

Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Físicas e Matemáticas
Departamento de Química

Interação da Albumina do Soro Bovino (BSA) com sais biliares induzidas por Surfactantes Aniônicos

Bianca Schweitzer

Tese de Doutorado

Orientador: Professor Doutor Dino Zanette

Florianópolis, março de 2006.

Bianca Schweitzer

Interação da Albumina do Soro Bovino (BSA)
com sais biliares induzidas por Surfactantes
Aniônicos

Esta tese foi julgada e aprovada na sua forma final para obtenção do título
“Doutora em Química no Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade
Federal de Santa Catarina”

Coordenador do Programa

Banca Examinadora

Prof. Dr. Dino Zanette

Orientador

Dra Iolanda Midea Cuccovia

Relatora

Dedicatória

Talvez haja mais compreensão e beleza na vida, quando os raios ofuscantes do sol forem suavizados pelos contornos da sombra. Talvez haja raízes mais profundas numa amizade que sofreu tempestade e as venceu.

A experiência que nunca desaponta ou entristece, que nunca toca nos sentimentos, é uma vivência neutra, com pequenos desafios e variações de cor. Quando sentimos confiança, fé e esperança de que podemos concretizar nossos objetivos, isto constrói dentro de nós um manancial de força, coragem e segurança.

Especialmente aos meus pais,
Paulo César Schweitzer e Izete Santos Schweitzer,
Minha irmã, Ana Paula Schweitzer,
E ao meu namorado Thiago Borsatti,
Pelo carinhoso e imensurável apoio.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Professor Doutor Dino Zanette, por ter me confiado este trabalho, por todos os conhecimentos transmitidos, e acima de tudo pela sincera amizade e apoio, minha admiração e respeito.

A minha família, por toda compreensão, amor e paciência que me foram dedicados ao longo de todos esses anos.

Ao Thiago, pelo amor mais sincero, bonito e paciente, que tenho recebido deste homem maravilhoso.

A banca examinadora e a relatora, Professora Iolanda Cuccovia.

Um agradecimento especial ao Jadir e a Graça pela amizade e serviços prestados.

A todos os amigos que compartilharam meus medos, conquistas e alegrias.

Aos colegas do laboratório 205 e 305, por todos os auxílios prestados e pela amizade compartilhada.

A todos os professores, que de alguma forma contribuíram para o meu aprendizado.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

A Deus, por toda força e sabedoria.

Índice Geral

“As adversidades despertam em nós capacidades que, em circunstâncias favoráveis, teriam ficado adormecidas”

Índice de Figuras	VII
Índice de Tabelas	XI
Resumo	XII
Abstract	XIII
Abreviaturas	XIV
Capítulo I	1
Introdução	1
1. Surfactantes	1
1.1. Um pouco de história	1
1.2. Denominação e classificação	2
1.2.1. Sais Biliares	4
1.3. Micelas	5
1.3.1. Formação de agregados de Sais Biliares	7
1.3.2. Micelas Mistas	10
2. Proteínas – Albumina do Soro Bovino (BSA)	11
3. Interações proteína-surfactante	15
3.1. Estudo da Interação entre BSA e Surfactantes via Medidas de fluorescência	18
Objetivos	24

Capítulo II	25
Parte Experimental	25
1. Materiais	25
1.1. Reagentes	25
2. Equipamentos e Métodos	26
Capítulo III	27
Resultados e Discussão	27
1. Ligação do SDS e de sais biliares com a BSA em baixas concentrações	28
1.1. Medidas da constante de Stern Volmer, K_{SV}	28
1.2. Supressão do (D) –Tryptofano	31
1.3. Competitividade entre SDS e NaC e/ou NaDC em misturas com BSA	32
1.4. Efeito da concentração da proteína na ligação do SDS e do NaC	36
2. Ligação com a BSA em altas concentrações de NaC, SDS e de SDoD	42
2.1. Medidas de Tensão Superficial para as misturas BSA - SDS e BSA – NaC	42
2.2. Condutividade elétrica em misturas BSA - SDS e BSA – NaC	45
2.3. Efeito da concentração de SDS sobre a emissão de fluorescência da BSA	49
2.4. Efeito da concentração de SDoD sobre a fluorescência da BSA	54
2.5. Supressão da fluorescência da BSA em misturas contendo SDS e NaC	55
2.6. Medidas de condutividade elétrica	63
2.7. Fluorescência estacionária do pireno, em misturas de BSA-SDS-NaC	67
Capítulo IV	71
Conclusão	71
Referências Bibliográficas	71

Índice de Figuras

Figura 01:	Ilustração de uma molécula de surfactante	2
Figura 02:	Representações estruturais do ácido cólico	5
Figura 03:	Equilíbrio de formação de micelas em solução	6
Figura 04:	Modelo de distribuição dos monômeros de surfactante	6
Figura 05:	Algumas técnicas utilizadas para determinação da <i>cmc</i>	7
Figura 06:	Representação de modelos propostos na literatura para a estrutura das micelas de sais biliares	8
Figura 07:	Modelo de agregados de sais biliares	10
Figura 08:	Representação esquemática de uma solução contendo mistura de dois surfactantes em solução aquosa	11
Figura 09:	Estrutura cristalográfica da HSA	13
Figura 10:	Isoterma de ligação da interação proteína-surfactante	15
Figura 11:	Modelos discutidos para o complexo Proteína-Surfactante (a- Modelo tipo bastão [35]; b- Modelo de hélice flexível; (b- c- Modelo de colar de pérolas)	16
Figura 12:	Modelo colar de pérolas elipsoidais	18
Figura 13:	Representação do diagrama de energia da sonda pireno	19
Figura 14:	Espectro de emissão do pireno em uma solução de SDS	20
Figura 15:	Estruturas do (A) triptofano e (B) do pireno	21
Figura 16:	Espectros de emissão de fluorescência do triptofano em água e da HSA	22

Figura 17:	Modelo proposto por Swati e col. para a interação proteína-surfactante	23
Figura 18:	Emissão de Fluorescência para 0,1% de BSA, com a adição de SDS até a concentração de 20 μM	29
Figura 19:	Efeito da concentração de (●) SDS, (■) NaC e (○) NaDC sobre a razão das intensidades da banda de emissão em presença (I) e na ausência do supressor (I_0).	30
Figura 20:	Gráficos de I_0/I em função da concentração do (○) SDS, (□) NaC e (■) NaDC, obtidos a partir da supressão da intensidade de fluorescência do (D)-triptofano	32
Figura 21:	Variação da razão I_0/I em função da [surfactante] em 0,1% de BSA, sendo: (□) SDS, (○) NaC (■) e para uma mistura de fração molar de 0,75 moles de NaC	33
Figura 22:	Variação da razão I_0/I em função χ_{SDS} , com concentração total da mistura de surfactante (SDS + NaC) fixa em (○) 5 μM e (□) em 15 μM . O anexo apresenta a variação de K_{sv} , M^{-1} em presença de SDS (○) e de NaC (●) em função da [BSA].	34
Figura 23:	Variação da razão I_0/I em função da concentração de surfactante onde: (□) SDS, (○) NaDC (■) e para fração molar de 0,75 moles de NaDC	35
Figura 24:	Gráficos de I_0/I em função da [SDS] em (■) 0,25% ; (Δ) 0,1% e (●) 0,025% de BSA	36
Figura 25:	Gráficos da concentração de SDS em função da concentração de BSA usando-se os seguintes valores de I_0/I : (○)1,28; (▲) 1,20; (□) 1,15 e (●) 1,08	37
Figura 26:	(A) Perfis da [NaC] vs. [BSA] para os seguintes valores de I_0/I : (●) 1,15; (□)1,12; (Δ) 1,08; (■)1,05 e (○) 1,01. (B) Idem para [NaDC] em função da [BSA], para os seguintes valores de I_0/I : (■) 1,08; (□)1,06; (●) 1,04; (○)1,02.	38
Figura 27:	Perfil de I_0/I versus o número de monômeros de surfactante ligados per molecule of BSA (n) obtidos para (○) SDS e (□) NaC, (■) χ_{NaC} 0,50 e (∇) χ_{NaC} 0,75	41

Figura 28:	Gráfico de tensão superficial <i>versus</i> log [SDS] (○) na ausência e em (●) em presença de 1,0 % de BSA	43
Figura 29:	Gráfico de Tensão Superficial <i>versus</i> log [NaC], (■) na ausência e em (△) em 0,5 % de BSA	44
Figura 30:	Gráfico de condutividade elétrica para SDS: (□) em ausência e (○) em presença de 0,1% de BSA	47
Figura 31:	Gráfico de condutividade elétrica para NaC: (○) em ausência e (△) em presença de 0,1% de BSA	48
Figura 32:	Condutividade elétrica do NaC em baixas concentrações	49
Figura 33:	Emissão de fluorescência para 0,1% BSA: (●) ausência de SDS e na [SDS]: (□) 1,5 mM; (△) 2,0 mM; (■) 10 mM; (a) 0,03 mM; (b) 0,075 mM; (c) 3,0 mM e (d) 4,0 mM	50
Figura 34:	Efeito da [SDS] sobre a razão A_0/A em uma solução de (○) 0,1% e (□) 0,25% de BSA. O anexo amplia a região de baixas concentrações de SDS	52
Figura 35:	Dependência da razão I_1/I_3 dos espectros de fluorescência do pireno com a [SDS] em presença de 0,1% de BSA	53
Figura 36:	Efeito da [SDoD] sobre a razão A_0/A em uma solução contendo 0,1% de BSA. O anexo apresenta bandas de emissão de fluorescência (●) na ausência e nas [SDoD]: (○) 0,5; (▲) 1,5; (△) 2,0; (■) 4,0 e (□) 10 mM	55
Figura 37:	Variação de A_0/A <i>versus</i> [surfactante]: (■) NaC; (□) SDS; (○) fração molar com 0,6 de SDS; (△) fração molar com 0,4 de SDS. O anexo destaca o perfil em baixas [surfactantes].	56
Figura 38:	Espectros de emissão de fluorescência do NaC, em presença de 0,1 % de BSA, na ausência de NaC (□), em 1,5 (○) e em 10 mM de NaC (△).	58
Figura 39:	Dependência da razão I_1/I_3 nos espectros de fluorescência do pireno com a [NaC] em presença de 0,1% de BSA	58
Figura 40:	Variação da relação A_0/A em função da da fração molar de SDS em concentração total de surfactante fixa em (■) 5 e (□) 15 mM	60

Figura 41:	Espectros de emissão de fluorescência em presença de 0,1 % de BSA, com fração molar de 0,5 de NaC: (○) em ausência; e em presença de (■) 0,075, (△) 1,5 e (●) 14 mM de surfactante	61
Figura 42:	Varição de A_0/A versus [surfactante]: (■) SDoD; (○) NaC; fração molar com 0,2 NaC (□); fração molar com 0,3 de NaC (●); fração molar com 0,5 de NaC (▲).	62
Figura 43:	Condutividade elétrica (em $\mu\text{S cm}^{-1}$) em presença de BSA 0,1%, para a fração molar com 0,75 de SDS	63
Figura 44:	Condutividade elétrica (em $\mu\text{S cm}^{-1}$) em presença de BSA 0,1% versus [surfactante], para a fração molar de 0,25 de SDS	65
Figura 45:	Condutividade elétrica (em $\mu\text{S cm}^{-1}$) em função da fração molar de 0,50 de SDS em presença de BSA 0,1% (○) e na ausência de proteína (□).	66
Figura 46:	Varição de I_1/I_3 dos espectros de fluorescência do pireno em função da concentração de BSA, nas diferentes [NaC]: 10 mM (●); 15 mM (○); 30 mM (■); 40 mM (□); 60 mM (▲); 100 mM (▼).	68
Figura 47:	Varição da razão I_1/I_3 em função da fração molar de NaC, em presença de BSA 0,1% , nas diferentes [surfactante]: 10 mM (○); 15 mM (●); 20 mM (△); 30 mM (▲); 40 mM (□); e 60 mM (■).	69
Figura 48:	Modelo proposto para o sistema BSA-SDS-NaC	75

Índice de Tabelas

Tabela 01:	Alguns exemplos de surfactantes	3
Tabela 02:	Constantes de Stern-Volmer (K_{sv} , M^{-1}) para o SDS, NaC e o NaDC, em diferentes concentrações de proteína	31
Tabela 03:	Alguns parâmetros, como número de moléculas de surfactante ligadas por molécula da proteína (n) e concentração livre de monômeros ($[S]_f$)	39
Tabela 04:	Valores das inclinações e inflexões obtidos a partir dos gráficos de condutividade elétrica em unidades $\Omega^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$, das regiões lineares abaixo da primeira (S1), entre o primeira e segunda (S2) e acima da terceira (S3) inflexão	66

Resumo

Neste trabalho, o sal biliar empregado foi o colato de sódio (NaC) para estudar o processo de ligação competitiva entre NaC e o dodecilsulfato de sódio (SDS) sobre a albumina do soro bovino (BSA), em uma solução tampão 0,02 M tris-HCl, em pH 7,5 e a 25 °C. A associação entre o NaC e o SDS com a BSA foi monitorado em baixas concentrações de surfactantes onde somente o processo de ligação específica se desenvolve, e também foi acompanhado em altas concentrações de surfactante onde o processo de ligação cooperativa pode ser observado.

Em baixas concentrações de surfactante, a metodologia aplicada para monitorar o processo de ligação específica está baseada na análise do efeito da concentração SDS e do NaC e ainda de misturas destes surfactantes, sobre a intensidade de fluorescência dos resíduos de triptofano da BSA. A metodologia é empregada para se medir a quantidade de monômeros de surfactante distribuídos sobre a molécula de proteína onde a ligação ocorre, como pode ser observado pela supressão da fluorescência dos grupos cromóforos. A análise, baseada na quantidade de molécula de surfactante ligada sobre a proteína, indicou que o SDS é um supressor de fluorescência mais eficiente que o sal biliar. São necessárias 4-6 moléculas de NaC ligadas sobre a proteína para se obter a mesma eficiência na supressão que uma única molécula de SDS.

Em altas concentrações de surfactante, os perfis das bandas de emissão de fluorescência são apresentados pela razão de A_0/A em função da concentração de surfactante, onde A_0 e A representam as áreas das bandas de emissão na ausência e em presença de surfactante, respectivamente. Uma outra metodologia, onde emprega-se gráficos de condutividade elétrica em função da concentração de surfactante, foi usada, para misturas de SDS e NaC, para investigar o processo de associação, e para determinação de parâmetros de ligação, como concentração de agregação crítica, *cac*, e concentração micelar crítica, *cmc*.

Os estudos foram realizados em diferentes concentrações de surfactantes, visando estudar desde as ligações específicas formadas pelos monômeros de surfactantes com a cadeia proteica, até, com o aumento da concentração de surfactante, as ligações cooperativas,

formadas pelos agregados micelares com a BSA. O método utilizado para monitorar o processo de ligação está baseado na análise do efeito da concentração dos surfactantes sobre a intensidade de fluorescência dos resíduos do triptofano da BSA. Como metodologia alternativa, foram realizadas medidas de condutividade elétrica em função da concentração de surfactante, para monitorar e interpretar a variação de parâmetros de ligação, como a concentração de agregação crítica (*cac*). A vantagem de utilizar estas medidas clássicas reside no fato de que elas já foram largamente utilizadas para sistemas compostos de misturas de polímeros neutros e surfactantes aniônicos e as características dos perfis, bem como suas interpretações, serão usadas neste trabalho como suporte para interpretação dos resultados.

Abstract

In this study sodium cholate (NaC) was used as a representative bile salt for the competitive binding between NaC and sodium dodecyl sulfate (SDS) in bovine serum albumin (BSA), in 0,02 M tris-HCl buffer solution at pH 7,50 and 25 °C. The NaC and SDS associations with BSA were monitored at low surfactant concentrations where only this specific binding process can develop, and too at high surfactant concentrations where the cooperative binding process can be observed.

At low surfactant concentrations, the applied method to monitor the binding was based on the analysis of the effect of SDS and NaC concentrations and their mixtures upon the fluorescence intensity of the BSA tryptophan residues. This consists of the measurement of the surfactant monomer partitioning between the dispersion medium and the microaggregates on the protein molecule where the binding is indicated by the quenching of the fluorescence chromophores. The analyses, based on the average number of surfactant molecules bound on the protein, indicated that the SDS is a more efficient quencher than the bile salt. The need for 4–6 NaC bound molecules to give the same protein quenching efficiency by a single molecule of SDS was estimated.

At high surfactant concentrations, plots of the fluorescence emission bands in terms of the A_0/A ratio vs surfactant concentrations, where A_0 and A represent the areas of emission bands in the absence and presence of the surfactants, respectively. An alternative methodology, the specific conductivity vs surfactant concentration plots, was used, which involves mixtures of SDS and NaC to investigate the association processes, through the determination of the critical aggregation concentration, cac , and the critical micellar concentration, cmc .

Abreviaturas

BSA	Albumina do Soro Bovino
SDS	Dodecilsulfato de Sódio
NaC	Colato de Sódio
SDoD	Dedecanoato de Sódio
NaDC	Deóxicolato e Sódio
HSA	Albumina do Soro Humano
W	Triptofano
<i>cmc</i>	Concentração Micelar Crítica
<i>cac</i>	Concentração Crítica de Agregação
<i>psp</i>	Ponto de saturação
γ	Tensão Superficial
SAXS	Espalhamento de raios-X a baixos ângulos
PEO	Pólioxydo-etileno
α	Grau de ionização
[]	Concentração em mol/L
λ	Condutância equivalente
λ_{Na^+}	Condutância equivalente do sódio
λ_{DS^-}	Condutância equivalente do dodecilsulfato
<i>n</i>	número de agregação
χ	fração molar
mM	mili Molar

CAPÍTULO I

Introdução

1. *Surfactantes*

1.1. *Um pouco de história*

Os primeiros registros encontrados, de material similar ao sabão convencional, são de aproximadamente 2800 a.C. e foram encontrados em cilindros de barro durante escavações da antiga Babilônia. As inscrições revelam que os habitantes ferviam gordura com cinzas. Sabe-se, ainda, que os antigos egípcios tomavam banho regularmente e, este conceito, evoluiu juntamente com as civilizações, em especial na Romana. De acordo com uma antiga lenda romana, a palavra saponificação tem sua origem no Monte Sapo, onde ocorriam sacrifícios de animais. Com as chuvas, um material formado de uma mistura de cinza, barro e do sebo animal (gordura) derretido, era arrastado para as margens do Rio Tibre. Essa mistura resultava numa borra (sabão). As mulheres descobriram que, usando esta borra, as roupas ficavam muito mais limpas. A essa mistura os romanos deram o nome de *sabão* e à reação de obtenção do sabão de *Reação de Saponificação* [63].

Com a queda do império Romano, veio também o declínio dos hábitos de banho e a Europa sentiu o impacto da sujeira sobre a saúde pública. A falta de asseio pessoal, aliada às condições insalubres de vida, contribuiu para as grandes epidemias da Idade Média e, em especial, para a Peste Negra do século XIV [63].

Foi o químico francês Nicolas Leblanc, quem deu o primeiro grande passo rumo à fabricação comercial de sabão. Seu processo, patenteado em 1791, utilizava sal comum para produzir *barrilha* (carbonato de sódio), o elemento ativo encontrado nas cinzas, que se juntava à gordura para fazer o sabão [63].

Atualmente, os surfactantes estão presentes com uma frequência diária na sociedade moderna. A maior utilização dos surfactantes concentra-se na indústria de produtos de limpeza (sabões e detergentes), na indústria de petróleo e na indústria de cosméticos e produtos de higiene.

1.2. Denominação e classificação

Surfactante (*Surfactant* em inglês) é uma abreviação para a expressão “*surface active agent*” [46], termo que, literalmente, significa agente de atividade superficial. Um surfactante, portanto, é uma substância caracterizada pela capacidade de alterar as propriedades superficiais e interfaciais de um líquido e, por isso, são também chamados de tensoativos. O termo interface denota o limite entre duas fases imiscíveis, enquanto o termo superfície, indica que uma das fases é gasosa [2, 46].

O termo surfactante refere-se a uma classe de compostos químicos, tecnicamente conhecida como *anfifílicos* (da palavra grega *amphi* que significa ambos), em cuja estrutura molecular existem duas regiões distintas: uma hidrofílica (polar), que tem afinidade com a água e, uma outra parte hidrofóbica (apolar), que tem afinidade com moléculas apolares como gorduras [1,2]. Quando em solução aquosa, usualmente estas duas partes moleculares são chamadas de *cabeça* e *cauda*, respectivamente. A Figura 01 ilustra, de forma bastante simples, uma molécula de surfactante.

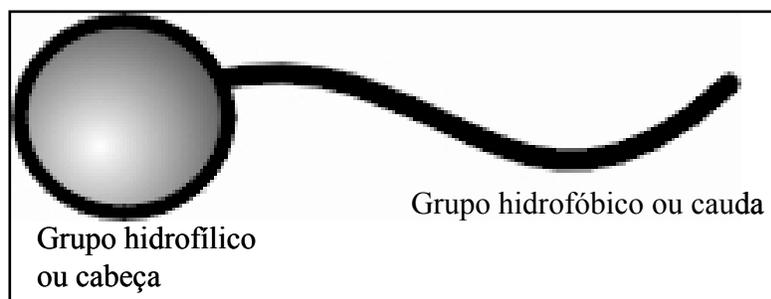


Figura 01: Ilustração de uma molécula de surfactante

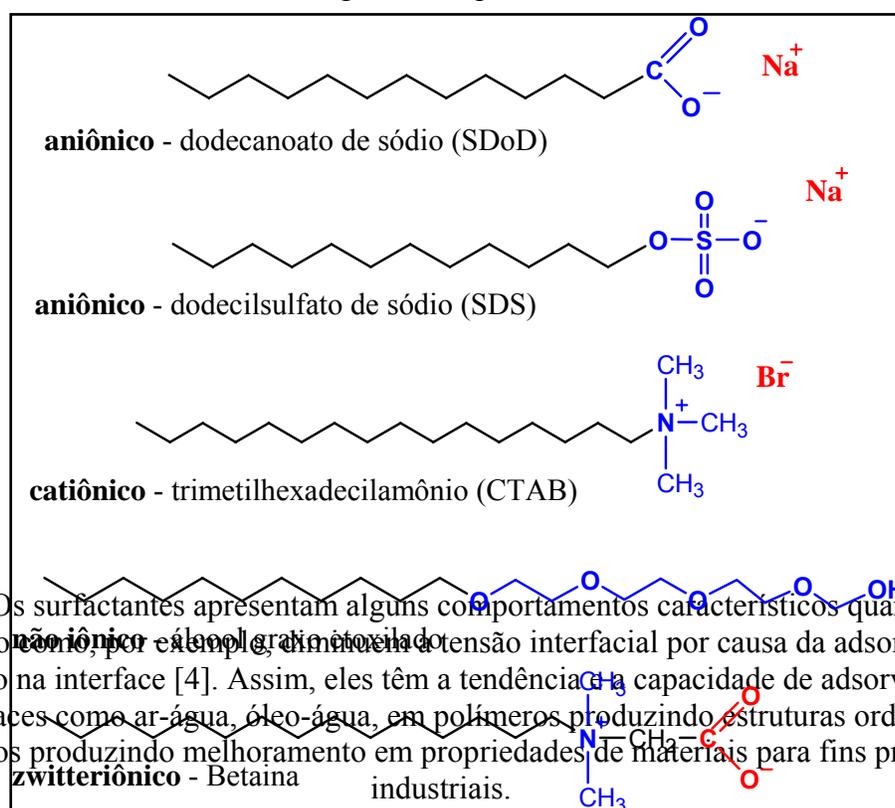
Os surfactantes podem ser classificados, de acordo com a natureza do grupo hidrofílico, em quatro classes:

- a) *Catiônicos*: quando possuem a parte hidrofílica da molécula constituída por um átomo ou grupo carregado positivamente;

- b) *Aniônicos*: a parte hidrofílica é constituída por um grupo carregado negativamente;
- c) *Zwiteriônicos* (Anfóteros): possuem grupos com características ácida ou básica e passam a ter o comportamento aniônico ou catiônico dependendo do pH do meio no qual se encontram;
- d) *Não-Iônicos*: são aqueles que apresentam estrutura molecular com uma parte polar que interage fortemente com a água, principalmente por ligações de hidrogênio.

Exemplos típicos de surfactantes das quatro diferentes classes acima descritas estão apresentados na tabela 01.

Tabela 01: Alguns exemplos de surfactantes



Os compostos de origem microbiana que exibem propriedades tensoativas, isto é, diminuem a tensão superficial e possuem alta capacidade emulsificante, são denominados *biossurfactantes*. Usualmente, eles provem de subprodutos metabólicos de bactérias, fungos e leveduras. Os biossurfactantes apresentam diversas vantagens em relação aos surfactantes sintéticos, podendo ser utilizados em uma gama de aplicações industriais, entretanto, ainda não são amplamente utilizados devido ao alto custo de produção, associados a métodos ineficientes de recuperação do produto e o uso de substratos caros.

1.2.1. Sais biliareis

Sais biliares são anfifílicos naturais produzidos na vesícula biliar. Nos mamíferos, sua principal função fisiológica é a emulsificação e o transporte de gorduras hidrolisadas e de lipídios provenientes dos alimentos [39,56,64]. Neste processo metabólico, a estrutura ativa responsável pelo transporte é formada por micelas mistas complexas dos sais com lipídios como monoglicerídeos, ésteres de ácidos graxos, colesterol, fosfolipídios além de enzimas, proteínas [64]. Os ácidos biliares podem ser divididos em primários e secundários. Os ácidos biliares primários são derivados do colesterol e sintetizados no fígado e, geralmente, eles estão conjugados com glicina ou taurina. Os ácidos biliares secundários são mais tarde modificados por bactérias no intestino, desempenham um papel importante na digestão e absorção de gordura [64].

A Figura 02 apresenta a estrutura do ácido biliar colato de sódio (NaC), mostrando a estrutura *cis* do anel e o modelo em “bolas” para melhor visualização da parte hidrofílica do monômero.

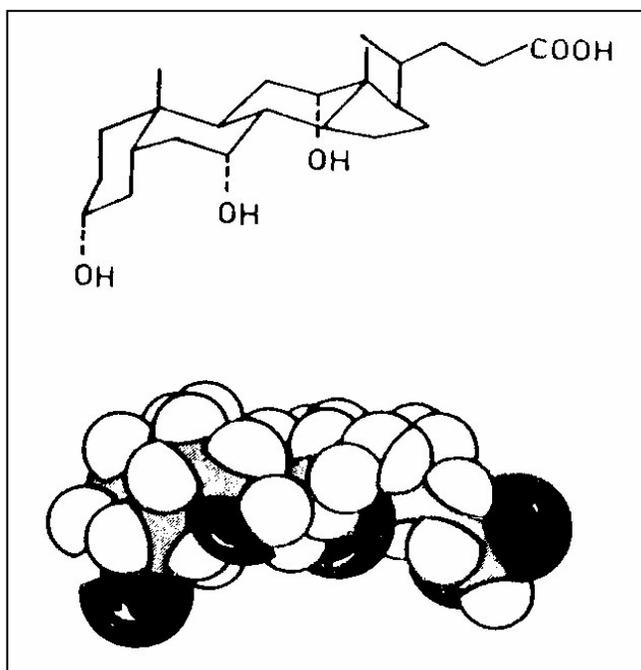


Figura 02: Representações estruturais do ácido cólico, mostrando a posição *cis* do anel e o modelo estrutural de “bola”.

Observa-se na Figura 02, que o grupo carboxílico em meio básico é dissociado gerando uma carga residual negativa, enquanto que as hidroxilas posicionam-se contrárias aos grupos apolares. Estruturalmente, a única diferença entre o NaC e o deoxicolato de sódio (NaDC), é que o segundo apresenta uma hidroxila a menos na posição 7 do anel.

1.3. Micelas

Em baixas concentrações, os monômeros de surfactantes iônicos atuam como eletrólitos fortes. No entanto, em concentrações mais elevadas, os monômeros organizam-se em agregados, estruturalmente organizados, chamados de *micelas* [2,3,4]. Este fenômeno deve-se à ação do efeito hidrofóbico, isto é, a alta organização das moléculas de água, que promovem naturalmente a associação das caudas hidrofóbicas dos monômeros, resultando na formação de agregados. Este processo é espontâneo e altamente cooperativo [5].

Micelas, portanto, são nanoagregados de moléculas de surfactantes em equilíbrio com seus monômeros livres em solução (veja Figura 03).

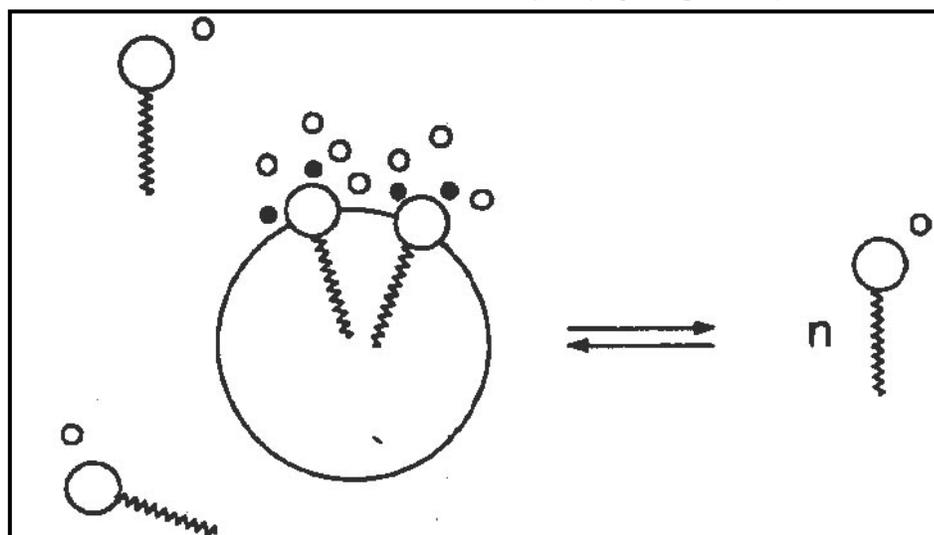
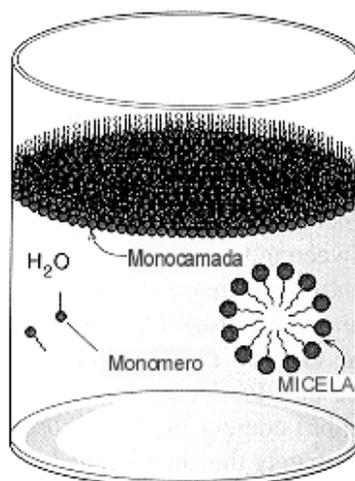


Figura 03: Equilíbrio de formação de micelas em solução [3]

Quando a concentração de surfactante é aumentada, o início da formação de agregados micelares é definido através de uma brusca variação de propriedades físico-químicas da solução [4,6,7]. Esta concentração é denominada *concentração micelar crítica*



(*cmc*). A *cmc* pode ser definida, portanto, como a menor concentração de surfactante na qual formam-se as micelas. A *cmc* é um parâmetro micelar que depende de fatores como hidrofobicidade da cadeia hidrocarbônica, da carga do surfactante, da natureza da cabeça polar e do contra-íon e, do tipo e da concentração de eletrólito adicionado à solução.

Figura 04: Modelo de distribuição dos monômeros de surfactante em solução aquosa. [46]

A Figura 04 ilustra um modelo de distribuição dos monômeros de surfactante em uma solução aquosa onde se pode observar: (i) a monocamada de monômeros localizada na interface água-ar; (ii) monômeros de surfactantes livres na solução e (iii) a micela.

A repentina variação de propriedades físicas da solução micelar, observada na *cmc*, ocorre numa faixa de concentração mas, por conveniência, pode ser definida por um ponto do perfil. A grandeza do intervalo depende da propriedade física utilizada. Desta forma, a Figura 05 mostra diferentes perfis representando a variação da concentração do surfactante com propriedades físicas.

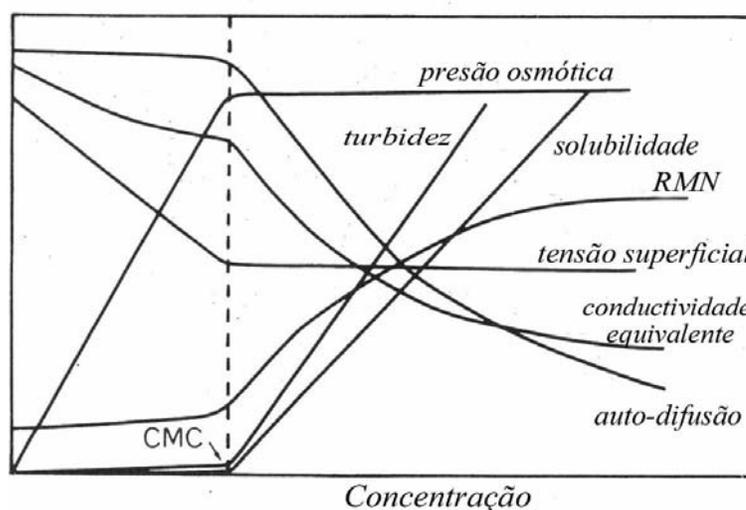


Figura 05: Técnicas mais utilizadas para determinação da *cmc* [46]

i. Formação de Agregados de Sais Biliares

Estudos do processo de micelização dos sais biliares têm contribuído para um melhor entendimento de processos como fenômenos de interação em membranas biológicas, secreção biliar e solubilização do colesterol. Devido sua particular estrutura e a rigidez da molécula de um sal biliar, as propriedades de agregação são diferentes quando comparadas com surfactantes clássicos [37,58,65-67]. A estrutura dos sais biliares em água vem sendo investigada, extensivamente, e tem sido motivo de discussão desde a

década de 60 [37,54 58,65,68,72]. A Figura 06 apresenta alguns dos modelos de agregados propostos para os sais biliares nos últimos anos.

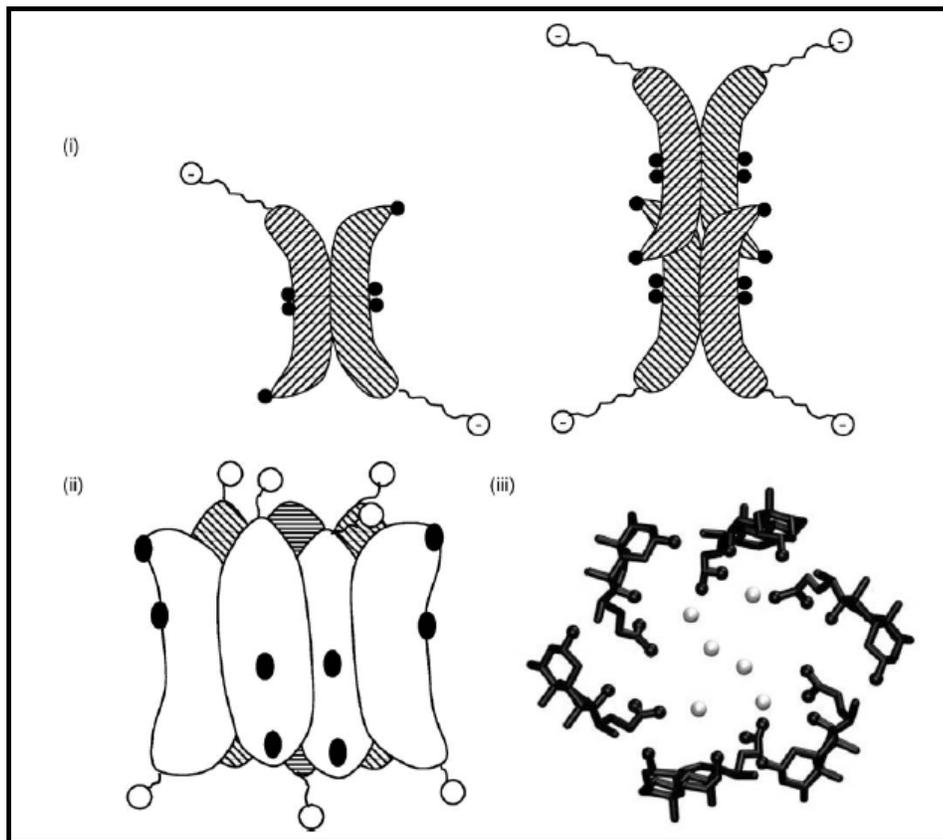


Figura 06: Representação de modelos propostos na literatura para a estrutura das micelas de sais biliares

A Figura 06 apresenta os seguintes modelos:

- (i) Modelo proposto por Small e col. [54]: Os autores propuseram a formação de micelas primárias (em forma de disco com uma ou duas camadas de monômeros) e secundárias (formadas com ligação de hidrogênio entre as micelas primárias). Eles concluíram que, na *cmc*, são formadas somente micelas primárias compostas de até 10 monômeros, presumivelmente, induzidas por interações hidrofóbicas entre as partes apolares dos monômeros. Com o aumento da concentração, as micelas crescem formando, então, as micelas secundárias via ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxílicos.

- (ii) A estrutura (ii) é o modelo proposto por Kawamura e col. [55]. As micelas teriam a forma de disco e cresceriam com o aumento da concentração.
- (iii) Giglio e col. [73] propuseram um modelo de estrutura heliética com contra-íons e moléculas de água dentro da estrutura micelar.

Oakenfull e Fisher [68], discordando de Small, propuseram que as micelas primárias são formadas via ligações de hidrogênio. Usando técnicas de espalhamento de luz, Kratochvil e colaboradores [40] determinaram o número de agregação na *cmc*, em diferentes concentrações de sal, e os resultados são consistentes com a formação de espécies de dímeros por ligações de hidrogênio. Eles também presumiram que, com o aumento da concentração de sal biliar, a formação de agregados maiores ocorre por interações hidrofóbicas.

Recentemente, Warrem e col. [72], estudando interação de sais biliares, concluíram que a associação é um processo espontâneo. Os autores empregaram o software GROMACS para a realização de simulações do comportamento dos sais biliares em solução, ao longo do tempo, e observaram que, após 20 ns, as micelas se formam espontaneamente. Eles ainda concluíram que, os agregados crescem com o passar do tempo, estabilizando seu tamanho após, aproximadamente, 12 ns. Eles também concordam com o modelo proposto por Small e col. [54].

A simples busca na literatura sobre o processo de micelização de sal biliar e propriedades como, *cmc*, número de agregação, mecanismo de auto-associação e morfologia, são suficientes para demonstrar as divergências de opiniões. Em particular, o uso de sondas fluorescentes hidrofóbicas [68,71], sondas de “spin” (baseadas em ressonância eletrônica de spin-ESR) [54] ou ainda o uso de outras técnicas [55,59,65,70], freqüentemente conduzem a resultados contrastantes, obviamente por causa da participação efetiva da sonda no processo de análise. A própria existência da *cmc* permanece ainda como assunto de muita controvérsia entre os cientistas [59,65,71].

O modelo mais recente foi o proposto Bohne e colaboradores [75], que estudaram extensivamente a interação de sais biliares utilizando diversas sondas fluorescentes derivadas do naftaleno. Eles concluíram que, inicialmente (em baixas concentrações de surfactante, até cerca de 20 mM) tem-se a formação de agregados primários [Figura 07]. Estes agregados são pequenos, com no máximo 10 monômeros de sal biliar por agregado formado. E concluíram ainda que, estes agregados primários são formados por interações hidrofóbicas entre as faces hidrofóbicas das moléculas de sal biliar. Com a adição de mais surfactante, os agregados primários interagem entre si por Ligação de hidrogênio dando

origem aos chamados agregados secundários [Figura 07]. A Figura 07 representa o modelo de interação entre sais biliareos proposto pelos autores.

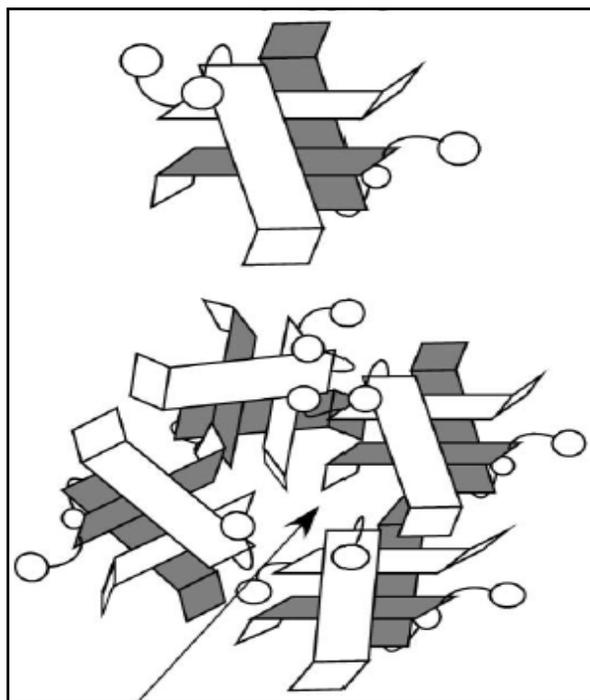


Figura 07: Modelo de agregados de sais biliareos proposto por Bohne e colaboradores [75]

1.3.2. Micelas Mistas

Sistemas constituídos de misturas de surfactante são utilizados em muitas aplicações práticas devido ao baixo custo, quando comparados com soluções de surfactantes puros, além de favorecer a formação de materiais com propriedades físico-químicas melhoradas para fins práticos. Do ponto de vista teórico, é relevante o entendimento da formação estrutural e termodinâmica de micelas mistas porque elas estão presentes em processos práticos e tecnológicos, tais como em processos de detergentes, em emulsões e na recuperação terciária do petróleo [3,6,22,46].

A distribuição de cada surfactante na fase micelar e na fase monomérica, varia de acordo com a estrutura dos surfactantes e com a composição total da solução. A Figura 08 representa esquematicamente o comportamento de uma solução contendo uma mistura de dois surfactantes similares [74].

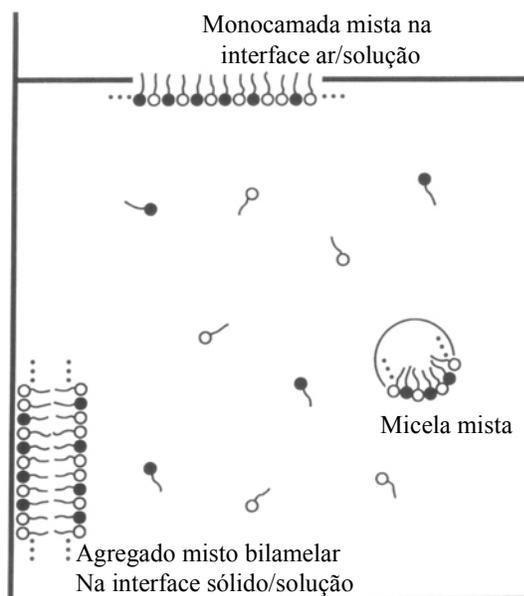


Figura 08: Representação esquemática de uma solução contendo mistura de dois surfactantes em solução aquosa [74].

Para uma mistura binária de surfactantes com estruturas semelhantes e cargas iguais (sistema ideal), possuem propriedades que podem ser previstas a partir de propriedades dos componentes individuais. A *cmc* da mistura que forma um sistema ideal, é intermediária à *cmc* dos surfactantes quando puros. Já sistemas não ideais ocorrem quando as estruturas dos surfactantes são diferentes como, por exemplo, em misturas de catiônicos com aniônicos ou cada um destes com surfactantes não iônicos [3,6,22,46].

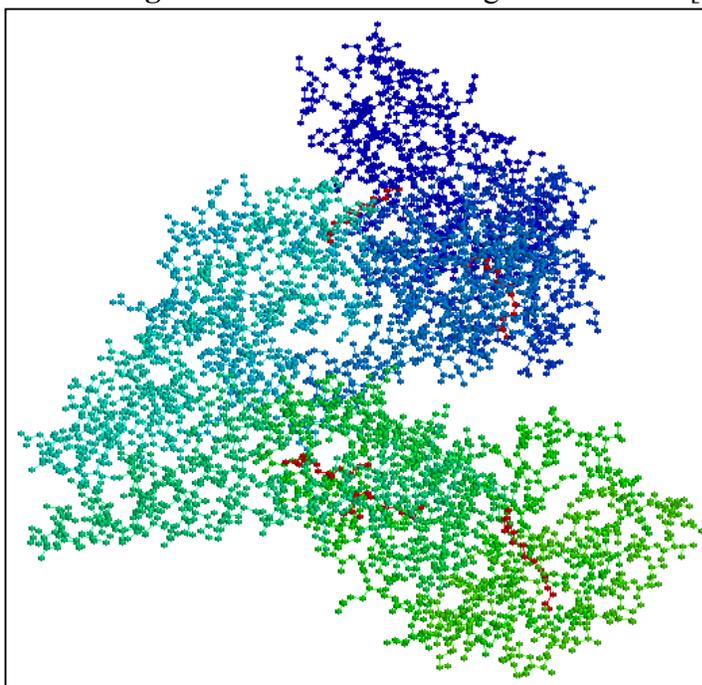
2. Proteínas – Albumina do Soro Bovino

Proteínas são biomoléculas, de estrutura complexa e de alto peso molecular, existentes em todos os organismos vivos, cuja estrutura primária consiste de aminoácidos ligados por ligações peptídicas. De acordo com sua composição, são classificadas em dois grandes grupos; as *proteínas simples*, como a albumina, que quando hidrolisadas geram apenas os aminoácidos, e as *proteínas conjugadas* que, quando hidrolisadas, geram os aminoácidos junto com outros componentes como carboidratos e gorduras [37].

As proteínas podem ter quatro diferentes tipos de classificação estrutural, dependendo do tipo de aminoácidos que possui, do tamanho da cadeia e da configuração espacial da cadeia polipeptídica. A *estrutura primária* é definida pela seqüência de aminoácidos ao longo da cadeia polipeptídica. É o nível estrutural mais simples e mais importante, pois dela deriva todo o arranjo espacial da molécula e são específicas para cada proteína. A *estrutura secundária* é atribuída ao arranjo espacial de aminoácidos próximos entre si na seqüência primária da proteína. As estruturas secundárias podem ser duas: a *alfa-hélice*, mais comum, que ocorre por ligações covalentes e pontes de dissulfeto intramoleculares caracterizada por uma hélice em espiral; e a folha-beta (ou folha pregueada), é formada por ligações extramoleculares, que envolve dois ou mais segmentos polipeptídicos da mesma molécula. Já a *estrutura terciária* de uma proteína resulta do enrolamento da hélice ou da folha pregueada, ou ainda das duas simultâneas. Esta estrutura confere a atividade biológica às proteínas.

As proteínas podem ser classificadas também de acordo com a sua forma tridimensional em: (a) **fibrosas (insolúveis)**, como por exemplo o colágeno e a queratina), as quais são formadas por cadeias de polipeptídios organizados “lado a lado” em longos filamentos; e (b) **globulares (solúveis)**, são exemplos a hemoglobina e a insulina), que têm estrutura compacta e quase esférica [37]. São importantes, entre as forças que estabilizam a estrutura terciária das proteínas, as interações hidrofóbicas, que repelem água das cadeias laterais hidrocarbônicas dos aminoácidos neutros, as pontes de dissulfetos e as forças por atração iônica entre sítios positivos e negativos das várias cadeias laterais de aminoácidos do interior da proteína, contribuem para complementar a estrutura terciária [37].

As albuminas constituem uma classe de proteína cuja função é transportar moléculas menores no organismo, como metabólitos, anti-coagulantes e, ácidos graxos entre outras [10]. Em especial, as albuminas ligam ácidos graxos sendo responsáveis pela remoção destas substâncias livres da corrente sanguínea. Estudos de interações destas proteínas com moléculas menores, como surfactantes, têm revelado detalhes do tipo de interação, em particular dos sítios de ligação dessas moléculas pequenas, de mudanças na estrutura protéica e detalhes sobre as funções no plasma [10]. A soroalbumina é a maior proteína globular existente no plasma (peso molecular de ≈ 66 kDaltons). Sua concentração média é de 5 g/100 mL e contribui com 80% da pressão sanguínea osmótica do sistema circulatório [10,27,37]. A Figura 09 é uma representação cristalográfica determinada por raio-X da Albumina do Soro Humano. A estrutura cristalográfica da BSA não está ainda catalogada no PDB (Protein Data Bank).

Figura 09: Estrutura cristalográfica da HSA [PDB]

A estrutura primária da BSA é constituída de uma única cadeia com 581 resíduos de aminoácidos. Cerca de 67% da estrutura secundária é formada por α -hélice de 6 voltas e 17 pontes de dissulfeto [76] e, sua estrutura terciária é globular, composta por 3 domínios que conferem à molécula a forma de um coração, com raio de giro $\approx 32 \text{ \AA}$ [20,43].

O domínio I, representado pela cor azul escuro, estende-se do resíduo 1 ao 191 e neste domínio ocorre uma grande afinidade para Hg^{2+} , Au^+ , ácidos graxos, triptofano, warfarina, corantes e compostos com anéis alicíclicos [10,76,77]. O domínio II, representado pela cor azul piscina, estende-se do resíduo 192 ao 379 e nesta região se verifica a maior afinidade para compostos como bilirrubina, digitoxina, ácidos graxos de cadeias curtas, corantes e outras drogas [10,56,76]. O domínio III, representado pela cor verde, estende-se do resíduo 380 ao 580 e nesta região verifica-se grande afinidade por ácidos graxos de cadeias curtas e constitui o maior sítio de ligação de drogas [10,76,77].

Tabela 02: Composição dos aminoácidos da albumina do soro bovino (BSA)

Aminoácido	BSA	Aminoácido	BSA
Ácido aspártico	41	Cisteína	35
Asparagina	13	Metionina	4
Treonina	34	Isoleucina	14
Serina	28	Leucina	61
Ácido glutâmico	59	Tirosina	19
Glutamina	20	Fenilalanina	27
Prolina	28	Lisina	59
Glicina	16	Histidina	17
Alanina	46	Triptofano	2
Valina	36	Arginina	23

total	582
--------------	------------

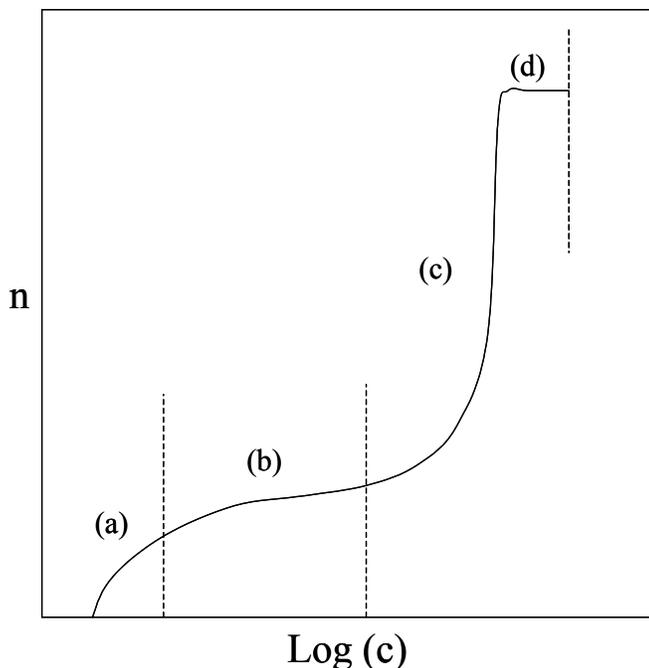
Cada domínio é constituído por um cilindro formado de 6 hélices, e cada um destes domínios é constituído por dois subdomínios formados por 2 α -hélices que estão covalentemente ligadas por pontes de dissulfeto.

A BSA possui seu ponto isoelétrico em pH 4,7. Estruturalmente, a BSA é muito semelhante à albumina do soro humano, HSA [10], mantendo cerca de 76% da identidade seqüencial da HSA e, sob o ponto de vista espectroscópico, difere por ter dois resíduos de triptofano, o W¹³¹ e o W²¹⁴, enquanto que a HSA possui apenas o W²¹⁴. Recentemente, foi obtida a estrutura cristalográfica para o complexo HSA-ácido mirístico, revelando que um total de cinco moléculas de ácido mirístico ligam-se assimetricamente à proteína. Há fortes evidências espectroscópicas de que o mecanismo de ligação do SDS e do ácido mirístico à cadeia protéica é similar [10].

3. Interação entre proteína e surfactante

Misturas de proteína e surfactante têm sido extensivamente estudadas nas últimas décadas devido às suas múltiplas aplicações em biociências, nas indústrias de alimentos e cosméticos e em biotecnologia. Na indústria de alimentos, emulsões utilizadas em produtos comestíveis como molhos de salada e em sorvetes, contém proteínas e emulsificantes na interface água/óleo e, os surfactantes são importantes na estabilização para evitar coalescência e também na reologia da mistura [20,27,37].

Figura 10: Isoterma de ligação da interação proteína-surfactante, onde n é o número de surfactante ligado por molécula de proteína, em função do $\text{Log } c$ [onde c é a concentração de surfactante livre].

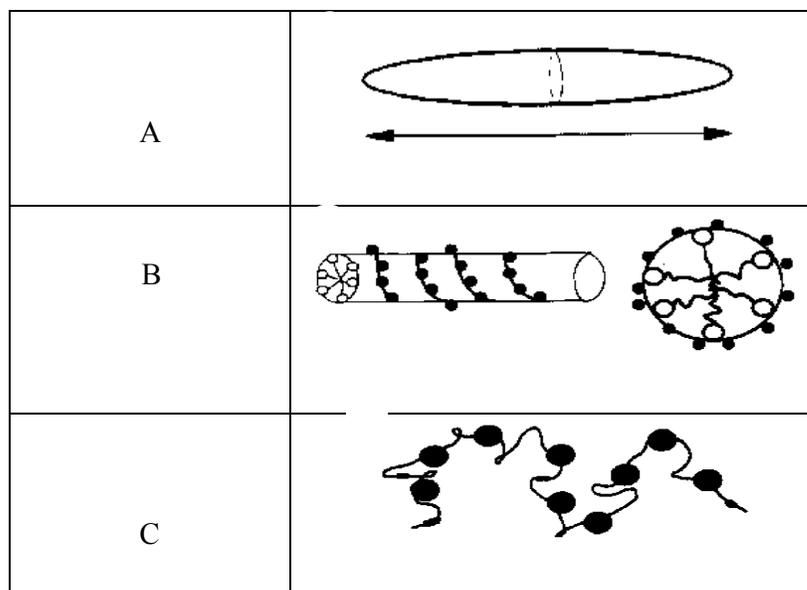


Em concentrações constantes de proteína, a tendência de formação do complexo proteína/surfactante aumenta com o aumento da concentração de surfactante. A Figura 10 mostra uma isoterma de ligação entre moléculas de surfactante e proteína. A isoterma exibe quatro regiões distintas, que podem ser definidas pela seguinte seqüência [11,20,27,34]:

- Uma região em baixas concentrações de surfactante onde ocorre ligação específica dos monômeros em sítios da proteína de alta afinidade resultante de interações eletrostáticas e hidrofóbicas. Esta região é muitas vezes seguida por um platô que define a passagem para a região (b). A ligação de monômeros nos sítios de alta afinidade não causa mudanças conformacionais da proteína;
- Uma segunda região onde ocorre a ligação de um número grande de monômeros induzindo expansão da macromolécula, neste caso, tem-se ligação não-específica.
- À medida que se aumenta a concentração de surfactante, observa-se um aumento da ligação por causa das intensas ligações dos outros sítios ativos que são imediatamente preenchidos. Nesta faixa de concentração tem-se ligação cooperativa entre a proteína e o surfactante. O desdobramento estrutural da proteína ocorre nesta região, ou seja, é nesta região que a proteína perde a estrutura terciária;
- Finalmente, uma região de saturação é alcançada pelo excesso de surfactante adicionado. Provavelmente, deve acontecer um alongamento na cadeia macromolecular com um conseqüente aumento da viscosidade do meio.

Diferentes modelos estruturais para o complexo BSA-SDS têm sido atribuídos ao longo dos anos [13,20,23,25,35]. A Figura 11 mostra diferentes formas sugeridas para o complexo.

Figura 11: Modelos discutidos para o complexo Proteína-Surfactante



(A- Modelo tipo bastão [35]; B- Modelo de hélice flexível [25]; C- Modelo de colar de pérolas[13])

Em 1970, Reynolds e Tanford [35], após uma série de estudos sobre viscosidade intrínseca, propuseram o modelo tipo bastão (Figura 11a) como a conformação mais provável para o complexo. Neste modelo, as moléculas de surfactantes agregam-se formando um elipsóide cujo semi-eixo menor mede aproximadamente 18 Å, que corresponde ao comprimento da cadeia do surfactante. Neste modelo a cadeia polipeptídica encontra-se enrolada em torno do agregado.

Lundahl e colaboradores [25], propuseram uma alternativa ao modelo de Reynolds e Tanford: um modelo semelhante a uma hélice, onde as micelas de SDS ficariam centralizadas com a cadeia polipeptídica localizando-se ao redor das micelas (Figura 11B).

Quatro anos depois, Teixeira e colaboradores [13], utilizando espalhamento de nêutrons a baixos ângulos, para complexos BSA-SDS, propuseram um modelo tipo “colar de pérolas” (Figura 11C). Neste modelo, a cadeia peptídica associa-se em torno da micela fazendo com que haja uma diminuição da mobilidade da cabeça polar do surfactante ou, as micelas podem encontrar-se nucleadas nos sítios hidrofóbicos da proteína de tal forma que, a mobilidade das cabeças polares, não pudesse ser afetada. Concordam também com este modelo, os resultados obtidos por viscosidade em diferentes concentrações de tampão apresentados por Shinagawa e col. [23].

Zanette colaboradores [20] propuseram uma estrutura consistente com o modelo “colar de pérola” formado por agregados micelares elipsoidais, estatisticamente arranjados ao longo da cadeia peptídica estendida (desnaturada) (Figura 12) [20].



Figura 12- Modelo colar de pérolas elipsoidais [20]

Para chegarem ao modelo proposto, os autores [20] realizaram estudos de SAXS, em concentração de BSA de 1%, variando a concentração de SDS de 0 a 100 mM. Em baixas concentrações de SDS, abaixo da *cac* (2,2 mM), nenhuma mudança conformacional da cadeia proteica causada pela adição de SDS pode ser observada. Em [SDS] logo acima da *cac*, quando os monômeros de SDS começam a se ligar cooperativamente com a BSA, verificou-se que o raio de giro da BSA aumenta de 32,1 Å para 39,2 Å e o diâmetro máximo de 100 para 130 Å. Quando mais SDS é adicionado à solução protéica, em concentração igual 10 mM, os agregados micelares formados pelo complexo BSA-SDS, são pequenas formas de esferas com anisometria igual a 1,0. Com o aumento da [SDS], a anisometria dos agregados micelares, monotonicamente aumentam, até atingirem 1,3 em 50 mM de SDS. Estes resultados corroboram com o fato de que, acima da *cac*, todo SDS adicionado contribui para o crescimento dos agregados micelares ligados na proteína. Os autores concluíram também que, acima de 50 mM de SDS, todo o surfactante adicionado contribui para a formação de micelas livres e, portanto, sem causar qualquer efeito na estrutura da proteína. Nestas condições tanto a anisometria quanto os demais parâmetros obtidos por SAXS não apresentaram qualquer alteração para o complexo BSA-SDS.

Durchschlag e colaboradores [32], usaram espectroscopia para monitorar a mudança de estrutura da proteína induzida por surfactante. Eles observaram que em baixas concentrações de surfactante, a estrutura da proteína é ligeiramente afetada. Em altas concentrações, no entanto, observaram uma mudança significativa na intensidade de fluorescência acompanhada de deslocamento da banda de emissão de fluorescência indicando mudanças conformacionais.

3.1. Estudo da Interação entre BSA e Surfactantes via Medidas de fluorescência

Sondas fluorescentes referem-se a uma variedade de moléculas e íons que, sob apropriada excitação eletromagnética, emitem luz. Os primeiros usos de sondas fluorescentes em sistemas contendo surfactantes foi para medir a concentração micelar crítica [1,11,46]. Considerando o caráter anisotrópico dos agregados micelares, é conveniente esperar que a distribuição dos reagentes, sonda e moléculas supressoras de fluorescência, não devam estar distribuídas uniformemente em mesmos ambientes ao longo de todo o volume da solução [37]. Na prática, considera-se a solução composta por duas pseudofases, a micelar e a aquosa, mas a micelar têm ainda diferentes microambientes com diferentes características. Assim, a escolha adequada da sonda depende de qual propriedade deseja-se acompanhar. Para efeitos de medida de *cmc*, a sonda deve ser hidrofóbica para que se identifique com clareza, na propriedade analisada, a rápida associação ao agregado micelar quando da ocorrência do processo de micelização. A Figura 13 apresenta um

diagrama de energia, universalmente utilizado para representar os principais caminhos que elétrons excitados de uma molécula percorre, em destaque o caminho percorrido para a formação das bandas I_1 e I_3 da sonda fluorescente pireno.

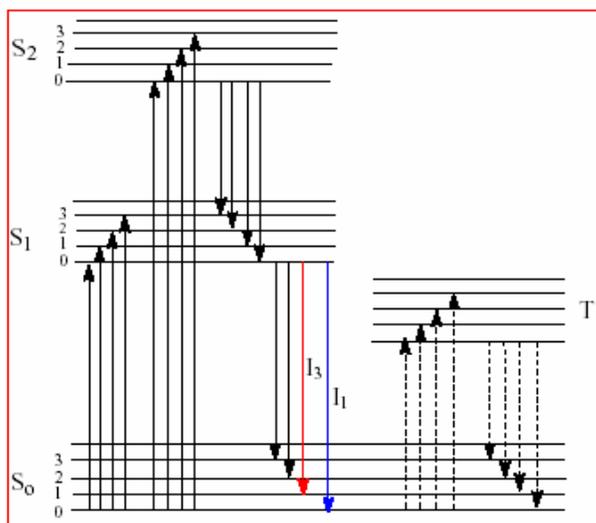


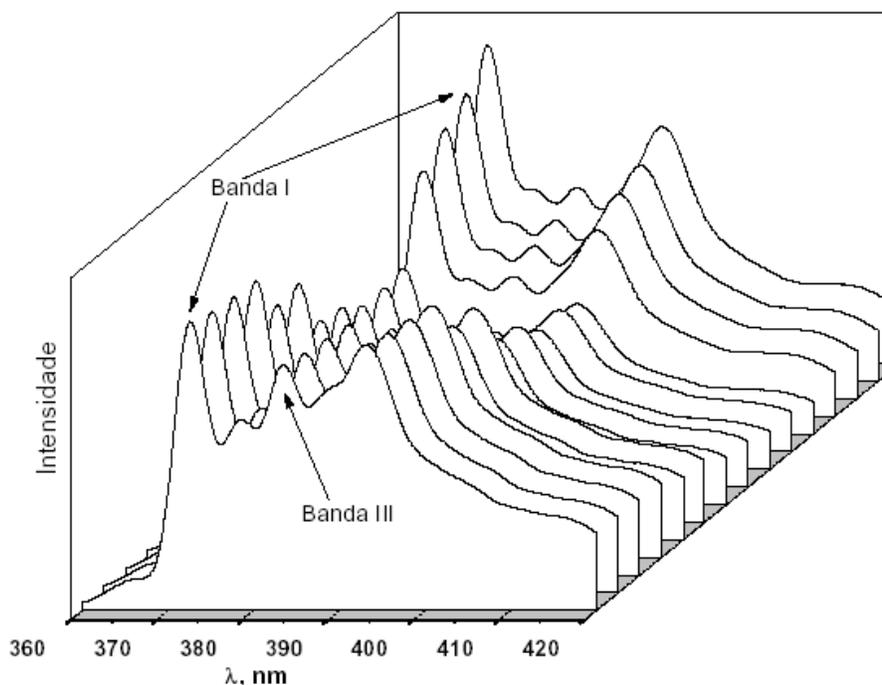
Figura 13: Representação do diagrama de energia para o pireno

Se nenhum processo perturba a molécula, cessada a excitação, a molécula deveria retornar ao estado fundamental com emissão de fóton de mesma energia do processo de absorção, cujo tempo está na ordem de 10^{-10} a 10^{-7} segundos. Em algumas moléculas, no entanto, os estados fundamental e excitado, estão associados a múltiplos níveis vibracionais e, sempre que a molécula absorve energia, a emissão ocorre como bandas largas.

Conforme diagrama da Figura 13, na temperatura ambiente, quase a totalidade das moléculas encontra-se em E_0 no nível vibracional v_0 . Na absorção, elas podem passar para diferentes níveis vibracionais de E_1 , em seguida a molécula chega num equilíbrio térmico no v_0 do nível eletrônico E_1 , e, finalmente, ocorre emissão em frequências menores do que na absorção. Fluorescência e fosforescência correspondem à emissão de luz associadas com as transições de $S_1^{v=0}$ e $T_1^{v=0}$ para $S_0^{v=0}$, respectivamente.

A sonda luminescente mais utilizada para estudar sistemas micelares é, sem dúvida, o pireno (Figura 15), onde as moléculas associam-se e formam dímeros chamados de exímeros. Neste caso, a emissão de fluorescência ocorre em comprimentos de onda maiores do que quando para a emissão do monômero. Para evitar que isso aconteça, na prática, a concentração de pireno na solução deve ser da ordem de 10^{-6} M. De qualquer forma, a distribuição do soluto, nos agregados micelares, ocorre estatisticamente.

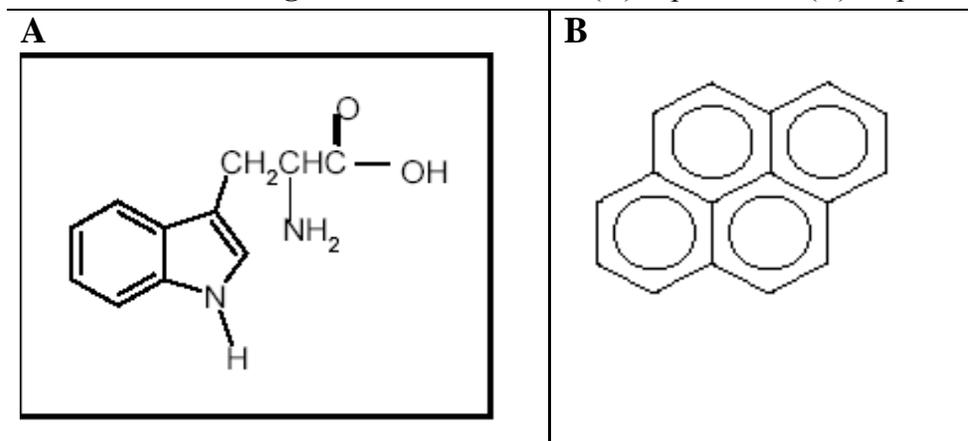
Figura 14: Espectro de emissão do pireno em uma solução com concentração



crescente de SDS, enfatizando as bandas I e III.

A Figura 14 apresenta as bandas de emissão do pireno, em uma solução de SDS, cuja concentração foi sendo aumentada gradualmente (destacando as bandas 1 e 3). Pode-se observar claramente a mudança de intensidade das bandas 1 e 3 com o aumento da concentração de surfactante, indicando a mudança da polaridade do microambiente onde o pireno encontra-se localizado.

A particularidade do espectro de emissão do pireno, é de que ele exibe bandas vibracionais finas cujas intensidades relativas são sensíveis à polaridade do meio. Enumerando as bandas de vibração de 1 a 5, que são observadas na temperatura ambiente, a banda I_3 em 384 nm, que corresponde a transição $S_1^{v=0} \rightarrow S_0^{v=1}$ (observe a seta vermelha na Figura 13), mostra pouca sensibilidade aos solventes, enquanto que a banda I_1 em 372,8 nm, $S_1^{v=0} \rightarrow S_0^{v=0}$ (observe a seta azul na Figura 13), muda a intensidade em função do solvente, aumentando em solventes polares. A medida da polaridade relativa é expressa em termos da relação I_1/I_3 (ou pelo inverso I_3/I_1), é utilizada como critério para avaliar a micropolaridade de meios e de micro-ambientes de agregados micelares.

Figura 15: Estruturas do (A) triptofano e (B) do pireno

As proteínas apresentam três diferentes resíduos de aminoácidos que contribuem em emissões de fluorescência: tirosina, triptofano e fenilalanina. Cerca de 90% da emissão total de fluorescência das proteínas, no entanto, é de atribuição aos resíduos de triptofano (veja estrutura na Figura 15) [46]. A banda de emissão máxima do triptofano, e seus derivados, são muito sensíveis à polaridade do solvente, devido às interações específicas entre o solvente e o anel. Exemplo deste efeito é observado no espectro de emissão do triptofano em água, que ocorre em **348 nm**, enquanto que o resíduo de triptofano da albumina humana, HSA, emite em **342 nm**, conforme pode ser observado na figura 16 [26].

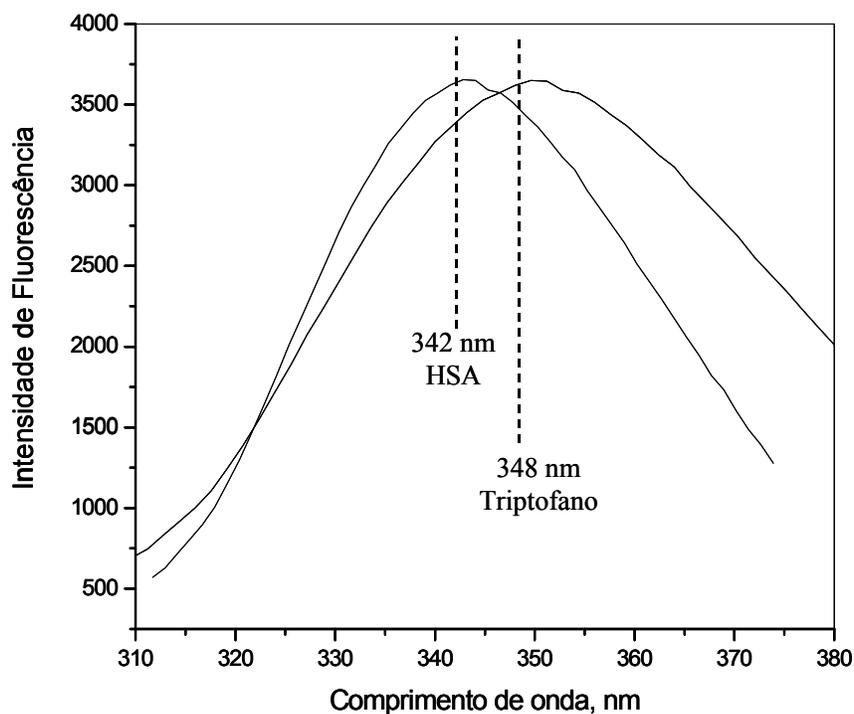


Figura 16: Espectros de emissão de fluorescência do triptofano em água e da HSA

Estudando complexos formados pela BSA com surfactantes não-iônicos, catiônicos e aniônicos através de medidas de fluorescência do triptofano da BSA, Swati e col. [70] propuseram um modelo de interação entre a proteína e surfactantes, veja Figura 17.

Recentemente, Swatti e colaboradores estudaram extensivamente o processo de desnaturação da proteína pela adição de surfactantes aniônicos. A Figura 17 representa, inicialmente, sem a adição de surfactante, a proteína encontra-se totalmente enovelada. Com a adição de uma pequena quantidade de surfactante à solução contendo a BSA, os monômeros de surfactante começam a se ligar na cadeia protéica, *via* contato físico, tem-se então o início do processo de ligação específica. Com o aumento da concentração de surfactante, inicia-se o processo de ligação cooperativa entre a proteína e surfactantes, formando agregados tipicamente micelares, que causam a abertura da cadeia da proteína. Os autores [70] observaram que a desnaturação de proteína ocorre em baixas concentrações de SDS (**10 mM**) quando comparado com a Uréia (**6 – 8 M**), que é bastante conhecida como agente desnaturador de proteínas. Os

autores [70] concluíram que com quando a uréia é o agente desnaturante empregado, a desnaturação ocorre por quebra das interações, enquanto que com os surfactantes a força motriz é a interação eletrostática que ocorre com os resíduos de aminoácidos.

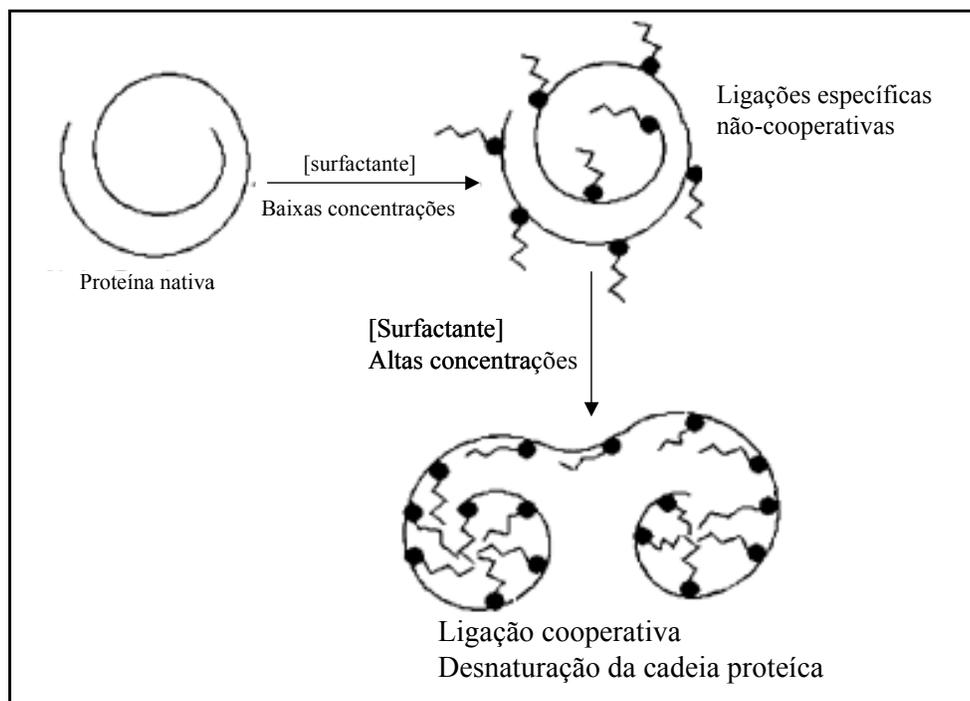


Figura 17: Modelo proposto por Swati e col. [70] para a interação proteína-surfactante

Recentemente, Swati e colaboradores [70], estudando interação entre a BSA e os sais biliares NaC e NaDC por medidas de fluorescência, concluíram que o processo de ligação entre os sais biliares a BSA é cooperativo. Eles concluíram ainda que os agregados formados entre os sais biliares e a BSA são maiores que as micelas dos sais biliares em solução.

Objetivo

O presente trabalho tem como principal interesse os sais biliares, se eles têm ou não a habilidade de associarem-se com proteínas em meio aquoso. Assim, o objetivo deste trabalho é o de investigar a associação dos sais biliares colato de sódio (NaC) e deoxicolato de sódio (NaDC), à uma proteína globular, albumina do soro bovino (BSA), induzido pelos surfactantes aniônicos dodecilsulfato de sódio (SDS) e dodecanoato de sódio (SDoD).

Os estudos experimentais foram realizados inicialmente em baixas concentrações dos surfactantes (até 50 mM), onde predomina o processo de ligação específica. Em seguida, os estudos foram realizados em altas concentrações de surfactante, onde predomina o processo de associação cooperativa.

Vale ressaltar que, em ambos os casos (nas diferentes faixas de concentrações de surfactante estudadas), este trabalho enfoca a competição dos surfactantes nos processos de ligação e a identificação das condições experimentais onde formam complexos mistos de BSA, SDS (SDoD) e NaC (NaDC).

As técnicas empregadas neste estudo foram: (a) Medidas da supressão da fluorescência da BSA, acompanhando os resíduos de triptofano presente na cadeia proteica da BSA; (b) Fluorescência do pireno, que é uma sonda externa à cadeia da BSA e bastante hidrofóbica; (c) Condutividade elétrica e (d) Tensão superficial, que são técnicas clássicas conhecidas para acompanhar os parâmetros de ligação como *concentração micelar crítica (cmc)*, *concentração de agregação crítica (cac)* e ainda o *ponto de saturação da proteína (psp)*.

CAPÍTULO II

Parte Experimental

1. Materiais

1.1. Reagentes

A Albumina do soro bovino (BSA), os sais biliares (Colato de Sódio (NaC) e Deóxicolato de Sódio (NaDC)) e o dodecilsulfato de sódio (SDS), com pureza de 99%, têm procedência da Sigma. O pireno empregado com pureza de 99% é de procedência da Aldrich.

Os parâmetros de micelização das misturas de sais biliares e surfactante aniônico foram determinados na ausência e em presença de diferentes concentrações de BSA, em condições de 20 mM de tampão tris/HCl, pH 7,50 e a 25,0°C, usando um pHmetro Beckman modelo ϕ 71, equipado com um eletrodo de vidro combinado.

As soluções aquosas de proteína BSA foram preparadas em concentrações 0,1% e 1,0%, sob agitação suave durante 12 horas. As soluções estoque de surfactante foram preparadas sob agitação suave, preparando-se a solução mais concentrada e realizando as

sucessivas diluições. As soluções estoques de Pireno foram preparadas em concentração de $1,0 \times 10^{-6}$ M em etanol.

2. Equipamentos e Métodos

Todas as medidas de condutividade elétrica em função da concentração de surfactante, com ou sem BSA, foram feitas usando um condutivímetro ATI-ORION modelo 170, equipado com eletrodo de platina e acoplado a uma bureta semi-automática da Metrohm Herisau tipo Multi-Bürette, modelo E-485 com capacidade para 20 mL. A técnica consiste na adição da mistura de surfactante-BSA, através de uma bureta automática, sobre um volume conhecido de solução contido numa cela de diluição previamente termostatizada a 25,0 °C.

A variação de tensão superficial foi monitorada num tensiômetro interfacial K8, Krüss GMBH, com escala de divisão de 0,1 mN/m, equipado com um anel Pt-Ir-20, 25,0 °C. Foram usados 10 mL de solução para cada medida. Os valores apresentados são uma média de três coletas de dados.

As medidas de intensidade de fluorescência foram realizadas num espectrofotômetro da Hitachi F-4500, equipado com uma cubeta de quartzo de 10 mm. As fendas de excitação e emissão do monocromador foram ajustadas para 2,5 mm. As medidas de fluorescência do triptofano da BSA, para estudar o espectro das bandas de emissão, foram obtidas com excitação em 280 nm.

As medidas de fluorescência utilizando uma sonda externa, o pireno, foram realizadas na concentração de pireno igual $1,0 \times 10^{-6}$ M, sendo que a solução estoque foi preparada em etanol. As amostras foram excitadas em 336 nm e os espectros de emissão foram obtidos entre 360 e 500 nm. A razão I_1/I_3 foi estimada analisando a relação da intensidade máxima do pico em 372,8 nm (I_1) e 384,0 (I_3).

CAPÍTULO III

Resultados e Discussão

Em solução aquosa, os sais biliares são conhecidos porque se associam formando agregados cujas características dependem das condições experimentais, tais como, força iônica e da concentração do sal biliar [37,38]. Em baixas concentrações, quando comparados com os surfactantes iônicos convencionais, os sais biliares associam-se formando agregados micelares pequenos. Assim, Zana e Guvelli [39] sugeriram um modelo de associação para os sais biliares onde, com o aumento da concentração de surfactante, eles associavam-se em pequenas micelas, *micelas primárias*, com número de agregação na ordem ≈ 16 (para o NaC), cresciam formando agregados micelares maiores denominados de *micelas secundárias*. Por espalhamento de luz, Kratochvil e col. [40] determinaram o número de agregação em concentrações próximas da *cmc*, consistente de 10 monômeros por agregado. Concluíram, ainda, que havia formação de dímeros que se associam por ligação de hidrogênio e, com o aumento da concentração, eles cresciam *via* interações hidrofóbicas entre os dímeros. Logo, estes resultados sugerem que uma solução de um sal biliar é constituída por agregados polidispersos. Por causa desta tendência no processo de associação, a *cmc* não é claramente definida por técnicas convencionais como, por medidas da condutividade elétrica da solução. Estas conclusões foram também observadas através de medidas de tensão superficial [6,41], fluorescência [7] e por solubilização [41].

Todos os resultados apresentados neste trabalho foram realizados em solução tampão 20 mM de tris/HCl, pH 7,50 e a 25°C. É importante notar que o ponto isoelétrico da

BSA ocorre em pH 4,7 [27,42] e, sendo assim, nas condições estudadas, a proteína está parcialmente negativa.

1. Ligação do SDS e de sais biliares com a BSA em baixas concentrações

Nesta primeira etapa, foi estudado o processo de ligação competitiva sobre a proteína, entre os sais biliares NaC e/ou NaDC e o SDS, em concentrações até **50 μM** , portanto, muito abaixo das concentrações de micelização crítica de ambos os surfactantes. Nestas condições, o mecanismo de ligação entre surfactantes e proteínas, tem sido já descrito como *via* processo de ligação específica de monômeros, por interações eletrostática e hidrofóbica, ocorrendo em sítios de alta afinidade da proteína [11,20,27].

A técnica de espectroscopia de fluorescência foi utilizada para monitorar mudanças na estrutura terciária da proteína. Em princípio, a interação da proteína com surfactantes induz mudanças na posição e/ou orientação dos resíduos de triptofano alterando a exposição ao solvente, conduzindo a alterações no rendimento quântico do processo de fluorescência [10]. Assim, as mudanças no microambiente do triptofano na proteína, foram monitoradas através do acompanhamento da banda de emissão de fluorescência na região de 320-360 nm.

1.1 *Medidas da constante de Stern Volmer, K_{SV}*

A constante de Stern-Volmer, K_{SV} , é um parâmetro muito utilizado para interpretar supressão de fluorescência e avaliar a eficiência de supressores da intensidade da banda de emissão de fluoróforos. Na prática, adicionam-se quantidades crescentes do supressor (neste estudo os supressores são SDS, NaC e NaDC) a uma solução contendo BSA. Em condições de concentração diluída de surfactante, até \approx **50 μM** , o estudo da supressão de fluorescência promovido pelas moléculas de surfactantes pode ser analisado através da equação clássica de Stern-Volmer [10, 16, 43]:

$$I_0 / I = 1 + K_{sv} [Q] \quad \text{equação 01}$$

onde I_0 e I são as intensidades de fluorescência na ausência e na presença de supressor, respectivamente, K_{sv} é a constante de Stern-Volmer e $[Q]$ é a concentração molar do supressor.

A Figura 18 apresenta um típico perfil de emissão de fluorescência dos triptofanos da BSA. Pode-se observar que com a adição de surfactante (até $20 \mu\text{M}$), ocorre a progressiva supressão da emissão de fluorescência, sem provocar deslocamento da banda de emissão.

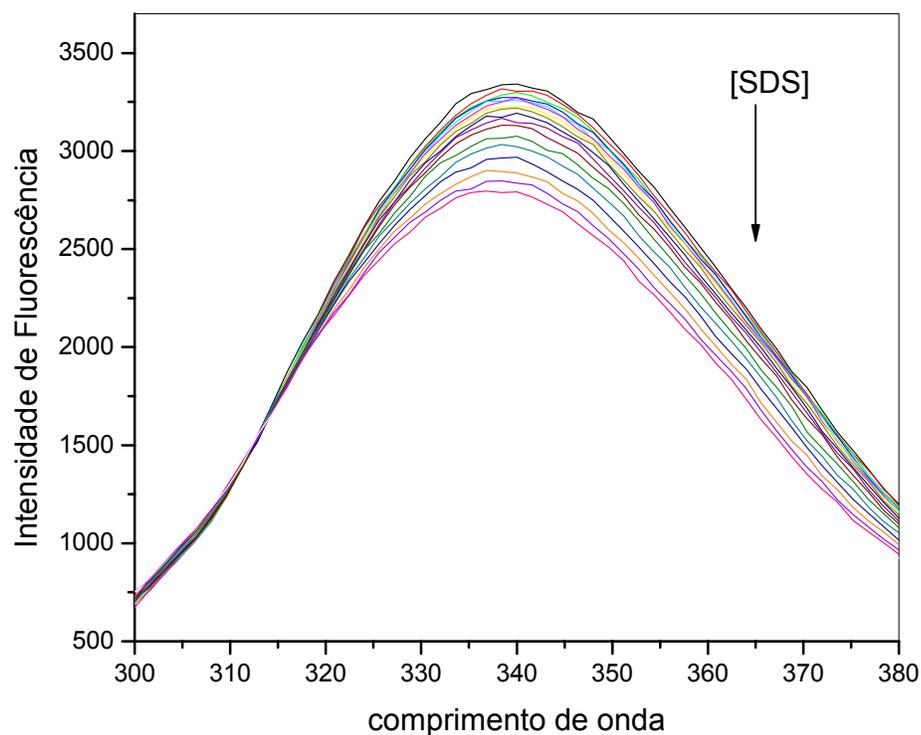


Figura 18: Emissão de Fluorescência para 0,1% de BSA, com a adição de SDS até a concentração de $20 \mu\text{M}$

A partir da figura 18, obtem-se um perfil como o apresentado na Figura 19, um gráfico típico de Stern-Volmer, construído em presença de $16 \mu\text{M}$ de BSA (correspondente a 0,1% de BSA). Foram adicionadas quantidades crescentes de SDS, NaC e NaDC, até a concentração de $20 \mu\text{M}$ de surfactante. Vale enfatizar que, nesta faixa de concentração de supressor, todos os gráficos são lineares com correlações lineares $\geq 0,9998$. Sendo assim,

para o SDS e o NaC, da Figura 19 obteve-se os valores de K_{sv} equivalentes a $15.000 \pm 500 \text{ M}^{-1}$ e $4.500 \pm 200 \text{ M}^{-1}$, respectivamente, indicando que o SDS é um supressor 3 a 4 vezes mais eficaz que o NaC. O argumento formal que suporta a metodologia usada aqui, está baseado no fato que os valores de K_{sv} obtidos para o SDS são em ordem de valor, similar àqueles relatados previamente na literatura para o sistema BSA-SDS [10, 44].

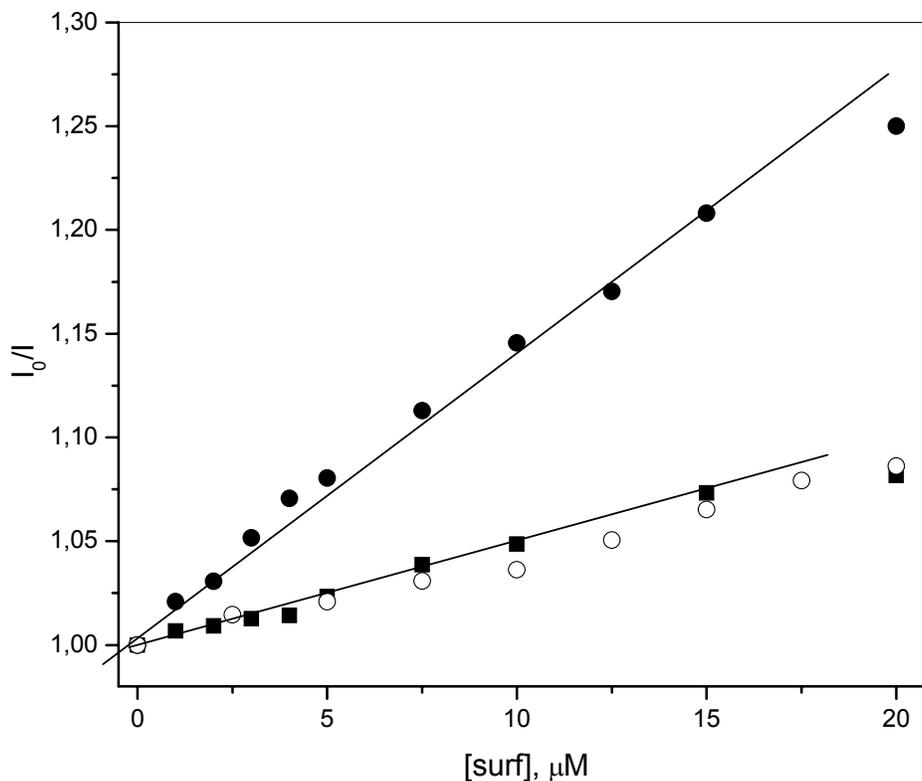


Figura 19: Efeito da concentração de (●) SDS, (■) NaC e (○) NaDC sobre a razão das intensidades da banda de emissão em presença (I) e na ausência do supressor (I_0), com 0,1% de BSA .

É importante anotar que, quando o supressor é o sal biliar NaDC, embora os valores de *cmc* encontrados na literatura para os dois surfactantes sejam bastante distintos, **12 mM** para o NaC e **4,2 mM** para o NaDC [45], o efeito de supressão é idêntico àquele causado pelo NaC (Figura 19). Esta semelhança de eficiência da supressão indica que a diferença fundamental nas estruturas moleculares, isto é, de três para dois grupos hidroxílicos, não é um fator relevante no processo de supressão da fluorescência da BSA.

A tabela 02 lista os valores de K_{sv} obtidos para o SDS e os sais biliares, NaC e NaDC, em diferentes concentrações de BSA. Inicialmente, para o NaDC, observa-se que os valores de K_{sv} são semelhantes aos obtidos para o NaC indicando, portanto, eficiência idêntica no processo de supressão da emissão de fluorescência da BSA. Depois, observa-se que os valores de K_{sv} diminuem com o aumento da concentração de BSA, sinalizando para um processo espontâneo de ligação e de supressão. A partir desta dependência, pode-se também concluir que a eficiência da supressão é em função da concentração de surfactante ligado sobre os sítios específicos da molécula de proteína.

Tabela 02: Constantes de Stern-Volmer (K_{sv} , M^{-1}) para o SDS, NaC e o NaDC, em diferentes concentrações de proteína.

BSA, μM	BSA, % wt	SDS	NaC	NaDC
Ausência ^(a)	Ausência ^(a)	3200 \pm 200	700 \pm 50	800 \pm 50
1,6	0,01	60000 \pm 500	8500 \pm 300	9 600 \pm 400
4,0	0,025	35000 \pm 400	6500 \pm 100	8 500 \pm 400
8,0	0,05	21000 \pm 500	5500 \pm 300	5 800 \pm 200
16	0,10	15000 \pm 500	4500 \pm 200	4 200 \pm 200
32	0,20	10000 \pm 500	4500 \pm 200	4 200 \pm 200
40	0,25	8000 \pm 500	5500 \pm 200	5 200 \pm 200

^(a) Valores obtidos para a supressão com a “molécula modelo” ((D)-triptofano) em água.

1.2 Supressão do (D)–Triptofano

Na ausência da proteína, foi usado o (D)-triptofano como “molécula modelo” para fins de comparação da eficiência de supressão dos surfactantes NaC, NaDC e SDS sobre os triptofanos da proteína. A Figura 20 mostra a variação da razão I_0/I em função das concentrações de NaC, NaDC e de SDS, contendo **0,0083 M** de (D)-triptofano.

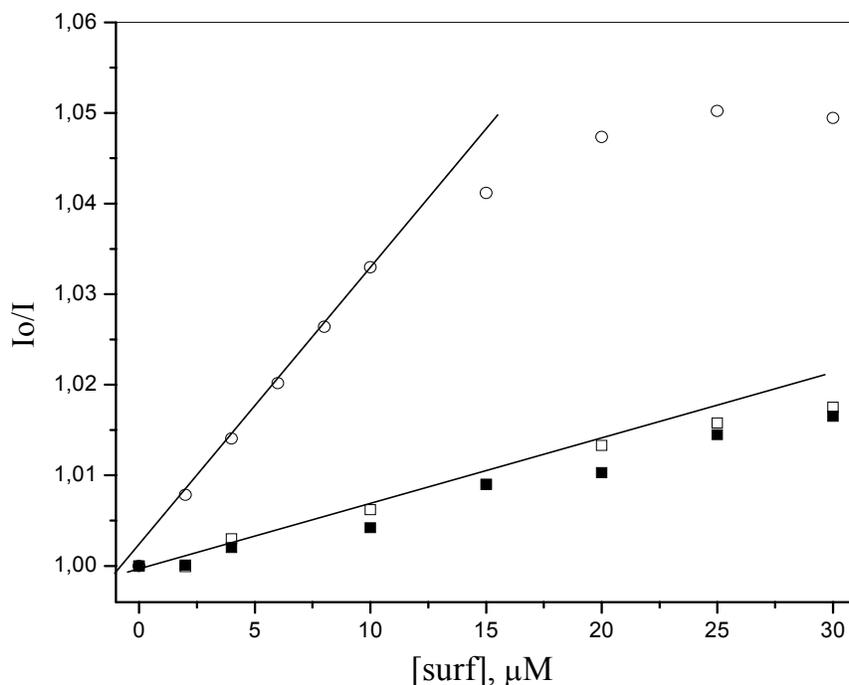


Figura 20: Gráficos de I_0/I em função da concentração do (○) SDS, (□) NaC e (■) NaDC, obtidos a partir da supressão da intensidade de fluorescência do (D)-triptofano.

Observa-se que os gráficos são lineares no intervalo de concentração de 0 a 20 μM de surfactante, sendo que, o NaC e o NaDC exercem eficiências semelhantes na supressão de fluorescência. As constantes de Stern-Volmer obtidas foram 3.200 ± 200 , 0 ± 50 e $800 \pm 50 \text{ M}^{-1}$ para o SDS, NaC e o NaDC, respectivamente. Estes valores mostram que o SDS é cerca de 4,5 vezes mais eficaz no processo de supressão da “molécula modelo” do que ambos os sais biliares. Um segundo ponto a ser enfatizado, é o de que a razão I_0/I é insensível à variação da concentração do (D)-triptofano no intervalo de $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ à 1×10^{-3} .

1.3 Competitividade entre SDS e NaC e/ou NaDC em misturas com BSA

Os estudos de misturas de SDS e NaC sobre a emissão de fluorescência da proteína foram realizados em presença de BSA 0,1%. Assim, o processo de ligação competitiva na proteína pode ser analisado na Figura 21. Inicialmente estes resultados indicam que o SDS é um supressor mais eficiente do que o NaC, conforme já foi constatado nas Figuras 19 e 20.

A Figura 21 exibe também o perfil de uma mistura do SDS e NaC em uma fração molar de **0,75 de NaC**. Observa-se que o efeito de supressão da fluorescência é intermediário entre aqueles quando dos surfactantes puros. Uma análise preliminar sugere um mecanismo de ligação onde os surfactantes ligam-se competitivamente a sítios específicos de alta afinidade da proteína.

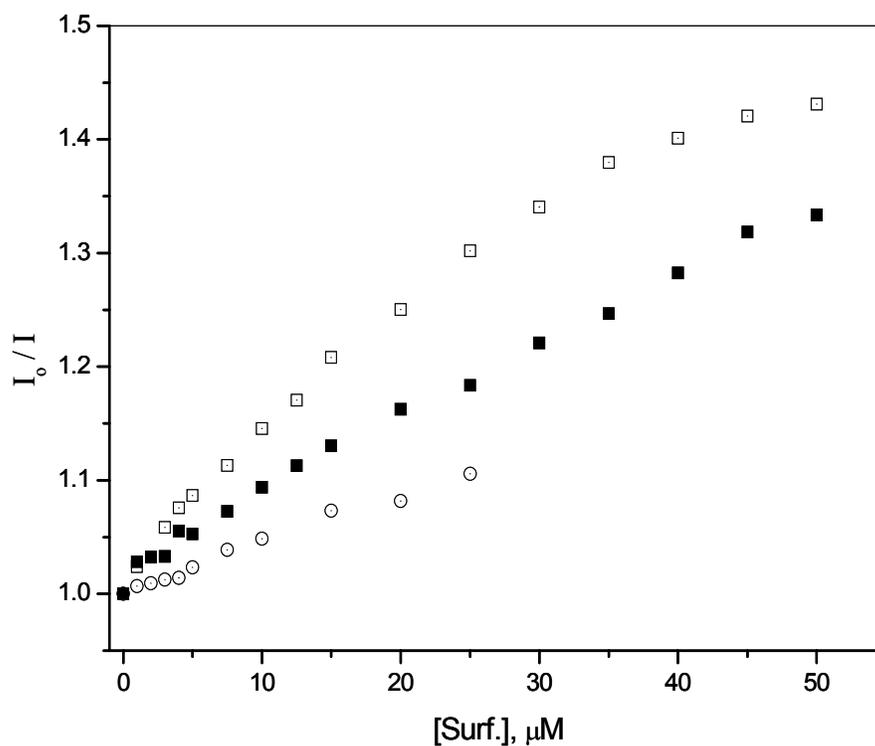


Figura 21: Variação da razão I_0/I em função da [surfactante] em 0,1% de BSA, sendo: (□) SDS, (○) NaC (■) e para uma mistura de fração molar de 0,75 moles de NaC.

Esta competição entre os surfactantes para ligarem-se à proteína pode ser observada muito mais claramente na Figura 22, onde a razão I_0/I foi representada graficamente em função da fração molar de SDS, em concentrações fixas da mistura de surfactantes, portanto, 5 e 15 μM e em 0,1% de BSA.

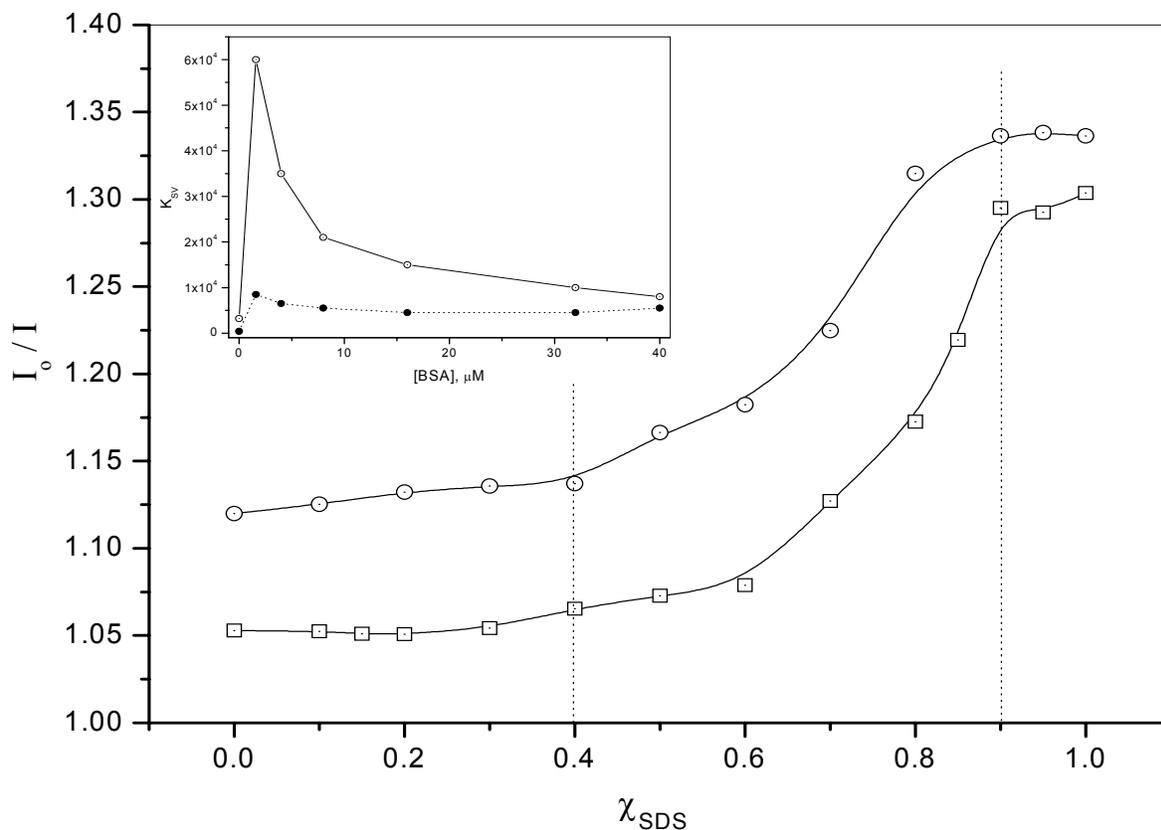


Figura 22: Variação da razão I_0/I em função χ_{SDS} , com concentração total da mistura de surfactante (SDS + NaC) fixa em (○) 5 μM e (□) em 15 μM . O anexo apresenta a variação de K_{sv} , M^{-1} em presença de SDS (○) e de NaC (●) em função da [BSA].

Como se pode observar na Figura 22, com a variação da fração molar da mistura, as isotermas resultantes mostram três regiões características:

- (i) Para ambas as isotermas, em frações molares de SDS até $\approx 0,4$, a variação de I_0/I permanece constante, não excedendo a 10% do total da variação da razão I_0/I ;
- (ii) Acima da fração molar de SDS $\approx 0,4$, entretanto, ocorre um forte aumento de I_0/I indicando um incremento de monômeros de SDS nos sítios de ligação da proteína,
- (iii) Finalmente, acima de $\approx 0,9$ SDS, ocorre um platô de saturação.

O anexo da Figura 22 destaca a dependência de K_{sv} com a concentração de proteína. De fato, tem sido descrito que os valores das constantes de Stern-Volmer são maiores em

concentrações menores de BSA [10,37,38,43,44], embora para o NaC, qualitativamente esta tendência é muito menos pronunciada. Enfatiza-se que, em **16 μM BSA** (ou 0,1% BSA), a diferença na eficiência da supressão entre os surfactantes é de aproximadamente **dez vezes** (tabela 02). Esta diferença pode ser relacionada com a maior capacidade de supressão que o SDS exerce sobre o (D)-triptofano, conforme foi mostrado na Figura 18.

A Figura 23 apresenta o processo de ligação competitiva na proteína, onde a razão I_0/I é representada graficamente em função da concentração dos surfactantes, SDS e NaDC e da fração molar de 0,75 de NaDC. Em todos os resultados obtidos para o NaDC, foi utilizada a mesma metodologia aplicada para quando NaC foi adicionado à BSA. Observa-se que os perfis são muito semelhantes para ambos os sais biliares (tabela 02).

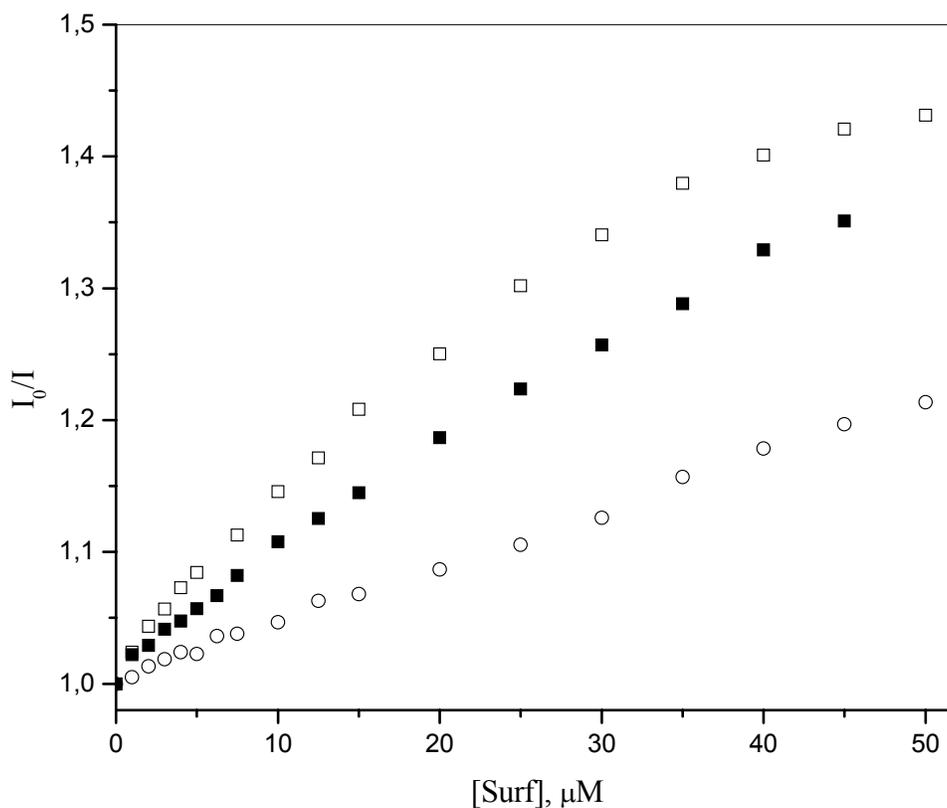


Figura 23: Variação da razão I_0/I em função da concentração de (\square) SDS e (\circ) NaDC (\blacksquare), e para fração molar de 0,75 moles de NaDC.

1.4 Efeito da concentração da proteína na ligação do SDS e do NaC

Diversos procedimentos têm sido usados para quantificar a ligação de surfactantes em proteínas [1,3,11-14,17,44]. O método aplicado aqui foi descrito por Lissi e colab. [44], que consiste em estimar uma pseudo-constante de ligação, definida como K , entre a proteína e os surfactante, através de medidas da intensidade do fluorescência da proteína, I_0/I (intensidade de fluorescência na ausência e em presença de proteína), em função da concentração do surfactante e em diferentes concentrações de proteína.

A Figura 24 apresenta alguns perfis obtidos para concentração crescente de SDS, em diferentes concentrações de BSA, **0,25**, **0,1** e **0,025** %. Observa-se que a razão I_0/I , proporcionalmente diminui com o aumento da concentração da proteína. Este fato pode ser facilmente entendido, uma vez que com o aumento da concentração de proteína, tem-se também o aumento de sítios hidrofóbicos (de alta afinidade com os surfactentes), ocorrendo assim a redistribuição dos surfactantes nestes sítios.

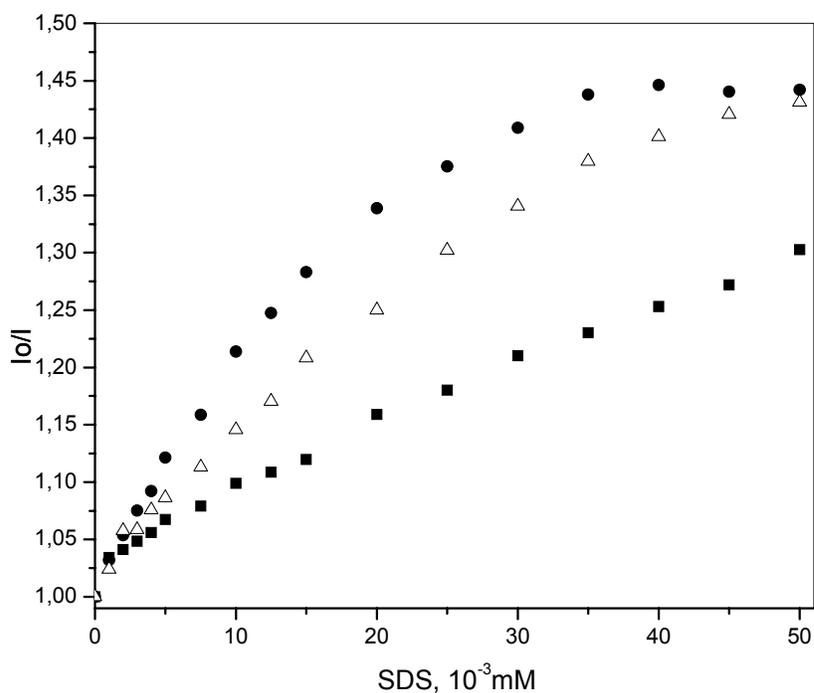


Figura 24: Gráficos de I_0/I em função da [SDS] em (■) 0,25% ;
(△) 0,1% e (●) 0,025% de BSA.

Na próxima etapa, fixando na Figura 24 alguns valores de I_0/I , obtêm-se correlações da relação da $[SDS]$ versus $[BSA]$, que estão apresentadas da Figura 25. Todos os gráficos resultantes como o apresentado na figura 25 apresentam correlações lineares superiores a 0,999.

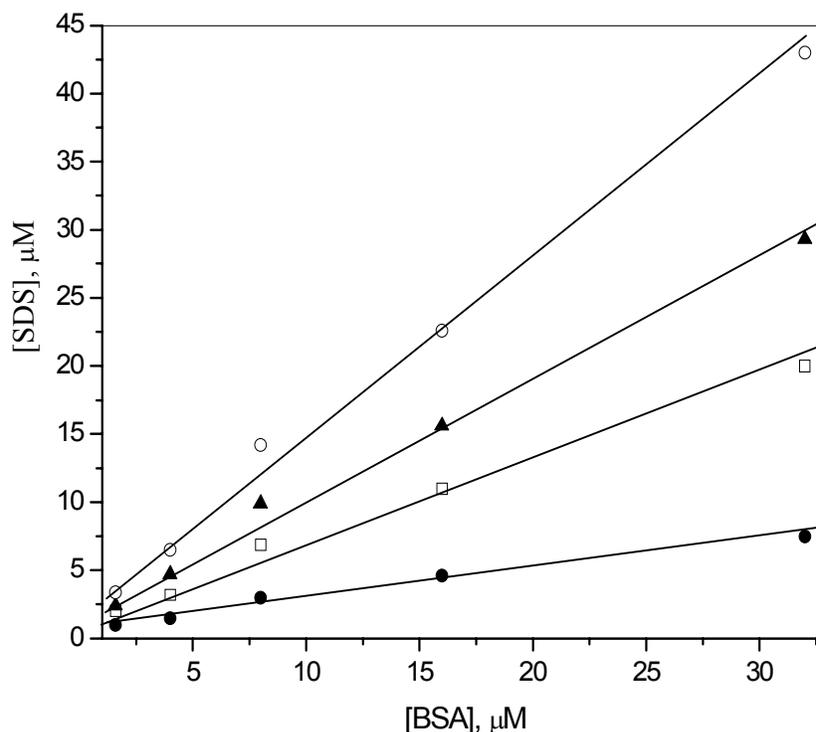


Figura 25: Gráficos da concentração de SDS em função da concentração de BSA usando-se os seguintes valores de I_0/I : (○) 1,28; (▲) 1,20; (□) 1,15 e (●) 1,08.

O efeito da concentração de BSA sobre os perfis de I_0/I em função da concentração de surfactante mostrados nas Figuras 24 e 25, pode ser atribuído à distribuição do surfactante entre os sítios de ligação da proteína e o meio externo à cadeia proteica. Assim, a partir dos perfis como os apresentados na Figura 25, a distribuição do surfactante pode ser quantificada nos termos de uma pseudo-constante de ligação, K , de acordo com a equação 02 [44]:

$$K = [S]_b / \{[S]_f [BSA]\} \quad \text{equação 02}$$

onde $[S]_b$ e $[S]_f$ referem-se às concentrações de surfactante ligado à proteína e livre, respectivamente. O termo “*livre*” indica aquela concentração de monômeros “*externa*”

à cadeia protéica, ou seja, não ligados à proteína. O método proposto para avaliar a constante K , está baseado na premissa de que o valor de I_0/I está determinado somente pelo número médio de monômeros ligados por molécula de proteína, n . Sendo assim, como $[S]_b / [BSA]$ representa o número de moléculas de surfactante (n) ligadas por mol de BSA, a constante K pode ser expressa pela equação 03 [44]:

$$K = \frac{n}{[S]_f} \quad \text{equação 03}$$

Na prática, a metodologia empregada usa uma aproximação, que consiste em representar graficamente a concentração de surfactante necessária para alcançar uma determinada relação de I_0/I em diferentes concentrações de proteína. Em seguida, são feitas as extrapolações para zero de BSA a partir dos gráficos obtidos experimentalmente e estimam-se as concentrações de monômeros livres ($[S]_f$). Das inclinações das retas resulta a estimativa média de monômeros ligados por molécula de proteína (n). As Figuras 26A e 26B mostram, respectivamente, as variações das concentrações de NaC e de NaDC em função da $[BSA]$ em diferentes valores da razão I_0/I .

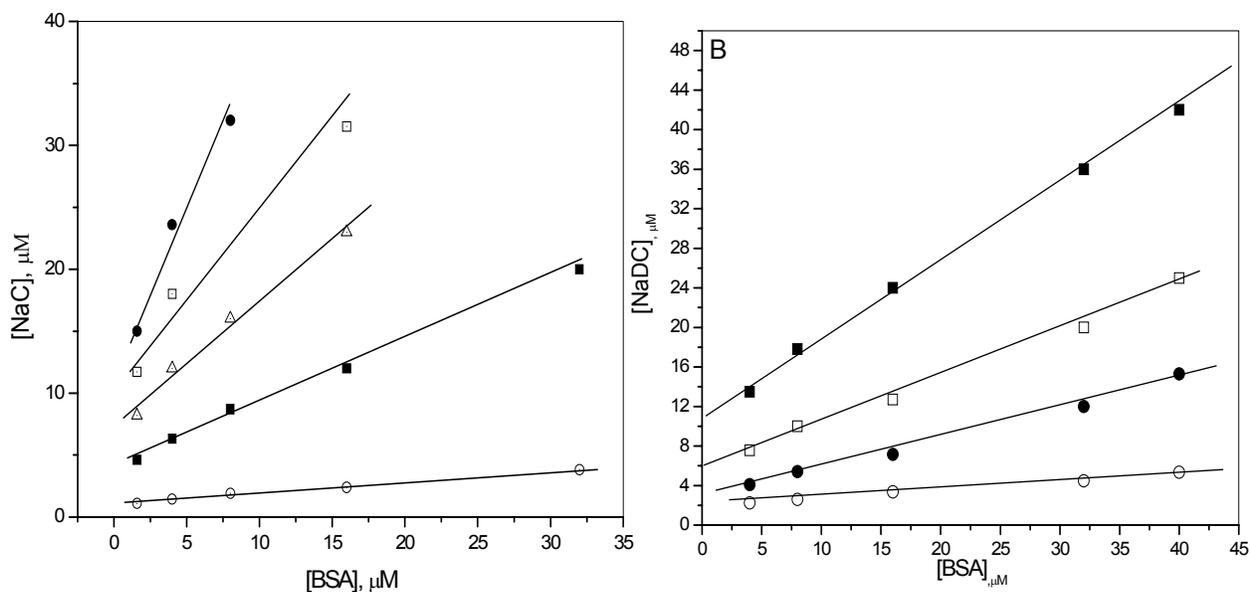


Figura 26: (A) Perfis da $[NaC]$ vs. $[BSA]$ para os seguintes valores de I_0/I : (●) 1,15; (□) 1,12; (△) 1,08; (■) 1,05 e (○) 1,01. (B) Idem para $[NaDC]$ em função da $[BSA]$, para os seguintes valores de I_0/I : (■) 1,08; (□) 1,06; (●) 1,04; (○) 1,02.

A Tabela 03 apresenta todos os parâmetros que foram obtidos a partir dos perfis das Figuras 25 e 26.

Tabela 03: Parâmetros como número de moléculas de surfactante ligadas por molécula da proteína (n) e concentração livre de monômeros ($[S]_{\text{livre}}$), obtidos dos perfis das Figuras 24 e 25.

<i>Surfactante</i>	I_0/I	$S_{\text{livre}} (\mu M)$	n	$10^3 K (M^{-1})$	$S_T (\mu M)^a$
NaC	1,01	1,0	0,07	70	2,5
	1,05	3,0	0,60	100	16,0
	1,08	6,0	1,21	201	23,0
	1,12	9,0	2,20	250	-
	1,15	10,4	2,60	250	-
NaDC	1,02	2,0	0,08	40	2,5
	1,04	2,8	0,30	107	3,1
	1,06	5,0	0,55	110	6,2
	1,08	7,0	0,82	117	10,8
	1,1	8,0	1,01	126	-
SDS	1,05	0,5	0,10	192	2,3
	1,08	0,7	0,23	328	4,6
	1,12	1,0	0,45	445	8,6
	1,15	1,1	0,60	550	11,0
	1,20	1,1	0,87	791	16,0
	1,28	1,3	1,29	1016	22,7

^a Concentrações analíticas de surfactante estimadas em cada relação de I_0/I

Considerando a estimativa média de moléculas de surfactante ligadas à proteína (n) listada na tabela 03, a razão $n_{\text{NaC}}/n_{\text{SDS}}$ varia de quatro a seis, dependendo da razão I_0/I considerada. Por exemplo, quando I_0/I é fixado em **1,08**, os valores de K obtidos são **328**,

201 e **117** para o SDS, NaC e NaDC, respectivamente. Estes valores representam a quantidade de monômero ligado à proteína, quando obtidos em uma mesma relação de I_0/I . Como já tem sido observado [44], K exibe pouca exatidão porque depende da incerteza na medida de $[S]_f$ estimada a partir das extrapolações. Entretanto, a tendência observada na tabela 03 pode ser aceita como real, isto é, para o SDS, os valores de K são maiores do que aqueles valores para os sais biliares.

As diferenças observadas na eficiência de supressão podem ser explicadas também a partir de um segundo ponto de vista. A tabela 03 mostra valores de $[S]_f$ estimados a partir dos gráficos das Figuras 24 e 25. Entende-se que $[S]_f$ representa a fração de monômero restante (não ligado), isto é, o que se encontra no meio externo à cadeia protéica [44]. Conseqüentemente, esta quantidade de surfactante não promove supressão da fluorescência da BSA. Considerando-se sempre razões iguais de I_0/I , de acordo com os valores apresentados na tabela 03, as concentrações de monômeros livres de NaC e NaDC são muito mais elevadas que aquelas obtidas para o SDS. Isto significa que o NaC e o NaDC exibem solubilidades mais elevadas no meio aquoso. Por exemplo, em $I_0/I = 1,08$ os valores de S_{livre} obtidos foram de **6,0**, **7,0** e **0,7** μM para NaC, NaDC e SDS, respectivamente, representando uma diferença de ≈ 9 vezes. Apesar da incerteza na determinação da concentração livre do monômero, a tendência observada nas proporções dos valores tem coerência.

Assim, uma explicação para a rápida diminuição de K_{SV} com o aumento da concentração de BSA (veja Figura 22), é a de que há um processo de redistribuição de monômeros em sítios de ligação disponíveis da proteína, sem causar supressão de fluorescência dos resíduos do triptofano. Pode-se assim concluir que, quando a concentração da proteína for elevada, a distribuição dos monômeros sobre sítios de ligação da BSA sem supressão de fluorescência, é o efeito mais importante podendo, assim, explicar a rápida diminuição dos valores de K_{SV} .

O significado real deste parâmetro de ligação (n), no entanto, refere-se à quantidade de monômero ligado por mol de BSA que produz a supressão. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 27. A correlação linear obtida justifica a relação proporcional entre a quantidade de proteína na solução e o processo de ligação representado pela razão I_0/I .

Estes resultados estão de acordo com a conclusão que, no intervalo das concentrações de SDS e NaC estudadas, está se desenvolvendo a ligação específica da proteína com os surfactantes e ainda, a linearidade dos gráficos, indica essencialmente supressão estática pelos monômeros de surfactante, mesmo para as misturas de surfactantes.

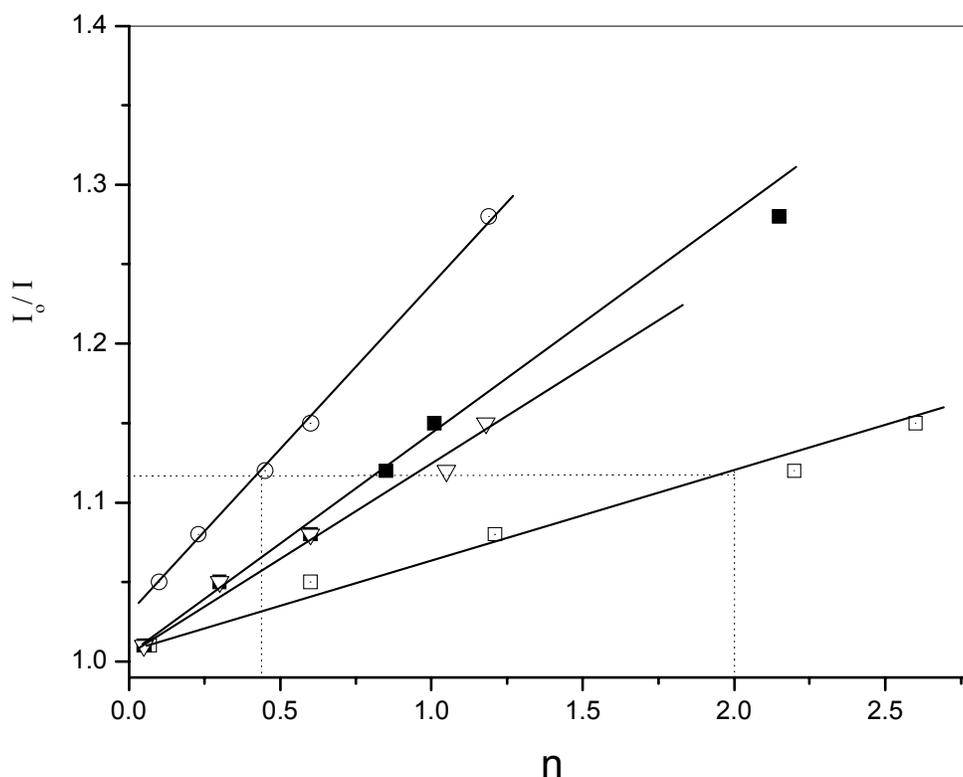


Figura 27: Perfil de I_0/I versus o número de monômeros de surfactante ligados por molécula of BSA (n) obtidos para (○) SDS e (□) NaC, (■) χ_{NaC} 0,50 e (▽) χ_{NaC} 0,75

Acrescenta-se ainda que, para o SDS e o NaC, as inclinações obtidas a partir da Figura 25, são **0,20** e **0,05**, respectivamente. Esta diferença representa uma maior eficiência de supressão do SDS ≈ 4 vezes quando comparado ao sal biliar. Em outras palavras, usando a premissa no qual está baseado este método de avaliação [43,44], pode-se afirmar que a quantidade de NaC necessária para produzir a mesma razão de I_0/I que o SDS produz sobre os resíduos de triptofano é de 4 vezes.

Com a semelhança encontrada nos resultados de K e de K_{SV} para os dois sais biliares estudados, conclui-se que o processo de ligação específica sobre a BSA, independe

da diferença existente nas estruturas moleculares dos monômeros destes surfactantes que, basicamente, corresponde a três e dois grupos hidroxílicos, respectivamente.

2. Ligação com a BSA em altas concentrações de NaC, SDS e de SDoD

Numa extensiva revisão sobre misturas de polímeros e surfactantes, E. D. Goddard [1] já concluía que a questão “*como se formam complexos polímero-surfactante*” é mais difícil de responder do que aquela “*por que eles se formam?*”. Vários fatores têm sido apontados como responsáveis pela ligação espontânea entre polímeros e surfactantes. A interpretação mais comum refere-se ao caráter hidrofóbico de polímeros e surfactantes, embora não explica, por exemplo, por que os catiônicos ligam-se com polímeros neutros apenas fracamente.

Neste trabalho, a técnica de fluorescência foi utilizada para monitorar mudanças na estrutura terciária da proteína, induzidas pela interação de surfactantes iônicos. Na prática, o espectro de emissão de fluorescência observado representa a média dos efeitos causados sobre os dois triptofanos da BSA nos seus respectivos microambientes da estrutura globular da proteína. De outro lado, sabe-se que a posição no espectro da banda de emissão é dependente da polaridade do solvente. A BSA nativa, em pH 7,0, por exemplo, emite em 342 nm enquanto que, em 0,2 % de SDS, a emissão ocorre em 332 nm [10,46]. O deslocamento para comprimentos de onda menores tem sido atribuído à diminuição da polaridade do microambiente onde os resíduos de triptofano estão localizados [2,30,46]. Desta forma, variações da banda de emissão podem ser interpretadas como uma medida direta da ligação de agregados tipicamente micelares em sítios da proteína, adjacentes à localização dos triptofanos. Enfatiza-se que a polaridade da superfície micelar é estimada como próxima da polaridade de um álcool, enquanto que o interior da micela assemelha-se à polaridade de um hidrocarboneto [46].

2.1. *Medidas de Tensão Superficial para as misturas BSA - SDS e BSA – NaC*

A Figura 28 mostra uma combinação dos perfis de tensão superficial na ausência e em presença de 1% de BSA, em 20 mM de tampão tris/HCl, pH 7,50. Na ausência de proteína, à medida que se adiciona SDS à solução, a tensão superficial diminui até ocorrer

inflexão brusca em **37 dina/cm** identificada como a *cmc* em **3,8 mM** de SDS, definida como início da formação de micelas de SDS. Quando BSA é adicionada, inicialmente é observado a diminuição dos valores de tensão superficial, de 68 dina/cm para 55 dina/cm. Este fato se deve ao fato de a proteína também apresentar atividade na superfície e com isso, causar a diminuição da tensão superficial.

Diferentemente, o perfil em presença de BSA, mostra duas inflexões, sendo que a primeira ocorre em valores inferiores ao da *cmc*, porém, em maiores valores de tensão superficial, **44 dina/cm**. Esta [SDS] é definida como o início de formação de agregados micelares ligados à proteína, ocorrendo aqui em **3,3 mM** de SDS. Em analogia às definições para misturas de polímeros e surfactantes [11,12,15,22,37,43], esta concentração é aqui definida como *concentração de agregação crítica, cac*. A interpretação do platô, que se forma acima da *cac*, é resultado do processo de associação cooperativa do SDS sobre a proteína enquanto que na interface solução/ar, a concentração monomérica de SDS é constante. A partir do ponto definido no perfil de tensão superficial como C_1 , em **10 mM** de SDS, tem-se o início do crescimento dos agregados micelares formados a partir do *cac*.

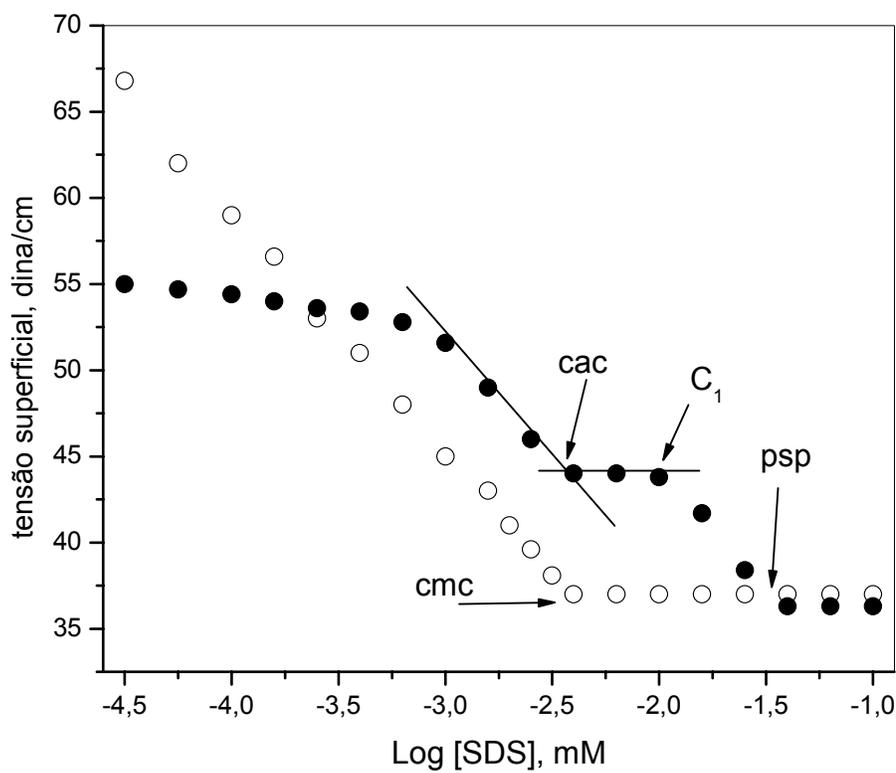


Figura 28: Gráfico de tensão superficial *versus* log [SDS] em 20 mM de tris/HCl, (○)na ausência e em (●) em presença de 1,0 % de BSA.

O modelo mais adequado para interpretar a diminuição da tensão superficial acima do primeiro platô é aquele no quais os monômeros de SDS no equilíbrio monômero/proteína, deslocam-se para o equilíbrio ar/solução. Assim, em **37 dina/cm**, inicia um segundo platô associado à saturação das cadeias da proteína, **psp = 42 ± 4 mM**. Assim, a partir desta [SDS], todo surfactante adicionado à solução contribui para a formação de micelas livres. A premissa desta conclusão é sustentada pelo fato de que, acima do *psp*, os valores de tensão superficial, com e sem proteína, são idênticos.

O valor obtido por tensão superficial para o *psp*, é muito próximo daquele que representa a saturação da proteína medida por diálise por Reynold e Tanford [12]. Esta coincidência leva-nos a concluir que, mesmo *via* uma medida indireta, o segundo ponto de descontinuidade está ocorrendo nas proximidades da saturação, fato que permite assumir que a técnica de tensão superficial, mesmo dentro de limitações, é uma alternativa para medir a saturação de proteínas por surfactantes aniônicos.

Quando NaC é adicionado à solução de BSA, com o propósito de identificar os parâmetros de ligação, *cac*, *psp* e *cmc*, a Figura 29 apresenta os perfis de tensão superficial do NaC em presença e na ausência de proteína.

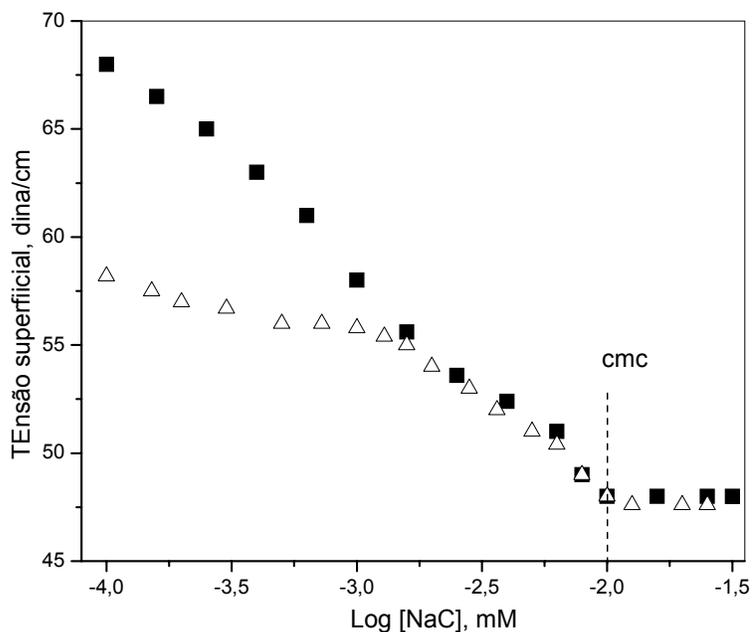


Figura 29: Gráfico de Tensão Superficial *versus* log [NaC] com 20 mM de tris/HCl, (■) na ausência e em (△) em 0,5 % de BSA.

Diferentemente dos resultados apresentados para o sistema BSA-SDS (Figura 29), a inflexão em **48 dina/cm** define uma *cmc* ocorrendo em **10 mM** de NaC, tanto na ausência quanto em presença de BSA. Este resultado é idêntico àquele encontrado por Nakashima e col. [47]. Embora a *cmc* do colato de sódio dependa da técnica usada [23, 37, 39-43], este valor determinado está em concordância com aqueles relatados por outras técnicas, como por exemplo, por potenciometria (**10,8 mM**) [48] e por calorimetria (10 mM, em presença de 0,1 M de NaCl) [23].

É relevante anotar, como principal informação, que em misturas de colato de sódio e BSA, o perfil de tensão superficial mostra apenas uma inflexão que coincide com a *cmc* do NaC. Como a capacidade da proteína em diminuir a *cmc*, portanto, com aparecimento de uma *cac*, é usada como forte indicação de ligação do surfactante ao polímero e a extensão da diminuição tem sido usada como um parâmetro para avaliar a força da interação entre o polímero e o surfactante [49-51], o resultado da Figura 29 indica forte evidência de ausência de ligação cooperativa do NaC à BSA.

Finalmente, como a técnica de tensão superficial é uma medida de uma propriedade da interface ar/água [2,6,49] e o processo de micelização que ocorre no interior da solução, as informações que a técnica fornece são indiretas porque estão relacionadas com o equilíbrio monomérico entre a interface e o interior. Sendo assim, as técnicas de condutividade elétrica e de fluorescência estacionária que seguem, são acrescentadas para complementar informações e aprimorar o entendimento dos sistemas aqui estudados.

2.2. Condutividade elétrica em misturas BSA - SDS e em BSA – NaC

A Figura 30 apresenta o perfil de condutividade elétrica para o SDS, na ausência e em presença de 0,1% de BSA, em 20 mM de tampão tris/HCl, pH 7,5. Na ausência de proteína, quando em baixas concentrações de SDS, à medida que a concentração é aumentada, a condutividade elétrica também aumenta, linearmente, até o início da formação de agregados micelares definido pela *cmc*. A *cmc*, nas condições da experiência,

ocorre em **5,0 mM** de SDS. Acima da *cmc*, com a adição de mais SDS à solução, a condutividade volta a aumentar linearmente. Considerando que os agregados micelares são iônicos, a linearidade é forte indicação de que os agregados micelares que se formam acima da *cmc* mantém as propriedades interfaciais idênticas.

Em mistura de proteína e surfactante, o perfil de condutividade elétrica, em analogia com as medidas já amplamente divulgadas, como por exemplo, poli(oxietileno) (PEO) e SDS [16,18,22], os perfis também indicam duas inflexões com as seguintes características: a primeira representa o início da associação cooperativa entre a proteína e o surfactante, *cac*, que, nas condições da experiência, ocorre em \approx **1,4 mM** e, o segundo, deveria ser a saturação da proteína por moléculas de surfactante, *psp*, mas, claramente, define o início de formação de micelas livres [16,18,22]. São características ainda duas regiões lineares (i) abaixo da *cac*, (ii) acima do *psp* e (iii) uma terceira não linear entre *cac*-*psp* [18,42,52].

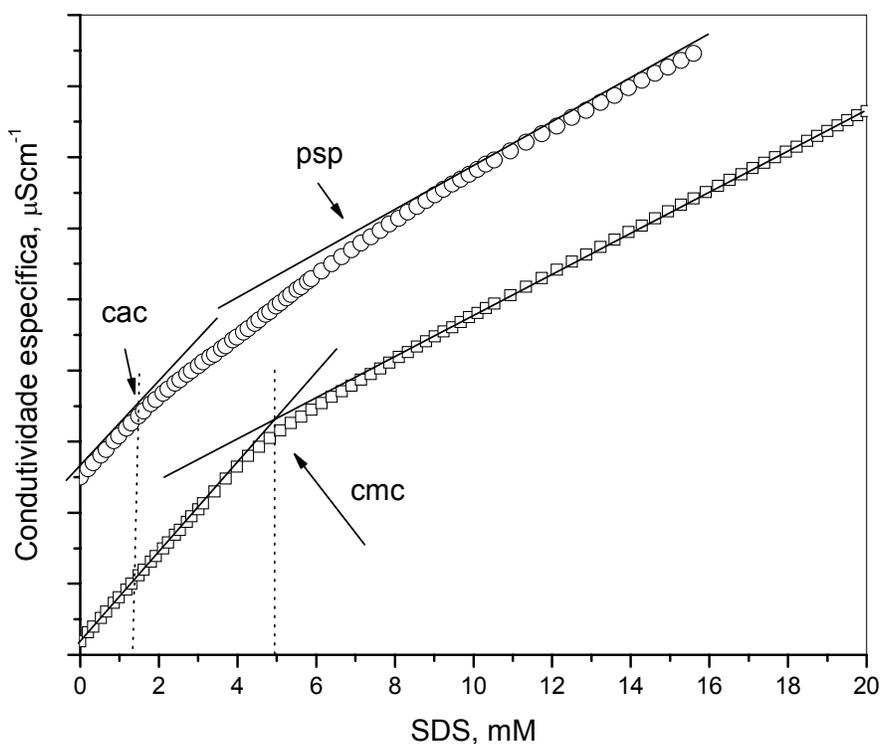
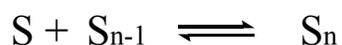


Figura 30: Gráfico de condutividade elétrica para SDS: (□) na ausência e (○) em presença de 0,1% de BSA, em 20 mM de tampão Tris/HCl, pH 7,50.

Aquela abaixo da *cac* ($\approx 1,4 \text{ mM}$), é associada ao processo de ligações específicas de monômeros em sítios hidrofóbicos da proteína. A região localizada entre a *cac-*psp**, é definida como a etapa de formação de complexos BSA-SDS. Considerando a região inteira, observa-se que, nitidamente, ela não é linear. A variação do coeficiente angular nesta região para o complexo BSA-SDS oferece duas interpretações [20]:

- i. Se houver formação somente de complexo BSA-SDS, a variação do coeficiente angular, ao longo desta região, necessariamente deve estar relacionada com o processo de associação. Neste caso, o comportamento do perfil de condutividade elétrica colabora com o mecanismo de formação do complexo, *via* associação cooperativa ocorrendo com adição de monômeros, S, ao agregado no complexo, S_n, por etapa, conforme o equilíbrio:



Assim, a *cac* pode ser considerada como a concentração de SDS onde os primeiros agregados com características micelares, pequenos e altamente ionizados começam a se formar. À medida que se aumenta a concentração de SDS, o coeficiente angular diminui, paulatinamente, porque os agregados crescem e tendem ao grau de ionização, tipicamente micelar, que somente é atingida no segundo ponto de descontinuidade, aqui denominado de *psp*. Dentro de uma aproximação, e considerando o intervalo de concentração, isto é, entre *cac* e $\approx 10 \text{ mM}$ SDS, a estimativa do grau de ionização leva ao valor próximo 0,8. Este valor representa um agregado altamente ionizável e, tipicamente um agregado micelar pequeno.

- ii. Desenvolvimento de agregados mistos, complexo BSA-SDS e agregados tipicamente micelares normais: Neste caso, a contínua variação e, portanto, a diminuição do coeficiente angular, seria o resultado do balanço na contribuição de ambas a espécies, a micela de SDS com baixo grau de ionização e o complexo.

iii. A terceira região é linear e bem caracterizada na literatura [7,9,18,20]. Como discutido acima, a extensão da variação do coeficiente angular culmina com o ponto de descontinuidade psp , para o qual o coeficiente angular é constante e idêntico àquele do perfil de cmc para o SDS nas mesmas condições experimentais.

O psp encontrado por condutividade elétrica é inferior ao encontrado por tensão superficial [43] e por diálise [12]. Como tem sido proposto [52], a saturação é um processo combinado: (i) a formação do complexo BSA-SDS que pode ser identificada no psp *condutométrico* (Figura 30), e (ii) o crescimento dos agregados do complexo BSA-SDS até a saturação, identificado pelo segundo ponto de descontinuidade na curva de tensão superficial e por diálise. A saturação seria, então, determinada pelo preenchimento de todas as “cavidades hidrofóbicas” em cuja concentração de SDS define-se a saturação da proteína. O crescimento dos agregados em concentrações abaixo da saturação, já tem sido documentado por outros autores [20,31].

Recentemente, Santos e colaboradores [20], por SAXS observaram que a anisometria dos agregados variavam de 1 a 1,3, entre 10 e 50 mM de SDS (em presença de 1% de BSA) e que acima, até **80 mM**, a anisometria permanece constante. Utilizando SAXS, nós observamos também que o SDS desenovela a proteína até o psp *tensiométrico*, ligando nas cavidades hidrofóbicas da macromolécula mas que é independente da força iônica da solução [20,52].

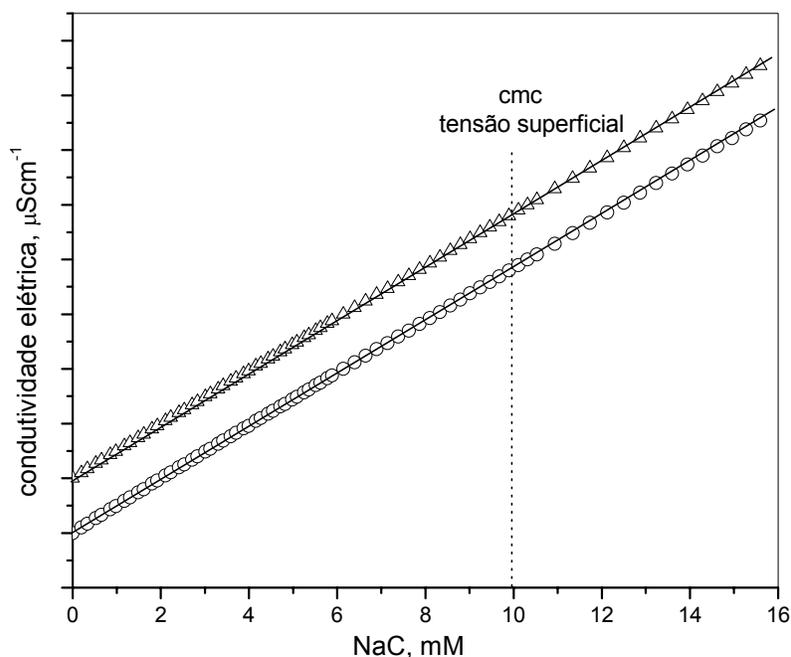


Figura 31: Gráfico de condutividade elétrica para NaC: (O) em ausência e (Δ) em presença de 0,1% de BSA, em 20 mM de tampão Tris/HCl, pH 7,50.

A Figura 31 mostra os perfis de condutividade elétrica para o NaC na ausência e em presença de 0,1% de BSA. Os dois perfis exibem comportamentos lineares e, a *cmc* tensiométrica (indicada no gráfico pela linha tracejada), não é observada por condutividade.

Entretanto, uma análise mais detalhada nas regiões de concentrações diluídas, revela um pequeno desvio da linearidade. A Figura 32 mostra um perfil ampliado em regiões de baixas concentrações de NaC. Este desvio da linearidade está em acordo com a formação de dímeros de colato de sódio e ocorre em [NaC] onde Oakenfull e Fisher [53] observaram um desvio nos perfis de condutância equivalente previsto pela equação de Onsager. Vários outros autores também já obtiveram resultados similares [38,39,54], concluindo que a explicação mais provável para este desvio está relacionada com a pré-agregação de ânions de sais biliares, formando dímeros.

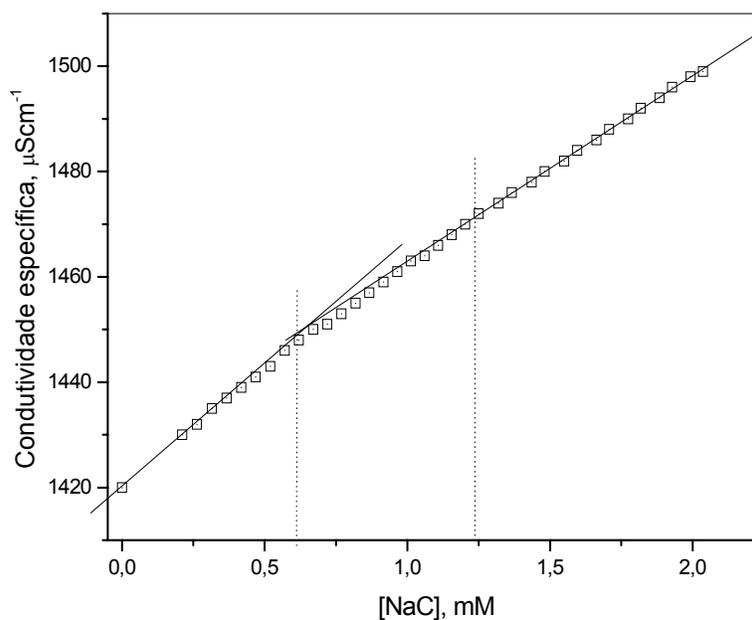


Figura 32: Condutividade elétrica em baixas concentrações de NaC.

2.3. Efeito da concentração de SDS sobre a emissão de fluorescência da BSA

Informações sobre a natureza dos agregados formados entre proteínas e surfactantes podem ser obtidas através da fluorescência estacionária dos resíduos de triptofano da cadeia protéica. Na prática, o espectro observado representa a média dos efeitos causados sobre os dois triptofanos da BSA nos seus respectivos microambientes da estrutura da proteína.

A Figura 33 apresenta os espectros de emissão de fluorescência para uma solução de 0,1% de BSA, registrados para diferentes [SDS]. Observando a Figura 34 com atenção, dois importantes efeitos ficam evidentes: o primeiro, em baixas concentrações de SDS, até $\approx 30 \mu\text{M}$, em 340 nm ocorre progressiva supressão da fluorescência e, o segundo, acima desta [SDS], a banda de emissão desloca-se para comprimentos de onda menores.

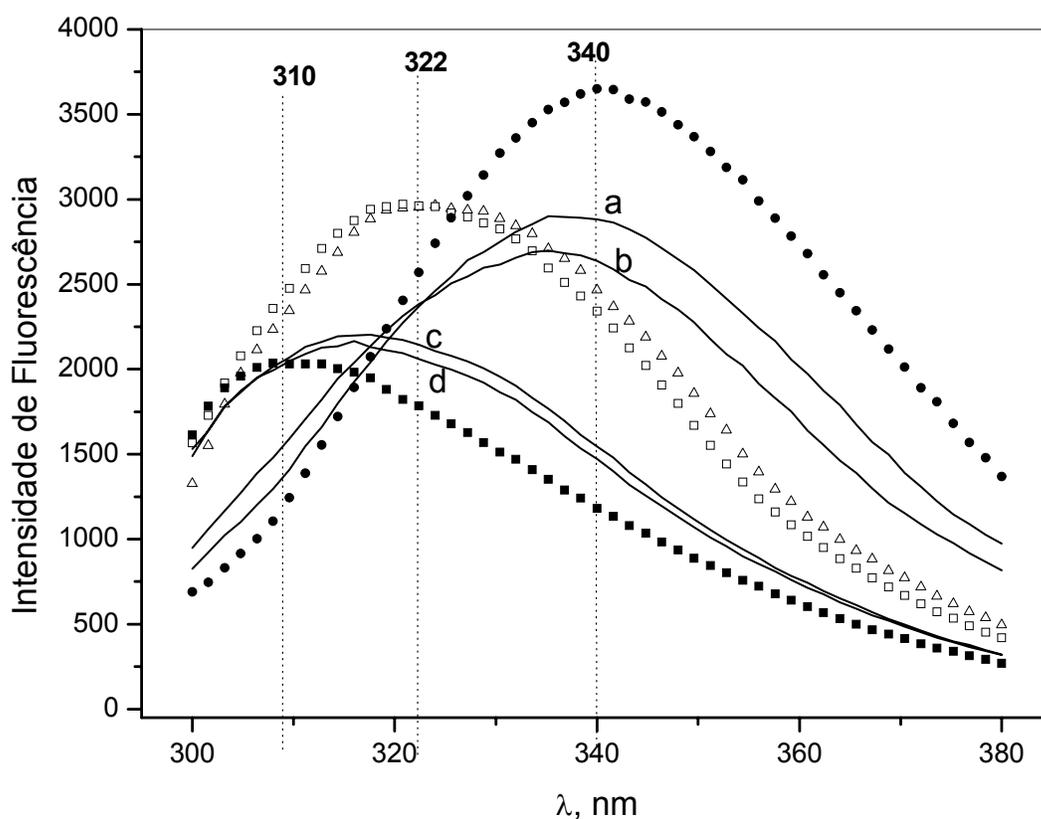


Figura 33: Emissão de fluorescência para 0,1% BSA: (●) ausência de SDS e em presença de diferentes concentrações de SDS: (□) 1,5 mM; (△) 2,0 mM; (■) 10 mM; (a) 0,03 mM; (b) 0,075 mM; (c) 3,0 mM e (d) 4,0 mM.

A variação das bandas de emissão de fluorescência observadas na Figura 33 podem ser assim interpretada:

- i. Até $\approx 0,03 \text{ mM}$ de SDS, ocorre cerca de 60 % supressão da fluorescência. Esta é a região de ligação específica de monômeros de SDS já descrita acima, na primeira parte da discussão deste trabalho, no ítem 1.
- ii. Acima de $0,03 \text{ mM}$ de SDS, até $\approx 2 \text{ mM}$, a intensidade de fluorescência permanece constante. Salienta-se que esta região coincide com o primeiro platô da supressão da fluorescência (veja Figura 34), embora a banda de emissão desloca-se para 322 nm. Se o deslocamento está vinculado com mudanças de polaridade, entende-se que neste intervalo próximo da *cac* (Figura 35), o processo de ligação já é cooperativo formando pequenos agregados micelares próximos dos resíduos de triptofano que sentem um ambiente menos polar.
- iii. Acima da *cac*, observa-se uma segunda etapa de supressão da fluorescência concomitantemente com deslocamento da banda de emissão para 310 nm ($\approx 10 \text{ mM}$ de SDS). Este deslocamento indica que os resíduos de triptofano progressivamente estabelecem-se em ambientes cuja polaridade é tipicamente de micelas.

Também foi usada neste trabalho a metodologia que utiliza perfis das razões de intensidade de emissão de fluorescência I_0/I *versus* concentração do supressor para acompanhar propriedades e mudanças estruturais de proteínas [10-13,30,46]. Salienta-se, no entanto, que ela é restrita somente àqueles casos onde a supressão ocorre sem deslocamento da banda de emissão. Uma metodologia alternativa, que não requer constância da banda de emissão, é *via* a representação do perfil construído expressando graficamente a área normalizada das bandas de emissão (A_0/A) *versus* [Surfactante], onde A_0 e A representam as áreas das bandas de emissão na ausência e em presença do supressor, respectivamente. Assim, com a finalidade de apresentar a influência da concentração do surfactante sobre a emissão de fluorescência da BSA, a Figura 34 mostra os perfis de A_0/A *versus* [SDS] em presença de 0,1 e 0,25% de BSA. O anexo destaca os perfis em baixas concentrações de SDS, enfatizando a região da *cac*. Curiosamente, eles descrevem isotermas com as mesmas formas daquelas isotermas de ligação, como quando

se representa o “número de ligantes associados por molécula de proteína em função da concentração de ligantes livres” [5,11,14,56].

Como se observa, em baixas concentrações de SDS, até cerca de 0,075 mM (veja o anexo da Figura 34), a razão A_0/A aumenta rapidamente indicando forte supressão de fluorescência. Em seguida, a supressão é parcialmente interrompida e o perfil exibe um platô que termina em concentrações de SDS próximas da $cac \approx 2$ mM, indicada por condutividade elétrica (Figura 34). Acima da cac , a isoterma exibe um perfil sigmoidal, tipicamente de processos onde ocorre ligação cooperativa [5,11,56,57]. Finalmente, em altas [SDS], aparece um segundo platô, descrito como a região de saturação da proteína por monômeros de surfactante [5,11,57]. Observa-se que efeito de supressão torna-se constante em ≈ 9 e ≈ 17 mM de SDS para 0,1 e 0,25 % de BSA, respectivamente.

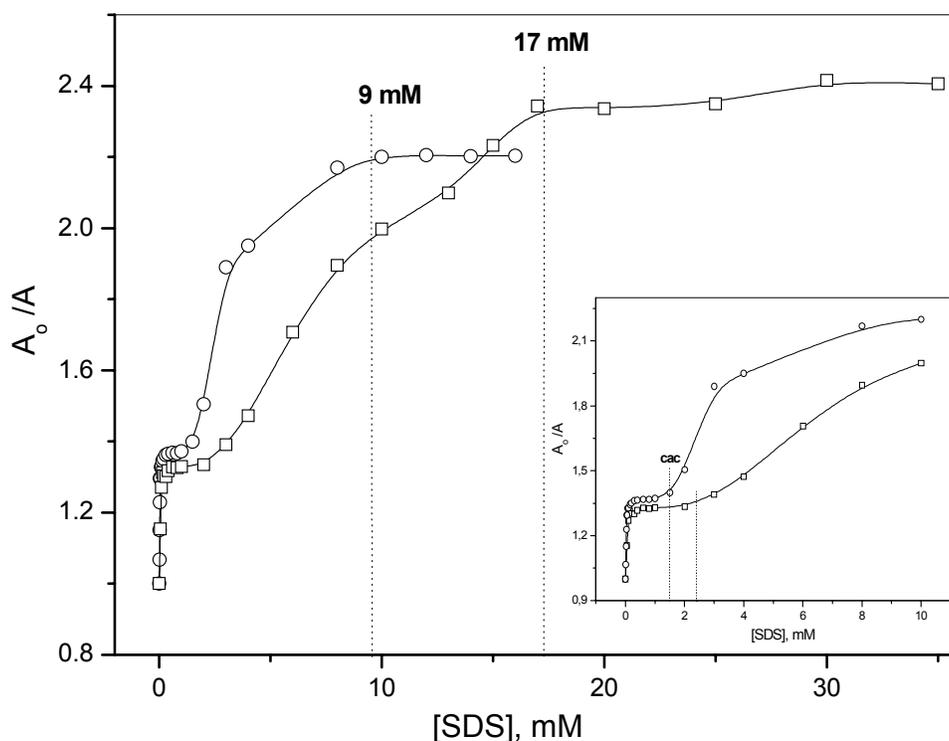


Figura 34: Efeito da [SDS] sobre a razão A_0/A em uma solução de (○) 0,1% e (□) 0,25% de BSA. O anexo amplia a região de baixas concentrações de SDS.

Enfatiza-se que estes resultados não contradizem aqueles obtidos por SAXS [20], onde em 1% BSA, os perfis de intensidade de espalhamento de raios-X mostram que, acima

de 5 mM de SDS, o pico micelar progressivamente aumenta de intensidade, indicando um aumento na dimensão da partícula dispersa acompanhada de modificação na estrutura terciária da proteína [5,23,52].

Diferentemente do comportamento da *cac*, em função da concentração, para os casos com polímeros neutros, já amplamente descritos na literatura [1,3,11,15,18,37], os perfis da Figura 34 indicam que a *cac* depende da concentração de proteína (veja também o anexo da Figura 34). Assim, podem ser relacionados os valores de *cac* sendo $\approx 1,5$ e $\approx 2,4$ mM em presença de 0,1 e 0,25% de BSA, respectivamente.

Técnicas utilizando sondas fluorescentes como o pireno, vem sendo bastante usadas para monitorar processos de auto-associação de surfactantes e com a possibilidade determinar parâmetros como *cmc* [26,58,59] e *cac* [26,60] quando em presença de proteína. O pireno, como uma sonda “*externa*” (não faz parte da estrutura da proteína), pode distribuir-se em diferentes microambientes, preferencialmente nos apolares, porque é uma molécula muito pouco solúvel em água. A técnica consiste em representar a razão I_1/I_3 *versus* $\text{Log}[\text{SDS}]$. Sendo assim, a Figura 35 representa um exemplo aplicado a uma mistura contendo proteína.

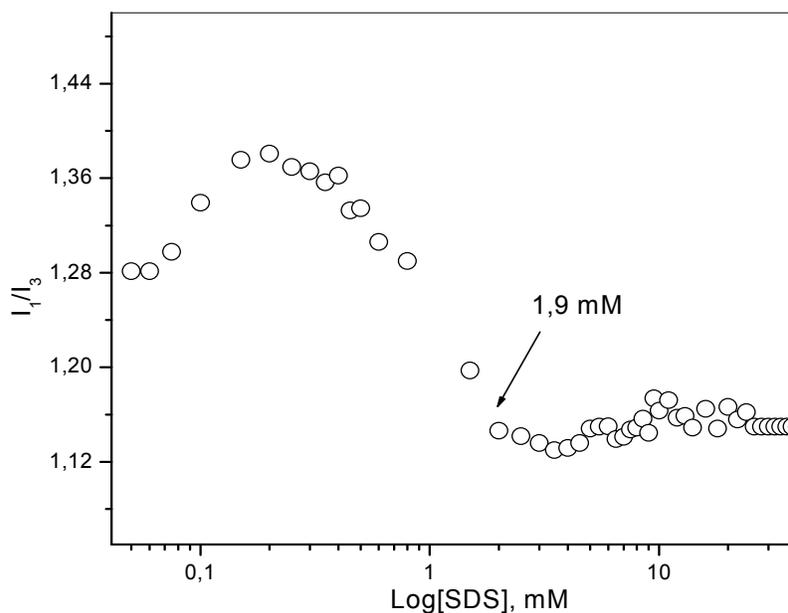


Figura35: Dependência da razão I_1/I_3 dos espectros de fluorescência do pireno com a $[\text{SDS}]$ em presença de 0,1% de BSA, em 20mM de tampão Tris/HCl, pH 7,5.

Para concentrações de SDS muito baixas, o perfil da Figura 35 indica que o pireno se localiza no interior da proteína, considerando que o valor da razão I_1/I_3 relatado para solução aquosa é de $\approx 1,84$ [49] e o valor encontrado somente na presença da proteína, ou seja, na ausência de SDS, é $\approx 1,28$ [49]. Com a adição de SDS à solução, o pireno indica um ambiente mais apolar, diminuindo a razão **1,14**, típico valor encontrado em micelas de SDS [38, 49]. No perfil de I_1/I_3 em função da concentração de surfactante, a *cac* é atribuída à concentração de surfactante onde ocorre a inflexão em **1,9 mM** de SDS. Nas condições do experimento, a *cac* ocorre numa concentração de SDS muito próxima dos valores obtidos por condutividade elétrica (**1,4 mM**) e por supressão da fluorescência do triptofano da BSA (**1,5 mM**).

2.4. Efeito da concentração de SDoD sobre a fluorescência da BSA

Quando SDoD é adicionado à solução contendo 0,1% BSA, observa-se resultados bastante semelhantes aos observados anteriormente para o sistema BSA-SDS, desde o efeito de supressão da intensidade da fluorescência, até o de deslocamento da banda de emissão para comprimentos de onda menores (Figura 36). O anexo mostra variação da banda de emissão em diferentes concentrações de SDoD.

Observa-se que o perfil de A_0/A em função [SDoD] descreve uma isoterma com as mesmas características daquelas apresentadas anteriormente na figura 35, quando SDS foi o surfactante utilizado. No entanto, é interessante observar que o SDoD demonstra ser um agente supressor cerca de três vezes mais eficiente que o SDS (compare o anexo da Figura 36 com a Figura 32).

Embora SDS e SDoD tenham valores diferentes de *cmc* e *cac*, considerando o aumento drástico observado na supressão em baixas concentrações de surfactante para o SDoD, o primeiro patamar inicia em $\approx 0,07$ mM, no mesmo intervalo onde ocorre no perfil com SDS (Figura 36).

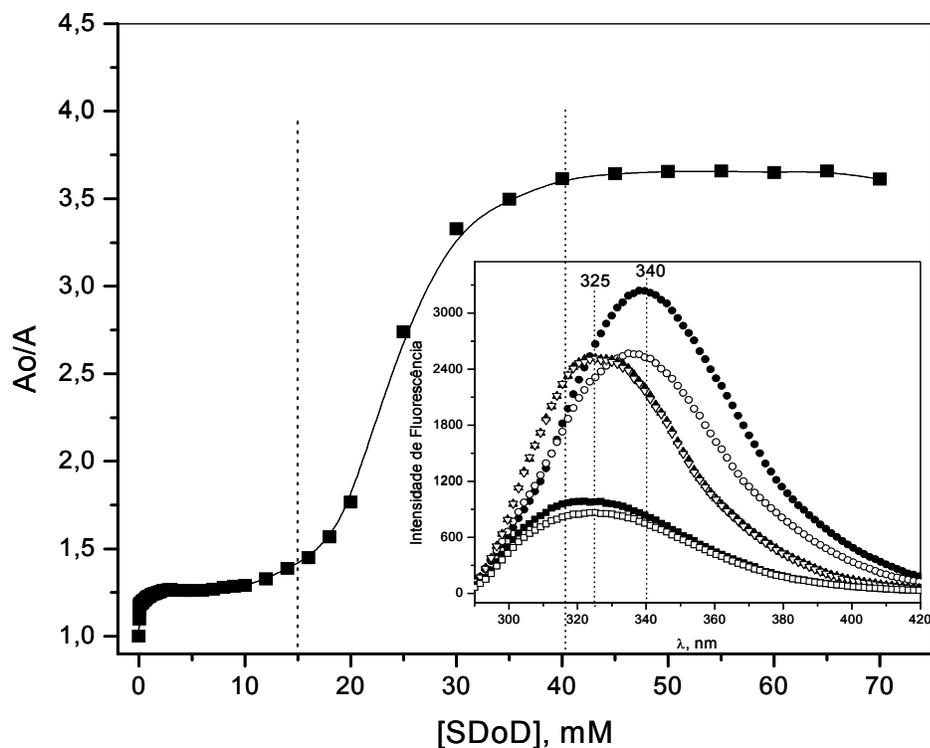


Figura 36: Efeito da [SDoD] sobre a razão A_0/A em uma solução contendo 0,1% de BSA. O anexo apresenta bandas de emissão de fluorescência (●) na ausência e nas [SDoD]: (○) 0,5; (▲) 1,5; (△) 2,0; (■) 4,0 e (□) 10 mM.

Conclui-se, então, que o processo de ligação específica, para ambos surfactantes, pouco depende das ações individuais no processo de associação cooperativa. Observa-se ainda que a *cac*, prevista no perfil da Figura 36, ocorre em ≈ 15 mM de SDoD, enquanto para o SDS ocorre em ≈ 2 mM (Figura 32). Neste caso, o segundo platô e, portanto, o efeito de supressão, cessa em ≈ 40 mM de SDoD.

2.5. Supressão da fluorescência da BSA em misturas contendo SDS e NaC

Sabe-se que a associação entre sais bilares em solução aquosa é pouco cooperativa e, em presença de polímero, este fenômeno é ainda mais irrelevante [38,57]. Recentemente, medidas de condutividade elétrica e de fluorescência desenvolvidas por Zanette e col. [38] em misturas de PEO e NaC, eles demonstraram que o colato de sódio não exibe nenhuma tendência para ligar-se cooperativamente com o polímero. No entanto,

eles observaram que o processo de associação do colato ao polímero pode ser induzido com a adição de um segundo surfactante aniônico como o SDS. Neste caso, propuseram a formação de complexos mistos dos surfactantes com polímero neutro, PEO-SDS-NaC, que ocorria somente em altas frações de SDS, acima de **0,7**.

Utilizando a mesma técnica de representação do efeito de concentração sobre a supressão de fluorescência da BSA acima proposta, a Figura 37 mostra diferentes perfis de A_0/A em função da [surfactante] para NaC e para duas frações molares, uma rica em SDS e uma segunda em NaC. Para efeitos comparativos, foi repetido o perfil do SDS da Figura 37. Na Figura 37, as linhas pontilhadas destacam a saturação da proteína em SDS e na fração molar de 0,6, ocorrendo em **10** e **18 mM**, respectivamente. O anexo da Figura 37 mostra detalhes dos perfis em baixas concentrações dos surfactantes e misturas.

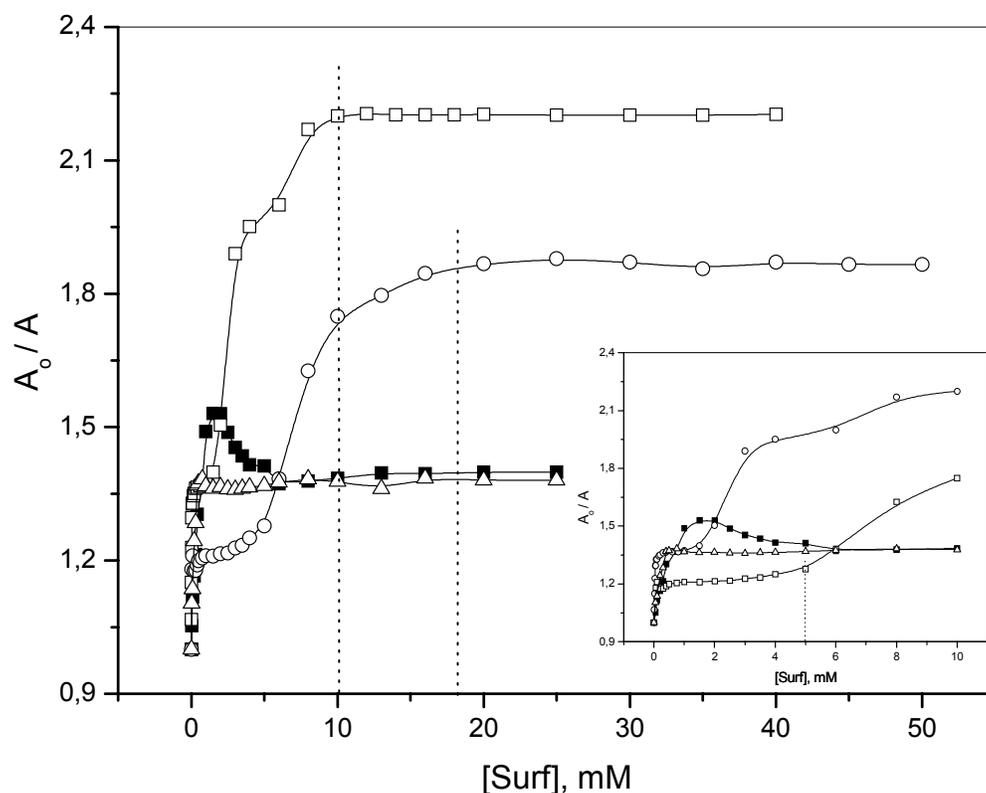


Figura 37: Variação de A_0/A versus [surfactante]: (■) NaC; (□) SDS; (○) fração molar 0,6 de SDS; (△) fração molar 0,4 de SDS. O anexo destaca o perfil em baixas [surfactantes].

A partir da Figura 37 as seguintes observações são relevantes:

- (i) O primeiro ponto a destacar é a significativa diferença do perfil do NaC comparativamente com o do SDS, ou com o SDoD (Figura 36). Sem dúvida, as características que evidenciam um processo de associação, por um mecanismo de ligação cooperativa, para o caso com o colato de sódio, estão completamente ausentes. A supressão que o colato exerce sobre a fluorescência está restrita, apenas para baixas concentrações. Desta forma, associando à discussão já desenvolvida acima, conclui-se aqui que, o processo de ligação do colato à proteína, está restrito somente a ligação tipicamente específica.
- (ii) O NaC suprime a fluorescência até no máximo em **1,5 mM de NaC** e, acima, o perfil indica um “extenso” patamar de saturação. Este resultado é extremamente relevante porque podemos concluir que, na região do platô, todo fenômeno de auto-associação do colato de sódio deve ocorrer na região “*externa*” da proteína. De fato, o perfil mostra que em **10 mM**, onde está prevista a *cmc* do NaC, nenhuma alteração da intensidade de fluorescência é observada e a banda em **324 nm** (Figura 38), diferentemente do que ocorre para o SDS que desloca-se para **317 nm** (Figura 33), é invariável, mesmo em altas concentrações de NaC.
- (iii) Embora na Figura 37 não estão apresentados os perfis intermediários, somente na fração 0,6 de SDS é de que o perfil da mistura recupera as características daquele do SDS quando puro. Caso a premissa acima desenvolvida esteja correta, esta fração define o limite máximo de NaC na mistura para que o sistema desenvolva um processo de associação cooperativa e forme na proteína agregados mistos de SDS e NaC.

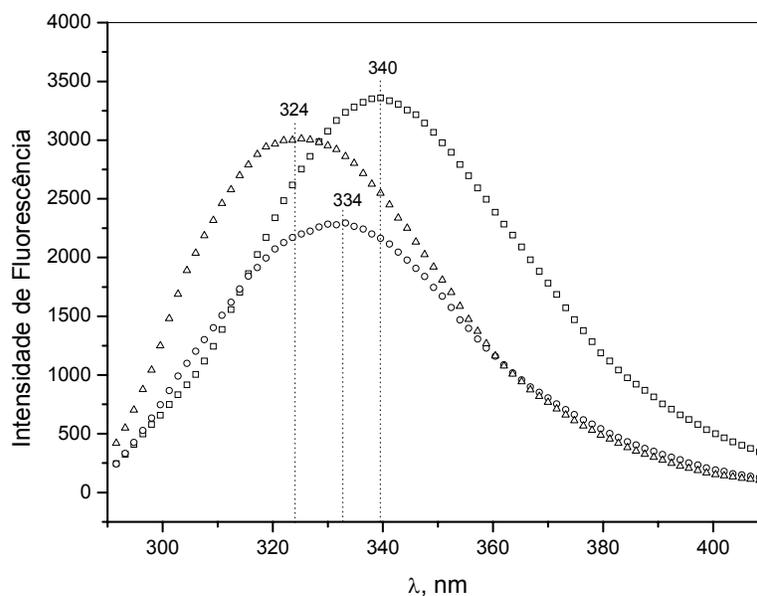


Figura 38: Espectros de emissão de fluorescência do NaC, em presença de 0,1 % de BSA, na ausência de NaC (\square), em 1,5 (O) e em 10 mM de NaC (\triangle).

A conclusão apresentada no item (iii), é aqui ratificada através de uma experiência adicional de fluorescência utilizando a técnica de adição do pireno ao sistema, como já foi apresentado acima na figura 35. Assim, a Figura 39 mostra um perfil I_1/I_3 versus o logaritmo da [NaC] referente à supressão do pireno.

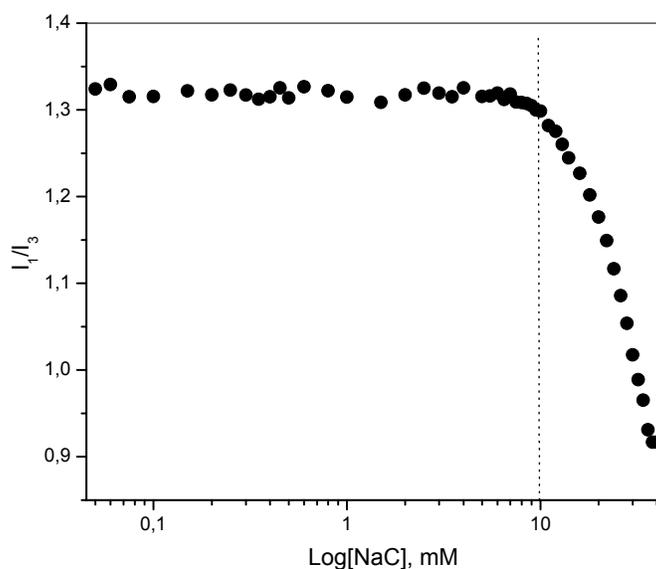


Figura 39: Dependência da razão I_1/I_3 nos espectros de fluorescência do pireno com a [NaC] em presença de 0,1% de BSA, em 20mM de tampão Tris/HCl, pH 7,5.

Sendo assim, a Figura 39 fornece-nos as seguintes informações:

Considerando que o valor de I_1/I_3 do pireno em água é $\approx 1,8$ [49], quando [NaC] está ausente, a razão I_1/I_3 encontrada é igual **1,33**, valor significativamente diferente do valor quando somente em água. Este fato é interpretado assumindo que o pireno, quando em presença de 0,1 % de BSA e, mesmo na ausência de surfactante, ele preferencialmente localiza-se em microambientes da estrutura natural da proteína mais apolar do que a água. Com a adição da NaC, a razão de $\approx 1,33$ permanece constante até próximo da *cmc* do colato de sódio que, quando em $\approx 10 \text{ mM}$ (*cmc* encontrada por tensão superficial, Figura 20), a razão diminui fortemente para valores abaixo de **0,9**. Já tem sido documentado na literatura que, em solução contendo micelas secundárias de colato de sódio, o pireno exhibe valores de I_1/I_3 próximos de **0,8** [37,38,49,50,59]. Com a formação de agregados micelares de NaC, o pireno distribui-se na fase micelar e progressivamente “sente” um ambiente micelar mais apolar. Estes resultados são consistentes com o modelo onde, com a adição de NaC, o pireno dissolvido em sítios mais hidrofóbicos da proteína, não “sente” a presença de monômeros de colato de sódio até a ocorrência da *cmc*, isto é, efetivamente, combinando os resultados de supressão da fluorescência da proteína com os do pireno é mais uma evidência de que o processo de auto-associação do colato de sódio ocorre em meios externos à proteína.

Observa-se ainda que o valor de I_1/I_3 em micelas de SDS é próximo de **1,20** [49]. Assim, as expressivas diferenças dos valores de I_1/I_3 nas micelas de SDS e NaC serão usadas aqui (veja mais abaixo) como ferramenta para acompanhar mudanças na composição da mistura SDS-NaC, isto é, a razão deverá variar progressivamente a medida que micelas mistas tornam-se mais ricas em um dos componentes.

O efeito da composição da mistura de SDS-NaC em presença de BSA é melhor interpretado medindo a supressão da fluorescência da BSA em função da variação da fração molar da mistura de surfactantes. Nesta metodologia, foram fixadas duas concentrações da mistura, uma em **5 mM**, próxima a *cac*, e uma segunda em **15 mM**, já em regiões de saturação nos perfis apresentados na Figura 25.

A Figura 40 apresenta os perfis obtidos, A_0/A vs fração molar de SDS, em presença de 0,1% de BSA.

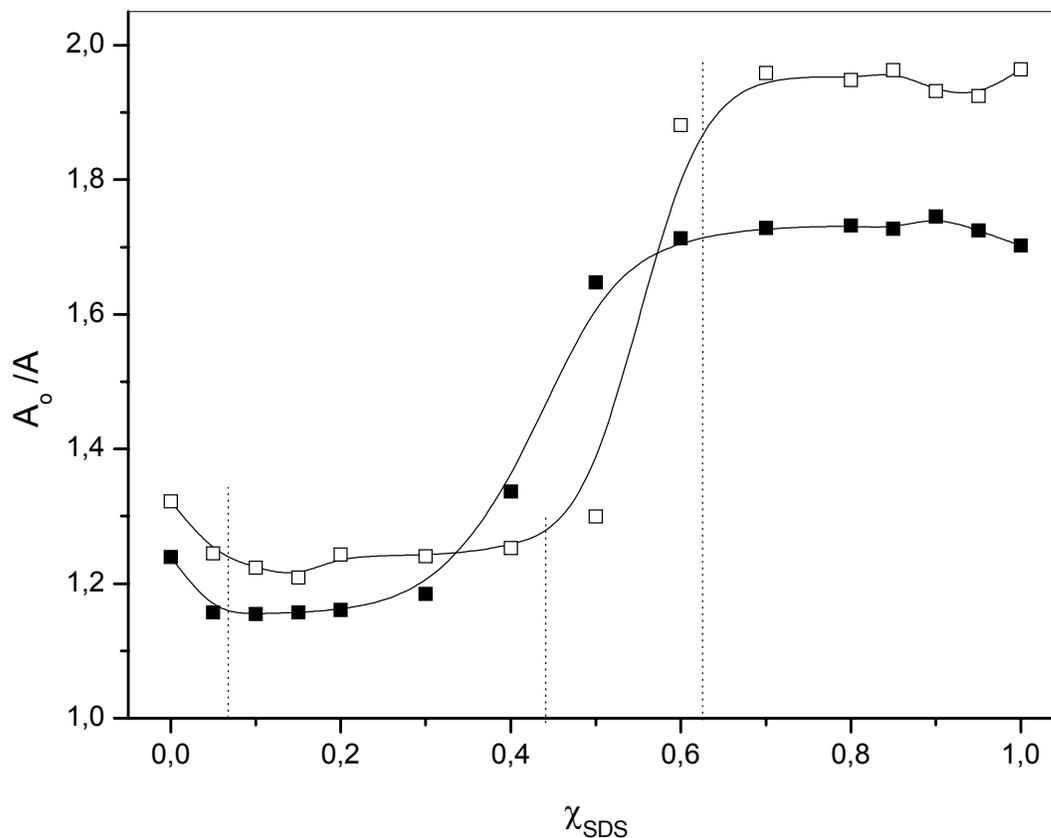


Figura 40: Variação da relação A_0/A em função da da fração molar de SDS em concentração total de surfactante fixa em (■) 5 e (□) 15 mM.

Uma análise dos perfis da Figura 38 indica quatro regiões distintas:

i) A primeira ocorre em altas frações de NaC, de **1 a 0,9**. Observa-se que a adição de somente uma pequena quantidade de SDS à solução contendo NaC é suficiente para provocar aumento da emissão de fluorescência, cerca de 25%. Esta tendência de aumento, provavelmente, tem relação com o fato de que o SDS exibe um efeito mais pronunciado no processo de ligação com a proteína [5,38]. Uma possível interpretação seria a de que, como o aumento da intensidade de fluorescência ocorre somente acima da *cac*, o SDS adicionado à solução liga-se a proteína, forçando a formação de um complexo misto entre BSA-SDS-NaC. Com isto, o ambiente dos triptofanos tornam-se mais hidrofóbicos.

ii) No intervalo de χ_{NaC} entre **0,9 e 0,6**, a razão A_0/A praticamente é invariável. Nesta segunda região, embora a composição da mistura varie, o resultado é base para

acreditar na premissa onde toda mudança de propriedade observada nestas condições, está ocorrendo na região externa da proteína.

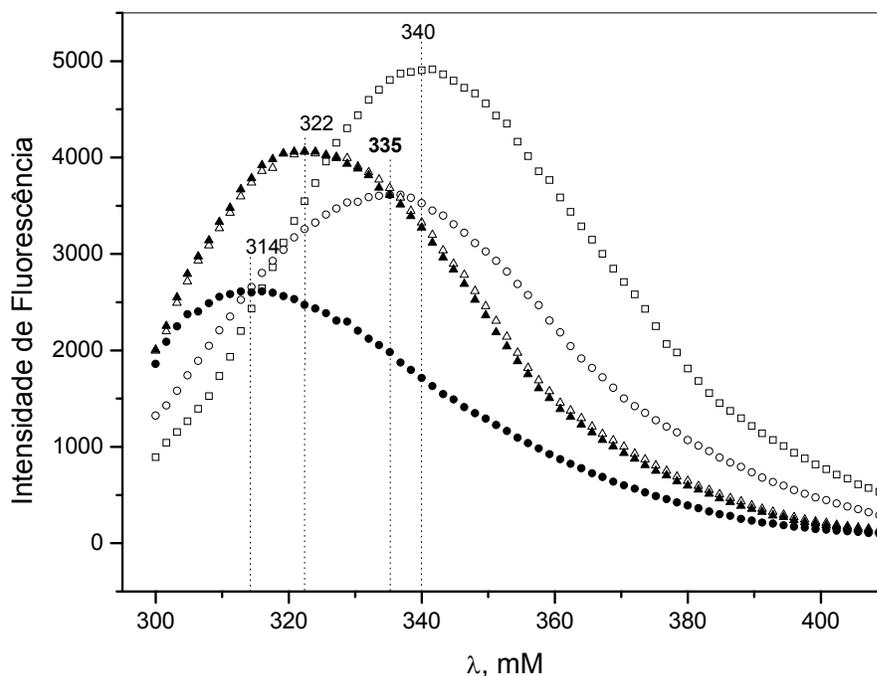


Figura 41: Espectros de emissão de fluorescência em presença de 0,1 % de BSA, com fração molar de 0,5 de NaC: (○) em ausência; e em presença de (■) 0,075, (△) 1,5 e (●) 14 mM de surfactante.

iii) Com a adição de mais SDS, a razão A_0/A rapidamente aumenta até $\chi_{\text{SDS}} \approx 0,6$ e, acima deste valor, o sistema praticamente ignora as mudanças da composição de surfactante. Nesta composição e em altas [surfactante], a banda de emissão de fluorescência desloca-se para 311 nm (veja Figuras 41) que é o mesmo deslocamento já observado e comentado, quando em altas [SDS] (veja Figura 35), fato que sugere, nesta terceira região, o desenvolvimento de complexos mistos de BSA-SDS-NaC.

iv) Finalmente, com a adição de mais SDS à mistura, $\chi_{\text{SDS}} \geq 0,4$, é observado um patamar no perfil indicando que, a partir desta fração molar nenhuma variação da emissão de fluorescência pode ser observada com a variação da mistura de surfactante. Este fato indica que, acima desta fração molar, está ocorrendo processo de ligação cooperativa entre a BSA e a mistura de surfactantes, visto que todo o surfactante adicionado está se ligando à cadeia proteica, nos mesmo ambientes quando somente SDS é adicionado à BSA.

Quando SDoD foi adicionado à solução contendo NaC e BSA, observou-se resultados bastante semelhantes aos relatados para a mistura BSA-SDS-NaC, desde o efeito de supressão de fluorescência, até o de deslocamento da banda de emissão. A Figura 42 mostra diferentes perfis de A_0/A versus [surfactante] para SDoD, NaC e para três frações molares, uma rica em SDoD, a segunda em NaC e uma terceira intermediária. Para efeitos comparativos, foi repetido o perfil do SDoD da Figura 35.

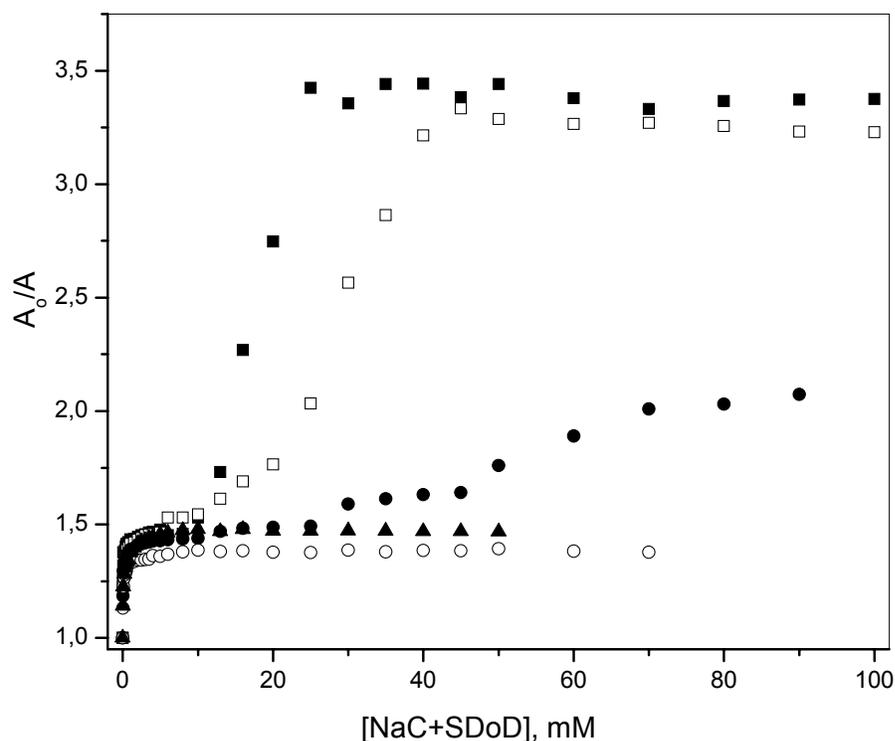


Figura 42: Variação de A_0/A versus [surf.]: (■) SDoD; (○) NaC; fração molar com 0,2 de NaC (□); fração molar 0,3 de NaC (●); fração molar com 0,5 de NaC (▲).

Observa-se que o perfil com fração molar $\chi_{\text{NaC}} = 0,3$ apresenta as mesmas características do SDoD puro, enquanto a fração $\chi_{\text{SDoD}} = 0,5$ apresenta características intermediárias entre os perfis. As observações e conclusões relevantes da Figura acima são idênticas às apresentadas na Figura 42 quando estuda a mistura BSA-SDS-NaC e não cabe aqui repetir toda a discussão.

2.6. Medidas de condutividade elétrica

Enfatizamos que os resultados de fluorescência apresentados, são medidas físico-químicas avaliadas sobre a molécula de proteína e os processos que ocorrem externamente, isto é, na solução, só podem ser analisados indiretamente. Em contrapartida, neste trabalho, a técnica de condutividade elétrica tem sido importante porque ela fornece informações de propriedades da solução. Esta metodologia é bastante aplicada para surfactantes iônicos para identificar as condições experimentais onde ocorre uma *cmc* e/ou *cac* [2,6,16,18,49] e, particularmente neste nosso caso, complexos proteína-surfactante.

Os perfis de condutividade elétrica para soluções contendo 0,1% de BSA, em presença de SDS e NaC, já foram apresentados e discutidos no item 2.2.

A Figura 43 apresenta o perfil de condutividade elétrica para solução de BSA 0,1%, com a mistura dos surfactantes SDS e NaC, sendo $\chi_{\text{SDS}} = 0,75$, correspondente a região de mínimo da razão A_0/A em função da fração molar de surfactante, apresentada na Figura 40.

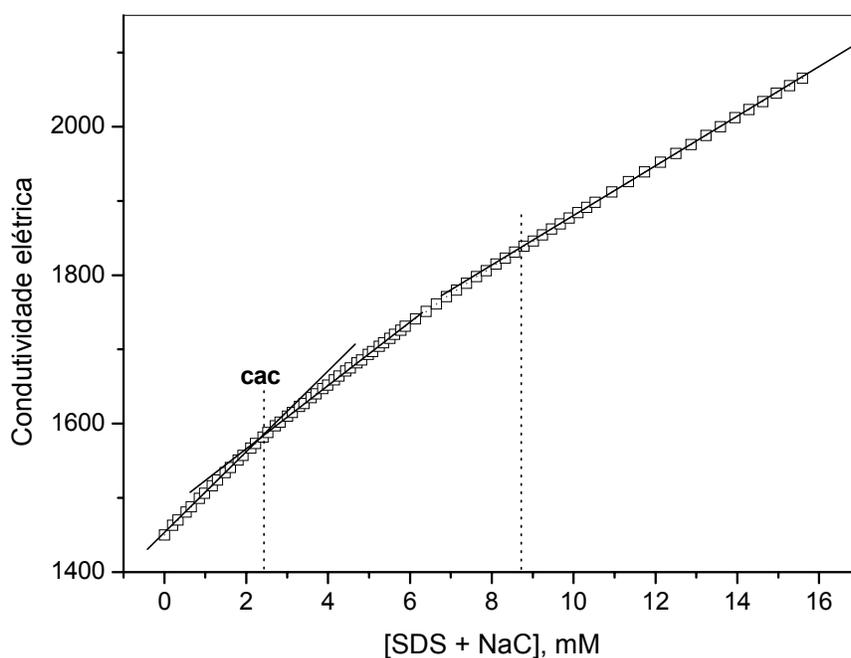


Figura 43: Condutividade elétrica (em $\mu\text{S cm}^{-1}$) em presença de BSA 0,1%, em 20 mM de tampão Tris/HCl (pH 7,50) para a fração molar com 0,75 de SDS.

São observadas neste perfil duas inflexões, sendo a primeira atribuída a *cac* em **2,4 mM**, e a segunda ao *psp*, em **8,7 mM**. Lembramos que, a presença de duas inflexões no perfil de condutividade elétrica, é evidência do desenvolvimento de processo de ligação cooperativa entre a proteína e surfactantes [16,18,38].

A Figura 44 mostra o perfil de condutividade elétrica em presença de BSA 0,1% para $\chi_{\text{SDS}} = 0,25$. Nesta composição dos surfactantes, em $\approx 5,0 \text{ mM}$ o perfil apresenta apenas uma inflexão, típica de *cmc*.

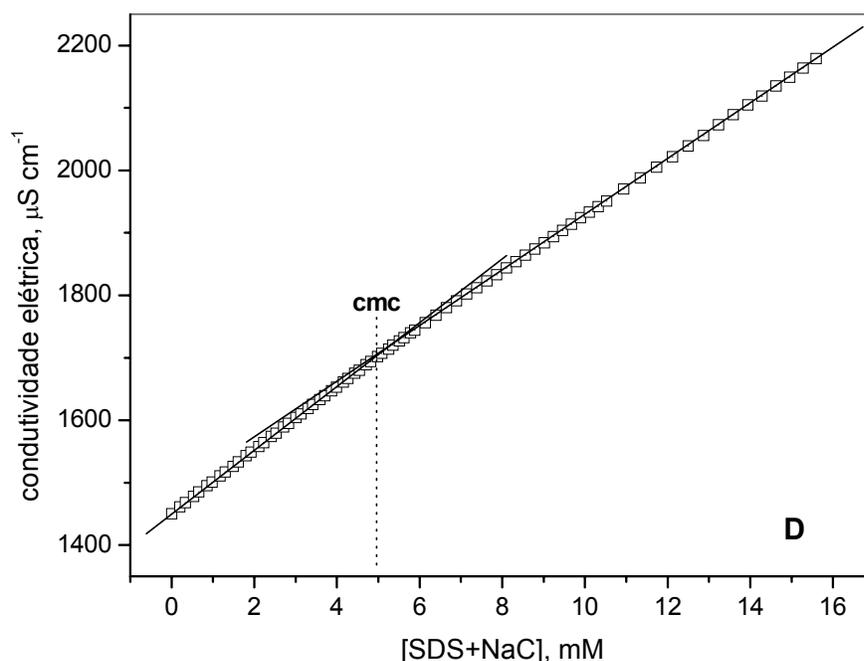


Figura 44: Condutividade elétrica (em $\mu\text{S cm}^{-1}$) em presença de BSA 0,1% *versus* [surfactante], para a fração molar de 0,25 de SDS.

Combinando o resultado apresentado pelo perfil da Figura 42 com os obtidos por fluorescência estacionária (como discutido anteriormente na Figura 38, onde foi excluído qualquer efeito sobre a molécula fluorescente da proteína pelos surfactantes ligados), no intervalo de fração molar compreendido entre **0,9 - 0,6 de NaC**, pode-se concluir que os agregados mistos são bastante relacionados com micelas mistas livres, ou seja, não estão ligando-se cooperativamente com a cadeia protéica.

Os valores das inclinações das regiões lineares dos perfis de condutividade abaixo (S_1) e acima (S_3) da *cac*, estão apresentados na tabela 04, em $\Omega^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$. Desde que a grandeza das inclinações das regiões lineares represente a condutividade equivalente das espécies iônicas em solução, S_1 pode ser definido como sendo a contribuição das espécies iônicas em solução, isto é, Na^+ , DS^- e o tampão. Para o SDS, por exemplo, o S_1 pode ser representado pela soma das duas condutividades equivalentes limite do ânion e do cátion, isto é,

$$S_1 = \lambda_{\text{DS}^-}^o + \lambda_{\text{Na}^+}^o \quad (\text{equação 04})$$

Acima da *cac*, a interpretação é mais complexa, pois se deve considerar a contribuição dos contra-íons dissociados e a contribuição da micela. Sendo assim, a partir das regiões lineares, os valores das inclinações foram obtidos em $\Omega^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$, estão listados na tabela 04, representando a condutividade equivalente das espécies iônicas em solução.

Tabela 04: Valores das inclinações e inflexões obtidos a partir dos gráficos de condutividade elétrica em unidades $\Omega^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$, das regiões lineares abaixo da primeira (S_1), entre a primeira e segunda (S_2) e acima da terceira (S_3) inflexão.

χ_{SDS}	S_1	S_2	S_3	1 ^a inflexão, (mM)	2 ^a inflexão, (mM)
1,0	58,1	42,5	29,36	$1,6 \pm 0,1$	$9,5 \pm 0,2$
0,75	56,0	51,2	61,5	$2,4 \pm 0,1$	$8,7 \pm 0,2$
0,5 ^a	52,0		35,0	$4,3 \pm 0,1$	
0,5	51,0		38,0	$3,5 \pm 0,1$	$5,8 \pm 0,2$
0,25	50,6		45,0	$5,0 \pm 0,1$	
0,0	48,6				

(a) Parametros obtidos em ausência de BSA.

A partir dos parâmetros obtidos por condutividade elétrica apresentados na tabela 04, torna-se clara a formação de agregados mistos, observada as mudanças ocorridas nos valores das inflexões e nos valores de S_3 . É evidente que é suficiente a adição de uma pequena quantidade de NaC para desestabilizar o complexo misto BSA-SDS-NaC, causando um pequeno aumento na *cac* (1,6 para 2,4 mM em $\chi_{\text{SDS}} = 1,0$ e $\chi_{\text{SDS}} = 0,75$, respectivamente) e, ainda, uma pequena diminuição no *psp* (9,5 para 8,7 mM, respectivamente). Conseqüentemente, com o aumento da *cac* e a diminuição do *psp*, ocorre a diminuição do intervalo onde os surfactantes estão ligando-se à BSA, isto é, diminui a região observada entre a primeira e a segunda inflexão. Este efeito está de acordo com os resultados já encontrados para as misturas de PEO e estes mesmos surfactantes [38,39].

Por fim, a Figura 45 apresenta os perfis de condutividade elétrica em presença e ausência de BSA 0,1%, para $\chi_{\text{SDS}} = 0,5$ (lembrando que, esta fração molar corresponde a região intermediária obtida na Figura 39).

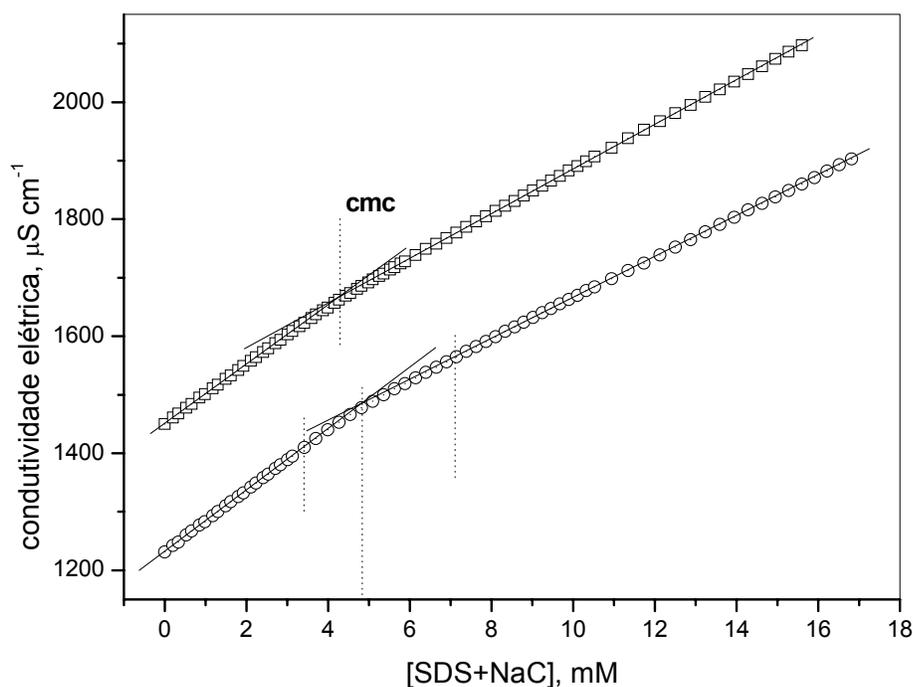


Figura 45: Condutividade elétrica (em $\mu\text{S cm}^{-1}$) em função da fração molar de 0,50 de SDS em presença de BSA 0,1% (○) e na ausência de proteína (□).

A partir da Figura 45, não fica claro se existe apenas uma inflexão típica da *cmc* (como a observada na Figuras 44, para $\chi_{\text{SDS}} = 0,25$) ou duas inflexões como as obtidas nos perfis das Figuras 30 e 43, para SDS e $\chi_{\text{SDS}} = 0,75$. Coincidentemente, quando em ausência de BSA, a *cmc* ocorre em $4,3 \pm 1$ mM, sendo bastante próximo do valor encontrado a partir da intercepção das linhas abaixo e acima da região de descontinuidade mostradas no perfil em presença de BSA 0,1%, de $\approx 4,8$ mM. Uma segunda coincidência que ocorre entre os perfis abaixo, é correspondente aos valores obtidos das inclinações das regiões lineares em presença e em ausência de BSA, sendo que S_1 obtido foi de 51,0 e 52,0, e S_2 foi 38,0 e 35,0, respectivamente.

A formação de agregados mistos de SDS-NaC pode ser explicada a partir da variação dos valores das inclinações dos perfis obtidos por condutividade elétrica (tabela 04). Sabe-se que a magnitude dos valores de S_3 obtidos pelos perfis de condutividade elétrica em função da concentração de surfactante em presença de polímero, é geralmente relatado como o desenvolvimento de micelas livres [1,5,29,38,49]. Na tabela 04 pode-se observar que, com o aumento da fração molar de NaC, S_3 aumenta proporcionalmente aproximando-se dos valores obtidos para o NaC puro, $S_1 = 48,6 \Omega^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$, não apresentando nenhuma inflexão, mesmo em presença de proteína. De fato, a tabela 04 apresenta $S_3 = 29,3$ e $45 \Omega^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ para $\chi_{\text{SDS}} = 1$ e $0,25$, respectivamente, e para o colato de sódio puro $S_3 = 48 \Omega^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$. Estes resultados concordam com a conclusão de que, com o aumento da fração molar de NaC, os agregados micelares começam a se tornar mais ionizados, aproximando-se das características dos agregados tipicamente de NaC.

2.7. Fluorescência estacionária do pireno, em misturas de BSA-SDS-NaC

Medidas de fluorescência estacionária utilizando o *pireno* como sonda fluorescente, foram realizadas com o intuito de observar o efeito da concentração da BSA sobre a variação de polaridade dos microambientes onde a sonda se localiza. Desta forma, a Figura 46 apresenta a variação da razão I_1/I_3 em função da concentração de BSA, em diferentes concentrações de NaC. Quando em baixas concentrações de NaC, as razões I_1/I_3 aumentam com a concentração de BSA, indicando que, com a adição de NaC, a sonda “sente” um

ambiente mais polar daquele quando na ausência. Quando se aumenta a concentração do NaC, os valores da razão I_1/I_3 tornam-se insensíveis ao efeito da concentração de BSA, em concentrações de surfactante superior à *cac* (**10 mM** por tensão superficial). Este efeito indica que a sonda percebe invariavelmente a mesma polaridade, independentemente da concentração de surfactante. Este comportamento é diferente daqueles resultados observados na supressão da fluorescência da proteína.

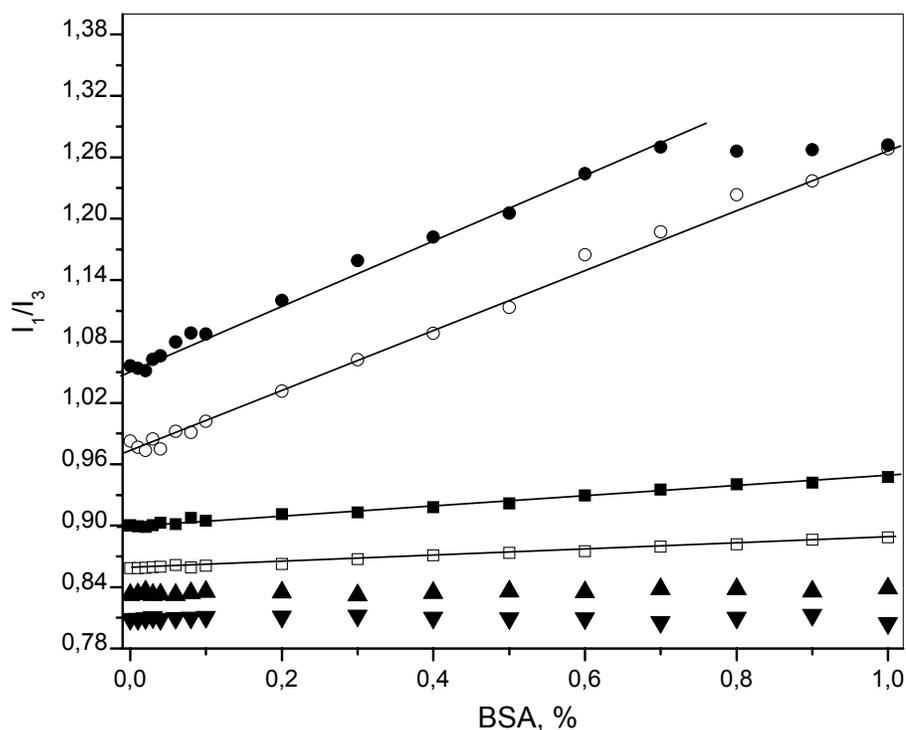


Figura 46: Variação de I_1/I_3 dos espectros de fluorescência do pireno em função da concentração de BSA, nas diferentes concentrações de NaC: 10 mM (●); 15 mM (○); 30 mM (■); 40 mM (□); 60 mM (▲); 100 mM (▼).

A partir dos resultados da Figura 46, em baixas concentrações de NaC, conclui-se que o pireno distribui-se entre a proteína e os pequenos agregados de NaC na solução. Conforme a concentração de NaC é aumentada, os agregados crescem e tornam-se menos hidrofílicos, deslocando assim o equilíbrio para o seu interior. Observe que, em altas

concentrações do sal biliar, a razão I_1/I_3 tende a valores idênticos àqueles para hidrocarbonetos descritos na literatura especializada [9,26,49]. Estes resultados são muito semelhantes aos encontrados por Ueno e colaboradores [38,48], que concluíram que a molécula de pireno localiza-se “*prensada*” entre as faces apolares de duas moléculas de colato de sódio.

A Figura 47 apresenta a variação da razão de I_1/I_3 em função da fração molar de NaC, em várias concentrações fixas de surfactante em presença de BSA 0,1%.

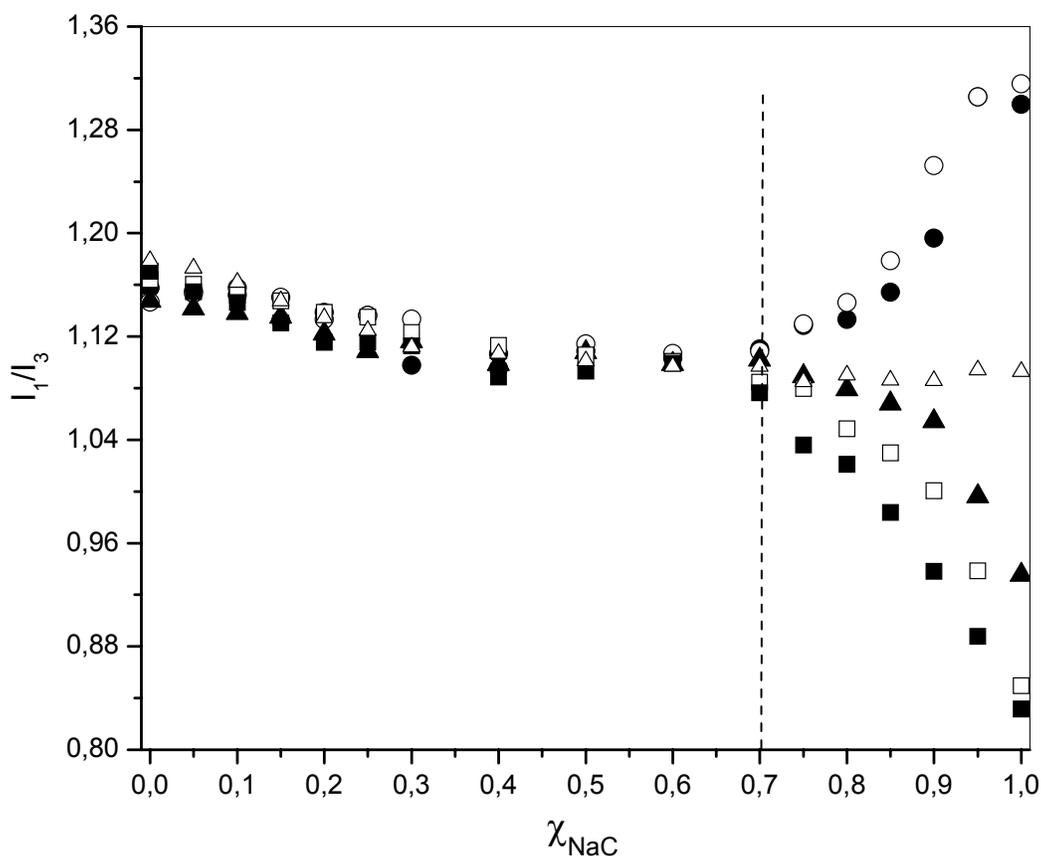


Figura 47: Variação da razão I_1/I_3 em função da fração molar de NaC, em presença de BSA 0,1% , nas diferentes concentrações de surfactante: 10 mM (○); 15 mM (●); 20 mM (△); 30 mM (▲); 40 mM (□); e 60 mM (■).

A Figura 47 apresenta três regiões distintas sendo:

- i) Nas frações molares ricas em SDS, a razão I_1/I_3 é consistente com a solubilização dos monômeros de NaC entre os agregados de SDS. Observe que $\chi_{\text{SDS}} = 1$, o valor da razão I_1/I_3 é $\approx 1,18$, semelhante ao relatado para micelas de SDS (Figura 35) [38,61]. Os valores de I_1/I_3 em presença de BSA podem ser explicados com base nos sítios da BSA onde a sonda está solubilizada. Como os agregados micelares ligados a proteína usualmente são menores que as micelas regulares livres em solução [38,20], os valores apresentados para a razão de I_1/I_3 em presença de proteína, sugerem que o pireno está mais exposto à solução aquosa que quando comparado com a presença de somente micelas regulares [38,60], ou seja, em presença de proteína ele se encontra em um ambiente mais polar quando comparado com o das micelas regulares.
- ii) Na segunda região intermediária, a razão I_1/I_3 mostra uma pequena variação com a fração molar de NaC. Estes resultados concordam com formação de micelas mistas, que variam de acordo com composição de surfactante, embora sejam cada vez sejam mais ricos em NaC e se encontram em equilíbrio com a proteína em solução.
- iii) Os resultados mais interessantes, todavia, são referentes aos diferentes perfis encontrados para $\chi_{\text{NaC}} > 07$, onde a razão I_1/I_3 é bastante sensível à concentração total de surfactante. Observe que, para as mesmas concentrações de surfactante, isto é, **10 e 15 mM**, a razão I_1/I_3 aumenta com o aumento da fração molar de NaC à mistura. Mas esta razão I_1/I_3 diminui para as concentrações de **30, 40 e 60 mM** de surfactantes, também com o incremento de NaC à mistura. Estes comportamentos opostos de acordo com a concentração de surfactante, podem ser relacionados com a polidispersibilidade da solução, que contém agregados micelares ricos em NaC, isto é, micelas primárias e secundárias. Conseqüentemente, pode-se esperar que os agregados de colato de sódio tenham múltiplos sítios de ligação com propriedades diferentes. As mudanças abruptas nos valores de I_1/I_3 que ocorrem entre 15 mM e 30 mM de surfactante, concordam com as conclusões de Bohne e colaboradores [38]. De fato, foi sugerido a ocorrência de somente micelas preliminares abaixo de 20 mM de NaC, visto que, acima desta concentração agregados secundários também começam a ser formados [38]. Pode-se concluir assim que, como nos resultados anteriores, quando a composição de surfactante fica rica em NaC, $\chi_{\text{NaC}} > 07$, micelas mistas ricas em NaC são formadas em solução e não se ligam cooperativamente com a BSA.

CAPÍTULO IV

Conclusão

Os surfactantes estudados, **SDS** e **os Sais Biliares**, ligam-se especificamente à cadeia proteica da BSA. O **SDS** é cerca de quatro vezes mais eficiente no processo de supressão de fluorescência quando comparado com os **Sais Biliares**.

- ✓ Em baixas concentrações de surfactante, onde ocorre o **processo de ligação específica** entre surfactantes e a BSA, foi observado que o SDS é mais eficiente, cerca de **quatro vezes**, do que os sais biliares, ou seja, a quantidade de NaC necessária para produzir a mesma razão de I_0/I que o SDS produz sobre os resíduos de triptofano são de 4 vezes.
- ✓ Quando é considerado o número de moléculas de surfactante ligados à proteína, pode ser observado que n_{NaC}/n_{SDS} **varia de quatro a seis vezes**. E ainda, quando considerado o número de moléculas de surfactante livres em solução, a diferença é de cerca de nove vezes para os sais biliares em relação ao SDS, indicando uma maior solubilidade dos sais biliares em meio aquoso.

Nas condições estudadas, os **sais biliares** não se ligam cooperativamente com a proteína. Por medidas de fluorescência estacionária e condutividade elétrica, os resultados levaram a conclusão geral de que, as micelas mistas ricas em sais biliares, apresentam **baixa capacidade de ligarem-se cooperativamente** à cadeia protéica.

- Quando apenas NaC está em solução, primeiramente há formação de **micelas primárias** que, com o aumento da concentração, crescem, formando micelas secundárias (veja figura 48A). Observa-se que os monômeros de NaC ligam-se especificamente à cadeia proteica, porém não é observado a existência de ligação cooperativa.
- Por medidas de Tensão Superficial para o sistema BSA-NaC, apenas uma inflexão foi observada, coincidente com inflexão da *cmc* do NaC, sendo este fato uma evidência de **ausência de ligação cooperativa** para este sistema.
- Através da técnica de condutividade elétrica, nenhuma mudança nas inclinações do perfil foi observada para o sistema BSA-NaC, sugerindo que as micelas de NaC não ligam contra-íons Na^+ e apresentam **grau de ionização micelar igual a um**, implicando em agregados micelares pequenos. E ainda, os resultados indicam que a BSA não liga cooperativamente com monômeros de NaC.
- Os resultados obtidos Fluorescência do triptofano da BSA quando NaC foi adicionado, apresentaram ausência das características que evidenciam um processo de associação cooperativa. Como o NaC supre a emissão somente até a **1,5 mM** (exibindo um platô em seguida), conclui-se que todo fenômeno de auto-associação ocorre na região externa à cadeia proteica. Estes resultados foram ainda concordantes com os obtidos por fluorescência do **pireno**, onde observou-se que a sonda distribui-se na fase micelar diminuindo a razão I_1/I_3 até a *cmc*, sendo mais uma evidência de que o processo de auto-associação do NaC ocorre em meios externos à BSA.
- Em baixas frações molares de SDS, $\chi_{\text{SDS}} \approx 0,1$, o modelo é consistente com aquele já descrito por Ueno e colaboradores [48] para misturas de NaC e surfactantes não-iônicos. Para o sistema BSA-SDS-NaC, nesta faixa de fração molar (de $\chi_{\text{NaC}} = 1,0$ até $\chi_{\text{NaC}} \approx 0,9$), os agregados de NaC são descritos por uma geometria que contém a estrutura rígida do anel esteroidal com os grupos

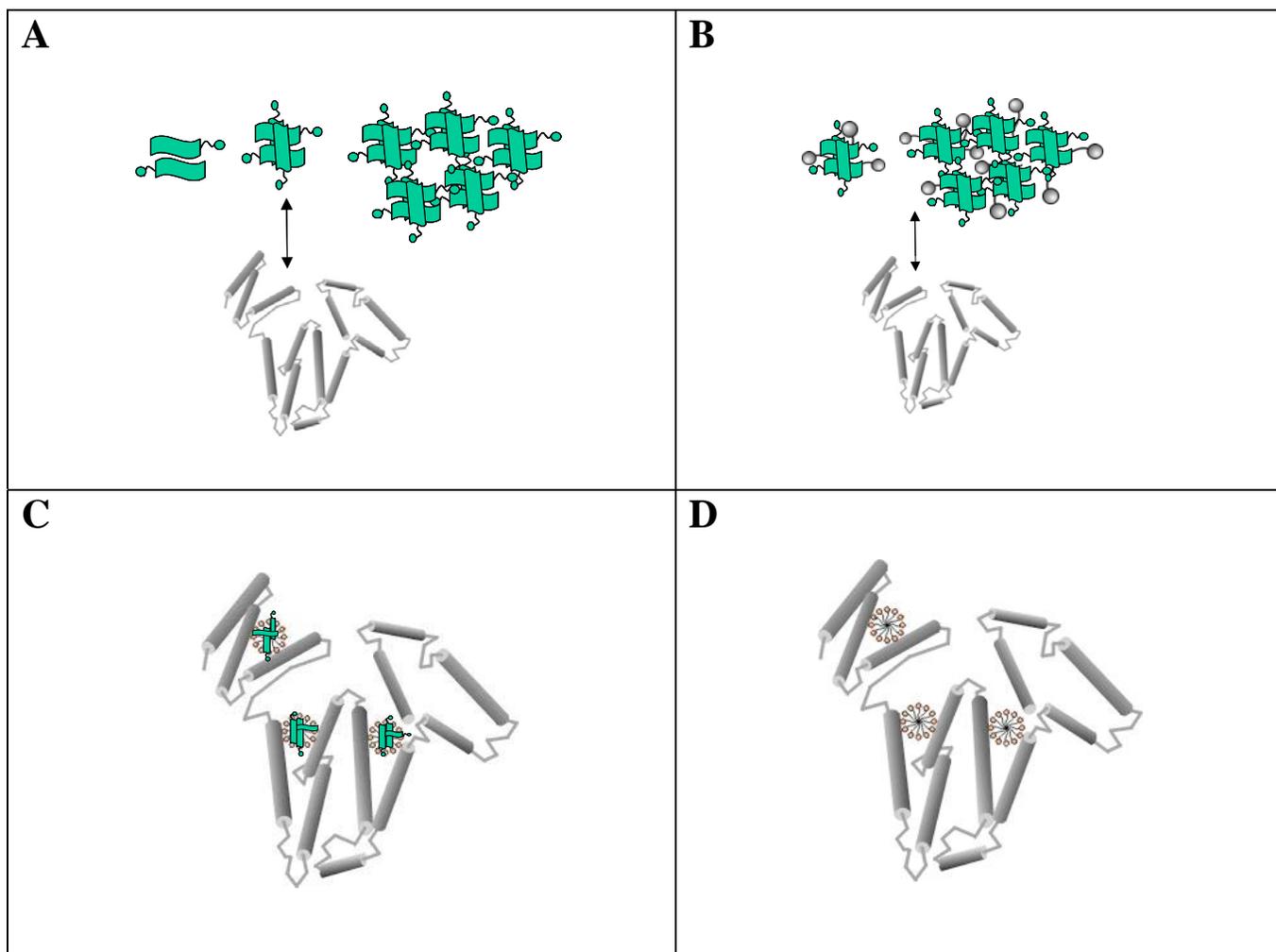
hidroxilas voltados à fase aquosa e as moléculas de pireno e os grupos alquilas do SDS incorporados dentro das micelas primárias típicas de NaC, sendo que a BSA se encontra livre em solução, ou seja, não há ligação cooperativa entre os surfactantes e a cadeia proteica (figura 47).

- Aumentando a fração molar de SDS, no intervalo de $\chi_{\text{SDS}} \approx 0,1 - 0,4$, sugere-se o desenvolvimento de típicas **micelas mistas**, definido por valores constantes de *cmc* e ausência de *cac* (Figura 42), excluindo a possibilidade da existência do complexo. Este fato é reforçado pela inexistência de variação na razão *Ao/A* observada na figura 37, que sugere que toda a mudança de propriedade observada nestas condições ocorre na região externa à proteína. E ainda, as razões I_1/I_3 não sofrem efeito da concentração da BSA em concentrações superior à *cac*, onde ainda tem-se somente micelas primárias de NaC em solução. Finalmente, neste intervalo de fração molar, I_1/I_3 permanece constante e independe da concentração de surfactante.
- Em baixas frações molares de NaC, $\chi_{\text{SDS}} \approx 0,6$, o complexo BSA-surfactante é rico em monômeros de SDS. As forças que orientam a existência de ligação cooperativa dos surfactantes com a BSA são amparadas pela existência de um agregado misto tipicamente de SDS. Acima $\chi_{\text{SDS}} \approx 0,6$, o processo cooperativo é descrito pelos perfis das curvas de condutividade mostrada na Figura 40. Este fato é demonstrado pelos resultados da Figura 37, pois de acordo com as condições experimentais presume-se que, nestas frações molares, estão sendo desenvolvidos complexos mistos de BSA-SDS-NaC. Ainda, nesta região os perfis de I_1/I_3 da Figura 44 indicam que o pireno é solubilizado em um agregado de maneira diferente daquele quando a proteína está ausente.

Por fim, quando mais SDS é adicionado à mistura, o complexo formado apresenta as mesmas características daquele quando somente SDS é adicionado à solução de BSA, com todas as características de um complexo BSA-surfactante aniônico, com nítidas *cac* e *psp*.

Finalmente, a figura 48 apresenta o modelo proposto para o sistema BSA-SDS-NaC, onde pode ser observado:

- (a) No quadro A, em ausência de SDS, está representado a formação de micelas primárias de NaC (como discutido na primeira parte da discussão) e o seu crescimento com o aumento da concentração; lembrando que não existe evidências de ligação cooperativa entre os sais biliares e a cadeia proteica nas condições estudadas.
- (b) Em B, em altas frações molares de NaC, está representado a formação de micelas mistas de NaC-SDS, ricas no sal biliar; lembrando que até $\chi_{\text{NaC}} = 0,6$ não há evidências da existência de ligação cooperativa entre as micelas formadas e a BSA.
- (c) A partir da $\chi_{\text{SDS}} \approx 0,6$, as micelas formadas são ricas em SDS, e evidências da ligação cooperativa entre os agregados mistos e a proteína já podem ser observadas. A formação de micelas livres ocorre somente após a saturação da cadeia proteica.
- (d) Representa a formação da ligação cooperativa entre o SDS e BSA. Novamente, a formação de micelas livres na solução só ocorre após a saturação da BSA pelo surfactante.



Monômeros de NaC



Proteína



Monômeros de SDS

Figura 48: O desenho ilustra o processo de agregação para a solução BSA-SDS-NaC, em diferentes frações molares de NaC-SDS, onde: **(a)** Somente NaC é adicionado a solução proteica; **(b)** em baixas χ_{SDS} , onde micelas mistas de SDS-NaC são formadas; **(c)** em χ_{SDS} acima de **0,6**, onde ocorre a formação de agregados entre a proteína e os surfactantes; **(d)** somente SDS é adicionado a solução de BSA.

Referências Bibliográficas

1. GODDARD, E.D., and ANANTHAPADMANABHAN, K.P., Interactions of surfactantes with Polymers and Proteins, CRC Press, Boca Raton, FL, 1993.
2. SHAW, D. J. Introdução à Química dos Colóides e de Superfícies; Tradução: Maar, J. H. São Paulo: Edgard Blücher,1975.
3. LIMA, F. Claudio. Investigação de complexos mistos Polímeros-surfactantes . Tese de Doutorado, UFSC, Florianópolis.
4. SANTOS, S. F. Interação entre o hialuronato e Surfactante Catiônico: Propriedades Catalíticas e Físico-Químicas. Dissertação de Mestrado em Química, UFSC, Florianópolis,1993.
5. SCHWEITZER, B., FELIPPE, A., DAL BÓ, A., MINATTI, E., ZANETTE, D., LOPES, A., Sodium dodecyl sulfate promoting a cooperative association process of sodium cholate with bovine serum albumin. Journal of Colloid and Interfaces Science. 298 (2006) 457-466.
6. RABOCAI, T. Físico-Química de Superfície. Washington: Organização dos Estados Americanos,1979.
7. GRUEN, D.W.R. The standard picture of ionic micelles. Prog. Colloid Polym. Sci., : 6. (1985).

8. HOLMBERG, K. Et al. Interactions between a lipase and charged surfactants – a comparison between bulk and interfaces. *Advances in colloid and interface science* 88 (2000) 223 – 241.

9. QUINA, F.H. & CHAIMOVICH, H. Ion exchange in micellar solutions. 1. Conceptual framework for ion exchange in micellar solutions. *J. Phys. Chem.*,83: 1844-1850, 1979.

10. GELAMO, E.L., SILVA, C.H.T.P., IMASATO, H., TABAK, M. Interaction of bovine (BSA) and human(HSA) serum albumins with ionic surfactants: Spectroscopy and modelling. *BBA*,1594, 84-99 (2002).

11. TURRO, N. J., ANANTHAPADMANABHAN, K. P., LEI, X. G., and ARONSON, M. Spectroscopic probe analysis of protein-surfactant interactions: the BSA/SDS system. *Langmuir* 11, 2525 (1995).

12. REYNOLDS, J. A., and TANFORD, C. Binding of dodecyl sulfate to proteins at higher ratios. Possible implications for the state of proteins in biological membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 66, 1002 (19).

13. GUO, X. H., ZHAO, N. M., CHEM, S. H., and TEIXEIRA, J. Small-angle neutron scattering study of the structure of protein/detergent complexes. *Biopolymers* 29, 335 (1990).

14. SCHWUGNER, M. And BARTNIK, F.G. Interaction of Anionic Surfactant With Proteins, Enzymes and Membranes – Anionic Surfactant. Edited by Christian Gloxhuber, New York, v.10, 1980.

15. ZANETTE, D. et al. Polymer-surfactant interactions demonstrated by a Kinetic probe: degree of ionization. *Colloids and Surfaces* 108(1996) 91 - 100.

16. ZANETTE, D. et al. Interactions of anionic surfactants with poly(ethylene oxide) and bovine serum albumin polymers: effect of the counterion hydrophobicity. *Colloids and Surfaces* 147(1999) 89 – 105.

17. YAMASAKI, M. et. al. Differential scanning calorimetric studies on bovine serum albumin IV. Effect of anionic surfactants with various lengths of hydrocarbon chain. *International Journal of Biological Macromolecules* 19 (1996) 241 – 246.

18. ZANETTE, D. et al. Salt effects on the interaction of poly(ethylene oxide) and sodium dodecyl sulfate measured by conductivity. *Colloids and Surfaces* 113 (1996) 237–246.

19. ZANETTE, D., SANTOS, F.S.; ITRI, R., Saturation conditions of bovine serum albumin (BSA) in association with sodium dodecyl sulfate (SDS). XV Conference European Colloid and Interface Society, 028, (2001)

20. SANTOS, S., ZANETTE, D., FISCHER, H., ITRI, R., A systematic study of bovine serum albumin (BSA) and sodium dodecyl (SDS) interactions by surface tension and small angle X-ray scattering. *J. Colloid Interface Sci.* 2620 (2003) 400-408.

21. DÍAZ, X., ABUN, E., LISSI, E.; Quenching of BSA intrinsic fluorescence by alkylpyridinium cations. Its relationship to surfactant-protein association. *J. of Photochem. and Photobio.* A6176 (2002) 1- 6

22. ZANETTE, D., FRESCURA, V., Ideal Mixing of Polymer-Surfactant Complexes of Polyethylene Oxide and Sodium Dodecyl Sulfate Plus Sodium Dodecanoate. *Colloids and Surfaces* 213(1999) 379 – 385.

23. SHINAGAWA, S., KAMEUAMA, 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 of the surfactant. *Bichimica et biophysica Acta*, 1161 (1993) 79 – 84.
24. GERBANOWSKI, A., RABILLER, C., GUEGUEN, J., Behaviors of bovine serum albumin and rapessed proteins at the air/water interface after grafting aliphatic or aromatic chains. *J. of colloid and interface science*, in press
25. LUNDAHL, P., GREIJER, E., SANDBERG, M., CARDELL, S. and ERIDSSON, K.O. A model for ionic and hydrophobic interactions and hydrogen-bonding in sodium dodecyl sulfate-protein complexes; *Biochim. Biophys. Acta* 873, 20-26, (1986).
26. LAKOWICZ, J. R. *Principles of Fluorescence spectroscopy*; New York: Plenum Press, 1983.
27. ITRI, R., L. Q. AMARAL, Micellar-shape anisometry near isotropic–liquid-crystal phase transitions; *Phys. Rev. E*, 47, 2551-2557, (1993);
28. G. IMOKAWA, K. SAMURA, M. KATSUMI, Study on skin roughness caused by surfactants: II. Correlation between protein denaturation and skin roughness.; *J. Am. Chem. Soc.* 52, 484-489 (1975);
29. SCHWUGER, M.J. Mechanism of interaction between ionic surfactants and polyglycol ethers in water; *J. Colloid Interface Sci.*, 43 (1973) 491
30. CAVALLI, V. Estudos de fluorescência de corantes solvatocrômicos. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2000.
31. Turro, Yetka, *J. Am. Chem. Soc.* 100, 4951 (1978).

32. H. Durchschlag, K. J. Tiefenbach, S. Gebauer, R. Jaenicke, J. Mol. Struct., 563-564 (2001) 449-455.

33. C. Kim, Y. Hieh, Colloids and surfaces A, 187-188 (2001) 385-397

34. Dickinson, E.- Proteins in Solution and at Interface, Boca Raton, ch.7, 1993.

35. Tanford, C., Reynolds, J. A., The Gross Conformation of Protein-sodium dodecylsulfate Complexes. Journal of Biological Chemistry. V.245, N.19 (19)

36. O. Glatter and O. Kratky, "Small Angle X-ray Scattering" (Academic Press: London, 1982).

37. FELIPPE, A.C. Auto-associação do colato de sódio (NaC) em misturas com o surfactante aniônico dodecilsulfato de sódio (SDS) e o polímero neutro hidrossolúvel Poli(oxietileno)(PEO). Dissertação de mestrado, UFSC, Florianópolis, 2006.

38. ZANETTE, D., FELIPPE, A. C., SHWEITZER, B., DAL BÓ, A., LOPES, A. The Absence of Cooperative Binding in Mixtures of Sodium Cholate and Poly(ethylene oxide) as Indicated by Surface Tension, Steady-State Fluorescence and Electrical Conductivity Measurements. Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects ;279, 87-95, (2006)

39. ZANA, R., GUVELI, D. Fluorescence probing study of the association of bile salts in aqueous solutions. J. Phy. Chem. 89, 1687-1690 (1985).

40. KRATOHVIL, J. P., HSU, W. P., KWOK, D. I. How large are the Micelles of Di- α -Hydroxy bile salts at the critical micellization concentrations in aqueous electrolyte solutions? Results for sodium Taurodeoxycholate and sodium deoxycholate. Langmuir 2, 256-258 (1986).

41. SUGIOKA, H. MOROI, Y. Micelle formation of sodium cholate and solubilization into the micelle. Biochimica et Biophysica Acta, 1394 (1998) 99-110.

42. SCHWEITZER, B. Crescimento dos Agregados Micelares em Complexos de Albumina do Soro Bovino – Dodecilsulfato de Sódio Controlado pela Proteína. Dissertação de mestrado, UFSC, Florianópolis, 2003.
43. SCHWEITZER, B., FELIPPE, A., DAL BO, A., MINATTI, E., ZANETTE, D., Competitive Process of Binding Between the Anionic Surfactants Sodium Dodecyl Sulfate and Sodium Cholate in Bovine Serum Albumin, *Macromol. Symp.*, 229 (2005) 208-216.
44. LISSI, E., ABUIN, E., LANIO, M. E., ALVAREZ, C., *J. Biochem. Biophys. Methods*, 50, 261-268, (2002).
45. GARIDEL, P., HILDEBRAND, A., NEUBERT, R., BLUME, A. Thermodynamic Characterization of Bile Salt Aggregation as a function of Temperature and Ionic Strength using Isothermal titration Calorimetry. *Langmuir*, 16, 5267-5275 (2000).
46. HOLMBERG, K., JÖNSSON, B., KRONBERG, B., LINDMAN, B., *Surfactants and Polymers in Aqueous Solution*, 2nd edition. Editora Wiley, 2005.
47. NAKASHIMA, T., ANNO, T., KANDA, H., SATO, Y., KUROI, T., FUJII, H., NAGADOME, S., SUGIHARA, G. Potentiometric Study on Critical Micellization Concentrations (CMC) of Sodium Salts of Bile Acids and their Amino Acid Derivates. *Colloids Surf.* 24, 103-110 (2002).
48. UENO, M., KIMONO, Y., IKEDA, I., MOMOSE, H., ZANA, R. Study on the Aggregation Number of Mixed Micelles in Aqueous Binary Mixtures of the Bile Salts and Nanionic Surfactant. *J. Colloid Interface Sci.* 117, 179-186 (1987).
49. LINDMAN, B., THALBERG, K., in: E.D. G. GODDARD, K. P. ANANTHAPADMANABHAN, (Eds.), *Interactions of Surfactants with Polymers and Proteins*, Vol., CRC Press, Boca Raton, (1993) 203-207.

50. DUBIN, P. L., GRUBER, J. H., XIA, J., ZHANG, H. The Effect of Cations on The Interaction Between Dodecylsulfate Micelles and Poly(Ethyleneoxide). *J. Colloid Interface Sci.* 148, 35-41 (1992).
51. BENRRAOU, M., BALES, B., ZANA, R. Effect of the Nature of the Counterions on the Interaction Between Cesium and Tetraalkylammonium Dodecylsulfates and Poly(Ethylene Oxide) or Poly(Vinylpyrrolidone). *J. Colloid Interface Sci.* 267, 519-523 (2003).
52. SCHWEITZER, B., ZANETTE, D., ITRI, R., Bovine serum albumin (BSA) plays a role in the size of SDS micelle-like aggregates at the saturation binding: the ionic strength effect. *Journal of Colloid and Interface Science*, 277 (2004) 285–291.
53. SCAMEHORN, J. F. Phenomena in Mixed Surfactant Systems, ACS Symposium Series 311, 1-27 (1985).
54. SMALL, D. M., PENKETT, S. A. Studies on simple and mixed bile salt micelles by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 176, 178-179 (1969).
55. KAWAMURA, H., MURATA, Y., YAMAGUCHI, T., IGIMI, H., TANAKA, M., SUGIHARA, G., KRATOHVIL, J. P. Spin-Label Studies of Bile Salt Micelles. *J. Phys. Chem.* 93, 3321-3326 (1989).
56. JONES, M.N., A theoretical approach to the binding of amphipathic molecules to globular proteins; *Journal Biochem.* 151, 109-114, (1975).
57. EVANS, D. F., WENNERSTROM, H. *The Colloidal Domain: Where Physics, Chemistry, Biology and Technology Meet.* VCH Publishers, New York, (1994) 515.

58. GOUIN, S., ZHU, X.

X. Fluorescence and NMR studies of the effect of a bile acid dimer on the micellizations of bile salts. *Langmuir* 14, 4025 – 4029 (1998).

59. ZANA, R., YIV, S.,

STRAZIELLE, C., LIANOS, P. Effect of alcohol on the properties of micellar systems: I. Critical Micellization Concentration, Micelle Molecular Weight and Ionization Degree, and Solubility of alcohols in micellar

solutions. *J. Colloid Interface Sci.* 80,
208-223 (1981).

60. TURRO, N. J., BARETZ, B. H., KUO, P. L. Photoluminescence probes for the investigation of interactions between sodium dodecylsulfate and water-soluble polymers. *Macromolecules* 17, 1321-1324 (1984).

61. CHEN, M., GRATZEL, M., THOMAS, J. K. Kinetic Studies in Bile Acid Micelles. *J. Am. Chem. Soc.* 97, 2052-2057 (1975).

62. MUKERJEE, P., CARDINAL, J. R. Benzene Derivatives and Naphthalene Solubilized in Micelles. Polarity of Microenvironments, Location and Distribution in Micelles, and Correlation with Surface Activity in Hydrocarbon-Water Systems. *The Journal of Physical Chemistry.* 82, 1620-1627 (1978).

63. <http://www.mazbra.com.br/historia.htm> acessado em 25/09/2006

64. http://www.bireme.br/php/decsws.php?tree_id=D04.808.105&lang=pt acessado em 25/09/2006

65. DJAVANBAKHT, A., KALE, K. M., ZANA, R. J. Ultrasonic Absorption and Density Studies of the Aggregation in Aqueous Solutions of Bile Acid Salts. *Colloid Interface Sci.* 59, 139-148 (1977).

66. COELHO, A., MEIJIDE, F., NÚÑEZ, R., TATO, J. V. J. Aggregation Behavior of Sodium Cholate in Aqueous Solution. *Phys. Chem.* 97, 10186-10191 (1993).

67. D'ALAGNI, M., D'ARCHIVIO, A. A., GALANTINI, L., GIGLIO, E. Structural Study of the Micellar Aggregations of Sodium Chenodeoxycholate and Sodium Deoxycholate. *Langmuir*. 13, 5811-5815 (1997).

68. OAKENFULL, D. G., FISHER, L. R. The role of hydrogen bonding in the formation of bile salt micelles. *J. Phys. Chem.* 81, 1838-1841(1977).

69. ALVES, R.F., FEITOSA, E. Interaction of sodium cholate with dioctadecyldimethylammonium chloride vesicles in aqueous dispersion. *Termochimica Acta*. 450, 46-80 (2006).

75. SWATI DE, GIRIGOSWAMI, A., DAS, S. Fluorescence probing of albumin-surfactant interaction. *Journal of Colloid and Interface Science* 285, 562-573 (2005).

71. HOLLAND, P. M.; RUBINGH, D. N. Nonideal Multicomponent Mixed Micelle Model, *J. Phys. Chem.* 87, 1984-1990 (1983).

72. WARREN, D., CHALMERS, D., HUTCHISON, K., DANG, W., POUTON, C. Molecular dynamics simulations of spontaneous bile salt aggregation. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 280, 182-193 (2006).

73. GIGLIO, E., LORETI, S., PAVEL, N.V., EXAFS: A New Approach to the Structure of Micellar Aggregates; *J. Phys. Chem.* 92, 2858-2862, (1988).

74. CABANE, B. Structure of some polymer-Surfactant aggregates in water. *J. Phys. Chem.* 81, 1639-1645 (1977).

75. Rinco O., Nolet M., Ovans R. and Bohne C.. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2003, 2, 1140-1151

