda levantam a possibilidade de micelas de SDS estarem também presentes em altas [SDS]. De qualquer forma, assumir c_{ac} como início da formação de complexos, sem nenhuma outra restrição, significa assumir também que os valores obtidos são resultados do número de agregação médio de todos os possíveis agregados presentes nas várias concentrações de SDS utilizadas. Entende-se que o supressor e a sonda fluorimétrica não tenha preferências por agregados e sim, pelo fato de serem hidrofóbicos, distribuem-se estatisticamente assim como o método o assume.

No entanto, em relação aos valores de \bar{N} da Tabela 8, destacamos duas relevantes observações: (i) A primeira refere-se ao valor de $\bar{N} = 37$ em 10 mM de SDS. Com base neste método, na descrição do tamanho do complexo BSA-SDS, este valor pode ser encarado como real. Assim, com uma aproximação, 10 mM está ligeiramente acima do α_c limite do término do patamar no perfil de tensão superficial (Fig 29A e 29B) (veja interpretação acima). De outro lado, o valor é concordante com o alto grau de ionização obtido por este trabalho (Tabela 7), estimado na faixa dos perfis de condutividade entre c_{ac} e α_c . Lembramos que agregados com alto valor de α são característicos de agregados pequenos, tais como neste caso, $\bar{N} = 37$. Observa-se que uma micela de SDS, nas proximidades da cmc , tem número de agregação de ≈ 60 [56,77,115,117,118]; (ii) Por outro lado, na obtenção dos demais valores de \bar{N} , cujas concentrações de SDS estão acima de 10 mM, o número de agregação aumenta mas, aparentemente, acima de 50 mM de SDS, os valores permanecem relativamente constantes, principalmente, considerando em 80 e 100 mM, cujos valores 70 e 71, são característicos de micelas de SDS. Curiosamente, embora as condições experimentais não são exatamente as mesmas, os valores de \bar{N} aqui obtidos, são semelhantes àqueles obtidos por Turro [56] e Vasilescu [118].

Não é ainda possível, com base somente nos valores observados de \bar{N} , assumir qualquer interpretação sobre o crescimento dos agregados. São necessárias maiores informações e mais evidências. Antecipa-se, no entanto, que, embora \bar{N} aumente, a linearidade obtida acima do p_{sp} condutivimétrico (20 mM SDS) é uma forte indicação de desenvolvimento de um agregado com características interfaciais constantes e mais, o grau de ionização, determinado a partir destas correlações lineares (Tabela 7), é tipicamente de agregados iguais aos de micelas de SDS.

Resta, pensar então, em crescimento de agregados que se for referente ao complexo BSA-SDS, eles apresentam nesta fase, estruturas semelhantes às aquelas micelas de SDS. De qualquer forma, sob o ponto de vista cinético, enfatizamos que as características observadas no perfil cinético em 1% de BSA (Figura 23), entre cac e psp são típicas de agregados micelares que não catalisam, isto é, tipicamente de agregados pequenos, $\bar{N} = 37$, e com altos valores de grau de ionização ($\alpha \approx 0,8 - 0,9$) (Tabela 7).

Tabela 8- Número de agregação (\bar{N}) em misturas de BSA e SDS, estimados em tampão succinato 20 mM, pH=5,40 e T=30 °C.

$10^3 [\text{SDS}] , \text{M}$	\bar{N}
10	37
20	45
30	47
50	59
80	70
100	71

3.16. Efeito da [BSA] e de [PEO] sobre o pH aparente (pH_{app}) do PADA

Micelas em água têm a peculiaridade de formar micro-ambientes anisotrópicos, cujo interior fornece um domínio hidrofóbico. Numa fase contínua de água, favorecem a solubilização de diferentes substratos orgânicos insolúveis em água, enquanto na interface água-interior (camada de Stern), a polaridade equivale à de um álcool. O sítio de solubilização do substrato orgânico depende do balanço das forças hidrofóbicas e hidrofílicas. Em micelas iônicas, as moléculas solubilizadas podem distribuir-se de acordo com a sua polaridade [26,98] mas, preferencialmente, solutos orgânicos, cuja estrutura molecular tem grupos aromáticos como o PADA e tendem a localizar-se na interface, propriamente na camada de Stern [119].

Sondas sensíveis às mudanças de pH em interfaces de agregados micelares têm sido usadas amplamente para monitorar mudanças da concentração hidrogeniônica nessas interfaces, principalmente, para interpretar mudanças de reatividade de reações químicas sensíveis ao pH do meio [71,107,120]. Em hidrólise de acetais, a velocidade da reação depende da concentração “local”, na interface, do substrato como depende da concentração do íon H⁺, conforme definido pelas Equações 32 e 33. Segundo o formalismo PIE, em soluções aquosas de SDS, a concentração de H⁺ na interface depende da extensão da troca-iônica H⁺/Na⁺ definida por uma constante de seletividade $K_{H/Na}$, conforme equilíbrio de troca-iônica (Eq. 30), mas que ainda está relacionada com o conteúdo de íons Na⁺ na fase aquosa provenientes do SDS adicionado, do tampão, de parâmetros como grau de ionização dos agregados e da *cmc* ou *cac*, já definidos pelas Equações 32 e 33.

O pH aparente dos complexos BSA/SDS e PEO/SDS, foram obtidos pelo indicador de pH, piridina-2-azo-p-dimetilanilina (PADA) [71] (Apêndice 9). Neste caso, assume-se que ambas as formas neutra e protonada do PADA estejam completamente incorporadas na micela e que também sejam sensíveis às variações de pH interfacial local da micela. O comprimento de onda para cada espécie protonada e desprotonada foi medido em $\lambda_{m\acute{a}x}$ = 555 e 450 nm, respectivamente. Esta evidência foi observada pelo espectro de absorção da PADA em 30 mM de SDS e em diferentes concentrações de BSA (Figura 37). O ponto isobéstico ($\lambda_{m\acute{a}x}$ = 490 nm) observado foi uma boa evidência de que ambas as formas estão totalmente ligadas na micela e que mudanças no pH_{app}, causadas pela presença de SDS e BSA, são indicativo de mudanças na [H⁺] da interface micelar.

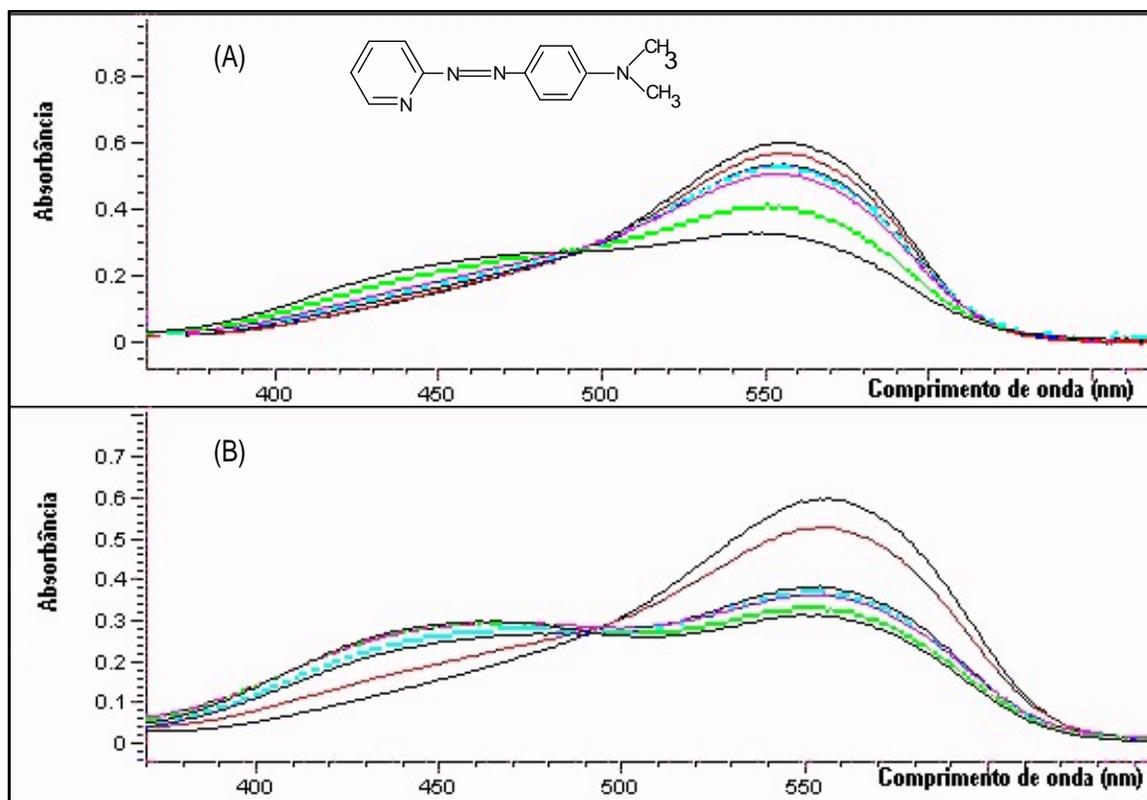


Figura 37– Efeito da concentração de (A) BSA e (B) PEO sobre o espectro de absorção da PADA (estrutura inserida) na presença de 30 mM de SDS, em de tampão succinato 20 mM, pH=5,40 à 30,0 °C. As concentrações utilizadas de BSA e PEO foram 0,0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 % definidos nos espectros de cima para baixo.

Foi feito um conjunto de medidas do pH_{Happ} dos sistemas complexos BSA/SDS e PEO/SDS: (i) em concentração constante de SDS (0, 7, 15 e 50 mM) e quantidades variadas de BSA e PEO e (ii) em concentração constante de BSA e PEO (0,2 e 1,0%) e concentrações variadas de SDS.

As figuras 38 (A) e (B) representam a situação (i), em que o pH_{Happ} estimado foi calculado por uso das Equações 38 e 39, como função da concentração da BSA e do PEO. Nós observamos que em baixas concentrações de SDS (7 mM) o pH_{Happ} tem um rápido aumento tendendo a um platô. Já em concentrações mais elevadas do surfatante (50 mM), observamos uma diminuição nos valores de pH_{Happ}.

Na ausência de SDS, os valores do pH_{Happ} não apresentam nenhuma modificação. No entanto, os valores foram bem maiores do que aqueles na presença do mesmo. No Apêndice 9, estão relacionados os valores de pH_{Happ} em função da concentração de SDS para BSA. Estas observações também se estendem para o sistema complexo formado por PEO/SDS.

A Figura 39 representa a situação (ii), a qual mostra os perfis pH_{Happ} versus [SDS], obtidos em 0,2 e 1,0% de BSA e PEO, respectivamente. Ambos os perfis mostram um grande aumento da concentração de próton em baixas [SDS], e ainda mais pronunciado em baixa concentração da BSA ou PEO. Em concentrações mais elevadas de proteína, a sonda “sente” um meio menos ácido. A figura inserida representa os valores de pH_{Happ} para a solução de SDS. Verifica-se que o pH_{Happ} diminuiu rapidamente com a [SDS] até atingir o valor constante de 3,5, em 10 mM de SDS.

Em comparação com PEO/SDS, observa-se que em baixas concentrações de PEO a sonda “sente” praticamente o mesmo microambiente que para o sistema que contém BSA. Por outro lado, em concentrações mais elevadas de BSA e PEO o comportamento é diferente. Os valores de pH_{Happ} em [SDS] \leq 25 mM para soluções de 1% de BSA são maiores que para solução de 1% de PEO. Em [SDS] \geq 30 mM os valores de pH_{Happ} no sistema que contém PEO são maiores do que aqueles que contém BSA. Entretanto, acima desta concentração de surfatante, a sonda PEO/SDS sente um ambiente menos ácido, nas mesmas condições experimentais.

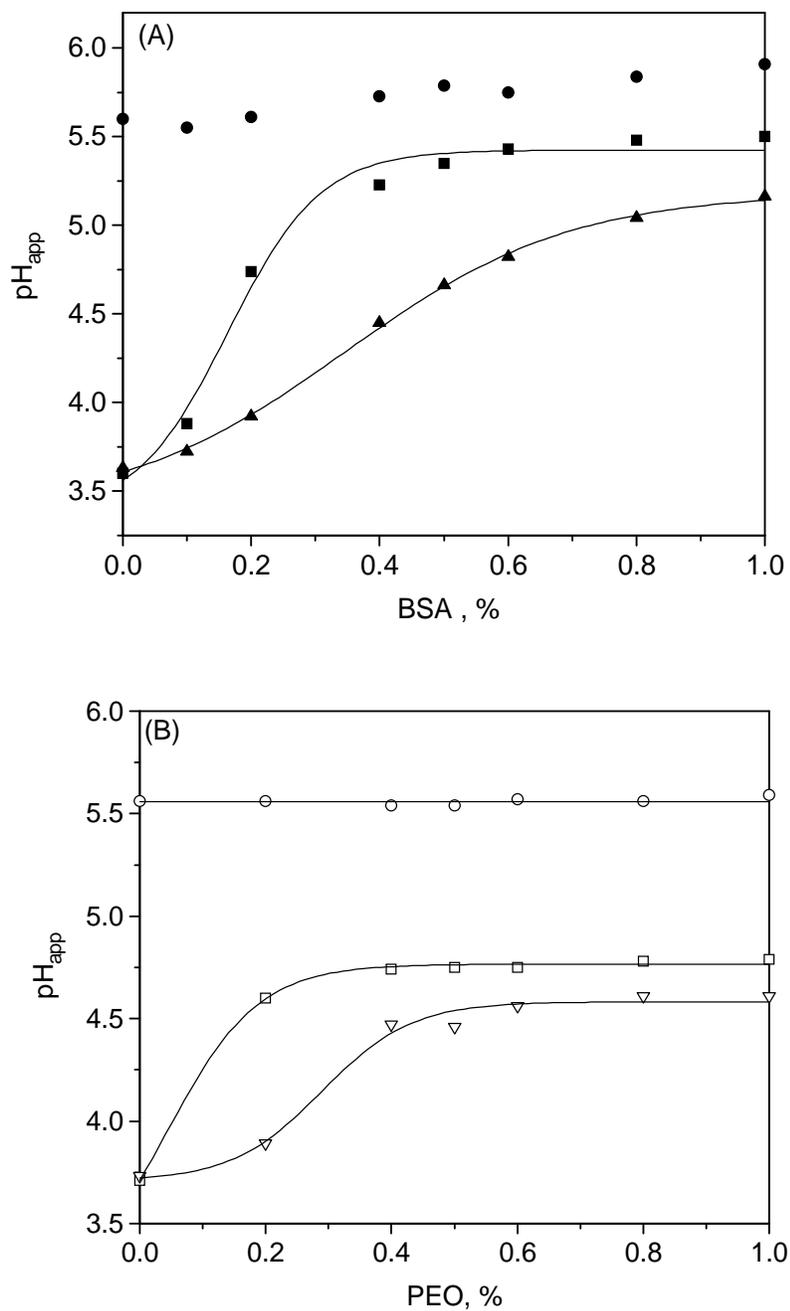


Figura 38– (A) Efeito da concentração de BSA nos valores de pH_{app} em (●) ausência de SDS, (■) 7 e (▲) 15mM de SDS. (B) Variação do pH_{app} para o sistema contendo PEO em (○) ausência, (□) 7 e (△) 25mM de SDS. Em tampão succinato 20 mM, $pH=5,40$ a $30,0^{\circ}C$.

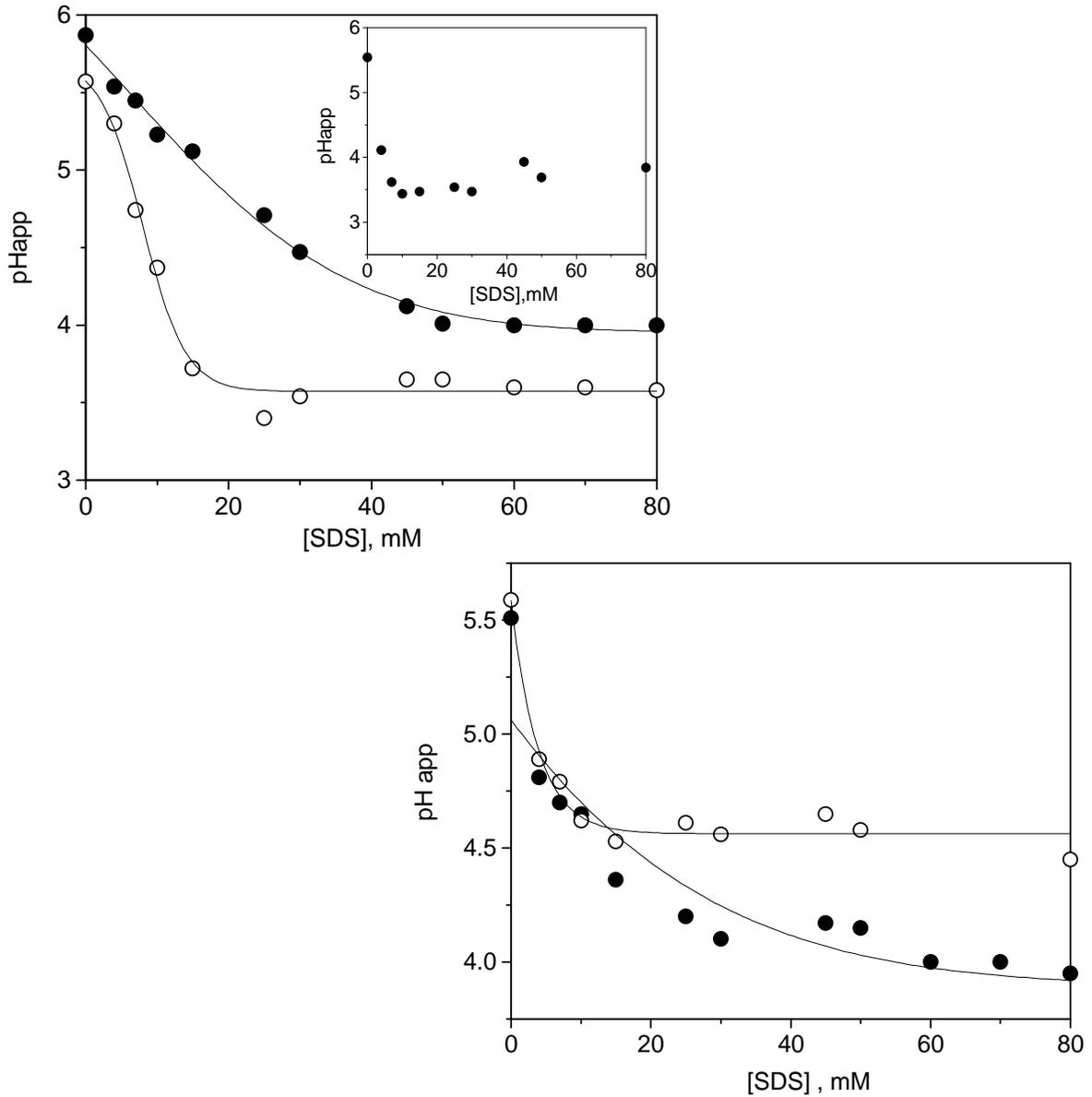


Figura 39 – (A) Efeito da adição de SDS na determinação dos valores do pH_{app}, em tampão de succinato de sódio 20 mM, pH=5,40, em presença de (○) 1,0 e (●) 0,5% de BSA, à 30°C. A Figura inserida mostra os valores de pH_{app} para o SDS, e (B) mostra os valores de pH_{app} para o sistema PEO nas mesmas condições experimentais.

Os perfis cinéticos, k_{obs} vs. $[SDS]$, mostram que k_{obs} aumenta com o aumento da concentração de SDS (Figuras 20 e 23) que são característicos de uma reação bimolecular e estão amplamente documentados para diferentes reações químicas [68,88]. O formalismo PIE interpreta o aumento inicial como um aumento da concentração interfacial de íons H^+ . Este fato realmente é documentado aqui, interpretando os perfis de pH_{app} vs $[SDS]$ mostrados na Figura 38. Em todos os casos, em 0,5 e 1,0 % de BSA e de PEO, a sonda indica que a taxa do aumento da concentração protônica interfacial é muito maior em menores concentrações de SDS, para depois ficar constante e os perfis tender a um patamar. Isto é, os perfis cinéticos têm formatos antagônicos aos de pH_{app} , tendendo também a patamares em maiores concentrações de SDS. Estes análogos comportamentos já têm sido documentados para misturas de SDS e PVP [71]. Portanto, o papel de monitoramento de concentração de íons H^+ na interface micelar por indicação do PADA é perfeitamente compreensivo.

Para a determinação do pH_{app} na superfície da micela formada na presença de BSA e PEO foi considerado que: (i) o pK_a do indicador na micela é igual ao pK_a do indicador no meio aquoso, $pK_a = 4,50$ [71] e (ii) não foram considerados quaisquer tipos de interação entre PADA e BSA.

De forma análoga, a Figura 39 mostra que o pH_{app} diminuiu com o aumento da $[SDS]$. Isto significa que a sonda sente um grande aumento na $[H^+]$ interfacial em baixa $[SDS]$, indicando que agregados concentram mais rapidamente H^+ em baixa concentração de surfatante. Por outro lado, estas mudanças são menos pronunciadas na curva com alta concentração de BSA, o que significa que o meio onde a sonda está localizada é menos ácido em toda concentração de surfatante.

Este fato é condizente com as curvas de k_{obs} versus $[SDS]$ mostradas na figura 23. Isso é significativo na interpretação da inibição observada da hidrólise ácida do 2-ND na presença de BSA, em que a diminuição da velocidade é devida à diminuição da concentração de H^+ interfacial. Então, a explicação do efeito da concentração de polímero (BSA e/ou PEO) sobre o valor de k_{obs} pode ser atribuída às mudanças do pH interfacial dos agregados micelares quando a reação está ocorrendo.

Assumindo que os reagentes estão em equilíbrio dinâmico entre a pseudofase aquosa, micelar e a do complexo BSA/SDS ou PEO/SDS, como já foi mencionado anteriormente, a contribuição de cada pseudofase para a velocidade total da reação tem sido definida pela Equ. 45 [71].

$$K_{obs} = k_{2w} [2-ND]_w [H^+]_w + k_{2m} [2-ND]_m [H^+]_m + k_{2p} [2-ND]_p [H^+]_p \quad (45)$$

Por outro lado, os valores de pH_{app} para complexos PEO/SDS, embora ligeiramente maiores, são semelhantes aos de BSA-SDS, o que pode significar que complexos BSA/SDS, proporcionalmente, ligam mais prótons na superfície micelar do que os agregados PEO/SDS (superfície menos ácida). Neste caso, apenas para ilustrar os efeitos cinéticos observados, sugerimos um modelo muito parecido com aqueles obtidos por Zanette e colaboradores [71] para o sistema PVP/SDS, já que ambos os sistemas BSA/SDS e PEO/SDS apresentam comportamentos cinéticos semelhantes. A Figura 40 mostra um esquema enfatizando a interface dos agregados onde a reação de hidrólise ácida do 2-ND ocorre.

Conforme observa-se por SAXS (ver mais adiante), somente os dados em 20 e 30 mM de SDS ajustam-se ao modelo do “colar de pérolas”, então, não pode-se afirmar que segmentos da cadeia macromolecular da BSA e do PEO estão distribuídos de igual maneira ao longo dos perfis k_{obs} vs. [Polímero]. Podemos assumir que os segmentos da BSA estão rodeando a interface tal como foi sugerido por Cabane [42]. Para o sistema BSA/SDS, a molécula de proteína é adsorvida na interface água/cadeia hidrocarbônica do SDS e, na região onde ocorre a reação, os prótons são diluídos por que são adsorvidos na superfície do polímero [120,121].

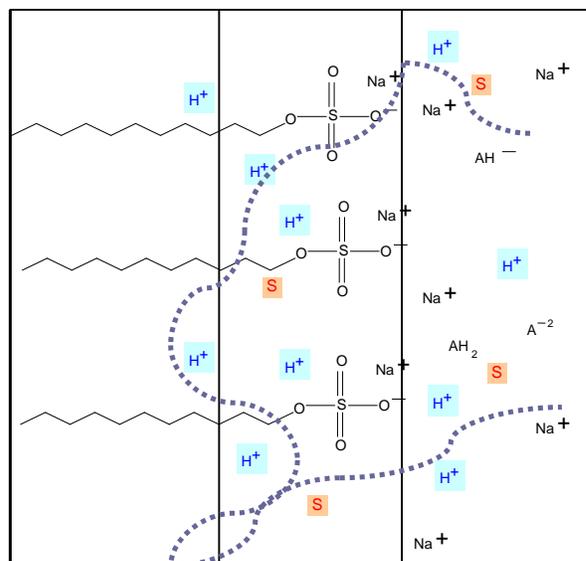


Figura 40- Esquema de uma seção parcial da região próxima da interface de agregados micelares e BSA/SDS e/ou PEO/SDS. A figura mostra a pseudofase micelar e aquosa separada pela camada de Stern [42], onde S= substrato, AH₂= ácido succínico e A⁻² e AH⁻ os ânions succinato.

3.17. Sistema BSA/SDS e PEO/SDS no *psp*

Foi monitorada a variação do clássico segundo ponto de descontinuidade (*psp*) das curvas de condutividade elétrica vs [SDS] em presença de proteína e polímero em função da concentração de BSA (Figura 41). Curiosamente, o valor do *psp* aumenta linearmente com a concentração de proteína, assim como ocorre com polímeros neutros sintéticos tal como o PEO (Figura 31) [42,67,68,121].

Classicamente, o *psp* define a saturação das cadeias poliméricas e, por esta razão, depende da concentração do polímero. Supõe-se então que, acima do *psp*, deva predominar somente a formação de micelas regulares de SDS e que cada incremento na concentração do surfactante contribui somente para o aumento da pseudofase micelar. Sob o ponto de vista cinético, o *psp* pode então ser encarado como uma segunda *cmc*. Entende-se, então, o porquê de a catálise observada na reação de hidrólise do 2-ND (Figura 23) tornar-se mais importante a partir desta [SDS]. Sem dúvida, relembramos que micelas de SDS são melhores catalisadores do que os agregados tanto para PEO-SDS [67] como BSA-SDS.

A assunção de que no *psp* condutivimétrico, isto é, ≈ 20 mM de SDS, ocorre formação de agregados tipicamente micelares, é assegurada pelos resultados de condutividade elétrica (Figura 30) porque: (i) a condutividade varia linearmente com a [SDS], tal como ocorre no sistema PEO-SDS (Figura 31); (ii) Os coeficientes angulares das regiões lineares acima do *psp*, com e sem BSA, são idênticos (Tabela 5) tal como os valores de α (Tabela 7).

Afinal, o que se questiona aqui, é o significado do *psp condutivimétrico*. Isto é, se ele representa ou não um ponto de saturação das cadeias proteicas por moléculas de SDS, uma vez que este parâmetro condutivimétrico comporta-se semelhantemente como no sistema PEO-SDS [122].

Este questionamento, seguramente, é relevante, e sua interpretação deve estar relacionada com o mecanismo de desnaturação da proteína. Lembramos que, já há muito tempo, Tanford e Reynolds [51,74], por diálise, concluíram que o ponto de saturação ocorre em 1,35 g de SDS/ g BSA e varia pouco com outras proteínas. Esta quantidade, que representa 0,047 M de SDS/ g BSA, é muito diferente daquela encontrada por condutividade elétrica de 0,020 M de SDS/ g BSA. Afinal, o que as duas técnicas estão observando para chegarem à mesma conclusão em valores tão diferentes?

De outro lado, Schwuger e Bartinick [49] definiram o ponto de saturação como sendo o final do primeiro platô do gráfico de tensão superficial vs. [SDS], e que a quantidade necessária de SDS, observada em torno de 47 mM, representaria a formação adicional de micelas normais em solução.

Estas interpretações também não são totalmente satisfatórias quando se considera somente a segunda interpretação pois, em princípio, contradiz os resultados de condutividade elétrica. Essa discrepância, existente entre a real definição do ρ_{sp} medidas por condutividade (Fig.30), tensão superficial (Fig.29), diálise [5,51,74] e microscopia [122] refletem alguma propriedade importante que esteja acontecendo no fenômeno de agregação. É portanto, conveniente, caracterizar estruturalmente os agregados em solução e o tipo de ligação existente entre as modificações sofridas pela proteína induzida pelo surfatante. Para uma melhor compreensão da definição de saturação e do tipo de estruturas que se formam em solução, usamos a técnica de espalhamento de raio-X a baixos ângulos (SAXS) [87,123,124] para ambos complexos estudados neste trabalho.

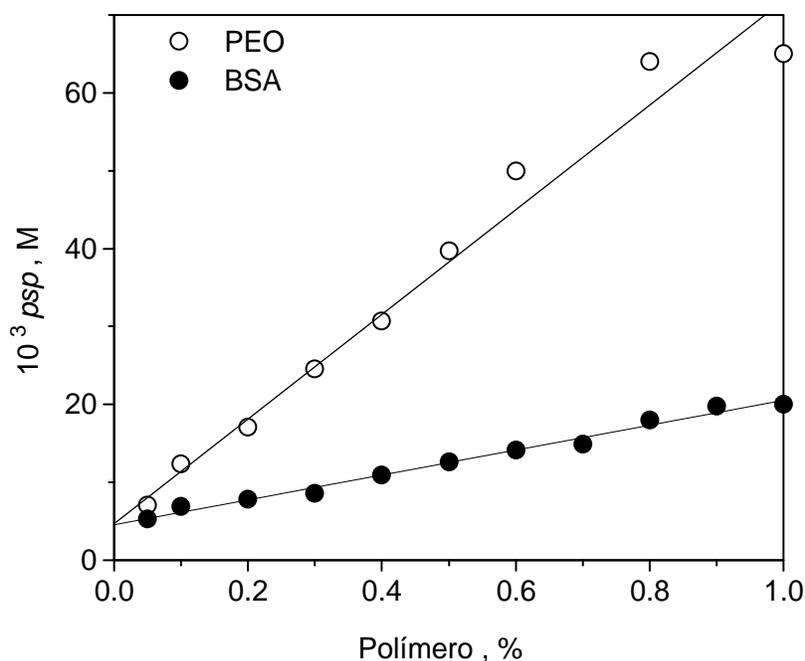


Figura 41- Mudanças no ρ_{sp} com a concentração de polímero: (●) BSA e (○) PEO em solução contendo SDS em de tampão succinato de sódio 20 mM, pH=5,40. A Figura foi construída com os dados da Tabela 5, página 81.

3.18. Espalhamento de Raio-X por Baixos Ângulos (SAXS)

3.18.1. Espalhamento de raios-X a baixos ângulos para soluções de BSA/SDS e PEO/SDS

A Figura 42 mostra curvas de SAXS (intensidade de espalhamento J_{obs} versus vetor de espalhamento (q)) para diferentes concentrações de SDS, em pH=5,40, na qual foi evidenciada a presença de dois picos. O primeiro pico ocorre em torno de $q \cong 0,04 \text{ \AA}^{-1}$ relacionado com um fator de estrutura intermicelar, devido às repulsões coulombicas entre as superfícies carregadas das micelas [78,124]. Em concentrações de 10 mM de SDS o efeito é menos intenso, quando comparado com [SDS]= 30 e 50 mM, onde ele é mais acentuado. Por outro lado, o segundo pico que ocorre em $q \cong 0,16 \text{ \AA}^{-1}$ é característico de estrutura intramicelar [78,124]. Deve-se notar que este pico não é definido na curva de SAXS a 10 mM de SDS, embora a *cmc* do SDS, nas condições experimentais, tenha sido identificada 3,5 mM.

Portanto, o pico intramicelar de SDS torna-se perceptível na curva de SAXS para concentrações de SDS maiores que 10 mM. Na concentração de 20 mM observa-se nitidamente o aparecimento deste pico. Entretanto, por razões experimentais os valores em “ q ” pequenos não apresentaram uma boa estatística. Portanto, a curva de SAXS para esta concentração não está sendo apresentada.

A Figura 43A apresenta os resultados de SAXS obtidos na presença de 1,0% de BSA em várias concentrações de SDS. Conforme se observa nesta Figura, as curvas de SAXS para as soluções de BSA pura e com 2,0 mM de SDS são idênticas. Isto evidencia que nenhuma mudança brusca na conformação da proteína foi induzida pela adição de 2,0 mM do surfatante. Os resultados de modelagem confirmam esta observação, que foi tratada no capítulo 1.5 deste trabalho.

Na concentração de 5,0 mM observaram-se variações em duas regiões distintas da curva de SAXS: (i) em q pequenos ($< 0,04 \text{ \AA}^{-1}$), observa-se um aumento de inclinação, indicando um aumento na dimensão do objeto espalhador e (ii) em q grandes ($> 0,1 \text{ \AA}^{-1}$), observa-se uma mudança no perfil da curva. Para $[\text{SDS}] \leq 5 \text{ mM}$, não foi observado o pico intramicelar. Porém, difere dos resultados obtidos na ausência de proteína (Figura 42), o pico intramicelar já é mais evidente na concentração de 10 mM do surfatante na presença de BSA (Figura 43A).

Este pico torna-se mais intenso e se desloca para q pequenos com a adição gradativa de SDS (de $q \cong 0,2 \text{ \AA}^{-1}$ para 10 mM passa para $q \cong 0,17 \text{ \AA}^{-1}$ para 50 mM).

Curiosamente, o efeito da repulsão eletrostática entre micelas de SDS (interferência intermicelar) em $q \cong 0,04 \text{ \AA}^{-1}$ (Figura 42), não foi observado na presença de proteína (tratada a seguir).

Da mesma forma que para a proteína, foram feitas medidas de SAXS para solução contendo um polímero neutro hidrossolúvel (PEO). A Figura 44B mostra as curvas de espalhamento para soluções contendo contendo 1% de PEO. Novamente, o pico intramicelar em 1,0 % de PEO na presença de 10 mM do surfatante é mal definido e torna-se claro em 20 mM ($q \cong 0,2 \text{ \AA}^{-1}$).

Em 50 mM, este pico torna-se mais intenso mas não muda sua posição ($q \cong 0,19 \text{ \AA}^{-1}$) com o aumento da [SDS]. É interessante notar a presença do pico intermicelar em $q \cong 0,04 \text{ \AA}^{-1}$.

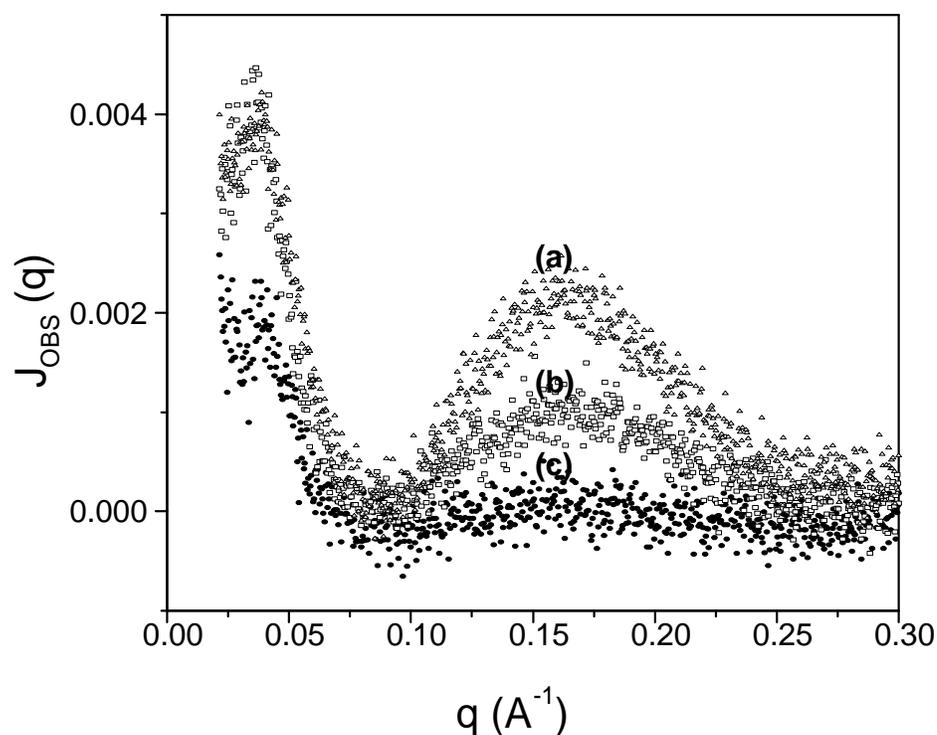


Figura 42- Curvas de espalhamento de raios-X a baixos ângulos em (a) 10, (b) 30 e (c) 50 mM de SDS, em tampão succinato de sódio 20 mM, pH=5,40.

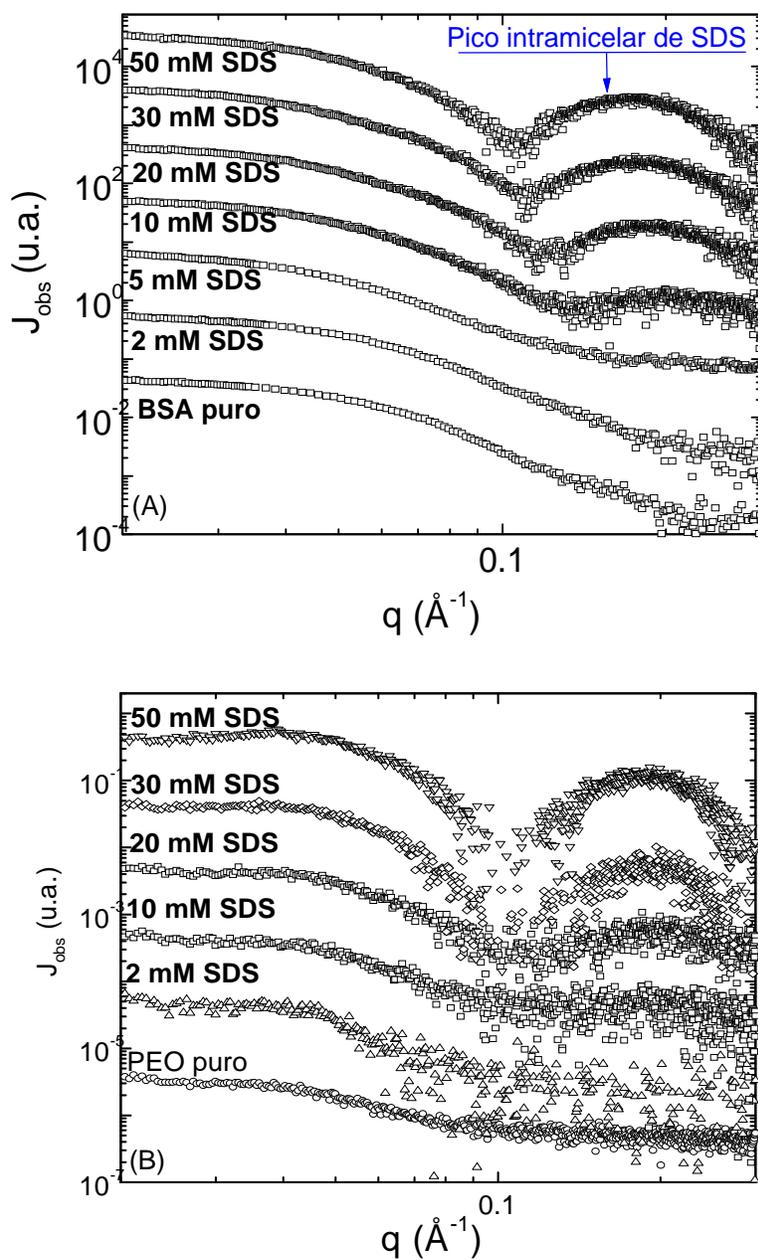


Figura 43- Curvas de SAXS para soluções de 1,0% de BSA (A) e para 1,0% de PEO (B), em várias concentrações de SDS. As curvas foram deslocadas na escala J_{obs} para melhor visualização.

3.18.2. Ajuste das Curvas para o Sistema BSA/SDS

A Figura 44 apresenta o ajuste às curvas de SAXS, a partir das coordenadas atômicas (programa CRY SOL) [85]. A forma monomérica e dimérica da Albumina do Soro Humano (HSA), foi empregada para ajustar as curvas das soluções de 1% de BSA na ausência e em presença de 2,0 mM de SDS, cujo valor é muito próximo da *cac*, tendo em vista que os dados cristalográficos da BSA não foram encontrados na literatura.

O excelente ajuste às curvas de SAXS indica que a BSA e HSA apresentam similaridade na estrutura cristalográfica, na ausência e em presença de pequenas quantidades de SDS na cadeia polipeptídica (Figura 44A). Pequenas diferenças na estrutura de ambas as proteínas não são perceptíveis quando avaliadas por SAXS. Portanto, em concentrações relativamente pequenas de SDS, não se observou mudança na estrutura da BSA como, por exemplo, sinal de desnovelamento. Turro e Lei [56], em concentrações pequenas de SDS, sugeriram também que a BSA não desnatura, mas somente ocorre ligação específica de molécula de SDS na BSA *via* interações iônicas ou hidrofóbicas, sem causar uma abertura de sua estrutura.

Por outro lado, na concentração próxima da *c_i*, portanto em 5,0 mM de SDS, o ajuste com a forma monomérica parece ser razoável em valores de $q < 0,1 \text{ \AA}^{-1}$, porém o ajuste se torna duvidoso na região de $q > 0,1 \text{ \AA}^{-1}$. O ajuste com a forma dimérica da HSA também foi empregado. Porém, não se obteve coerência dos valores teóricos com os experimentais (Figura 44B). É relevante salientar que os resultados dos ajustes para as formas monoméricas e diméricas em 5,0 mM de SDS apontam para uma mudança na conformação da proteína.

A partir da curva de SAXS correspondente à solução de BSA em 5,0 mM de SDS, determinou-se a função de distribuição de distâncias $p(r)$ que nos fornece informações sobre a forma e a dimensão máxima dos objetos espalhadores (Figura 45a). A Figura 45b mostra a forma da curva associada com a estrutura de estudo.

Comparando a Figura 45 com a 13 e com a Figura 45b⁸⁷, pode-se inferir que, na ausência de SDS, a albumina apresenta a forma de uma elipsóide com $R_g=32,1 \text{ \AA}$ e dimensão máxima $D_{\text{máx}}= 100 \text{ \AA}$. Por outro lado, na presença de 5,0 mM de SDS a curva de distribuição de distâncias é bem diferente. Neste caso, o R_g e a dimensão máxima assumem valores de 39,2 e 120 \AA , respectivamente.

De fato, segundo os valores do raio de giro e $D_{\text{máx}}$, a BSA está se “desenovelando” à medida que SDS é adicionado na solução.

Nesta concentração bem próximo da c_1 , identificado como o final do primeiro platô de tensão superficial (Figura 29), novas estruturas complexas começam a aparecer, considerando que ocorre a diminuição da tensão superficial e que de acordo com os resultados de SAXS a proteína começa a se desnóvelar.

Turro e Lei ^[56] não observaram mudança estrutural significativa por causa da ausência de micelas de SDS na solução. As conclusões propostas são baseadas na isoterma da Figura 7 na qual, em baixas concentrações de surfatante (que corresponde à região "a"), moléculas de surfatante ligam-se só especificamente. Este tipo de ligação causa uma expansão da proteína que é seguida de uma ligação não-cooperativa (região "b", Figura 7).

Estruturas do tipo "colar de pérolas" são observadas com a formação de micelas em concentrações mais elevadas (região "c"). Neste caso, tem-se uma ligação fortemente cooperativa, conforme mostrado na Figura 12 ^[56].

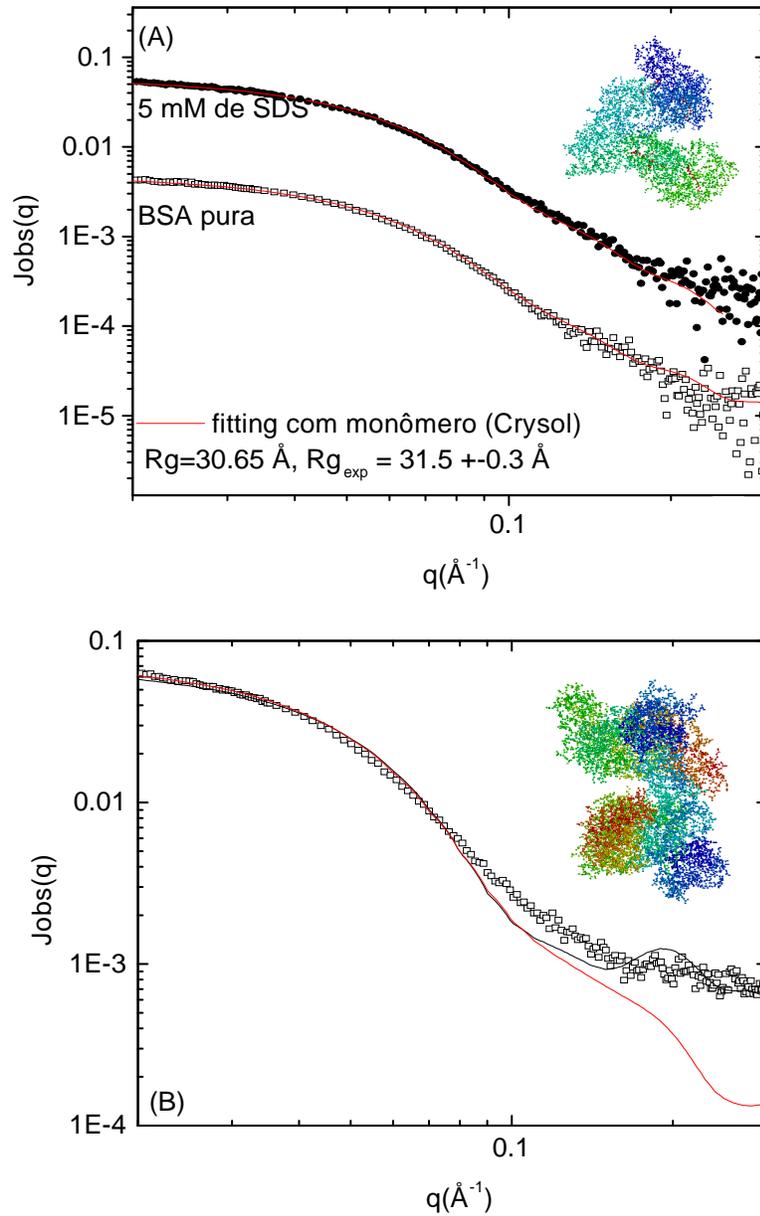


Figura 44- (A) Ajuste da forma monomérica da HSA nas curvas de SAXS de 1,0% de BSA na ausência e na presença 2,0 mM de SDS em 20 mM de tampão succinato, pH=5,4. (B) Ajuste para sistema com 5 mM de SDS. A linha vermelha mostra o ajuste com a forma monomérica e a preta o ajuste com a forma dimérica pelo programa Crysol. As estruturas estão mostradas no gráfico.

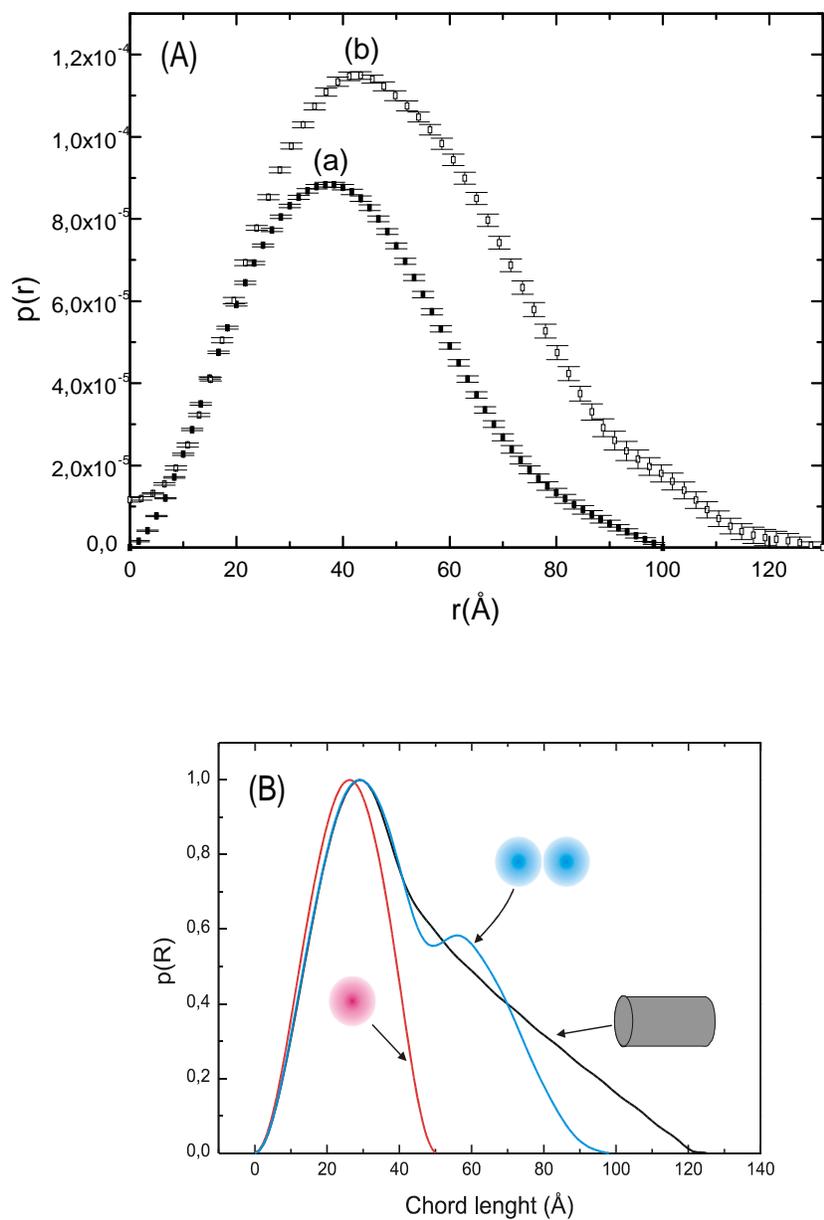


Figura 45 Funções $p(r)$ obtidas para: (a) 1,0 % de BSA em $\text{pH}=5,40$ com $D_{\text{m\acute{a}x}}=100 \text{ \AA}$ e $R_g=32,1 \pm 0,2 \text{ \AA}$ e (b) 1,0 % de BSA em 5,0 mM de SDS com $D_{\text{m\acute{a}x}}=130 \text{ \AA}$ e $R_g=39,2 \pm 0,5 \text{ \AA}$. A Figura (B) mostra a associa\c{c}\~ao da forma da macromol\c{e}cula com a $p(r)$ obtida em fun\c{c}\~ao de λ (\AA).

Portanto, para concentrações de SDS entre c_{ac} e c_i (Figuras 29 e 30) os monômeros de surfatante devem estar ligados na proteína, induzindo a sua desnaturação que se desnovele segundo resultados de SAXS. Não é possível discriminar por SAXS se os monômeros formam agregados pré-micelares uma vez que não se observa o pico intramicelar sobre a curva de SAXS. Vale a pena ressaltar, entretanto, que se observa uma tendência à formação deste pico na região de $q > 0,1 \text{ \AA}^{-1}$ (Figura 46). O não pronunciamento do mesmo sobre a curva pode ser devido ao efeito de concentração, isto é, a concentração de agregados tipicamente micelares é baixa e, portanto, não espalha suficiente radiação para aparecer um pico de intensidade importante.

Por outro lado, os resultados cinéticos também mostram que, em concentrações menores que 10 mM de surfatante, em presença de 1,0 % BSA, k_{obs} é praticamente constante. Relaciona-se este fato com agregados micelares pequenos e de grau de dissociação alto. Lembra-se ainda que, somente em concentrações acima de 15 mM, é que k_{obs} começa a aumentar. O SAXS, no entanto, indica o aparecimento de micelas já em 10 mM, enquanto que a condutividade elétrica indica o psp em 20 mM de SDS. Para soluções de BSA em concentrações maiores que 10 mM de SDS, as curvas de SAXS são ajustadas através do modelo de “colar de pérolas”, quando o fator da forma da micela de SDS $P(q)$ é representado por uma elipsóide de anisotropia ν (parâmetro de ajuste), Equação 37, página 42. A função de interação entre micelas, ou seja, o fator de estrutura $S(q)$ é definida segundo o “modelo fractal” [77], Equação 34, página 41, com alcance de correlação micela-micela ξ e dimensão fractal D (dois parâmetros do ajuste).

A Figura 46 mostra a intensidade de espalhamento vs. q , onde a linha cheia representa o melhor ajuste teórico aos dados experimentais, mostrando boa concordância. Os parâmetros extraídos da modelagem estão resumidos na Tabela 9.

Os resultados apontam para o fato de que concentrações maiores que 10 mM favorecem a abertura da cadeia polipeptídica da BSA (flexível e quase linear, $D=1$) com agregados de SDS crescendo de forma aproximadamente esférica em 10 mM ($\nu=1,0$) para pequenos agregados elipsóides em 50mM ($\nu=1,3$). O alcance de correlação micela - micela ξ é constante e da ordem de 100 Å. O crescimento micelar é condizente com a mudança da posição do pico intramicelar, já ressaltada na apresentação dos resultados. Além disso, da posição deste pico pode-se concluir que os agregados micelares no complexo são menores (10 mM de SDS) do que micelas de SDS puras e crescem até atingir dimensões próximas às das micelas regulares de SDS puras em torno de 50 mM (Figura 42). Para concentrações mais elevadas (60 e 80 mM), os agregados apresentaram o mesmo tamanho que em 50 mM, conforme resultados mostrados na Tabela 9.

Notamos um pico micelar bem definido em 20 mM de SDS (Figura 44A), muito embora em 10 mM também aparece um pico, mas é de baixa intensidade. Portanto, 20 mM de SDS coincide com o clássico ponto de saturação observado por condutividade elétrica (Figura 30), já também definido para sistemas formados por polímeros neutro hidrossolúvel (PEO) e surfatantes, diferentemente do que afirmaram Reynolds e Tanford [51] para a saturação da BSA por SDS determinada por diálise.

Os resultados de SAXS obtidos neste trabalho, no entanto, apontam para uma nova interpretação. O parâmetro anisometria (Tabela 9) mostra que o agregado micelar cresce somente até 50 mM de SDS. Observa-se que, em 60 e 80 mM, a anisometria (ν) tem o mesmo valor de 50 mM.

Esse fato pode estar relacionado com o ponto de saturação indicado por Reynolds e Tanford porque a saturação em 47 mM aponta para uma região onde os agregados param de crescer.

Segundo os resultados obtidos de SAXS, combinados com o condutivimétrico, esse ponto de saturação, que a literatura aceita há quase cinquenta anos, pode ser real, porém não é a definição mais apropriada.

Tabela 9- Parâmetros estruturais obtidos pelo ajuste das curvas supondo o modelo do “colar de pérolas”, onde R_{par} é o raio parafínico, σ a espessura da camada polar, ρ_{pol} a densidade eletrônica polar, ν é a anisometria (razão entre o eixo maior e menor), D dimensão fractal ($D=3$ para esferas em arranjo compacto e $D=1$ esferas num arranjo linear) e ε é o tamanho de correlação.

Parâmetros	1,0% BSA						1,0%PEO		
	10 mM	20 mM	30 mM	50 mM	60 mM	80 mM	10 mM	30 mM	50 mM
R_{par} (Å)	16,7	16,7	16,7	16,7	16,7	16,7	16,7	16,7	16,7
σ (Å)	7	7	7	7	6,5	6,0	5,5	6,0	4,6
ρ_{pol} (e / Å ³)	0,420	0,395	0,400	0,395	0,395	0,398	0,400	0,400	0,400
ν	1,01	1,1	1,2	1,3	1,3	1,3	1,01	1,01	1,01
D	1,01	1,01	1,01	1,01	1,01	1,01	1,01	1,01	1,01
ε (Å)	100	100	100	100	90	90	70	100	100

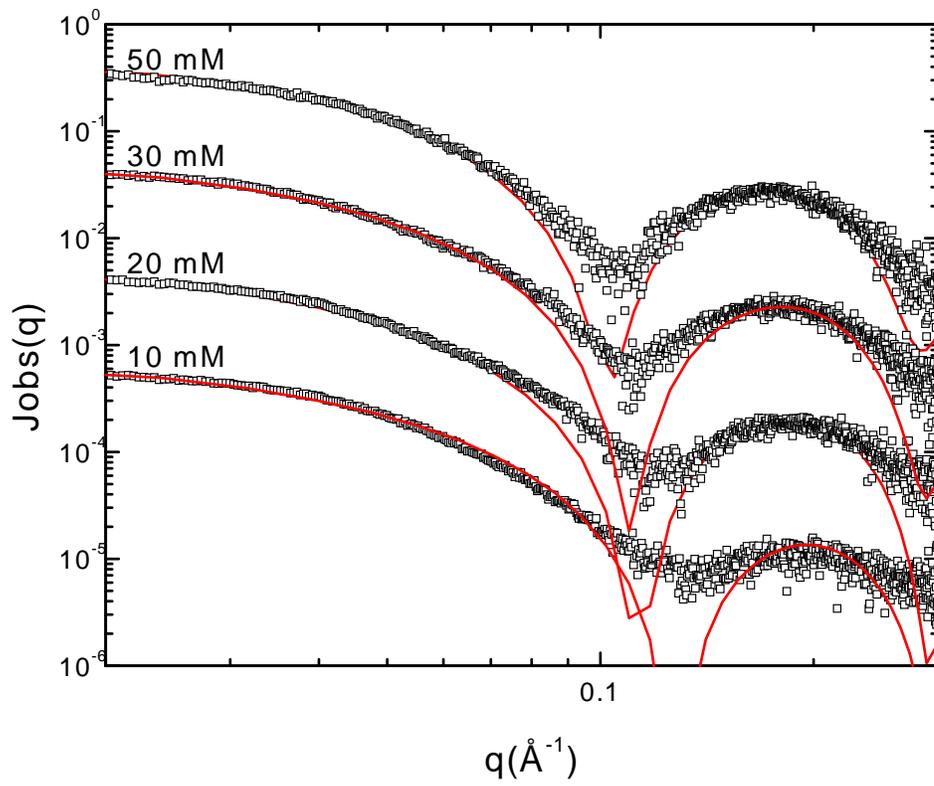


Figura 46- Curvas da intensidade de espalhamento obtidos para amostras de 1,0% de BSA em diferentes concentrações de SDS, em pH=5,4.

3.18.3. Ajuste das Curvas para o Sistema PEO/SDS

As curvas de espalhamento para o sistema na presença de PEO são bem diferentes daquelas observadas para a proteína (Figura 47). Para o sistema em 20 mM de SDS, observou-se um ombro acentuado em q aproximadamente $0,2 \text{ \AA}^{-1}$ o que é uma forte evidência de agregados micelares. Para concentrações até 10 mM de SDS, pode-se obter informações relacionadas com a estrutura do polímero em solução num gráfico de $I \times q^2$ versus 2θ . Se a forma da região intermediária deste gráfico torna-se horizontal, implica em dizer que o polímero é flexível em solução tal como definido pela Figura 15. De fato, as curvas obtidas em 1,0% de PEO, em 2,0, 5,0 e 10,0 mM de SDS conferem esta característica (Figura 47), e em todos os casos, foram calculados o comprimentos de persistência da ordem de 23 \AA utilizando a Equação 46:

$$1,91 = \left(\frac{4\pi\theta^+}{\lambda} \right) a \quad (46)$$

Na qual, $\theta^+(=0,085 \text{ \AA}^{-1})$ é o ângulo observado experimentalmente do ponto de transição da Figura 46B, $\lambda(=1.608)$ é o comprimento de onda, "a" o tamanho de persistência.

Para concentrações de 20 e 30 mM os dados experimentais se ajustaram regularmente ao modelo do "colar de pérolas, conforme observado na Figura 47. A Tabela 9 inclui os parâmetros de ajuste, e pode-se afirmar que o polímero adquire a conformação quase linear ($D = 1,0$), análogo à BSA.

Entretanto, não foi observado crescimento das micelas de SDS ($\nu=1,0$, Tabela 9). Para 50 mM, existe um bom ajuste do pico intramicelar com $\nu \approx 1,0$, mas o modelo já não se ajusta bem para $q < 0,1 \text{ \AA}^{-1}$, devido ao aparecimento de um pico de interferência em $q \approx 0,04 \text{ \AA}^{-1}$. Portanto, parece que as micelas no complexo PEO/SDS a 50 mM do surfatante, não estão totalmente "blindadas", diferente do que foi observado no sistema BSA/SDS.

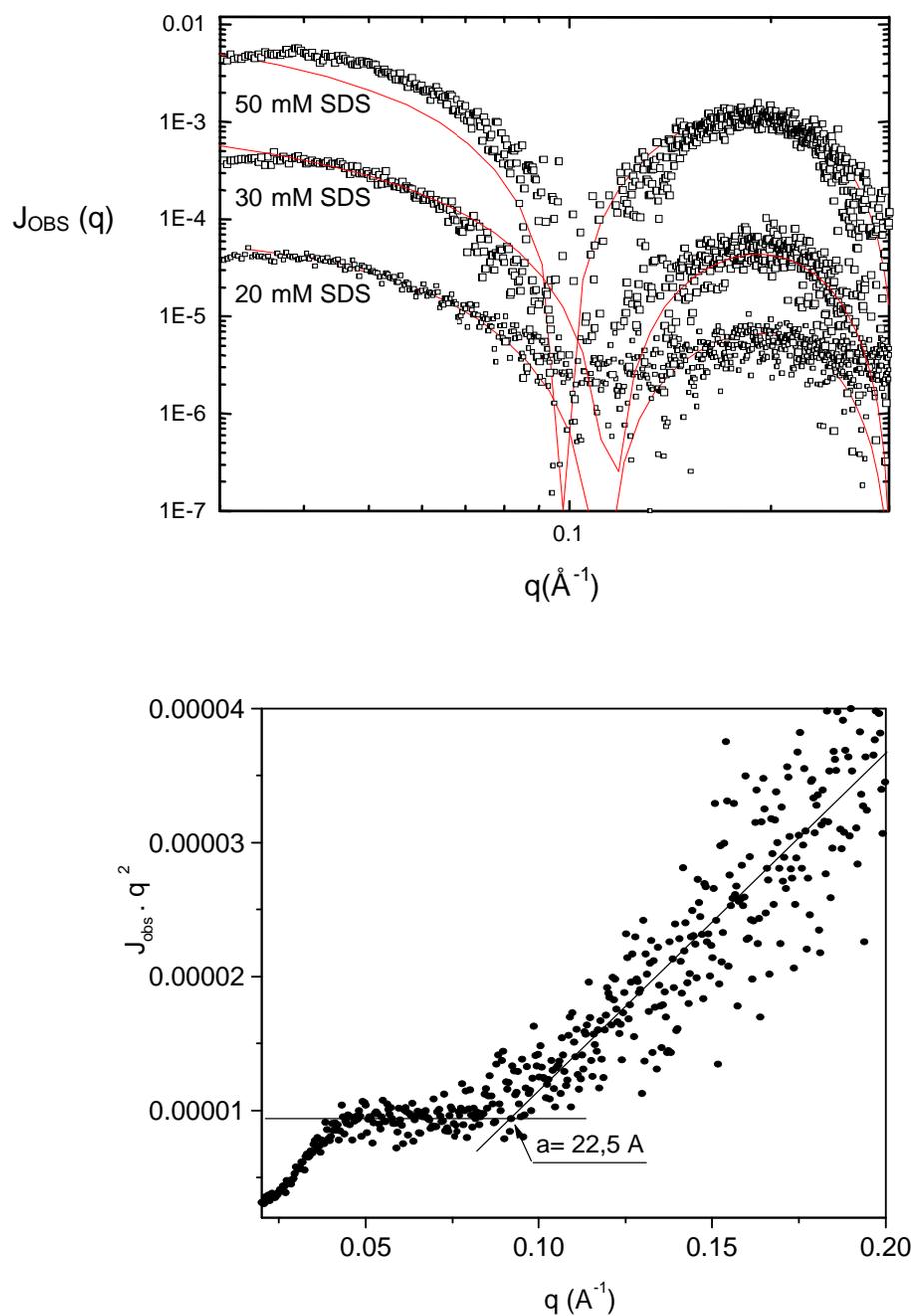


Figura 47- Curvas da intensidade versus ângulo de espalhamento para amostras de 1,0 % de PEO em diferentes concentrações de SDS, em pH=5,40. Curvas de $J_{\text{OBS}} \times q^2$ versus q obtidas para amostras de 1,0% de PEO, em pH=5,4.

3.19. Uma Nova Interpretação sobre a Saturação da Proteína por Surfatante

Finalmente, os resultados de SAXS são condizentes com estruturas complexas que catalisam em torno de 20 mM conforme identificado também por condutividade. Em concentrações menores que 2,0 mM de SDS, a proteína não se desnatura, isto é, não perde sua estrutura terciária, embora os monômeros de SDS ligam-se aos sítios de mais alta energia por ligações específicas. O início desta ligação é identificado por condutividade e por tensão superficial.

Em concentrações, tal que alcancem a c_f , a BSA começa a sofrer modificações estruturais. O ponto de saturação das micelas na cadeia macromolecular da proteína é observado em torno de 20 mM, e o que foi observado por Tanford e Reynolds não seria necessariamente saturação, uma vez que as informações obtidas por SAXS sugerem que os agregados crescem de 20-50 mM de SDS e acima desta concentração não se verifica mais mudanças do parâmetro v .

Além disso, Takagi e colaboradores ^[116], discutindo resultados de viscosidade deste mesmo sistema, desabafaram afirmando que a *“crença na quantidade fixa de 1,4g/g é errada e duvidosa”*.

Então, com base nos resultados, uma definição mais apropriada para a saturação seria o que chamamos de "*psp condutivimétrico*", observado nos perfis de condutividade elétrica, que na realidade seria nada mais do que o clássico ponto de saturação que por medidas de diálise não é verificado porque o agregado micelar cresce até nas proximidades de 50 mM de SDS.

A Figura 48 resume as técnicas empregadas e suas informações sobre a formação de complexos BSA/SDS. A técnica de condutividade tem sensibilidade para identificar o *psp* em torno de 20 mM (para 1,0% de BSA) e a técnica de diálise observa esta saturação em 47 mM. Em concentrações na faixa de 2,5 a 10 mM, não se observa nenhuma catálise, tendo em vista que agregados micelares são pequenos e não têm a habilidade de concentrar prótons. A catálise inicia somente em torno de 18 mM de SDS, nas proximidades do *psp* condutivimétrico. Por outro lado, a técnica de SAXS mostra um pico bem definido de micelas em solução, mas de baixa intensidade, como pode ser verificado na Figura 47 na curva em 10 mM para os agregados formados por PEO/SDS.

Figura 48- Quadro de resumo das técnicas empregadas no estudo da interação entre o dodecilsulfato de sódio e a albumina do soro bovino.

[SDS], mM	2,5	6,3	10	20	45	50
SAXS	Proteína nativa	desnaturação		Micelas pequenas de SDS, elipsóides prolata		
R _g (Å)	32	39	Cadeia aberta			
D _{máx} (Å)	100	130				
Tensão superficial	Ligação especif.	Associação cooperativa		Saturação (diálise)		
Condutividade	<i>cac</i>	<i>c_f</i>	<i>psp</i>			
Cinética	Ausência catálise			Catálise		

Portanto, uma dimensão técnica sobre o episódio de um “real” ponto de saturação que defina o início da formação de micelas interagindo com a cadeia da proteína foi discutida. As evidências metodológicas que há anos têm reportado sobre o *psp* e que tentam caracterizar as interações que ocorrem com polímeros e surfatantes, são desmistificadas pelos resultados de SAXS que corroboram com os resultados da reação de hidrólise do 2-ND. Ora, a catálise ocorre em 20 mM de SDS o que sugere que micelas comecem a se formar nesta concentração. O fato reportado na literatura como sendo o *psp* em 47 mM, não é contraditório, porém, não é saturação. Os resultados de anisometria deixam claro que, os agregados crescem na faixa de 20 - 50 mM de SDS. Portanto, O *psp* condutivimétrico é o mais adequado para definir o ponto de saturação.

Nós observamos também que os agregados formados com surfatante/proteína e surfatante/polímero apresentam similariedade de comportamentos, conforme observado também por Adams [122], embora o raio hidrodinâmico do PEO (100.000) é de 20 nm e da BSA de 7.4 nm, ambos comportam-se de maneira análoga em algumas situações.

CAPÍTULO IV

CONCLUSÕES

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos a partir do conjunto das técnicas utilizadas para elucidar o processo de interação entre proteínas e surfatantes, nos permitiu chegar a conclusões importantes sobre aspectos relacionados aos tipos de agregados que se formam em solução e suas principais características.

(1) O relevante significado do segundo ponto de descontinuidade definido como c_f e a região não-linear entre c_f e psp foi relacionado com diferentes tipos de agregados. Nas soluções em domínios diluídos de SDS (2 mM) a BSA e a HSA apresentaram estruturas cristalográficas semelhantes.

Nestas condições, monômeros de SDS ligam-se especificamente na cadeia macromolecular da BSA sem alterar a sua conformação. Por outro lado, as formas monoméricas e diméricas da HSA não se ajustaram quando a [SDS] foi 5 mM (próximo da c_f), o que indicou um provável alongamento da macromolécula, tendo em vista a variação obtida pelo raio de giro (R_g).

(2) Em concentração [SDS] = 10 mM, observaram-se indícios do aparecimento das primeiras micelas em solução, evidenciados pelo ajuste dos resultados de SAXS e do modelo teórico “colar de pérolas”. Em [SDS] > 10 mM foi verificado que estes agregados (BSA/SDS) apresentavam características de micelas que catalisavam a hidrólise do 2-ND.

Por comparação, o sistema PEO/SDS se ajustou regularmente ao modelo somente nas concentrações de SDS próximas a 20 mM. Os resultados foram consistentes com estruturas linearmente flexíveis de acordo com o modelo “worm like” para agregados formados por polímeros sintéticos.

(3) Ao lado deste fato, existe a interpretação da desnaturação da proteína ocasionando crescimento de micelas. Além disso, o psp , que define a formação de micelas livres por condutividade elétrica, não coincidiu com o segundo platô obtido por tensão superficial que representa a formação adicional de micelas livres. O ponto de saturação (psp), definido por Reynolds and Tarford em 47,0 M SDS / g BSA, é muito diferente do valor obtido por condutividade elétrica em 20,0 M SDS/ g BSA. A saturação que é obtida por diálise, na realidade, corresponde a uma região obtida por SAXS cujos agregados micelares praticamente não crescem mais .

(4) Os gráficos de condutividade elétrica mostram ligação específica do SDS na proteína indicada pelas mudanças de ζ com o aumento da concentração de BSA, contrariamente aos perfis observados por PEO/SDS na qual é independente da concentração do polímero.

(5) Os complexos formados por BSA/SDS na faixa de ζ - p_{sp} são agregados parecido com micelas com elevado grau de ionização ($\alpha > 0,7$), características de agregados pequenos conforme parâmetros de SAXS, e que continuamente mudam de tamanho. Nesta estágio, há o desenvolvimento de agregados mistos.

(6) O gráfico de k_{obs} versus [SDS], em 1,0% de BSA, mostra catálise somente em 20 mM, consistente com a formação de agregados micelares no p_{sp} evidenciados também pela reação de hidrólise em vários pH e estão de acordo com o item (5). Observou-se que, agregados micelares com elevado valor de α , não concentram próton na interface. Em misturas de PEO e SDS, já se conhece que micelas de SDS livres são melhores catalisadores do que complexos PEO/SDS, porque estes agregados apresentam um elevado valor de α .

7) Finalmente, misturas de SDS e BSA, em hidrólise de acetais, comportam-se semelhantemente a misturas de SDS e PEO. Em princípio, agregados formados por PEO/SDS podem ser utilizados como um modelo adequado para reações químicas de surfatantes aniônicos e proteínas.

REFERÊNCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MARZZOCO, A; TORRES, B. B. **Bioquímica básica**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara , 1990. cap. 2, p. 9-27.
2. ALBERTS, B. **Biologia molecular da célula**. 3. ed. Porto Alegre: Editora Artes Médicas, 1997. cap. 3, p. 111-130.
3. VOET, D.; VOET, J. **Biochemistry**. New York : John Wiley & Sons, 1990. cap. 11, p. 271-286.
4. ESQUEMA de uma membrana. Disponível em: <<http://ubu.hahnemann.edu/heme-iron/-membrane.htm>>. Acesso em maio de 2001.
5. SILVA FILHO, E. A. **Estudo termodinâmico da interação de tensoativos iônicos com tripsina**. 1995. 134f. Tese (Doutorado), Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1995.
6. VAN HOLDE; KENSAL E. **Bioquímica física**. São Paulo: Ed. Edgard Blücher Ltda, 1975.
7. CARTER, D; HO, J. X- Structure of serum albumin. In: **ADVANCES in protein chemistry**. New York: Academic Press Inc., 1994. v.45, p. 153-181.
8. TANAKA, M.; ASahi, Y. Interaction between drugs and water-soluble polymers. VII. binding of berberine with bovine serum albumin. **J.M.S. Pure Appl. Chem.**; v. A32, n.2, p. 339-347, 1995.
9. MEREDITH, S. C.; TONSGARD, J. H. Characterization of the binding sites for dicarboxylic acids on bovine serum albumin. **J. of Biochem.**; v. 276, p. 569-575, 1991.
10. PETERS, T. J. Serum albumin. In: **ADVANCES in protein chemistry**. New York: Academic Press Inc.; 1985. v.37, p. 161-188.
11. LIN, V.J.C.; KOENING, J.L. Raman studies of bovine serum albumin. **Biopolymers**. v.15, p. 203-218, 1976.
12. FASMAN, G.D.; TIMASHEFF, N. **Fine structure of proteins and nucleic acids**. New York: Marcel Dekker, 1970. v.4.
13. JAIN, M. K. **Introduction to biological membranes**. 2nd ed. New York: John Wiley, 1988. p. 423.
14. HUNTER, R. J. **Foundations of colloids science**. New York: Clarendon Press, 1995. v.1.
15. ATWOOD, D.; FLORENCE, A. T. **Surfactants Systems: their chemistry, pharmacy and biology**. New York: Chapman, 1983. cap. 3, p. 72-123.
16. ATWOOD, D.; FLORENCE, A. T. **Surfactants Systems : their chemistry, pharmacy and biology**. New York: Chapman, 1983. cap. 10 (p. 614-697), cap. 11 (p. 698-777).

17. TANFORD, C. **The Hydrofobic effect:** formation of micelles and biological membranes. 2nd ed. New York: John Wiley, 1973.
18. STIGTER, D. micelle formation by ionic surfactants 1. 2- phase model, Gouy-Chapman model, hydrophobic interactions. **J. of Col. and Inter. Sci.**; v.47, n. 2, p.473-482, 1974.
19. GRUEN, D. W. R. The standard picture of ionic micelles. **Prog. Coll. Pol. Sci.** v.70, p.6-16, 1985.
20. BUNTON, C. A. Reactions kinetics in aqueous surfactants solutions. **Catal. Rev. Enz.** V.20, n. 1, p. 1-56, 1979.
21. SHINODA, K. Colloidal surfactants. **The formation of micelles;** New York: Academic Press, 1963, p. 1-95.
22. LINDMAN, B. Structural aspects of surfactant micellar systems. In: TADROS, Th. F. (Ed.) **Surfactants.** London: Academic Press, 1984.
23. MENGER, F. M.; PORTNOV, C. E. On the chemistry of reactions proceeding inside molecular aggregates, **J. Am. Chem. Soc.**; v.89, p.4698-4703, 1967.
24. BUNTON, C. A. et al. Ion binding and reactivity at charged aqueous interfaces. **Am. Chem. Soc.**, v.24, n.12, p.357-364, 1991.
25. BEREZIN, I. V.; MARTINEK, K.; YATSIMIRKII, A. K. Physicochemical foundations of micellar catalysis. **Russ. Chem. Rev. Uspekki Khimii**, v.42, n.10, p.787-798, 1973.
26. ROMSTED, L. S. Micellar effects on reactions rates and equilibria, In: MITTAL, K.L. (Ed.) **Surfactants in solutions.** New York: Plenum Press, v.2, p.1015-1067, 1984.
27. QUINA, F. H.; CHAIMOVICH, H. Ion exchange in micellar solutions. 1. conceptual framework for ion exchange in micellar solutions. **J. Phys. Chem.** v.83, n.14, p.1844-1850, 1979.
28. FERREIRA, L. C. et al. Pseudofase ion-exchange model applied to kinetics in aqueous micelles under extremal conditions: a simple modification. **J. Phys. Chem.** v.96, n.22, p.9058-9061, 1992.
29. DICKINSON, E. Proteins in solution and at interfaces. In: Goddard, E. D.; ANANTHAPADMANABHAN, K.P. (Ed.). **Interactions of surfactants with polymers and proteins.** Boca Raton: CRC Press, 1993. cap. 7, p. 295-317.

-
30. ANANTHAPADMANABHAN, K. P. Protein - surfactant interactions. In: Goddard, E. D.; ANANTHAPADMANABHAN, K.P. (Ed.). **Interactions of surfactants with polymers and proteins**. Boca Raton: CRC Press, 1993. cap. 8, p. 319-365.
 31. SAITO, S. Polymer-surfactant interactions. In: CROSS, J. **Nonionic surfactants**. New York: M. Dekker, 1997. cap. 15, p.881-926.
 32. JUAN, M.R.P.; MA ROSARIO, R.N. Protein adsorption and protein-lipid interactions at the air-aqueous solution interface. **Coll. and Surf.**; v.103, p.91-93,1995.
 33. JUAN, M. R. P et al. stability and mechanical strength of aqueous foams containing food proteins. **Coll. And Surf.**; v.99, p.65-78, 1995.
 34. LIN, T. J. Microemulsions and application of solubilization in cosmetics. In: Rieger, M.M. (Ed.). **Surfactants in cosmetics**. New York: M. Dekker, 1985, cap. 2, p. 29-53.
 35. ARNEBRANT, T.; WAHLGREN, M. Protein - surfactant interactions at solid surfaces. In: HORBETT, T.A.; BRASH, J.L. **Proteins at interfaces**. Washington: ACS, 1995, cap. 17, p. 239-254.
 36. LOMAX, E.- The practical importance of surfactant monomer concentrations [artigo científico]. 1997. Disponível em: <<http://alphaline.com/11/specchem.htm>; 1997>. Acesso 11 set. de 1997.
 37. COOPER, R.; BERNER, B. Interactions of surfactant with epidermal tissues: physicochemical aspects. In: Rieger, M. M. (Ed.). **Surfactants in cosmetics**. New York: M. Dekker, 1985. cap. 7, p. 195-210.
 38. THAU, PAUL. Surfactants for skin cleaners. Rieger, M.M. (Ed.). **Surfactant in cosmetics**. New York: M. Dekker, 1985. cap. 11, p.349-376.
 39. IMOKAWA, G.; TAKEUCHI, T. Surfactants and skin- roughness. **Cosmet. Toiletries**, v.91, n. 8, p.32-46, 1976.
 40. IMOKAWA, G. Comparative study on the mechanism of irritation by sulfate and phosphate type of anionic surfactants- **J. Soc. Cosmet. Chem.**; v. 31, n.2, p. 45-66, 1980.
 41. IMOKAWA, G.; SAMURA, K.; KATSUMI, M. Study on skin roughness caused by surfactants: II. correlation between protein denaturation and skin roughness. **J. Am. Chem. Soc.**; v.52, n.12, p.484- 489, 1975.
 42. CABANE, B. Structure of some polymer - detergent aggregates in water. **J. of Phys. Chem.**; v.8, n.7, p.1839- 1845,1977.

-
44. GODDARD, E.D. Polymer-surfactants interactions part I- uncharged water-soluble polymers and charged surfactants. In: Goddard, E.D.; ANANTHAPADMANABHAN, K. P. (Ed.). **Interactions of surfactant with polymers and proteins**. Boca Raton: CRC Press, 1993. cap. 4, p. 123-169.
 45. OAKES, J. Protein- surfactant interactions nuclear magnetic resonance and binding isotherm studies of interactions between bovine serum albumin and sodium dodecyl sulphate. **J. chem. Soc. Faraday Trans I.**; v.70, p.2200- 2209,1974.
 46. LYKLEMA, J. Adsorption at solid-liquid interfaces with special reference to emulsion Systems. **Coll. and Surf.**; v.91, p.25-38, 1994.
 47. KONDO, T. ElectroKinetic phenomena in biological systems. In: KITAHARA, A.; WATANABE, A. **Electrical phenomena at interfaces**. New York: M. Dekker, 1984. cap. 15, p. 397-412.
 48. FOSTER, J. F. A physical- chemical study of zein in aqueous detergent solutions. **J. Phys. Col. Chem.**; v. 53, n. 1, p. 175- 183, 1949.
 49. SCHWUGER, M.; BARTNIK, F. G. Interaction of anionic surfactant with proteins, enzymes and membranes. In: GLOXHUBER, C. **Anionic surfactants: biochemistry, toxicology and dermatology**. New York: M. Dekker, 1980. cap. 1, v.10, p. 1-49.
 50. LOVE, R. L.; MARKUS, G.; WISSLER, F. C. Mechanism of protection by anionic detergents against denaturation of serum albumin. **J. of Biol. Chem.**; v. 239, n.11, p.3687- 3693, 1964.
 51. TANFORD, C.; REYNOLDS, J.; NOZAKI, Y. The interaction of a cationic detergent with bovine serum albumin and other proteins. **J. Biol. Chem.**; v.249, n.14, p. 4452-4459,1974.
 52. JONES, M. N. A microcalorimetric study of the interaction between trypsin and sodium n-dodecyl sulphate. **Biochim. Biophys.**; v.491, p. 12,1977.
 53. BLOMBERG, E.; CLAESSION, P. M. Proteins at interface studied with the surface force technique. In: HORBETT, T.A.; BRASH, J.L. **Proteins at interface**. Washington: ACS, 1995. cap. 21, p. 296-310.
 54. JONES, M. N. A theoretical approach to the binding of amphipathic molecules to globular proteins. **Biochem. J.**; v.151, p.109-114, 1975.
 55. CONNORS, K. A. **Binding constants: the measurement of molecular complex stability constant**. New York: John Wiley & Sons, 1987. p. 69-85.
 56. TURRO, N. J.; LEI, X. G. Spectroscopy probe analysis of protein-surfactant interactions: the BSA/SDS systems. **Langmuir**, v.11, p.2525- 2533, 1995.

-
57. GODDARD, E. D. J. Polymer and surfactant of opposite charge. In: Goddard, E. D.; ANANTHAPADMANABHAN, K.P. (Ed.). *Intercations of surfactants with polymers and proteins*. Boca Raton: CRC Press, 1993. cap. 4, p. 171-201.
58. SHAW, D.J. **Introdução à química dos colóides e de superfície**. São Paulo: Ed. Edgard Blücher Ltda, 1975. cap. 4, p.42-60.
59. ADASOM, Arthur. W. **Physical chemistry of surfaces**. 5th ed. New Yor: Wiley-interscience: J. Wiley, 1990. p.4-40.
60. FRIBERG, S. E.; EL-NOKALY, M. Surfactant association structures of relevance to cosmetics preparations. In: RIEGER, M. M. **Surfactants in cosmetics**. New York: M. Dekker, 1985,p.488.
61. JONES, M. N. The interactions of sodium dodecyl sulfate with polyethylene oxide. **J. Coll. Interf. Sci.**; v.23, p.36- 40, 1967.
62. KNOX, W.J.; PARSHALL, T. O. The interaction of sodium dodecylsulfate with gelatin- **J. of Coll. and Interf. Sci**; v. 33,n.1, p.16- 23, 1970.
63. MINATTI, E.; ZANETTE, D. Salt effects on the interaction of poly(ethylene oxide) and sodium dodecyl sulfate measured by conductivity. **Coll. and Surf.**; v.113, p.237- 246, 1996.
64. ZANA, R.; LIANOS, P.; LANG, J. Fluorescence probe studies of the aggregation state of sodium dodecyl - sulfate in aqueous solutions of polyoxyethyleneglycol and poly-N-vinylpyrrolidone. **Abstr. Pap. Am. Chem. Soc**, v.183, p.23- 39, 1982.
65. EVANS, H. C. Alkyl sulphates .I. critical micelle concentrations of sodium salts. **J. Chem. Soc.**; p.579- 686, 1956.
66. TURRO, N. J.; YEKTA, A. Luminescent probes for detergent solutions. A simple procedure for determination of the mean aggregate number of micelles. **J. Am. Chem. Soc.**; v.100, p.5951- 5962,1978.
67. ZANETTE, D. et al. Polymer- surfactant interactions demonstrated by a kinetic probe: degree of ionization. **Coll. and Surf.**; v.108,p.91- 100, 1996.
68. WITTE, F. M.; ENGBERT, J. B. F. N. Pertubation of SDS and CTAB micelles by complexation with poly(ethylnene oxide) and poly(propylene oxide). **J. Org. Chem.**; v.52, p.4767- 4772, 1987.
69. KAMENKA, N.; ZANA, R. Interaction of magnesium and cadmium dodecylsulfate with poly(ethylene oxide) and poly(vinylpyrrolidone): condutance, self-

- deffusion and fluorescence probing investigations. **J. Coll. and Interf. Sci.**; v.188, p.130-138, 1997.
70. ZANETTE, D.; FROEHNER, S. J.; NOME, F. Micellar- mediated general acid catalysed acetal hydrolysis reaction in comicelles. **J. Chem. Perkin Trans.**; v.2, p.673- 676, 1996.
71. ZANETTE, D. et al. Effects of polymer and salt concentration on ketal acid hydrolysis in solutions of sodium dodecyl sulfate and poly(Vinylpyrrolidone) or poly(ethylene oxide). **Langmuir**, v.13, n.4, p.659-665,1997.
72. ZANETTE, D.; SANTOS, S. F. Interactions of anionic surfactant with poly(ethilene oxide) and bovine serum albumin polymers: effect of the couterion hydrophobicity. **Coll. and Surf.**; v.147, p.89-105, 1999.
73. LUNDGREN, H.P. Synthetic protein fibers from protein-detergent complex, **Tex. Res. J.**; v.15, n.10, p.35-353, 1945.
74. TANFORD, C.; REYNOLDS, J. The gross conformation of protein- sodium dodecylsulfate complexes. **J. of Biol. Chem.**; v.245, n.19, p.5161- 5165,1970.
75. SHIRAHAMA, K.; TSUJÜ, K.; TAKAGI, T. Free boundary electrophoresis of sodium dodecylsulfate - proetin pypeptide complexes with special reference to SDS- polyacrylamide gel electrophoresis. **J. Biochem. Tokyo.**; v.75, n.2, p.309-319, 1974.
76. LUNDAHL, P.; GREIJER, E.; SANDBERG, M. A model for ionic hydrophobic interactions and hydrogen - bonding in sodium sulphate –protein complex- **Biochem. Biophys. Acta**, v.873, p.20- 26, 1986.
77. GUO, X. H.; ZHAO, N.M.; CHEN, S.H.; TEIXEIRA, J. Small-angle neutron scattering study of the structure of protein/detergents complexes. **Biopolymers**, v.29, p.335-346, 1990.
78. ITRI, R.; AMARAL, L.Q. Micellar- shape anisometry near isotropic- liquid- crystal phase transitions. **Phys. Rev.**; v.47, n.4, p.2551- 2557, 1993.
79. CASTELLETTO, V.; ITRI, R.; AMARAL, L.Q. Micellar aggregates near the isotropic- cubic liquid crystal phase transition. **J. Chem. Phys.** v.107, n.2, p.638- 644, 1997.
80. TEIXEIRA, C. V. **Estudo da influência de aditivos decanol e anestésico local tetracaína em sistemas micelares.** 1999, 130f. Tese (Doutorado). Instituto de Física, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.
81. GUINIER, A.; FOURNET, G. **Small- angle x- ray scattering.** New York: Wiley, 1955.
82. GLATTER, O.; KRATKEY, O. - **Small- Angle X-Ray Scattering.** London: Academic press, 1982, p. 361-371.

-
83. AZÁROFF, L. V. Elements of x-ray crystallography. New York: Mc Graw-Hill, 1968.
84. SVERGUN, D. I.; SEMENYUK, A. V. GNOM - a program package for small-angle scattering data processing. **J. Appl. Cryst.**; v.24, p. 537-540, 1991.
85. SVERGUN, D. I. et al. CRY SOL - A Program to Evaluate x-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. **J. Appl. Cryst.**; v.28, p.768-773, 1995.
86. TANFORD, C. Micelle shape and size. **J. Phys. Chem.**; v.76, n. 21, p.3020-302, 1972.
87. FISCHER, H. **Estudos estruturais de xerogéis de óxido de níquel.** 2000, 100f. Dissertação (Mestrado). Instituto de Física, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.
88. FIFE, T. H.; JAO, L. K. Substituent effects in acetal hydrolysis- **J. Org. Chem.**; v.22, n.485, p.1492-1495, 1957.
89. LIMA, C. F.; NOME, F.; ZANETTE, D. First evidence of poly(ethyleneoxide)- mixed sodium dodecylsulfate / sodium decyl phosphate complexes. Note. **J. Coll. and Interf. Sci.**; v.189, p.174-176, 1997.
90. MUKERJEE, P.; MYSELS, K.L.. **Critical micelle concentrations of aqueous of surfactant System (NSRDS-MBS36).** Washington:D.C, 1971.
91. LIANOS, P.; LANG, J. Static and Dinamic Properties of Sodium propyl(nonyl) benzenesulfonate micelles. **J. Coll. Interf. Sci.**; v.96, n.1, p.222-228, 1983.
92. LIMA, C. F. **Investigação de complexos mistos polímero-surfatantes formados por misturas de dodecilsulfato de sódio e decilfosfato de sódio com polióxido de etileno: medidas de condutividade, tensão superficial e evidências cinéticas.** 1998, 100f. Tese (Doutorado). Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1998.
93. ZANETTE, D.; et al.- Quantitative treatment of ketal hydrolysis in aqueous solutions containing polymer-surfactant complex using a pseudo phase kinetic model. **J. Phys. Chem.**; v.98, n.47, p.12361-12366, 1994.
94. FRESCURA, V.L. A.; NOME, F.; BUNTON, C. A. Nucleophilically assisted deacylation in sodium dodecanoate and dodecyl sulfate micelles quantitative evidence on premicellar complexes. **J. Phys. Chem.** v.98, p.12415-12419, 1994.
95. ZANETTE, D. et al. Effects of monoalkyl phosphate surfactants upon the acid hydrolysis of dioxolanes. **J. Phys. Chem.**; v.96, p.1463- 146, 1992.

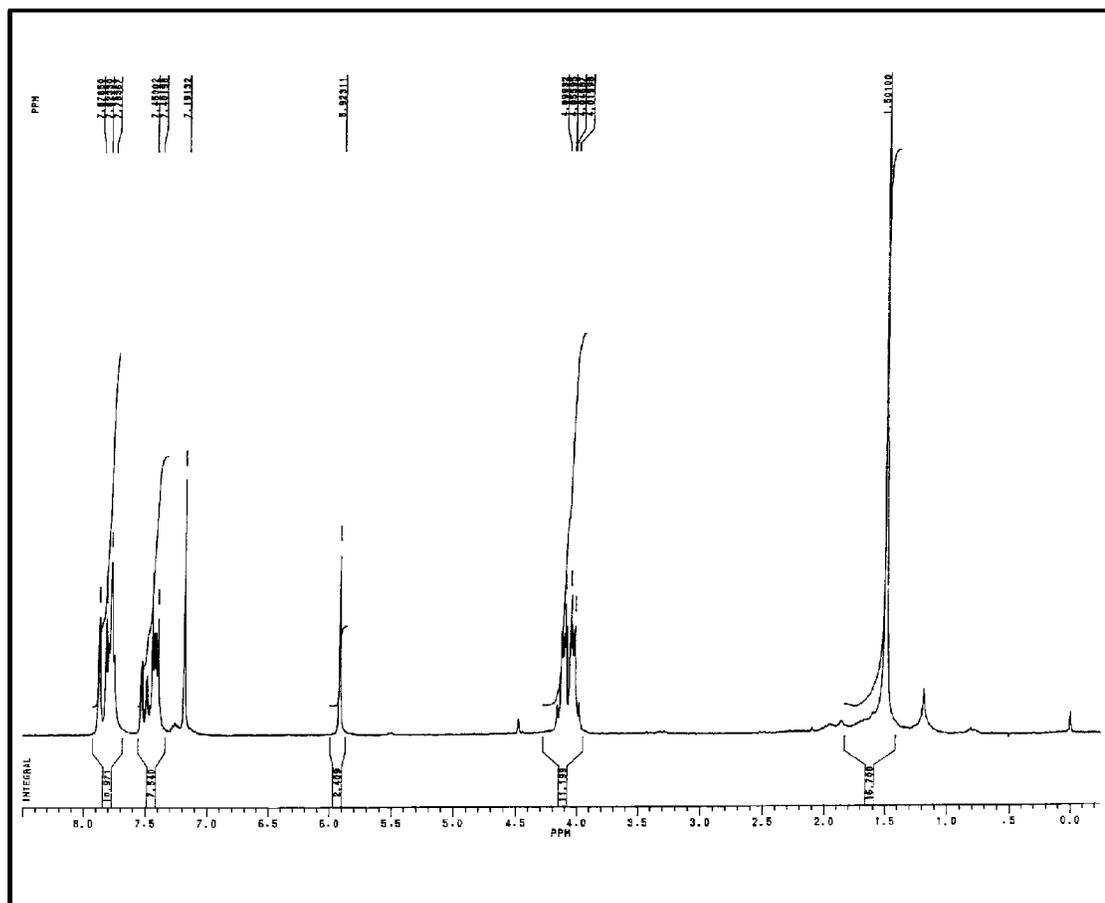
-
96. ROMSTED, L. S.; ZANETTE, D. Quantitative treatment of indicator equilibria in micellar solutions of sodium decyl phosphate and sodium lauryl sulfate- **J. Am. Chem. Soc.**; v.92, n.16, p.4690- 4698, 1988.
97. BUNTON, C.; GAN, L.; SAVELLI, G. Dephosphorylation and aromatic nucleophilic substitution in an alkoxyd functionalized-. **J. Phys. Chem.**; v.87,p.5491- 5498, 1983.
98. FRESCURA, V.L. A. **Estudo da reação de hidrólise de ésteres arílicos e anidrido benzóico em presença de dodecanoato de sódio e sulfobetáinas.** 1995, 134f. Tese (Doutorado). Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 1995.
99. SPECTOR, A. A. Fatty acid binding to plasma albumin- **J. of Lipid Research Review**; v.16, p.165-179, 1975.
100. TAYLOR, R.P.; VATZ, J.B. Bovine serum albumin as a catalyst accelerate decomposition of a meisenheimer complex. **J. Am. Chem. Soc.**; v.95, n.17, p.5819-5820, 1973.
101. KIKUCHI, K. et al. Albumin catalysed proton transfer. **J. Am. Chem. Soc.**; v. 118, p.8184- 8185. 1996,
102. MEANS, G.E.; BENDER, M.L. Acetylation oh human serum albumin by p-nitrophenyl acetate. **Biochemistry**; v.14,n. 22, p.4989-4994, 1975.
103. LINDMAN, B.; THALBERG, K. Polymer- surfactant interactions- recent developments. In: GODDARD, E. et al. **Interact. surfactants polym. proteins.** Boca Raton: CRC Press, 1993. cap. 5, p. 203-276.
104. ALBUIN, E. et al. Effect of sodium couterion substitution by lithium on the interaction of dodecyl sulfate with poly (ethylene oxide) in aqueous solution. **Bol. Soc. Chil. Quim.**; v.40, p.65-67,1995.
105. TAKEDA, K.; MIURA, M. Stepwise formation of complexes between sodium dodecylsulfate and bovine serum albumin detected by measurements of eletric conductivity, binding isotherm and circular dichroism. **J. Coll. Interf. Sci.**; v.82, n.1, p.38-44, 1981.
106. NISHIKIDO, N. et al. Interaction between hydrophilic proteins and nonionic detergents studied by surface tension measurements. **Bull. Chem. Soc. Jpn.**; v.55, p.3085-3088, 1982.
107. ZANETTE, D.; FRESCURA, V.L.A. Ideal mixing of polymer- surfactant complexes of poly(ethylene oxide) and dodecyl sulfate plus sodium dodecanoate. **J. Coll. Interf. Sci.** v. 213, p.379-385, 1999.
108. DICKINSON, E. **An introduction to food colloids.** New York: University Press, 1992, cap. 6, p. 140-173.

-
109. JONES, M.N.; BRASS, A. Interactions between small amphipathic molecules and protein. **Food polym., gels colloids.** v.82, p.65-80, 1990.
110. STEINHARDT, J. et al. The nonspecific large binding of amphiphiles by proteins. **Biochemistry;** v.13, n.21, p.4461- 4468, 1974.
111. KRÄGEL, J.; et al. Dynamic surface tension and surface shear rheology studies of mixed β -lactoglobulin / tween 20 systems. **Colloid Surf.;** v.98, p.127- 135, 1995.
112. TAKEDA, K. et al. Size and mobility of sodium dodecyl sulfate-bovine serum albumin complex as studied by dynamic light scattering and electrophoretic light scattering. **J. Coll. Interf. Sci.;** v.154, n.2, p.385- 392, 1992.
113. PHILLIPS, J. N.; MYSELS, K. J. Light scattering by aqueous solution of sodium dodecyl sulfate. **J. Phys. Chem.;** v.59, n.325, p. 325-330, 1955.
114. MUKERJEE, P.; MYSELS, K.J.; KAPAUUAN, P. Counterion specificity in the formation of ionic micelles- size, hydration and hydrophobic effects. **J. Phys. Chem.;** v.7, p.4166- 4678, 1967.
115. MARTINEK, K et al. The kinetic theory and the mechanisms of micellar effects on chemical reactions. In: MITTAL, K.L. (Ed.). **Micellization, solubilization and microemulsions.** New York: Plenum Press, 1977, v.2, p.489.
116. SHINAGAWA, S.; KAMEYAMA, K.; TAKAGI, T. Effect of salt concentration of buffer on the binding of sodium dodecyl sulfate and on the viscosity behavior of the protein polypeptide derived from bovine serum albumin in the presence on the surfactant. **Biochim. Biophys. Acta.;** v.1161, p.79-84, 1999.
117. NILSSON, S.; HOLMBERG, C.; SUNDELOF, L.O. Aggregation numbers of SDS micelles formed on EHC. A steady state fluorescence quenching study. **Colloid Polym. SC.;** v.273, p.83-95, 1995.
118. VASILESCU, M.; ANGELLESCU, D. Interactions of globular proteins with surfactants studied with fluorescence probe methods. **Langmuir.** v.15, p. 2635-2643, 1999.
119. FENDLER, J. H.; FENDLER, E.J. **Catalysis in micellar and macromolecular systems.** New York: Academic Press, 1975.
120. TURRO, N. J. et al. Fluorescent probes for micellar system. In: MITTAL, K.L. (E.d.). **Micellization, solubilization and microemulsion.** New York: Plenum Press, 1997, v.1, p. 175.

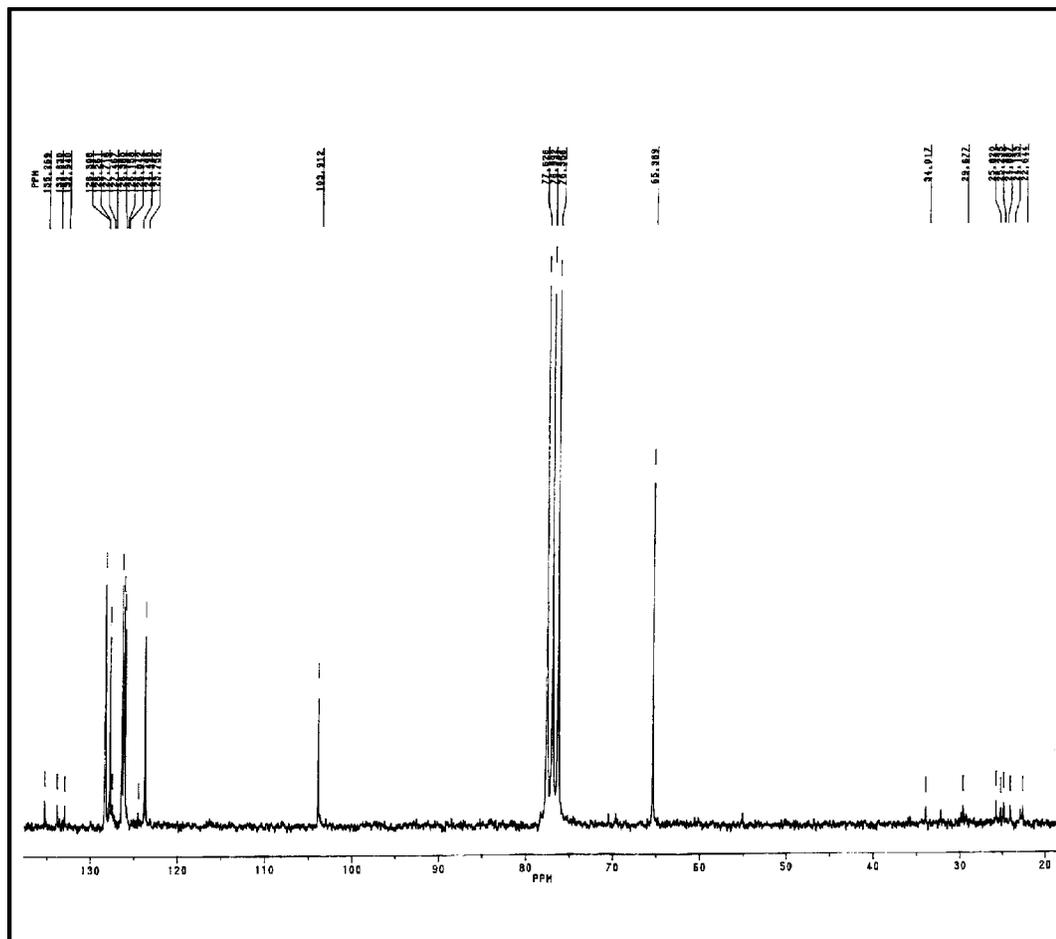
121. CABANE, B.; DUPLESSISE, R. Organization of surfactant micelles adsorbed on a polymer molecule in water- a neutron scattering study. **J. Phys.** v.43, n.10, p.1529- 1542, 1982.
122. ADAMS, M.; AND FRADEN, S. Phase behavior of mixtures of rods (tobacco mosaic virus) and spheres (polyethylene oxide, bovine serum albumin). Brandeis University, Waltham, September, 1997. Disponível em <<http://www.elsie.brandeis.edu/seth/rods-spheres/index.html>>. Acesso em: 12 dez. 1998.
123. MAZA, A. DELA et al. Use of wde and small angle x-ray diffraction to study the modifications in the stratum corneum induced by octylglucoside. **Coll. And Surf.**; v. 162, n.1-3, p.123-130, 2000.
124. SUESS, D.; COHEN, Y.; TALMONT, Y. The Microstructure of the Poly (ethylene oxide) / sodium dodecyl sulfate system studied by cryogenic-temperature transmission electron microscopy and small angle x-ray scattering. **Polymer**; v.36, n.9, p.1809-1815, 1995.
- .

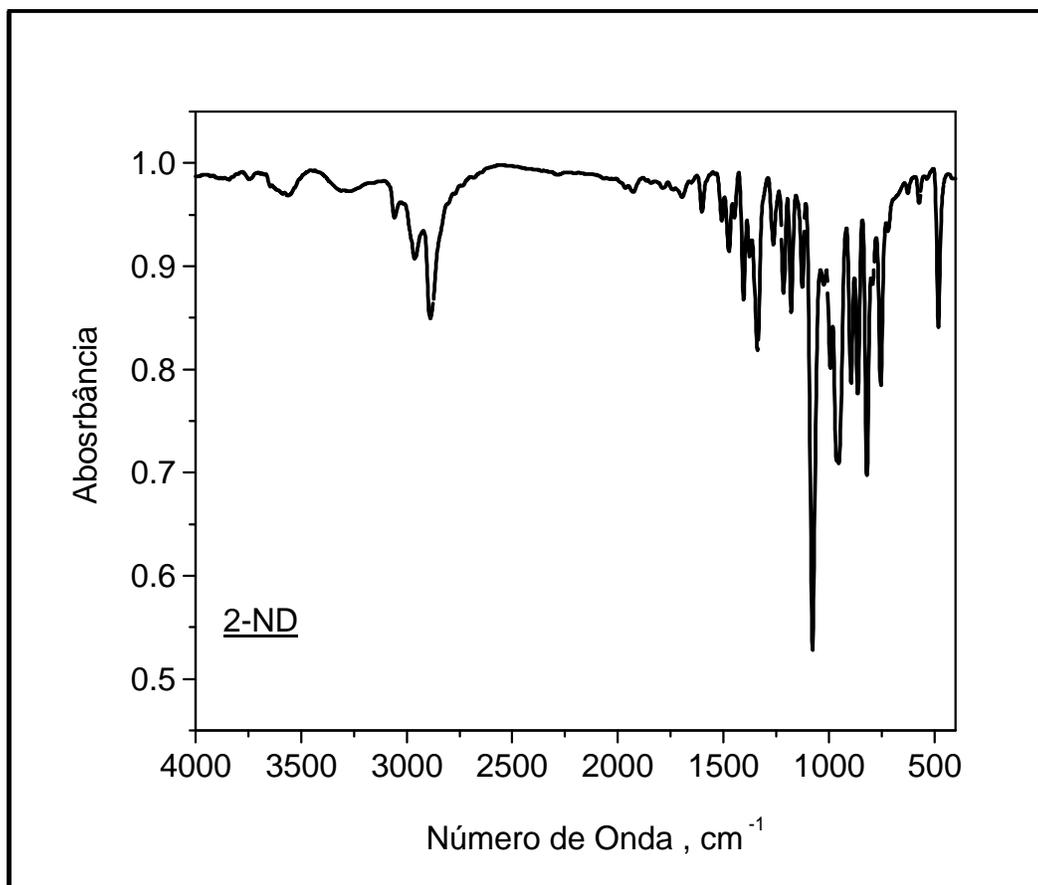
APÊNDICES

Apêndice 1- Espectro de RMN do 2-Naftaleno-1,3-dioxolano (2-ND) em clorofórmio deuterado.



Apêndice 2- Espectro de ^{13}C Carbono 2-Naftaleno-1,3-dioxolano (2-ND) em clorofórmio deuterado.



Apêndice 3- Espectro de Absorção no IV do 2-Naftaleno-1,3-Dioxolano (2-ND) em pastilhas de KBr.

Apêndice 4- Valores de k_{obs} da hidrólise do 2-ND em função do pH, Tampão succinato de sódio 20 mM, T= 250 °C.

$10^4 [H^+], M$	$10^4 k_{\text{obs}}, s^{-1}$
0,04	0,23
0,16	0,70
0,32	1,04
0,96	2,81

Apêndice 5- Valores da constante de velocidade observada para a hidrólise do 2-ND em diferentes concentração de SDS, tampão succinato de sódio pH=5,40 a 30,0°C.

$10^3 [SDS], M$	Ausência de BSA
0	0,3
2	0,4
4	3,1
6	3,2
7	
8	6,6
9	
10	6,8
15	7,5
20	7,8
25	8,0
30	8,3
40	7,9
45	
50	8,0
60	
80	6,8
90	
100	6,6
110	6,4
120	6,1
130	6,5
140	6,0

Apêndice 6- Valores da constante de velocidade observada para a hidrólise do BTBA em diferentes concentração de BSA, tampão succinato de sódio pH=5,40 a 30,0°C.

10 ³ [SDS], M	10 ² k _{obs} , S ⁻¹		
	Ausência de BSA	0,025 % de BSA	0,1 % de BSA
3			0,9
4	1,4	0,7	1,2
6	3,2	1,6	
7			1,8
8	4,3	2,2	2,1
10	6,0	2,6	2,5
12	6,5	3,1	2,8
14	7,8	3,4	2,8
15	7,5	3,7	3,1
18	8,5	4,2	3,4
20	9,3	4,5	3,8
25	10,0	5,5	4,0
30	11,2	5,7	4,2
40	11,2	5,6	4,3
50	11,3	6,0	4,6
60	10,87	5,8	4,7
70	10,9	5,9	4,8
80	10,8	5,7	4,7
100	10,2	5,7	

Apêndice 7a- Valores da constante de velocidade observada para a hidrólise do 2-ND em solução de SDS na presença de diferentes concentração de BSA, tampão succinato de sódio pH=5,40 a 30,0°C.

BSA, %	$10^4 k_{obs}, S^{-1}$			
	[SDS]= 7mM	[SDS]= 9 mM	[SDS]= 10 mM	[SDS]= 15 mM
0,0	6,2	2,1	6,4	8,6
			7,4	9,2
0,05	3,5	1,4	5,3	7,6
			2,9	5,7
0,1	1,7	0,9	4,4	7,0
			1,7	3,7
0,2	0,7	0,3	2,2	5,2
			1,3	1,6
0,3	0,32	0,4	0,7	3,1
			1,1	1,3
0,4	0,55	0,3	0,8	1,6
			0,86	1,3
0,5		0,25	0,3	1,1
			0,89	1,4
0,6	0,12	0,6	0,2	0,5
			0,93	1,5
0,7	0,19		0,2	0,48
			0,9	1,11
0,8	0,10	0,8	0,1	0,8
			0,8	1,2
0,9		0,7	0,08	
			0,9	1,2
1,0		0,5	0,05	0,26
			0,8	1,3

Os valores em negrito correspondem as medidas feitas na presença de PEO

Apêndice 7b- Valores da constante de velocidade observada para a hidrólise do 2-ND em solução de BSA na presença de diferentes concentração de SDS, tampão succinato de sódio pH=5,40 a 30,0°C.

BSA, %	$10^4 k_{obs}, S^{-1}$			
	[SDS]= 20mM	[SDS]= 25 mM	[SDS]= 30 mM	[SDS]= 40 mM
0,0	9,0	9,2	8,9	10,3
		8,8	9,8	
0,05	6,1	8,5	7,4	9,6
		7,3	8,3	
0,1	5,1	7,9	6,8	8,9
		6,2	7,3	
0,2	3,9	6,9	6,3	8,4
		3,2	4,0	
0,3	3,6	5,1	5,4	7,2
		1,7	2,4	
0,4	2,8	4,8	4,8	6,4
		1,5	2,0	
0,5	2,0	3,5	4,2	5,7
		0,9	1,5	
0,6	1,14	2,9	3,7	5,1
		1,5	1,6	
0,7	1,1	2,2	3,0	4,6
		1,4	1,4	
0,8	0,8	1,5	2,2	4,0
		1,6	1,3	
0,9	0,4	1,3	1,5	3,0
		1,4	1,1	
1,0	0,4	0,78	1,3	2,2
		1,2	0,86	

Os valores em negrito correspondem as medidas feitas na presença de PEO

Apêndice 7c- Valores da constante de velocidade observada para a hidrólise do 2-ND em solução de BSA na presença de diferentes concentração de SDS, tampão succinato de sódio pH=5,40 a 30,0°C.

BSA, %	$10^4 k_{obs}, S^{-1}$			
	[SDS]= 50mM	[SDS]= 60 mM	[SDS]= 80 mM	[SDS]= 90 mM
0,0	9,3	8,8	7,7	6,4
		7,8	7,2	
0,05	8,9	8,3	7,3	6,5
		8,5	7,1	
0,1	8,7	7,2	7,2	6,2
		7,1	6,5	
0,2	8,2	7,5	6,5	5,8
		6,0	5,2	
0,3	7,8	6,4	6,1	6,0
		5,1	4,7	
0,4	7,0	6,5	6,0	5,6
		3,7	3,7	
0,5	7,9	6,0	6,3	5,1
		2,7	3,2	
0,6	6,0	5,5	6,2	5,4
		2,5	2,9	
0,7	6,0	6,0	5,9	5,0
		2,6	2,2	
0,8	5,1	5,5	5,1	4,8
		2,1	1,8	
0,9	4,8	5,0	5,1	4,6
		1,8	1,5	
1,0	4,0	4,4	4,3	4,1
		1,7	1,1	

Os valores em negrito correspondem as medidas feitas na presença de PEO

Apêndice 8- Valores da constante de velocidade observada para a hidrólise do 2-ND em solução de BSA na presença de diferentes concentração de SDS, tampão succinato de sódio pH=5,40 a 30,0°C.

$10^4 k_{obs}, S^{-1}$					
$10^3 [SDS], M$	BSA 0,2%		BSA 1,0 %		
	pH= 4,00	pH= 4,70	pH= 4,00	pH= 4,70	pH= 5,4
0,0	0,3	0,03	0,193	0,0065	
5,0		0,19			
7,0					0,02
9,0					0,05
10,0	3,0	0,75		0,11	0,04
15,0	11,0	2,2		0,13	0,04
20,0	15,7	3,1		0,11	0,07
25,0	18,5	3,5	0,703	0,22	0,13
30,0	20,0	3,6	1,37	0,34	0,29
35,0	20,2	3,8	2,2	0,53	0,2
40,0	19,0	3,9	3,2	0,75	0,3
45,0	20,0	3,9	4,3	0,96	0,4
50,0	21,0	3,8	5,1	1,2	0,43
60,0	19,0	3,7	7,2	1,4	
65,0	20,3	3,6	8,9	1,6	
70,0	19,0	3,4	8,9	1,7	0,43
80,0	20,5	3,5	10,0	2,0	0,41
85,0	19,5	3,5	11,2	2,2	0,41
90,0	19,6	3,5	11,3	2,4	0,42
100,0	19,3		13,6	2,4	0,36
120,0					0,36
140,0					0,32
160,0					0,28
180,0					
200,0					

Apêndice 9a- Valores de pH_{app} estimados pela PADA na superfície micelar de complexos BSA/SDS, tampão succinato de sódio pH=5,40 a 30,0°C.

BSA, %	pH _{app}				
	[SDS]= 0,0 mM	[SDS]= 4,0 mM	[SDS]= 7,0 mM	[SDS]= 10,0 mM	[SDS]= 15,0 mM
0,0	5,6	4,1	3,6	3,91	3,63
	5,56	4,16	3,71	3,81	3,37
0,1	5,55	4,7	3,88	3,75	3,72
0,2	5,61	5,34	4,74	4,45	3,92
	5,56	4,85	4,70	4,10	3,36
0,4	5,73	5,55	5,23	4,96	4,45
	5,54	4,88	4,74		4,53
0,5	5,79	5,55	5,35		4,66
	5,54	4,87	4,75		4,54
0,6	5,75	5,55	5,43	5,24	4,82
	5,57	4,88	4,75	4,65	4,54
0,8	5,84	5,53	5,48	5,39	5,04
	5,56	4,89	4,78	4,69	4,56
1,0	5,91	5,59	5,5	5,57	5,16
	5,58	4,89	4,79	4,62	4,53

Os valores em negrito correspondem as medidas feitas na presença de PEO.

Apêndice 9b- Valores de pH_{app} estimados pela PADA na superfície micelar de complexos BSA/SDS, tampão succinato de sódio pH=5,40 a 30,0°C.

BSA, %	pH _{app}				
	[SDS]= 25 mM	[SDS]= 30 mM	[SDS]= 45 mM	[SDS]= 50 mM	[SDS]= 80 mM
0,0	3,72	3,46	3,91	3,94	3,82
	3,93	3,50	4,99	3,24	3,84
0,1	3,54	3,52	3,40	3,79	3,47
0,2	3,76	3,70	3,90	3,89	3,86
	3,89	3,90	4,17	4,15	3,91
0,4	4,03	3,87	3,94	4,00	3,47
	4,47	4,37	4,41	4,44	4,05
0,5	4,09	3,89	4,00		3,78
	4,46	4,40		4,49	4,02
0,6	4,30	3,99	4,07	4,02	3,95
	4,56	4,43	4,58	4,54	4,27
0,8	4,57	4,30	4,12	4,06	4,00
	4,61	4,52	4,66	4,56	4,35
1,0	4,76	4,53	4,25	4,15	3,97
	4,61	4,56	4,71	4,50	4,45

Os valores em negrito correspondem as medidas feitas na presença de PEO