

ALAN STAMPINI BENHAME DE CASTRO

**DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA E TERMODINÂMICA DA FORMAÇÃO DE
ESTRUTURAS SUPRAMOLECULARES DE PROTEÍNA-SURFACTANTE**

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*.

Orientador: Luis Henrique Mendes da Silva

Coorientadores: Ana Clarissa dos Santos Pires
Maria do Carmo Hespanhol
Yara Luiza Coelho

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2021**

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

T

C355d
2021
Castro, Alan Stampini Benhame de, 1992-
Determinação da cinética e termodinâmica da formação de
estruturas supramoleculares de proteína-surfactante / Alan
Stampini Benhame de Castro. – Viçosa, MG, 2021.
1 tese eletrônica (91 f.): il. (algumas color.).

Inclui apêndice.

Orientador: Luis Henrique Mendes da Silva.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Química, 2021.

Referências bibliográficas: f. 76-88.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2021.159>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Estrutura molecular. 2. Química supramolecular.
3. Proteínas. 4. Agentes ativos de superfície. 5. Termodinâmica.
I. Silva, Luis Henrique Mendes da. II. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Química. Programa de Pós-Graduação
em Agroquímica. III. Título.

CDD 22. ed. 572.633

Bibliotecário(a) responsável: Alice Regina Pinto CRB6 2523

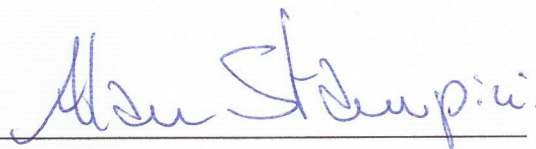
ALAN STAMPINI BENHAME DE CASTRO

**DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA E TERMODINÂMICA DA FORMAÇÃO DE
ESTRUTURAS SUPRAMOLECULARES DE PROTEÍNA-SURFACTANTE**

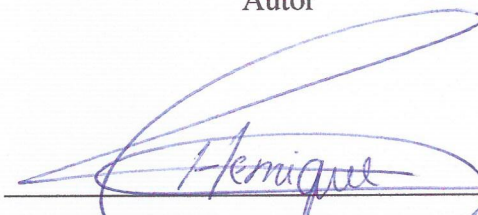
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 19 de outubro de 2021.

Assentimento:



Alan Stampini Benhame de Castro
Autor



Luis Henrique Mendes da Silva
Orientador

AGRADECIMENTOS

A Deus.

À minha Mãe, agradeço pelo amor, carinho, generosidade, e por me transmitir paz. Ao meu Pai, pelos sábios ensinamentos e por toda confiança depositada em mim. Ao meu irmão pela preocupação, suporte e apoio sempre que precisasse.

À minha namorada, pelo apoio emocional e tornar esta jornada mais significativa.

Ao meu orientador professor Luis Henrique Mendes da Silva pela orientação tanto profissional quanto pessoal, ensinamentos, incentivo, confiança, exemplo de profissionalismo e paciência. O senhor vem me tornando uma pessoa mais sábia, muito obrigado!

Às minha coorientadoras, professora Ana Clarissa dos Santos Pires e professora Maria do Carmo Hespanhol pelo apoio, incentivo e profissionalismo.

Aos membros da banca de avaliação: Ana Clarissa dos Santos Pires, Adilson David da Silva, Márcia Cristina Teixeira Ribeiro Vidigal e Sukarno Olavo Ferreira pelo aceite ao convite e pelas contribuições na correção e desenvolvimento do trabalho.

Aos meus amigos do coração Hauster e Franciele pela amizade e companheirismo, muito obrigado! Aos integrantes e amigos gerados desse grupo maravilhoso de trabalho que é o QUIVECOM.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

RESUMO

CASTRO, Alan Stampini Benhame, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2021. **Determinação da cinética e termodinâmica da formação de estruturas supramoleculares de proteína-surfactante.** Orientador: Luis Henrique Mendes da Silva. Coorientadoras: Ana Clarissa dos Santos Pires, Maria do Carmo Hespanhol e Yara Luiza Coelho.

A organização, estabilidade e viabilidade funcional das proteínas para as células vivas baseiam-se em um delicado equilíbrio entre o dobramento espontâneo e a montagem de suas moléculas componentes. Uma compreensão e quantificação das interações proteína-surfactante são importantes tanto para o planejamento racional de novos sistemas supramoleculares, incluindo materiais inteligentes, quanto para o desenvolvimento de novos agentes biologicamente ativos. Neste trabalho em um primeiro momento avaliamos a interação proteína-surfactante por meio da determinação completa de todos os parâmetros termodinâmicos e cinéticos associados a interação entre Lactoferrina bovina (bLF) e o surfactante não-iônico Brij58 pela técnica de ressonância plasmônica de superfície (RPS). O complexo de transição [bLF-Brij58][‡] foi completamente caracterizado, bem como o processo de interação entre as moléculas bLF e Brij58 até o complexo termodinamicamente estável [bLF-Brij58][°]. As constantes cinéticas de associação ($k_a \approx 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) e dissociação ($k_d \approx 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) foram proporcionais e inversas proporcionais ao aumento de temperatura, respectivamente. [bLF-Brij58][‡] formado a partir da associação de moléculas livres de bLF e Brij58 ocorre com uma barreira energética quase igual ao aumento de entalpia ($E_{\text{act-ass}} = 29,22 \text{ KJ mol}^{-1}$, $\Delta H_{\text{ass}}^{\ddagger} = 26,74 \text{ KJ mol}^{-1}$, $T\Delta S_{\text{ass}}^{\ddagger} = -24,56 \text{ KJ mol}^{-1}$ e $\Delta G_{\text{ass}}^{\ddagger} = 51,31 \text{ KJ mol}^{-1}$) enquanto formado a partir de [bLF-Brij58][°] a barreira energética ($E_{\text{act-diss}} = -5,96 \text{ KJ mol}^{-1}$, $\Delta H_{\text{diss}}^{\ddagger} = -8,44 \text{ KJ mol}^{-1}$, $T\Delta S_{\text{diss}}^{\ddagger} = -93,35 \text{ KJ mol}^{-1}$ e $\Delta G_{\text{diss}}^{\ddagger} = 84,91 \text{ KJ mol}^{-1}$) é dominada pela perda de entropia. A formação de [LF-Brij58][°] foi conduzida entropicamente ($T\Delta S^{\circ} = 65,46 \text{ KJ mol}^{-1}$ e $\Delta H^{\circ} = 33,74 \text{ KJ mol}^{-1}$), mostrando que a interação hidrofóbica tem papel fundamental na interação entre bLF e Brij58. Posteriormente avaliamos a mesma interação sob diferentes condições de pH e força iônica, obtendo os parâmetros termodinâmicos por calorimetria de titulação isotérmica e informações sobre as condições térmicas de desdobramento da proteína por calorimetria diferencial de varredura. Aqui, Brij58 interagiu de forma independente com lóbulo complexado por ferro (hLF) e com o lóbulo sem ferro (aLF). As constantes de ligação a pH 7,4 para a interação entre Brij58 com hLF e aLF foram da ordem de grandeza de $\approx 10^7 \text{ L mol}^{-1}$. Os valores negativos de $\Delta H_{\text{int}}^{\circ}$ e

$T\Delta S_{int}^{\circ}$ indicaram que foram formadas ligações de hidrogênio e interações van der Waals formadas durante o processo. A pH 7,4 a formação dos complexos [hLF-Brij58]^o e [aLF-Brij58]^o foram diminuídos à medida que aumentou a força iônica. A pH 7,4 o aumento da força iônica promoveu a desnaturação das estruturas nativas hLF e aLF. A pH 12 o aumento da força iônica embora não tenha afetado as aLF estruturas nativas promoveu a captura dos íons férricos presentes em hLF interrompendo a interação com Brij58 após 75 mM de NaSCN concentração. Portanto, o sal NaSCN agiu como estabilizador térmico para hLF e desestabilizador térmico para aLF. Esses resultados ampliam a compreensão sobre os mecanismos de interações entre surfactantes não iônicos e proteínas globulares fornecendo informações importantes para posterior aplicações tecnológicas.

Palavras-chave: Estrutura molecular. Química supramolecular. Proteínas. Agentes ativos de superfície. Termodinâmica.

ABSTRACT

CASTRO, Alan Stampini Benhame, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2021. **Determination of the kinetics and thermodynamics of the formation of protein-surfactant supramolecular structures.** Adviser: Luis Henrique Mendes da Silva. Co-Advisers: Ana Clarissa dos Santos Pires, Maria do Carmo Hespanhol and Yara Luiza Coelho.

The organization, stability and functional viability of proteins for living cells are based on a delicate balance between spontaneous folding and assembly of their component molecules. Understanding and quantifying protein-surfactant interactions are important both for the rational design of new supramolecular systems, including intelligent materials, and for the development of new biologically active agents. In this work we firstly evaluated the protein-surfactant interaction through the complete determination of all thermodynamic and kinetic parameters associated with the interaction between Bovine Lactoferrin (bLF) and non-ionic surfactant Brij58 by surface plasmon resonance technique. The transition complex [bLF-Brij58][‡] has been fully characterized, as well as the process of interaction between bLF and Brij58 molecules to the thermodynamically stable complex [bLF-Brij58][°]. The kinetic constants of association ($k_a \approx 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) and dissociation ($k_d \approx 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) were proportional and inverse proportional to the temperature increase, respectively. [bLF-Brij58][‡] formed from the association of free molecules of bLF and Brij58 occurs with an energy barrier almost equal to the increase in enthalpy ($E_{\text{act-ass}} = 29.22 \text{ KJ mol}^{-1}$, $\Delta H_{\text{ass}}^{\ddagger} = 26.74 \text{ KJ mol}^{-1}$, $T\Delta S_{\text{ass}}^{\ddagger} = -24.56 \text{ KJ mol}^{-1}$, and $\Delta G_{\text{ass}}^{\ddagger} = 51.31 \text{ KJ mol}^{-1}$) whereas formed from [bLF-Brij58][°] the energy barrier ($E_{\text{act-diss}} = -5.96 \text{ KJ mol}^{-1}$, $\Delta H_{\text{diss}}^{\ddagger} = -8.44 \text{ KJ mol}^{-1}$, $T\Delta S_{\text{diss}}^{\ddagger} = -93.35 \text{ KJ mol}^{-1}$, and $\Delta G_{\text{diss}}^{\ddagger} = 84.91 \text{ KJ mol}^{-1}$) is dominated by entropy loss. [LF-Brij58][°] formation was entropically conducted ($T\Delta S^{\circ} = 65.46 \text{ KJ mol}^{-1}$ and $\Delta H^{\circ} = 33.74 \text{ KJ mol}^{-1}$), showing that hydrophobic interaction plays a fundamental role in the interaction between bLF and Brij58. Afterwards we evaluated the same interaction under different conditions of pH and ionic strength, obtaining the thermodynamic parameters by isothermal titration calorimetry and information about the thermal unfolding conditions of the protein by scanning differential calorimetry. Here, Brij58 interacted independently with iron-complexed lobe (hLF) and iron-free lobe (aLF). At pH 7.4 binding constants for the interaction between Brij58 with hLF and aLF were on the order of $\approx 10^7$. $\Delta H_{\text{int}}^{\circ}$ and $T\Delta S_{\text{int}}^{\circ}$ negative values indicated that hydrogen bonds and van der Waals interactions were formed during the process. At pH 7.4, the increase in ionic strength promoted

the denaturation of native hLF and aLF structures. At pH 12, the increase in ionic strength, although it did not affect the aLF native structures, promoted the capture of ferric ions present in hLF, interrupting the interaction with Brij58 after 75 mM of NaSCN concentration. Therefore the NaSCN salt acted as a thermal stabilizer for hLF and a thermal destabilizer for aLF. These results broaden the understanding of the interaction mechanisms between nonionic surfactants and globular proteins providing important information for further technological application.

Keywords: Molecular structure. Supramolecular Chemistry. Proteins. Surface active agents. Thermodynamics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura básica dos aminoácidos, onde R representa a cadeia lateral.	21
Figura 2. 20 tipos de aminoácidos formadores de proteínas.	22
Figura 3. Processo de formação da ligação peptídica.....	23
Figura 4. Níveis estruturais das proteínas.....	23
Figura 5. Estrutura química da lactoferrina bovina. (A) holo-lactoferrina com forma ligada a átomos de ferro; (B) apo-lactoferrina com forma livre de átomos de ferro.	26
Figura 6. Representação esquemática dos surfactantes, a cauda corresponde à porção apolar e a cabeça à porção polar.	27
Figura 7. A) Micela formada em uma solução aquosa. B) Micela invertida formada em um solvente orgânico não polar.	30
Figura 8. Estrutura química do Brij58.	31
Figura 9. Ilustração do sensor chip CM5 e o design de interface do filme de ouro.	34
Figura 10. Diagrama esquemático da ressonância plasmônica de superfície (RPS).	35
Figura 11. Descrição dos componentes de um calorímetro de titulação isotérmica.....	38
Figura 12. Descrição dos componentes de um calorímetro diferencial de varredura.....	39
Figura 13. Sensograma (RU vs. tempo) para interações bLF-Brij58, com ([Brij58] = 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 e 16 μ M) fluindo sobre um chip sensor CM5 de baixa densidade de bLF imobilizado na superfície (3945 RU) a 298,15 K. A seta indica o aumento da concentração .50	
Figura 14. Gráficos de Arrhenius de $\ln k_a$ versus $1/T$ (■) e $\ln k_d$ versus $1/T$ (○) associados com interações bLF-Brij58 em pH 7,4.	53
Figura 15. Gráficos de ΔH_{obs} em função da razão molar [Brij58]/[bLF] (ou como funções de [Brij58]) para adição de Brij58 a (□) solução de bLF 10 μ M em pH 7,4 e (○) tampão de fosfato a pH 7,4 e 298,15 K. A concentração de Brij58 é indicada pelo eixo superior.superior.....	59
Figura 16. Valores de $\Delta H_{app} - int$ plotados em função da razão molar [Brij58]/[bLF] (ou em função de [Brij58]) para a interação bLF-Brij58 em tampão de fosfato em pH 7,4 e 298,15 K.	60

Figura 17. Valores de $\Delta H_{app} - int$ em função da razão molar de (Δ) [Brij58]/[hLF] (eixo inferior) e razão molar de (\blacktriangle) [Brij58]/[aLF] (topo eixo) em tampão pH 7,4 e 298,15 K. (-) A linha sólida representa a curva calculada de $\Delta H_{app} - int$ em função de [Brij58]/[lóbulo bLF] da Equação 1.....61

Figura 18. Termogramas NanoDSC para soluções de bLF 25 μ M com diferentes concentrações de Brij58 em pH 7,4. Os valores acima e à esquerda das curvas são as concentrações de Brij58.62

Figura 19. Gráficos de ΔH_{obs} em função da razão molar [Brij58]/[bLF] (ou em função de [Brij58]) para adição de Brij58 a (\square) solução de bLF 10 μ M em tampão pH 12, e (\circ) tampão pH 12 a 298,15 K. A concentração de Brij58 é indicada pelo eixo superior.65

Figura 20. Valores de $\Delta H_{app} - int$ em função da razão molar [Brij58]/[bLF] (ou em função de [Brij58]) para a interação bLF-Brij58 em tampão pH 12 a 298,15 K.66

Figura 21. Valores de $\Delta H_{app} - int$ em função da razão molar de (Δ) [Brij58]/[hLF] (eixo inferior) e razão molar de (\blacktriangle) [Brij58]/[aLF] (eixo superior) em tampão pH 12 e 298,15 K.67

Figura 22. Termogramas NanoDSC para soluções de bLF 25 μ M com diferentes concentrações de Brij58, em pH 12. Os valores acima e à esquerda das curvas são as concentrações de Brij58.68

Figura 23. Valores de $\Delta H_{app} - int$ em função da razão molar [Brij58]/[hLF] (símbolos abertos) e [Brij58]/[aLF] (símbolos sólidos) em tampão pH 7,4 e 298,15 K, (\square, \blacksquare) sem adição de sal; (\circ, \bullet) 25mM; (Δ, \blacktriangle) 50 mM; ($\nabla, \blacktriangledown$) 75 mM e ($\triangleleft, \blacktriangleleft$) 100 mM de NaSCN respectivamente.69

Figura 24. Termogramas NanoDSC para soluções de bLF 25 μ M com diferentes concentrações de NaSCN a pH 7,4. Os valores acima e à esquerda das curvas são os valores das concentrações de NaSCN.71

Figura 25. Valores de $\Delta H_{app} - int$ em função da razão molar [Brij58]/[hLF] (símbolos abertos) e [Brij58]/[aLF] (símbolos sólidos) em tampão pH 12 a 298,15 K (\square, \blacksquare) sem adição de sal; (\circ, \bullet) 25 mM; (Δ, \blacktriangle) 50 mM; ($\nabla, \blacktriangledown$) 75 mM e ($\triangleleft, \blacktriangleleft$) 100 mM de NaSCN respectivamente.72

Figura 26. Termogramas NanoDSC para soluções de bLF 25 μ M com diferentes concentrações de NaSCN a pH 12. Os valores acima e à esquerda das curvas são os valores das concentrações de NaSCN.74

Figura S1. Sensogramas de cinética de interação para soluções de Brij58 (9-16 μM) que fluem sobre uma superfície de um sensor chip CM5 Biacore imobilizado por lactoferrina (3945 RU) a temperaturas: (a) 289,15 K, (b) 293,15 K, (c) 297,15 K e (d) 301,15 K.....89

Figura S2. Alteração na absorvância de soluções de vermelho carmim no máximo de absorção (525 nm) em várias concentrações de Brij58 a pH 7,4.....89

Figura S3. Gráfico de K_{obs} em função da concentração de Brij58, usado para determinar k_a nas temperaturas: (■) 289,15 K, (●) 293,15 K, (▲) 297,15 K, (○) 298,15 K, e (△) 301,15 K.....90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação dos surfactantes de acordo com o grupo polar.	28
Tabela 2. Constante da taxa de associação (k_a) para a ligação de moléculas bLF e Brij58 não complexadas e constante da taxa de dissociação (k_d) do complexo termodinamicamente estável [bLF-Brij58] ^o em várias temperaturas.....	52
Tabela 3. Parâmetros de energia cinética de ativação para (a) a formação do complexo de transição via associação de moléculas Brij58 não complexadas em moléculas bLF não complexadas e (b) quebra do complexo termodinamicamente estável [bLF-Brij58] ^o (processo de dissociação) em pH 7,4.....	54
Tabela 4. Constante de ligação (K_b), variação da energia livre de Gibbs padrão (ΔG°), variação de entalpia padrão (ΔH°) e variação de entropia padrão ($T\Delta S^\circ$) de formação do complexo [bLF-Brij58] ^o em temperaturas variáveis e pH 7,4.	57
Tabela 5. Parâmetros termodinâmicos do processo de complexação de [hLF-Brij58] e [aLF-Brij58], obtidos em pH 7,4 e em diferentes concentrações de NaSCN.....	69
Tabela 6. Parâmetros termodinâmicos do processo de complexação de [hLF-Brij58] e [aLF-Brij58], obtidos a pH 12 e diferentes concentrações de NaSCN.....	73
Tabela S1. Valores de ΔH_{den} e T_m associados às transições térmicas de aLF e hLF em diferentes concentrações de NaSCN a pH 7,4.....	90
Tabela S2. Valores de ΔH_{den} e T_m associados à transição térmica aLF em diferentes concentrações de NaSCN a pH 12.....	91

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

Substâncias

bLF: lactoferrina bovina;

aLF: lóbulo sem ferro;

hLF: lóbulo complexado por ferro;

AP: palmitato de ascorbila;

AS: estearato de ascorbila;

BSA: albumina do soro bovino;

Brij58: éter cetílico de polioxietileno (20);

EDC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida;

NaSCN: tiocianato de sódio;

NHS: N-hidroxissuccinimida;

PEO: poli(óxido de etileno);

SDS: dodecil sulfato de sódio;

Técnicas

DSC: calorimetria diferencial de varredura;

ITC: calorimetria de titulação isotérmica;

RPS: ressonância plasmônica de superfície;

Símbolos e abreviações

ΔG°_{int} : variação da energia livre de Gibbs padrão;

ΔG^{\ddagger} : variação da energia livre de Gibbs obtido a partir de processos cinéticos;

$\Delta G^{\ddagger}_{ass}$: variação da energia livre de Gibbs de ativação para os processos de associação;

$\Delta G^{\ddagger}_{diss}$: variação da energia livre de Gibbs de ativação para os processos de dissociação;

ΔH_{den} : variação da entalpia de desnaturação;

ΔH_{obs} : variação da entalpia observada;

ΔH°_{int} : variação da entalpia padrão de interação;

ΔH°_{conf} : variação da entalpia padrão por alterações conformacionais;

ΔH°_{des} : variação da entalpia padrão por dessolvatação de moléculas de H₂O;
 $\Delta H_{app-int}$: variação da entalpia molar aparente de interação;
 $\Delta H^\circ_{int}{}^{aLF-Brij58}$: variação da entalpia padrão das interações de aLF-Brij58;
 $\Delta H^\circ_{int}{}^{hLF-Brij58}$: variação da entalpia padrão das interações de hLF-Brij58;
 ΔH^\ddagger : variação da entalpia obtido a partir de processos cinéticos;
 ΔH^\ddagger_{ass} : variação da entalpia de ativação para os processos de associação;
 ΔH^\ddagger_{diss} : variação da entalpia de ativação para os processos de dissociação;
 ΔS°_{int} : variação da entropia padrão;
 ΔS°_{conf} : variação da entropia padrão por alterações conformacionais;
 ΔS°_{rel} : variação da entropia padrão por dessolvatação de moléculas de H₂O;
 $\Delta S^\circ_{trans-rot}$: variação da entropia padrão devido por mudança no número de graus de liberdade translacional-rotacional;
 $\Delta S^\circ_{int}{}^{aLF-Brij58}$: variação da entropia padrão das interações de aLF-Brij58;
 $\Delta S^\circ_{int}{}^{hLF-Brij58}$: variação da entropia padrão das interações de hLF-Brij58;
 ΔS^\ddagger : variação da entropia obtido a partir de processos cinéticos;
 ΔS^\ddagger_{ass} : variação da entropia de ativação para os processos de associação;
 ΔS^\ddagger_{diss} : variação da entropia de ativação para os processos de dissociação;
 $[bLF]_T$: concentrações total da espécie bLF;
 $[Surf]$: concentração de surfactante;
 $[Brij58]_T$: concentrações total da espécie Brij58;
c.m.c: critical micellar concentration;
 C_p : capacidade calorífica;
 ΔC_p : variação da capacidade calorífica;
dq: variação infinitesimal do calor transferido ou absorvido pelo sistema;
dw: variação infinitesimal do trabalho realizado sobre ou pelo sistema;
dU: variação infinitesimal da energia interna do sistema;
 E_{act} : energia de ativação de processos cinéticos;
 $E_{act-ass}$: energia de ativação de associação;
 $E_{act-diss}$: energia de ativação de dissociação;
h: constante de Planck;
H: entalpia;
 k_a : constante de associação;

k_d : constante de dissociação;

k_B : constante de Boltzmann;

K_b : constante de ligação;

K_{obs} : constante observada;

n : razão estequiométrica;

P_{ext} : pressão externa no sistema;

q : calor;

Q : conteúdo total do calor;

R : constante universal dos gases;

RU : unidades de ressonância arbitrárias;

RU_{max} : unidades de ressonância no equilíbrio metaestável;

$RU(t)$: unidades de ressonância no tempo t ;

$RU(t_f)$: unidades de ressonância que inicia o processo de dissociação;

T_m : pico máximo da temperatura;

V_c : volume da amostra na célula calorimétrica;

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1 Proteínas e seus processos de auto-organização	21
2.2 Desnaturação e agregação de proteínas	24
2.3 Aspectos gerais da lactoferrina.....	25
2.4 Surfactantes: Estrutura e propriedades físico-químicas	27
2.4.1 Aspectos gerais de Brij58.....	30
2.5 Interação proteína-surfactante	31
2.5.1 Aspectos teóricos para o estudo da interação proteína-surfactante.....	33
2.5.2 Ressonância Plasmônica de Superfície – RPS.....	33
2.5.3 Calorimetria de Titulação Isotérmica – ITC	36
2.5.4 Calorimetria Diferencial de Varredura – DSC	39
3 OBJETIVOS	42
3.1 Objetivos gerais.....	42
3.1.1 Objetivos específicos: Análises cinéticas dos parâmetros de ligação entre proteína multifuncional globular e surfactante não iônico	42
3.1.2 Objetivos específicos: Estudo da interação entre Brij58 e lactoferrina: Propriedades termodinâmicas, NaSCN e efeitos de pH	42
4 MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1 Materiais.....	44
4.2 Determinação da c.m.c de Brij58	44
4.3 Ressonância plasmônica de superfície	45
4.4 Calorimetria de titulação isotérmica.....	47
4.5 Calorimetria diferencial de varredura.....	49
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1 Análises cinéticas dos parâmetros de ligação entre proteína multifuncional globular e surfactante não iônico	50
5.1.1 Análises cinéticas da interação bLF-Brij58 por RPS.....	50
5.1.2 Análises termodinâmicas da interação bLF-Brij58 por RPS	56
5.1.3 Conclusões	57
5.2 Interação de brij58 com lactoferrina: Propriedades termodinâmicas, efeitos de NaSCN e pH.....	58

5.2.1 Caracterização termodinâmica da interação entre bLF e Brij58.....	58
5.2.2 Efeito de NaSCN em complexações [hLF-Brij58] e [aLF-Brij58] em pH 7,4	68
5.2.3 Efeito de NaSCN em complexações [hLF-Brij58] e [aLF-Brij58] em pH 12.	71
5.2.3 Conclusão.....	75
REFERÊNCIAS.....	76
APÊNDICE.....	89

1 INTRODUÇÃO

A evolução da vida ainda é um grande enigma, apesar dos rápidos avanços no campo da astrobiologia, microbiologia e genética. A resposta para esse quebra-cabeça é tão surpreendente quanto o enigma relacionado à evolução do próprio universo.

As proteínas estão presentes em todos os seres vivos e participam em praticamente todos os processos celulares sendo responsáveis por construir todos os seres vivos: plantas, animais e, portanto, nós humanos. A bioquímica percorreu um longo caminho para explicar como as células produzem todas as suas várias proteínas. Desde a descoberta, no século XVIII, das primeiras substâncias que coagulam em altas temperaturas, foi somente em meados dos anos 1838, com o holandês Gerardus Johannes Mulder, que ocorreu o primeiro relato do termo proteína (*do grego proteios, primeiro, primitivo*). Desde essa época já se sabia que as proteínas eram constituintes fundamentais de todos os seres vivos. Com o desenvolvimento da caracterização estrutural das proteínas, suas propriedades e funções fisiológicas, a maioria da comunidade científica da época estava convencida que as proteínas seriam responsáveis pela hereditariedade. Chegaram a especular que as diferenças atômicas entre as proteínas poderiam gerar a diversidade esperada para todas as formas de vida. Ainda mais além, dizendo que, durante o desenvolvimento embrionário, a fusão da informação das duas células germinativas eliminaria eventuais erros nas proteínas. Futuramente, com uma das descobertas mais importantes da história das ciências da vida, em um trabalho publicado em 1871 o suíço Johann Friedrich Miescher relata o descobrimento de uma nova substância que futuramente após a sua morte seria chamada de DNA, o novo precursor da vida. Apesar dessa descoberta, os estudos com DNA somente se intensificaram após meados de 1920. Em 1953, James D. Watson, biólogo americano e o Francis Crick, físico inglês, propuseram o modelo da dupla hélice do DNA (THIEMANN, 2003). Esta proposta foi uma das maiores conquistas científicas no século XX e fez com que ganhassem o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina no ano de 1962.

O DNA foi isolado e descoberto quimicamente antes que suas funções se tornassem claras. Hoje sabemos que é o DNA que determina a sequência de subunidades de aminoácidos nas proteínas e que a sequência de subunidades afeta a estrutura tridimensional de uma proteína e, portanto, sua função. O estudo de proteínas não foi descontinuado muito menos diminuído; atualmente ainda se encontra a todo vapor. Recentemente, no ano de 2018, Frances H. Arnold “*pela evolução dirigida de enzimas*”, George P. Smith e Sir Gregory P. Winter “*pela exibição em fagos de peptídeos e anticorpos*” foram os ganhadores do Prêmio Nobel de Química deste

ano inspirados pelo poder da evolução usando os mesmos princípios - mudança e seleção genética - para desenvolver proteínas que resolveram alguns problemas químicos da humanidade.

A imobilização e modificação de proteínas são técnicas amplamente utilizadas nos campos da bioquímica e da ciência de biomateriais (FINBLOOM; FRANCIS, 2018). Neste sentido, a química supramolecular se apresenta com uma oportunidade para avançar em uma ampla gama de aplicações, incluindo administração de medicamentos e modificações pós-traducionais que afetam a atividade da proteína. A química supramolecular, é particularmente a química do hospedeiro-hóspede formando um complexo, onde a formação desse complexo ocorre por meio de interações não covalentes altamente controláveis com afinidades de ligação personalizáveis. Complexos de biomoléculas supramoleculares oferecem o potencial para novos desenvolvimentos em materiais à base de proteínas, pois essas estratégias de modificação podem oferecer construções únicas que combinam a função e a precisão das proteínas com o comportamento responsivo das montagens supramoleculares.

Surfactantes são compostos anfifílicos com capacidade para se ligar a uma extensa variedade de proteínas, devido às propriedades hidrofóbicas e hidrofílicas dos aminoácidos, segundo diferentes mecanismos, formando complexos estáveis (GULL et al., 2009). As interações de surfactantes com proteínas são importantes em uma grande variedade de sistemas industriais, biológicos (VASILESCU et al., 1999), farmacêuticos (BROWN; SLUSSER, 1994), cosméticos (AMIRI et al., 2012) e de alimentos (KELLEY; MCCLEMENTS, 2003; WATANABE et al., 2005). Em solução, os surfactantes ajudam a solubilizar uma variedade de espécies químicas, dissociando agregados e desdobrando proteínas. Outro fator é que os complexos de proteínas quimicamente modificadas por surfactantes, devido à sua natureza biodegradável, são potenciais substitutos das macromoléculas sintéticas e, portanto, estão encontrando um papel cada vez mais importante na indústria.

A formação de sistemas complexos proteína-surfactante dão origem a propriedades físico-químicas específicas, resultantes principalmente de interações diretas proteína-surfactante que geram estruturas supramoleculares com características cinéticas e termodinâmicas de formação variadas (OTZEN, 2011). Geralmente, as propriedades funcionais dos complexos de proteína-surfactante não-iônico são superiores às das proteínas e dos surfactantes isoladamente (HOLMBERG, 2018). Por exemplo, foi relatado que a interação de surfactantes com proteínas poderia modificar as funções biológicas dos biopolímeros (RANDOLPH; LATOYA, 2002), em grande parte como resultado de interações hidrofóbicas e eletrostáticas, as duas forças dominantes permitindo sua associação (FERREIRA et al., 2018a,

2018b; HOLMBERG, 2018). Os estudos sobre as interações proteína-surfactante são abundantes na literatura (KHAN; MAHLER; KISHORE, 2015; LI; LEE, 2019), no entanto, estes são amplamente focados na análise de nanoestruturas agregadas e/ou na determinação das características termodinâmicas da formação do complexo surfactante-proteína.

Em contraste com as interações do surfactante iônico, as interações do surfactante não iônico com as proteínas globulares são mais fracas (DE; GIRIGOSWAMI; DAS, 2005) e estabilizam a estrutura secundária do peptídeo (SJÖGREN et al., 2005). Alam et al. estudaram o efeito de vários surfactantes na atividade e estabilidade estrutural da lipase de *Rhizopus niveus* (ALAM et al., 2014). Eles descobriram que os surfactantes aniônicos e catiônicos desativaram a lipase, enquanto o Brij35, um surfactante não iônico, melhorou a atividade ao promover o desdobramento parcial da proteína. Essa discrepância pode ser atribuída às diferenças nas interações entre os parceiros de ligação. A interação entre proteínas globulares e surfactantes não-iônicos é considerada hidrofóbica, com associações entre cadeias alquílicas sendo mais importantes do que aquelas de grupos polares (DURCHSCHLAG et al., 2000; HOLMBERG, 2018; VLASOVA et al., 2018). Sjögren e colaboradores mostraram que as interações entre surfactantes não iônicos e peptídeos com forte caráter hidrofílico não promoveram mudanças conformacionais nas estruturas desses peptídeos, além do efeito desprezível das interações hidrofílicas (SJÖGREN et al., 2005). Por outro lado, uma revisão anterior sobre as interações entre surfactantes alquil não iônicos etoxilados e compostos bioativos considerou, além das interações hidrofóbicas, possíveis ligações de hidrogênio entre os aminoácidos mais polares e cadeias de óxido de etileno (EO), e concluiu que o fenômeno dependeu consideravelmente das espécies moleculares envolvidas (CSERHATI, 1995). Até onde sabemos, dados sobre os parâmetros cinéticos das interações diretas entre surfactantes não iônicos e proteínas globulares não foram relatados.

Até o momento, o mecanismo das interações surfactante-proteína permanecem pouco compreendidas, vários estudos abrangentes empregaram surfactantes iônicos (por exemplo, dodecilsulfato de sódio, SDS) porque eles participam de interações mais robustas e a interpretação dos resultados é mais representativa (EISSA, 2019; MANDAL et al., 2012; OTZEN, 2015; SRIVASTAVA; ALAM, 2018). No entanto, os surfactantes normalmente usados em formulações não são iônicos por causa de suas propriedades estabilizantes, enquanto os surfactantes iônicos também podem se ligar a grupos polares de proteínas e causar desnaturação. Em particular, os estudos físico-químicos que caracterizam completamente formação de complexos supramoleculares a partir das interações entre proteínas e surfactantes não iônicos são necessários porque tais combinações têm características únicas e suas

aplicações no mercado estão se expandindo (HUANG et al., 2019; KERSTENS; MURRAY; DICKINSON, 2006; LI; MCCLEMENTS, 2013; YAO et al., 2018; ZHOU et al., 2015).

Para nossos estudos escolhemos um sistema modelo de proteína-surfactante não iônico que consiste em uma mistura de lactoferrina bovina (bLF) e o surfactante não iônico Brij58. Portanto, neste estudo, determinamos os parâmetros cinéticos e termodinâmicos da formação de uma estrutura supramolecular a partir da interação entre bLF e Brij58 bem como a influência da concentração do surfactante, temperatura, pH e força iônica neste processo.

A estrutura supramolecular formada foi caracterizada por meio dos seguintes procedimentos: 1. Os parâmetros termodinâmicos foram determinados por calorimetria de titulação isotérmica (VALENTE; SÖDERMAN, 2014) e por ressonância plasmonica de superfície (RPS); 2. Os parâmetros cinéticos foram determinados por ressonância plasmonica de superfície (RPS); 3. As estabilidades térmicas conformacionais foram determinadas por Nano Calorimetria Diferencial de Varredura (NanoDSC). Os resultados do presente estudo podem ser úteis na otimização de estruturas complexas entre proteínas e surfactantes não iônicos, além de apresentarem grande potencial terapêutico e são relevantes para diversas formulações.

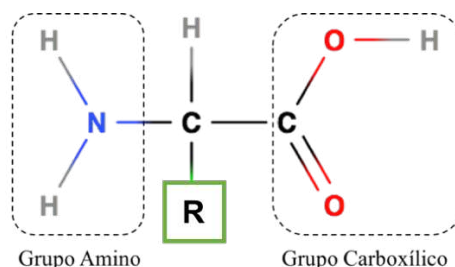
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Proteínas e seus processos de auto-organização

As proteínas estão entre as moléculas orgânicas mais abundantes nos sistemas vivos, elas existem em uma grande diversidade de estruturas que desempenham uma variedade gigantesca de funções fisiológicas, tais como: transporte de substâncias, defesa, catálise de reações, coagulação do sangue, liberação de hormônios, controle de pressão arterial, dentre outras. As enzimas são um tipo de proteína que atuam como catalisadores de reações bioquímicas. Cada célula pode conter milhares de enzimas que atuam na quebra, ligação ou reorganização de substâncias (NEURATH, 1984).

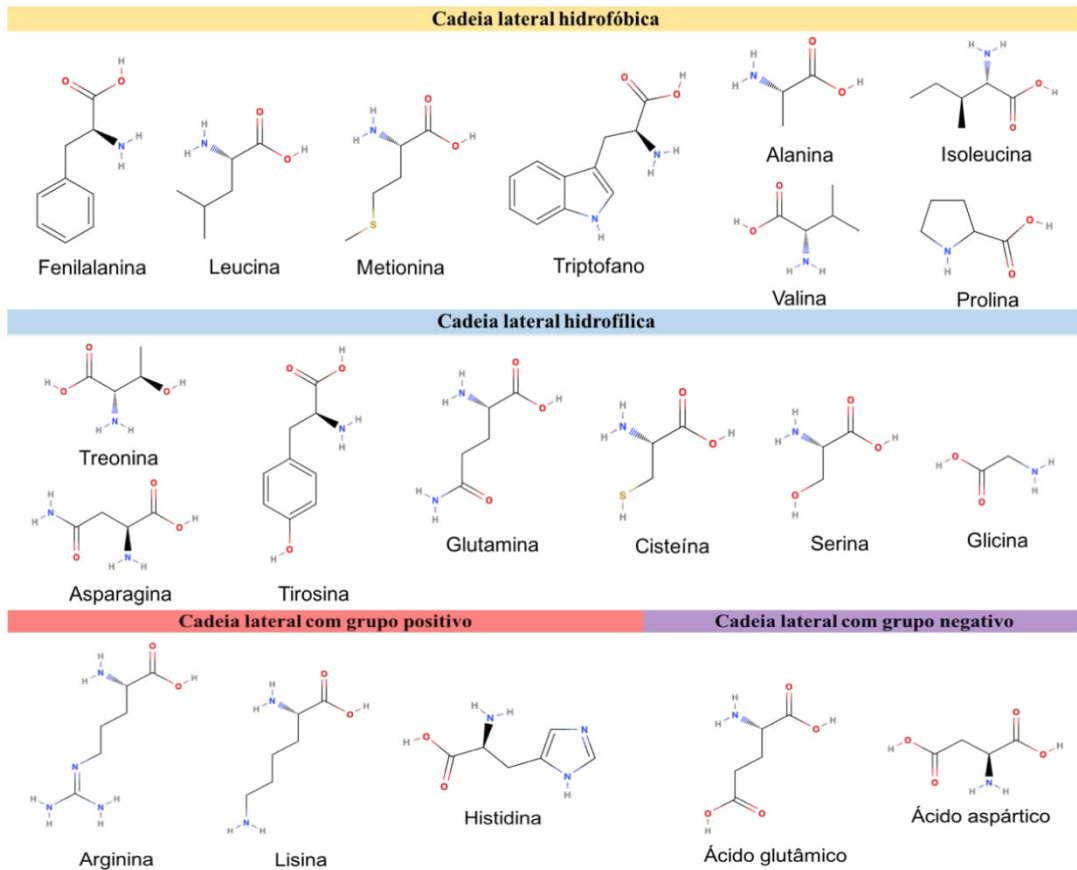
As proteínas existem em diferentes tamanhos e formas, algumas delas na forma globular (esférica) e outras na forma fibrosa (fibras finas e longas). A constituição de uma proteína é derivada de uma sequência de segmentos monoméricos interligados denominados aminoácidos.

Figura 1. Estrutura básica dos aminoácidos, onde R representa a cadeia lateral.



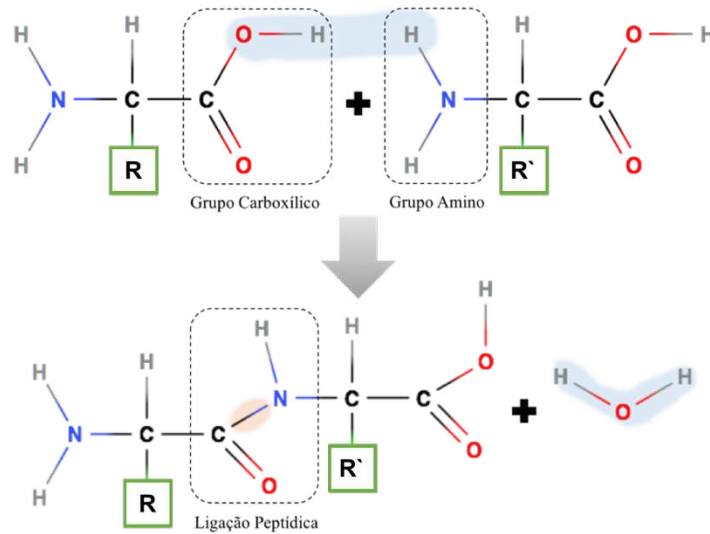
A estrutura básica de um aminoácido é constituída de um átomo central ligado a um grupo amina (-NH₂), um grupo carboxílico (-COOH), um átomo de hidrogênio (-H) e um grupamento químico que possui diferentes composições (-R). O grupo amina pode ser protonado, enquanto o grupo carboxílico pode existir na forma desprotonada, conferindo carga positiva ou negativa respectiva ao aminoácido dependendo do pH do sistema. O grupo R ligado ao átomo central de carbono representa um conjunto de 20 tipos de estruturas químicas distintas determinando a identidade do aminoácido (figura 2). As propriedades de cada aminoácido são determinadas pelas propriedades do grupo R, como hidrofobicidade e carga por exemplo.

Figura 2. 20 tipos de aminoácidos formadores de proteínas.



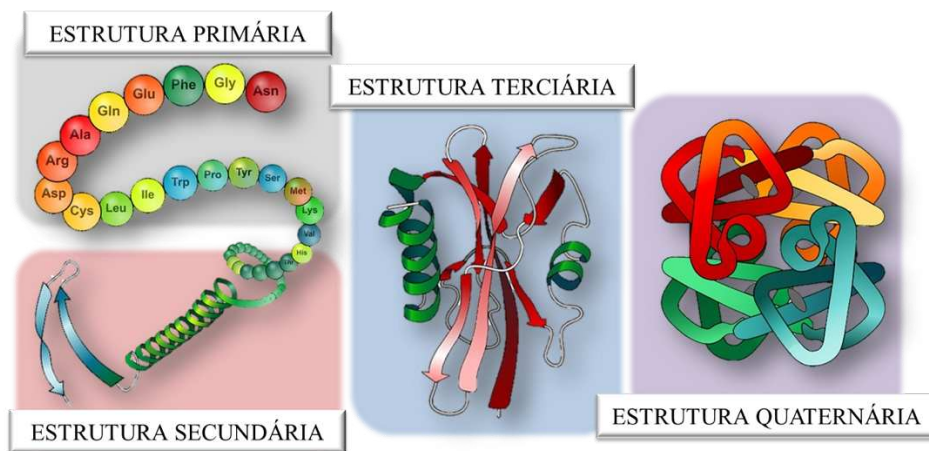
As proteínas são constituídas por uma ou mais cadeias polipeptídicas que por sua vez são constituídas de diferentes aminoácidos que se ligam em uma ordem específica pré-descrita geneticamente. Os aminoácidos de um polipeptídeo se ligam a seus vizinhos por meio de ligações covalentes chamadas ligações peptídicas. As ligações peptídicas ocorrem com uma reação de síntese entre o grupo carboxílico de um aminoácido e o grupo amino de outro aminoácido o qual libera uma molécula de água por ligação formada, como mostrado na figura 3.

Figura 3. Processo de formação da ligação peptídica.



A estrutura de uma proteína pode refletir quatro níveis de organização.

Figura 4. Níveis estruturais das proteínas.



O nível mais simples de estrutura proteica, estrutura primária, corresponde a uma sequência de aminoácidos codificados geneticamente. À medida que a sequência de aminoácidos cresce, ligações de hidrogênio são formadas entre o grupo carbonil de um aminoácido e o grupo amina de outro formando uma estrutura dobrada, as formas mais comuns de dobragem são em formas de α hélices e folhas β . A partir do momento que isso começa a ocorrer caracterizamos essa estrutura como secundária. Dependendo da natureza dos aminoácidos estes podem ser mais provavelmente encontrados em uma das formas de dobramento. A estrutura terciária representa a conformação da proteína como um todo, onde

ocorreu um enovelamento de α hélices e folhas β devido somente a interações entre os grupamentos R dos resíduos de aminoácidos, que podem ser do tipo:

- Pontes de dissulfeto: aminoácidos que contém o grupo tiol ($-SH$) na cadeia lateral quanto próximos entre si, ocorre uma ligação covalente entre dois átomos de enxofre ($-S-S-$).
- Ligações de hidrogênio: diferentemente da estrutura secundária as ligações de hidrogênio aqui ocorrem entre os grupamentos R laterais dos aminoácidos, o qual envolve ligação entre átomos de oxigênio ou nitrogênio com hidrogênio, mesmo sendo um tipo de ligação fraca ainda são fundamentais para a formação da estrutura terciária.
- Ligações iônicas: alguns aminoácidos possuem grupamentos R laterais que se encontram ionizados em meio aquoso e quando em proximidade podem interagir entre si com natureza de interação eletrostática.
- Interações hidrofóbicas: aminoácidos com grupamentos R laterais apolares tendem a interagir entre si minimizando o contato não favorável com moléculas de água. Esse tipo de interação é considerado a força motriz para a formação final de uma estrutura compacta onde os grupos hidrofóbicos ficam localizados no interior e grupos hidrofílicos no exterior interagindo com moléculas de água.

Muitas proteínas são formadas por uma única cadeia polipeptídica e possuem somente três níveis de estrutura. No entanto existem proteínas que são compostas por mais de uma cadeia polipeptídica. A junção de cadeias polipeptídicas são chamadas de subunidades formadas por estruturas terciárias. Quando subunidades se juntam originam uma proteína com estrutura quaternária. Os mesmos tipos de interações que contribuem para formar a estrutura terciária também mantêm as subunidades unidas estabilizando a estrutura quaternária (CLARK et al., 2019).

2.2 Desnaturação e agregação de proteínas

A conformação nativa de uma proteína é caracterizada pela estrutura quaternária em algumas e pela estrutura terciária em outras. Quando a proteína está na conformação nativa ela apresenta funções biológicas específicas nas células. Cada proteína possui sua forma única, mas em todas estruturas as ligações e interações químicas realizadas entre os aminoácidos são fundamentais para manter essa forma. Mudanças no ambiente como alterar a temperatura, pH ou adição de novas substâncias químicas podem acarretar no rompimento dessas ligações e

interações, fazendo com que a proteína perca sua estrutura nativa. Quando uma proteína perde sua estrutura nativa sem ocorrer quebra de ligação peptídica entre os aminoácidos do polipeptídeo, diz-se que ela está desnaturada. Proteínas desnaturadas são geralmente não funcionais (HAMBORG et al., 2020). Para algumas proteínas, a desnaturação pode ser revertida. Uma vez que a estrutura primária do polipeptídeo ainda está intacta (os aminoácidos não se separaram), pode ser capaz de voltar a dobrar em sua forma funcional se for devolvida ao seu ambiente normal. Outras vezes, no entanto, a desnaturação é permanente.

A síntese de uma proteína nativa ocorre com um mecanismo gradual de enovelamento que envolve a construção a partir de estados transitórios de dobragem termodinamicamente estáveis. No entanto, em algumas circunstâncias, tais como envelhecimento celular, mutação e estresse ambiental etc., o caminho de dobragem natural da proteína pode ser desviado levando à formação de agregados de proteínas/amiloides. Estados parcialmente dobrados de proteínas têm como um dos principais fatores de agregação a exposição de grupos hidrofóbicos para a extremidade o qual facilita a formação de agregados via interação hidrofóbica entre outras proteínas de mesmo estado (ZAMAN et al., 2019).

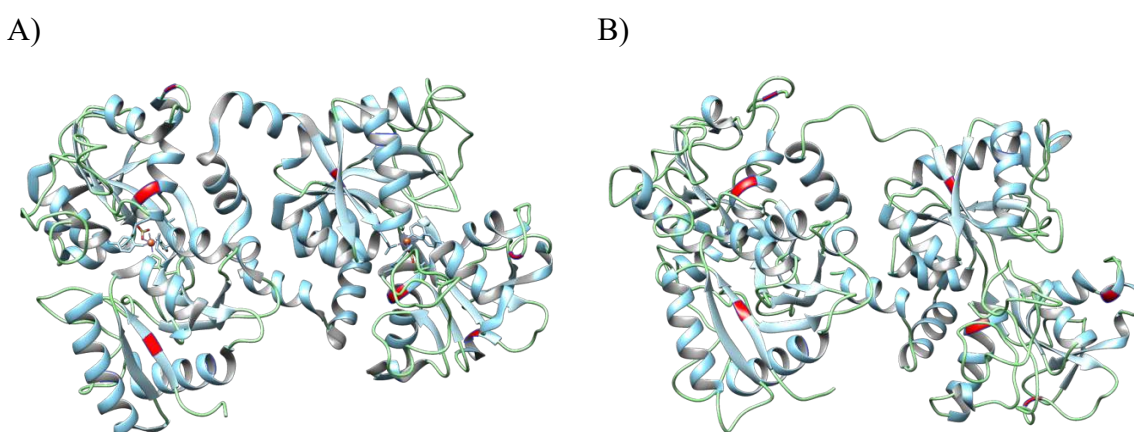
As proteínas podem se agregar na forma de amorfos desordenados ou na forma de fibrilas ordenadas. Agregados amorfos são geralmente formados a partir de rápidos processos de desnaturação o qual originam uma forma randômica de grandes agregados, que tendem a precipitar da solução. Normalmente, agregados amorfos são identificados pelo sistema de defesa celular acarretando no descarte desse tipo de agregado. Já a formação de fibrilas ocorre a partir de um processo de cinética lenta que envolve uma sucessão de etapas de desnaturação parcial de proteínas. As fibrilas são formadas a partir de moléculas de proteína parcialmente desnaturadas que se associam formando núcleos estáveis, à medida que essa cadeia cresce longos filamentos são formados. Uma característica peculiar às fibrilas é o alto conteúdo de arranjos de folhas β mantidos por meio de ligações de hidrogênio entre grupos amina e o grupo carboxila da cadeia principal dos resíduos de aminoácidos. Diferentemente dos agregados amorfos, a formação de fibrilas está associada com inúmeras doenças, tais como mal de Alzheimer, mal de Parkinson, diabetes tipo II e catarata que são coletivamente conhecidas como amiloidoses (ALAM et al., 2017; HATAMI et al., 2017).

2.3 Aspectos gerais da lactoferrina

Lactoferrina é uma proteína globular, pertencente à família das transferrinas e possui a capacidade de sequestrar íons livres de Fe^{2+} e Fe^{3+} . A Lactoferrina é secretada por células epiteliais em várias espécies de mamíferos, incluindo bovinos, ovinos, caprinos, espécie de equino, canino, roedores e seres humanos sendo encontrada em fluido seminal, secreções exócrinas pancreáticas, lágrimas, saliva, secreções uterinas e leite. Os níveis de concentração variam muito, os mais altos níveis de produção são atribuídos ao leite e do colostro de mamíferos (7 g/L colostro humano, 1g/L leite maduro humano e 0,4 mg/L no plasma humano) (EMBLETON et al., 2013; MORENO-EXPÓSITO et al., 2018).

Lactoferrina é uma glicoproteína de cadeia única de polipeptídeo apresentando massa molar de aproximadamente 80 kDa. Esta proteína é composta por 691 e 696 resíduos de aminoácidos em humanos e bovinos, respectivamente. Em sua construção, a cadeia de polipeptídeo é dobrada produzindo uma estrutura semelhante à transferrina, possuindo dois lóbulos homólogos N- e C- terminais que estão interligados por uma pequena cadeia de peptídeos. Os dois lóbulos carregam uma glicosilação local com um sítio de ligação de ferro cada. A lactoferrina bovina (bLF) pode ser encontrada em diferentes formas dependendo do número de átomos de ferro ligados: a forma holo-lactoferrina encontra-se saturada por íons ferro enquanto a forma apo-lactoferrina encontra-se desprovido de íons ferro, ainda existem as formas intermediárias contendo ferro em apenas um lóbulo (FRANCO et al., 2018).

Figura 5. Estrutura química da lactoferrina bovina. (A) holo-lactoferrina com forma ligada a átomos de ferro; (B) apo-lactoferrina com forma livre de átomos de ferro.



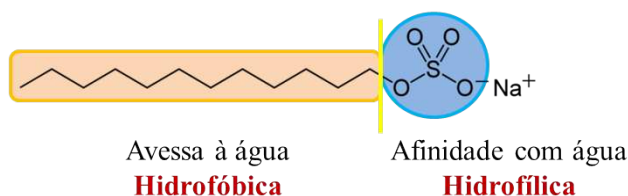
bLF é caracterizada como uma biomolécula multifuncional, visto que ela está intimamente envolvida na resposta imunológica contra patógenos, atividade anti-inflamatória,

atividade antioxidante, atividade anticancerígena, capacidade antimicrobiana contra bactérias, parasitas, fungos e vírus (IGLESIAS-FIGUEROA et al., 2019). Todas essas propriedades demonstram o grande potencial terapêutico dessa biomolécula, dos quais restam muitos mecanismos de ação ainda a ser descritos.

2.4 Surfactantes: Estrutura e propriedades físico-químicas

Compostos classificados como surfactantes (termo originado da expressão: *surface active agent*) apresentam como característica principal um comportamento anfifílico, ou seja, podendo interagir tanto com substâncias polares quanto com substâncias apolares. Esse fenômeno se deve ao fato de sua estrutura apresentar uma região hidrofílica e outra hidrofóbica bem definidas. Popularmente a região hidrofílica do surfactante é denominada cabeça e a região hidrofóbica é denominada cauda, que interagem com substâncias polares e apolares respectivamente.

Figura 6. Representação esquemática dos surfactantes, a cauda corresponde à porção apolar e a cabeça à porção polar.



Os surfactantes podem ser classificados segundo a natureza do grupo hidrofílico em:

- **Catiônicos:** possuem a parte hidrofílica constituída por um átomo ou grupo carregado positivamente.
- **Aniônicos:** possuem a parte hidrofílica constituída por um átomo ou grupo carregado negativamente.
- **Anfóteros:** possuem a parte hidrofílica constituída por um grupo que em solução aquosa exibem características aniônicas ou catiônicas dependendo do pH do meio no qual se encontram.
- **Não iônicos:** possuem a parte hidrofílica constituída por um grupo que interage fortemente com a água e não exibe carga em solução.

Alguns exemplos dos diferentes tipos de surfactantes podem ser observados na tabela 1.

Tabela 1. Classificação dos surfactantes de acordo com o grupo polar.

Surfactantes	Fórmula molecular	Classificação
Cloreto de dodecil trimetilamônio	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{Cl}$	Catiônico
Dodecil sulfato de sódio (SDS)	$\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$	Aniônico
Propionato de N–alquil– N, N– dimetil–β–amônio	$\text{CH}_3–(\text{CH}_2)_n\text{N}^+$ $(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$	Anfótero
4– (1,1,3,3) –tetrametilbutilfenil– polietileno glicol (Triton X100)	$\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O} (\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n (n=9–10)$	Não iônico

A característica anfífilica dos surfactantes lhes permite a capacidade de interagir entre meios com polaridades diferentes no qual se obtém várias funções, tais como: redução da tensão interfacial e superficial, emulsificação, dispersão de fases, redução da viscosidade, detergência, capacidade espumante e muitas outras (KNEPPER; BERNA, 2003). As variadas funções dos surfactantes fazem com que eles sejam apropriados para diversas aplicações. Entre as principais aplicações dos agentes surfactantes na indústria atualmente, encontram-se:

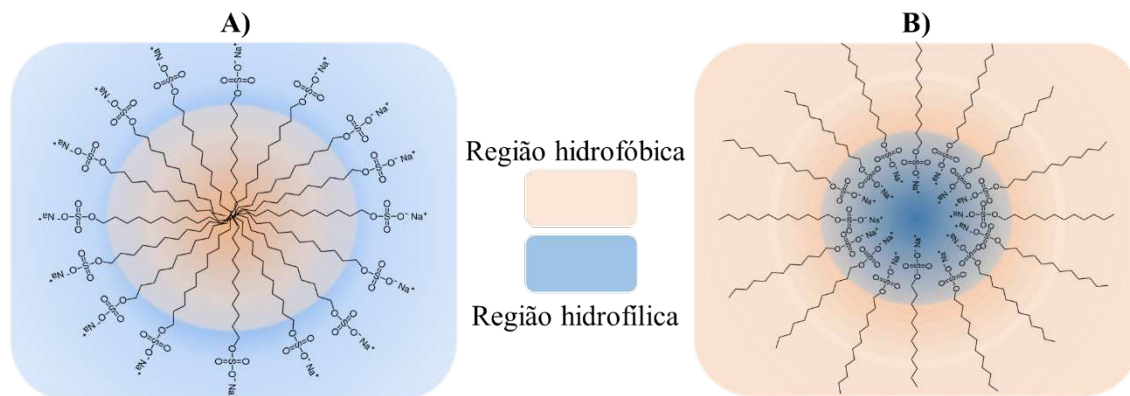
- **Petrolífera:** recuperação de óleo residual, redução da viscosidade de óleos, agentes permeabilizadores e limpeza.
- **Farmacêutica:** bactericida, antifúngico, antiviral, agentes permeabilizadores, solubilização ou emulsificante.
- **Alimentícia:** removedor de ceras de frutas e vegetais, solubilização ou emulsificante e limpeza.
- **Cosmética:** agente umectante, solubilização ou emulsificante e limpeza.
- **Papel:** agente dispersante e solubilização ou emulsificante.
- **Plásticos:** solubilização ou emulsificante.
- **Têxtil:** agente umectante, estabilizante, agentes permeabilizadores, lubrificante, solubilização ou emulsificante
- **Curtumes:** detergente e formadores de espuma.
- **Indústria química:** limpeza, detergente e formadores de espuma.
- **Metalúrgica:** lubrificante, agente umectante e detergente e formadores de espuma.
- **Biorremediação:** sequestrante de metais.

- **Tratamento residual:** sequestrante de metais.
- **Construção civil:** ligação do asfalto à areia e cascalho.

Surfactantes quando adicionados a um solvente como a água, se acumulam preferencialmente na superfície do solvente, ou seja, na interface solvente/ar. À medida que surfactantes se concentram na superfície do solvente ocorre diminuição da força de coesão (forças moleculares de atração que fazem com que as moléculas do próprio líquido fiquem unidas) entre as moléculas do solvente localizadas na superfície, como consequência a tensão interfacial é diminuída. Com adição de mais surfactante em um dado momento a superfície do solvente fica saturada onde a partir não mais ocorrerá a redução da tenção interfacial deste sistema. As moléculas de surfactantes adicionadas após a saturação da superfície se concentraram no bulk da solução (parte da solução onde moléculas da solução são influenciadas por outras moléculas da solução e não por quaisquer outras moléculas em fase sólida ou gasosa tais como o recipiente ou gases acima da superfície da solução). À medida que mais surfactantes são adicionados ao bulk em uma dada concentração eles interagirão entre si formando agregados moleculares, denominados de micelas (FAINERMAN; MÖBIUS; MILLER, 2001). A concentração no qual se inicia a formação de micelas é chamada de c.m.c (termo originado da expressão: *critical micellar concentration*). A c.m.c é uma propriedade intrínseca de cada surfactante, quaisquer alterações na estrutura do surfactante bem como alteração das condições do meio como: força iônica, temperatura, pH e etc., podem afetar o valor dessa propriedade (CHEN et al., 1998; RUSSO KRAUSS et al., 2021). Os valores de c.m.c são importantes porque proteínas interagem muito diferentemente com surfactantes monoméricos ou em forma de micelas, então o intervalo de concentração para essas interações diferentes está associado diretamente com (mas não sempre inteiramente ditada por) a c.m.c.

As micelas são geralmente globulares com número de monômeros de surfactantes diferentes formando tamanhos que podem variar entre 0,1 e 0,001 micrômetros de diâmetro em soluções coloidais. As micelas se organizam com as caldas hidrofóbicas voltadas ao centro da esfera sendo a superfície dessa esfera formada pelas cabeças dos surfactantes que interagem diretamente com o solvente polar. Caso o solvente possua característica apolar o agregado é formado como micelas invertidas, onde as cabeças são agora voltadas ao centro da esfera e as caldas dos surfactantes interagindo com o solvente (Fig. 7).

Figura 7. A) Micela formada em uma solução aquosa. B) Micela invertida formada em um solvente orgânico não polar.



As micelas podem comportar substâncias apolares no interior da esfera hidrofóbica bem como as micelas invertidas podem comportar substâncias polares no interior da esfera hidrofílica, esse fenômeno permite uma série de aplicações desses agregados em diferentes sistemas.

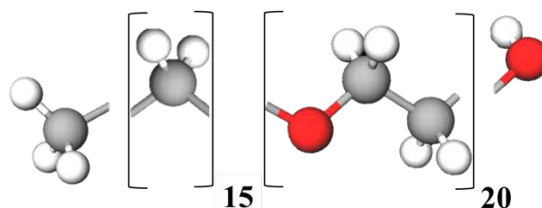
2.4.1 Aspectos gerais de Brij58

Entre as moléculas detergentes amplamente utilizadas, os detergentes não iônicos da série Brij (éteres de ácido gordo poli(óxido de etileno)), são particularmente populares. A família Brij é caracterizada por uma cabeça hidrofílica feita de poli(óxido de etileno) (PEO) e uma cauda hidrofóbica feita de uma cadeia alquílica.

Os detergentes da série Brij, particularmente, têm sido empregados em sistemas de liberação controlada de fármacos (KAPOOR; CHAUHAN, 2008), como facilitadores da biodegradação por contaminantes de diesel (FRANZETTI et al., 2008), em nanopartículas dependentes de pH (FILIPPOV et al., 2008), dentre outras.

O surfactante Brij58 apresenta uma estrutura muito simples onde a parte hidrofóbica é composta por um grupo CH_3 seguido de 15 grupos alquil originando a estrutura $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{15}$ com uma sequência de 16 unidades de carbono enquanto a parte hidrofílica é composta por 20 grupos etoxi-etano seguido de um grupo $-\text{OH}$ originando a estrutura $(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_{20}-\text{OH}$, ainda ambas as partes são formadas apenas por uma cadeia de segmentos sem apresentar ramificações, substituições ou insaturações.

Figura 8. Estrutura química do Brij58.



Experimentos determinando a c.m.c. de surfactantes demonstraram que os surfactantes iônicos apresentaram valores elevados dessa propriedade, quando comparados com surfactantes não iônicos. Para o surfactante catiônico dodecil sulfato de sódio (SDS) em água, c.m.c foi encontrada no valor de 8 mmol kg^{-1} (CID et al., 2019) enquanto que para o surfactante não iônico Brij58 o valor de c.m.c foi $0,08 \text{ mmol kg}^{-1}$ (RAVAL; BAHADUR; RAVALL, 2018), cerca de 100x menor. Este fato se deve a existência de uma força eletrostática, surfactantes iônicos carregados positivamente ou negativamente apresentam repulsão entre surfactantes de mesma espécie vizinhos, fazendo com que apenas comecem a interagir formando agregados após vencida essa barreira energética eletrostática. A esta grande diferença de c.m.c., para analisar um sistema termodinâmico e suas propriedades se torna de suma importância caracterizar se em solução possuímos apenas monômeros de surfactante ou já presentes agregados.

2.5 Interação proteína-surfactante

A construção natural de uma proteína é um dos exemplos mais complexos, fundamentais e universais da química supramolecular. À medida que a estrutura de uma proteína é sintetizada, dobramentos e desdobramentos são cruciais para delimitar a sua atividade biológica (DOBSON, 2003). O dobramento e desdobramento de uma proteína depende da interação entre a cadeia de aminoácidos que a compõe. O desdobramento estrutural da proteína nativa é um processo abrupto que pode ocorrer segundo a variação das condições fisiológicas, temperatura, pH ou interações com outras moléculas (HAMILL; WANG; LEE, 2005; VALSTAR et al., 2001). Produtos farmacêuticos e de saúde usam frequentemente proteínas globulares devido a capacidade de se ligar a outras moléculas e formar agregados moleculares que se ligam a substâncias de forma específica. Os surfactantes se apresentam como capazes de

dobrar uma proteína, formando um complexo proteína-surfactante, em que as porções hidrofóbicas do surfactante causam desdobramento ao interagir com os aminoácidos não polares, assim, evitando interações desfavoráveis com solvente polar. A interação da proteína-surfactante desempenha um papel importante em muitos processos biológicos, por exemplo, as interações da proteína com surfactantes de membrana celular. As interações proteína-surfactante também são comparáveis em certa medida com interações de proteínas-lipídios em membranas celulares. A maioria das pesquisas sobre a interação proteínas-surfactantes concentrou-se na ligação de surfactantes a enzimas e o efeito da ligação sobre a atividade enzimática (OTZEN, 2011).

O mecanismo de interações proteína-surfactante depende da natureza e concentração do surfactante no volume de solução. A classificação dos surfactantes quanto ao grupo polar os classificam em substâncias carregadas (quando, aniônico ou catiônico) e neutras (quando, não iônico ou anfótero em condições específicas de pH). Esta classificação está ligada diretamente com a forma de interação com proteínas, podendo ser interações cooperativas que podem estabilizar ou promover a desnaturação da estrutura nativa da proteína. Com poucas exceções (OTZEN; SEHGAL; WESTH, 2009), surfactantes neutros são classificados como não desnaturantes. Já surfactantes iônicos promovem a desnaturação de proteínas em concentrações baixas, muitas vezes abaixo da c.m.c., que normalmente é de unidades em mM. Este fenômeno tem sido frequentemente explorado para extrair e solubilizar proteínas fracamente solúveis, tais como proteínas de membrana. A força de interação variam de acordo com as sequências de aminoácidos, e forças hidrofóbicas que provavelmente estão envolvidas na interação (KAUSHAL; RANA; CHAUHAN, 2013).

O conhecimento estrutural dos complexos proteína-surfactante é interessante do ponto de vista de aplicações, por exemplo, para administração de medicamentos, cosméticos, produtos alimentícios e farmacêuticos (DE; GIRIGOSWAMI; DAS, 2005). Surfactantes e proteínas compartilham a propriedade de grupos hidrofílicos e porções hidrofóbicas, implicando que as propriedades da solução do complexo podem ser muito diferentes daquelas das soluções individuais. As forças envolvidas na ligação de surfactantes às proteínas ainda não foram completamente caracterizadas. Os resultados indicam que a porção hidrofóbica de surfactantes pode se ligar aos aminoácidos apolares, enquanto a cadeia hidrofílica de etileno-óxido pode interagir com a ligação peptídica e com um ou mais resíduos de aminoácidos polares, provavelmente por forças eletrostáticas e ligações de hidrogênio (MALIK, 2015).

2.5.1 Aspectos teóricos para o estudo da interação proteína-surfactante

Soluções formadas pela mistura de proteínas e surfactantes podem conter não somente diferentes tipos de complexos de proteína-surfactante, mas também moléculas de proteína e surfactante livres bem como agregados de proteínas e de surfactantes na forma de micelas em solução (GODDARD; ANANTHAPADMANABHAN, 2018). Portanto é necessária uma análise prévia sobre as condições do estado que se encontram as proteínas e surfactantes em solução.

A seleção de abordagens adequadas e suas combinações sobre a análise de alterações estruturais de proteínas se torna essencial para explorar os mecanismos de vinculação com surfactantes.

Considerando a diversidade e a complexidade das interações entre proteínas e surfactantes, deve-se considerar cuidadosamente variações nas composições do sistema estudado, como: pH, temperatura e concentração dos componentes para elucidar o comportamento de formação do complexo.

2.5.2 Ressonância Plasmônica de Superfície – RPS

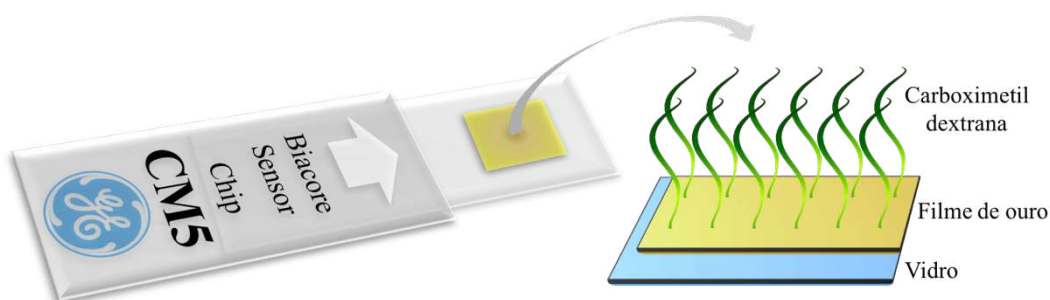
A ressonância plasmônica de superfície (RPS) é uma técnica utilizada para estudo de interações moleculares, com destaque para interações entre biomoléculas e diferentes tipos de ligantes, sendo aplicável a interações entre proteínas e surfactantes (COELHO et al., 2019). A RPS não possui marcadores e é capaz de medir afinidades e cinéticas de interação de forma quantitativa em tempo real com resultados altamente precisos. A análise dos dados gerados nos permite a caracterização completa da interação proteína-surfactante com a obtenção das constantes cinéticas de associação e dissociação, k_a e k_d , bem como da constante termodinâmica, K_b . A partir da dependência das constantes cinéticas com a temperatura podemos determinar a energia de ativação (E_{act}), variação da energia livre de Gibbs (ΔG^\ddagger), variação de entalpia (ΔH^\ddagger) e variação de entropia (ΔS^\ddagger) de ativação, associados a possível formação de um complexo intermediário entre os parceiros de ligação. Assim como para as constantes cinéticas a dependência da constante termodinâmica, K_b , com a temperatura permite a determinação variação de energia livre de Gibbs padrão (ΔG°_{int}), variação de entalpia padrão

($\Delta H^{\circ}_{\text{int}}$) e variação de entropia padrão ($\Delta S^{\circ}_{\text{int}}$) da formação do complexo estável termodinamicamente (HUDSON et al., 2019; REZENDE et al., 2019).

A RPS mede pequenas mudanças no índice de refração de um meio nas proximidades de um metal através de um método óptico, o qual pode ser utilizado para monitorar interações entre moléculas de analito e moléculas receptoras imobilizadas na superfície do metal. Enquanto a biomolécula sendo a molécula receptora é imobilizada no sensor chip seu parceiro de ligação em solução a partir de um sistema em fluxo flui sobre a superfície metálica do chip para que a interação possa ocorrer (FLORINSKAYA et al., 2018).

Os chips são formados por lâminas de vidro de 1 cm² revestidas com um filamento de ouro em um dos lados do chip. A molécula receptora geralmente é imobilizada de forma indireta na superfície de ouro do chip podendo também ser imobilizada de forma direta. O chip CM5 é uma escolha recomendada pelo fornecedor para a maioria dos experimentos envolvendo proteínas, aplicável a sistemas de interação proteína-surfactante.

Figura 9. Ilustração do sensor chip CM5 e o design de interface do filme de ouro.



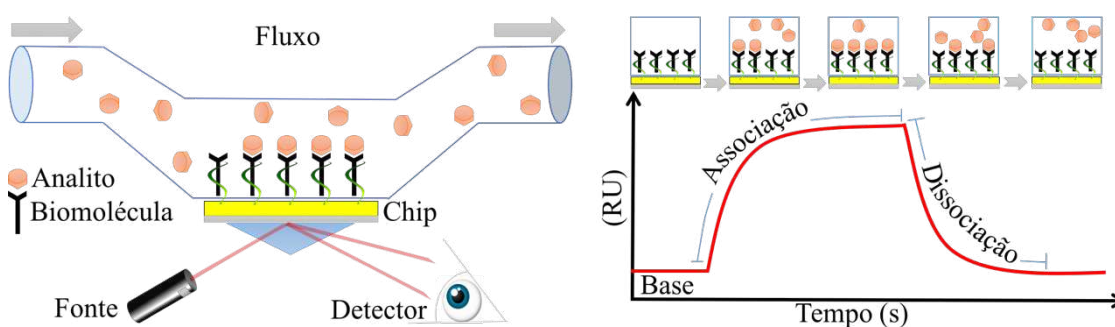
O processo de imobilização da proteína na superfície do chip é realizado de acordo com um protocolo de acoplamento de amino. Primeiro, o chip CM5 é ativado injetando uma mistura de N-hidroxissuccinimida (EDC) e 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (NHS), onde os filmes de carboximetil dextrana ficam aptos a se ligar com as proteínas. Após uma solução de proteína em tampão de imobilização é injetado no sistema fluindo sobre a superfície do chip resultando em uma densidade de proteínas imobilizadas através de ligação covalente entre os seus grupos amina e os grupos carboxil do sensor chip CM5. Por fim, os grupos carboxila ativados que não se ligaram a proteínas são bloqueados pela adição em fluxo de uma solução de cloridrato de etanolamina (GEDIG, 2008; REZENDE et al., 2020).

O equipamento é composto por uma fonte de laser que direciona uma luz polarizada através de um prisma para a superfície inferior do filme de ouro em um ângulo de reflexão total. Parte dessa energia forma um filme eletromagnético ou onda evanescente na superfície superior

do ouro no qual o ângulo de reflexão se torna dependente do meio localizado até 300 nm de altura, no qual o ângulo de reflexão varia quando moléculas se ligam a superfície, por exemplo, quando moléculas do analito em solução se ligam a biomoléculas imobilizadas. Quando ocorrer a interação entre o analito e a biomolécula o índice de refração na superfície do filme de ouro será alterado e o equipamento registra essa variação pelo aumento na intensidade do sinal. O sinal registrado é denominado de unidades de ressonância ou resposta (RU) que indica quanto a modificação da superfície do filme de ouro altera o ângulo de refração, onde 1 RU é igual a uma variação de 10^{-4} graus no ângulo (PRABOWO; PURWIDYANTRI; LIU, 2018).

Inicialmente o sistema em fluxo injeta apenas o solvente da solução que flui sobre o chip contendo a biomolécula no qual o valor de RU correspondente ao ângulo inicial é fixado como padrão. Posteriormente o sistema em fluxo injeta a solução contendo o analito, a interação começa a ocorrer e uma região temporal chamada de fase de associação é caracterizada onde o analito começa a ocupar os sítios de ligação da biomolécula e a forma da curva de resposta gerada é usada para determinar a taxa de associação (k_a). Caso a injeção da solução não seja cessada em um dado momento um número total de sítios de ligação da biomolécula estará ocupado atingindo um estado estacionário onde o valor máximo de sinal é registrado. Por fim, novamente o sistema em fluxo injeta apenas o solvente da solução que ao fluir sobre o sistema começa a romper as interações entre o analito e a biomolécula e a forma da curva de resposta em função do tempo gerada é usada para determinar a taxa de dissociação (k_d). Quando o sinal retorna a seu valor inicial podemos concluir que a superfície foi totalmente regenerada onde estão presentes apenas as biomoléculas imobilizadas ausentes de analito. A resposta e tempo real do experimento RPS é apresentada na forma de um sensograma.

Figura 10. Diagrama esquemático da ressonância plasmônica de superfície (RPS).



O sinal em RU está diretamente relacionado a alteração na concentração de massa na superfície de ouro do chip, logo o peso da molécula do analito em relação ao número de sítios

de ligação da proteína deve ser cuidadosamente analisado. O limite de detecção do RPS depende de vários fatores, incluindo concentração da proteína imobilizada, peso molecular do analito, força da interação e propriedade óptica do equipamento (PILIARIK; HOMOLA, 2006).

Os biossensores ópticos de RPS têm capacidade de medir a formação complexa em tempo real. A maioria das interações de ligação que encontramos rotineiramente são simples interações bimoleculares no qual duas moléculas devem se unir no espaço para formar um complexo. As taxas de formação de complexos (k_a) e desagregação (k_d) são governadas pelas taxas de associação e dissociação intrínsecas, respectivamente. A possibilidade de determinação de propriedades cinéticas pela técnica RPS pode fornecer informações sobre alterações nas interações proteína-surfactante, ou seja, a taxa em que as possíveis alterações estruturais ocorrem quando se associam e se dissociam. Além disso, as constantes cinéticas também fornecem dados valiosos sobre a dinâmica do sistema biológico investigado, o que poderia ser aplicado para selecionar e projetar racionalmente novas moléculas de interesse terapêutico (DE MOL; FISCHER, 2010a).

2.5.3 Calorimetria de Titulação Isotérmica – ITC

A calorimetria de titulação isotérmica (ITC) é uma técnica com abordagem termodinâmica capaz de caracterizar quantitativamente interações biomoleculares, baseada que quando duas substâncias interagem ocorre acompanhada por mudanças de calor. Esta técnica permite obter diretamente a energia na forma de calor liberada ou absorvida durante a interação de dois reagentes quanto titulado um reagente contra o outro em condições isotérmicas. Como resultado de um experimento completo pode-se obter a informação de propriedades termodinâmicas da interação, incluindo estequiometria, variação de entalpia, constante de ligação, variação da energia livre de Gibbs e variação de entropia que são totalmente aplicáveis à mensuração de interações proteína-surfactante (KELLEY; MCCLEMENTS, 2003; NIELSEN; ARLETH; WESTH, 2005).

O ITC se apresenta como a única técnica capaz de determinar o valor com grande precisão da variação de entalpia de um processo de interação intermolecular (HOLDGATE, 2001). Pois em um processo a pressão constante, o valor da variação de energia em forma de calor (q) é igual ao valor numérico da variação de entalpia do processo de interação (ΔH_{int}). A seguir será apresentado uma dedução físico-química que descreve este processo, a partir da primeira lei da termodinâmica:

$$dU = dq + dw \quad (\text{Equação 1})$$

dU é a variação infinitesimal da energia interna do sistema, dq é a energia na forma de calor transferido ou absorvido pelo sistema e dw é o trabalho realizado sobre ou pelo sistema. Ao integrar a equação 6, temos:

$$\int_i^f dU = \int_i^f dq - \int_i^f P_{\text{ext}} dV \quad (\text{Equação 2})$$

Onde P_{ext} é a pressão externa no sistema e dV é a variação infinitesimal do volume do sistema. Em um sistema restrito à realização de trabalho de expansão ou compressão com pressão constante, a resolução da equação 7, torna-se:

$$U_f - U_i = q - P_{\text{ext}}(V_f - V_i) \quad (\text{Equação 3})$$

Reordenando em função de q :

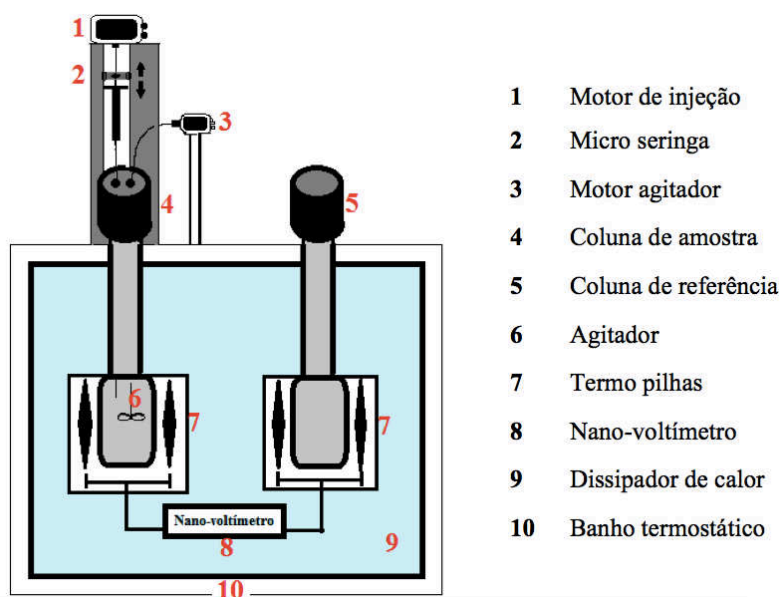
$$(U_f + P_{\text{ext}}V_f) - (U_i + P_{\text{ext}}V_i) = q \quad (\text{Equação 4})$$

O termo $U + P_{\text{ext}}V$ é definido como entalpia (H).

$$H_f - H_i = \Delta H = q \quad (\text{Equação 5})$$

Essa definição expressa a possibilidade de calcular a variação de entalpia determinando-se a quantidade de energia na forma de calor absorvida ou liberada. Na figura 11 são representados os componentes de um ITC.

Figura 11. Descrição dos componentes de um calorímetro de titulação isotérmica.



O ITC está equipado com duas células que se encontram em mesma temperatura, onde a célula de referência é preenchida com o solvente do sistema que geralmente é água e a célula de amostra é preenchida com solução de proteína em caso de sistemas de interação de proteína-surfactante. A seringa é preenchida com uma solução de surfactante concentrada e injetada várias porções de pequenos volumes constantes sobre a célula de amostra. A célula de amostra é agitada constantemente para garantir a homogeneização do sistema. Quando ocorre interação, a temperatura da célula de amostra altera, essa energia absorvida ou liberada do sistema é detectada pelas termopilhas, gerando uma diferença de potencial elétrico que é convertido em potência pelo calorímetro. As mudanças de potência em função do tempo durante o processo são registradas. Um segundo experimento é realizado para descontar a variação de energia associada a diluição do surfactante no sistema, onde agora a célula de amostra também é preenchida pelo solvente e novamente a solução de surfactante é titulada (RÜHMANN et al., 2015). A partir do momento (relação de concentração entre a proteína e surfactante, razão molar) em que o valor da variação de calor da titulação de surfactante na solução de proteína torna-se igual ao valor de variação de calor da titulação de surfactante no solvente dizemos que ocorreu a saturação dos sítios de ligação da proteína pelo surfactante.

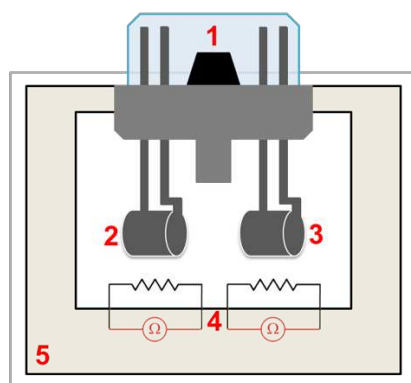
Durante o decorrer do experimento a razão molar entre a proteína e o surfactante aumenta gradativamente com a sequência de titulações da solução concentrada de surfactante,

logo os picos de potência em função do tempo são tratados para formar uma isoterma de interação de variação de entalpia em função da razão molar (OTZEN, 2011).

2.5.4 Calorimetria Diferencial de Varredura – DSC

A calorimetria diferencial de varredura (DSC) é uma técnica que permite obter a capacidade calorífica (C_p) de uma solução em função da temperatura além de ser altamente sensível para caracterizar as propriedades termotrópicas de biomoléculas. Em estudos com proteínas, o DSC é usado para avaliar estabilidades térmicas, temperatura de desnaturação, entalpia de desnaturação e entalpia de desnaturação reversível (quando aplicável). DSC tem sido amplamente usado como uma técnica complementar que visa por meio de comparação de respostas com outras técnicas a elucidação de fenômenos de interação intermolecular se tornando uma ferramenta fundamental em sistemas proteína-surfactante (MISRA; DASH; MAHARANA, 2015). A seguir são representados os componentes de um DSC.

Figura 12. Descrição dos componentes de um calorímetro diferencial de varredura.



- 1 Regulador de pressão
- 2 Célula de amostra
- 3 Célula de referência
- 4 Dispositivos termoeletrônicos
- 5 Jaqueta adiabática

O DSC é equipado com uma célula de amostra e uma célula de referência que se encontram em seu interior revestido por uma jaqueta adiabática. Um dispositivo termoeletrônico controla a variação de temperatura sobre as células de forma independente. Outro dispositivo regula a pressão interna do equipamento que durante a realização dos experimentos fica em torno de 2 ou 3 vezes superior à pressão externa de 1 atm. Para a realização do experimento a célula de amostra é preenchida com a solução contendo a biomolécula de interesse enquanto a

célula de referência é preenchida somente com o solvente usado. Em uma análise de interação proteína-surfactante ambas as células são preenchidas com soluções que contêm a mesma concentração de surfactante descontando qualquer efeito do mesmo. Quando iniciado o experimento as células são aquecidas ou resfriadas para a mesma temperatura de interesse de forma sincronizada e essa variação de temperatura segue em função de uma taxa predeterminada. A diferença no fluxo de calor (absorvido ou liberado) entre a amostra e a referência indica a diferença de capacidade calorífica entre as soluções. Essa diferença de energia esta associada ao rompimento ou formação de interações intermoleculares realizadas na célula de amostra e não na de referência (HAMBORG et al., 2020).

O equipamento registra a taxa de transferência de calor com o tempo a pressão constante $\left(\frac{dq_\rho}{dt}\right)$ e sabendo a taxa de variação da temperatura das células com o tempo $\left(\frac{dT}{dt}\right)$ usada, torna-se possível determinar a diferença de capacidade calorífica entre a célula de amostra e referência, de acordo com a equação a seguir:

$$\left(\frac{\left(\frac{dq_\rho}{dt}\right)_{amos.} - \left(\frac{dq_\rho}{dt}\right)_{ref.}}{\frac{dT}{dt}}\right) = C_{\rho_{amos.}} - C_{\rho_{ref.}} = \Delta C_\rho \quad (\text{Equação 6})$$

Os dados gerados são apresentados em um termograma de variação de capacidade calorífica, ΔC_ρ , em função da temperatura. O valor de C_ρ indica a taxa de variação da entalpia com a temperatura a pressão constante, onde em um processo de aquecimento ou resfriamento entre as temperaturas T_1 e T_2 a variação da entalpia desse processo pode ser obtida pela integral definida de ΔC_ρ em função de T :

$$\Delta H = \int_{T_1}^{T_2} C_\rho dT \quad (\text{Equação 7})$$

O termograma ΔC_ρ em função de T fornece informações termodinâmicas qualitativas e quantitativas sobre interações proteína-surfactante e o estado conformacional da proteína. Em um processo de aquecimento as proteínas passam por um processo de desnaturação térmica e os parâmetros termodinâmicos associados a este processo podem ser obtidos a partir dos termogramas gerados pelo DSC. Quando análises de DSC são conduzidas em concentrações

diferentes de surfactante e uma concentração de proteína fixa, o efeito da ligação de surfactante sobre a estabilidade térmica das proteínas pode ser investigado. Outra vantagem do DSC é que pode ser usado para correlacionar a termodinâmica da interação proteína-surfactante com a indução de mudanças conformacionais térmicas da proteína, permitindo um procedimento de rápida verificação se a interação fornece um complexo mais ou menos estável (MICHNIK, 2003).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

O objetivo desta tese foi contribuir para a compreensão de processos de interação entre surfactantes não iônicos e proteínas globulares a fim de descrever completamente o processo de formação de complexos supramoleculares a partir destes compostos. Neste sentido, duas abordagens complementares foram realizadas, cujos objetivos gerais foram:

- Descrever a termodinâmica e cinética de interação entre a proteína globular Lactoferrina bovina e o surfactante não iônico Brij58 sob diferentes condições de temperatura;
- Estudar o efeito da força iônica do pH e da concentração do ligante sobre a interação entre a proteína globular Lactoferrina bovina e o surfactante não iônico Brij58.

3.1.1 Objetivos específicos: Análises cinéticas dos parâmetros de ligação entre proteína multifuncional globular e surfactante não iônico

Por meio da técnica de Ressonância Plasmônica de Superfície, foram estudados:

- O processo de interação entre Lactoferrina bovina e Brij58 sob diferentes condições de temperatura;
- Os parâmetros cinéticos e termodinâmicos obtidos da formação do complexo termodinamicamente estável [bLF-Brij58]^o e o do complexo de transição [bLF-Brij58][‡];
- O processo de associação e de dissociação da formação do complexo de transição [bLF-Brij58][‡];
- Os parâmetros termodinâmicos obtidos a fim de propor a força motriz para a formação do complexo termodinamicamente estável [bLF-Brij58]^o.

3.1.2 Objetivos específicos: Estudo da interação entre Brij58 e lactoferrina: Propriedades termodinâmicas, NaSCN e efeitos de pH

Por meio da técnica de Calorimetria de Titulação Isotérmica, foram estudados:

- Os parâmetros termodinâmicos obtidos da interação entre Lactoferrina bovina e Brij58, para duas condições de pH e em diferentes concentrações de NaSCN;
- Os estados de interação entre Lactoferrina bovina e Brij58 representados pelas isotermas de interação, objetivando relacionar a forma independente de Brij58 interagir com os dois sítios de ligação da Lactoferrina;
- Os parâmetros termodinâmicos associados as interações independentes entre Brij58 e os lóbulos complexados com ferro ou lóbulos vazios da Lactoferrina bovina, descrevendo as interações que mais contribuem para a formação dos complexos [hLF-Brij58]^o e [aLF-Brij58]^o.

Através da técnica de Nanocalorimetria Diferencial de Varredura, foi estudado:

- O efeito da concentração de NaSCN sobre a estabilidade térmica, conformação geral e integridade de dobramento dos domínios de interação para a formação dos complexos [hLF-Brij58]^o e [aLF-Brij58]^o.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

A lactoferrina bovina (20% de ferro saturado) foi obtida da DMV International Food (EUA). O éter cetílico de polioxietileno (20), Brij58 ($C_{16}H_{33}-(OCH_2CH_2)_{20}-OH$) é considerado essencialmente puro em relação às suas propriedades de superfície, tiocianato de sódio (98%) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St Louis, EUA). Chips de sensor CM5 de nível de pesquisa e reagentes de acoplamento (N-etil-N',N'-dimetilaminopropilcarbodiimida, EDC; N-hidroxissuccinimida, NHS; e cloridrato de etanolamina 1 M, pH 8,5) foram adquiridos da GE Healthcare (Pittsburgh, PA, EUA). Os tampões de fosfato monopotássico 0,1 M e hidróxido de sódio (pH 7,4 e pH 12) foram preparados no laboratório. As soluções de bLF e Brij58 foram preparadas nestes tampões. Água deionizada de um sistema Milli-QII (Millipore, EUA) foi usada para preparar todas as soluções.

4.2 Determinação da c.m.c de Brij58

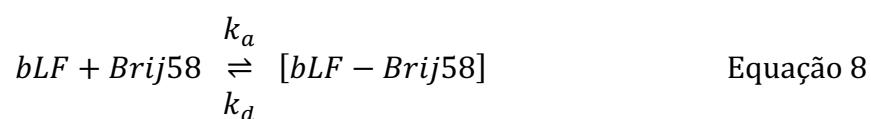
Pelo efeito da solubilização do corante hidrofóbico vermelho carmim por micelas do surfactante Brij58 foi possível identificar o valor do c.m.c. Para fazer isso, uma série de soluções de corantes saturados foram preparadas variando a concentração de surfactante. Para tanto, um excesso de solubilizado cristalino foi adicionado em soluções das diferentes concentrações do surfactante estudado ($[Brij58] = 10, 20, 30, 40, 50, 60, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130$ e $140 \mu M$) em uma solução tampão pH 7,4. Todas as soluções aquosas foram preparadas em água deionizada (Millipore, modelo Milli-Q®). As soluções resultantes foram agitadas em um misturador de vórtice (CertomatMV, B.Braun Biotech International) até que o sistema se tornasse visualmente homogêneo, e foram colocadas em um banho de temperatura controlada (MQBTC 99-20, Microchemical, incerteza de $\pm 0,1 K$) a 298,15 K por pelo menos 48 h para atingir o equilíbrio. Alíquotas do sobrenadante solúvel foram então transferidas para cubetas de quartzo e a absorbância da amostra foi determinada no comprimento de onda máximo de absorção do corante (525 nm) usando o método espectrofotométrico em um espectrofotômetro UV/Vis (Modelo UV-2550, Shimadzu, Japão). A absorbância máxima foi plotada em função da concentração do surfactante. A curva gerada foi ajustada para uma função sigmoidal e no ponto de inflexão, o valor c.m.c foi dado.

4.3 Ressonância plasmônica de superfície

As medições de RPS foram realizadas em um instrumento Biacore X100 (GE Healthcare, Pittsburgh, PA, EUA) equipado com um sistema automático de injeção em fluxo. Primeiramente, bLF foi imobilizado em um chip sensor CM5 por acoplamento de amina de acordo com as instruções do fabricante. Para tanto, a ativação dos grupos carboximetildextrano na superfície do chip CM5 foi realizada por injeção de um pulso de 7 min com uma mistura 1:1 de 1-3-(N,N-dimetilamino) propil-N-etilcarbodiimida (EDC) e N-hidroxissuccinimida (NHS) a 298,15K. Posteriormente, uma solução de bLF ($15 \mu\text{g mL}^{-1}$) em acetato de sódio 10 mM, pH 4,0 foi injetada. Um pulso de cloridrato de etanolamina por 7 min foi então usado para bloquear o excesso de grupos carboxila ativados da superfície que não reagiu com a proteína. A imobilização bLF foi realizada em níveis baixos (3945 RU), a fim de reduzir qualquer efeito de transporte de massa potencial. Para todos experimentos uma segunda célula de fluxo é usada como superfície de referência; esta superfície foi preparada como descrito acima, mas sem imobilização de bLF.

Os experimentos de interação bLF-Brij58 foram realizados em pH 7,4 em temperaturas variando de 289,15 a 301,15 K. Soluções de Brij58 em concentrações de trabalho (9-16 μM) foram preparadas em tampão pH 7,4. No decorrer de cada experimento de ligação, a solução na concentração de Brij58 necessária foi injetada de modo a aumentar a concentração de surfactante em ambas as superfícies da amostra (bLF imobilizado e referência, sem bLF). A duração da injeção foi de 9 min (incluindo o tempo de associação de 65 s) a uma taxa de fluxo de 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ para corrigir ruído sistêmico e desvio do instrumento. Na etapa de regeneração, Brij58 foi completamente removido da superfície do chip do sensor por um fluxo contínuo de tampão sem o uso de soluções de regeneração. Entre cada ciclo de ligação bLF-Brij58, o tampão foi injetado para restaurar a linha de base.

A interação entre bLF e Brij58 é de natureza bimolecular no qual duas moléculas devem se unir no espaço para formar um complexo, como descrito pela equação 8.



Os dados de sensogramas gerados a partir da interação entre bLF e Brij58 são ajustados a equações de primeira ordem para obtenção dos parâmetros K_{obs} e k_d , apresentadas a seguir:

$$RU(t) = RU_{max} [1 - e^{-K_{obs}(t-t_0)}] \quad \text{Equação 9}$$

$$RU(t) = RU(t_f) e^{-k_d(t-t_f)} \quad \text{Equação 10}$$

onde $RU(t)$ é a resposta de ressonância no tempo t , RU_{max} é a resposta obtida quando a solução Brij58 flui sobre a superfície do chip e atinge o equilíbrio metaestável, e $RU(t_f)$ é a amplitude da resposta no ponto pelo qual o fluxo tampão-surfactante cessa e se inicia o processo de dissociação.

Durante o processo de associação eventos moleculares de rompimento de interações também ocorrem, em uma escala pequena, mas considerável. Quando a variação da resposta ocorre através de uma dependência linear com a concentração do ligante podemos determinar apenas a resposta referente a taxa de associação das moléculas, k_a , como mostrado a seguir:

$$K_{obs} = k_a [Brij58] + k_d \quad \text{Equação 11}$$

onde $[Brij58]$ é a concentração do ligante.

Através dos valores das constantes k_a e k_d torna-se possível a determinação de propriedades cinéticas de formação do complexo ativado entre bLF e Brij58 a partir do processo de associação e do processo de dissociação.

A variação da energia livre de Gibbs de ativação para os processos de associação (ΔG_{ass}^\ddagger) e dissociação (ΔG_{diss}^\ddagger) pode ser obtida usando a equação de Eyring's (Equação 12).

$$\Delta G_x^\ddagger = -RT \ln \left(\frac{k_x h}{k_B T} \right) \quad \text{Equação 12}$$

onde h e k_B são as constantes de Planck e Boltzmann, respectivamente, e k_x representa k_a ou k_d .

As variações de entalpia de ativação para os processos de associação (ΔH_{ass}^\ddagger) e dissociação (ΔH_{diss}^\ddagger) foram obtidas usando as equações 13 e 14.

$$E_{act-x} = -R \left(\frac{d(\ln k_x)}{d\left(\frac{1}{T}\right)} \right) \quad \text{Equação 13}$$

$$\Delta H_x^\ddagger = E_{act-x} - RT \quad \text{Equação 14}$$

Finalmente, a partir dos valores ΔG_x^\ddagger e ΔH_x^\ddagger , os valores de $T\Delta S_x^\ddagger$ foram obtidos usando a equação termodinâmica clássica (Equação 15).

$$\Delta G_x^\ddagger = \Delta H_x^\ddagger - T\Delta S_x^\ddagger \quad \text{Equação 15}$$

Através dos valores das constantes k_a e k_d torna-se possível também a determinação de propriedades termodinâmicas de formação do complexo termodinamicamente estável entre bLF e Brij58 a partir do processo de associação e do processo de dissociação.

A constante de ligação K_b que indica a constante de equilíbrio de formação do complexo termodinamicamente estável $[LF - Brij58]^\circ$ pode ser calculada pela relação:

$$K_b = \frac{k_a}{k_d} \quad \text{Equação 16}$$

Através da constante de ligação K_b e aplicando as equações 17, 18 e 19, ΔG° , ΔH° e $T\Delta S^\circ$ foram determinados.

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_b \quad \text{Equação 17}$$

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

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad \text{Equação 19}$$

onde ΔG° é a variação da energia livre de Gibbs padrão, ΔH° é a variação de entalpia padrão, $T\Delta S^\circ$ é a variação de entropia padrão, T é a temperatura e R é a constante universal dos gases (8,3145 J mol⁻¹ K⁻¹).

4.4 Calorimetria de titulação isotérmica

As análises de titulação foram realizadas a 298,15 K em um calorímetro de titulação isotérmica (ITC), modelo CSC 4200 (TA Instruments, New Castle, DE, EUA), controlado pelo software ITCRun. A solução de Brij58 (titulante) na concentração $1,75 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada em cada uma das soluções tampão (pH 7,4 e pH 12). A solução de bLF (titulada) na concentração $2,50 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ também foi preparada nas respectivas soluções tampão. Depois que todas as soluções foram desgaseificadas, a célula de amostra foi carregada com 1,8 ml de solução de bLF, a célula de referência foi carregada com 1,8 ml do solvente da solução e a solução de Brij58 foi carregada na seringa de injeção. As amostras foram agitadas constantemente a 180 rpm. Depois que o equilíbrio térmico foi alcançado, alíquotas de $10 \mu\text{L}$ da solução de Brij58 foram tituladas 48 vezes com uma seringa de microlitro Hamilton em intervalos de 1000 s. Os dados foram preparados para análise subtraindo o calor de diluição (medido durante a titulação da solução Brij58 em um solvente) do calor liberado ou absorvido durante a titulação da solução Brij58 na solução bLF (a titulação do solvente no bLF solução produziu efeitos térmicos desprezíveis).

Os dados experimentais obtidos foram ajustados com a ligação do analito a macromolécula com modelo de locais idênticos e independentes (ISN) (C. et al., 2013) usando a equação 20:

$$Q = \frac{V_c \Delta H^\circ}{2K_b} \left[1 + K_b [\text{Brij58}]_T + nK_b [\text{bLF}]_T - \sqrt{(1 + K_b [\text{Brij58}]_T + nK_b [\text{bLF}]_T)^2 - 4nK_b^2 [\text{bLF}]_T [\text{Brij58}]_T} \right]$$

Equação 20

onde Q é o conteúdo total de calor; V_c representa o volume efetivo dentro da célula calorimétrica da amostra; $[\text{bLF}]_T$ e $[\text{Brij58}]_T$ são as concentrações totais das espécies bLF e Brij58 no sistema, respectivamente; e n é a razão estequiométrica. Ajustando os dados ITC à equação 20, valores de K_b e ΔH° foram obtidos para a formação da interação bLF-Brij58. A magnitude de K_b foi usada para calcular os valores de ΔG° para a formação do complexo de acordo com a equação 17:

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_b$$

Equação 17

onde R é a constante universal do gases e T é a temperatura absoluta do sistema. A partir das magnitudes de ΔG° e ΔH° , os valores de $T\Delta S^\circ$ foram calculados usando a relação fundamental de Gibbs:

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad \text{Equação 19}$$

4.5 Calorimetria diferencial de varredura

A influência da temperatura, bem como a quantidade de NaSCN na desnaturação térmica de bLF foi avaliada usando um calorímetro NanoDSC 6300-A (TA Instruments, New Castle, EUA). Soluções concentradas de bLF preparadas em tampão fosfato (pH 12) foram misturadas para se obter soluções de $2,50 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de bLF em diferentes concentrações de surfactante e quantidade de NaSCN. Após 10 minutos de degaseificação, essas soluções foram carregadas na célula de amostra e a célula de referência foi carregada com os respectivos solventes. A temperatura da célula variou de 30 a 110 °C a uma taxa de $1 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$, e o fluxo de calor necessário para manter as duas células em equilíbrio térmico foi registrado. Uma varredura também foi realizada com o solvente em ambas as amostras e células de referência. Os termogramas foram preparados subtraindo as curvas com soluções pelas curvas com apenas solventes, posteriormente convertidas em valores de capacidade térmica molar. Todos os dados foram registrados pelo software do sistema TA Instruments e processados usando o software TA NanoAnalyze v.2.4.1. Através das áreas sob os picos dos termogramas gerados, as mudanças de entalpia de desnaturação foram determinadas para cada condição.

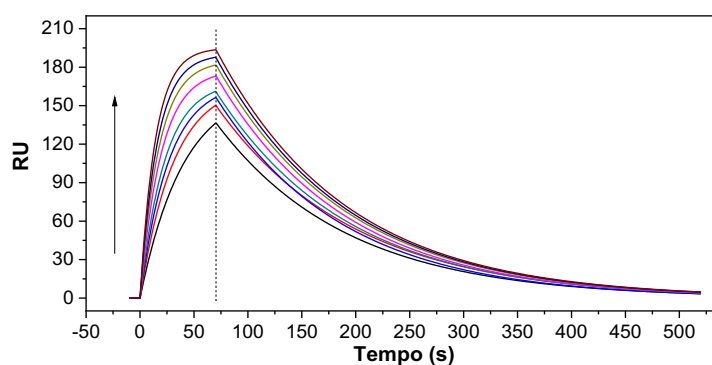
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análises cinéticas dos parâmetros de ligação entre proteína multifuncional globular e surfactante não iônico

5.1.1 Análises cinéticas da interação bLF-Brij58 por RPS

RPS é uma técnica amplamente utilizada implementada para o estudo e caracterização da dinâmica molecular (MD) de ligação entre proteínas e vários solutos (DRESCHER; SELVAKUMAR; DRESCHER, 2018). Para a determinação de MD das interações entre bLF e Brij58, é importante obter parâmetros de ligação cinética, como a constante de taxa da associação de moléculas bLF e Brij58 não complexadas (k_a), e a constante de taxa de dissociação do complexo termodinâmico estável, $[bLF-Brij58]^o$. Em nosso experimento de RPS, bLF foi ligado à superfície de um chip sensor CM5, enquanto Brij58 foi dissolvido no tampão em pH 7,4, que fluiu sobre a proteína bLF anexada na superfície do chip. A figura 13 representa um sensograma típico obtido a partir de interações bLF-Brij58, medidas em unidades de ressonância arbitrárias (RU) em função do tempo em pH 7,4 e 298,15 K.

Figura 13. Sensograma (RU vs. tempo) para interações bLF-Brij58, com ($[Brij58] = 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15$ e $16 \mu M$) fluindo sobre um chip sensor CM5 de baixa densidade de bLF imobilizado na superfície (3945 RU) a 298,15 K. A seta indica o aumento da concentração



Todas as soluções de Brij58 geraram valores de RU que foram discerníveis acima do ruído de fundo (linha de base, $t < 0$), demonstrando uma interação eficaz entre as moléculas bLF e Brij58. Uma taxa de fluxo de $30 \mu L \text{ min}^{-1}$ foi usada para a solução de Brij58, e bLF foi imobilizada com baixa densidade para evitar o efeito do transporte de massa nos parâmetros cinéticos calculados (DE MOL; FISCHER, 2010b). Os sensogramas exibiram respostas de

interação que eram dependentes da concentração de Brij58 injetada ao longo de um tempo de associação de 0 a 65 s, em que os valores de RU aumentaram com o tempo; subsequentemente, a resposta diminuiu na etapa de dissociação, que começou quando a injeção de Brij58 cessou ($t > 65$ s) e apenas o tampão estava fluindo. Eventualmente, os sinais de RPS retornaram à linha de base em um máximo de 400 s, indicando que a interação bLF-Brij58 foi um processo reversível. O mesmo procedimento experimental de RPS foi realizado em temperaturas de 289,15, 293,15, 297,15 e 301,15 K, resultando na mesma tendência descrita acima para 298,15 K. (Figura S1).

Os resultados de RPS para a interação bLF-Brij58 podem ser modelados como um processo de dois estados: $\text{bLF} + \text{Brij58} \rightleftharpoons [\text{bLF-Brij58}]^\circ$, onde o estado não ligado corresponde as moléculas do analito (Brij58) e ligante (bLF) não complexadas, enquanto o estado ligado corresponde ao complexo termodinamicamente estável $[\text{bLF-Brij58}]^\circ$, adsorvido na superfície do chip CM5. Para aplicar este modelo de dois estados, é importante garantir que as moléculas Brij58 não estejam no estado micelar, ou seja, $[\text{Brij58}] < \text{c.m.c.}$

Ao examinar o efeito da concentração de Brij58 (usando o tampão de pH 7,4 como solvente) na solubilidade do Vermelho Carmim (composto hidrofóbico) (Fig. S3), foi possível determinar o c.m.c para Brij58 (MIRGORODSKAYA et al., 2019). A agregação de Brij58 (c.m.c = $56,63 \pm 1,01 \mu\text{M}$) ocorre em uma concentração de surfactante mais alta do que a usada em nossos experimentos de RPS, confirmando que apenas os monômeros Brij58 interagiram com bLF.

A cinética do processo de ligação de bLF-Brij58 foi caracterizada usando as constantes de velocidade de associação (k_a) e dissociação (k_d), que indicam a escala de tempo para a ocorrência dos processos de associação e dissociação. Os parâmetros k_{obs} e k_d foram obtidos por ajuste global não linear dos dados dos sensogramas à equações 9 e 10.

Como K_{obs} aumentou linearmente ($r > 0,98$) com a concentração de Brij58 em todas as temperaturas (Fig. S4), k_a foi calculado usando a equação 11. A tabela 2 lista os valores de ambas as constantes cinéticas em cinco temperaturas diferentes, fornecendo informações sobre a taxa de associação de moléculas Brij58 não complexadas em moléculas bLF não complexadas, bem como a taxa de dissociação do complexo termodinamicamente estável ($[\text{bLF-Brij58}]^\circ$). Especificamente, a constante da taxa de associação (k_a) se refere ao número de complexos bLF-Brij58 formados por segundo, enquanto a constante da taxa de dissociação (k_d) expressa a fração de complexos que decaem por segundo.

Tabela 2. Constante da taxa de associação (k_a) para a ligação de moléculas bLF e Brij58 não complexadas e constante da taxa de dissociação (k_d) do complexo termodinamicamente estável [bLF-Brij58]^o em várias temperaturas.

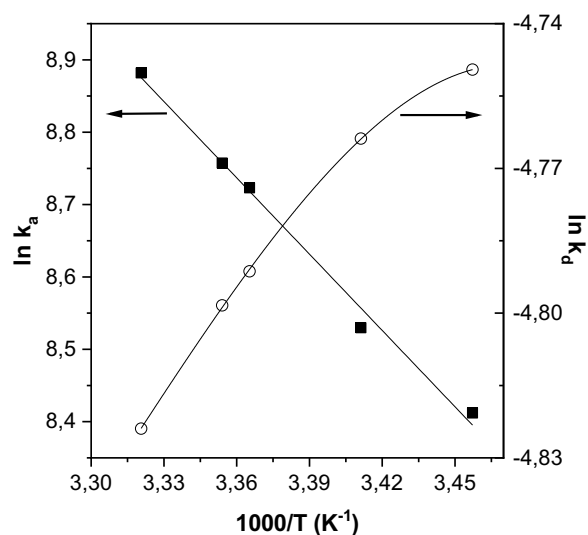
T	k_a	k_d
K	$10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	10^{-3} s^{-1}
289,15	4,50 ±0,17	8,66 ±0,41
293,15	5,06 ±0,15	8,53 ±0,09
297,15	6,14 ±0,31	8,30 ±0,13
298,15	6,36 ±0,22	8,24 ±0,20
301,15	7,20 ±0,28	8,04 ±0,22

A falta de estudos focados na cinética das interações proteína/surfactante não iônico prejudica uma comparação direta de nossos valores de k_a e k_d com os dados da literatura. No entanto, sistemas semelhantes na literatura podem ser usados para realizar uma análise comparativa com nossos resultados.

Fathi *et al.* (FATHI et al., 2018) usaram RPS para determinar a cinética de ligação para a interação entre proteína albumina sérica bovina (BSA) e aditivos alimentares, palmitato de ascorbila (AP) e estearato de ascorbila (AS). Brij58, AP e AS contêm caudas hidrofóbicas semelhantes, diferindo em comprimento a seguir: AP $-(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3 = \text{Brij58} -(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3 < \text{AS} -(\text{CH}_2)_{16}\text{CH}_3$. Os autores estabeleceram que quando a cauda hidrofóbica aumenta em dois átomos de carbono, as constantes cinéticas k_a e k_d diminuem em uma e duas ordens de magnitude, respectivamente, confirmando que o tamanho da cauda hidrofóbica influencia a cinética das interações do BSA com esses aditivos. O complexo bLF-Brij58 tem um valor k_d que é intermediário aos dos complexos BSA-AP ($k_d = 2,77 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$) e BSA-AS ($k_d = 9,92 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$), enquanto a associação de Brij58 e moléculas de bLF é uma ou duas ordens mais rápida do que a ligação entre AP ($k_a = 6,78 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) ou AS ($k_a = 5,25 \times 10^1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) com BSA em 298,15 K, respectivamente. Além disso, a dependência de k_a e k_d com a temperatura para o complexo bLF-Brij58 mostra um comportamento oposto ao do complexo BSA-AP, enquanto para BSA-AS, uma tendência aleatória foi relatada para k_a e k_d com a dependência da temperatura. Essas diferenças podem ser explicadas pelas diferentes proteínas em estudo e as diferentes frações hidrofílicas dos analitos. Para entender melhor a interação cinética de bLF-Brij58, é fundamental determinar os parâmetros energéticos associados à formação do complexo de transição (DE PAULA et al., 2020).

Há muito se reconhece que as interações proteína-analito podem ser descritas por cenários de energia complexos, e muitos exemplos de intermediários foram caracterizados ao longo dessas vias interativas (CHOI et al., 2019). Portanto, é importante determinar a via de ligação e considerar uma possível espécie de transição metaestável (complexo ativado), para descrever os parâmetros energéticos do mecanismo de ligação operacional nas interações proteína-analito (MCDONNELL, 2001). Para a interação bLF-Brij58, enquanto k_a aumenta com o aumento da temperatura, k_d diminui, demonstrando que em altas temperaturas, a formação do complexo [bLF-Brij58] $^\circ$ é acelerada enquanto sua taxa de decomposição diminui. A dependência dos valores de k_a e k_d com a temperatura nos permite determinar os parâmetros energéticos associados à formação do complexo ativado a partir de dois processos moleculares distintos: i) a associação de moléculas de Brij58 não complexadas em moléculas bLF não complexadas e ii) a quebra do complexo termodinamicamente estável [bLF-Brij58] $^\circ$ (processo de dissociação), permitindo uma compreensão mais profunda dos eventos de reconhecimento biomolecular. A figura 14 representa o gráfico de $\ln k_a$ ou $\ln k_d$ vs. $1/T$ (gráfico de Arrhenius) para a interação de bLF com Brij58 em pH 7,4.

Figura 14. Gráficos de Arrhenius de $\ln k_a$ versus $1/T$ (■) e $\ln k_d$ versus $1/T$ (○) associados com interações bLF-Brij58 em pH 7,4.



A variação da energia livre de Gibbs de ativação para os processos de associação ($\Delta G_{\text{ass}}^\ddagger$) e dissociação ($\Delta G_{\text{diss}}^\ddagger$) foi obtida através da equação 12 e estão listados na tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros de energia cinética de ativação para (a) a formação do complexo de transição via associação de moléculas Brij58 não complexadas em moléculas bLF não complexadas e (b) quebra do complexo termodinamicamente estável [bLF-Brij58]^o (processo de dissociação) em pH 7,4.

T	FASE DE ASSOCIAÇÃO (a)				FASE DE DISSOCIAÇÃO (b)			
	E _{act-ass}	ΔH [‡] _{ass}	ΔG [‡] _{ass}	TΔS [‡] _{ass}	E _{act-diss}	ΔH [‡] _{diss}	ΔG [‡] _{diss}	TΔS [‡] _{diss}
K	KJ mol ⁻¹				KJ mol ⁻¹			
289,15		26,82 ±1,05	50,54 ±2,01	-23,72 ±0,93	-1,02 ±0,05	-3,43 ±0,08	82,16 ±3,10	-85,59 ±3,08
293,15		26,79 ±1,11	50,96 ±1,77	-24,17 ±0,91	-3,91 ±0,15	-6,35 ±0,12	83,36 ±2,33	-89,71 ±2,55
297,15	29,22 ±1,67	26,75 ±0,99	51,21 ±0,96	-24,46 ±0,80	-5,68 ±0,25	-8,15 ±0,22	84,60 ±1,01	-92,75 ±3,28
298,15		26,74 ±0,60	51,31 ±1,05	-24,57 ±0,52	-5,96 ±0,22	-8,44 ±0,18	84,91 ±3,22	-93,35 ±2,71
301,15		26,72 ±0,46	51,54 ±0,88	-24,82 ±0,42	-6,42 ±0,31	-8,92 ±0,15	85,86 ±2,76	-94,78 ±3,08

Os valores de ΔG_x^\ddagger representam uma combinação das contribuições da barreira de energia potencial (E_{act-x} ou ΔH_x^\ddagger), bem como das barreiras de mudança de entropia conformacional e configuracional ($T\Delta S_x^\ddagger$) associadas à formação do complexo de transição, [bLF-Brij58][‡], da associação de moléculas Brij58 não complexadas em moléculas bLF não complexadas (ΔG_{ass}^\ddagger) ou a quebra do complexo termodinamicamente estável, [bLF-Brij58]^o (processo de dissociação) (ΔG_{diss}^\ddagger). Os valores de ΔG_{ass}^\ddagger e ΔG_{diss}^\ddagger foram independentes das mudanças de temperatura, e a barreira de energia livre de Gibbs para a formação do complexo de transição [bLF-Brij58][‡] do processo de dissociação foi maior do que a associação de moléculas Brij58 não complexadas em moléculas bLF não complexadas.

ΔG_x^\ddagger pode ser racionalizado como a energia do sistema considerando mudanças configuracionais associadas aos seguintes processos moleculares: i) ruptura de moléculas de água da camada de solvatação de bLF e Brij58, $\Delta G_{x-sol}^\ddagger$; ii) mudanças conformacionais nos sítios de interação de bLF, $\Delta G_{x-conf}^\ddagger$, e iii) formação de interações diretas entre moléculas bLF e Brij58 não solvatadas e conformacionalmente modificadas, $\Delta G_{x-int}^\ddagger$ (equação 21).

$$\Delta G_x^\ddagger = \Delta G_{x-des}^\ddagger + \Delta G_{x-conf}^\ddagger + \Delta G_{x-int}^\ddagger \quad \text{Equação 21}$$

Para ΔG_{ass}^\ddagger ser menor que ΔG_{diss}^\ddagger , pelo menos uma das seguintes condições deve ser considerada: $\Delta H_{ass}^\ddagger < \Delta H_{diss}^\ddagger$ e/ou $T\Delta S_{ass}^\ddagger < T\Delta S_{diss}^\ddagger$. Para analisar melhor se a diferença entre os valores ΔG_{ass}^\ddagger e ΔG_{diss}^\ddagger surge da diferença nas distribuições espaciais atômicas ou da

mudança no número de distribuições configuracionais distintas, os componentes ΔG_x^\ddagger , ΔH_x^\ddagger e $T\Delta S_x^\ddagger$ ainda precisam ser determinados.

Os dados da curva de Arrhenius para a fase de adsorção ajustaram uma relação linear $\left(\ln k_a = \frac{-E_{act-ass}}{R} \left(\frac{1}{T}\right) + \ln A\right)$, enquanto $\ln k_d \times 1/T$ ajustou uma curva polinomial de terceira ordem $\left(\ln K_a = \ln A + a \left(\frac{1}{T}\right) + b \left(\frac{1}{T}\right)^2 + c \left(\frac{1}{T}\right)^3\right)$, a partir do qual, aplicando a equação 13, foi possível calcular $E_{act-diss}$ $\left(E_{act-diss} = -R \left[a + 2b \left(\frac{1}{T}\right) + 3c \left(\frac{1}{T}\right)^2 \right]\right)$, na faixa de temperatura estudada. As mudanças de entalpia de ativação para os processos de associação (ΔH_{ass}^\ddagger) e dissociação (ΔH_{diss}^\ddagger) foram obtidas usando equação 14. Finalmente, a partir dos valores ΔG_x^\ddagger e ΔH_x^\ddagger , $T\Delta S_x^\ddagger$ pode ser calculado usando a equação termodinâmica clássica (equação 15).

Os valores de E_{act-x} , ΔH_x^\ddagger e $T\Delta S_x^\ddagger$ ($x = ass$ ou $diss$) estão listados na tabela 3. Conforme discutido anteriormente para ΔG_x^\ddagger , os valores de E_{act-x} , ΔH_x^\ddagger e $T\Delta S_x^\ddagger$ podem também ser racionalizados como as mudanças de energia e configuração que ocorrem devido a processos moleculares (dessolvatação, mudanças conformacionais e interações diretas de bLF-Brij58) associadas com moléculas bLF e Brij58 não complexadas e $[bLF-Brij58]^\circ$. Esses processos moleculares ocorrem para gerar o complexo de transição $[bLF-Brij58]^\ddagger$.

Especificamente, a magnitude de $E_{act-ass}$ ou ΔH_{ass}^\ddagger pode ser atribuída aos seguintes processos moleculares: a barreira de energia potencial para a formação do complexo ativado $[bLF-Brij58]^\ddagger$ a partir da interação de moléculas bLF e Brij58 não complexadas. Os valores de $E_{act-ass}$ foram positivos ($29,22 \pm 1,67 \text{ KJ mol}^{-1}$) e independentes das mudanças de temperatura, sugerindo que o complexo ativado $[bLF-Brij58]^\ddagger$ é formado em uma única etapa. A magnitude de $E_{act-ass}$ surge principalmente porque a energia necessária para romper a camada de solvatação de água de moléculas interagentes ($E_{act-ass-sol}$) e as mudanças nas conformações dos locais de interação de bLF e moléculas de Brij58 ($E_{act-ass-conf}$) superam a energia liberada pela formação de novas interações ($E_{act-ass-int}$) presentes em $[bLF-Brij58]^\ddagger$. Esta maior contribuição energética dos processos de dessolvatação e mudança conformacional para $E_{act-ass}$ está provavelmente associada à interação direta entre a cauda hidrofóbica Brij58 e o sítio hidrofóbico bLF. Como é bem conhecido, a dessolvatação de superfícies moleculares hidrofóbicas contribui positivamente para $E_{act-ass}$ e ΔH_{ass}^\ddagger (NUNES et al., 2019).

Por outro lado, os valores de $E_{act-diss}$ foram negativos, baixos e dependentes da temperatura ($-6,42 \leq E_{act-diss} \leq -1,02 \text{ KJ mol}^{-1}$) porque quando $[bLF-Brij58]^\circ$ sofre alterações conformacionais ($E_{act-diss-conf}$) para gerar a estrutura conformacional de $[bLF-Brij58]^\ddagger$, as novas

interações liberam mais energia do que a absorvida para quebrar as interações presentes no complexo termodinamicamente estável. Durante o processo de dissociação, provavelmente não há contribuição energética da liberação da camada de solvatação de água ($E_{\text{act-diss-des}} = 0$) porque a molécula Brij58, em ambos os complexos, está dentro do local de interação bLF e, conseqüentemente, os estados de solvatação de $[\text{bLF-Brij58}]^\ddagger$ e $[\text{bLF-Brij58}]^\circ$ são semelhantes. O mesmo conceito pode ser aplicado para descrever ΔH_x^\ddagger .

As mudanças de entropia relacionadas à formação de $[\text{bLF-Brij58}]^\ddagger$ de ambas as interações moleculares de bLF e Brij58 ou a quebra de $[\text{bLF-Brij58}]^\circ$ foram negativas (valores médios $T\Delta S_{\text{ass}}^\ddagger = -24,26 \pm 0,56 \text{ KJ mol}^{-1}$ e $T\Delta S_{\text{diss}}^\ddagger = -90,19 \pm 4,60 \text{ KJ mol}^{-1}$). $T\Delta S_{\text{ass}}^\ddagger < 0$ indica que durante a formação do complexo ativado $[\text{bLF-Brij58}]^\ddagger$ por associação, a redução de entropia causada pela perda de graus de liberdade de translação de bLF e Brij58 superou o aumento de entropia causado pela liberação de água do camada de solvatação e o ajuste conformacional por sítio de bLF e Brij58, ou seja, $|T\Delta S_{\text{ass-int}}^\ddagger| > |T\Delta S_{\text{ass-des}}^\ddagger| + |T\Delta S_{\text{ass-conf}}^\ddagger|$. Por outro lado, como não há contribuição de entropia translacional para $T\Delta S_{\text{diss}}^\ddagger$ porque no processo de dissociação ambas as moléculas interacionais (bLF e Brij58) estão conectadas nas estruturas complexas, os valores negativos de $T\Delta S_{\text{diss}}^\ddagger$ só podem ser devido a mudanças conformacionais em o local de ligação bLF e Brij58. $T\Delta S_{\text{diss}}^\ddagger < 0$ indica que no complexo ativado, o local de interação de bLF e a cauda hidrofóbica de Brij58 são mais estruturados de forma conformacional do que no complexo termodinamicamente estável.

5.1.2 Análises termodinâmicas da interação bLF-Brij58 por RPS

A constante de equilíbrio de formação do complexo termodinamicamente estável $[\text{bLF-Brij58}]^\circ$ (K_b) foi obtida usando a equação 16. Considerando que o processo termodinâmico de formação de complexos estáveis ocorre em uma única etapa, foi possível determinar os parâmetros termodinâmicos de formação do complexo estável $[\text{bLF-Brij58}]^\circ$ (ΔG° , ΔH° e $T\Delta S^\circ$) através das equações 17, 18 e 19, listados na tabela 4. Esses parâmetros termodinâmicos são usados para elucidar o tipo de interações (ligação de hidrogênio, van der Waals ou forças hidrofóbicas) envolvidas, bem como a força motriz para o processo de formação de um mol de $[\text{bLF-Brij58}]^\circ$ a partir da associação de um mol de moléculas Brij58 não complexadas em um mol de moléculas bLF não complexadas (LELIS et al., 2017).

Tabela 4. Constante de ligação (K_b), variação da energia livre de Gibbs padrão (ΔG°), variação de entalpia padrão (ΔH°) e variação de entropia padrão ($T\Delta S^\circ$) de formação do complexo [bLF-Brij58] $^\circ$ em temperaturas variáveis e pH 7,4.

T	K_b	ΔH°	ΔG°	$T\Delta S^\circ$
K	10^5 L mol^{-1}		kJ mol^{-1}	
289,15	$5,20 \pm 0,22$	$30,25 \pm 1,05$	$-31,74 \pm 2,07$	$61,87 \pm 2,01$
293,15	$5,93 \pm 0,11$	$33,14 \pm 0,95$	$-32,40 \pm 1,72$	$65,54 \pm 2,19$
297,15	$7,40 \pm 0,24$	$34,90 \pm 0,59$	$-33,39 \pm 0,98$	$68,29 \pm 1,98$
298,15	$7,71 \pm 0,22$	$35,18 \pm 0,61$	$-33,60 \pm 2,13$	$68,78 \pm 1,62$
301,15	$8,96 \pm 0,29$	$35,64 \pm 0,51$	$-34,32 \pm 1,82$	$69,96 \pm 1,75$

bLF e Brij58 interagem para formar [bLF-Brij58] $^\circ$ com valores de K_b na ordem de 10^5 L mol^{-1} , que aumentaram aproximadamente 1,72 vezes quando a temperatura aumentou de 289,15 para 301,15 K. bLF interage com corantes, drogas e alimentos aditivos, formando complexos com uma faixa de valores de constantes de ligação (valores de K_b na ordem de 10^4 ou 10^5 M^{-1}) (BASTOS; DE CARVALHO; GARCIA-ROJAS, 2018; COELHO et al., 2019; GUO et al., 2017; HUANG et al., 2018; NUNES et al., 2019; REZENDE et al., 2019). Valores negativos de ΔG° foram obtidos, diminuindo de $-31,74$ a $-34,32 \text{ kJ mol}^{-1}$ com o aumento da temperatura, indicando que [bLF-Brij58] $^\circ$ é mais estável em temperaturas mais altas. Com base nos dados cinéticos (tabela 2), o efeito da temperatura em K_b ocorre porque um aumento na energia cinética molecular média ($\langle E_c \rangle = 3/2 \text{ kT}$) aumenta a taxa de associação e, correspondentemente, diminui a taxa de dissociação. No entanto, a temperatura afetou predominantemente o k_a , que aumentou 1,6 vezes, enquanto o k_d diminuiu apenas 1,07 vezes com o aumento da temperatura. Os valores positivos de ambos ΔH° e $T\Delta S^\circ$ são indicativos de forças hidrofóbicas sendo dominantes para a ligação de bLF-Brij58 (FATHI et al., 2018; ROSS; SUBRAMANIAN, 1981). Este poder de condução hidrofóbico para a formação de [bLF-Brij58] $^\circ$ se origina da interação direta entre a cadeia hidrofóbica de alquil Brij58 (grupo $-\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{15}$) e o sítio bLF hidrofóbico, liberando moléculas de água da camada de solvatação superficial hidrofóbica, o que aumenta a entalpia e a entropia do sistema (JANEK et al., 2017).

5.1.3 Conclusões

O surfactante Brij58 se liga à proteína bLF com alta afinidade ($K_b \approx 10^5 \text{ L mol}^{-1}$), formando o complexo termodinamicamente estável, $[\text{bLF-Brij58}]^\circ$, cuja estabilidade aumenta com o aumento da temperatura. Os valores positivos de ΔH° e $T\Delta S^\circ$ demonstraram que o processo de formação de $[\text{bLF-Brij58}]^\circ$ foi conduzido por interações hidrofóbicas. Ao examinar a dependência das constantes de taxa de associação (k_a) e dissociação (k_d) com a temperatura, os parâmetros de energia de ativação para a formação do complexo ativado, $[\text{bLF-Brij58}]^\ddagger$, foram determinados. $[\text{bLF-Brij58}]^\ddagger$ é formado a partir da associação de moléculas Brij58 não complexadas em moléculas bLF não complexadas, com uma barreira energética determinada quase igualmente pelo aumento da entalpia e diminuição da entropia ($E_{\text{act-ass}} = 29,22 \text{ KJ mol}^{-1}$, $\Delta H_{\text{ass}}^\ddagger = 26,74 \text{ KJ mol}^{-1}$, $T\Delta S_{\text{ass}}^\ddagger = -24,56 \text{ KJ mol}^{-1}$, e $\Delta G_{\text{ass}}^\ddagger = 51,31 \text{ KJ mol}^{-1}$, em 298,15 K). Por outro lado, quando a formação do complexo ativado ocorre através da quebra de $[\text{bLF-Brij58}]^\circ$ (processo de dissociação), a barreira energética é dominada por uma diminuição da entropia ($E_{\text{act-diss}} = -5,96 \text{ KJ mol}^{-1}$, $\Delta H_{\text{diss}}^\ddagger = -8,44 \text{ KJ mol}^{-1}$, $T\Delta S_{\text{diss}}^\ddagger = -93,35 \text{ KJ mol}^{-1}$, e $\Delta G_{\text{diss}}^\ddagger = 84,91 \text{ KJ mol}^{-1}$, a 298,15 K). Observou-se que $T\Delta S_{\text{ass}}^\ddagger > T\Delta S_{\text{diss}}^\ddagger$, principalmente porque os valores de $T\Delta S_{\text{ass}}^\ddagger$ são afetados pelo aumento de entropia atribuído à liberação de moléculas de água da camada de solvatação bLF e Brij58, enquanto para $T\Delta S_{\text{diss}}^\ddagger$, esta contribuição não existe.

A abordagem cinética apresentada neste estudo pode ser aplicada a outros sistemas surfactante/proteína, para aprofundar nossa compreensão da dinâmica molecular e energética das interações surfactante não iônico-proteína globular como sistemas potenciais para o desenvolvimento de novas aplicações em diversas áreas.

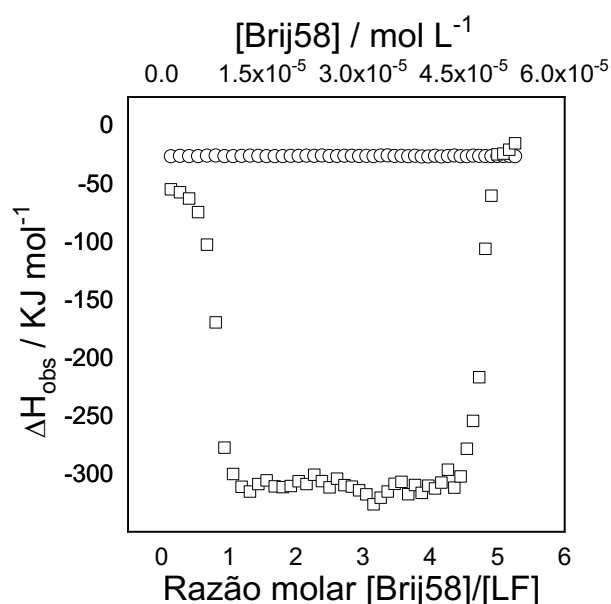
5.2 Interação de brij58 com lactoferrina: Propriedades termodinâmicas, efeitos de NaSCN e pH

5.2.1 Caracterização termodinâmica da interação entre bLF e Brij58

No estudo calorimétrico das interações proteína-surfactante, as curvas resultantes da variação de entalpia molar aparente de interação ($\Delta H_{\text{app-int}}$) em função da concentração de surfactante ($[\text{Surf}]$) são geralmente expressas por uma única sigmoideal (BARANAUSKIENE et al., 2019). O tratamento clássico dessas curvas sigmoideais envolve o ajuste de dados ao modelo ISN que descreve as interações moleculares do sistema e a obtenção dos seguintes parâmetros: estequiometria de reação (n), constante de ligação (K_b), variação de entalpia padrão

(ΔH°_{int}), variação de energia livre de Gibbs padrão (ΔG°_{int}) e variação de entropia padrão ($T\Delta S^{\circ}_{int}$) No entanto, a interação bLF-Brij58 produziu diferentes $\Delta H_{app-int}$ versus [Surf]. A figura 15 mostra a variação de entalpia observada (ΔH_{obs}) em função da razão molar [Brij58]/[bLF] (ou como funções de [Brij58]) para adição de Brij58 em: i) tampão pH 7,4 (curva de diluição do surfactante) ou ii) solução de bLF 10 μ M a pH 7,4 (curva para titulação do surfactante na solução bLF) a 298,15K.

Figura 15. Gráficos de ΔH_{obs} em função da razão molar [Brij58]/[bLF] (ou como funções de [Brij58]) para adição de Brij58 a (\square) solução de bLF 10 μ M em pH 7,4 e (\circ) tampão de fosfato a pH 7,4 e 298,15 K. A concentração de Brij58 é indicada pelo eixo superior.superior.



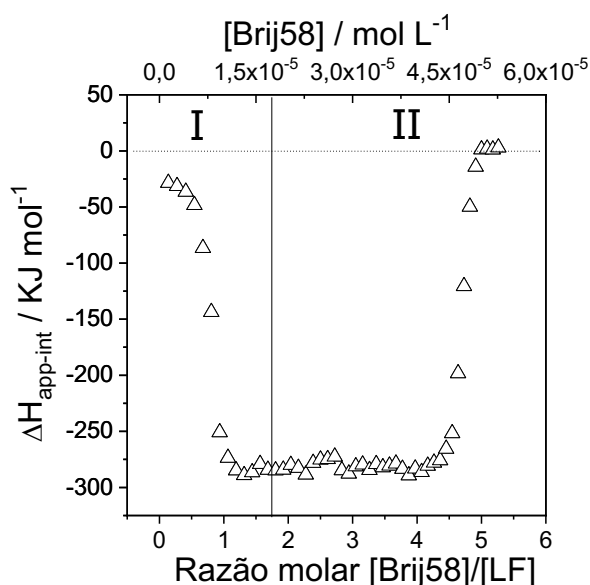
Para ambas as titulações, os valores de ΔH_{obs} permaneceram negativos na faixa de concentração de Brij58 analisada. Enquanto os processos de diluição do surfactante ocorreram com valores de energia quase constantes, a curva de titulação do surfactante em solução bLF apresentou perfil diferente, demonstrando que o surfactante interagiu com a proteína.

A titulação de Brij58 em solução bLF apresenta processos que envolvem a interrupção e formação de várias interações intermoleculares que contribuem para os valores obtidos de ΔH_{obs} . Quando titulamos Brij58 no tampão 7,4, os mesmos processos moleculares ocorrem quando titulamos Brij58 em solução bLF, exceto para o processo de interação direta entre Brij58 e bLF. Portanto, quando subtraímos os valores de ΔH_{obs} obtidos por titulação de surfactante em tampão fosfato 7,4 dos valores de ΔH_{obs} obtidos por titulação de surfactante em solução tampão de fosfato bLF, determinamos $\Delta H_{app-int}$ (variação aparente de entalpia

molar), um parâmetro termodinâmico que expressa a interação direta entre as moléculas bLF e Brij58. O termo aparente foi usado aqui porque a quantidade de monômeros de surfactante aos quais a proteína se liga em cada injeção é desconhecida.

A figura 16 mostra $\Delta H_{app-int}$ em função da razão molar [Brij58]/[bLF] (ou em função de [Brij58]) para a interação bLF-Brij58 em pH 7,4 e 298,15 K .

Figura 16. Valores de $\Delta H_{app-int}$ plotados em função da razão molar [Brij58]/[bLF] (ou em função de [Brij58]) para a interação bLF-Brij58 em tampão de fosfato em pH 7,4 e 298,15 K.

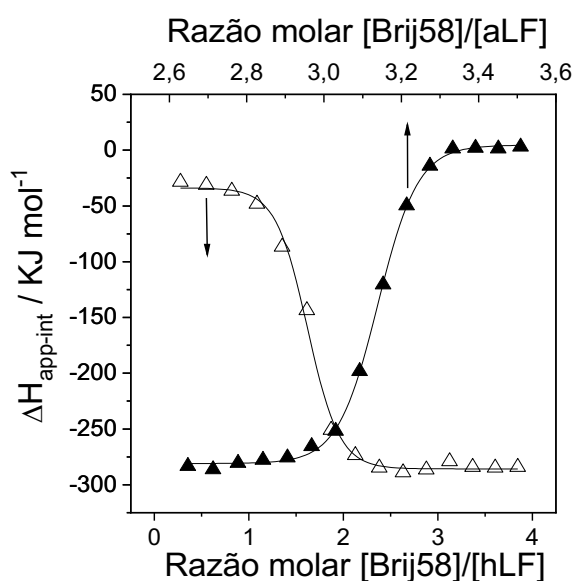


A curva $\Delta H_{app-int}$ versus [Brij58]/[bLF] pode ser dividida em duas regiões distintas, I ($0,25 \leq [Brij58]/[bLF] \leq 1,75$) e II ($1,75 \leq [Brij58]/[bLF] \leq 5,4$), cada um caracterizado por uma única curva sigmoideal sob diferentes concentrações de Brij58. Para entender esta curva calorimétrica devemos considerar que a amostra de proteína utilizada neste trabalho consiste em uma mistura de aproximadamente 80% apo-lactoferrina (proteína com lóbulos N e C livres) e 20% holo-lactoferrina (proteína com lóbulos N e C complexados com ferro). Como os lóbulos N e C são estruturalmente semelhantes e têm a mesma afinidade para complexar o ferro (GONZÁLEZ-CHÁVEZ; ARÉVALO-GALLEGOS; RASCÓN-CRUZ, 2009; KANYSHKOVA; BUNOVA; NEVINSKY, 2001), podemos considerar que Brij58 interage de forma independente com hLF (lóbulo complexado por ferro) ou aLF (lóbulo livre), produzindo diferentes parâmetros termodinâmicos. Em pequena concentração de surfactante (região I), Brij58 interage fortemente com o lóbulo complexado com ferro, registrando uma liberação de energia marcada entre a razão molar [Brij58]/[bLF] de 0,1 a 1,3. Após [Brij58] = $1,3 \times 10^{-5}$ mol

L^{-1} ($[Brij58]/[bLF] > 1,3$), ocorre a saturação dos sítios de ligação de hLF por moléculas de Brij58. Depois disso, uma energia liberada constante é registrada entre $1,5 < [Brij58]/[bLF] < 4$, onde as moléculas de Brij58 interagem principalmente com aLF. Finalmente, a energia liberada diminui quando $[Brij58]/[bLF] > 4$, registrando a saturação de aLF em uma razão molar $[Brij58]/[bLF]$ maior que 5.

Para aplicar o modelo ISN aos dados de isoterma calorimétrica, é necessário expressar os valores de energia $\Delta H_{app-int}$ como uma função de $[Brij58]/[hLF]$ ($0,25 \leq [Brij58]/[bLF] \leq 1,75$) ou $[Brij58]/[aLF]$ ($1,5 < [Brij58]/[bLF] < 4$), como mostrado pela figura 17. Como discutido antes $[hLF] = 0,2[bLF]$ e $[aLF] = 0,8[bLF]$.

Figura 17. Valores de $\Delta H_{app-int}$ em função da razão molar de (Δ) $[Brij58]/[hLF]$ (eixo inferior) e razão molar de (\blacktriangle) $[Brij58]/[aLF]$ (topo eixo) em tampão pH 7,4 e 298,15 K. (-) A linha sólida representa a curva calculada de $\Delta H_{app-int}$ em função de $[Brij58]/[lóbulo\ bLF]$ da Equação 1.



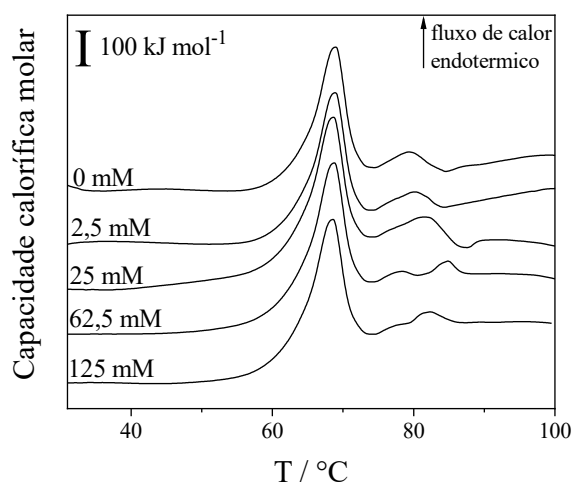
Após os dados ajustados das duas curvas sigmoidais mostrados na figura 17 para o modelo ISN, as propriedades termodinâmicas da interação do lóbulo bLF-Brij58 foram determinadas. O complexo $[hLF-Brij58]^{\circ}$ apresentou estequiometria de 1:1,5, foi formado com alta afinidade ($K_b = 1,89 \times 10^7\ L\ mol^{-1}$) e foi conduzido entalpicamente com $\Delta H_{int}^{\circ} = -248,58\ kJ\ mol^{-1}$ e $T\Delta S_{int}^{\circ} = -207,50\ kJ\ mol^{-1}$ a pH 7,4. As interações de Brij58 com aLF tiveram uma afinidade menor ($K_b = 1,11 \times 10^7\ L\ mol^{-1}$) do que a formação do complexo $[hLF-Brij58]^{\circ}$ e seu processo de ligação liberou mais energia ($\Delta H_{int}^{\circ} = -319,22\ kJ\ mol^{-1}$) e diminuiu mais intensamente a entropia do sistema ($T\Delta S_{int}^{\circ} = 279,00\ kJ\ mol^{-1}$) em pH 7,4, com cerca de 1:3

de estequiometria. As interações hLF-Brij58 e aLF-Brij58 ocorreram com alto valor de energia liberado por entalpia e diminuição de entropia do sistema, demonstrando que ocorreu uma interação intensa e específica.

Dados relatados na literatura para interações entre proteínas e surfactantes não iônicos geralmente mostram ΔH°_{int} e $T\Delta S^{\circ}_{int}$ calculados por ITC menos intensos do que os encontrados. Por exemplo, as interações entre albumina de soro humano e Tween 40 (HSA-TW40) (GHOSH et al., 2015), albumina de soro bovino e hepta ou penta (etilenoglicol) monododecil éter (BSA-C12EO7 e BSA-C12EO5) (NIELSEN; BORCH; WESTH, 2000), albumina de soro humano e Tween 20 (HSA-TW20) (GARIDEL; HOFFMANN; BLUME, 2009) mostraram valores negativos de ΔH°_{int} (de -10,70 a -68,00 kJ mol⁻¹) e $T\Delta S^{\circ}_{int}$ (de -8,72 a -50,00 kJ mol⁻¹).

Os parâmetros termodinâmicos da interação bLF-Brij58 podem ser controlados pelo processo de desnaturação de proteínas induzido pela interação surfactante. Para verificar se o processo de desnaturação de bLF ocorreu, as medições de NanoDSC foram realizadas em $2,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de solução de bLF em diferentes concentrações de Brij58, figura 18.

Figura 18. Termogramas NanoDSC para soluções de bLF 25 μ M com diferentes concentrações de Brij58 em pH 7,4. Os valores acima e à esquerda das curvas são as concentrações de Brij58.



A mudança na diferença entre a capacidade calorífica molar das amostras representa principalmente a ruptura das interações de estabilização da estrutura de bLF nativa. O perfil do termograma exibe um processo de transição atribuído à desnaturação térmica de bLF. Dois estágios de temperatura são observados para o processo de desnaturação de bLF em todas as

concentrações de Brij58 analisadas em pH 7,4. Onde a primeira fase está associada à desnaturação de aLF a 68,9-69,1 °C e a segunda fase está associada à desnaturação de hLF a 79,2-84,9 °C. Brij58 interagiu com lóbulos de bLF causando um aumento na estabilização térmica das estruturas nativas aLF e hLF. Portanto, as propriedades termodinâmicas determinadas por ITC da interação direta entre hLF-Brij58 e aLF-Brij58 em pH 7,4 não correspondem a processos associados à desnaturação da estrutura de bLF nativa.

Com base na análise do resultado do NanoDSC, as variações observadas nos parâmetros termodinâmicos padrão do processo de interação entre Brij58 com um tipo de lóbulo de proteína podem ser racionalizadas em três subprocessos diferentes que ocorrem simultaneamente durante a associação. Portanto, a variação de entalpia padrão das interações de bLF-Brij58 pode ser escrita como a seguinte soma:

$$\Delta H_{int}^{\circ, xLF-Brij58} = \Delta H_{des}^{\circ} + \Delta H_{conf}^{\circ} + \Delta H_{int}^{\circ} \quad \text{Equação 22}$$

Onde para o subscrito x pode ser do tipo aLF ou hLF, ΔH_{des}° representa a variação de entalpia padrão associada com a ruptura das moléculas de água da camada de solvatação de Brij58 e x lóbulo; ΔH_{conf}° é a variação de entalpia padrão relacionada às alterações conformacionais nos locais de interação de bLF; e ΔH_{int}° é a variação de entalpia padrão relacionada à formação do complexo.

Como ΔH_{int}° foi muito negativo, podemos concluir que a energia liberada pelas interações diretas entre as moléculas de Brij58 e xLF (ΔH_{int}°) foi muito maior do que a energia absorvida para liberar as moléculas de água da camada de solvatação de Brij58 e xLF (ΔH_{des}°), bem como para alterar a conformação das moléculas de Brij58 e xLF (ΔH_{conf}°). A relação de $|\Delta H_{int}^{\circ, xLF-Brij58}| \gg (|\Delta H_{des}^{\circ}| + |\Delta H_{conf}^{\circ}|)$ demonstrou que existe uma orientação específica de Brij58 que segmenta em torno dos resíduos de aminoácidos de bLF para otimizar as interações máximas (-CH₂-CH₂-)-aminoácido e (-CH₂-CH₂-O)-aminoácido. Este comportamento de orientação segmental de bLF-Brij58 mútua produz uma única estrutura supramolecular com uma alta estabilidade ($\Delta G_{int}^{\circ} = -41,08$ e $-40,22$ kJ mol⁻¹, para [hLF-Brij58]^o e [aLF-Brij58]^o, respectivamente), que pode ser usado para diferentes aplicações, tais como: alcançar funções novas ou alteradas (YEATES; PADILLA, 2002), administração de drogas (ZHANG; MA, 2013), modelos para síntese de nanopartículas (UCHIDA et al., 2010), montagem mediada por metal (BRODIN et al., 2012), ligação de pequenas moléculas químicas

(FEGAN et al., 2010), proteger a célula bacteriana por sequestro de intermediários tóxicos (PIETERS et al., 2016), entre outros.

O $\Delta H_{int}^{\circ, aLF-Brij58}$ foi mais negativo do que $\Delta H_{int}^{\circ, hLF-Brij58}$ provavelmente porque a energia gasta para mudar o local de conformação hLF é maior devido à presença de ferro dentro do lóbulo hLF que causam sua estabilização. Em estudo anterior, Ferreira *et al* (FERREIRA et al., 2018a) confirmaram que a presença de ferro na estrutura da proteína LF aumentou a estabilidade contra a desnaturação induzida por surfactante aniônico.

Uma interpretação semelhante a variação de entalpia pode ser aplicada para analisar as contribuições entrópicas para o processo de complexação de [hLF-Brij58]^o e [aLF-Brij58]^o. Portanto, a variação de entropia padrão da interação pode ser escrita como a seguinte soma:

$$\Delta S_{int}^{\circ, xLF-Brij58} = \Delta S_{rel}^{\circ} + \Delta S_{conf}^{\circ} + \Delta S_{trans-rot}^{\circ} \quad \text{Equação 23}$$

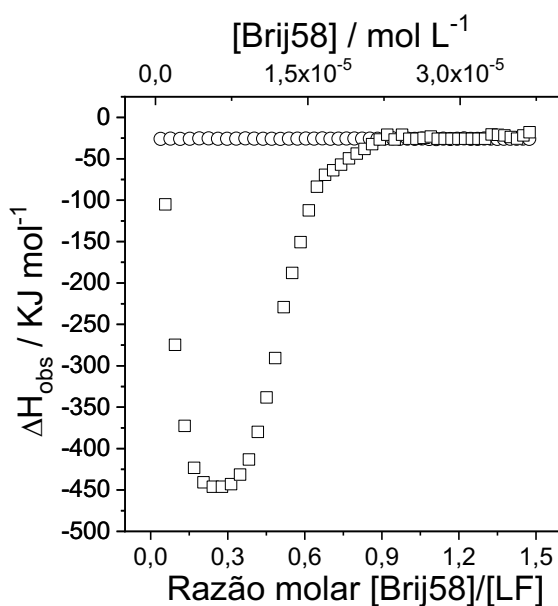
ΔS_{rel}° é a variação de entropia padrão associada à ruptura das moléculas de água da camada de solvatação de Brij58 e xLF; ΔS_{conf}° é a variação de entropia padrão relacionada à mudanças conformacionais nos locais de interação de bLF; $\Delta S_{trans-rot}^{\circ}$ é a variação de entropia padrão devido às variações do número de graus de liberdade translacional-rotacional para a formação do complexo.

A mudança de entropia padrão relacionada aos processos de formação de [hLF-Brij58]^o e [aLF-Brij58]^o foi negativa, mostrando que o aumento na entropia do sistema causado pela liberação de moléculas de água que compõem a camada de solvatação de Brij58 e bLF, bem como a mudança conformacional de Brij58 e bLF foi superada pela perda de entropia promovida pelas reduções do grau de liberdade translacional e rotacional, ou seja, $|\Delta S_{trans-rot}^{\circ}| > |\Delta S_{rel}^{\circ}| + |\Delta S_{conf}^{\circ}|$. Para explicar a maior valor negativo de $\Delta H_{int}^{\circ, xLF-Brij58}$ e $\Delta S_{int}^{\circ, xLF-Brij58}$ devemos considerar que na estrutura do complexo [xLF-Brij58]^o a proteína e o segmento do surfactante deve ser muito mais estruturado/orientado do que nas moléculas livres da solução.

Nosso resultado termodinâmico anterior mostrou que a conformação do local de interação da proteína tem uma contribuição importante para as interações do bLF-Brij58 lóbulo. Para elucidar o papel da contribuição da conformação para a formação do complexo [xLF-Brij58]^o, as análises também foram realizadas em pH 12, onde é bem conhecido que bLF muda sua conformação nativa (FERREIRA et al., 2018a; HU et al., 2008).

A figura 19 mostra a mudança de entalpia observada (ΔH_{obs}) como uma função da razão molar [Brij58]/[bLF] (ou como uma função de [Brij58]) para a adição de Brij58 em: i) tampão pH 12 (curva de diluição do surfactante) ou ii) solução 10 μ M de bLF em tampão pH 12 (curva para titulação de surfactante em solução de bLF) em 298,15K.

Figura 19. Gráficos de ΔH_{obs} em função da razão molar [Brij58]/[bLF] (ou em função de [Brij58]) para adição de Brij58 a (\square) solução de bLF 10 μ M em tampão pH12, e (\circ) tampão pH 12 a 298,15 K. A concentração de Brij58 é indicada pelo eixo superior.

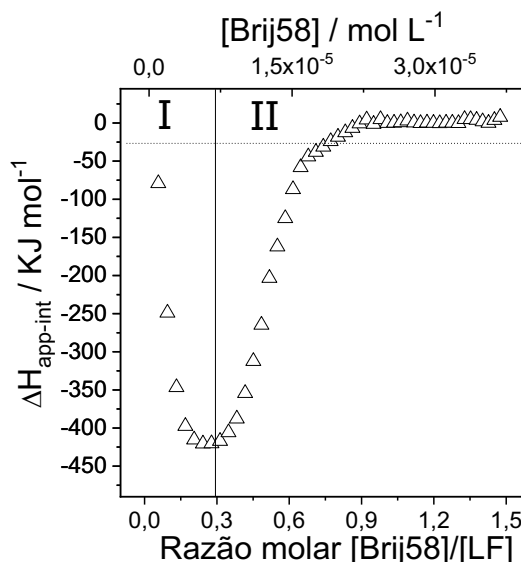


Como em pH 7,4, a curva de diluição de Brij58 em tampão pH 12 mostrou variação de energia constante por mol de surfactante adicionado. No entanto, a titulação de Brij58 em solução de bLF exibiu um perfil não monótono e uma dependência diferente de ΔH_{obs} da concentração de Brij58 observada em pH 7,4. A curva ΔH_{obs} em função de [Brij58]/[bLF] mostrou uma diminuição dos valores ΔH_{obs} em $0,05 < [Brij58]/[bLF] < 0,25$ seguido por um pequeno platô depois que a energia liberada foi diminuindo até atingir um novo platô em $[Brij58]/[bLF] > 0,9$. Os diferentes perfis entre a curva de diluição Brij58 e a curva de Brij58 adicionado à solução de bLF deixam claro que a interação entre Brij58 e bLF também ocorre em pH 12.

Os valores de $\Delta H_{app-int}$ para interação direta entre Brij58 e bLF em pH 12 foram obtidos subtraindo os valores de ΔH_{obs} obtidos por titulação de surfactante em tampão pH 12 a partir dos valores de ΔH_{obs} obtidos pela titulação do surfactante em solução de bLF. A figura

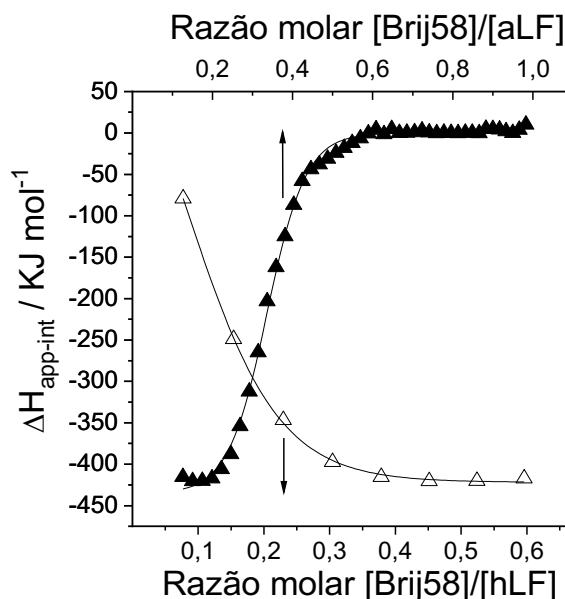
20 mostra o $\Delta H_{app-int}$ em função da razão molar [Brij58]/[bLF] (ou em função de [Brij58]) para a interação bLF-Brij58 em pH 12 a 298,15 K.

Figura 20. Valores de $\Delta H_{app-int}$ em função da razão molar [Brij58]/[bLF] (ou em função de [Brij58]) para a interação bLF-Brij58 em tampão pH 12 a 298,15 K.



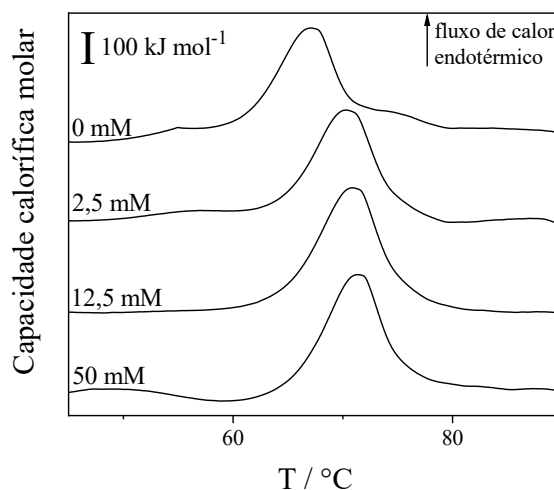
Como ocorreu em pH 7,4, a interação bLF-Brij58 em pH 12 mostrou dois eventos moleculares distintos. O primeiro evento ocorreu em $0,05 < [\text{Brij58}]/[\text{bLF}] < 0,3$ (região I) e o segundo em $0,3 < [\text{Brij58}]/[\text{bLF}] < 0,9$ (região II), com a saturação complexa dos locais de ligação de bLF pela interação com Brij58 acontecendo em $[\text{Brij58}]/[\text{bLF}] = 0,9$. Como considerado para pH 7,4, os dois eventos em pH 12 foram associados a interações entre hLF (região I) ou aLF (região II) com Brij58, respectivamente. A curva $\Delta H_{app-int}$ em função de $[\text{Brij58}]/[\text{bLF}]$ foi separada em um gráfico de $\Delta H_{app-int}$ em função de $[\text{Brij58}]/[\text{hLF}]$ e $[\text{Brij58}]/[\text{aLF}]$, figura 21.

Figura 21. Valores de $\Delta H_{app-int}$ em função da razão molar de (Δ) [Brij58]/[hLF] (eixo inferior) e razão molar de (\blacktriangle) [Brij58]/[aLF] (eixo superior) em tampão pH 12 e 298,15 K.K.



Em pH 12, a interação Brij58-hLF ocorreu com $K_b = 1,93 \times 10^6 \text{ L mol}^{-1}$ enquanto para Brij58-aLF com $K_b = 2,25 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1}$ mostrando que conforme o pH aumentou de 7,4 para 12 a estabilidade do complexo bLF-Brij58 diminuiu. O complexo [hLF-Brij58] apresentou estequiometria de 1:0,2 e foi conduzido entalpicamente com $\Delta H_{int}^\circ = -463,35 \text{ kJ mol}^{-1}$ e $T\Delta S_{int}^\circ = -427,48 \text{ kJ mol}^{-1}$ enquanto o complexo [hLF- Brij58] apresentou estequiometria de 1:0,2 com $\Delta H_{int}^\circ = -456,00 \text{ kJ mol}^{-1}$ e $T\Delta S_{int}^\circ = -425,46 \text{ kJ mol}^{-1}$ em pH 12. Provavelmente esta diferença entre o parâmetro termodinâmico obtido em pH 7.4 e 12 devem ser causados pela mudança conformacional de bLF causada pela modificação do pH. Para avaliar o efeito do pH na estabilidade da estrutura de bLF, medidas de NanoDSC foram realizadas em uma solução de $2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de bLF em diferentes concentrações de Brij58 a pH 12, figura 22.

Figura 22. Termogramas NanoDSC para soluções de bLF 25 μ M com diferentes concentrações de Brij58, em pH 12. Os valores acima e à esquerda das curvas são as concentrações de Brij58.

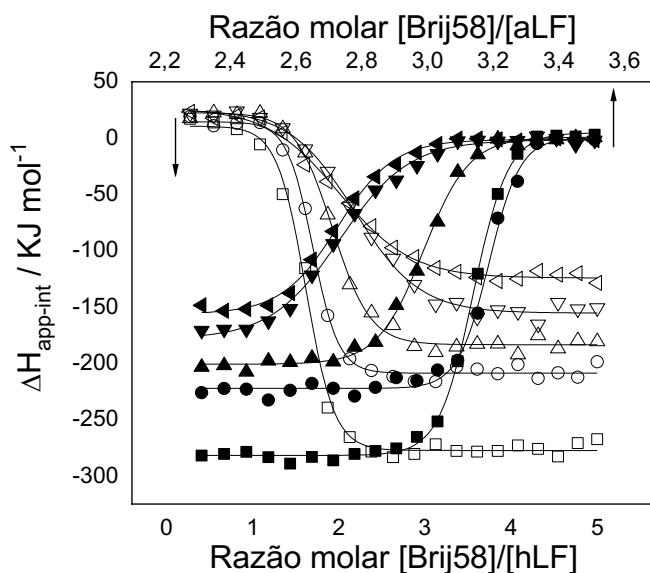


Em pH 12, o perfil do termograma exibe um único processo de transição ($T_m = 66,56$ °C e $\Delta H_{den} = 621,90$ kJ mol⁻¹) atribuído a uma desnaturação térmica do lóbulo aLF, mostrando que sua estrutura permanece parcialmente no estado nativo em comparação com pH 7,4 ($T_m = 68,91$ °C e $\Delta H_{den} = 971,00$ kJ mol⁻¹). Por outro lado, a pH 12 a estrutura de hLF se apresenta completamente desnaturada como mostrado pela ausência do seu pico de transição que ocorre a $T_m = 79,17$ °C. Com o aumento da concentração de Brij58, a estrutura aLF torna-se mais estável, conforme demonstrado pelo aumento do valor de T_m (de 66,56 para 73,22 °C). Os valores de ΔH°_{int} e $T\Delta S^{\circ}_{int}$ para a interação aLF-Brij58 diminuíram, demonstrando que a energia gasta para alterar o sítio conformacional aLF foi menor em pH 12.

5.2.2 Efeito de NaSCN em complexações [hLF-Brij58] e [aLF-Brij58] em pH 7,4

A mudança no pH de 7,4 para 12 promoveu uma mudança conformacional no lóbulo hLF, refletindo mudanças nas propriedades termodinâmicas de interação entre Brij58-hLF. Outra forma de induzir essa mesma mudança conformacional é adicionar ao sistema NaSCN que, ao complexar com íons de ferro previamente complexados com a proteína, promoverá mudanças estruturais no local hLF. Para investigar o efeito do NaSCN na formação dos complexos [aLF-Brij58] e [hLF-Brij58] em pH 7,4, determinamos os parâmetros termodinâmicos da interação proteína-surfactante em várias concentrações de NaSCN.

Figura 23. Valores de $\Delta H_{app-int}$ em função da razão molar [Brij58]/[hLF] (símbolos abertos) e [Brij58]/[aLF] (símbolos sólidos) em tampão pH 7,4 e 298,15 K, (\square, \blacksquare) sem adição de sal; (\circ, \bullet) 25mM; ($\triangle, \blacktriangle$) 50 mM; ($\nabla, \blacktriangledown$) 75 mM e ($\triangleleft, \blacktriangleleft$) 100 mM de NaSCN respectivamente.



Todos os parâmetros termodinâmicos associados à interação entre Brij58 com hLF e aLF em pH 7,4 sob diferentes condições de concentração de NaSCN foram determinados e mostrados na tabela 5.

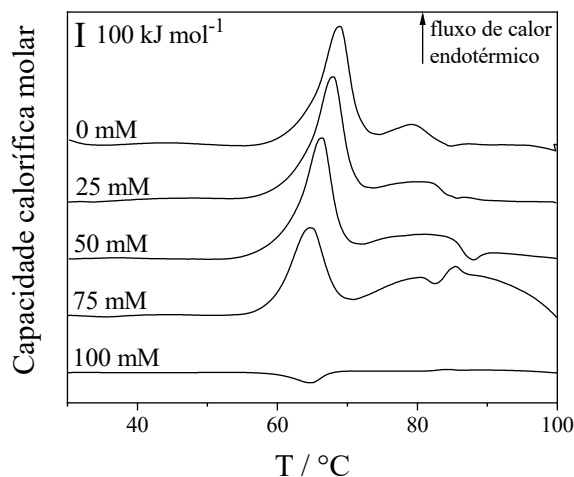
Tabela 5. Parâmetros termodinâmicos do processo de complexação de [hLF-Brij58] e [aLF-Brij58], obtidos em pH 7,4 e em diferentes concentrações de NaSCN.

[hLF-Brij58]					
NaSCN mmol L ⁻¹	K _b 10 ⁵ L mol ⁻¹	ΔG°_{int}	ΔH°_{int} kJ mol ⁻¹	T ΔS°_{int}	n
0	188,62 ± 54,72	-41,08 ± 0,74	-248,58 ± 4,60	-207,50 ± 3,86	1,55 ± 0,02
25	243,65 ± 73,82	-41,71 ± 0,78	-192,35 ± 3,51	-150,63 ± 2,73	1,72 ± 0,02
50	110,75 ± 25,56	-39,76 ± 0,58	-180,09 ± 3,15	-140,33 ± 2,57	1,98 ± 0,02
75	37,30 ± 7,02	-37,06 ± 0,57	-157,06 ± 3,86	-120,00 ± 3,29	2,29 ± 0,04
100	27,89 ± 5,99	-36,06 ± 0,49	-133,34 ± 3,44	-97,28 ± 2,95	2,12 ± 0,04
[aLF-Brij58]					
0	111,37 ± 29,58	-40,22 ± 0,67	-319,23 ± 3,27	-279,00 ± 2,59	3,12 ± 0,01
25	139,84 ± 33,88	-40,79 ± 0,60	-252,31 ± 2,23	-211,52 ± 1,63	3,18 ± 0,01
50	51,80 ± 12,24	-38,32 ± 0,60	-227,23 ± 3,00	-188,91 ± 2,40	2,94 ± 0,01
75	18,16 ± 3,72	-35,73 ± 0,51	-202,07 ± 4,82	-166,35 ± 4,30	2,63 ± 0,01
100	24,92 ± 4,84	-36,51 ± 0,49	-177,04 ± 3,66	-140,53 ± 3,17	2,63 ± 0,01

A variação da concentração de NaSCN promoveu semelhantes perfis de $\Delta H_{app-int}$ em função de $[Brij58]/[hLF]$ e $[Brij58]/[aLF]$, no entanto, os valores dos parâmetros termodinâmicos foram bastante afetados. Exceto de 0 a 25 mM de NaSCN, onde a forma sigmoidal se torna mais acentuada, com o aumento da concentração de eletrólitos, a forma sigmoidal das curvas tornou-se menos pronunciada, sugerindo que a afinidade de ligação diminuiu gradualmente. O aumento da concentração de NaSCN de 25 para 100 mM diminuiu a constante de ligação de 8,7 e 5,6 vezes para formar os complexos $[hLF-Brij58]$ e $[aLF-Brij58]$, respectivamente. Como resultado, ΔG_{int}° aumentou, mostrando que a ligação se tornou menos favorável para a formação de ambos os complexos. Com o aumento da força iônica, a magnitude de ΔH_{int}° , $T\Delta S_{int}^{\circ}$ e n aumentou, exceto para formar o complexo $[hLF-Brij58]$, onde n diminuiu de 3,12 para 2,63.

Como mostrado acima quando ocorre variação de pH, as propriedades termodinâmicas das interações bLF-Brij58 podem ser alteradas por condições do microambiente que afetam a conformação da proteína nativa. A estabilidade de uma proteína é geralmente estimada com base na análise de suas transições desdobradas induzidas por desnaturantes, como: temperatura, força iônica ou mudanças de pH, medidas espectroscopicamente ou calorimetricamente (HASSAN; VERDES; RUSO, 2011; PSIMADAS et al., 2012). Neste trabalho, o NanoDSC foi usado para analisar a estabilidade térmica e o desdobramento da estrutura de bLF nativa sob diferentes concentrações de NaSCN. A partir das curvas de capacidade térmica molar (C_p) versus variação de temperatura (termogramas), foram calculadas a variação da entalpia de desnaturação (ΔH_{den}) e o pico máximo de temperatura (T_m). A figura 24 mostra os termogramas NanoDSC para 25 μ M de bLF na presença de NaSCN a pH 7,4.

Figura 24. Termogramas NanoDSC para soluções de bLF 25 μM com diferentes concentrações de NaSCN a pH 7,4. Os valores acima e à esquerda das curvas são os valores das concentrações de NaSCN.



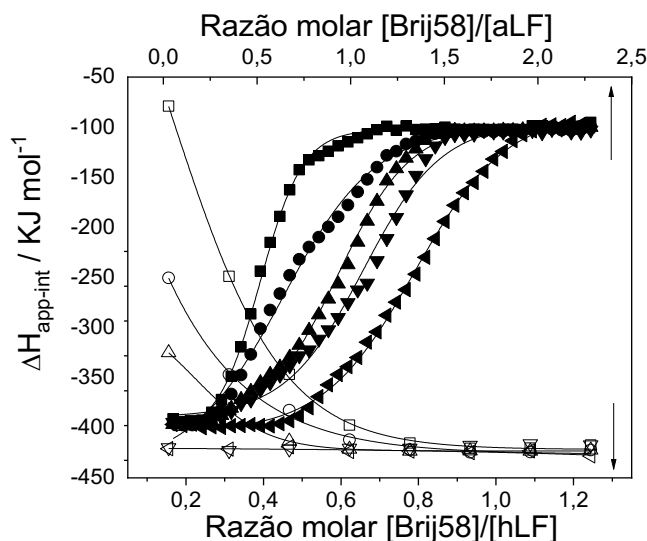
Os picos obtidos na ausência de NaSCN estão associados a transições de dois estados de conformação independentes atribuídos aos lóbulos aLF e hLF, onde cada domínio protéico se comporta como unidade cooperativa individual no desenvolvimento do processo de desnaturação térmica (BOKKHIM et al., 2013, 2014). Os dois grupos de parâmetros de desnaturação de transições são os seguintes: para aLF $T_m = 68,90\text{ }^\circ\text{C}$ e $\Delta H_{den} = 971,10\text{ kJ mol}^{-1}$ e para hLF $T_m = 79,20\text{ }^\circ\text{C}$ e $\Delta H_{den} = 168,70\text{ kJ mol}^{-1}$. Conforme a concentração de NaSCN aumentou até 75 mM, ΔH_{den} diminuiu de 971,10 para 473,50 kJ mol⁻¹ para aLF e de 168,70 para 57,80 kJ mol⁻¹ para hLF, mostrando que NaSCN promoveu a redução das interações intramoleculares de aLF e hLF. Quando a concentração de NaSCN foi aumentada para 100 mM, ambos os picos desapareceram, mostrando que aLF e hLF foram desnaturados, mas os dados ITC ainda foram capazes de determinar a interação desnaturada do lóbulo bLF-Brij58.

Para explicar o efeito do NaSCN na interação bLF-Brij58 devemos considerar que quando a concentração do eletrólito aumenta ocorre a blindagem eletrostática da dupla camada elétrica de bLF, diminuindo a repulsão eletrostática entre os aminoácidos e causando mudanças conformacionais nos sítios de interação de bLF, o que facilitou energeticamente as penetrações do Brij58 nos lóbulos hLF e aLF.

5.2.3 Efeito de NaSCN em complexações [hLF-Brij58] e [aLF-Brij58] em pH 12.

Verificou-se que tanto pH quanto NaSCN promovem modificações conformacionais dos sítios de interação de bLF. Para avaliar se esse sinergismo permanece sob diferentes condições de pH, avaliamos o efeito do NaSCN na interação bLF-Brij58 em pH 12. A fim de comparar os efeitos produzidos pela adição de NaSCN sobre os parâmetros termodinâmicos da interação entre bLF e Brij58 sob pH 7,4 realizamos a mesma proposta para o sistema sob pH 12. A figura 25 mostra as curvas de $\Delta H_{app-int}$ em função das razões molares de [Brij58]/[hLF] e [Brij58]/[aLF] sob diferentes condições de NaSCN a pH 12.

Figura 25. Valores de $\Delta H_{app-int}$ em função da razão molar [Brij58]/[hLF] (símbolos abertos) e [Brij58]/[aLF] (símbolos sólidos) em tampão pH 12 a 298,15 K (\square, \blacksquare) sem adição de sal; (\circ, \bullet) 25 mM; ($\triangle, \blacktriangle$) 50 mM; ($\nabla, \blacktriangledown$) 75 mM e ($\triangleleft, \blacktriangleleft$) 100 mM de NaSCN respectivamente.



Todos os parâmetros termodinâmicos associados às interações entre Brij58 com hLF e aLF a pH 12 sob diferentes condições de concentração de NaSCN foram determinados e apresentados na tabela 6.

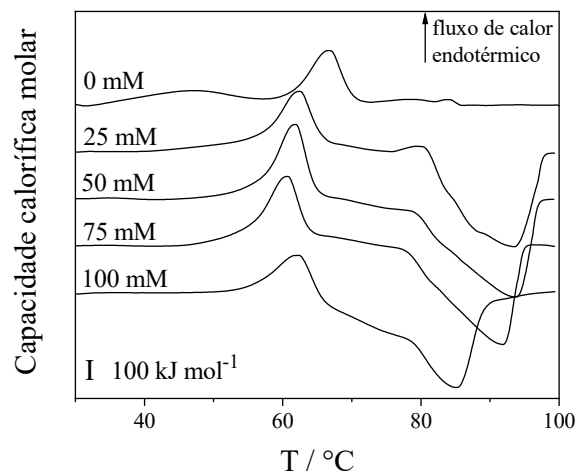
Tabela 6. Parâmetros termodinâmicos do processo de complexação de [hLF-Brij58] e [aLF-Brij58], obtidos a pH 12 e diferentes concentrações de NaSCN.

[hLF-Brij58]					
NaSCN mmol L⁻¹	K_b 10⁵ L mol⁻¹	ΔG^o_{int}	ΔH^o_{int} kJ mol⁻¹	TΔS^o_{int}	n
0	19,30 ± 5,24	-35,88 ± 0,69	-463,35 ± 40,23	-427,48 ± 39,48	0,22 ± 0,01
25	18,16 ± 11,11	-35,73 ± 1,78	-248,26 ± 58,61	-212,53 ± 56,83	0,19 ± 0,03
50	11,20 ± 10,10	-34,53 ± 3,67	-104,36 ± 9,92	-69,83 ± 6,25	0,11 ± 0,01
75	-	-	-	-	-
100	-	-	-	-	-
[aLF-Brij58]					
0	2,25 ± 0,22	-30,55 ± 0,24	-456,00 ± 5,24	-425,46 ± 5,00	0,71 ± 0,01
25	0,66 ± 0,09	-27,52 ± 0,33	-483,91 ± 11,71	-456,39 ± 11,38	0,90 ± 0,01
50	1,66 ± 0,23	-29,79 ± 0,34	-435,18 ± 6,04	-405,39 ± 5,70	1,15 ± 0,01
75	1,75 ± 0,29	-29,92 ± 0,41	-425,24 ± 6,65	-395,32 ± 6,24	1,29 ± 0,01
100	1,67 ± 0,25	-29,82 ± 0,37	-413,45 ± 5,69	-383,63 ± 5,32	1,54 ± 0,01

A presença de NaSCN a pH 12, afeta negativamente as interações entre os lóbulos de bLF e Brij58, causando a diminuição na formação dos complexos [hLF-Brij58] e [aLF-Brij58]. O equilíbrio da formação do complexo [hLF-Brij58] a pH 12 é forte e inversamente afetado pelo aumento na concentração de NaSCN, cessando a formação do complexo a partir de [NaSCN] = 75 mM. Até a interrupção completa da interação entre Brij58 e hLF, conforme a concentração de NaSCN aumentou as propriedades ΔH°_{int} e $T\Delta S^{\circ}_{int}$ diminuíram e mais moléculas Brij58 se ligaram a aLF para formar o complexo [aLF-Brij58].

Quanto à análise do efeito da adição de NaSCN na estrutura bLF com carga líquida positiva para pH 7,4, realizamos a mesma análise com a estrutura bLF com carga líquida negativa a pH 12. Os efeitos na estabilidade térmica, bem como mudanças conformacionais de bLF pela adição de NaSCN a pH 12 são mostrados na figura 26.

Figura 26. Termogramas NanoDSC para soluções de bLF 25 μ M com diferentes concentrações de NaSCN a pH 12. Os valores acima e à esquerda das curvas são os valores das concentrações de NaSCN.



O perfil do termograma na ausência de NaSCN refletiu apenas uma transição térmica. O pico endotérmico observado está relacionado a bLF com lóbulos aLF na faixa de 50-75 °C, com T_m de 67,1 °C. Com a mudança do pH de 7,4 para pH 12, o lóbulo do hLF foi fortemente afetado, apresentando-se na forma desnaturada. Embora hLF esteja na forma desnaturada, os dados ITC foram capazes de determinar as propriedades de interação entre Brij58 e hLF. Portanto, deve haver uma quantidade de estado nativo aLF que não foi possível observar nos dados do NanoDSC. Na ausência de NaSCN, o valor de ΔH_{den} associado a $T_m = 67,1$ °C foi de 621,90 kJ mol⁻¹.

A presença do NaSCN gerou um pico exotérmico muito pronunciado na faixa 75-98 °C, a região que inicia o fenômeno coincide com a transição térmica do hLF em pH 7,4. Em pH 12, NaSCN remove o íon ferro do interior de hLF e promove uma desestabilização acentuada da estrutura nativa de hLF, desencadeando o processo de precipitação de LF em temperaturas acima de 75 °C (picos exotérmicos). Além disso, quando NaSCN remove o íon de ferro de dentro de hLF, um novo aLF é gerado para interação direta com Brij58. Portanto, associamos o aumento da formação do complexo [aLF-Brij58] quando a concentração de NaSCN aumentou de 25 mM para 75 mM com a formação de novo aLF a partir de hLF. Como resultado, quando NaSCN é adicionado ao sistema, a interação entre Brij58 e hLF é fortemente afetada negativamente. Os dados de ITC estão muito bem associados a esta proposta. O aumento da concentração de NaSCN até 75 mM promove a desestabilização térmica da estrutura aLF nativa, os valores de T_m mudaram para temperaturas mais baixas em comparação com a

ausência de NaSCN (diminuído em 5,86 °C). Por outro lado, os valores de ΔH_{den} aumentaram em 532,30 kJ mol⁻¹, de modo que aLF permaneceu em sua forma nativa. Uma exceção é observada, onde o valor de T_m aumentou em 1,33 °C e ΔH_{den} diminuiu em 192,80 kJ mol⁻¹ quando a concentração de NaSCN aumentou de 75 para 100 mM de NaSCN.

5.2.3 Conclusão

A termodinâmica das interações entre lactoferrina bovina e surfactante não iônico Brij58 sob diferentes condições de pH e força iônica foi investigada por calorimetria de titulação isotérmica. Brij58 interagiu com bLF de forma independente de acordo com os dois tipos de lóbulos que compõem a proteína. Em todas as condições do sistema estudadas, os resultados indicam que os fatores de entalpia foram as únicas forças motrizes para a formação de [hLF-Brij58] e [aLF-Brij58]. O aumento do pH de 7,4 para 12 promoveu uma forte desnaturação de hLF (lóbulo contendo ferro em seu interior), o que diminuiu a formação do complexo [hLF-Brij58] em 9,7 vezes a pH 12 em comparação com pH 7,4. Em pH 7,4, o aumento da força iônica atuou como uma barreira para a formação de complexos [hLF-Brij58] e [aLF-Brij58]. Em pH 12 a presença de NaSCN promoveu a precipitação de íons de ferro presentes em hLF e a interação entre Brij58 e hLF foi completamente interrompida após concentração de NaSCN 75 mM. De acordo com os dados do NanoDSC, a presença de NaSCN desencadeou a desestabilização térmica das estruturas de bLF nas duas condições de pH investigadas.

REFERÊNCIAS

- ALAM, Parvez; RABBANI, Gulam; BADR, Gamal; BADR, Badr Mohamed; KHAN, Rizwan Hasan. The Surfactant-Induced Conformational and Activity Alterations in *Rhizopus niveus* Lipase. **Cell Biochemistry and Biophysics**, [S. l.], v. 71, n. 2, p. 1199–1206, 2014. ISSN: 10859195. DOI: 10.1007/s12013-014-0329-2.
- ALAM, Parvez; SIDDIQI, Khursheed; CHTURVEDI, Sumit Kumar; KHAN, Rizwan Hasan. **Protein aggregation: From background to inhibition strategies**. **International Journal of Biological Macromolecules** 2017. ISSN: 18790003. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.05.048.
- AMIRI, Razieh; BORDBAR, Abdol Khalegh; GARCÍA-MAYORAL, Ma Flor; KHOSROPOUR, Ahmad Reza; MOHAMMADPOOR-BALTORK, Iraj; MENÉNDEZ, Margarita; LAURENTS, Douglas V. Interactions of gemini surfactants with two model proteins: NMR, CD, and fluorescence spectroscopies. **Journal of Colloid and Interface Science**, [S. l.], 2012. ISSN: 00219797. DOI: 10.1016/j.jcis.2011.11.062.
- BARANAUSKIENE, Lina; KUO, Tai Chih; CHEN, Wen Yih; MATULIS, Daumantas. Isothermal titration calorimetry for characterization of recombinant proteins. **Current Opinion in Biotechnology**, [S. l.], v. 55, p. 9–15, 2019. ISSN: 18790429. DOI: 10.1016/j.copbio.2018.06.003. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.06.003>.
- BASTOS, Livia Pinto Heckert; DE CARVALHO, Carlos Wanderlei Piler; GARCIA-ROJAS, Edwin Elard. Formation and characterization of the complex coacervates obtained between lactoferrin and sodium alginate. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 120, p. 332–338, 2018. ISSN: 18790003. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.08.050. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.050>.
- BOKKHIM, Huma; BANSAL, Nidhi; GRNDAHL, Lisbeth; BHANDARI, Bhesh. Physico-chemical properties of different forms of bovine lactoferrin. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 141, n. 3, p. 3007–3013, 2013. ISSN: 18737072. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.05.139. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.139>.
- BOKKHIM, Huma; TRAN, Trang; BANSAL, Nidhi; GRØNDAHL, Lisbeth; BHANDARI, Bhesh. Evaluation of different methods for determination of the iron saturation level in bovine lactoferrin. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 152, p. 121–127, 2014. ISSN: 18737072. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.11.132. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.132>.
- BRODIN, Jeffrey D.; AMBROGGIO, X. I.; TANG, Chunyan; PARENT, Kristin N.;

- BAKER, Timothy S.; TEZCAN, F. Akif. Metal-directed, chemically tunable assembly of one-, two- and three-dimensional crystalline protein arrays. **Nature Chemistry**, [S. l.], v. 4, n. 5, p. 375–382, 2012. ISSN: 17554330. DOI: 10.1038/nchem.1290.
- BROWN, Alan R.; SLUSSER, Joyce G. Propellant-driven aerosols of functional proteins as potential therapeutic agents in the respiratory tract. **Immunopharmacology**, [S. l.], 1994. ISSN: 01623109. DOI: 10.1016/0162-3109(94)90060-4.
- C., Jose; MURCIANO-CALLES, Javier; S., Eva; IGLESIAS-BEXIGA, Manuel; LUQUE, Irene; RUIZ-SANZ, Javier. Isothermal Titration Calorimetry: Thermodynamic Analysis of the Binding Thermograms of Molecular Recognition Events by Using Equilibrium Models. **Applications of Calorimetry in a Wide Context - Differential Scanning Calorimetry, Isothermal Titration Calorimetry and Microcalorimetry**, [S. l.], 2013. DOI: 10.5772/53311.
- CHEN, Li Jen; LIN, Shi Yow; HUANG, Chiung Chang; CHEN, En Ming. Temperature dependence of critical micelle concentration of polyoxyethylenated non-ionic surfactants. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [S. l.], 1998. ISSN: 09277757. DOI: 10.1016/S0927-7757(97)00238-0.
- CHOI, Ucheor B.; SANABRIA, Hugo; SMIRNOVA, Tatyana; BOWEN, Mark E.; WENINGER, Keith R. Spontaneous switching among conformational ensembles in intrinsically disordered proteins. **Biomolecules**, [S. l.], v. 9, n. 3, p. 1–16, 2019. ISSN: 2218273X. DOI: 10.3390/biom9030114.
- CID, Antonio; MOLDES, Oscar A.; MEJUTO, Juan C.; SIMAL-GANDARA, Jesus. Interaction of caffeic acid with SDS micellar aggregates. **Molecules**, [S. l.], 2019. ISSN: 14203049. DOI: 10.3390/molecules24071204.
- CLARK, D. P.; J., PazdernikN.; MCGEHEE, M. R.; CLARK, D. P., PAZDERNIK, N. J.; MCGEHEE, M. R. **Protein Structure and Function**. [s.l: s.n.]. v. 23 ISSN: 0066-426X. ISBN: 9780128132883. DOI: 10.1146/annurev.pc.23.100172.001121.
- COELHO, Yara Luiza; DE PAULA, Hauster Maximiler C.; AGUDELO, Alvaro Javier P.; DE CASTRO, Alan S. B.; HUDSON, Eliara A.; PIRES, Ana Clarissa S.; SILVA, Luis Henrique M. Lactoferrin-phenothiazine dye interactions: Thermodynamic and kinetic approach. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 136, p. 559–569, 2019. ISSN: 18790003. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.06.097. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.097>.
- CSERHATI, T. Alkyl ethoxylated and alkylphenol ethoxylated nonionic surfactants: Interaction with bioactive compounds and biological effects. **Environmental Health**

Perspectives, [*S. l.*], v. 103, n. 4, p. 358–364, 1995. ISSN: 00916765. DOI: 10.1289/ehp.95103358.

DE MOL, Nico J.; FISCHER, Marcel J. E. Chapter 5. Kinetic and Thermodynamic Analysis of Ligand–Receptor Interactions: SPR Applications in Drug Development. *In: Handbook of Surface Plasmon Resonance*. [s.l.: s.n.]. DOI: 10.1039/9781847558220-00123.

DE MOL, Nico J.; FISCHER, Marcel J. E. **Surface Plasmon Resonance: Methods and Protocols**. [s.l.: s.n.]. ISSN: 18728294. ISBN: 9781607616696. DOI: 10.1007/978-1-60761-670-2.

DE PAULA, Hauster M. C.; COELHO, Yara L.; DE CASTRO, Alan S. B.; REZENDE, Jaqueline P.; PIRES, Ana C. S.; DA SILVA, Luis H. M. Activated complex approach to describe bovine serum albumin-azure a and bovine serum albumin-azure b intermolecular interactions. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [*S. l.*], v. 31, n. 12, p. 2611–2619, 2020. ISSN: 16784790. DOI: 10.21577/0103-5053.20200143.

DE, Swati; GIRIGOSWAMI, Agnishwar; DAS, Susmita. Fluorescence probing of albumin-surfactant interaction. **Journal of Colloid and Interface Science**, [*S. l.*], v. 285, n. 2, p. 562–573, 2005. ISSN: 00219797. DOI: 10.1016/j.jcis.2004.12.022.

DOBSON, Christopher M. **Protein folding and misfolding**. **Nature** 2003. ISSN: 00280836. DOI: 10.1038/nature02261.

DRESCHER, Dennis G.; SELVAKUMAR, Dakshnamurthy; DRESCHER, Marian J. **Analysis of Protein Interactions by Surface Plasmon Resonance**. 1. ed., [s.l.] : Elsevier Inc., 2018. v. 110 ISSN: 18761623. ISBN: 9780128143445. DOI: 10.1016/bs.apcsb.2017.07.003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.apcsb.2017.07.003>.

DURCHSCHLAG, H.; TIEFENBACH, K. J.; WEBER, R.; KUCHENMÜLLER, B.; JAENICKE, R. Comparative investigations of the molecular properties of detergents and protein-detergent complexes. **Colloid and Polymer Science**, [*S. l.*], v. 278, n. 4, p. 312–320, 2000. ISSN: 0303402X. DOI: 10.1007/s003960050519.

EISSA, Ahmed S. Effect of SDS on whey protein polymers. Molecular investigation via dilute solution viscometry and dynamic light scattering. **Food Hydrocolloids**, [*S. l.*], v. 87, n. July 2018, p. 97–100, 2019. ISSN: 0268005X. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2018.07.046. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.07.046>.

EMBLETON, Nicholas D.; BERRINGTON, Janet E.; MCGUIRE, William; STEWART, Chris J.; CUMMINGS, Stephen P. Lactoferrin: Antimicrobial activity and therapeutic potential. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**, [*S. l.*], v. 18, n. 3, p. 143–149, 2013.

ISSN: 18780946. DOI: 10.1016/j.siny.2013.02.001. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.siny.2013.02.001>.

FAINERMAN, V. B.; MÖBIUS, D.; MILLER, R. Surfactants - Chemistry, Interfacial Properties, Applications. *In: Studies in Interface Science*. [s.l.: s.n.]. ISSN: 13837303. ISBN: 0 444 50962 3.

FATHI, Farzaneh; MOHAMMADZADEH-AGHDASH, Hossein; SOHRABI, Yousef; DEHGHAN, Parvin; EZZATI NAZHAD DOLATABADI, Jafar. Kinetic and thermodynamic studies of bovine serum albumin interaction with ascorbyl palmitate and ascorbyl stearate food additives using surface plasmon resonance. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 246, n.

November 2017, p. 228–232, 2018. ISSN: 18737072. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.11.023.

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.023>.

FEGAN, Adrian; WHITE, Brian; CARLSON, Jonathan C. T.; WAGNER, Carston R.

Chemically controlled protein assembly: Techniques and applications. **Chemical Reviews**, [S. l.], v. 110, n. 6, p. 3315–3336, 2010. ISSN: 00092665. DOI: 10.1021/cr8002888.

FERREIRA, Gabriel Max Dias; FERREIRA, Guilherme Max Dias; AGUDELO, Álvaro Javier Patiño; HUDSON, Eliara Acipreste; PIRES, Ana Clarissa dos Santos; DA SILVA, Luis Henrique Mendes. Lactoferrin denaturation induced by anionic surfactants: The role of the ferric ion in the protein stabilization. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 117, p. 1039–1049, 2018 a. ISSN: 18790003. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.05.058. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.058>.

FERREIRA, Gabriel Max Dias; FERREIRA, Guilherme Max Dias; AGUDELO, Álvaro Javier Patiño; HUDSON, Eliara Acipreste; PIRES, Ana Clarissa dos Santos; DA SILVA, Luis Henrique Mendes. Lactoferrin denaturation induced by anionic surfactants: The role of the ferric ion in the protein stabilization. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 117, p. 1039–1049, 2018 b. ISSN: 18790003. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.05.058. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.058>.

FILIPPOV, Sergey; HRUBÝ, Martin; KOŇÁK, Čestmír; MACKOVÁ, Hana; ŠPÍRKOVÁ, Milena; ŠTĚPÁNEK, Petr. Novel pH-responsive nanoparticles. **Langmuir**, [S. l.], v. 24, n. 17, p. 9295–9301, 2008. ISSN: 07437463. DOI: 10.1021/la801472x.

FINBLOOM, Joel A.; FRANCIS, Matthew B. **Supramolecular strategies for protein immobilization and modification**. **Current Opinion in Chemical Biology** 2018. ISSN: 18790402. DOI: 10.1016/j.cbpa.2018.05.023.

FLORINSKAYA, Anna; ERSHOV, Pavel; MEZENTSEV, Yuri; KALUZHSKIY, Leonid; YABLOKOV, Evgeniy; MEDVEDEV, Alexei; IVANOV, Alexis. **SPR biosensors in direct**

molecular fishing: Implications for protein interactomics. Sensors (Switzerland) 2018.

ISSN: 14248220. DOI: 10.3390/s18051616.

FRANCO, Indira; PÉREZ, María Dolores; CONESA, Celia; CALVO, Miguel; SÁNCHEZ, Lourdes. **Effect of technological treatments on bovine lactoferrin: An overview. Food Research International** 2018. ISSN: 18737145. DOI: 10.1016/j.foodres.2017.12.016.

FRANZETTI, A.; DI GENNARO, P.; BESTETTI, G.; LASAGNI, M.; PITEA, D.;

COLLINA, E. Selection of surfactants for enhancing diesel hydrocarbons-contaminated media bioremediation. **Journal of Hazardous Materials, [S. l.]**, 2008. ISSN: 03043894.

DOI: 10.1016/j.jhazmat.2007.08.005.

GARIDEL, Patrick; HOFFMANN, Claudia; BLUME, Alfred. A thermodynamic analysis of the binding interaction between polysorbate 20 and 80 with human serum albumins and immunoglobulins: A contribution to understand colloidal protein stabilisation. **Biophysical Chemistry, [S. l.]**, v. 143, n. 1–2, p. 70–78, 2009. ISSN: 03014622. DOI:

10.1016/j.bpc.2009.04.004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpc.2009.04.004>.

GEDIG, Erk T. Chapter 6. Surface Chemistry in SPR Technology. *In: Handbook of Surface Plasmon Resonance.* [s.l: s.n.]. DOI: 10.1039/9780854042678-00173.

GHOSH, Narayani; MONDAL, Ramakanta; DESHMUKH, Arundhati; DUTTA, Sanjay;

MUKHERJEE, Saptarshi. Weak interactive forces govern the interaction between a non-ionic surfactant with human serum albumin. **Chemical Physics Letters, [S. l.]**, v. 634, p. 77–82, 2015. ISSN: 00092614. DOI: 10.1016/j.cplett.2015.05.046. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cplett.2015.05.046>.

GODDARD, E. D.; ANANTHAPADMANABHAN, K. P. **Interactions of surfactants with polymers and proteins.** [s.l: s.n.]. ISBN: 9781351082235. DOI: 10.1201/9781351073783.

GONZÁLEZ-CHÁVEZ, Susana A.; ARÉVALO-GALLEGOS, Sigifredo; RASCÓN-CRUZ, Quintín. Lactoferrin: structure, function and applications. **International Journal of Antimicrobial Agents, [S. l.]**, v. 33, n. 4, p. 301.e1-301.e8, 2009. ISSN: 09248579. DOI:

10.1016/j.ijantimicag.2008.07.020.

GULL, Nuzhat; SEN, Priyankar; KHAN, Rizwan Hasan; KABIR-UD-DIN. Interaction of bovine (BSA), rabbit (RSA), and porcine (PSA) serum albumins with cationic single-chain/gemini surfactants: A comparative study. **Langmuir, [S. l.]**, 2009. ISSN: 07437463. DOI: 10.1021/la901639h.

GUO, Ming; LU, Xiaowang; WANG, Yan; BRODELIUS, Peter E. Comparison of the interaction between lactoferrin and isomeric drugs. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, [S. l.]**, v. 173, p. 593–607, 2017. ISSN:

10.1016/j.spectrochim.2017.05.010.

GUO, Ming; LU, Xiaowang; WANG, Yan; BRODELIUS, Peter E. Comparison of the interaction between lactoferrin and isomeric drugs. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, [S. l.]**, v. 173, p. 593–607, 2017. ISSN:

10.1016/j.spectrochim.2017.05.010.

GUO, Ming; LU, Xiaowang; WANG, Yan; BRODELIUS, Peter E. Comparison of the interaction between lactoferrin and isomeric drugs. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, [S. l.]**, v. 173, p. 593–607, 2017. ISSN:

10.1016/j.spectrochim.2017.05.010.

13861425. DOI: 10.1016/j.saa.2016.10.029. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2016.10.029>.

HAMBORG, Louise; HORSTED, Emma Wenzel; JOHANSSON, Kristoffer Enøe; WILLEMOËS, Martin; LINDORFF-LARSEN, Kresten; TEILUM, Kaare. Global analysis of protein stability by temperature and chemical denaturation. **Analytical Biochemistry**, [S. l.], 2020. ISSN: 10960309. DOI: 10.1016/j.ab.2020.113863.

HAMILL, Andrea C.; WANG, Shao Chun; LEE, C. Ted. Probing lysozyme conformation with light reveals a new folding intermediate. **Biochemistry**, [S. l.], 2005. ISSN: 00062960. DOI: 10.1021/bi051646c.

HASSAN, Natalia; VERDES, Pedro V.; RUSO, Juan M. Assessment of interactions between four proteins and benzothiazole derivatives by DSC and CD. **Journal of Chemical Thermodynamics**, [S. l.], v. 43, n. 3, p. 399–404, 2011. ISSN: 00219614. DOI: 10.1016/j.jct.2010.10.015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jct.2010.10.015>.

HATAMI, Asa; MONJAZEB, Sanaz; MILTON, Saskia; GLABE, Charles G. Familial Alzheimer's disease mutations within the amyloid precursor protein alter the aggregation and conformation of the amyloid- β peptide. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], 2017. ISSN: 1083351X. DOI: 10.1074/jbc.M116.755264.

HOLDGATE, G. A. Making cool drugs hot: Isothermal titration calorimetry as a tool to study binding energetics. **BioTechniques**, [S. l.], 2001. ISSN: 07366205.

HOLMBERG, Krister. Interactions between surfactants and hydrolytic enzymes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S. l.], v. 168, p. 169–177, 2018. ISSN: 18734367. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2017.12.002. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.12.002>.

HU, Fangyu; PAN, Fenggang; SAWANO, Yoriko; MAKINO, Tsukasa; KAKEHI, Yuji; KOMIYAMA, Makoto; KAWAKAMI, Hiroshi; TANOKURA, Masaru. Studies of the structure of multiferric iron-bound lactoferrin: A new antianemic edible material. **International Dairy Journal**, [S. l.], v. 18, n. 10–11, p. 1051–1056, 2008. ISSN: 09586946. DOI: 10.1016/j.idairyj.2008.05.003.

HUANG, Junyi et al. Studies on the Interaction between Three Small Flavonoid Molecules and Bovine Lactoferrin. **BioMed research international**, [S. l.], v. 2018, p. 7523165, 2018. ISSN: 23146141. DOI: 10.1155/2018/7523165.

HUANG, Xiang Feng; WANG, Yi Han; SHEN, Yi; PENG, Kai Ming; LU, Li Jun; LIU, Jia. Using non-ionic surfactant as an accelerator to increase extracellular lipid production by oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* MUCL 29819. **Bioresource Technology**, [S. l.], v.

274, n. November 2018, p. 272–280, 2019. ISSN: 18732976. DOI:

10.1016/j.biortech.2018.11.100. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.11.100>.

HUDSON, Eliara Acipreste; DE PAULA, Hauster Maximiler Campos; DA SILVA, Richard Marins; PIRES, Ana Clarissa dos Santos; DA SILVA, Luis Henrique Mendes. Curcumin-micellar casein multisite interactions elucidated by surface plasmon resonance. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], 2019. ISSN: 18790003. DOI:

10.1016/j.ijbiomac.2019.04.166.

IGLESIAS-FIGUEROA, Blanca F.; ESPINOZA-SÁNCHEZ, Edward A.; SIQUEIROS-CENDÓN, Tania S.; RASCÓN-CRUZ, Quintín. **Lactoferrin as a nutraceutical protein from milk, an overview**. **International Dairy Journal** 2019. ISSN: 09586946. DOI:

10.1016/j.idairyj.2018.09.004.

JANEK, Tomasz; CZYŻNIKOWSKA; ŁUCZYŃSKI, Jacek; GUDIÑA, Eduardo J.; RODRIGUES, Lígia R.; GAŁĘZOWSKA, Joanna. Physicochemical study of biomolecular interactions between lysosomotropic surfactants and bovine serum albumin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S. l.], v. 159, p. 750–758, 2017. ISSN: 18734367. DOI:

10.1016/j.colsurfb.2017.08.046.

KANYSHKOVA, T. G.; BUNEVA, V. N.; NEVINSKY, G. A. Review: Lactoferrin and its biological functions. **Biokhimiya**, [S. l.], v. 66, n. 1, p. 5–13, 2001. ISSN: 03209725.

KAPOOR, Yash; CHAUHAN, Anuj. Drug and surfactant transport in Cyclosporine A and Brij 98 laden p-HEMA hydrogels. **Journal of Colloid and Interface Science**, [S. l.], v. 322, n. 2, p. 624–633, 2008. ISSN: 00219797. DOI: 10.1016/j.jcis.2008.02.028.

KAUSHAL, D.; RANA, D. S.; CHAUHAN, S. Effect of Furosemide on denaturation of lysozyme in the presence of ionic surfactant at different temperatures. **Fluid Phase Equilibria**, [S. l.], 2013. ISSN: 03783812. DOI: 10.1016/j.fluid.2013.09.059.

KELLEY, D.; MCCLEMENTS, D. J. Interactions of bovine serum albumin with ionic surfactants in aqueous solutions. **Food Hydrocolloids**, [S. l.], 2003. ISSN: 0268005X. DOI: 10.1016/S0268-005X(02)00040-1.

KERSTENS, Sven; MURRAY, Brent S.; DICKINSON, Eric. **Microstructure of β -lactoglobulin-stabilized emulsions containing non-ionic surfactant and excess free protein: Influence of heating**. **Journal of Colloid and Interface Science** 2006. ISSN: 00219797. DOI: 10.1016/j.jcis.2005.08.046.

KHAN, Tarik A.; MAHLER, Hanns Christian; KISHORE, Ravuri S. K. Key interactions of surfactants in therapeutic protein formulations: A review. **European Journal of**

- Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [*S. l.*], v. 97, p. 60–67, 2015. ISSN: 18733441. DOI: 10.1016/j.ejpb.2015.09.016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.09.016>.
- KNEPPER, Thomas P.; BERNA, José Luis. **Chapter 1 Surfactants: Properties, production, and environmental Aspects**. **Comprehensive Analytical Chemistry** 2003. ISSN: 0166526X. ISBN: 9780444509352. DOI: 10.1016/S0166-526X(03)40004-4.
- LELIS, Carini Aparecida; HUDSON, Eliara Acipreste; FERREIRA, Guilherme Max Dias; FERREIRA, Gabriel Max Dias; DA SILVA, Luis Henrique Mendes; DA SILVA, Maria do Carmo Hespanhol; PINTO, Maximiliano Soares; PIRES, Ana Clarissa dos Santos. Binding thermodynamics of synthetic dye Allura Red with bovine serum albumin. **Food Chemistry**, [*S. l.*], v. 217, p. 52–58, 2017. ISSN: 18737072. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.08.080. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.080>.
- LI, Yan; LEE, Jae Seung. Staring at protein-surfactant interactions: Fundamental approaches and comparative evaluation of their combinations - A review. **Analytica Chimica Acta**, [*S. l.*], v. 1063, p. 18–39, 2019. ISSN: 18734324. DOI: 10.1016/j.aca.2019.02.024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.02.024>.
- LI, Yan; MCCLEMENTS, David Julian. Influence of non-ionic surfactant on electrostatic complexation of protein-coated oil droplets and ionic biopolymers (alginate and chitosan). **Food Hydrocolloids**, [*S. l.*], v. 33, n. 2, p. 368–375, 2013. ISSN: 0268005X. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2013.04.016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.04.016>.
- MALIK, Nisar Ahmad. **Surfactant–Amino Acid and Surfactant–Surfactant Interactions in Aqueous Medium: a Review**. **Applied Biochemistry and Biotechnology** 2015. ISSN: 15590291. DOI: 10.1007/s12010-015-1712-1.
- MANDAL, Harasit Kumar; KUNDU, Arjama; BALTI, Subrata; MAHAPATRA, Ambikesh. Kinetic investigation on the oxidation of tris(1,10-phenanthroline)iron(II) by oxone: The effect of BSA-SDS interaction. **Journal of Colloid and Interface Science**, [*S. l.*], v. 378, n. 1, p. 110–117, 2012. ISSN: 00219797. DOI: 10.1016/j.jcis.2012.04.017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2012.04.017>.
- MCDONNELL, James M. Surface plasmon resonance: Towards an understanding of the mechanisms of biological molecular recognition. **Current Opinion in Chemical Biology**, [*S. l.*], v. 5, n. 5, p. 572–577, 2001. ISSN: 13675931. DOI: 10.1016/S1367-5931(00)00251-9.
- MICHNIK, A. Thermal stability of bovine serum albumin DSC study. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, [*S. l.*], 2003. ISSN: 13886150. DOI: 10.1023/A:1022851809481.
- MIRGORODSKAYA, A. B.; KUSHNAZAROVA, R. A.; LUKASHENKO, S. S.;

- ZAKHAROVA, L. Ya. Aggregation behavior and solubilization properties of 3-hydroxypiperidinium surfactants. **Russian Chemical Bulletin**, [S. l.], v. 68, n. 2, p. 328–333, 2019. ISSN: 15739171. DOI: 10.1007/s11172-019-2388-4.
- MISRA, Pramila K.; DASH, Uma; MAHARANA, Suprava. Investigation of bovine serum albumin-surfactant aggregation and its physicochemical characteristics. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [S. l.], 2015. ISSN: 18734359. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2015.06.052.
- MORENO-EXPÓSITO, Luis; ILLESCAS-MONTES, Rebeca; MELGUIZO-RODRÍGUEZ, Lucía; RUIZ, Concepción; RAMOS-TORRECILLAS, Javier; DE LUNA-BERTOS, Elvira. Multifunctional capacity and therapeutic potential of lactoferrin. **Life Sciences**, [S. l.], v. 195, n. November 2017, p. 61–64, 2018. ISSN: 18790631. DOI: 10.1016/j.lfs.2018.01.002. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.01.002>.
- NEURATH, H. **Evolution of proteolytic enzymes**. **Science** 1984. ISSN: 00368075. DOI: 10.1126/science.6369538.
- NIELSEN, Anders D.; ARLETH, Lise; WESTH, Peter. Analysis of protein-surfactant interactions - A titration calorimetric and fluorescence spectroscopic investigation of interactions between *Humicola insolens* cutinase and an anionic surfactant. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, [S. l.], 2005. ISSN: 15709639. DOI: 10.1016/j.bbapap.2005.08.001.
- NIELSEN, Anders D.; BORCH, Kim; WESTH, Peter. Thermochemistry of the specific binding of C12 surfactants to bovine serum albumin. **Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology**, [S. l.], v. 1479, n. 1–2, p. 321–331, 2000. ISSN: 01674838. DOI: 10.1016/S0167-4838(00)00012-1.
- NUNES, Natália M.; DE PAULA, Hauster M. C.; COELHO, Yara L.; DA SILVA, Luis Henrique M.; PIRES, Ana Clarissa S. Surface plasmon resonance study of interaction between lactoferrin and naringin. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 297, n. June, p. 125022, 2019. ISSN: 18737072. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.125022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125022>.
- OTZEN, Daniel. Protein-surfactant interactions: A tale of many states. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, [S. l.], v. 1814, n. 5, p. 562–591, 2011. ISSN: 15709639. DOI: 10.1016/j.bbapap.2011.03.003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.03.003>.
- OTZEN, Daniel E. Proteins in a brave new surfactant world. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, [S. l.], v. 20, n. 3, p. 161–169, 2015. ISSN: 18790399. DOI:

- 10.1016/j.cocis.2015.07.003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cocis.2015.07.003>.
- OTZEN, Daniel E.; SEHGAL, Pankaj; WESTH, Peter. α -Lactalbumin is unfolded by all classes of surfactants but by different mechanisms. **Journal of Colloid and Interface Science**, [S. l.], 2009. ISSN: 00219797. DOI: 10.1016/j.jcis.2008.10.021.
- PIETERS, Bas J. G. E.; VAN ELDIJK, Mark B.; NOLTE, Roeland J. M.; MECINOVIĆ, Jasmin. Natural supramolecular protein assemblies. **Chemical Society Reviews**, [S. l.], v. 45, n. 1, p. 24–39, 2016. ISSN: 14604744. DOI: 10.1039/c5cs00157a.
- PILIARIK, Marek; HOMOLA, Jiří. SPR Sensor Instrumentation. *In*: [s.l.: s.n.]. DOI: 10.1007/5346_016.
- PRABOWO, Brilliant Adhi; PURWIDYANTRI, Agnes; LIU, Kou Chen. **Surface plasmon resonance optical sensor: A review on light source technology**. **Biosensors** 2018. ISSN: 20796374. DOI: 10.3390/bios8030080.
- PSIMADAS, Dimitrios; GEORGOULIAS, Panagiotis; VALOTASSIOU, Varvara; LOUDOS, George. Molecular Nanomedicine Towards Cancer : **Journal of pharmaceutical sciences**, [S. l.], v. 101, n. 7, p. 2271–2280, 2012. DOI: 10.1002/jps.
- RANDOLPH, Theodore; LATOYA, Jones. Surfactant-Protein Interactions." Rational Design of Stable Protein Formulations: Theory and Practice. **New York: Kluwer Academic**, [S. l.], 2002.
- RAVAL, Ami; BAHADUR, Pratap; RAVAL, Ankur. Effect of nonionic surfactants in release media on accelerated in-vitro release profile of sirolimus eluting stents with biodegradable polymeric coating. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 45–54, 2018. ISSN: 20951779. DOI: 10.1016/j.jpha.2017.06.002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpha.2017.06.002>.
- REZENDE, Jaqueline de Paula; HUDSON, Eliara Acipreste; DE PAULA, Hauster Maximiler Campos; COELHO, Yara Luiza; DA SILVA, Luis Henrique Mendes; PIRES, Ana Clarissa dos Santos. Thermodynamic and kinetic study of epigallocatechin-3-gallate-bovine lactoferrin complex formation determined by surface plasmon resonance (SPR): A comparative study with fluorescence spectroscopy. **Food Hydrocolloids**, [S. l.], v. 95, n. May, p. 526–532, 2019. ISSN: 0268005X. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2019.04.065. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.04.065>.
- REZENDE, Jaqueline de Paula; HUDSON, Eliara Acipreste; DE PAULA, Hauster Maximiler Campos; MEINEL, Raissa Soares; DA SILVA, Adilson David; DA SILVA, Luis Henrique Mendes; PIRES, Ana Clarissa dos Santos. Human serum albumin-resveratrol complex formation: Effect of the phenolic chemical structure on the kinetic and thermodynamic

- parameters of the interactions. **Food Chemistry**, [S. l.], 2020. ISSN: 18737072. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.125514.
- ROSS, Philip D.; SUBRAMANIAN, S. Thermodynamics of Protein Association Reactions: Forces Contributing to Stability. **Biochemistry**, [S. l.], v. 20, n. 11, p. 3096–3102, 1981. ISSN: 15204995. DOI: 10.1021/bi00514a017.
- RÜHMANN, Eggert; BETZ, Michael; FRICKE, Marie; HEINE, Andreas; SCHÄFER, Martina; KLEBE, Gerhard. Thermodynamic signatures of fragment binding: Validation of direct versus displacement ITC titrations. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, [S. l.], 2015. ISSN: 18728006. DOI: 10.1016/j.bbagen.2014.12.007.
- RUSSO KRAUSS, Irene; CAVASSO, Domenico; CICCARELLI, Donato; HEENAN, Richard K.; ORTONA, Ornella; D'ERRICO, Gerardino; PADUANO, Luigi. A Hofmeister series perspective on the mixed micellization of cationic and non-ionic surfactants. **Journal of Molecular Liquids**, [S. l.], 2021. ISSN: 01677322. DOI: 10.1016/j.molliq.2021.116205.
- SJÖGREN, Helen; ERICSSON, Caroline A.; EVENÄS, Johan; ULVENLUND, Stefan. Interactions between charged polypeptides and nonionic surfactants. **Biophysical Journal**, [S. l.], v. 89, n. 6, p. 4219–4233, 2005. ISSN: 00063495. DOI: 10.1529/biophysj.105.065342.
- SRIVASTAVA, Rachana; ALAM, Md Sayem. Effect of pH and surfactant on the protein: A perspective from theory and experiments. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 107, p. 1519–1527, 2018. ISSN: 18790003. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.10.019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.019>.
- THIEMANN, Otavio Henrique. A Descoberta da Estrutura do DNA: de Mendel a Watson e Crick. **Química Nova na Escola**, [S. l.], 2003. ISSN: 01040405.
- UCHIDA, Masaki; KANG, Sebyung; REICHHARDT, Courtney; HARLEN, Kevin; DOUGLAS, Trevor. The ferritin superfamily: Supramolecular templates for materials synthesis. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, [S. l.], v. 1800, n. 8, p. 834–845, 2010. ISSN: 03044165. DOI: 10.1016/j.bbagen.2009.12.005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.12.005>.
- VALENTE, Artur J. M.; SÖDERMAN, Olle. The formation of host-guest complexes between surfactants and cyclodextrins. **Advances in Colloid and Interface Science**, [S. l.], v. 205, p. 156–176, 2014. ISSN: 00018686. DOI: 10.1016/j.cis.2013.08.001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2013.08.001>.
- VALSTAR, Ank; VASILESCU, Marilena; VIGOUROUX, Cécile; STILBS, Peter; ALMGREN, Mats. Heat-set bovine serum albumin-sodium dodecyl sulfate gels studied by

fluorescence probe methods, NMR, and light scattering. **Langmuir**, [S. l.], 2001. ISSN: 07437463. DOI: 10.1021/la0016221.

VASILESCU, Marilena; ANGELESCU, Daniel; ALMGREN, Mats; VALSTAR, Ank. Interactions of globular proteins with surfactants studied with fluorescence probe methods. **Langmuir**, [S. l.], 1999. ISSN: 07437463. DOI: 10.1021/la981424y.

VLASOVA, I. M.; VLASOV, A. A.; GRAPENDAAL, G. R.; SALETSKII, A. M. Association Constants in the Bovine Serum Albumin/Human Serum Albumin–Tween 20 System in Aqueous Solutions. **Russian Journal of Physical Chemistry A**, [S. l.], v. 92, n. 4, p. 714–718, 2018. ISSN: 00360244. ISBN: 0036024418040. DOI: 10.1134/S0036024418040325.

WATANABE, Yumiko; ABURATANI, Kenichi; MIZUMURA, Tasuku; SAKAI, Masatoshi; MURAOKA, Shiroo; MAMEGOSI, Shinichi; HONJOH, Tsutomu. Novel ELISA for the detection of raw and processed egg using extraction buffer containing a surfactant and a reducing agent. **Journal of Immunological Methods**, [S. l.], 2005. ISSN: 00221759. DOI: 10.1016/j.jim.2005.02.014.

YAO, Xiaolin et al. The influence of non-ionic surfactant on lipid digestion of gum Arabic stabilized oil-in-water emulsion. **Food Hydrocolloids**, [S. l.], v. 74, p. 78–86, 2018. ISSN: 0268005X. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2017.07.043. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.07.043>.

YEATES, Todd O.; PADILLA, Jennifer E. Designing supramolecular protein assemblies. **Current Opinion in Structural Biology**, [S. l.], v. 12, n. 4, p. 464–470, 2002. ISSN: 0959440X. DOI: 10.1016/S0959-440X(02)00350-0. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0959-440X\(02\)00350-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0959-440X(02)00350-0).

ZAMAN, Masihuz; KHAN, Asra Nasir; WAHIDUZZAMAN; ZAKARIYA, Syed Mohammad; KHAN, Rizwan Hasan. **Protein misfolding, aggregation and mechanism of amyloid cytotoxicity: An overview and therapeutic strategies to inhibit aggregation**. **International Journal of Biological Macromolecules** 2019. ISSN: 18790003. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.05.109.

ZHANG, Jianxiang; MA, Peter X. Cyclodextrin-based supramolecular systems for drug delivery: Recent progress and future perspective. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S. l.], v. 65, n. 9, p. 1215–1233, 2013. ISSN: 18728294. DOI: 10.1016/j.addr.2013.05.001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2013.05.001>.

ZHOU, Yan; CHEN, Hongmei; QI, Feng; ZHAO, Xuebing; LIU, Dehua. Non-ionic surfactants do not consistently improve the enzymatic hydrolysis of pure cellulose.

Bioresource Technology, [S. l.], v. 182, p. 136–143, 2015. ISSN: 18732976. DOI:
10.1016/j.biortech.2015.01.137. Disponível em:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.137>.

APÊNDICE

A seguir são mostrados dados complementares da tese:

Figura S1. Sensogramas de cinética de interação para soluções de Brij58 (9-16 μM) que fluem sobre uma superfície de um sensor chip CM5 Biacore imobilizado por lactoferrina (3945 RU) a temperaturas: (a) 289,15 K, (b) 293,15 K, (c) 297,15 K e (d) 301,15 K.

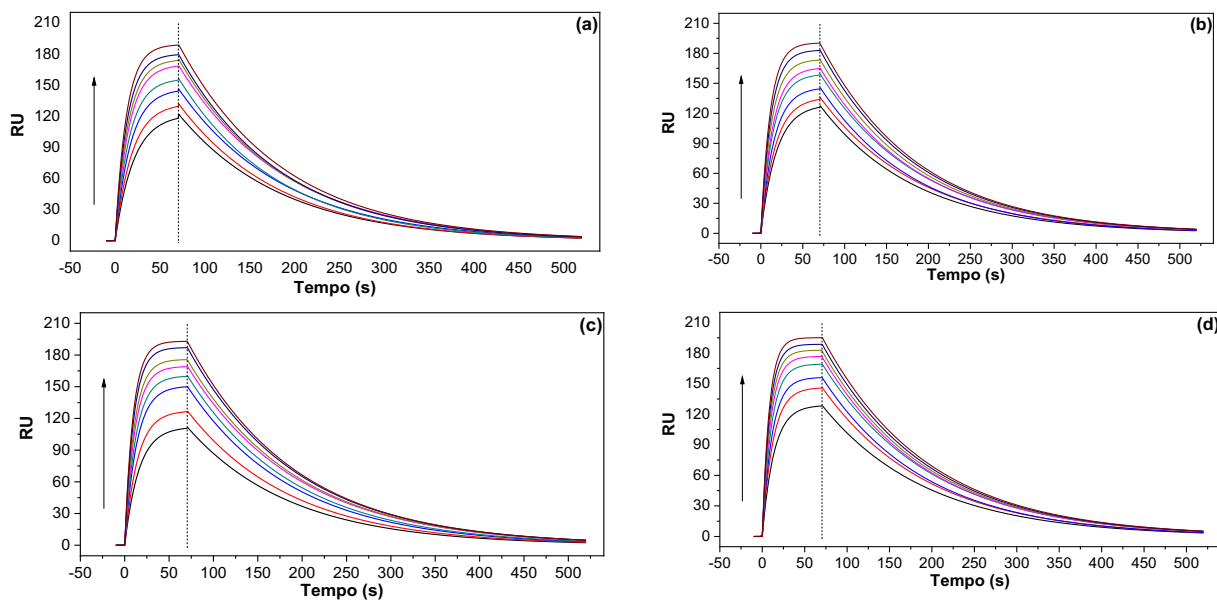


Figura S2. Alteração na absorvância de soluções de vermelho carmim no máximo de absorção (525 nm) em várias concentrações de Brij58 a pH 7,4.

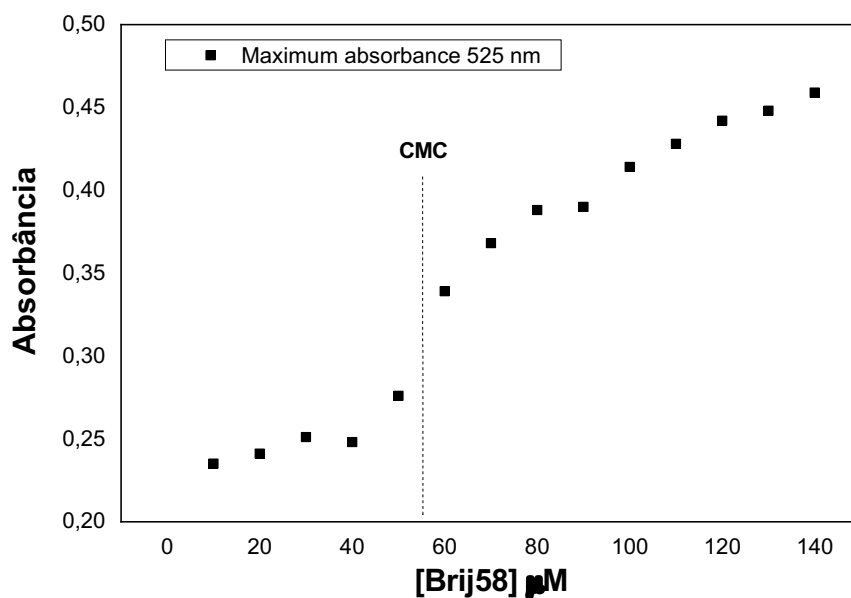


Figura S3. Gráfico de K_{obs} em função da concentração de Brij58, usado para determinar k_a nas temperaturas: (■) 289,15 K, (●) 293,15 K, (▲) 297,15 K, (○) 298,15 K, e (△) 301,15 K.

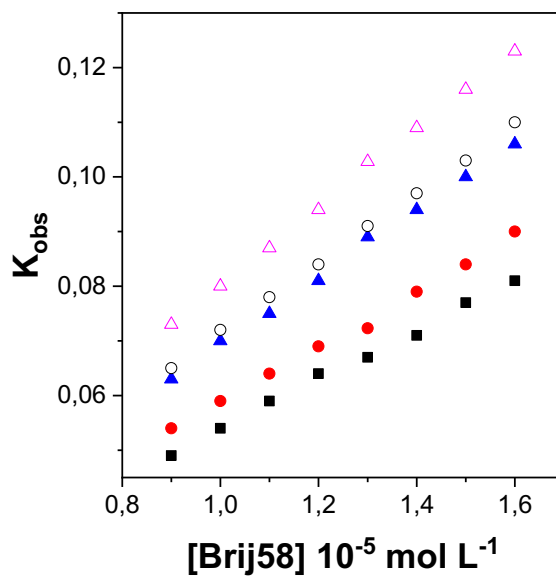


Tabela S1. Valores de ΔH_{den} e T_m associados às transições térmicas de aLF e hLF em diferentes concentrações de NaSCN a pH 7,4.

hLF			
NaSCN (mmol L ⁻¹)	$\Delta H_{den}/ \text{kJ mol}^{-1}$	T_m (°C)	T (°C) range
0	168,70	79,17	73-85
25	85,90	80,24	72-85
50	70,60	81,07	70-85
75	57,80	81,07	70-85
100	-	-	-
aLF			
NaSCN (mmol L ⁻¹)	$\Delta H_{den}/ \text{kJ mol}^{-1}$	T_m (°C)	T (°C) range
0	971,00	68,91	55-75
25	878,00	67,97	55-75
50	661,20	66,39	55-75
75	473,50	64,62	55-75
100	-	-	-

Tabela S2. Valores de ΔH_{den} e T_m associados à transição térmica aLF em diferentes concentrações de NaSCN a pH 12.

aLF			
NaSCN (mmol L⁻¹)	$\Delta H_{den}/ \text{kJ mol}^{-1}$	T_m (°C)	T (°C) range
0	621,90	66,56	50-75
25	784,60	62,51	50-70
50	978,70	61,84	50-70
75	1154,20	60,69	50-70
100	961,40	62,02	50-70