

GABRIEL MAX DIAS FERREIRA

**TERMODINÂMICA DE INTERAÇÃO DE LACTOFERRINA E POLI(ÓXIDO
DE ETILENO) COM SURFACTANTES ANIÔNICOS**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2016**

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

T

F383t
2016
Ferreira, Gabriel Max Dias, 1987-
Termodinâmica de interação de lactoferrina e poli(óxido de etileno) com surfactantes aniônicos / Gabriel Max Dias Ferreira.
– Viçosa, MG, 2016.
xxii, 145f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndices.

Orientador: Luis Henrique Mendes da Silva.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Agentes ativos de superfície. 2. Físico-química.
3. Polímeros. 4. Proteínas. 5. Termodinâmica. 6. Lactoferrina.
7. Óxido de etileno. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Química. Programa de Pós-graduação em
Agroquímica. II. Título.

CDD 22. ed. 540.33

GABRIEL MAX DIAS FERREIRA

**TERMODINÂMICA DE INTERAÇÃO DE LACTOFERRINA E POLI(ÓXIDO
DE ETILENO) COM SURFACTANTES ANIÔNICOS**

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

APROVADA: 18 de março de 2016.

Alvaro Vianna Novaes de Carvalho
Teixeira

Ana Clarissa dos Santos Pires

Márcio Santos Rocha

Clebio Soares Nascimento Júnior

Luis Henrique Mendes da Silva
(Orientador)

*“Cuidado com seus pensamentos, pois eles se tornam palavras.
Cuidado com suas palavras, pois elas se tornam ações.
Cuidado com suas ações, pois elas se tornam hábitos.
Cuidado com seus hábitos, pois eles se tornam o seu caráter.
E cuidado com o seu caráter, pois ele se torna o seu destino.
O que nós pensamos, nos tornamos”*

Margaret Thatcher

AGRADECIMENTOS

À Deus, no qual encontro toda força necessária para superar os desafios e obstáculos em minha vida; o Senhor com sua mania de me fazer mais forte quando me sinto mais fraco;

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Química, ao Programa de Pós-graduação em Agroquímica e ao Laboratório QUIVECOM por garantirem todo suporte para o desenvolvimento deste trabalho;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida;

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

Aos meus pais pelos ensinamentos constantes, pelo apoio incondicional e pelo carinho. Imensamente grato pelo ambiente familiar construído, no qual fui sempre incentivado a lutar por meus sonhos. Amo vocês!

Ao meu irmão Guilherme, companheiro eterno de estudos e trabalho. Sua dedicação, paciência, força de vontade e humildade são raros e sempre foram um incentivo para mim. Muito obrigado!

Ao meu irmão Gustavo pelo carinho, amizade e momentos de descontração;

À namorada Aparecida, por sua eterna paciência ao longo destes quase 4 anos de doutorado. Você é para mim a expressão maior do que a fé e o trabalho árduo são capazes de proporcionar em nossas vidas. Te amo!

Ao professor Luis Henrique pela orientação, pela confiança em meu trabalho e pelas agradáveis discussões que proporcionaram meu crescimento enquanto pesquisador. Obrigado por sua amizade!

À professora Maria do Carmo por sua coorientação e amizade; imensamente grato por seu apoio e confiança durante todos estes anos no grupo QUIVECOM;

Aos professores Alvaro Vianna, Renê Chagas e José Ésio, do departamento de Física da UFV, e à professora Ana Clarissa, do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFV, pela participação na banca de qualificação e suas importantes contribuições para a finalização desta tese;

Aos amigos do grupo QUIVECOM, pelo respeito, pelo apoio e pela agradável convivência no laboratório;

Aos amigos Álvaro e Andrés por sua disposição e empenho como colaboradores na realização dos experimentos; à amiga Anne pelo suporte com as medidas de NanoDSC e ao meu irmão Guilherme que sempre caminhou ao meu lado nas discussões dos resultados e na elaboração dos experimentos;

À Jaqueline, do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFV, por sua disponibilidade em realizar as medidas de tamanho e potencial zeta;

Ao professores Alvaro Vianna e Márcio Santos, do departamento de Física da UFV, à professora Ana Clarissa, do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFV, e ao professor Clebio Soares, do Departamento de Ciências Naturais da UFSJ, por aceitarem prontamente participar da banca desta defesa;

A todos que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente para o sucesso deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES.....	viii
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xviii
RESUMO	xix
ABSTRACT	xxi
Capítulo 1: Introdução e Revisão de Literatura	1
<i>1.1. Introdução</i>	<i>1</i>
<i>1.2. Revisão de Literatura</i>	<i>3</i>
1.2.1. Surfactantes e Macromoléculas: Propriedades e Estruturas	4
1.2.1.1. Surfactantes	4
1.2.1.2. Macromoléculas: Proteínas versus Polímeros.....	8
1.2.2. Interação Macromolécula-surfactante	9
1.2.2.1. Interação Proteína-surfactante.....	11
1.2.2.2. Interação Polímero-surfactante	16
1.2.3. Cooperatividade.....	22
1.2.4. Líquidos Iônicos	24
<i>1.3. Ferramentas para o Estudo da Interação Macromolécula-surfactante</i>	<i>26</i>
1.3.1. Calorimetria de Titulação Isotérmica	26
1.3.2. Calorimetria Diferencial de Varredura	31
1.3.3. Espectroscopia de Fluorescência	35
1.3.3.1. Uso da Fluorescência no Estudo da Interação Proteína-ligante.....	38
1.3.3.2. Uso da Fluorescência na Determinação da cmc de Surfactantes	40
<i>1.4. Organização da Tese.....</i>	<i>42</i>
<i>1.5. Referências</i>	<i>43</i>

Capítulo 2: Objetivos	51
2.1. <i>Objetivos Gerais</i>	51
2.2. <i>Objetivos Específicos</i>	51
2.2.1. <i>Objetivos Específicos da Proposta 1</i>	51
2.2.2. <i>Objetivos Específicos da Proposta 2</i>	52
Capítulo 3: Effect of 1-Butyl-3-methylimidazolium Halide on the Relative Stability between Sodium Dodecyl Sulfate Micelles and Sodium Dodecyl Sulfate–Poly(ethylene oxide) Nanoaggregates	53
3.1. <i>Introduction</i>	54
3.2. <i>Experimental Section</i>	56
3.2.1. <i>Materials</i>	56
3.2.2. <i>Conductivity Measurements</i>	56
3.2.3. <i>Isothermal Titration Calorimetry</i>	57
3.2.4. <i>Fluorescence Measurements</i>	58
3.2.5. <i>Dynamic Light-Scattering and Zeta Potential Measurements</i>	58
3.3. <i>Results and Discussion</i>	58
3.3.1. <i>Effect of ILs on SDS Aggregation</i>	58
3.3.2. <i>SDS-PEO Interaction in Water-IL-Mixed Solvents</i>	72
3.4. <i>Conclusion</i>	84
3.5. <i>References</i>	86
Capítulo 4: A Calorimetric and Spectroscopic Study of the Interaction between Lactoferrin and Anionic Surfactants	92
4.1. <i>Introduction</i>	93
4.2. <i>Experimental</i>	94
4.2.1. <i>Materials</i>	94
4.2.2. <i>Determination of Iron Saturation in Lf</i>	95
4.2.3. <i>Nano Differential Scanning Calorimetry</i>	95
4.2.4. <i>Fluorescence Spectroscopy</i>	96

4.2.5. Determination of the Critical Micelle Concentration of the Surfactants	96
4.2.6. Isothermal Titration Calorimetry	97
4.2.7. Zeta Potential and Dynamic light scattering	97
4.3. <i>Results and Discussion</i>	98
4.3.1. Effect of pH on the Lf Structure	98
4.3.2. Effect of Anionic Surfactants on the Lf Thermal Unfolding.....	102
4.3.3. Fluorescence Spectroscopy.....	107
4.3.4. Isothermal Titration Calorimetry	114
4.3.4.1. SDS-Lf Interaction.....	119
4.3.4.2. DSS-Lf Interaction.....	124
4.3.4.3. SDBS-Lf Interaction	127
4.4. <i>Conclusion</i>	130
4.5. <i>References</i>	131
Considerações finais e perspectivas.....	135
Apêndice A.....	137
Apêndice B.....	143

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

Lista de Símbolos e Abreviações dos Capítulos 1 e 2:

BSA: albumina do soro bovino;

C_2 : concentração de saturação;

C_p : capacidade calorífica a pressão constante;

c_m : concentração de micela livre;

cac: concentração de agregação crítica;

cmc: concentração micelar crítica;

DSC: calorimetria diferencial de varredura;

ΔH_{obs} : variação de entalpia observada;

H: entalpia;

H_i e H_f : entalpias do sistema nos estados termodinâmicos i e f , respectivamente;

ITC: calorimetria de titulação isotérmica;

K: constante de equilíbrio;

L: ligante;

LI: líquido iônico;

M: macromolécula;

n_H : coeficiente de Hill;

n-DSC: nanocalorimetria diferencial de varredura;

P: pressão do sistema;

P_{ext} : pressão externa;

P: potência;

PEO: poli(óxido de etileno);

Phe: fenilalanina;

pI: ponto isoelétrico;

PVP: polivinilpirrolidona;

q : energia trocada entre sistema e vizinhança na forma de calor;

S0, S1 e S2: estados eletrônicos singletes representando o estado fundamental, o primeiro estado excitado e o segundo estado excitado, respectivamente;

SDS: dodecilsulfato de sódio;

t : tempo;

t_1 e t_2 : tempo no início e no final da injeção, respectivamente, em um experimento de calorimetria de titulação isotérmica;

T: temperatura;

T1: estado eletrônico triplete de menor energia;

Trp: triptofano;

Tyr: tirosina;

U : energia interna;

U_i e U_f : energias internas do sistema nos estados termodinâmicos i e f , respectivamente;

V_i e V_f : volumes do sistema nos estados termodinâmicos i e f , respectivamente;

w : energia trocada entre sistema e vizinhança na forma de trabalho;

Lista de Símbolos e Abreviações dos Capítulos 3 e 4:

α : degree of micelle ionization;

AAS: atomic absorption spectroscopy;

Asp: aspartic acid;

bmim⁺: 1-butyl-3-methylimidazolium cation;

bmimBr: 1-butyl-3-methylimidazolium bromide;

bmimCl: 1-butyl-3-methylimidazolium chloride;

bmimPF₆: 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate;

C_2 : saturation concentration;

c2thc: second critical concentration;

C5mim⁺: 1-pentyl-3-methylimidazolium cation;

CLl: ionic liquid concentration;

C_{SDS}: sodium dodecyl sulfate concentration;

C_p: molar heat capacity;

cac: critical aggregation concentration;

cmc: critical micellar concentration;

$\Delta\Delta G_{agg}$: standard free energy of micelle adsorption on the macromolecule chain;

ΔG_{mic}^o : micellization Gibbs free energy change;

$\Delta H_{agg}(int)$: integral enthalpy change for macromolecule-surfactant aggregate formation;

ΔH_{ap-int} : apparent change in molar enthalpy of the interaction;

$\Delta_{den}H$: denaturation enthalpy change;

ΔH_{mic}^o : micellization enthalpy change;

ΔH_{obs} : observed enthalpy change per mol of surfactant added into the sample calorimetric cell;

ΔS_{mic}^o : micellization entropy change;

d: hydrodynamic diameter;

DS⁻: dodecyl sulfate anion;

DSS: sodium decyl sulfate;

His: histidine;

I₁ and **I₃**: fluorescence intensity of the first and third vibronic peaks, respectively, of the emission spectrum of the pyrene;

I_f: fluorescence intensity;

IL: ionic liquid;

ITC: isothermal titration calorimetry;

κ : specific conductivity;

λ_{max} : maximum emission wavelength;

Lf: lactoferrin;

m_{PEO}: poly(ethylene oxide) total mass in the calorimetric sample cell;

m_{Lf} : lactoferrin total mass in the calorimetric sample cell;

n_{bmimBr} : moles of 1-butyl-3-methylimidazolium bromide;

n_{SDS} : moles of sodium dodecyl sulfate;

n_{inj} : moles of the surfactant added in the calorimetric cell in each injection;

N_S : extent of binding;

NanoDSC: Nano differential scanning calorimetry;

NMR: nuclear magnetic resonance;

PEO: poly(ethylene oxide);

PEO35000: poly(ethylene oxide) with an average molar mass 35,000 g mol⁻¹;

PF₆⁻: hexafluorophosphate anion;

pI: isoelectric point;

q_{obs} : observed enthalpy after each injection of the titrant solution into the calorimetric sample cell;

$q_{demic+dil}$: energy of demicellization and dilution of the surfactant;

R : gas constant;

SDBS: sodium dodecylbenzene sulfonate;

SDS: sodium dodecyl sulfate;

T : absolute temperature;

T_m : maximum peak temperature;

Trp: tryptophan;

Tyr: tyrosine;

V_t : total volume in the sample cell at the saturation concentration;

V_y : total volume in the calorimetric sample cell after Y injections of the titrant solution;

Y : number of injections in the calorimetric sample cell;

ζ : zeta potential;

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1.** Estrutura molecular do surfactante dodecilsulfato de sódio.4
- Figura 1.2.** Organização dos monômeros de um surfactante iônico na interface e em solução, em regiões de concentração abaixo (**A** e **B**) e acima (**C** e **D**) da cmc. (●) cabeça do surfactante; (○) contração e (~) cauda do surfactante.6
- Figura 1.3.** Fluxograma representando as diferentes combinações macromolécula/surfactante cujas interações são comumente estudadas.10
- Figura 1.4.** Esquema geral para o mecanismo de interação entre proteínas e surfactantes iônicos que tem como consequência a desnaturação da biomolécula. A concentração de surfactante aumenta no sentido das setas. (●) cabeça do surfactante e (~) cauda do surfactante.13
- Figura 1.5.** Esboço de curvas de tensão superficial versus o logaritmo da concentração de surfactante. A curva em (**A**) é obtida para diferentes concentrações do surfactante em água; as curvas em (**B**) e (**C**) são obtidas para diferentes concentrações do surfactante em soluções aquosas de um polímero.18
- Figura 1.6.** Representação bidimensional da estrutura dos agregados PEO-SDS proposta por Cabane: a linha em cinza representa a macromolécula do PEO, a qual se encontra adsorvida sobre as micelas do surfactante. (●) cabeça do surfactante e (~) cauda do surfactante.19
- Figura 1.7.** Estrutura molecular de um líquido iônico imidazólico.25

Figura 1.8. Esquema de um calorímetro de titulação isotérmica que opera por fluxo de calor.....	27
Figura 1.9. Termograma obtido em um calorímetro de titulação isotérmica a partir da titulação de uma solução de BaCl ₂ 100 mM sobre uma solução de 18-crown-6 5 mM. Cada injeção consistiu da adição de 4uL do titulante e o volume inicial de titulado na cela foi de 0,85 mL.	29
Figura 1.10. Esquema de um calorímetro diferencial de varredura que opera por compensação de potência.....	32
Figura 1.11. Termograma de DSC da albumina do soro bovina (BSA) obtido em tampão acetato 0,1 M pH 5,8.	35
Figura 1.12. Diagrama de Jablonski.	36
Figura 1.13. Estruturas moleculares dos aminoácidos (A) triptofano, (B) fenilalanina e (C) tirosina.	38
Figura 1.14. (A) Estrutura molecular do pireno; (B) Espectro de emissão do pireno com excitação em 335 nm; (C) Razão 1:3 do pireno (I ₁ /I ₃) versus a concentração de um surfactante aniônico em solução aquosa.	41
Figure 3.1. Degree of micelle ionization (open symbols) and cmc (closed symbols) for SDS in the presence of bmimBr and BmimCl obtained from conductance data at 298.2 K.	59

Figure 3.2. Pyrene I_1/I_3 ratio versus $\log(C_{\text{SDS}})$ in the presence of different bmimBr concentrations at 298.2 K. The pyrene concentration was 1.2 μM for all experiments. Solid lines correspond to a sigmoidal fit.....	62
Figure 3.3. ITC curves obtained from the addition of (a) 50.0 mM and (b) 472.0 mM SDS to bmimBr aqueous solutions at several concentrations at 298.2 K. At 100.0 mM bmimBr in panel a the SDS concentration in the titrant solution was 10.0 mM.	64
Figure 3.4. Hydrodynamic diameter of SDS aggregates in bmimBr aqueous solutions at 298 K.....	66
Figure 3.5. Relative thermodynamic stability between the SDS aggregates in IL solutions and in water expressed by $\Delta\Delta X^{\circ}_{mic} = \Delta X^{\circ}_{mic} (\text{with IL}) - \Delta X^{\circ}_{mic} (\text{without IL})$ ($X = G, H,$ or TS) as a function of bmimBr (open symbols) and bmimCl (closed symbols) concentration at 298.2 K.	70
Figure 3.6. Titration curve of 472.0 mM SDS to 0.100% m/v PEO 35000 or solvent. The solvents are (a) pure water and (b) 4.00 mM bmimBr.	72
Figure 3.7. Pyrene I_1/I_3 ratio versus $\log(C_{\text{SDS}})$ in the presence of 4.00 mM bmimBr with and without 0.100% m/v PEO 35000 at 298.2 K. Pyrene concentration was 1.2 μM ; cac value presented was determined by ITC.	75
Figure 3.8. Apparent change in the molar enthalpy of the interaction between 0.100% m/v PEO 35000 and SDS versus SDS concentration at different bmimBr concentrations.	76

Figure 3.9. Effect of bmimBr concentration on the relative stability between the SDS/IL aggregates adsorbed onto the PEO chain and the SDS/IL nanostructures formed at cmc ($\Delta\Delta G_{agg(1)}$) or formed at c2thc ($\Delta\Delta G_{agg(2)}$).79

Figure 4.1. NanoDSC thermograms of 12.5 μM Lf solutions at (a) pH 9.0, (b) pH 12.0 and (c) pH 3.0.99

Figure 4.2. NanoDSC thermograms for the Lf thermal denaturation in the presence of different SDS concentrations at pH 9.0. The concentration of Lf is 12.5 μM . Scan rate was 1°C per minute. Numbers on the curves give the SDS concentrations.103

Figure 4.3. NanoDSC thermograms of Lf in the absence and presence of (a) DSS and (b) SDBS at pH 9.0. The concentration of Lf is 12.5 μM . Scan rate was 1°C per minute. Numbers on the curves give the surfactant concentrations.....106

Figure 4.4. (a) SDS effect on the fluorescence emission spectrum of 12.5 μM Lf at pH 9.0; the fluorescence intensity always increases as SDS concentration increases from 0 to 5.2 mM; (b) (■) I_f versus SDS concentration and (○) λ_{max} versus SDS concentration curves. Lf concentration is 12.5 μM . Protein excitation was performed at 295 nm.108

Figure 4.5. Effect of the thermal treatment temperature on the λ_{max} values in the Lf fluorescence emission spectrum at pH 9.0. Lf concentration is 12.5 μM . Protein excitation was performed at 295 nm.....110

Figure 4.6. (a) DSS effect on the Lf fluorescence emission spectrum, at pH 9.0; the fluorescence intensity always increases as DSS concentration increases from 0 to 16 mM; (b) (■) I_f versus DSS concentration and (○) λ_{max} versus DSS concentration curves. Lf concentration is 12.5 μM . Protein excitation was performed at 295 nm.111

Figure 4.7. (a) SDBS effect on the Lf fluorescence emission spectrum, at pH 9.0; I_f decreases as SDBS concentration increases from 0 to 0.10 mM, then increases from 0.10 to 0.63 mM SDBS, and decreases again from 0.63 to 4.38 mM SDBS; (b) (■) I_f versus SDBS concentration and (○) λ_{\max} versus SDBS concentration curves. Lf concentration is 12.5 μ M. Protein excitation was performed at 295 nm.112

Figure 4.8. ΔH_{obs} versus SDS concentration curves for addition of SDS on (●) 12.5 μ M Lf in 0.05 M citrate buffer, pH 3.0 and (□) 0.05 M citrate buffer, pH 3.0. The inset shows the magnification of the titration curve in Lf solution at low SDS concentrations.115

Figure 4.9. ΔH_{ap-int} versus SDS concentration curves relative to the Lf-SDS interaction at (a) pH 9.0; (b) pH 12.0 and (c) pH 3.0. The concentration of Lf is 12.5 μ M. The insets show the magnification of the curves at low SDS concentrations.120

Figure 4.10. ΔH_{ap-int} versus DSS concentration relative to Lf-DSS interaction: (a) pH 9.0; (b) pH 12.0 and (c) pH 3.0. The concentration of Lf is 12.5 μ M. The insets show the magnification of the curve at low DSS concentrations.125

Figure 4.11. ΔH_{ap-int} versus SDBS concentration relative to Lf-SDBS interaction: (■) pH 9.0; (Δ) pH 12.0 and (*) pH 3.0. The concentration of Lf is 12.5 μ M. The inset shows the magnification of the curves at low SDBS concentrations.127

Figure A.S1. Conductimetric titration of aqueous solutions of SDS in the presence of bmimBr [(a) and (c)] and bmimCl [(b) and (d)], at 298.2 K. Red lines are the linear fits obtained in the pre-micellar and post-micellar regions. Correlation coefficients were higher than 0.999.138

Figure A.S2. Pyrene I_1/I_3 versus $\log(C_{\text{SDS}})$ in the presence of several bmimCl concentrations, at 298.2 K. Pyrene concentration was 1.2 μM . Solid lines correspond to sigmoidal fit.139

Figure A.S3. ITC curves obtained from the addition of (a) 50.0 mM and (b) 472.0 mM SDS to bmimCl aqueous solutions at several concentrations, at 298.2 K. At 100 mM bmimCl in panel a, the SDS concentration in the titrant solution was 10.0 mM.....139

Figure A.S4. Size distributions curves of SDS solutions at different bmimBr concentrations at 298.2 K. Dash line: $\text{cmc} < C_{\text{SDS}} < c_{2\text{thc}}$; Solid lines: $C_{\text{SDS}} > c_{2\text{thc}}$. 140

Figure A.S5. Apparent molar enthalpy change of interaction between PEO 35000 and SDS at different bmimBr concentrations.140

Figure A.S6. Apparent molar enthalpy change of interaction between PEO 35000 and SDS at different bmimCl concentrations.141

Figure B.S1. NanoDSC thermograms for the Lf thermal denaturation in the presence of 2 and 5 mM SDS at pH 9.0. The concentration of Lf is 12.5 μM . Scan rate was 1°C per minute. Numbers on the curves give the SDS concentrations.144

Figure B.S2. Molecular structures of the surfactants: (a) sodium dodecyl sulfate, (b) sodium decyl sulfate, and (c) sodium dodecylbenzene sulfonate.144

LISTA DE TABELAS

Table 3.1. Aggregation Parameters of SDS in Different Water-IL Mixed Solvents at 298.2 K Obtained by Calorimetry, Fluorescence, and Conductivity Data	65
Table 3.2. ζ Measurements for SDS Aggregates in the Presence of ILs at 298 K.....	67
Table 3.3. Thermodynamic Parameters of SDS Aggregation in 0.100% m/v PEO in Different Water-IL Mixed Solvents at 298.2 K.....	82
Table 4.1. Thermodynamic Parameters of Lf Denaturation at Different pH Values ...	101
Table 4.2. Thermodynamic Parameters of Lf Denaturation at Different SDS Concentrations, at pH 9.0.....	104
Table 4.3. Micellization Parameters of SDBS, SDS and DSS Surfactants at 25°C and Different pH Values.....	116
Table 4.4. Extent of Binding of SDS, DSS and SDBS at pH 3.0, 9.0 and 12.0 Derived from Isothermal Titration Calorimetric Experiments	118
Table 4.5. Integral Enthalpy Change for Formation of Lf-surfactant Complex at Different pH.....	129
Table A.S1. Thermodynamic Parameters of SDS Micellization in Different Water-ILs Mixed Solvents, at 298.2K.....	142
Table A.S2. Cac Values for PEO-SDS Interactions in the Presence of ILs.....	142
Table B.S1. Aggregate Size and Zeta Potential of Lf-SDS Complexes at pH 3.0.....	145

RESUMO

FERREIRA, Gabriel Max Dias, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2016. **Termodinâmica de interação de lactoferrina e poli(óxido de etileno) com surfactantes aniônicos.** Orientador: Luis Henrique Mendes da Silva. Coorientadora: Maria do Carmo Hespagnol da Silva.

Misturas aquosas contendo surfactantes e macromoléculas têm muitas aplicações práticas como no processamento de petróleo, na indústria de papel, em processos biológicos e em produtos de higiene pessoal. Em todas estas misturas, as propriedades físico-químicas do sistema são determinadas pela interação entre a macromolécula e o surfactante. Neste trabalho, nós avaliamos a interação macromolécula-surfactante sob dois aspectos distintos: o estudo da interação polímero-surfactante e o estudo da interação proteína-surfactante. No primeiro, o efeito dos líquidos iônicos (LIs) brometo de 1-butil-3-metilimidazólio (bmimBr) e cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio (bmimCl) sobre a interação entre poli(óxido de etileno) (PEO) e dodecilsulfato de sódio (SDS) foi avaliado utilizando-se condutimetria, fluorimetria e calorimetria de titulação isotérmica (ITC). O efeito dos LIs sobre a micelização do SDS também foi investigado. Parâmetros termodinâmicos da micelização do SDS e da agregação PEO-SDS foram obtidos em várias concentrações de LI e a estabilidade relativa entre as micelas de SDS e os agregados PEO/SDS foi estabelecida. Os LIs diminuíram a concentração micelar crítica (cmc) do surfactante, estabilizando as micelas de SDS, e aumentaram a concentração de agregação crítica (cac) para a formação do agregado, tornando os agregados PEO/SDS menos estáveis. Além disso, os LIs induziram uma segunda concentração crítica (c_{2thc}) no processo de micelização do SDS, a qual foi associada a um processo de diminuição do tamanho micelar. A variação de entalpia integral de formação do agregado ($\Delta H_{agg}(int)$) mudou de -0,72 para 2,16 kJ mol⁻¹ quando a concentração de bmimBr aumentou de 0 para 4,00 mM. Quando o cloreto foi substituído pelo brometo na estrutura do LI, a micelização do SDS e o início da agregação PEO-SDS não foram afetados. No entanto, a quantidade de SDS ligado ao polímero na concentração de saturação (C₂) aumentou. Em 100,0 mM de LI, a interação PEO-SDS desapareceu. Nós sugerimos que os LIs participam da estrutura dos agregados PEO/SDS, interagindo com o SDS na interface/núcleo das micelas adsorvidas sobre o PEO e promovendo a solvatação preferencial dos segmentos do polímero. Para estudar a interação proteína-surfactante, nós escolhemos sistemas formados pela proteína lactoferrina (Lf) e os surfactantes

aniônicos dodecilsulfato de sódio (SDS), dodecilbenzeno sulfonato de sódio (SDBS) ou decilsulfato de sódio (DSS). A interação Lf-surfactante foi caracterizada em diferentes valores de pH utilizando ITC, nanocalorimetria diferencial de varredura (n-DSC) e espectroscopia de fluorescência. A variação de entalpia molar aparente de interação (ΔH_{ap-int}), a extensão de ligação (N_S) e a variação de entalpia integral de formação do complexo ($\Delta H_{agg(int)}$) foram determinadas a partir da ITC e variaram com o pH e com a estrutura do surfactante. Os valores de $\Delta H_{agg(int)}$ foram sempre negativos e variaram entre $-5,99 \text{ kJ mol}^{-1}$, para o SDS em pH 3,0, e $-0,61 \text{ kJ mol}^{-1}$, para o DSS em pH 12,0. Dados de espectroscopia de fluorescência e n-DSC demonstraram que a interação proteína-surfactante promove a desnaturação da Lf e a eficiência de desnaturação seguiu a ordem $\text{DSS} < \text{SDS} < \text{SDBS}$. À medida que a concentração do surfactante aumentou, a temperatura de desnaturação (T_m) e a área do pico nos termogramas de n-DSC diminuíram. Nossos resultados mostraram que a Lf ligada ao ferro tem mais resistência contra a desestabilização induzida pelos surfactantes do que a Lf livre de ferro.

ABSTRACT

FERREIRA, Gabriel Max Dias, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2016. **Thermodynamic of interaction of lactoferrin and poly(ethylene oxide) with anionic surfactants.** Adviser: Luis Henrique Mendes da Silva. Co-Adviser: Maria do Carmo Hespanhol da Silva.

Aqueous mixtures comprising surfactants and macromolecules have many practical applications, as in the oil processing, paper industry, biological processes and personal care products. In all of those mixtures, the physical-chemical properties of the system are determinate by the interaction between the macromolecule and the surfactant. In this thesis, we evaluated the macromolecule-surfactant interaction under two different aspects: the study of the polymer-surfactant interaction and the study of the protein-surfactant interaction. In the first one, the effect of the ionic liquids (ILs) 1-butyl-3-methylimidazolium bromide (bmimBr) and 1-butyl-3-methylimidazolium chloride (bmimCl) on the interaction between poly(ethylene oxide) (PEO) and sodium dodecyl sulfate (SDS) was evaluated using conductimetry, fluorimetry, and isothermal titration calorimetry (ITC). The effect of those ILs on the SDS micellization was also investigated. Thermodynamic parameters of SDS micellization and SDS-PEO aggregation were obtained at several IL concentrations and the relative stability between the SDS micelles and the SDS/PEO aggregates was established. The ILs decreased the critical micellar concentration (cmc) of the surfactant, stabilizing the SDS micelles, and increased the critical aggregation concentration (cac) to the aggregate formation, making the SDS/PEO aggregates less stable. In addition, ILs induced a second critical concentration (c_{2thc}) in the SDS micellization process, which was associated with a process of micelle size decrease. The integral enthalpy change for the aggregate formation ($\Delta H_{agg}(int)$) changed from -0.72 to 2.16 kJ mol⁻¹ when the bmimBr concentration increased from 0 to 4.00 mM. When chloride was replaced with bromide in the IL structure, the SDS micellization and the beginning of the SDS-PEO aggregation were not affected. However, the amount of SDS bound to the polymer in the saturation concentration (C₂) increased. At 100.0 mM IL, the SDS-PEO interaction vanished. We suggested that the ILs participate in the structure of the formed SDS/PEO aggregates, interacting with the SDS at the core/interface of the micelles attached to the polymer, and promoting a preferential solvation of the PEO segments. To study the protein-surfactant interaction, we chose systems comprising the lactoferrin (Lf) protein and the anionic surfactants

sodium dodecyl sulfate (SDS), sodium dodecylbenzene sulfonate (SDBS), or sodium decyl sulfate (DSS). The interaction Lf-surfactant was characterized at different pH values using ITC, nano differential scanning calorimetry (NanoDSC) and fluorescence spectroscopy. The apparent molar enthalpy change of interaction (ΔH_{ap-int}), the extent of binding (N_S), and the integral enthalpy change for the complex formation ($\Delta H_{agg(int)}$) were determined from ITC and depended on the pH and the surfactant structure. The $\Delta H_{agg(int)}$ values were always negative and ranged from $-5.99 \text{ kJ mol}^{-1}$, for SDS at pH 3.0, to $-0.61 \text{ kJ mol}^{-1}$, for DSS at pH 12.0. Fluorescence spectroscopy and NanoDSC data demonstrated that the protein-surfactant interaction leads to the Lf denaturation, and the denaturation efficiency followed the order $\text{DSS} < \text{SDS} < \text{SDBS}$. As the surfactant concentration increased, the denaturation temperature (T_m) and the peak area in the NanoDSC thermograms decreased. Our results shown that the Lf bound to iron has more resistance against the destabilization induced by surfactants than the iron free Lf.

Capítulo 1: Introdução e Revisão de Literatura

1.1. Introdução

Sistemas formados por surfactantes e macromoléculas são amplamente conhecidos por sua utilização em uma série de produtos de aplicação tecnológica tais como cosméticos, lubrificantes, produtos de limpeza, tintas, fármacos e produtos alimentícios.¹⁻⁴ Além disso, surfactantes e macromoléculas constituem a base de uma série de sistemas biológicos que desempenham funções fundamentais para a manutenção da vida.⁵⁻⁷ Por estes aspectos, a compreensão da interação entre estes compostos tem sido alvo de estudo de diversos pesquisadores como será percebido ao longo das várias referências citadas ao longo deste texto.

O interesse da comunidade científica por sistemas constituídos por surfactantes e macromoléculas se deu inicialmente no campo da bioquímica, no estudo da interação entre proteínas e lipídeos por volta do início do século XX, e se consolidou entre o final de 1960 e o início de 1970 quando se estabeleceram os princípios gerais de como surfactantes carregados se ligam e desnaturam proteínas.⁸

O primeiro estudo sistemático envolvendo a interação entre um polímero e um surfactante surgiu apenas meio século depois dos primeiros trabalhos relatando a interação de proteínas com surfactantes. Precisamente em 1957, Saito,⁹ investigando as propriedades de soluções aquosas formadas por polivinilpirrolidona (PVP) e dodecilsulfato de sódio (SDS), verificou que misturas ternárias formadas por SDS + PVP + água apresentavam características físico-químicas muito distintas daquelas observadas em soluções binárias SDS + água e PVP + água. Tais resultados já revelavam a potencial

aplicação destes sistemas em formulações com propriedades reológicas específicas¹⁰ e com uma alta capacidade de solubilizar substâncias de baixa solubilidade em água.¹¹

A despeito dos vários avanços na compreensão de como surfactantes interagem com macromoléculas, diversas questões em aberto tornam o estudo desta interação um campo de pesquisa ainda em destaque. Os recentes interesses no campo de pesquisa envolvendo sistemas macromolécula-surfactante decorrem, entre outros aspectos, de: (i) existir um número extremamente grande de surfactantes e macromoléculas (proteínas ou polímeros) que podem interagir entre si formando uma variedade de estruturas coloidais com propriedades diversificadas; (ii) possuir uma diversidade de técnicas em desenvolvimento e aperfeiçoamento que podem proporcionar novas descobertas neste campo; (iii) haver uma variedade de cossolutos e/ou cossolventes que podem atuar em tais sistemas alterando as propriedades coloidais dos agregados formados e (iv) entender que novas descobertas neste campo de pesquisa podem conduzir novos sistemas macromolécula-surfactante a novas aplicações.

Por reconhecer estes aspectos, neste trabalho avaliou-se (i) o efeito de líquidos iônicos sobre a interação do polímero poli(óxido de etileno) (PEO) com o surfactante dodecilsulfato de sódio e (ii) a interação da proteína lactoferrina com diferentes surfactantes aniônicos. O primeiro com objetivo de compreender o efeito de uma classe de compostos emergentes, os líquidos iônicos, sobre a formação de agregados PEO-SDS, um dos mais estudados sistemas polímero-surfactante;¹² o segundo como proposta de avançar no estudo da interação entre surfactantes e metaloproteínas, uma classe especial de proteínas com a capacidade de ligar-se a átomos de um determinado metal.

Apesar de reconhecermos que proteínas são uma classe especial de polímeros (por vezes denominadas biopolímeros), neste texto elas serão tratadas separadamente devido às suas propriedades estruturais particulares. Ao contrário da maioria dos polímeros, os

quais apresentam uma estrutura macromolecular flexível, as proteínas possuem uma estrutura macromolecular rígida, com as várias ligações intermoleculares entre seus resíduos de aminoácido determinando uma estrutura tridimensional bastante definida. Esta é uma diferenciação importante que faz com que na literatura as interações polímero-surfactante e proteína-surfactante sejam tratadas independentemente.

Apesar das diferenças estruturais que temos utilizado para distinguir polímeros de proteínas, diferenças estas que determinam propriedades físicas e químicas entre estes compostos, existe uma série de similaridades no comportamento de fase de misturas contendo polímero + surfactante e misturas contendo proteína + surfactante, principalmente do ponto de vista termodinâmico. Por este motivo justifica-se, nesta tese, tratar simultaneamente aspectos relacionados às interações polímero-surfactante e proteína-surfactante.¹³

Para fornecer uma base teórica à compreensão dos trabalhos desenvolvidos nesta tese, a seguir é apresentada uma breve revisão de literatura abordando alguns aspectos importantes sobre as propriedades gerais de sistemas proteína-surfactante e polímero-surfactante bem como sobre as técnicas que foram utilizadas para caracterização dos sistemas de interesse.

1.2. Revisão de Literatura

Antes de iniciar a discussão sobre os aspectos fundamentais associados ao processo de interação entre surfactantes e macromoléculas, uma breve descrição sobre as principais propriedades físico-químicas de cada um desses compostos é apresentada: primeiramente alguns dos aspectos relacionados às características estruturais dos surfactantes e de suas propriedades de mistura em soluções aquosas; em seguida, uma

breve descrição das características das macromoléculas que caracterizam os polímeros e proteínas.

1.2.1. Surfactantes e Macromoléculas: Propriedades e Estruturas

1.2.1.1. Surfactantes

Surfactantes são uma classe de compostos anfifílicos que possuem a capacidade de reduzir significativamente a tensão superficial em soluções aquosas mesmo quando em concentrações muito baixas. Tal propriedade está associada principalmente à característica estrutural destes compostos, os quais são constituídos por uma região hidrofóbica, comumente designada como cauda do surfactante, e por uma região hidrofílica, geralmente denominada de cabeça do surfactante. Ambos, o comprimento da cauda hidrofóbica e a carga sobre a cabeça hidrofílica do surfactante, são parâmetros que influenciam diretamente no comportamento destas substâncias em solução aquosa. A figura 1.1 apresenta a estrutura do surfactante dodecilsulfato de sódio (SDS) para o qual as regiões hidrofóbica e hidrofílica são destacadas.

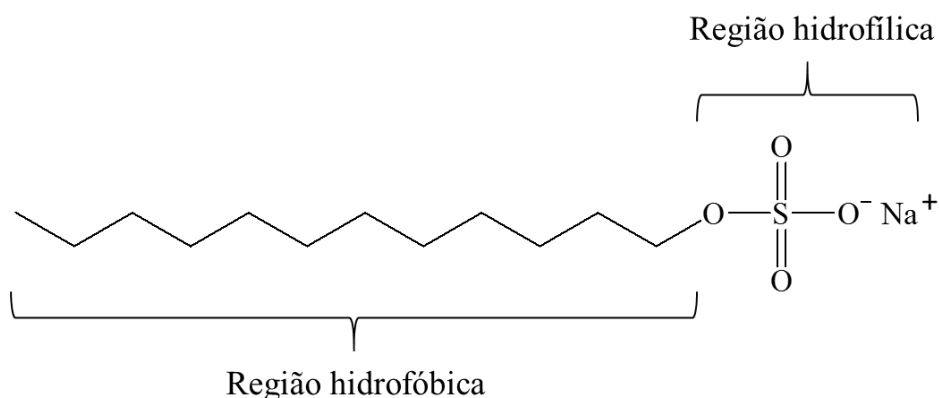


Figura 1.1. Estrutura molecular do surfactante dodecilsulfato de sódio.

Quanto à carga do grupo cabeça o surfactante pode ser classificado em: (i) surfactante iônico, o qual em solução aquosa se dissocia formando grupos cabeça carregados positivamente (surfactante catiônico) ou negativamente (surfactante aniônico); (ii) surfactante não-iônico que não possui grupos ionizáveis e, portanto não forma espécies carregadas em solução e (iii) surfactante zwitteriônico que possui diferentes grupos ionizáveis na região hidrofílica, os quais em solução aquosa originam cargas tanto positivas quanto negativas que se somam para gerar uma carga líquida igual a zero.

Quando colocados em solução aquosa em concentrações muito baixas, uma fração dos monômeros de um surfactante, como são denominadas cada uma das espécies formadas por uma região hidrofóbica e uma região hidrofílica, transfere-se espontaneamente para a interface líquido-ar enquanto outra fração permanece em solução. Na região da interface os monômeros se orientam preferencialmente expondo sua região hidrofóbica para a fase gasosa (ar) enquanto sua região hidrofílica permanece imersa na fase aquosa. Com o aumento da concentração de surfactante até determinada concentração característica, denominada concentração micelar crítica (cmc), ocorre a saturação energética da interface líquido-gás, tornando-se favorável para os monômeros se associarem em solução para formar agregados denominados micelas. Acima da cmc o aumento na concentração de surfactante não conduz ao aumento da concentração de monômeros livres em solução, mas promove a incorporação de novos monômeros às micelas já formadas. A figura 1.2 apresenta um esquema da estruturação dos monômeros de um surfactante iônico na interface e em solução, em regiões de concentração acima e abaixo da cmc.

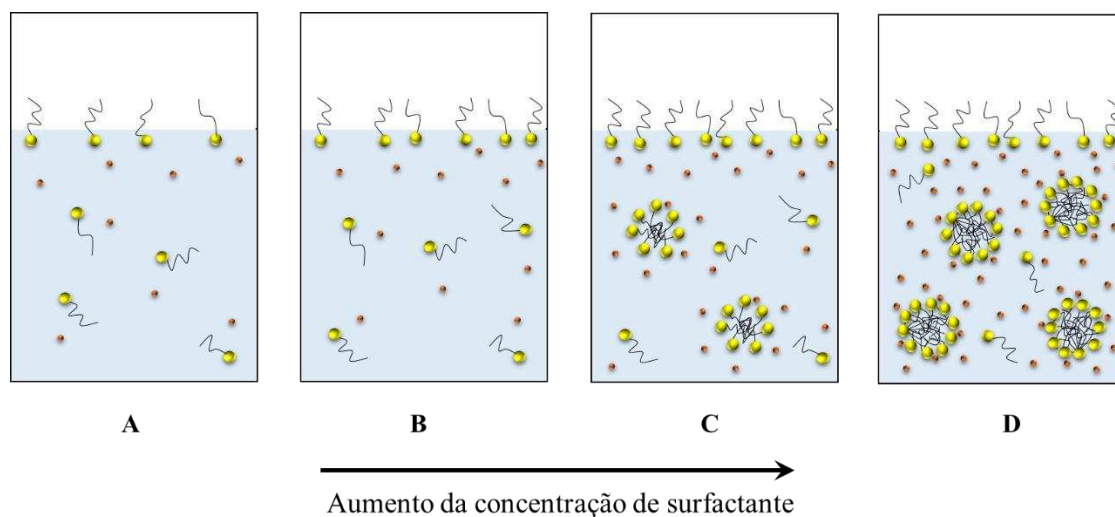


Figura 1.2. Organização dos monômeros de um surfactante iônico na interface e em solução, em regiões de concentração abaixo (**A** e **B**) e acima (**C** e **D**) da cmc. (●) cabeça do surfactante; (●) contração e (~) cauda do surfactante.

A notória capacidade de os surfactantes apresentarem uma orientação particular na região da interface e de auto agregarem-se em solução para formar micelas têm no efeito hidrofóbico sua principal força motriz. A compreensão deste fenômeno perpassou séculos e teve sua construção a partir dos primeiros estudos envolvendo experimentos com misturas de água e óleo. Com a observação constante de que a “baixa afinidade” de óleo por água ($\Delta_{mix}G > 0$) dirige muitos tipos de associação não covalente em sistemas químicos e biológicos, as questões moleculares associadas com tal fenômeno têm sido elucidadas:^{14,15} ao contrário do que inicialmente imaginava-se, isto é, que a formação de micelas em sistemas de surfactantes era dirigida por uma forte atração cauda-cauda, atualmente estabelece-se que moléculas de baixa polaridade, como o são as caudas dos surfactantes, “evitam” interagir com água pois são incapazes de competir com a forte interação de moléculas de água com elas mesmas, as quais interagem entre si por meio de ligações de hidrogênio.

Quando moléculas de água realizam ligações de hidrogênio com moléculas de água vizinhas, suas contribuições para a entropia do sistema diminuem devido à perda de graus de liberdade rotacional e translacional, principalmente. Portanto, a entropia por mol de moléculas de água envolvidas em uma rede de ligações de hidrogênio no “bulk” é menor que a entropia por mol de moléculas de água hipotéticas que pudessem estar livres no “bulk” sem realizar ligações de hidrogênio com outras moléculas. Por sua vez, a entropia por mol de moléculas de água solvatando cadeias hidrocarbônicas (de baixa polaridade) é menor que a entropia por mol de moléculas de água envolvidas na rede de ligações de hidrogênio no “bulk” pelo seguinte aspecto: para interagir com uma cadeia hidrocarbônica, moléculas de água devem deixar de interagir por meio de ligações de hidrogênio com outras moléculas de água para interagir com o hidrocarboneto por meio de interações do tipo dipolo-dipolo induzido, as quais são de energia entálpica mais baixa.

A perda entálpica associada ao processo de solvatação das cadeias hidrocarbônicas é minimizada quando as moléculas de água na camada de solvatação da cadeia hidrocarbônica se orientam mais efetivamente, perdendo entropia configuracional, para maximizar as ligações de hidrogênio com as moléculas de água vizinhas. Para uma determinada concentração do hidrocarboneto em solução, a perda entrópica associada com as moléculas de água solvatando as cadeias hidrocarbônicas não compensa o ganho de entropia advindo de outros processos que ocorrem durante a mistura dos dois componentes (por exemplo, o aumento de entropia configuracional) ou a redução da energia entálpica que pode ocorrer em certas situações. Como consequência, a natureza escolhe agregar as moléculas de hidrocarboneto, liberando moléculas de água de sua camada de solvatação e aumentando, desta forma, a entropia do sistema.

Em linhas gerais, o termo hidrofóbico é utilizado para referir-se à interação de moléculas de baixa polaridade com moléculas de água. O efeito hidrofóbico dá nome ao

fenômeno de autoassociação espontânea de moléculas de baixa polaridade (hidrofóbicas) em água. Este efeito tem como força motriz o aumento de entropia do sistema a partir da liberação de moléculas de água estruturadas na camada de solvatação da molécula hidrofóbica.

1.2.1.2. Macromoléculas: Proteínas versus Polímeros

Define-se uma macromolécula como uma molécula formada por uma grande coleção de átomos ligados covalentemente entre si e organizados em pequenas unidades estruturalmente bem definidas (unidade repetitiva da macromolécula) que se repetem, periodicamente ou não, ao longo da cadeia macromolecular.

Quando nos referimos a um polímero, estamos falando de uma amostra que contém macromoléculas formadas por diferentes quantidades da(s) mesma(s) unidade(s) repetitiva(s), constituindo uma amostra com uma distribuição de massas moleculares. Se formados por um único tipo de unidade repetitiva os polímeros são denominado de homopolímeros. Em outro caso eles são chamados de copolímeros, quando formados pela repetição ordenada (copolímeros blocos) ou aleatória (copolímeros randômicos) de mais de um tipo de unidade repetitiva.¹⁶

As proteínas são um tipo especial de copolímero randômico constituído a partir de um conjunto bem definido de unidades repetitivas (resíduos de aminoácidos) que estão arranjados de forma aperiódica, mas de uma forma prescrita que foi selecionada ao longo do processo de evolução a fim de conferir propriedades particulares à macromolécula. Essas propriedades não estão associadas apenas à maneira como as unidades repetitivas estão distribuídas ao longo da cadeia (estrutura primária da proteína), mas também à habilidade de a macromolécula se auto-organizar em uma estrutura tridimensional complexa e bem definida.¹⁶

Pela definição de proteína que apresentamos, é evidente que uma proteína é um polímero. A distinção que realizamos nesta tese é apenas uma estratégia para considerar o efeito que as características estruturais únicas das proteínas apresentam sobre a interação com os surfactantes, principalmente no que diz respeito à flexibilidade da macromolécula. Uma estrutura macromolecular ser flexível ou rígida depende das propriedades termodinâmicas do sistema. Por exemplo, o PEO apresenta uma estrutura macromolecular rígida quando puro e abaixo de sua temperatura de transição vítrea; mas quando em solução, nas condições termodinâmicas utilizadas neste trabalho, apresenta suas macromoléculas flexíveis. Proteínas, por outro lado, mesmo em solução sob condições termodinâmicas abaixo de sua temperatura de desnaturação, apresentam estruturas macromoleculares rígidas. Estas diferenças podem ser determinantes nas características de interação de macromoléculas com surfactantes.

1.2.2. Interação Macromolécula-surfactante

A complexidade de sistemas constituídos por macromoléculas e surfactantes bem como sua aplicação em uma variedade de produtos tecnológicos tornam o estudo da interação entre estes dois compostos um alvo de interesse de diversos pesquisadores. Ainda hoje, décadas após o início dos estudos da interação entre macromoléculas e surfactantes, investigações fundamentais são realizadas com o objetivo de avançar na compreensão do comportamento dos sistemas coloidais formados por estas duas substâncias.¹³

Quando nos referimos a sistemas macromolécula-surfactante, inevitavelmente englobamos uma grande diversidade de estruturas de macromoléculas (ou surfactantes) que apresentam propriedades físico-químicas bastante distintas entre si. Por conseguinte, as propriedades destes sistemas são altamente dependentes das características

moleculares da macromolécula e do surfactante. Neste contexto, é comum classificar tais sistemas em função das características estruturais da macromolécula e do surfactante, principalmente quanto à carga do grupo cabeça do surfactante (de uma forma geral) e quanto à presença de cargas ou não sobre a cadeia da macromolécula (no caso específico de sistemas polímero-surfactante). Desta forma, é recorrente a diferenciação entre sistemas polímero/surfactante iônico, polímero/surfactante não-iônico e polieletrólito (polímero carregado)/surfactante (no estudo da interação polímero-surfactante)¹² e entre sistemas proteína/surfactante iônico e proteína/surfactante não-iônico (no estudo da interação proteína-surfactante).¹⁷ A figura 1.3 apresenta, na forma de um fluxograma, as possíveis combinações de macromoléculas e surfactantes cujas interações são comumente estudadas.

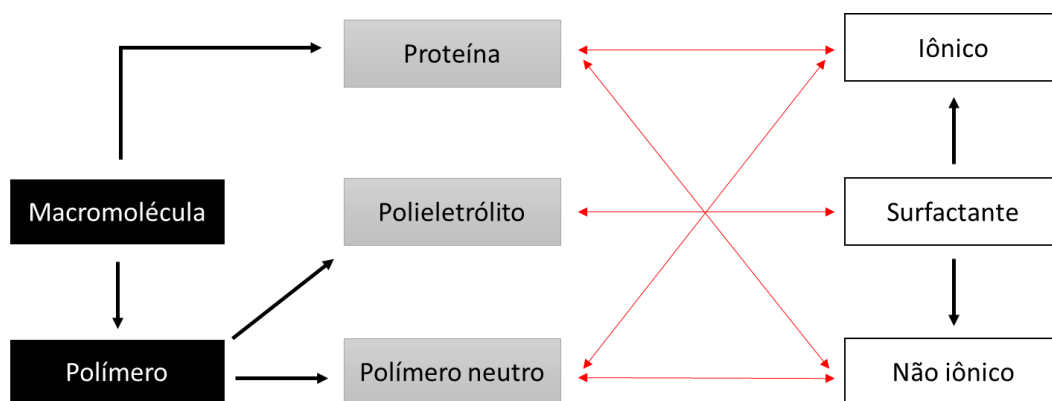


Figura 1.3. Fluxograma representando as diferentes combinações macromolécula/surfactante cujas interações são comumente estudadas.

De maneira geral, a interação de polieletrólitos com surfactantes de carga oposta é mais intensa que a interação de polímeros não-iônicos com surfactantes de qualquer classe; surfactantes não-iônicos interagem fracamente (ou não interagem) com macromoléculas^{12,18} e, por razões ainda não muito bem estabelecidas, surfactantes

catiônicos interagem mais fracamente com polímeros não-iônicos quando comparados a surfactantes aniônicos de hidrofobicidade semelhante.¹⁹ Apesar disso, algumas propostas para a diferença de “reatividade” de surfactantes aniônicos e catiônicos frente a polímeros são encontradas na literatura para alguns sistemas específicos. Por exemplo, Schwuger²⁰ atribuiu a maior interação de PEO com surfactantes aniônicos à propriedade de o átomo de oxigênio nas unidades de óxido de etileno tornar-se parcialmente positivo, podendo interagir através de interações eletrostáticas favoráveis com o grupo cabeça destes surfactantes. Com respeito às proteínas, a magnitude da interação entre estas e surfactantes iônicos é fortemente dependente da carga da biomolécula que depende diretamente do pH do meio.

Salvo os diferentes tipos de sistemas macromolécula-surfactante terem sua particularidade, a interação entre macromoléculas e surfactantes aniônicos tem recebido atenção especial da comunidade científica e é alvo de estudo neste trabalho. A seguir destacam-se os principais aspectos relacionados aos mecanismos das interações proteína-surfactante e polímero-surfactante com ênfase em sistemas formados por proteína (ou polímero não-iônico) + surfactante iônico.

1.2.2.1. Interação Proteína-surfactante

O estudo da interação entre proteínas e surfactantes é particularmente importante do ponto de vista teórico e prático por diversos aspectos, a ressaltar:

(i) Surfactantes são extensivamente usados para extrair proteínas a partir de membranas celulares sendo, de forma geral, agentes utilizados na extração e purificação destas biomoléculas;^{21,22}

(ii) A interação entre proteínas e surfactantes é comparável, em alguma extensão, à interação proteína-lipídeo que ocorre nas membranas celulares;^{23,24}

(iii) Surfactantes iônicos são agentes desnaturantes de proteínas;^{25,26}

(iv) Surfactantes previnem o fenômeno de agregação em vários processos de manipulação de proteínas;²⁷

(v) Sistemas constituídos por surfactantes e proteínas são de ampla relevância no desenvolvimento de diversos produtos de aplicação tecnológica como fármacos, alimentos e cosméticos;^{28,29}

Muito do que se compreende sobre sistemas proteína-surfactante decorreu de estudos realizados entre o início do século XX e o início da década de 1970, quando os princípios gerais de como surfactantes carregados se ligam e desnaturam proteínas foram estabelecidos.⁸ As observações até então obtidas, em conjunto com estudos posteriores, permitiram aos pesquisadores estabelecer um esquema geral do mecanismo de interação entre proteínas e surfactantes iônicos, o qual é descrito em uma série de etapas^{18,30-33}. Na primeira etapa (“**a**” na figura 1.4), em baixas razões molares surfactante:proteína (concentrações de surfactante bem abaixo da cmc do surfactante), monômeros individuais de surfactante ligam-se à sítios específicos da proteína via interações eletrostáticas e hidrofóbicas. Esta etapa, em geral, ocorre sem alterações da estrutura terciária da proteína, mas pode ocorrer com pequenas mudanças conformacionais da biomolécula que, em alguns casos, promovem a expansão de sua estrutura. Na segunda etapa, quando os sítios específicos de interação estão saturados, os monômeros de surfactante ligam-se à cadeia da biomolécula através de interações não-específicas e não-cooperativas até que em uma terceira etapa (“**b**” na figura 1.4) uma grande quantidade de surfactante passa a ligar-se cooperativamente à proteína. Acredita-se que nesta etapa ocorra a maior alteração conformacional da biomolécula que pode, em alguns casos, perder sua funcionalidade biológica. Com as mudanças estruturais que ocorrem ao longo da cadeia polipeptídica, sítios hidrofóbicos tornam-se disponíveis para interagir com o

surfactante, principalmente por meio de interações hidrofóbicas. Na última etapa (“c” na figura 1.4), em razões molares surfactante:proteína elevadas, a proteína torna-se saturada pelos monômeros de surfactante os quais passam a formar micelas livres em solução.

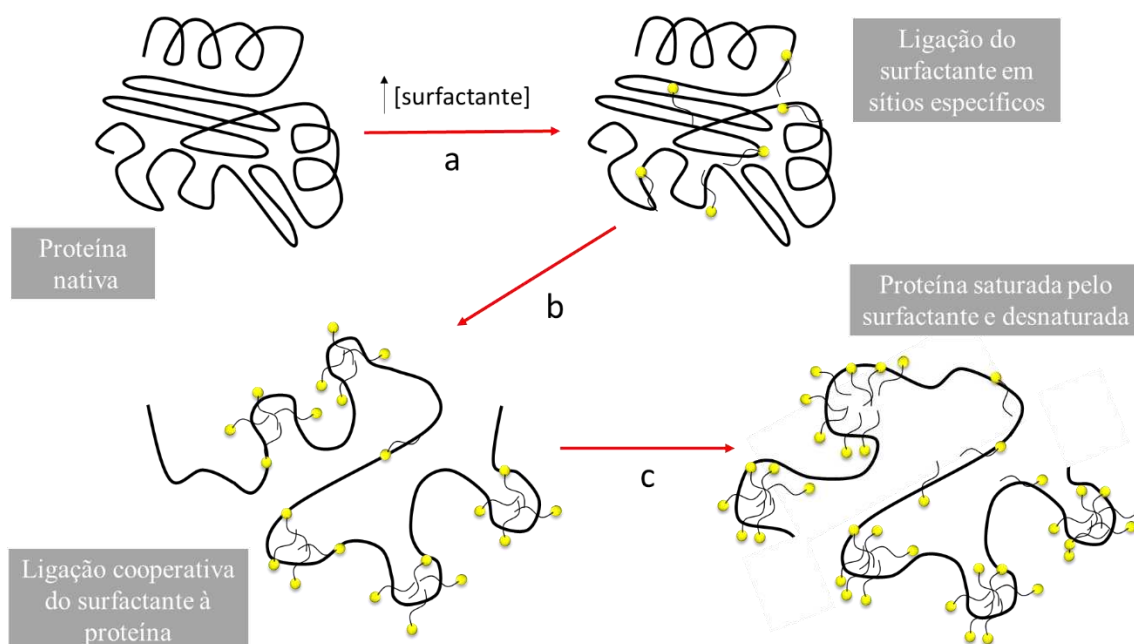


Figura 1.4. Esquema geral para o mecanismo de interação entre proteínas e surfactantes iônicos que tem como consequência a desnaturação da biomolécula. A concentração de surfactante aumenta no sentido das setas. (●) cabeça do surfactante e (—) cauda do surfactante.

A morfologia do complexo proteína-surfactante na concentração de saturação foi investigada por diversos pesquisadores e diferentes modelos estruturais foram propostos. Gudixsen et al.³³ têm revisado ao menos cinco modelos que descrevem a estrutura de agregados proteína-SDS desnaturados. Dentre estes destacam-se: (i) agregados de surfactantes alongados ao redor dos quais a proteína está localizada;²³ (ii) agregados cilíndricos de surfactantes em torno dos quais os segmentos hidrofílicos do polipeptídeo

estão ligados³⁴ e (iii) agregados micelares distribuídos randomicamente ao longo da cadeia polipeptídica. O último é o mais utilizado na descrição de agregados surfactante-proteína.^{26,32,35,36}

A saber, a maioria dos trabalhos que culminaram na elaboração de um mecanismo de interação proteína-surfactante iônico é proveniente de estudos avaliando a ligação do surfactante SDS à proteínas globulares. Por volta de 1968 já estava bem estabelecido que este surfactante forma complexos saturados com proteínas numa proporção de 1-1,4 g do surfactante para 1 g da biomolécula³⁷ e muito já se sabia da natureza das interações (eletrostáticas ou hidrofóbicas) que regem a formação de agregados proteína-SDS.

Dentre os diversos fatores dos quais depende a intensidade da interação proteína-surfactante iônico (estrutura da proteína, carga e hidrofobicidade do surfactante, força iônica, temperatura, pH, entre outros), a dependência com o pH deve ser destacada. Avaliando-se o efeito do pH na formação de complexos proteína-surfactante iônico, a importância das forças eletrostáticas na interação entre estes compostos tem sido provada.³⁸⁻⁴⁰ Em valores de pH superiores ao ponto isoelétrico (pI) da proteína, surfactantes aniônicos interagem fracamente com a biomolécula em virtude das repulsões eletrostáticas entre o grupo cabeça do surfactante e a cadeia polipeptídica que apresenta carga líquida negativa nesta condição de pH. Por outro lado, em valores de pH inferiores ao pI, nos quais as proteínas encontram-se com carga líquida positiva, a atração eletrostática entre os resíduos de aminoácidos carregados positivamente e o grupo hidrofílico do surfactante carregado negativamente torna a interação bastante intensa.

A destacar, quando monômeros de um surfactante aniônico ligam-se à cadeia polipeptídica de uma proteína com carga líquida positiva ($\text{pH} < \text{pI}$), a carga líquida do agregado proteína-surfactante formado é cada vez mais próxima da neutralidade à medida que a concentração de surfactante aumenta. Nessa condição, em alguma concentração do

surfactante a precipitação de um complexo proteína-surfactante pode ocorrer devido ao favorecimento de interações hidrofóbicas entre os agregados.²⁸ Ao passo que mais monômeros do surfactante ligam-se à proteína, a carga líquida deste complexo afasta-se da neutralidade e a dissolução do mesmo pode ser observada. Evento similar pode ser verificado na interação entre surfactantes catiônicos e proteínas com carga líquida negativa ($\text{pH} > \text{pI}$).³¹ A ocorrência destes fenômenos envolve um balanço delicado de forças eletrostáticas e hidrofóbicas que se contrapõe na estabilização do agregado proteína-surfactante em solução.

Apesar dos sistemas proteína-surfactante serem estudados há um longo tempo e já serem bem conhecidos, questões em aberto ainda movimentam o trabalho científico nesta área. Otzen,⁸ em um trabalho de revisão, tem identificado uma série de questões envolvendo a pesquisa de sistemas proteína-surfactante entre as quais nos chamam a atenção: (i) em que extensão o processo de desnaturação de proteínas por surfactantes iônicos é reversível? (ii) como as condições do solvente podem afetar o modo pelo qual estes surfactantes desnaturam proteínas? e (iii) surfactantes aniônicos podem imitar membranas biológicas? É neste cenário que estudos recentes utilizando técnicas sofisticadas e complementares em sistemas envolvendo uma maior variedade de proteínas e surfactantes têm se desenvolvido.

Dos registros de artigos da literatura reportando o estudo de sistemas proteína-surfactante a grande maioria remete a proteínas globulares bem conhecidas como lisozima,^{28,41,42} albumina do soro bovino^{43,44} e tripsina.^{45,46} Por outro lado, estudos envolvendo metaloproteínas, como é o caso das proteínas da classe das transferrinas, são escassos.⁴⁷ Em resposta à deficiência de trabalhos envolvendo proteínas desta natureza nós investigamos a interação entre a proteína lactoferrina e diferentes surfactantes aniônicos.

A lactoferrina é uma proteína da família das transferrinas (proteínas com a capacidade de se ligar a átomos de ferro) encontrada em níveis elevados no leite de diversos mamíferos e, em menor extensão, em diversos outros fluidos secretórios.^{48,49} A presença desta proteína nestes organismos vivos está associada a uma série de funções biológicas importantes, em especial:⁴⁸ (i) transporte de ferro na corrente sanguínea; (ii) regulação da absorção deste elemento no intestino e (iii) resposta imune e proteção contra infecção microbiana. É bem estabelecido que a presença do átomo de ferro nesta proteína é responsável por um aumento de sua estabilidade frente à desnaturação térmica,⁵⁰ não sendo conhecido ainda a importância deste elemento na estabilização da biomolécula frente à desnaturação induzida por surfactantes.

1.2.2.2. Interação Polímero-surfactante

As primeiras investigações envolvendo sistemas formados por um polímero e um surfactante datam dos anos de 1950 a 1960, sendo Saito⁹ considerado o autor mais influente na época e cujos trabalhos ainda influenciam os estudos atuais. A partir dos inúmeros trabalhos consolidados nesta área, algumas características gerais do comportamento de sistemas polímero-surfactante têm sido estabelecidas e são apresentadas a seguir.

Quando na presença de um polímero, em meio aquoso, surfactantes são capazes de agregar-se em uma concentração menor do que sua cmc, num processo em que o polímero é dito ser um facilitador do fenômeno de auto-associação do surfactante.¹² Esta concentração, que indica o início da ligação do surfactante à macromolécula, é denominada concentração de agregação crítica (cac). A concentração na qual a cadeia da macromolécula torna-se saturada pelo surfactante é também uma concentração crítica importante para caracterizar o processo de interação polímero-surfactante, sendo denominada concentração de saturação (C_2). Tanto a cac quanto a C_2 dependem de vários

fatores, a destacar: estrutura do polímero, hidrofobicidade e carga do surfactante, presença de aditivos (cossolutos ou cossolventes) e temperatura.⁵¹⁻⁵⁵ Além disso, o valor de C_2 depende linearmente da concentração de polímero no sistema, o que não é verificado para a cac que é praticamente independente deste parâmetro.⁵⁶

Uma terceira concentração crítica para caracterizar o processo de interação polímero-surfactante é mencionada em alguns textos^{56,57} para definir a concentração acima da qual micelas de surfactante livre começam a ser formadas em solução e passam a coexistir com agregados polímero-surfactante. Esta concentração é denominada concentração de micela livre (c_m). Em virtude do valor da c_m ser muito próximo do valor da C_2 , a maioria das técnicas experimentais são incapazes de diferenciar entre estas duas concentrações críticas, sendo comum afirmar que micelas de surfactante livre começam a ser formadas acima de C_2 . Bloor e coautores,⁵⁸⁻⁶⁰ combinando calorimetria de titulação isotérmica com eletrodo seletivo de surfactante, descreveram uma metodologia para obter estas duas grandezas.

Em alguma extensão, evidências da diferenciação entre as grandezas C_2 e c_m são fornecidas a partir do estudo das propriedades superficiais dos sistemas formados por polímeros e surfactantes. Curvas de tensão superficial versus o logaritmo da concentração de surfactante em água possuem uma única concentração crítica, a qual é definida como a cmc do surfactante (figura 1.5a). Quando estas curvas são obtidas na presença do polímero elas comumente apresentam duas concentrações críticas, as quais são usualmente definidas como os valores de cac e C_2 (figura 1.5b).⁶¹ No entanto, alguns autores têm observado até três concentrações críticas para alguns sistemas particulares, duas das quais encontram-se na região em torno da concentração em que o polímero torna-se saturado pelo surfactante (figura 1.5c).⁶² A primeira destas é a concentração de saturação do polímero (C_2); acima de C_2 , ocorre uma redução abrupta da tensão

interfacial do sistema à medida que a concentração de surfactante aumenta, indicando um acúmulo de monômeros no “bulk” da solução. Esse fenômeno acontece até que a c_m seja atingida, quando micelas livres começam a ser formadas em solução.

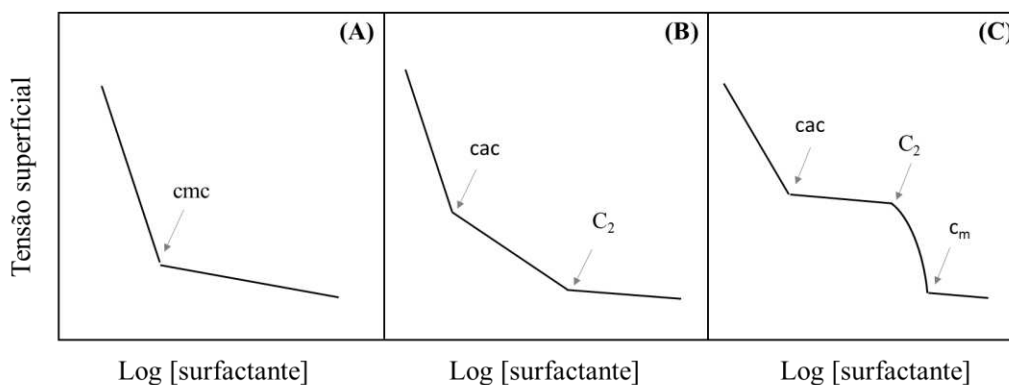


Figura 1.5. Esboço de curvas de tensão superficial versus o logaritmo da concentração de surfactante. A curva em (A) é obtida para diferentes concentrações do surfactante em água; as curvas em (B) e (C) são obtidas para diferentes concentrações do surfactante em soluções aquosas de um polímero.

Em certos sistemas polímero-surfactante, medidas de tensão superficial constataram que pode existir um máximo na curva de tensão superficial versus concentração de surfactante, na região entre a cac e a C_2 . Este fenômeno é observado, por exemplo, no sistema PVP-SDS em concentrações de polímero superiores a 1% e indica uma mudança de composição (razão e quantidade de polímero e surfactante) na interface, na faixa de concentração em que ocorre a ligação dos monômeros de SDS à cadeia do PVP.⁶³ No entanto, esse perfil na curva de tensão superficial versus concentração de surfactante mostra-se uma importante função da atividade superficial do polímero, sendo verificado que polímeros mais ativos superficialmente interagem mais intensamente com surfactantes.⁶²

A respeito da morfologia dos agregados, a primeira proposta a ganhar força na comunidade científica, e que se estende aos dias atuais, foi feita por Cabane no ano de 1977.⁶¹ A partir de medidas de ressonância magnética nuclear em sistemas constituídos por poli(óxido de etileno), PEO, e SDS, Cabane sugeriu que os agregados PEO-SDS poderiam ser descritos como micelas mistas consistindo de uma pequena parte de segmentos de óxido de etileno adsorvidos sobre a superfície de agregados de SDS (na região entre 2 a 3 átomos de carbono próximo ao grupo cabeça do surfactante); o autor ainda propôs que alguns dos segmentos de PEO estariam adsorvidos na interface água-micela, enquanto a maioria destes segmentos está em uma conformação enovelada, interagindo com as moléculas do solvente. A figura 1.6 mostra uma representação bidimensional da estrutura dos agregados PEO-SDS proposta por Cabane.

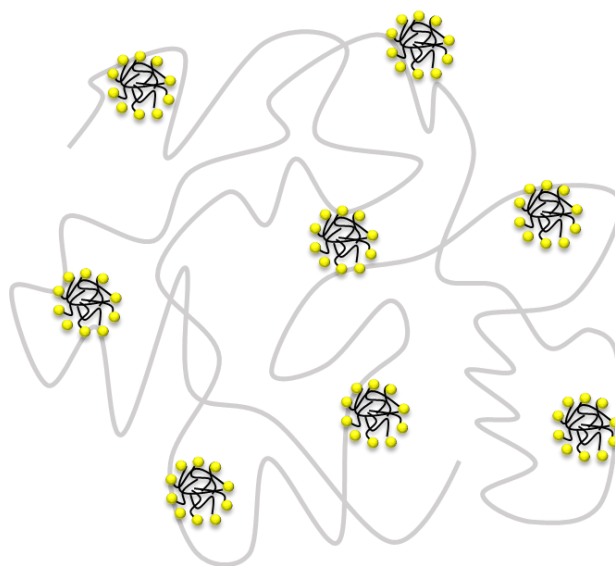


Figura 1.6. Representação bidimensional da estrutura dos agregados PEO-SDS proposta por Cabane:⁶¹ a linha em cinza representa a macromolécula do PEO, a qual se encontra adsorvida sobre as micelas do surfactante. (●) cabeça do surfactante e (—) cauda do surfactante.

Assim como ocorre no campo de pesquisa de sistemas proteína-surfactante, no estudo de sistemas polímero-surfactante existe uma diversidade de estruturas de polímeros, surfactantes e solventes que podem ser combinados entre si para originar sistemas coloidais com propriedades físico-químicas únicas. No entanto, explorar as características particulares associadas a cada um destes sistemas está fora dos objetivos deste trabalho. Neste sentido, visto o grande interesse em sistemas formados por PEO e SDS, um dos sistemas polímero-surfactante mais estudados pela comunidade científica¹² e de interesse nessa tese, um foco nos sistemas formados por estes dois compostos tem sido dado nesta parte da revisão.

Os estudos de sistemas formados pela mistura de PEO e SDS iniciaram-se no ano de 1967 com o trabalho de Jones⁶⁴ que formalizou vários dos conceitos utilizados no campo de estudo de sistemas polímero-surfactante. A partir de então diversas técnicas têm sido aplicadas no estudo deste sistema entre as quais destacam-se condutimetria,^{20,64} tensiometria,^{20,65} viscosimetria,^{57,66} calorimetria de titulação isotérmica,^{56,67,68} espalhamento de luz,^{69,70} espalhamento de nêutrons,^{71,72} e espectrometria de fluorescência.⁷³

No que se refere ao mecanismo da interação entre PEO e SDS, é sugerido que o balanço de dois eventos principais controlam a maneira pela qual PEO de massa molar elevada interage com SDS.^{56,68} O primeiro evento, um processo endotérmico em concentrações menores de SDS, corresponde à ligação cooperativa de micelas de SDS de baixo número de agregação aos segmentos de PEO desidratados e é governado por interações puramente hidrofóbicas; neste evento, os segmentos de óxido de etileno do PEO interagem com as caudas hidrofóbicas do surfactante no núcleo dos agregados de SDS. O segundo evento, um processo exotérmico em concentrações elevadas de SDS, refere-se à reidratação da cadeia do polímero promovida pela transferência dos segmentos

de PEO solubilizados no interior das micelas para a superfície micelar; neste processo, a associação do surfactante ao polímero se dá por meio de interações íon-dipolo. Após a saturação da macromolécula de PEO pelo SDS, o aumento da concentração de SDS leva à formação de micelas livres em solução. O evento exotérmico não é observado quando PEO de massa molecular entre 400 e 4000 g mol⁻¹ é utilizado e nenhuma ligação de SDS ao PEO é verificada com PEO de massa molecular inferior a 400 g mol⁻¹.⁵⁶

A interação entre PEO e SDS tem sido estudada sob diferentes condições termodinâmicas, ficando demonstrado que mudanças nas propriedades do solvente podem alterar as características de agregação entre o polímero e o surfactante. Dai e Tam,⁵² utilizando a técnica de ITC, avaliaram a interação PEO-SDS em soluções aquosas de diferentes glicóis. Os autores demonstraram que a diminuição da polaridade do solvente pela adição de glicol em água aumenta a cac do surfactante, o qual não forma agregados com o PEO na presença de concentrações elevadas do cossolvente.

Barbosa et al.,⁶⁹ utilizando a mesma técnica, avaliaram o efeito da adição de diferentes eletrólitos (NaCl, Na₂SO₄, NaSCN, Li₂SO₄ e Na₂[Fe(CN)₅NO]) sobre as forças motrizes associadas com o processo de interação PEO-SDS. Eles mostraram que concentrações de 10 e 100 mM de NaCl, Na₂SO₄, NaSCN, Li₂SO₄ são capazes de diminuir a cac, aumentar a C₂ e estabilizar o agregado PEO-SDS, mas sem modificar muito as energias de interação intermolecular associadas à ligação do SDS ao PEO. Por outro lado, verificaram que o eletrólito Na₂[Fe(CN)₅NO] afeta em grande extensão as curvas de ITC associadas à interação PEO-SDS, o que é atribuído a uma interação específica do sal complexo com as unidades de óxido de etileno do polímero.

Nenhum outro trabalho avaliando o efeito de cossolutos ou cossolventes na interação PEO-SDS tem sido encontrado. No entanto, dado o efeito que diferentes cossolutos ou cossolventes podem apresentar sobre esta interação, novos estudos na

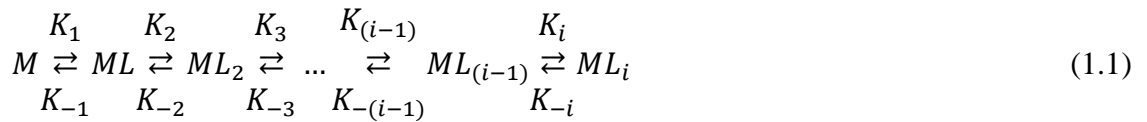
presença de compostos emergentes e com propriedades únicas são estratégicos. Por estes aspectos, o estudo da interação entre PEO e SDS na presença de uma classe emergente de substâncias, os Líquido iônicos, é uma das propostas deste trabalho.

1.2.3. Cooperatividade

Um aspecto comum observado nas propostas de mecanismos de interação proteína-surfactante e polímero-surfactante diz respeito a uma faixa de concentração do surfactante em que ocorre uma associação cooperativa entre a macromolécula e o surfactante. Neste sentido, justifica-se detalhar mais a fundo as características associadas com este fenômeno de ligação.

A associação cooperativa está entre os fenômenos moleculares que mais intrigam os pesquisadores no estudo de interações intermoleculares, sobretudo interações que determinam a ocorrência de processos biológicos como, por exemplo: ligação de oxigênio à hemoglobina humana,⁷⁴ atividade enzimática,^{75,76} regulação de expressão de genes^{77,78} e ligação de pequenas moléculas ao DNA.⁷⁹

Em sistemas de macromoléculas que contenham mais de um sítio de ligação para um ligante, a cooperatividade é caracterizada pela dependência da constante de equilíbrio (associada com a ligação do ligante a um sítio da macromolécula) com o avanço da reação. Em outras palavras, à medida que um sítio de ligação na macromolécula é ocupado por uma molécula do ligante, a “afinidade” dos demais sítios de ligação pelas moléculas do ligante é afetada.⁸⁰ Se uma macromolécula M possui i sítios de ligação idênticos disponíveis para a ligação com um ligante L , as etapas de ligação do ligante à macromolécula para formar o complexo ML_i pode ser esquematizada da seguinte forma:



em que K_1, K_2, \dots, K_i são as constantes de equilíbrio das reações diretas e $K_{-1}, K_{-2}, \dots, K_{-i}$ são as constantes de equilíbrio das reações inversas. Se o processo de ligação é cooperativo, cada molécula do ligante que se liga à macromolécula na etapa i altera a constante de ligação na etapa $i+1$ e, portanto, $K_i \neq K_{(i+1)}$.

Os primeiros modelos descrevendo processos de associação cooperativa foram propostos por Hill, no início do século XX, para descrever a ligação de oxigênio à hemoglobina.⁸¹ Apesar da existência de outros modelos mais completos para caracterizar este tipo de associação (que não serão tratados aqui), atualmente, medidas quantitativas de cooperatividade em sistemas biomolécula-ligante são tipicamente ajustadas à equação de Hill:

$$\theta = \frac{K[L]^{n_H}}{1 + K[L]^{n_H}} \quad (1.2)$$

em que θ é a fração de sítios ligados, $[L]$ é a concentração de ligante, K é uma constante aparente de associação e n_H é o coeficiente de Hill. Se $n_H > 1$ é dito que o sistema sob estudo apresenta cooperatividade positiva, ou seja, a ligação de uma molécula do ligante a um sítio de ligação na macromolécula aumenta a “afinidade” das demais moléculas do ligante pelo próximo sítio a ser ocupado; por outro lado, $n_H < 1$ indica cooperatividade negativa e a ligação de uma molécula do ligante a um sítio de ligação na macromolécula diminui a “afinidade” entre o ligante e o próximo sítio a ser ocupado. Valores de n_H iguais à unidade indicam que os sítios de interação sobre a macromolécula são independentes e não ocorre cooperatividade.^{80,82}

1.2.4. Líquidos Iônicos

Os líquidos iônicos (LIs) são eletrólitos que, em contraste aos sais comuns como NaCl, Li₂SO₄ e KBr, apresentam ponto de fusão abaixo de 100 °C. Dentre as propriedades que os tornam alvos de diversas áreas de pesquisa destacam-se sua alta estabilidade térmica e química, alta solubilidade, densidade elevada, baixa pressão de vapor e grande capacidade de alterar a camada de solvatação de espécies químicas quando em solução aquosa.⁸³⁻⁸⁵

A síntese dos primeiros LIs data do início do século XX, sendo o nitrato de etilamônio, [EtNH₃][NO₃], o primeiro líquido iônico a ser reportado na literatura.⁸⁶ A exemplo deste, a maioria dos LIs sintetizados e estudados até o final da década de 1970 era instável ao ar e à água. Porém, este contexto mudou com a síntese dos primeiros líquidos iônicos baseados em cátions imidazólicos (figura 1.7) que, atualmente, estão entre as principais classes de LIs estudadas.

A estrutura dos LIs é usualmente formada por um ânion de natureza inorgânica e um cátion de natureza orgânica de baixa simetria e as suas propriedades físico-químicas são diretamente dependentes da combinação cátion-ânion que dá origem ao composto. Por haver um número tão grande de estruturas de cátions e ânions que podem se combinar entre si para formar os LIs, a síntese de um líquido iônico pode ser planejada para atingir um objetivo específico.⁸⁶

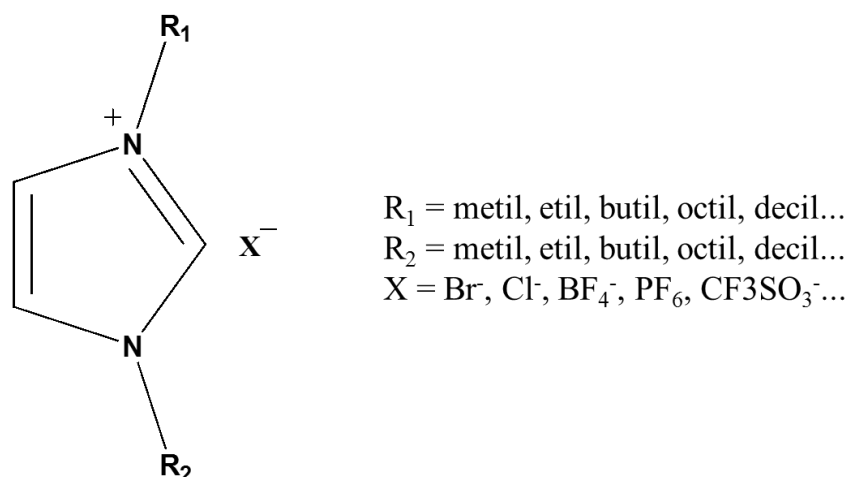


Figura 1.7. Estrutura molecular de um líquido iônico imidazólico.

O interesse da comunidade científica pelos LIs surgiu com a premissa de que eles poderiam substituir os tradicionais solventes orgânicos, voláteis e tóxicos, em vários processos industriais.⁸⁷ No entanto, a capacidade de estes compostos participarem e modificarem uma série de processos físico-químicos tem feito deles mais do que simplesmente solventes. Atualmente, líquidos iônicos são utilizados, por exemplo, como catalisadores,⁸⁸ como eletrólitos em células solares,⁸⁹ no desenvolvimento de biossensores,⁹⁰ como estabilizantes de proteínas e ativadores de enzimas^{91,92} e na formação de filmes ordenados.⁹³

O papel dos LIs na química de sistemas coloidais vem se destacando pela capacidade destes compostos afetarem em grande extensão as propriedades de fase de sistemas poliméricos^{94,95} e sistemas de surfactantes.^{96,97} Além disto, determinadas classes de LIs são sintetizadas com propriedades de surfactantes, sendo investigadas suas propriedades de comportarem-se como tal em soluções aquosas⁹⁸ ou atuarem como cossurfactantes.⁹⁹ Aqui, nós temos investigado o papel de LIs imidazólicos sobre o fenômeno de interação entre o surfactante SDS e o polímero PEO.

1.3. Ferramentas para o Estudo da Interação Macromolécula-surfactante

O processo de interação entre macromoléculas e surfactantes compreende uma série de eventos moleculares que dependem de vários fatores, a citar: as características estruturais da macromolécula e do surfactante, as propriedades do solvente, o pH do meio e a temperatura do sistema. A compreensão destes eventos é possível por meio da interpretação das propriedades físico-químicas do sistema de interesse que são obtidas a partir de uma variedade de técnicas entre as quais se destacam a calorimetria de titulação isotérmica, a calorimetria diferencial de varredura e a espectroscopia de fluorescência. A seguir são apresentados os princípios gerais que dão base à utilização destas técnicas e permitem que elas sejam utilizadas em estudos de sistemas complexos contendo macromoléculas e surfactantes.

1.3.1. Calorimetria de Titulação Isotérmica

A calorimetria de titulação isotérmica (ITC) tem sido amplamente utilizada no estudo da interação entre macromoléculas e surfactantes sendo uma ferramenta importante na obtenção de parâmetros termodinâmicos associados ao processo de formação de agregados proteína-surfactante e polímero-surfactante.^{55,69,100-102} Esta técnica permite obter diretamente a energia na forma de calor liberada ou absorvida durante a ocorrência de um evento molecular no interior de um calorímetro, em um procedimento de titulação a temperatura constante. Para esclarecer alguns fundamentos desta técnica, na figura 1.8 é apresentada uma ilustração esquemática de um calorímetro de titulação isotérmica que opera por fluxo de calor.

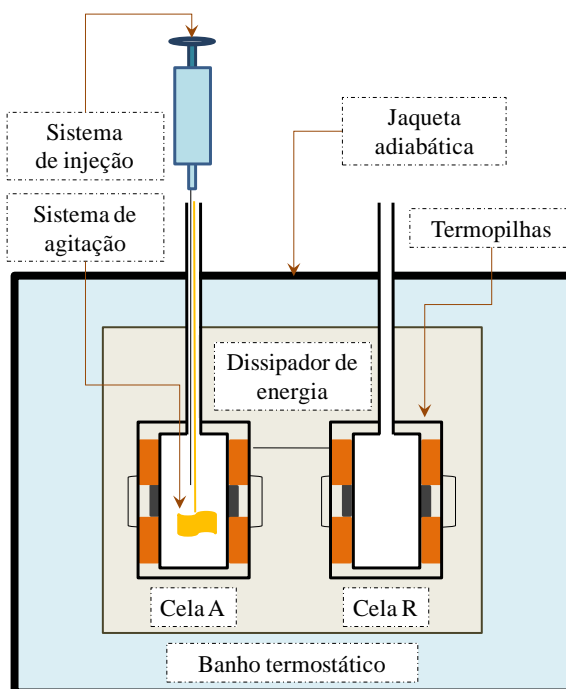


Figura 1.8. Esquema de um calorímetro de titulação isotérmica que opera por fluxo de calor.

Neste dispositivo duas celas calorimétricas (volume usual de 1 a 4 mL), uma de referência (cela R) e outra de amostra (cela A), de capacidades caloríficas e propriedades térmicas muito próximas estão localizadas no interior de um ambiente de temperatura altamente controlada. Este ambiente é delimitado por uma grande massa de metal (um dissipador de energia) que se encontra em equilíbrio térmico com um banho termostático revestido por uma jaqueta adiabática. Interposto entre as celas calorimétricas e o dissipador de energia encontra-se um conjunto de termopilhas semicondutoras responsável pela detecção da energia na forma de calor que é absorvida ou liberada pelos sistemas no interior das celas calorimétricas. O compartimento onde as celas se localizam é construído de modo a permitir o fluxo de energia entre as celas e o dissipador de energia apenas através das termopilhas.

Em um experimento típico de ITC, o titulante é adicionado passo a passo à cela de amostra em volumes de injeção fixos variando de 1 a 15 μL de acordo com as características do equipamento e propriedades do sistema sob investigação. Um intervalo de tempo bem definido é estabelecido entre as injeções que são realizadas utilizando-se uma seringa de alta precisão controlada por um sistema automatizado. Em geral, em experimentos de interação macromolécula-surfactante o titulante é uma solução de surfactante cerca de 10 a 20 vezes o valor de sua cmc e o titulado é uma solução da macromolécula em uma concentração pré-determinada.¹² Um agitador na cela de amostra é utilizado para acelerar o processo de homogeneização do titulante na solução titulada.

Quando as soluções se misturam no interior da cela de amostra após uma injeção, processos termodinâmicos envolvendo o rompimento e a formação de interações intermoleculares ocorrem promovendo a variação da temperatura da cela que tem a pressão em seu interior mantida constante. Para que o equilíbrio térmico seja novamente alcançado surge um fluxo de energia na forma de calor (q) entre sistema e vizinhança, o qual é detectado através das termopilhas. Quando energia na forma de calor flui através delas, uma diferença de potencial elétrico (V) proporcional à taxa de absorção ou liberação de energia pelas celas é medida entre os seus terminais podendo ser utilizado na determinação de q .

Os dados brutos são fornecidos como um gráfico de potência (\mathcal{P}) em função do tempo (t) (figura 1.9) e o valor de q referente a cada injeção pode ser calculado pela integral da curva no intervalo de tempo adequado ($q = \int_{t_1}^{t_2} \mathcal{P} dt$ em que t_1 é o tempo no início da injeção e t_2 o tempo no qual a linha base retorna ao seu valor inicial).

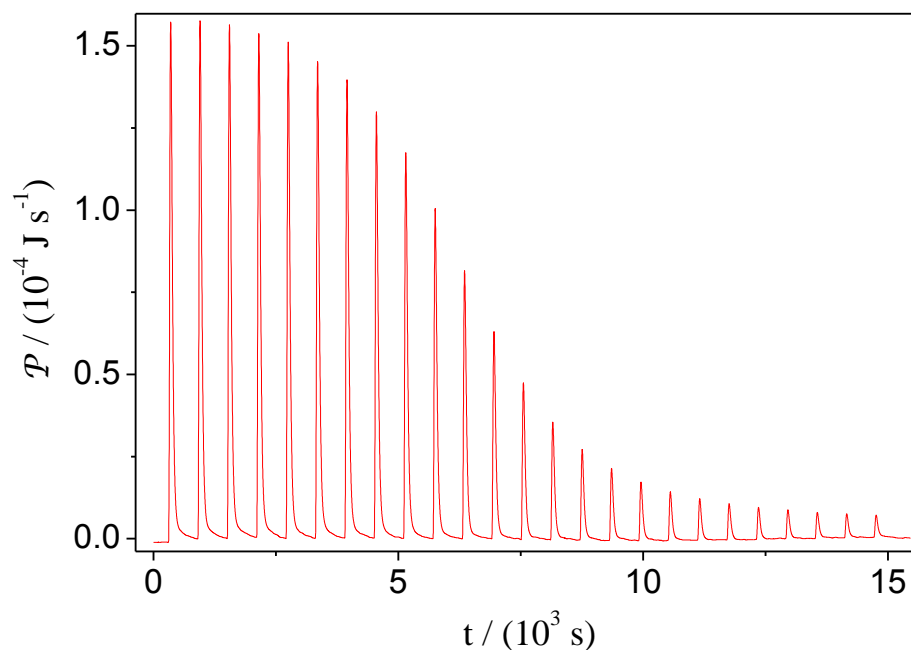


Figura 1.9. Termograma obtido em um calorímetro de titulação isotérmica a partir da titulação de uma solução de BaCl_2 100 mM sobre uma solução de 18-crown-6 5 mM. Cada injeção consistiu da adição de 4 μL do titulante e o volume inicial de titulado na cela foi de 0,85 mL.

A utilização de uma cela de referência proporciona a diminuição do ruído da linha base por se eliminar pequenas flutuações do termostato que regula a temperatura do banho termostático. Assim, a potência fornecida pelo equipamento leva em consideração a diferença entre o fluxo de energia na cela de amostra e na cela de referência.¹⁰³

Nas condições de medida, o valor de q obtido corresponde à variação de entalpia do processo termodinâmico ocorrido no interior da cela de amostra, conforme demonstrado a seguir.

Seja um sistema termodinâmico qualquer, para o qual a primeira lei da termodinâmica em sua forma diferencial simplificada fornece $dU = dq + dw$, em que U

é a energia interna do sistema e q e w são as quantidades de energia trocadas entre sistema e vizinhança nas formas de calor e trabalho, respectivamente.

Se por algum processo termodinâmico este sistema passa de um estado inicial i a um estado final f , a variação de energia interna do sistema pode ser obtida por:

$$\int_i^f dU = \int_i^f dq + \int_i^f dw \quad (1.3)$$

Se no referido processo for permitido apenas a ocorrência de trabalho de expansão contra uma pressão P_{ext} das vizinhanças, a equação 1.3 torna-se:

$$\Delta U = U_f - U_i = q - \int_i^f P_{ext} dV \quad (1.4)$$

Que para um processo a pressão constante fornece:

$$\Delta U = U_f - U_i = q - P_{ext}(V_f - V_i) \quad (1.5)$$

Se o sistema estiver em equilíbrio mecânico com suas vizinhanças tem-se $P = P_{ext}$, em que P é a pressão do sistema, e a equação 1.5 pode ser escrita como:

$$U_f - U_i = q - P(V_f - V_i) \quad (1.6)$$

Reorganizando os termos na equação 1.6 obtém-se:

$$(U_f + PV_f) - (U_i + PV_i) = q \quad (1.7)$$

À quantidade $U + PV$, que aparece frequentemente em termodinâmica, dá-se o nome de entalpia (H) e define-se:

$$H \equiv U + PV \quad (1.8)$$

Utilizando esta definição na equação 1.7 obtém-se:

$$q = H_f - H_i = \Delta H \quad (1.9)$$

demonstrando que, para um sistema passando por um processo termodinâmico a pressão constante, limitado a realizar apenas trabalho de expansão e em equilíbrio mecânico com suas vizinhanças, a quantidade de energia trocada entre sistema e vizinhança na forma de calor é numericamente igual à variação de entalpia para o referido processo.

Conseqüentemente, em um experimento de interação entre uma macromolécula e um surfactante, a variação de entalpia por mol de surfactante adicionado (ΔH_{obs}) em cada injeção no experimento de titulação, também denominada variação de entalpia observada, pode ser determinada. Por conseguinte, o perfil da curva de ΔH_{obs} versus concentração de surfactante pode fornecer informações importantes sobre os eventos moleculares que ocorrem durante o processo de interação.

1.3.2. Calorimetria Diferencial de Varredura

Os parâmetros termodinâmicos obtidos a partir da técnica de ITC em estudos de interação proteína-surfactante resultam da contribuição de diferentes subprocessos moleculares como alterações conformacionais da biomolécula, mudanças na estruturação das moléculas de solvente e alterações no estado de protonação das espécies durante o processo de associação.¹⁰³ Assim, embora a técnica de ITC seja particularmente adequada para acompanhar as variações energéticas em um processo de associação entre proteínas e surfactantes, sua combinação com outras técnicas é fundamental para elucidação dos fenômenos envolvidos. Uma técnica complementar neste sentido é a calorimetria diferencial de varredura (DSC).^{27,104,105}

A fim de elucidar os princípios gerais da técnica de DSC, a figura 1.10 ilustra um esquema geral de um calorímetro diferencial de varredura que opera por compensação de potência.

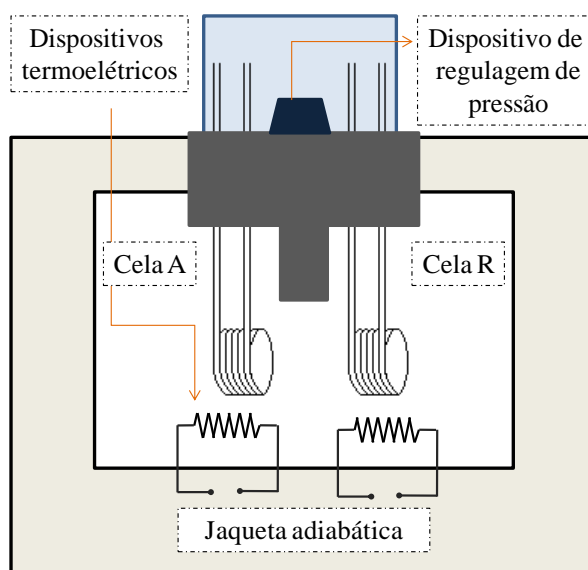


Figura 1.10. Esquema de um calorímetro diferencial de varredura que opera por compensação de potência.

Neste equipamento uma cela de amostra (cela A) e outra de referência (cela R) encontram-se no interior de uma jaqueta adiabática e têm sua temperatura controlada por dispositivos termoeletrônicos independentes. Um dispositivo de regulagem de pressão é responsável por controlar a pressão que atua sobre as soluções no interior das células.

Em um experimento típico de DSC no estudo de proteínas, a cela de amostra é preenchida com uma solução da biomolécula de interesse enquanto a cela de referência é preenchida com o solvente no qual ela foi preparada. Em experimentos para investigação da interação entre uma proteína e um surfactante, o surfactante deve estar presente tanto na cela de amostra quanto na cela de referência, na mesma concentração. Esse

procedimento garante que qualquer efeito do surfactante sobre as propriedades do “bulk” da solução seja corrigido e apenas mudanças devido à interação macromolécula-surfactante sejam consideradas.

Com as celas preenchidas, o sistema é fechado para que a temperatura inicial e a pressão possam ser reguladas. Estabelecido o equilíbrio térmico e mecânico, os dispositivos termoelétricos iniciam o aquecimento (ou resfriamento) das celas por meio do fornecimento (ou remoção) de energia na forma de calor. Estes dispositivos são regulados de maneira a permitir que ambas as celas estejam sempre à mesma temperatura o que é conseguido regulando-se as taxas de transferência de energia na forma de calor para cada cela independentemente. Isso é possível uma vez que cada cela possui seu próprio dispositivo termoelétrico (figura 1.10). A temperatura das celas é programada para variar em uma taxa linear enquanto a pressão permanece constante em um valor de 2 a 3 vezes superior à pressão atmosférica.

A diferença entre taxas de transferência de energia introduzida (ou removida) em ambas as celas resulta da diferença de capacidade calorífica entre elas. Esta diferença pode estar associada à quantidade de energia em excesso que é liberada (ou absorvida) pela macromolécula na cela de amostra durante a ocorrência de algum processo molecular específico que envolve o rompimento e formação de interações intermoleculares.¹⁰⁶

Conhecendo-se a taxa de transferência de energia na forma de calor (dq_p/dt), em que o subscrito p denota um processo a pressão constante) em cada cela e a taxa de variação da temperatura das celas com o tempo (dT/dt), é possível determinar a diferença de capacidade calorífica a pressão constante (ΔC_p) entre a cela de amostra, $C_p(A)$, e a cela de referência, $C_p(R)$, de acordo com a equação 1.10.

$$\frac{(dq_p/dt)_A - (dq_p/dt)_R}{dT/dt} = C_p(A) - C_p(R) = \Delta C_p \quad (1.10)$$

Os dados gerados a partir dos experimentos são representados em um termograma que mostra ΔC_p em função da temperatura das celas. Uma vez que C_p é a taxa de variação da entalpia com a temperatura, a entalpia associada a algum processo molecular decorrente do processo de aquecimento (ou resfriamento) entre uma temperatura T_1 e T_2 pode ser obtida pela integral definida da curva de ΔC_p versus T, de acordo com a equação 1.11:

$$\Delta H = \int_{T_1}^{T_2} \Delta C_p dT \quad (1.11)$$

No estudo de proteínas, as informações obtidas por meio da técnica de DSC são muito relevantes.¹⁰⁷ Sob aquecimento, proteínas passam por um processo de desnaturação que consiste da perda de sua estrutura terciária e/ou secundária a partir do rompimento de interações intramoleculares que estabilizam sua estrutura nativa, como forças de van der Waals, interações hidrofóbicas e eletrostáticas e ligações de hidrogênio. Parâmetros termodinâmicos associados a este evento podem ser obtidos a partir de um termograma como aquele representado na figura 1.11 que apresenta a curva de transição térmica da proteína globular BSA obtida em tampão acetato 0,1 M pH 5,8.

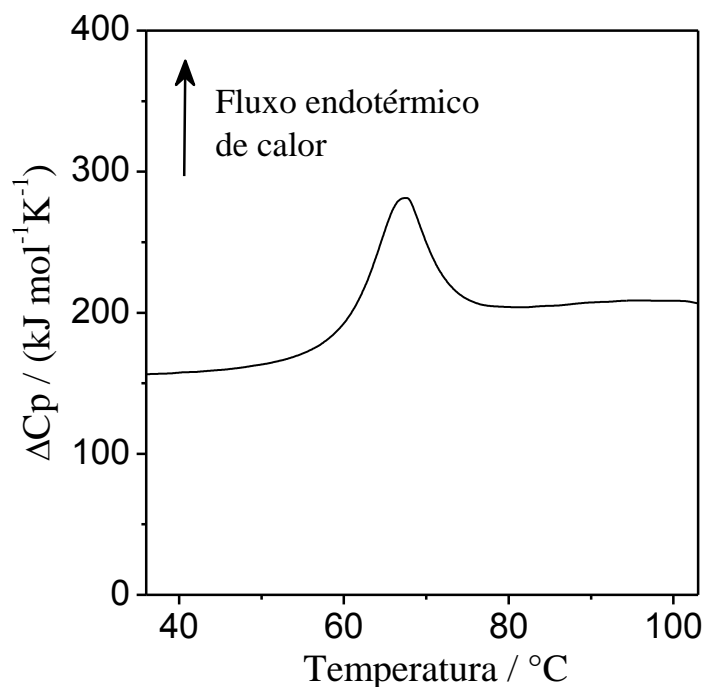


Figura 1.11. Termograma de DSC da albumina do soro bovina (BSA) obtido em tampão acetato 0,1 M pH 5,8.

O pico endotérmico que aparece na faixa de temperatura entre 60 e 80 $^{\circ}\text{C}$ é o pico correspondente ao processo de desnaturação da BSA. A integral deste pico fornece a variação de entalpia de desnaturação da proteína e a temperatura no máximo do pico é considerada ser a sua temperatura de desnaturação.

1.3.3. Espectroscopia de Fluorescência

A técnica de fluorescência é considerada uma das primeiras ferramentas de pesquisa em bioquímica e biofísica e tem sido extensivamente aplicada tanto para o estudo da interação entre proteínas e surfactantes^{25,36,108} quanto para a obtenção da concentração micelar crítica de surfactantes.¹⁰⁹⁻¹¹²

A fluorescência, assim como a fosforescência, é um fenômeno luminescente caracterizado pela emissão de fótons por uma espécie química (fluoróforo). Esse processo

é decorrente da relaxação do fluoróforo a partir de um estado eletrônico excitado para o estado fundamental, após sua excitação pela absorção de radiação eletromagnética. Entender como este fenômeno acontece requer a compreensão das características dos estados eletrônicos envolvidos. Uma representação adequada da estrutura dos estados excitados e das transições relevantes que conduzem ao fenômeno de fluorescência pode ser feita de forma conveniente por meio de um diagrama de Jablonski¹¹³ como aquele representado na figura 1.12.

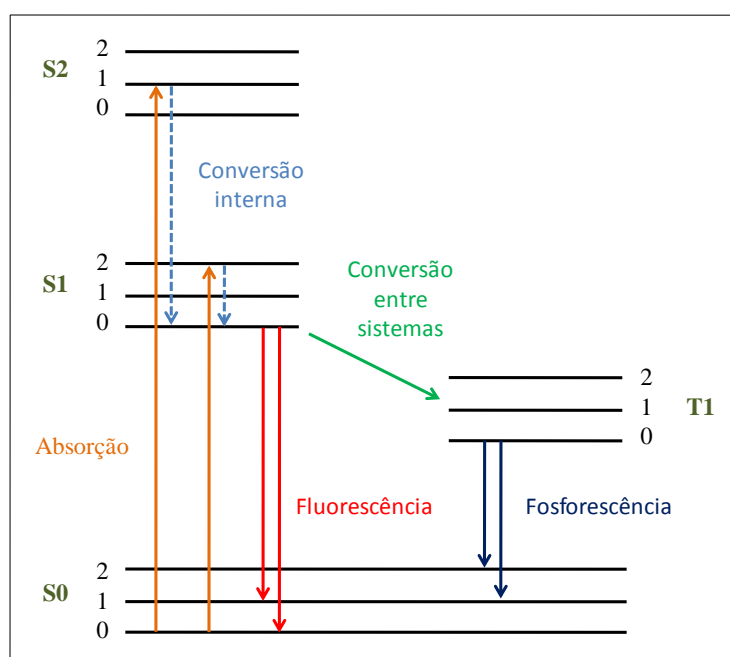


Figura 1.12. Diagrama de Jablonski.¹¹³

Nesse diagrama, S0, S1 e S2 são estados eletrônicos singletes que representam o estado fundamental, o primeiro estado excitado e o segundo estado excitado, respectivamente. T1 representa o estado tripleto de menor energia. Em cada um destes estados eletrônicos o fluoróforo pode existir em vários subníveis de energia vibracional representados pelos números inteiros 0, 1 e 2. Os estados singletes são as funções de onda

que apresentam estados de spin antissimétrico enquanto os estados tripletes são as funções de onda simétricas. A principal diferença entre estes estados está em seu tempo de vida: enquanto estados singletes têm tempo de vida na faixa de 10^{-5} a 10^{-8} segundos, os tempos de vida de estados tripletes variam entre 10^{-4} até diversos segundos. As setas mostradas no diagrama de Jablonski representam as possíveis transições entre estes estados.

Um fluoróforo em seu estado fundamental S_0 , ao absorver radiação eletromagnética, é usualmente excitado para algum dos estados vibracionais de maior energia em S_1 ou S_2 e rapidamente (10^{-12} segundos ou menos), num processo denominado de conversão interna, ele relaxa ao estado vibracional de menor energia em S_1 . Ao sofrer uma transição eletrônica do estado S_1 para qualquer um dos estados vibracionais em S_0 , o fluoróforo emite um fóton em um fenômeno conhecido por fluorescência. Se o fluoróforo sofrer uma transição de S_1 para T_1 num processo chamado de conversão entre sistemas, ao retornar para o estado fundamental ele emite um fóton em um fenômeno conhecido como fosforescência.¹¹³

Os espectros de emissão de fluorescência de um fluoróforo podem conter diversas bandas associadas a diferentes transições de fótons fluorescentes. Estes fótons apresentam comprimentos de onda maiores do que aqueles provenientes da radiação que promoveu a excitação, o que uma é consequência direta do fenômeno de conversão interna. As características destes espectros dependem de vários fatores a destacar a polaridade do solvente, a temperatura, a concentração do fluoróforo e, em especial, das interações que o fluoróforo pode realizar com determinadas moléculas. Neste último caso essas moléculas podem atuar como um supressor de fluorescência (“quencher”). A supressão de fluorescência refere-se à diminuição na intensidade de fluorescência que pode se dar de duas formas principais: a supressão estática (a diminuição da intensidade

de fluorescência é devido à formação de um complexo não fluorescente entre o fluoróforo e o supressor) e a supressão dinâmica (a diminuição da intensidade de fluorescência é a transferência de energia do fluoróforo para o supressor por meio de colisões moleculares antes que o processo de emissão ocorra).¹¹⁴

Neste trabalho a técnica de fluorescência foi utilizada para investigar a interação entre a proteína lactoferrina e diferentes surfactantes aniônicos bem como para obter a cmc dos diferentes surfactantes estudados em diversas condições termodinâmicas utilizando o pireno como sonda molecular fluorescente.

1.3.3.1. Uso da Fluorescência no Estudo da Interação Proteína-ligante

O fenômeno de fluorescência em proteínas resulta da presença de pelo menos um dos três resíduos de aminoácidos aromáticos que podem estar presentes nessas biomoléculas: triptofano (Trp), tirosina (Tyr) e fenilalanina (Phe) (figura 1.13). Apesar disso, pode-se dizer que os espectros de emissão dessas macromoléculas são dominados pela presença dos resíduos de Trp os quais apresentam absorvidade e rendimento quântico maiores do que Tyr e Phe.^{113,115,116}

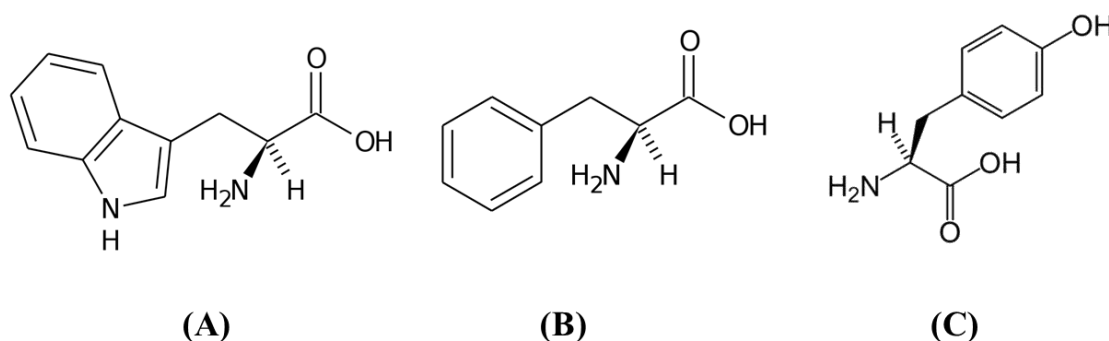


Figura 1.13. Estruturas moleculares dos aminoácidos (A) triptofano, (B) fenilalanina e (C) tirosina.

Espectros de emissão de proteínas são usualmente obtidos excitando-se a biomolécula em comprimentos de onda próximos ao seu comprimento de onda de máxima absorção (em torno de 280 nm). Entretanto, a excitação entre 295 e 305 nm permite acessar seletivamente a fluorescência devido exclusivamente aos resíduos de Trp. Isso é experimentalmente importante, pois como as proteínas tendem a possuir poucos resíduos deste aminoácido, informações locais específicas sobre alterações da estrutura da biomolécula podem ser obtidas.

A utilização de resíduos de Trp como sondas intrínsecas para acompanhar mudanças estruturais em proteínas é possível em virtude do espectro de emissão deste aminoácido ser altamente dependente da polaridade do microambiente local no qual ele se encontra:¹¹⁵ resíduos de Trp que se encontram em microambientes de baixa polaridade exibem espectro de emissão com máximo de emissão deslocado para a região do azul em comparação àqueles resíduos de Trp localizados em microambientes de maior polaridade, os quais apresentam máximo de emissão em comprimentos de onda maiores. Tal dependência ocorre devido ao elevado momento de dipolo do estado excitado do triptofano que é estabilizado em solventes de maior polaridade.

Devido a seu caráter aromático, os resíduos de Trp são frequentemente encontrados completamente ou parcialmente enclausurados no interior do núcleo hidrofóbico de proteínas, na interface entre dois domínios ou subdomínios da proteína ou na interface de sistemas de proteína formando oligômeros.¹¹⁵ Quando alguma alteração nas propriedades do sistema (mudança de temperatura, adição de um agente desnaturante, mudança da força iônica ou alteração do pH) promove o rompimento de interações intramoleculares entre resíduos de aminoácido da proteína, causando alteração de estrutura secundária, terciária ou quaternária da biomolécula, as cadeias laterais dos resíduos de Trp podem tornar-se mais expostas para o solvente. Neste processo, a

polaridade do microambiente ao redor deste aminoácido pode ser modificada, alterando as características do seu espectro de fluorescência. Como consequência, alterações ocorridas em espectros de emissão de Trp em biomoléculas frequentemente estão associadas a mudanças conformacionais e/ou a desnaturação da proteína, que torna a espectroscopia de fluorescência uma ferramenta importante para avaliar o efeito de moléculas diversas sobre a conformação destas macromoléculas.¹¹⁶

1.3.3.2. Uso da Fluorescência na Determinação da cmc de Surfactantes

Diversas técnicas têm sido reportadas na literatura para a determinação da concentração micelar crítica de surfactantes, tais como condutimetria,¹¹⁷ microcalorimetria de titulação isotérmica¹² e tensiometria.^{118,119} Entretanto, o uso da fluorescência utilizando pireno como sonda molecular tem sido uma das alternativas mais populares para a determinação deste parâmetro em sistemas aquosos diversos.¹¹⁰

O pireno é um hidrocarboneto aromático policíclico (figura 1.14a) de baixa solubilidade em água que possui características fluorescentes bem conhecidas. De modo geral, quando excitado em 335 nm, o espectro de emissão do pireno apresenta cinco bandas vibrônicas bem resolvidas, denominadas bandas I, II, III, IV e V, na região do espectro entre 370 e 400 nm (figura 1.14b). Entretanto, as intensidades relativas dessas várias bandas possuem uma forte dependência das características do solvente no qual o pireno encontra-se solubilizado, sobretudo as intensidades relativas das bandas I e III. A razão entre as intensidades das bandas I e III, denominada de razão 1:3 do pireno (I_1/I_3), é fortemente afetada pela hidrofobicidade do microambiente ao redor da molécula de pireno, variando na faixa de valores de 1,25 a 2,00 para solventes de polaridade mais elevada como água, até a faixa de 0,57 a 0,61 para solventes de polaridade mais baixa como hexano.

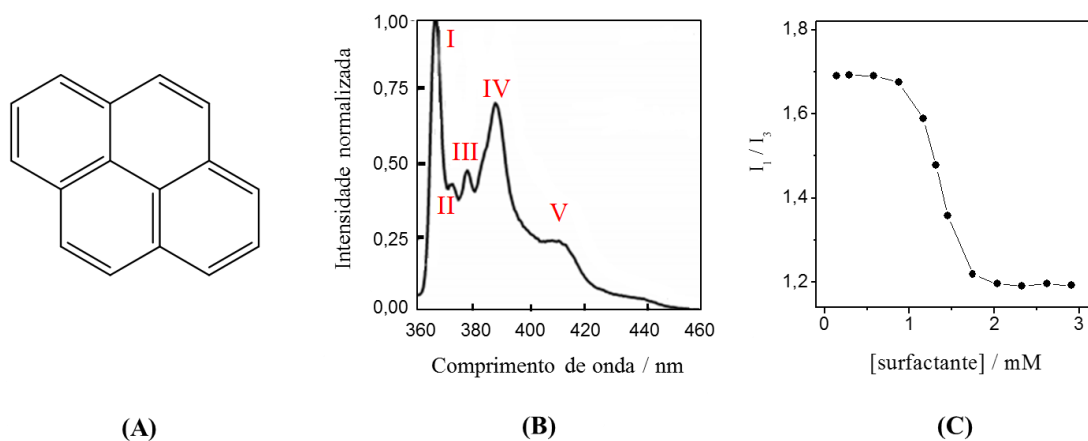


Figura 1.14. (A) Estrutura molecular do pireno; (B) Espectro de emissão do pireno com excitação em 335 nm; (C) Razão 1:3 do pireno (I_1/I_3) versus a concentração de um surfactante aniônico em solução aquosa.

Kalyanasundaram e Thomas¹²⁰ foram os primeiros a demonstrar a potencialidade do pireno como sonda molecular para determinação da cmc de surfactantes. Para este propósito, o espectro de fluorescência do pireno é obtido para uma série de soluções contendo diferentes concentrações do surfactante em uma faixa que se estende entre valores abaixo e acima da cmc (figura 1.14c). Em concentrações abaixo da cmc, em que não há micelas, a razão I_1/I_3 é constante, se aproximando do valor obtido no solvente puro; quando a concentração de surfactante aumenta em torno da cmc o valor desta razão diminui gradualmente até uma dada concentração a partir da qual ela volta a permanecer constante. A redução no valor da razão I_1/I_3 em torno da cmc surge como uma consequência da incorporação do pireno nos núcleos hidrofóbicos das micelas que promovem a diminuição da hidrofobicidade do microambiente ao redor das moléculas do mesmo. Na faixa de concentração acima da cmc em que a razão I_1/I_3 permanece constante, o pireno encontra-se quase que em sua totalidade no interior do núcleo hidrofóbico dos agregados.

1.4. Organização da Tese

Neste primeiro capítulo, escrito em português, apresentamos uma breve introdução ao tema de estudo e uma revisão de literatura que teve como objetivos: apresentar ao leitor as características estruturais que definem as substâncias que foram objeto de interesse neste trabalho; ressaltar os principais aspectos da interação polímero-surfactante e proteína-surfactante; apontar lacunas que ainda precisam ser resolvidas na área e discutir alguns dos fundamentos teóricos associados às principais técnicas experimentais utilizadas aqui para caracterizar tais interações.

O capítulo 2, também escrito em português, apresenta os objetivos gerais e específicos que conduziram ao desenvolvimento dos dois trabalhos que constituem o corpo principal desta tese. Estes dois trabalhos são apresentados nos capítulos 3 e 4, redigidos em inglês, e são apresentados na forma de artigos científicos. Na presente data, o trabalho apresentado no capítulo 3 encontra-se publicado e o artigo apresentado no capítulo 4 está em fase de finalização para submissão em um periódico de relevância internacional.

O artigo no capítulo 3 encontra-se publicado no periódico *Journal of Physical Chemistry B* e é referente ao estudo do efeito de líquidos iônicos imidazólicos sobre a interação entre o surfactante aniônico dodecilsulfato de sódio (SDS) e o polímero poli(óxido de etileno) (PEO). Novas descobertas sobre o efeito destes líquidos iônicos sobre o processo de micelização do SDS também são apresentadas.

O artigo no capítulo 4 trata do estudo da interação entre a proteína lactoferrina e os surfactantes dodecilsulfato de sódio, decilsulfato de sódio e dodecilbenzenosulfonato de sódio. Aspectos importantes sobre as energias de interação proteína-surfactante e sobre a desnaturação da proteína induzida pelo processo de interação são discutidos.

1.5. Referências

1. Paulsson, M.; Edsman, K. *J. Pharm. Sci.* **2001**, *90*, 1216–1225.
2. Paulsson, M.; Edsman, K. *J. Colloid Interface Sci.* **2002**, *248*, 194–200.
3. Lee, H. J.; McAuley, A.; Schilke, K. F.; McGuire, J. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, *63*, 1160–1171.
4. Balcão, V. M.; Costa, C. I.; Matos, C. M.; Moutinho, C. G.; Amorim, M.; Pintado, M. E.; Gomes, A. P.; Vila, M. M.; Teixeira, J. A. *Food Hydrocolloid.* **2013**, *32*, 425–431.
5. Schram, V.; Hall, S. B. *Biophys. J.* **2001**, *81*, 1536–1546.
6. Antonelli, M. L.; Capalbi, A.; Gente, G.; Palacios, A. C.; Sallustio, S.; Mesa, C. L. *Colloid. Surface. A* **2004**, *246*, 127–134.
7. Hussain, A.; Arnold, J. J.; Khan, M. A.; Ahsan, F. *J. Control. Release* **2004**, *94*, 15–24.
8. Otzen, D. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1814*, 562–591.
9. Saito, V. S. *Kolloid Z.* **1957**, *154*, 19–29.
10. Roscigno, P.; D’Auria, G.; Falcigno, L.; D’Errico, G.; Paduano, L. *Langmuir* **2005**, *21*, 8123–8130.
11. Wesley, R. D.; Dreiss, C. A.; Cosgrove, T. *Langmuir* **2005**, *21*, 4856–4861.
12. Olofsson, G.; Loh, W. *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, *20*, 577–593.
13. Mesa, C. L. *J. Colloid Interface Sci.* **2005**, *286*, 148–157.
14. Southall, N. T.; Dill, K. A.; Haymet, A. D. J. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 521–533.
15. De Maeyer, L.; Trachimow, C.; Kaatze, U. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 8480–8491.
16. Jones, R. A. L., *Soft Condensed Matter*. Oxford University Press: 2002.

17. Zhou, T.; Ao, M.; Xu, G.; Liu, T.; Zhang, J. *J. Colloid Interface Sci.* **2013**, *389*, 175–181.
18. Nielsen, M. M.; Andersen, K. K.; Westh, P.; Otzen, D. E. *Biophys. J.* **2007**, *92*, 3674–3685.
19. Chatterjee, A.; Moulik, S. P.; Majhi, P. R.; Sanyalaa, S. K. *Biophys. Chem.* **2002**, *98*, 313–327.
20. Schwuger, M. J. *J. Colloid Interface Sci.* **1973**, *43*, 491–498.
21. De, S.; Girigoswami, A.; Das, S. *J. Colloid Interface Sci.* **2005**, *285*, 562–573.
22. Cheng, S. I.; Stuckey, D. C. *Process Biochem.* **2012**, *47*, 712–719.
23. Reynolds, J. A.; Tanford, C. *J. Biol. Chem.* **1970**, *245*, 5161–5165.
24. Singer, S. J.; Nicolson, G. L. *Science* **1972**, *175*, 720–731.
25. Naidu, K. T.; Prabhu, N. P. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 14760–14767.
26. Andersen, K. K.; Westh, P.; Otzen, D. E. *Langmuir* **2008**, *24*, 399–407.
27. Zaragoza, A.; Teruel, J. A.; Aranda, F. J.; Marques, A.; Espuny, M. J.; Manresa, A.; Ortiz, A. *Langmuir* **2012**, *28*, 1381–1390.
28. Lad, M. D.; Ledger, V. M.; Briggs, B.; Green, R. J.; Frazier, R. A. *Langmuir* **2003**, *19*, 5098–5103.
29. Hansted, J. G.; Wejse, P. L.; Bertelsen, H.; Otzen, D. E. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1814*, 713–723.
30. Jones, M. N. *Chem. Soc. Rev.* **1992**, *21*, 127–136.
31. Kelley, D.; McClements, D. J. *Food Hydrocolloid.* **2003**, *17*, 73–85.

32. Santos, S. F.; Zanette, D.; Fischer, H.; Itri, R. *J. Colloid Interface Sci.* **2003**, *262*, 400–408.
33. Gudixsen, K. L.; Gitlin, I.; Moustakas, D. T.; Whitesides, G. M. *Biophys. J.* **2006**, *91*, 298–310.
34. Lundahl, P.; Greijer, E.; Sandberg, M.; Cardell, S.; Eriksson, K. -O. *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, *873*, 20–26.
35. Shirahama, K.; Tsujji, K.; Takagi, T. *J. Biochem.* **1974**, *75*, 309–319.
36. Chakraborty, T.; Chakraborty, I.; Moulik, S. P.; Ghosh, S. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 2736–2746.
37. Pitt-Rivers, R.; Impiombato, F. S. A. *Biochem. J.* **1968**, *109*, 825–830.
38. Faustino, C. M. C.; Calado, A. R. T.; Garcia-Rio, L. *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 2508–2514.
39. Cheng, S. I.; Stuckey, D. C. *Process Biochemistry* **2012**, *47*, 712–719.
40. Santiago, P. S.; Carvalho, F. A.; Domingues, M. M.; Carvalho, J. W.; Santos, N. C.; Tabak, M. *Langmuir* **2010**, *26*, 9794–9801.
41. Stenstam, A.; Montalvo, G.; Grillo, I.; Gradzielski, M. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 12331–12338.
42. Chauhan, S.; Chauhan, M. S.; Sharma, P.; Rana, D. S.; Umar, A. *Fluid Phase Equilib.* **2013**, *337*, 39–46.
43. Oakes, J. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1* **1974**, *70*, 2200–2209.
44. Turro, N. J.; Lei, X. -G.; Ananthapadmanabha, K. P.; Aronson, M. *Langmuir* **1995**, *11*, 2525–2533.
45. Ghosh, S. *Colloids Surf., B* **2005**, *41*, 209–216.

46. Ghosh, S.; Banerjee, A. *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 9–16.
47. Taheri-Kafrani, A.; Bordbar, A. -K. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2013**, *115*, 2123–2127.
48. Gonzalez-Chavez, S. A.; Arevalo-Gallegos, S.; Rascon-Cruz, Q. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2009**, *33*, 301.e1–301.e8.
49. Stanciuc, N.; Aprodu, I.; Rapeanu, G.; van der Plancken, I.; Bahrim, G.; Hendrickx, M. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 2234–2243.
50. Bokkhim, H.; Tran, T.; Bansal, N.; Grondahl, L.; Bhandari, B. *Food Chem.* **2014**, *152*, 121–127.
51. Nizri, G.; Lagerge, S.; Kamyshny, A.; Major, D. T.; Magdassi, S. *J. Colloid Interface Sci.* **2008**, *320*, 74–81.
52. Dai, S.; Tam, K. C. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 20794–20800.
53. Dai, S.; Tam, K. C. *Langmuir* **2004**, *20*, 2177–2183.
54. Froehner, S. J.; Belarmino, A.; Zanette, D. *Colloid. Surface., A* **1998**, *137* 131–139.
55. Niemiec, A.; Loh, W. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 727–733.
56. Dai, S.; Tam, K. C. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 10759–10763.
57. Bayat, E.; Sadeghi, R. *Colloid. Surface., A* **2013**, *436*, 260–269.
58. Bloor, D. M.; Holzwarth, J. F.; Wyn-Jones, E. *Langmuir* **1995**, *11*, 2312–2313.
59. Bloor, D. M.; Li, Y.; Wyn-Jones, E. *Langmuir* **1995**, *11*, 3778–3781.
60. Ghoreishi, S. M.; Li, Y.; Bloor, D. M.; Warr, J.; Wyn-Jones, E. *Langmuir* **1999**, *15*, 4380–4387.
61. Cabane, B. *J. Phys. Chem.* **1977**, *81*, 1639–1645.
62. Goddard, E. D. *J. Colloid Interface Sci.* **2002**, *256*, 228–235.

63. Folmer, B. M.; Kronberg, B. *Langmuir* **2000**, *16*, 5987–5992.
64. Jones, M. N. *J. Colloid Interface Sci.* **1967**, *23*, 36–42.
65. Yan, P.; Xiao, J. -X. *Colloid. Surface., A* **2004**, *244*, 39–44.
66. Brackman, J. C. *Langmuir* **1991**, *7*, 469–472.
67. Olofsson, G.; Wang, G. *Pure Appl. Chem.* **1994**, *66*, 527–532.
68. Bernazzani, L.; Borsacchi, S.; Catalano, D.; Gianni, P.; Mollica, V.; Vitelli, M.; Asaro, F.; Feruglio, L. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 8960–8969.
69. Barbosa, A. M.; Santos, I. J. B.; Ferreira, G. M. D.; da Silva, M. C. H.; Teixeira, A. V. N. C.; da Silva, L. H. M. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 11967–11974.
70. Brown, W.; Fundin, J.; Miguel, M. G. *Macromolecules* **1992**, *25*, 7192–7198.
71. Cabane, B.; Duplessix, R. *J. Physique* **1987**, *48*, 651–662.
72. Cabane, B.; Duplessix, R. *J. Physique* **1982**, *43*, 1529–1542.
73. Maltesh, C.; Somasundarn, P. *Langmuir* **1992**, *8*, 1926–1930.
74. Bellelli, A. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2010**, *11*, 2–36.
75. Banerjee, K.; Das, B.; Gangopadhyay, G. *J. Chem. Phys.* **2012**, *136*, 154502.
76. Bury, D.; Dahmane, I.; Derouaux, A.; Dumbre, S.; Herdewijn, P.; Matagne, A.; Breukink, E.; Mueller-Seitz, E.; Petz, M.; Terrak, M. *Biochem. Pharmacol.* **2015**, *93*, 141–150.
77. Rourke, I. J.; Hansen, T. V.; Nerlov, C.; Rehfeld, J. F.; Nielsen, F. C. *FEBS Lett.* **1999**, *448*, 15–18.
78. Varani, L.; Gunderson, S. I.; Mattaj, I. W.; Kay, L. E.; Neuhaus, D.; Varani, G. *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 329–335.

79. Kudrev, A. G. *Talanta* **2013**, *116*, 541–547.
80. Cattoni, D. I.; Chara, O.; Kaufman, S. B.; González Flecha, F. L. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0146043.
81. Barcroft, J.; Hill, A. V. *J. Physiol.* **1910**, *39*, 411–428.
82. Solomatin, S. V.; Greenfeld, M.; Herschlag, D. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2011**, *18*, 732–734.
83. Berthod, A.; Ruiz-Angel, M. J.; Carda-Broch, S. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1184*, 6–18.
84. Dupont, J. *J. Braz. Chem. Soc.* **2004**, *15*, 341–350.
85. Fang, L.; Hu, Y.; Qi, J.; Chen, Y.; Zhang, H.; Huang, H. *Electrochim. Acta* **2014**, *133*, 440–445.
86. Keskin, S.; Kayrak-Talay, D.; Akman, U.; Hortaçsu, Ö. *J. Supercrit. Fluids* **2007**, *43*, 150–180.
87. Rogers, R. D.; Seddon, K. R. *Science* **2003**, *302*, 792–793.
88. Ghatole, A. M.; Lanjewar, K. R.; Gaidhane, M. K.; Hatzade, K. M. *Spectrochim. Acta A* **2015**, *151*, 515–524.
89. Attri, P.; Park, D. H.; Lee, S. -H.; Kim, Y. S.; Kim, Y. B.; Kwon, G. -C.; Choi, W.; Jun, Y.; Lee, H. -S.; Choi, E. H.; Kim, I. T. *Sci. Adv. Mater.* **2015**, *7*, 2583–2595.
90. Xia, J.; Cao, X.; Wang, Z.; Yang, M.; Zhang, F.; Lu, B.; Li, F.; Xia, L.; Li, Y.; Xia, Y. *Sensor Actuat. B Chem.* **2016**, *225*, 305–311.
91. Park, S.; Kazlauskas, R. J. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14*, 432–437.
92. Zhao, H. *J. Chem. Technol. Biot.* **2016**, *91*, 25–50.

93. Shimizu, K.; Lopes, J. N. C.; da Silva, A. M. P. S. G. *Langmuir* **2015**, *31*, 8371–8378.
94. Lee, H.-N.; Newell, N.; Bai, Z.; Lodge, T. P. *Macromolecules* **2012**, *45*, 3627–3633.
95. Hoarfrost, M. L.; He, Y.; Lodge, T. P. *Macromolecules* **2013**, *46*, 9464–9472.
96. Inoue, T.; Kawashima, K.; Miyagawa, Y. *J. Colloid Interface Sci.* **2011**, *363*, 295–300.
97. Chen, L. G.; Bermudez, H. *Langmuir* **2012**, *28*, 1157–1162.
98. Saien, J.; Asadabadi, S. *Fluid Phase Equilibr.* **2015**, *386*, 134–139.
99. Javadian, S.; Nasiri, F.; Heydari, A.; Yousefi, A.; Shahir, A. A. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 4140–4150.
100. Brinatti, C.; Mello, L. B.; Loh, W. *Langmuir* **2014**, *30*, 6002–6010.
101. Andersen, K. K.; Otzen, D. E. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1844*, 2338–2345.
102. Chiappisi, L.; Li, D.; Wagner, N. J.; Gradzielski, M. *J. Chem. Thermodynamics* **2014**, *68*, 48–52.
103. Jelesarov, I.; Bosshard, H. R. *J. Mol. Recognit.* **1999**, *12*, 3–18.
104. Bengoechea, C.; Jones, O. G.; Guerrero, A.; McClements, D. J. *Food Hydrocolloid.* **2011**, *25*, 1227–1232.
105. Deep, S.; Ahluwalia, J. C. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2001**, *3*, 4583–4591.
106. Gill, P.; Moghadam, T. T.; Ranjbar, B. *J. Biomol. Tech.* **2010**, *21*, 167–193.
107. Sturtevant, J. M. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1987**, *38*, 463–488.
108. Nielsen, A. D.; Arleth, L.; Westh, P. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1752*, 124–132.

109. Aguiar, J.; Carpena, P.; Molina-Bolívar, J. A.; Carnero Ruiz, C. *J. Colloid Interface Sci.* **2003**, *258*, 116–122.
110. Piñeiro, L.; Novo, M.; Al-Soufi, W. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2015**, *215*, 1–12.
111. Pal, A.; Chaudhary, S. *Fluid Phase Equilib.* **2014**, *372*, 100–104.
112. Mitsionis, A. I.; Vaimakis, T. C. *Chem. Phys. Lett.* **2012**, *547*, 110–113.
113. Lakowicz, J. R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3 ed.; Springer: 2006.
114. Callis, P. R. *J. Mol. Struct.* **2014**, *1077*, 14–21.
115. Royer, C. A. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 1769–1784.
116. Callis, P. R. *J. Mol. Struct.* **2014**, *1077*, 22–29.
117. Bielawska, M.; Chodzińska, A.; Jańczuk, B.; Zdziennicka, A. *Colloid. Surface., A* **2013**, *424*, 81–88.
118. Kjellin, U. R. M.; Reimer, J.; Hansson, P. *J. Colloid Interface Sci.* **2003**, *262*, 506–515.
119. Comelles, F.; Ribosa, I.; González, J. J.; Garcia, M. T. *J. Colloid Interface Sci.* **2014**, *425*, 44–51.
120. Kalyanasundaram, K.; Thomas, J. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 2039–2044.

Capítulo 2: Objetivos

2.1. Objetivos Gerais

Foi objetivo geral neste trabalho de doutorado buscar novas descobertas dentro do amplo campo de pesquisa que compreende o estudo da interação entre macromoléculas e surfactantes. Neste sentido, nós buscamos contemplar tanto o estudo da interação polímero-surfactante quanto o estudo da interação proteína-surfactante a partir de duas propostas distintas:

Proposta 1: estudar o efeito de líquidos iônicos imidazólicos sobre a interação entre o polímero poli(óxido de etileno) e o surfactante dodecil sulfato de sódio;

Proposta 2: estudar a interação entre a proteína lactoferrina e os surfactantes dodecilsulfato de sódio, decilsulfato de sódio e dodecilbenzenosulfonato de sódio.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Objetivos Específicos da Proposta 1

- ✓ Utilizar calorimetria de titulação isotérmica, condutividade e fluorescência para avaliar o efeito de haletos (brometo ou cloreto) de 1-butil-3-metilimidazólio sobre o comportamento de mistura de PEO e SDS em solução aquosa;
- ✓ Obter os parâmetros termodinâmicos de micelização do SDS em soluções aquosas de haletos (brometo ou cloreto) de 1-butil-3-metilimidazólio, em diferentes concentrações de líquido iônico;

- ✓ Obter os parâmetros termodinâmicos de agregação referentes à interação PEO-SDS em soluções aquosas de haletos (brometo ou cloreto) de 1-butil-3-metilimidazólio, em diferentes concentrações de líquido iônico;
- ✓ Estabelecer como a presença dos líquidos iônicos imidazólicos afeta a estabilidade das micelas de SDS e a estabilidade relativa entre estas micelas e os agregados PEO-SDS.

2.2.2. Objetivos Específicos da Proposta 2

- ✓ Utilizar a calorimetria de titulação isotérmica (ITC) para determinar as energias entálpicas de interação entre a proteína lactoferrina e os surfactantes dodecilsulfato de sódio, decilsulfato de sódio e dodecilbenzenosulfonato de sódio, em diferentes valores de pH;
- ✓ Obter os parâmetros termodinâmicos de desnaturação da proteína lactoferrina em diferentes valores de pH utilizando a nanocalorimetria diferencial de varredura (n-DSC);
- ✓ Por meio da nanocalorimetria diferencial de varredura, investigar o efeito da interação lactoferrina-surfactante sobre os termogramas de n-DSC da lactoferrina;
- ✓ Utilizar a técnica de fluorescência para acompanhar qualitativamente a ocorrência de mudanças estruturais ocorrendo na estrutura da proteína devido à interação com os surfactantes;
- ✓ Avaliar o efeito da estrutura da cauda hidrofóbica do surfactante sobre a interação lactoferrina-surfactante;
- ✓ Determinar o papel do átomo de ferro ligado à estrutura da lactoferrina no processo de desnaturação induzido pelos surfactantes.

Capítulo 3: Effect of 1-Butyl-3-methylimidazolium Halide on the Relative Stability between Sodium Dodecyl Sulfate Micelles and Sodium Dodecyl Sulfate–Poly(ethylene oxide) Nanoaggregates

Abstract

It is well-known that ionic liquids (ILs) alter the properties of aqueous systems containing only surfactants. However, the effect of ILs on polymer–surfactant systems is still unknown. Here, the effect of 1-butyl-3-methylimidazolium bromide (bmimBr) and chloride (bmimCl) on the micellization of sodium dodecyl sulfate (SDS) and its interaction with poly(ethylene oxide) (PEO) was evaluated using conductimetry, fluorimetry, and isothermal titration calorimetry. The ILs decreased the critical micellar concentration (cmc) of the surfactant, stabilizing the SDS micelles. A second critical concentration (c_{2thc}) was verified at high SDS concentrations, due to the micelle size decrease. The stability of SDS/PEO aggregates was also affected by ILs, and the critical aggregation concentration (cac) of SDS increased. ILs changed the integral aggregation enthalpy from -0.72 in water to 2.16 kJ mol⁻¹ in 4.00 mM bmimBr. IL anions did not affect the SDS micellization or the beginning of SDS/PEO aggregation. Nevertheless, when chloride was replaced with bromide, the amount of SDS bound to the polymer increased. At 100.0 mM IL, the PEO-SDS interaction vanished. We suggest that the effect of ILs comes from participating in the structure of the formed aggregates, interacting with the SDS monomers at the core/interface of the micelles, and promoting preferential solvation of the polymer.

3.1. Introduction

Surfactants interact with polymers in aqueous solutions to generate systems with several applications in detergents, oil processing, the paper industry, and personal care products.¹ In general, the interaction occurs due to a cooperative aggregation process between the polymer and the surfactant at concentrations below the critical micellar concentration (cmc) of the surfactant.² This cooperative aggregation depends strongly on the solvent, which can modulate the interactions and alter the surfactant micellization process³ and polymer chain conformation.⁴ Therefore, adding different cosolvents and cosolutes⁵⁻⁷ into aqueous systems containing surfactants and polymers is invaluable for controlling the colloidal properties of many important industrial formulations. Ionic liquids (ILs) are one class of modifiers that has attracted great attention in research communities in several research fields,⁸⁻¹² including colloidal systems. Nevertheless, despite the great number of papers reporting surfactant aggregation either in pure IL¹³⁻¹⁶ or in IL aqueous solutions,¹⁷⁻¹⁹ to the best of our knowledge, there are no studies investigating how ILs affect polymer–surfactant interactions.

ILs are chemical compounds comprising ions that are liquid at temperatures below 100 °C. Their structures are diverse as a result of the large number of combinations of cations and anions, which permits obtaining particular characteristics for specific applications.²⁰ Therefore, the study of the effect of ILs on aqueous systems comprising polymers and/or surfactants is very broad. Among the diversity of IL structures, those containing 1-alkyl-3-methylimidazolium cations have received special attention as cosolvents in systems containing amphiphilic molecules.^{16,21-26} The 1-alkyl-3-methylimidazolium cations, with both long and short chains, can act as cosurfactants in the surfactant aggregation process, thus promoting the formation of surfactant–IL mixed aggregates.^{24,27-30} For example, Javadian et al.²² studied the effect of

ILs formed by 1-butyl-3-methylimidazolium and 1-hexyl-3-methylimidazolium cations on the surface activity and micellization of sodium dodecyl sulfate (SDS). They proposed that ILs with higher carbon chains interact with SDS through hydrophobic interactions, resulting in the formation of vesicles.

In view of this scenario, we believe that ILs can significantly affect the interaction between surfactants and polymers. Systems formed by SDS and poly(ethylene oxide) (PEO) constitute an appropriate system to begin understanding the effect of ILs on surfactant-polymer complex systems. PEO-SDS systems have been studied since 1967 using many techniques³¹ such as conductimetry, tensiometry, viscosimetry, isothermal titration calorimetry (ITC), NMR, and light scattering, making it one of the most well-known polymer-surfactant systems. The scientific community agrees that in this system, at a critical aggregation concentration (cac), SDS monomers adsorb onto the polymer chain, forming micelles of lower aggregation number. With increasing SDS concentration, aggregates grow and the macromolecular chain goes to the micellar surface. Then, when polymer molecules are saturated by the surfactant at the saturation concentration, C_2 , further addition of the surfactant leads to free micelle formation in the solvent.^{7,32,33}

The aggregation parameters of PEO-SDS interactions depend on the addition of different compounds. For example, Dai and Tam⁶ examined the effect of different glycols on the binding of SDS to PEO by ITC, and they showed that these additives increase the cac values and decrease the C_2 of this system. An inverse tendency was observed by Barbosa et al.⁷ These authors investigated the effect of NaCl, Na₂SO₄, NaSCN, and Li₂SO₄ ionic cosolutes on the driving forces associated with PEO-SDS interactions using ITC and small-angle X-ray scattering. They showed that the salts decreased cac and increased C_2 . However, the change in the enthalpic titration curves obtained by ITC in

the presence of these electrolytes did not change very much. On the other hand, when $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$ salt was evaluated, it reduced the thermal effect of the PEO-SDS interaction to almost zero, which was attributed to the specific interaction between the complex anions and the ethylene oxide units of the polymer.

In this study, we examined the effect of 1-butyl-3-methylimidazolium chloride (bmimCl) and bromide (bmimBr) ionic liquids on PEO-SDS interactions in aqueous solutions. SDS micellization in the presence of the same ILs was evaluated too. This investigation was conducted by specific conductimetry, fluorescence spectroscopy, and isothermal titration calorimetry measurements, which allowed us to obtain the thermodynamic parameters of the system. These parameters demonstrate the effect of ILs on the PEO-SDS interactions.

3.2. Experimental Section

3.2.1. Materials

Poly(ethylene oxide) with an average molar mass (according to the manufacturer) of 35000 g mol^{-1} (designated as PEO35000) was supplied by Fluka (USA). Sodium dodecyl sulfate surfactant (SDS) ($\geq 98.5\%$), 1-butyl-3-methylimidazolium bromide ($\geq 97\%$) and 1-butyl-3-methylimidazolium chloride ($\geq 95\%$) ionic liquids, and pyrene (99%) were all manufactured by Sigma-Aldrich (USA). All chemicals were used without further purification. Deionized water was used for preparing all solutions.

3.2.2. Conductivity Measurements

Aqueous solutions of ILs were utilized as solvents to prepare concentrated surfactant titrant solutions. An initial volume of solvent (13.0 mL) was introduced into the water-jacketed cell and titrated with the surfactant solution using a gastight Hamilton

syringe (250 μL). The volumes of the additions were 25.0 or 50.0 μL . The electrical conductivities were measured at 298.2 ± 0.1 K by using a digital conductivity meter (DM-32) with a conductivity cell (DMC-010M) with platinized platinum electrodes purchased from Digimed (Brazil). Prior to the measurements, the cell was calibrated with a DM-S6A KCl standard aqueous solution supplied by Digimed (Brazil). The conductance was measured while mixing after each addition of the surfactant titrant solution.

3.2.3. Isothermal Titration Calorimetry

Enthalpy changes associated with PEO-SDS interactions in the presence of different concentrations of the ILs (0.0, 1.00, 2.00, 4.00, 6.00, 8.00, 10.0, and 100.0 mM) were performed in a TAM III isothermal titration nanocalorimeter from TA Instruments controlled by TAM AssistantTM dedicated software. Each IL aqueous solution was used as a solvent to prepare 0.100% m/v PEO and SDS solutions at adequate concentrations (472.0, 50.0, or 10.0 mM). Experiments were made in stainless steel reaction cells (sample and reference) capable of holding 4.0 mL. The cells were filled with 2.70 mL of an IL aqueous solution or a mixture obtained by dissolving the polymer into an IL aqueous solution. Titrations were carried out in the sample cells using step-by-step injections of the concentrated surfactant solution with a Hamilton syringe (250 μL) controlled by a 3810 syringe pump from TA Instruments. The time interval between consecutive injections was 20 min. Solutions were titrated with stirring at 150 rpm (2.5 s^{-1}) using a gold helix stirrer, and measurements were carried out at a constant temperature of 298.1500 ± 0.0001 K. PEO solutions were allowed to equilibrate for at least 24 h before the calorimetric titrations, and all solutions were degassed before experiments.

3.2.4. Fluorescence Measurements

Fluorescence emission spectra of pyrene in the investigated solutions were taken on a Cary Eclipse fluorescence spectrophotometer (Agilent Technologies, USA). A pyrene solution of adequate concentration prepared in ethanol was added into the aqueous solutions to obtain a final pyrene concentration of 1.20×10^{-6} mol L⁻¹, which was sufficiently low to prevent formation of excimers. Measurements were realized at different SDS concentrations in aqueous solutions containing 1.00, 4.00, and 10.0 mM of ILs. The slits selected were 2.5 nm for excitation and 1.5 nm for emission, and the spectra were acquired in the range from 360 to 410 nm at an excitation wavelength of 335 nm. Five spectra were averaged at a scan speed of 30 nm/min. The fluorescence intensities of the first (I₁ at 372.5 nm) and third (I₃ at 383.5 nm) vibronic peaks were obtained, and the I₁/I₃ ratios were calculated and plotted as a function of the log of SDS concentration. All spectra were collected at 298.2 K using 10 mm quartz cells. Samples were left to equilibrate for at least 10 min before measurements. Similar experiments were conducted in the presence of 0.100% m/v PEO 35000.

3.2.5. Dynamic Light-Scattering and Zeta Potential Measurements

Aggregate sizes and zeta potentials (ζ) were measured on a Zetasizer Nano-ZS compact system from Malvern for solutions containing different SDS and bmimBr concentrations.

3.3. Results and Discussion

3.3.1. Effect of ILs on SDS Aggregation

The PEO-SDS interaction depends on a delicate balance between the relative thermodynamic stability of SDS micelle and PEO-SDS aggregates, that is, the system

will choose a less-free Gibbs energy configuration. Thus, to determine the effect of ILs on the PEO-SDS aggregation, we must determine the effect of ILs on the formation of SDS micelles. We used conductivity measurements to obtain the cmc and the degree of micelle ionization of SDS (α) in aqueous solutions containing ILs (bmimBr or bmimCl) at different concentrations. For all IL concentrations, our specific conductivity (κ) results were correlated to the surfactant concentration (C_{SDS}) by a linear equation in both premicellar and the postmicellar regions (Figure A.S1 in the Supporting Information). The interception point between the curves in the premicellar and postmicellar regions gives the cmc value, and the ratio of the obtained slopes in the postmicellar and premicellar regions gives α .²⁴

Figure 3.1 presents the cmc and α values of SDS obtained by the conductometric method versus IL concentration (C_{IL}) for both bmimBr and bmimCl.

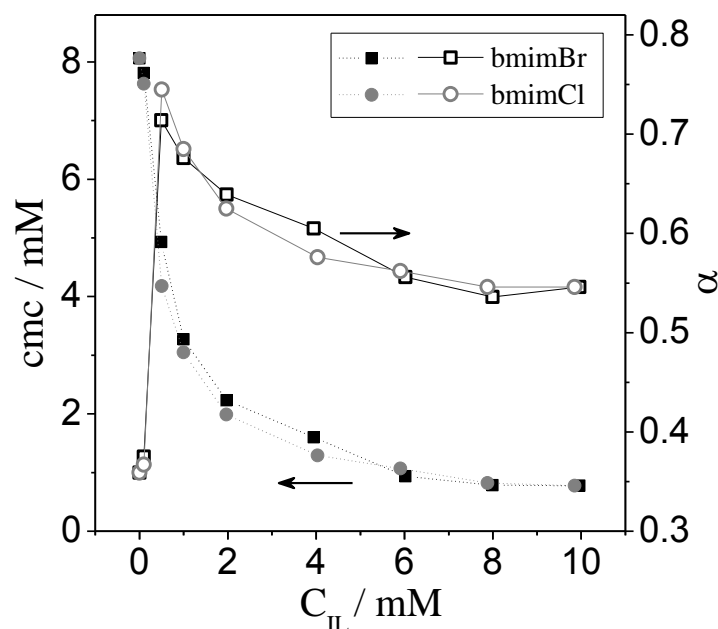


Figure 3.1. Degree of micelle ionization (open symbols) and cmc (closed symbols) for SDS in the presence of bmimBr and BmimCl obtained from conductance data at

298.2 K.

When the IL concentration increases, the cmc values decrease exponentially, showing a micelle stabilization process probably caused by a preferential adsorption of imidazolium cations on the SDS micellar interface that released some sodium ions. To confirm this hypothesis, the α values were evaluated. The α values increase from 0.36 (in water), in good agreement with literature values,³⁴ to 0.71 and 0.74 when the bmimBr and bmimCl concentrations, respectively, increase to 0.50 mM. Then, the α values decrease with increasing IL concentration up to 8.00 mM, at which point the values remain almost constant for both ILs. Additionally, the degree of micelle ionization in the presence of both IL concentrations is larger than the degree of micelle ionization in pure water, corroborating the hypothesis that preferential adsorption of imidazolium cations promotes charge shielding of the micelle, releasing sodium cations from the micelle electric double layer to the bulk. However, the decrease in α after 0.50 mM IL suggests that another mechanism dominates. This mechanism can be associated with the following processes: (i) bmimCl (or bmimBr) incorporation in the core/interface of the micelles and (ii) changes in the size and/or form of the micelles due to electrostatic screening promoted by bmim⁺ cations, which increases the charge density of the micelles and causes a readsorption of sodium cations onto the micelle electric double layer.³⁵ After saturation of the micelle interface/core by ILs, the cmc and α values changed slightly.

In fact, our results show that there is a specific interaction between imidazolium cations and DS⁻ anions in SDS micelles, as also concluded by Javadian et al.²² Moreover, the same tendencies in cmc and α versus C_{IL} obtained in the current study were observed by Behera and Pandey,³⁵ who evaluated the properties of SDS aqueous solutions containing bmimPF₆ hydrophobic ionic liquids in a wide concentration range (from 0.0 to 2.0% m/v \approx 70 mM). On the other hand, changing 1-butyl-3-methylimidazolium cations (bmim⁺) by 1-pentyl-3-methylimidazolium (C₅mim⁺) with the same anion, PF₆⁻,

Pal and Chaudhary²⁴ observed an inverse trend for the SDS cmc versus C_{IL} curves. They suggested that C_5mim^+ cations interact with dodecyl sulfate monomers (DS^-), hindering the hydrophobic interaction of water molecules, which increases the cmc values. Despite the hindering solvophobic interactions between water and DS^- anions, some studies have shown that ILs with cations containing higher carbon chain lengths decrease the cmc of SDS.^{18,22} Briefly, the way that ILs affect SDS aggregation is very dependent on both the cation and anion structure of the IL.

To confirm whether aggregates are really formed at low SDS concentrations due to the presence of ILs, as shown by the conductivity experiments, fluorescence measurements were done. Fluorescence is a fast, simple, and accurate technique to determine the cmc of a surfactant, and it has been successfully applied to systems formed by SDS and ILs.^{24,25,35,36,37} Here, we used pyrene as a fluorescent probe to determine the micelle formation.³⁸

Figure 3.2 shows the I_1/I_3 ratio versus $\log(C_{SDS})$ curves at different bmimBr concentrations. I_1 and I_3 correspond to the intensity of the vibronic peaks at 372.5 and 383.5 nm in the pyrene emission spectrum. The data were fitted to a sigmoidal equation (solid lines shown in the figure). Similar results were obtained for bmimCl (Figure A.S2 in the Supporting Information).

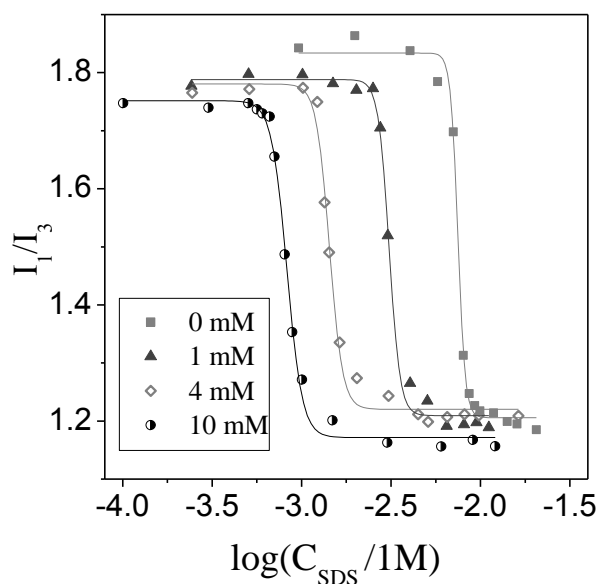


Figure 3.2. Pyrene I_1/I_3 ratio versus $\log(C_{\text{SDS}})$ in the presence of different bmimBr concentrations at 298.2 K. The pyrene concentration was 1.2 μM for all experiments.

Solid lines correspond to a sigmoidal fit.

For each bmimBr amount at lower SDS concentrations, the I_1/I_3 values remain almost constant. Then, a sudden decrease in the I_1/I_3 ratio can be observed with increasing SDS concentration, indicating a decrease in the polarity sensed by pyrene because of the incorporation of this fluorophore into the hydrophobic domain of the formed aggregates. The concentrations at which these aggregates were formed were calculated by obtaining the inflection point of the sigmoidal fit of the I_1/I_3 versus $\log(C_{\text{SDS}})$ curves. The cmc values obtained from fluorescence (Table 3.1) are in agreement with those obtained by conductivity measurements, confirming the existence of SDS aggregates in the presence of the ILs.

To evaluate the effect of ILs on the SDS aggregate stability, thermodynamic parameters of aggregation must be obtained. Isothermal titration calorimetry (ITC) was applied to determine the enthalpic contribution to SDS aggregation in the presence of

ILs. Although some researchers have obtained thermodynamic data associated with SDS aggregation in different IL aqueous solutions using the van't Hoff approximation,²³⁻²⁵ there was only one study on calorimetric measurements to obtain these micellization thermodynamic parameters.³⁹ ITC can provide important thermodynamic parameters such as cmc, the Gibbs free energy change (ΔG_{mic}^o), the enthalpy change (ΔH_{mic}^o), and the entropy change (ΔS_{mic}^o).

In an ITC experiment, a typical sigmoidal curve of the measured enthalpy change per mole of surfactant, called ΔH_{obs} , versus surfactant concentration is generally obtained. It can be divided in three parts that are associated with different molecular processes occurring in the calorimetric sample cell. In the first part of the curve, the surfactant concentration remains below cmc, and ΔH_{obs} changes little with increasing surfactant concentration. The ΔH_{obs} values in this surfactant concentration range result from the dilution/demicellization of micelles and dilution of surfactant monomers. In the second part of the curve, as the surfactant concentration increases, a sudden change of ΔH_{obs} occurs because the surfactant concentration in the cell reaches cmc, causing surfactant micelle formation in the sample cell. When ΔH_{obs} decreases with increasing surfactant concentration, the aggregation process is exothermic; otherwise, it is endothermic. Finally, in the last part of the curve, the surfactant concentration exceeds cmc and the ΔH_{obs} values result from the dilution of the micellar aggregates in the sample cell solution.³⁹ The inflection point that appears in ΔH_{obs} versus surfactant concentration curve can be chosen as the cmc value.

Figure 3.3 shows a set of ITC curves obtained by the dilution of 50.00 mM (or 10.00 mM) (Figure 3.3a) and 472.0 mM (Figure 3.3b) SDS in aqueous solutions at different bmimBr concentrations. All calorimetric results obtained in the presence of

bmimBr were similar to those obtained in the presence of bmimCl (Figure A.S3 in the Supporting Information).

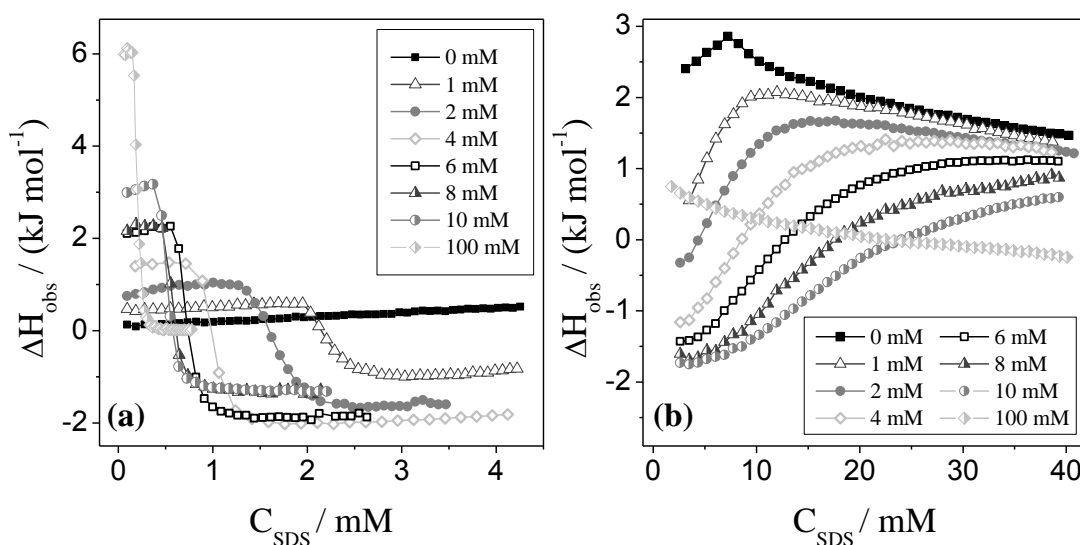


Figure 3.3. ITC curves obtained from the addition of (a) 50.0 mM and (b) 472.0 mM SDS to bmimBr aqueous solutions at several concentrations at 298.2 K. At 100.0 mM bmimBr in panel a the SDS concentration in the titrant solution was 10.0 mM.

In the SDS concentration range from 0 to approximately 4 mM (Figure 3.3a), the ΔH_{obs} versus SDS concentration curves shows a typical sigmoidal shape in the presence of bmimBr that is not observed in pure water, indicating an exothermic cooperative process in the IL aqueous solution. However, at surfactant concentrations higher than 3.5 mM (Figure 3.3b), an endothermic thermodynamic event can be observed in the ITC curves in the presence of bmimBr, in which ΔH_{obs} begins to increase with increasing SDS concentration and a second inflection point appears. At 0 mM bmimBr, no inflection point appears and a maximum in the ITC curve is observed around the cmc values of SDS, as expected.³⁹ Smirnova et al.,⁴⁰ using a different approach, studied the thermodynamics of SDS micellization in the presence of the 1-butyl-3-

methylimidazolium cations and PF_6^- anions, and did not report the occurrence of a second inflection point in their ITC curves. The SDS concentration in the first [cmc (ITC)] and second [c2thc] inflection points in the ITC curves determined in this paper are shown in Table 3.1. The cmc values obtained by conductivity and fluorescence measurements are also shown for comparison.

Table 3.1. Aggregation Parameters of SDS in Different Water-IL Mixed Solvents at 298.2 K Obtained by Calorimetry, Fluorescence, and Conductivity Data

C_{IL}/mM	cmc (Cond) / mM	cmc (Fluor) / mM	cmc (ITC) / mM	c2thc / mM	α
bmimBr					
0.0	8.06 ± 0.04	7.47 ± 0.01	-	-	0.36
1.00	3.27 ± 0.03	3.09 ± 0.03	2.20 ± 0.03	4.34 ± 0.07	0.68
2.00	2.23 ± 0.02	-	1.64 ± 0.02	5.18 ± 0.08	0.64
4.00	1.60 ± 0.02	1.45 ± 0.01	1.01 ± 0.01	6.04 ± 0.09	0.61
6.00	0.94 ± 0.01	-	0.72 ± 0.01	9.41 ± 0.14	0.56
8.00	0.78 ± 0.01	-	0.58 ± 0.01	11.10 ± 0.17	0.54
10.0	0.78 ± 0.01	0.83 ± 0.01	0.52 ± 0.01	12.80 ± 0.19	0.55
100.0	-	-	0.20 ± 0.01	-	-
bmimCl					
1.00	3.05 ± 0.06	3.02 ± 0.05	2.30 ± 0.02	4.33 ± 0.07	0.69
2.00	1.99 ± 0.02	-	1.44 ± 0.03	5.19 ± 0.08	0.63
4.00	1.66 ± 0.02	1.38 ± 0.03	0.91 ± 0.03	6.89 ± 0.10	0.61
6.00	1.07 ± 0.01	-	0.68 ± 0.01	9.40 ± 0.14	0.56
8.00	0.82 ± 0.01	-	0.61 ± 0.01	11.10 ± 0.17	0.55
10.0	0.78 ± 0.01	0.78 ± 0.01	0.47 ± 0.01	13.60 ± 0.20	0.55
100.0	-	-	0.16 ± 0.02	-	-

Because the cmc (ITC) values approach those obtained by conductivity and fluorescence techniques, the thermodynamic event that occurs at lower surfactant concentrations (Figure 3.3a) is the aggregation of the SDS monomers. In addition, because the ITC curves change from linear (in water) to sigmoidal (even at very low IL concentrations) in this SDS concentration range, the ILs should participate in the micelle structure.

To determine the process that takes place at SDS concentrations equal to c_{2thc} (Figure 3.3b), nanostructure size measurements were done for SDS solutions at different bmimBr concentrations (0.0, 1.00, 4.00, and 10.0 mM). Figure 3.4 shows the hydrodynamic diameter of the SDS aggregates at different SDS and bmimBr concentrations (The aggregate size distribution curves are shown in Figure A.S4 in the Supporting Information).

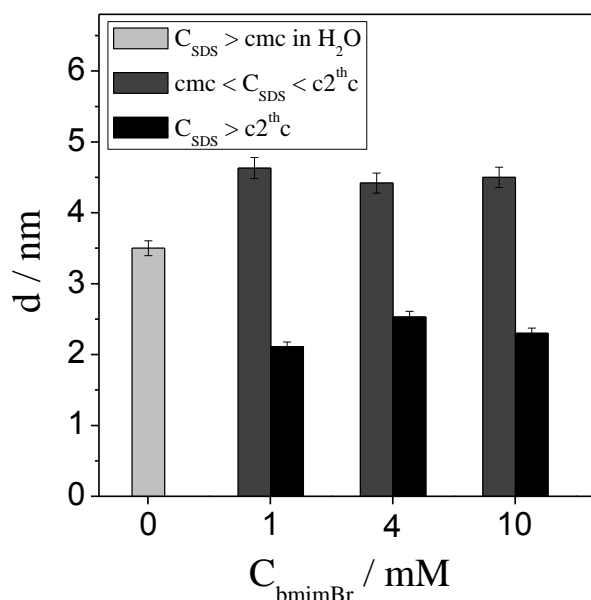


Figure 3.4. Hydrodynamic diameter of SDS aggregates in bmimBr aqueous solutions at 298 K.

In water, SDS micelles had hydrodynamic diameter equal to 3.50 nm. In the presence of bmimBr, at $\text{cmc} < C_{\text{SDS}} < c_{2thc}$, the SDS aggregates increased and aggregates with sizes ranging from 4.42 to 4.63 nm were found. When the SDS concentration increased above c_{2thc} , the aggregate size decreased by half, changing in the range from 2.11 to 2.53 nm. These results show that the thermodynamic event observed in c_{2thc} is associated with the breakup of SDS/IL aggregates to form smaller structures. Thus, the

area of the micelle-solution interface increases, leading to redistribution of the bmim⁺ cations among the aggregates in the presence of ILs.

The ζ measurements for SDS aggregates in the system with and without bmimBr at different SDS concentrations confirmed the increase in the negative charge of the aggregates with increasing SDS concentration due to the redistribution of ILs between the bulk and aggregate core/surface, except with 100.0 mM SDS. In this case, the micellar charge changed a little (Table 3.2).

Table 3.2. ζ Measurements for SDS Aggregates in the Presence of ILs at 298 K^a

ζ (mV)				
bmimBr 0 mM	bmimBr 1 mM	bmimBr 6 mM	bmimBr 10 mM	bmimBr 100 mM
-	-43.8 (3.5)	-34.8 (2.0)	-48.6 (1.5)	-
-39.9 (10)	-51.8 (7.0)	-51.3 (11)	-61.3 (11)	-21.8 (11)
-50.7 (20)	-61.0 (20)	-57.6 (20)	-	-19.9 (20)
-58.1 (35)	-63.3 (35)	-58.8 (35)	-62.8 (35)	-24.5 (35)

^aValues in parentheses are the SDS concentrations, in mM.

The IL effect on SDS micellization can be rationalized as follows. The SDS nanostructures in the syringe ($C_{SDS} \gg c_{2thc}$) are smaller than the SDS/IL aggregates in the sample cell with an SDS concentration around the cmc. When SDS/IL aggregates in the syringe are added to the sample cell at $cmc < C_{SDS} < c_{2thc}$, they are diluted, and SDS monomers and bmim⁺ cations are rearranged in order to form larger micelles due to the incorporation of bmim⁺ in the core/interface of the aggregates (exothermic process). As the SDS concentration increases in the sample cell, the n_{bmimBr}/n_{SDS} ratio decreases, and as the SDS concentration approaches c_{2thc} , the aggregate size decreases, again redistributing the SDS monomers and the bmim⁺ cations in the system. The energy cost associated with this decrease in SDS aggregate size (endothermic process) (Figure 3.3b) is attributed to (i) the increase in the micelle-solution interface area, (ii) the increase in

the electrostatic repulsion among the DS⁻ headgroups on the aggregate surface, and (iii) the increase in the electrostatic repulsion among the aggregates in the sample cell. As pointed out above, all these factors result from the redistribution of SDS monomers and bmim⁺ cations in the system. To corroborate this hypothesis, ITC curves for the IL aqueous solutions (1.00, 2.00, and 4.00 mM) overlapped, at specific SDS concentration, with the curve for pure water. The greater the IL concentration, the greater the concentration of SDS where the curves found each other. This result suggests that the average aggregate size stops changing in the sample cell at this specific surfactant concentration and that the core/surface/solution bmim⁺ distribution remains constant. Besides, c_{2thc} values increase as the IL concentration increases, and at 100.0 mM IL, c_{2thc} disappears in the evaluated concentration range, indicating that the formation of a second SDS nanostructure in solution is associated with a stoichiometric ratio between the number of SDS monomers and the bmim⁺ cations in the solution.

The redistribution of bmim⁺ and SDS monomers occurs with increasing system enthalpy, and the driving force that governs this process is the increase of system entropy. This result comes from the increase in the number of formed aggregates and water molecules released from the imidazolium cation solvation shell, both of which increase the configurational entropy of the system.

To evaluate the driving forces that govern the aggregation of SDS at low concentrations, the thermodynamic parameters of SDS aggregation (ΔG_{mic}^o , ΔH_{mic}^o , and ΔS_{mic}^o) at different IL concentrations were obtained (Table A.S1 in the Supporting Information). The values of ΔH_{mic}^o were calculated from the ITC curves (Figure 3.3a and Figure A.S3a in the Supporting Information) utilizing the method described by Olofsson and Loh,³⁹ which determines the difference between the measured ΔH_{obs} values in the third and first parts of the sigmoidal curve extrapolated to cmc. The standard Gibbs free

energy change of SDS micellization (ΔG_{mic}^o) was determined by equation 3.1, that is, according to the charged pseudophase model of micelle formation.⁴¹ $T\Delta S_{mic}^o$ was calculated from ΔH_{mic}^o and ΔG_{mic}^o .

$$\Delta G_{mic}^o = (2 - \alpha)RT \ln(cmc) \quad (3.1)$$

The anionic nature of the IL did not affect the ΔG_{mic}^o values, showing that the change in SDS micellization was due to bmim^+ cations.

To understand the effect of ILs on the ΔG_{mic}^o values, we should evaluate the contribution of ILs on the entropic and enthalpic contributions for SDS aggregation. In pure water, ΔH_{mic}^o values arise from contributions from different processes. Interactions that positively contribute to ΔH_{mic}^o are associated with the disruption of interactions between water molecules and surfactant monomers, with the repulsive interactions between the SDS headgroup in the micellar surface, and with the disruption of hydrogen bonds among the water molecules structured around the hydrophobic dominium of DS^- anions. Interactions that negatively contribute to ΔH_{mic}^o are associated with the formation of chain-chain interactions in the micellar core and the binding among the water molecules released from the surfactant solvation shell to the bulk. At 298 K, ΔH_{mic}^o cannot be obtained directly by calorimetric experiments because it is almost zero,³⁹ showing that the enthalpic contributions from those molecular processes are offset. By considering $\Delta H_{mic}^o(298.15\text{K}) = 0$, the entropic contribution to ΔG_{mic}^o ($T\Delta S_{mic}^o$) in pure water is approximately $+19.6 \text{ kJ mol}^{-1}$, which results from the release of water molecules structured around the hydrophobic dominium of the surfactant when SDS monomers are transferred to the inner core of the micelles.

The presence of ILs changes the thermodynamic parameters ΔH_{mic}^o and ΔS_{mic}^o , leading to modification of the SDS aggregate thermodynamic stability. A more

appropriate thermodynamic parameter to express the relative stability between aggregates formed in IL solutions and in pure water is $\Delta\Delta X_{mic}^o = \Delta X_{mic}^o(\text{with IL}) - \Delta X_{mic}^o(\text{without IL})$, where X can be G , H , or TS . Figure 3.5 shows the relative thermodynamic stability between the SDS aggregates in IL solution and in water ($\Delta\Delta X_{mic}^o$) as a function of the IL concentration.

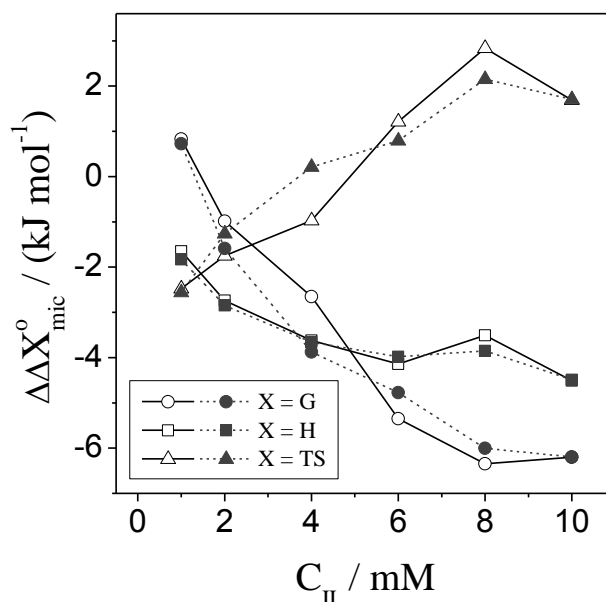


Figure 3.5. Relative thermodynamic stability between the SDS aggregates in IL solutions and in water expressed by $\Delta\Delta X_{mic}^o = \Delta X_{mic}^o(\text{with IL}) - \Delta X_{mic}^o(\text{without IL})$ ($X = G, H, \text{ or } TS$) as a function of bmimBr (open symbols) and bmimCl (closed symbols) concentration at 298.2 K.

As the IL concentration increases, $\Delta\Delta G_{mic}^o$ values become more negative because the enthalpy change decreases and the entropy change increases. Based on the mechanism proposed for SDS-IL interactions, the enthalpic stabilization promoted by the presence of ILs on the micellization process ($\Delta\Delta H_{mic}^o < 0$) is due to the following reasons: (i) the IL promotes electrostatic shielding that decreases the electrostatic repulsion energy

between the SDS headgroup in the micellar surface and (ii) the IL can preferentially solvate DS⁻ anions in the bulk, avoiding the breaking of hydrogen bonds between water molecules around the surfactant hydrocarbon chain when monomers are transferred to the inner core of the micelle. As the IL concentration increases, electrostatic shielding increases and more IL solvates the monomer chain, making $\Delta\Delta H_{mic}^o$ more negative.

In the $\Delta\Delta S_{mic}^o$ versus C_{IL} curves, the $\Delta\Delta S_{mic}^o$ values are negative when the IL concentration ranges from 1.00 mM to 4.00 mM. The further addition of IL makes $\Delta\Delta S_{mic}^o$ positive, showing that two thermodynamic processes compete in stabilizing the aggregates. At lower IL concentrations, the entropic loss in the presence of the IL agrees with the formation of bmim⁺DS⁻ ionic pairs. This hypothesis was suggested by the decrease of $d\kappa/dC_{SDS}$ in the κ versus C_{SDS} curves (Figure A.S1 in the Supporting Information) with increasing IL concentration. This rate changed from 68.8 $\mu\text{S cm}^{-1} \text{mM}^{-1}$ in the absence of IL to 59.7 $\mu\text{S cm}^{-1} \text{mM}^{-1}$ and 60.0 $\mu\text{S cm}^{-1} \text{mM}^{-1}$ in the presence of 10.0 mM bmimBr and 10.0 mM bmimCl, respectively. Thus, when cmc is attained, bmim⁺ cations bound to the surfactant headgroup are transferred together with SDS monomers to the micellar surface. Otherwise, water molecules solvating the SDS headgroups would be released, thus increasing the entropy of the system. On the other hand, at IL concentrations higher than 4.00 mM, the bmim⁺ cations begin to solvate the SDS hydrophobic tail. Considering that in the solvation shell of the SDS hydrophobic tail the IL increases the structuration of the water molecules, when SDS/IL aggregates are formed, water molecules and bmim⁺ cations that are released from the SDS hydrophobic chain contribute to an increase in the configurational entropy of the system (ΔS_{mic}^o is more positive in IL solutions).

3.3.2 SDS-PEO Interaction in Water-IL-Mixed Solvents

Isothermal titration calorimetry has been extensively used in studies of polymer–surfactant interactions because it helps researchers obtain important parameters that characterize this kind of interaction, such as the cac , C_2 , the integral enthalpy change for aggregate formation $[\Delta H_{agg(int)}]$, the standard free energy of micelle adsorption on the macromolecule chain ($\Delta\Delta G_{agg}$), and the extent of binding of the surfactant to the polymer.^{2,7} By using ITC in mixed systems containing water, IL, SDS, and PEO, we can evaluate the effect of ILs on these aggregation parameters for PEO-SDS interactions.

Figure 3.6 presents the ITC curves obtained by titrating a 472.0 mM SDS solution into 0.100% m/v PEO prepared in pure water (Figure 3.6a) or in 4.00 mM bmimBr aqueous solution (Figure 3.6b). The corresponding SDS dilution curves in solvent (pure water or bmimBr aqueous solution) are shown for comparison.

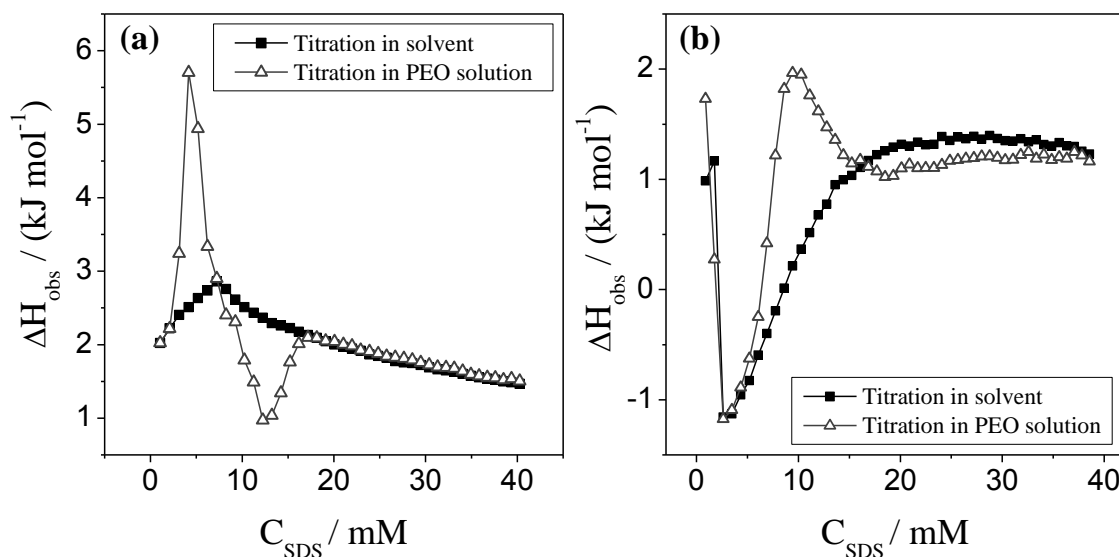


Figure 3.6. Titration curve of 472.0 mM SDS to 0.100% m/v PEO 35000 or solvent.

The solvents are (a) pure water and (b) 4.00 mM bmimBr.

The differences between the curve of SDS titration in PEO solution and the curve of SDS dilution for each solvent are attributed to the PEO-SDS interaction. In pure water (Figure 3.6a), for the first two injections in the calorimetric sample cell, the SDS titration curve in PEO solution coincides with the surfactant dilution curve because SDS does not interact with PEO at the corresponding concentration range. However, at 3.47 mM SDS, the curves begin to separate, and ΔH_{obs} for the SDS titration curve in polymer solution becomes more positive than that for SDS dilution in water. This concentration is denoted as the *cac*, and it indicates the beginning of SDS aggregation on the polymer chain. Because the *cac* value (3.47 mM) is lower than the SDS *cmc* value (8.06 mM), we say that the SDS self-association is facilitated by the presence of the polymer owing to a cooperative aggregation process.³⁹ As the SDS concentration increases, the difference in ΔH_{obs} for the two curves depends on the SDS concentration; the SDS titration curve in polymer solution displays an endothermic peak relative to the SDS dilution curve in water (ΔH_{obs} for SDS titration in PEO > ΔH_{obs} for SDS dilution), followed by an exothermic peak (ΔH_{obs} for SDS titration curve < ΔH_{obs} for SDS dilution curve). At 18.1 mM SDS, the curves join together again, indicating the saturation of the polymer macromolecular chains and the end of the influence of PEO on the SDS aggregation. This concentration is called the saturation concentration, C_2 . The further addition of SDS to the sample cell leads to micelle formation in the bulk.

At 4.00 mM bmimBr (Figure 3.6b), some features of the SDS titration curve in PEO solution relative to the SDS dilution curve are the same as those observed in pure water, but the differences should be highlighted. Clearly, *cac* increases by the presence of 4.00 mM bmimBr (*cac* = 5.19 mM), and the *cac* value is higher than the SDS *cmc* value in 4.00 mM bmimBr (*cmc* = 1.60 mM). This shows that at this IL concentration, the SDS/IL aggregates in the bulk are more stable than those formed on the PEO chain

(cac values obtained for all studied IL concentrations are shown in Table A.S2 in the Supporting Information; they are always higher than SDS cmc for the same IL concentration). Nevertheless, as previously discussed, in the presence of the IL, the SDS concentration increase from c_{2thc} (6.04 mM in 4.00 mM bmimBr) promotes a change in the SDS nanostructures, modifying their thermodynamic stability. Therefore, whereas cac (5.19 mM) < c_{2thc} (6.04 mM), the SDS nanostructures formed at c_{2thc} are less stable than the PEO-SDS complexes formed at cac in the presence of bmimBr.

The presence of bmimBr also increases the C_2 value, from 18.1 mM in pure water to 37.1 mM in 4.00 mM bmimBr, leading to an increase in the SDS concentration range over which SDS interacts with the polymer. This suggests an increase in the binding capacity of SDS to PEO, demonstrating that SDS/IL mixed aggregates interacting with the PEO chain are more stable than SDS aggregates formed on the PEO surface in pure water.

The picture that comes from our calorimetric data (graphical abstract in supporting information) is that as SDS is added into the 0.100% m/v PEO solutions in the presence of bmimBr, SDS micelles in the titrant solution are diluted and broken into monomers. Then, as the SDS concentration increases to cmc, the SDS monomers aggregate to form SDS/IL mixed micelles in the bulk, and no interaction between SDS and PEO occurs (the ITC curves of SDS titration in PEO solution and SDS dilution in solvent are coincident). After the SDS concentration attains cac , the SDS/IL aggregates in bulk become less stable than the SDS/IL nanostructures adsorbed onto the PEO chains and the SDS/IL adsorption process on the polymer starts. Finally, when the PEO chain becomes energetically saturated at C_2 , SDS/IL aggregates with the same structure as those formed at c_{2thc} (in the absence of PEO) appeared in the bulk.

To check our hypothesis that there are SDS micelles at surfactant concentrations below cac , fluorescence measurements using pyrene as a molecular probe were done in solutions containing 0.100% m/v PEO 35000, bmimBr, and SDS. Figure 3.7 shows the curves of the I_1/I_3 ratio obtained as a function of $\log(C_{SDS})$ in the absence and presence of the polymer at 4.00 mM bmimBr. Similar results were obtained in 10.00 mM bmimBr.

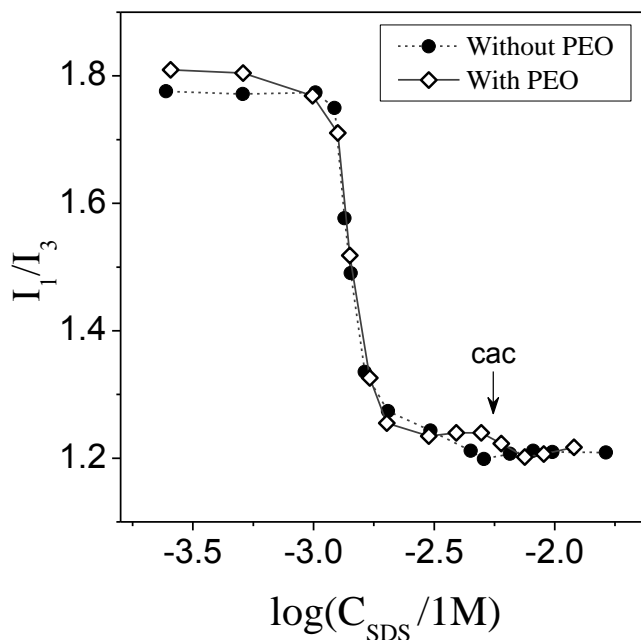


Figure 3.7. Pyrene I_1/I_3 ratio versus $\log(C_{SDS})$ in the presence of 4.00 mM bmimBr with and without 0.100% m/v PEO 35000 at 298.2 K. Pyrene concentration was 1.2 μ M; cac value presented was determined by ITC.

In fact, the addition of PEO does not change the I_1/I_3 ratio obtained in the absence of macromolecules or the surfactant concentration in which SDS/IL aggregates are formed, showing that PEO does not facilitate SDS aggregation when bmimBr is present. Consequently, before SDS begins interacting with the polymer ($C_{SDS} < cac$), SDS/IL aggregates are formed in the bulk at a concentration equal to the SDS cmc in the solvent.

To evaluate the effect of IL concentration on the enthalpic change associated with the PEO-SDS interaction, we subtracted the SDS titration curve in the PEO 35000 solution from the SDS dilution curve in the solvent for each SDS concentration. Then, we obtained the apparent change in molar enthalpy of the interaction, ΔH_{ap-int} , versus SDS concentration for each IL concentration. Here, the term “apparent” is used because the SDS amount bound to the polymer at each injection is unknown. Therefore, we cannot calculate the exact molar enthalpy change of the PEO-SDS interaction. Despite this, the ITC curve can provide qualitative information about the surfactant aggregation stages as the SDS concentration increases. Figure 3.8 shows the ΔH_{ap-int} versus C_{SDS} curves at bmimBr concentrations of 0, 1.0, 4.0, 6.0, 10.0, and 100 mM. Figure A.S5 in the Supporting Information contains all studied IL concentrations. Similar results obtained for bmimCl are shown in Figure S6.

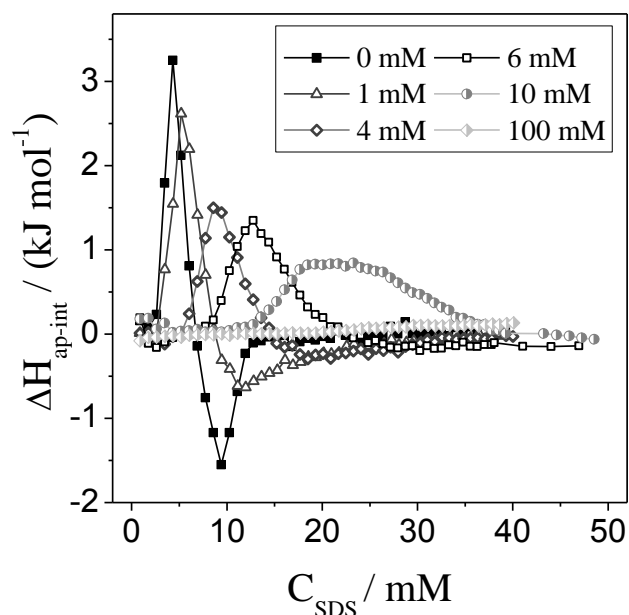


Figure 3.8. Apparent change in the molar enthalpy of the interaction between 0.100% m/v PEO 35000 and SDS versus SDS concentration at different bmimBr concentrations.

For each IL concentration, ΔH_{ap-int} values equal to zero correspond to the SDS concentrations in which the curve of SDS titration in PEO solution and the SDS dilution curve in solvent are coincident, and no SDS is bound to the polymer chain. Therefore, cac and C_2 can be determined directly from the ΔH_{ap-int} versus C_{SDS} curves according with their definitions, as discussed above in regards to Figure 3.6. Clearly, the IL concentration increase promotes an increase in cac (values given in Table A.S2 in the Supporting Information), indicating that the IL destabilizes the PEO-SDS aggregates.

In the absence of IL, the ΔH_{ap-int} versus C_{SDS} curve presents two peaks, one endothermic after the cac value, followed by one exothermic peak, that ends at C_2 . For IL concentrations up to 6.0 mM, the same profile of ΔH_{ap-int} versus C_{SDS} curves is observed, but the increase in the IL concentration decreases the intensity of the endothermic and exothermic peaks, making them broader. Finally, the exothermic peak vanishes at 8.0 and 10.0 mM of bmimBr, and no peak can be observed at 100.0 mM bmimBr, suggesting that the PEO-SDS interaction does not occur at this last bmimBr concentration.

On the basis of previous studies regarding the PEO-SDS interaction in pure water,^{7,32} the endothermic peak after cac (ΔH_{obs} for SDS titration in PEO > ΔH_{obs} for SDS dilution) arises from the dehydration of PEO chains that are solubilized in the core of SDS micelles with low aggregation number. As the surfactant concentration increases, an exothermic peak (ΔH_{obs} for SDS titration in PEO < ΔH_{obs} for SDS dilution) occurs as result of the rehydration of polymer chain segments when they leave the micellar core and move to the SDS micellar surface. Consequently, the change in the intensity and shape of the endothermic and exothermic peaks in the ΔH_{ap-int} versus C_{SDS} curves in bmimBr solution suggests that the desolvation and resolvation processes of macromolecule segments during surfactant binding is altered by the IL. The energy

involved in the desolvation and resolution processes probably helps modulate the relative stability of the nanoaggregates (SDS/IL and SDS/PEO/IL) in the system. To evaluate the degree to which the SDS/IL aggregates adsorbed on the polymer are more stable than SDS/IL aggregates in the bulk, the standard free energy change of aggregate adsorption on the macromolecule chain in relation to the aggregate formation in the solution was calculated by using the following equation.^{32,39}

$$\Delta\Delta G_{agg(1)} = \Delta G_{p-s} - \Delta G_{mic}^o = RT \ln \frac{cac}{cmc} \quad (3.2)$$

where it is considered that the Gibbs free energy change in terms of the formation of SDS aggregates in the bulk at cmc and in terms of the formation of SDS aggregates adsorbed onto the polymer surface at cac is the result of similar forces. The more negative is the $\Delta\Delta G_{agg(1)}$ value, the more favorable is the transference of the SDS monomer from a surfactant aggregate in the bulk to an aggregate adsorbed onto the polymer chain. In a similar way, we defined $\Delta\Delta G_{agg(2)}$ to express the relative stability between the SDS/IL aggregates adsorbed onto the polymer chain and the SDS/IL nanostructures formed at c2thc by using the c2thc value in equation 3.2. In pure water, $\Delta\Delta G_{agg(1)}$ is negative ($-2.09 \text{ kJ mol}^{-1}$), showing that SDS aggregates adsorbed onto the PEO chain are more stable than SDS micelles in the bulk. Interestingly, the 4.00 mM bmimBr makes the SDS/PEO/IL aggregates less stable than SDS/IL aggregates formed in the absence of PEO at cmc ($\Delta\Delta G_{agg(1)} = +2.92 \text{ kJ mol}^{-1}$). However, at this IL concentration, the SDS/PEO/IL aggregates are more stable than the second SDS/IL aggregates formed at c2thc ($\Delta\Delta G_{agg(2)} = -0.85 \text{ kJ mol}^{-1}$). Figure 3.9 shows the bmimBr concentration effect on the $\Delta\Delta G_{agg(1)}$ and $\Delta\Delta G_{agg(2)}$ values.

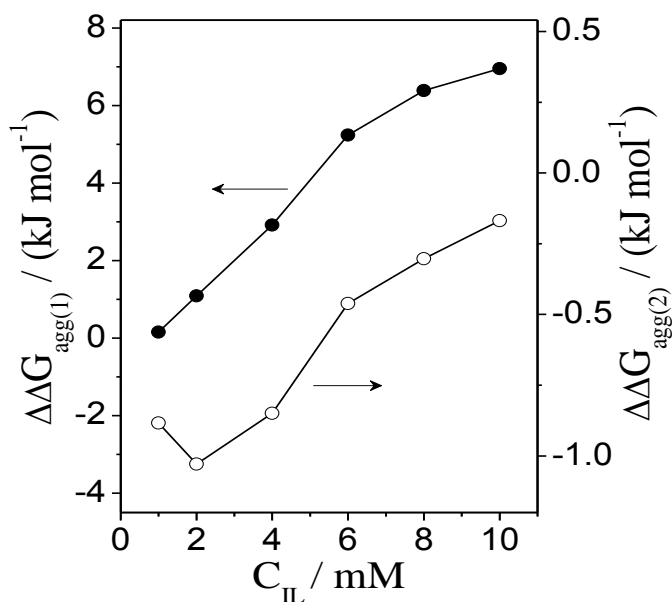


Figure 3.9. Effect of bmimBr concentration on the relative stability between the SDS/IL aggregates adsorbed onto the PEO chain and the SDS/IL nanostructures formed at cmc ($\Delta\Delta G_{agg(1)}$) or formed at c2thc ($\Delta\Delta G_{agg(2)}$).

The $\Delta\Delta G_{agg(1)}$ values were positive for all IL concentrations evaluated, and the values increased with increasing bmimBr concentration, showing that the IL stabilizes the SDS/IL aggregates formed at the cmc in the bulk and destabilizes the SDS/PEO aggregates. Destabilization of the SDS/PEO/IL aggregates is also suggested by the bmimBr effect on $\Delta\Delta G_{agg(2)}$ values, which became less negative as the bmimBr concentration increased.

It was not possible to calculate $\Delta\Delta G_{agg}$ values for 100.0 mM bmimBr because the PEO-SDS interaction at this IL concentration was not verified by ITC [ΔH_{ap-int} values were zero for all SDS concentrations evaluated (Figure 3.8)]. Despite this, fluorescence measurements showed that SDS aggregates (in the absence of PEO) are formed at a 100.0 mM bmimBr solution at a cmc of 0.331 mM. At the same time, there was no calorimetric evidence about a second SDS nanostructure at this IL

concentration in the SDS range studied. In fact, by fitting the $\Delta\Delta G_{agg(2)}$ versus IL concentration curve to an exponential fit and extrapolating to 100.0 mM bmimBr, $\Delta\Delta G_{agg(2)}$ was +12 kJ mol⁻¹, showing that at this IL concentration, the SDS/IL nanostructures formed in the bulk are more stable than SDS/IL aggregates adsorbed onto the PEO chain in the SDS concentration range evaluated and that the PEO-SDS interaction does not take place. At 100.0 mM of other electrolytes such as Li₂SO₄, NaCl, NaSCN, and Na₂[Fe(CN)₅(NO)],⁷ the PEO-SDS interaction was observed in the same SDS concentration range, confirming that in the current study, bmim⁺ cations participated directly in the structure of formed aggregates.

Reported data about PEO-SDS interactions have shown that SDS aggregation is facilitated by the presence of the polymer, even in the presence of some cosolvents or cosolutes. For example, Dai and Tam⁶ studied the interaction between PEO and SDS in different glycol–water mixtures. At lower glycol concentrations, cac values obtained by ITC increased with increasing cosolvent concentration, but for each solvent, cac remained smaller than SDS cmc, so that $\Delta\Delta G_{agg(1)}$ was negative. Barbosa et al.⁷ evaluated the interaction between SDS and PEO in the presence of different electrolytes. The authors studied a salt that does not interact with PEO (NaCl) and others that are known to interact with macromolecules, such as Li₂SO₄, NaSCN, and Na₂[Fe(CN)₅NO]. They showed that the cac values were almost the same when PEO-SDS interactions occurred in water or in a 1.00 mM salt aqueous solution. When salt concentrations were increased to 10.0 and 100 mM, the cac values decreased around one unit, but the values were always smaller than the SDS cmc for the same solvents. The $\Delta\Delta G_{agg(1)}$ values were also negative for all conditions studied. Here, we have demonstrated that IL makes $\Delta\Delta G_{agg(1)}$ positive. Thus, when SDS binds to PEO chains, entropic and/or enthalpic contributions associated with the surfactant aggregation process in the presence of the polymer are modified by the IL.

A parameter that permits evaluation of how bmimBr changes the enthalpic contribution to relative stability between SDS/PEO/IL and SDS/IL aggregates is the integral enthalpy change for aggregate formation, $\Delta H_{agg}(int)$.

The $\Delta H_{agg}(int)$ values were estimated by assuming that (i) C_2 is achieved after Y injections of n_{inj} moles of the surfactant, giving a total volume, V_y , and that (ii) at C_2 , the monomer concentration in the bulk is equal to cmc . The total amount of added surfactant is Yn_{inj} , but from this total, $V_y(cm)$ mol does not interact with the polymer. Naturally, the sum of the observed enthalpies ($\sum q_{obs}$) should be discounted by the energy of demicellization and dilution ($Yq_{demic+dil}$) to give equation 3.3, as proposed by Olofsson and Loh.³⁹

$$\Delta H_{agg}(int) = \left[\frac{\sum q_{obs} - Yq_{demic+dil}}{Yn_{inj} - V_y cmc} \right] \quad (3.3)$$

The $\Delta H_{agg}(int)$ parameter expresses the enthalpy change for the formation of SDS aggregates on PEO from one mole of surfactant monomers in the concentration range from cac to C_2 . The values of $\Delta H_{agg}(int)$ were only calculated for IL concentrations in which C_2 was determined with more accuracy (Table 3.3). C_2 is less well defined at IL concentrations above 4.00 mM, and the derived values are quite uncertain.³⁹ Thus, they are not shown in Table 3.3.

Table 3.3. Thermodynamic Parameters of SDS Aggregation in 0.100% m/v PEO in Different Water-IL Mixed Solvents at 298.2 K

[LI] / mM	$\Delta H_{agg}(int)$ / kJ mol ⁻¹ ^a	C_2 / mM	N_S / (mmol g ⁻¹ of PEO)
bmimBr			
0.0	-0.72	18.1	10.4
1.00	1.35	25.7	23.8
2.00	1.94	27.9	27.3
4.00	2.16	37.1	38.6
bmimCl			
1.00	1.36	18.5	15.8
2.00	1.91	21.7	20.3
4.00	2.05	31.0	31.2

^aStandard deviations were less than 4.0%.

The SDS aggregation process on the PEO chain surface changed from exothermic in pure water ($\Delta H_{agg}(int) < 0$) to endothermic in the presence of bmimBr and bmimCl ($\Delta H_{agg}(int) > 0$), showing that the ILs enthalpically destabilized SDS/PEO aggregates and highlighting the hydrophobic character of the PEO-SDS interaction in the presence of the ILs. In addition, the increase in IL concentration makes $\Delta H_{agg}(int)$ more positive.

In synthesis, the $\Delta H_{agg}(int)$ value is the result of the energetic balance of the desolvation and resolution processes of the polymer chain, which explains the endothermic and exothermic peaks that appeared in the ΔH_{ap-int} versus C_{SDS} curves. Thus, the change in the $\Delta H_{agg}(int)$ values from negative in pure water to positive in systems containing ILs shows that the polymer desolvation/solvation process also occurs by disrupting and forming interactions between PEO and imidazolium cations, which are less intense when compared to PEO-water interactions.⁴² The increase in $\Delta H_{agg}(int)$ as the IL concentration increases indicates that the ILs play a more important role in the resolution process than in the desolvation process. This occurs because the resolution process, in which PEO is transferred from the core to the surface of the SDS/IL

aggregates, involves imidazolium cations that are located on the SDS/IL aggregate surface adsorbed onto the PEO chain. To corroborate the hypothesis that there is preferential PEO solvation by ILs, the exothermic peak disappears at 8.0 mM IL (Figures A.S4 and A.S5 in the Supporting Information). Besides, that preferential PEO solvation by ILs must involve hydrogen bonds between the oxygen atoms of the PEO chain and the hydrogen atoms of the imidazolium cations as suggested by Watanabe et al.⁴³ and Lodge et al.,⁴⁴ who have demonstrated that hydrogen bonds play an important role in determining the phase behavior of systems formed by PEO and imidazolium ILs.

The extent of binding (N_S), that is, the amount of SDS bound to PEO at C_2 , was calculated according to equation 3.4.

$$N_S = \frac{(C_2 - cmc) \cdot V_t}{m_{PEO}} \quad (3.4)$$

where V_t is the total volume in the sample cell at C_2 and m_{PEO} is the PEO total mass in the calorimetric sample cell. The results are shown in Table 3.3. The extent of the binding increases with increasing the IL concentration for both ILs, suggesting an increase in the aggregation number of the SDS/IL aggregates adsorbed onto the PEO chain, probably due to the formation of stoichiometric SDS/IL mixed aggregates. This result is supported by the linear increase in the extent of binding as the IL concentration increases ($N_S = 13.5 + 6.6C_{bmimBr}$, $R^2 = 0.906$ and $N_S = 10.4 + 5.2C_{bmimCl}$, $R^2 = 0.998$).

Although the replacement of bromide with chloride did not alter the micellization of the IL/SDS mixed aggregates, the effect of IL anions on SDS/PEO/IL aggregation is evident in terms of C_2 and the extent of binding. Chloride anions decrease the extent of SDS binding as compared to bromide anions, suggesting that the relative interaction between IL anions and $bmim^+$ cations modulates the interactions in the SDS/PEO/IL aggregates. Usually, more electronegative anions such as Cl^- interact more strongly with

imidazolium cations, promoting its stabilization in the bulk and decreasing the amount of it available to form SDS/PEO/IL aggregates. As result, C_2 (consequently the extent of binding) decreases because this parameter depends proportionally on IL concentration. The same reason has been used to explain why bmimCl is more efficient than bmimBr for inducing the formation of an aqueous biphasic system.⁴⁵

3.4. Conclusion

We used isothermal titration calorimetry, conductimetry, and fluorescence spectroscopy to evaluate the effect of ILs formed by 1-butyl-3-methylimidazolium cations on SDS micellization and PEO-SDS interaction in aqueous systems. SDS micellization was more favorable enthalpically and entropically in the presence of the ILs; however, the SDS aggregate stability in the presence of the ILs depended on the $n_{IL}:n_{SDS}$ ratio in the system. A second critical concentration, c_{2thc} , associated with the decrease in micelle size promoted by the redistribution of the DS^- monomers and $bmim^+$ cations in the aggregates, was verified in the ITC curves.

The interaction between PEO and SDS was affected by the ILs. However, the presence of PEO did not affect the micellization of SDS in water + IL systems. The SDS/PEO/IL aggregates were formed in a critical aggregation concentration, c_{ac} , above the cmc of the SDS but below the c_{2thc} . Thus, the relative stability order of the aggregates formed was SDS/IL (at cmc) > $SDS/PEO/IL$ (at c_{ac}) > SDS/IL (at c_{2thc}).

Our results showed that ILs interacted directly with the SDS and PEO in the formed nanostructures, being incorporated in the core/interface of SDS micelle and altering the solvation and desolvation processes in the formation of SDS/PEO aggregates. The interaction between PEO and SDS became unfavorable enthalpically in the presence of ILs, which enhanced the hydrophobic interaction contribution for the nanoaggregate

formation. The increase in the IL concentration up to 100.0 mM improved the stability of the SDS/IL micelles observed at c2thc as compared to the SDS/PEO/IL nanoaggregates, eliminating the SDS/PEO interaction.

Our results clearly show that ILs may alter the phase behavior of polymer–surfactant systems, and therefore, new applications of these systems can be accessed, particularly in fields related to separation and solubilization technology.

Supporting Information.

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.jpcc.5b09819 and can be found attached at the end of this thesis: Figures showing conductance versus SDS concentration curves in the presence of bmimCl and bmimBr (Figure A.S1); Pyrene I₁/I₃ ratio versus log (SDS concentration) curves in the presence of bmimCl (Figure A.S2); calorimetric curves of SDS dilution in the presence of bmimCl (Figure A.S3); The DLS size distribution curves in the presence of bmimBr (Figure A.S4); curves of apparent molar enthalpy change of PEO-SDS interaction in the presence of bmimCl and bmimBr (Figure A.S5 and A.S6). Tables containing parameters of SDS micellization (Table A.S1) and SDS aggregation in PEO (Table A.S2).

3.5. References

1. Goddard, E. D.; Anathapadmanabhan, K. P. *Interaction of Surfactants with Polymer and Proteins*; CRC Press: New York, 1993.
2. Brinatti, C.; Mello, L. B.; Loh, W. Thermodynamic Study of the Micellization of Zwitterionic Surfactants and their Interaction with Polymers in Water by Isothermal Titration Calorimetry. *Langmuir* **2014**, *30*, 6002–6010.
3. Carnero Ruiz, C.; Molina-Bolívar, J.; Aguiar, J.; MacIsaac, G.; Moroze, S.; Palepu, R. Effect of Ethylene Glycol on the Thermodynamic and Micellar Properties of Tween 20. *Colloid Polym. Sci.* **2003**, *281*, 531–541.
4. Hezaveh, S.; Samanta, S.; Milano, G.; Roccatano, D. Molecular Dynamics Simulation Study of Solvent Effects on Conformation and Dynamics of Polyethylene Oxide and Polypropylene Oxide Chains in Water and in Common Organic Solvents. *J. Chem. Phys.* **2012**, *136*, 124901.
5. Zdziennicka, A.; Jańczuk, B. The Relationship between the Adhesion Work, the Wettability and Composition of the Surface Layer in the Systems Polymer/Aqueous Solution of Anionic Surfactants and Alcohol Mixtures. *Appl. Surf. Sci.* **2010**, *257*, 1034–1042.
6. Dai, S.; Tam, K. C. Effect of Cosolvents on the Binding Interaction between Poly(ethylene oxide) and Sodium Dodecyl Sulfate. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 20794–20800.
7. Barbosa, A. M.; Santos, I. J. B.; Ferreira, G. M. D.; da Silva, M. C. H.; Teixeira, A. V. N. C.; da Silva, L. H. M. Microcalorimetric and SAXS Determination of PEO-SDS Interactions: The Effect of Cosolutes Formed by Ions. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 11967–11974.

8. Rogošić, M.; Sander, A.; Pantaler, M. Application of 1-Pentyl-3-methylimidazolium Bis(trifluoromethylsulfonyl) Imide for Desulfurization, Denitrification and Dearomatization of FCC Gasoline. *J. Chem. Thermodyn.* **2014**, *76*, 1–15.
9. Lai, X.; Ruan, C.; Liu, R.; Liu, C. Application of Ionic Liquid-Based Dispersive Liquid-Liquid Microextraction for the Analysis of Ochratoxin A in Rice Wines. *Food Chem.* **2014**, *161*, 317–322.
10. Dong, M.; Nan, Z.; Liu, P.; Zhang, Y.; Xue, Z.; Lu, X.; Liu, X. Two-Phase Synthesis of Hydrophobic Ionic Liquid-Capped Gold Nanoparticles and their Application for Sensing Cholesterol. *Electrochim. Acta* **2014**, *132*, 465–471.
11. Neto, B. A. D.; Spencer, J. The Impressive Chemistry, Applications and Features of Ionic Liquids: Properties, Catalysis & Catalysts and Trends. *J. Braz. Chem. Soc.* **2012**, *23*, 987–1007.
12. Keskin, S.; Kayrak-Talay, D.; Akman, U.; Hortaçsu, Ö. A Review of Ionic Liquids towards Supercritical Fluid Applications. *J. Supercrit. Fluids* **2007**, *43*, 150–180.
13. Chen, L. G.; Bermudez, H. Charge Screening between Anionic and Cationic Surfactants in Ionic Liquids. *Langmuir* **2013**, *29*, 2805–2808.
14. Chen, L. G.; Bermudez, H. Solubility and Aggregation of Charged Surfactants in Ionic Liquids. *Langmuir* **2012**, *28*, 1157–1162.
15. Inoue, T.; Higuchi, Y.; Misono, T. Differential Scanning Calorimetric Study of Nonionic Surfactant Mixtures with a Room Temperature Ionic Liquid, BmimBF₄. *J. Colloid Interface Sci.* **2009**, *338*, 308–311.
16. Inoue, T.; Aburai, K.; Sakai, H.; Abe, M. Surface Adsorption and Vesicle Formation of Dilaurylphosphatidylcholine in Room Temperature Ionic Liquids. *J. Colloid Interface Sci.* **2012**, *377*, 262–268.

17. Modaressi, A.; Sifaoui, H.; Grzesiak, B.; Solimando, R.; Domanska, U.; Rogalski, M. CTAB Aggregation in Aqueous Solutions of Ammonium Based Ionic Liquids; Conductimetric Studies. *Colloids Surf., A* **2007**, *296*, 104–108.
18. Beyaz, A.; Oh, W. S.; Reddy, V. P. Ionic Liquids as Modulators of the Critical Micelle Concentration of Sodium Dodecyl Sulfate. *Colloids Surf., B* **2004**, *35*, 119–124.
19. Rao, V. G.; Ghatak, C.; Ghosh, S.; Pramanik, R.; Sarkar, S.; Mandal, S.; Sarkar, N. Ionic Liquid-Induced Changes in Properties of Aqueous Cetyltrimethylammonium Bromide: A Comparative Study of Two Protic Ionic Liquids with Different Anions. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 3828–3837.
20. Rogers, R. D.; Seddon, K. R. Ionic Liquids-Solvents of the Future? *Science* **2003**, *302*, 792–793.
21. Inoue, T. Micelle Formation of Polyoxyethylene-Type Nonionic Surfactants in BmimBF₄ Studied by ¹H NMR and Dynamic Light-Scattering. *J. Colloid Interface Sci.* **2009**, *337*, 240–246.
22. Javadian, S.; Nasiri, F.; Heydari, A.; Yousefi, A.; Shahir, A. A. Modifying Effect of Imidazolium-Based Ionic Liquids on Surface Activity and Self-Assembled Nanostructures of Sodium Dodecyl Sulfate. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 4140–4150.
23. Pal, A.; Chaudhary, S. Effect of Hydrophilic Ionic Liquid on Aggregation Behavior of Aqueous Solutions of Sodium Dodecylsulfate (SDS). *Fluid Phase Equilib.* **2013**, *352*, 42–46.
24. Pal, A.; Chaudhary, S. Ionic Liquid Induced Alterations in the Physicochemical Properties of Aqueous Solutions of Sodium Dodecylsulfate (SDS). *Colloids Surf., A* **2013**, *430*, 58–64.

25. Pal, A.; Chaudhary, S. Ionic Liquids Effect on Critical Micelle Concentration of SDS: Conductivity, Fluorescence and NMR Studies. *Fluid Phase Equilib.* **2014**, *372*, 100–104.
26. Pramanik, R.; Sarkar, S.; Ghatak, C.; Rao, V. G.; Mandal, S.; Sarkar, N. Effects of 1-Butyl-3-methyl Imidazolium Tetrafluoroborate Ionic Liquid on Triton X-100 Aqueous Micelles: Solvent and Rotational Relaxation Studies. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 6957–6963.
27. Sharma, R.; Mahajan, S.; Mahajan, R. K. Surface Adsorption and Mixed Micelle Formation of Surface Active Ionic Liquid in Cationic Surfactants: Conductivity, Surface Tension, Fluorescence and NMR Studies. *Colloids Surf., A* **2013**, *427*, 62–75.
28. Comelles, F.; Ribosa, I.; Gonzalez, J. J.; Garcia, M. T. Interaction of Nonionic Surfactants and Hydrophilic Ionic Liquids in Aqueous Solutions: Can Short Ionic Liquids Be more than a Solvent. *Langmuir* **2012**, *28*, 14522–14530.
29. Pal, A.; Pillania, A. The Effect of Hydrophilic Ionic Liquid 1-Butyl-2,3-dimethylimidazolium Bromide on the Aggregation Behavior of Tetradecyltrimethylammonium Bromide in Aqueous Media. *J. Mol. Liq.* **2015**, *209*, 6–13.
30. Łuczak, J.; Latowska, A.; Hupka, J. Micelle Formation of Tween 20 Nonionic Surfactant in Imidazolium Ionic Liquids. *Colloids Surf., A* **2015**, *471*, 26–37.
31. Bayat, E.; Sadeghi, R. Vapor Pressure Osmometry, Volumetry and Conductometry Investigations on the Interaction of Sodium Dodecyl Sulfate with Poly(Ethylene Glycol) and Poly(Propylene Glycol) in Aqueous Solutions. *Colloids Surf., A* **2013**, *436*, 260–269.

32. Niemiec, A.; Loh, W. Interaction of Ethylene Oxide-Propylene Oxide Copolymers with Ionic Surfactants Studied by Calorimetry: Random versus Block Copolymers. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 727–733.
33. Dai, S.; Tam, K. C. Isothermal Titration Calorimetry Studies of Binding Interactions between Polyethylene Glycol and Ionic Surfactants. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 10759–10763.
34. Rodenas, E.; Sierra, M. L. Aggregation Model that Describes the Physical Properties of the Sodium Dodecyl Sulfate/Poly(Propylene Glycol) System in Aqueous Solution. *Langmuir* **1996**, *12*, 1600–1604.
35. Behera, K.; Pandey, S. Modulating Properties of Aqueous Sodium Dodecyl Sulfate by Adding Hydrophobic Ionic Liquid. *J. Colloid Interface Sci.* **2007**, *316*, 803–814.
36. Behera, K.; Pandey, S. Ionic Liquid Induced Changes in the Properties of Aqueous Zwitterionic Surfactant Solution. *Langmuir* **2008**, *24*, 6462–6469.
37. Behera, K.; Dahiya, P.; Pandey, S. Effect of Added Ionic Liquid on Aqueous Triton X-100 Micelles. *J. Colloid Interface Sci.* **2007**, *307*, 235–245.
38. Ananthapadmanabhan, K. P.; Goddard, E. D.; Turro, N. J.; Kuot, P. L. Fluorescence Probes for Critical Micelle Concentration. *Langmuir* **1985**, *1*, 352–355.
39. Olofsson, G.; Loh, W. On the Use of Titration Calorimetry to Study the Association of Surfactants in Aqueous Solutions. *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, *20*, 577–593.
40. Smirnova, N. A.; Vanin, A. A.; Safonova, E. A.; Pukinsky, I. B.; Anufrikov, Y. A.; Makarov, A. L. Self-Assembly in Aqueous Solutions of Imidazolium Ionic Liquids and their Mixtures with an Anionic Surfactant. *J. Colloid Interface Sci.* **2009**, *336*, 793–802.
41. Rosen, M. J. *Surfactants and Interfacial Phenomena*; John Wiley & Sons: NJ, 2004.

42. Sturcova, A.; Schmidt, P.; Dybal, J. Role of Hydration and Water Coordination in Micellization of Pluronic block copolymers. *J. Colloid Interface Sci.* **2010**, *352*, 415–423.
43. Tsuda, R.; Kodama, K.; Ueki, T.; Kokubo, H.; Imabayashi, S.; Watanabe, M. LCST-Type Liquid-Liquid Phase Separation Behaviour of Poly(ethylene oxide) Derivatives in an Ionic Liquid. *Chem. Commun.* **2008**, 4939–4941.
44. Lee, H. -N.; Lodge, T. P. Lower Critical Solution Temperature (LCST) Phase Behavior of Poly(ethylene oxide) in Ionic Liquids. *J. Phys. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 1962–1966.
45. Freire, M. G.; Cláudio, A. F.; Araujo, J. M.; Coutinho, J. A.; Marrucho, I. M.; Canongia Lopes, J. N.; Rebelo, L. P. Aqueous Biphasic Systems: A Boost Brought about by Using Ionic Liquids. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 4966–4995.

Capítulo 4: A Calorimetric and Spectroscopic Study of the Interaction between Lactoferrin and Anionic Surfactants

Abstract

Lactoferrin (Lf) plays fundamental role in many biological processes due to its iron-binding feature. Therefore, to know the factors that affect the capacity of the Lf binding to iron is very important. To the best of our knowledge, studies evaluating how surfactants interact with this protein are poor and the effect of the interaction on the protein conformation and its iron binding capacity is unknown. In this work, we investigated the interaction between the Lf and different anionic surfactants [sodium dodecyl sulfate (SDS), sodium dodecylbenzene sulfonate (SDBS) and sodium decyl sulfate (DSS)] at different pH values. Isothermal titration calorimetry (ITC), nano differential scanning calorimetry (NanoDSC) and fluorescence spectroscopy were used to investigate this interaction. Fluorescence spectroscopy and NanoDSC data demonstrate that all surfactants induce Lf denaturation: the denaturation efficiency followed the order DSS < SDS < SDBS. The apparent molar enthalpy change of interaction (ΔH_{ap-int}), the extent of binding (N_S) and the integral enthalpy change for complex formation ($\Delta H_{agg}(int)$) were determinate from ITC and were highly dependent on pH and surfactant structure. The $\Delta H_{agg}(int)$ values were always negatives and ranged between $-0.61 \text{ kJ mol}^{-1}$, for DSS at pH 12.0, and $-5.99 \text{ kJ mol}^{-1}$, for SDS at pH 3.0. NanoDSC measurements showed that Lf bound to iron has more resistance against the destabilization induced by surfactants than iron free Lf. These results have important implications for help us to understanding the influence of surfactants on structural changes in proteins.

4.1. Introduction

Surfactants and proteins are compounds that together can generate complex systems with applications in many pharmaceutical, food and biological products.¹⁻⁴ Despite the fact that protein-surfactant systems find diverse applicability, the interest to elucidate the interaction between proteins and surfactants has made these systems a target of studied of several researchers.⁵⁻⁸ Although a great scientific advance has been obtained in the study of this interaction, some questions about the behavior of the systems containing proteins and surfactants remain unanswered, for example, about the instability of proteins in front to some surfactants.⁹ Moreover, surfactants and proteins are classes of heterogenic compounds and thus the study of protein-surfactant interaction using different proteins and/or surfactants is required.

To our knowledge, specific studies on the interaction of the lactoferrin protein with surfactants are scarce.¹⁰ Lactoferrin (Lf) is a monomeric glycoprotein of the transferrin family present in the milk of diverse mammals. This protein presents a high isoelectric point (pI close to 9) and its polypeptide chain has about 689 amino acid residues, resulting in a molecular weight of 80000 g mol⁻¹.^{11,12} Three-dimensional structures of lactoferrin from different mammals have been proposed by several authors.¹³⁻¹⁵ In general, the macromolecules of this protein are composed by two homologous globular lobes, one N-lobe and other C-terminal lobe, linked by a short α -helix. Each lobe consists of two domains and one metal binding site that binds tightly to one ferric ion together with one carbonate as synergistic anion. Each ferric ion is covalently bound to four protein ligands (2 Tyr, 1 Asp and 1 His) and to the synergistic carbonate anion that appears to bind to iron in a bidentate mode.

The Lf protein has several antimicrobial functions¹⁶ as well as presents many properties in the immune and inflammatory responses.¹⁷ These properties, in addition

with the many food and biopharmaceutical applications of the Lf,¹⁸ make the study of the interaction of this protein with surfactants strategic.

The interaction between apo-human transferrin and surfactant SDS has been recently studied by Taheri-Kafrani and Bordbar¹⁰ who utilized isothermal titration calorimetry to determine the enthalpy and heat capacity changes of this interaction. The authors found that SDS promotes the protein denaturation as verified for other proteins,¹⁹⁻²¹ however, insights about the role of ferric ion on the stability of the protein front to denaturation induced by surfactant have not been discussed. Because of this, we believe that other studies of interaction between transferrins and ionic surfactants are required.

In this work, we evaluated the interaction between the bovine milk lactoferrin and different anionic surfactants at different pH values. Isothermal titration calorimetry, nano differential scanning calorimetry and fluorescence spectroscopy were used. The surfactants sodium dodecyl sulfate (SDS), sodium dodecylbenzene sulfonate (SDBS), and sodium decyl sulfate (DSS) were studied.

4.2. Experimental

4.2.1. Materials

Bovine milk lactoferrin was obtained from DMV International Food (U.S.A.). Sodium dodecylbenzene sulfonate ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2(\text{C}_6\text{H}_4)\text{SO}_3\text{Na}$), sodium dodecyl sulfate ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2\text{OSO}_3\text{Na}$) and sodium decyl sulfate ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{CH}_2\text{OSO}_3\text{Na}$) surfactants were supplied by Sigma-Aldrich (U.S.A.). All surfactants were of the highest purity available. Pyrene (99%) was manufactured by Sigma-Aldrich. Citrate 0.05 M (pH 3.0), carbonate 0.1 M (pH 9.0) and phosphate 0.05 M (pH 12.0) buffers were prepared at our laboratory. All chemicals were used without further purification. Milli-QII water

(Millipore, USA) was used to prepare all buffers. The buffers were used to prepare all solutions.

4.2.2. Determination of Iron Saturation in Lf

The total content of iron in the Lf sample was measured by flame atomic absorption spectroscopy (AAS) with a VARIAN AA-240 spectrometer. Samples for analyses were prepared solubilizing the protein in water after the Lf powder was dissolved in 65% w/w nitric acid under heating (60 °C) during 1 h. The Iron content obtained in Lf (mg g^{-1}) was converted to percentage iron saturation by considering that a sample of Lf with 2 mol of iron per mole of protein (1.4 mg iron per g Lf) is 100% saturated with iron.

4.2.3. Nano Differential Scanning Calorimetry

The influence of the surfactants on the Lf thermal denaturation was evaluated using a NanoDSC calorimeter developed by TA instruments (EUA). Stock solutions containing or Lf either surfactant were mixed to obtaining 12.5 μM Lf solutions at several surfactant concentrations. These solutions were degassed by 10 minutes and filled the sample cell of the NanoDSC. A buffer solution, at same pH, was placed in the reference cell to obtaining a sample versus buffer scan. While the temperature of cells was increased from 30 to 110 °C, at a rate of 1 °C per minute, the heat flow necessary to keep both cells in thermal equilibrium was recorded. A scan with the buffer solution in both sample and reference cells (buffer versus buffer scan) also was obtained. Thermograms were prepared for analysis by subtracting the buffer versus buffer scan from sample versus buffer scan and converting to molar heat capacity data. All data were recorded with the TA Instruments software, and further analysis was performed using TA

NanoAnalyze version 2.4.1. Enthalpy changes of denaturation were estimated from the peak area in the thermograms using a straight baseline drawn from the onset to the end of thermal transition.

4.2.4. Fluorescence Spectroscopy

Fluorescence emission spectra were recorded on a Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer (Agilent Technologies, USA) equipped with a thermostat bath and 10 mm quartz cells. Spectra were obtained for 12.5 μM Lf in buffer (pH 3.0, 9.0 or 12.0), in the absence and presence of several concentrations of surfactant. The excitation was set at 295 nm to excite only the tryptophan residues, and the emission spectrum was recorded between 300 and 470 nm. The widths of both the excitation slit and emission slit were set at 5.0 and 2.5 nm, respectively. Measurements were performed at 25 °C and samples were left to equilibrate for at least 30 min before analysis.

4.2.5. Determination of the Critical Micelle Concentration of the Surfactants

The critical micelle concentration (cmc) of all surfactants, in all particular conditions, was measured using the pyrene assay. In the presence of micelles, the I_1/I_3 ratio, where I_1 and I_3 are the emission intensities of pyrene at 372.5 and 383.5 nm upon excitation at 335 nm, respectively, undergoes a change. The inflection point in the curve of I_1/I_3 ratio versus \log [surfactant] gives the cmc of surfactant. Pyrene concentration in samples was of 1.2 μM obtained from a 122 μM stock solution in ethanol. Samples were left to equilibrate for at least 30 min before analysis. 2.5 nm slit widths were used in the measurements. Three spectra were averaged at a scan speed of 30 nm per minute.

4.2.6. Isothermal Titration Calorimetry

Enthalpy changes associated with the Lf-surfactant interaction were obtained in a TAM III isothermal titration nanocalorimeter (TA instruments, EUA) controlled by TAM assistant™ dedicated software. 4 mL stainless steel cells were used in both sample and reference. Titrations were carried out by step-by-step injections (5 or 10 μL) of concentrated surfactant solution into 2.7 mL of 12.5 μM Lf solution at reaction cell. A Hamilton syringe (250 μL) controlled by a piston pump was used. All solutions were degassed by 10 minutes before of the experiments. The sample in the reaction cell was continually stirred at 120 rpm using a helix stirrer and the time intervals between the injections were of 12 minutes. The reference cell was filled with 2.7 mL of the same buffer used to prepare the Lf solution in the sample cell. Similar experiments were performed by replacing Lf solution in sample cell by buffer. Measurements were conducted at 25.0000 ± 0.0001 °C. Raw data were obtained as a plot of potency (μW) against time. These data were integrated to obtain a plot of observed enthalpy change per mole of injected surfactant against total surfactant concentration in the calorimetric sample cell.

4.2.7. Zeta Potential and Dynamic light scattering

The size and the zeta potential of the protein-surfactant aggregates were obtained on a Zetasizer, Nano series, Nano-ZS compact system from Malvern. Samples were prepared like in the fluorescence experiments.

4.3. Results and Discussion

4.3.1. Effect of pH on the Lf Structure

Nano differential scanning calorimetry (NanoDSC) can provide information on the thermal stability of proteins, on its mechanism of denaturation and on the reversibility of this process in several thermodynamic conditions. In addition, NanoDSC allows evaluate the effect of the protein-solute interaction on the protein denaturation process.²²⁻²⁴ Thus, we used NanoDSC to determinate the thermodynamic parameters associated with the Lf denaturation process, namely denaturation enthalpy change ($\Delta_{den}H$) and maximum peak temperature (T_m), at different pH values and several anionic surfactant concentrations.

The dependence of the Lf denaturation thermodynamic parameters on the surfactant concentration is related to Lf-surfactant interaction magnitude. On the other hand, the Lf-surfactant interaction magnitude depends on the protein conformation that is influenced by hydrogenionic concentration of the medium. To determine the pH effect on the Lf three-dimensional structure, NanoDSC thermograms of 12.5 μM Lf solutions were obtained at pH 3.0, 9.0, and 12.0 (Figure 4.1). All thermal transitions observed were irreversible as verified by second scans after cooling the Lf solution (data not shown).

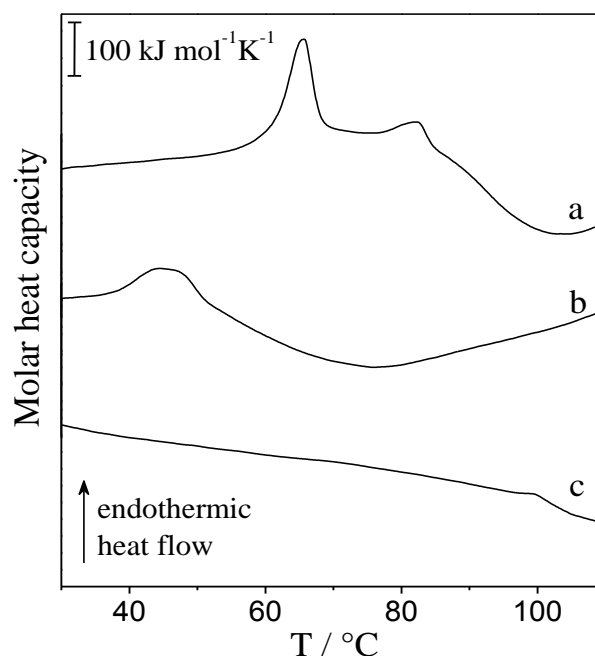


Figure 4.1. NanoDSC thermograms of 12.5 μM Lf solutions at (a) pH 9.0, (b) pH 12.0 and (c) pH 3.0.

The molar heat capacity (C_p) change versus temperature curves are originated from different molar heat capacities between the sample cell and the reference cell during the heating process. The different C_p values for each peak arise from disruption of the interactions stabilizing the Lf native structure in the sample cell. Thus, the transitions verified in thermograms are attributed to the Lf thermal denaturation process. At pH 9.0 (curve a), the Lf presents two endothermic transitions: the first one appears in the range of 56-70 $^{\circ}\text{C}$, with T_m at 65.59 $^{\circ}\text{C}$, and the second one appears in the range of 77-85 $^{\circ}\text{C}$, with $T_m = 82.45$ $^{\circ}\text{C}$. On the other hand, only one endothermic transition appears at pH 12.0 (curve b), between 40 and 53 $^{\circ}\text{C}$, with $T_m = 48.11$ $^{\circ}\text{C}$, while no thermal transition is observed at pH 3.0 (curve c), showing that the Lf is partially and completely denatured at pH 12.0 and 3.0, respectively.

Our results were the first ultrasensitive DSC measurements for bovine lactoferrin, however, “classical” DSC thermograms were obtained for this protein and it was also observed that two thermal transitions are present in the native Lf.^{25,26} The presence of two denaturation peaks has been attributed to the differences in the thermal stability between the apolactoferrin (iron free Lf) and the (mono- or di-)iron saturated Lf, in which the apolactoferrin presents a thermal stability lower than the (mono- or di-)iron saturated Lf.²⁶ Thus, the first ($T_m = 65.59$ °C) and the second ($T_m = 82.45$ °C) endothermic transition peaks observed at pH 9.0 (figure 4.1) are attributed to the thermal denaturation of apolactoferrin and (mono- or di-)iron saturated Lf, respectively. The peak observed at pH 12.0 is attributed to the (mono- or di-)iron saturated Lf. At pH 3.0, the Lf is fully denatured and probably it has released the ferric ion from its structure.^{11,27}

At pH values above and below pI (pH 9.0) the Lf net charge is different from zero and, especially at extremes pH values (in relation to pI), the electrostatic repulsions among Lf amino acid residues are strong enough to cause the disruption of hydrogen bonds and van der Waals interactions responsible by maintaining the tertiary structure of the protein. Thus, the Lf three-dimensional structures at pH 3.0 and 12.0 are different from that at pH 9.0. The complete denaturation of the Lf at pH 3.0 shows that the repulsive forces among the amino acid residues at this thermodynamic condition are stronger than at pH 12.0 because the Lf net charge is higher at pH 3.0 than at pH 12.0. Zeta potential (ζ) measures were performed and show that the Lf has $\zeta = +(21.7 \pm 1.5)$ mV at pH 3.0 and $\zeta = -(17.9 \pm 0.8)$ mV at pH 12.0. At pH 12.0 weaker electrostatic repulsions are not able to break all van der Waals interactions and hydrogen bonds that maintain the tertiary structure of the protein, and thus the Lf is partially denatured.

Our results show that the Lf structure depends on pH and they agree with “classical” DSC and spectroscopic data previously reported. Iafisco et al.²⁸ used

“classical” DSC and Raman spectroscopy to show the pH effect on the secondary and tertiary structures of cow’s milk lactoferrin with pH ranging between 4.0 and 9.0. At pH 4.0, the protein showed low thermal stability and all of its iron was free. Similar results were obtained by Sreedhara et al.²⁹ that utilized spectroscopic techniques to verify the thermal stability and the conformation changes of caprine and bovine lactoferrin in the pH range between 2.0 and 8.0. It was verified that bovine lactoferrin at low pH values exposes a lot hydrophobic regions to the solvent. More recently, Bokkim et al.,²⁵ using “classical” DSC, investigated the pH effect on the thermal stability of native Lf at very low ionic concentration with pH ranging between 4.0 and 7.0. In these conditions, they did not verify significant pH effect on the T_m and $\Delta_{den}H$ values. We do not have found studies on the pH effect on the Lf thermal stability at pH values higher than pH 9.0.

To asserting about the Lf thermodynamic stability, the maximum peak temperature was obtained. Table 4.1 presents the T_m values at pH 9.0 and 12.0, for each observed thermal transition. The $\Delta_{den}H$ values are also presented. Whereas no thermal transition is observed at pH 3.0, thermodynamic parameters associated with the Lf denaturation at this pH are not presented.

Table 4.1. Thermodynamic Parameters of Lf Denaturation at Different pH Values^a

pH	$T_{m1} / ^\circ\text{C}$	$\Delta_{den}H_1 / (\text{kJ mol}^{-1})$	$T_{m2} / ^\circ\text{C}$	$\Delta_{den}H_2 / (\text{kJ mol}^{-1})$
9.0	65.59	993.36	82.45	198.60
12.0	48.11	411.69	-	-

^a Standard error was lower than 5.5% for the $\Delta_{den}H$ and lower than 0.5% for the T_m

The $\Delta_{den}H$ values are positive for both thermodynamic conditions, reflecting the unfavorable enthalpic balance in the disruption and formation of interactions during the denaturation process.

At pH 9.0, $\Delta_{den}H$ for denaturation of iron free Lf ($\Delta_{den}H_1$) ($T_m = 65.59$ °C) is five times greater than $\Delta_{den}H$ for denaturation of (mono- or di-)iron saturated Lf ($\Delta_{den}H_2$) ($T_m = 82.45$ °C), suggesting that the level of Lf iron saturation is low in according to Bokkim et al.²⁶ To support this proposition, analysis of total iron content in the Lf sample was realized and an iron saturation of (7.51 ± 0.24) % was obtained.

At pH 12.0, $\Delta_{den}H_1$ ($T_m = 48.11$ °C) is lower than $\Delta_{den}H_1$ at pH 9.0 indicating a decrease in the enthalpic energy necessary to denature the Lf. This occurs because electrostatic repulsions among negatively charged amino acid residues are strong and/or there are few interactions maintaining the Lf tertiary structure at pH 12.0. This result, in addition to the decrease in T_m value, shows that the Lf thermal stability at pH 12.0 is smaller than at pH 9.0.

Magnitudes of the $\Delta_{den}H$ values found by us are in concordance with data reported in the literature and the differences observed are attributed to the distinct experimental conditions and/or slight difference in Lf structure. For example, Paulsson et al.³⁰ using “classical” DSC reported $\Delta_{den}H_1$ ($T_m = 65$ °C) and $\Delta_{den}H_2$ ($T_m = 92$ °C) values equals to 1120 and 880 kJ mol⁻¹, respectively, for native bovine Lf at pH 7.2. Bokkim et al.²⁶ using the same technique has determinate $\Delta_{den}H_1$ ($T_m = 60.6$ °C) and $\Delta_{den}H_2$ ($T_m = 89.4$ °C) values equal to 1048 and 168 kJ mol⁻¹, respectively, for native bovine Lf with 12.9 % iron saturation at pH 7.0.

4.3.2. Effect of Anionic Surfactants on the Lf Thermal Unfolding

NanoDSC data discussed above show that surfactants are going to interact with different structures of the Lf at the different pH values, however, just at pH 9.0 they are going to interact with Lf in its native form. Thus, to verify the effect of the anionic surfactants on the Lf thermal unfolding, NanoDSC thermograms at several surfactant

concentrations were obtained at this pH. Figure 4.2 shows NanoDSC thermograms of 12.5 μM Lf in the presence of different SDS concentrations. All the thermal transitions observed in the presence of this surfactant were also irreversible as verified by consecutive scans after cooling the Lf solution (data not shown).

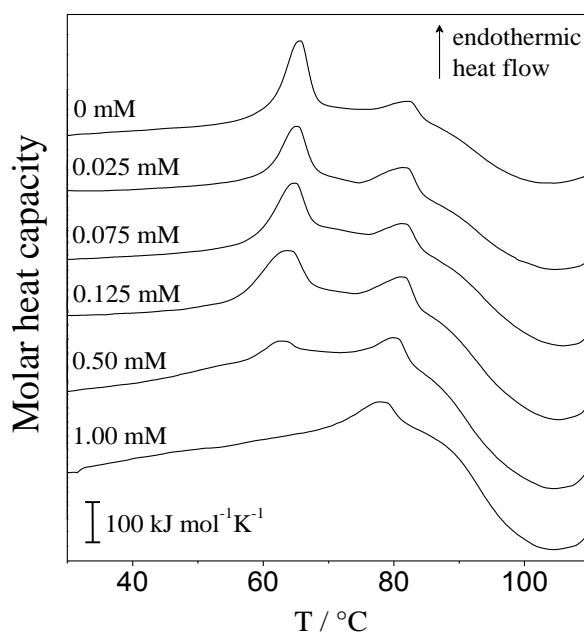


Figure 4.2. NanoDSC thermograms for the Lf thermal denaturation in the presence of different SDS concentrations at pH 9.0. The concentration of Lf is 12.5 μM . Scan rate was 1°C per minute. Numbers on the curves give the SDS concentrations.

In the presence of SDS, at concentrations below 1.00 mM, both endothermic transitions can be still observed in the Lf thermograms, nevertheless, the area and the position of the peaks are dependent on the surfactant concentration. In this concentration range, as the SDS concentration increases the peak area relative to the first endothermic transition (around 64 °C) decreases progressively while the peak area relative to second endothermic transition (around 80 °C) remains almost constant. These results show that

SDS is able to promote the Lf denaturation prior to heating and suggest that SDS interact more favorably with iron free Lf or that this one is less stable than (mono- or di-)iron saturated Lf in front to unfolding caused by SDS.

Table 4.2 shows T_{m1} , T_{m2} and $\Delta_{den}H_1$ obtained at different SDS concentration, at pH 9.0.

Table 4.2. Thermodynamic Parameters of Lf Denaturation at Different SDS Concentrations, at pH 9.0^a

[SDS] / mM	T_{m1} / °C	$\Delta_{den}H_1$ / kJ mol ⁻¹	T_{m2} / °C
0	65.59	993.36	82.45
0.025	65.03	925.7	82.04
0.075	64.54	863.40	81.97
0.13	63.45	738.87	81.73
0.50	62.44	232.46	80.62
1.00	-	-	77.88

^a Standard error was lower than 6% for the $\Delta_{den}H_1$ and lower than 0.5% for the T_m ; endothermic peak was not observed at 1.0 mM SDS.

The $\Delta_{den}H_1$ values decrease as SDS concentration increases and are a contribution of the denaturation of both Lf interacting with SDS and free Lf. This result, in addition to a slight decrease in the T_m values for both peaks, shows that SDS, besides promoting Lf denaturation, reduces its thermal stability. In the SDS concentration range from 0 to 0.50 mM, the thermal stability of the iron free Lf is more affected than the thermal stability of the (mono- or di-)iron saturated Lf as can be seen by higher variation of T_{m1} ($\Delta T_{m1} = 3.15$ °C) with respect to T_{m2} ($\Delta T_{m2} = 1.83$ °C).

When the SDS concentration attains 1.00 mM, the first endothermic transition at NanoDSC thermograms disappears and only the peak relative to the second endothermic transition is observed, indicating that the iron free Lf was fully denatured at this concentration. Finally, at SDS concentrations above 1.00 mM (figure B.S1 in Supporting

Information), the peak around 80 °C also disappears, showing that the (mono- or di-)iron saturated Lf also was completely denatured by SDS in higher surfactant concentrations.

The SDS effect on the thermal stability of the Lf at pH 12.0 was also evaluated and at 0.50 mM SDS the endothermic peak around 45 °C disappeared (data not shown), showing that the Lf is denatured by SDS at this pH. This SDS concentration is lower than that needed to promote the Lf denaturation at pH 9.0, indicating that electrostatic repulsions among negatively charged amino acid residues decrease the energetic cost to disrupting interactions maintaining the Lf tertiary structure.

According to above, SDS interacts with the Lf and it is able to induce the complete denaturation of the protein. However, SDS have different efficiencies to denaturing the iron free Lf and the (mono- or di-)iron saturated Lf. With our results we have suggested that the iron bound to the Lf, besides increasing protein thermal stability,^{30,31} increases its resistance against the destabilization induced by SDS. The ability of the SDS to cause the destabilization of the native structure of proteins has been attributed to both electrostatic and hydrophobic forces^{1,32,33} and it has been proved by several techniques such as fluorescence spectroscopy,³⁴ isothermal titration calorimetry¹⁰ and small angle X-ray scattering.³⁵

As the protein-surfactant interaction has the contribution of electrostatic and hydrophobic forces, this kind of interaction depends strongly on the surfactant structure, both the tail length and the headgroup features. To verify the surfactant structure effect on the formation of Lf-surfactant complexes, the Lf-DSS and Lf-SDBS interactions were also studied. DSS and SDBS have similar structures to the SDS, however, DSS has two carbon atoms less in the hydrophobic tail while SDBS has a benzene ring next to headgroup (figure B.S2 in Supporting Information). NanoDSC thermograms of 12.5 μM

Lf at pH 9.0 and at different concentrations of DSS and SDBS are showed in figures 4.3a and 4.3b, respectively.

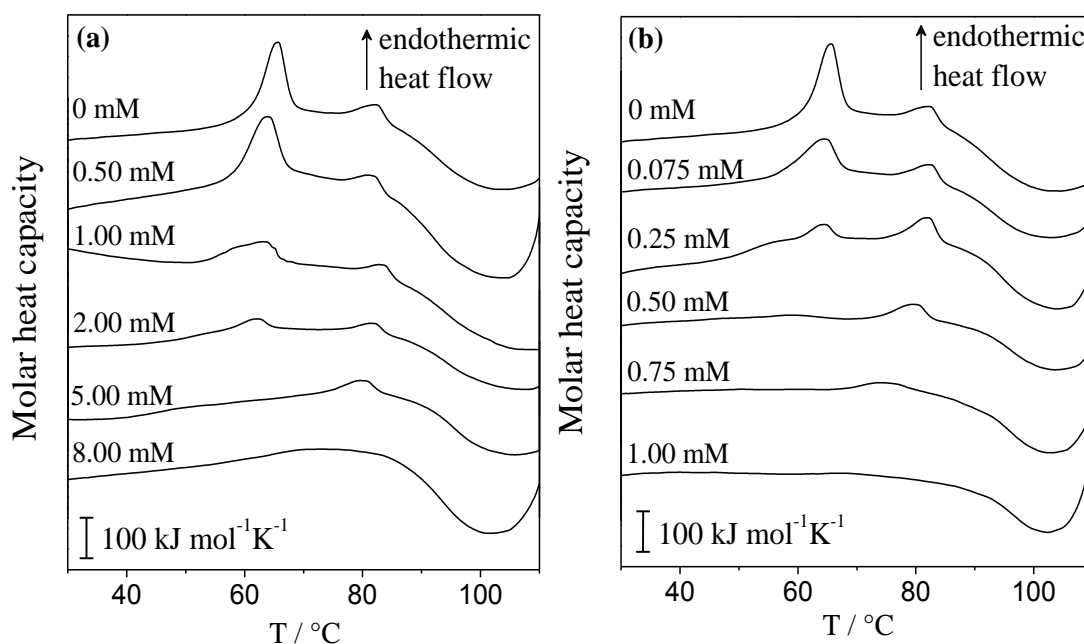


Figure 4.3. NanoDSC thermograms of Lf in the absence and presence of (a) DSS and (b) SDBS at pH 9.0. The concentration of Lf is 12.5 μM . Scan rate was 1°C per minute.

Numbers on the curves give the surfactant concentrations.

Similarly to the SDS effect on the Lf thermograms, DSS and SDBS promote changes on the area and the position of the endothermic peaks, showing that both surfactants also interact with Lf promoting its denaturation. However, different surfactant concentrations are necessary to denaturate completely the Lf, indicating that the Lf-surfactant binding constant depends on the surfactant structure. When the surfactant is the DSS, the first endothermic peak disappears at 5.0 mM while the peak associated with the second thermal transition is not observed from 8.0 mM. On the other hand, when SDBS is present, the first and second peaks disappear at 0.75 mM and 1.0 mM,

respectively. Thus, denaturation efficiency follows the order DSS < SDS < SDBS, demonstrating a clear contribution of the hydrophobic forces on the formation of the Lf-surfactant complexes. These results are in accordance with data of Andersen and Otzen³⁶ that showed that the ability of sodium alkyl sulfate surfactants to unfold the acyl coenzyme A binding protein increases with the hydrophobic tail length increase of the surfactant.

4.3.3. Fluorescence Spectroscopy

Fluorescence measurements were performed to corroborate with the NanoDSC data and better understanding the effect of the surfactants on the Lf structure. The fluorescence spectroscopy is a sensitive technique that allows obtaining information about conformational changes in proteins caused by interaction with some molecule. This technique can reveal details about the surrounding environment of protein fluorophores, help to elucidate the binding mechanism between protein and other molecules as well as provide idea about the nature of the binding phenomenon.^{37,38} We used fluorescence spectroscopy to accessing tryptophan intrinsic fluorescence in the Lf.

Figure 4.4a shows the SDS effect on the fluorescence emission spectrum of 12.5 μ M Lf at pH 9.0, with excitation of the protein at 295 nm.

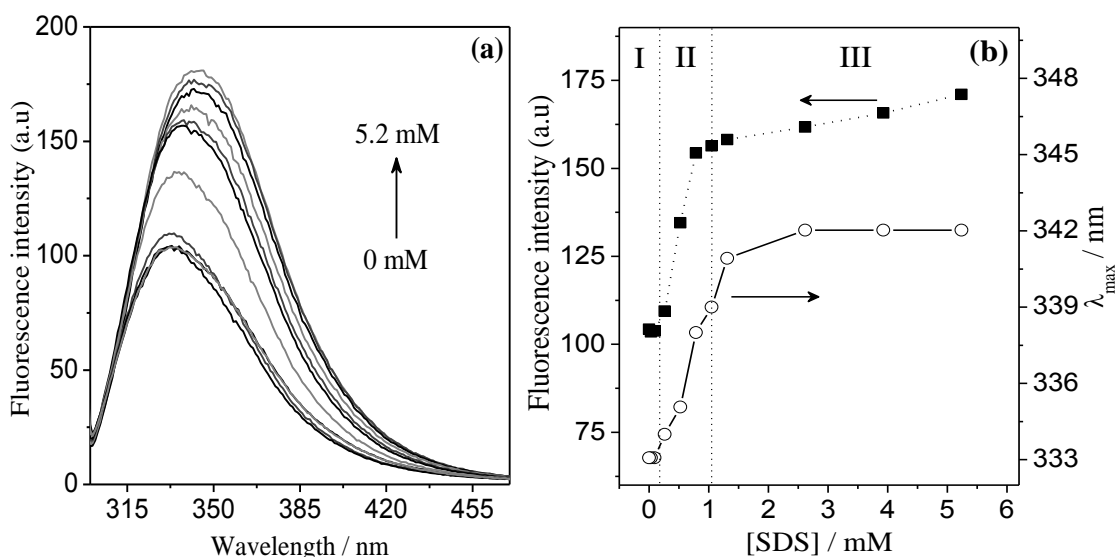


Figure 4.4. (a) SDS effect on the fluorescence emission spectrum of 12.5 μM Lf at pH 9.0; the fluorescence intensity always increases as SDS concentration increases from 0 to 5.2 mM; (b) (■) I_f versus SDS concentration and (○) λ_{max} versus SDS concentration curves. Lf concentration is 12.5 μM . Protein excitation was performed at 295 nm.

Lf in the absence of SDS shows, as excited at 295 nm, an emission spectrum with a maximum emission wavelength (λ_{max}) at 333 nm and this one exclusively arises due to the tryptophan amino acid residues (Trp).³⁹ Characterization of the primary structure of the bovine lactoferrin indicates that this protein contains thirteen Trp¹² and whereas these residues contribute unequally to the total emission, the emission spectrum obtained reflects the average environment of all the Trp in the protein. Because of its aromatic character, the Trp in the native Lf can be buried, either in the hydrophobic interior of the protein or at the interface between two domains/subdomains of the biomolecule. According to Royer,³⁹ a maximum emission wavelength around 335 nm is compatible with Trp residues in a partially buried configuration, suggesting that Trp in the Lf are in this configuration.

As SDS concentration increases an increase in the fluorescence intensity (I_f) is observed. This I_f increase is accompanied by a moderate red shift in λ_{\max} , indicating that the Trp residues migrated from a more hydrophobic region to a more hydrophilic region⁴⁰ and confirming that Lf-SDS interaction promotes conformational changes in the protein as demonstrated by NanoDSC.

Figure 4.4b shows in more details how I_f and λ_{\max} depend on the SDS concentration and three distinct regions are highlighted. In the region I, from 0 to 0.095 mM SDS, both λ_{\max} and I_f remain almost constant indicating that at this concentration range the SDS interacts with Lf without altering the Trp microenvironment. In the regions II and III, I_f increases linearly as the SDS concentration increases, but the slope in the region II (from 0.095 mM to 1.0 mM SDS) is higher than the slope in the region III (above 1.0 mM SDS). The I_f increase in the region II is accompanied by a large red shift in λ_{\max} from 333 to 339 nm while in the region III, λ_{\max} come back to be almost constant from 2.6 mM SDS, showing that the higher conformational change of the Lf occurs in the region II. Slope change from the region II to the region III at 1.0 mM gives the SDS concentration in which the iron free Lf is fully denatured and the (mono- or di-)iron saturated Lf begins to be denatured as showed by NanoDSC. Thus, the large slope in the region II shows that the iron free Lf contributes with a high number of Trp residues exposed to the solvent.

The increase of I_f (increase of quantum yield of Trp) is attributed to the exposition of buried Trp residues to the solvent during the Lf denaturation. This process increases the number of fluorophores that can be excited by radiation source and/or decreases the amount of lost energy through non-radiative processes such as energy transfer from Trp to other amino acid residues.^{12,39}

Despite the SDS effect on the λ_{\max} values, a red shift in the Lf fluorescence emission spectrum also is observed when the Lf is thermally treated. Figure 4.5 shows the λ_{\max} versus thermal treatment temperature (T_{TT}) curve for Lf at pH 9.0.

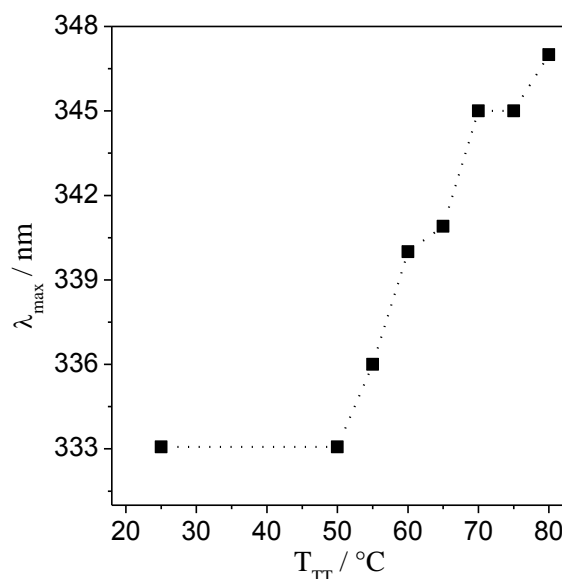


Figure 4.5. Effect of the thermal treatment temperature on the λ_{\max} values in the Lf fluorescence emission spectrum at pH 9.0. Lf concentration is 12.5 μM . Protein excitation was performed at 295 nm.

In the range between 25 and 50 $^\circ\text{C}$, the λ_{\max} values do not change and then they increase from 333 to 347 nm when the temperature ranges from 50 to 80 $^\circ\text{C}$. This λ_{\max} shift is accompanied by an increase in I_f (data not shown) and indicates the thermally induced Lf denaturation. This result is in accordance with the NanoDSC thermogram of Lf at pH 9.0 (Figure 4.1) that shows the start of the thermal denaturation of the protein at 56 $^\circ\text{C}$. In addition, the λ_{\max} in the thermally denatured Lf at 80 $^\circ\text{C}$ is higher than the λ_{\max} in the Lf denatured by SDS ($[\text{SDS}] > 2.6 \text{ mM}$) indicating that: (i) the thermally denatured Lf structure is different from that denatured by SDS; (ii) SDS decreases the solvent

hydrophilicity around the Trp residues and/or (iii) SDS interacts with sites near Trp residues.

To verify the surfactant structure effect on the Lf fluorescence, the emission spectrum of the biomolecule was obtained in the presence of DSS and SDBS. Figure 4.6 shows the DSS effect on the fluorescence emission spectrum of 12.5 μM Lf as well as the I_f and λ_{max} versus DSS concentration curves, at pH 9.0.

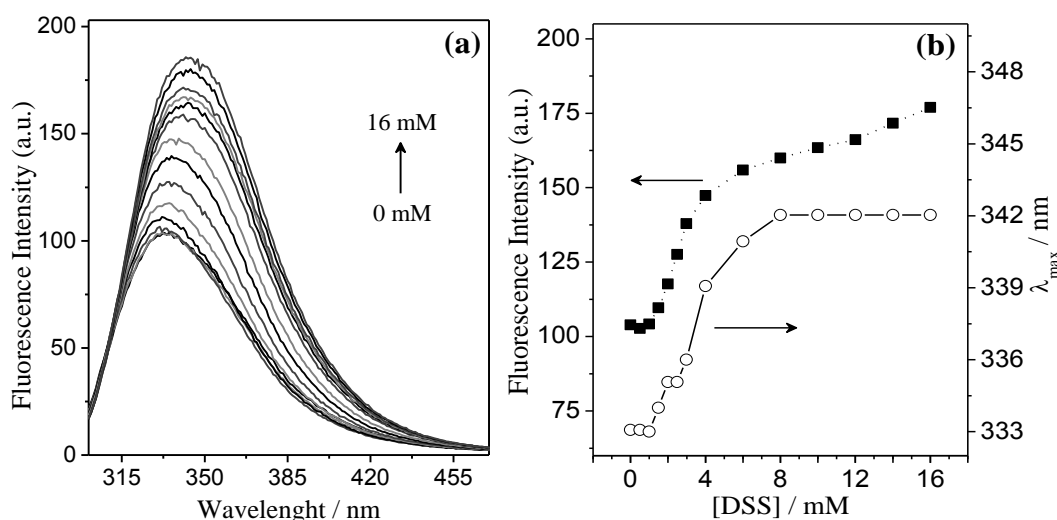


Figure 4.6. (a) DSS effect on the Lf fluorescence emission spectrum, at pH 9.0; the fluorescence intensity always increases as DSS concentration increases from 0 to 16 mM; (b) (■) I_f versus DSS concentration and (○) λ_{max} versus DSS concentration curves. Lf concentration is 12.5 μM . Protein excitation was performed at 295 nm.

The DSS effect on the I_f and λ_{max} values (figure 4.6b) is similar to that verified for SDS (figure 4.4b), indicating that the Lf-DSS interaction occurs by the same molecular processes of the Lf-SDS interaction. However, these processes occur at different surfactant concentration ranges confirming the effect of the hydrophobicity of the surfactant on the Lf-surfactant interaction. At DSS concentrations ranging between 0

and 1.0 mM (corresponding to range from 0 to 0.095 mM for SDS), I_f and λ_{\max} remain almost constant. Then, large changes in these parameters are verified between 1.0 and 5.0 mM (corresponding to range from 0.095 to 1.0 mM for SDS), indicating the iron free Lf denaturation (figure 4.3a) as previously proposed in the Lf-SDS interaction analyses. Above 5.0 mM DSS, λ_{\max} becomes constant attaining a maximum at 342 nm that is the same value observed in the Lf-SDS system. This result suggests that both SDS and DSS interact with Lf exposing Trp residues to a microenvironment with similar polarity.

The SDBS effect on the Lf fluorescence emission spectrum (Figure 4.7a) is very distinct from that observed with SDS and DSS. Figure 4.7b shows the I_f and λ_{\max} values as a function of the SDBS concentration, at pH 9.0.

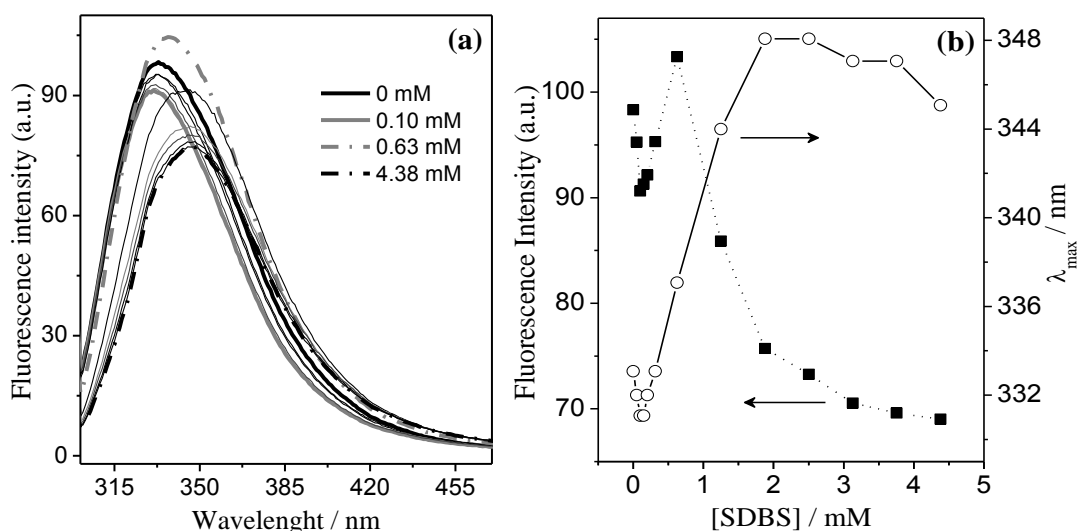


Figure 4.7. (a) SDBS effect on the Lf fluorescence emission spectrum, at pH 9.0; I_f decreases as SDBS concentration increases from 0 to 0.10 mM, then increases from 0.10 to 0.63 mM SDBS, and decreases again from 0.63 to 4.38 mM SDBS; (b) (■) I_f versus SDBS concentration and (○) λ_{\max} versus SDBS concentration curves. Lf concentration is 12.5 μ M. Protein excitation was performed at 295 nm.

Firstly, the increase in the SDBS concentration from 0 to 0.10 mM promotes the decrease of the I_f values and, at the same time, a slight blue shift in λ_{\max} (from 333 to 331 nm), suggesting a specific Trp-SDBS interaction. Then, as SDBS concentration rises up to 0.63 mM, the increase of I_f is observed simultaneously to a red shift in the λ_{\max} values (from 331 to 337 nm), showing that a lot of Trp residues are exposed to a more hydrophilic environment. Finally, further increasing SDBS concentration above 0.63 mM promotes a decrease of I_f that remains almost constant from 3.0 to 4.4 mM, showing that the Trp residues has been saturated by surfactant. A red shift of 11 nm is observed in λ_{\max} as SDBS concentration changes from 0.63 to 1.9 mM. Then, the λ_{\max} values decrease from 348 to 345nm when the SDBS concentration ranges from 1.9 to 4.4 mM SDBS.

The distinct effect of the SDBS on the fluorescence emission spectrum of the Lf can be attributed to the presence of a benzene ring in the hydrophobic tail of this surfactant, which is able to interact with the aromatic ring of the Trp residue via π - π stacking interaction.³⁹ In this sense, the complex profile of the I_f and λ_{\max} versus [SDBS] curves has been attributed to a balance of two contributions: (i) the π - π stacking interaction between SDBS and Trp residues that decreases the quantum yield of the Trp (quencher effect) and (ii) the Lf unfolding that exposes buried Trp residues to the solvent and increases its quantum yield (nonquencher effect).

When SDBS concentration ranges from 0 to 0.10 mM, quencher effect dominates over nonquencher effect as a result of (i) a slight Lf tertiary structure change that makes a few Trp residues unburied and (ii) a preferential and specific interaction between less buried Trp and SDBS. As result of this interaction, the Trp microenvironment hydrophobicity increases, promoting the slight blue shift in the λ_{\max} values.

On the other hand, from 0.10 to 0.63 mM, the nonquencher effect becomes more important mainly in view of the great change in the Lf tertiary structure (see DSC data)

that leads to the exposition of buried Trp residues and hydrophobic interaction sites to the solvent. The exposition of new hydrophobic sites with a higher binding affinity by SDBS minimizes the interaction between the surfactant and Trp residues promoting an increase of the Trp quantum yield and a reduction of the Trp environment hydrophobicity. Thus, both I_f and λ_{\max} values increase.

Then, above 0.63 mM SDBS, when iron free Lf is all unfolded (in accordance with DSC data) and Trp residues are almost all exposed, quencher effect takes place again. In this concentration range, the SDBS monomers continue to interact directly with Trp residues leading to a decrease of the Trp quantum yield. Thus, I_f values decrease again. This result agrees with the λ_{\max} decrease above 1.9 mM as result of the interaction Trp-SDBS that increases the hydrophobicity of the Trp microenvironment.

4.3.4. Isothermal Titration Calorimetry

As showed by NanoDSC and fluorescence spectroscopy, anionic surfactants interact with Lf leading to changes in its three-dimensional structure. To obtaining thermodynamic parameters associated with the formation of the Lf-surfactant complexes ITC was used.

ITC allows obtaining directly the released or absorbed heat during the occurrence of a molecular event and has been used in studies of interaction between macromolecules and several solutes.^{8,41,42} In the study of protein-surfactant interactions, ITC can provide a lot of information and we have used this technique to obtain the apparent molar enthalpy change of interaction (ΔH_{ap-int}), the saturation concentration (C_2), the extent of binding (N_5) and the integral enthalpy change of aggregation ($\Delta H_{agg}(int)$) associated with the formation of the Lf-surfactant complex at different pH values.

Figure 4.8 presents the ITC curves of observed enthalpy change (ΔH_{obs}) versus SDS concentration obtained when the reaction cell was filled or with citrate buffer at pH 3.0 (surfactant dilution curve) either with 12.5 μM Lf in citrate buffer at pH 3.0 (surfactant titration curve in Lf solution). ITC curves were also obtained for other surfactants and pH values studied and presented similar characteristics.

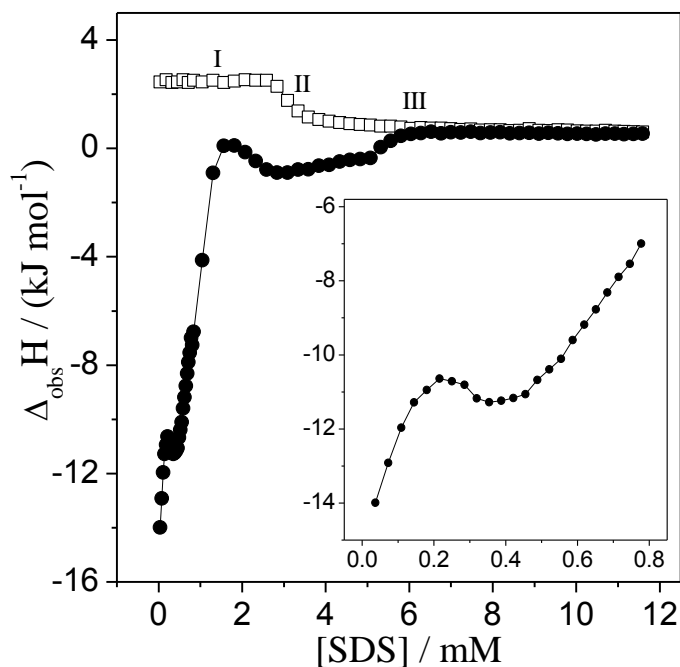


Figure 4.8. ΔH_{obs} versus SDS concentration curves for addition of SDS on (●) 12.5 μM Lf in 0.05 M citrate buffer, pH 3.0 and (□) 0.05 M citrate buffer, pH 3.0. The inset shows the magnification of the titration curve in Lf solution at low SDS concentrations.

The surfactant titration curve in Lf solution and the surfactant dilution curve are distinct in the range $0.037 \text{ mM} < [\text{SDS}] < 7.00 \text{ mM}$, indicating that different molecular events occur when the Lf is present in the sample cell. It is well known that the SDS dilution curve profile obtained when concentrated SDS solution is titrated on the pure solvent arises due to the following molecular processes: in the first injections generating

final concentrations below the cmc in the calorimetric cell [region I in the SDS dilution curve (figure 4.8)], the micelles present in the titration solution are diluted and broken to give monomers that are also diluted; then, when the SDS concentration in the calorimetric cell reaches the cmc region (region II), only a part of the injected micelles breaks up and the other one is diluted in the calorimetric cell; finally, at concentrations above cmc (region III), the added micelles are only diluted.⁴³

Using calorimetric data of the SDS dilution curve it is possible calculate the cmc by determining the inflection point in that curve. The enthalpy change associated with the micellization process (ΔH_{mic}^o) can be obtained by calculating the difference between ΔH_{obs} in the postmicellar region (region II) and ΔH_{obs} in the premicellar region (region I).⁴³ The cmc and ΔH_{mic}^o values for micellization of the SDS, DSS and SDBS surfactants in the buffering conditions used in this work are presented in the Table 4.3. To support the calorimetric cmc, fluorescence spectroscopy using pyrene as molecular probe was also used to determine cmc.

Table 4.3. Micellization Parameters of SDBS, SDS and DSS Surfactants at 25°C and Different pH Values*

Surfactant	pH 3.0			pH 9.0			pH 12.0		
	cmc ^a	cmc ^b	ΔH_{mic}^o ^c	cmc ^a	cmc ^b	ΔH_{mic}^o	cmc ^a	cmc ^b	ΔH_{mic}^o
SDS	2.73	3.20	-1.69	1.37	1.10	-3.03	1.33	1.00	-1.64
DSS	20.54	17.93	0.92	13.17	10.29	0.82	12.74	9.65	1.42
SDBS	0.37	- ^d	-	0.27	-	-	0.26	-	-

*Standard error was lower than 5% for the ΔH_{mic}^o and lower than 3% for the cmc.

^a cmc determinate by fluorimetry; ^b cmc determinate by calorimetry; cmc values are given in mM.

^c values in kJ mol⁻¹; ^d determination of parameters was not possible.

The cmc values obtained in both techniques are in agreement with each other and with literature data.⁴⁴ For all surfactants, when the pH increases from 3.0 to 12.0, the cmc values decrease, indicating a micelle stability increase. In addition, the micellization

process is more exothermic for SDS at pH 9.0 and less endothermic for DSS at the same pH. This result comes from the higher electrostatic shielding promoted by the higher ionic strength of the carbonate buffer.

The profile of the SDS titration curve in Lf solution (figure 4.8) arises due to a variety of molecular events, including the process of formation of the Lf-SDS complexes, the conformational changes of the Lf induced by SDS, and the formation of aggregates among Lf-SDS complexes. Thus, detailed interpretation of that curve can provide information about the interaction mechanism between Lf and SDS.

The SDS titration curve in Lf solution starts to deviate from the SDS dilution curve at the first SDS concentration in the calorimeter cell (0.037 mM), suggesting that the binding constant between SDS and Lf is strong. It was not possible to study the Lf-SDS interaction in lower surfactant concentrations because the measured calorimetric energy presented the same magnitude order than the equipment noise. In view of this, we were not able to determinate the concentration in which the interaction between Lf and SDS starts. However, it is possible to assert that this concentration is smaller than the cmc shown in table 4.3 [cmc (SDS pH 3.0) = 1.10 mM], indicating that in lower SDS concentrations the protein interacts with surfactant monomers at specific interaction sites.^{6,35}

At $0.037 \text{ mM} < [\text{SDS}] <$ and 7.00 mM , the ΔH_{obs} values in the SDS dilution curve are higher than the ΔH_{obs} values in the SDS titration curve in Lf solution. Therefore, the Lf-SDS interaction is enthalpically favorable, releasing energies with magnitude up to 16 kJ mol^{-1} (value obtained by subtracting ΔH_{obs} in the SDS dilution curve from ΔH_{obs} in the SDS titration curve in Lf solution at the first SDS solution injection). However, when the SDS concentration is equal to 7.00 mM , the ΔH_{obs} values become the same in both

curves, showing that the interaction Lf-SDS has ceased and the biomolecule has been saturated by SDS. This concentration is denominated saturation concentration (C_2).

By assuming that at C_2 the concentration of free surfactant in the Lf solution is equal to cmc in the buffer without protein, the subtraction of cmc from C_2 allows determine the extent of binding (N_S), that is, the amount of surfactant bound to biomolecule when the Lf is saturated with surfactant,⁴⁵ in according to equation 4.1:

$$N_S = \frac{(C_2 - cmc) \cdot V_t}{m_{Lf}} \quad (4.1)$$

where V_t is the total volume in the sample cell at C_2 and m_{Lf} is the Lf total mass into the cell. Table 4.4 presents the N_S values for all studied surfactants at pH 3.0, 9.0 and 12.0.

Table 4.4. Extent of Binding of SDS, DSS and SDBS at pH 3.0, 9.0 and 12.0 Derived from Isothermal Titration Calorimetric Experiments

Surfactant	Extent of binding / (surfactant monomers per molecule of Lf)		
	pH 3.0	pH 9.0	pH 12.0
DSS	322.4	297.6	234.4
SDS	379.2	360.8	345.6
SDBS	505.2	440.0	352.2

The N_S values are dependent on the pH and the surfactant structure, indicating that the relative magnitude of electrostatic, van der Waals and hydrophobic forces governing the Lf-surfactant interaction process is dependent on the biomolecule net charge and surfactant hydrophobicity. As the Lf net charge changes from positive to negative (from pH 3.0 to pH 12.0), N_S decreases because of the electrostatic repulsion between the protein and the surfactant. On the other hand, the surfactant hydrophobicity increase promotes the increase of N_S , confirming the NanoDSC and spectroscopy data that hydrophobic forces also contribute to the Lf-surfactant interaction. The N_S values

obtained for Lf-SDS interaction at pH 12.0, 9.0 and 3.0 correspond to 1.25, 1.30 and 1.37 g SDS per gram Lf, respectively, and are similar to the values found for other proteins.^{33,46} Thus, the assumption that free micelles are only formed after Lf saturation is valid.⁴⁷

To compare the energy magnitude involved in the Lf-surfactant interaction at different pH values, we have obtained the apparent molar enthalpy change of interaction (ΔH_{ap-int}) by subtracting the surfactant dilution curve from the surfactant titration curve in Lf solution. We refer to an apparent molar enthalpy change because the number of surfactant monomers interacting with the protein at each injection in the calorimetric cell is unknown and thus we cannot calculate the exact molar enthalpy change for the interaction. Nevertheless, ΔH_{ap-int} curves provide useful qualitative information about the interaction protein-surfactant. These curves are discussed in detail below for all system evaluated.

4.3.4.1. SDS-Lf Interaction

Figure 4.9 shows the dependence of ΔH_{ap-int} on the SDS concentration, at different pH values.

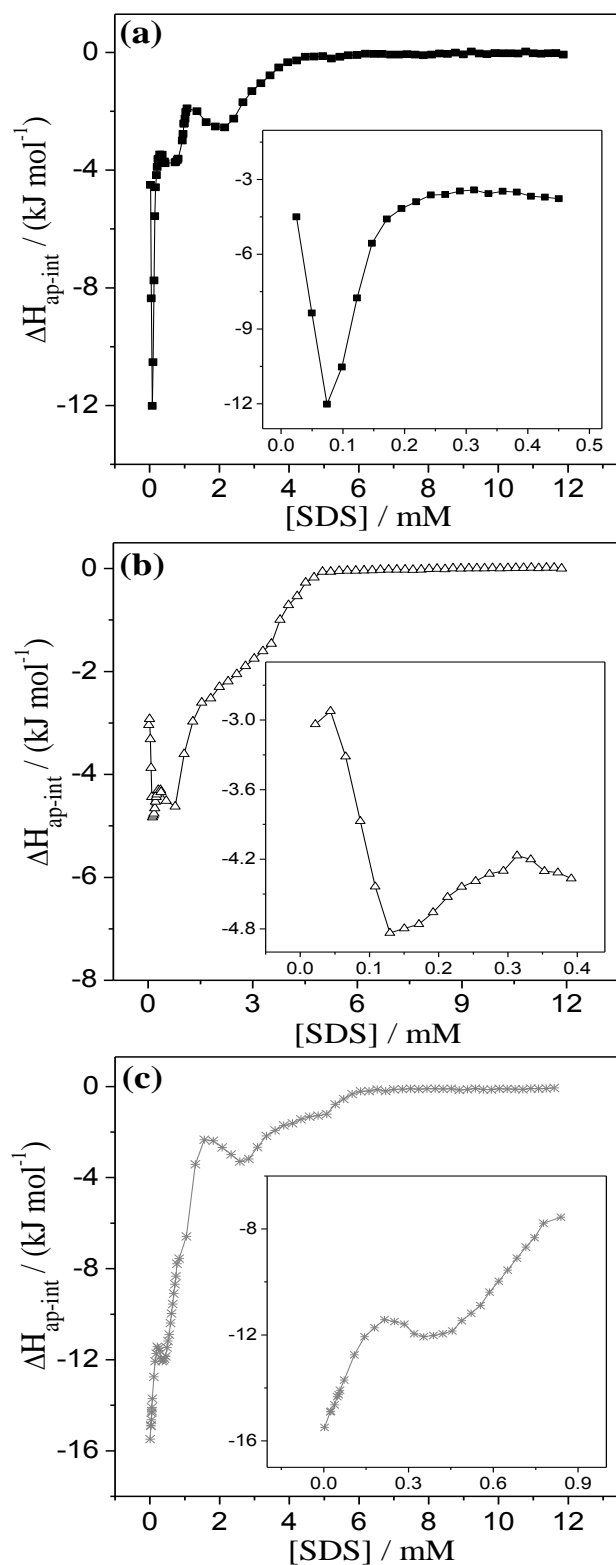


Figure 4.9. ΔH_{ap-int} versus SDS concentration curves relative to the Lf-SDS interaction at (a) pH 9.0; (b) pH 12.0 and (c) pH 3.0. The concentration of Lf is $12.5 \mu\text{M}$. The insets show the magnification of the curves at low SDS concentrations.

The features of ΔH_{ap-int} versus SDS concentration curves show that different molecular events associated with the Lf-SDS interaction occur over all surfactant concentration range in which the interaction is observed. These events are discussed in three concentration ranges.

Lf-SDS Interaction at Low SDS Concentrations. At $[SDS] < 0.10$ mM, the ΔH_{ap-int} values are always negatives varying between -2.9 kJ mol⁻¹ (pH 12.0) and -15.5 kJ mol⁻¹ (pH 3.0). Moreover, as SDS concentration increases, the ΔH_{ap-int} values become more exothermic at pH 9.0 and 12.0 and less exothermic at pH 3.0. Exothermic apparent enthalpies also have been verified at the start of the interaction between SDS and other proteins^{20,33,48} and the magnitude of ΔH_{ap-int} found by us is in according with the cited literature. However, ITC curves profile is very particular and depends strongly on the surfactant and biomolecule structures and the experimental conditions.

At pH 9.0, NanoDSC data showed that the surfactant interacts with the protein slightly disrupting the tertiary structure of the iron free Lf molecules. At the same time, fluorescence spectroscopy showed that this structural change of the biomolecule does not alter the Trp microenvironment polarity. Thus, the first SDS monomers interact mainly with more hydrophilic amino acid residues present in the Lf-solution interface, and this interaction should be predominantly driven by non hydrophobic interactions. However, as the SDS concentration increases, the changes in the Lf tertiary structure leads to the exposition of new interaction sites. Despite the spent energy in the Lf conformational change, the overall process occurs with the increase in the exothermicity of the Lf-SDS interaction. This result indicates that the exposed sites interact with the surfactant releasing a higher enthalpic energy, compensating the energy absorbed to change the Lf conformation. Similar ITC curve profile is observed at pH 12.0, suggesting the

occurrence of the same molecular process. Nevertheless, the ΔH_{ap-int} values are less negatives due to the electrostatic repulsions between SDS and Lf molecules, both negatively charged at pH 12. An increase in the exothermicity of the interaction as SDS concentration increases also has been reported by Lad et al.⁴⁷ for Lysozyme-SDS interaction at low SDS concentration, however, the causes associated with this behavior have not been well established.

The ΔH_{ap-int} values at pH 3.0 are more negatives than the ΔH_{ap-int} values at pH 9.0 and 12.0 as consequence of the electrostatic attractions between the negatively charged SDS and the positively charged Lf. Moreover, the ΔH_{ap-int} values become less negatives as SDS concentration increases. NanoDSC data show that at pH 3.0 the Lf is completely denatured, thus, that behavior is observed because the Lf-SDS interaction occurs firstly with the sites of more negative enthalpic energy.

Lf-SDS Interaction at Intermediary SDS Concentrations. Between 0.10 and 1.00 mM SDS, the ΔH_{ap-int} values remain negatives but the Lf-SDS interaction becomes less exothermic as the SDS concentration increases for all pH values. In according to NanoDSC and fluorescence spectroscopy data, at pH 9.0, the iron free Lf continues undergoing a large conformational change at that concentration range, exposing many hydrophobic sites to the solvent. For some proteins, the enthalpic contribution from hydrophobic interactions and conformational changes induced by SDS make the protein-SDS interaction to be endothermic.^{1,33,44} Thus, in addition to the absorption of energy to change the Lf tertiary structure, hydrophobic interactions contribute to the ΔH_{ap-int} increase. Similar behavior is observed at pH 12.0, however, the ΔH_{ap-int} values at this pH are more negative than the ΔH_{ap-int} values at pH 9.0, probably as a result of the

lower energy necessary to unfolding the protein at pH 12 in view of the electrostatic repulsions among negatively charged amino acids.

At pH 3.0, the Lf-SDS interaction also becomes less exothermic as SDS concentration increases, nevertheless, a slight decrease in the ΔH_{ap-int} can be observed between 0.21 mM and 0.35 mM SDS, suggesting the occurrence of a new molecular event. Dynamics light scattering measures (Table B.S1 in Supporting Information) indicate an increase of the Lf-SDS aggregate size in this concentration range, and turbidimetric titration shows the occurrence of precipitation above 0.60 mM SDS. Thus, (Lf-SDS)_n aggregates, where *n* is the number of Lf-SDS complexes forming the aggregate, start to be formed from 0.21 mM as result of the Lf net charge decrease and consequent decrease of the electrostatic repulsion among Lf-SDS complexes (Table B.S1 in Supporting Information).

As the SDS concentration increases from 1.0 to 2.1 mM at pH 9.0, the ΔH_{ap-int} values become more negative. In according to NanoDSC data, above 1.0 mM SDS, the (mono- or di-)iron saturated Lf is denatured and, thus, the decrease in ΔH_{ap-int} arises because again the Lf denaturation exposes new interaction sites that interact with the surfactant releasing a higher energy. On the other hand, in this concentration range at pH 12.0, the Lf-SDS interaction becomes less exothermic as the surfactant concentration increases, indicating that the SDS interacts firstly with more exothermic sites. This is possible because at this SDS concentration range and pH 12.0 the Lf is fully denatured as determinate by NanoDSC. For the same reason, a similar behavior is observed at pH 3.0 as SDS concentration ranges from 0.35 to 1.8 mM.

Lf-SDS Interaction at Higher SDS Concentrations. At pH 9.0 and 12.0 above 2.1 mM SDS, the Lf-SDS interaction continue with ΔH_{ap-int} becoming less negative

without the occurrence of some particular phenomenon. Thus, the ΔH_{ap-int} increase occurs as the sites that interact with the surfactant releasing higher enthalpic energy become occupied. Contrarily, an abrupt change in the ITC curve occurs between 1.8 and 3.6 mM SDS at pH 3.0, and ΔH_{ap-int} becomes more negative as the surfactant concentration increases. This results comes from the re-hydration of the Lf-SDS complexes due to the re-solubilisation of (Lf-SDS)_n aggregates. As determinate by turbidimetric titration, at 3.7 mM SDS Lf-SDS aggregates are totally soluble in the solution. Finally, for all pH values, at the end of the interaction the ITC curves reach C_2 and ΔH_{ap-int} become zero. From this concentration, SDS micelles added are simply diluted and remain free in solution.

4.3.4.2. DSS-Lf Interaction

Figure 4.10 shows the ΔH_{ap-int} versus DSS concentration curves at different pH values.

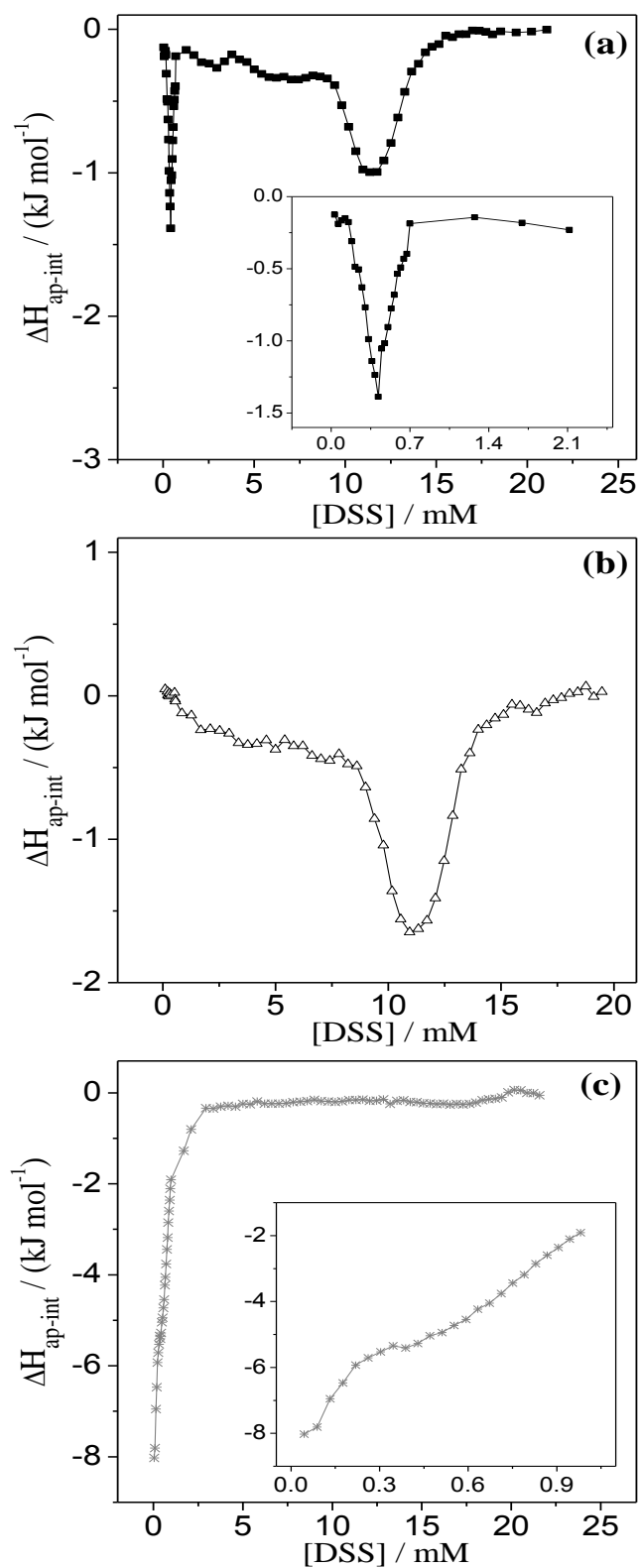


Figure 4.10. ΔH_{ap-int} versus DSS concentration relative to Lf-DSS interaction: (a) pH 9.0; (b) pH 12.0 and (c) pH 3.0. The concentration of Lf is $12.5 \mu\text{M}$. The insets show the magnification of the curve at low DSS concentrations.

At pH 9.0 and $[DSS] < 0.42$ mM, the ΔH_{ap-int} values are negatives and decrease as the DSS concentration increases. On the contrary, as DSS concentration ranges between 0.42 mM and 0.7 mM, the ΔH_{ap-int} values become less negative as the surfactant concentration increase. Then, ΔH_{ap-int} decreases slightly up to 2.95 mM, increasing again until 4.0 mM. This profile in the ΔH_{ap-int} versus surfactant concentration curve is similar to the described above for the Lf-SDS interaction at $[SDS] < 1.0$ mM, indicating that similar molecular processes are involved in the Lf-DSS interaction. However, these processes occur with eight times less enthalpic energy and eight times more surfactant when the surfactant is the DSS. At concentration range of 4.0 mM $< [DSS] < 7.0$ mM, the ΔH_{ap-int} values decrease as DSS concentration increases. In according to NanoDSC data, the (mono- or di-)iron saturated Lf is denatured in this concentration range and again the same molecular event described to Lf-SDS interaction at 1.0 mM $< [SDS] < 2.1$ mM can be considered. This similar behavior between DSS and SDS curves indicate that the interactions between the Lf and the surfactant occurs at interaction specific sites, however, the binding constant of the Lf-surfactant interaction depends on the surfactant hydrophobicity. At pH 12.0 (where the Lf sites are negatively charged), the ITC curve for DSS is very different from that obtained for SDS at the lowest surfactant concentrations ($[DSS] < 8.0$ mM), indicating that hydrophobic interactions determinate the Lf-surfactant interaction at this pH.

As the DSS concentration increases from 9.0 to 16.0 mM at pH 9.0, and from 8.0 to 15.0 mM at pH 12.0, the ΔH_{ap-int} versus surfactant concentration curves display a pronounced exothermic peak, suggesting that a new aggregation processes occurs, probably the aggregation of DSS monomers on the Lf macromolecules.

At pH 3.0, the ITC curve profile for Lf-DSS interaction is similar to that obtained for Lf-SDS interaction. However, the involved enthalpic energy is smaller when the

surfactant is the DSS. This result comes from the lower amount of DSS binding to the Lf in comparison with the SDS and is directly associated with the surfactant hydrophobicity.

4.3.4.3. SDBS-Lf Interaction

Figure 4.11 shows the ΔH_{ap-int} versus SDBS concentration curves at different pH values.

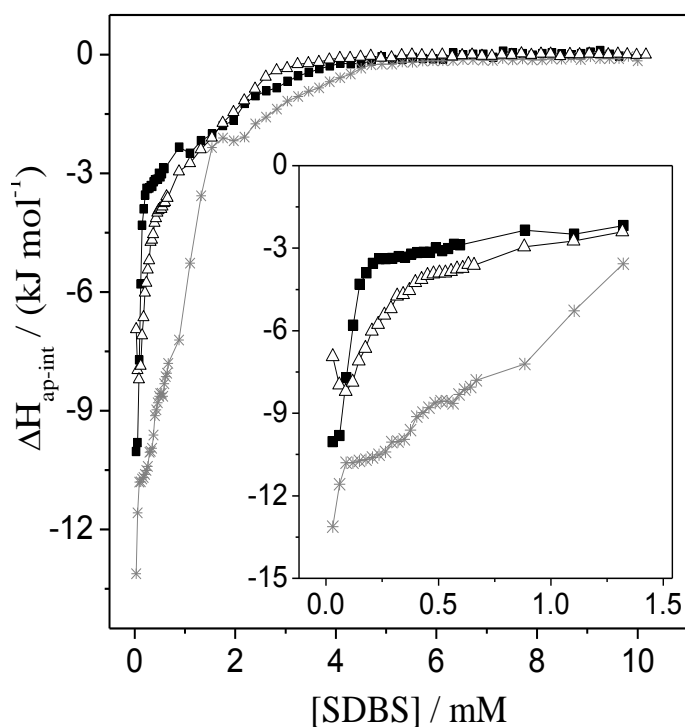


Figure 4.11. ΔH_{ap-int} versus SDBS concentration relative to Lf-SDBS interaction: (■) pH 9.0; (Δ) pH 12.0 and (*) pH 3.0. The concentration of Lf is 12.5 μ M. The inset shows the magnification of the curves at low SDBS concentrations.

The ITC curves for Lf-SDBS interaction have less complex profiles than the ITC curves for Lf-SDS and Lf-DSS interactions, mainly at pH 9.0 and 12.0, probably because

the Lf-SDBS interaction occurs in a very narrow concentration range and the energy associated with some particular molecular event predominates during the interaction process. However, some differences can be highlighted among the curves at different pH values.

For the first three injections in the calorimetry experiment ($[SDBS] < 0.08$ mM), the ΔH_{ap-int} values increase in the order ΔH_{ap-int} (pH 3.0) $<$ ΔH_{ap-int} (pH 9.0) $<$ ΔH_{ap-int} (pH 12.0), indicating that at this concentration range the electrostatic interactions govern the Lf-SDBS interaction. On the other hand, from 0.08 to 1.5 mM SDBS, the ΔH_{ap-int} values become less negatives at pH 9.0 when compared to the pH 12.0, showing that non electrostatic forces take place on the interaction process. Then, above 1.5 mM, the ΔH_{ap-int} values at pH 12.0 come back to be less exothermic. At SDBS concentrations smaller than 0.08 mM, the less negative ΔH_{ap-int} values at pH 12.0 arise from the higher electrostatic repulsions between the Lf and the SDBS. When the SDBS concentration increases from 0.08 to 1.5 mM, conformational changes occur in the Lf structure at both pH 9.0 and pH 12.0, however, they occur with a higher energetic cost at pH 9.0 than at pH 12.0; thus, the ΔH_{ap-int} values became less negative at pH 12.0 than at pH 9.0 in this concentration range. Finally, above 1.5 mM, when the conformational changes cease (or occur in low extension), the higher electrostatic repulsions at pH 12.0 come back to determinate the less negative ΔH_{ap-int} values at this hydrogenionic concentration. The ΔH_{ap-int} values at pH 3.0 are always more negatives than at pH 9.0 and 12.0 due to the more favorable Lf-surfactant electrostatic interactions at that pH. In addition, the energetic cost to denature the Lf is absent at pH 3.0 because the protein is fully denatured at this thermodynamic condition.

To evaluate how the surfactant structure and the pH change the enthalpic contribution to the relative stability between the Lf-surfactant complex and the surfactant

micelles, the integral enthalpy change for complex formation, $\Delta H_{agg}(int)$, was estimated in according to equation 4.2 proposed by Olofsson and Loh.⁴³

$$\Delta H_{agg}(int) = \left[\frac{\sum q_{obs} - Yq_{demic+dil}}{Yn_{inj} - V_y cmc} \right] \quad (4.2)$$

where $\sum q_{obs}$ is the sum of the observed enthalpies when surfactant is added on Lf solution up to the surfactant concentration attain C_2 , $q_{demic+dil}$ is the energy of demicellization and dilution of the monomers obtained from pre-micellar region in the surfactant dilution curve, Y is the number of injections necessary to C_2 be attained, V_y is the total volume in the calorimetric cell at C_2 , and n_{inj} is the number of moles of surfactant injected in each injection.

Table 4.5 presents the $\Delta H_{agg}(int)$ values for formation of the Lf-surfactant complex at different pH values studied.

Table 4.5. Integral Enthalpy Change for Formation of Lf-surfactant Complex at Different pH

Surfactant	$\Delta H_{agg}(int) / \text{kJ mol}^{-1}$		
	pH 3.0	pH 9.0	pH 12.0
DSS	-2.72 ± 0.09	-0.97 ± 0.06	-0.61 ± 0.03
SDS	-5.99 ± 0.12	-4.50 ± 0.14	-3.76 ± 0.11
SDBS	-3.98 ± 0.15	-1.79 ± 0.08	-2.37 ± 0.10

The $\Delta H_{agg}(int)$ values are always negatives, indicating that the formation process of the Lf-surfactant aggregates is enthalpically favorable. The $\Delta H_{agg}(int)$ values depend on the surfactant structure and are more negatives when the surfactant is the SDS. Moreover, the aggregation process becomes more enthalpically favorable when the pH varies in the order $\text{pH } 12.0 < \text{pH } 9.0 < \text{pH } 3.0$ as result of the electrostatic contribution in the interaction process.

4.4. Conclusion

The SDS, SDBS and DSS surfactants interacted with the lactoferrin protein promoting its denaturation. The denaturation efficiency was dependent of the surfactant structure and followed the order $DSS < SDS < SDBS$. The presence of the ferric ion binding to the Lf increased the protein stability against the denaturation process promoted by surfactant.

The Trp intrinsic fluorescence was used to prove that the presence of the benzene ring in the SDBS structure alters the Lf-surfactant interaction nature. The benzene ring interacted specifically with the interaction sites containing Trp, actuating as a quencher of fluorescence. This process was not observed for SDS and DSS.

The apparent molar enthalpy change of interaction, the extent of binding, and the integral enthalpy change for complex formation were highly dependent on the pH and the surfactant structure. The apparent molar enthalpy change at each surfactant concentration was a balance of the energies associated with several process, namely Lf conformational change, formation of the Lf-surfactant complex and/or formation of $(Lf-surfactant)_n$ complexes. The Lf-surfactant interaction was always enthalpically driven.

Our results extend the knowledge about the role of the ferric ion in the stabilization of the Lf against the denaturation process induced by surfactants.

Supporting Information.

The Supporting Information can be found attached at the end of this thesis: Figures showing the NanoDSC thermograms for the Lf thermal denaturation in the presence of high SDS concentration (Figure B.S1), and the surfactant structures (figure B.S2); Table containing the size and zeta potential of the Lf-SDS aggregates at pH 3.0 (Table B.S1).

4.5. References

1. Nielsen, A. D.; Arleth, L.; Westh, P. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1752*, 124–132.
2. Lee, H. J.; McAuley, A.; Schilke, K. F.; McGuire, J. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, *63*, 1160–1171.
3. Tran Le, T.; Sabatino, P.; Heyman, B.; Kasinos, M.; Dinh, H. H.; Dewettinck, K.; Martins, J.; Van der Meeren, P. *Food Hydrocolloid.* **2011**, *25*, 594–603.
4. Zhou, T.; Ao, M.; Xu, G.; Liu, T.; Zhang, J. *J. Colloid Interface Sci.* **2013**, *389*, 175–181.
5. De, S.; Girigoswami, A.; Das, S. *J. Colloid Interface Sci.* **2005**, *285*, 562–573.
6. Andersen, K. K.; Westh, P.; Otzen, D. E. *Langmuir* **2008**, *24*, 399–407.
7. Faustino, C. M. C.; Calado, A. R. T.; Garcia-Rio, L. *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 2508–2514.
8. Zaragoza, A.; Teruel, J. A.; Aranda, F. J.; Marques, A.; Espuny, M. J.; Manresa, A.; Ortiz, A. *Langmuir* **2012**, *28*, 1381–1390.
9. Otzen, D. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1814*, 562–591.
10. Taheri-Kafrani, A.; Bordbar, A.-K. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2014**, *115*, 2123–2127.
11. Baker, E. N.; Baker, H. M. *Cell. Mol. Life Sci.* **2005**, *62*, 2531–2539.
12. Stănciuc, N.; Aprodu, I.; Râpeanu, G.; van der Plancken, I.; Bahrim, G.; Hendrickx, M. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 2234–2243.
13. Anderson, B. F.; Baker, H. M.; Dodson, E. J.; Norris, G. E.; Rumball, S. V.; Waters, J. M.; Baker, E. N. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 1769–1773.
14. Anderson, B. F.; Baker, H. M.; Norris, G. E.; Rice, D. W.; Baker, E. N. *J. Mol. Biol.* **1989**, *209*, 711–734.
15. Moore, S. A.; Anderson, B. F.; Groom, C. R.; Haridas, M.; Baker, E. N. *J. Mol. Biol.* **1997**, *274*, 222–236.

16. Jenssen, H.; Hancock, R. E. *Biochimie* **2009**, *91*, 19–29.
17. Legrand, D.; Ellass, E.; Carpentier, M.; Mazurier, J. *Cell. Mol. Life Sci.* **2005**, *62*, 2549–2559.
18. Balcão, V. M.; Costa, C. I.; Matos, C. M.; Moutinho, C. G.; Amorim, M.; Pintado, M. E.; Gomes, A. P.; Vila, M. M.; Teixeira, J. A. *Food Hydrocolloid.* **2013**, *32*, 425–431.
19. Turro, N. J.; Lei, X. -G.; Ananthapadmanabhan, K. P.; Aronson, M. *Langmuir* **1995**, *11*, 2525–2533.
20. Bagger, H. L.; Hoffmann, S. V.; Fuglsang, C. C.; Westh, P. *Biophys. Chem.* **2007**, *129*, 251–258.
21. Ghosh, S. *Colloids Surf., B* **2008**, *66*, 178–186.
22. Wang, L.; Wang, B.; Lin, Q. *Sens. Actuators, B* **2008**, *134*, 953–958.
23. Celej, M. S.; Dassie, S. A.; Freire, E.; Bianconi, M. L.; Fidelio, G. D. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1750*, 122–133.
24. Hassan, N.; Verdes, P. V.; Ruso, J. M. *J. Chem. Thermodynamics* **2011**, *43*, 399–404.
25. Bokkhim, H.; Bansal, N.; Grondahl, L.; Bhandari, B. *Food. Chem.* **2013**, *141*, 3007–3013.
26. Bokkhim, H.; Tran, T.; Bansal, N.; Grondahl, L.; Bhandari, B. *Food. Chem.* **2014**, *152*, 121–127.
27. Abdallah, F. B.; Chahine, J. -M. E. H. *J. Mol. Biol.* **2000**, *303*, 255–266.
28. Iafisco, M.; Foltran, I.; Di Foggia, M.; Bonora, S.; Roveri, N. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2010**, *103*, 41–47.
29. Sreedhara, A.; Flengsrud, R.; Prakash, V.; Krowarsch, D.; Langsrud, T.; Kaul, P.; Devold, T. G.; Vegarud, G. E. *Int. Dairy J.* **2010**, *20*, 487–494.

30. Paulsson, M. A.; Svensson, U.; Kishore, A. R.; Naidu, S. *J. Dairy Sci.* **1993**, *76*, 3711–3720.
31. Conesa, C.; Sánchez, L.; Pérez, M. -D.; Calvo, M. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 4848–4853.
32. Gitlin, I.; Gudiksen, K. L.; Whitesides, G. M. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 2372–2377.
33. Nielsen, M. M.; Andersen, K. K.; Westh, P.; Otzen, D. E. *Biophys. J.* **2007**, *92*, 3674–3685.
34. Naidu, K. T.; Prabhu, N. P. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 14760–14767.
35. Santos, S. F.; Zanette, D.; Fischer, H.; Itri, R. *J. Colloid Interface Sci.* **2003**, *262*, 400–408.
36. Andersen, K. K.; Otzen, D. E. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 13942–13952.
37. Rawel, H. M.; Frey, S. K.; Meidtnr, K.; Kroll, J.; Schweigert, F. J. *Mol. Nutr. Food Res.* **2006**, *50*, 705–713.
38. Park, Y. S.; Polovka, M.; Martinez-Ayala, A. L.; González-Aguilar, G. A.; Ham, K. -S.; Kang, S. -G.; Park, Y. -K.; Heo, B. -G.; Namiesnik, J.; Gorinstein, S. *J. Lumin.* **2015**, *160*, 71–77.
39. Royer, C. A. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 1769–1784.
40. Fang, B.; Zhang, M.; Tian, M.; Jiang, L.; Guo, H. Y.; Ren, F. Z. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1841*, 535–543.
41. Jha, N. S.; Kishore, N. *J. Chem. Thermodynamics* **2011**, *43*, 814–821.
42. Pethica, B. A. *Anal. Biochem.* **2015**, *472*, 21–29.
43. Olofsson, G.; Loh, W. *J. Braz. Chem. Soc* **2009**, *20*, 577–593.
44. Kelley, D.; McClements, D. J. *Food Hydrocolloid.* **2003**, *17*, 73–85.
45. Wang, G.; Olofsson, G. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 9276–9283.

46. Reynolds, J. A.; Tanford, C. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1970**, *66*, 1002–1007.
47. Lad, M. D.; Ledger, V. M.; Briggs, B.; Green, R. J.; Frazier, R. A. *Langmuir* **2003**, *19*, 5098–5103.
48. Onesippe, C.; Lagerge, S. *Colloids Surf., A* **2009**, *337*, 61–66.

Considerações finais e perspectivas

Este trabalho, em sua essência, cumpriu com o seu objetivo de estabelecer novas descobertas dentro do vasto campo de pesquisa que caracteriza o estudo da interação macromolécula-surfactante e, de forma secundária, o estudo da micelização de surfactantes. Dentre os vários resultados apresentados e discutidos, alguns se destacaram por sua virtude de alimentar em nós o desejo de continuar a compreender e avançar o conhecimento científico nesta área tão importante que é o estudo de sistemas coloidais formados por surfactantes e/ou macromoléculas. Para deixar claro o que queremos dizer com esta afirmação, segue abaixo a descrição dos principais resultados encontrados nesta tese e que nos abriram portas para o início de novas pesquisas nesta área.

Em primeiro lugar, foi surpreendente para nós, no estudo do efeito de haletos de 1-butil-3-metilimidazólio sobre a micelização de SDS, a observação de um segundo ponto de inflexão nas curvas calorimétricas de variação de entalpia observada versus concentração de surfactante. Sem entrar no mérito do fenômeno molecular por trás deste resultado, será que a mesma observação pode ser feita para sistemas de outros surfactantes e/ou outros líquidos iônicos? Ou esta é uma característica particular de surfactantes em soluções aquosas de líquidos iônicos imidazólicos? Como será que a mudança do comprimento da cadeia alquílica do cátion imidazólico afeta este fenômeno? Qual deve ser o efeito da temperatura sobre este processo?

Tão surpreendente quanto o resultado acima foi a forma como os haletos de 1-butil-3-metilimidazólio alteraram a estabilidade relativa entre os agregados de SDS/LI e os agregados SDS/PEO/LI. Nossos resultados demonstraram que estes líquidos iônicos aumentam a estabilidade da micela de SDS ao mesmo tempo em que tornam os agregados SDS/PEO menos estáveis; este fenômeno ocorre até o extremo em que a formação de agregados SDS/PEO não é detectada pela técnica de ITC em concentrações elevadas do

LI. Este é um resultado de extrema importância que sugere a participação de líquidos iônicos do tipo imidazólio na interação entre outros compostos de interesse, como por exemplo, na interação entre surfactantes e compostos de inclusão ou mesmo entre surfactantes e proteínas.

Por fim, gostaríamos de destacar o papel do átomo de ferro ligado à estrutura da lactoferrina na estabilização da proteína contra o processo de desnaturação induzido por surfactantes aniônicos. Seria esta uma propriedade exclusiva da lactoferrina ou é um fenômeno comum que pode ser observado para outras metaloproteínas? Como será que o aumento do grau de saturação da lactoferrina com ferro afeta a estabilidade da proteína frente à desnaturação induzida por surfactantes?

Diante destes resultados e das novas questões que se abrem no campo de estudos envolvendo sistemas de natureza semelhante àqueles estudados nesta tese, nós reconhecemos a importância da continuidade nas pesquisas dentro da área em que este trabalho está inserido. Além disso, estamos certos da importância de trabalhos fundamentais como o realizado aqui para a compreensão profunda de sistemas complexos como o são os sistemas macromolécula-surfactante. Estabelecer uma base teórica forte acerca destes sistemas é proporcionar ferramentas para o desenvolvimento e aprimoramento de produtos estratégicos com aplicação nos mais variados ramos da indústria.

Apêndice A

Supporting Information of the Article 1:

Effect of 1-Butyl-3-methylimidazolium Halide
on the Relative Stability between Sodium
Dodecyl Sulfate Micelles and Sodium Dodecyl
Sulfate–Poly(ethylene oxide) Nanoaggregates

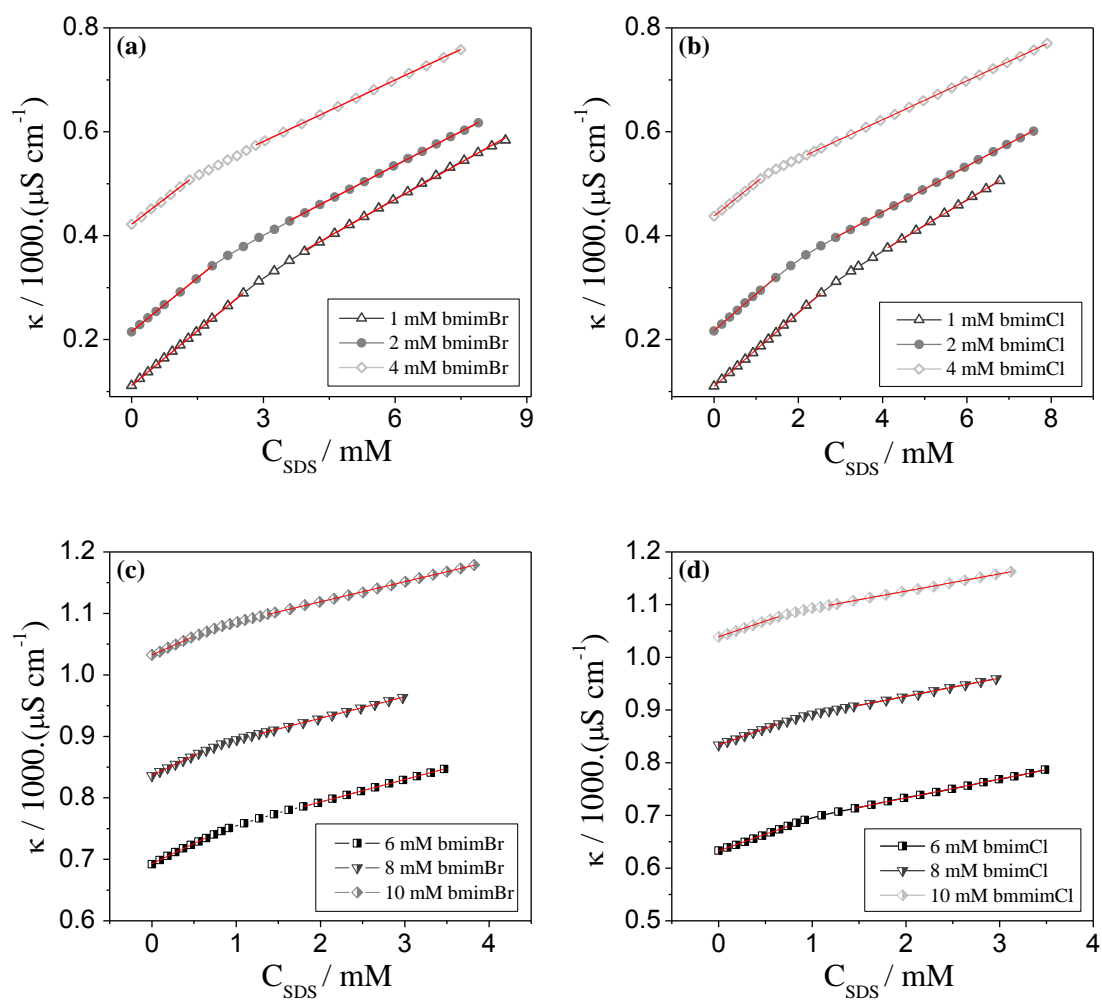


Figure A.S1. Conductimetric titration of aqueous solutions of SDS in the presence of bmimBr [(a) and (c)] and bmimCl [(b) and (d)], at 298.2 K. Red lines are the linear fits obtained in the pre-micellar and post-micellar regions. Correlation coefficients were higher than 0.999.

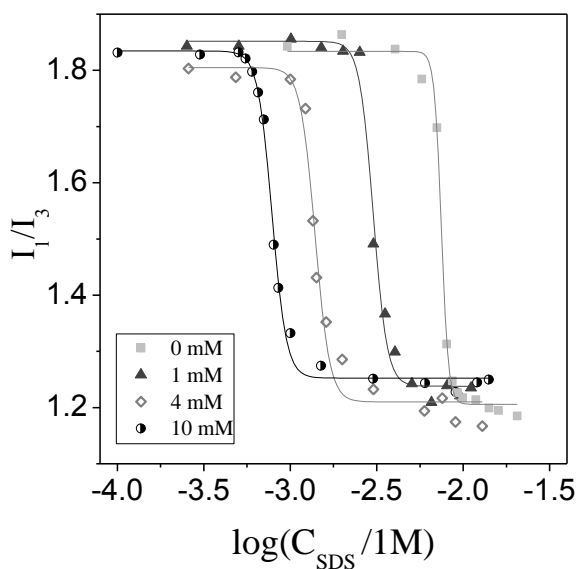


Figure A.S2. Pyrene I_1/I_3 versus $\log(C_{\text{SDS}})$ in the presence of several bmimCl concentrations, at 298.2 K. Pyrene concentration was 1.2 μM . Solid lines correspond to sigmoidal fit.

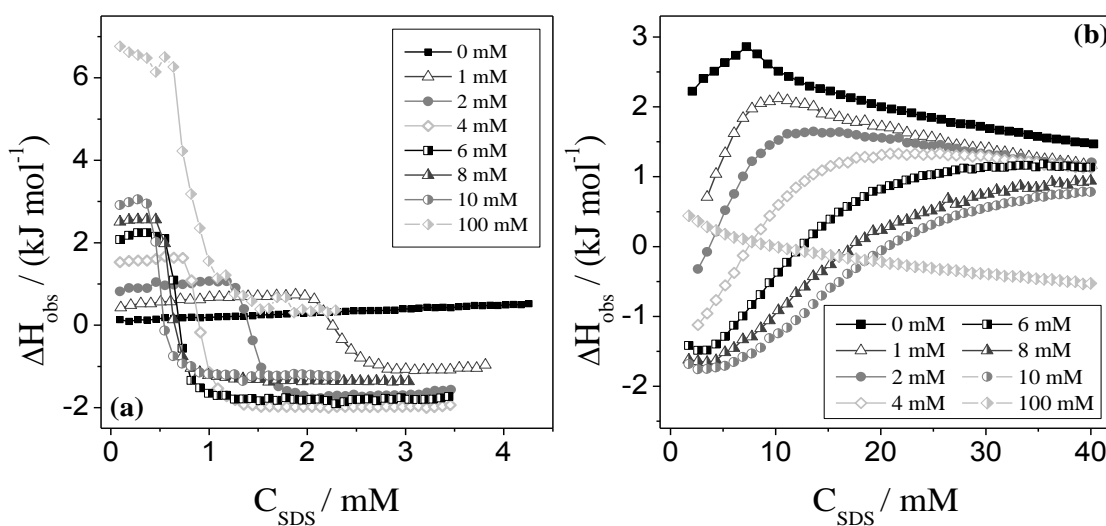


Figure A.S3. ITC curves obtained from the addition of (a) 50.0 mM and (b) 472.0 mM SDS to bmimCl aqueous solutions at several concentrations, at 298.2 K. At 100 mM bmimCl in panel a, the SDS concentration in the titrant solution was 10.0 mM.

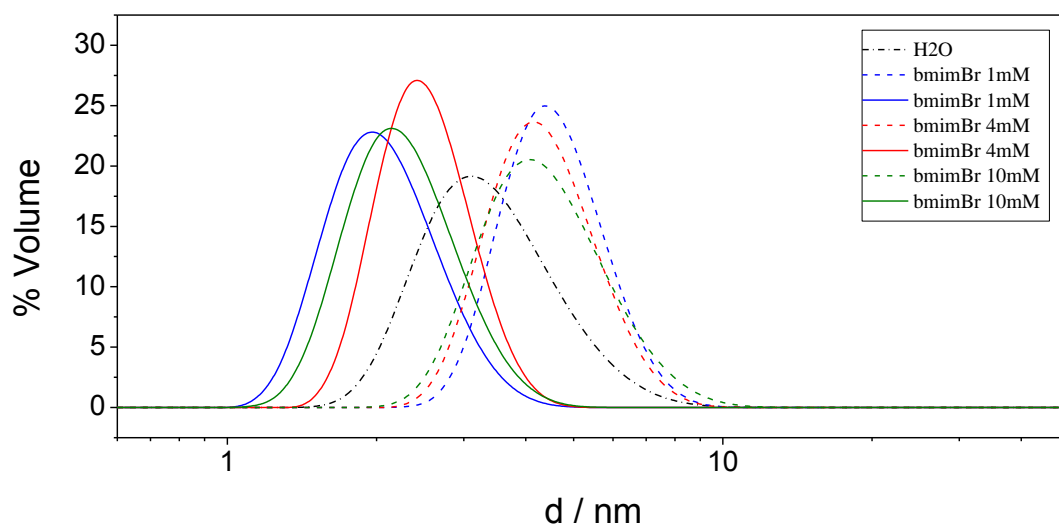


Figure A.S4. Size distributions curves of SDS solutions at different bmimBr concentrations at 298.2 K. Dash line: $cmc < C_{SDS} < c_{2thc}$; Solid lines: $C_{SDS} > c_{2thc}$.

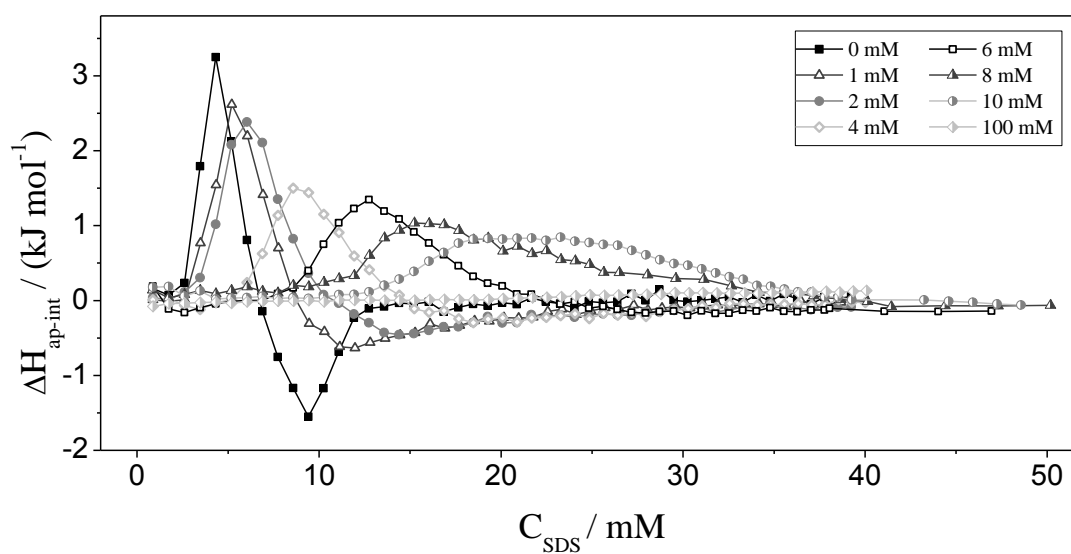


Figure A.S5. Apparent molar enthalpy change of interaction between PEO 35000 and SDS at different bmimBr concentrations.

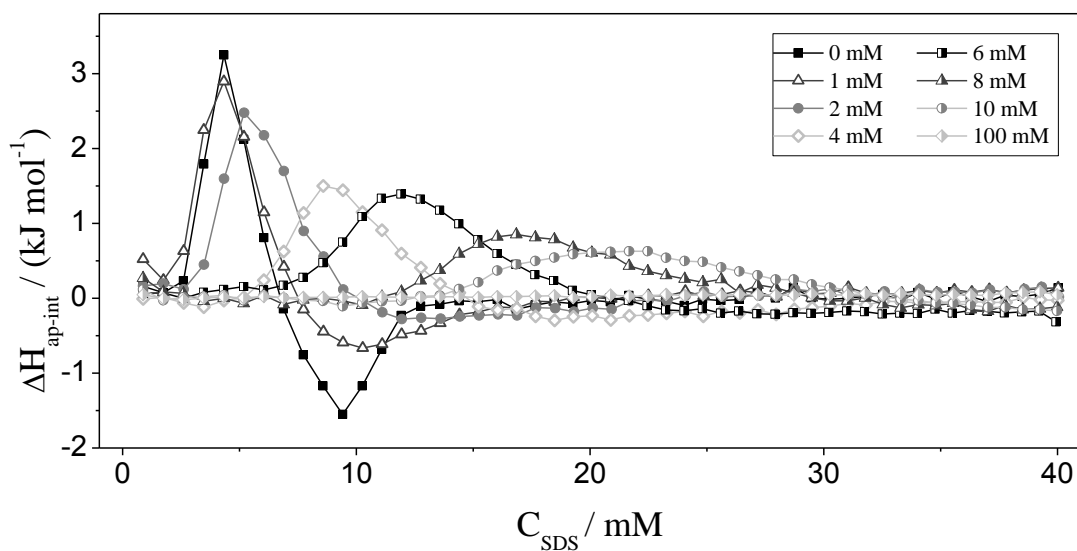


Figure A.S6. Apparent molar enthalpy change of interaction between PEO 35000 and SDS at different bmimCl concentrations.

Graphical abstract

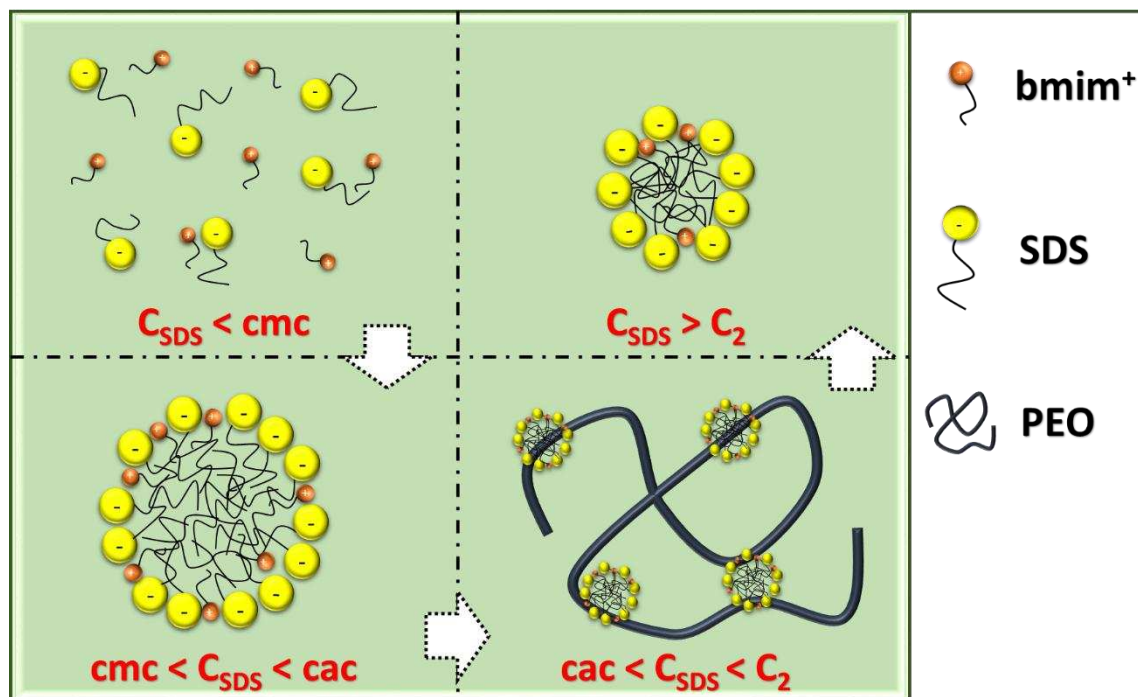


Table A.S1. Thermodynamic Parameters of SDS Micellization in Different Water-ILs Mixed Solvents, at 298.2K

[LI] / mM	ΔG_{mic}^o ^a	ΔH_{mic}^o ^b	$T\Delta S_{mic}^o$
	kJ mol ⁻¹		
	bmimBr		
0.0	-19.6	0	19.6
1.00	-18.8	-1.65	17.1
2.00	-20.6	-2.74	17.9
4.00	-22.3	-3.62	18.6
6.00	-25.0	-4.14	20.8
8.00	-26.0	-3.51	22.4
10.0	-25.8	-4.51	21.3
100	-	-6.10	-
	bmimCl		
1.00	-18.9	-1.83	17.1
2.00	-21.2	-2.85	18.3
4.00	-23.5	-3.66	19.8
6.00	-24.4	-3.98	20.4
8.00	-25.6	-3.85	21.8
10.0	-25.8	-4.49	21.3
100	-	-6.33	-

^aValues obtained from cmc determined by conductivity; Standard deviation for ΔG_{mic}^o were less than 2.8%.

^bStandard deviation for ΔH_{mic}^o were less than 5.2%.

Table A.S2. Cac Values for PEO-SDS Interactions in the Presence of ILs^a

[LI] / mM	cac / mM	
	bmimBr	bmimCl
0.0	3.47	3.47
1.00	3.48	3.47
2.00	3.46	3.48
4.00	5.19	6.04
6.00	7.73	7.73
8.00	10.3	11.1
10.0	12.8	12.8

^aStandard deviation were less than 4.0%.

Apêndice B

Supporting Information of the Article 2:

A Calorimetric and Spectroscopic Study of the Interaction between Lactoferrin and Anionic Surfactants

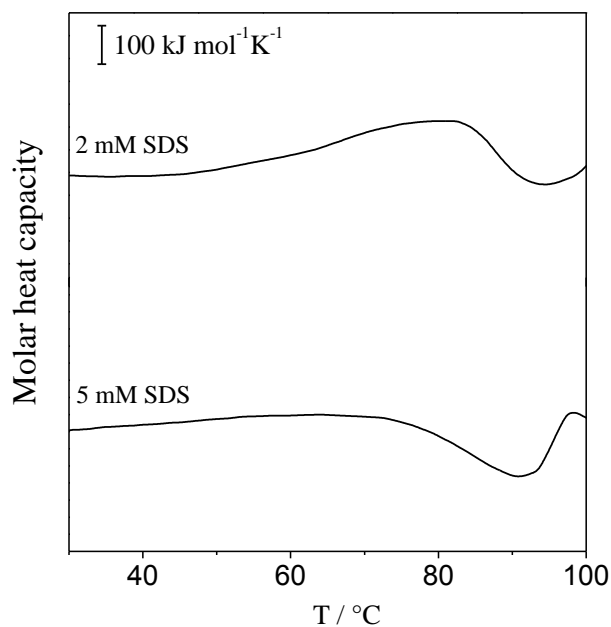


Figure B.S1. NanoDSC thermograms for the Lf thermal denaturation in the presence of 2 and 5 mM SDS at pH 9.0. The concentration of Lf is 12.5 μM . Scan rate was 1 $^{\circ}\text{C}$ per minute. Numbers on the curves give the SDS concentrations.

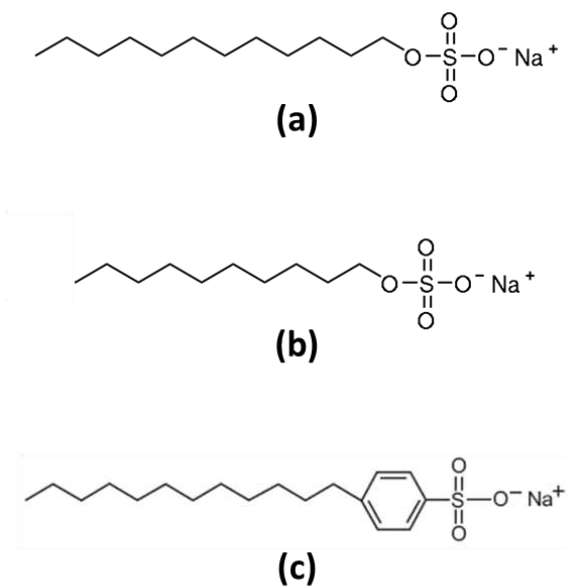


Figure B.S2. Molecular structures of the surfactants: (a) sodium dodecyl sulfate, (b) sodium decyl sulfate, and (c) sodium dodecylbenzene sulfonate.

Table B.S1. Aggregate Size and Zeta Potential of Lf-SDS Complexes at pH 3.0

[SDS] / mM	d / nm	ζ / mV
0	10.97 ± 0.38	$+21.00 \pm 0.75$
0.2	9.02 ± 0.81	$+19.65 \pm 2.78$
0.6	23.19 ± 1.39	$+17.50 \pm 1.93$
3.5	14.69 ± 1.21	-28.00 ± 3.14
5.9	10.25 ± 0.57	-48.83 ± 1.81