

Universidade de São Paulo
Instituto de Física

Investigação da interação de proteínas modelo
com líquidos iônicos e surfactantes em meio
aquoso

Juliana Raw



Orientador: Prof. Dr. Leandro R. S. Barbosa

Tese de doutorado apresentada ao Instituto de Física como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Leandro Ramos Souza Barbosa (Orientador) - IFUSP

Prof. Dr. Caetano Rodrigues Miranda - IFUSP

Prof^a. Dr^a. Thereza Amélia Soares da Silva - FFCLRP USP

Dr^a. Leticia Maria Zanphorlin Murakami - CNPEM

Dr^a. Juliana Sakamoto Yoneda - CNPEM

São Paulo
2023

FICHA CATALOGRÁFICA
Preparada pelo Serviço de Biblioteca e Informação
do Instituto de Física da Universidade de São Paulo

Raw, Juliana

Investigação da interação de proteínas modelo com líquidos iônicos e surfactantes em meio aquoso. São Paulo, 2023.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Instituto de Física. Depto. de Física Geral

Orientador: Prof. Dr. Leandro Ramos de Souza Barbosa

Área de Concentração: Física Experimental - Biofísica.

Unitermos: 1. Biofísica molecular; 2. Proteínas; 3. Líquidos iônicos.

USP/IF/SBI-045/2023

University of São Paulo
Physics Institute

Investigation of the interaction of model proteins with ionic liquids and surfactants in aqueous media

Juliana Raw

Supervisor: Prof. Dr. Leandro R. S. Barbosa

Thesis submitted to the Physics Institute of the
University of São Paulo in partial fulfillment of the
requirements for the degree of Doctor of Science.

Examining Committee:

Prof. Dr. Leandro Ramos Souza Barbosa (Supervisor) - IFUSP
Prof. Dr. Caetano Rodrigues Miranda - IFUSP
Prof. Dr. Thereza Amélia Soares da Silva - FFCLRP USP
Dr. Letícia Maria Zanphorlin Murakami - CNPEM
Dr. Juliana Sakamoto Yoneda - CNPEM

São Paulo
2023

Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Leandro R. S. Barbosa, pelos aprendizados, pelo companheirismo, pela empatia e pela dedicação essenciais tanto para a conclusão deste trabalho como para a minha formação.

Agradeço à Prof^a. Dr^a. M. Teresa Lamy, ao Dr. Evandro L. Duarte, à Prof^a. Dr^a. Karin do Amaral Riske e à Dr^a. Letícia Zanphorlin pela disponibilidade e suporte na realização das explorações experimentais.

Agradeço aos meus colegas de grupo e colaboradores, em especial ao Dr. Leandro Franco, Me. Luis Fernando Rodrigues e ao Dr. Pedro Leonidas pelas discussões e contribuições para o aprimoramento deste trabalho.

Agradeço à minha família, meus pais, Elizabeth e Maurício, minha irmã, Nina, e meu parceiro, Caio, pelo incentivo e apoio em todos os momentos.

Agradeço à agência de fomento FAPESP (#2015/15822-1) pelo auxílio financeiro essencial à realização deste trabalho.

O presente trabalho também foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Resumo

Exploramos, neste trabalho, os mecanismos de interação entre as proteínas BSA, HSA e lisozima e os líquidos iônicos imidazólicos em meio aquoso, juntamente com as modificações estruturais envolvidas. Os líquidos iônicos são moléculas versáteis que vêm ganhando notoriedade em múltiplos campos do conhecimento. Buscamos diminuir as lacunas ainda existentes no entendimento da interação dessas moléculas em sistemas de interesse biológico, a fim de suportar o desenvolvimento de aplicações dos líquidos iônicos, principalmente no campo farmacêutico.

Os resultados demonstram que a interação entre os líquidos iônicos e as proteínas BSA e HSA são semelhantes. Ambos os sistemas apresentaram supressão da fluorescência e deslocamento do pico de emissão para menor comprimentos de onda. Observamos o aumento do raio de giro, bem como a perda da estrutura globular das proteínas e formação de estruturas semelhantes a micelas com o aumento da concentração de líquidos iônicos em ambos os sistemas. Com base em nossos dados experimentais, propomos que a interação ocorre prioritariamente em três estágios. No primeiro estágio, há uma interação inicial de baixa intensidade, movida principalmente pelo efeito eletrostático. No segundo estágio, com a adição do líquido iônico, o efeito hidrofóbico se torna mais relevante, resultando em mudanças significativas nos parâmetros estudados. Nesse estágio, observa-se a exposição de sítios hidrofóbicos, desenovelamento parcial das proteínas e uma interação cooperativa. No terceiro estágio, ocorre a saturação da interação e a formação de micelas em solução. A proteína lisozima interage de forma mais fraca com os líquidos iônicos. Observamos a supressão da intensidade de fluorescência, conservação do comprimento de onda de emissão e mudanças estruturais sutis. Há evidências da formação de micelas de líquido iônico decoradas com lisozima.

Acreditamos que este trabalho contribui para o entendimento da interação entre líquidos iônicos e proteínas, destacando características que podem ser relevantes para o *design* de líquidos iônicos em diversas aplicações, além de ressaltar o potencial tóxico dos líquidos iônicos para sistemas com interesse biológico.

Palavras-chave: Líquido iônico; BSA; HSA; lisozima; interação proteína-surfactante.

Abstract

In this study, we investigated the interaction mechanisms between the proteins BSA, HSA, and lysozyme, and imidazolium ionic liquids in an aqueous medium, along with the associated structural modifications.

Our results demonstrate that the interaction between the ionic liquids and BSA protein is similar to that observed with HSA protein. Both systems exhibited fluorescence quenching and a shift in the emission peak towards shorter wavelengths. Moreover, we observed an increase in the radius of gyration, loss of the proteins' globular structure, and the formation of micelle-like structures as the concentration of ionic liquids increased in both systems.

Based on our experimental data, we propose a three-stage interaction process. In the first stage, a low-intensity initial interaction occurs, primarily driven by the electrostatic effect. In the second stage, the hydrophobic effect becomes more prominent with the addition of the ionic liquid, leading to significant changes in the studied parameters. In this stage, the exposure of hydrophobic sites, partial unfolding of the proteins without significant loss of the secondary structure, and cooperative interaction are observed. The third stage involves saturation of the interaction and the formation of micelles in solution.

The interaction between lysozyme protein and the ionic liquids is comparatively weaker. We observed suppressed fluorescence intensity, conserved emission wavelength, and subtle structural changes. Furthermore, there is evidence of the formation of ionic liquid micelles decorated with lysozyme.

This study contributes to the understanding of the interaction between ionic liquids and proteins, highlighting characteristics that have potential implications for designing ionic liquids in various applications. Additionally, it underscores the potential toxic effects of ionic liquids in biologically relevant systems.

Keywords: Ionic liquid; BSA; HSA; lysozyme; protein-surfactant interaction.

Lista de Figuras

Figura 1: Linha do tempo com os fatos mais relevantes para o estudo dos aminoácidos e proteínas.	2
Figura 2: Estrutura de um aminoácido, onde R corresponde à cadeia lateral.	3
Figura 3: Os 21 aminoácidos comuns. Referências: [10] [11]	3
Figura 4: Estruturas de organização de uma proteína. Adaptado de [14].....	5
Figura 5: Estrutura cristalográfica da albumina de soro humano, imagem obtida a partir do <i>Protein Data Bank RCSB PDB (rcsb.org)</i> , código 4F5S [19]. Em destaque subdomínios e triptofanos.....	7
Figura 6: Estrutura da HSA representando os domínios e sítios de ligação de 5 tipos de ácidos graxos escritos na notação Cm:n (onde m é o número de carbonos da molécula e n é o número de ligações duplas). Os domínios estão coloridos da seguinte forma: I em vermelho, II em verde e III em azul. Os subdomínios A e B estão nas mesmas cores dos domínios, onde A é a mais escura. Os ácidos graxos estão coloridos conforme os átomos (carbono: cinza; oxigênio: vermelho). Quando dois ácidos graxos se ligam em regiões muito próximas, um deles está em cinza mais escuro. Figura reproduzida de Bhattacharya e colaboradores [20], Copyright 2023, com permissão de Elsevier (https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4158).	8
Figura 7: Estrutura cristalográfica da lisozima da clara do ovo da galinha, imagem obtida a partir do <i>Protein Data Bank RCSB PDB (rcsb.org)</i> , código 1LYZ [22]. Triptofanos em destaque.	9
Figura 8: Representação esquemática: (A) da água (— ligação covalente entre os átomos de oxigênio e hidrogênio dentro da molécula de água, -- ligação de hidrogênio entre as moléculas de água); (B) das moléculas de surfactante na superfície, interface água-ar; (C) formação de micelas em solução quando a concentração micelar crítica é atingida.	12
Figura 9: Espectro eletromagnético, com destaque na faixa do visível, com frequência da radiação, comprimento de onda e sistemas com escala de grandeza aproximada ao comprimento de onda. Imagem editada de [25] com a adição da escala aproximada do comprimento de onda.	14
Figura 10: Esquema ilustrativo do experimento para medir a absorvância. Imagem editada de [30].....	16
Figura 11: Diagrama sobre a interação da radiação com a matéria. Editado de [31].....	18
Figura 12: Diagrama de Jablonski. As linhas pretas representam os níveis energéticos, as setas azuis a absorção de radiação promovendo a excitação da molécula. As setas tracejadas representam transição sem emissão de radiação, onde a amarela representa a conversão interna (dentro da mesma multiplicidade de spin), a vermelha representa o cruzamento intersistemas (diferentes multiplicidades de spin, como exemplificado no quadro vermelho tracejado) e a verde representa o relaxamento vibracional, isto é, perda de energia de forma não radiativa. A seta sólida em roxo claro representa o processo de emissão através da fluorescência e a seta em roxo escuro representa a emissão através da fosforescência.	19
Figura 13: Estema ilustrativo da relaxação de uma molécula fluorescente com o solvente. O círculo representa a molécula fluorescente com momento de dipolo no estado fundamental μ_F e momento de dipolo no estado excitado μ_E , as elipses representam o solvente, no caso, moléculas de água, onde $\mu_E > \mu_F$. Adaptação da figura 6.7 de “ <i>Principles of Fluorescence Spectroscopy</i> ” [27].	22

Figura 14: Esquema da molécula do aminoácido triptofano. Estão identificados o anel benzênico e o anel pirrólico que juntos formam o indol. No estado excitado do triptofano 1L_a a nuvem eletrônica é deslocada do anel pirrólico para o anel benzênico. As cargas e as cores correspondem ao deslocamento do comprimento de onda da emissão. Uma carga negativa nas proximidades do anel benzênico ou uma carga positiva nas proximidades do anel pirrólico causam <i>blue-shift</i> . Uma carga positiva nas proximidades do anel benzênico ou uma carga negativa nas proximidades do anel pirrólico causam <i>red-shift</i>	24
Figura 15: Esquema ilustrativo do efeito de filtro interno. A seta azul representa o feixe de fótons irradiado sobre a amostra, que perde intensidade ao longo da cubeta. A seta verde representa a intensidade de emissão, que também perde intensidade ao longo da cubeta. l_1 é o comprimento da cubeta ao longo do feixe incidente, l_2 o comprimento da cubeta a 90° do feixe incidente. l_{ex} é o comprimento que percorrido até atingir o fluoróforo que se encontra no centro amostra, l_{em} é o comprimento percorrido pela emissão a partir do fluoróforo.....	26
Figura 16: Esquema ilustrativo do equipamento de dicroísmo circular. Adaptado de Tamara Šmidlehner et al. [37], Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0).	29
Figura 17: Espectro de CD característicos das 3 principais organizações estruturais, alfa-hélice, folha beta e desordenada. Imagem traduzida de [38].....	29
Figura 18: Lado esquerdo: Esquema ilustrativo dos vetores campo elétrico de onda circularmente polarizada a direita E_D e a esquerda E_E . No caso ilustrado $E_D > E_E$ simulando uma maior absorção de E_E em um experimento de CD. Lado direito: Elipse com grau de elipticidade indicado, θ (ângulo oposto ao semi-eixo menor de uma elipse). Referência: adaptado de [39].	30
Figura 19: Linha cronológica de marcos relevantes para o estudo da estrutura da matéria e macromoléculas da radiação. Referências: [28]	33
Figura 20: Experimento de difração por uma fenda simples.....	34
Figura 21: Difração por uma rede cristalina.....	35
Figura 22: Espalhamento da radiação por um material não cristalino. Referência: [43].	36
Figura 23: Gráfico de Kratky de uma proteína enoveladas, parcialmente desenovelada e totalmente desenovelada. Referências: figura 24 de [48].....	40
Figura 24: Comparação entre a estrutura molecular de um cristal e a função de distribuição de pares correspondente. Adaptada da figura 2 de [48].....	40
Figura 25: Intensidade de espalhamento de SAXS, em escala mono-log, e função de distribuição de pares, $p(r)$, de cinco tipos de forma de partículas (esfera - vermelho, esfera oca - azul, disco - laranja, haste - verde e haltere - magenta). Referência: adaptado da figura 5 de [49].	41
Figura 26: (A) Antiga fonte de luz síncrotron Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, LNLS, hoje desativado. (B) Sírius, nova fonte do LNLS.	42
Figura 27: Estrutura típica de acelerador tipo Síncrotron.....	43
Figura 28: Esquema ilustrativo do equipamento DSC.	45
Figura 29: (A)Espectro de absorbância do líquido iônico $[C_{14}MIM][Cl]$ em variadas concentrações. (B) Absorbância do líquido iônico $[C_{14}MIM][Cl]$ nos comprimentos de onda 280nm, 295nm e 350nm em função da concentração de $[C_{14}MIM][Cl]$	49
Figura 30: (A)Espectro de absorbância da BSA em ausência e em presença de $[C_{14}MIM][Cl]$. <i>Insert</i> com destaque na região do pico. (B)Absorbância nos comprimentos de onda 295nm e 350nm em função da razão molar $[C_{14}MIM][Cl]:BSA$ em eixo inferior e concentração de $[C_{14}MIM][Cl]$ no eixo superior.....	50

Figura 31: Absorbância 290nm (A) e em 350nm (B) em função da razão molar entre líquido iônico e a proteína BSA. As curvas foram desenhadas a fim de servir como guiar para os olhos.	51
Figura 32: (A) Fluorescência do triptofano em ausência e presença de [C ₁₄ MIM][Cl]. Os espectros foram divididos pelo pico da intensidade de emissão do triptofano em ausência de LI. (B) Absorbância em 350nm (eixo esquerdo, dados na cor preta) e em 295nm (eixo direito, dados na cor vermelha) do triptofano em presença e ausência de [C ₁₄ MIM][Cl], curvas traçadas para guiar os olhos.	52
Figura 33: Espectro de emissão de fluorescência da proteína BSA (30µM) em ausência e presença de variadas concentrações de [C ₁₄ MIM][Cl]. A intensidade relativa dos espectros foi calculada dividindo a intensidade pela intensidade do pico de emissão da proteína em ausência de ligante. Os espectros foram corrigidos pelo efeito da lâmpada e pelo efeito de filtro interno. A seta vermelha indica o sentido geral do pico de emissão com o aumento da concentração de LI.	53
Figura 34: Intensidade relativa de fluorescência da proteína BSA (30µM) em ausência e em presença de (A) [C ₁₂ MIM][Cl] e (B) [C ₁₀ MIM][Cl]. Na legenda a concentração absoluta de LI e entre parênteses a razão molar entre LI:BSA. A seta vermelha indica o sentido geral do pico de emissão com o aumento da concentração de LI.	54
Figura 35: Razão entre intensidade de fluorescência em presença do supressor e ausência do supressor, F/F_0 , função da razão molar entre LI e BSA.	55
Figura 36: Ajuste de Stern-Volmer da supressão da fluorescência da BSA causada pela presença dos LIs [C ₁₄ MIM][Cl], [C ₁₂ MIM][Cl] e [C ₁₀ MIM][Cl].	56
Figura 37: Comprimento de onda do pico da emissão de fluorescência em função da razão molar [LI]:[BSA].	57
Figura 38: Intensidade de fluorescência normalizada no intervalo entre 0 e 1 para a proteína BSA em ausência e em presença de [C ₁₄ MIM][Cl] nas razões molares [C ₁₄ MIM][Cl]:[BSA] conforme legenda; em destaque o pico de emissão em ausência de [C ₁₄ MIM][Cl]. No <i>insert</i> são apresentadas todas as curvas experimentais normalizadas, a concentração de [C ₁₄ MIM][Cl] aumenta conforme a direção da seta.	59
Figura 39: Espectro de intensidade de fluorescência relativa de 10µM da proteína BSA _{fatty free} (sem ácido graxo) em ausência e em presença de variadas concentrações de [C ₁₄ MIM][Cl]. Na legenda a concentração absoluta de LI e entre parênteses a razão molar. A seta vermelha indica o sentido geral do pico de emissão com o aumento da concentração de LI.	60
Figura 40: (A) Razão entre intensidade de fluorescência em presença de LI e em ausência de LI (eixo esquerdo, dados na cor preta) e comprimento de onda do máxima de emissão (eixo direito, dados na cor vermelha) em função da razão molar entre a concentração de [C ₁₄ MIM][Cl] e de BSA _{fatty free} . (B) Ajuste de Stern-Volmer.	61
Figura 41: Espectro de intensidade de fluorescência relativa da proteína BSA (30µM) em ausência e em presença de variadas concentrações de TTAB. Na legenda a concentração absoluta de TTAB e entre parênteses a razão molar. A seta vermelha indica o sentido geral do pico de emissão com o aumento da concentração de TTAB.	62
Figura 42: (A) Razão entre intensidade de fluorescência em presença de supressor e ausência do supressor, F/F_0 , em função da razão molar entre supressor, ou ligante, e BSA. (B) Comprimento de onda do pico de emissão em função da concentração molar.	63
Figura 43: Espectro de dicroísmo circular, em unidades de grau de elipticidade, da BSA em ausência em presença de variadas concentrações de [C ₁₄ MIM][Cl]. No <i>insert</i> porcentagem calculada da estrutura α -hélice em função da razão molar.	64

Figura 44: Espectro de dicroísmo circular, em unidades de graus de elipticidade, da BSA em ausência em presença de variadas concentrações de [C ₁₂ MIM][Cl]. No <i>insert</i> porcentagem calculada da estrutura α -hélice em função da razão molar.	65
Figura 45: Espectro de dicroísmo circular, em unidades de graus de elipticidade, da BSA em ausência em presença de variadas concentrações de [C ₁₀ MIM][Cl]. No <i>insert</i> porcentagem calculada da estrutura α -hélice em função da razão molar.	66
Figura 46: Intensidade de espalhamento de SAXS do sistema contendo BSA com variadas concentrações de [C ₁₄ MIM][Cl] e [C ₁₄ MIM][Cl] em ausência de BSA. As curvas foram deslocadas no eixo vertical para uma melhor visualização.	67
Figura 47: Intensidade de espalhamento de SAXS do sistema contendo BSA em ausência e presença de variadas concentrações de (A) [C ₁₂ MIM][Cl] e (B) [C ₁₀ MIM][Cl].	68
Figura 48: Raio de giro dos sistemas contendo BSA em presença de variadas concentrações de de LI (conforme a legenda) em função da razão.	69
Figura 49: Curva de <i>Kratky</i> do sistema BSA em ausência e em presença de variadas concentrações de [C ₁₄ MIM][Cl], de 0 μ M a 2400 μ M em A e de 4500 μ M a 18000 μ M em B.	70
Figura 50: P(r) da BSA em ausência e presença de [C ₁₄ MIM][Cl].	71
Figura 51: Envelope (esferas verdes) e PDB da proteína por cristalografia.	72
Figura 52: Envelopes (esferas) e PDB. Estrutura em ciano, verde- envelope em ausência de LI, magenta BSA na razão 10, laranja na razão 30.	73
Figura 53: Intensidade de espalhamento de SAXS do sistema contendo BSA em ausência e presença de variadas concentrações de TTAB.	74
Figura 54: Raio de giro do sistema contendo BSA e TTAB ou [C ₁₄ MIM][Cl] em função da razão molar.	75
Figura 55: Gráfico de <i>Kratly</i> na forma normalizada do sistema contendo BSA em ausência e presença de variadas concentrações TTAB. Razões molares entre 0 e 20 em A e entre 50 e 300 em B.	76
Figura 56: ΔC_p do sistema contendo a proteína BSA em ausência e presença de variadas concentrações de [C ₁₄ MIM][Cl] em função da temperatura.	76
Figura 57: Entalpia em função da razão molar [C ₁₄ MIM][Cl]:BSA.	77
Figura 58: RMSD (do inglês, <i>root mean square deviation</i>) em função do tempo de simulação.	79
Figura 59: RMSF (do inglês, <i>root mean square fluctuations</i>) em função da posição do resíduo da BSA.	80
Figura 60: Figuras ilustrativas do arquivo PDB gerado para DM de uma mesma configuração, porém rotacionadas. Destacadas em vermelho os aminoácidos 110-120, 500-535 e 560-583. Os aminoácidos 560-583 estão localizados na extrema esquerda em (A) e extrema direita em (B). Destacados em azul os triptofanos (W134 e W213) para referência.	80
Figura 61: (A) Distância mínima encontrada entre um triptofano, sendo Trp 1 o W134 e Trp 2 o W213, e uma molécula de LI. (B) Distância entre os anéis (benzeno e pirrol) do triptofano W134 e o anel imidazólico do LI, na simulação com 200 moléculas de LIs. Sendo [C ₁₄ MIM][Cl] o LI.	81
Figura 62: Número de ligações de hidrogênio (A) entre componentes da BSA ou (B) entre a BSA e moléculas de água.	82
Figura 63: PDB da simulação com 1 BSA e 200 moléculas de [C ₁₄ MIM][Cl] nos instantes (A) 50ns e (B) 500ns.	82
Figura 64: Instante 500ns na simulação de DM de 1 BSA e 200LI.	83
Figura 65: Parâmetros experimentais normalizados (entre 0 e 1) em função da razão molar.	86

Figura 66: Espectro de intensidade de fluorescência relativa da proteína HSA (60 μ M) em ausência e em presença de variadas concentrações de [C ₁₄ MIM][Cl]. Na legenda a concentração absoluta de [C ₁₄ MIM][Cl].	87
Figura 67: F/F ₀ e comprimento de onda do pico de emissão. Todas as curvas foram ajustadas funções de Boltzmann para guiar os olhos.	88
Figura 68: Espectro de dicroísmo circular, em unidades de graus de elipticidade, da HSA em ausência em presença de variadas concentrações de (A) [C ₁₄ MIM][Cl], (B) [C ₁₂ MIM][Cl]. E (C) [C ₁₀ MIM][Cl]. No insert porcentagem calculada da estrutura α -hélice em função da razão molar.	89
Figura 69: Intensidade de espalhamento de SAXS do sistema contendo HSA em ausência e presença de variadas concentrações de [C ₁₄ MIM][Cl].	90
Figura 70: Curva de Kratky do sistema HSA em ausência e em presença de variadas concentrações de [C ₁₄ MIM][Cl], de 0 μ M a 1200 μ M em A e de 1800 μ M a 12000 μ M em B.	91
Figura 71: Raio de giro dos sistemas contendo HSA e BSA em presença de variadas concentrações de [C ₁₄ MIM][Cl] e TTAB (conforme a legenda) em função da razão molar.	91
Figura 72: Espectro de intensidade de fluorescência relativa da proteína lisozima (60 μ M) em ausência e em presença de variadas concentrações de (A) [C ₁₄ MIM][Cl], (B) [C ₁₂ MIM][Cl] e (C) [C ₁₀ MIM][Cl]. Na legenda a concentração absoluta de LI e entre parênteses a razão molar. A seta vermelha indica o sentido geral do pico de emissão com o aumento da concentração de TTAB. Fluo Lisozima C14	94
Figura 73: Razão entre intensidade de fluorescência em presença de supressor e ausência do supressor, F/F ₀ , em função da razão molar entre líquido iônico e HSA. Curva desenhada para guiar os olhos.	95
Figura 74: Espectro de intensidade de fluorescência relativa da proteína lisozima (10 μ M) em ausência e em presença de variadas concentrações de TTAB. Na legenda a concentração absoluta de TTAB e entre parênteses a razão molar. A seta vermelha indica o sentido geral do pico de emissão com o aumento da concentração de TTAB.	96
Figura 75:(A) Razão entre intensidade de fluorescência da lisozima em presença de supressor e ausência do supressor, F/F ₀ , em função da razão molar entre ligante e lisozima ([C ₁₄ MIM][Cl] e TTAB) (B) Comprimento de onda do pico de emissão em função da razão molar.	97
Figura 76: Espectros de CD da proteína Lisozima em ausência e presença dos líquidos iônicos (A) [C ₁₄ MIM][Cl], (B) [C ₁₂ MIM][Cl] e (C) [C ₁₀ MIM][Cl].	98
Figura 77: Intensidade de espalhamento de SAXS do sistema contendo lisozima em ausência e presença de variadas concentrações de [C ₁₄ MIM][Cl].	99
Figura 78: Intensidade de espalhamento de SAXS do sistema contendo lisozima em ausência e presença de variadas concentrações de TTAB.	100
Figura 79: Raio de giro dos sistemas contendo lisozima em presença de variadas concentrações de TTAB e [C ₁₄ MIM][Cl] (conforme a legenda) em função da razão molar.	101
Figura 80: Curva de Kratky normalizada do sistema contendo lisozima em ausência e em presença de variadas concentrações de [C ₁₄ MIM][Cl].	102
Figura 81: Curva de Kratky normalizada do sistema contendo lisozima em ausência e em presença de variadas concentrações de TTAB.	102
Figura 82: P(r) da lisozima em presença de (A) [C ₁₄ MIM][Cl] e (B) TTAB.	103
Figura 83: Envelopes da proteína Lisozima com estrutura cristalográfica (verde) e (A) em ausência de ligantes (ciano), (B) em presença de [C ₁₄ MIM][Cl] na razão mola 20 e (C) em presença de TTAB nas razões molares 50 (magenta) e 100 (laranja).	104

Figura 84: Estrutura primária da proteína lisozima. Triptofanos marcados em verde e ligações disulfeto em retângulo preto. Figura editada de Hamdani e colaboradores [77], Copyright 2023, com permissão de Elsevier (<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.060>)..... 108

Lista de tabelas

Tabela 1: Tabela descritiva dos líquidos iônicos estudados.....	10
Tabela 2: Tabela descritiva do surfactante estudado.....	12
Tabela 3: Intensidade normalizada de emissão de referência da sonda triptofano em água em função do comprimento de onda.....	25
Tabela 4: Ajustes de K_d e K_a para os sistemas BSA em presença de $[C_{14}MIM][Cl]$, $[C_{12}MIM][Cl]$ e $[C_{10}MIM][Cl]$ obtidos a partir do ajuste de Stern-Volmer.	56
Tabela 5: Entalpia do primeiro pico, entalpia total da curva e temperatura do primeiro pico de acordo com a molar $[C_{14}MIM][Cl]:BSA$	78

Abreviaturas

BSA – *Bovine Serum Albumin*

[C₁₄MIM][Cl] – *1-Methyl-3-tetradecylimidazolium chloride*

[C₁₂MIM][Cl] – *1-Dodecyl-3-methylimidazolium chloride*

[C₁₀MIM][Cl] – *1-Decyl-3-methylimidazolium chloride*

CD – *Circular Dichroism*

CMC – Concentração micelar crítica

Da – Dalton (unidade de medida de massa, definida como 1/12 da massa do átomo de carbono-12 em seu estado fundamental. 1 Da corresponde a aproximadamente 1,66.10⁻²⁷kg).

DSC – *Differential Scanning Calorimetry*

HSA – *Human Serum Albumin*

LI – Líquido iônico

M – Molar (unidade de concentração que equivale a mols por litro)

pH – Potencial de Hidrogênio

p(r) ou P(r) – função distribuição de distância entre pares

R_g – Radio de giro ou raio de giração

SAXS – *Small Angle X-ray Scattering*

TTAB – *Tetradecyltrimethylammonium Bromide*

Sumário

I.	Introdução	1
A.	Aminoácidos	1
B.	Proteínas.....	4
1.	Albumina de soro bovino.....	6
2.	Albumina de soro humano	7
3.	Lisozima de clara de ovo de galinha.....	8
C.	Líquidos Iônicos	9
1.	Líquidos Iônicos Surfactantes Imidazólicos	10
D.	Surfactantes.....	11
II.	Objetivos.....	13
III.	Metodologia.....	14
A.	Espectroscopia na região UV-VIS	15
1.	Detalhamento teórico	15
B.	Fluorescência	17
1.	Desenvolvimento teórico	17
C.	Dicroísmo Circular.....	28
1.	Detalhamento teórico	28
D.	Espalhamento de Raios-X a baixo ângulo	33
1.	Desenvolvimento teórico	33
2.	Análise de Dados de SAXS de Proteínas.....	38
3.	Síncrotron.....	42
E.	Calorimetria de Varredura Diferencial	43
1.	Desenvolvimento teórico	44
IV.	Materiais	47
1.	Preparação das amostras	47
V.	Resultados.....	48
A.	Interação entre líquidos iônicos e albumina de soro bovino.....	48
1.	Influência dos LIs na absorção e emissão da BSA	48

2.	Efeito do LI na estrutura secundária da BSA.....	64
3.	Influência dos LIs na estrutura terciária da BSA.....	66
4.	Influência dos LIs na estabilidade térmica da BSA.....	76
5.	Investigação teórica da interação entre LI e a BSA.....	78
6.	Discussões.....	83
B.	Interação entre líquidos iônicos e albumina de soro humano.....	87
1.	Influência dos LIs na absorção e emissão da HSA.....	87
2.	Influência dos Lis na estrutura secundária da HSA.....	88
3.	Influência dos LIs na estrutura terciária da HSA.....	90
4.	Discussões.....	92
C.	Interação entre líquidos iônicos e lisozima de clara de ovo de galinha.....	93
1.	Influência dos LIs na absorção e emissão da Lisozima.....	94
2.	Efeito dos LIs na estrutura secundária da Lisozima.....	98
3.	Efeito dos LIs na estrutura terciária da Lisozima.....	99
4.	Discussões.....	105
VI.	Conclusão.....	110
VII.	Referências.....	113

I. Introdução

Líquidos iônicos compõem uma classe de moléculas que vem conquistando espaço em várias áreas do conhecimento, principalmente por sua versatilidade. Os líquidos iônicos, entre as várias aplicações que serão exploradas posteriormente, podem ser empregados como substitutos “verdes” aos solventes tradicionais, que são agressivos ao meio ambiente. Esta classe de moléculas iônicas se encontra no estado líquido em temperaturas próximas à temperatura ambiente, tornando-os de especial interesse.

Solventes orgânicos são um dos principais fatores de risco à saúde e de impacto ao meio ambiente nos processos químicos da indústria e correspondem a mais de 50% dos materiais empregados na produção de fármacos [1]. De todos os possíveis solventes a água é inegavelmente o mais seguro e vantajoso, pois não é tóxica, nem inflamável, é barata e abundante. Porém sua polaridade e grande disponibilidade de ligações de hidrogênio impossibilitam uma boa solubilização de componentes orgânicos e estabilidade de algumas reações, motivo pelo qual os solventes orgânicos são tão utilizados. Por outro lado, a adição de moléculas anfífilas, como os surfactantes e líquidos iônicos surfactantes, à água possibilita a formação de sítios apolares que suportam os componentes orgânicos e determinadas reações [2].

O desenvolvimento de novos líquidos iônicos e novas metodologias, particularmente no campo farmacêutico, demanda um entendimento da interação dessas moléculas com sistemas de interesse biológico. O presente trabalho constitui nossa contribuição a tal entendimento, através do estudo da interação de líquidos iônicos com proteínas modelo, dentre elas, a albumina do soro bovino, albumina do soro humano e lisozima da clara do ovo da galinha. Alguns princípios teóricos, definições e particularidades sobre as proteínas e líquidos iônicos são necessários e apoiarão nossas discussões, começaremos com a apresentação do constituinte das proteínas, os aminoácidos.

A. Aminoácidos

Os aminoácidos se encontram fundamentalmente em um contexto de exploração sobre a origem da vida e a natureza da matéria. Jöns Jakob Berzelius foi um proeminente cientista sueco que estudou dentre vários assuntos o efeito da eletricidade em elementos químicos [3]. Em 1807 Berzelius sugere que existe uma diferença fundamental entre substâncias orgânicas e inorgânicas, isto é, coisas encontradas em seres vivos só podem ser

feitas pelos seres vivos. Porém em 1828 Friedrich Wöhler consegue produzir substância orgânica a partir de inorgânicas e escreve para Berzelius “Tenho de lhe dizer que consigo fazer ureia sem uso de figados.” [4].

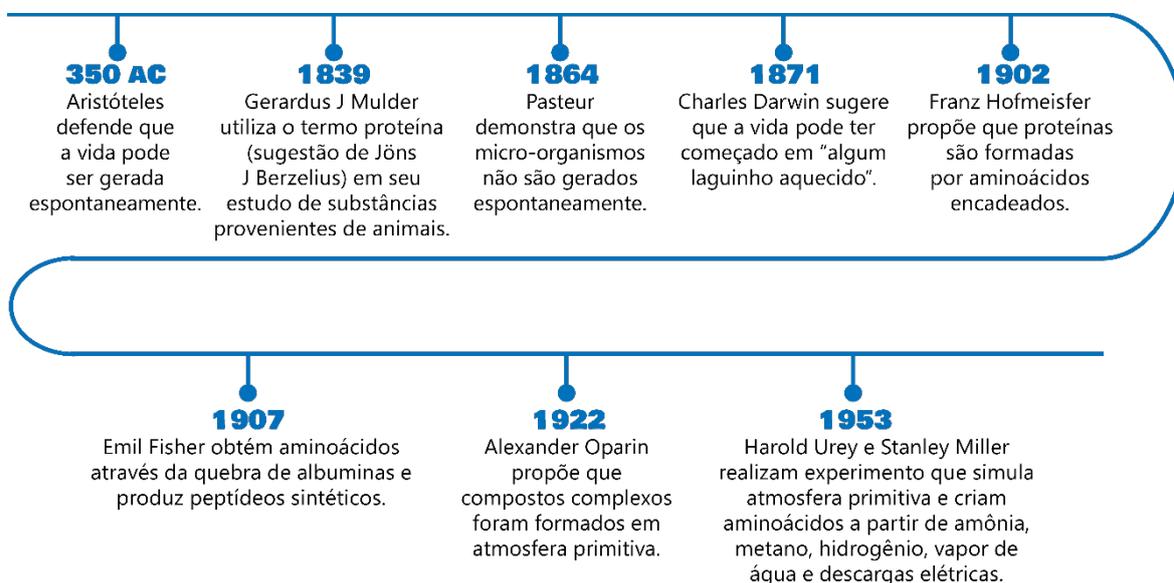


Figura 1: Linha do tempo com os fatos mais relevantes para o estudo dos aminoácidos e proteínas.

Gerrit Mulder, que trocava cartas e sugestões com Berzelius, analisava a composição de produtos naturais, principalmente os com interesse medicinal, como extratos de casca de árvore e óleos naturais. Em 1838 se concentrou na análise da composição de substâncias que continham nitrogênio, na época designadas como “albuminas”. Mulder acreditava ter encontrado uma composição comum a todas as substâncias que estava estudando, a fórmula calculada seria equivalente a $C_{400}H_{620}N_{100}O_{120}P_1S_1$. Berzelius sugeriu uma palavra derivada de $\rho\rho\rho\rho\rho\rho$, do grego, que significa ‘estar na frente’, dado que a substância parecia ser a primordial nos animais, esta palavra é ‘proteína’ [5]. A fórmula de Berzelius se demonstrou incorreta, porém a importância de seu trabalho e o termo ‘proteína’ permaneceram. Embora o aminoácido leucina tenha sido descoberto em 1819 por Proust [6] [7], a constatação que as proteínas eram compostas por aminoácidos só veio em 1902 por Franz Hofmeister [5].

Os aminoácidos possuem uma estrutura em comum ligada a uma cadeia lateral (R) que os diferencia, como pode ser observado na Figura 2. A estrutura comum é composta por um grupo amina (-NH₂) e um grupo carboxila (-COOH) ligados a um carbono central, conhecido como carbono α .

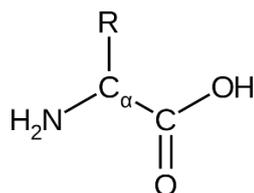


Figura 2: Estrutura de um aminoácido, onde R corresponde à cadeia lateral.

Existem muitas formas de categorizar e classificar os aminoácidos. Uma classificação comum é quanto a capacidade do corpo humano sintetizar o aminoácido, neste contexto existem os essenciais (não podem ser sintetizados e, portanto, devem ser obtidos através da dieta), não-essenciais (podem ser sintetizados e, portanto, não precisam de outra fonte) e os condicionalmente essenciais (podem ser sintetizados pelo corpo, porém, em situações especiais do organismo, como doença ou estresse, também devem ser obtidos pela dieta).

A Figura 3 traz 21 aminoácidos comuns para apreciação. Os aminoácidos comuns são definidos como os aminoácidos para os quais existe pelo menos um códon no código genético [8]. Há na literatura autores que enumeram 20 e autores que enumeram 21 aminoácidos comuns. O 21º, o aminoácido selenocisteína, nem sempre está presente nas listas pois a literatura a seu respeito é mais recente e sua presença na composição das proteínas é mais rara que a dos outros aminoácidos [9].

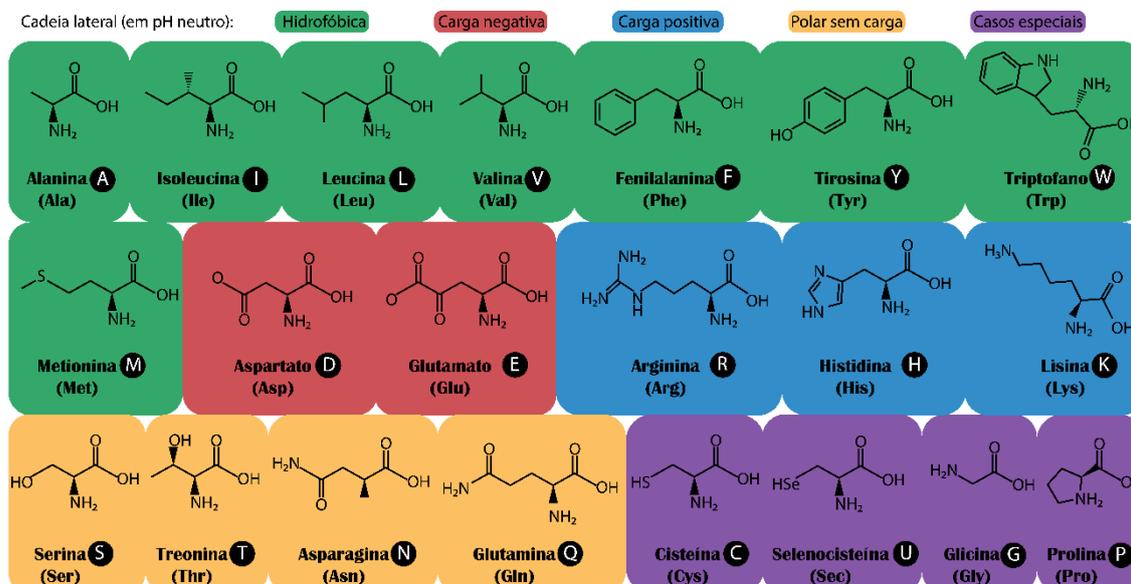


Figura 3: Os 21 aminoácidos comuns. Referências: [10] [11]

Neste trabalho, como estamos interessados em como se dá a interação entre proteínas e outras moléculas, é mais conveniente classificar os aminoácidos de acordo com a carga em

pH neutro ou como alteram a estrutura da proteína. Existem os aminoácidos com carga positiva no radical, os de carga negativa e dentro dos que não possuem carga temos os polares e os apolares, como pode ser visto na Figura 3. Nos casos especiais temos aminoácidos com outras características mais relevantes à estrutura da proteína, por exemplo, a cisteína forma ponte de dissulfeto com outra cisteína devido ao átomo de enxofre em sua estrutura. Também é interessante destacar os aminoácidos que possuem um anel aromático (composto orgânico cíclico com ligações duplas alternadas): fenilalanina, triptofano e tirosina. Um composto cíclico pode conferir a uma molécula a propriedade de fluorescente, tal efeito será explicitado na Seção III.B.

Os aminoácidos se ligam uns aos outros através de ligações peptídicas, o grupo α -carboxílico de um aminoácido forma uma ligação covalente com o grupo α -amino de outro aminoácido por eliminação de uma molécula de água, esse mecanismo pode se repetir formando assim uma cadeia polipeptídica. Em geral, cadeias contendo menos de 50 aminoácidos são chamadas de peptídeos e as contendo mais de 50 aminoácidos são chamadas de proteínas.

B. Proteínas

As proteínas são macromoléculas que desempenham um papel fundamental na manutenção da vida. Possuem funções dinâmicas, como catálise e transporte, e funções estruturais, como composição da matriz do osso e tecido conjuntivo [8].

As proteínas são constituídas por aminoácidos, que se ligam através de ligações peptídicas como detalhado anteriormente, podendo formar estruturas organizadas e relativamente rígidas. As estruturas são importantes para a função da proteína, a perda do grau de organização é chamada de desnaturação ou desenovelamento e pode causar perda da sua atividade. Tais modificações podem ser causadas por vários fatores, como interação com outras moléculas, mudanças no pH do meio, temperatura e outros. A proteína em seu estado natural é chamada de proteína nativa ou em estado nativo.

Classificamos as possíveis estruturas das proteínas em quatro níveis: **primária**, **secundária**, **terciária** e **quaternária**. A **estrutura primária** é definida pela cadeia de aminoácidos, em outras palavras, refere-se à estrutura covalente. Tal estrutura possui vital importância nos demais níveis estruturais da proteína, bem como na sua função. Os níveis superiores de organização são gerados por interações/ligações não covalentemente. Perdas

ou mutações na estrutura primária podem favorecer a má formação das outras estruturas (*misfolding*, do inglês) e muitas estão relacionadas a doenças como Parkinson, Alzheimer, doença da vaca louca, diabetes tipo 2 e outras [12] [13].

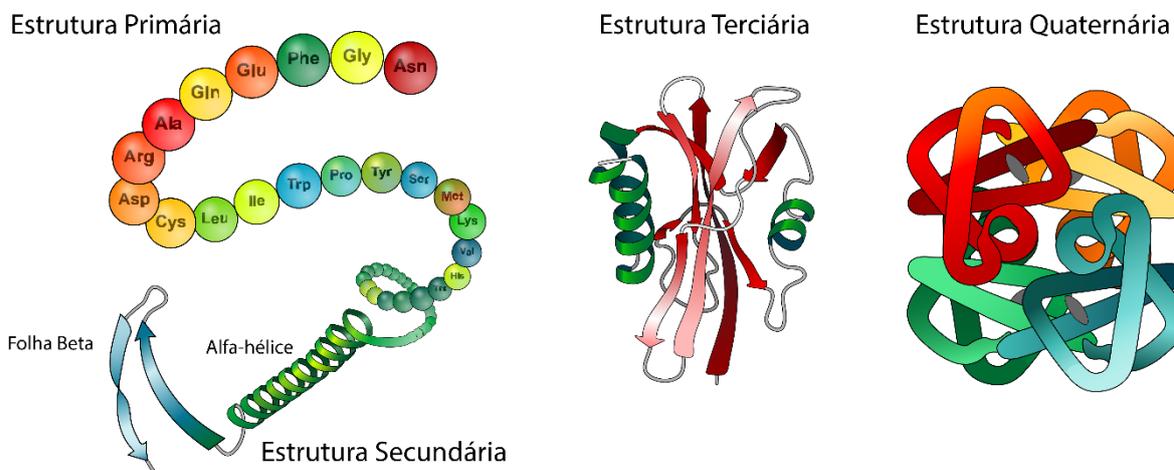


Figura 4: Estruturas de organização de uma proteína. Adaptado de [14].

A **estrutura secundária** surge da interação entre aminoácidos, principalmente através de pontes de hidrogênio, formando pequenos *loops* ou folhas, chamados de alfa-hélice e folha beta, respectivamente, ou se dobram ao acaso quando não há uma forma bem definida (estrutura desordenada, outrora chama de *random coil*, do inglês). A estrutura secundária também protagoniza a função das proteínas. Alterações significantes na estrutura secundária de uma proteína usualmente desencadeiam a perda ou alteração da função.

A **estrutura terciária** de uma proteína é constituída por sua forma tridimensional. Sítios hidrofóbicos tendem a permanecer em regiões mais internas da proteína, enquanto os sítios mais polares tendem a ficar mais expostos ao meio aquoso. Longas cadeias polipeptídicas podem ser subdivididas em domínios, formando regiões compactadas e semi-independentes, mas ainda ligadas conforme a estrutura primária. Um domínio pode estar associado a uma função específica, como o sítio de ativação em enzimas, que é a região onde ocorre a ação catalítica da enzima.

A **estrutura quaternária** é a associação de cadeias polipeptídicas em uma proteína de multicadeias, chamada de multimérica. A Hemoglobina é um exemplo de uma proteína com estrutura quaternária com 4 cadeias, ligadas não covalentemente. A estrutura quaternária nem sempre está presente e quando está pode variar bastante, por exemplo, a proteína do vírus do mosaico do tabaco contém 2120 subunidades polipeptídicas.

Chamamos de enovelamento o processo de formação dos graus superiores de organização de uma proteína (estrutura secundária, terciária e quaternária, quando houver). A conformação mais estável de uma proteína, considerando todos os seus graus de organização, é a de menor energia livre de Gibbs acessível à sua sequência, dentro de um contexto em que o tempo e o meio importam, isto é, o enovelamento está sob controle termodinâmico e cinético. Evidências indicam que o enovelamento se inicia espontaneamente por interações não covalentes entre uma cadeia lateral e sua vizinhança, porém outras proteínas podem ajudar no processo de enovelamento, acelerando ou garantindo as dobras corretas. Por exemplo, as proteínas dissulfeto isomerases catalisam a quebra e a formação de pontes de dissulfeto garantindo a estabilização das ligações para a formação da estrutura nativa mais rapidamente. As proteínas chaperonas impedem a agregação de outras proteínas antes que o processo de enovelamento se complete.

1. Albumina de soro bovino

A albumina de soro é a proteína mais abundante no sangue. A **albumina do soro bovino** (BSA, *bovine serum albumin* do inglês) possui 586 aminoácidos e massa de 66000 Da. A principal função da BSA é o transporte de pequenas moléculas pelo plasma sanguíneo, entre eles ácidos graxos, vitaminas, hormônios, metais e cálcio. O transporte dessas moléculas se dá através dos vários sítios de ligação presente na proteína.

Quanto a estrutura primária, segue a sequência de aminoácidos da BSA com os triptofanos em destaque nas posições 134 e 213:

DTHKSEIAHRFKDLGEEHFKGLVLI AFSQYLQQCPFDEHVKLVNELTEFAKTCVAD
ESHAGCEKSLHTLFGDELCKVASLRETYGDMADCCEKQEPERNECFLSHKDDSPD
LPKLPDPNTLCDEFKADEKKF **W**GKYL YEIARRHPYFYAPELLYANKYNGVFQE
CCQAEDKGACLLPKIETMREKVL TSSARQRLRCASIQKFGERALKA **W**SVARLSQK
FPKAEFVEVTKLVTDLTKVHKECCHGDLLECADDRADLAKYICDNQDTISSKLKE
CCDKP LLEKSHCIAEVEKDAIPENLPPLTADFAEDKDVCKNYQEAKDAFLGSFLYE
YSRRHPEYAVSVLLRLAKEYEATLECCA KDDPHACYSTVFDK LKHLVDEPQNLI
KQNC DQFEKLGEYGFQNALIVRYTRKVPQVSTPTLVEVSRSLGKVGTRCCTKPESE
RMPCTEDYLSLILNRLCVLHEKTPVSEKVT KCCTESLVNRRPCFSALTPDETYVPK
AFDEKLFTFHADICTLPDTEKQIKQTALVELLKHKPKATEEQ LKTVMENFVAFVD
KCCAADDKEACFAVEGPKLVVSTQTALA

Na literatura há registros com certa variedade de valores da estrutura secundária das proteínas, dado que há modificações na estrutura a depender das propriedades do meio, como pH e força iônica, mas também há diferentes valores se considerarmos diferentes ferramentas de análise. A BSA possui entre 62% e 68% de estrutura α -hélice e 7% e 17% de folha- β [15]

[16]. Quanto a estrutura terciária, apresenta uma forma semelhante a um coração dividido em 3 principais domínios, chamados de domínios I, II e III, cada um dividido em 2 subdomínios, sendo eles A e B, como pode ser observado na Figura 5. Quanto a estrutura quaternária, BSA se encontra majoritariamente como monômero, porém as formas monoméricas e diméricas coexistem na razão 6:1 para soluções com concentração menores que 10mg/mL [17]. É importante mencionar que o pH da solução é relevante para todos os níveis superiores de organização da proteína [18].

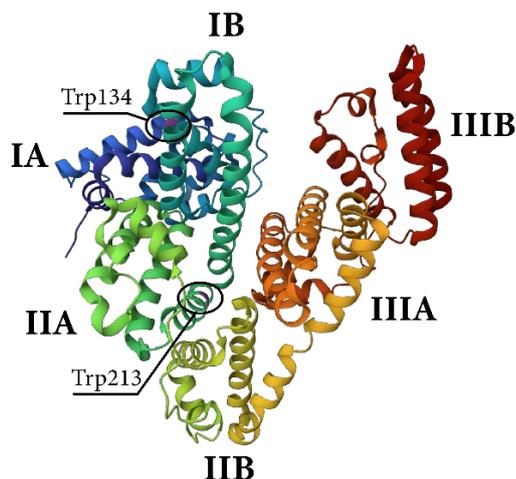


Figura 5: Estrutura cristalográfica da albumina de soro humano, imagem obtida a partir do *Protein Data Bank RCSB PDB* (*rcsb.org*), código 4F5S [19]. Em destaque subdomínios e triptofanos.

2. Albumina de soro humano

A **albumina de soro humano** (HSA, *human serum albumin*) é muito semelhante a BSA, porém está presente no sangue humano. Possui massa igual a 66571 Da e 585 aminoácidos, com somente 1 triptofano. Possui em torno de 67% de estrutura α -hélice e 10% de folha- β [16]. Também está dividida em 3 domínios (I, II e III) e cada um deles em 2 subdomínios (A e B).

Segue a sequência de aminoácidos da HSA com o triptofano em destaque na posição 121:

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVA
 DESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCA KQEPERNECFLQHKDDN
 PNL PRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKA AF
 TECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKA **W**AVARL
 SQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKL
 KECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMF
 LYEYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQ
 NLIKQNC ELF EQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKKH
 PEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDE

TYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDD
FAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL

Assim como a BSA, a HSA é uma proteína de transporte de pequenas moléculas, principalmente ácido graxo. Os principais sítios de ligação de moléculas de ácidos graxo na HSA podem ser observados na Figura 6.

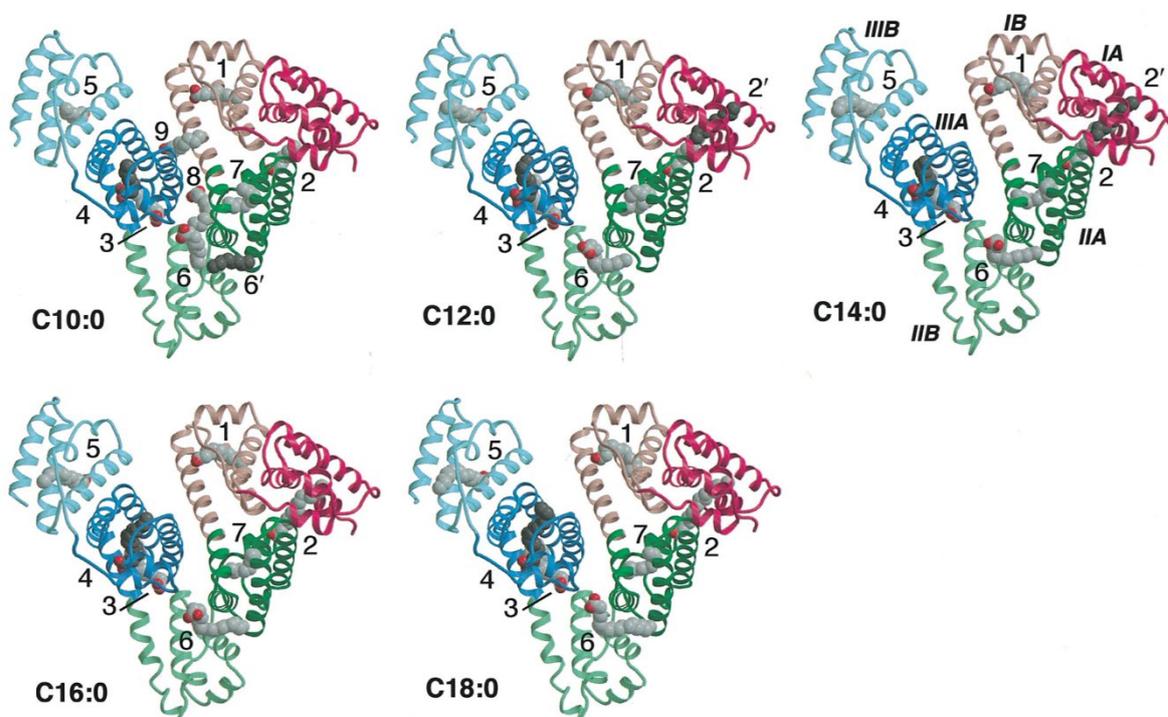


Figura 6: Estrutura da HSA representando os domínios e sítios de ligação de 5 tipos de ácidos graxos escritos na notação $C_m:n$ (onde m é o número de carbonos da molécula e n é o número de ligações duplas). Os domínios estão coloridos da seguinte forma: I em vermelho, II em verde e III em azul. Os subdomínios A e B estão nas mesmas cores dos domínios, onde A é a mais escura. Os ácidos graxos estão coloridos conforme os átomos (carbono: cinza; oxigênio: vermelho). Quando dois ácidos graxos se ligam em regiões muito próximas, um deles está em cinza mais escuro. Figura reproduzida de Bhattacharya e colaboradores [20], Copyright 2023, com permissão de Elsevier (<https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4158>).

Observe que embora haja moléculas de ácido graxo ligadas a todos os domínios da proteína, a maior concentração de ligante se dá em regiões menos expostas ao solvente, regiões estas que contém mais sítios hidrofóbicos.

3. Lisozima de clara de ovo de galinha

Lisozima é uma classe de enzimas com atividade antimicrobiana encontrada com frequência no reino animal. Devido à atividade e à relativa fácil obtenção da lisozima, essa possui aplicação na indústria médica, farmacêutica e alimentícias, agindo principalmente na conservação de alimentos [21].

A lisozima utilizada neste trabalho é proveniente da clara do ovo de galinha (sigla HEW do inglês *Hen Egg White lysozyme*), é consideravelmente menor que as albuminas

apresentadas anteriormente, pesa 14520Da e possui 129 aminoácidos. A estrutura cristalográfica da proteína pode ser observada na Figura 7 e a sequência de aminoácidos da lisozima está descrita a seguir com os 6 triptofanos em destaque nas posições 28, 62, 63, 108, 111 e 123:

```
KVFGRCELAAAMKRHGLDNYRGYSLGNWVCAAKFESNFNTQATNRNTDGSTDY  
GILQINSRWWCNDGRTPGSRNLCNIPCSALLSSDITASVNC AKKIVSDGNGMNAW  
VAWRNRCKGTDVQAWIRGCR L
```

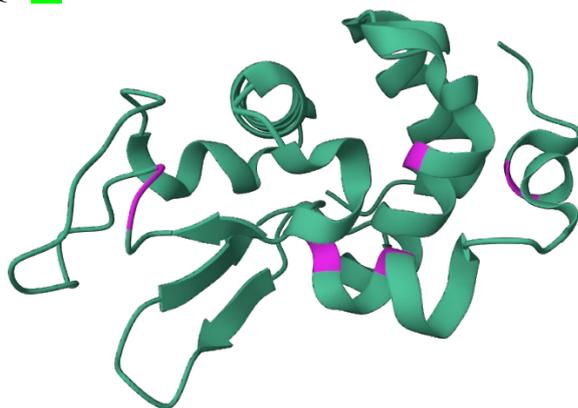


Figura 7: Estrutura cristalográfica da lisozima da clara do ovo da galinha, imagem obtida a partir do *Protein Data Bank RCSB PDB* (*rcsb.org*), código 1LYZ [22]. Triptofanos em destaque.

A lisozima da clara de ovo possui em torno de 34% de estrutura tipo α -hélice e 14% de folha- β [23], quanto a estrutura secundária, e 4 pontes de dissulfeto que estabilizam a estrutura terciária.

C. Líquidos Iônicos

Líquidos iônicos são compostos iônicos (se dividem em uma parte positiva e uma negativa) e estão em estado líquido em temperaturas próximas a temperatura ambiente [24]. Os sais são compostos que em meio aquoso também se dividem em uma parte positiva e uma negativa, porém normalmente estão no estado sólido na temperatura ambiente. Dessa forma os líquidos iônicos podem ser utilizados como meio reacional, por exemplo. Tal propriedade confere ao líquido iônico um papel promissor como solvente, principalmente por serem menos tóxicos que os solventes orgânicos convencionais.

Os líquidos iônicos abrangem uma grande variedade de moléculas e de características físico-químicas. Estuda-se modificações e diferentes combinações dos componentes aniônicos e catiônicos a fim de alcançar uma propriedade específica.

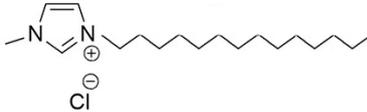
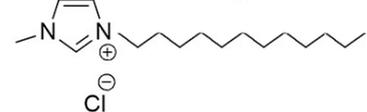
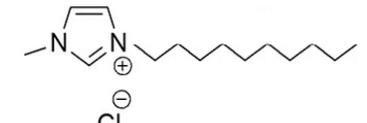
Uma das primeiras possibilidades cogitadas aos líquidos iônicos é como um “solvente verde”. Muitos solventes utilizados na indústria são tóxicos e agressivos ao meio ambiente [2]. De forma geral, os líquidos iônicos possuem baixa pressão de vapor, ou são pouco voláteis, isto é, as moléculas no estado líquido não escapam da solução e não vão para o estado gasoso com facilidade, em contraste com os solventes tradicionais. Tal característica torna os líquidos iônicos, a priori, menos agressivos ao meio ambiente, porém, como será discutido ao longo desse trabalho, a baixa pressão de vapor não assegura uma baixa toxicidade a um composto. Muitas outras características, inclusive estruturais, são relevantes quando se observa a interação entre moléculas, principalmente em sistemas de interesse biológico. Os líquidos iônicos são versáteis e altamente moldáveis, portanto, o entendimento dos fatores relevantes da interação com outras moléculas é fundamental para o design mais acurado de novas moléculas.

Há líquidos iônicos sendo utilizados e estudados em várias áreas do conhecimento e com diversas funcionalidades, como potencializador enzimático, solvente, molde para novas moléculas, otimizador de componentes eletrônicos e carreador de drogas.

1. Líquidos Iônicos Surfactantes Imidazólicos

Os líquidos iônicos selecionados para este trabalho são compostos por uma cadeia carbônica e um anel imidazólico, possuem, portanto, propriedades surfactantes (serão descritas na Seção I.D Surfactantes), sendo a diferença entre eles a extensão da cadeia carbônica. São eles o $[C_{14}MIM][Cl]$, $[C_{12}MIM][Cl]$ e $[C_{10}MIM][Cl]$, como pode ser visto na Tabela 1.

Tabela 1: Tabela descritiva dos líquidos iônicos estudados.

Fórmula	Nome da molécula	Estrutura molecular
$[C_{14}MIM][Cl]$	<i>1-tetradecyl-3-methylimidazolium chloride</i>	
$[C_{12}MIM][Cl]$	<i>1-Dodecyl-3-methylimidazolium chloride</i>	
$[C_{10}MIM][Cl]$	<i>1-Decyl-3-methylimidazolium chloride</i>	

Os LIs surfactantes imidazólicos ou Im-SAILs (do inglês, *Imidazolium-based Surface Active Ionic Liquids*) exibem uma rica variedade de conformações, tipos e formas

de agregados, incluindo micelas esféricas, micelas alongadas, nanotubos, vesículas, cristais líquidos, bicamas planas e gel. Os elétrons deslocalizados do anel imidazólico (elétrons que se distribuem sobre vários átomos) e as ligações de hidrogênio entre os Im-SAILs contribuem para propriedades de agregação únicas. Im-SAILs possuem maior estabilidade térmica e atividade surfactante que outros líquidos iônicos surfactantes e, assim como outros ILs, são versáteis e podem ser moldados conforme a aplicação.

D. Surfactantes

Embora os líquidos iônicos não possuam necessariamente propriedades surfactantes, os líquidos iônicos utilizados neste trabalho possuem. Portanto é essencial entender quais são as características de um surfactante. Ademais, sistemas proteínas-surfactantes também foram utilizados neste estudo a fim de comparação e melhor entendimento das interações.

As moléculas que alteram de alguma forma a interface água-ar foram chamadas de surfactantes (*Surface Acting Agent*, do inglês). Tal propriedade dos surfactantes deve-se ao fato que são constituídos por uma parte hidrofílica (tende a interagir com a água) e uma parte hidrofóbica (tende a ser isolada pela água).

A água é uma molécula polar que se atrai e se organiza facilmente através das ligações de hidrogênio, como ilustrado na Figura 8A. A interação entre polos opostos é favorecida em relação a componentes apolares. Os surfactantes possuem um grupo polar e um grupo apolar, portanto, os grupos polares integram bem com a água, já os grupos apolares tendem a ser isolados pela água a fim de maximizar o número de ligações de hidrogênio e diminuir a entropia. Tal dinâmica possibilita a formação de estruturas organizadas, a depender da concentração de surfactante no meio aquoso.

Abaixo de uma determinada concentração, os surfactantes são encontrados majoritariamente na superfície, na interface entre os meios, com a região polar voltada para o meio mais polar e a cadeia apolar voltada para o meio menos polar, como ilustrado na Figura 8B. Com o aumento da concentração do surfactante e a saturação do número de moléculas na superfície, formam-se diferentes estruturas a depender da geometria do surfactante, como micelas (como pode ser visto na Figura 8C), bicamadas lipídicas, vesículas, cubossomos e outras. A concentração na qual há a saturação de surfactante na superfície é denominada como concentração micelar crítica, ou CMC.

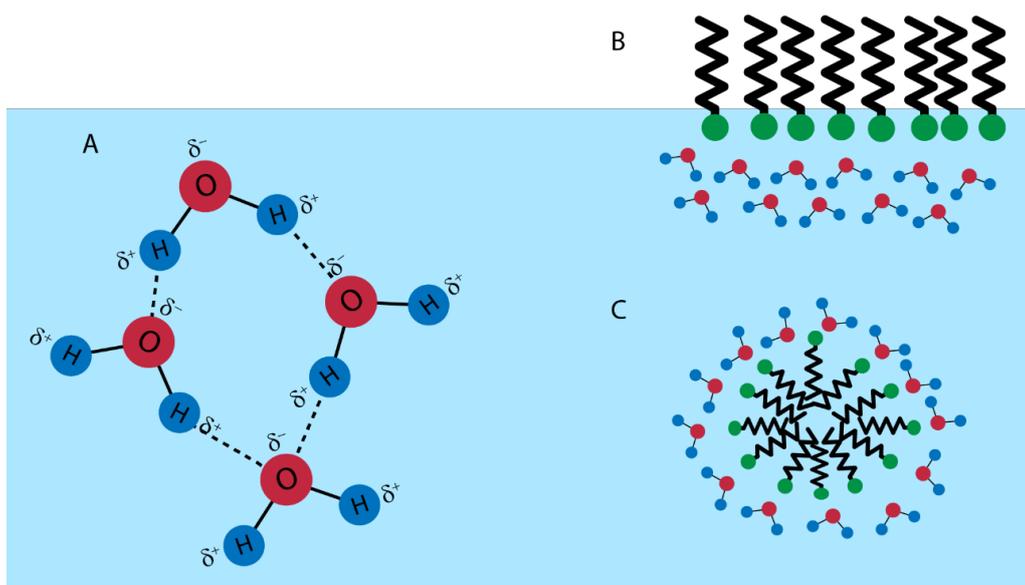


Figura 8: Representação esquemática: (A) da água (— ligação covalente entre os átomos de oxigênio e hidrogênio dentro da molécula de água, -- ligação de hidrogênio entre as moléculas de água); (B) das moléculas de surfactante na superfície, interface água-ar; (C) formação de micelas em solução quando a concentração micelar crítica é atingida.

O surfactante utilizado nesse trabalho é o TTAB (do inglês, *Tetradecyltrimethylammonium bromide*), que possui uma carga positiva na parte polar e uma cadeia carbônica composta por 14 carbonos.

Tabela 2: Tabela descritiva do surfactante estudado.

Fórmula	Nome da molécula	Estrutura molecular
TTAB	<i>Tetradecyltrimethylammonium bromide</i>	

II. Objetivos

O objetivo geral deste trabalho é realizar um estudo sistemático da interação entre líquidos iônicos imidazólicos funcionalizados com cadeias alquílicas e proteínas modelo em meio aquoso. Pretende-se delimitar os mecanismos da interação e as modificações estruturais sofridas pelas proteínas, a fim de prover informações relevantes para o desenvolvimento de novos líquidos iônicos, dado um interesse específico, e nortear novas aplicações e limitações.

Os objetivos específicos dizem respeito a metas intermediárias para atingir o objetivo geral. Cada um está relacionado com uma técnica experimental específica, a mais relevante em cada caso. Evidentemente os dados devem ser tratados em conjunto, os experimentos fornecem informações que se complementam e juntos podem oferecer indícios fortes sobre as questões elencadas.

Os objetivos específicos são:

- Discutir se há evidências de interação e qual a relevância/intensidade em comparação com moléculas semelhantes. → Fluorescência
- Discutir as possíveis modificações na estrutura secundária das proteínas. → Dicroísmo Circular
- Discutir as possíveis modificações na estrutura terciária das proteínas. → Espalhamento de Raios-X a Baixo ângulo
- Indicar a estrutura de possíveis agregados ou complexos em solução. → Espalhamento de Raios-X a Baixo ângulo
- Discutir a natureza da interação e custos energéticos envolvidos. → Calorimetria de Varredura Diferencial.
- Análise comparativa entre os diferentes líquidos e as diferentes proteínas.

III. Metodologia

A escolha da técnica investigativa adotada para o estudo da interação entre proteínas e surfactantes deve levar em consideração alguns fatores, por exemplo: qual informação é relevante ao escopo do estudo; precisão necessária; natureza da amostra e entre outros. Grande parte das técnicas experimentais empregadas nas áreas de bioquímica e biofísica utilizam princípios de interação da radiação com a matéria.

A **radiação eletromagnética** é composta por um campo elétrico e um magnético, que oscilam perpendicularmente entre si. Podemos interpretar tais oscilações como ondas transversais, com comprimento de onda, frequência, amplitude e velocidade, características de ondas. A radiação eletromagnética é normalmente classificada conforme o comprimento de onda e a decomposição da radiação em função do comprimento de onda define o **espectro eletromagnético**. O comprimento de onda está também relacionado com a energia transportada pela onda (ou na visão da física quântica, a energia carregada por um fóton, que será discutido posteriormente). A Figura 9 traz o espectro eletromagnético e “objetos” de mesma grandeza do comprimento de onda.

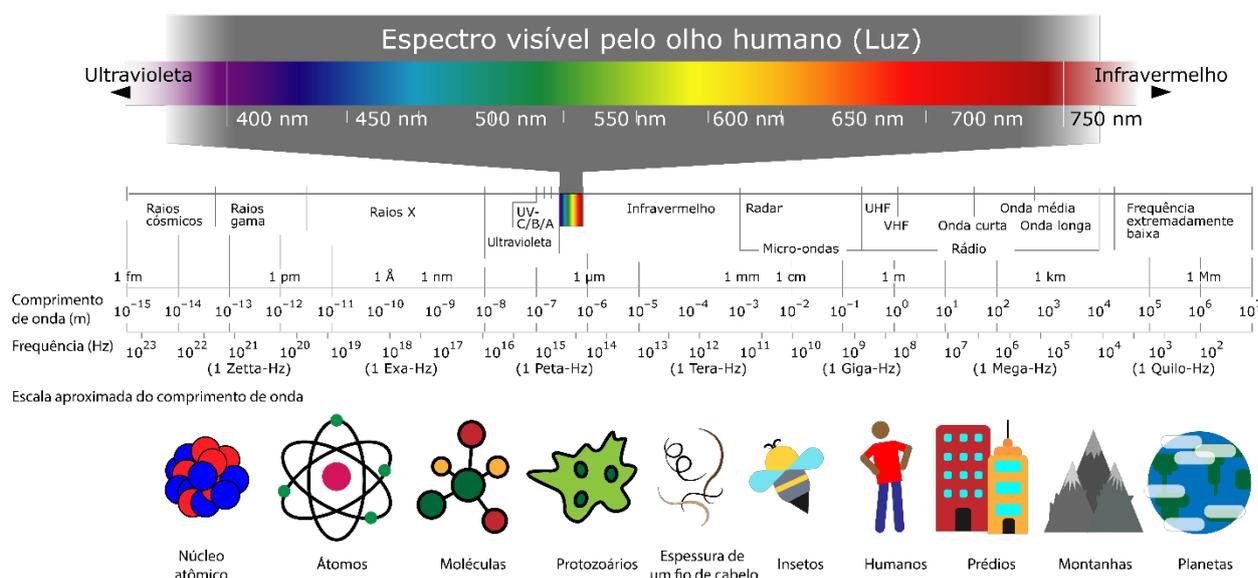


Figura 9: Espectro eletromagnético, com destaque na faixa do visível, com frequência da radiação, comprimento de onda e sistemas com escala de grandeza aproximada ao comprimento de onda. Imagem editada de [25] com a adição da escala aproximada do comprimento de onda.

Observe que quanto menor o comprimento de onda maior é a energia associada. A energia é fundamental na interação da radiação com matéria e nos seus efeitos.

As técnicas e o detalhamento teórico que serão exploradas a seguir foram descritos primordialmente tomando como referência livros bem aceitos no meio acadêmico, entre eles

estão “Manual de bioquímica com correlação clínicas” [8], “Física Moderna: Origens clássicas e Fundamentos Quânticos” [26], “Principles of Fluorescence Spectroscopy” [27], “Methods in Molecular Biophysics” [28] e outros que serão referenciados ao longo do texto.

A. Espectroscopia na região UV-VIS

As técnicas de espectroscopia óptica UV-vis consistem em incidir radiação eletromagnética, na faixa do ultravioleta e do visível, sobre uma amostra e quantificar a intensidade da radiação que foi absorvida pela amostra. O espectro de absorbância fornece informações sobre composição e processos químico-físicos do sistema. É uma das técnicas mais utilizadas para o estudo de macromoléculas de interesse biológico.

1. Detalhamento teórico

Evidentemente, quando tratamos de sistemas de interesse biológico estamos nos referindo a moléculas, macromoléculas, estruturas complexas e suas interações. Porém, a fim de facilitar o início da explanação, considere um átomo em seu estado fundamental. O átomo pode absorver energia e atingir um determinado estado excitado. Os processos que ocorrem após a absorção, como o retorno para o estado fundamental, serão discutidos posteriormente. O comprimento de onda absorvido depende da energia entre o estado fundamental o estado excitado, que são característicos do átomo. Tal fenômeno foi inicialmente observado por William Hyde Wollaston quando identificou linhas escuras no espectro do Sol, que posteriormente foram catalogadas pelo físico alemão Joseph von Fraunhofer [29]. As linhas escuras correspondem aos comprimentos de ondas que são absorvidos pelos átomos presentes na superfície do Sol.

Cada átomo possui um conjunto único de possíveis níveis energéticos que podem alcançar. Portanto, o espectro de absorção é único e pode ser utilizado como uma “impressão digital” do elemento químico, como constatado por Kirchhoff e Bunsen, constituindo as linhas características [29].

Ao considerarmos moléculas, temos vários átomos que interagem entre si, há ligações e diferentes conformações. Desta forma os possíveis estados se multiplicam, consequentemente os possíveis comprimentos de onda a serem absorvidos. As “linhas características” se tornam curvas, constituídas pela somatória de vários comprimentos de onda próximos.

É importante salientar a relevância do meio para o espectro de absorção. Um meio com mais cargas em solução, por exemplo, promove mudanças conformacionais nas moléculas, conseqüentemente também pode alterar a diferença de energia entre o estado fundamental e o estado excitado, modificando assim o espectro de absorção. Como será discutido posteriormente, tais modificações devido ao meio, embora não nulas, são mais evidentes no espectro de emissão. Ademais, a própria absorção do meio deve ser considerada.

a) *Lei de Lambert-Beer*

A Lei de *Lambert-Beer* nos diz que conhecendo como uma molécula absorve, em um meio e em um dado comprimento de onda, a absorbância passa a depender da quantidade de moléculas que o feixe incidente encontrará no caminho, portanto, dependerá da concentração dessa molécula e do caminho óptico.

Considere a Figura 10, I_0 é a intensidade da radiação incidente com um determinado comprimento de onda λ , c a concentração da molécula de interesse, l a largura da cubeta na direção do feixe (caminho óptico), I a intensidade da radiação após percorrer o caminho óptico e dl a espessura de uma camada infinitesimal de amostra.

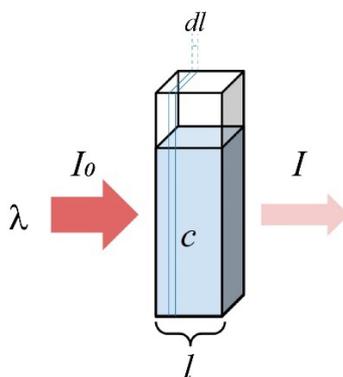


Figura 10: Esquema ilustrativo do experimento para medir a absorbância. Imagem editada de [30].

Considerando um feixe de radiação incidente com pequena área da secção transversal, A , a intensidade da radiação absorvida, $-AdI$, pelas moléculas ao longo dl é proporcional ao número de moléculas neste pequeno volume (Adl), portanto, proporcional a $CA dl$.

$$-AdI \propto CA dl \rightarrow -dI \propto C dl \quad (1)$$

A intensidade da radiação absorvida também depende da intensidade incidente e de uma constante a ser determinada, ϵ'_{λ} , que é o coeficiente de extinção molar. Portanto:

$$-dI = C\varepsilon'_\lambda Idl \quad (2)$$

Ao integrarmos a equação acima ao longo de todo o caminho que temos amostra, teremos:

$$\int_{I_0}^I -dI = \int_0^l C\varepsilon'_\lambda Idl \rightarrow \int_{I_0}^I -\frac{1}{I} dI = \int_0^l C\varepsilon'_\lambda dl \rightarrow \ln\left(\frac{I_0}{I}\right) = C\varepsilon'_\lambda l \quad (3)$$

A equação acima normalmente é expressa na forma de logaritmo na base 10, portanto:

$$\log\left(\frac{I_0}{I}\right) = C\varepsilon_\lambda l \equiv A(\lambda) \quad (4)$$

A equação (4) é a definição da lei de *Lambert-Beer*. A absorvância, $A(\lambda)$, é a grandeza normalmente obtida experimentalmente para vários comprimentos de onda, portanto, o espectro de absorvância de uma amostra. ε_λ também é chamado de coeficiente de extinção molar e está relacionado com o anterior na forma $\varepsilon_\lambda = \varepsilon'_\lambda/e \approx \varepsilon'_\lambda/2,303$. A lei de *Lambert- Beer* pode ser utilizada para obter a concentração de uma determinada molécula em solução.

B. Fluorescência

A fluorescência traz informação de fenômenos que ocorrem a nível molecular e mudanças conformacionais. É uma técnica útil para explorar interações entre uma sonda fluorescente e um ligante, é também uma técnica auxiliar para discutir desenovelamento/agregação de uma proteína. Normalmente é realizada em paralelo com a técnica de Espectroscopia óptica UV-Vis.

1. Desenvolvimento teórico

É sabido que ondas eletromagnéticas podem interagir com a matéria de diversas formas. Neste contexto é mais conveniente considerar a natureza da dualidade onda-partícula, conceito construído com grandes contribuições de Louis de Broglie e Albert Einstein [26]. Portanto a onda eletromagnética será tratada através de sua partícula associada, o fóton.

Um elétron ao absorver um fóton pode adquirir energia suficiente para romper a barreira de potencial proveniente do átomo, assim o elétron é ejetado e o átomo passar a ser

ionizado. Quando a energia não é suficiente para a ionização há outra série de fenômenos possíveis. O elétron pode ir a um estado excitado, de maior energia, permanecer nesse estado por um determinado período e voltar para seu estado fundamental através da emissão de outro fóton ou através da perda de energia de forma não radiativa. A Figura 11 traz um esquema resumido da interação entre radiação e matéria, com os principais efeitos no átomo em função da energia da radiação incidente.

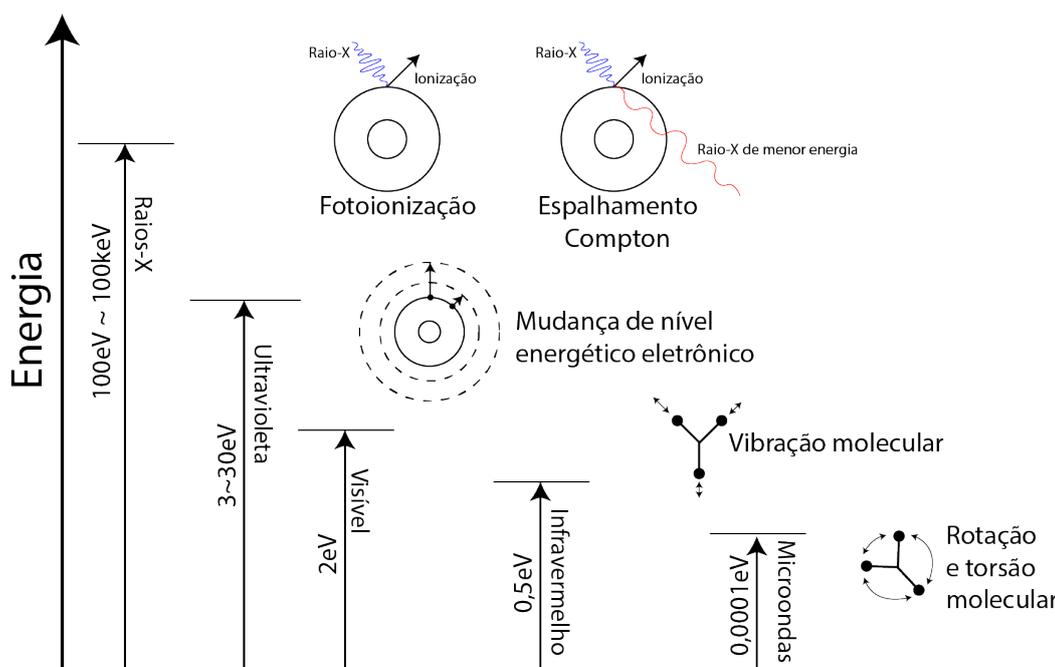


Figura 11: Diagrama sobre a interação da radiação com a matéria. Editado de [31].

Na técnica de fluorescência estamos interessados em mudanças de níveis energéticos eletrônicos, sem que haja ionização do átomo, portanto na faixa do ultravioleta e do visível. Um esquema mais detalhado deste fenômeno, com os efeitos fluorescência e fosforescência é descrito pelo diagrama de *Jablonski* e pode ser visto na Figura 12.

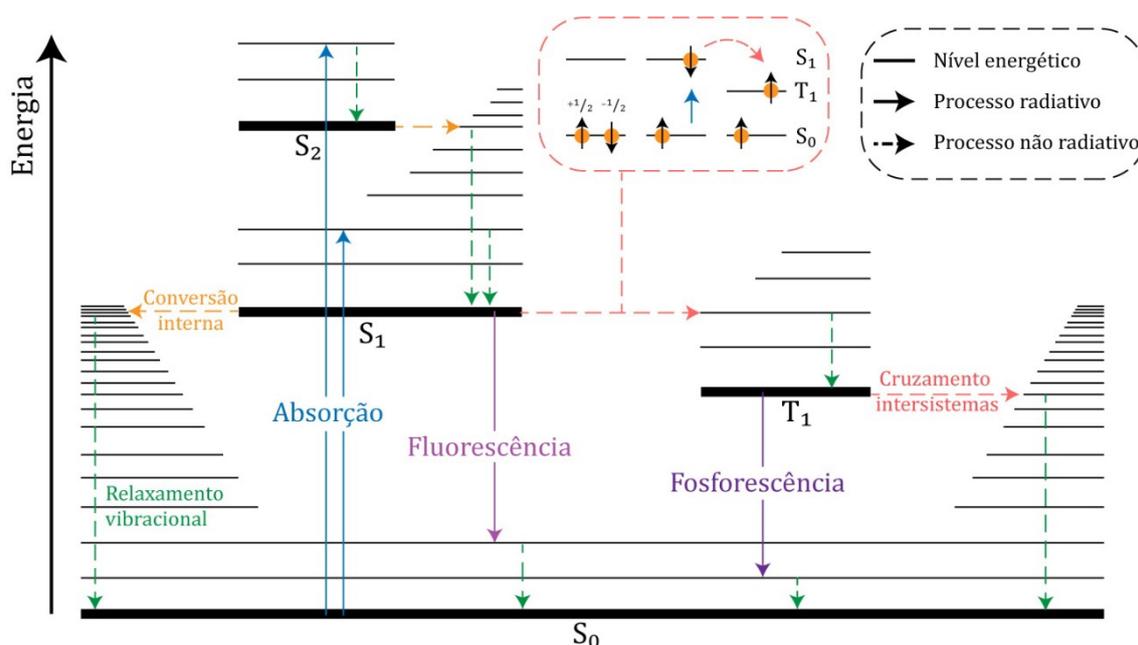


Figura 12: Diagrama de Jablonski. As linhas pretas representam os níveis energéticos, as setas azuis a absorção de radiação promovendo a excitação da molécula. As setas tracejadas representam transição sem emissão de radiação, onde a amarela representa a conversão interna (dentro da mesma multiplicidade de spin), a vermelha representa o cruzamento intersistemas (diferentes multiplicidades de spin, como exemplificado no quadro vermelho tracejado) e a verde representa o relaxamento vibracional, isto é, perda de energia de forma não radiativa. A seta sólida em roxo claro representa o processo de emissão através da fluorescência e a seta em roxo escuro apresenta e emissão através da fosforescência.

Considere que um átomo está em seu estado fundamental singlete S_0 e com a **absorção** de um fóton atinja o primeiro estado excitado S_1 , o retorno para o seu estado fundamental sem emissão de radiação é possível e é chamado de **relaxamento vibracional**. Nesse caso, o excesso de energia é transferido ao solvente através de colisões entre as moléculas excitadas e as moléculas do solvente. Porém, também é possível o retorno ao S_0 através da emissão de um fóton, esse processo é chamado de **luminescência**. Se tal rearranjo ocorrer de forma direta, dentro de níveis singletos, temos a **fluorescência** e o período que a molécula permanece no estado excitado antes de voltar ao fundamental (tempo de vida, τ) é da ordem de 10^{-9} s. É possível que ocorra transições não radiativas entre níveis de mesma multiplicidade de spin, que chamamos de **conversões internas**, antes da emissão do fóton. A **fosforescência** é o processo que ocorre após uma transição não radiativa entre um estado singlete e um tripleto, chamada de **cruzamento intersistema**. No cruzamento intersistema ocorre uma mudança de spin tornando a transição para o estado S_0 proibida, portanto, é um processo mais demorado com tempo de vida da ordem de pelo menos 10^{-3} s, podendo atingir horas [27].

Observe que a energia emitida é sempre menor que a energia absorvida, o que está refletido nos comprimentos da onda do fóton absorvido e do fóton emitido.

A probabilidade de a fluorescência ocorrer está associada ao rendimento quântico da molécula, que é definido como a razão entre o número de fótons emitidos pelo número de fótons absorvidos. A realização de um experimento a partir do efeito de fluorescência exige uma molécula com rendimento quântico suficiente para a emissão ser detectada. Tais moléculas são chamadas de sondas fluorescentes, caso o sistema já seja fluorescente dizemos que a sonda é intrínseca, caso seja necessária a adição da sonda, dizemos que esta é extrínseca.

Dentre as moléculas biológicas, as aromáticas são muito utilizadas nas técnicas de fluorescência. Os elétrons nos anéis aromáticos podem ser facilmente excitados pois a diferença de energia entre o estado fundamental e o primeiro estado excitado é relativamente pequena por conta da interação entre os vários elétrons do anel. Os anéis aromáticos também possuem uma estrutura relativamente rígida, que dificulta um relaxamento vibracional eficiente, favorecendo o retorno ao estado fundamental de forma radiativa.

Desta forma, os aminoácidos compostos por anéis aromáticos são fluorescentes e podem ser usados como sondas fluorescentes intrínsecas das proteínas. As proteínas utilizadas neste trabalho possuem ao menos um aminoácido triptofano, o aminoácido com rendimento quântico maior em comparação com os outros.

a) Supressão da fluorescência

Diminuição da intensidade de fluorescência detectada pelo equipamento pode ocorrer por alguns efeitos. O aumento da turbidez do sistema, por exemplo, provocará uma diminuição da radiação captada pelo sensor do instrumento, mesmo se a intensidade de radiação emitida pelo fluoróforo tiver se mantido. Tal efeito pode ser corrigido e está descrito na Seção III.B.1.d) Correções. É considerado supressão somente a diminuição real da radiação emitida pelo fluoróforo.

Lakowicz [27] discute a supressão a partir da interação entre um fluoróforo e um supressor, um componente que de alguma forma promove a diminuição da emissão de fluorescência do fluoróforo. Lakowicz descreve dois mecanismos de interação que causam a supressão. O primeiro se deve a interação entre o fluoróforo e o supressor a nível de formar um novo composto com menor capacidade de emissão. O segundo mecanismo se deve a interação com o supressor após a excitação do fluoróforo, tal interação, que podemos correlacionar com uma colisão, promove a volta ao estado fundamental de forma não radiativa. O primeiro mecanismo é denominado como supressão estática e o segundo como supressão colisional.

Patrik R. Callis publicou uma completa revisão sobre o processo de supressão em 2 artigos científicos [32] [33] onde define o sistema fluoróforo-supressor como uma supermolécula. Supondo que a interação entre fluoróforo e supressor não é através de uma ligação covalente, Callis afirma que os processos de absorção e emissão não podem ser inibidos e que toda supressão possui um fator dinâmico. Portanto o termo “supressão dinâmica” não é um sinônimo para “supressão colisional”. Callis define dois tipos de super moléculas (A e B) e os tipos de supressão que podem existir.

(A) Super molécula onde fluoróforo e supressor são moléculas diferentes

- a. Supressão colisional – exige difusão e contato para que haja a perda da energia no estado excitado do fluoróforo
- b. Supressão devido a ligação – ocorre devido a uma ligação não covalente, também exige contato

(B) Super molécula onde fluoróforo e supressor fazem parte da mesma molécula

- a. Auto supressão – Um componente emissor é suprimido por outro componente da mesma molécula. Por exemplo as ligações dissulfeto suprimem a emissão do triptofano que estejam nas proximidades, nas proteínas [33].

A vantagem de se considerar o sistema como uma super molécula é a simplificação do processo quântico por trás da supressão na forma de transferência de elétrons, que passa a ser vista como um cruzamento intersistemas, ou conversão interna, como visto no diagrama de Jablonski, Figura 12. No caso do triptofano tal concepção é especialmente conveniente dada a facilidade que possui de doar elétrons [33]. É importante mencionar que Callis traz a auto supressão em proteínas como um fator importante a se considerar, principalmente proveniente do aminoácido triptofano, também devido à sua relativa facilidade em doar elétrons no estado excitado.

b) *Ajuste de Stern-Volmer*

Uma análise mais quantitativa da supressão é possível através do ajuste de Stern-Volmer, utilizado para sistemas contendo proteína e um ligante em potencial que causa supressão. Através deste ajuste é possível obter uma estimativa da constante de associação, que nos dá uma ideia da facilidade de ocorrer uma interação, entre o fluoróforo e seu supressor. É importante mencionar que na literatura encontramos algumas equações utilizadas para o ajuste de *Stern-Volmer*, porém algumas revisões mostram que nem todas

fornecem valores razoáveis [34] [35]. A seguir a equação com resultados mais satisfatórios e compatíveis com os obtidos através de outras técnicas experimentais [34]:

$$\frac{F_0 - F}{F_0 - F_c} = \frac{[P]_t - [L]_t + K_d - \sqrt{([P]_t + [L]_t + K_d)^2 - 4[P]_t[L]_t}}{2[P]_t} \quad (5)$$

Onde $[P]_t$ é a concentração da proteína, F_0 é a integral da fluorescência da proteína em ausência de LI, F é a integral da fluorescência e varia conforme a concentração de ligante varia, $[L]_t$ é a concentração de ligante, F_c é integral da fluorescência remanescente, isto é, fluorescência quando a interação é máxima. K_d é o parâmetro de ajuste e interesse, a constante de dissociação. O inverso da constante de dissociação é definido na literatura como constante de associação, $K_a = 1/K_d$.

Embora através do ajuste de *Stern-Volmer* seja possível obter a constante de associação, é importante mencionar que há técnicas mais apropriadas para a determinação da constante de associação de uma interação, como a calorimetria de titulação isotérmica (ITC, do inglês *Isothermal Titration Calorimetry*), por exemplo.

c) Deslocamento da emissão

Muitos trabalhos acadêmicos analisam o deslocamento do pico de emissão de fluorescência somente através da mudança na polaridade do meio nas proximidades da sonda fluorescente. A teoria é ilustrada pelo modelo de Lippert e princípio de Franck-Condon, porém, como discutiremos mais adiante, tal modelo pode nos induzir a erros quando aplicado indiscriminadamente.

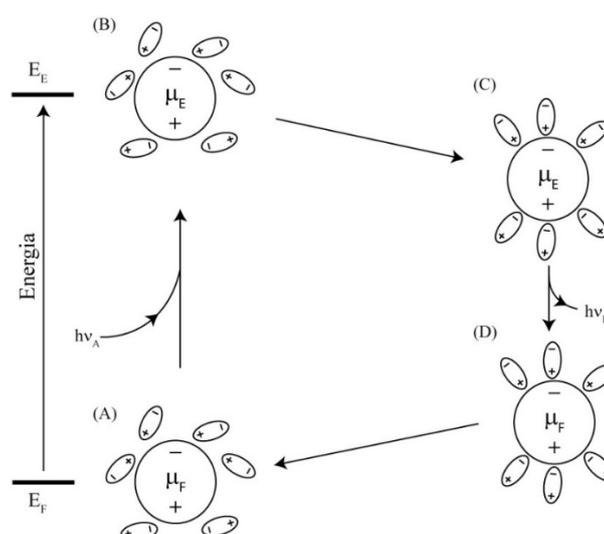


Figura 13: Estema ilustrativo da relaxação de uma molécula fluorescente com o solvente. O círculo representa a molécula fluorescente com momento de dipolo no estado fundamental μ_F e momento de dipolo no estado excitado μ_E , as elipses representam o solvente, no caso, moléculas de água, onde $\mu_E > \mu_F$. Adaptação da figura 6.7 de “*Principles of Fluorescence Spectroscopy*” [27].

Dado que uma molécula com momento de dipolo diferente de zero se alinha conforme o momento de dipolo do meio à sua volta, considere essa molécula em um estado excitado com um momento de dipolo diferente daquele do seu estado fundamental. Em tal condição haverá um novo realinhamento desta molécula com o meio e um gasto energético adicional. Se tal realinhamento for mais rápido que o tempo de emissão da molécula, haverá uma mudança na energia a ser emitida, por conta desse gasto adicional, dessa forma, a polaridade do meio pode modificar o comprimento de onda do fóton emitido.

Portanto, um meio mais polar terá como consequência a emissão de fóton com menor energia, ou seja, com maior comprimento de onda. O experimento de fluorescência é, em grande parte, comparativo, assim, é dito que houve um deslocamento para maiores comprimentos de onda em relação a uma situação anterior, sem a adição de ligante, por exemplo. O oposto ocorre quando o meio se torna menos polar, há a emissão de um fóton com maiores energia, ou com menor comprimento de onda. Os termos mais utilizados na literatura são: deslocamento para o azul (maior energia) ou *blue-shift* e deslocamento para o vermelho (menor energia) ou *red-shift*.

Embora tal fenômeno seja verdadeiro, quando tratamos de moléculas mais complexas, como proteínas e ligantes, a análise deve ser mais cuidadosa. É comum encontrarmos publicações onde sugere-se que a parte polar de um surfactante está próximo ao triptofano quando há um deslocamento para o vermelho e que a cadeia carbônica está próxima quando há um deslocamento para o azul. Porém Callis e colaboradores [36] fizeram uma série de simulações e concluíram que uma carga pode provocar tanto um deslocamento para o azul quanto um deslocamento para o vermelho a depender da sua disposição em relação aos anéis do triptofano.

O triptofano possui um anel indol, que é um composto aromático heterocíclico constituído por um anel benzênico acoplado a um anel pirrólico. O sistema com os dois anéis causa 2 estados excitados singletos, 1L_a e 1L_b , sendo 1L_a o mais sensível ao solvente em proteínas. A excitação do triptofano para o estado 1L_a ocorre com o deslocamento da nuvem eletrônica do anel pirrólico para o anel benzênico. Portanto, cargas nas proximidades dos anéis podem interagir com a nuvem eletrônica e modificar a energia necessária para a excitação, assim como a energia do fóton emitido. A Figura 14 traz um esquema para ilustrar os mecanismos anteriores.

Uma carga positiva pode causar tanto um deslocamento para maiores comprimentos de onda, quanto para menores comprimentos de onda a depender de qual anel está mais próximo. Neste contexto, um *blue-shift* pode ser causado tanto por uma carga negativa próxima ao anel benzênico quanto uma carga positiva próxima do anel pirrólico e um *red-shift* pode ser causado tanto por uma carga positiva próxima ao anel benzênico quanto uma carga negativa próxima do anel pirrólico.

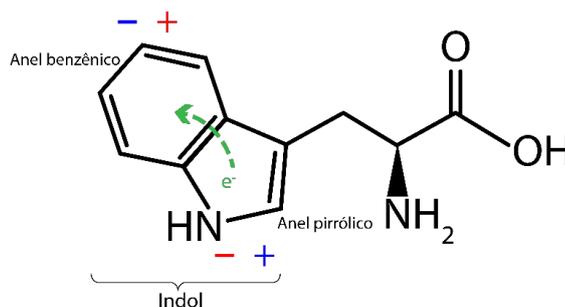


Figura 14: Esquema da molécula do aminoácido triptofano. Estão identificados o anel benzênico e o anel pirrólico que juntos formam o indol. No estado excitado do triptofano 1L_a a nuvem eletrônica é deslocada do anel pirrólico para o anel benzênico. As cargas e as cores correspondem ao deslocamento do comprimento de onda da emissão. Uma carga negativa nas proximidades do anel benzênico ou uma carga positiva nas proximidades do anel pirrólico causam *blue-shift*. Uma carga positiva nas proximidades do anel benzênico ou uma carga negativa nas proximidades do anel pirrólico causam *red-shift*.

Callis e colaborador [36] fizeram a correta previsão do pico de emissão do triptofano de uma série de proteínas em água e a compararam com o pico de emissão do triptofano na fase gasosa utilizando um modelo híbrido de mecânica quântica e dinâmica molecular clássica. Os autores concluíram que o comprimento de onda é determinado primariamente pela diferença de potencial elétrico ao longo do eixo do indol.

Desta forma, embora a polaridade do meio seja uma importante ferramenta na análise dos espectros de fluorescência, o potencial elétrico ao longo do eixo indol da sonda intrínseca triptofano também deve ser levada em consideração.

d) Correções nos espectros de emissão de fluorescência

Lakowicz apresenta duas correções necessárias ao espectro de fluorescência. A primeira correção está relacionada com as próprias limitações do equipamento e chamamos de correção da lâmpada ou do equipamento. Idealmente o equipamento seria capaz de detectar com a mesma qualidade todos os comprimentos de onda, o que não é verdade. Portanto devemos corrigir o espectro de fluorescência conforme um padrão bem estabelecido, dentro do intervalo de comprimento de onda relevante ao experimento. A segunda correção implementada neste trabalho é do efeito de filtro interno, que se deve ao efeito da turbidez da amostra na intensidade captada pelo detector.

Correção da lâmpada

A correção da lâmpada faz-se necessária principalmente ao comparar um espectro publicado na literatura, dado que os equipamentos são diferentes e podem possuir diferentes sensibilidades para cada comprimento de onda.

A curva de correção utilizada para este trabalho foi obtida a partir do espectro de fluorescência do aminoácido triptofano livre em água. Obteve-se a curva experimental conforme instruções e dividiu-se o espectro experimental pelo esperado, utilizamos a referência presente no livro *Principles of Fluorescence*, de Lakowicz [27]. A divisão gera uma curva de correção que foi utilizada em todos os experimentos de fluorescência deste trabalho. É importante mencionar que existem registros de várias sondas como referência para fluorescência, a escolha deve ser feita com base no intervalo de espectro de emissão da amostra a ser estudada. A fim de completude, segue reprodução das instruções e resultados registrados da sonda triptofano em *Appendix I* de [27]:

Triptofano - Código CAS (do inglês, *Chemical Abstract Service registry number*) para correta identificação da sonda: 54-12-6; solvente: água; comprimento de onda de excitação: 265nm; intervalo de comprimento de onda de emissão: 310nm-428nm.

Tabela 3: Intensidade normalizada de emissão de referência da sonda triptofano em água em função do comprimento de onda.

$\lambda(\text{nm})$:	310	312	314	316	318	320	322	324	326
Int (u.a):	0.111	0.149	0.194	0.242	0.299	0.357	0.417	0.485	0.547
$\lambda(\text{nm})$:	328	330	332	334	336	338	340	342	344
Int (u.a):	0.611	0.675	0.727	0.771	0.814	0.86	0.906	0.928	0.957
$\lambda(\text{nm})$:	346	348	350	352	354	356	358	360	362
Int (u.a):	0.972	0.996	1	0.999	0.987	0.972	0.946	0.922	0.892
$\lambda(\text{nm})$:	364	366	368	370	372	374	376	378	380
Int (u.a):	0.866	0.837	0.798	0.768	0.728	0.697	0.663	0.627	0.592
$\lambda(\text{nm})$:	382	384	386	388	390	392	394	396	398
Int (u.a):	0.558	0.523	0.492	0.461	0.43	0.404	0.375	0.348	0.323
$\lambda(\text{nm})$:	400	402	404	406	408	410	412	414	416
Int (u.a):	0.299	0.279	0.259	0.239	0.222	0.204	0.19	0.176	0.163
$\lambda(\text{nm})$:	418	420	422	424	426	428	484	486	
Int (u.a):	0.151	0.139	0.128	0.118	0.109	0.101	0.113	0.105	

Correção de filtro interno

Primeiro, vamos ao exemplo clássico que gera imprecisões na análise: o espectro detectado é percebido como menor, porém o espalhamento da amostra aumentou, trazendo a falsa impressão que a emissão do fluoróforo diminuiu, quando na verdade este não mudou, somente incide menos no detector. Portanto a correção de filtro interno é obtida a partir da absorvância da amostra em função do comprimento de onda. O aumento do espalhamento diminui a intensidade detectada em dois momentos: primeiro, menos radiação incide sobre o fluoróforo, causando consequentemente menor emissão; segundo, após a emissão, uma quantidade maior dessa radiação é espalhada e menor parte incidirá no detector.

O efeito que ocorre no primeiro estágio, diminuindo a radiação que excitará a sonda fluorescente, é conhecido como efeito de filtro interno primário. O efeito que ocorre após a emissão, causando o espalhamento ou reabsorção do fóton emitido, é conhecido como efeito de filtro interno secundário.

A Figura 15 traz um esquema ilustrativo do efeito de filtro interno primário e secundário. As setas azuis representam o feixe incidente, que ao atravessar a amostra perde intensidade por uma série de fenômenos já explicitados. Já as setas verdes representam a intensidade emitida, que também perde intensidade ao percorrer o restante da amostra. Observe que as setas verdes são perpendiculares às setas azuis, isso se deve à configuração geométrica dos experimentos. O detector no experimento de espectroscopia óptica, a fim de obter a absorvância, é posicionado na linha do feixe incidente, já o detector no experimento de fluorescência é posicionado perpendicularmente ao feixe incidente.

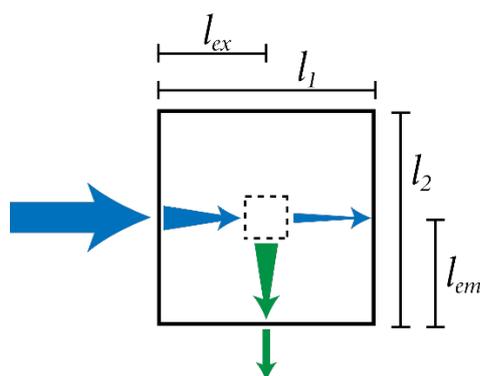


Figura 15: Esquema ilustrativo do efeito de filtro interno. A seta azul representa o feixe de fótons irradiado sobre a amostra, que perde intensidade ao longo da cubeta. A seta verde representa a intensidade de emissão, que também perde intensidade ao longo da cubeta. l_1 é o comprimento da cubeta ao longo do feixe incidente, l_2 o comprimento da cubeta a 90° do feixe incidente. l_{ex} é o comprimento que percorrido até atingir o fluoróforo que se encontra no centro amostra, l_{em} é o comprimento percorrido pela emissão a partir do fluoróforo.

Existe uma série de modelos para a correção do espectro de fluorescência, alguns bem complexos a depender da natureza e da geometria do sistema. Optamos por um modelo simplificado que considera somente uma pequena região no centro da cubeta como relevante para o fenômeno, gerando uma relação linear entre a fluorescência corrigida e a observada. A fluorescência corrigida, F_{corr} , é igual a fluorescência observada, F_{obs} vezes dois fatores, um corresponde ao efeito de filtro interno primário, f_{prim} , e outro ao secundário, f_{sec} .

$$F_{corr} = F_{obs} \cdot f_{prim} \cdot f_{sec} \quad (6)$$

Consideraremos que ambos os fatores podem ser descritos pela lei de Lambert-Beer:

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) \rightarrow I_0 = I \cdot 10^A \quad (7)$$

$$F_{corr} = F_{obs} \cdot 10^{A_{prim}} \cdot 10^{A_{sec}} \quad (8)$$

A absorvância primária está relacionada com a absorvância do comprimento de onda de excitação, dado que o feixe de luz incidente possui um comprimento de onda bem definido para promover a excitação. Já a absorvância secundária está relacionada com todo o espectro de fluorescência.

São adicionados fatores devido a geometria do experimento, como já mencionado. Absorvância é medida através do espectrofotômetro, o feixe deve percorrer toda o comprimento da cubeta para atingir o detector. Já no experimento de fluorescência, o detector do fluorímetro fica a 90° do feixe incidente, como pode ser visto na Figura 15. Considere uma molécula da sonda fluorescente no centro cubeta, o feixe incidente percorrerá somente metade de l_1 e a radiação emitida percorrerá metade de l_2 . A fluorescência corrigida em um dado comprimento de onda de emissão λ_{em} , com a amostra excitada no comprimento de onda λ_{ex} é igual a:

$$F_{corr} = F_{obs} \cdot 10^{A_{\lambda_{ex}} \cdot l_{ex}/l_1} \cdot 10^{A_{\lambda_{em}} l_{em}/l_1} \quad (9)$$

Obs.: Atentar-se à relação entre l_1 e l_2 e em qual configuração a absorvância foi medida. A equação considera que a absorvância foi medida ao longo do caminho óptico $l=l_1$.

Agora para todo o espectro de fluorescência gerado a partir de um feixe com comprimento de excitação bem definido:

$$F_{corr}(\lambda) = F_{obs}(\lambda) \cdot 10^{A_{\lambda_{ex}} \cdot l_{ex}/l_1} \cdot 10^{A(\lambda) l_{em}/l_1} \quad (10)$$

No caso de uma cubeta quadrada, $l_1=l_2$, temos:

$$F_{corr}(\lambda) = F_{obs} \cdot 10^{(A_{\lambda ex} + A(\lambda))/2} \quad (11)$$

C. Dicroísmo Circular

O experimento de dicroísmo circular (CD, *circular dichroism*, do inglês) traz informação sobre a estrutura secundária de proteínas. Através da análise de seu espectro, pode-se calcular a porcentagem de alfa-hélice, folha-beta e estruturas desordenadas de uma proteína ou peptídeo.

1. Detalhamento teórico

A teoria se baseia na propriedade de algumas moléculas de modificar a polarização da luz. As moléculas quirais possuem tal propriedade. Uma molécula quiral é uma molécula assimétrica e não é sobreponível a sua imagem especular (imagem de um espelho), como as nossas mãos.

Considere uma onda circularmente polarizada, isto é, com a mesma composição de uma onda plana horizontalmente polarizada e outra verticalmente polarizada. A onda pode ainda ser circularmente polarizada à esquerda ou à direita, isto é, com o sentido de propagação saindo do plano do papel/tela, no sentido horário ou anti-horário, respectivamente. Uma molécula pode absorver a radiação polarizada à esquerda com diferente intensidade do que à direita. A diferença entre a absorbância (definida pela equação (4)) da radiação à esquerda e à direita, em um determinado comprimento de onda, constitui uma medida de $\Delta A = A_E - A_D$, ao variarmos o comprimento de onda incidente temos um espectro de CD.

O esquema ilustrativo do equipamento de CD pode ser observado na Figura 16. O feixe de luz gerado pela fonte, o comprimento de onda é selecionado pelo monocromador e o modulador (PEM, do inglês, *photoelastic modulator*) produz, de forma alternada, luz circularmente polarizada à esquerda e à direita. O detector (foto multiplicadora) capta a luz transmitida (luz incidente menos a luz absorvida) circularmente polarizada à direita e à esquerda.

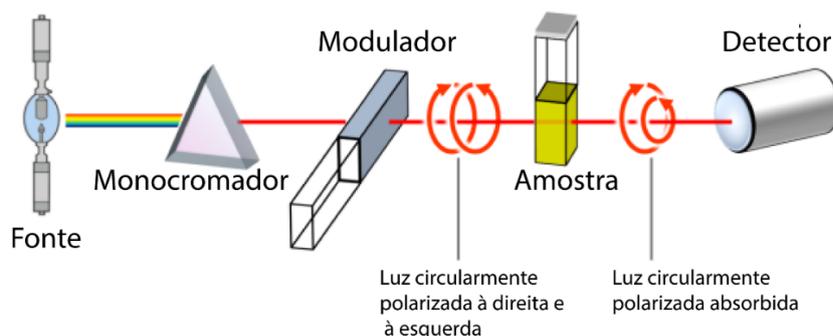


Figura 16: Esquema ilustrativo do equipamento de dicroísmo circular. Adaptado de Tamara Šmidlehner et al. [37], Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>).

As estruturas secundárias típicas de polipeptídios, descritas na Seção I.B, absorvem de forma diferente a radiação polarizada a direita e a esquerda, portanto possuem um espectro de CD diferente de zero. Ademais cada estrutura possui um espectro de CD bem característico, como pode ser observado na Figura 17. Portanto é possível determinar a composição da estrutura secundária de uma proteína a partir de seu espectro de CD, que fornece a somatória de todas as contribuições.

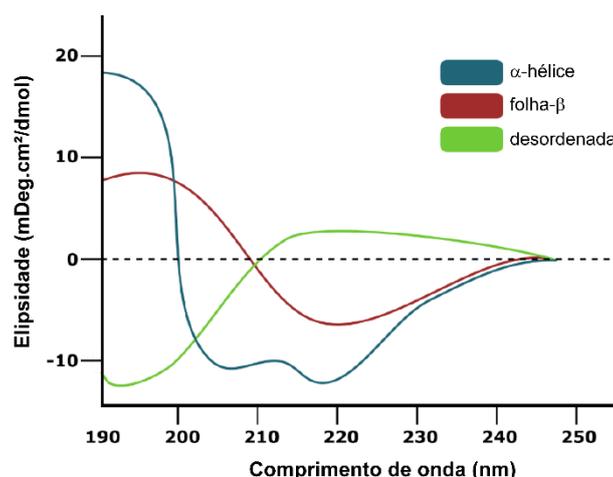


Figura 17: Espectro de CD característicos das 3 principais organizações estruturais, alfa-hélice, folha beta e desordenada. Imagem traduzida de [38].

a) Unidades de CD

Várias unidades podem ser encontradas no eixo y do espectro de CD, buscamos aqui demonstrar como essas grandezas se relacionam e como é possível caminhar de uma unidade para outra, baseado nas informações contidas nas referências [39] [40]. A grandeza mais direta e intuitiva para iniciar o raciocínio é ΔA ,

$$\Delta A = A_E - A_D \quad (12)$$

Onde A_D e A_E é a absorbância da radiação circularmente polariza à direita e à esquerda, respectivamente. A facilidade de tal grandeza se deve a absorbância já ser familiar pela técnica de espectroscopia UV-Vis. Uma segunda unidade também intuitiva é $\Delta\varepsilon$, onde ε pode ser calculado a partir da equação (4), $A(\lambda) = Cl\varepsilon_\lambda$.

$$\Delta\varepsilon_\lambda = \Delta A_\lambda / Cl \quad (13)$$

Historicamente utilizou-se também o grau de elipticidade (*degree of ellipticity*, θ) buscando facilitar a relação entre as medidas de dicroísmo circular e as medidas de rotação óptica e polarimetria. Onde θ é definido como o ângulo oposto ao semi-eixo menor da elipse:

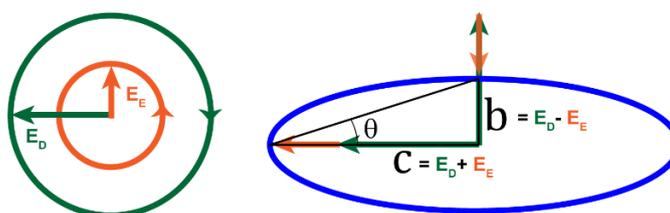


Figura 18: Lado esquerdo: Esquema ilustrativo dos vetores campo elétrico de onda circularmente polarizada a direita E_D e a esquerda E_E . No caso ilustrado $E_D > E_E$ simulando uma maior absorção de E_E em um experimento de CD. Lado direito: Elipse com grau de elipticidade indicado, θ (ângulo oposto ao semi-eixo menor de uma elipse). Referência: adaptado de [39].

A elipse em questão é definida por dois eixos e seus semi-eixos (c e b da Figura 18). O eixo menor é igual a diferença entre os vetores campo elétrico da onda circularmente polarizada a direita e a esquerda, já o eixo maior é igual à soma dos mesmos vetores. Dado que o campo elétrico é proporcional a raiz quadrada da intensidade da onda eletromagnética, a tangente de θ é igual a:

$$\tan(\theta) = \frac{E_D - E_E}{E_D + E_E} = \frac{I_D^{1/2} - I_E^{1/2}}{I_D^{1/2} + I_E^{1/2}} \approx \theta \quad (14)$$

Os valores de θ são pequenos, portanto podemos considerar $\tan(\theta) \approx \theta$, em radianos. θ também é normalmente expresso em $grau \cdot 10^{-3}$, ou, *mdeg* (*deg* do inglês *degree*). Para deduzirmos a conversão de θ para outras unidades primeiramente iremos substituir a intensidade pela absorbância, decorrente da equação (4) e substituir na equação (14).

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) \rightarrow I = I_0 e^{-A \ln 10} \quad (15)$$

$$\begin{aligned}
\theta(rad) &= \frac{I_D^2 - I_E^2}{I_D^2 + I_E^2} = \frac{I_0(e^{-\frac{A_D \ln 10}{2}} - e^{-\frac{A_E \ln 10}{2}})}{I_0(e^{-\frac{A_D \ln 10}{2}} + e^{-\frac{A_E \ln 10}{2}})} \\
&= \frac{e^{-\frac{A_E \ln 10}{2}} (e^{-\left(\frac{A_D \ln 10}{2} - \frac{A_E \ln 10}{2}\right)} - e^{-\left(\frac{A_E \ln 10}{2} - \frac{A_E \ln 10}{2}\right)})}{e^{-\frac{A_E \ln 10}{2}} (e^{-\left(\frac{A_D \ln 10}{2} - \frac{A_E \ln 10}{2}\right)} + e^{-\left(\frac{A_E \ln 10}{2} - \frac{A_E \ln 10}{2}\right)})} \\
&= \frac{e^{-(\Delta A \ln 10)/2} - 1}{e^{-(\Delta A \ln 10)/2} + 1}
\end{aligned} \tag{16}$$

Partindo do polinômio de Taylor, com n termos em torno de c, definido por:

$$P_n(c) = \sum_0^n \frac{f^{(n)}(c)}{n!} (x - c)^n \tag{17}$$

Em torno de zero, c=0, temos o polinômio de Mac-Laurin:

$$P_n(0) = f(0) + f'(0).x + \frac{f''(0).x^2}{2!} + \dots \tag{18}$$

Renomeando o expoente de (16) para x temos $\frac{e^x - 1}{e^x + 1}$ e os primeiros termos do polinômio de Mac-Laurin:

$$\frac{e^x - 1}{e^x + 1} \approx \frac{x}{2} - \frac{x^3}{24} + \frac{x^5}{240} - \dots \tag{19}$$

Utilizando somente o primeiro termo polinômio e transformando a unidade θ para graus temos:

$$\theta(graus) = \frac{\Delta A \ln 10}{4} \cdot \frac{360}{2\pi} \approx 32,98. \Delta A \tag{20}$$

Encontramos, desta forma, a relação entre elipticidade e a variação da absorbância. Como dito anteriormente também é possível obter a relação com a variação do coeficiente de extinção molar, ou delta épsilon, $\Delta \epsilon$, utilizando a equação (13).

$$\theta(graus) = 32,98. C.l. \Delta \epsilon \tag{21}$$

É muito comum na literatura encontrarmos a elipticidade θ em 10^{-3} graus (ou *mdeg*). Porém algumas outras unidades também são utilizadas. A elipticidade molar $[\theta]$ e a elipticidade média por resíduo ($[\theta]_{MR}$ ou sigla MRE, do inglês Mean Residue Ellipticity) são muito utilizadas, definidas como:

$$[\theta] \left(\frac{\text{graus. cm}^2}{\text{dmol}} \right) = \frac{100. \theta}{C. n. l} \quad (22)$$

$$MRE = [\theta]_{MR} \left(\frac{\text{graus. cm}^2}{\text{dmol. resíduo}} \right) = 3298. \Delta\varepsilon \quad (23)$$

Onde C é a concentração em molar, l é o caminho óptico em centímetro e o fator 100 deve-se a conversão de unidade de l para metro.

Também é possível calcular $\Delta\varepsilon$ a partir do peso médio dos resíduos (MRW, do inglês *mean residue weight*) ao invés da concentração. MRW é definido como a massa atômica da proteína, em daltons (Da), dividido pelo número de resíduos. Assim:

$$\Delta\varepsilon = \frac{\theta(\text{mili graus}). 0,1. MRW(\text{daltons}/n^{\circ}\text{resíduos})}{l(\text{cm}). C(\text{mg/ml}). 3298,2} \quad (24)$$

É importante ressaltar que as notações podem variar de acordo com a referência.

b) Cálculo da composição da estrutura secundária

O espectro de CD fornece a somatória de todas as estruturas que espalham a radiação polarizada à direita diferentemente de à esquerda. Portanto há a necessidade de fazer uma decomposição dos espectros ou comparar com espectros de proteínas bem conhecidos, onde a composição da estrutura secundária foi calculada através de outras técnicas.

Existem uma série de ferramentas para o cálculo da composição da estrutura secundária de proteínas, dentre estas destacamos o DichroWeb [41], uma aplicação on-line desenvolvida no laboratório da Professora B.A. Wallace do Birbeck College, Londres, UK disponível em <http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/>. Infelizmente os espectros obtidos no desenvolvimento desta tese contém o intervalo reduzido, em comprimentos de onda, comprometendo uma análise satisfatória utilizando o DichroWeb. Embora uma análise qualitativa fosse suficiente para discutir as interferências dos líquidos iônicos na estrutura secundária das proteínas, buscou-se outros meios para uma análise mais quantitativa.

A equação a seguir foi obtida empiricamente para a proteína BSA e foi utilizada no trabalho de A. Bhogale e colaboradores [42]:

$$\alpha - \text{hélice}(\%) = \frac{-MRE_{208} - 4000}{33000 - 4000} \cdot 100 \quad (25)$$

A equação será utilizada para estimar a porcentagem de estrutura tipo α -hélice nas proteínas BSA e HSA. MRE_{208} é a elipticidade média por resíduo observada experimentalmente, definida pela equação (23) no comprimento de onda 208nm, que

corresponde a um dos vales característicos da estrutura de α -hélice. 4000 é MRE da estrutura tipo folha- β e *random coil* em 208nm e 33000 é o MRE de uma estrutura puramente constituída de α -hélice em 208.

D. Espalhamento de Raios-X a baixo ângulo

O espalhamento de raios-x a baixo ângulo (SAXS, *small angle x-ray scattering*) é uma técnica de baixa resolução, isto é, não é possível determinar posições atômicas com precisão, porém é possível apontar a forma de aglomerados e mudanças estruturais. A grande vantagem do SAXS em comparação com técnicas de difração e espalhamento é a sua versatilidade com relação a natureza da amostra, principalmente *soft matter* (matéria mole, como soluções líquidas, coloidais, espumas e gels). Desta forma é possível observar a estrutura terciária e quaternária de uma proteína em solução.

1. Desenvolvimento teórico

O reconhecimento do fenômeno da difração da luz como possível ferramenta para análise de distâncias inter e intramoleculares ocorreu no início do século XX com P.P. Ewald, W. Friedrich, P. Knipping e M. Von Laure. A difração de partículas também pode ser utilizada para o mesmo fim, dada a relação entre onda e partícula apontada pelo pesquisador L. V. de Broglie. Uma breve linha cronológica dos principais feitos para esse campo de estudo pode ser apreciada na Figura 19.

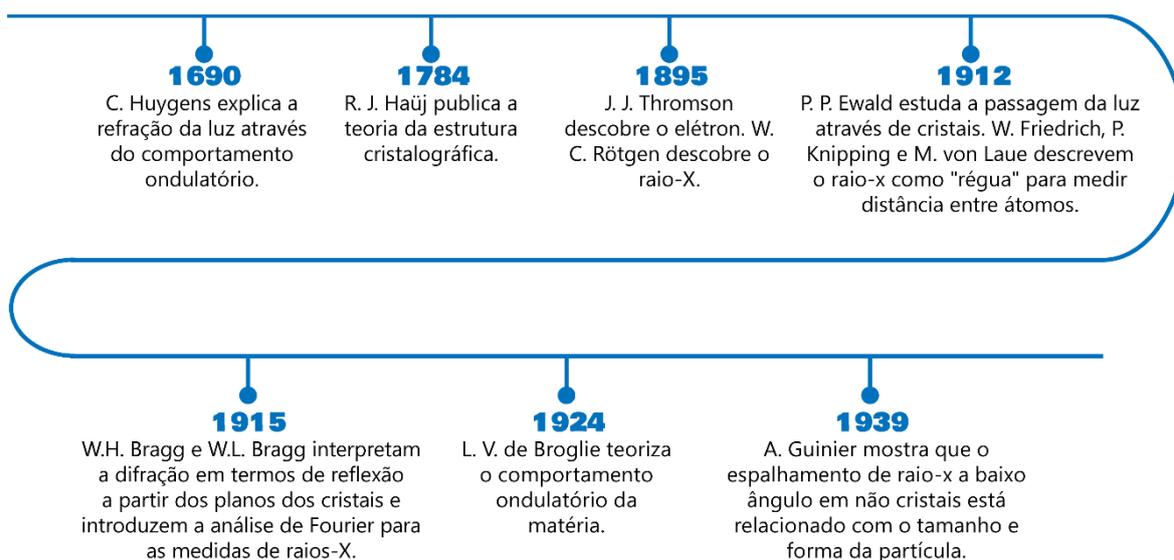


Figura 19: Linha cronológica de marcos relevantes para o estudo da estrutura da matéria e macromoléculas da radiação. Referências: [28]

Raios-x, elétrons e nêutrons sofrem difração em um intervalo de distâncias conveniente para o estudo da matéria. Desta forma temos três possíveis fontes para o estudo de ligações atômicas, cujo comprimento é da ordem de 1Å . Raios-x possuem comprimento de onda em torno de 1Å , elétrons em torno de $0,01\text{Å}$ e nêutrons entre $0,5\text{Å}$ e 10Å . Para esse trabalho o espalhamento de raios-x se mostrou mais apropriado devido à relativa facilidade de acesso ao equipamento. Iniciaremos assim a explanação com a descrição dos fenômenos físicos para o entendimento geral da técnica.

a) *Difração da luz*

O experimento de fenda simples é uma forma direta de observarmos a **difração da luz**. O experimento consiste em posicionar uma fenda, ou um obstáculo, no feixe de uma luz monocromática (*laser*) e uma tela/anteparo, conforme ilustra a Figura 20. O padrão de difração será observado na tela a depender da relação entre o tamanho da fenda e o comprimento de onda do *laser*. Foi observado que cada ponto no interior da fenda age como uma nova fonte de luz que interagem entre si (construtivamente ou destrutivamente a depender das fases das ondas) e geram um padrão no anteparo, evidenciando a natureza ondulatória da luz.

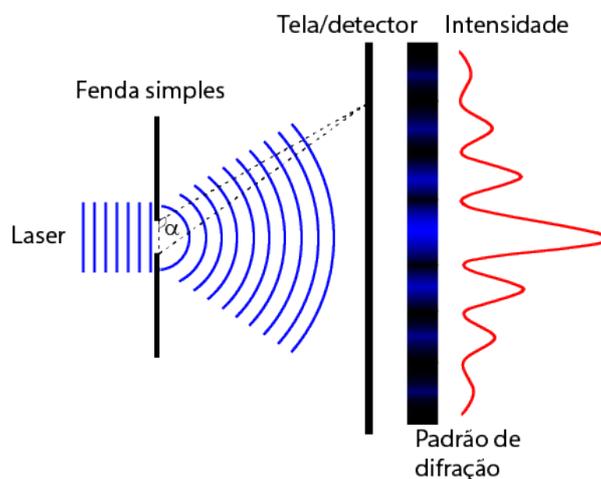


Figura 20: Experimento de difração por uma fenda simples.

O padrão de difração será gerado quando o comprimento de onda da onda incidente é da ordem de grandeza da espessura da fenda ou do obstáculo. Podemos antecipar que tal fenômeno será utilizado na exploração experimental da organização de átomos e moléculas. Estruturas com alto grau de organização, como nos cristais, podem ser descritas a partir do padrão de difração através da Lei de Bragg, conforme Figura 21.

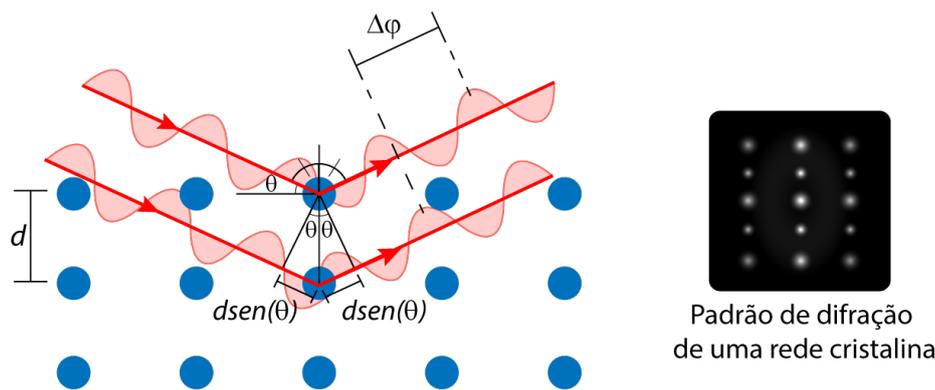


Figura 21: Difração por uma rede cristalina.

A lei de Bragg se baseia em dois fenômenos, a interferência e a reflexão. Considere dois átomos em uma rede cristalina a uma distância d , ambos receberão e refletirão radiação de uma mesma fonte. Observe que a radiação atinge os átomos em momentos diferentes, a diferença entre os deslocamentos dos feixes até atingir os átomos é igual $dsen(\theta)$, sendo θ o ângulo entre a radiação a superfície da rede cristalina. Após a reflexão haverá a mesma diferença de deslocamento até o detector que estará localizado perpendicularmente aos feixes refletidos. Quando as ondas atingirem o detector haverá uma diferença total de deslocamento de $2dsen(\theta)$. No detector ocorrerá o fenômeno da interferência, que pode ser construtiva ou destrutiva a depender da diferença de fase entre as ondas, $\Delta\phi$.

O padrão de difração apresenta franjas escuras e claras. O pico de máxima intensidade é construído a partir da interferência construtiva com as ondas em fase, já as franjas escuras são construídas a partir da interferência destrutiva, com as ondas em fases opostas. A condição para que a interferência seja construtiva é que a diferença de deslocamento entre as ondas seja igual a um número inteiro do comprimento de onda, assim $\Delta\phi=0$ e as ondas estarão em fase, portanto, nesta situação:

$$2dsen(\theta) = n\lambda \quad (26)$$

A equação (26) é conhecida como lei de Bragg.

b) *Espalhamento da luz*

A técnica de espalhamento de raio-X a baixo ângulo é utilizada principalmente para a matéria mole e materiais não cristalinos. Desta forma não é possível obter um padrão de intensidade tão definido como nos experimentos de difração de cristais. Materiais não cristalinos irão produzir perfis de intensidade de espalhamento.

Explorando um material não cristalino, onde a distância entre os centros espalhadores pode variar muito, temos a situação ilustrada na Figura 22.

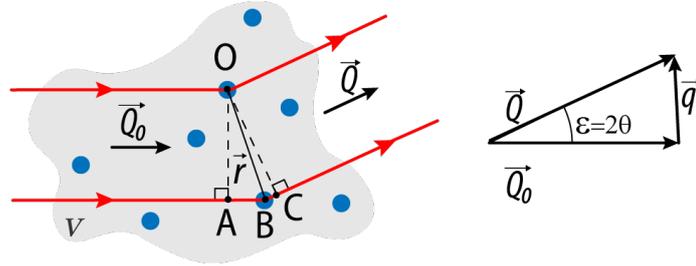


Figura 22: Espalhamento da radiação por um material não cristalino. Referência: [43].

A diferença entre o vetor de onda incidente, \vec{Q}_0 , e o vetor de onda espalhado, \vec{Q} , é definido como o vetor espalhamento \vec{q} , o vetor espalhamento é proporcional ao momento transferido ao sistema no processo de espalhando do fóton, $\Delta\vec{p} = h\vec{q}$, onde h é a constante de Plank. O módulo do vetor espalhamento também pode ser escrito como:

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \text{sen}(\theta) \quad (27)$$

Sendo θ igual a metade do ângulo de espalhamento.

Considerando agora vários centros espalhadores em um volume, V , com densidade eletrônica, ρ , temos a amplitude total espalhada em função do vetor espalhamento, $A(\vec{q})$, igual a:

$$A(\vec{q}) = \int_V \rho(\vec{r}) e^{-i\vec{q}\cdot\vec{r}} dv \quad (28)$$

Neste ponto estamos desconsiderando múltiplos espalhamentos e efeitos de absorção. Nosso interesse é obter a estrutura, portanto, $\rho(\vec{r})$. Observe que $A(\vec{q})$ é definida como a transformada de *Fourier* da densidade eletrônica. Portanto podemos obter a densidade eletrônica através da transformada inversa de *Fourier*:

$$\rho(\vec{r}) = \frac{1}{(2\pi)^3} \int_V A(\vec{q}) e^{i\vec{q}\cdot\vec{r}} dv_q \quad (29)$$

Temos, portanto, como obter a densidade eletrônica a partir da amplitude do espalhamento, porém experimentalmente não temos acesso a amplitude como um todo, os detectores nos fornecem a intensidade através da contagem de fótons. Dado que $I(\vec{q}) = A(\vec{q}) \cdot A(\vec{q})^* = |A(\vec{q})|^2$ temos perda de informação sobre a fase da onda. Desta forma é importante encontrarmos uma relação entre a intensidade espalhada no espaço recíproco,

$I(\vec{q})$, com uma função relacionada com a estrutura no espaço real. Esta função é a função de correlação $\gamma(\vec{r})$.

$$I(\vec{q}) = V \int_V \gamma(\vec{r}) e^{-i\vec{q}\cdot\vec{r}} dv \quad (30)$$

Onde,

$$\gamma(\vec{r}) = \frac{1}{V} \int_V \Delta\rho(\vec{r}') \Delta\rho(\vec{r}' + \vec{r}) dv' = \overline{\Delta\rho(\vec{r}') \Delta\rho(\vec{r}' + \vec{r})} = \frac{1}{(2\pi)^3 V} \int I(\vec{q}) \cdot e^{i\vec{q}\cdot\vec{r}} dv_q \quad (31)$$

A função de correlação é a média espacial do produto entre a variação de densidade eletrônica em dois volumes quaisquer separados por um vetor \vec{r} . Considerando agora um sistema isotrópico, isto é, suas propriedades não dependem da direção, temos:

$$\langle e^{-i\vec{q}\cdot\vec{r}} \rangle = \frac{\text{sen}(qr)}{qr} \quad (32)$$

$$I(q) = V \int_0^\infty 4\pi r^2 \gamma(r) \frac{\text{sen}(qr)}{qr} dr \quad (33)$$

Temos dessa forma a intensidade espalhada por uma estrutura em um sistema isotrópico. Reescrevendo a equação (33) para uma forma mais popular:

$$I(q) = \int_0^\infty p(r) \frac{\text{sen}(qr)}{qr} dr \quad (34)$$

Surge aqui a famosa função de distribuição de pares, $p(r)$, que buscamos encontrar para explorar a forma da estrutura espalhadora. Aplicando a transformada inversa de Fourier:

$$p(r) = \frac{2}{\pi} r^2 \int_0^\infty q^2 I(q) \frac{\text{sen}(qr)}{qr} dq \quad (35)$$

A função distribuição de pares, devido a sua importância, será discutida em mais detalhes na próxima seção.

As equações (34) e (35) são válidas para sistemas com 1 centro espalhador, porém em solução temos muitas partículas. Consideraremos inicialmente um sistema com N partículas isoladas (sistema diluído) distribuídas e orientadas aleatoriamente. Dado que, neste caso, cada uma das estruturas espalha de forma idêntica, temos que a intensidade total é igual a média da intensidade de uma partícula considerando todas as orientações vezes o número de partículas:

$$I(q) = N \langle I_1(q) \rangle \quad (36)$$

Podemos estar interessados em um sistema não diluído, isto é, as nanopartículas não estão isoladas e podem formar estruturas e agregados. Neste caso a equação anterior não é válida para qualquer \vec{q} . Se o sistema for isotrópico é possível separar a contribuição do espalhamento de uma nanopartícula da contribuição da estrutura:

$$I(q) = N\langle I_1(q) \rangle \langle S(q) \rangle \quad (37)$$

Ou como mais vemos na literatura

$$I(q) = N\langle P(q) \rangle \langle S(q) \rangle \quad (38)$$

Onde $P(q)$ é o fator de forma e $S(q)$ o fator de estrutura.

A questão pode ser complicada em muitos sentidos, por exemplo se quisermos acessar nanopartículas com diferentes tamanhos ou com diferentes densidades eletrônicas.

2. Análise de Dados de SAXS de Proteínas

Existe uma série de modelos que podem ser utilizados para a análise de uma curva de espalhamento de raios-X a baixo ângulo, a depender da natureza da amostra. O processo de análise e os modelos optados neste trabalho são largamente utilizados na literatura para o estudo de sistemas de interesse biológico, como membranas e proteínas. O pacote ATSAS 3.0 [44] é composto por uma série de software para análise de SAXS, alguns destes foram utilizados neste trabalho e serão descritos nesta seção.

São quatro as principais informações que buscamos obter a partir da curva de SAXS neste trabalho. A primeira delas é o raio de giro (calculado a partir do ajuste de Guinier), a segunda é a curva de Kratky (ambas obtidas através da ferramenta SAXSMoW 3.0 [45]), a terceira é a distribuição de pares, $p(r)$, (obtida através do software GNOM Version 4.6 [46]) e a quarta é um possível envelope do centro espalhador (obtido através do software DAMMIN Version 1.1.2 [46]).

a) *Radio de giro*

O raio de giro, R_g , é utilizado para descrever as dimensões de uma partícula. Há duas formas bem conhecidas de se obter o raio de giro por SAXS. A primeira é a aproximação de Guinier, que pode ser facilmente obtida a partir do dado experimental, a segunda é calculada a partir da $p(r)$, portanto exige uma análise mais complexa, porém é mais precisa para sistemas com grande flexibilidade.

Guinier [47] mostrou que uma função Gaussiana é uma boa aproximação para $I(q)$ quando $q \rightarrow 0$ e, portanto, pode ser reescrita da seguinte forma:

$$I(q) = I_0 e^{-\left(\frac{1}{3}\right)R_g^2 q^2} \quad (39)$$

Aplicando logaritmo normal nos dois lados da equação temos:

$$\ln(I(q)) = \ln(I_0) - \frac{R_g^2 q^2}{3} \quad (40)$$

A equação (40) é conhecida como aproximação de Guinier. O R_g pode ser obtido a partir do coeficiente angular da reta ajustada do gráfico $\ln(I(q))$ x q^2 . É importante mencionar que existem intervalos válidos a depender da forma esperada da estrutura, por exemplo, para proteínas globulares $R_g \cdot q < 1,3$.

Caso $p(r)$ tenha sido obtida, como será descrito mais adiante, é possível calcular R_g através da equação:

$$R_g^2 = \frac{\frac{1}{2} \int_0^{D_{max}} p(r) r^2 dr}{\int_0^{D_{max}} p(r) dr} \quad (41)$$

Onde D_{max} é diâmetro máximo da partícula.

b) Gráfico de Kratky

O gráfico de Kratky proporciona uma análise qualitativa referente a globularidade e flexibilidade, no caso de proteínas. O gráfico de Kratky é definido como $q^2 I$ em função de q . Uma proteína globular enovelada exibe uma curva em forma de sino, já a curva de uma proteína com grande flexibilidade não converge a zero após o pico e proteínas com multidomínio podem exigir ombros adicionais. Uma tendência geral de como o gráfico de Kratky pode ser utilizado para o estudo do desenovelamento de uma proteína pode ser observado na Figura 23.

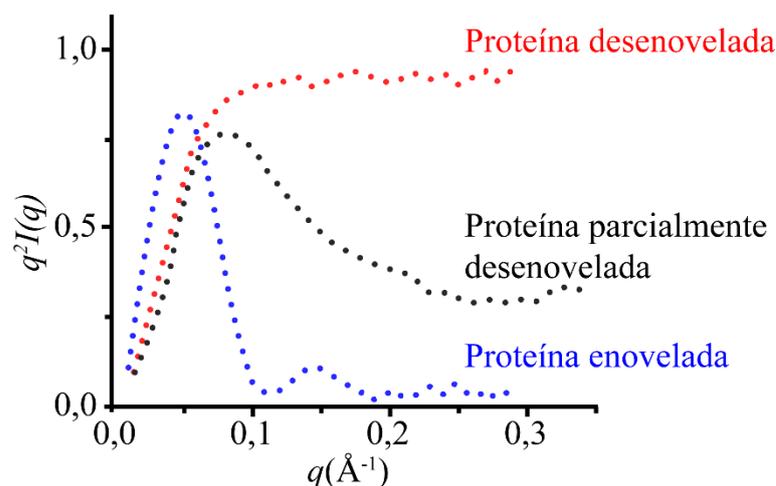


Figura 23: Gráfico de Kratky de uma proteína enoveladas, parcialmente desenvolvida e totalmente desenvolvida. Referências: figura 24 de [48].

É encontrado na literatura o gráfico de Kratky normalizado, o qual possibilita uma melhor comparação entre curvas e sistemas em que há alteração da concentração, é definido como $q^2 R_g^2 I / I_0$ em função de $q R_g$. I_0 e R_g podem ser obtidos pela aproximação de Guinier descrita anteriormente.

c) Função distribuição de pares

A função de distribuição de pares, $p(r)$, é importante na análise de espalhamento de raios-x, porém, para melhor entendimento do seu significado utilizaremos uma analogia com a cristalografia, conforme Figura 24. Dada uma estrutura com alto grau de organização, como um cristal, a $p(r)$ pode ser interpretada como um histograma de átomos, ou centros espalhadores, função da distância em relação ao centro.

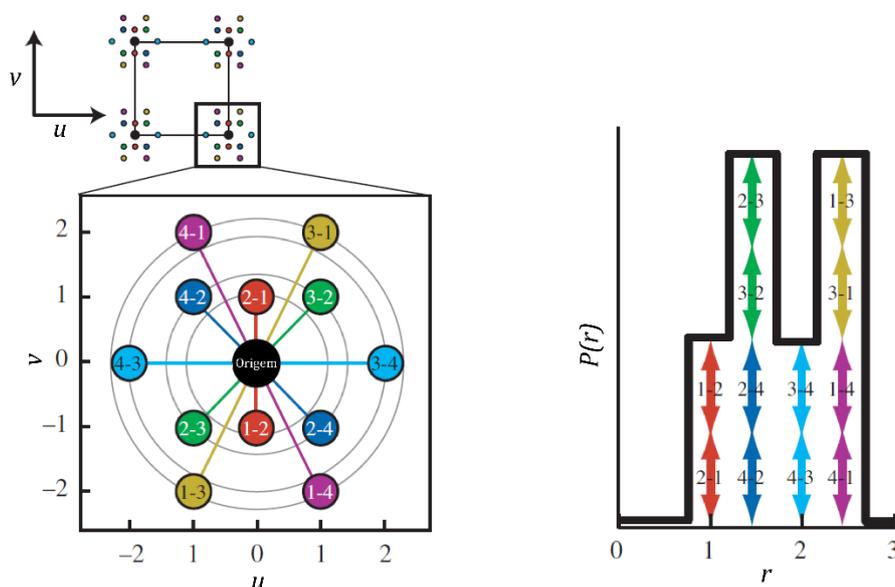


Figura 24: Comparação entre a estrutura molecular de um cristal e a função de distribuição de pares correspondente. Adaptada da figura 2 de [48].

$P(r)$ está demonstrada na equação (35) e foi obtida através da transformada inversa de Fourier da intensidade de espalhamento $I(q)$, equação (34). No caso de um sistema isotrópico e monodisperso (com somente uma espécie de centro espalhador) bastaria realizar a transformada inversa de Fourier da intensidade espalhada experimental, passando do espaço recíproco para o espaço real. Em linhas gerais, o software GNOM “recorta” a curva experimental em pequenos intervalos, utiliza algoritmos de regularização e faz o cálculo da transformada inversa de Fourier de cada um desses pedaços.

A forma da partícula pode ser obtida a partir da $p(r)$, dado que algumas estruturas não são facilmente identificáveis somente pela intensidade de espalhamento, como pode ser observado na Figura 25.

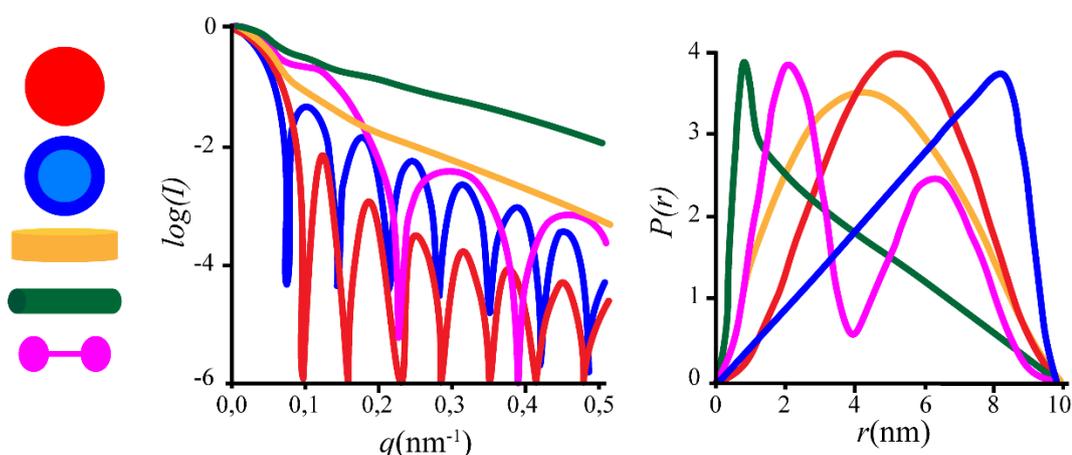


Figura 25: Intensidade de espalhamento de SAXS, em escala mono-log, e função de distribuição de pares, $p(r)$, de cinco tipos de forma de partículas (esfera - vermelho, esfera oca - azul, disco - laranja, haste - verde e haltere - magenta). Referência: adaptado da figura 5 de [49].

Especificamente para análise de proteínas, podemos focar em algumas características da curva, por exemplo a posição do pico e o D_{max} , dimensão máxima, onde a $p(r)$ torna a ser zero. A proteína globular apresenta uma curva em forma de sino, o aumento de D_{max} pode significar um desnovelamento e a formação de ombros podem indicar a formação de domínios [48].

d) *Envelope da partícula espalhadora*

O programa DAMMIN busca encontrar a forma de uma partícula, cuja curva de espalhamento de raios-x mais se aproxima de uma dada curva experimental. Para tal, um volume é preenchido com N esferas compactas, cada uma simulando um átomo. São geradas configurações com essas esferas, calcula-se o espalhamento teórico de cada configuração e as configurações que geram a menor discrepância entre o dado experimental e o teórico são selecionadas. Há também um modelo quantitativo com penalidades, isto é, buscando dar

preferência a uma configuração compacta e interconectada, são introduzidas a penalidade de frouxidão e a penalidade de desconexão. Alguns parâmetros iniciais podem ser fornecidos/modificados para guiar o processo, como forma esperada (esfera, elipsoide, cilindro ou paralelepípedo), simetria e outros [50].

3. Síncrotron

Um componente crucial do experimento de espalhamento de raios-x a baixo ângulo é a fonte de raios-x. Existem equipamentos de “bancada” como o Nanostar, disponível no Laboratório de Cristalografia do Instituto de Física da USP, sob supervisão do Prof Dr. Cristiano L.P. Oliveira e equipamentos com fonte síncrotron, cada um com suas características, aplicações, vantagem e desvantagens. Utilizamos o Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Figura 26A, linhas SAXS1 e SAXS2, hoje já não mais disponíveis, pois houve a substituição para a fonte de luz Sirius, Figura 26B, mais moderna e potente, e sua nova linha de SAXS, a SAPUCAIA.

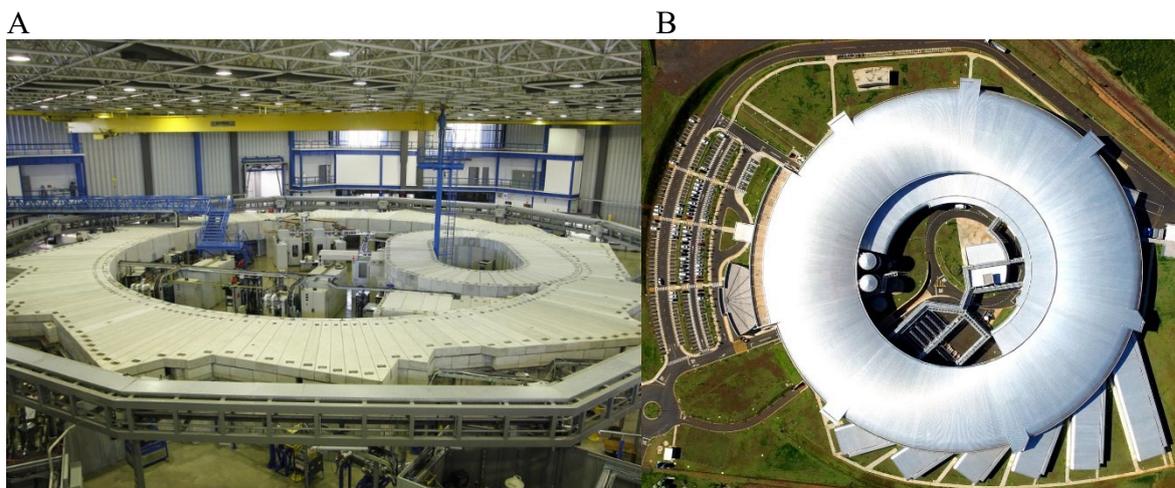


Figura 26: (A) Antiga fonte de luz síncrotron Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, LNLS, hoje desativado. (B) Sirius, nova fonte do LNLS.

Os laboratórios síncrotrons possuem estruturas semelhantes, inclusive o LNLS, um esquema da estrutura do laboratório pode ser apreciado na Figura 27. Temos inicialmente uma fonte de elétrons, um filamento de tungstênio no LNLS. Os elétrons são acelerados através de microondas em um acelerador linear (LINAC) e acelerados novamente em um acelerador em forma de anel, o acelerador injetor ou *booster*. Ao final desse processo os elétrons atingem velocidades próximas a da luz e podem ser transferidos ao anel de armazenamento, que é composto por vários segmentos de reta com redes magnéticas nos vértices para mudar a trajetória dos elétrons para o próximo segmento. Os elétrons, ao terem

sua trajetória modificada, emitem radiação eletromagnética, a radiação síncrotron. A radiação emitida passa pela linha de luz e interage com a amostra na estação experimental. Cada linha luz é construída com uma finalidade específica, portanto a energia da radiação é selecionada previamente.

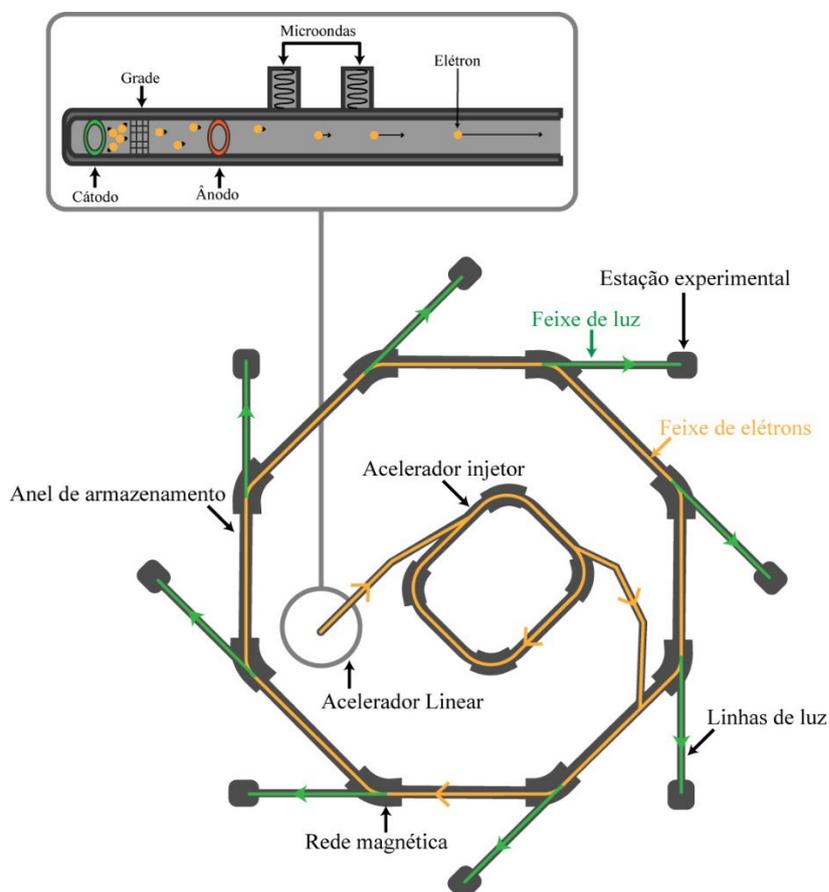


Figura 27: Estrutura típica de acelerador tipo Síncrotron.

O LNLS possuía 2 linhas para o experimento de espalhamento de raios-x a baixos ângulos, SAXS1 e SAXS2. Os experimentos de SAXS foram realizados na linhas SAXS1 com o detector Pilatus 300K posicionado a 1m da amostra. O porta amostra utilizado é composto por um célula de mica e possui espessura de 1mm.

E. Calorimetria de Varredura Diferencial

A calorimetria de varredura diferencial ou calorimetria exploratória diferencial (DSC, do inglês *differential scanning calorimetry*) é uma técnica que traz informações sobre a entalpia de processos, mudanças de estado físico e resistência térmica. Está inserida dentro da área de calorimetria, cujo objetivo, em termos gerais, é a medição de transporte de calor, ou fluxo de calor, normalmente envolvendo mudanças na temperatura de um certo sistema

ou processo. Portanto, traremos uma breve introdução à conceitos da termodinâmica para um melhor entendimento da técnica e análise dos resultados.

1. Desenvolvimento teórico

Temos 4 leis fundamentais que podem ser descritas a partir da termodinâmica. No contexto desta técnica iremos nos concentrar nos conceitos de conservação de energia e entalpia. A partir da primeira lei, temos que a variação da energia interna (U) é igual a energia recebida (Q) pelo sistema mais o trabalho realizado sobre o sistema (W), ou menos o trabalho realizado pelo sistema, mais outras transferências de energias residuais (E_i) resultando na seguinte equação, na sua forma diferencial:

$$dU = dQ + dW + \sum_i dE_i \quad (42)$$

A entalpia é a energia envolvida na mudança entre dois estados, normalmente associado a processos químicos. Em outras palavras, é a energia necessária para criar um sistema mais a energia necessária para “abrir espaço”, trabalho realizado na expansão ($p.V$). Portanto, a definição de entropia é:

$$H = U + pV \quad (43)$$

Na forma diferencial:

$$dH = dU + d(pV) \quad (44)$$

$$dH = dU + p.dV + V.dp \quad (45)$$

Considerando $dW = -p.dV$ e remanejando as equações anteriores, temos:

$$dQ = dH - V.dp - \sum_i dE_i \quad (46)$$

No experimento de DSC temos que a pressão e o volume são mantidos constantes e quaisquer outras trocas de calor que não envolvam a reação química são consideradas desprezíveis. Nessa situação a entalpia é igual a quantidade de calor absorvida ou liberada durante a reação. Dado que a capacidade térmica é a quantidade de calor a ser absorvida ou cedida por um sistema para que ocorra a variação de temperatura de 1°C, a capacidade térmica, a pressão constante, em termos de entalpia em função da temperatura é igual a:

$$C_p(T) = \left(\frac{\partial H}{\partial T} \right)_p \quad (47)$$

A equação acima é essencial para a análise dos dados de DSC. Embora normalmente os dados sejam apresentados na forma de variação da capacidade térmica específica (ΔC_P , na unidade $kca/mol^\circ C$) em função da temperatura, constituindo assim o termograma, a medida direta do DSC é o fluxo de calor em função da temperatura. Já a entalpia de uma reação pode ser calculada a partir da integral de ΔC_P em um intervalo de temperatura, como pode ser visto pela equação (47). Para entendermos essas duas etapas precisamos entender o aparato experimental.

O equipamento é composto com duas células, uma é a célula de referência (normalmente preenchida com água ou tampão) e outra de amostra, como pode ser observado na Figura 28. As duas células estão submetidas a termômetros e aquecedores (resistência elétrica). O controle é feito de forma a manter iguais a temperatura da referência e amostra durante o aquecimento. O aumento da temperatura é gradual e constante, registrando a energia fornecida pelos aquecedores para as células (fluxo de calor – energia fornecida por minuto). Caso seja necessário fornecer mais energia a célula de amostra, em relação a referência, para gerar a mesma variação temperatura temos um sinal positivo, caso seja necessário menos energia o sinal é negativo.

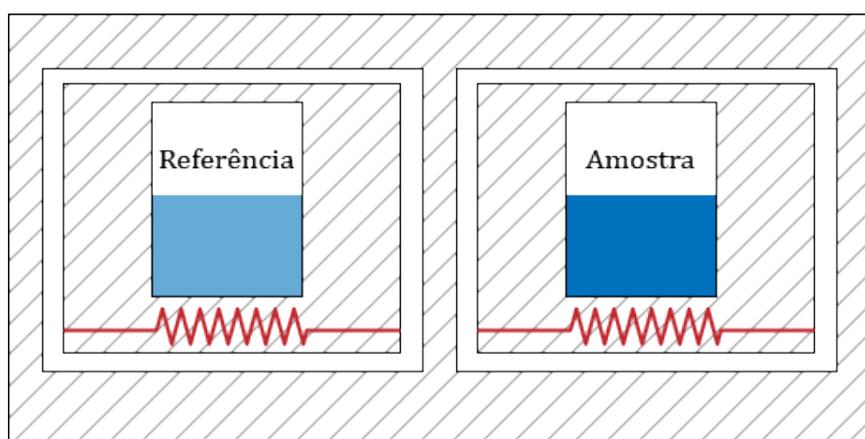


Figura 28: Esquema ilustrativo do equipamento DSC.

Desta forma a capacidade térmica em função da temperatura pode ser calculada a partir do dado experimental fluxo de calor (ϕ , geralmente em unidades $mcal/min$), da taxa de incremento da temperatura (dt , geralmente em $^\circ C/h$) definida, da concentração da amostra (c , em M) e volume da cela de amostra (V , em mL), portanto temos:

$$\Delta C_p(T) = \frac{\varphi(T) \cdot 0,06}{d_t \cdot c \cdot V} \quad (48)$$

O fator 0,06 deve-se às transformações das unidades. Já a entalpia da reação que ocorre entre as temperaturas T_f e T_i pode ser obtida a partir de:

$$H_n = \int_{T_i}^{T_f} \Delta C_p dT \quad (49)$$

A entalpia positiva significa que o processo ocorre com absorção de calor, portanto endotérmico, já a entalpia negativa significa que o processo ocorre com a liberação de calor, portanto exotérmico.

IV. Materiais

As proteínas albumina de soro humano, albumina de soro bovino e lisozima de clara de ovo utilizadas neste trabalho são da fabricante *Sigma-Aldrich*, cujos códigos de referência são, respectivamente, L6876-10g, A9511-1g e A2153-10g. Os líquidos iônicos [C₁₄MIM][Cl], [C₁₂MIM][Cl] e [C₁₀MIM][Cl] são da fabricante *IoLiTec*, cujos códigos de referência são IL-0141, IL-0120 e IL-0065, respectivamente.

1. Preparação das amostras

Todas as amostras medidas neste projeto foram solubilizadas em tampão acetato-fosfato-borato de sódio 10mM e pH 7,4, utilizando água ultrapura milli-Q. O pH foi verificado utilizando um pHmetro e ajustado utilizando soluções de HCl (concentração: 1M) ou NaOH (concentração: 1M). O processo de preparação das amostras consiste em solubilizar as proteínas, os líquidos iônicos e o surfactante separadamente em tampão, formando assim as soluções concentradas que chamamos de estoque. Os componentes são pesados utilizando uma balança analítica com precisão de 0,1mg e pipetas volumétricas automáticas. Posteriormente realizamos as misturas dos componentes desejados a partir do cálculo das concentrações finais desejadas constituindo assim as amostras propriamente ditas. Todas as soluções estoque e as amostras foram misturadas com agitação manual simples e esperou-se ao menos 1 hora para a estabilização do sistema. Tal procedimento garante boa solubilização, dado que todos os componentes utilizados são solúveis em água. Não foi utilizado agitador Vórtex a fim de evitar a formação de espuma.

Todas as amostras são mantidas sob refrigeração até a medição, quando necessário, e neste caso aguarda-se pelo menos 1 hora para estabilização da temperatura antes da medição. A medição é realizada com a amostra ainda fresca, isto é, com até 48h após a preparação, preferencialmente com até 12h.

Os experimentos, de forma geral, foram realizados mantendo a concentração da proteína constante e variando a concentração de ligante (líquido iônico e surfactante). Optamos por não utilizar o processo de pipetar (mesma solução base com pequenas adições consecutivas de ligante) a fim de priorizar a invariabilidade da concentração da proteína. Portanto, em um experimento com 10 concentrações diferentes de ligantes foram preparadas 10 amostras separadamente.

V. Resultados

A fim de ilustrar melhor a linha de raciocínio e a forma como os resultados experimentais se associam, a apresentação dos resultados será dividida por sistemas e pelas técnicas experimentais. Com os dados experimentais já expostos os resultados serão discutidos e analisados conjuntamente por sistema. Ao final realizaremos uma conclusão geral deste trabalho.

É importante mencionar que parte dos dados foram obtidos durante a execução da dissertação de mestrado, porém alguns cálculos e fatores de correção foram refinados criando a necessidade de apresentá-los novamente para entendimento completo da análise.

A. Interação entre líquidos iônicos e albumina de soro bovino

A proteína BSA foi a mais minuciosamente estudada, por conta da vasta literatura disponível e relativa facilidade de trabalho (boa solubilidade, maior resistência a agregação e preço mais acessível comparativamente às outras proteínas). Portanto esse sistema inicial será mais detalhado e com mais subdivisões.

1. Influência dos LIs na absorção e emissão da BSA

A influência dos LIs na absorção da BSA será analisada a partir do espectro de absorbância e da absorbância em comprimentos de onda específicos. Já a influência dos LIs na emissão da BSA será analisada a partir do espectro de fluorescência.

Espectroscopia de absorção óptica

Os espectros de absorbância foram obtidos através do equipamento espectrofotômetro da marca Varian, modelo CARY 50 Bio, disponível no laboratório de Biomembranas no Departamento de Física Geral do Instituto de Física da USP coordenado pela Prof^a Dr^a Maria Teresa Lamy. As amostras foram sempre preparadas e medidas no mesmo dia. O espectro de absorbância de fundo (cubeta + tampão) foi subtraído de todas as curvas.

[C₁₄MIM][Cl]

O espectro de absorbância do líquido iônico em solução, em ausência de outras moléculas, como as proteínas, é relevante como controle da análise. O espectro de

absorbância pode ser apreciado na Figura 29A e a absorbância em comprimentos de ondas específicos pode ser apreciada na Figura 29B.

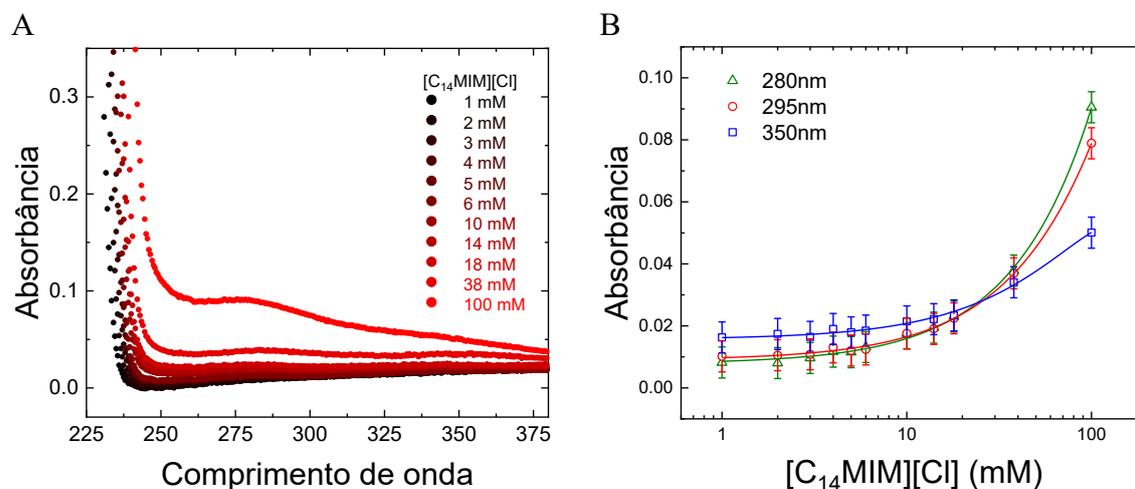


Figura 29: (A) Espectro de absorbância do líquido iônico [C₁₄MIM][Cl] em variadas concentrações. (B) Absorbância do líquido iônico [C₁₄MIM][Cl] nos comprimentos de onda 280nm, 295nm e 350nm em função da concentração de [C₁₄MIM][Cl].

Observe que a absorbância do LI [C₁₄MIM][Cl] entre 225nm e 250nm é muito relevante, tal fenômeno pode inviabilizar experimentos espectroscópicos nesse intervalo de comprimento de onda. A absorbância se mantém menor que 0,1 para comprimentos de onda maiores que 250nm. No experimento de fluorescência, cuja sonda fluorescente é o aminoácido triptofano, o intervalo de comprimento de onda de interesse é tipicamente entre 280nm e 500nm, portanto a alta absorbância inicial não prejudicará a análise de fluorescência. A absorbância nos comprimentos de onda 280nm, 295nm e em 350nm foram ressaltados, Figura 29B, pois posteriormente serão relevantes para a análise da fluorescência. Neste instante basta observar que as absorbâncias são compatíveis e mantêm-se abaixo de 0,03 até a concentração 30mM, aproximadamente. Nas concentrações 40mM e 100mM já podemos observar um aumento significativo das absorbâncias, portanto concentrações dessa ordem serão evitadas nos próximos experimentos.

BSA + [C₁₄MIM][Cl]

A absorbância da proteína BSA em ausência e em presença de variadas concentrações de [C₁₄MIM][Cl] é apresentada na Figura 30.

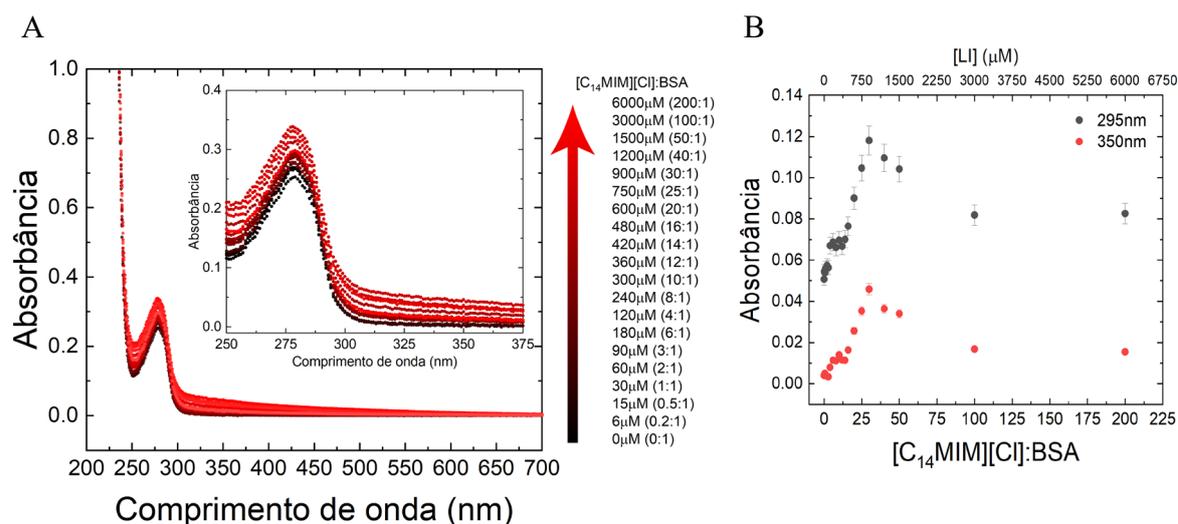


Figura 30: (A) Espectro de absorvância da BSA em ausência e em presença de $[C_{14}MIM][Cl]$. *Insert* com destaque na região do pico. (B) Absorvância nos comprimentos de onda 295nm e 350nm em função da razão molar $[C_{14}MIM][Cl]:BSA$ em eixo inferior e concentração de $[C_{14}MIM][Cl]$ no eixo superior.

O pico de absorvância da BSA se dá em torno de 280nm que corresponde a um dos picos de absorção do triptofano. Embora a absorção no comprimento de onda igual a 295nm seja bem menor que em 280nm ainda é suficiente para promover a excitação (no experimento de fluorescência) do aminoácido triptofano e prevenir a excitação dos aminoácidos fenilalanina e da tirosina. Este é um procedimento comumente utilizado em estudos espectroscópicos de proteínas em solução.

Conforme a concentração de LI varia é possível observar que há mudanças na absorvância, porém a forma da curva é aproximadamente a mesma. A Figura 30B traz a absorvância em 295nm e em 350nm, o primeiro comprimento de onda corresponde a excitação que será utilizada no experimento de fluorescência e o segundo será nossa referência para a turbidez. Observe que os comportamentos nos dois comprimentos de onda são semelhantes. O aumento da absorvância que ocorre em 295nm pode ser explicado pelo aumento da turbidez da amostra, mais pronunciado a partir da razão molar 20, e não necessariamente por uma interação direta das moléculas de líquido iônico com as moléculas de triptofano. O máximo da absorção ocorre aproximadamente na razão 35 e volta a diminuir. O aumento da turbidez pode estar associado a formação de estruturas ou agregados. A posterior diminuição da turbidez pode ser explicada pelo colapso dessas grandes estruturas ou decantação. Embora haja mudanças na absorvância os valores ainda são baixos e não comprometem a qualidade das medidas de espectroscopia. Adicionalmente todos os espectros de fluorescência foram corrigidos utilizando a absorvância, neutralizando o efeito da turbidez e filtro interno, conforme explicamos nas seções anteriores.

É possível afirmar que a presença do líquido iônico não altera significativamente o perfil de absorção da radiação da BSA, dado que o aumento da absorbância pode ser explicado pelo aumento da turbidez, e pelo fato de não haver alterações significativas na forma dos espectros.

Os espectros de absorbância da BSA em ausência e presença dos LIs $[C_{12}MIM][Cl]$ e $[C_{10}MIM][Cl]$ apresentaram o mesmo comportamento que o $[C_{14}MIM][Cl]$ e podem ser apreciados na Figura 31.

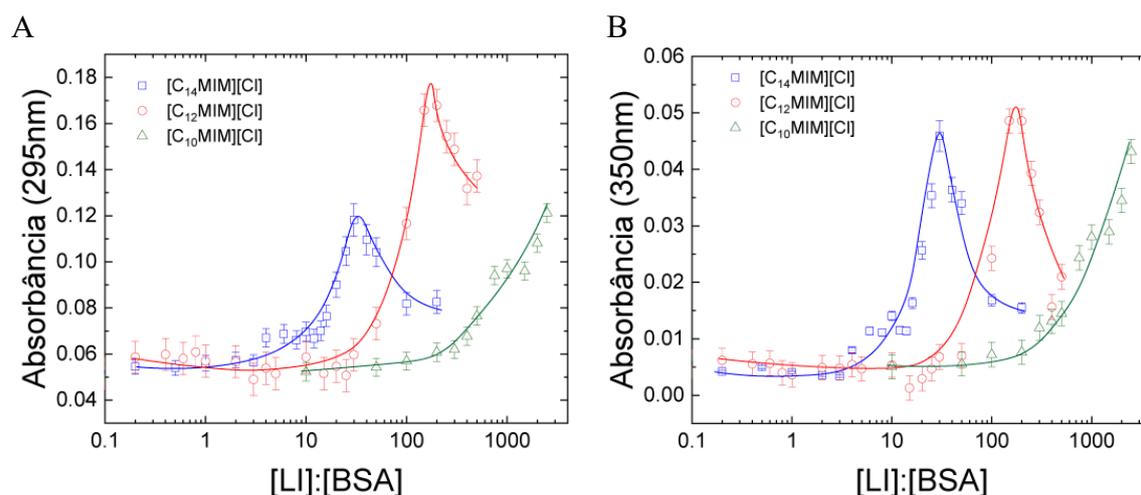


Figura 31: Absorbância 290nm (A) e em 350nm (B) em função da razão molar entre líquido iônico e a proteína BSA. As curvas foram desenhadas a fim de servir como guia para os olhos.

Observe que o sistema possui baixa absorbância em presença das menores concentrações de $[C_{14}MIM][Cl]$ e $[C_{12}MIM][Cl]$, atinge um pico e decai, tanto em 295nm quanto 350nm. A concentração necessária para atingir o pico é maior no sistema contendo $[C_{12}MIM][Cl]$. Já o pico do sistema contendo $[C_{10}MIM][Cl]$, embora crescente, não apresentou o pico e a subsequente diminuição. Podemos supor que a concentração necessária de $[C_{10}MIM][Cl]$ para observar tal comportamento não foi atingida.

Fluorescência

Os espectros de fluorescência foram obtidos através do equipamento fluorímetro da marca Varian, modelo Cary-Eclipse, disponível no laboratório de Biomembranas no Departamento de Física Geral do Instituto de Física da USP coordenado pela Prof^a Dr^a Maria Teresa Lamy. As amostras foram sempre preparadas e medidas no mesmo dia. Todos os espectros foram corrigidos utilizando a correção da lâmpada e do efeito de filtro interno.

Antes de apresentar a fluorescência das proteínas faremos um pequeno adendo a seguir referente ao aminoácido triptofano.

Triptofano + $[C_{14}MIM][Cl]$

O aminoácido triptofano é a sonda intrínseca presente nas proteínas estudadas neste trabalho. Desta forma, observar a influência dos líquidos iônicos neste aminoácido livre em solução pode nos trazer informações relevantes aos estudos seguintes. Em exceção aos outros espectros, o comprimento de onda escolhidos para excitação do triptofano livre foi igual 280nm a fim de maximizar a intensidade de emissão. A concentração do triptofano foi mantida constante e igual a 60 μ M.

A fluorescência relativa do triptofano em ausência e em presença de variadas concentrações de $[C_{14}MIM][Cl]$ é apresentada na Figura 32A, a absorbância em 350nm e 295nm do mesmo sistema é apresentada na Figura 32B. A fluorescência relativa foi calculada a partir da divisão da intensidade de fluorescência pela intensidade de fluorescência do pico de emissão em ausência de LI.

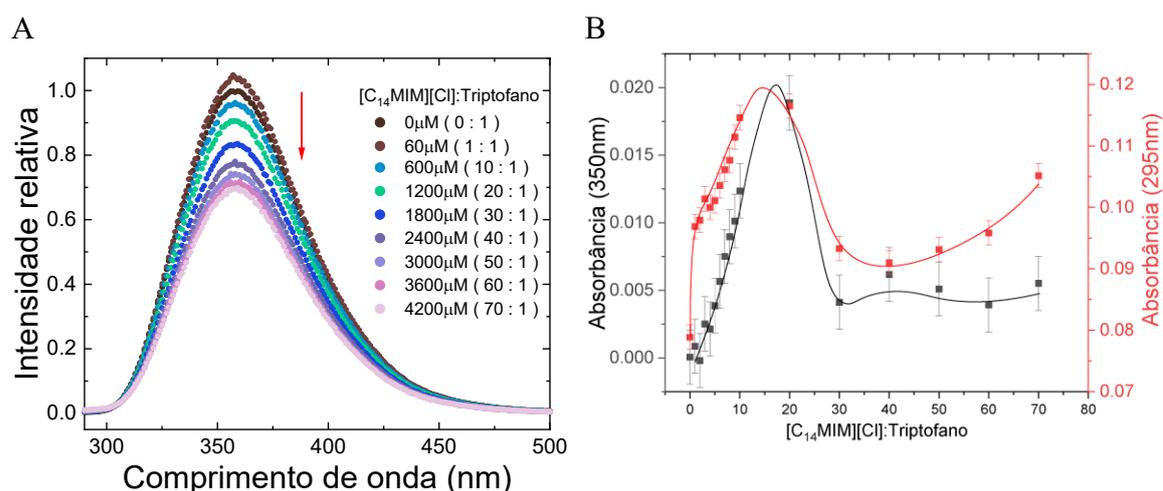


Figura 32: (A) Fluorescência do triptofano em ausência e presença de $[C_{14}MIM][Cl]$. Os espectros foram divididos pelo pico da intensidade de emissão do triptofano em ausência de LI. (B) Absorbância em 350nm (eixo esquerdo, dados na cor preta) e em 295nm (eixo direito, dados na cor vermelha) do triptofano em presença e ausência de $[C_{14}MIM][Cl]$, curvas traçadas para guiar os olhos.

Observe que a intensidade de fluorescência do triptofano diminui conforme a concentração de líquido iônico aumenta, ao passo que o perfil da curva e comprimento de onda do pico de emissão se mantêm. Tal efeito está condizente com a literatura, dado que o imidazol é um conhecido supressor (*quencher*) do triptofano [27].

BSA+LI

O espectro de emissão da proteína BSA em ausência e presença de variadas concentrações de $[C_{14}MIM][Cl]$ pode ser apreciado na Figura 33. A concentração da proteína foi mantida constante. A fim de diminuir a contribuição da emissão dos aminoácidos

fenilalanina e da tirosina, a amostra foi excitada a 295nm. Desta forma a fluorescência é constituída pela emissão dos 2 triptofanos presentes na BSA.

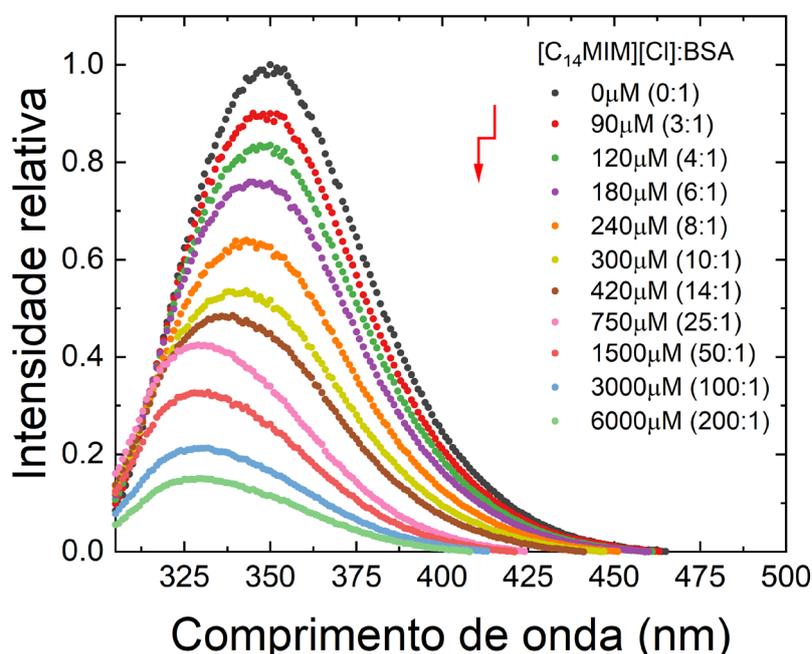


Figura 33: Espectro de emissão de fluorescência da proteína BSA (30μM) em ausência e presença de variadas concentrações de [C₁₄MIM][Cl]. A intensidade relativa dos espectros foi calculada dividindo a intensidade pela intensidade do pico de emissão da proteína em ausência de ligante. Os espectros foram corrigidos pelo efeito da lâmpada e pelo efeito de filtro interno. A seta vermelha indica o sentido geral do pico de emissão com o aumento da concentração de LI.

É possível observar que o aumento da concentração do LI provoca a diminuição da intensidade relativa de fluorescência e o deslocamento do pico de emissão para menores comprimentos de onda (*blue-shift*). Como as correções do espectro foram realizadas (efeito de filtro interno e espectro de emissão da lâmpada do equipamento), iremos supor que diminuição da fluorescência está associado ao processo de supressão (*quenching*), estabelecendo o [C₁₄MIM][Cl] como supressor (*quencher*) dos triptofanos existentes na proteína.

É importante ressaltar que embora a supressão da fluorescência esteja presente tanto no sistema Trp+[C₁₄MIM][Cl] quanto no sistema BSA+[C₁₄MIM][Cl], mesmo que em escalas diferentes, o deslocamento do pico de emissão está presente somente no sistema BSA+[C₁₄MIM][Cl]. O *blue-shift* está de alguma forma condicionado a estrutura da proteína como um todo, ou condicionado pela posição dos triptofanos na cadeia polipeptídica da BSA. Este ponto será discutido posteriormente.

Trazendo os outros LIs, os espectros de fluorescência da proteína BSA em ausência e em presença de $[C_{12}MIM][Cl]$ e $[C_{10}MIM][Cl]$ podem ser apreciados na Figura 34A e na Figura 34B, respectivamente.

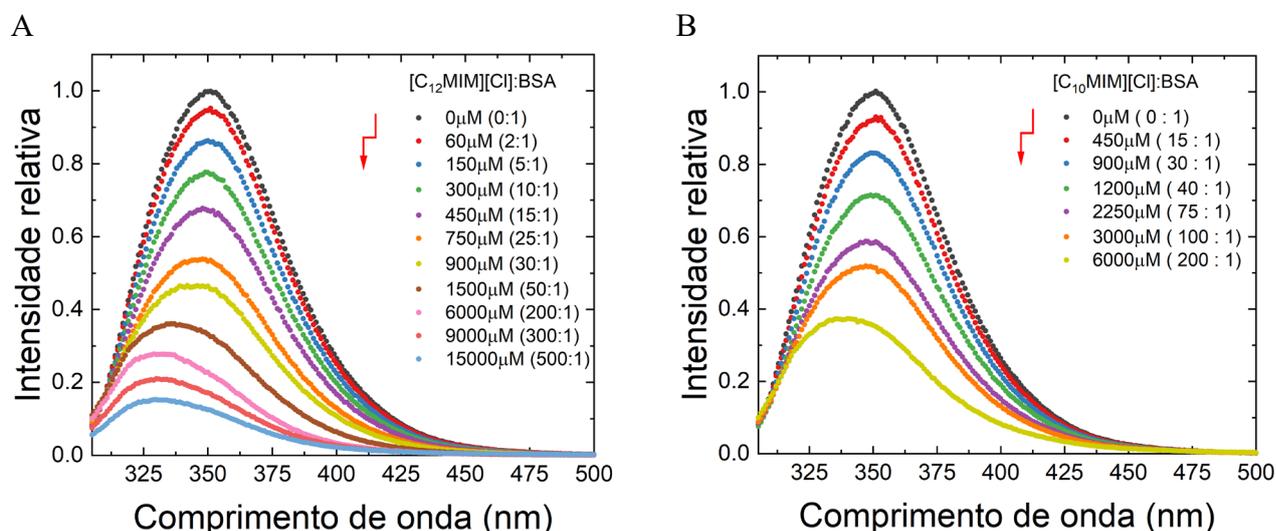


Figura 34: Intensidade relativa de fluorescência da proteína BSA (30 μM) em ausência e em presença de (A) $[C_{12}MIM][Cl]$ e (B) $[C_{10}MIM][Cl]$. Na legenda a concentração absoluta de LI e entre parênteses a razão molar entre LI:BSA. A seta vermelha indica o sentido geral do pico de emissão com o aumento da concentração de LI.

Observe que os comportamentos são análogos ao comportamento observado anteriormente no sistema $[C_{14}MIM][Cl]+BSA$. Tanto a presença de $[C_{12}MIM][Cl]$ quanto de $[C_{10}MIM][Cl]$ geram *quenching* e *blue-shift*. Portanto há interação entre esses LIs e pelo menos um dos triptofanos da BSA. A intensidade das modificações são diferentes e serão discutidas conjuntamente.

A supressão da fluorescência pode ser analisada de algumas formas. A forma mais simples é acompanharmos a razão entre intensidade de fluorescência em presença do supressor e ausência do supressor, F/F_0 , em função da razão molar. F/F_0 foi calculada a partir da integral sob a curva de cada um dos espectros e pode ser apreciada na Figura 35.

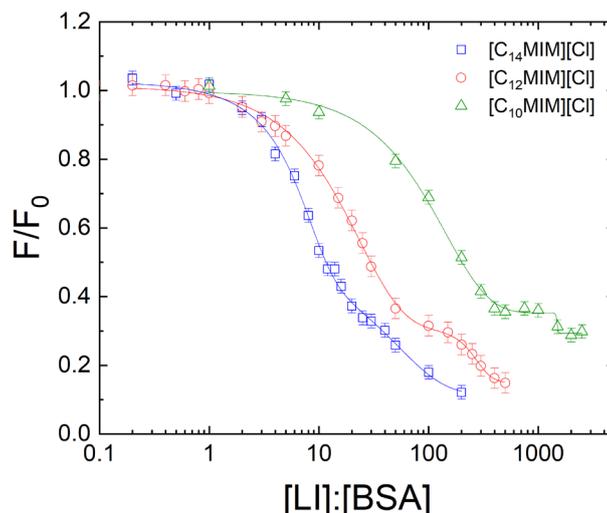


Figura 35: Razão entre intensidade de fluorescência em presença do supressor e ausência do supressor, F/F_0 , função da razão molar entre LI e BSA.

Observe que há significativa diminuição da fluorescência nos três sistemas, porém a concentração necessária para chegar a mesma supressão é diferente. Para gerar uma intensidade que representa 50% da intensidade da proteína livre são necessários aproximadamente $300\mu\text{M}$, $900\mu\text{M}$ e $6000\mu\text{M}$ de $[\text{C}_{14}\text{MIM}][\text{Cl}]$, $[\text{C}_{12}\text{MIM}][\text{Cl}]$ e $[\text{C}_{10}\text{MIM}][\text{Cl}]$, respectivamente, ou 10, 30 e 200 em razão molar. Dado que a única diferença entre os LI é o comprimento da cadeia carbônica e que a supressão requer proximidade, é possível afirmar que o comprimento da cadeia carbônica favorece a interação.

Uma análise mais quantitativa da supressão é possível com a constante de associação utilizando o modelo de *Stern-Volmer* como mencionado na Seção III.B.1.b) Ajuste de Stern-Volmer. A equação de Stern-Volmer é definida como, conforme a equação (6):

$$\frac{F_0 - F}{F_0 - F_c} = \frac{[P]_t - [L]_t + K_d - \sqrt{([P]_t + [L]_t + K_d)^2 - 4[P]_t[L]_t}}{2[P]_t}$$

Onde $[P]_t$ é a concentração da proteína e foi fixada igual $30 \cdot 10^{-6}\text{M}$, F_0 é a integral da fluorescência da proteína em ausência de LI, F é a integral da fluorescência e varia conforme a concentração de LI varia, $[L]_t$ é a concentração de ligante (no caso LI), F_c é integral da fluorescência remanescente, isto é, fluorescência quando a interação é máxima (foi considerado o ponto de menor intensidade de emissão) e K_d é a constante de dissociação. A constante de associação é definida como $K_a = 1/K_d$.

O gráfico de $\frac{F_0 - F}{F_0 - F_c}$ em função $[LI]$ com os respectivos ajustes pode ser apreciado na

Figura 36.

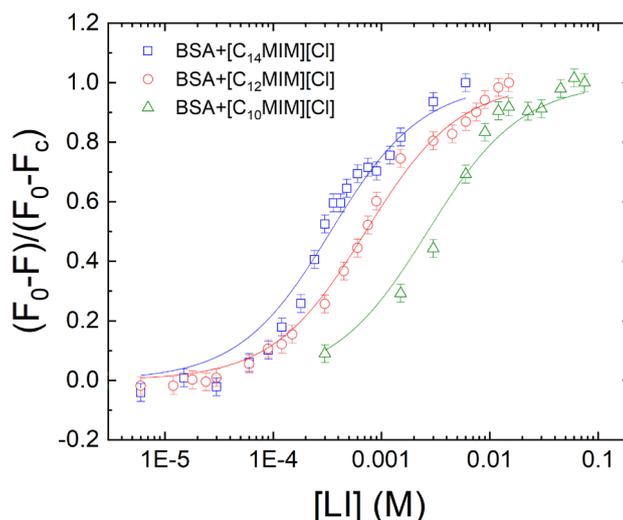


Figura 36: Ajuste de Stern-Volmer da supressão da fluorescência da BSA causada pela presença dos LIs $[C_{14}MIM][Cl]$, $[C_{12}MIM][Cl]$ e $[C_{10}MIM][Cl]$.

Observe que as curvas se ajustam bem aos dados. Os valores obtidos pelos ajustes estão na Tabela 4.

Tabela 4: Ajustes de K_d e K_a para os sistemas BSA em presença de $[C_{14}MIM][Cl]$, $[C_{12}MIM][Cl]$ e $[C_{10}MIM][Cl]$ obtidos a partir do ajuste de Stern-Volmer.

LI	$K_d (M)$	$K_a (M^{-1})$
$[C_{14}MIM][Cl]$	$(3.3 \pm 0.3) \cdot 10^{-4}$	$(30 \pm 2) \cdot 10^2$
$[C_{12}MIM][Cl]$	$(7.0 \pm 0.3) \cdot 10^{-4}$	$(14.3 \pm 0.7) \cdot 10^2$
$[C_{10}MIM][Cl]$	$(27 \pm 3) \cdot 10^{-4}$	$(3.8 \pm 0.4) \cdot 10^2$

Observe que K_a é maior conforme o tamanho da cadeia carbônica aumenta $[C_{14}MIM][Cl] > [C_{12}MIM][Cl] > [C_{10}MIM][Cl]$ reforçando a importância do componente hidrofóbico para a interação LI/Trp. Darya e colaboradores [51], investigando a interação da BSA com surfactantes, composto por um anel imidazol e um fragmento de uretano, com diferentes tamanhos de cadeia carbônica, encontraram o valor de K_a igual a $26 \cdot 10^2 M^{-1}$ para o surfactante com cadeia carbônica de 14 carbonos, valor compatível dentro de dois intervalos de incerteza com o encontrado por nós. É importante frisar que uma medição precisa da constante de associação é feita através de técnicas mais apropriadas, como a calorimetria de titulação isotérmica (ITC, sigla do inglês, *Isothermal Titration Calorimetry*) e pode variar com a temperatura, meio racional e concentração da proteína.

No que se refere ao *blue-shift*, o comprimento de onda do pico de emissão em função da razão molar dos três LIs pode ser apreciado na Figura 37.

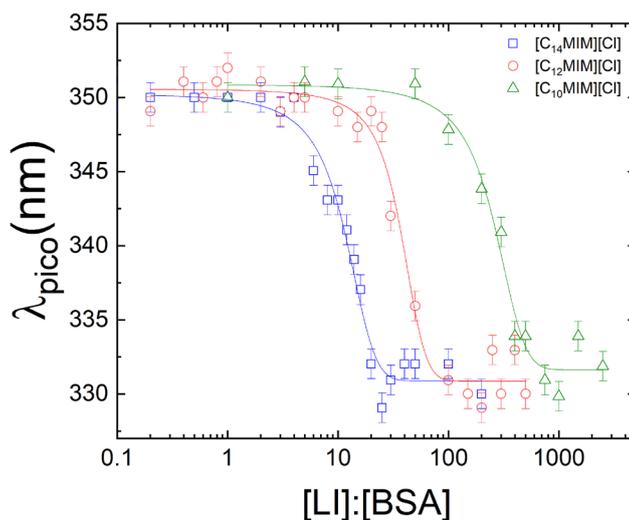


Figura 37: Comprimento de onda do pico da emissão de fluorescência em função da razão molar [LI]:[BSA].

A partir da Figura 37 é possível verificar que, em baixas concentrações de LI, λ_{pico} está em torno de 350nm, um pouco menor do que λ_{pico} do Trp livre, o que é razoável dado que toda a vizinhança do Trp livre é polar (água), já na proteína o Trp está ligado e envolto de outros aminoácidos, porém ainda com bastante exposição ao solvente. Com a adição de uma certa quantidade de LI o λ_{pico} diminui consistentemente até aproximadamente 332nm e tende a uma estabilização. As concentrações necessárias para iniciar o *blue-shift* e para atingir a estabilização variam dependendo de qual LI é adicionado. Observe que a concentração mínima necessária para iniciar o *blue-shift* é maior quanto menor é o comprimento da cadeia carbônica. A concentração necessária para deslocar o pico até 340nm é 300 μ M, 900 μ M, 6000 μ M de [C₁₄MIM][Cl], [C₁₂MIM][Cl] e [C₁₀MIM][Cl], nas razões molares 10, 30 e 200. Observe que os deslocamentos máximos providos pelos três LIs são semelhantes, $\Delta\lambda=20$ nm.

A diminuição do comprimento de onda pode estar relacionada a um ambiente mais apolar nas redondezas da sonda fluorescente, segundo o modelo de *Lippert*, porém tal interpretação se demonstrou insuficiente para um bom entendimento da interação. Optamos por realizar a discussão do deslocamento do pico de emissão a partir da perspectiva de James T. Vivian e Patrick R. Callis [36], que estabelece as interações eletrostáticas com o anel indol do triptofano como essenciais, como descrito na seção III.B.1.a) Supressão da fluorescência. Fizemos tal escolha pois proporciona uma visão mais completa da interação quando em conjunto com dados de dinâmica molecular. As simulações de dinâmica molecular do sistema BSA+[C₁₄MIM][Cl] foram realizadas pelo Dr. Leandro Resende, que nos auxiliou nesta etapa do trabalho, e serão apresentadas posteriormente.

James T. Vivian e Patrick R. Callis trazem a constatação que cargas nas proximidades do triptofano podem gerar tanto um *blue-shift* quanto um *red-shift* a depender da carga e de qual dos anéis no triptofano está mais próximo (anel benzênico ou anel pirrol). A dinâmica molecular constatou que o LI interage diretamente com o triptofano, mais especificamente, o componente com carga positiva de uma molécula de LI manteve uma pequena distância do anel pirrol do triptofano mais externo. Tal cenário está condizente com a possibilidade de *blue-shift* descrito por James T. Vivian e Patrick R. Callis. Os resultados de dinâmica molecular e uma discussão mais aprofundada serão realizadas posteriormente.

Portanto, podemos supor que todos os LIs geram *blue-shift* pois todos possuem a mesma cabeça polar e devem interagir com o triptofano de forma semelhante (componente polar positivo próximo ao anel pirrol), porém o aumento da cadeia carbônica favorece tal interação, necessitando menor quantidade de LI em solução para que os efeitos dessa interação sejam visualizados de forma global nos efeitos de *blue-shift* e *quenching*.

Agora que temos uma visão geral dos efeitos dos líquidos iônicos na fluorescência da BSA, podemos destacar alguns detalhes.

É interessante verificar possíveis modificações no formato da curva, além da posição do pico e da intensidade total. O formato da curva pode evidenciar modificações no mecanismo de emissão da sonda fluorescente em presença de líquido iônico. A fim de facilitar tal comparação utilizou-se a fluorescência normalizada no intervalo entre 0 e 1, calculada a partir do software *OriginLab*®, e pode ser apreciada na Figura 38.

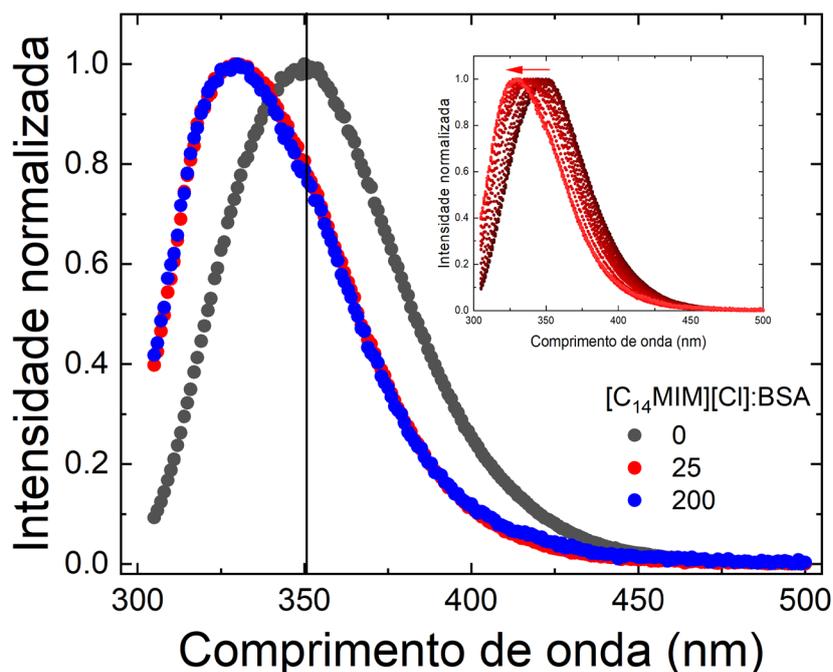


Figura 38: Intensidade de fluorescência normalizada no intervalo entre 0 e 1 para a proteína BSA em ausência e em presença de $[C_{14}MIM][Cl]$ nas razões molares $[C_{14}MIM][Cl]:[BSA]$ conforme legenda; em destaque o pico de emissão em ausência de $[C_{14}MIM][Cl]$. No *insert* são apresentadas todas as curvas experimentais normalizadas, a concentração de $[C_{14}MIM][Cl]$ aumenta conforme a direção da seta.

Através da fluorescência normalizada, exposta na Figura 38, é possível verificar que, de modo geral, a forma dos espectros se mantém. Há deslocamento para menores comprimentos de onda e a formação de um pequeno ombro na região de 350nm com a adição de $[C_{14}MIM][Cl]$. Observe que os espectros normalizados das razões molares 25 e 200 se sobrepõem, indicando a manutenção do formato da curva e do deslocamento do pico. A diferença fundamental entre os espectros de emissões dessas duas concentrações se deve a supressão, como pode ser visto na Figura 33.

Não é esperado que 100% das moléculas de proteína estejam ligadas, isto é, é provável que haja coexistência entre proteínas em seu estado nativo e proteínas que constituem o complexo BSA+LI. Portanto, o ombro na região de 350nm pode ser explicado pela existência de proteínas que pouco interagiram com o LI em solução e ainda mantém a sua emissão nativa (curva preta com pico em 350nm), já que a intensidade captada pelo detector é um somatório de todas as ocorrências.

Serão expostos a seguir dois sistemas auxiliares, pois irão prover informações interessantes para o aprofundamento da análise da interação entre BSA e os LIs.

BSA sem ácido graxo + [C₁₄MIM][Cl]

A BSA é uma proteína de transporte, principalmente de ácidos graxos, pelo organismo. Tanto a proteína em seu estado mais natural, podendo estar ligada a ácidos graxos (*fatted*, do inglês) quanto a proteína após um processo para retirada de ácido graxo (*fatty free*, do inglês) são comercializadas. Utilizamos majoritariamente a proteína sem o tratamento para a retirada de ácido graxo neste trabalho, devido a seu preço mais acessível e por representar o estado mais comum da proteína nos organismos. A fim de verificar a interferência do ácido graxo no espectro de fluorescência realizamos um ensaio com a BSA *fatty free*. O espectro de fluorescência da BSA *fatty free* em ausência e presença de variadas concentrações de [C₁₄MIM][Cl] pode ser apreciado na Figura 39A.

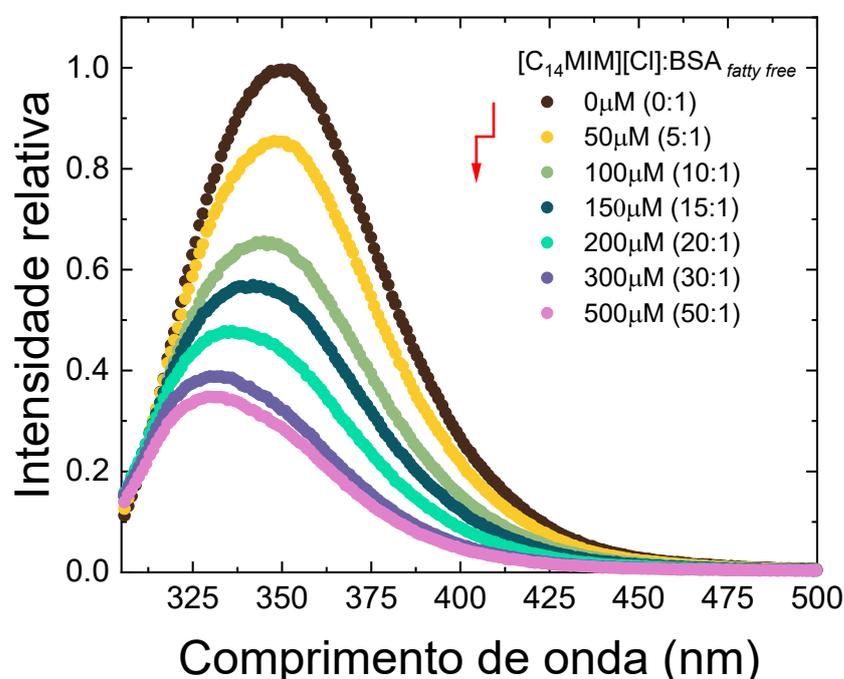


Figura 39: Espectro de intensidade de fluorescência relativa de 10 μM da proteína BSA_{fatty free} (sem ácido graxo) em ausência e em presença de variadas concentrações de [C₁₄MIM][Cl]. Na legenda a concentração absoluta de LI e entre parênteses a razão molar. A seta vermelha indica o sentido geral do pico de emissão com o aumento da concentração de LI.

Observe que o comportamento é análogo ao observado no sistema com a proteína BSA apresentada anteriormente. Há supressão e deslocamento do pico para o azul, como pode ser visto em mais detalhes na Figura 40A.

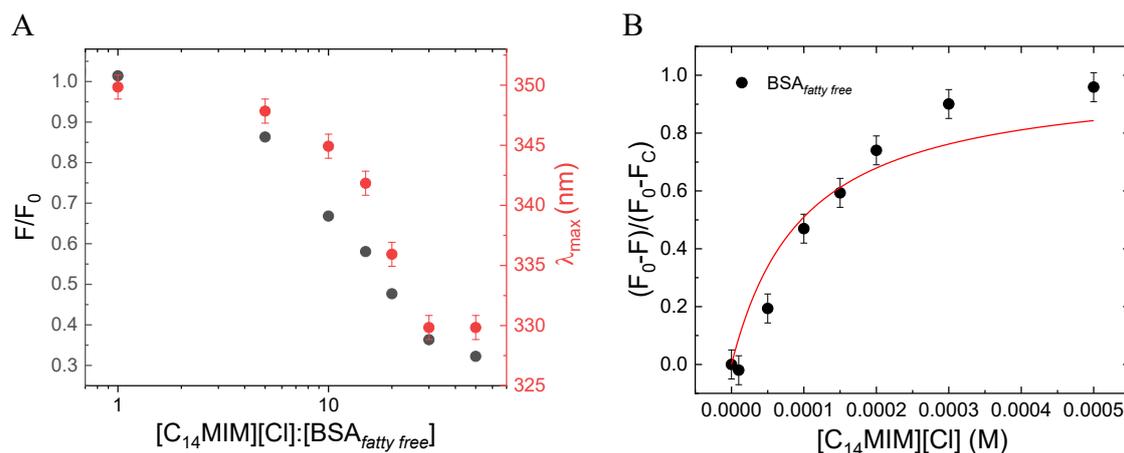


Figura 40: (A) Razão entre intensidade de fluorescência em presença de LI e em ausência de LI (eixo esquerdo, dados na cor preta) e comprimento de onda do máxima de emissão (eixo direito, dados na cor vermelha) em função da razão molar entre a concentração de $[C_{14}MIM][Cl]$ e de $BSA_{fatty\ free}$. (B) Ajuste de *Stern-Volmer*.

O deslocamento máximo do pico encontrado é igual a 20 ± 1 nm, valor compatível com o encontrado com a BSA sem tratamento para retirada de ácido graxo. Já a supressão, através do ajuste de *Stern-Volmer*, Figura 40B, apresentou diferenças, o valor obtido de constante de associação com o sistema sem ácido graxo é $K_a = (110 \pm 21) \cdot 10^2 M^{-1}$ é maior que o obtido anteriormente, com ácido graxo, igual a $K_a = (30 \pm 2) \cdot 10^2 M^{-1}$. Desta forma podemos afirmar que a proteína BSA sem ácido graxo possui uma interação mais forte com o LI, o que é esperado dado que a presença de ácido graxo pode inviabilizar alguns sítios de ligação.

BSA+TTAB

A fim de proporcionar maior embasamento para o estudo da interação da proteína com os LI, também realizamos experimentos da proteína com surfactante, dado que algumas características são semelhantes, como descrito nas Seções I.C e I.D. O surfactante TTAB foi o selecionado para implementar o trabalho e analisar o efeito da cabeça polar, pois apresenta a mesma extensão da cadeia carbônica que $[C_{14}MIM][Cl]$ e carga positiva na cabeça polar, porém não possui o anel imidazólico. Desta forma, sempre que disponíveis, os dados das proteínas em presença de TTAB serão apresentados.

Os espectros de fluorescência da proteína BSA em ausência e presença do surfactante TTAB podem ser apreciados na Figura 41.

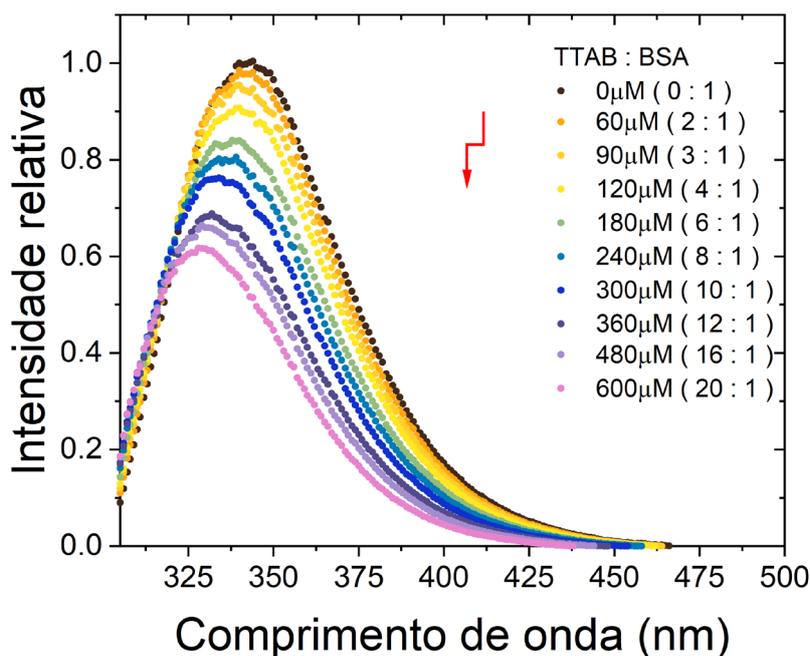


Figura 41: Espectro de intensidade de fluorescência relativa da proteína BSA (30 μM) em ausência e em presença de variadas concentrações de TTAB. Na legenda a concentração absoluta de TTAB e entre parênteses a razão molar. A seta vermelha indica o sentido geral do pico de emissão com o aumento da concentração de TTAB.

O efeito geral é o mesmo observado da BSA em presença dos LIs. Com o aumento da concentração de TTAB há diminuição da intensidade fluorescência e *blue-shift*. A comparação entre os efeitos causados pelo TTAB e os causados pelo [C₁₄MIM][Cl] é feita na Figura 42. A Figura 42A traz os valores da fluorescência total em presença de ligante dividido pela fluorescência total da BSA em ausência de ligante, em função da concentração de ligante. Figura 42B traz o comprimento de onda de máxima emissão de fluorescência em função da concentração de ligante. Foram considerados ligantes o surfactante TTAB e somente o LI [C₁₄MIM][Cl] pois possuem o mesmo componente apolar e poderemos distinguir melhor o efeito da cabeça polar.

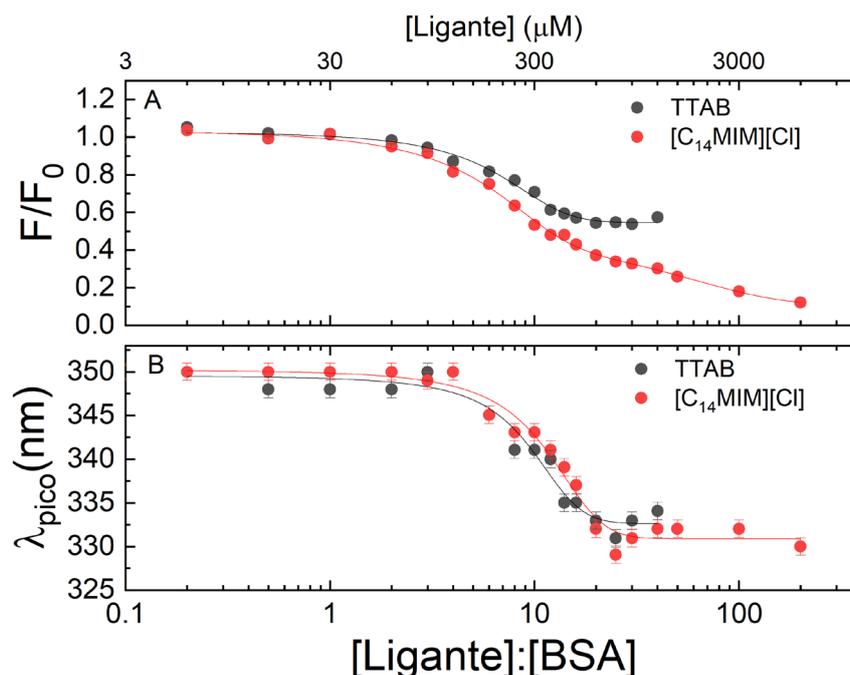


Figura 42: (A) Razão entre intensidade de fluorescência em presença de supressor e ausência do supressor, F/F_0 , em função da razão molar entre supressor, ou ligante, e BSA. (B) Comprimento de onda do pico de emissão em função da concentração molar.

A diminuição da fluorescência apresenta diferença na intensidade, isto é, o menor valor obtido F/F_0 do sistema contendo TTAB é $0,6$ a partir da razão 15 , enquanto no sistema com $[C_{14}MIM][Cl]$ a razão permanece em queda até $0,1$ na razão 200 , como pode ser constatado na Figura 42A.

Observe que os comportamentos do comprimento de onda do pico de emissão dos dois sistemas, Figura 42B, são muito semelhantes. Ambas as curvas permanecem constantes em torno de 350nm até a razão molar aproximadamente igual a 4 , com o aumento da concentração de ligante o pico se desloca para valores menores e volta a se estabilizar em torno de $331\pm 1\text{nm}$ para $[C_{14}MIM][Cl]$ e $333\pm 1\text{nm}$ para TTAB, valores compatíveis entre si. Há 3 regiões bem delimitadas, a primeira contentando o primeiro *plateau*, a segunda contendo o *blue-shift* através de uma variação abrupta e a terceira com um segundo *plateau*. As concentrações características de cada região também são as mesmas.

Portanto as diferenças da cabeça polar parecem ser mais relevantes para a supressão que do para o deslocamento do pico, embora de modo geral demonstrem o mesmo comportamento.

2. Efeito do LI na estrutura secundária da BSA

Para melhor entender os efeitos dos LIs na estrutura da BSA, realizamos medidas de dicroísmo circular (CD). Os espectros de CD proporcionam informações sobre a estrutura secundária da proteína. O experimento foi realizado no CNPEM (Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais), nas instalações do LNBR (Laboratório Nacional de Biorrenováveis) em colaboração com a Dr^a. Letícia Zanphorlin.

BSA+LI

Os espectros de CD da proteína BSA em ausência e em presença de variadas concentrações de $[C_{14}MIM][Cl]$, $[C_{12}MIM][Cl]$ e $[C_{10}MIM][Cl]$ podem ser apreciados na Figura 43, Figura 44 e Figura 45, respectivamente. Os *inserts* em cada figura trazem a porcentagem de α -hélice calculada a partir da equação descrita na Seção III.C.1.b) Cálculo da composição da estrutura secundária.

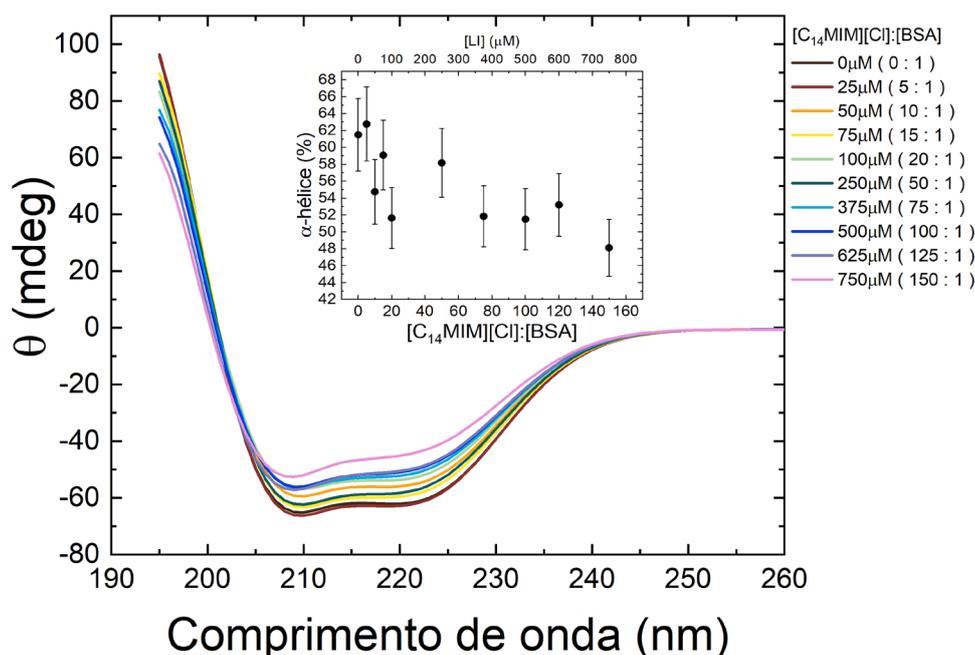


Figura 43: Espectro de dicroísmo circular, em unidades de graus de ellipticidade, da BSA em ausência e em presença de variadas concentrações de $[C_{14}MIM][Cl]$. No *insert* porcentagem calculada da estrutura α -hélice em função da razão molar.

O espectro de CD da proteína BSA em ausência de LI apresenta vales bem definidos em 208nm e em 222nm como é característico de proteínas ricas em estrutura α -hélice. A adição de $[C_{14}MIM][Cl]$ provoca uma diminuição destes vales, portanto podemos supor que há modificação na estrutura secundária da proteína, uma perda parcial. A partir do *insert* da Figura 43 é possível obter o valor de $(62\pm 4)\%$ de α -hélice para a BSA em ausência de LI, tal valor está condizente com a literatura [15]. Ao adicionarmos $[C_{14}MIM][Cl]$ é possível

observar uma tendência de diminuição de α -hélice atingindo $(48\pm 4)\%$ na concentração $750\mu\text{M}$ de $[\text{C}_{14}\text{MIM}][\text{Cl}]$, razão 150, correspondendo a uma variação de negativa de 14 pontos percentuais. Porém, os valores são compatíveis dentro de um intervalo de 2 incertezas. Portanto o LI interage com a proteína e, embora possa alterar a sua estrutura secundária, esta é, em sua maior parte, mantida.

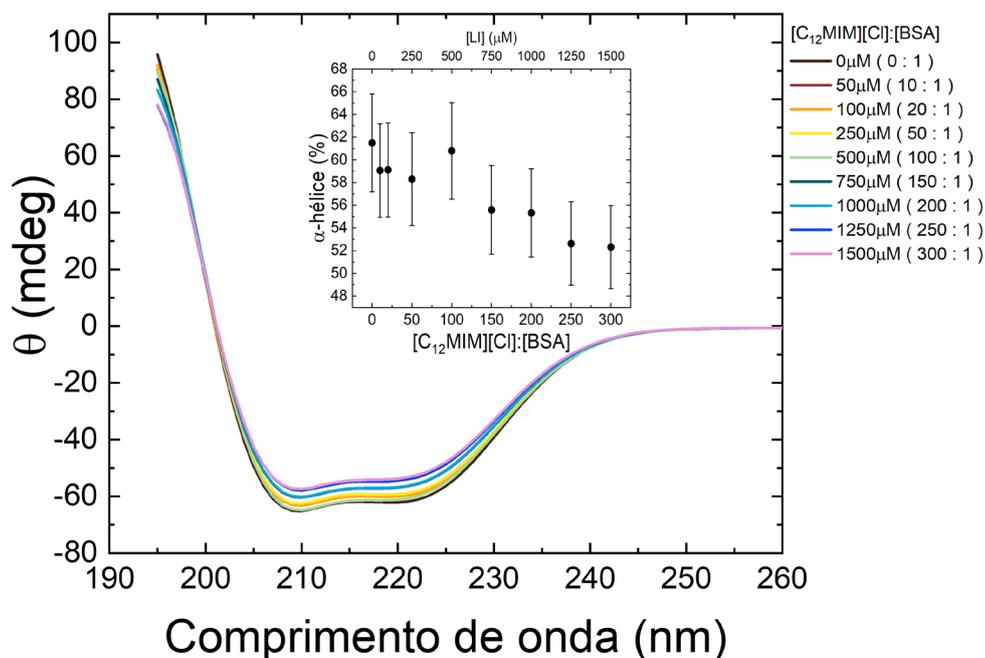


Figura 44: Espectro de dicroísmo circular, em unidades de grau de elipticidade, da BSA em ausência em presença de variadas concentrações de $[\text{C}_{12}\text{MIM}][\text{Cl}]$. No *insert* porcentagem calculada da estrutura α -hélice em função da razão molar.

Ao observarmos o espectro de CD da BSA com $[\text{C}_{12}\text{MIM}][\text{Cl}]$, Figura 44, já é possível verificar que a diminuição dos vales característicos é menos pronunciada, mesmo com concentrações maiores de LI. A porcentagem de α -hélice também apresenta uma tendência de queda partindo de $(62\pm 4)\%$ e atingindo $(52\pm 4)\%$ na concentração $1500\mu\text{M}$ de $[\text{C}_{12}\text{MIM}][\text{Cl}]$, razão 300, uma variação de $-9,5$ pontos percentuais. Porém, assim como no caso anterior, os valores são compatíveis. Portanto podemos afirmar que $[\text{C}_{12}\text{MIM}][\text{Cl}]$ pode modificar a estrutura secundária da proteína, porém em menor intensidade que o $[\text{C}_{14}\text{MIM}][\text{Cl}]$.

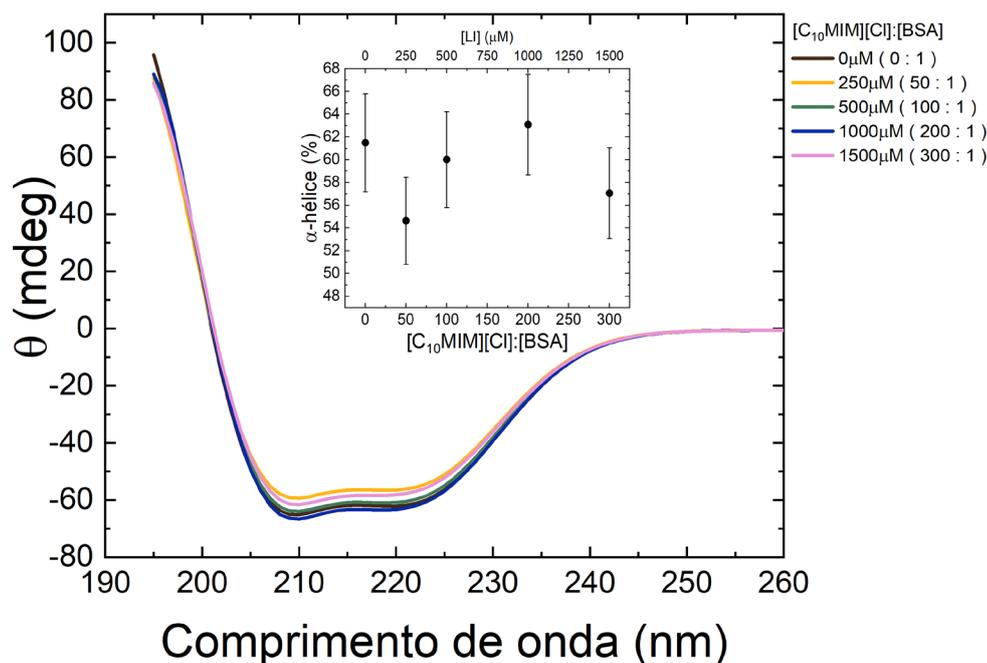


Figura 45: Espectro de dicroísmo circular, em unidades de graus de elipticidade, da BSA em ausência em presença de variadas concentrações de $[C_{10}MIM][Cl]$. No *insert* porcentagem calculada da estrutura α -hélice em função da razão molar.

O espectro de CD da BSA em presença $[C_{10}MIM][Cl]$ nos mostra que as variações nos vales característicos são ainda mais sutis que nos casos anteriores. Ao observarmos a porcentagem de α -hélice verificamos que de fato não há uma tendência clara de comportamento. A máxima diminuição ocorre na razão 50, $250\mu M$ de $[C_{10}MIM][Cl]$, atingindo $(54\pm 4)\%$ de α -hélice, uma variação igual a $-7,3$ pontos percentuais. Neste caso não é possível afirmar a que a interação se dá a nível de modificar parte da estrutura secundária.

É importante mencionar que compostos que possuem cloro em sua composição demonstram alta absorção nos comprimentos de onda utilizados para o experimento de CD. Portanto, os líquidos iônicos utilizados neste trabalho podem comprometer a qualidade dos dados. Mesmo assim acreditamos que é válida a discussão e os indícios proporcionados por esta seção.

3. Influência dos Lis na estrutura terciária da BSA

A fim de explorar as modificações na estrutura terciária da proteína realizamos medidas de espalhamento de raio-x a baixo ângulo (SAXS). O experimento foi realizado nas linhas de SAXS do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS). As amostras foram preparadas e mantidas refrigeradas até a medição, em no máximo 2 dias. A concentração da BSA foi mantida igual a $60\mu M$.

BSA+LI

As curvas de espalhamento de raios-x a baixo ângulo da proteína BSA, em ausência e em presença de $[C_{14}MIM][Cl]$ podem ser apreciadas na Figura 46.

As curvas na Figura 46 foram deslocadas em Y para facilitar a visualização. Observe que conforme a concentração de $[C_{14}MIM][Cl]$ aumenta há uma modificação no início da curva, região de Guinier, que estará refletido nas alterações de raio de giro. Na região em torno de $q=2,25\text{nm}^{-1}$, há a formação de um pico, a partir de $2400\mu\text{M}$ (razão 20), que se torna bem evidente nas concentrações maiores de LI. Observe que na curva do $[C_{14}MIM][Cl]$ em solução, sem a presença da proteína, há um pico semelhante na região de $q=1,3\text{nm}^{-1}$. Portanto iremos supor, à priori, que o pico mencionado corresponde a formação de estruturas tipo *core-shell*, como micelas, em solução.

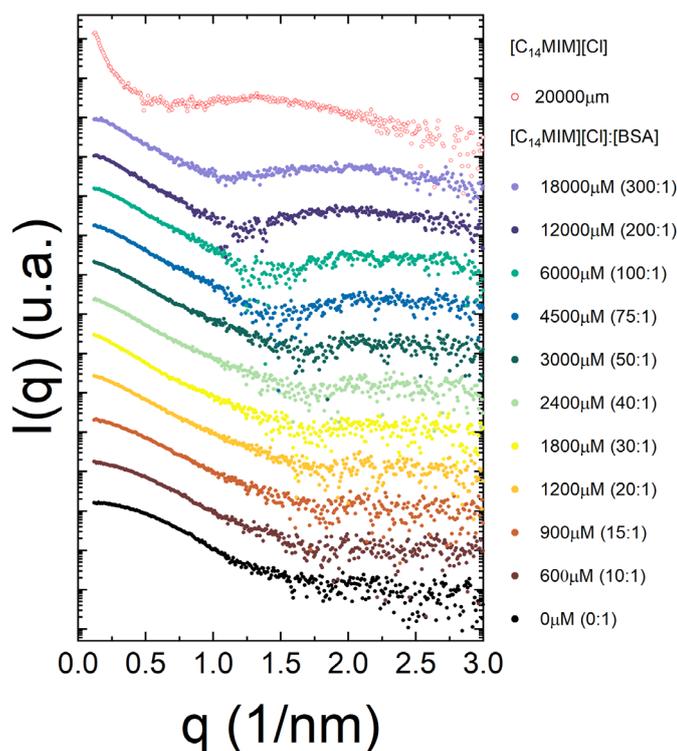


Figura 46: Intensidade de espalhamento de SAXS do sistema contendo BSA com variadas concentrações de $[C_{14}MIM][Cl]$ e $[C_{14}MIM][Cl]$ em ausência de BSA. As curvas foram deslocadas no eixo vertical para uma melhor visualização.

Buscou-se investigar a possibilidade das curvas de SAXS com maiores concentrações de LI serem compostas por uma combinação entre a curva da BSA em ausência de LI e a curva de micelas de LI, porém tal exploração demonstrou-se improcedente, não foi possível encontrar uma simples associação. As modificações que ocorrem na curva de espalhamento do sistema não podem ser explicadas pela simples adição de micelas em solução. Em outras palavras, do ponto de vista estrutural, é possível afirmar

que existe uma interação entre as moléculas de LI e de BSA, de modo que altere a distribuição espacial dos átomos da proteína, alterando assim, sua curva de espalhamento.

As curvas de SAXS da BSA em ausência de $[C_{12}MIM][Cl]$ e $[C_{10}MIM][Cl]$ podem ser apreciadas na Figura 47A e na Figura 47B respectivamente. É importante mencionar que a diferença entre a dispersão dos dados na Figura 47A e na Figura 47B se dá pela diferença na qualidade do feixe de raios-X utilizada nos experimentos, como a intensidade da radiação. As coletas de dados foram realizadas em momentos diferentes e neste período algumas características do equipamento foram modificadas.

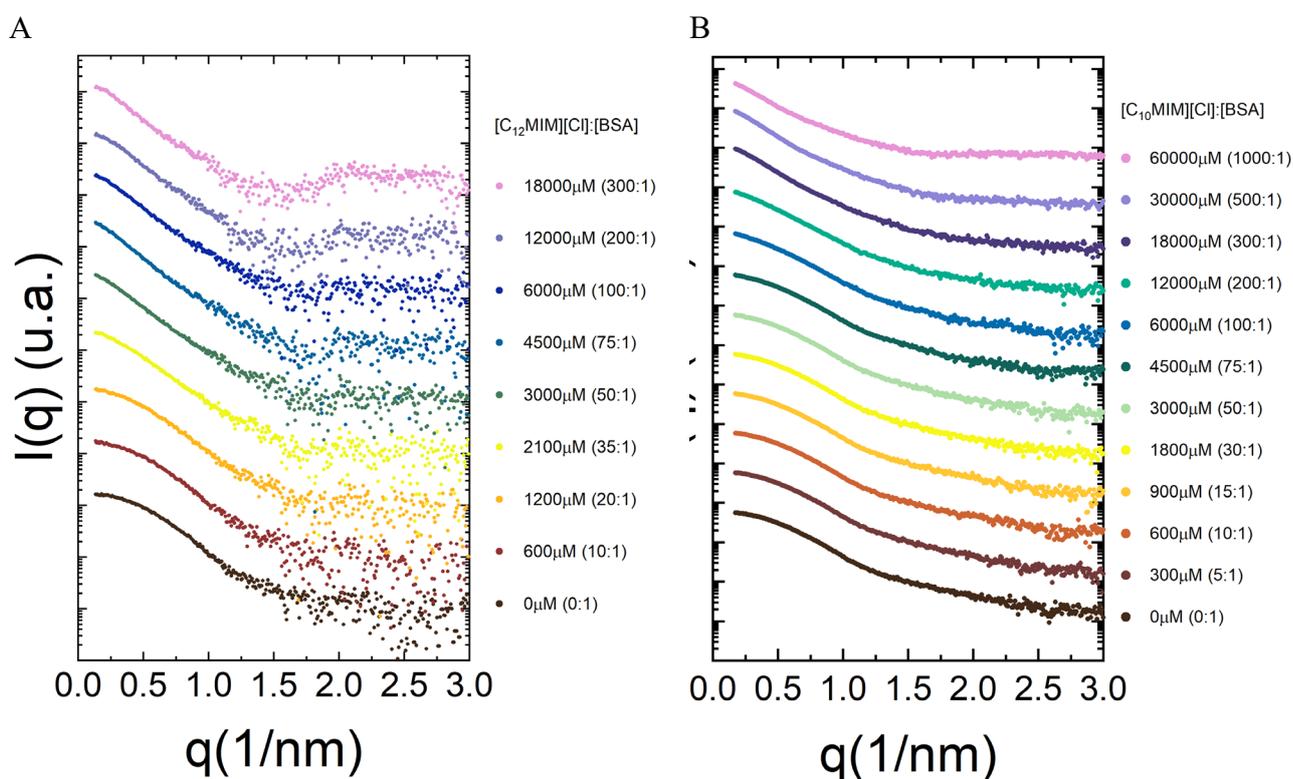


Figura 47: Intensidade de espalhamento de SAXS do sistema contendo BSA em ausência e presença de variadas concentrações de (A) $[C_{12}MIM][Cl]$ e (B) $[C_{10}MIM][Cl]$.

Observe que, na Figura 47A, temos características semelhantes do $[C_{12}MIM][Cl]$ com o LI de cadeia maior, porém menos evidentes. Há alterações na região de Guinier e há, em torno de $q=2,5nm^{-1}$, indícios da formação de um pico na concentração 12000 μM de $[C_{12}MIM][Cl]$ ou razão igual a 200. O pico é menos intenso que no caso anterior e surge somente com maiores concentrações. Como estamos considerando que a formação deste pico corresponde ao aparecimento de estruturas *core-shell* em solução tal fenômeno é como o esperado, já que quanto menor o tamanho da cadeia carbônica maior é a concentração necessária para a formação de micelas, pois o efeito hidrofóbico é menor.

Já com o LI $[C_{10}MIM][Cl]$ as mudanças são ainda mais sutis, as mudanças na região de Guinier ainda são evidentes, porém a formação de um pico em q maior não é mais tão clara. Portanto não temos evidência de formação de micelas de $[C_{10}MIM][Cl]$ em presença de BSA até a concentração estudada.

Os valores dos raios de giração (R_g) em ausência e presença dos 3 LIs foram obtidos utilizando o software SAXSMoW 3.0 [45] disponível no endereço <http://saxs.ifsc.usp.br/> e podem ser apreciados na Figura 48. Os valores são calculados através do ajuste de *Guinier*, dentro do limite $q.R_g < 1,5$.

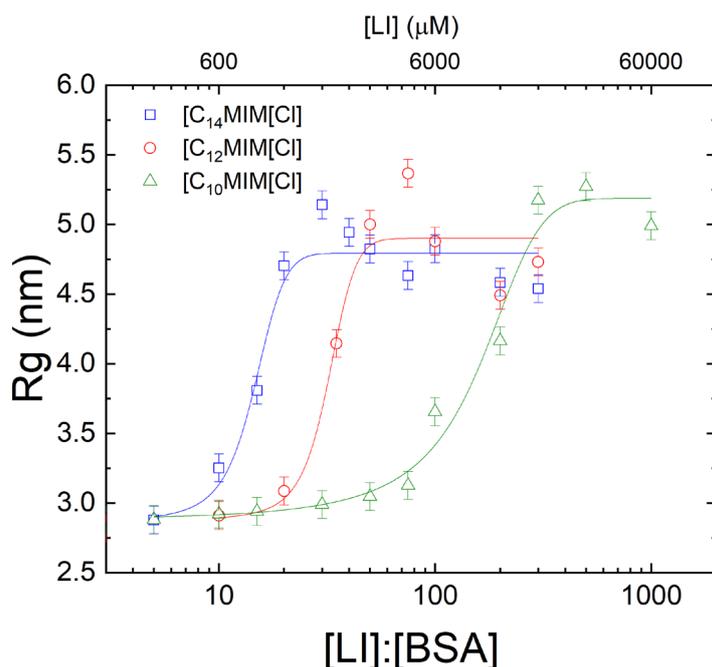


Figura 48: Raio de giro dos sistemas contendo BSA em presença de variadas concentrações de de LI (conforme a legenda) em função da razão.

O R_g da proteína em ausência de LI é igual a $2,8 \pm 0,1 nm$, valor compatível com a proteína nativa pela literatura [52]. Observe que ao aumentar a concentração de $[C_{14}MIM][Cl]$ o R_g aumenta consistentemente até $5,2 nm$ na razão 30, ou $1800 \mu M$ de LI, em seguida diminui singelamente e se estabiliza em torno de $4,6 nm$. O aumento significativo do raio de giro, nos indica possíveis mudanças na estrutura terciária da proteína. O mesmo comportamento é observado nos sistemas com $[C_{12}MIM][Cl]$ e $[C_{10}MIM][Cl]$

Podemos afirmar que os 3 LIs promovem o aumento do raio de giro do sistema, partindo de $2,8 nm$ e atingindo $5,0 nm$ aproximadamente. Nos três casos há um aumento abrupto e estabilização do raio de giro. O aumento de R_g é iniciado em concentrações maiores quanto menor é a cadeia carbônica. Em outras palavras, são necessárias mais

moléculas dos LIs de cadeia menor para causar o mesmo aumento de raio de giro. Para atingir o raio de giro igual a 4,25nm são necessários 900 μ M, 1800 μ M e 12000 μ M de [C₁₄MIM][Cl], [C₁₂MIM][Cl] e [C₁₀MIM][Cl], respectivamente, ou razões molares iguais a 15, 30 e 200. O aumento do raio de giro pode estar relacionado com o desenovelamento da proteína, o que poderá ser verificado com o gráfico de *Kratky* normalizado.

O gráfico de *Kratky* normalizado da BSA com [C₁₄MIM][Cl] pode ser apreciado na Figura 49. O gráfico de *Kratky* normalizado nos permite discutir a flexibilidade do complexo proteína/surfactante [53] [54]. Jill Trehwella e colaboradores [55] afirmam que uma proteína enovelada, com uma estrutura globular possui um pico com intensidade igual a 1,1 em $qR_g=1,75$, aproximadamente. Proteínas com maior grau de flexibilidade possuem mais intensidade do pico e em maiores qR_g .

A Figura 49A traz as curvas de *Kratky* para BSA em ausência e em presença de LI até a razão 40. Observe que em ausência de LI a BSA possui um pico igual a 1,1 em y na posição 1,75 em x, exatamente como discutido por Jill Trehwella. Portanto podemos afirmar que a proteína se encontra em seu estado nativo enovelado, com pouca flexibilidade. Conforme a concentração de LI é aumentada há um aumento do pico, de 1,1 até 1,3, e um deslocamento para maiores qR_g , de 1,5 até 2,2. Conforme mencionado, esse comportamento indica um aumento na flexibilidade da proteína, alinhado com o aumento do raio de giro exibido anteriormente, podemos considerar que estamos testemunhando o desenovelamento da BSA.

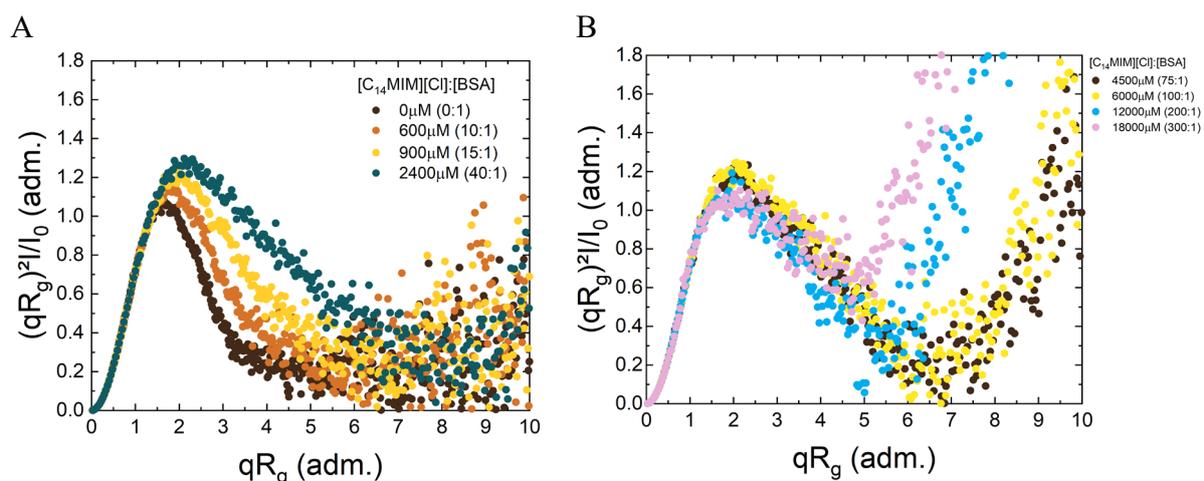


Figura 49: Curva de *Kratky* do sistema BSA em ausência e em presença de variadas concentrações de [C₁₄MIM][Cl], de 0 μ M a 2400 μ M em A e de 4500 μ M a 18000 μ M em B.

Para concentrações maiores de LI, a razão entre 75 e 300, as curvas de *Kratky* mudam de comportamento, conforme a Figura 49B. O pico oscila de 1,2 para 1,1 e não há

deslocamento do pico com a adição de LI. Há o surgimento de uma nova tendência ascendente a partir de $qR_g = 6,5$ na razão 75, de $qR_g = 5,5$ na razão 200 e de $qR_g = 4,8$ na razão 300. Uma estrutura completamente desnovelada apresentaria um *plateau* a partir de $qR_g = 5,5$ [53] [54], portando não podemos afirmar que há um completo desenovelamento da proteína.

O desenovelamento da proteína BSA foi estudado por Rosangela Itri e colaboradores [56] através da interação dessa proteína com ureia, onde o R_g atingiu o valor igual a 7,2nm em presença de 5M de ureia, valor significativamente maior ao encontrado nesse trabalho. G. Scanavachi e colaboradores [57] estudaram a interação da proteína BSA com o surfactante SDS, observaram um desenovelamento parcial demonstrado pelo aumento do R_g de 2,69nm até 3,20 nm. Com o aumento da concentração de SDS houve a formação de dímeros atingindo um R_g igual a 4,92nm. Os valores encontrados pelos autores se assemelham aos descritos nesse trabalho, porém uma discussão mais detalhada será feita posteriormente quando todos os dados do sistema forem expostos.

A distribuição de distância entre pares, $P(r)$, foi calculada utilizando o pacote ATSAS3.0 [44], desenvolvido pelo grupo de pesquisa liderado pelo Professor Svergun. As $P(r)$ podem ser apreciadas na Figura 50.

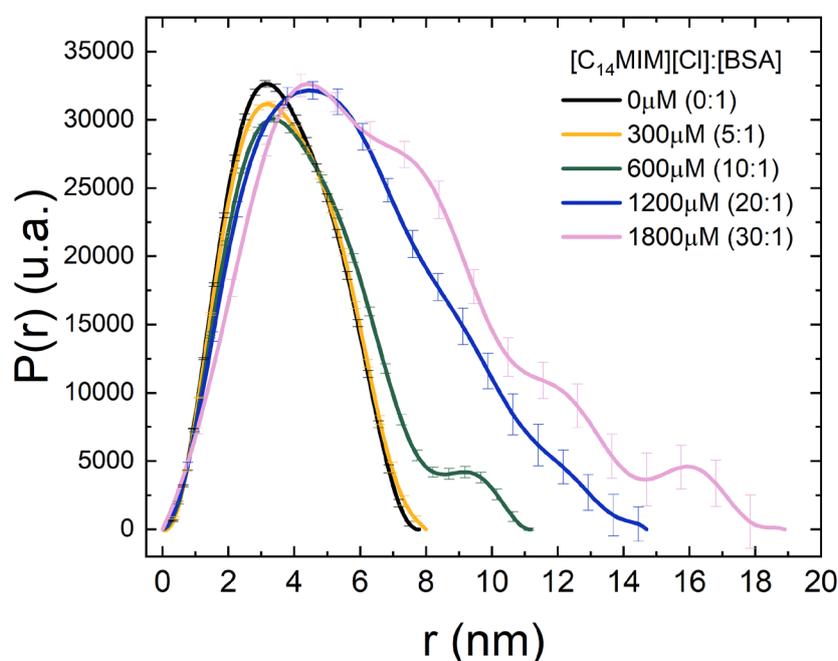


Figura 50: $P(r)$ da BSA em ausência e presença de $[C_{14}MIM][Cl]$

Observa que até a razão molar 5 a curva pouca muda, evidenciando uma estrutura globular com distância máxima, D_{max} , igual a 8, já a partir da razão 10 há aumento da

distância, atingindo $11,5\text{nm}$, $15,0\text{nm}$ e $19,0\text{nm}$ nas razões 10 , 20 e 30 . Há também a formação de oscilações ao longo das curvas com maiores concentrações de LI.

Foram encontrados envelopes, utilizando o software DAMMIN do pacote ATSAS 3.0 [44]. Optou-se por obter o envelope das curvas de SAXS que não apresentaram o pico característico de estruturas do tipo *core-shell* por limitações da metodologia. Os envelopes são gerados em formato de arquivo .pdb e o software PyMol [58] foi utilizado para criar a representação gráfica desses arquivos. Também utilizamos a estrutura cristalográfica da proteína, que fornece a posição de todos os átomos, a fim de comparação. O .pdb da estrutura cristalográfica da proteína foi obtido através do banco de dados aberto *PROTEIN DATA BANK* e está disponibilizado na página <https://www.rcsb.org/structure/4F5S>. O software CIFSUP, também do pacote ATSAS 3.0, foi utilizado para sobrepor, da melhor forma possível, os arquivos pdb.

O envelope da BSA em ausência de $[\text{C}_{14}\text{MIM}][\text{Cl}]$ obtido através dos dados experimentais pode ser apreciado na Figura 51 acompanhado da estrutura cristalográfica da proteína obtida através do banco de dados mencionado anteriormente.

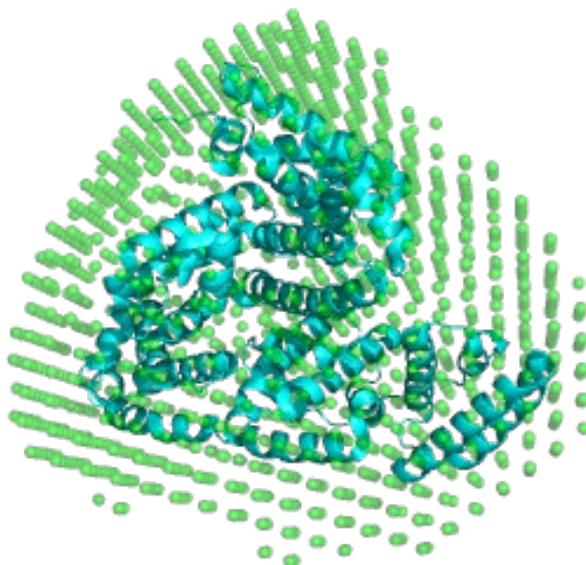


Figura 51: Envelope (esferas verdes) e PDB da proteína por cristalografia.

Observe que o envelope obtido da BSA em ausência de LI (esferas verdes) está em acordo com a estrutura cristalizada. O envelope um pouco maior em relação ao PDB é esperado pois no SAXS utilizamos a amostra em solução, isto é, a estrutura é mais dinâmica e pode assumir mais conformações que quando cristalizada.

Os envelopes da proteína em ausência de LI e em presença de $[C_{14}MIM][Cl]$ nas razões molares 10 e 30 podem ser apreciados na Figura 52.

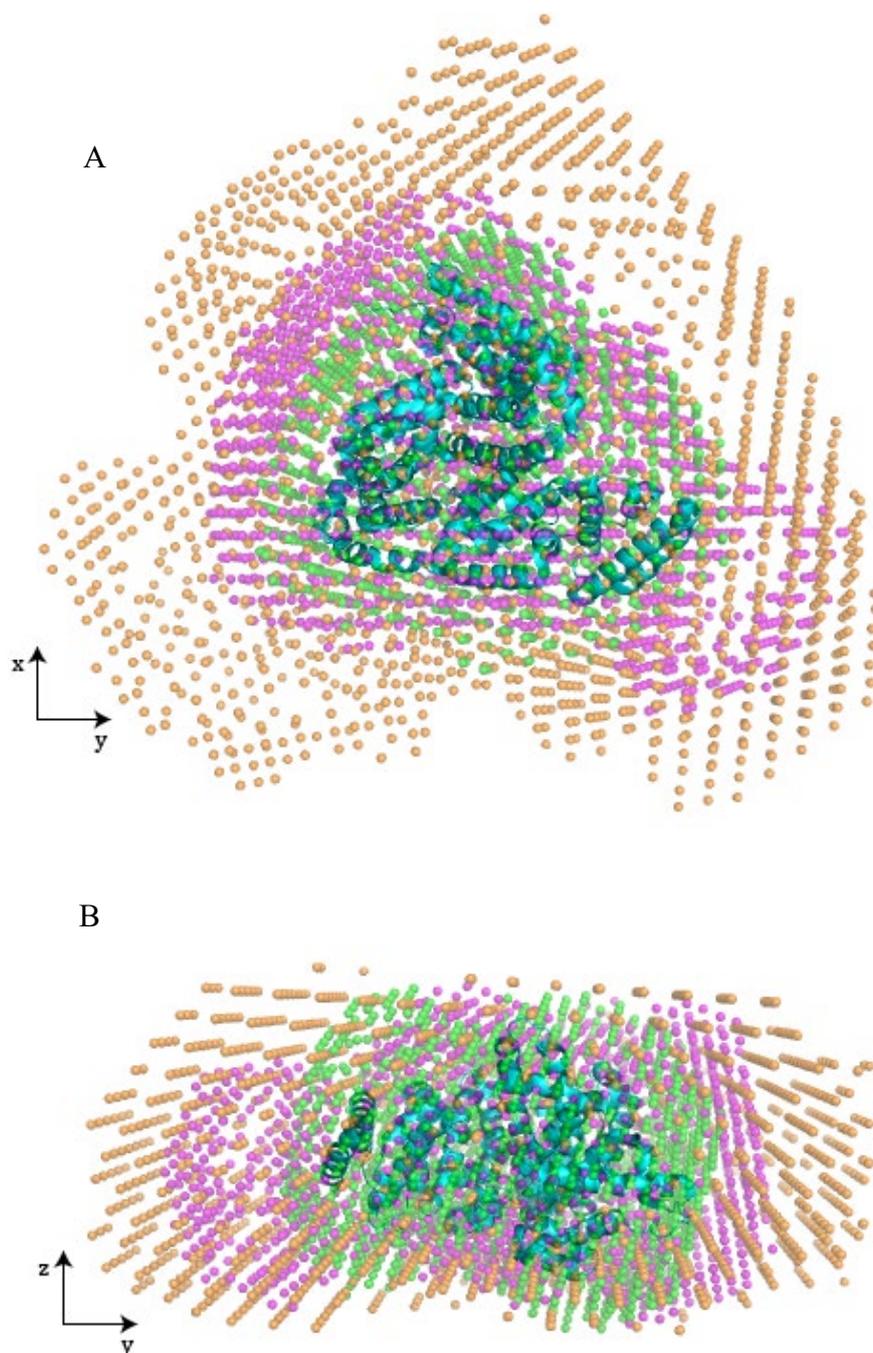


Figura 52: Envelopes (esferas) e PDB. Estrutura em ciano, verde- envelope em ausência de LI, magenta BSA na razão 10, laranja na razão 30

Podemos observar que há um aumento significativo do volume do centro espalhador quanto maior a concentração de $[C_{14}MIM][Cl]$, portanto temos mais uma evidência que o LI promove o desenovelamento da proteína BSA e a torna mais flexível. Observando a Figura

52 é possível afirmar que o aumento ocorre majoritariamente nas duas dimensões da Figura 52A e somente ao longo do eixo y na Figura 52B. Tal constatação nos leva a supor que o desenovelamento proteico ocorre de forma a diminuir a rigidez da estrutura terciária, tornando as três regiões da proteína mais dinâmicas e com interações menos rígidas entre si. As máximas distâncias ao longo do eixo horizontal na perspectiva da Figura 52B são 7,70nm para o PDB da BSA, 8,78nm para o envelope da BSA em ausência de LI e 12,49nm e 16,42nm em presença de $[C_{14}MIM][Cl]$ nas razões 10 e 30, respectivamente. É importante mencionar que moléculas de LI na superfície da proteína também contribuem para o aumento do envelope, assim como a formação de complexos.

BSA+TTAB

As curvas de espalhamento de raios-X a baixo ângulo da proteína BSA em ausência e presença de variadas concentrações do surfactante TTAB podem ser apreciadas na Figura 53.

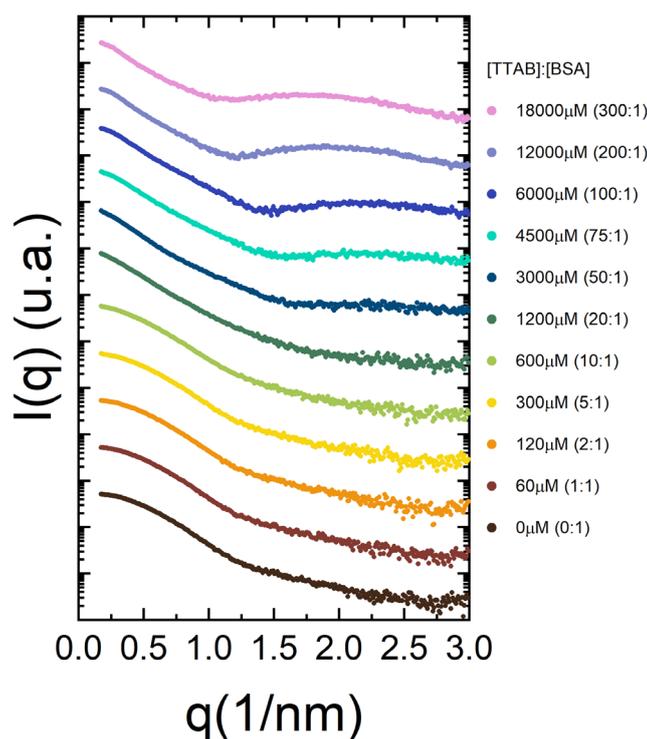


Figura 53: Intensidade de espalhamento de SAXS do sistema contendo BSA em ausência e presença de variadas concentrações de TTAB.

A curva de SAXS da proteína em ausência de TTAB está condizente com a curva da proteína em seu estado nativo. Com a adição de surfactante há modificações na curva em pequenos valores de vetor de espalhamento $q < 0,5 \text{ nm}^{-1}$, região de Guinier que será explorada nas alterações de raio de giro. Há a formação de um pico em torno de $q = 2.25 \text{ nm}^{-1}$ na razão

75 que aumenta e se desloca para valores menores de q até aproximadamente $q=1.8nm^{-1}$ na razão 300. Tal descrição é análoga ao comportamento observado no sistema BSA+[C₁₄MIM][Cl]. O raio de giro em ausência e presença de TTAB e de [C₁₄MIM][Cl] a fim de comparação, pode ser apreciado na Figura 54, e gráficos de Kratky na Figura 55.

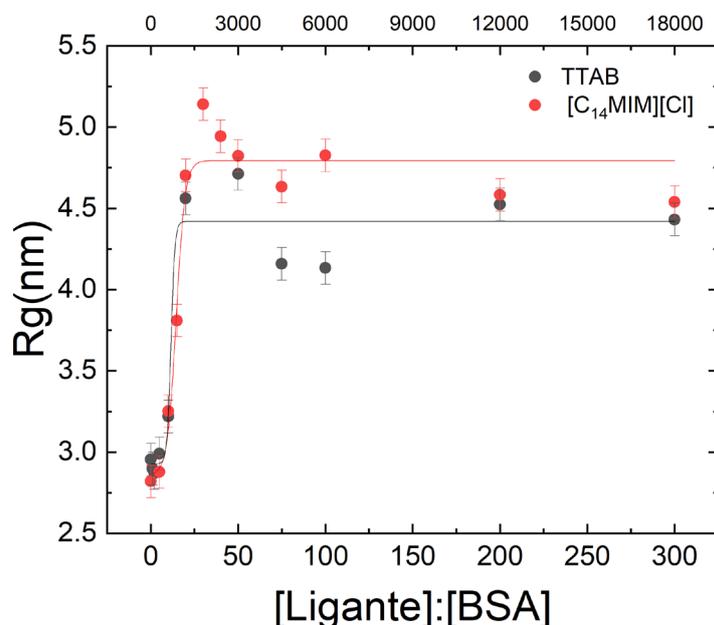


Figura 54: Raio de giro do sistema contendo BSA e TTAB ou [C₁₄MIM][Cl] em função da razão molar.

Observe que o raio de giro da BSA em presença de baixas concentrações de TTAB permanece aproximadamente igual ao raio de giro da proteína em seu estado nativo $R_g=2,8\pm 0,1nm$. O raio aumenta abruptamente a partir da razão 10 e se estabiliza em torno de $R_g=4,4\pm 0,1nm$ a partir da razão 20. As concentrações em que há o aumento do raio de giro e a estabilização são iguais para os dois ligantes, embora o valor atingido no sistema com o LI [C₁₄MIM][Cl] seja um pouco maior, em torno de $R_g=4,8\pm 0,1nm$.

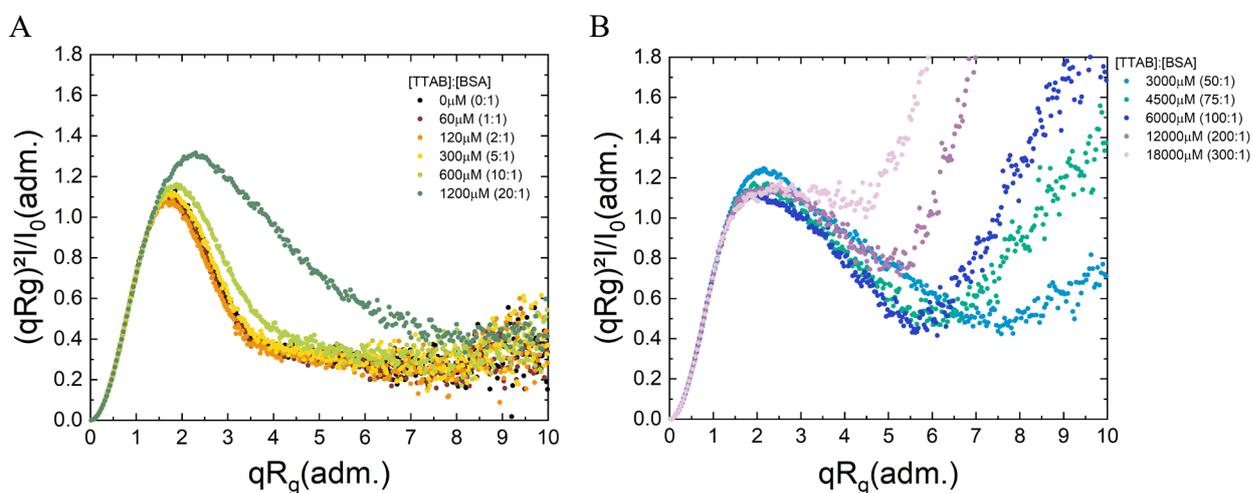


Figura 55: Gráfico de Kratky na forma normalizada do sistema contendo BSA em ausência e presença de variadas concentrações TTAB. Razões molares entre 0 e 20 em A e entre 50 e 300 em B.

Os gráficos de Kratky normalizado apresentam um comportamento semelhante aos vistos anteriormente. Na Figura 55A há o aumento do pico acompanhado de um deslocamento para qR_g maiores e perda da forma tipo sino, indicando um aumento da flexibilidade da proteína. Na Figura 55B vemos um grande aumento para $q.R_g > 2,0$ com a concentração de TTAB, assim como a formação de um segundo pico que pode estar associado a formação de grandes aglomerados.

4. Influência dos Lis na estabilidade térmica da BSA

Para investigar a influência dos Lis na estabilidade termodinâmica da BSA, realizamos medidas de calorimetria diferencial de varredura (DSC). Os dados de DSC foram obtidos em colaboração com a professora Dra. Karin do Amaral Riske do Departamento de Biofísica da EPM/Unifesp. Os termogramas de ΔC_p podem ser apreciadas na Figura 56.

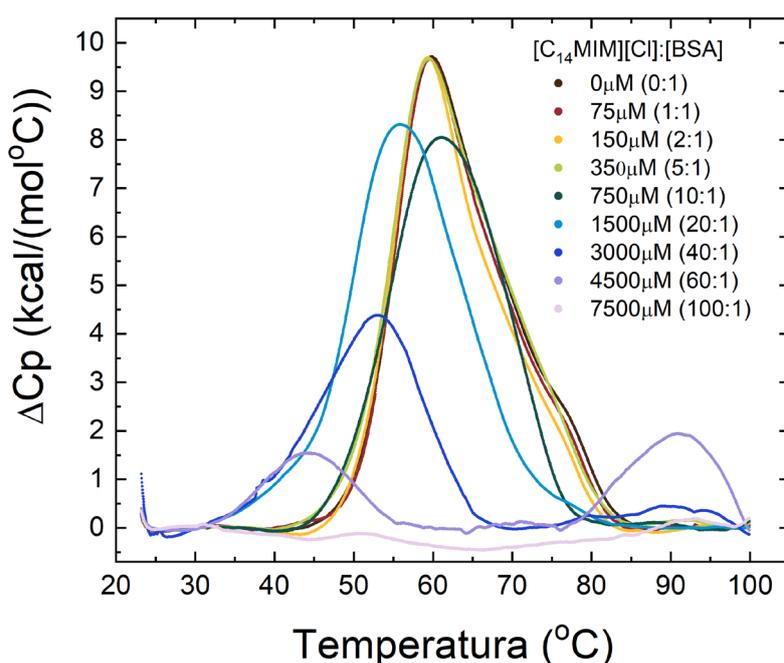


Figura 56: ΔC_p do sistema contendo a proteína BSA em ausência e presença de variadas concentrações de $[C_{14}MIM][Cl]$ em função da temperatura.

Como mencionado na Seção III.E Calorimetria de Varredura Diferencial, ΔC_p equivale a energia necessária para elevar $1^\circ C$ $1mol$ de amostra em comparação com a referência, que no nosso caso é a solução tampão. Observe que a curva da BSA em ausência de LI apresenta um pico positivo em torno de $60^\circ C$. ΔC_p se mantém aproximadamente igual a zero para temperaturas abaixo de $45^\circ C$, isto é, a energia necessária para elevar a

temperatura da amostra em 1°C é igual a energia necessária para elevar a temperatura do tampão em 1°C . A partir de 45°C passa a ser necessário cada vez mais energia, atingindo o máximo em 60°C e retornando a zero por volta de 85°C . Tal comportamento é característico de transições de fase. Borzova e colaboradores [59] estudaram a desnaturação e agregação da proteína BSA pré-aquecida a 60°C em diferentes intervalos de tempo. A transição de fase que os autores observaram ocorre em torno de 58°C atingindo um pico de ΔC_p igual a aproximadamente 47kJ/mol.K ou $11,2\text{kcal/mol.}^{\circ}\text{C}$, valores compatíveis com os encontrados neste trabalho. Portanto os resultados são compatíveis com a desnaturação térmica da BSA, um processo endotérmico, dado que ocorre com a absorção de calor. É importante mencionar que a largura da curva encontrada por Borzova e colaboradores é menor, isto é, após atingir o pico ΔC_p decresce rapidamente, atingindo o zero na temperatura 66°C . Tal diferença pode ser atribuída à proteína utilizada, Barzova e colaboradores utilizaram a proteína BSA com maior pureza e com a exclusão de ácido graxo, desta forma iremos supor que o alargamento da curva se deve a presença de impurezas e ácido graxo em solução.

A entalpia em função da razão molar foi calculada pela integral sob a curva do primeiro pico conforme equação (49) e pode ser apreciada na Figura 57.

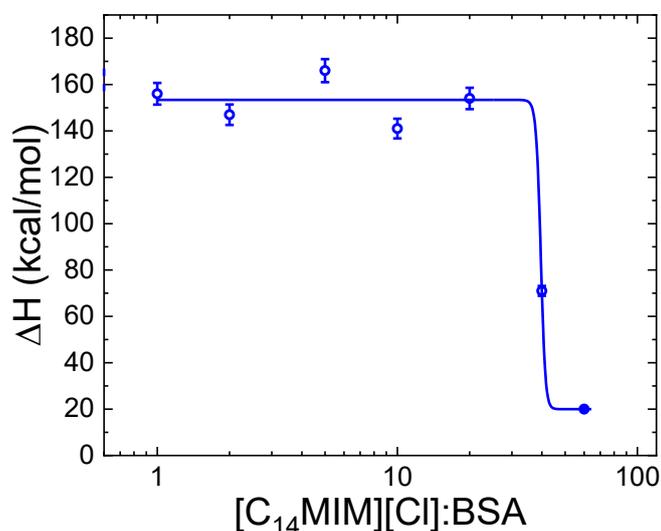


Figura 57: Entalpia em função da razão molar $[\text{C}_{14}\text{MIM}][\text{Cl}]:\text{BSA}$

A adição de $[\text{C}_{14}\text{MIM}][\text{Cl}]$ não modifica significativamente a curva até a razão molar igual a 5. Na razão 10 a amplitude do pico é significativamente menor e na razão 20 a temperatura do pico também passa a ser menor. Na razão 60 a temperatura e a amplitude são ainda menores e há a formação de um segundo pico. A diminuição do pico e deslocamento para menores temperaturas nos indica que o líquido iônico favorece a desnaturação da proteína, o que é razoável com as outras informações que obtemos da interação, pois temos

evidências de desenovelamento da proteína, através dos dados de SAXS. Também é possível supor que o líquido iônico promove desestabilidade térmica à BSA. O segundo pico na razão 60 pode estar associado a uma outra estrutura em solução ou um segundo estágio de desnaturação do complexo BSA+LI. A entalpia de transição, isto é, a integral sob a curva do primeiro pico e a soma da integral dos dois picos, quando houver, assim como a temperatura correspondente ao primeiro pico estão na Tabela 5.

Tabela 5: Entalpia do primeiro pico, entalpia total da curva e temperatura do primeiro pico de acordo com a molar $[C_{14}MIM][Cl]:BSA$.

$[C_{14}MIM][Cl]:[BSA]$	$\Delta H_1(KCAL/MOL)$	$\Delta H_{TOTAL}(KCAL/MOL)$	$T_M(^{\circ}C)$
0	162±5	162±5	59.8±0.3
1	156±5	156±5	59.7±0.3
2	147±5	147±5	59.4±0.3
5	166±5	166±5	59.5±0.3
10	141±5	141±5	61.0±0.3
20	154±5	154±5	55.9±0.3
40	71±2	77±2	53.0±0.3
60	20±1	47±1	44.1±0.3

A partir da Tabela 5 podemos afirmar que a temperatura de transição de fase não varia significativamente com a adição de $[C_{14}MIM][Cl]$ até a razão 10, mantendo-se em torno de $59,7\pm 0,3^{\circ}C$. As entalpias se mantêm compatíveis dentro de duas vezes a incerteza nesse intervalo, em torno de $157\pm 5kcal/mol$, com exceção da razão igual a 10, onde diminui para $141\pm 5kcal/mol$. A adição de mais LI promove tanto a diminuição da temperatura de transição como a da entalpia associada.

5. Investigação teórica da interação entre LI e a BSA

Para investigar em mais detalhes como se dá a interação dos LIs com a BSA, realizamos simulações de dinâmica molecular. Essas simulações de dinâmica molecular (DM) foram realizadas pelo Dr. Leandro Rezende Franco utilizando o pacote *Gromacs* 5.1.4 e os campos de força *GROMOS54A7* para BSA e $[C_{14}MIM][Cl]$ e SPC/E para água. As simulações contemplaram as razões molares 0:1, 10:1, 100:1 e 200:1 de $[C_{14}MIM][Cl]:BSA$. Foram adicionados 16 contra íons de sódio para neutralizar a carga da proteína em uma caixa cúbica de lado 16nm com N moléculas de água, onde N é igual a 117000, 116697, 115623 e 114243 nas respectivas razões molares de $[C_{14}MIM][Cl]:BSA$. A pressão e temperatura foram mantidas constantes e iguais a 1atm e 298,15K. Realizou-se a termalização do sistema por 10ns e a simulação por 300ns ou 500ns até atingir a estabilidade.

A raiz quadrada do desvio quadrado médio (*root mean square deviation*, RMSD) da BSA nas quatro condições em função do tempo de simulação pode ser apreciado na Figura 58A e o raio de giro (R_g) na Figura 58B, este é um parâmetro que está intimamente relacionado ao desenovelamento proteico.

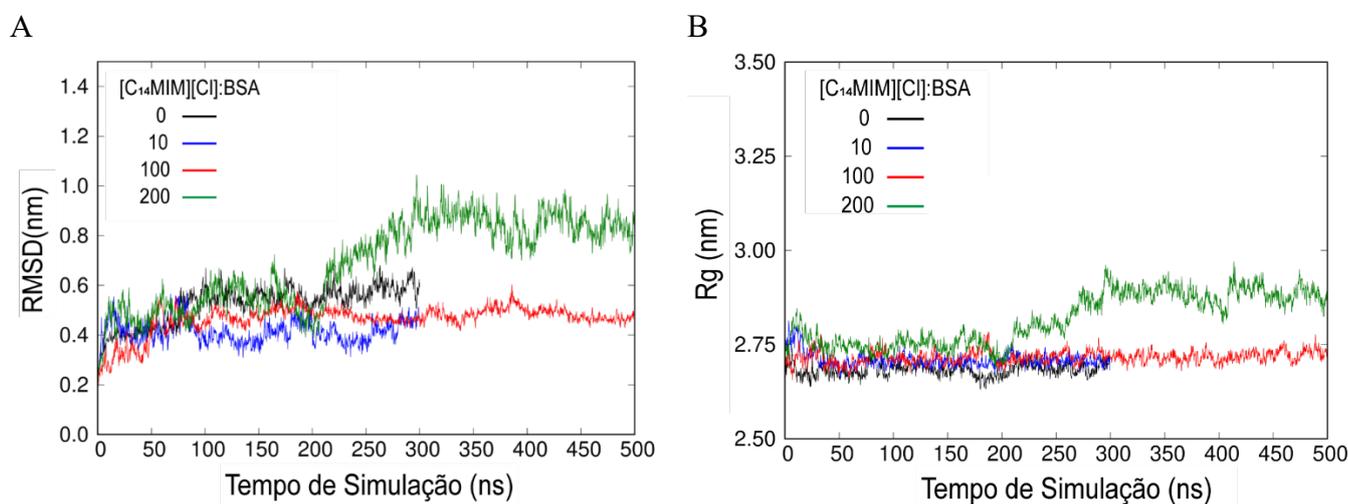


Figura 58: RMSD (do inglês, *root mean square deviation*) em função do tempo de simulação.

O RMSD nos dá informação de como a estrutura da BSA se deforma como um todo e está associado ao raio de giro, tanto que os dois gráficos apresentam comportamentos semelhantes. Através da Figura 58A podemos observar que a variação da estrutura de 1 molécula de BSA em ausência e em presença de 10 e 100 moléculas de LI se mantém aproximadamente constante a partir de 50ns de simulação. Já em presença de 200 moléculas de LI o RMSD inicia um crescimento a partir de 200ns e atinge a estabilidade em torno de 300ns de simulação. Valores maiores de RMSD podem indicar uma estrutura mais dinâmica o que também está refletido no aumento do raio de giro evidenciado na Figura 58B. O raio de giro da BSA em presença de 10 e 100 moléculas de LI se manteve constante desde o início da simulação e compatível com a BSA em ausência de LI. Já em presença de 200 moléculas de LI vemos um aumento a partir 200ns de simulação e uma estabilização a partir de 300ns.

É importante mencionar que a dinâmica molecular é uma ferramenta muito poderosa, nos dá informações adicionais que podem auxiliar no entendimento dos resultados experimentais, mas têm suas limitações. A DM provê informações do início do processo, 500ns de simulação já requer um grande recurso computacional e mesmo assim pode ser insuficiente para observamos o processo como um todo e reproduzir o dado experimental, como por exemplo, observar o desenovelamento proteico na razão molar 100:1.

Podemos concluir que o LI, ao menos em altas concentrações, modifica a estrutura da BSA aumentando seu raio de giro. As regiões que mais colaboram para tais modificações podem ser identificadas a partir da raiz da flutuação quadrada média (*root mean square fluctuations*, *RMSF*) em função da posição do resíduo da BSA, Figura 59.

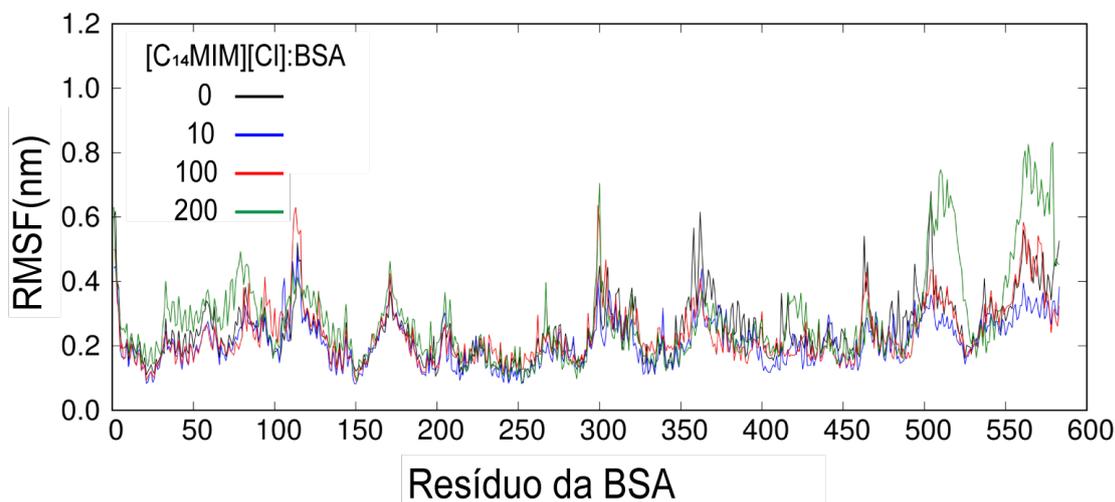


Figura 59: RMSF (do inglês, *root mean square fluctuations*) em função da posição do resíduo da BSA.

Através do RMSF podemos notar que há regiões mais flexíveis e dinâmicas que outras, mesmo com a BSA em ausência de LI. Gostaríamos de destacar a região 110-120 para a BSA em presença de 100 moléculas de LI e as regiões 500-535 e 560-583 para a BSA em presença de 200 moléculas de LI. Tais regiões são as que mais contribuem para o aumento da flexibilidade e estão ilustradas na Figura 60.

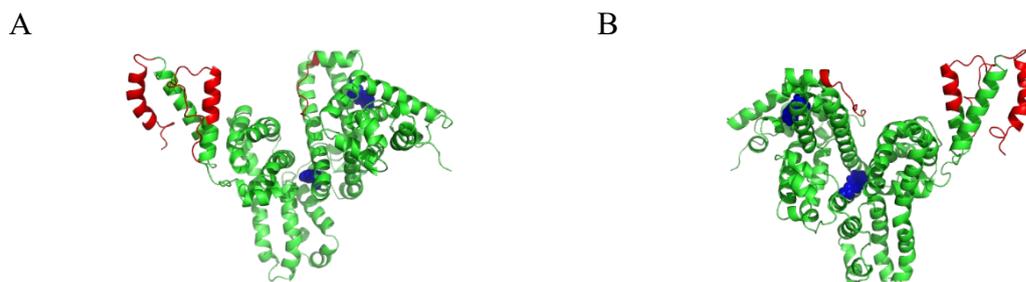


Figura 60: Figuras ilustrativas do arquivo PDB gerado para DM de uma mesma configuração, porém rotacionadas. Destacadas em vermelho os aminoácidos 110-120, 500-535 e 560-583. Os aminoácidos 560-583 estão localizados na extrema esquerda em (A) e extrema direita em (B). Destacados em azul os triptofanos (W134 e W213) para referência.

Podemos observar que as principais regiões responsáveis pelos picos de RMSF no intervalo da simulação são as alfa-hélices, mais expostas ao meio, do subdomínio III.

Buscando elucidar os fenômenos de fluorescência foi calculada a menor distância entre os dois triptofanos e uma molécula de $[C_{14}MIM][Cl]$ nas simulações com 100 e 200

LIs, como pode ser verificado na Figura 61A. Na Figura 61B temos a distância entre os anéis do Trp 1 e o anel imidazólico do LI mais próximo.

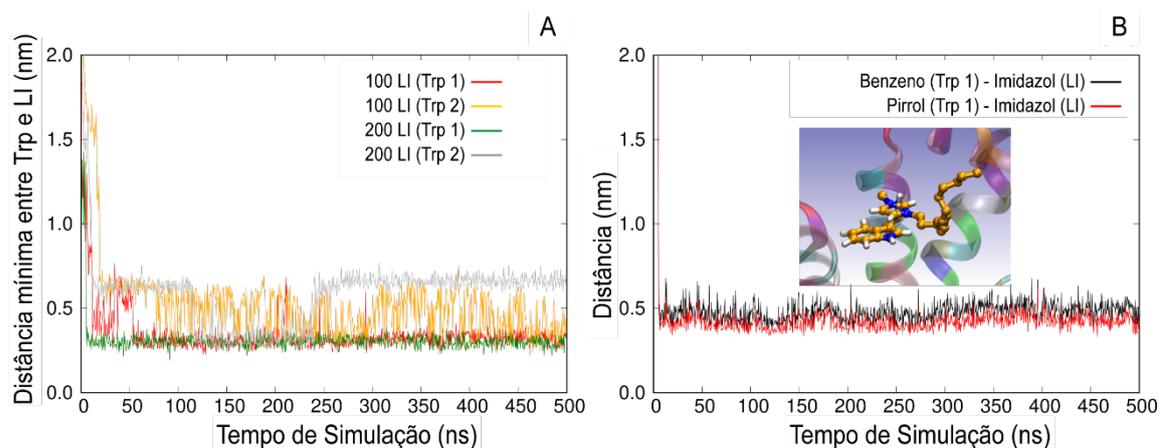


Figura 61: (A) Distância mínima encontrada entre um triptofano, sendo Trp 1 o W134 e Trp 2 o W213, e uma molécula de LI. (B) Distância entre os anéis (benzeno e pirrol) do triptofano W134 e o anel imidazólico do LI, na simulação com 200 moléculas de LIs. Sendo $[C_{14}MIM][Cl]$ o LI.

Trp 1 é o triptofano mais externo (W134) enquanto Trp 2 é o menos exposto ao meio (W213). Observe que tanto na simulação 100 quanto na simulação 200 a distância mínima entre Trp 1 e LI atinge rapidamente 0,4nm e pouco varia, indicando que há uma interação relativamente forte que mantém essas moléculas próximas com pouca variação. Já em relação ao Trp 2, as distâncias são mais dinâmicas, com grandes oscilações entre 0,4nm e 0,6nm.

As distâncias entre o benzeno e o imidazol e entre o indol e o imidazol variam em torno de 0,5nm, porém é possível notar que a distância entre o pirrol e o imidazol é sempre menor que a distância entre o benzeno e o imidazol. Tal constatação fortalece a suposição do *blue-shift* observado na fluorescência ser causado pela aproximação e posicionamento de um dipolo elétrico, dado que o anel imidazólico possui carga (positiva).

As simulações de dinâmica molecular indicam que a aproximação das moléculas de $[C_{14}MIM][Cl]$ retira moléculas de água do entorno da BSA. A Figura 62A traz o número de ligações de hidrogênio intramoleculares e a Figura 62B traz o número de ligações de hidrogênio entre a BSA e moléculas de água.

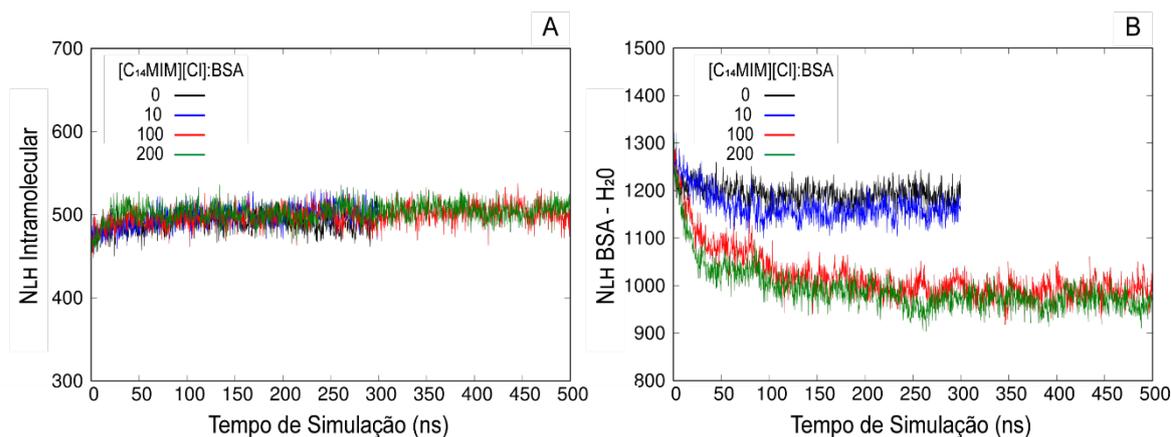


Figura 62: Número de ligações de hidrogênio (A) entre componentes da BSA ou (B) entre a BSA e moléculas de água.

O número de ligações de hidrogênio entre componentes da BSA, no interior da própria proteína, não variou significativamente com o tempo e nem com a adição de moléculas de LI. Já o número de ligações de hidrogênio entre a proteína e moléculas de água diminuiu substancialmente com a adição de LI. O número de ligações de hidrogênio variou de 1200 em ausência de LI para aproximadamente 980 em presença de 200 LIs.

Uma “fotografia” das moléculas (1 BSA e 200 moléculas de $[C_{14}MIM][Cl]$) em um instante inicial e em um instante final da simulação ser apreciadas na Figura 63.

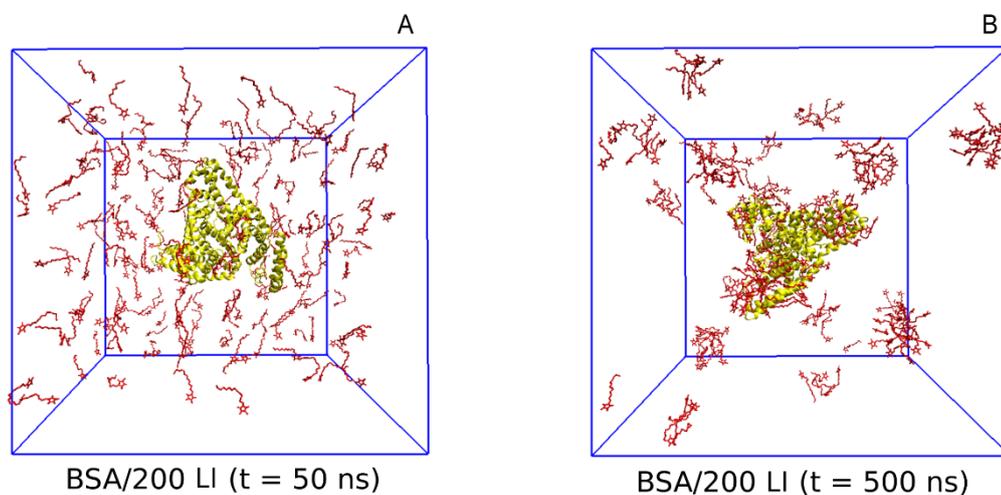


Figura 63: PDB da simulação com 1 BSA e 200 moléculas de $[C_{14}MIM][Cl]$ nos instantes (A) 50ns e (B) 500ns.

No instante $50ns$ as moléculas de LI estão dispersas em solução, no instante $500ns$ as moléculas de LI se aglomeram em pequenas estruturas tipo micela em solução e na superfície da BSA. Uma aproximação da molécula de BSA no instante 500ns pode ser apreciado na Figura 64.

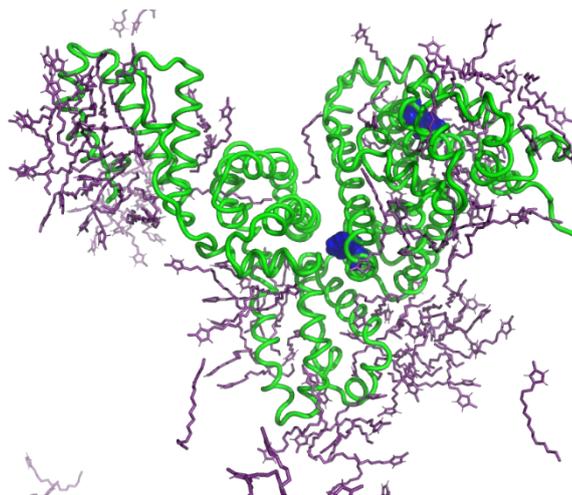


Figura 64: Instante 500ns na simulação de DM de 1 BSA e 200LI.

A proteína possui sítios apolares e polares propícios para a interação com $[C_{14}MIM][Cl]$, dado que este é uma molécula anfifílica, como pode ser visto na Figura 64. A dinâmica molecular não demonstrou modificações na estrutura secundária da proteína.

6. Discussões

Existe na literatura uma gama de trabalhos sobre a interação da proteína BSA com surfactantes. Surfactantes aniônicos, como SDS (do inglês, *sodium dodecyl sulfate*), induz a estabilização térmica à baixas concentrações [60], enquanto induz a desnatura à altas concentrações [61]. Surfactantes catiônicos, como CTAB (do inglês, *cetyltrimethylammonium bromide*) e DTAB (do inglês, *dodecyltrimethylammonium bromide*) mudam a conformação da BSA [62].

Gurbir S. e Tejwant S. K. [63] investigaram a interação de líquidos iônicos surfactantes (LIS) com a proteína BSA. Três LIS foram utilizados, o $[C_{12}mim][Cl]$ não funcionalizado e funcionalizado com amida, $[C_{12}Amim][Cl]$, e com éster, $[C_{12}Emim][Cl]$. Os autores descrevem como os LIS promovem a formação de diferentes estruturas. A presença de $[C_{12}mim][Cl]$ em todas as concentrações investigadas induziu a formação de grandes estruturas desordenadas de agregados da proteína, enquanto em presença dos outros LIS foram observadas estruturas com organização. $[C_{12}Amim][Cl]$ induziu a formação de estruturas semelhantes a hastes longas e $[C_{12}Emim][Cl]$ induziu a formação de fibras amiloides ricas em folhas β .

Gurbir S. e Tejwant S. K. observaram, utilizando a técnica fluorescência, diminuição da intensidade de fluorescência e deslocamento do pico de emissão para o azul com o

aumento da concentração de todos os LI. Tais variações se dão de forma aproximadamente linear entre concentrações características que serão discutidas a seguir (C_1 , C_2 , C_3 e C_4). *Quenching* e *blue-shift* também foram apresentados no presente trabalho, embora tenhamos presenciado mudanças compatíveis com curvas de Boltzman ao invés de lineares. Outra diferença relevante é o máximo *blue-shift* observado pelo autores, igual a 10nm para $[C_{12}mim][Cl]$, enquanto nós relatamos 20nm para a mesma molécula. As diferenças no comportamento podem ser atribuídas ao diferente comprimento de onda de excitação utilizado nos experimentos, nós optamos por utilizar $\lambda_{ex}=295nm$ enquanto os outros autores optaram por $\lambda_{ex}=280nm$. Porém as presenças de *quenching* e *blue-shift* em ambos os trabalhos nos permitem paralelos interessantes.

Os autores indagaram a possibilidade do *quenching* ser causado pela relaxação do triptofano com o meio ao ficar mais exposto (desenovelamento parcial), porém tal cenário geraria também um *red-shift* dado o meio mais polar, o que não foi observado. São levantadas três razões gerais para o *blue-shift*: (a) internalização do fluoróforo em uma região mais apolar, proveniente de um enovelamento da proteína; (b) deslocamento e distanciamento das moléculas de água gerando um ambiente relativamente menos polar na região do fluoróforo; (c) interação hidrofóbica entre a cadeia apolar dos LIS com o fluoróforo. A possibilidade (a) é descartada pelos autores pois há evidência de desenovelamento da proteína, ao invés de enovelamento; (b) e (c) são mantidos como possibilidades, dado que a presença dos LIS pode tanto diminuir a presença de moléculas de água na região como pode possibilitar a interação com o componente hidrofóbico do próprio LIS.

Os resultados de dinâmica molecular nos permitem descartar a alternativa (c), dado que vemos claramente que a interação entre o LI e triptofano mais externo se dá com o componente polar do LI, o anel imidazólico. Callis e colaboradores [36] defendem outra possibilidade para o *blue-shift*: (d) a carga positiva nas proximidades do anel pirrólico do triptofano. (d) está condizente com os resultados de dinâmica molecular. Tanto (b) quanto (d) explicam o *blue-shift* dos ligantes mencionados, porém (d) explica o *blue-shift* e o *quenching* conjuntamente, dado que o anel imazólico é um supressor do triptofano.

Através da técnica de calorimetria de titulação isotérmica (ITC, do inglês, *Isothermal Titration Calorimetry*) Gurbir S. e Tejwant S. K. determinaram 4 concentrações de LIS relevantes que marcam diferentes configurações da interação ($C_1 < C_2 < C_3 < C_4$). Nas concentrações menores que C_1 os LIS estão monoméricos e interagem com BSA via efeito

hidrofóbico e eletrostático, desencadeando uma perda parcial da estrutura secundária e um pequeno aumento do diâmetro hidrodinâmico, D_h , calculado a partir da técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS, do inglês, *Dynamic Light Scattering*). D_h parte de 8,0nm e atinge 11,0nm. Entre C_1 e C_2 há aumento pronunciado de D_h atribuído a mediação dos LIS a auto agregação da proteína BSA formando complexos, ou agregados. O crescente desenovelamento neste estágio expõe mais sítios de ligação da BSA, favorecendo a interação, portanto há uma adsorção cooperativa. O desenovelamento também é suportado pela diminuição da estrutura secundária α -hélice de 58% até 34% em C_1 e até 4% em concentrações maiores.

Os autores observaram estabilização de D_h entre C_2 e C_3 , o LIS adicionado supostamente é incorporado a outros LIS na superfície da proteína, desencadeando a formação de estrutura tipo “*hemimicelle*”. Nas concentrações maiores que C_3 há a diminuição de D_h atribuída ao colapso de alguns agregados e formação de micelas de LIS em solução, que se tornam bem estabelecidas em C_4 . Nas altas concentrações, $>C_4$, há a grande diferenciação entre os LIS estudados e a formação das diferentes estruturas (o agregado amorfo, o tipo haste e a fibra amiloide). Os autores também mencionam como o aumento de D_h entre C_1 e C_2 promovido por $[C_{12}mim][Cl]$ é notadamente maior que o provocado por $[C_8mim][Cl]$, publicado em outro trabalho, indicando a relevância do componente hidrofóbico.

Embora não tenhamos realizado medidas de DLS, podemos relacionar qualitativamente o diâmetro hidrodinâmico, D_h , com o raio de giro, R_g , que obtivemos através da técnica SAXS. Os valores de R_g se comportaram de forma semelhante ao D_h descrito pelos autores, apresentando um aumento bem significativo a partir de uma certa concentração. Também observamos diminuição da estrutura α -hélice reforçando a tese do desenovelamento parcial. A perda da estrutura secundária que observamos é muito menor que a registrada pelos autores, podemos atribuir a diferença à maior concentração de LI empregada no artigo, atingindo até 6mM.

Na Figura 65: Parâmetros experimentais normalizados (entre 0 e 1) em função da razão molar. Na Figura 65 trazemos o gráfico com os principais dados experimentais normalizados entre zero e um para discutirmos estágios da interação.

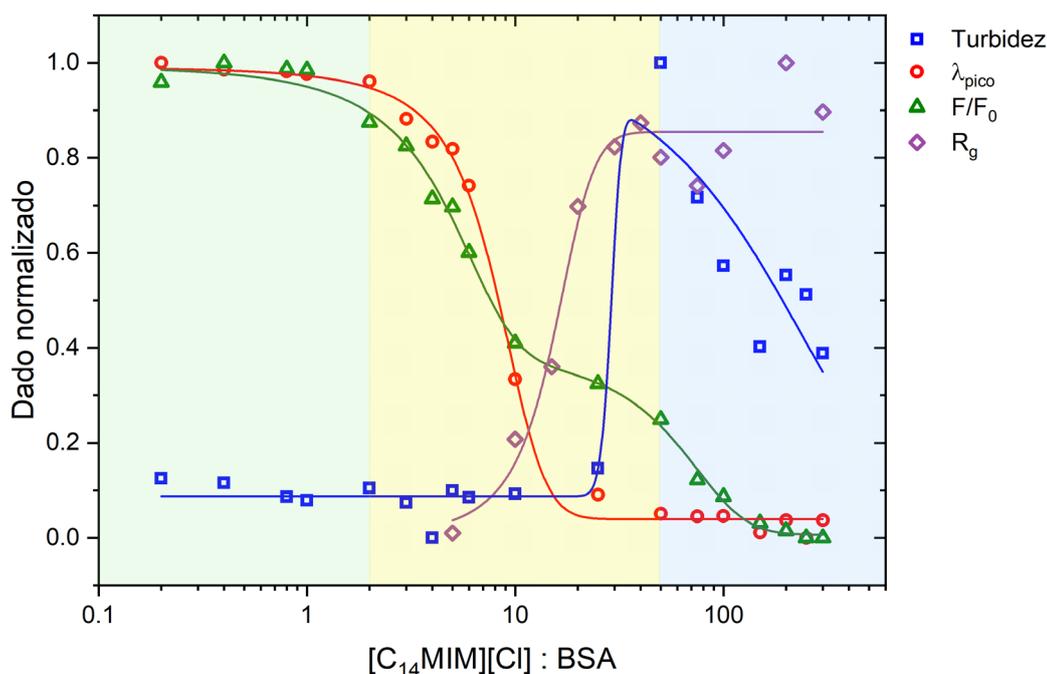


Figura 65: Parâmetros experimentais normalizados (entre 0 e 1) em função da razão molar.

Observe que há 3 regiões bem definidas, que serão descritas levando em consideração os trabalhos descritos anteriormente. No primeiro estágio os parâmetros são aproximadamente constantes, portanto a interação ainda não é suficiente para promover mudanças estruturais na proteína. As moléculas de LI devem se aproximar dos sítios de ligação através de efeitos hidrofóbicos, porém, principalmente devido à interação eletrostática. No segundo estágio há grande variação de todos os parâmetros, com exceção à turbidez. Nesse estágio a interação passa a ser cooperativa, a adsorção de LI na superfície da proteína expõe sítios hidrofóbicos que favorecem a interação. A aproximação dos LIs do Trp mais externo da BSA promove a supressão e o deslocamento para azul da fluorescência e um desenovelamento parcial da proteína. No terceiro estágio os parâmetros passam a tender a uma estabilização, indicando uma saturação da interação, novas moléculas de LI não são mais adsorvidas pela proteína. A turbidez atinge um pico e passa a diminuir, indicando a formação de grandes estruturas e posterior decantação ou colapso das mesmas. As curvas de SAXS nos levam a supor que há a formação de complexos BSA+LI e micelas de LI em solução.

B. Interação entre líquidos iônicos e albumina de soro humano

Inicia-se nesta seção a exposição dos dados e discussão da interação entre líquidos iônicos e a proteína HSA. É importante mencionar que embora a proteína HSA seja muito semelhante a BSA há diferenças importantes, portanto, a discussão deve ser direcionada. O leitor notará que o volume de dados é menor, isto se deve a menor disponibilidade da proteína. Priorizamos as técnicas com melhor acesso e o sistema com o LI $[C_{14}MIM][Cl]$.

1. Influência dos Lis na absorção e emissão da HSA

Os espectros de emissão de fluorescência da proteína HSA em ausência e em presença do LI $[C_{14}MIM][Cl]$ pode ser apreciado na Figura 66. Observe que analogamente como ocorre com a proteína BSA, o espectro de fluorescência da proteína HSA sofre supressão e *blue-shift* com a adição de $[C_{14}MIM][Cl]$. O comprimento de onda do pico do espectro de emissão da HSA é aproximadamente igual a 347nm, enquanto para a BSA era 350nm. A HSA possui somente 1 triptofano (Trp214), correspondente ao triptofano mais interno da BSA, portanto em uma região mais hidrofóbica, mais apolar, justificando o pico de emissão em comprimento de onda um pouco menor. A supressão e o deslocamento do pico podem ser melhor apreciados através de F/F_0 e λ_{pico} na Figura 67A e Figura 67B, respectivamente.

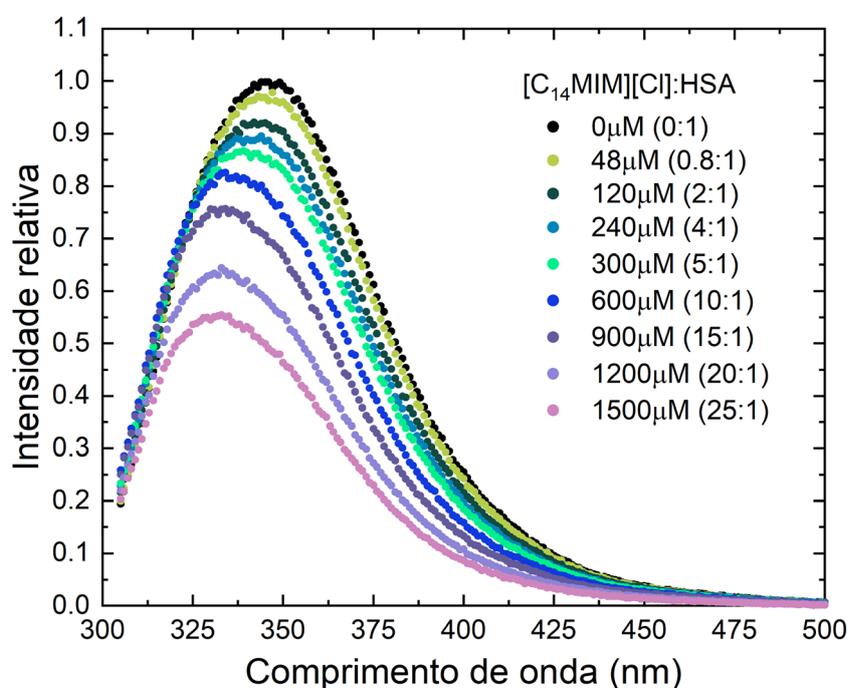


Figura 66: Espectro de intensidade de fluorescência relativa da proteína HSA (60 μM) em ausência e em presença de variadas concentrações de $[C_{14}MIM][Cl]$. Na legenda a concentração absoluta de $[C_{14}MIM][Cl]$.

Os experimentos com os LIs $[C_{12}MIM][Cl]$ e $[C_{10}MIM][Cl]$ não puderam ser realizados em concentrações maiores devido ao aumento da turbidez que compromete a qualidade dos dados, portanto a comparação não poderá ser feita quanto a estabilização dos parâmetros. Porém é possível observar que assim como a proteína anterior, quanto maior a cadeia carbônica do LI maior é a supressão e o deslocamento do pico na mesma concentração.

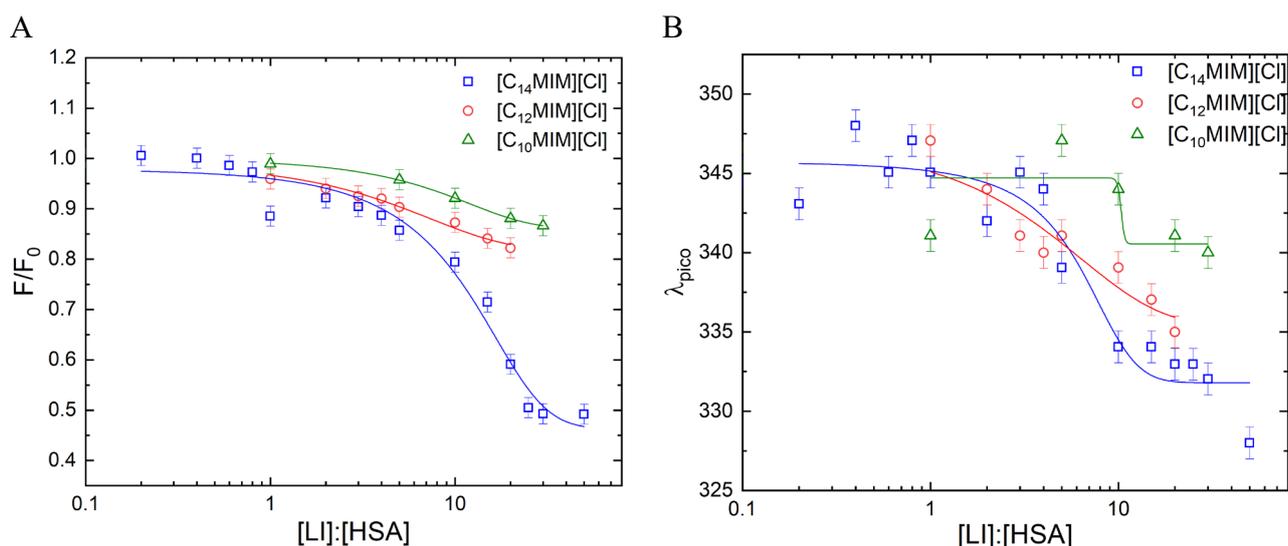


Figura 67: F/F_0 e comprimento de onda do pico de emissão. Todas as curvas foram ajustadas funções de Boltzmann para guiar os olhos.

O fato das modificações que $[C_{14}MIM][Cl]$ geram tanto na supressão quanto no deslocamento do pico serem menores que as geradas na BSA pode ser explicado pelo menor acesso que as moléculas de LIs têm ao triptofano. Podemos concluir que há interação entre as moléculas de LI e a proteína HSA e inclusive na região próxima ao triptofano.

2. Influência dos Lis na estrutura secundária da HSA

Os espectros de CD da proteína HSA em ausência e em presença dos 3 LIs podem ser apreciados na Figura 68.

A HSA em ausência de LI apresentou $(58 \pm 4)\%$ de estrutura secundária do tipo α -hélice, valor este compatível com a literatura [64]. Porém é importante mencionar que na literatura encontramos grande variação da porcentagem de α -hélice da HSA nativa, desde 47% [65] até 66% [66].

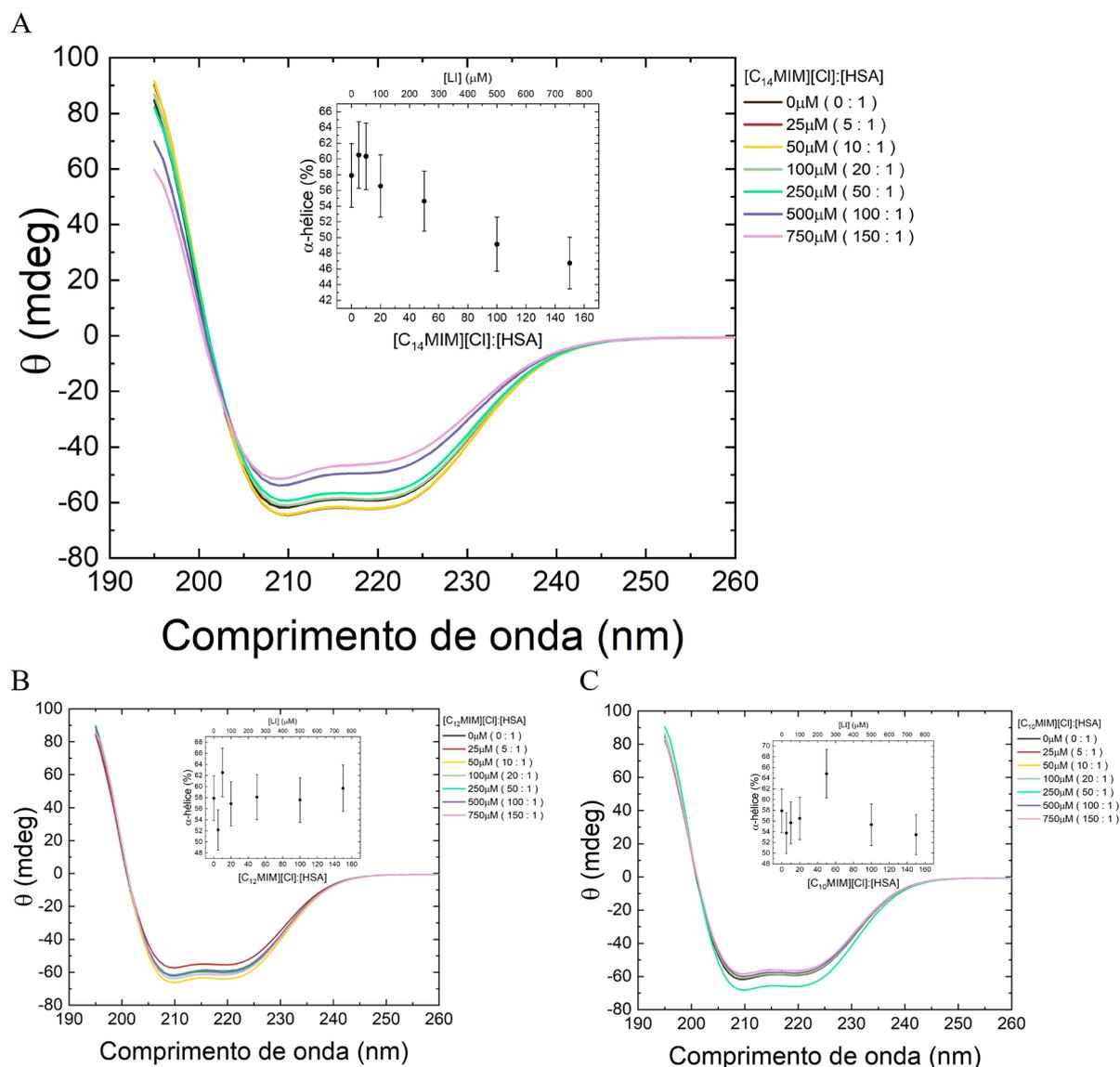


Figura 68: Espectro de dicroísmo circular, em unidades de graus de elipticidade, da HSA em ausência em presença de variadas concentrações de (A) [C₁₄MIM][Cl], (B) [C₁₂MIM][Cl], E (C) [C₁₀MIM][Cl]. No insert porcentagem calculada da estrutura α -hélice em função da razão molar.

Observe que somente na presença de [C₁₄MIM][Cl] há uma tendência clara de queda na porcentagem de α -hélice, partindo de (58 \pm 4)% até atingir (46 \pm 4)%, na razão molar igual a 150, uma variação de -12 pontos percentuais. Porém, assim como nos casos anteriores, os valores são compatíveis dentro do intervalo de 2 incertezas. Em presença de [C₁₂MIM][Cl] e [C₁₀MIM][Cl] os valores oscilam tanto positivamente quanto negativamente. Portanto [C₁₄MIM][Cl] pode modificar a estrutura secundária da HSA, porém, de forma geral, a estrutura secundária da HSA se mantém em grande parte ao interagir com os LIs.

3. Influência dos LIs na estrutura terciária da HSA

As curvas de espalhamento de raios-X a baixo ângulo da proteína HSA em ausência e em presença de variadas concentrações de $[C_{14}MIM][Cl]$ podem ser apreciadas na Figura 69. As curvas então deslocadas no eixo vertical a fim de facilitar a visualização.

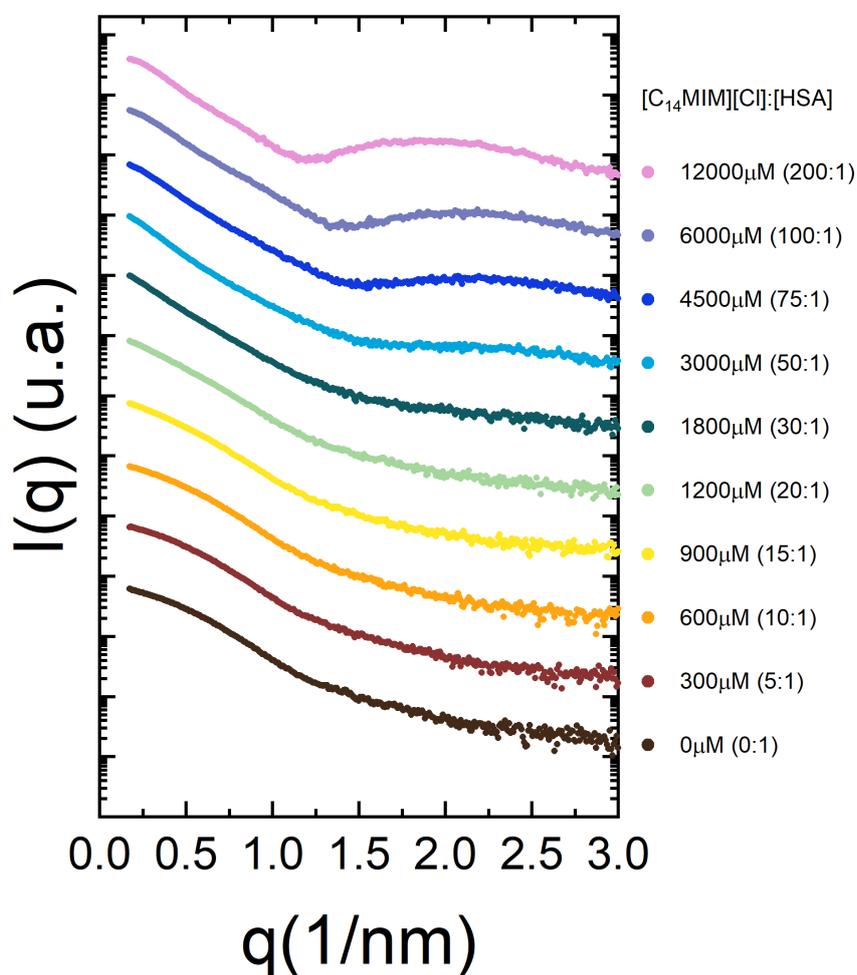


Figura 69: Intensidade de espalhamento de SAXS do sistema contendo HSA em ausência e presença de variadas concentrações de $[C_{14}MIM][Cl]$.

Observe que de forma semelhante ao sistema anterior há mudanças na curva para $q < 0,5 \text{ nm}^{-1}$ e a formação de um pico em torno de $q = 2,25 \text{ nm}^{-1}$ na razão 50 que aumenta de intensidade e se desloca até $q = 1,8 \text{ nm}^{-1}$ na razão 200. Podemos atribuir este pico a formação de estruturas de tipo *core-shell* de LI em solução, dado que se assemelha muito a curva de LI puro em solução em altas concentrações, Figura 46.

As curvas de Kratky adimensional podem ser apreciadas na Figura 70, separada em A e B para melhor visualização. A Figura 70 traz a proteína HSA em ausência e em presença de $[C_{14}MIM][Cl]$ em concentrações crescentes até $1200 \mu\text{M}$, Figura 70A, e até $12000 \mu\text{M}$, Figura 70B.

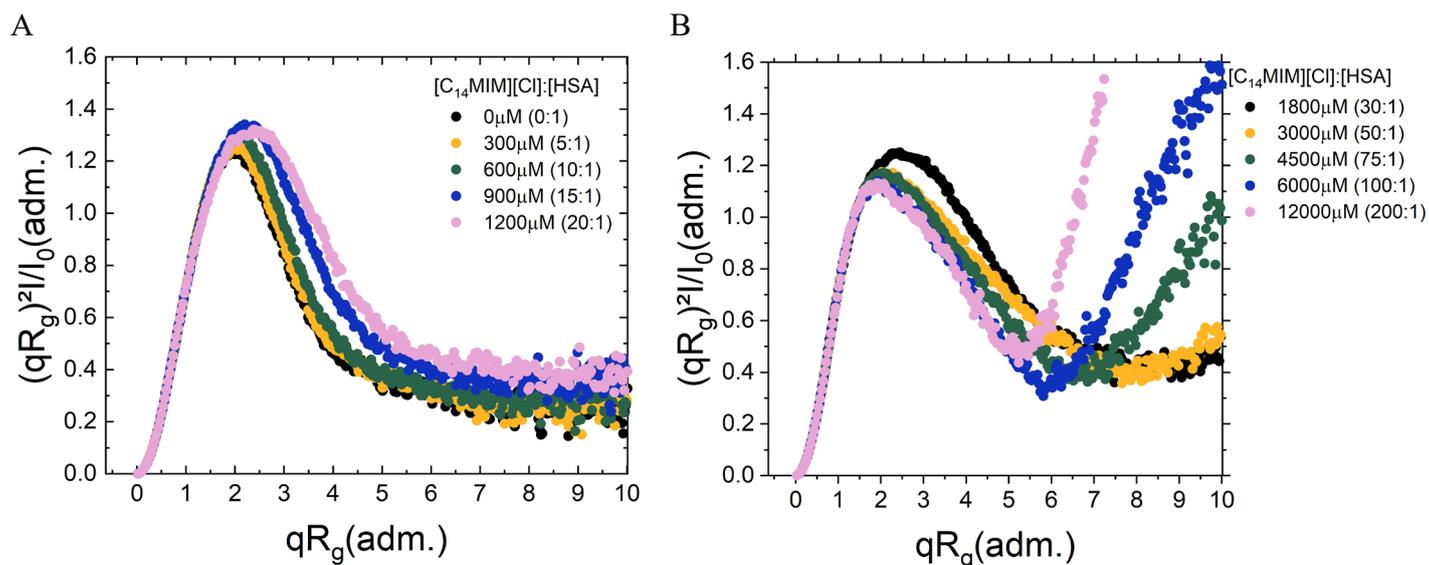


Figura 70: Curva de Kratky do sistema HSA em ausência e em presença de variadas concentrações de [C₁₄MIM][Cl], de 0 μM a 1200 μM em A e de 1800 μM a 12000 μM em B.

As curvas de Kratky normalizado nos dizem que a proteína HSA em ausência de LI se encontra enovelada, em seu estado nativo, revelando um pico em $qR_g=2,0$ igual a 1,2. A adição de LI promove o aumento da intensidade do pico e deslocamento para valores maiores de qR_g até 2,4 na razão 20. Para concentrações maiores de LI o pico diminui e retorna para valores menores de qR_g até 1,9 em x.

Os raios de giro da proteína dos sistemas [C₁₄MIM][Cl]:HSA, [C₁₄MIM][Cl]:BSA e [C₁₄MIM][Cl]:BSA podem ser apreciados na Figura 71.

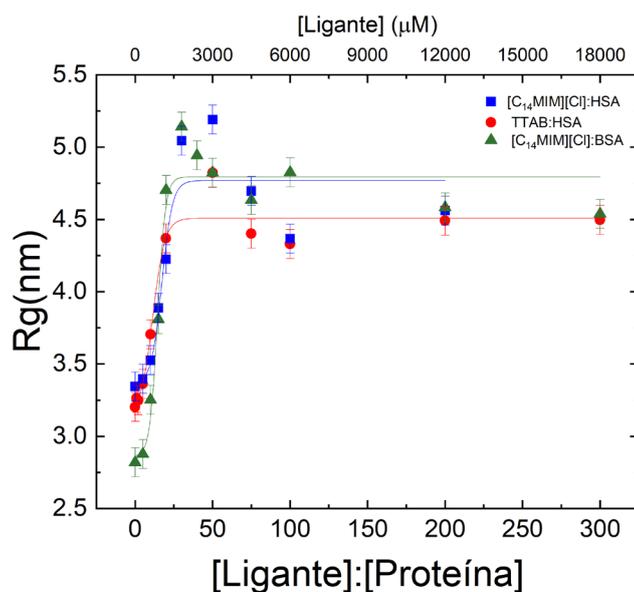


Figura 71: Raio de giro dos sistemas contendo HSA e BSA em presença de variadas concentrações de [C₁₄MIM][Cl] e TTAB (conforme a legenda) em função da razão molar.

O raio de giro da HSA em ausência de ligante é igual $R_g=3,3\pm 0,1$ nm, em torno de 1nm maior que a BSA. O valor é compatível dentro de três intervalos de confiança com a literatura igual a 3,04nm [67]. Observe que com a adição de ligante o raio aumenta e em torno da razão 25 passa a se estabilizar. O raio de giro da HSA em presença de altas concentrações de [C₁₄MIM][Cl] se estabiliza em torno de $R_g=4,8\pm 0,1$ nm, valor igual ao da BSA em presença do mesmo ligante. Já em presença de TTAB o sistema se estabiliza em torno $R_g=4,5\pm 0,1$ nm, valor compatível com o sistema TTAB:BSA ($R_g=4,4\pm 0,1$ nm a partir da Figura 54).

4. Discussões

Kumari e colaboradores [68] investigaram a interação entre a proteína HSA e o líquido iônico catiônico BMOP (*N-butyl-N-methyl-2-oxopyrrolidinium bromide*), que contém um anel pirrólico e uma cadeia de 4 carbonos, através das técnicas de fluorescência, fluorescência resolvida no tempo, tensão superficial, condutividade, modelagem computacional (*molecular docking*), espectroscopia UV-Vis e FT-IR. A respeito de fluorescência os autores observaram supressão e deslocamento para o azul da emissão intrínseca, de 332nm para 316nm. Os autores concluíram que o processo de supressão é governado por 2 mecanismos, em baixa temperatura a supressão é colisional e em alta temperatura há uma combinação de supressão colisional e supressão devido à ligação. Os autores afirmam que o *blue-shift* está associado a um desenovelamento parcial e que a interação provoca a supressão simultaneamente. É importante mencionar que os termos foram adaptados conforme revisão de Callis [32] [33] e a discussão da Seção III.B.1.a) Supressão da fluorescência.

Kumari e colaboradores também observaram modificações na estrutura secundária da HSA através de uma pequena diminuição de α -hélice (de 52% para 50%) e aumento de folha- β (de 14% para 28%), fenômeno já observado com a HSA em presença de colesterol [69]. A modelagem computacional indicou um provável sítio de ligação em uma região hidrofóbica no sub-domínio IIA. O *docking* também indica que a interação hidrofóbica é a dominante no sistema.

O resultados que encontramos da interação entre a HSA e os LIs [C₁₄MIM][Cl], [C₁₂MIM][Cl] e [C₁₀MIM][Cl] estão de acordo com os observados por Kumari e colaboradores. Há deslocamento para o azul e supressão da fluorescência, modificações na estrutura secundária na presença de [C₁₄MIM][Cl] e aumento do raio de giro indicando o

desenovelamento parcial da proteína. O fato de os efeitos serem mais intensos quanto maior a cadeia carbônica também está de acordo com o protagonismo da interação hidrofóbica defendida pelos autores.

Gostaríamos de trazer uma ressalva e adicionar um paralelo com a discussão do sistema da BSA. Defendemos que o deslocamento do pico de emissão para menores comprimento de onda não está diretamente relacionado com o desenovelamento da proteína, embora de fato este ocorra conforme os dados de SAXS. Retomando as possibilidades levantadas para o *blue-shift* na discussão da BSA [63] [36]: (a) internalização do fluoróforo em uma região mais apolar, proveniente de um enovelamento da proteína; (b) deslocamento e distanciamento das moléculas de água gerando um ambiente relativamente menos polar na região do fluoróforo; (c) interação hidrofóbica entre a cadeia apolar dos LIS com o fluoróforo; (d) carga positiva nas proximidades do anel pirrólico do triptofano (ou negativa nas proximidades do anel benzeno). Podemos descartar (a) dado que vemos desenovelamento da HSA por SAXS; (b) e (c) serão mantidos como possibilidades, porque assim como no caso anterior, a presença dos LIS pode tanto diminuir a presença de moléculas de água na região como pode possibilitar a interação com o componente hidrofóbico do próprio LIS. Embora os dados de DM da BSA não nos mostrem uma interação forte entre a carga positiva do LI e o anel pirrólico do Trp mais interno (somente mostrou com Trp mais externo, ausente na HSA) ainda há essa possibilidade, portanto (d) também se mantém como possibilidade.

C. Interação entre líquidos iônicos e lisozima de clara de ovo de galinha

A proteína lisozima, como visto na seção I.B.3, possui grandes diferenças estruturais e de função em relação às proteínas apresentadas anteriormente. As proteínas BSA e HSA são proteínas transportadoras com aproximadamente 66kDa de massa, já a lisozima é uma proteína com atividade antimicrobiana e aproximadamente 14kDa. Conseqüentemente, o interesse no estudo da interação da lisozima com os líquidos iônicos pode estar em outro contexto, como na busca por sistemas que prolonguem a meia-vida ou aumentem a atividade da proteína. Ademais este estudo contribui para o conhecimento geral de base de como os líquidos iônicos interagem em sistemas biológicos.

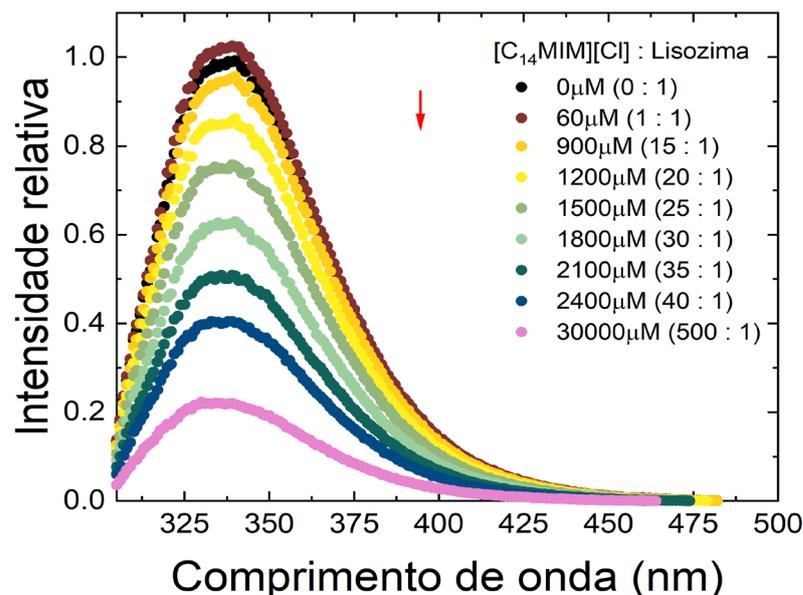
1. Influência dos LIs na absorção e emissão da Lisozima

Inicia-se nesta seção a exposição dos dados e discussão da interação entre líquidos iônicos e a proteína lisozima. Como explorado na Introdução deste trabalho, a lisozima é uma proteína relacionada com o sistema defensivo e têm aplicações na conservação de alimentos. É substancialmente menor que as proteínas anteriores e possui outras diferenças que serão destacadas ao longo do texto.

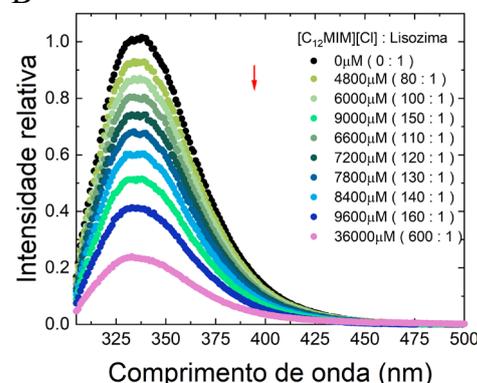
Lisozima+LI

Os espectros de fluorescência da proteína Lisozima em ausência e em presença dos LI $[C_{14}MIM][Cl]$, $[C_{12}MIM][Cl]$ e $[C_{10}MIM][Cl]$ podem ser apreciados na Figura 72A,B e C respectivamente. Enquanto os espectros de fluorescência da lisozima em ausência e presença do surfactante TTAB estão na Figura 74.

A



B



C

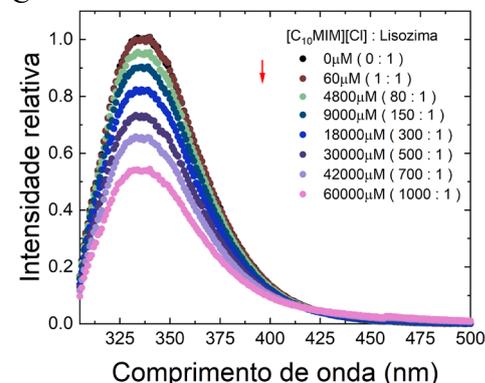


Figura 72: Espectro de intensidade de fluorescência relativa da proteína lisozima ($60\mu M$) em ausência e em presença de variadas concentrações de (A) $[C_{14}MIM][Cl]$, (B) $[C_{12}MIM][Cl]$ e (C) $[C_{10}MIM][Cl]$. Na legenda a concentração absoluta de LI e entre parênteses a razão molar. A seta vermelha indica o sentido geral do pico de emissão com o aumento da concentração de TTAB. Fluo Lisozima C14

Observe que os comportamentos dos espectros são diferentes dos apresentados com as proteínas BSA e HSA. Ainda há uma pronunciada supressão da fluorescência com a adição de LI, porém não há um deslocamento significativo do pico. Analisando os espectros de fluorescência da lisozima em ausência e em presença dos LI $[C_{12}MIM][Cl]$ e $[C_{10}MIM][Cl]$, Figura 72B e Figura 72C respectivamente, podemos observar que o mesmo ocorre. Há relevante supressão, sem deslocamento aparente do pico. A supressão nos induz a afirmar que há interação entre a proteína lisozima e os líquidos iônicos, porém a ausência do *blue-shift* indica que tal interação se difere da interação entre os LIs e a proteínas BSA e HSA. A intensidade da supressão pode ser melhor analisado a partir da Figura 73, que traz a razão entre a fluorescência em presença de LI e em ausência de LI.

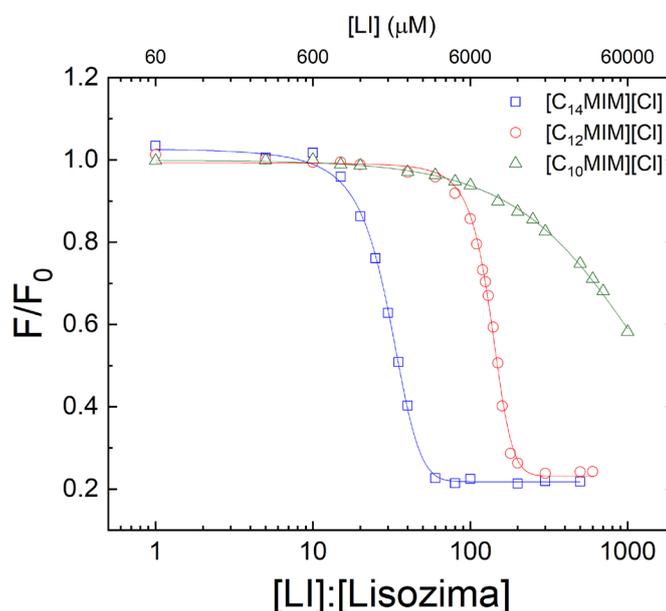


Figura 73: Razão entre intensidade de fluorescência em presença de supressor e ausência do supressor, F/F_0 , em função da razão molar entre líquido iônico e HSA. Curva desenhada para guiar os olhos.

O comportamento da razão F/F_0 para os LIs $[C_{14}MIM][Cl]$ e $[C_{12}MIM][Cl]$ são semelhantes. Ambas as curvas apresentam um *plateau* a baixas concentrações, diminuem bruscamente e tornam a formar um segundo *plateau* em maiores concentrações, embora a razão molar que se encerra o primeiro *plateau* e se inicia o segundo sejam diferentes. O LI $[C_{10}MIM][Cl]$ não apresentou o mesmo comportamento que os demais nas concentrações empregadas, há uma diminuição expressiva, porém o segundo *plateau* não está presente até a razão 1000.

Observe que semelhantemente aos casos anteriores, menor é concentração necessária de LI para causar a mesma supressão quanto maior é o tamanho da cadeia carbônica. Portanto o efeito hidrofóbico também é um fator importante para a interação entre os LIs e a lisozima.

A equação Stern-Volmer não forneceu um ajuste razoável para nenhum dos sistemas contendo Lisozima e LI. Podemos supor que a presença de 6 triptofanos trouxe tal impossibilidade.

Lisozima+TTAB

Já o comportamento da fluorescência da lisozima em presença do surfactante TTAB é diferente, como pode ser visto na Figura 73.

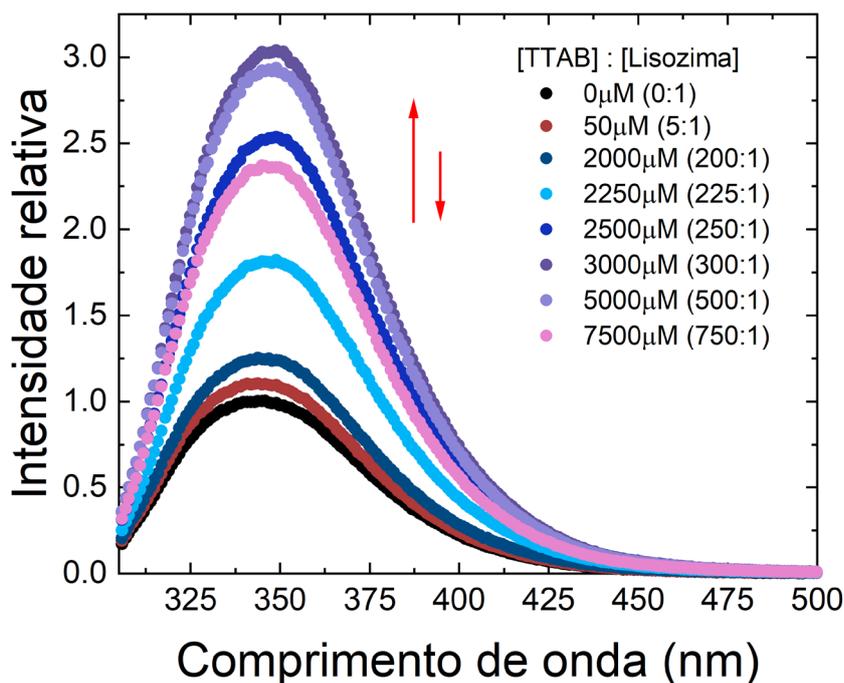


Figura 74: Espectro de intensidade de fluorescência relativa da proteína lisozima (10 μM) em ausência e em presença de variadas concentrações de TTAB. Na legenda a concentração absoluta de TTAB e entre parênteses a razão molar. A seta vermelha indica o sentido geral do pico de emissão com o aumento da concentração de TTAB.

A intensidade de fluorescência da lisozima aumenta até 3x na presença de TTAB, na razão 300 e passa a diminuir para concentrações maiores. Não há deslocamento significativo aparente. Os gráficos de F/F_0 e λ_{pico} da lisozima em presença de TTAB e $[C_{14}MIM][Cl]$ proporcionam melhor visualização da diferença dos fenômenos e estão presentes na Figura 75 A e B, respectivamente.

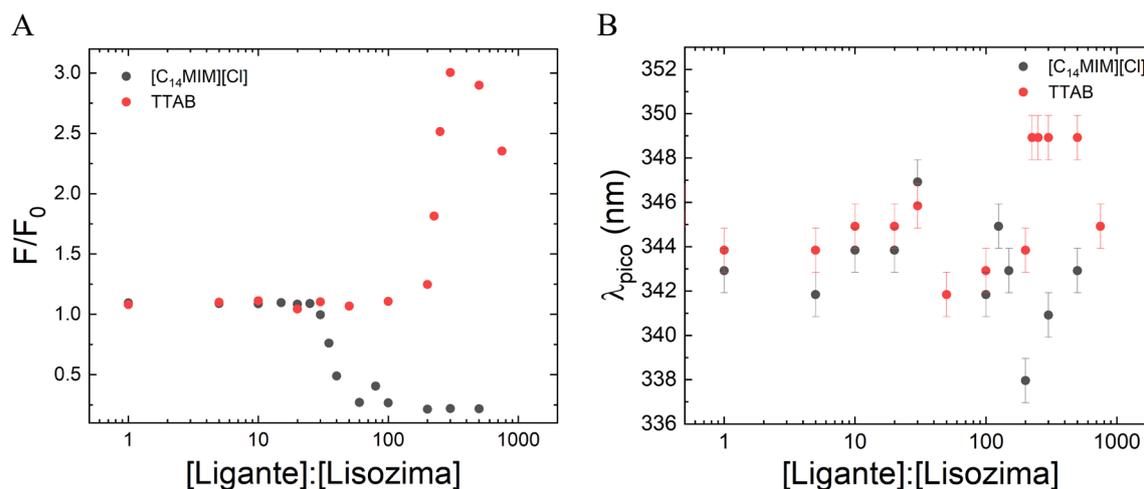


Figura 75:(A) Razão entre intensidade de fluorescência da lisozima em presença de supressor e ausência do supressor, F/F_0 , em função da razão molar entre ligante e lisozima ($[C_{14}MIM][Cl]$ e TTAB) (B) Comprimento de onda do pico de emissão em função da razão molar.

Observe que F/F_0 apresentam comportamento opostos, enquanto o LI $[C_{14}MIM][Cl]$ causa a supressão da fluorescência (mesmo efeito observado com as outras proteínas), o surfactante TTAB causa o aumento da intensidade de fluorescência. Na razão molar 200 entre TTAB e lisozima $F/F_0 = 3,0$, na mesma razão entre $[C_{14}MIM][Cl]$ e lisozima $F/F_0 = 0,2$. As variações mais pronunciadas também ocorrem em razões molares diferentes. A partir da razão 30 no sistema com o LI já é possível observar mudanças significativas em F/F_0 , enquanto somente na razão 200 de TTAB é possível notar tais variações.

O deslocamento do pico λ_{pico} não é tão relevante como nas proteínas anteriores. Há uma pequena variação para menores valores de λ_{pico} em presença de $[C_{14}MIM][Cl]$, de 343nm para 338nm, e uma variação para valores maiores de λ_{pico} em presença de TTAB, de 343nm para 349nm, ambas na razão 200.

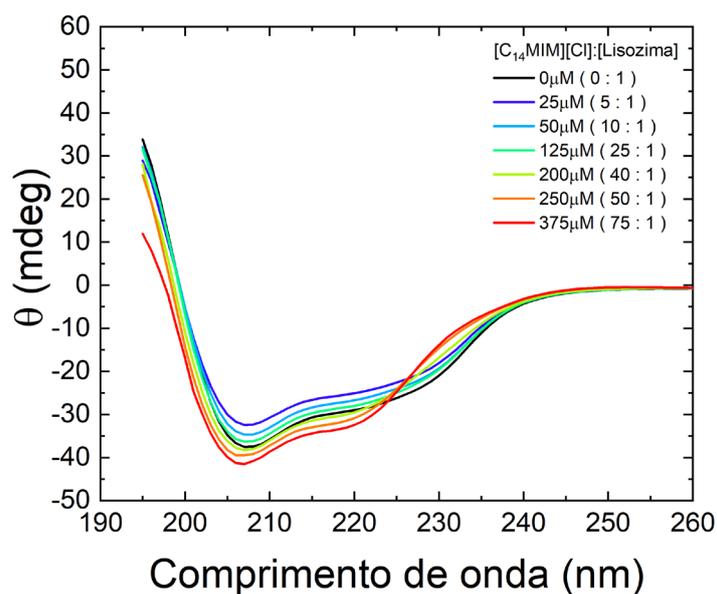
A lisozima é uma proteína que contém 6 triptofanos, portanto, a fluorescência observada é resultante da somatória de todos os triptofanos, tornando a análise mais complexa e de difícil individualização dos resíduos de Trp nos efeitos do espectro de emissão de fluorescência.

O aumento da intensidade de fluorescência sem deslocamento significativo do comprimento de onda do pico de emissão é um fenômeno curioso. Uma possibilidade que levantamos é a diminuição da auto supressão da lisozima guiada pela presença de TTAB. Tal discussão será melhor abordada posteriormente. Este ponto, no entanto, precisa ser melhor explorado.

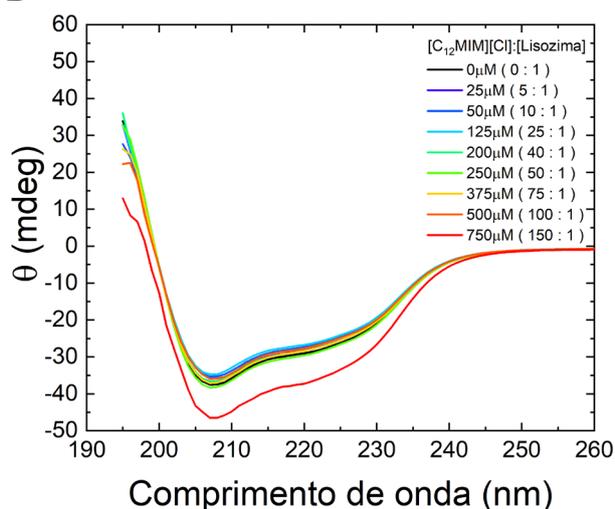
2. Efeito dos LIs na estrutura secundária da Lisozima

Os espectros de CD em ausência e presença de LI podem ser apreciados na Figura 76. A partir da Figura 76A podemos observar que com a adição de 25 μ M [C₁₄MIM][Cl] há um pequeno aumento da curva como um todo (diminuição do vale), aumentando a concentração LI a curva torna a diminuir nos comprimentos de onda menores que 220nm, enquanto na região em torno de 230nm o aumento persiste. O aumento do vale em 220nm nos indica um aumento da estrutura secundária tipo α -hélice, enquanto a diminuição do vale em 230nm pode estar relacionado com a diminuição de estruturas tipo folha- β .

A



B



C

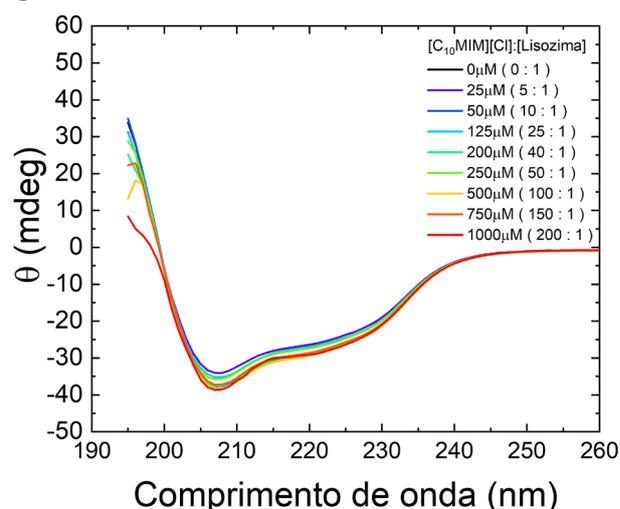


Figura 76: Espectros de CD da proteína Lisozima em ausência e presença dos líquidos iônicos (A) [C₁₄MIM][Cl], (B) [C₁₂MIM][Cl] e (C) [C₁₀MIM][Cl].

Em presença do LI $[C_{12}MIM][Cl]$ existem pequenas variações da curva até a razão 150 onde há uma pronunciada diminuição da curva como um todo, principalmente na região em torno de 208nm, indicando aumento da estrutura alfa-hélice. Em presença do LI $[C_{10}MIM][Cl]$ há pequenas oscilações para todas as concentrações.

3. Efeito dos LIs na estrutura terciária da Lisozima

Para melhor compreender os efeitos dos LIs na estrutura terciária da lisozima realizamos medidas de SAXS. As curvas de espalhamento de raios-x a baixo ângulo da proteína lisozima em ausência e presença de $[C_{14}MIM][Cl]$ e de TTAB podem ser apreciadas na Figura 77 e Figura 78, respectivamente.

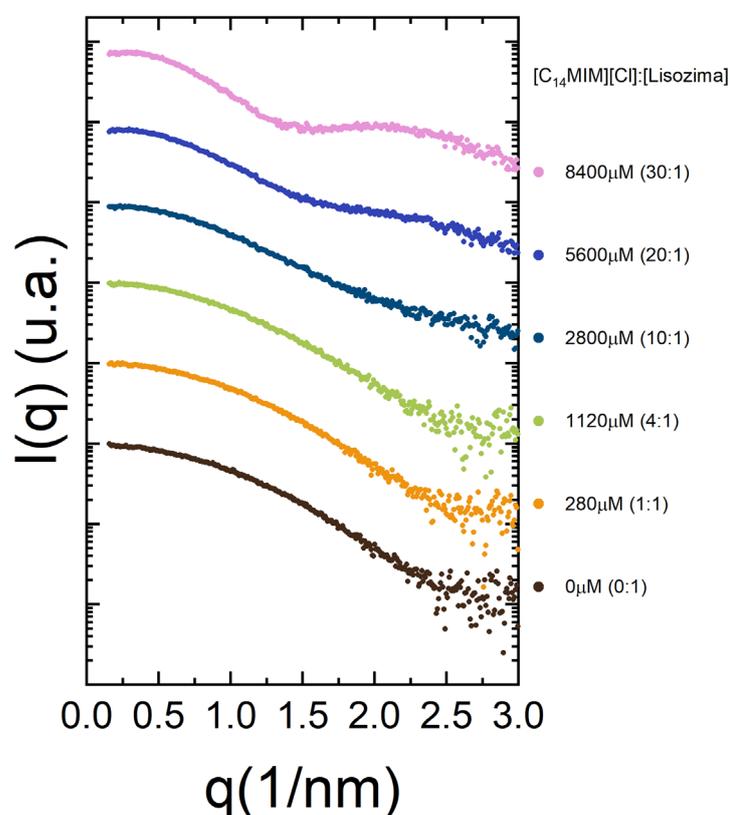


Figura 77: Intensidade de espalhamento de SAXS do sistema contendo lisozima em ausência e presença de variadas concentrações de $[C_{14}MIM][Cl]$.

Diferentemente dos casos anteriores o início da curva, região de Guinier, $q < 0,5 \text{ nm}^{-1}$, não sofre grandes alterações com a adição de LI, porém, assim como nos sistemas anteriores com $[C_{14}MIM][Cl]$, há a formação de um pico na região de $q = 2,25 \text{ nm}^{-1}$, na razão 20, que se desloca para $q = 2,0 \text{ nm}^{-1}$ na razão 30, ou concentrações igual a $5600 \mu\text{M}$ e $8400 \mu\text{M}$ respectivamente.

As curvas de SAXS da proteína lisozima em ausência e em presença do surfactante TTAB podem ser apreciadas na Figura 78.

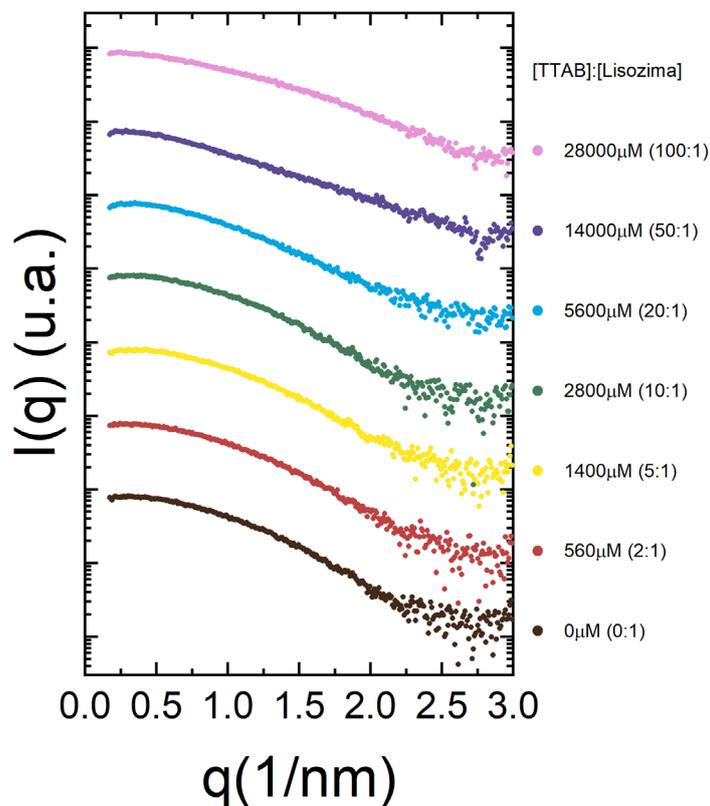


Figura 78: Intensidade de espalhamento de SAXS do sistema contendo lisozima em ausência e presença de variadas concentrações de TTAB.

Com a adição de TTAB é possível observar uma pequena modificação na região de Guinier e não há evidências de formação de um pico até a razão molar igual a 50. O raio de giro do sistema lisozima em ausência e presença dos ligantes TTAB e $[C_{14}MIM][Cl]$ pode ser apreciado na Figura 79.

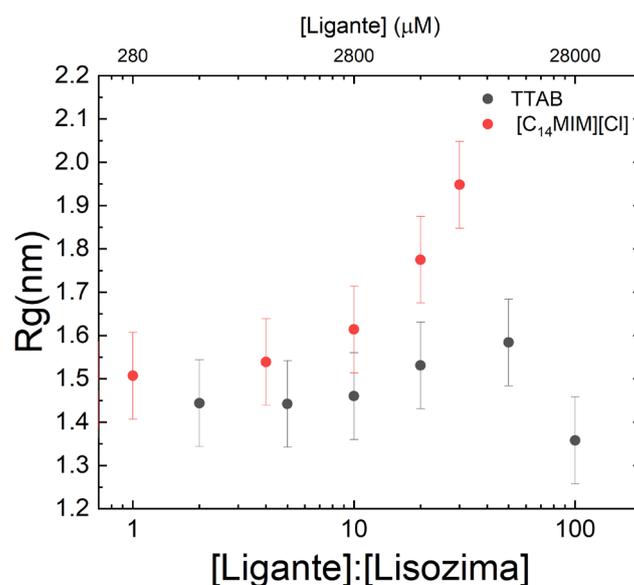


Figura 79: Raio de giro dos sistemas contendo lisozima em presença de variadas concentrações de TTAB e [C₁₄MIM][Cl] (conforme a legenda) em função da razão molar.

O raio de giro da proteína em ausência de ligante é igual a $1,45 \pm 0,10$ nm, compatível com o valor da literatura em torno de 1,38 nm [70]. Observe que há aumento do raio de giro com a adição de LI até $1,95 \pm 0,10$ nm na razão molar 30. O aumento de 0,5 nm representa aproximadamente 34% do valor inicial, é um aumento considerável, porém menor quando comparado com as proteínas anteriores, 71% para BSA e 45% para HSA, considerando os valores na estabilização. Repare, entretanto, que não observamos uma estabilização para o valor do raio de giro da lisozima em presença de [C₁₄MIM][Cl]

Já em presença de TTAB não há aumento significativo, somente oscilação positiva até $1,58 \pm 0,10$ nm na razão molar 50 e uma diminuição para $1,36 \pm 0,10$ nm na razão 100. Tal comportamento se difere das outras proteínas, que embora apresentassem um aumento de raio de giro em presença de TTAB menor que em presença de [C₁₄MIM][Cl], ainda é um aumento significativo.

Os gráficos de Kratky estão presentes na Figura 80 e na Figura 81.

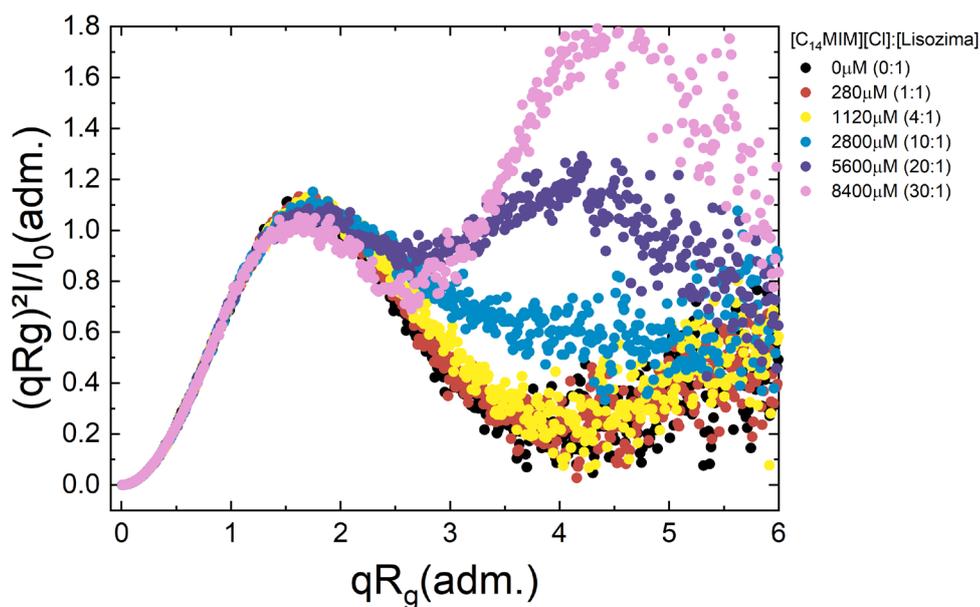


Figura 80: Curva de Kratky normalizada do sistema contendo lisozima em ausência e em presença de variadas concentrações de $[C_{14}MIM][Cl]$.

A curva da Lisozima em ausência de ligante apresenta uma forma de sino, com pico em $(x;y)=(1,5;1,15)$, caracterizando uma proteína enovelada em seu estado nativo. Com a adição $[C_{14}MIM][Cl]$ há pequenas variações no pico e a formação de um segundo pico bem pronunciado em torno de $qR_g=4,5$ para concentrações de LI maiores que $2800\mu M$. Este segundo pico pode indicar a presença de estruturas tipo *core-shell*. A baixa variação da curva na região do primeiro pico pode nos indicar pouca mudança na estrutura enovelada da proteína.

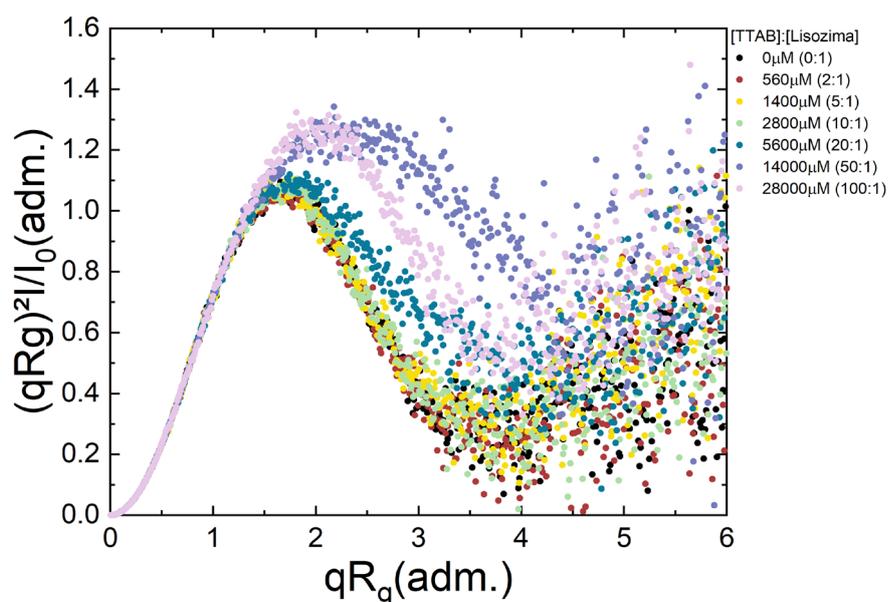


Figura 81: Curva de Kratky normalizada do sistema contendo lisozima em ausência e em presença de variadas concentrações de TTAB.

As curvas de Kratky da lisozima em ausência e em presença de TTAB mostram um aumento e deslocamento do pico, partindo de $(x;y)=(1,5;1,15)$ em ausência de ligante e atingindo $(x;y)=(1,2;1,24)$ na razão 50. O perfil em forma de sino ainda se mantém parcialmente mesmo com deslocamento e aumento do pico, nos indicando um aumento de flexibilidade da proteína, porém ainda com uma estrutura globular. Os gráficos contendo $p(r)$ da lisozima em ausência de $[C_{14}MIM][Cl]$ e TTAB podem ser apreciados na Figura 82A e na Figura 82B, respectivamente.

Em presença de $[C_{14}MIM][Cl]$ é possível observar a formação de um segundo pico pronunciado em torno de $r=3,5nm$, já em presença de TTAB a forma da curva pouco varia na razão 10 e há a formação de um pequeno pico em torno de $r=4,2nm$ para maiores concentrações.

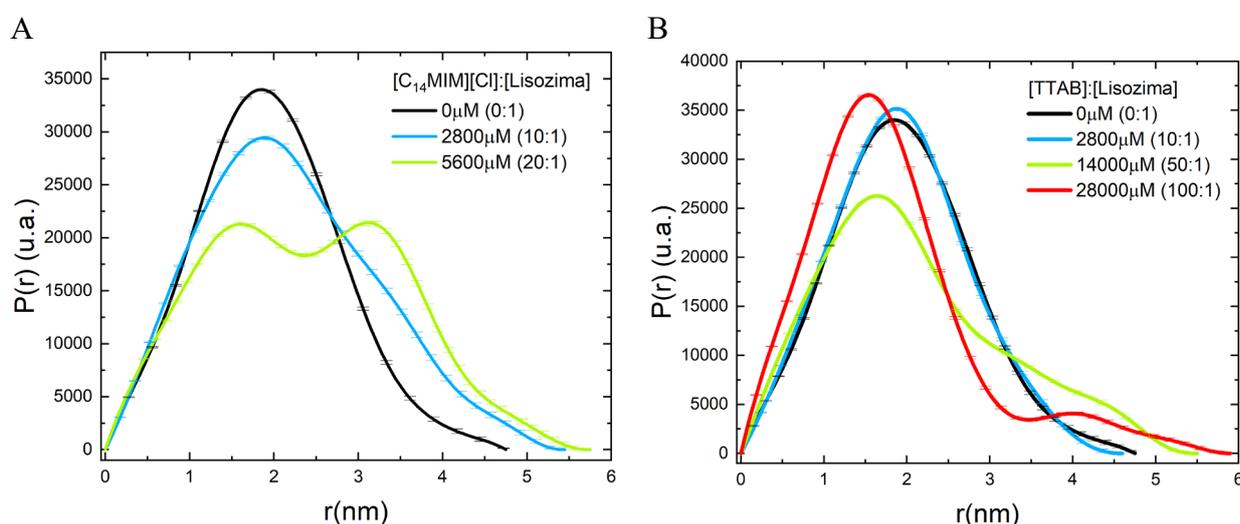


Figura 82: $P(r)$ da lisozima em presença de (A) $[C_{14}MIM][Cl]$ e (B) TTAB.

Os envelopes da lisozima em ausência de ligante e em presença de TTAB e C14 podem ser apreciados na Figura 83.

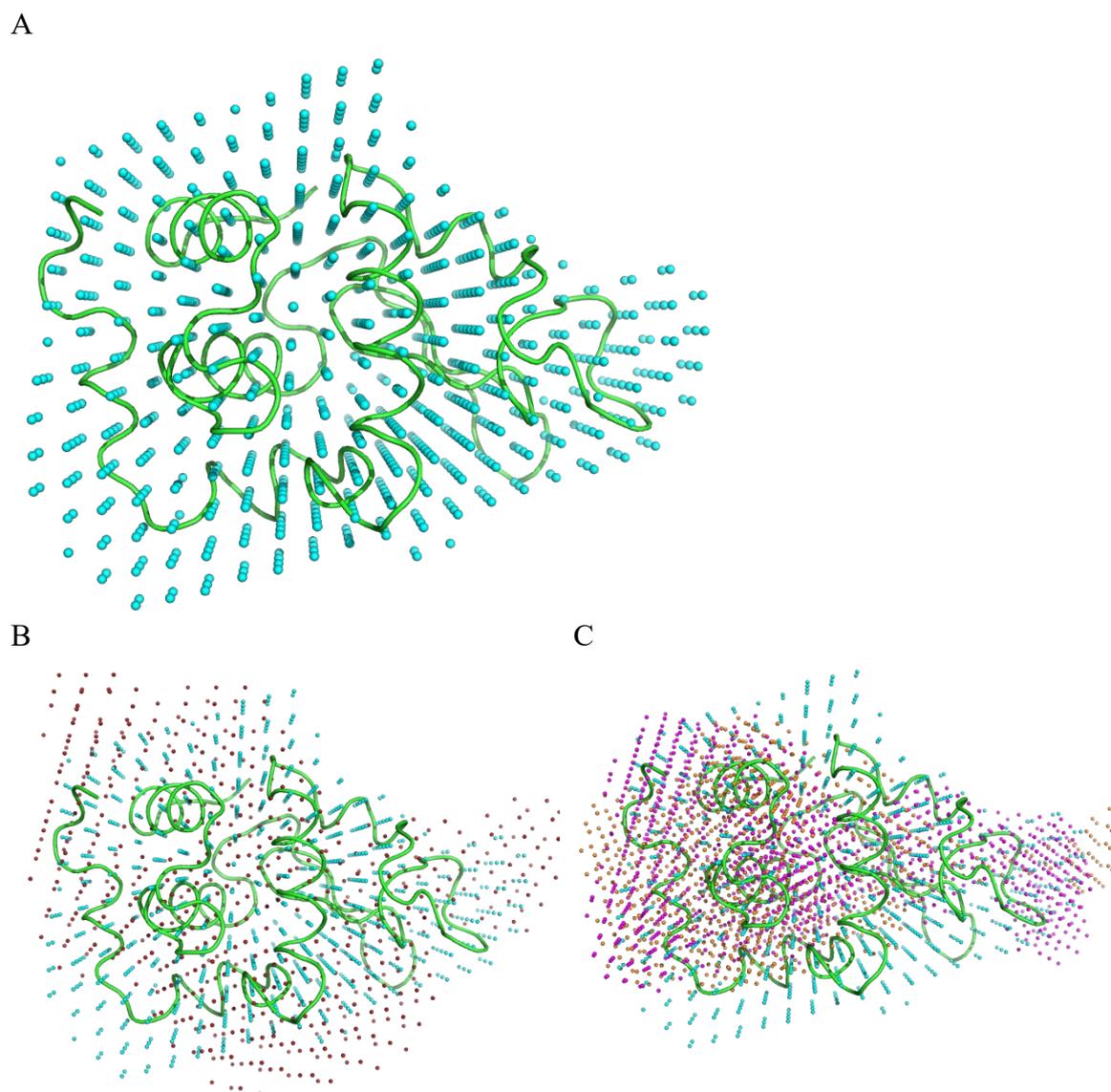


Figura 83: Envelopes da proteína Lisozima com estrutura cristalográfica (verde) e (A) em ausência de ligantes (ciano), (B) em presença de $[C_{14}MIM][Cl]$ na razão mola 20 e (C) em presença de TTAB nas razões molares 50 (magenta) e 100 (laranja).

Os envelopes indicam uma estrutura menos compacta em presença de $[C_{14}MIM][Cl]$, porém não associada a um aumento de flexibilidade ou desenovelamento, dada as curvas de Kratky. Podemos atribuir o aumento do raio de giro e aumento do envelope a presença de moléculas ou estruturas de líquido iônico à superfície da proteína. Já o envelope do sistema contendo TTAB não demonstra grande aumento de volume, porém uma flexibilização de sítios da proteína.

4. Discussões

O comportamento da proteína lisozima em presença de LI diferiu significativamente em relação às proteínas anteriores, assim como o comportamento da lisozima em presença de TTAB. A proteína lisozima é muito menor que as outras proteínas, BSA e HSA possuem aproximadamente o dobro de raio de giro e quatro vezes o peso molar da lisozima.

Qi Han e colaboradores [71] estudaram a interação da lisozima com 4 líquidos iônicos com cátions que se diferenciam pelo tamanho de cadeia carbônica (2, 4, 6 e 8 carbonos) e mesmo ânion, são eles EAN (*ethylammonium nitrate*), BAN(*butylammonium nitrate*), HAN (*hexylammonium nitrate*) e OAN(*octylammonium nitrate*), respectivamente, que são chamados de PIL (*protic ionic liquid*). Utilizando a técnica de SAXS os autores afirmam que há formação de nanoestruturas em solução a partir de 10 %mol BAN, 5 %mol HAN e 1 %mol OAN e um pequeno aumento do raio de giro de 15Å para 16Å em presença de 0,5%mol ou 1%mol de PIL. Esse pequeno aumento, sob nosso olhar, pode ser considerado uma variação, dada a incerteza instrumental da técnica SAXS. Porém, é atribuído ao ânion que, segundo os autores, é mais relevante à interação em baixas concentrações de PIL. Já para concentrações maiores, foi observado o aumento do raio de giro até aproximadamente 20Å em presença de 50%mol EAN e 5%mol de HAN, tornando a lisozima parcialmente desnovelada. Os autores observaram modificações na estrutura secundária da proteína em presença de HAN e OAN, onde há perda de α -hélice e formação de folha- β , indicando a influência da cadeia carbônica longa e a relevância da interação hidrofóbica.

Yang Sun e colaboradores [72] sugerem de forma bem detalhada um caminho da interação da lisozima com o surfactante aniônico SDS (*sodium dodecyl sulfate*) através de 5 estágios e a formação de uma estrutura chamada micelas decoradas. No primeiro estágio a cabeça polar se liga a sítios positivamente carregados da proteína e a neutralização desta diminui a repulsão eletrostática entre as estruturas facilitando a formação de complexos e agregados. Neste estágio são observados *blue-shift* e *quenching* através da fluorescência, *blue-shift* é atribuído à ligação da cadeia carbônica nas proximidades dos triptofanos mais expostos ao meio tornando o ambiente mais hidrofóbico e o *quenching* é atribuído ao contato direto do grupo sulfato com o orbital- π dos resíduos triptofano e tirosina. A proteína é levemente desnovelada e expõe mais sítios hidrofóbicos que agora estão disponíveis a SDS.

O segundo estágio é caracterizado por uma interação cooperativa que leva ao desenovelamento da proteína e à formação de micelas de SDS decoradas. A ligação inicial de SDS na superfície da proteína deixa exposta a cadeia carbônica e facilita a formação de micelas nessas regiões, desta forma há a formação de micelas que podem inclusive possuir mais de uma proteína na superfície. O interior da micela decorada é composto pela cadeia carbônica dos surfactantes enquanto a casca é composta pelas proteínas e cabeça polar do surfactante. No terceiro estágio as moléculas de SDS adicionadas se ligam à proteína de forma a torná-la mais rígida. As micelas ligadas a duas macromoléculas de lisozima se esgotam e há formação de novas micelas para “dividir” as proteínas, neste estágio o interior da micela decorada se mantém, mas a casca se torna mais fina, isto é, a quantidade de proteína por micela diminui. Desta forma, a proteína recupera parte da estrutura nativa, *quenching* e *blue-shift* diminuem. No quinto e último estágio 50 moléculas de SDS compõem o interior da micela que é decorada por 1 monômero de lisozima em estado globular, há a saturação da interação e formação de micelas livres em solução.

Observando mais atentamente os dados de SAXS, embora tenhamos visto um aumento de raio de $1,5\text{nm}$ até $2,0\text{nm}$ da lisozima em presença de $[\text{C}_{14}\text{MIM}][\text{Cl}]$, como Qi Huan [71], o gráfico de Kratky e a curva de espalhamento nos indicam uma proteína que permanece globular e há a formação de estrutura tipo micelas em solução. Portanto, o modelo de micelas decoradas proposto por Yang Sun [72] é mais consistente com nossos resultados. Ademais, os dados de fluorescência nos indicam que há interação entre a proteína e o LI. Portanto iremos supor um mecanismo de interação semelhante, embora não tenhamos condição de verificar todos os estágios descritos pelos autores.

Já a lisozima em presença de TTAB demonstrou maior flexibilidade sem aumento significativo do raio de giro e sem a formação de estruturas micelares em solução, pelo menos não neste intervalo de concentração. O aumento da intensidade de fluorescência nos indica que há interação entre lisozima e TTAB.

Quanto à fluorescência, a supressão do triptofano pelo LI $[\text{C}_{14}\text{MIM}][\text{Cl}]$ é esperada dado que o anel imidazol é um poderoso supressor do triptofano, o que de fato ocorre com a lisozima. Porém neste sistema não vimos mudanças significativas no comprimento de onda do pico de emissão, o que pode significar que ou os triptofanos não experimentam mudanças na polaridade do meio ou na somatória da emissão dos 6 triptofanos esses efeitos sejam suprimidos. Já o aumento consistente da fluorescência da lisozima em presença de TTAB

necessita melhor investigação e para isso chamaremos a atenção para um efeito minoritário dos outros sistemas, antes ignorado.

Observe que em presença de baixíssimas concentrações de [C₁₄MIM][Cl], razão molar igual a 1, há um pequeno aumento na fluorescência da lisozima, Figura 72. Tal fenômeno também ocorre com a proteína BSA e HSA na razão 0,2, porém muito menos evidente, como pode ser visto na Figura 41 e na Figura 67. Tal aumento pôde ser desprezado pois representa um aumento de 1%, portanto ainda compatível com a fluorescência total em ausência de LI. Em outras palavras, o primeiro ponto, na menor concentração de LI diferente de zero, o valor de F/F_0 é maior que 1, embora ainda compatível com 1. Em todos esses casos há posterior diminuição consistente da fluorescência ao adicionar ligante. O aumento da fluorescência não é discutido de forma clara na literatura, sendo normalmente associado a modificações na estrutura terciária ou a maior exposição do Trp [73] [74] ao solvente. Gostaríamos de adicionar algumas possibilidades para o aumento da fluorescência em um âmbito geral:

(a) O aminoácido triptofano doa elétrons com facilidade e por isso pode ser facilmente suprimido, inclusive pode sofrer supressão de outros aminoácidos ou de pontes de dissulfeto no interior da própria proteína, fenômeno conhecido como autossupressão [33] [75]. A autossupressão pode ser diminuída causando o aumento da fluorescência.

(b) Maior excitação da sonda fluorescente.

(c) Transferência de energia entre resíduos aromáticos fluorescentes, da tirosina para o triptofano, por exemplo.

(d) A formação de uma estrutura fluorescente, como o complexo triptofano+ligante, que possui maior intensidade de emissão.

Podemos descartar a opção (d) dado que temos evidências que a presença de LI diminui a emissão do triptofano. Podemos descartar a opção (c) dado que optamos por excitar a amostra em 295nm excitando somente o triptofano e não os outros resíduos fluorescentes. A hipótese (b) pode ser verificada através da absorbância das amostras. Como discutido anteriormente as variações da absorbância em 295nm pode ser explicada pela variação em 350nm, isto é, pela turbidez, portanto não há indícios de aumento da excitação do triptofano. Não iremos descartar (b) mas continuemos a exploração.

Considerando (a), como poderíamos modificar a autossupressão das proteínas? E no caso dos LIs em presença de BSA e HSA, como essa mudança ocorre somente em concentração muito baixas de LI e de forma quase imperceptível?

Uma possível resposta é que ao adicionarmos os ligantes também estamos adicionando íons em solução, consequentemente a força iônica aumenta. O aumento da força iônica pode modificar a estrutura da proteína [76]. Modificações na autossupressão é uma hipótese possível, observe, por exemplo, na Figura 84, a estrutura primária da proteína lisozima com os aminoácidos e as pontes de dissulfeto em destaque. Interações, ou modificações, que flexibilizem a proteína, principalmente nas regiões de ponte de dissulfeto terão impacto direto na emissão dos triptofanos nas proximidades. Repare que não estamos sugerindo a quebra das pontes dissulfeto, somente flexibilização nessas regiões. Portanto a interação das proteínas com íons provenientes dos ligantes pode modificar a estrutura a ponto de diminuir a autossupressão e aumentar a emissão. Com a adição de ligante outras interações ocorrerão, sobrepondo esse efeito ou não. Desta forma a hipótese (a) é plausível.

Consideraremos, a priori, que a interação entre os LIs e a proteína lisozima também se dá em ao menos três estágios, embasado na razão da intensidade de fluorescência, Figura 73. Embora seja uma evidência mais fraca quando compararmos com os sistemas anteriores, nos proporciona paralelos interessantes com a literatura.

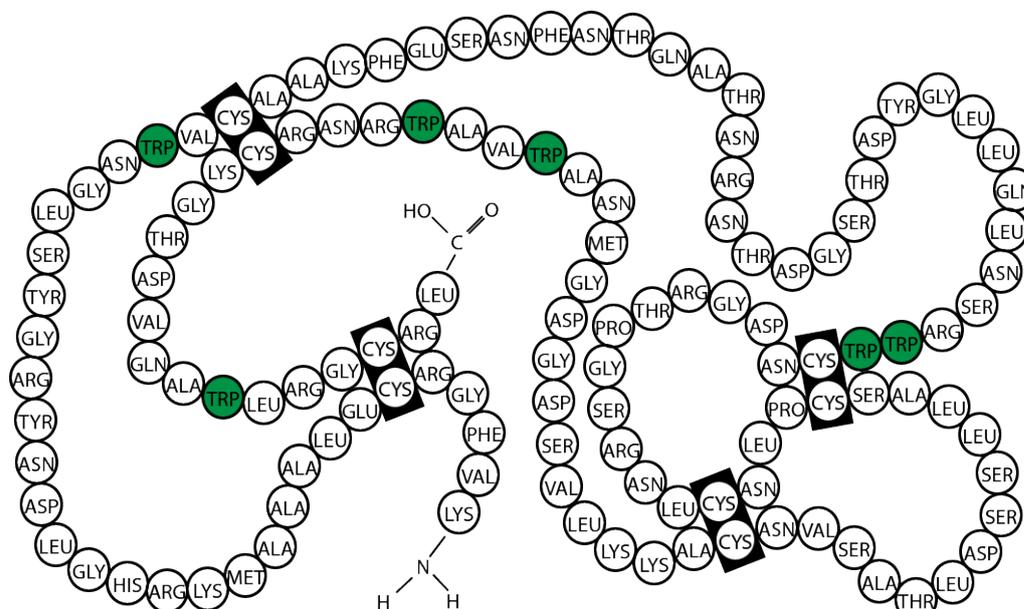


Figura 84: Estrutura primária da proteína lisozima. Triptofanos marcados em verde e ligações disulfeto em retângulo preto. Figura editada de Hamdani e colaboradores [77], Copyright 2023, com permissão de Elsevier (<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.060>).

Considerando então que todas as proteínas estudadas possuem ao menos 3 estágios de interação com os LIs. Iremos adicionar um detalhe ao estágio inicial da interação das proteínas com os LIs e surfactante, neste estágio há uma pequena reestruturação das proteínas em função das cargas adicionadas, como defendido por Qi Huan [71], os contra-íons são mais relevantes nesse primeiro momento. Essa reestruturação pode promover a diminuição da auto-supressão dos triptofanos e aumento da emissão. Concomitantemente há a aproximação dos líquidos iônicos ou surfactante através de forças eletrostáticas em sítios de ligação. Os ligantes por serem compostos por uma cadeia carbônica se tornam sítios de ligação para outras moléculas de ligante, desta forma uma interação cooperativa se iniciará no segundo estágio. Temos nesse momento algumas diferenciações.

Vimos que as moléculas de $[C_{14}MIM][Cl]$ interagem fortemente com o triptofano mais externo da BSA, promovendo supressão e deslocamento do pico, também vimos um desenovelamento parcial, interação cooperativa, formação de grandes aglomerados e de micelas em solução. Já a proteína lisozima não demonstrou grande desenovelamento.

O $[C_{14}MIM][Cl]$ causou supressão na lisozima, porém sem deslocamento do pico de emissão de fluorescência e houve pouca variação na flexibilidade da proteína, portanto iremos supor que as moléculas de LI interagem superficialmente com a lisozima e expõe a cadeia carbônica de forma a promover a formação de micelas, sem grandes alterações estruturais na própria proteína, formando uma estrutura tipo micela decorada como descrito por Yang Sun [72]. Já o surfactante TTAB causou o aumento da fluorescência em quase toda a extensão de concentração, portanto iremos supor que a presença do surfactante promoveu a flexibilização da proteína, diminuindo a autossupressão, enquanto o TTAB não demonstra boa capacidade de supressão da lisozima e não há indícios de formação aglomerados ou micelas.

VI. Conclusão

Resgatando o objetivo principal deste trabalho, podemos afirmar que foram apresentados resultados e discussões suficientes para elencarmos um possível mecanismo de ação da interação entre as proteínas BSA, HSA e lisozima e os líquidos iônicos imidazólicos (LIs) em meio aquoso, assim como as modificações estruturais que as proteínas demonstraram durante a interação.

Propomos que os mecanismos da interação entre os LIs e a proteína BSA são análogos entre os LIs e a proteína HSA. Tal afirmação se baseia nos resultados experimentais. Ambos os sistemas apresentaram supressão da fluorescência e descolamento do pico de emissão para menores comprimento de onda. Utilizando SAXS observamos aumento do raio de giro, perda da forma de seno no gráfico de Kratky e formação de pico indicativo de estruturas tipo-micelas com o aumento da concentração de LI, em ambos os sistemas. As estruturas secundárias de ambas as proteínas podem sofrer modificações em sentido de diminuir a quantidade de estrutura tipo α -hélice com a adição de LI de maior cadeia carbônica. Os dois sistemas apresentaram grandezas cujo comportamento pôde ser descrito por uma curva de Boltzman, indicando ao menos três momentos (inicial, transição e final).

Considerando os resultados apresentados e estudos publicados sobre sistemas semelhantes concluímos que o modelo que melhor abarca o presente estudo descreve a interação em três estágios. Devido à pouca variação das grandezas à baixa concentração de LI, o primeiro estágio consiste em uma interação relativamente baixa, que não provoca mudanças estruturais e conformacionais nas proteínas. O primeiro estágio é movido por efeito hidrofóbico e principalmente por efeito eletrostático. As proteínas apresentam carga líquida oposta a carga da cabeça polar dos LIs, desta forma há aproximação dessas moléculas à superfície, podendo afastar moléculas de água. As mudanças são mínimas, o único efeito relevante nesse cenário é a possibilidade de haver mudanças na autossupressão das proteínas, gerando um pequeno aumento na emissão, mas que deve ser analisado mais a fundo através de um estudo específico.

No segundo estágio da interação mais moléculas de LI são adicionadas e agora o efeito hidrofóbico passa a ser mais relevante. Como há moléculas surfactantes na superfície da proteína, há, portanto, a formação de regiões hidrofóbicas propensas a receber mais moléculas surfactantes, desta forma há uma interação cooperativa. As moléculas de água

foram deslocadas dessas regiões e regiões hidrofóbicas das proteínas, que antes estavam interiorizadas, passam a ficar mais expostas à moléculas de LI, constituindo assim sítios de ligação. Nesse estágio observamos grandes variações dos parâmetros estudados. Um dos sítios de ligação possível é próximo ao triptofano 312. Segundo os resultados da dinâmica molecular, o triptofano 312 interage consistentemente com uma molécula de LI, o que pode ser confirmado com os resultados de fluorescência. O posicionamento do anel imidazólico do LI (positivo), mais próximo do anel pirrólico que do benzeno do triptofano, causa aumento da energia do fóton emitido pelo triptofano. Tal aumento é verificado pelo deslocamento para o azul do espectro de fluorescência com o aumento da concentração para o azul. O aumento da energia emitida também pode ser explicado pelo afastamento das moléculas de água na região. Conjuntamente é observada a supressão da fluorescência, o que também é efeito da aproximação do imidazol do triptofano.

Ainda neste segundo estágio, a exposição de sítios hidrofóbicos da proteína ocorre através de um desenovelamento parcial da mesma, observado pelo aumento do raio de giro e perda da forma de sino da curva de Kratky. Os resultados da dinâmica molecular e os envelopes obtidos por SAXS nos levam a supor que o domínio III das proteínas se torna mais flexível em relação aos outros, aumentando a dinâmica da proteína e diminuindo parcialmente a quantidade de estrutura secundária tipo α -hélice, confirmado por dicróismo circular. Os sítios hidrofóbicos expostos e moléculas de LI nos sítios de ligação podem promover a formação de agregados de proteínas.

O aumento da concentração de LI leva a formação de micelas em solução dando início ao terceiro estágio. A saturação da interação ocorre, as moléculas de LI adicionada irão constituir micelas. Há formação de micelas na superfície das proteínas e em solução, como observado pela dinâmica molecular. O excesso de LI agora favorece a formação de micelas e desfavorece a formação de agregados de proteína, podendo desfazer os agregados proteicos formados anteriormente. Neste estágio o raio de giro está estabilizado, não há mais modificações no espectro de emissão e é possível observar a formação de pico no espalhamento de SAXS, fortalecendo a hipótese de formação de micelas.

Os estágios descritos nos trechos anteriores são definidos pela concentração de LI e pelo componente apolar. Quanto maior a cadeia carbônica, menor a concentração necessária para gerar os efeitos discutidos, reafirmando a importância do efeito hidrofóbico para a interação.

A interação entre os LIs e a proteína lisozima deve seguir um diferente mecanismo. A carga líquida da lisozima é positiva, assim como é o íon dos LIs, desta forma espera-se que a interação seja menos favorecida. Ademais a lisozima não é uma proteína de transporte como a BSA e HSA, características que se demonstraram fundamentais para a interação. Porém, ainda sim houve interação e a supressão da fluorescência nos leva a supor que também ocorre em três estágios.

Propomos que no primeiro estágio a interação é fraca, o efeito eletrostático se dá mais entre os contra-íons dos LIs e a lisozima, podendo modificar e diminuir a autossupressão da proteína. Com o aumento da concentração dos LIs em solução há a aproximação em pequenos sítios hidrofóbicos diminuindo a repulsão eletrostática, é dada assim o início da segunda etapa. A segunda etapa é caracterizada por uma interação cooperativa entre os LIs na superfície da proteína, gerando supressão da lisozima, já as modificações estruturais não são relevantes como nos casos anteriores, mas existem. Temos indícios de aumento do raio de giro e aumento na estrutura tipo alfa-hélice. Há a formação de micelas com a lisozima está posicionada na região polar, voltada para o solvente, constituindo assim a estrutura tipo micela decorada. O terceiro estágio inicia com a formação de micelas em solução, coexistindo com as micelas decoradas. A literatura traz a possibilidade tanto de haver mais de uma proteína por micela decorada, como micelas compartilhando a mesma proteína.

A partir desses estudos há algumas possibilidades. As proteínas BSA e HSA demonstraram uma interação interessante com os líquidos iônicos, e estes, por formarem estruturas organizadas são possíveis *pockets* para drogas com componentes hidrofóbicos. Essas proteínas, por serem proteínas de transporte, podem aumentar a difusão e o tempo dessas drogas no sistema. Porém, como observado, os LIs causam modificações estruturais, que podem comprometer a função das proteínas, portanto a toxicidade deve ser considerada.

Acreditamos que o trabalho apresentado contribui para o entendimento da interação dos líquidos iônicos com as proteínas BSA, HSA e lisozima e seus mecanismos de ação. Através deste também é possível elencar as características mais relevantes a serem consideradas no *design* de líquidos iônicos dado o contexto e objetivo da aplicação.

VII. Referências

- [1] Jimenez-Gonzalez, Concepcion and Ponder, Celia S. and Broxterman, Quirinus B. and Manley, Julie B., “Using the Right Green Yardstick: Why Process Mass Intensity Is Used in the Pharmaceutical Industry To Drive More Sustainable Processes,” *Organic Process Research & Development*, vol. 15, pp. 912-917, 2011.
- [2] Cornelia S. Buettner and Alice Cognigni and Christian Schröder and Katharina Bica-Schröder, “Surface-active ionic liquids: A review,” *Journal of Molecular Liquids*, vol. 347, p. 118160, 2022.
- [3] R. A. Pizzi, “Jons Jakob Berzelius. This Swedish researcher helped consolidate the transformation of chemistry from art to science,” *TODAY’S CHEMIST AT WORK*, pp. 54-57, December 2004.
- [4] Adan Hart-Davis ... [et al.], *O livro da ciência*, São Paulo: Globo, 2016.
- [5] Charles Tanford and Jacqueline Reynolds, *Nature's Robots: A History of Proteins*, Oxford University Press, 2004.
- [6] Proust, “Recherches sur le principe qui assaisonne les fromages,” *Ann. chim. phys.*, vol. 10, pp. 29-49, 1819.
- [7] R. J. Block, “Some Amino Acids, Peptides and Amines in Milk, Concentrated Milks and Cheese,” *Journal of Dairy Science*, vol. 34, p. 1–10, 1951.
- [8] T. M. Devlin, *Manual de bioquímica com correlações clínicas*, São Paulo: Blucher, 2011.
- [9] Stadtman T. C., “Selenocysteine,” *Annual review of biochemistry*, vol. 65, p. 83–100, 1996.
- [10] D. Cojocari, “Molecular structures of the 21 proteinogenic amino acids,” 2010. [Online]. Available:
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Molecular_structures_of_the_21_proteinogenic_amino_acids.svg. [Acesso em 15 01 2023].
- [11] “Proteinogenic Amino Acid Table,” 2022. [Online]. Available:
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Proteinogenic_Amino_Acid_Table.png. [Acesso em 15 01 2023].
- [12] C. M. Dobson, “Protein folding and misfolding,” *Nature*, vol. 426, pp. 884-890, 2003.

- [13] E. Reynaud, “Protein Misfolding and Degenerative Diseases,” *Nature Education*, 2010.
- [14] “Main protein structures levels,” [Online]. Available: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Main_protein_structure_levels_en.svg. [Acesso em 05 02 2023].
- [15] Charbonneau, David M. and Tajmir-Riahi, Heidar-Ali, “Study on the Interaction of Cationic Lipids with Bovine Serum Albumin,” *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 114, pp. 1148-1155, 2010.
- [16] Theodore Peters, *All About Albumin*, San Diego: Academic Press, 1995.
- [17] Molodenskiy, Dmitry and Shirshin, Evgeny and Tikhonova, Tatiana and Gruzinov, Andrey and Peters, Georgy and Spinozzi, Francesco, “Thermally induced conformational changes and protein–protein interactions of bovine serum albumin in aqueous solution under different pH and ionic strengths as revealed by SAXS measurements,” *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 19, pp. 17143-17155, 2017.
- [18] Barbosa LR, Ortore MG, Spinozzi F, Mariani P, Bernstorff S, Itri R, “The importance of protein-protein interactions on the pH-induced conformational changes of bovine serum albumin: a small-angle X-ray scattering study,” *Biophys J.*, vol. 98, pp. 147-157, 2010.
- [19] Bujacz, A., Bujacz, G., “Crystal Structure of Bovine Serum Albumin,” RCSB PDB, 13 05 2012. [Online]. Available: <https://www.rcsb.org/structure/4F5S>. [Acesso em 15 02 2023].
- [20] Ananyo A Bhattacharya and Tim Grüne and Stephen Curry, “Crystallographic analysis reveals common modes of binding of medium and long-chain fatty acids to human serum albumin,” *Journal of Molecular Biology*, vol. 303, pp. 721-732, 2000.
- [21] Tiziana Silveti and Stefano Morandi and Martin Hintersteiner and Milena Brasca, “Chapter 22 - Use of Hen Egg White Lysozyme in the Food Industry,” em *Egg Innovations and Strategies for Improvements*, San Diego, Academic Press, 2017, pp. 233-242.
- [22] R. Diamond, “Real-space refinement of the structure of hen egg-white lysozyme,” *Journal of Molecular Biology*, vol. 82, pp. 371-391, 1974.
- [23] Sheng, Long and Wang, Jing and Huang, Mengjie and Xu, Qi and Ma, Meihu, “The changes of secondary structures and properties of lysozyme along with the egg storage,” *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 92, p. 600 – 606, 2016.
- [24] Egorova, Ksenia S. and Gordeev, Evgeniy G. and Ananikov, Valentine P., “Biological Activity of Ionic Liquids and Their Application in Pharmaceuticals and Medicine,” *Chemical Reviews*, vol. 117, pp. 7132-7189, 2017.

- [25] “Electromagnetic spectrum,” [Online]. Available: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Electromagnetic_spectrum_-pt.svg. [Acesso em 17 01 2023].
- [26] Francisco Caruso, Vitor Oguri, Física Moderna: Origens clássicas e Fundamentos Quânticos, Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.
- [27] J. R. Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, Third ed., Baltimore, Maryland: Springer, 2006.
- [28] Nathan R. Zaccai, Igor N. Serdyuk and Joseph Zaccai, Methods in Molecular Biophysics: Structure, Dynamics, Function for Biology and Medicine, Cambridge: Cambridge University Press, 2007.
- [29] Francis A. Jenkins and Harvey E. White, Fourth Edition, Fundamentals of Optics, The McGraw-Hill Companies, Inc., 1965.
- [30] “Transmittance,” [Online]. Available: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Transmittance.svg>. [Acesso em 17 01 2023].
- [31] hyperphysics, “The interaction of radiation with matter,” [Online]. Available: <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/mod3.html>. [Acesso em 17 01 2023].
- [32] P. R. Callis, “Binding phenomena and fluorescence quenching. I: Descriptive quantum principles of fluorescence quenching using a supermolecule approach,” *Journal of Molecular Structure*, vol. 1077, pp. 14-21, 2014.
- [33] P. R. Callis, “Binding phenomena and fluorescence quenching. II: Photophysics of aromatic residues and dependence of fluorescence spectra on protein conformation,” pp. 22-29, 2014.
- [34] K. Azreena Bakar e S. Rizal Feroz, “A critical view on the analysis of fluorescence quenching data for determining ligand–protein binding affinity,” *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 223, p. 117337, 2019.
- [35] Marco van de Weert and Lorenzo Stella, “Fluorescence quenching and ligand binding: A critical discussion of a popular methodology,” *Journal of Molecular Structure*, vol. 998, pp. 144-150, 2011.
- [36] Callis, James T. Vivian and Patrik R., “Mechanisms of Tryptophan Fluorescence Shifts in Proteins,” *Biophysical Journal*, vol. 80, pp. 2093-2109, 2001.

- [37] Šmidlehner, T.; Piantanida, I.; Pescitelli, G. Beilstein, “Polarization spectroscopy methods in the determination of interactions of small molecules with nucleic acids – tutorial,” *J. Org. Chem.*, vol. 14, pp. 84-105, 2018.
- [38] Thomas Warwick, “An Introduction to Circular Dichroism Part 2: Circular Dichroism Practice,” [Online]. Available: <https://bitesizebio.com/59809/circular-dichroism-sample-preparation/>. [Acesso em 05 04 2023].
- [39] “Photophysics,” [Online]. Available: <https://www.photophysics.com/faqs/methods-techniques/cd-units-faqs/>. [Acesso em 12 05 2023].
- [40] “Dichroweb,” [Online]. Available: <http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/userguide.shtml>. [Acesso em 12 05 2023].
- [41] Miles, Andrew J. and Ramalli, Sergio G. and Wallace, B. A., “DichroWeb, a website for calculating protein secondary structure from circular dichroism spectroscopic data,” *Protein Science*, vol. 31, pp. 37-46, 31.
- [42] A. Bhogale and N. Patel and J. Mariam and P.M. Dongre and A. Miotello and D.C. Kothari, “Comprehensive studies on the interaction of copper nanoparticles with bovine serum albumin using various spectroscopies,” *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 113, pp. 276-284, 2014.
- [43] Aldo Craievich, “Small angle x-ray scattering. (Basic Aspects),” 2008. [Online]. Available: <https://indico.ictp.it/event/a07145/session/44/contribution/27/material/0/0.pdf>. [Acesso em 16 01 2023].
- [44] Manalastas-Cantos, Karen and Konarev, Petr V. and Hajizadeh, Nelly R. and Kikhney, Alexey G. and Petoukhov, Maxim V. and Molodenskiy, Dmitry S. and Panjkovich, Alejandro and Mertens, Haydyn D. T. and Gruzinov, Andrey and Borges, Clemente and Jeffries, Cy, “ATSAS 3.0: expanded functionality and new tools for small-angle scattering data analysis,” *Journal of Applied Crystallography*, vol. 54, pp. 343-355, 2021.
- [45] de Oliveira Neto, Mario and de Freitas Fernandes, Adriano and Piiadov, Vassili and Craievich, Aldo Felix and de Araújo, Evandro Ares and Polikarpov, Igor, “SAXSMoW 3.0: New advances in the determination of the molecular weight of proteins in dilute solutions from SAXS intensity data on a relative scale,” *Protein Science*, vol. 31, pp. 251-258, 2022.
- [46] Svergun D.I., “Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria,” *J. Appl. Crystallogr.*, vol. 25, pp. 495-503, 1992.

- [47] A. Guinier, “La diffraction des rayons X aux très petits angles : application à l'étude de phénomènes ultramicroscopiques,” *Ann. Phys*, 1939.
- [48] Putnam, Christopher D. and Hammel, Michal and Hura, Greg L. and Tainer, John A., “X-ray solution scattering (SAXS) combined with crystallography and computation: defining accurate macromolecular structures, conformations and assemblies in solution,” *Quarterly Reviews of Biophysics*, p. 191–285, 2007.
- [49] Dmitri I Svergun and Michel H J Koch, “Small-angle scattering studies of biological macromolecules in solution,” *Reports on Progress in Physics*, vol. 66, p. 1735, 2003.
- [50] Petr V. Konarev and Dmitri I. Svergun, “Direct shape determination of intermediates in evolving macromolecular solutions from small-angle scattering data,” *IUCrJ*, vol. 5, pp. 402-409, 2018.
- [51] Darya A. Kuznetsova and Dinar R. Gabdrakhmanov and Svetlana S. Lukashenko and Dzhigangir A. Faizullin and Yuriy F. Zuev and Irek R. Nizameev and Marsil K. Kadirov and Denis M. Kuznetsov and Lucia Ya. Zakharova, “Interaction of bovine serum albumin with cationic imidazolium-containing amphiphiles bearing urethane fragment: Effect of hydrophobic tail length,” *Journal of Molecular Liquids*, vol. 307, p. 113001, 2020.
- [52] Sonia F. Santos and Dino Zanette and Hannes Fischer and Rosangela Itri, “A systematic study of bovine serum albumin (BSA) and sodium dodecyl sulfate (SDS) interactions by surface tension and small angle X-ray scattering,” *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 262, pp. 400-408, 2003.
- [53] Dominique Durand, Corinne Vivès, Dominique Cannella, Javier Pérez, Eva Pebay-Peyroula, Patrice Vachette and Franck Fieschi, “NADPH oxidase activator p67phox behaves in solution as a multidomain protein with semi-flexible linkers,” *Journal of Structural Biology*, vol. 169, pp. 45-53, 2010.
- [54] T. Bizien, D. Durand, P. Roblina, A. Thureau, P. Vachette e J. Pérez, “A Brief Survey of State-of-the-Art BioSAXS,” *Protein & Peptide Letters*, vol. 23, pp. 217-231, 2016.
- [55] Trehwella J, Duff AP, Durand D, Gabel F, Guss JM, Hendrickson WA, Hura GL, Jacques DA, Kirby NM, Kwan AH, Pérez J, Pollack L, Ryan TM, Sali A, Schneidman-Duhovny D, Schwede T, Svergun DI, Sugiyama M, Tainer JA, Vachette P, Westbrook J, Whitten AE, “2017 publication guidelines for structural modelling of small-angle scattering data from biomolecules in solution: an update,” *Acta crystallographica. Section D, Structural biology*, vol. 73, pp. 710-728, 2017.

- [56] Rosangela Itri, Wilker Caetano, Leandro R. S. Barbosa and Mauricio S. Baptista, “Effect of Urea on Bovine Serum Albumin in Aqueous and Reverse Micelle Environments Investigated by Small Angle X-Ray Scattering, Fluorescence and Circular Dichroism,” *Brazilian Journal of Physics*, vol. 34, pp. 58-63, 2004.
- [57] G. Scanavachi and Y.R. Espinosa and J.S. Yoneda and R. Rial and J.M. Ruso and R. Itri, “Aggregation features of partially unfolded bovine serum albumin modulated by hydrogenated and fluorinated surfactants: Molecular dynamics insights and experimental approaches,” *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 572, pp. 9-21, 2020.
- [58] “The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8,” © Schrodinger LLC, 2015.
- [59] Borzova, Vera A. AND Markossian, Kira A. AND Chebotareva, Natalia A. AND Kleymentov, Sergey Yu. AND Poliansky, Nikolay B. AND Muranov, Konstantin O. AND Stein-Margolina, Vita A. AND Shubin, Vladimir V. AND Markov, Denis I. AND Kurganov, Boris I., “Kinetics of Thermal Denaturation and Aggregation of Bovine Serum Albumin,” *PLOS ONE*, pp. 1-29, 2016.
- [60] Concetta Giancola and Cira De Sena and Dimitrios Fessas and Giuseppe Graziano and Guido Barone, “DSC studies on bovine serum albumin denaturation Effects of ionic strength and SDS concentration,” *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 20, pp. 193-204, 1997.
- [61] D Kelley and D.J McClements, “Interactions of bovine serum albumin with ionic surfactants in aqueous solutions,” *Food Hydrocolloids*, vol. 17, pp. 73-85, 2003.
- [62] Madaeni, S.S., Rostami, E., “Spectroscopic Investigation of the Interaction of BSA with Cationic Surfactants,” *Chemical Engineering & Technology*, vol. 31, p. 1265–1271, 2008.
- [63] Gurbir Singh and Tejwant Singh Kang, “Ionic Liquid Surfactant Mediated Structural Transitions and Self-Assembly of Bovine Serum Albumin in Aqueous Media: Effect of Functionalization of Ionic Liquid Surfactants,” *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 119, pp. 10573-85, 2015.
- [64] Chudzik, Mariola, Małgorzata Maciążek-Jurczyk, Bartosz Pawełczak, and Anna Sułkowska, “Spectroscopic Studies on the Molecular Ageing of Serum Albumin,” *Molecules*, vol. 22, 2017.
- [65] Shanshan Zhang and Xuerui Chen and Shiping Ding and Qunfang Lei and Wenjun Fang, “Unfolding of human serum albumin by gemini and single-chain surfactants: A

- comparative study,” *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 495, pp. 30-38, 2016.
- [66] A. Ahmed Ouameur, R. Marty, H.A. Tajmir-Riahi, “Human serum albumin complexes with chlorophyll and chlorophyllin,” *Biopolymers*, vol. 77, pp. 129-136, 2005.
- [67] Merzougui, C.E., Roblin, P., Aimar, P., Venault, A., Chang, Y., Causserand, C., Bacchin, P., “Pearl-necklace assembly of human serum albumin with the poly(acrylic acid) polyelectrolyte investigated using small angle X-ray scattering (SAXS),” *Soft Matter*, vol. 16, p. 9964–9974, 2020.
- [68] Meena Kumari and Jitendra Kumar Maurya and Munazzah Tasleem and Prashant Singh and Rajan Patel, “Probing HSA-ionic liquid interactions by spectroscopic and molecular docking methods,” *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 138, pp. 27-35, 2014.
- [69] Abu Teir, M.M. and Ghithan, J. and Darwish, S. and Abu-Hadid, M.M., “Multi-spectroscopic investigation of the interactions between cholesterol and human serum albumin,” *Journal of Applied Biological Sciences*, vol. 6, pp. 45-55, 2012.
- [70] Voets, Ilja K. and Cruz, Willeberg A. and Moitzi, Christian and Lindner, Peter and Arêas, Elizabeth P. G. and Schurtenberger, Peter, “DMSO-Induced Denaturation of Hen Egg White Lysozyme,” *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 114, pp. 11875-11883, 2010.
- [71] Han, Q., Broomhall, H. C., Vieira Veríssimo, N., Ryan, T. M., Drummond, C. J., Pereira, J. F. B., and Greaves, T. L., “Protic Ionic Liquid Cation Alkyl Chain Length Effect on Lysozyme Structure,” *Molecules*, p. 984, 2022.
- [72] Sun, Yang and Filho, Pedro L. O. and Bozelli, José C. and Carvalho, Juliana and Schreier, Shirley and Oliveira, Cristiano L. P., “Unfolding and folding pathway of lysozyme induced by sodium dodecyl sulfate,” *Soft Matter*, vol. 11, pp. 7769-7777, 2015.
- [73] Zhongyang Ren and Yaqing Cui and Yueqi Wang and Linfan Shi and Shen Yang and Gengxin Hao and Xujian Qiu and Yanyan Wu and Yongqiang Zhao and Wuyin Weng, “Effect of ionic strength on the structural properties and emulsion characteristics of myofibrillar proteins from hairtail (*Trichiurus haumela*),” *Food Research International*, vol. 157, p. 111248, 2022.

- [74] Javed Masood Khan and Ajamaluddin Malik and Mohammad Z. Ahmed, “Bimolecular interaction of zwitterionic surfactant with hen egg white lysozyme (HEWL): A biophysical study,” *Journal of King Saud University - Science*, vol. 1, p. 101674, 2022.
- [75] Hennecke, Jens and Sillen, Alain and Huber-Wunderlich, Martina and Engelborghs, Yves and Glockshuber, Rudi, “Quenching of Tryptophan Fluorescence by the Active-Site Disulfide Bridge in the DsbA Protein from *Escherichia coli*,” *Biochemistry*, vol. 36, pp. 6391-6400, 1997.
- [76] Lianzhou Jiang and Zhongjiang Wang and Yang Li and Xianghe Meng and Xiaonan Sui and Baokun Qi and Linyi Zhou, “Relationship Between Surface Hydrophobicity and Structure of Soy Protein Isolate Subjected to Different Ionic Strength,” *International Journal of Food Properties*, vol. 18, pp. 1059-1074, 2015.
- [77] Afshan Mumtaz Hamdani and Idrees Ahmed Wani and Naseer Ahmad Bhat and Raushid Ahmad Siddiqi, “Effect of guar gum conjugation on functional, antioxidant and antimicrobial activity of egg white lysozyme,” *Food Chemistry*, vol. 240, pp. 1201-1209, 2018.
- [78] “COMPOUNDCHEM,” 2014. [Online]. Available: <https://www.compoundchem.com/2014/09/16/aminoacids/>. [Acesso em 15 01 2023].
- [79] “BIONINJA,” [Online]. Available: <https://ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-2-molecular-biology/24-proteins/amino-acids.html>. [Acesso em 15 01 2023].