



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA - UFSC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ESTUDO DA AUTO-ASSOCIAÇÃO DE BIOPOLÍMEROS COM
SURFACTANTES

SAMUEL DE MEDEIROS MODOLON

ORIENTADOR
PROF. Dr. EDSON MINATTI

Florianópolis
2009.

SAMUEL DE MEDEIROS MODOLON

ESTUDO DA AUTO-ASSOCIAÇÃO DE BIOPOLÍMEROS COM
SURFACTANTES

ORIENTADOR: PROF. DR. EDSOM MINATTI

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Físico-Química

Florianópolis
2009

SAMUEL DE MEDEIROS MODOLON

ESTUDO DA AUTO-ASSOCIAÇÃO DE BIOPOLÍMEROS COM SURFACTANTES

Esta dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção do título de **Mestre em Química** no **Programa de Pós-Graduação em Química** da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 16 de fevereiro de 2009.

Prof. Dr. Ademir Neves
Coordenador do Programa

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Edson Minatti
Orientador
(UFSC)

Prof. Dr. Nito Ângelo Debacher
(UFSC)

Prof. Dr. Pedro Luiz Manique Barreto
(UFSC)

Prof^ª. Dr^ª Elenara Lemos Senna
(UFSC)

AGRADECIMENTOS

Ao orientador professor Dr. Edson Minatti por toda dedicação, conhecimentos transmitidos e pela amizade adquirida ao longo do tempo.

Aos professores Nito A. Debacher, Pedro Luiz Manique Barreto e Elenara Lemos Senna que participaram da Banca Examinadora.

Aos colegas e amigos dos laboratórios 205 e 305.

Ao laboratório de Materiais Poliméricos, 202/204.

Ao Jadir e a Graça pela amizade e serviços prestados.

A minha família por toda a confiança que foram em mim confinadas, especialmente ao meu irmão Sidnei e minha mãe.

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

Aos meus amigos Klaiani, Leandro, Samira, Marcel, Ricardo, Silvane e Renato.

Ao meu amigo Claudio por todos os conselhos.

A Capes pelo suporte financeiro.

A Deus.

Meu Muito Obrigado

ÍNDICE GERAL

Índice de Figuras.....	VII
Índice de Tabelas.....	X
Lista de símbolos e abreviaturas.....	XI
Resumo.....	XII
Abstract.....	XIII

Capítulo I

Introdução.....	1
1.1. Surfactantes.....	1
1.2. Micelas e Concentração Micelar Crítica (cmc).....	2
1.3. Biossurfactantes - Sais biliares.....	4
1.4. Celulose e o Polímero não Iônico Etil(hidroxietil)Celulose (EHEC).....	6
1.5. Proteínas-Caseína.....	9
1.6. Técnicas.....	11
1.6.1. Condutividade elétrica.....	11
1.6.2. Tensão superficial.....	12
1.6.3. Fluorescência.....	13
Objetivos.....	17

Capítulo II

Parte Experimental.....	18
2.1. Materiais e Reagentes.....	18
2.2. Equipamentos e Métodos Utilizados.....	18
2.2.1. Medidas de pH.....	18
2.2.2. Método condutivimétrico.....	18
2.2.3. Método Tensiométrico.....	19
2.2.4. Método fluorimétrico.....	19

Capítulo III

Resultados e Discussões.....	20
3.1. Interação de EHEC com SDoD e NaDC.....	20
3.1.1. Condutividade Elétrica de SDoD na Ausência e em Presença de EHEC.....	20
3.1.2. Condutividade Elétrica de NaDC na Ausência e em Presença de EHEC.....	23
3.1.3. Tensão Superficial de Misturas de SDoD e EHEC.....	24
3.1.4. Tensão Superficial de Misturas de NaDC e EHEC.....	26
3.1.5. Fluorescência estacionária do pireno em misturas de NaDC-EHEC e SDoD-EHEC.....	28
3.2. Interações de caseína com SDS, DTAB e NADC.....	30
3.2.1. Medidas de tensão superficial para misturas de caseína-SDS, caseína-DTAB e caseína-NaDC.....	30
3.2.2. Condutividade elétrica em misturas caseína/SDS, caseína/ NaDC e caseína/DTAB.....	33
3.2.3. Fluorescência estacionária do pireno em misturas de SDS/caseína, DTAB/caseína e NaDC/caseína.....	37
3.2.4. Efeito da concentração de SDS sobre a emissão de fluorescência da caseína.....	41
3.2.5. Efeito da concentração de DTAB sobre a emissão de fluorescência da caseína.....	43
3.2.6. Efeito da concentração de NaDC sobre a emissão de fluorescência da caseína.....	46

Capítulo IV

Conclusões.....	47
Referências Bibliográficas.....	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Representação dos vários modelos de estrutura micelar.	3
Figura 2.	Ilustração da variação de algumas propriedades físico-químicas em função da concentração de surfactante em solução aquosa.	4
Figura 3.	Ilustração da estrutura do sal biliar deoxicolato de sódio.	5
Figura 4.	Ilustração do modelo da associação de sais biliares segundo Small e Penkell.	6
Figura 5.	Ilustração da estrutura básica da celulose.	7
Figura 6.	Ilustração das etapas do processo de modificação química da celulose.	8
Figura 7.	Ilustração de uma titulação condutivimétrica de surfactante em água indicando a micelização.	11
Figura 8.	Ilustração de uma titulação condutivimétrica de solução aquosa de polímero com surfactante, com indicação dos parâmetros de associação	12
Figura 9.	Ilustração de uma curva obtida na titulação tensiométrica de surfactante em água, indicando o processo de micelização.	13
Figura 10.	Representação do diagrama de Jablonski de energia para o pireno	14
Figura 11.	Espectros de fluorescência do pireno com o aumento da concentração de SDS. O gráfico inserido mostra a ampliação da região das bandas.	16
Figura 12.	Curva de condutividade específica <i>versus</i> [SDoD] em ausência de EHEC.	20
Figura 13.	Figura 13. Curva de condutividade específica <i>versus</i> [SDoD] em presença de 0,10% de EHEC.	21
Figura 14.	Curva de condutividade específica <i>versus</i> [NaDC] na ausência (1), e em presença de 0,1% (2) de EHEC..	24
Figura 15.	Curva de tensão superficial de SDoD na ausência de EHEC.	25
Figura 16.	Curva de tensão superficial de SDoD em presença de EHEC.	26

Figura 17.	Curva de tensão superficial de NaDC sem EHEC.	27
Figura 18.	Curva de tensão superficial de NaDC com a presença de EHEC.	28
Figura 19.	Curvas da razão I_1/I_3 em função da [SDoD] na ausência(■) e em presença de caseína (○).	29
Figura 20.	Curvas da razão I_1/I_3 em função da [NaDC] na ausência(■) e em presença de EHEC (○).	29
Figura 21.	Curva de tensão superficial versus [SDS] na presença (○) e ausência (■) de caseína.	31
Figura 22.	Curva de Tensão superficial versus [DTAB] na ausência (○) e presença (■) de caseína.	32
Figura 23.	Curva de Tensão superficial versus [NaDC] na presença (○) e ausência (■) de caseína.	33
Figura 24.	Curva de condutividade específica versus [SDS] na ausência de caseína.	34
Figura 25.	Curva de condutividade específica versus [SDS] em presença de caseína.	35
Figura 26.	Curvas de condutividade elétrica para o NaDC na ausência (○) e em presença (□) de caseína.	36
Figura 27.	Curva de condutividade elétrica para o DTAB na ausência de caseína.	37
Figura 28.	Curva de condutividade elétrica para o DTAB na presença de caseína.	38
Figura 29.	Razão I_1/I_3 versus [NaDC] na ausência (■) e presença (●) de caseína.	39
Figura 30.	Razão I_1/I_3 versus [NaDC] na presença (○) e ausência (■) de caseína.	40
Figura 31.	Razão I_1/I_3 versus [DTAB] na presença de caseína.	41
Figura 32.	Curva de intensidade de fluorescência versus [SDS].	42

Figura 33.	Curva de λ_{max} versus [SDS].	IX 43
Figura 34.	Curva de intensidade de fluorescência versus [DTAB]	44
Figura 35.	Curva de λ_{max} versus [DTAB]	45
Figura 36.	Curva de Intensidadede fluorescência versus [NaDC]	46

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.	Classificação e alguns exemplos de surfactantes.	1
Tabela 2.	Parâmetros obtidos por condutividade elétrica para o SDoD em ausência e em presença de EHEC.	23
Tabela 3.	Parâmetros obtidos por condutividade elétrica para o SDS em ausência e presença caseína.	35
Tabela 4.	Parâmetros obtidos por condutividade elétrica para o DTAB em ausência e presença de caseína.	38

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

cmc	Concentração Micelar Crítica
EHEC	Etil(hidroxietil) celulose
SDS	Dodecilsulfato de Sódio
SDoD	Dodecanoato de Sódio
NaDC	Deoxicolato de Sódio
DTAB	Brometo de Dodeciltrimetilamônio
<i>cac</i>	Concentração de Agregação Crítica
<i>psp</i>	Ponto de Saturação do Polímero
γ	Tensão Superficial
α	Grau de Ionização
κ	Condutividade Específica
S_1	Coeficiente Angular do Perfil de Condutividade Específica abaixo da <i>cmc</i> e/ou <i>cac</i> na presença de polímero
S_2	Coeficiente Angular do Perfil de Condutividade Específica entre a <i>cac</i> e o <i>psp</i>
S_3	Coeficiente Angular do Perfil de Condutividade Específica acima da <i>cmc</i> e/ou <i>psp</i> na presença de polímero
M	Molaridade
mM	Milimolar
I_1	Intensidade de Fluorescência do Pireno obtido em 372,8 nm
I_3	Intensidade de Fluorescência do Pireno obtido em 384,0 nm
λ_{\max}	Comprimento de onda máximo

RESUMO

A interação entre surfactantes e dois biopolímeros, o etil(hidroxietil) celulose (EHEC) e a caseína foi investigada usando as técnicas de condutividade elétrica, tensão superficial e espectroscopia de fluorescência. Verificou-se e interpretou-se a variação dos parâmetros de concentração de agregação crítica, cac, e ponto de saturação do polímero, psp, no processo de interação dos surfactantes Dodecanoato de Sódio (SDoD) e Deoxicolato de sódio (NaDC) com o polímero EHEC em solução aquosa 20 mM de tampão borato/NaOH, pH 9,20, a 25,0°C. Os resultados obtidos por tensão superficial, condutividade elétrica e fluorescência mostraram que há a formação de complexos EHEC/SDoD. Para o sistema EHEC/NaDC, somente a técnica de tensão superficial foi sensível para detectar a formação do complexo. Também se estudou a interação dos surfactantes Dodecil sulfato de sódio (SDS), e Dodecil trimetil amônio (DTAB) e NaDC com a caseína em solução aquosa 10 mM de tampão fosfato, pH 7,0, a 25,0°C. Os resultados obtidos mostraram que há a formação de complexos caseína/SDS e a formação de complexos caseína/DTAB. Porém no sistema composto por caseína e NaDC, as técnicas mostraram que não há interação da caseína com o NaDC.

ABSTRACT

The interaction between surfactants and two biopolymers, the ethyl(hydroxyethyl) cellulose (EHEC) and the casein was investigated using electrical conductivity, surface tension and fluorescence spectra measurements. It was verified and interpreted the variation of the parameters of the surfactant to polymer association processes such as the critical aggregation concentration, *cac*, and saturation of the polymer, *psp*, during the process of interaction by sodium dodecanoate (SDoD) and dodium deoxycholate (NaDC) surfactants with EHEC polymer in 20mM borate buffer solutions, pH 9,2, at 25°C. The results got by surface tension, electrical conductivity and fluorescence spectra measurements showed that there is a formation of EHEC/SDoD compounds. To the system EHEC-NaDC, only the technic of surface tension was sensible to detect the formation of the compound. It was also studied the interaction by sodium dodecyl sulfate (SDS), dodecyltrimethylammonium (DTAB) and NaDC surfactants with the casein in 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7,0, at 25°C. The results showed that there is the formation of casein/SDS and casein/DTAB compounds. But in the system formed by NaDC and casein, the technics showed that there is not interaction between the NaDC and casein.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

1.1. Surfactantes.

Surfactante é uma abreviação do inglês de “surface active agent”, que significa agente com atividade na superfície. Em outras palavras, um surfactante é caracterizado pela tendência de ser adsorvido em interfaces como sólido-vapor, sólido-líquido, sólido-sólido, líquido-vapor e líquido-líquido. Essa característica é a principal propriedade de um surfactante [1].

Estruturalmente, surfactantes são substâncias cujas moléculas apresentam duas regiões distintas, uma hidrofílica (polar) e outra hidrofóbica (apolar); por isso estas moléculas são chamadas de anfífilas. A parte hidrofóbica é geralmente constituída de uma longa cadeia de hidrocarbonetos (linear ou ramificada), podendo variar de 8 a 18 átomos de carbono [1].

Dentre as formas de classificação dos surfactantes, existe a baseada na natureza da região hidrofílica, que pode ser um grupo aniônico, catiônico, não iônico ou zwitteriônico (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação e exemplos de surfactantes.

Classificação	Nomenclatura	Fórmula Molecular
Aniônico	dodecilsulfato de sódio	$C_{12}H_{25}SO_4^- Na^+$
	dodecanoato de sódio	$C_{11}H_{23}COO^- Na^+$
Catiônico	brometo de dodeciltrimetilamônio	$C_{12}H_{25}N^+ Me_3 Br^-$
Não iônico	hexaetileno glicol dodecil monoeter	$C_{12}H_{25}(CH_2CH_2O)_6-OH$
Zwitteriônico	butirato de 4-dodecil dimetil amônio	$C_{12}H_{25}N^+ Me_2(CH_3)CO_2^-$

Uma das aplicações mais destacada no uso dos surfactantes é em materiais de limpeza e/ou em processo de detergência. Os surfactantes aniônicos são os que apresentam maior eficiência com as características necessárias na detergência, principalmente os que possuem cadeias alquílicas entre 12 e 18 carbonos. Já os surfactantes catiônicos não são tão utilizados por causarem irritação na pele, porém são

excelentes bactericidas e amaciantes industriais. Os surfactantes não iônicos estão sendo muito utilizados como ingredientes ativos de fórmulas para lava-roupas automáticas, pois não são afetados por água dura e formam o mínimo de espuma.

Os surfactantes não só se destacam na indústria de produtos de limpeza, mas também são muito utilizados na indústria de petróleo, cosméticos, alimentos, pesticida farmacêutica e produtos de higiene [2]. Sua produção mundial excede três milhões de toneladas por ano, sendo que a grande maioria dos surfactantes disponível, comercialmente, é sintetizada a partir de derivados de petróleo. Entretanto, o crescimento da preocupação ambiental entre os consumidores, combinado com novas legislações de controle do meio ambiente, levou os pesquisadores à procura por surfactantes naturais como alternativas aos produtos existentes.

1.2. Micelas e Concentração Micelar Crítica (*cmc*).

Quando em solução, surfactantes tendem a formar agregados coloidais denominados de micelas, que se formam a partir de certa concentração denominada de concentração micelar crítica, *cmc*. A *cmc* é uma importante característica de um surfactante e depende de fatores como hidrofobicidade da cadeia carbônica, carga do surfactante, natureza da cabeça polar do contra-íon, temperatura e força iônica. [2].

Existem vários modelos micelares propostos baseados em estudos realizados por uma variedade de técnicas como medidas de espalhamento de luz, raio X e nêutrons e ressonância magnética nuclear. Entre os modelos destacam-se o de forma esférica de Gruen [3], o de forma de cacho de uva de Menger [4], o de bloco de Fromhenz [5] e o de rede de Dill-Flory [6], representados na figura 1.

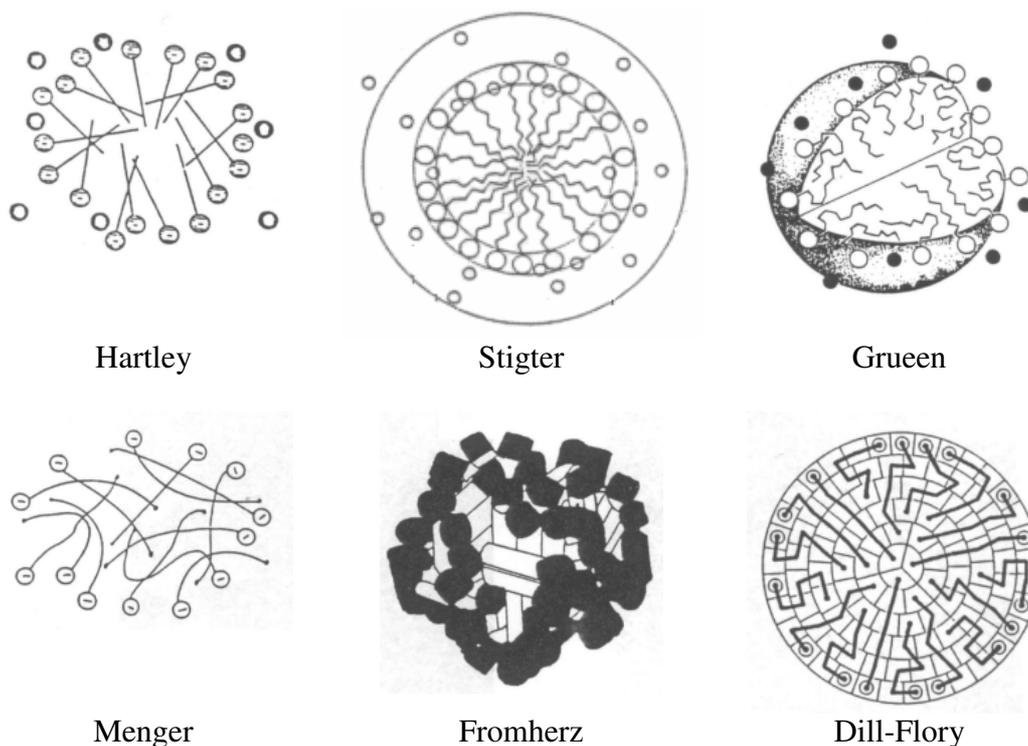


Figura 1. Representação dos vários modelos de estrutura micelar.

A formação de micelas é processo dinâmico sendo que meia vida é definida na ordem de 10^{-5} segundos. O tamanho de agregados micelares é usualmente determinado pelo *número de agregação* que corresponde ao número de moléculas de surfactante por micela. Sua formação pode ser detectada através de medidas de variação de propriedades físicas em função da concentração do surfactante. As propriedades mais utilizadas são: tensão superficial, condutividade elétrica, espalhamento de luz, pH, solubilidade, calor específico, densidade, propriedades ópticas, ressonância magnética nuclear, pressão osmótica e solubilidade. A cmc é observada durante uma mudança brusca nestas propriedades físicas conforme é ilustrado na figura 2. Portanto, a cmc corresponde à menor concentração de surfactante nas quais as micelas se formam. [7].

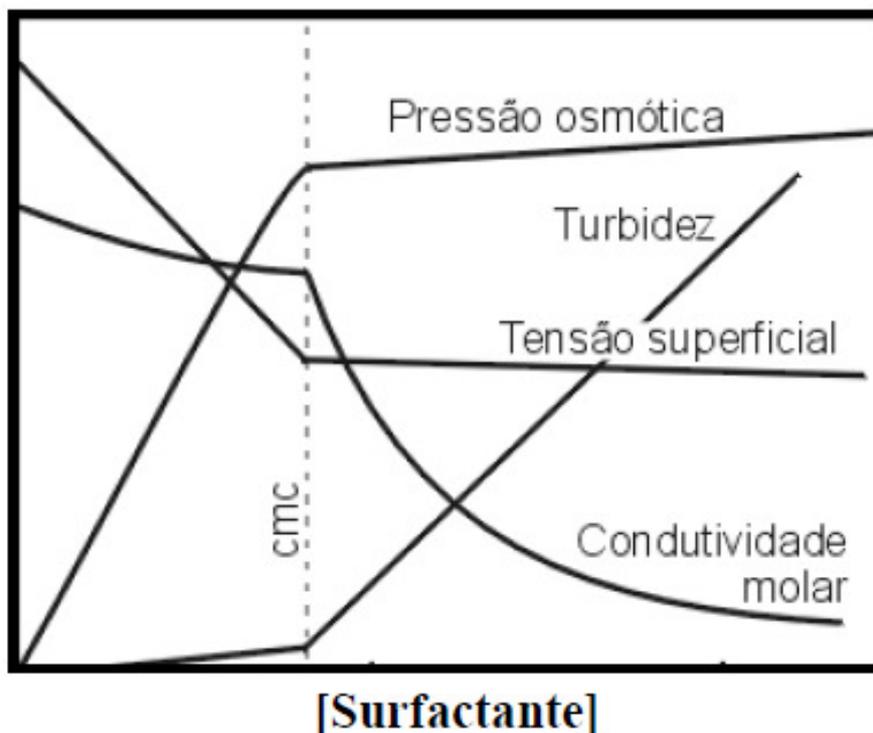


Figura 2. Ilustração da variação de algumas propriedades físico-químicas em função da concentração de surfactante em solução aquosa.

1.3. Biossurfactantes – Sais biliares.

Os biossurfactantes constituem uma classe de surfactantes naturais. São classificados de acordo com a sua composição química e sua origem microbiana. As principais classes incluem glicolipídios, lipopeptídios e lipoproteínas, fosfolipídios e ácidos graxos. Possui em sua estrutura uma porção lipofílica – usualmente composta por cadeia hidrocarbônica de um ou mais ácidos graxos, que podem ser saturados, insaturados, hidroxilados ou ramificados - ligados a uma porção hidrofílica - que pode ser um éster, um grupo hidróxi, fosfato, carboxilato ou carboidrato (Figura 3). A maioria dos biossurfactantes são neutros ou aniônicos variando desde pequenos ácidos graxos até grandes polímeros.

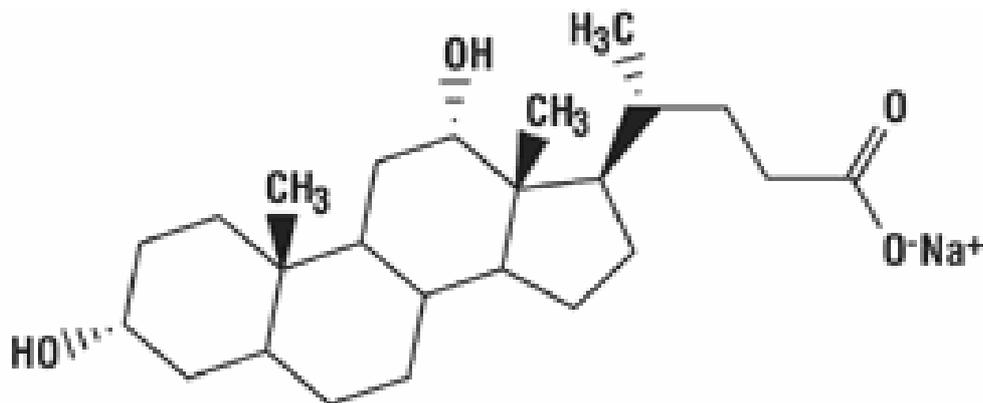


Figura 3. Ilustração da estrutura do sal biliar deoxicolato de sódio.

Os biossurfactantes apresentam a vantagem de serem sintetizados a partir de substratos renováveis e possuírem grande diversidade química, possibilitando aplicações específicas para cada caso particular. Além disto, possuem características estruturais e propriedades físicas distintas, o que os torna comparáveis ou superiores aos surfactantes sintéticos em termos de eficiência.

O maior mercado para os biossurfactantes se encontra na indústria petrolífera, onde são utilizados na recuperação terciária de petróleo ou incorporados em formulações de óleos lubrificantes. Outras aplicações incluem biorremediação e dispersão no derramamento de óleos, remoção e mobilização de resíduos de óleo em tanques de estocagem. Atualmente, as aplicações se distribuem entre os mais diversos setores industriais.

Sais biliares são exemplos de biossurfactantes naturais produzidos na vesícula biliar. Nos mamíferos, sua principal função fisiológica é a emulsificação e o transporte de gorduras hidrolisadas e lipídios provenientes dos alimentos. Neste processo metabólico, a estrutura ativa responsável pelo transporte é formada por complexas micelas mistas de sais biliares com espécies como monoglicerídeos, ésteres de ácidos graxos, colesterol, fosfolipídios, enzimas, proteínas e outros [8].

Por causa da estrutura particular e rigidez da molécula, o processo de agregação é totalmente diferente dos outros surfactantes. O mecanismo de agregação e os agregados formados em solução são motivos ainda de muita discussão. Alguns autores descrevem a agregação sucedendo-se em etapas: primeiramente são formadas pequenas micelas primárias e então estas se associam para formar grandes micelas em altas

concentrações de sal biliar [8,9]. A Figura 4 exemplifica o modelo. A estrutura primária corresponde a dímeros e tetrâmeros enquanto a secundária a agregados que crescem via associação entre os dímeros.

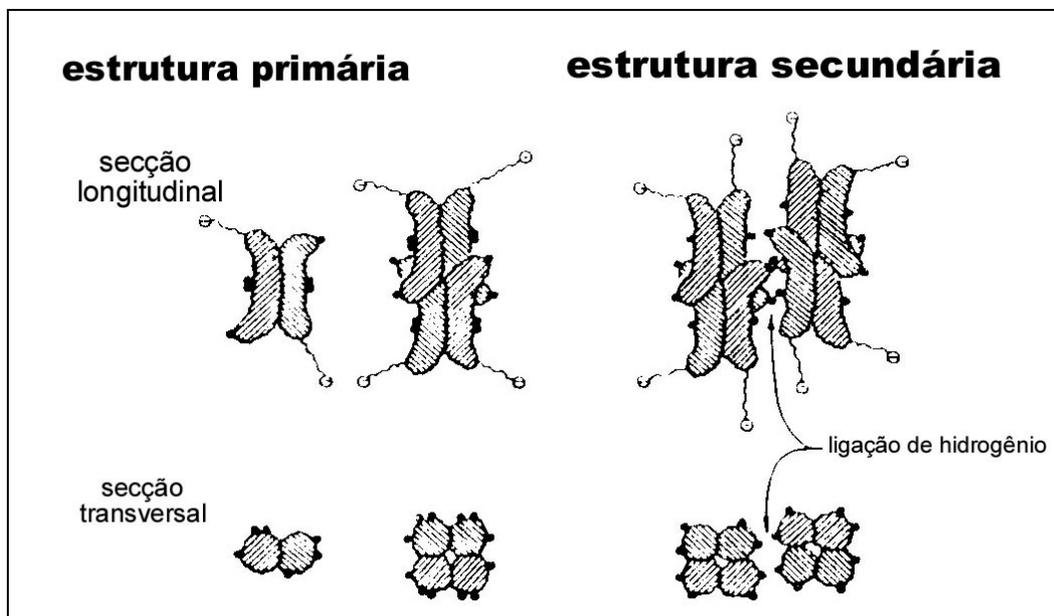


Figura 4. Ilustração do modelo da associação de sais biliares segundo Small e Penkell [9].

Maiores questionamentos são levantados quando o sistema em estudo torna-se mais complexo com adição de aditivos como polímeros e lipídios, por exemplo. Sem dúvida que o objetivo de compreender e interpretar os resultados de possíveis interações com polímeros é uma forma de mimetizar as funções do biossurfactante *in vivo*. Enquanto que se sabe que a função principal no intestino delgado é o de absorção de gorduras, no processo se aceita que há formação de micelas mistas de ácidos graxos e de monoglicerídios provindo da hidrólise ácida de triglicerídios e proteínas e colesterol.

Assim, o entendimento dos processos de associação dos sais biliares com aditivos, polímeros e proteínas ajudam a identificar as propriedades onde maior estabilização ocorre e, portanto, simular as atividades fisiológicas dos sais biliares como transporte de gorduras, assistência da hidrólise delas via processos enzimáticos em lipólise e em transporte de drogas lipossolúveis.

1.4. Celulose e o Polímero não Iônico Etil(hidroxi)etil)Celulose (EHEC).

As moléculas de celulose são polissacarídeos, isto é, biopolímeros formados pela repetição do monômero glucose (Figura 5). Mais precisamente, a celulose é um carboidrato fibroso composto por moléculas de D-glicose unidas por ligação β -1,4-glucosídicas [10].

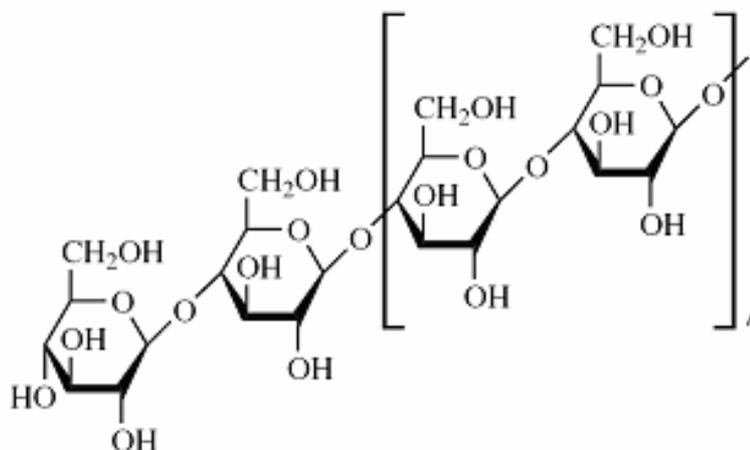


Figura 5. Ilustração da estrutura básica da celulose.

A celulose o componente estrutural primário das plantas e não é digerível pelo homem. Alguns animais, particularmente os ruminantes, podem digerir celulose, mas com a ajuda de micro-organismos. Industrialmente, a celulose é extraída da madeira de árvores como o pinho, o eucalipto ou de plantas herbáceas com grande quantidade de celulose no talo, como a cana-de-açúcar, diversas gramíneas e juncos. A razão prática e comercial do seu uso provém do fato de ser naturalmente abundante e, conseqüentemente, de baixo custo.

A celulose natural é insolúvel em água devido às grandes regiões cristalinas formadas via ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxilas que estão em cadeias poliméricas diferentes. Por isso, a amplitude do seu uso fica limitada porque a maioria dos processos e materiais comerciais é formulada em meio aquoso.

A solução comercial para adaptá-la às condições aquosas, é via modificação química, introduzindo substituintes como hidroxietil e etil na estrutura da celulose, dificultando a formação de ligações hidrogênio entre as cadeias e, portanto, aumentando

a solubilidade. Esse processo é utilizado pela empresa Akzo Nobel Surface Chemistry Ab, Suécia. Basicamente, o processo consiste em reagir a celulose *in natura* com NaOH para formação do alcóxido, com isso, as cadeias do polímero são forçadas a se expandir ocorrendo, assim, a diminuição das regiões cristalinas (figura 6). Como consequência da modificação química, resulta uma celulose solúvel em água, além de conferir maior resistência química e resistência a ataques enzimáticos. Um exemplo deste tipo de modificação ocorre na preparação do Polímero não iônico etil(hidroxi)etilcelulose (EHEC).

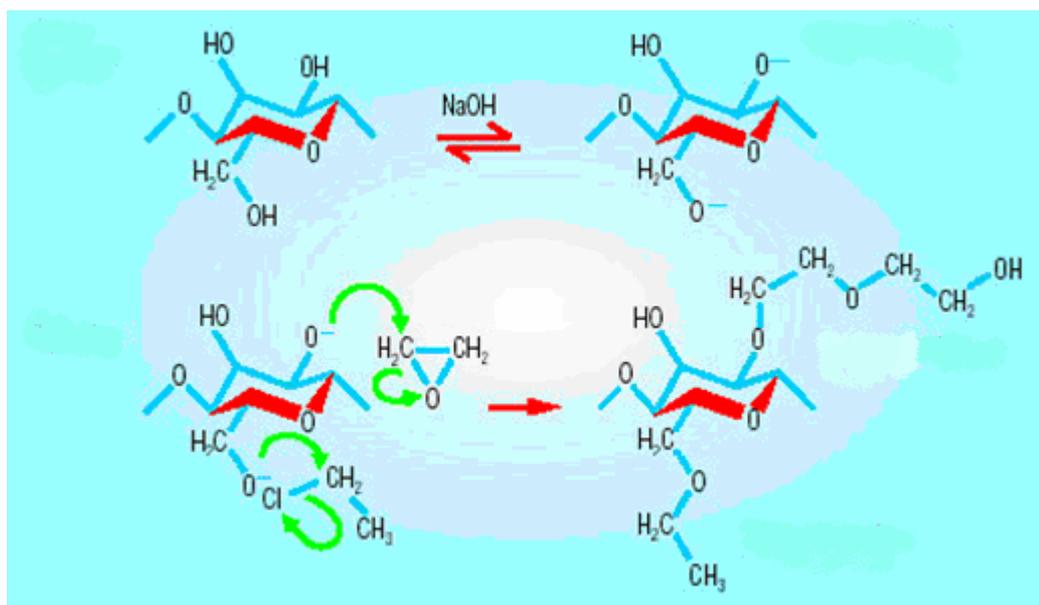


Figura 6. Ilustração das etapas do processo de modificação química da celulose.

Polímeros como o EHEC associam-se com surfactantes aniônicos e, geralmente, o fenômeno inicia em concentrações menores do que a cmc do surfactante quando na ausência do polímero. A associação é vista como sendo um fenômeno induzido pelo polímero. O resultado desta associação é a formação de complexos termodinamicamente estáveis, com propriedades físico-químicas diferentes daquelas observadas em soluções micelares [1,11-13].

Estes efeitos, resultados da combinação de polímero e surfactante, são sinérgicos, isto é, os dois componentes associados conferem aprimoramento de propriedades para uso comercial. Por exemplo, a mistura promove a diminuição da concentração micelar crítica quando comparada com o valor para o surfactante puro. Neste caso, é possível preparar formulações em concentrações menores resultando, por conseguinte, em redução da quantidade de surfactante mínima necessária para sua

operacionalidade e com melhoramento prático de formulações. Como outro exemplo, em formulações com polímeros solúveis em água, corantes e/ou aditivos, no entanto insolúveis em água, podem ser usados quando em presença de surfactante porque o complexo formado por ambos tem propriedades semelhantes às micelas aquosas do surfactante, que são amplamente conhecidas por dissolverem substâncias insolúveis em água.

1.5. Proteínas- Caseína.

Proteínas são biomoléculas orgânicas de alta massa molar, existentes em todos os organismos vivos. Quimicamente, proteínas são polímeros lineares de amino ácidos unidos covalentemente através de ligações peptídicas, um tipo especial de amida. Por isso, as cadeias poliméricas nas proteínas são chamadas de polipeptídeos. Somente L-amino ácidos estão presentes em proteínas naturais [10].

As proteínas são classificadas em dois grandes grupos: as proteínas simples e as conjugadas. As proteínas simples são descritas em termos de sua solubilidade em água em cinco grupos: (i) albuminas - solúveis em água e em soluções salinas diluídas; (ii) globinas - solúveis em água (ex. hemoglobinas); (iii) globulinas – insolúveis em água, mas solúveis em soluções salinas; (iv) prolaminas – insolúveis em água, mas solúveis em 70% de álcool etílico; (v) histonas - solúveis em água.

As proteínas conjugadas são descritas pelos grupos não protéicos: (i) nucleoproteínas - uma proteína básica como a histona ou prolamina combinada com ácido nucléico; (ii) fosfoproteínas - proteínas ligadas por ácido fosfórico (ex: caseína); (iii) glicoproteínas - uma proteína e um carboidrato (ex. mucina na saliva); (iv) lipoproteínas - proteínas combinadas com lipídeos (ex. lecitina).

As proteínas podem ser encontradas em três formas: (i) lineares (ex. colágeno, queratina, miosina); (ii) esférica (ex. lisozima, albumina) e (iii) elástica (ex. elastina).

A estrutura das proteínas não pode ser descrita somente através da sequência das ligações entre os átomos da molécula. São necessários quatro níveis diferentes de classificação estrutural que indicam a sequência dos aminoácidos na molécula, do tamanho da cadeia e configuração espacial da cadeia polipeptídica. A *estrutura primária* é o nível de estrutura mais fundamental definida pela sequência de aminoácidos ao longo da cadeia polipeptídica. A *estrutura secundária* é atribuída ao arranjo espacial de aminoácidos próximos entre si que se arranjam para formar um

padrão regular. A *estrutura terciária* de uma proteína resulta do enrolamento da proteína como um todo para dar sua forma tridimensional. A *estrutura quaternária* refere-se à maneira como várias moléculas de proteínas se unem para formar grandes estruturas [10].

A caseína (do latim "caseus", queijo) é uma proteína do tipo fosfoproteína encontrada no leite fresco. Representa cerca de 80% do total de proteínas do leite. A caseína é uma proteína conjugada, cuja estrutura quaternária é constituída por subgrupos α_{s1} -, α_{s2} -, β - e κ - caseína, com uma proporção em peso de 4:1:4:1. Estas proteínas possuem uma característica estrutural comum: um dos grupos hidroxil da molécula forma um éster de ácido fosfórico. O grupo fosfórico liga-se ao cálcio e ao magnésio, e alguns desses sais formam pontes de coordenação entre as moléculas de caseína. O ponto isoelétrico da caseína é de 4,8.

A caseína apresenta uma forte tendência para formarem agregados, comumente conhecidos como "micelas de caseína". Estes agregados são formados pela associação de vários polipeptídios que formam a caseína e têm um domínio hidrofóbico em seu interior e, na interface com o solvente, grupos hidrofílicos, carregados que dão origem a uma camada elétrica interfacial difusa que estabiliza a micela através de efeitos estéricos e eletrostáticos. Ela contém aproximadamente 75% de material inorgânico, principalmente de aglomerados de fosfato de cálcio que é responsável pela ligação dos resíduos fosfoserina de diferentes agregados moleculares de caseína. Além disso, numa solução também são encontradas moléculas livres de caseínas em solução.

O estudo da interação entre proteínas, como a caseína, e surfactantes tem sido extensivamente estudado nas últimas décadas devido às suas múltiplas aplicações em biociências, nas indústrias de alimentos e cosméticos [14-19]. Embora o uso de proteínas e surfactantes no preparo e no controle da estabilidade físico-química de muitas dispersões e emulsões coloidais seja bastante freqüente, a compreensão fundamental dos mecanismos moleculares subjacentes as interações proteína-surfactante e o impacto das mesmas sobre a formação e as propriedades dos produtos coloidais ainda são incompletamente entendidos. Além disso, muitas questões relativas ao processo de formação dos complexos proteínas/surfactantes continuam ainda a serem respondidas.

1.6. Técnicas.

1.6.1. Condutividade Elétrica.

A titulação condutométrica é um método clássico para determinar a cmc. A condutividade é o recíproco da resistência elétrica da solução e depende do número de íons e da mobilidade das espécies iônicas. Para eletrólitos fortes, a concentração de íons na solução aumenta linearmente com a concentração de eletrólito adicionado à solução enquanto que para eletrólitos fracos a concentração de íons na solução depende do equilíbrio de dissociação e do coeficiente de atividade dos íons. Neste caso, a condutividade depende do grau de ionização, α , do eletrólito.

A Figura 7 mostra um gráfico típico da condutividade específica *versus* concentração molar de surfactante. Observa-se que a cmc é definida na concentração do surfactante correspondente à repentina mudança na inclinação da curva [20-23]. O aumento linear da condutividade abaixo da cmc é característico de eletrólitos fortes e a inclinação depende da condutividade molar das espécies em solução, isto é, do contra-íon e do surfactante.

Assim, a partir do gráfico da Figura 7, é possível estimar o grau de ionização (α) de micelas iônicas como sendo a razão entre a inclinação da região linear acima (S_3) e abaixo (S_1) da cmc. A medida e o conhecimento de α são importantes porque estão relacionados com o conteúdo de contra-íons ligados na superfície da micela.

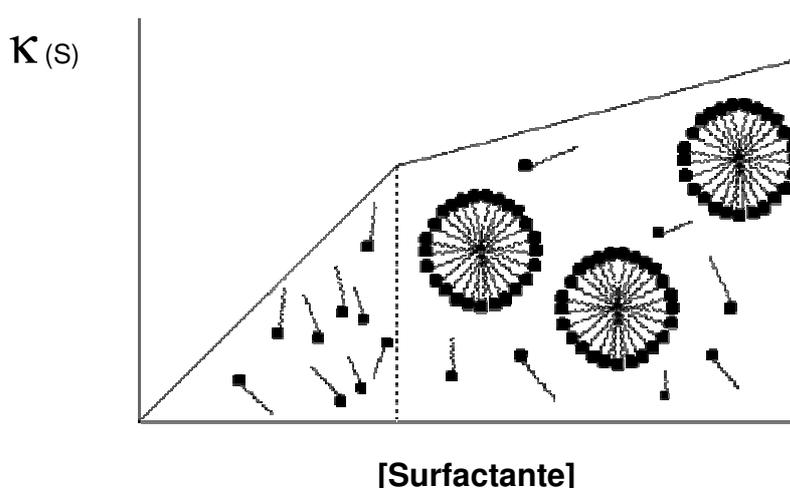


Figura 7. Ilustração de uma titulação condutivimétrica de surfactante em água indicando a micelização.

Na presença de polímero, a curva obtida em titulações condutivimétrica com surfactante exibe diferentes regiões que indicam o início da interação do polímero com o surfactante e a respectiva saturação das cadeias poliméricas. A Figura 8 ilustra uma curva clássica: os dois pontos de descontinuidade são conhecidos como concentração de agregação crítica (*cac*) e a concentração de surfactante onde ocorre a saturação do polímero (*psp*), respectivamente. A *cac* é interpretada como sendo o início da associação cooperativa entre o surfactante e o polímero. A região localizada entre *cac*-*psp* é aceita e definida como a etapa de formação de agregados micelares que encerra no *psp* onde ocorre a saturação da cadeia polimérica pelo surfactante [20-22].

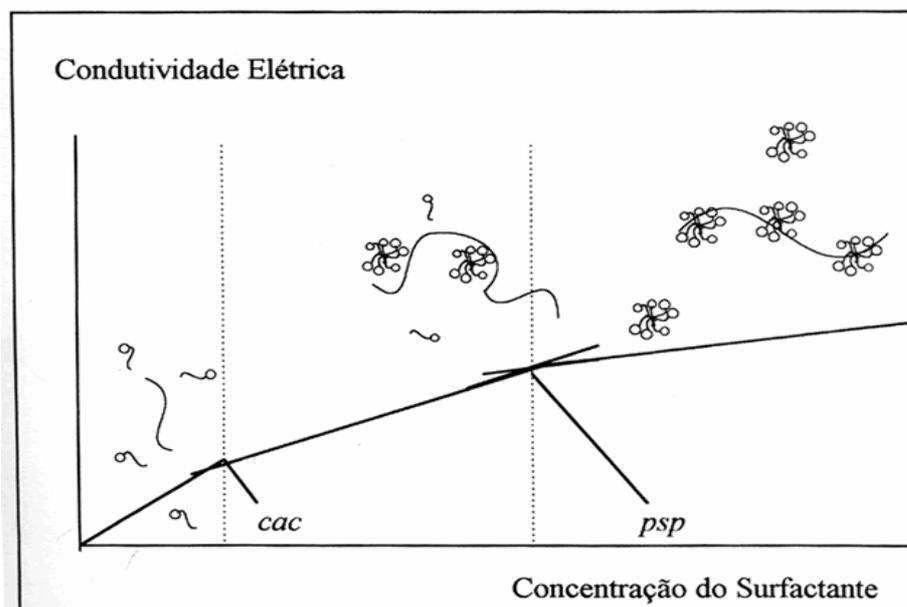


Figura 8. Ilustração de uma titulação condutivimétrica de solução aquosa de polímero com surfactante, com indicação dos parâmetros de associação.

1.6.2. Tensão superficial.

Em líquidos, no seu interior, as forças de atração mantêm as moléculas próximas uma das outras, ou seja, cada molécula é atraída em todas as direções, tendo como resultado uma força resultante igual a zero. Entretanto, com as moléculas na superfície isso não acontece. Cada molécula na superfície está sujeita a uma forte atração que é perpendicular a superfície. Devido a esta força de atração voltada para o interior do líquido, menos moléculas tendem a ficar na superfície, diminuindo a superfície do líquido e conseqüentemente causando uma tensão na superfície das moléculas, levando ao conceito de tensão superficial.

A técnica de tensão superficial é amplamente usada para determinar a cmc e o comportamento das moléculas de surfactante atuando na interface ar-líquido [11,23]. Quando um surfactante é adicionado à água, suas moléculas tendem a arranjar-se de modo a minimizar o contato entre os grupos hidrofóbicos e a água: os grupos polares do surfactante ficam na solução aquosa, próximo à superfície, e os grupos apolares ficam na superfície. (ver figura 9). Isto gera uma diminuição na tensão superficial da água porque diminui o número de moléculas de água na superfície. A diminuição de γ ocorre até na cmc; em concentrações acima deste ponto, a tensão superficial da solução é geralmente constante, pois todo surfactante adicionado é destinado à formação de micelas.

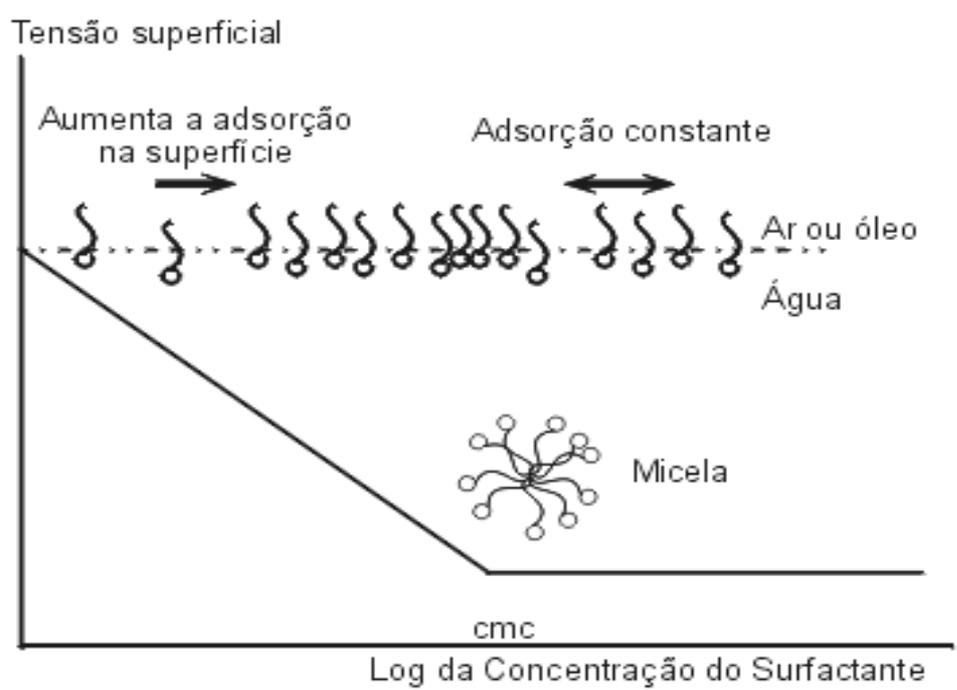


Figura 9. Ilustração de uma curva obtida na titulação tensiométrica de surfactante em água, indicando o processo de micelização.

1.6.3 Fluorescência.

A técnica de fluorescência tem sido utilizada nos campos da química, bioquímica e medicina, trazendo enormes contribuições em análises de proteínas, membranas, ácidos nucleicos e complexas macromoleculares. Os primeiros usos de

sondas fluorescentes em sistemas contendo surfactantes foi para medir a concentração micelar crítica [24,25]. Sondas fluorescentes referem-se a uma variedade de moléculas e íons que, sob apropriada excitação eletromagnética, emitem luz. Na prática, as características da banda de emissão são exploradas para fins de monitoramento de microambiente de sistemas moleculares organizados e estão atreladas a fatores como polaridade do meio.

A solução micelar pode ser considerada como um sistema heterogêneo formado por duas pseudofases, a micelar e a aquosa, onde a micelar possui distintos microambientes com diferentes características. Para o uso de uma sonda fluorescente no estudo do comportamento dos agregados micelares e dos complexos polímeros-surfactantes é necessário considerar que a mesma não seja distribuída uniformemente em todos os ambientes ao longo de todo o volume da solução. Por isso, a escolha adequada da sonda depende de qual propriedade deseja-se acompanhar. Para efeitos de medida de *cmc*, a sonda deve ser hidrofóbica para que seja altamente particionada para a pseudofase correspondente ao interior da micela e, portanto, identifique a ocorrência do processo de micelização.

O pireno, sem dúvida, é a sonda fluorescente mais usada para este fim. A particularidade é que o espectro de emissão exibe bandas de vibração finas cujas intensidades relativas são sensíveis à polaridade do meio. A Figura 10 mostra os diferentes níveis de energia e as transições ocorridas na molécula de pireno após a excitação. Enumerando as bandas de vibração de 1 a 5, que são observadas na temperatura ambiente, a banda I_3 em 384,0 nm, que corresponde a transição $S_1^{v=0} \rightarrow S_0^{v=1}$, mostra pouca sensibilidade aos solventes, enquanto que a banda I_1 em 372,8 nm, $S_1^{v=0} \rightarrow S_0^{v=0}$, muda a intensidade em função do solvente, aumentando em solventes polares.

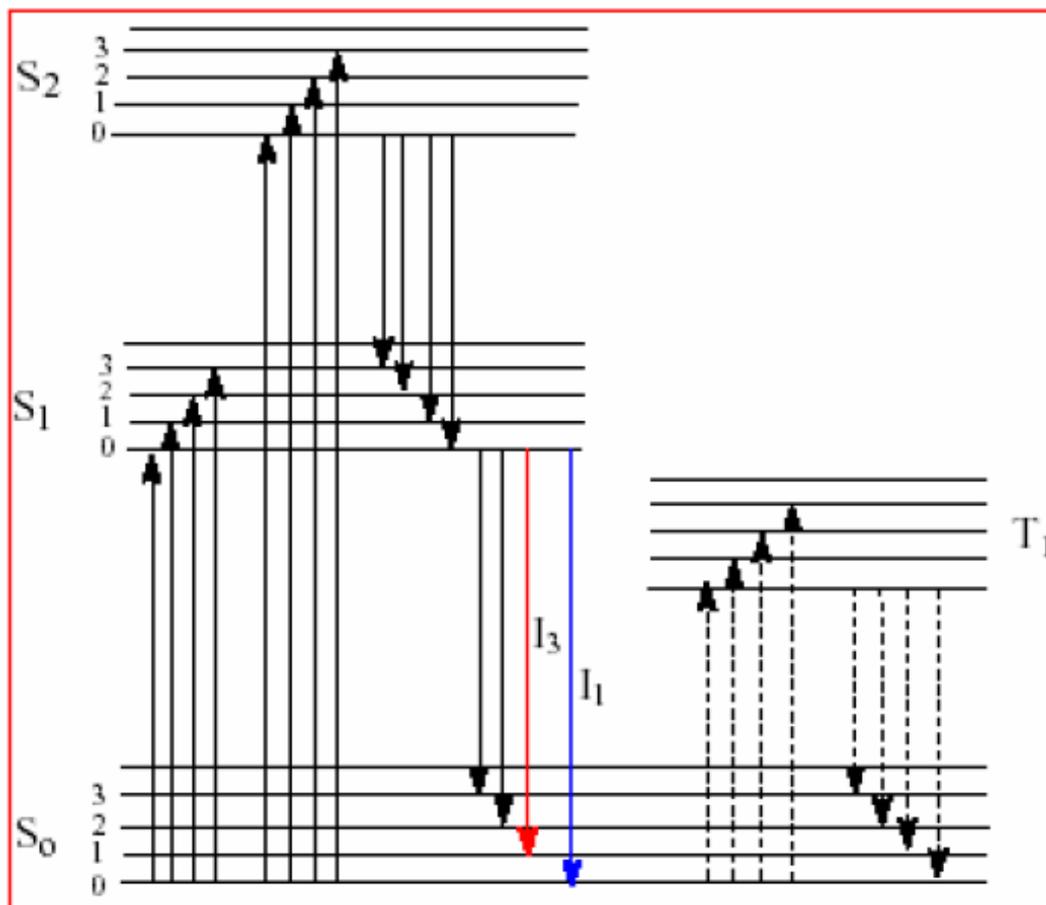


Figura 10. Representação do diagrama de Jablonski de energia para o pireno.

A Figura 11 mostra os espectros que são obtidos para o pireno à medida que se adiciona surfactante à solução. Observa-se o crescimento relativo da intensidade de fluorescência da banda I_3 em relação à banda I_1 . Isto mostra que o pireno está mudando de ambiente químico, ou seja, está passando da solução para o interior das micelas.

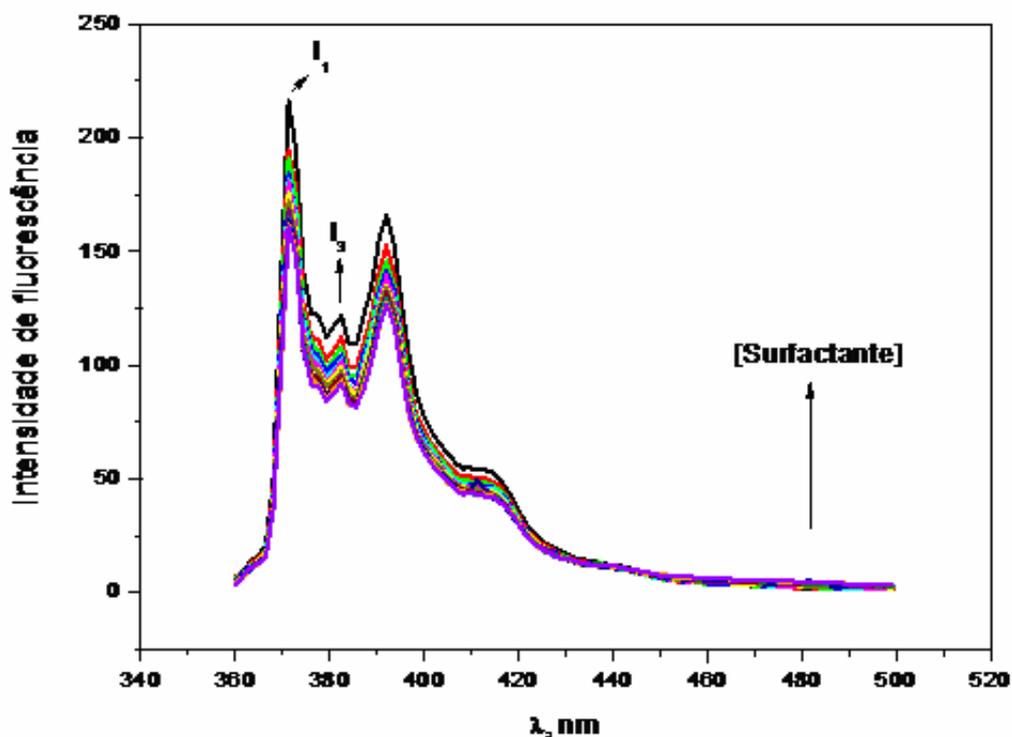


Figura 11. Espectros de fluorescência do pireno com o aumento da concentração de SDS.

A medida da polaridade relativa é expressa em termos da relação I_1/I_3 (ou o inverso I_3/I_1) e é utilizada como critério para avaliar a micropolaridade de meios e de microambientes de agregados micelares.

As proteínas apresentam três diferentes resíduos de aminoácidos que contribuem em emissões de fluorescência: tirosina, triptofano e fenilalanina. Cerca de 90% da emissão total de fluorescência das proteínas, no entanto, é de atribuição aos resíduos de triptofano. A banda de emissão máxima do triptofano, e seus derivados, são muito sensíveis à polaridade do solvente, devido às interações específicas entre o solvente e o anel. A caseína possui um total de três resíduos de triptofano. Estes resíduos de triptofano estão localizados principalmente no domínio hidrofóbico da micela de caseína sendo responsáveis por importantes informações da sua estrutura, principalmente se tratando de estudos de interação com surfactante [26].

OBJETIVO

- Estudar a interação entre SDoD e NaDC com o etil(hidroxietil) celulose (EHEC) em solução aquosa 20 mM de tampão borato/NaOH, pH 9,20, a 25,0⁰C.
- Estudar a interação entre SDS, DTAB e NaDC com a caseína em solução aquosa 10 mM de tampão fosfato, pH 7,0, a 25,0⁰C.
- Monitorar e interpretar a variação dos parâmetros *cac* e *psp* no processo de interação dos surfactantes com os biopolímeros.

CAPÍTULO II

PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Materiais e Reagentes.

O deoxicolato de sódio, 99%, é procedente da Sigma. O dodecil sulfato de sódio (SDS), o brometo de dodeciltrimetil amônio (DTAB) são procedentes da Aldrich. O dodecanoato de sódio foi preparado a partir de neutralização do ácido dodecanóico de procedência da também da Aldrich.

A etil(hidroxi)etilcelulose (EHEC), comercialmente denominada de Bermocoll E 481 FQ, foi doada pela Akzo Nobel, Surface Chemistry Ab, Suécia. As soluções de EHEC foram preparadas sob agitação suave por aproximadamente 12 horas em 10 mM de tampão borato, pH 9,2.

A caseína foi doada pelo laboratório de Materiais Poliméricos (POLIMAT) do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina, proveniente da Aldrich. A caseína foi submetida a um processo de purificação através de uma diálise e posterior liofilização. As soluções de caseína foram preparadas sob agitação suave em 10 mM de tampão fosfato, pH 7,0. Em todo o experimento utilizou-se soluções de caseína em concentração de 2 mg/mL.

2.2. Equipamentos e métodos utilizados.

2.2.1. Medidas de pH.

As medidas de pH foram feitas através de um pHmetro Beckman modelo Ø71, equipado com um eletrodo de vidro combinado.

2.2.2. Método condutivimétrico.

As medidas de condutividade específicas foram realizadas utilizando um condutivímetro modelo 170 da ATI-ORION, com uma bureta semi-automática da Metrohm Herisau tipo Multi-Bürette, modelo E-485 com capacidade para 20 mL e uma cela de diluição.

As medidas foram executadas da seguinte forma: pequenos volumes de solução

estoque de surfactantes eram adicionados com uma bureta, sobre um volume conhecido de solução tampão, com ou sem o polímero, numa cela de diluição previamente termostaticada a 25° C. Com o eletrodo de condutividade mergulhado na solução, fazia-se a leitura da condutividade específica a cada adição da solução estoque. O cálculo da concentração resultante, após cada adição, era corrigido considerando o volume total da cela.

2.2.3. Método Tensiométrico.

Para as medidas de tensão superficial, foi utilizado o método do “destacamento” do anel de du Nouy. Este método baseia-se na medida da força máxima necessária para destacar um anel da superfície líquida. O anel é suspenso ao mesmo tempo em que se abaixa a mesa contendo o copo com a solução para manter o braço de torsão no nível de referência. A força máxima exercida pelo braço de torsão ocorre quando o anel é destacado da superfície. Neste instante, o valor da força F é lido na escala diretamente como sendo a tensão superficial, em mN/m ou dinas/cm.

O aparelho utilizado foi um tensiômetro da KRUSS GMBH, modelo K 8, com escala de divisão de 0,1 mN/m, equipado com um anel de Pt-Ir-20 e frasco termostaticado com a amostra. Foram utilizados volumes de 10,0 mL de solução dos correspondentes surfactantes, com ou sem o polímero, previamente preparadas para cada medida. As soluções eram deixadas em repouso por no mínimo uma hora. A temperatura foi mantida a 25° C por meio de um termostato.

2.2.4. Método Fluorimétrico.

As medidas de intensidade de fluorescência foram realizadas num espectrofotômetro da Hitachi F-4500, equipado com uma cubeta de quartzo de 10 mm. As fendas de excitação e emissão do monocromador foram ajustadas para 2,5 mm. As medidas de fluorescência utilizando como sonda externa, o pireno, foram realizadas em concentração $1,0 \times 10^{-6}$ M, preparadas em etanol. As amostras foram excitadas em 336 nm e os espectros de emissão foram obtidos entre 360 e 500 nm. A razão I_1/I_2 foi estimada analisando a relação da intensidade máxima do pico em 372,8 nm (I_1) e 384,0 nm (I_2). As medidas de fluorescência do triptofano da caseína foram obtidas com excitação em 295 nm.

CAPÍTULO III

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Interação de EHEC com SDoD e NaDC.

3.1.1 Condutividade Elétrica de SDoD na Ausência e em Presença de EHEC.

A figura 12 mostra a curva de condutividade elétrica do SDoD em 20 mM de tampão borato. Observa-se que a curva tem duas regiões lineares e o ponto de intersecção define o início da formação dos agregados micelares, portanto, a concentração micelar crítica, *cmc*, que nestas condições experimentais ocorreu em 23 mM de SDoD.

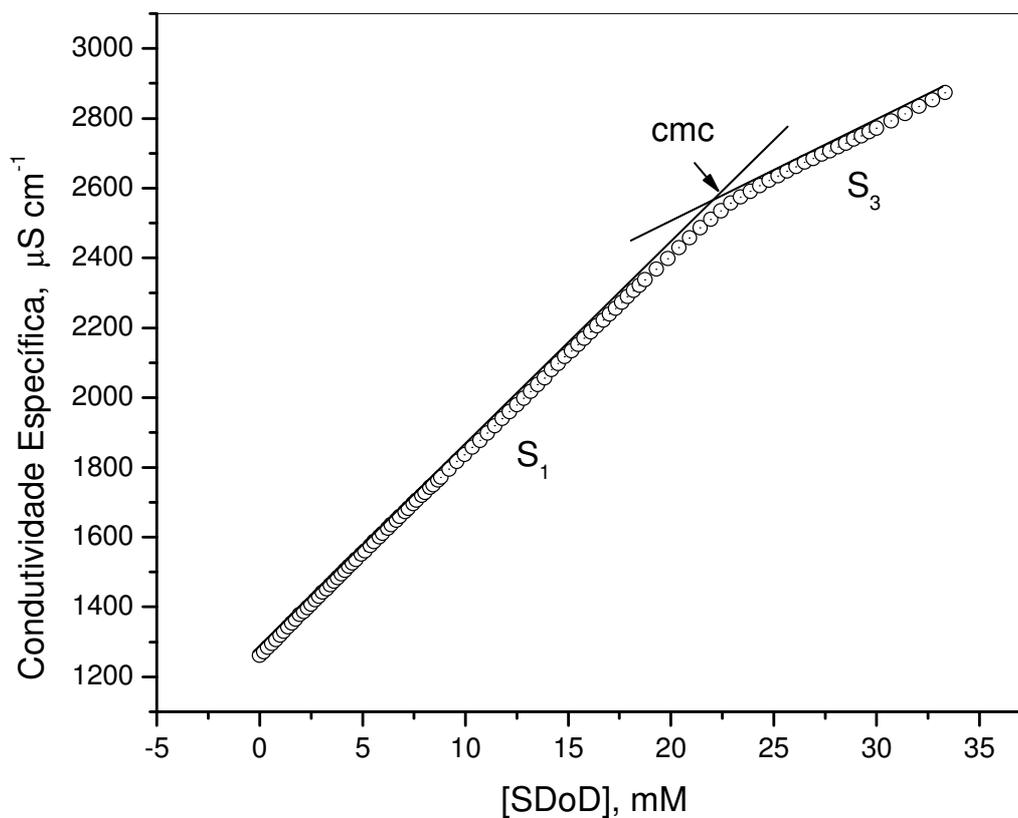


Figura 12. Curva de condutividade específica *versus* [SDoD] em ausência de EHEC.

As inclinações das retas da titulação condutimétrica da figura 12, abaixo (S_1) e acima (S_3) da cmc, apresentaram valores de 58 e 28 $\Omega^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$, respectivamente. Admitindo-se que a grandeza das inclinações das regiões lineares representa a condutividade molar das espécies iônicas em solução, S_1 pode ser definido como a contribuição das espécies iônicas em solução (Na^+ , DoD^- e do tampão). O grau de ionização micelar obtido foi de 0,48, mostrando que as micelas de SDoD comportam-se em solução como um eletrólito fraco e que, portanto, não são considerados agregados totalmente dissociados.

A figura 13 mostra a curva de condutividade específica *versus* [SDoD] em presença de 0,1 % de EHEC. Observa-se que, neste caso, há três diferentes regiões separadas por dois pontos de descontinuidade denominados aqui de concentração de agregação crítica, *cac*, e de concentração de saturação do polímero, *psp*, por moléculas de surfactante [20-22]. A primeira região ocorreu em concentrações abaixo da *cac*, primeiro ponto de inflexão, que caracteriza o início da associação entre SDoD e EHEC. Na segunda região, entre os pontos de descontinuidade, assume-se que há a formação de complexos EHEC-SDoD. A terceira região formada a partir do segundo ponto de inflexão, *psp*, é interpretada como sendo uma região onde se inicia o processo de saturação do polímero, e que há somente micelas de SDoD sendo formadas em equilíbrio com os complexos EHEC-SDoD.

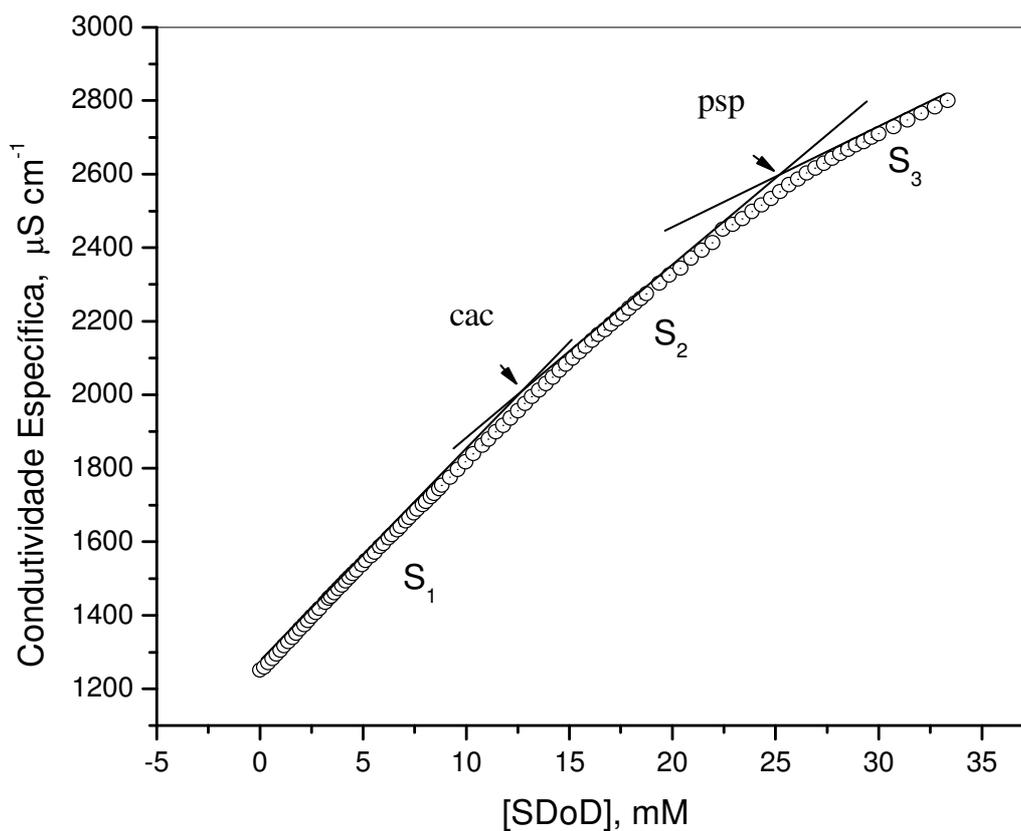


Figura 13. Curva de condutividade específica *versus* [SDoD] em presença de 0,10% de EHEC.

A tabela 2 apresenta os parâmetros obtidos por condutividade elétrica para o SDoD em ausência e presença de EHEC. Observa-se que o coeficiente angular S_1 , quando são mantidas constantes todas as condições experimentais, é numericamente idêntico àquele valor quando na ausência do EHEC. Este fato indica que não há interação entre SDoD e EHEC abaixo da *cac* ou seja, o processo de ligação ocorre somente na *cac*. O mesmo acontece com os valores de S_3 , mostrando realmente que há um ponto de saturação do polímero.

Tabela 2. Parâmetros obtidos por condutividade elétrica para o SDoD em ausência e presença de EHEC.

% EHEC	<i>cmc</i> , mM	<i>cac</i> , mM	<i>psp</i> , mM	S ₁	S ₂	S ₃
0,0	22,91	-	-	57,60	-	28,40
0,10	-	12,87	25,09	56,20	45,12	28,60

3.1.2. Condutividade Elétrica de NaDC na Ausência e em Presença de EHEC.

A figura 14 mostra a curva de condutividade específica versus concentração de NaDC, tanto na presença quanto em ausência de EHEC. Nenhum ponto de descontinuidade na região da *cmc* foi observado. A primeira interpretação leva a supor que as micelas de deoxicolato de sódio são agregados micelares totalmente dissociados ($\alpha = 1$) e, a segunda, é indicação de que não há interação entre o polímero EHEC e o biossurfactante NaDC. Porém, sabe-se que um pequeno desvio de linearidade na curva de condutividade específica ocorre em concentrações diluídas de sais biliares relacionado à pré-agregação de ânions de sais de bÍlis, formando dímeros [27].

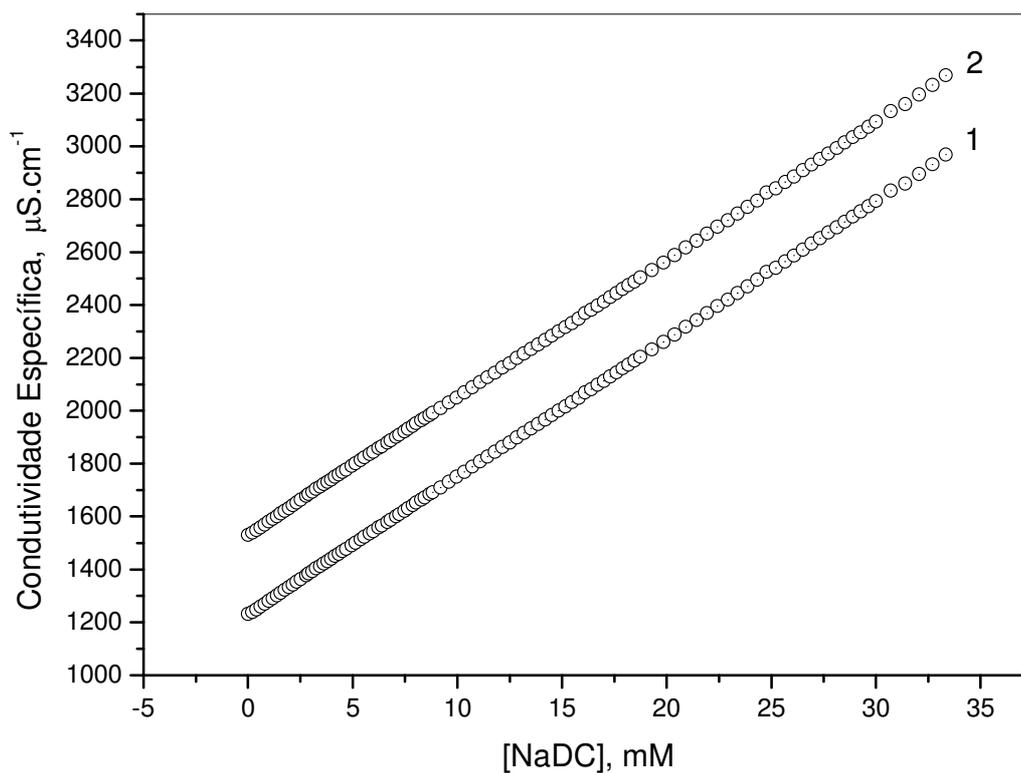


Figura 14. Curva de condutividade específica *versus* [NaDC] na ausência (1), e em presença de 0,1% (2) de EHEC.

3.1.3. Tensão Superficial de Misturas de SDoD e EHEC.

A Figura 15 mostra a curva de tensão superficial do SDoD na ausência do EHEC. Nota-se que há um ponto de descontinuidade atribuído à *cmc*, que ocorre em 21 mM, numa tensão superficial de 27 dina cm^{-1} .

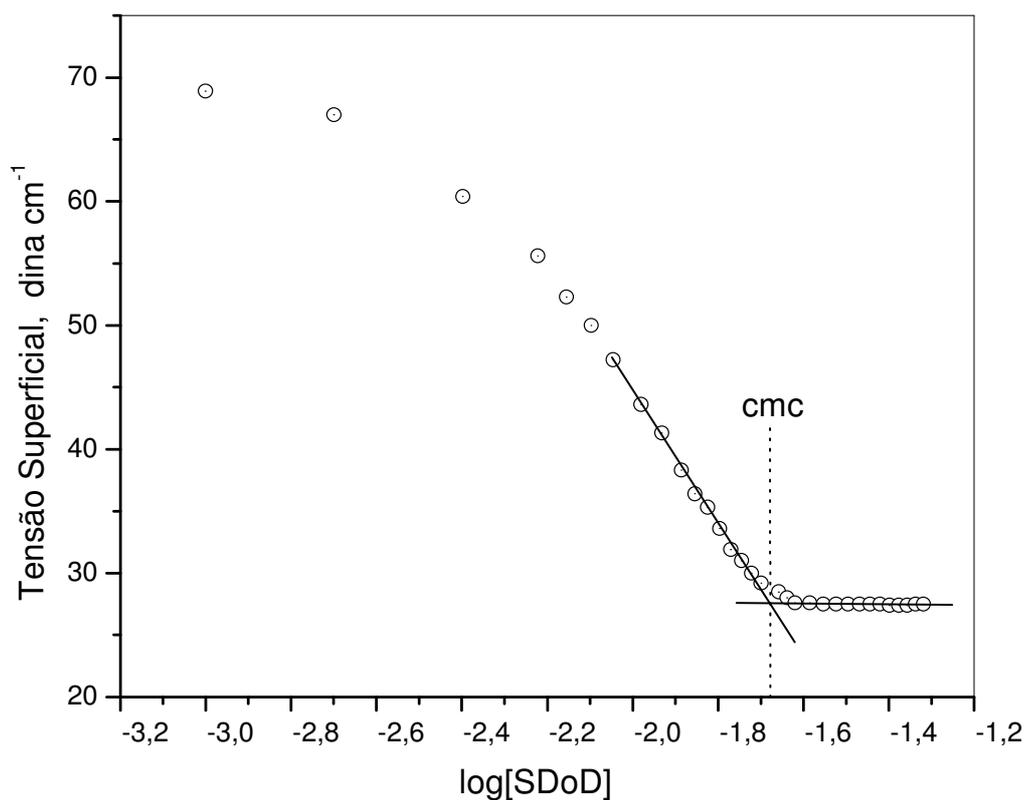


Figura 15. Curva de tensão superficial de SDoD na ausência de EHEC.

A figura 16 apresenta o gráfico de tensão superficial *versus* o log [SDoD] de uma solução contendo 0,1% de EHEC. Observa-se, agora, que a curva passou a exibir dois pontos de descontinuidade, assim como observado nas curvas de condutividade elétrica [21,22,28-33]. O primeiro, representado pela concentração onde se inicia o processo de agregação com o polímero, *cac*, ocorre em 9,6 mM e em 38 dina cm⁻¹. O platô, que se estende até ≈16 mM, é indicação de que a concentração de surfactante na interface ar/água é mantida constante. Em 25 mM e 28 dina cm⁻¹, ocorre o segundo ponto de descontinuidade, *psp*, representando a concentração em que há a saturação do polímero.

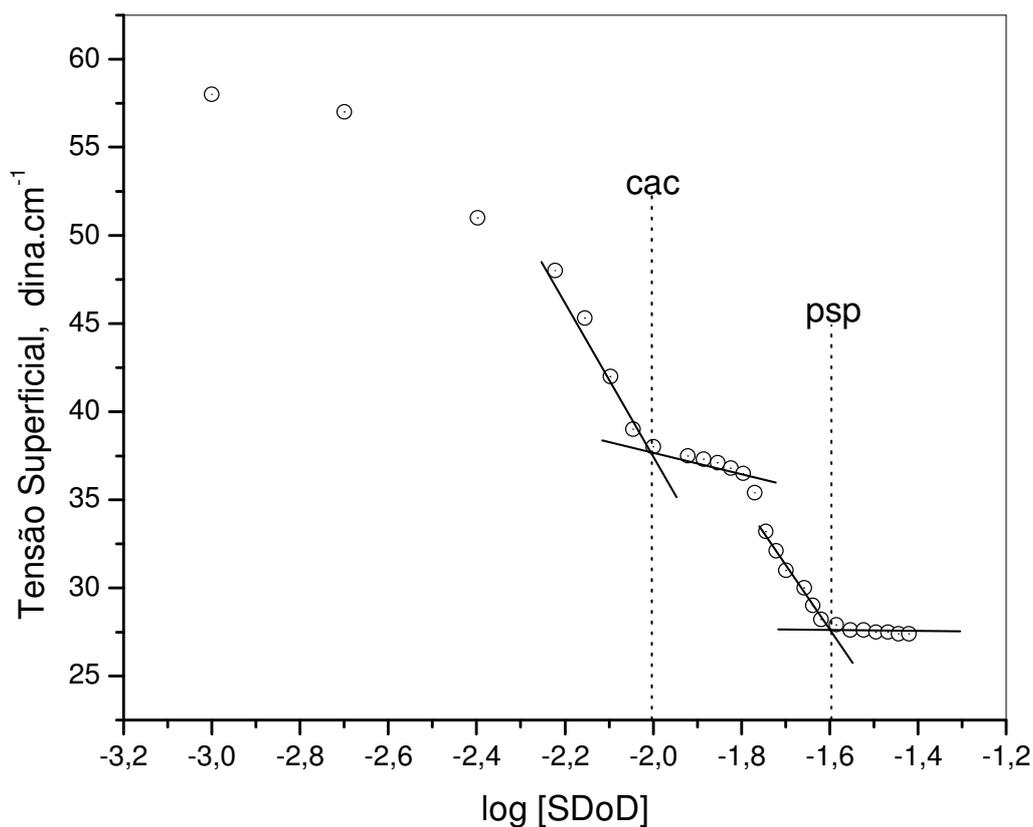


Figura 16. Curva de tensão superficial de SDoD em presença de EHEC.

Pode-se observar que o primeiro ponto de transição ocorre antes da *cmc* do SDoD, pois o EHEC exerce um efeito de estabilização dos agregados micelares ligados. O abaixamento da *cmc* tem sido usado como critério de estabilização termodinâmica e critério e/ou evidência experimental da ocorrência de ligação entre o surfactante e o polímero. Nota-se que a tensão superficial permanece constante tanto acima da *cmc* como acima do *psp*, indicando que o *psp* determina a formação de somente micelas de SDoD em equilíbrio com os complexos EHEC-SDoD formados no intervalo de concentração *cac-psp*. Como se esperava, as curvas de tensão, assim como as de condutividade, mostram que há interação entre o surfactante SDoD e a celulose EHEC.

3.1.4. Tensão Superficial de Misturas de NaDC e EHEC.

A figura 17 mostra a curva de tensão superficial de NaDC puro na ausência do EHEC. Observa-se que há um ponto de descontinuidade que representa a *cmc* em 2,7 mM e numa tensão superficial de 53 dina cm^{-1} .

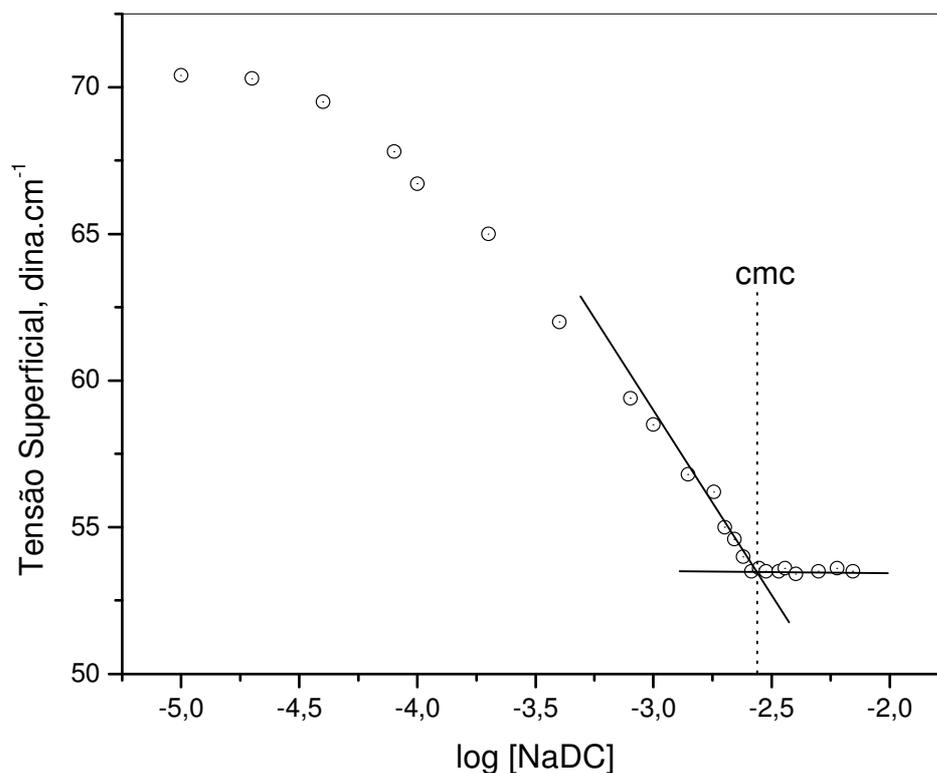


Figura 17. Curva de tensão superficial de NaDC sem EHEC.

Já a figura 18, apresenta o gráfico de tensão superficial versus o log [NaDC] em presença de 0,1% de EHEC. Diferentemente do apresentado nas curvas de condutividade elétrica da figura 14, este também apresenta dois pontos de descontinuidade. O primeiro, *cac*, ocorre em 1,41 mM e em 51,2 dina cm^{-1} e o segundo, *psp*, em 4,0 mM e 50,6 dina cm^{-1} . Interessantemente, as indicações de *cac* e *psp* no gráfico, mostram que ocorre interação formando complexos EHEC-NaDC, diferentemente do resultado obtido por condutividade elétrica. Isso se deve ao fato de que os agregados micelares de NaDC e os complexos EHEC-NaDC serem pequenos, com isso sua mobilidade se torna insensível nas medidas de condutividade elétrica

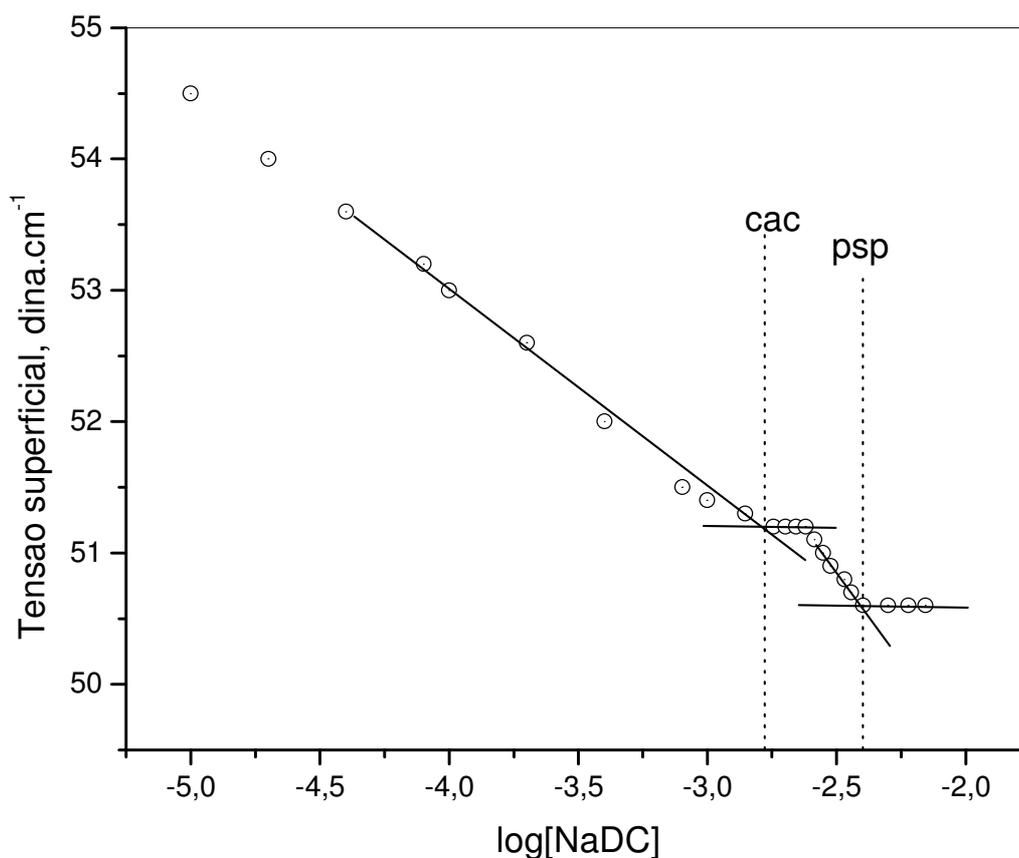


Figura 18. Curva de tensão superficial de NaDC com a presença de EHEC.

3.1.5. Fluorescência estacionária do pireno em misturas de NaDC-EHEC e SDoD-EHEC.

Técnicas utilizando sondas fluorescentes tais como o pireno, foram utilizadas extensivamente para monitorar a formação de agregados de surfactante e também para determinar a *cmc* das micelas e a *cac* de agregados micelares associados a polímeros [34, 35].

Na ausência e em presença de EHEC, a Figura 19 e 20 mostram as curvas da razão I_1/I_3 versus [SDoD] e I_1/I_3 versus [NaDC], respectivamente.

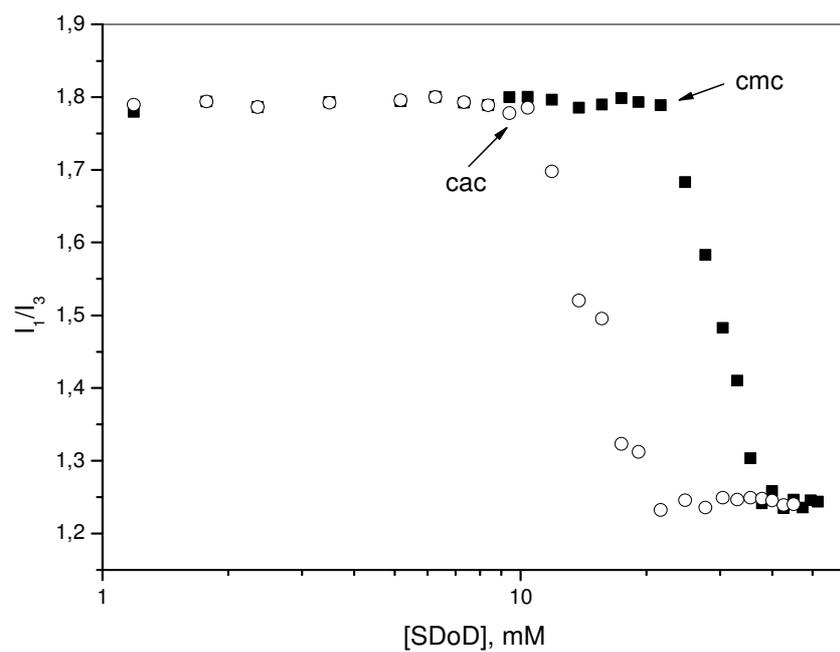


Figura 19. Curvas da razão I_1/I_3 em função da [SDoD] na ausência(■) e em presença de EHEC (○).

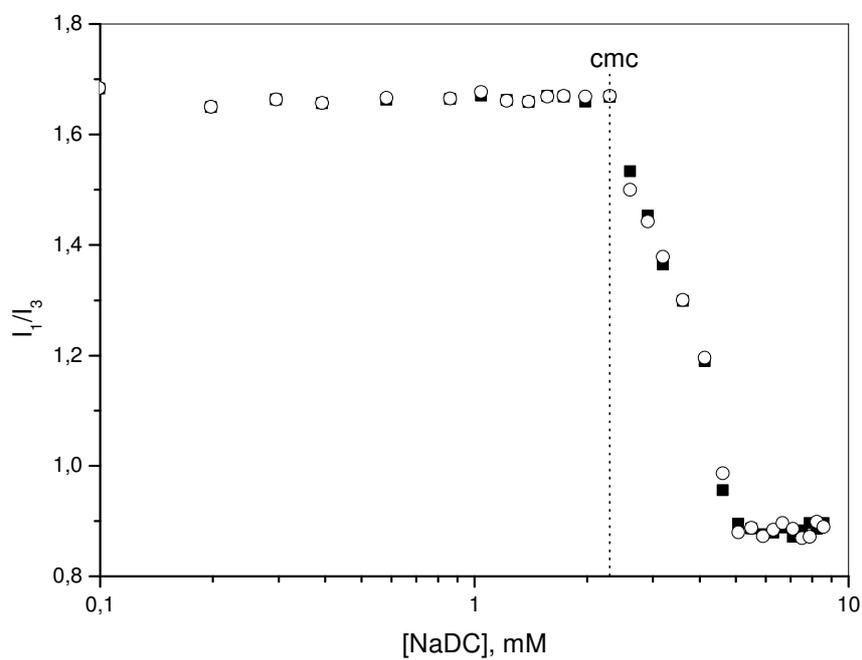


Figura 20. Curvas da razão I_1/I_3 em função da [NaDC] na ausência(■) e em presença de EHEC (○).

A atribuição mais razoável do valor de *cmc* nas curvas das figuras 19 e 20 refere-se à concentração de surfactante onde o primeiro platô termina. Baseando-se nesta metodologia, os valores de *cmc* para o NaDC e SDoD ocorrem em $\approx 2,4$ e ≈ 22 mM, respectivamente, concordando com aqueles obtidos por tensão e por condutividade elétrica. Enfatiza-se ainda que a adição de EHEC à solução contendo SDoD desloca as curvas para baixas concentrações exibindo uma nítida *cac* em ≈ 11 mM.

A Figura 20 mostra que a adição de EHEC não altera o espectro de fluorescência do pireno em solução aquosa de NaDC, ou seja, não observa-se uma *cac* como acontece na Figura 19. Assim, o processo de associação cooperativa, por fluorescência, é inexistente entre o NaDC e EHEC. Resultado semelhante ao encontrado por condutividade, porém, viu-se que por tensiometria há a formação de complexos EHEC/NaDC.

3.2. Interações de caseína com SDS, DTAB e NADC.

3.2.1 Medidas de tensão superficial para misturas de caseína-SDS, caseína-DTAB e caseína-NADC.

A figura 21 mostra uma curva de tensão superficial *versus* log [SDS] na ausência e presença de caseína em 10 mM de tampão fosfato. Na ausência de caseína, a tensão superficial diminui até ocorrer uma brusca inflexão em 38 dina/cm e 5,0 mM representando a *cmc*, definido como o início da formação de micelas de SDS. Com a adição de caseína, observa-se a presença de dois momentos de inflexão, sendo o primeiro definido como o início da formação de agregados micelares ligados a proteína, ocorrendo em 3,2 mM de SDS, a *cac*. A interpretação do platô que se forma acima da *cac* é resultado do processo de associação cooperativa do SDS sobre a proteína enquanto na interface solução/ar a concentração monomérica do SDS é constante. O desdobramento estrutural da proteína ocorre nesta região, ou seja, é nesta região que a proteína perde a estrutura terciária. Logo após, ocorre a diminuição da tensão superficial justificada pelo fato de os monômeros de SDS no equilíbrio monômero/proteína deslocarem-se para o equilíbrio ar/solução. Assim, em 38 dina/cm inicia um segundo platô associado à saturação das cadeias da proteína, $psp = 8$ mM. A partir desta [SDS], todo surfactante adicionado à solução contribui para a formação de micelas livres. Esta

conclusão é sustentada pelo fato de que acima do *psp* os valores de tensão superficial, com e sem proteína, são idênticos.

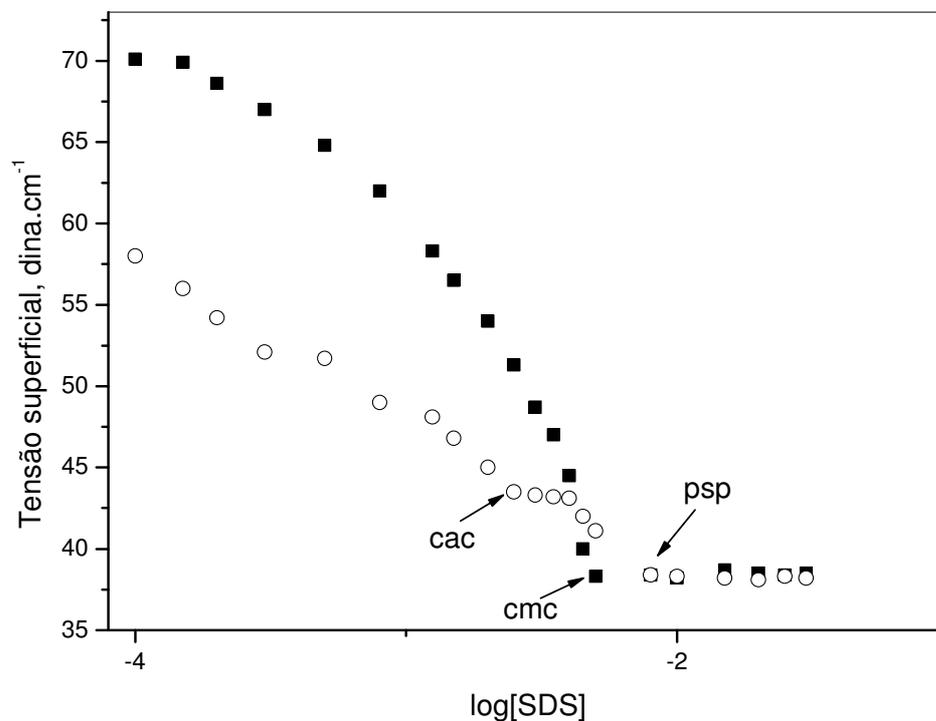


Figura 21. Curva de tensão superficial versus [SDS] na presença (○) e ausência (■) de caseína.

A figura 22 mostra uma curva de tensão superficial *versus* log [DTAB] na ausência e presença de caseína em 10 mM de tampão fosfato. Na ausência de caseína observa-se uma *cmc* em 13,8 mM definido como o início da formação de micelas de DTAB. Quando se adiciona caseína, observa-se a novamente a presença de dois momentos de inflexão, sendo o primeiro, *cac*, ocorrendo em 11 mM de DTAB. E o segundo, *psp*, em 16 mM. Assim como na presença de SDS, com o DTAB também há a formação de um platô acima da *cac* e os valores de tensão superficial, acima da *psp*, com e sem proteína, são idênticos. Estes resultados mostram que há a interação entre caseína e DTAB com a formação de complexos caseína/DTAB e posterior saturação dos mesmos.

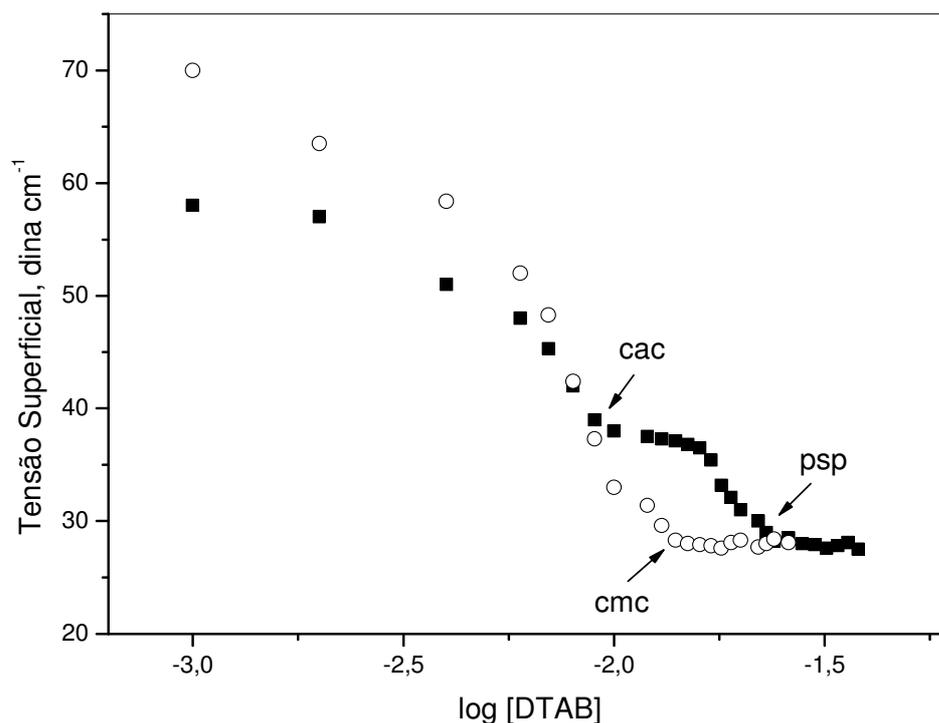


Figura 22. Curva de Tensão superficial versus [DTAB] na ausência (○) e presença (■) de caseína.

A figura 23 mostra uma curva de tensão superficial *versus* log [NaDC] na ausência e presença de caseína em 10 mM de tampão fosfato. Na ausência de caseína observa-se uma *cmc* em 2,5 mM definido como o início da formação de micelas de NaDC. Quando se adiciona caseína observa-se a presença de somente um ponto de inflexão, coincidindo com a *cmc* do NaDC. Como o aparecimento de uma *cac* é usado como forte indicação de ligação do surfactante ao polímero [36,37], o resultado da figura 23 indica a ausência de ligação entre NaDC e a caseína.

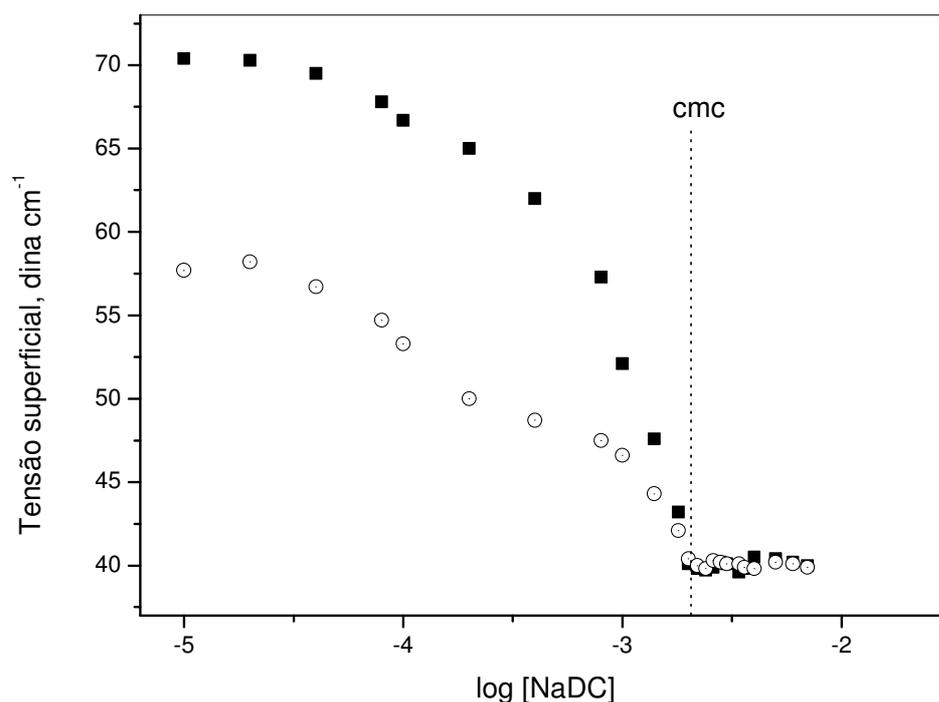


Figura 23. Curva de Tensão superficial *versus* [NaDC] na presença (○) e ausência (■) de caseína.

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

3.2.2. Condutividade elétrica em misturas caseína/SDS, caseína/ NaDC e caseína/DTAB.

As Figuras 24 e 25 apresentam as curvas de condutividade elétrica para o SDS, na ausência e em presença de caseína, respectivamente. A *cmc*, nas condições experimentais, ocorreu em 5,4 mM de SDS.

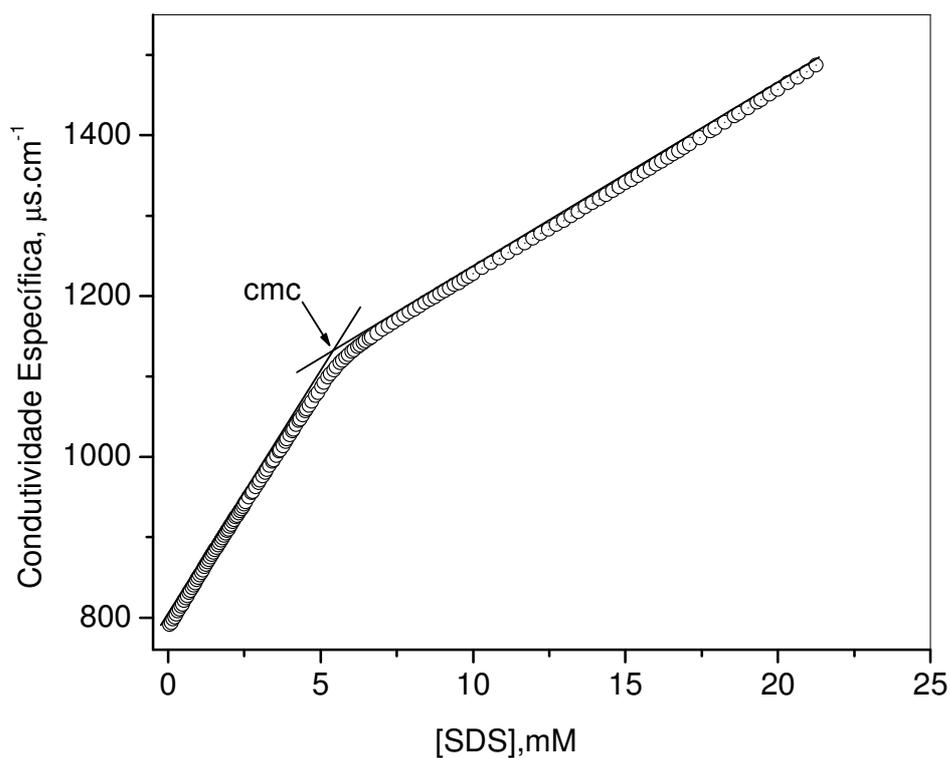


Figura 24. Curva de condutividade específica *versus* [SDS] na ausência de caseína.

Em mistura de proteína e surfactante, a curva de condutividade elétrica apresenta-se semelhante às curvas já amplamente divulgadas [38-40]. Estas curvas indicam duas inflexões com as seguintes características: a primeira representa o início da associação cooperativa entre a proteína e o surfactante, *cac*, que, nas condições experimentais ocorreu em 3,1 mM e, o segundo em 8 mM, representa a saturação da proteína por moléculas de surfactante, *psp*, mas, claramente, define o início de formação de micelas livres. O coeficiente angular S_1 , quando são mantidas constantes todas as condições experimentais, é numericamente idêntico àquele valor quando na ausência de caseína. Este fato indica que não há interação entre SDS e caseína abaixo da *cac* ou seja, o processo de ligação ocorre somente na *cac*. O mesmo acontece com os valores de S_3 , mostrando realmente que há um ponto de saturação do polímero.

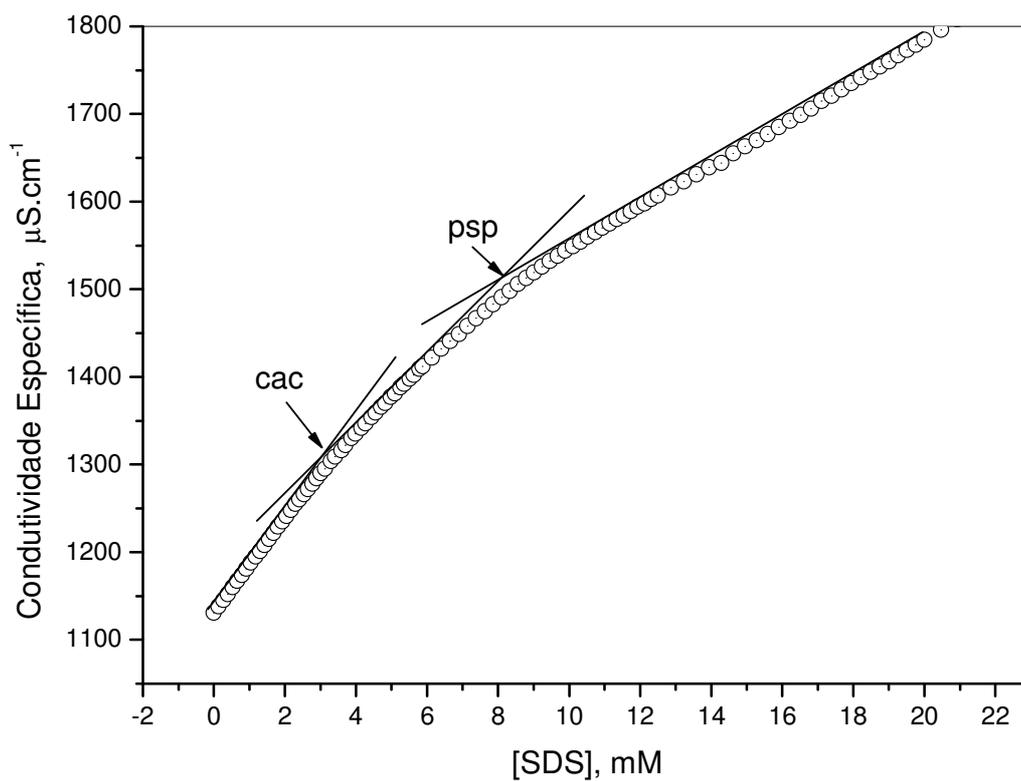


Figura 25. Curva de condutividade específica *versus* [SDS] em presença de caseína.

A tabela 3 apresenta os parâmetros obtidos por condutividade elétrica para o SDS em ausência e presença de caseína.

Tabela 3. Parâmetros obtidos por condutividade elétrica para o SDS em ausência e presença de caseína.

caseína	<i>cmc</i> , mM	<i>cac</i> , mM	<i>psp</i> , mM	S ₁	S ₂	S ₃
0,0	5,4	-	-	55,0	-	25,0
2mg/mL	-	3,1	8,0	53,0	40,0	24,0

A Figura 26 mostra as curvas de condutividade elétrica para o NaDC na ausência e em presença de caseína. As duas curvas exibem comportamentos lineares e, a *cmc* tensiométrica não é observada por condutividade elétrica. Os resultados de condutividade elétrica são semelhantes aos resultados obtidos por tensão superficial, ou seja, não há interação de caseína com NaDC.

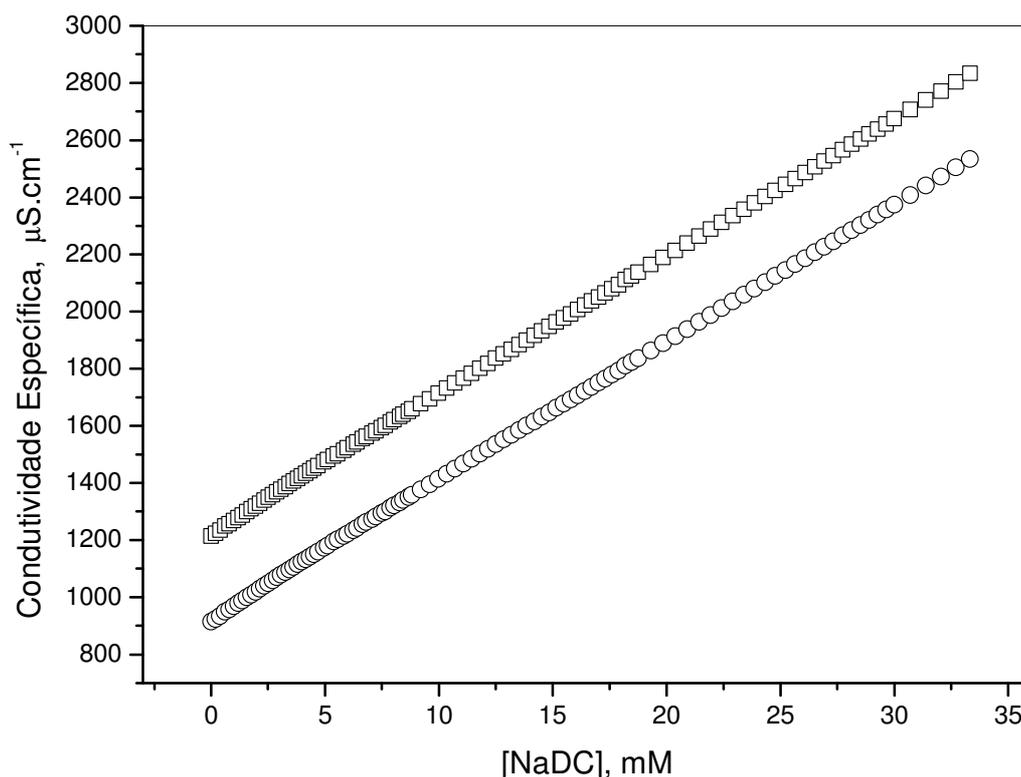


Figura 26. Curvas de condutividade elétrica para o NaDC na ausência (\circ) e em presença (\square) de caseína.

As Figuras 27 e 28 apresentam as curvas de condutividade elétrica para o DTAB na ausência e em presença de caseína, respectivamente. Na ausência de proteína, a *cmc* nas condições da experiência, ocorre em 10,8 mM de DTAB.

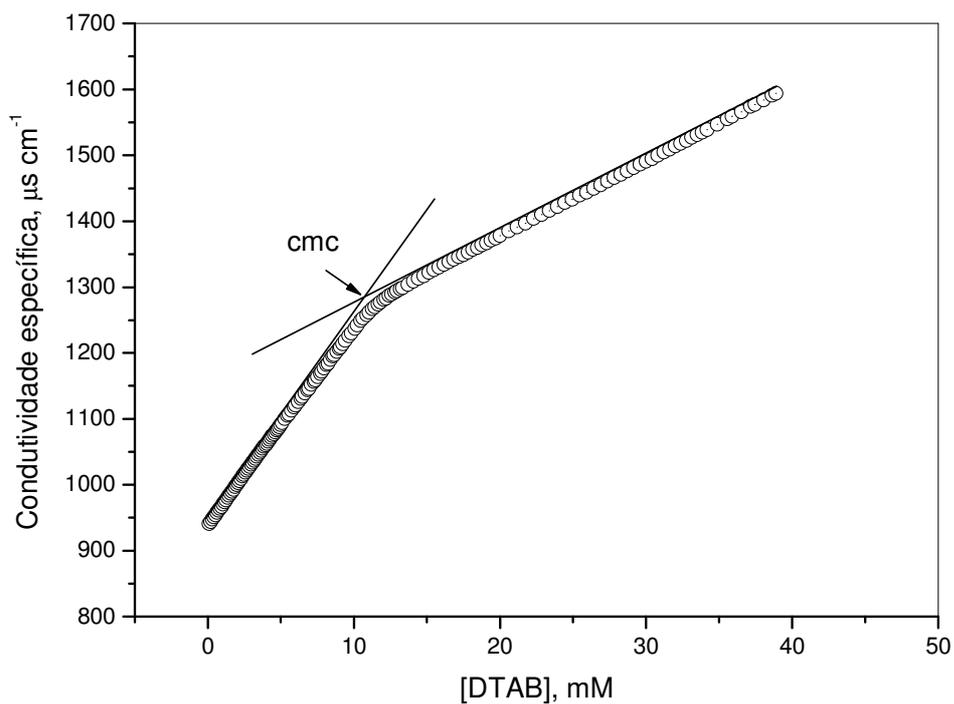


Figura 27. Curva de condutividade elétrica para o DTAB na ausência de caseína.

Em mistura de proteína e surfactante (figura 28), a curva de condutividade específica mostra uma *cac* em 3,8 mM e uma *psp* em 14 mM. Acima da *cac*, os monômeros de surfactantes ligam aos sítios da caseína carregados negativamente formando agregados caseína/DTAB. Acima da *psp* ocorre a saturação dos complexos pelo surfactante e a curva de condutividade torna-se linear porque novamente só há a formação de micelas livres em solução sem a formação de novos agregados caseína/DTAB.

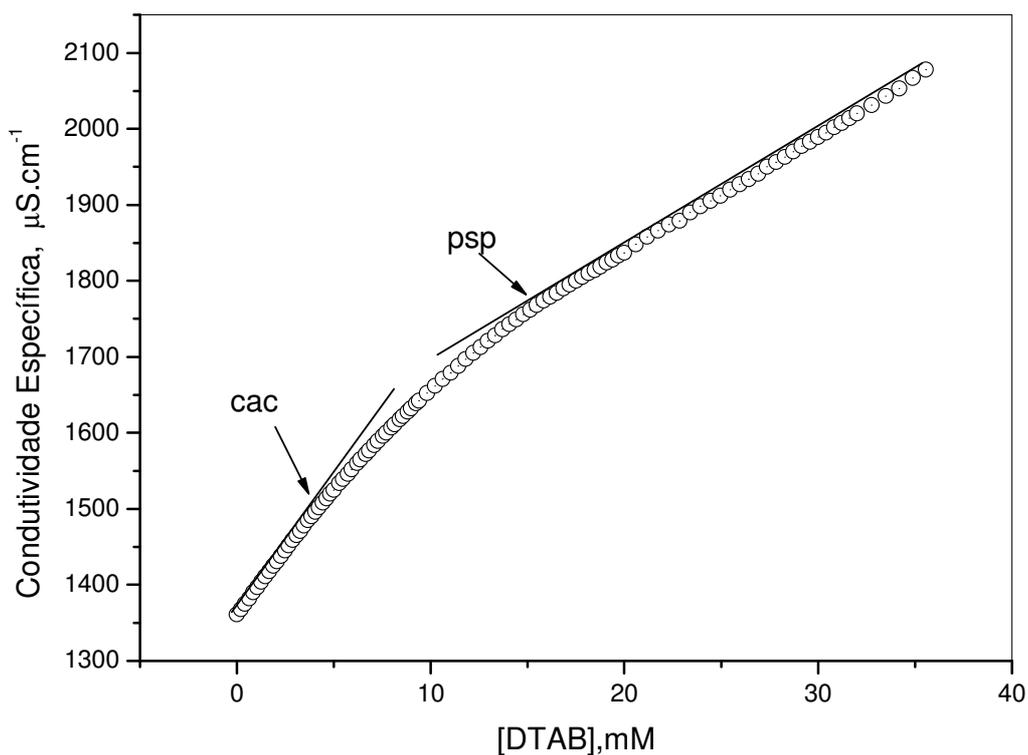


Figura 28. Curva de condutividade elétrica para o DTAB na presença de caseína.

A tabela 4 apresenta os parâmetros obtidos por condutividade elétrica para o DTAB em ausência e presença de caseína.

Tabela 4. Parâmetros obtidos por condutividade elétrica para o DTAB em ausência e em presença de caseína.

caseína	<i>cmc</i> , mM	<i>cac</i> , mM	<i>psp</i> , mM	S_1	S_2	S_3
0,0	10,8	-	-	30,0	-	11,5
2mg/mL	-	3,8	14,0	32,0	24,0	12,5

3.2.3. Fluorescência estacionária do pireno em misturas de SDS/caseína, DTAB/caseína e NaDC/caseína.

Para investigar melhor a interação entre a SDS e micelas de caseína usou-se uma sonda hidrofóbica de pireno. A razão de intensidade (I_1/I_3) mostra a polaridade do

ambiente. A Figura 29 mostra o efeito concentração de SDS sobre a razão I_1/I_3 na ausência e presença de micelas de caseína. Como pode ser visto a razão I_1/I_3 nas micelas de caseína tem um valor de 1,13 na ausência de qualquer tensioativo (\circ), o que indica que as moléculas de pireno residem em um domínio hidrofóbico nas micelas de caseína. A mudança na razão I_1/I_3 com a concentração de SDS na ausência de caseína indica claramente a formação de micelas de SDS em água (\blacksquare), mas não há uma clara mudança com a concentração de SDS na presença de micelas de caseína (\circ) o que sugere que a ligação de micelas de SDS com as micelas de caseína não altera a polaridade do microambiente do pireno. [41].

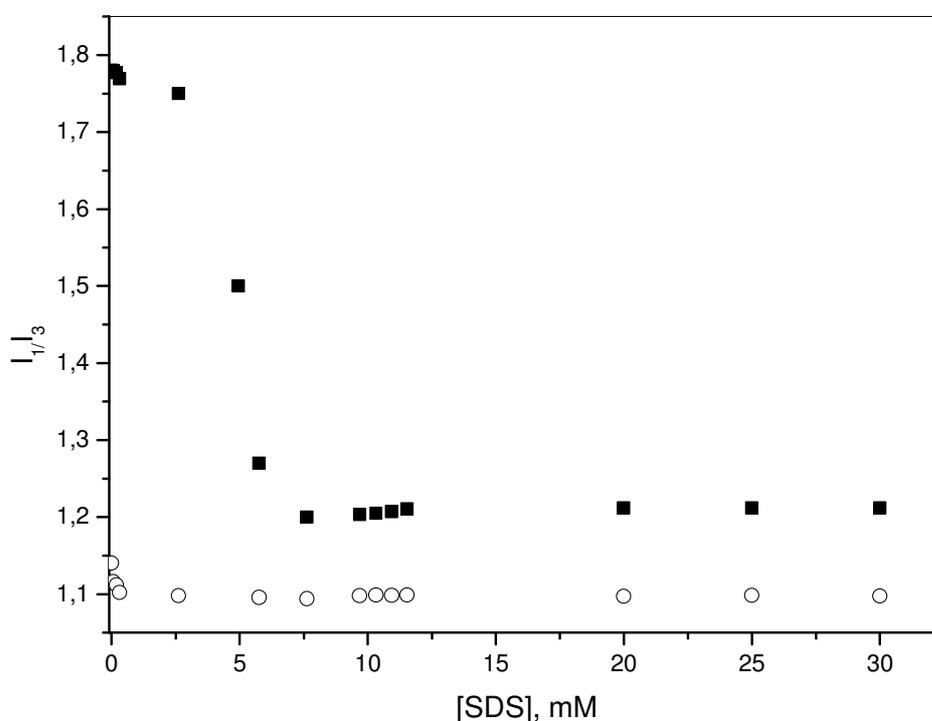


Figura 29. Razão I_1/I_3 versus [SDS] na ausência (\blacksquare) e presença (\circ) de caseína.

A Figura 30 mostra o efeito concentração de NaDC sobre a razão I_1/I_3 na ausência e presença de micelas de caseína. Como pode ser visto a razão I_1/I_3 nas micelas de caseína tem um valor de 1,2 na ausência de qualquer tensioativo (\circ), o que indica que as moléculas de pireno residem em um domínio hidrofóbico nas micelas de caseína. A mudança na razão I_1/I_3 com a concentração de NaDC na ausência de caseína indica claramente a formação de micelas de NaDC em água (\bullet). Porém, não há uma clara

mudança com a concentração de NaDC na presença de micelas de caseína (○), evidenciando a não formação de complexos NaDC/caseína.

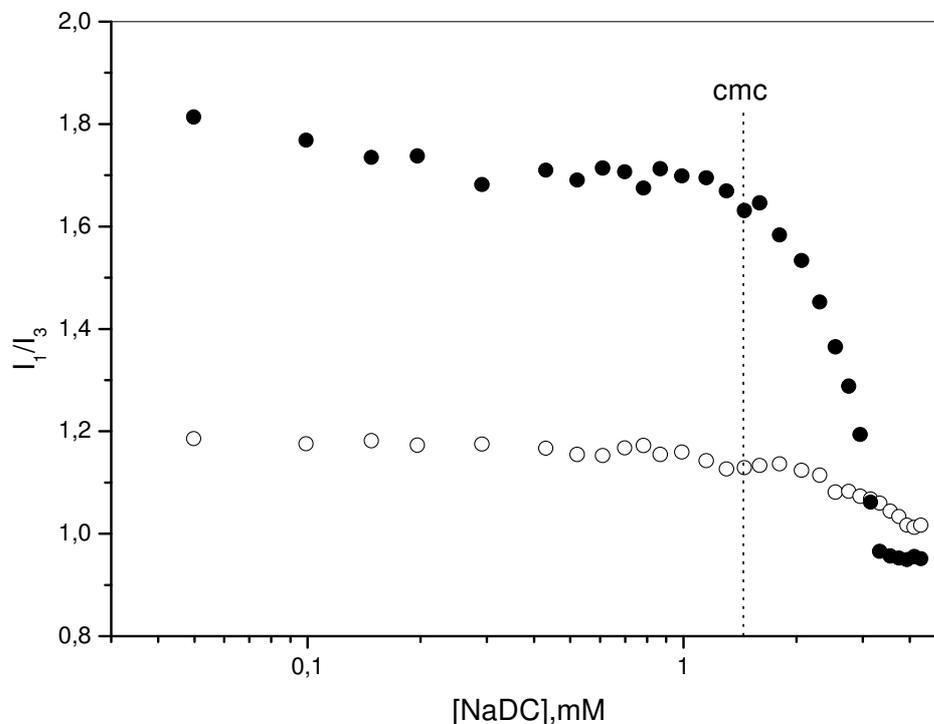


Figura 30. Razão I_1/I_3 versus [NaDC] na presença (○) e ausência (●) de caseína.

A Figura 31 mostra o efeito da concentração de DTAB sobre a razão I_1/I_3 . Como pode ser visto, a razão tem um valor de 1,22 na ausência de surfactantes, o que indica que moléculas de pireno residem em um domínio mais hidrofóbico nas micelas de caseína. A razão diminui em concentrações de DTAB inferiores a 0,8mM e permanece constante em concentrações de DTAB superior a 16 mM.

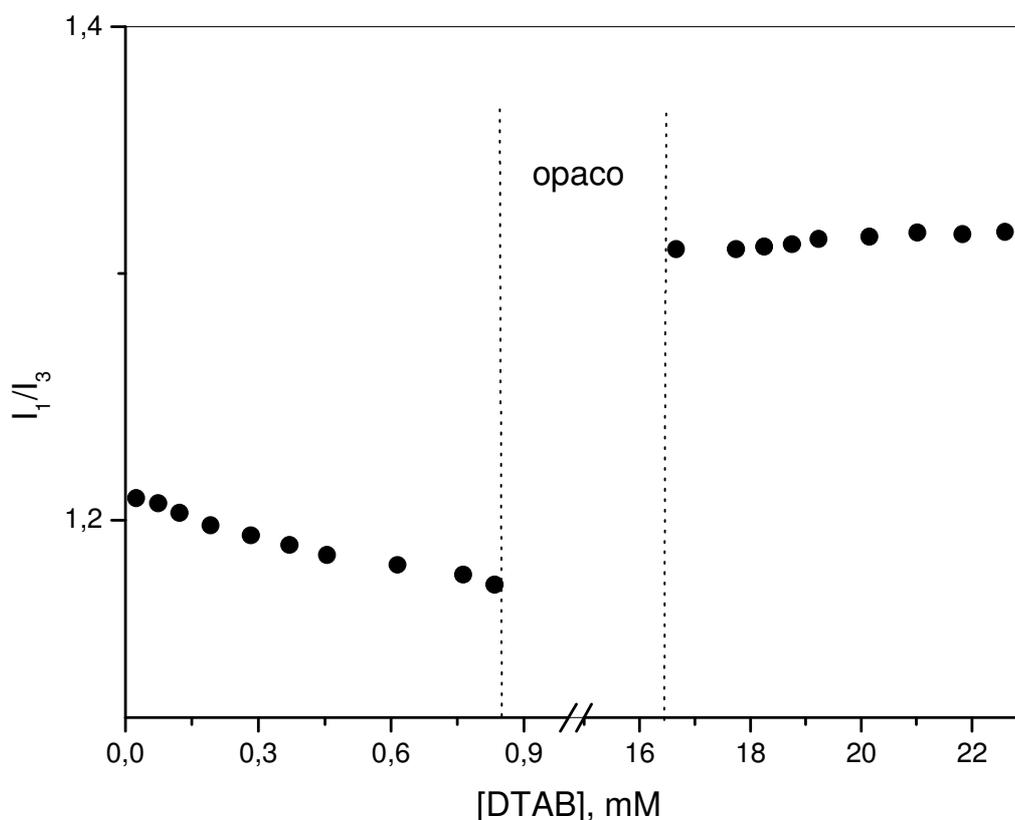


Figura 31. Razão I_1/I_3 versus [DTAB] na presença de caseína.

A estrutura mais compacta de micelas de caseína faz com que as moléculas de pireno se localizem em um domínio mais hidrofóbico, resultando em uma menor I_1/I_3 com a adição de DTAB até 0,8 mM. A estrutura mais flexível do novo complexo caseína/DTAB eleva a micropolaridade do meio aumentando a razão I_1/I_3 . Já quando ocorre a saturação do complexo caseína / DTAB a razão torna-se constante [42].

3.2.4. Efeito da concentração de SDS sobre a emissão de fluorescência da caseína.

Informações sobre a natureza dos agregados formados entre proteínas e surfactantes podem ser obtidas através da fluorescência estacionária dos resíduos de triptofano da cadeia protéica. Na prática, o espectro observado representa a média dos

efeitos causados sobre os resíduos de triptofanos da caseína nos seus respectivos microambientes da estrutura da proteína [25].

As figuras 32 e 33 mostram a influência da concentração de SDS na intensidade de emissão e no comprimento de onda máximo, respectivamente. Observa-se uma acentuada diminuição da intensidade com aumento da concentração de SDS até 3,2mM. Essa diminuição da intensidade mostra que os monômeros de SDS ligam-se a micelas de caseína numa concentração de surfactante menor que 3,2 mM. Portanto, os resíduos de Trp estão localizados em um meio mais hidrofóbico quando micelas de caseína estão ligadas com SDS. Isso leva a diminuição do λ_{\max} . Quando a concentração de SDS excede 8mM, referentes ao ponto de saturação das micelas de caseína por SDS obtidos por tensiometria e condutividade, não há mais influencia do SDS sobre os resíduos de triptofano [41].

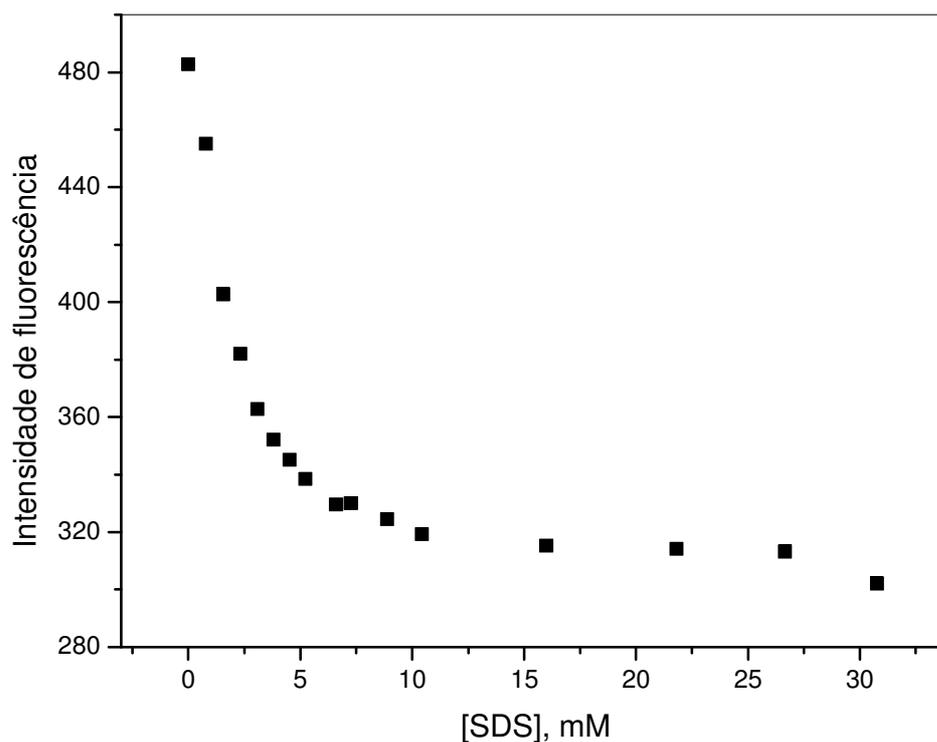


Figura 32. Curva de intensidade de fluorescência *versus* [SDS].

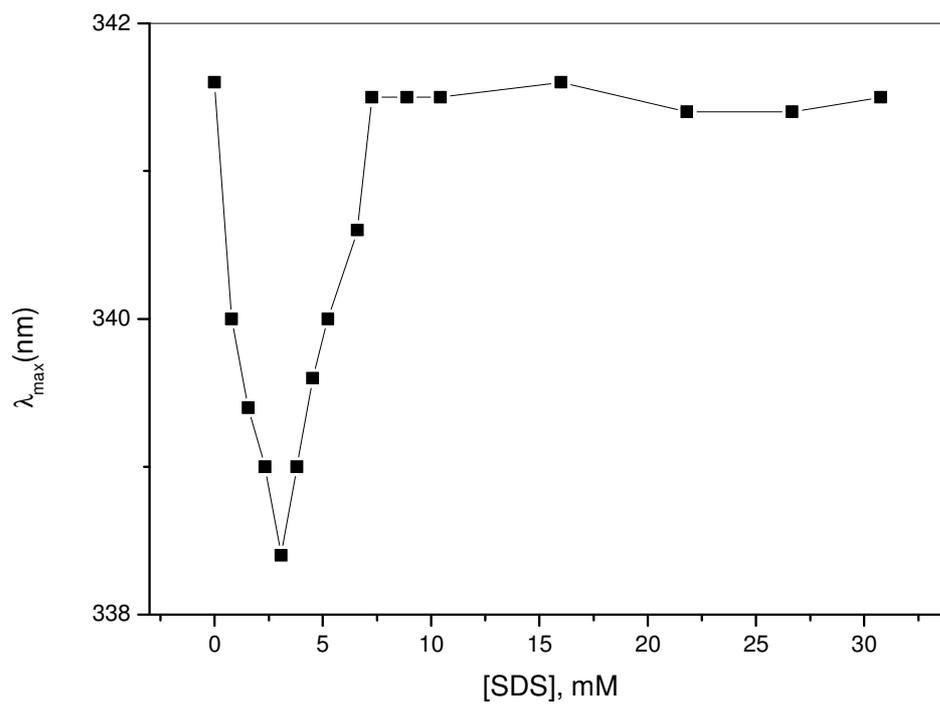


Figura 33. Curva de λ_{max} versus [SDS].

3.2.5. Efeito da concentração de DTAB sobre a emissão de fluorescência da caseína.

Foram feitos estudos de fluorescência de misturas de caseína com DTAB em concentrações menores que 1,2mM e maiores que 20mM, isso porque entre essas concentrações o sistema se apresenta muito turvo. A figura 34 mostra o a curva de intensidade em função da concentração de DTAB.

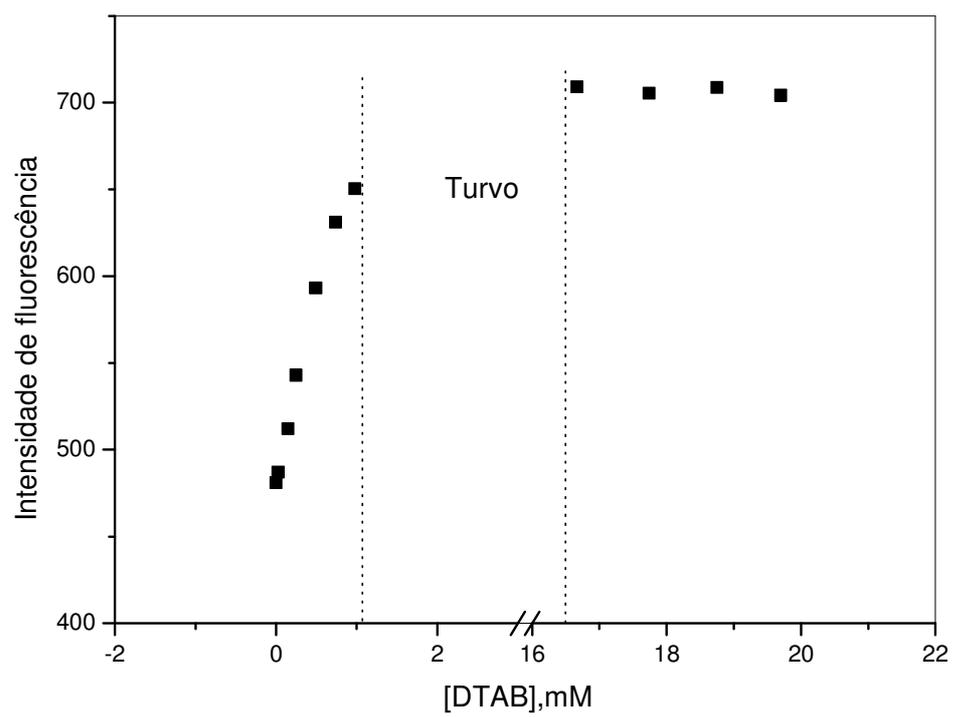


Figura 34. Curva de intensidade de fluorescência *versus* [DTAB].

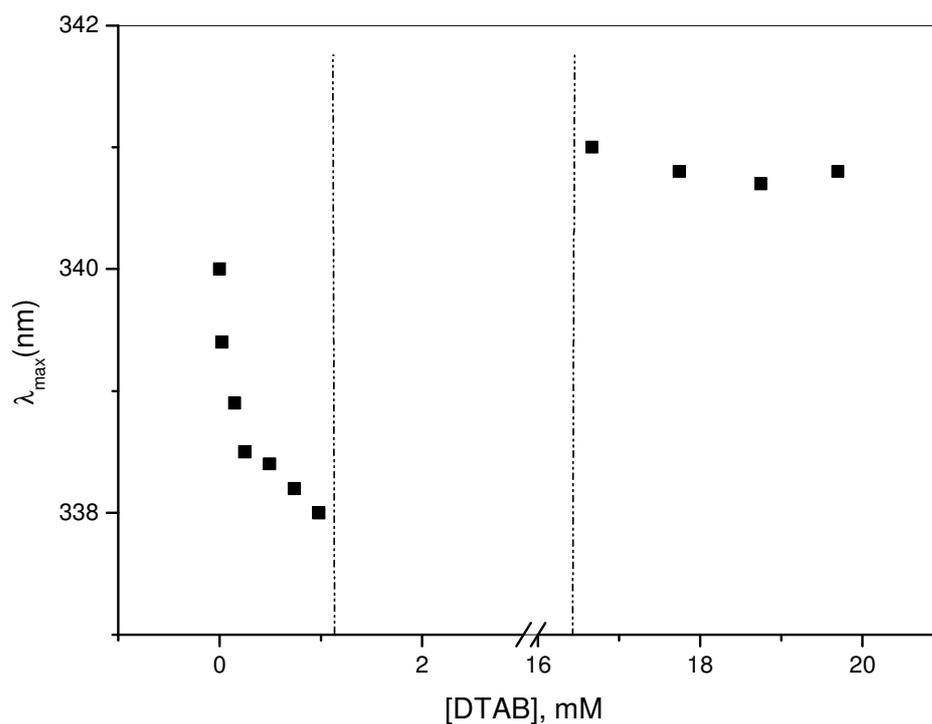


Figura 35. Curva de λ_{\max} versus [DTAB].

É observado nas figuras que um pequeno aumento no valor da intensidade é acompanhado com uma mudança no comprimento de onda com o aumento da concentração de DTAB. Quando o sistema deixa de ser turvo, tanto o comprimento de onda quanto a intensidade ficam inalteradas com o aumento da concentração de DTAB.

Como foi discutido anteriormente há a formação de complexos caseína/proteína demonstrada pelas técnicas de tensão superficial e condutividade. Por isso, o aumento da intensidade, junto com a diminuição do comprimento de onda, pode ser explicado pelo fato de os resíduos de Trp se localizarem em um meio mais hidrofóbico e assim estarem mais expostos devido ao aumento da micropolaridade pela formação de complexos de DTAB/caseína. Após a saturação dos complexos DTAB/caseína, tanto o comprimento de onda quanto a intensidade permanecem constantes [42].

3.2.6. Efeito da concentração de NaDC sobre a emissão de fluorescência da caseína.

A figura 36 mostra a influência da concentração de NaDC na intensidade. Os resultados vêm de encontro aos obtidos por condutividade elétrica, tensão superficial e fluorescência do pireno, que indicam ausência de interação entre NaDC e caseína. Já que não houve uma alteração considerável na intensidade de fluorescência e também não houve nenhuma alteração do comprimento de onda máximo que permaneceu constante.

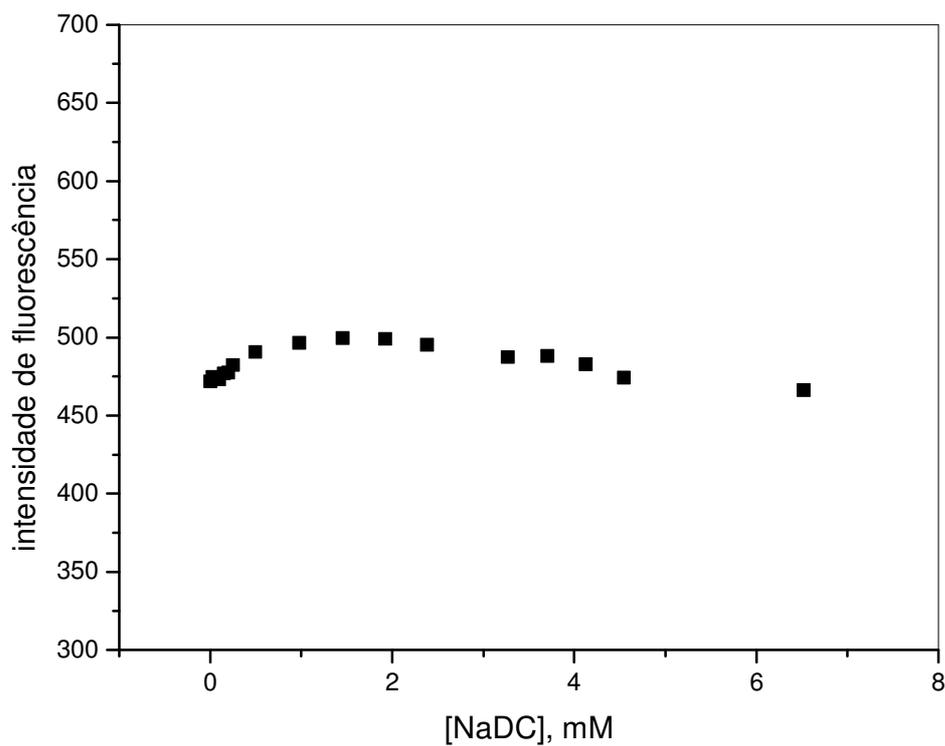


Figura 36. Curva de Intensidade de fluorescência *versus* [NaDC].

CONCLUSÕES

Muitas técnicas são usadas para caracterizar a auto-associação entre polímeros e surfactantes. O estudo desse processo de associação é importante porque a combinação desses componentes promove mudanças nas estabilidades de propriedades físico-químicas, na reologia, na estabilidade de emulsões, entre outras.

Os resultados obtidos através das técnicas de tensão superficial, condutividade elétrica e fluorescência mostraram que há a formação de complexos EHEC/SDoD. Para o sistema EHEC/NaDC, somente a técnica de tensão superficial foi sensível para detectar a formação do complexo.

Quando se estudou a interação da caseína com os surfactantes SDS, DTAB, NADC, observou-se pelas técnicas que há a formação de complexos caseína/SDS e a formação de complexos caseína/DTAB. Porém as técnicas de tensão superficial, condutividade elétrica e fluorescência não mostraram a presença dos parâmetros de auto-associação da caseína com o NaDC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. HOLMBERG, K., JÖNSSON, B., KRONBERG, B., LINDMAN, B., Surfactants and Polymers in Aqueous Solution, 2nd edition, Editora Wiley, 2002.
2. PATEL, T., GHOSH, G., ASWAL, V., BAHADUR, P. Structural characteristics of the aqueous mixed nonionic–cationic surfactants: Effect of chain length, head group and temperature. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2009, 333, 145-149.
3. GRUEN, D. W. R. The standard picture of ionic micelles. Prog. Coll. And Polymer Sci. 1985, 70, 6-16.
4. MENGER, F. M., DOLL, D. On the structure of micelles. J. Am. Chem. Soc. 1984, 106, 1109-1113.
5. FROMHERTZ, F. Micelle structure: a surfactant block model. Chem. Phys. Lett. 1981, 77, 460-466.
6. DILL, K., FLORY, P. Molecular organization in micelles and vesicles. Proc. Natl. Acad. Sci. Usa. 1981, 78, 678-680.
7. SHAW, D. J. Introdução à Química dos Colóides e de Superfícies; tradução: Maar, J. H. São Paulo: Edgard Blücher, 1975.
8. ZANA, R.; GUVELI, D. Floorescence probing study of the association of bile salt in aqueous solutions, J. Phys. Chem. 1985, 89, 1687-1690.
9. SMALL, D. M.; PENKETT, S. A. Studies on Simple and mixed bile salt micelles by nuclear magnetic resonance spectroscopy. Biochim. Biophys. Acta. 1969, 176, 178-189.

10. MCMURRY, J. Química orgânica. Pioneira Thomson Learning, São Paulo, 2005.
11. DAL BÓ, A., ZANETTE, D., SHWEITZER, B., FELIPPE, A. C., LINDMAN, B. Ethyl(hydroxyethyl)cellulose-sodium dodecanoate interaction investigated by surface tension and electrical conductivity techniques. *Colloids Surf. , A* 2005, 256, 171-180.
12. KARLSTROM, G.; LINDMAN, B., In *Organized Solutions: Surfactants in Science and Technology*, Marcel Dekker, New York, 1992.
13. ZANETTE, D., FRESCURA, V. Ideal Mixing of Polymer-Surfactant Complexes of Polyethylene Oxide and Sodium Dodecyl Sulfate Plus Sodium Dodecanoate. *J. Colloid Interface Sci.* 1999, 213, 379–385.
14. ANTIPOVA, A. S., SEMENOVA, M. G., BELYAKOVA, L. E., IL'IN, M. M. On relationships between molecular structure, interaction and surface behavior in mixture: small-molecule surfactant+protein. *Colloids Surf., B* 2001, 21, 217–230.
15. KRÄGEL, J., WÜSTNECK, R., HUSBAND, F., WILDE, P. J., MAKIEVSKI, A.V., GRIGORIEV, D.O., LI, J.B. Properties of mixed protein/surfactant adsorption layers. *Colloids Surf., B* 1999, 12, 399–407.
16. CONG H., TAO L.L., YU Y.H., TAO Z., YANG F., ZHAO Y.J., XUE S.F., LAWRENCE G.A., WEI G. Interaction between Tetramethylcucurbit[6]uril and Some Pyridine Derivates. *J. Phys. Chem. C.* 2007, 111, 2715-2723.
17. WÜSTNECK, R., KRÄGEL, J., MILLER, R., WILDE, P.J., CLARK, D.C., The adsorption of surface-active complexes between β -casein, β -lactoglobulin and ionic surfactants and their shear rheological behaviour. *Colloids Surf. , A* 1996, 114, 255-265.

18. LUCASSEN-REYNDERS, E.H., Competitive adsorption of emulsifiers 1. Theory for adsorption of small and large molecules. *Colloids Surf. , A* 1994, 91, 79-88.
19. GHOREISHI, S.M., BLOOR, D.M. , WARR, D.M., WYN-JONES, E. Electromotive Force Studies Associated with the Binding of Sodium Dodecyl Sulfate to a Range of Nonionic Polymers. *Langmuir*, 1999, 15, 4380-4387.
20. ZANETTE, D., SOLDI, V., ROMANi, A. P., GEHLEN, M. H. The Role of the Carboxylate Head Group in the Interaction of Sodium Dodecanoate with Poly(ethylene oxide) Investigated by Electrical Conductivity, Viscosity, and Aggregation Number . *J. Colloid Interface Sci.* 2003, 262, 400-408.
21. ZANA, R.; YIV, S.; STRAZIELLE, C.; LIANOS, P. Effect of Alcohol on The Properties of Micellar Systems : I. Critical Micellization Concentration, Micelle Molecular Weight and Ionization Degree, and Solubility of Alcohols in Micellar Solutions. *J. Colloid Interface Sci.* 1981, 80, 208-223.
22. JONES, M. N. The interaction of sodium dodecyl sulfate with polyethylene oxide. *J. Colloid Interf. Sci.* 1967, 23, 36-42.
23. AHRINGBAUER, I. Polymer–Surfactant Interaction As Revealed by the Time Dependence of Surface Tension. The EHEC/SDS/Water System. *Langmuir*, 1997, 13, 2242–2249.
24. TURRO, N. J.; BARETZ, B. H.; KUO, P. L. Photoluminescence probes for the investigation of interactions between sodium dodecylsulfate and water-soluble polymers. *Macromolecules*, 1984, 17, 1321-1324.

25. WINNIK, F. M.; REGISMOND, S. T. A. Fluorescence Methods in The Study of The Interactions of Surfactants with Polymers. *Colloids Surf. , A* 1996, 118, 1-39.
26. FARRELL, H. M., WICKHAM, E. D., UNRUH, J. J., Qi, P. X., HOAGLAND P. D. Secondary structural studies of bovine caseins: temperature dependence of β -casein structure as analyzed by circular dichroism and FTIR spectroscopy and correlation with micellization. *Food Hydrocolloids*, 2001, 15, 341-35.
27. GOUIN, S.; ZHU, X. X. Fluorescence and NMR Studies of the Effect of a Bile Acid Dimer on the Micellization of Bile Salts. *Langmuir*, 1998, 14, 4025-4029.
28. OAKENFULL, D. G.; FISHER, L. R. The Role of Hydrogen Bonding in The Formation of Bile Salt Micelles. *J. Phys. Chem.* 1977, 81, 1838-1841.
29. SCHWUGER, M. J. Mechanism of Interaction between ionic Surfactant and Polyglycol Ethers in Water. *J. Colloid Interface Sci.* 1973, 43, 491-498.
30. EVANS, D. F.; WENNERSTROM, H. *The Colloidal Domain: Where Physics, Chemistry, Biology and Technology Meet.* New York, VCH Publishers. 515, 1994.
31. MURATA, M.; ARAI, H. The Interaction Between Polymer and Surfactant: The Effect of Temperature and Added Salt on The Interaction Between Polyvinylpyrrolidone and Sodium Dodecyl Sulfate. *J. Colloid Interface Sci.* 1973, 44, 475-480.
32. CABANE, B. Structure of Some Polymer-Surfactant Aggregates in Water *J. Phys. Chem.* 1977, 81, 1639-1645.

33. SCHWEITZER, B., FELIPPE, A., DAL BO, A., MINATTI, E., ZANETTE, D. Competitive Process of Binding Between the Anionic Surfactants Sodium Dodecyl Sulfate and Sodium Cholate in Bovine Serum Albumin. *Macromolecules*. 2005, 229, 208-216.
34. ZANA, R.; YIV, S.; STRAZIELLE, C.; LIANOS, P. Effect of Alcohol on The Properties of Micellar Systems : I. Critical Micellization Concentration, Micelle Molecular Weight and Ionization Degree, and Solubility of Alcohols in Micellar Solutions. *J. Colloid Interface Sci.* 1981, 80, 208-223.
35. WINNIK, F. M.; REGISMOND, S. T. A. Fluorescence Methods in The Study of The Interactions of Surfactants with Polymers. *Colloids Surf. , A* 1996, 118, 1-39.
36. DUBIN, P. L., GRUBER, J. H., XIA, J., ZHANG, H. The Effect of Cations on The Interaction Between Dodecylsulfate Micelles and Poly(Ethyleneoxide). *J. Colloid Interface Sci.* 148, 35-41 (1992).
37. BENRRAOU, M., BALES, B., ZANA, R. Effect of the Nature of the Counterions on the Interaction Between Cesium and Tetraalkylammonium Dodecylsulfates and Poly(Ethylene Oxide) or Poly(Vinylpyrrolidone). *J. Colloid Interface Sci.* 2003, 267, 519-523.
38. BARRY, B. W.; GRAY, G. M. Mixed Micelle Formation in Aqueous Solutions of Alkyltrimethylammonium Cholates. *J. Colloid Interface Sci.* 1975, 52, 314- 326.
39. ZANA, R., GUVELI, D. Fluorescence Probing Study of The Association of Bile Salts in Aqueous Solutions. *J. Phys. Chem.* 1985, 89, 1687-1690.
40. SMALL, D. M. Size and Structure of Bile Salts. Influence of Structure, Concentration, Counterion Concentration, pH, and temperature. *Adv. Chem. Ser.* 1968, 84, 31-51.

41. LIU, Y., GUO, R. Interaction between casein and sodium dodecyl sulfate. *J. Colloid Interface Sci.* 2007, 315, 685-692.
42. LIU, Y., GUO, R Interaction between Casein and the Oppositely Charged Surfactant. *Biomacromolecules*, 2007, 8, 2902-2908.