

Título do projeto

Pesquisas mediante SAXS/WAXS de materiais nanoestruturados

Projeto de pesquisa CNPq - Processo: 402613/2007-4

Coordenador: Aldo F. Craievich

craievich@if.usp.br

“Pesquisas mediante SAXS/WAXS de materiais nanoestruturados”

Coordenador: Aldo F. Craievich
Laboratório de Cristalografia
Departamento de Física Aplicada
Instituto de Física
Universidade de São Paulo

I - Resumo do projeto original

O projeto de pesquisa aprovado correspondente ao Edital CNPq/MCT no.10/2007 para melhoria da infra-estrutura laboratorial em nanotecnologia teve como objetivo a ampliação da capacidade do Laboratório de Cristalografia (LCr) do Instituto de Física da USP para análise estrutural de diferentes materiais, compreendendo materiais cerâmicos mesoporosos, ligas metálicas com propriedades magneto-ópticas importantes para armazenamento de informação, nanoestruturas com poços quânticos, colóides, sistemas auto-organizados e materiais de interesse biológico. O projeto foi apoiado por 26 pesquisadores de várias instituições de pesquisa no país e no exterior.

O equipamento solicitado e adquirido foi um Nanostar, fabricado pela Bruker, que permite realizar medições de espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS) e de espalhamento de raios X a altos ângulos (WAXS). O aparelho consiste de um tubo de raios X, com radiação $K\alpha$ do Cu ($\lambda = 0,15418$ nm), de 1,5kW, colimado por um sistema de espelhos de Gobel e um conjunto de 3 fendas, fornecendo um feixe de seção quase pontiforme. A câmara porta-amostra tem um grande volume, o que permite a utilização de diferentes tipos de suporte para amostras, atendendo assim a diferentes demandas dos usuários. O detector de raios X para SAXS é multifilar, bidimensional e sensível à posição. A detecção de raios X nas experiências de WAXS é feita com uma placa de imagem (“image plate”).

II - Instalação

O Laboratório de Cristalografia (LCr) teve suas instalações de rede elétrica, hidráulica e lógica adaptadas para receber o Nanostar no período de 11 a 22 de agosto de 2008. O equipamento foi montado no fim de agosto e comissionado na primeira semana de setembro de 2008 com o auxílio de um técnico alemão e de um técnico brasileiro da Bruker.

Participaram do comissionamento os Profs. Aldo F. Craievich, Elizabeth Andreoli de Oliveira e Márcia C.A. Fantini, os dois técnicos do LCr (Antonio Carlos Franco e Sergio da

Silva), que se revezam no atendimento a usuários, e dois estudantes de pós-graduação do grupo (Rebeca Bacani e Leandro R.S. Barbosa).

A Figura 1(a) mostra o equipamento principal já instalado no LCr e a Figura 1b exibe a leitora de placa de imagem, IP, para medidas de WAXS.

Logo após a instalação do equipamento, os dois estudantes do LCr iniciaram testes com amostras de interesse de seus respectivos projetos e se familiarizaram com o equipamento, principalmente com seu *software* de comando e análise. A estudante Rebeca Bacani passou a confeccionar uma Manual de Uso do equipamento em português, o qual se encontra disponível na página do LCr (<http://www.if.usp.br/cristal/>).

(a)



(b)



Fig. 1: (a) Vista lateral do aparelho de SAXS e WAXS Nanostar instalado no LCr. DE esquerda a direita observa-se o suporte do tubo de raios X, o alojamento dos espelhos de Gobbel, os posicionadores dos conjuntos de colimadores, a câmara porta-amostra, o caminho de vácuo e o detetor sensível à posição multifilar. (b) Vista parcial do aparelho principal e, a direita, acessório leitor de image plate.

III - Manutenção

A verificação das condições de operação e calibração do equipamento são realizadas semanalmente, pelos dois técnicos do LCr, que medem o espalhamento sem amostra (Figura 2 (a)), o espalhador padrão de uma amostra de carbono vítreo (Figura 2 (b)) e o padrão de calibração de distância de AgBh (Figura 2 (c)). As Figuras 2 (a),(b) e (c) mostram esses resultados para medidas feitas em diferentes datas. Nesse procedimento verifica-se também a curva de resposta do detector.

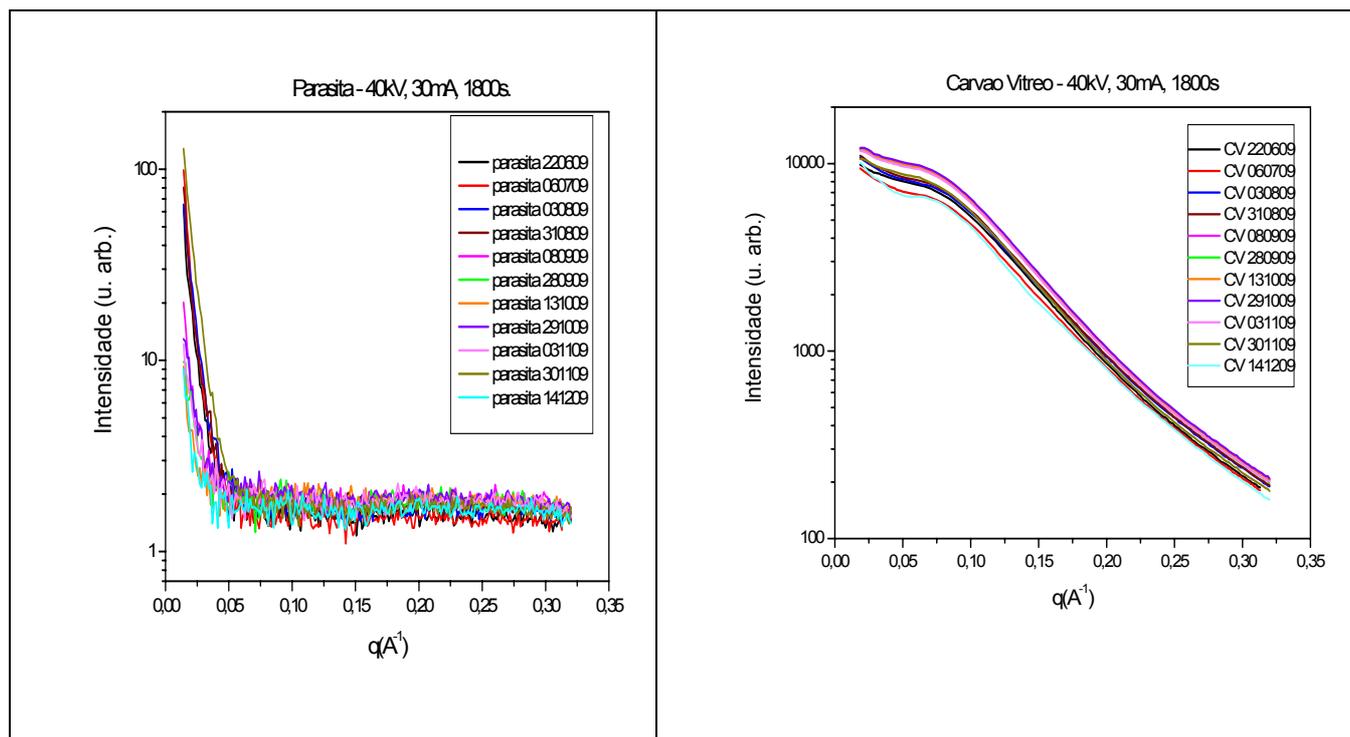


Figura 2(a): Espalhamento parasita. Figura 2(b): Espalhamento de carbono vítreo (CV)

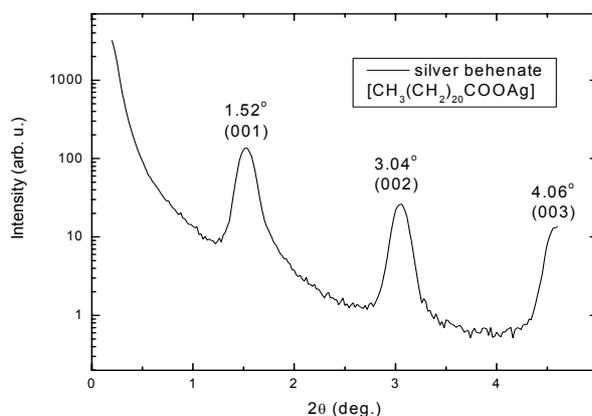


Fig. 2(c): Difração do padrão de silver behenate obtido no Nanostar (03/08/09) indexado de acordo com T. C. Huang et al., *J. Appl. Cryst.* (1993). 26, 180-184. *X-ray Powder Diffraction Analysis of Silver Behenate, a Possible Low-Angle Diffraction Standard.*

IV - Formação e treinamento de usuários

A prioridade para o início das atividades de pesquisa nesse equipamento foi ministrar um curso sobre os fundamentos teóricos e experimentais da técnica SAXS/WAXS, aos usuários, bem como começar o treinamento prático de uso do novo equipamento.

Com esses objetivos foi montado o “Curso de Treinamento de Usuários do Nanostar”, ministrado entre 15 e 19 de dezembro de 2008 no IFUSP, cujo programa e cronograma é mostrado na Tabela 1. Assistiram ao curso 44 pesquisadores, entre professores, técnicos e estudantes.

Tabela 1: Programa do “Curso de Treinamento de Usuários do Nanostar”

	Segunda feira 15 dez, 2008	Terça feira, 16 dez, 2008	Quarta feira 17 dez. 2008	Quinta feira 18 dez 2008	Sexta feira 19 dez 2008
9:00-10:00	Teoria básica de SAXS (Aldo, Auditório Sul)	Princípios básicos. Ótica e detetor do NanoStar (Aldo, Auditório Sul)	Exemplos de aplicações de SAXS ao estudo de sóis e géis (Celso, Auditório Sul)	SAXS por soluções concentradas. Aspectos básicos (Rosangela, Auditório Sul)	Painéis dos projetos de pesquisa dos usuários (Auditório A. de Moraes)
10:15-11:15	Introdução à operação do NanoStar (I) (Márcia, Rebeca, Auditório Sul)	Aplicações gerais de SAXS (Aldo, Auditório Sul)	Análise dos dados da Experiência 1 (I) (Guinther, Auditório Sul)	Exemplos de análise de curvas de SAXS de soluções coloidais concentradas. (Rosangela, Auditório Sul)	
11:30-12:30	Introdução à operação do NanoStar (II) (Márcia, Rebeca, Auditório Sul)	SAXS/WAXS por materiais inorgânicos (Guinther, Auditório Sul)	Análise dos dados da Experiência 1 (II) (Guinther, Auditório Sul)	Treinamento prático do Grupo 10 (Laboratório de Cristalografia)	Treinamento prático do Grupo 12 (Laboratório de Cristalografia)
14:00-15:00	Treinamento prático do Grupo 1 (Laboratório de Cristalografia)	Treinamento prático do Grupo 5 (Laboratório de Cristalografia)	SAXS por proteínas em solução. Programas de análise (Mario, Auditório Sul)	Análise dos dados da Experiência 2 (I) (Mario, Auditório Sul)	Análise dos dados da Experiência 3 (I) (Rosangela, Auditório Abrahão de Moraes)
15:00-16:00	Treinamento prático do Grupo 2 (Laboratório de Cristalografia)	Treinamento prático do Grupo 6 (Laboratório de Cristalografia)	Treinamento prático do Grupo 8 (Laboratório de Cristalografia)	Análise dos dados da Experiência 2 (II) (Mario, Auditório Sul)	Análise dos dados da Experiência 3 (II) (Rosangela, Auditório Abrahão de Moraes)
16:00-17:00	Treinamento prático do Grupo 3 (Laboratório de Cristalografia)	Treinamento prático do Grupo 7 (Laboratório de Cristalografia)	Treinamento prático do Grupo 9 (Laboratório de Cristalografia)	Treinamento prático do Grupo 11 (Laboratório de Cristalografia)	Procedimento para o acesso ao NanoStar (Márcia, Auditório Abrahão de Moraes)
17:00-18:00	Treinamento prático do Grupo 4 (Laboratório de Cristalografia)	Experiência 1: SAXS e WAXS por nanocristais em vidros (Guinther)	Experiência 2: SAXS por soluções diluídas de proteínas (Mário)	Experiência 3: SAXS de sistemas concentrados (Rosangela, Laboratório de Cristalografia)	Encerramento e entrega de Certificados de Participação (Auditório A. de Moraes)

O curso foi montado na grade mostrada na Tabela 1 com os seguintes palestrantes: Aldo F. Craievich, professor (IFUSP), Márcia C.A. Fantini, professora (IFUSP), Rosangela Itri, professora (IFUSP), Celso V. Santilli, professor (IQ-UNESP, Araraquara), Guinther Kellerman,

pós-doutor (LNLS), Mário de Oliveira Neto, pós-doutor (IFSC-USP), Rebeca Bacani, aluna de mestrado (IFUSP).

O curso contou com aulas expositivas, três experiências referentes a diferentes temas realizadas no Nanostar e analisadas pelos respectivos professores, além do treinamento específico de operação do equipamento. Na aula de treinamento, grupos de 3 a 4 usuários executaram medidas de SAXS e WAXS em uma amostra de parafina. Houve também uma sessão de painéis, onde 11 participantes apresentaram seus projetos de pesquisa, nos quais a técnica SAXS vem sendo ou será utilizada. A lista de participantes do curso é mostrada na Tabela 2.

Todo o material do curso encontra-se disponível na página do LCr (<http://www.if.usp.br/cristal>), bem como o manual de operação em português, os modelos de submissão de projetos, ficha de experimento e relatório.

Decidimos organizar a agendamento do Nanostar através do envio, por parte dos usuários interessado no uso do equipamento, de projetos suscintos endereçados a um endereço de e-mail dedicado a esse fim (nanostar@if.usp.br). Por questões de ordem prática, o atendimento a usuários externos é feito pelos técnicos do LCr.

Tabela 2: Participantes do “Curso de Treinamento de Usuários do Nanostar”

1	Alain André Quivy	IF-USP-São Paulo
2	Aline dos Santos Lira Durães	IF-USP-São Paulo
3	Aline Regina Hellmann Carollo	Fac. C. Farmacêuticas -USP-R. Preto
4	Álvaro Diego Bernardino Maia	IF-USP-São Paulo
5	Antonio C. Franco da Silveira	IF-USP-São Paulo
6	Antonio Domingues dos Santos	IF-USP-São Paulo
7	Barbara Bianca Gerbelli	IF-USP-São Paulo
8	Carlos E. Bayer Simões Esteves	IF-USP-São Paulo
9	Cássia Alves de Freitas	POLI-USP-São Paulo
10	Cíntia Fabiana Kanagussuko	IF-USP-São Paulo
11	Cláudio de Almeida Filho	IQ-UNESP-Araraquara
12	Daniel Ortega da Cruz	IF-USP-São Paulo
13	Danilo Justino Carastan	POLI-USP-São Paulo
14	Débora Romero Barcellos	D.C. Exatas e da Terra-UNIFESP- Diadema
15	Eduardo F. Molina	IQ-UNESP-Araraquara
16	Elisangela S Zarif Cardoso	IQ-USP-São Paulo
17	Emerson R. Teixeira da Silva	IF-USP-São Paulo
18	Fernanda AP. H. Batista	IFSC-USP-São Carlos

19	Fernanda de Sá Teixeira	IF-USP-São Paulo
20	Fernando Massa Fernandes	IF-USP-São Paulo
21	Francisco Mariano Neto	IF-USP-São Paulo
22	Gabriel Teixeira Landi	IF-USP-São Paulo
23	George Zilioti	IF-USP-São Paulo
24	Giovanna Canalli Ortiz	D. C. Exatas e da Terra-UNIFESP- Diadema
25	Hudson W. P. de Carvalho	IQ-UNESP-Araraquara
26	Javier Bustamante Mamani	IF-USP-São Paulo
27	Jorge Amim Júnior	IQ-USP-São Paulo
28	Karin do Amaral Riske	Dpto. Biofísica - UNIFESP- São Paulo
29	Leandro Lopes	IQ-UNESP-Araraquara
30	Lisandro José Giovanetti	Univ. Nacional de La Plata - Argentina
31	Luis Carlos Cides da Silva	IQ-USP-São Paulo
32	Magali Naomi Tanaka	Depto. Psicobiologia - UNIFESP - São Paulo
33	Márcio R. da Silva Oliveira	POLI-USP-São Paulo
34	Otávio Bianchi	IQ- UFRGS - Porto Alegre
35	Patricia Targon Campana	EACH-USP-Ermelino Matarazzo-São Paulo
36	Rebeca Bacani	IF-USP-São Paulo
37	Renata Naporano Bicev	IF-USP-São Paulo
38	Renilson Adriano da Silva	IPEN-São Paulo
39	Rosane M. Duarte Soares	IQ- UFRGS - Porto Alegre
40	Sérgio Alexandre da Silva	IF-USP-São Paulo
41	Tatiana Batista	IQSC-USP-São Carlos
42	Thaís Fernandes Schmidt	IFSC-USP-São Carlos
43	Tereza da Silva Martins	D. C. Exatas e da Terra-UNIFESP- Diadema
44	Wagner W. R. De Araújo	IF-USP-São Paulo

V - Agendamento do uso do NanoStar

Os títulos das pesquisas de SAXS/WAXS agendadas e realizadas até dezembro de 2009 estão listados na Tabela 3. Os relatórios correspondentes aos experimentos já realizados pelos diferentes grupos de usuários são apresentados nos Apêndices 1 a 24. Algumas poucas

experiências realizadas não deram origem a relatório final porque os resultados foram obtidos recentemente e se encontram ainda em fase de análise.

Um elevado número de projetos de pesquisas foram distribuídos ao longo do tempo, em função dos resultados obtidos e muitas períodos foram compartilhadas. Experimentos executados sob condição de temperatura constante proporcionaram um controle satisfatório. Os resultados experimentais foram incluídos nos relatórios específicos que acompanham este relatório geral, em artigos e comunicações científicos, em tese doutorado e em dissertações de mestrado.

Tabela 3: Agendamento de utilização do equipamento Nanostar em testes, controles e projetos de pesquisa

Mês/ Ano	Participantes	Título do projeto
Agosto 2008	Técnicos da Bruker. Técnicos, estudantes e pesquisadores do IFUSP	Montagem e alinhamento do equipamento. Treinamento para uso do Nanostar.
Setembro 2008	R.Bacani (IFUSP) M.C.A. Fantini (IFUSP)	Testes com sílica mesoporosa
	R. Bacani (IFUSP) G.T. Landi (IFUSP)	Testes com nanomateriais
Outubro 2008	L.R.S. Barbosa (IFUSP) R. Itri (IFUSP) S. Mazzoni (Un. Ancona, Itália)	Estudos conformacionais de monoleína com citocromo e lisozima.
	L.R.S. Barbosa (IFUSP) R. Itri (IFUSP)	Estudos de soluções de BSA
	C.F. Kanagussuko (IFUSP) M.C.A. Fantini (IFUSP)	Protocolo de preparação e caracterização de sílica mesoporosa ordenada cúbica
Novembro 2008	L.R.S. Barbosa (IFUSP) R. Itri (IFUSP) S. Mazzoni (U.Ancona, Itália)	Estudos conformacionais de monoleína com citocromo e lisozima.
	C.F. Kanagussuko (IFUSP) M.C.A. Fantini (IFUSP)	Protocolo de preparação e caracterização de sílica mesoporosa ordenada cúbica
	R. Bacani (IFUSP) A. F. Craievich (IFUSP) M.C.A. Fantini	Testes com parafina para medidas simultâneas SAXS/WAXS. Preparação do curso
Dezembro 2009	R. Bacani (IFUSP) M.C.A. Fantini (IFUSP)	Testes de padrões de calibração SAXS/WAXS Estudo de óxidos de Zr-Ce mesoporosos ordenados por SAXS

Dezembro 2009	L.R.S. Barbosa (IFUSP) R. Itri (IFUSP) S. Mazzoni (Un. Ancona, Itália)	Estudos conformacionais de monoleína com citocromo e lisozima.
	L.R.S. Barbosa (IFUSP) R. Itri (IFUSP) H. Millan (C. Biot. Havana, Cuba)	Peptídeos do Hormônio de Crescimento
Janeiro 2009	Palestrantes da USP, UNESP e LNLS	Curso de Treinamento de Usuários do Nanostar http://www.if.usp.br/cristal
	A.C. Franco (IFUSP) A.F. Craievich (IFUSP)	Medidas de água: intensidade absoluta
	C.F. Kanagussuko (IFUSP) M.C.A. Fantini (IFUSP)	Protocolo de preparação e caracterização de sílica mesoporosa ordenada cúbica
	R. Bacani (IFUSP) M.C.A. Fantini (IFUSP)	Estudo de óxidos de Zr-Ce mesoporosos ordenados por SAXS
Fevereiro 2009	R. Bacani (IFUSP) M.C.A. Fantini (IFUSP)	Estudo de óxidos de Zr-Ce mesoporosos ordenados por SAXS
	E. A. Oliveira (IFUSP) B.B. Gerbelli (IFUSP) R.N. Bicev (IFUSP))	Soluções de DNA
Março 2009	E. A. Oliveira (IFUSP) B.B. Gerbelli (IFUSP) R.N. Bicev (IFUSP))	Estudos de lecitina
	R. Bacani (IFUSP) M.C.A. Fantini (IFUSP)	Estudo de óxidos de Zr-Ce mesoporosos ordenados por SAXS
Abril 2009	R. Bacani (IFUSP) M.C.A. Fantini (IFUSP)	Estudo de óxidos de Zr-Ce mesoporosos ordenados por SAXS
	M. Oliveira Neto (IFSC-USP) P. Maziero (EEL-USP)	Estudos estruturais de ligninas obtidas em diferentes condições de oxidação
	F.S. Teixeira (IFUSP) M.C.B.S. Salvadori (IFUSP) M.S.D. Cattani (IFUSP)	Implantação iônica de baixa energia em polímeros para desenvolvimento de camadas compósitas condutoras litografáveis
	E. A. Oliveira (IFUSP) B.B. Gerbelli (IFUSP) R.N. Bicev (IFUSP))	Estudos de Lecitina
	D. Carastan (POLI-USP) N.R. Demarquette (POLI-USP) L. G. Amurin (POLI-USP)	Análise da orientação e desorientação de copolímeros em bloco e seus nanocompósitos

Maio 2009	E. A. Oliveira (IFUSP) B.B. Gerbelli (IFUSP) R.N. Bicev (IFUSP)	Transição de fase em membranas de lipídeo. Transição de fase em soluções de fragmentos de DNA
	M.C.A. Fantini (IFUSP)	Testes com sílica mesoporosa cúbica
	R. Bacani (IFUSP) M.C.A. Fantini (IFUSP)	Estudo de óxidos de Zr-Ce mesoporosos ordenados por SAXS
	F.S. Teixeira (IFUSP) M.C.B.S. Salvadori (IFUSP) M.S.D. Cattani (IFUSP)	Implantação iônica de baixa energia em polímeros para desenvolvimento de camadas compósitas condutoras litografáveis
	D. Carastan (POLI-USP) N.R. Demarquette (POLI-USP) L. G. Amurin (POLI-USP)	Análise da orientação e desorientação de copolímeros em bloco e seus nanocompósitos
Junho 2009	L.R.S. Barbosa (IFUSP) R. Itri (IFUSP) C. Alvarez (Un. Havana, Cuba)	Estudos conformacionais da Sticholysin: Evidência da presença de monômeros-tetrâmeros em solução
	L. Giovanetti (UNLP, Argentina) F. Requejo (UNLP, Argentina) A.F. Craievich (IFUSP)	Caracterización por SAXS de la morfología de nanopartículas bifásicas en solución
	L.Q. Amaral (IFUSP) E. C.V. Oliveira ((FCFRP-USP) P.A. Rocha Filho (FCFRP-USP)	Estudo de emulsões dermatológicas por raios X de baixo e alto ângulo
	A. Miranda (IFUSP) A. Vannucci (IFUSP) G.E.S. Brito (IFUSP)	Estudo da água e de soluções aquosas ultra-diluídas de LiCl
	R. Bacani (IFUSP) M.C.A. Fantini (IFUSP)	Estudo de óxidos de Zr-Ce mesoporosos ordenados por SAXS
Julho 2009	R. Bacani (IFUSP) M.C.A. Fantini (IFUSP)	Estudo de óxidos de Zr-Ce mesoporosos ordenados por SAXS
	G.T. Landi (IFUSP) A. Y. Hirata (IFUSP) A.D. Santos (IFUSP)	Produção e caracterização de nanopartículas de metais nobres em matriz dielétrica
	R.D. Baixo (Dow Chem., UFSCar) M.C.A. Fantini (IFUSP)	Estudo sobre neutralização do KOH na reação de polióis
	L.A. Chiavacci (FCF-UNESP) C.B. Terrugi (FCF-UNESP) L.R.S. Barbosa (IFUSP) R. Itri (IF-USP)	Estudo estrutural de lipossomas estabilizados com ácido polilático-coglicólico (PLGA) para liberação intravitreal de Bevacizumabe

	R. Bacani (IFUSP) M.C.A. Fantini (IFUSP)	Estudo de óxidos de Zr-Ce mesoporosos ordenados por SAXS
Agosto 2009	R. Bacani (IFUSP) M.C.A. Fantini (IFUSP)	Estudo de óxidos de Zr-Ce mesoporosos ordenados por SAXS
	Y. A. Marques (Dow Chem., UFSCar) M.C.A. Fantini	Avaliação da estrutura molecular de surfactantes do tipo poliéter glicóis no ponto de névoa
	T.F. Schmidt (IFUSP) L.R.S. Barbosa (IFUSP) R. Itri (IFUSP)	Estudo de membranas lipídicas de DOPC e cardiolipina com azul de metileno por espalhamento de raios-x a baixos ângulos
	L.Q. Amaral (IFUSP) E.C.V. Oliveira ((FCFRP-USP) P.A. Rocha Filho (FCFRP-USP)	Estudo de emulsões dermatológicas por raios X de baixo e alto ângulo
	G.T. Landi (IFUSP) A.D. Santos (IFUSP) M.C.A. Fantini (IFUSP)	NP'S de Co com tratamento térmico
	R. Bacani (IFUSP) M.C.A. Fantini (IFUSP)	Estudo de óxidos de Zr-Ce mesoporosos ordenados por SAXS
	Y.A. Marques (Dow Chem., UFSCar) M.C.A. Fantini (IFUSP)	Avaliação da estrutura molecular de surfactantes do tipo poliéter glicóis no ponto de névoa
	S. Mazoni (UNIVAN) L.R.S. Barbosa (IFUSP) R. Itri (IFUSP)	Estudo de mudança de fase de monoleína na presença de citocromo a temperatura divergente
Setembro 2009	E.A. Oliveira (IFUSP) B.B. Gerbelli (IFUSP) R.N. Bicev (IFUSP)	Transição de fase de membranas de lipídeo
	F. V. Gozzo (IFUSP) S. L. Morelhão (IFUSP)	Estudo de cabelo com tratamentos por SAXS
	G.T. Landi (IFUSP) A.D. Santos (IFUSP) M.C.A. Fantini (IFUSP)	NP'S de Co com tratamento térmico
	C.O. Sena (IFUSP) A.M. Figueiredo Neto (IFUSP)	Elastômeros
	E.A. Oliveira (IFUSP) B.B. Gerbelli (IFUSP) R.N. Bicev (IFUSP)	Transição de fase de membranas de lipídeo
	S. Mazoni (UNIVAN) L.R.S. Barbosa (IFUSP) R. Itri (IFUSP)	Estudo de mudança de fase de monoleína na presença de citocromo a temperatura divergente

Outubro 2009	J.M. Ruso (Espanha) L.R.S. Barbosa (IFUSP) R. Itri (IFUSP)	Interação de fibrinogenico com surfactantes
	C.O. Sena (IFUSP) A.M. Figueiredo Neto (IFUSP)	Elastômeros
	F.V. Gozzo (IFUSP) S.L. Morelhão (IFUSP)	Estudo de cabelo com tratamentos por SAXS
	A.C. Franco (IFUSP) S.A. Silva (IFUSP)	Manutenção
Novembro 2009	C.O. Sena (IFUSP) A. M. Figueiredo Neto (IFUSP)	Elastômeros
	C.O. Sena (IFUSP) A. M. Figueiredo Neto (IFUSP)	Elastômeros
	L.R.S. Barbosa (IFUSP) R. Itri (IFUSP)	Micelas interagindo com peptídeos: uma visão por SAXS
	L.R.S. Barbosa (IFUSP) R. Itri (IFUSP)	Estudo os potenciais de interação do BSA com NaCl
	T.F. Schmidt R. Itri (IFUSP)	Vesículas lipídicas de DOPC e cardiolipina sob ação do fotossensibilizador azul de metileno
Dezembro 2009	C.O. Sena (IFUSP) A. M. Figueiredo Neto (IFUSP)	Elastômeros
	J. F. Q. Rey (UFABC) Z. Ahmed (UFABC)	Estudo da morfologia de membranas híbridas utilizadas em células a combustível do tipo PEM
	K. Dahmouche (UFRJ) A. F. Craievich (IFUSP)	Estudo da nanoestrutura de polímero PTFE contendo líquidos iônicos

VI - Produção científica

Desde o comissionamento do equipamento de SAXS/WAXS NanoStar, em setembro de 2008, ele vem sendo utilizado por pesquisadores do Laboratório de Cristalografia, de outros laboratórios da USP, e de outras Universidades do Brasil e do Exterior. Várias pesquisas realizadas originaram artigos publicados ou em processo de publicação e comunicações apresentadas em várias reuniões científicas. Por outro lado, vários alunos de pós-graduação executaram pesquisas com o NanoStar que foram incluídas em suas dissertações ou teses. Na Tabela 3 apresentamos os números de artigos, comunicações e teses que incluíram dados de experimentos de SAXS realizados no NanoStar.

Tabela 3: Produção científica

Tipo de produção	Número
Artigos publicados	2
Artigos submetidos ou em preparação	4
Comunicações em Congressos	8
Dissertações de Mestrado	3
Teses de Doutorado	1

V - 1 - Artigos publicados

- D.J. Carastan, L.G. Amurin, A.F. Craievich, N.R. Demarquette, “Efeitos da Anisotropia nas Propriedades Reológicas de Nanocompósitos de Copolímeros em Bloco”, Anais do 10° Congresso Brasileiro de Polímeros, Foz do Iguaçu, 13-17/10/2009.

- F.S. Teixeira, M.C. Salvadori, M. Cattani, I.G. Brown "Structural properties of buried conducting layers formed by very low energy ion implantation of gold into polymer". Journal of Applied Physics, v. 106, 056106 (2009).

V - 2 - Artigos submetidos ou em preparação

- D.J. Carastan, L.G. Amurin, A.F. Craievich, N.R. Demarquette. “The effect of anisotropy on the extensional rheology of block copolymer nanocomposites” (2010).

- F.S. Teixeira, M.C. Salvadori, M. Cattani and I.G. Brown. "SAXS determination of the fundamental structures of disordered gold-polymer thin films". Trabalho em progresso a ser submetido para revista internacional indexada (2010).

- F.S. Teixeira, M.C. Salvadori, M. Cattani and I.G. Brown. "Electrical, optical and structural studies of shallow buried Au-PMMA composite films formed by very low energy ion implantation". Trabalho submetido para JVST A como "contributed paper for AVS 56th International Symposium and Exhibition". Previsto para publicação em 2010.

- M. Cattani, M.C. Salvadori, F. S. Teixeira. "SAXS structural characterization of nanostructured conducting thin films. A brief review of SAXS theories." Previsto para publicação em 2010.

V - 3 - Comunicações (resumo) em congressos nacionais e internacionais

- L. J. Giovanetti, F. Fernandez-Baldis, E. Shevchenko, M. Salmeron, A. F. Craievich y F. G. Requejo, "Electronics, local structure and morphology of heterogeneous nanoparticles investigated by XAFS techniques" (Oral). V Reunión de la Asociación Argentina de Cristalografía - Posadas, Pcia. de Misiones - 12 a 14 de agosto de 2009.

- L. J. Giovanetti, F. G. Requejo, J. M. Ramallo-López, E. Shevchenko, M. Salmeron, A. F. Craievich. "Electronics, local structure and morphology of heterogeneous nanoparticles investigated by XAFS techniques"(Oral). Técnicas Experimentales con Luz Sincrotrón, Instituto Balseiro 26 de octubre - 6 de noviembre de 2009.

- C.F. Kanagussuko, M.C.A. Fantini, T.S. Martins, L.C. Cides da Silva, J.R. Matos, "Cubic ordered mesoporous silica the effect of pH and alcohol on the structural properties" (Painel), XV International Conference Sol Gel 2009, Porto de Galinhas, PE, Brasil, 23-27 de agosto de 2009.

- F.S. Teixeira, M.C. Salvadori, M. Cattani and I.G. Brown. "Electrical, Optical and Structural Studies of Shallow Buried Au-PMMA Composite Films formed by Very Low Energy Ion Implantation" (Oral). "AVS 56th International Symposium & Exhibition, San Jose, CA, 2009". Livro de resumos disponível em

<http://www2.avs.org/symposium/AVS56/pdfs/abstractbook.pdf>, pág 144.

- R. Bacani, M. C. A. Fantini and T. S. Martins, "Structural Analysis of Mesoporous SiO₂:ZrO₂-90%CeO₂" (Oral), 19 Reunião da Associação Brasileira de Cristalografia (ABCr2009), 9-11 de setembro de 2009, Belo Horizonte, MG, Brasil.

- R. Bacani, M. C. A. Fantini, T. S. Martins, J. R. Matos, D. G. Lamas and R. O. Fuentes "Mesoporous ZrO₂-CeO₂ with SiO₂ for Catalytic Applications" (Painel), International

Conference on Advanced Materials (ICAM09), 20-25 de setembro de 2009, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Abstract submetido em setembro/09 ao World Congress on Emulsion 2010, a realizar-se em Lyon, França, no período 12-14 outubro 2010.

- E. C. Vargas de Oliveira, N. Rezende Maciel, I. Sperchi Camilo, L. Queiroz Amaral, P. A. Rocha-Filho. "Characterization by wide and small angle x-ray diffraction of lamellar structures in emulsions from vegetable raw material". 1Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Brazil. 2Instituto de Física, Universidade de São Paulo, Brazil

- N. Rezende Maciel, E. C. V. Oliveira, C. H. Okuma, J. F. Topan, L. G. Walther, L. Queiroz Amaral, P. A. Rocha-Filho. "A new system consisting of multiple emulsions and gel phase lamellar structures characterized by wide and small angle x-ray diffraction". 1Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Brazil. 2Instituto de Física, Universidade de São Paulo, Brazil.

V - 4 - Dissertações de Mestrado

Rebeca Bacani, M.C.A. Fantini (orientadora), "Sistemas porosos de zircônia e céria", Instituto de Física da USP. Defesa realizada e aprovada em: 14/12/2009.

Rogério Baixo, M. Tsunoda (orientador), "Estudo da complexação do íon K⁺ por poliglicóis de peso molecular 400 e 3000", Universidade Federal de São Carlos. Defesa prevista: 2010.

Yuri A. Marques, M. Tsunoda (orientador), "Avaliação da estrutura molecular de surfactantes do tipo poliéter glicóis no ponto de névoa", Universidade Federal de São Carlos. Defesa prevista: 2010.

V - 5 - Teses de Doutorado

Fernanda de Sá Teixeira, Maria Cecília Salvadori (orientadora), Mauro Cattani (co-orientador), "Implantação iônica de baixa energia em polímeros para desenvolvimento de camadas compósitas condutoras litografáveis". Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Defesa prevista: 2010.

VI - Relatórios de projetos realizados enviados pelos usuários

Apêndice 1, página 20.

"Interaction of Cytochrome-C with Biomimetic Systems". Mazzoni, S.1; Barbosa, L.R.S.2 ; Itri, R.2, Mariani, P.1. 1 SAIFET " Dipartimento di Scienze Alimentari, Agro-Ingegneristiche, Fische, Economico-Agrarie e del Territorio. Ancona, Italy. 2 Instituto de Física - Universidade de São Paulo, São Paulo - Brasil.

Apêndice 2, página 29.

“Estudo dos potenciais de interação de proteínas por espalhamento de Raios-X a baixos ângulos”. Leandro R. S. Barbosa, Elisa Morandé Sales e Rosângela Itri. Instituto de Física da USP Departamento de Física Aplicada, São Paulo, Brasil.

Apêndice 3, página 31.

“Protocolo de preparação e caracterização de sílica mesoporosa ordenada cúbica”. Cíntia Fabiana Kanagussuko e Marcia C. A. Fantini. Instituto de Física da USP, Departamento de Física Aplicada, São Paulo, Brasil.

Apêndice 4, página 37.

“Estudo de óxidos de Zr-Ce mesoporosos ordenados por SAXS”. Rebeca Bacani e Márcia C. A. Fantini. Instituto de Física da USP, Departamento de Física Aplicada, São Paulo, Brasil.

Apêndice 5, página 41.

“Estudo de sistemas de relevância biológica por SAXS - Aplicações e possibilidades do equipamento Nanostar - Bruker”. Hector Milania, Leandro R.S. Barbosab, Rosângela Itrib. aCentro de Biotecnologia, Havana, Cuba. bInstituto de Física, USP, São Paulo, Brasil.

Apêndice 6, página 47.

“Transição de fase em membranas de lipídio e transição de fase em soluções de fragmentos de DNA”. E. A. Oliveira (IFUSP), B.B. Gerbelli (IFUSP), R.N. Bicev (IFUSP)).

Apêndice 7, página 55.

“Estudos Estruturais de Ligninas Obtidas em Diferentes Condições de Oxidação”. Oliveira Neto M.a Maziero P.b Golçalves A.R.b Craievich, A.F.C Polikarpov Ia. aInstituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, Brasil. bEscola de Engenharia de Lorena- Departamento de Biotecnologia, Universidade de São Paulo, Lorena, Brasil. cInstituto de Física de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Apêndice 8, página 59.

“Implantação Iônica de Baixa Energia em Polímeros para Desenvolvimento de Camadas Compósitas Conductoras Litografáveis”. F. S. Teixeira^{1,2}, M. C. Salvadori¹, M. Cattani¹. 1 Instituto de Física, USP, São Paulo, Brasil. 2 Escola Politécnica, USP, São Paulo, Brasil.

Apêndice 9, página 65.

“Efeitos da anisotropia nas propriedades reológicas de nanocompósitos de copolímeros em bloco”. Leice G. Amurin¹; Danilo J. Carastan¹; Aldo F. Craievich²; Nicole R. Demarquette^{1*}. 1 Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo - USP, *nick@usp.br. 2 Departamento de Física Aplicada - Instituto de Física da Universidade de São Paulo - USP.

Apêndice 10, página 73.

“Análise da Orientação e Desorientação de Copolímeros em Bloco e Seus Nanocompósitos”. D. J. Carastan^a, L. G. Amurin^a, A. F. Craievich^b, N. R. Demarquette^a.
^aDepartamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. ^bInstituto de Física, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Apêndice 11, página 77.

“Estudos conformacionais da interação de peptídeos correspondentes à região N-terminal das toxinas protéicas Sticholisina I e II com membranas modelo”. Joana Paulinoa Leandro R S Barbosab, Shirley Schereiera Rosangela Itrib. aInstituto de Química da USP, São Paulo, Brasil. bInstituto de Física da USP, São Paulo, Brasil.

Apêndice 12, página 85.

“Caracterización por SAXS de la morfología de nanopartículas bifásicas en solución”.L.J. Giovanettia, J. M. Ramallo López, F.G. Requejoa, E.V. Shevchenkob and A.F. Craievichc. aDepartamento de Física, Facultad de Ciencias Exactas UNLP. INIFTA, Facultad de Ciencias Exactas UNLP. bLawrence Berkeley National Laboratory-Berkeley CA United States of América. cInstitute of Physics, University of Sao Paulo, CEP 05508-900 Sao Paulo, SP, Brazil.

Apêndice 13, página 90.

“Estudo de emulsões dermatológicas por raios X de baixo e alto ângulo”. Erika Cristina Vargas de Oliveiraa, Pedro Alves da Rocha Filhoa e Lia Queiroz do Amaralb. aFaculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da USP, SP, Brasil. bInstituto de Física da USP, São Paulo, SP, Brasil.

Apêndice 14, página 95.

“Investigação das propriedades morfológicas e estruturais de nanopartículas de cobalto produzidas pelo método de agregação gasosa”. G. T. Landia, M. C. A. Fantinib e A. D. Santosa. aLaboratório de Materiais Magnéticos, Instituto de Física da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil. bLaboratório de Cristalografia, Instituto de Física da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

Apêndice 15, página 99.

“Estudo da complexação do íon K⁺ por poliglicóis de peso molecular 400 e 3000”. Baixo, Rogério; Tsunoda, Mitsukimi; Oliveira, Abel. Departamento de Pós Graduação, UFSCar, São Carlos, Brasil. Instituto de Física, USP, São Paulo, Brasil.

Apêndice 16, página 103.

“Estudo estrutural de lipossomas estabilizados com ácido polilático-coglicólico (PLGA) para liberação intravitreal de Bevacizumabe”. Bruno, Ca, Chiavvacci, La; Barbosa, L R Sb, Itri, Rb . aDepartamento de Ciências Farmacêuticas, Unesp Araraquara, Brasil. bInstituto de Física, USP, São Paulo, Brasil.

Apêndice 17, página 106.

“Influência da distribuição de pesos moleculares sobre o "ponto de névoa" de surfactantes do tipo poliéter glicóis”. Y.A. Marquesa e M. Tsunodaa. aDepartamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brasil.

Apêndice 18, página 110.

”Estudo de membranas lipídicas de DOPC e cardioplipina com azul de metileno por espalhamento de raios-x a baixos ângulos”. Thaís F. Schmidta, Leandro Barbosa e Rosangela Itrib. aUniversidade Federal do ABC, Santo André, SP. bInstituto de Física, Universidade de São Paulo, SP.

Apêndice 19, página 113.

“Vesículas lipídicas de DOPC e cardioplipina sob ação do fotossensibilizador azul de metileno”. Thaís F. Schmidta, Leandro Barbosa e Rosangela Itrib. aUniversidade Federal do ABC, Santo André, SP. bInstituto de Física, Universidade de São Paulo, SP.

Apêndice 20, página 114.

“Transição de fase em membranas de lipídio”. E. A. Oliveira (IFUSP), B.B. Gerbelli (IFUSP), R.N. Bicev (IFUSP).

Apêndice 21, página 123.

”Caracterização de fios de cabelos submetidos a tratamentos diversos”. F. V. Gozsoa e S. L. Morelhãoa. aLaboratório de Cristalografia, Instituto de Física, Universidade de São Paulo, Brasil.

Apêndice 22, página 127.

”Estudo das propriedades estruturais, mecânicas, ópticas e magnéticas de elastômeros de uretano/uréia”. C. Senaa e A.M. Figueiredo Netoa. aDepartamento de Física Experimental, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Apêndice 23, página 131.

“Estudo das propriedades estruturais de filmes de elastômeros derivados de celulose (HDI/APC)”. C. Sena^a e A.M. Figueiredo Neto^a. ^aDepartamento de Física Experimental, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Apêndice 24, página 136.

“The influence of fluorene anion hydrogenate surfactants on bovine fibrinogen structure”. Leandro R. S. Barbosaa, Juan M. Rusob, Rosangela Itria. a DIFUSP - Dpto de Física Aplicada, USP, São Paulo, Brasil. bFaculty of Physics University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain.

VII - Comentários finais

O presente relatório mostra que o equipamento Nanostar vem sendo intensivamente utilizado em pesquisas de diversos tipos de materiais pelos pesquisadores que apoiaram o projeto, seus estudantes, bem como por novos usuários do Laboratório de Cristalografia do IFUSP, de outros laboratórios da USP, de outras Universidades brasileiras e de instituições do Exterior.

As etapas iniciais de comissionamento do aparelho treinamento de usuários foram cumpridas com sucesso, e o equipamento vem mostrando atualmente um desempenho adequado.

O rotina de funcionamento do aparelho está sendo gerenciada pelo Laboratório de Cristalografia do IFUSP da forma característica de um aparelho multiusuário. Antes do uso, todos os pesquisadores apresentam um projeto específico para as experiências propostas e, após a realização das mesmas, nos encaminham um relatório de resultados.

Uma grande variedade de pesquisas foram já realizadas, referentes a materiais de vários tipos, tais como proteínas em solução e outros sistemas biológicos, membranas, nanocompósitos poliméricos, elastômeros, óxidos mesoporosos, ligninas em solução, materiais implantados, e nanopartículas metálicas monofásicas e bifásicas em solução. Os resultados científicos correspondentes a pouco mais de um ano de uso do aparelho Nanostar estão descritos nos 24 relatórios encaminhados nos Apêndices, nos artigos publicados ou em processo de publicação, e nas comunicações apresentadas em várias reuniões científicas.

Finalmente, mencionaremos que, além dos recursos que nos foram outorgados pelo CNPq (900.000,00R\$) para a compra do aparelho Nanostar, a FAPESP nos concedeu um auxílio de pesquisa complementar de 130.000,00R\$ (Processo 08/52084-5) para a aquisição de acessórios adicionais, peças sobressalentes e componentes de apoio.

Prof. Dr. Aldo Felix Craievich (Coordenador)

São Paulo, 15 de janeiro de 2010

Apêndice 1

Interaction of Cytochrome-C with Biomimetic Systems

Mazzoni, S.¹; Barbosa, L.R.S.²; Itri, R.², Mariani, P.¹

¹ SAIFET " Dipartimento di Scienze Alimentari, Agro-Ingegneristiche, Fisiche, Economico-Agrarie e del Territorio. Ancona, Italy

² Instituto de Física - Universidade de São Paulo, São Paulo - Brasil

1. Introduction

Amphiphilic molecules, when in aqueous solutions, have the ability to self-assemble. The structure formed by these molecules is dependent on the geometry of molecule and environment conditions (eg pH, temperature, concentration of amphiphilic, salt concentration and others). One of the most important amphiphilic molecules are the lipids, the main component of cell membranes.

Previous studies indicated that under high lipid concentrations (i.e., low amount of water), liquid-crystalline structures such as cubic or hexagonal phases, can be formed. The cubic symmetry in the X-ray diffraction pattern of the water-liquid crystalline structure was first observed by Luzzati et al. [1]. The cubic structures are formed as two unconnected water channels, surrounded by lipids in a complex arrangement. The bicontinuous cubic phase was used also in the crystallization of membrane proteins, making it the subject of several studies [2].

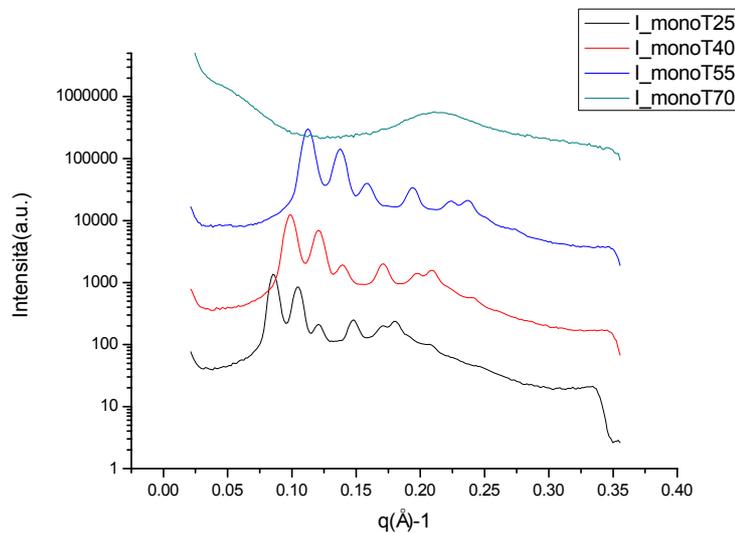
On the other hand, Cytochrome c (cyto-c) is a small [heme protein](#) found in the inner membrane of the [mitochondrion](#), its function is associated with the transfer of an electron on the respiratory chain. Besides, there are some indications that cyto-c is involved in the programmed cell death, i.e., apoptosis. Thus, the aim of this work was to investigate, through small angle X-ray diffraction studies, the incorporation of cyto-c into the 3-D periodic structure of MO and to characterize the lipid phases at different temperatures.

2. Results and Discussions

In the present work, we have done a systematic work on the MO/cyto-c systems, to do so, we made measurements in the absence and presence of 1 and 10 mg/ml of cyto-c at different days and different temperatures. The figures above indicate each measurement at each day and temperature. First of all, we will present all results and after that we will discuss the MO/cyto-c behavior. The data of MO in the absence of cyto -c are below.

1. MO in excess of water (and absence of Cyto-c)

1st Day



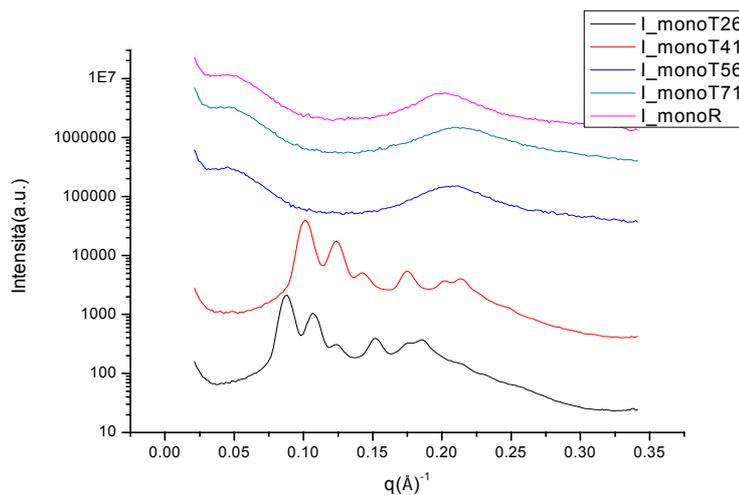
Mo a 25 °C : Q224 a 103.9 Å

Mo a 40 °C : Q224 a 89.7 Å

Mo a 55 °C : Q224 a 79.7 Å

Mo a 70 °C : just one peak at $q: 0.2 \text{ \AA}^{-1}$

2nd Day



Mo a 26 °C : Q224 a 100.9 Å

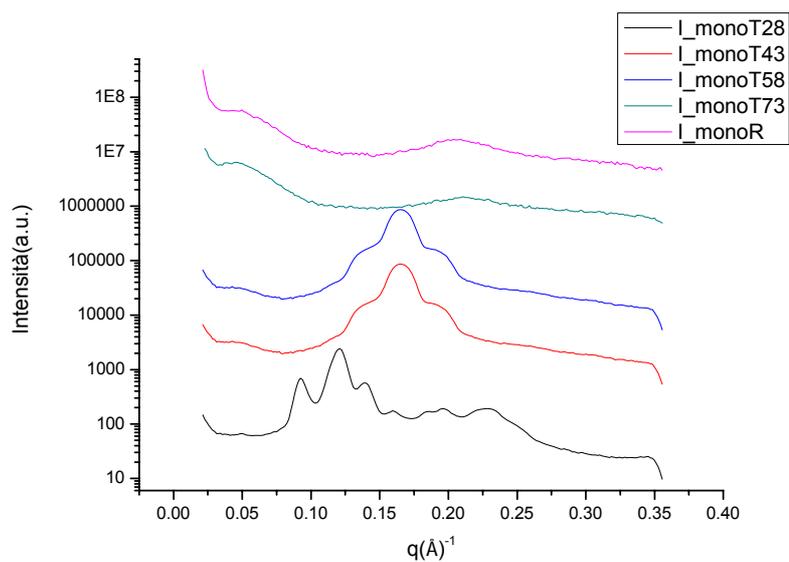
Mo a 41 °C : Q224 a 87.9 Å

Mo a 56 °C : just one peak at $q: 0.2 \text{ \AA}^{-1}$

Mo a 70 °C : just one peak at $q: 0.2 \text{ \AA}^{-1}$

Mo a 26 °C R: just one peak at $q: 0.2 \text{ \AA}^{-1}$

3rd Day (these results are somewhat strange)



Mo a 28 °C : ?

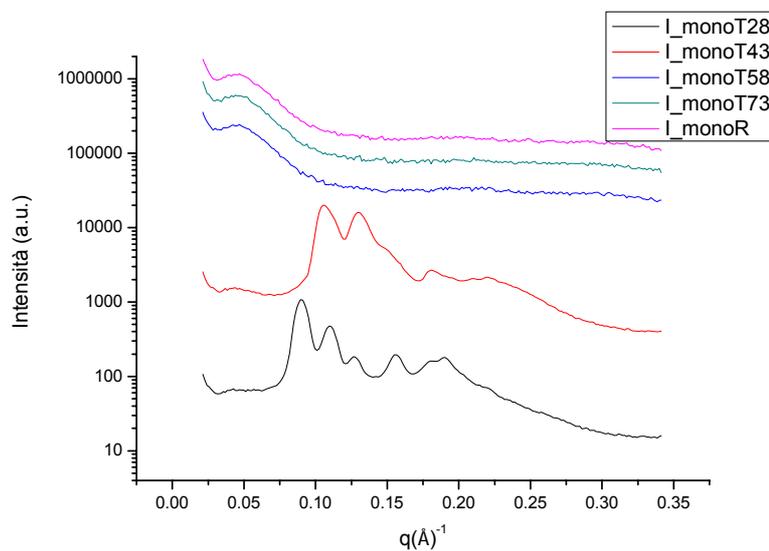
Mo a 43 °C : just one peak at q: 0.17 Å⁻¹

Mo a 58 °C : just one peak at q: 0.16 Å⁻¹

Mo a 73 °C : just one peak at q: 0.21 Å⁻¹

Mo a 28 °C R: just one peak at q: 0.2 Å⁻¹

4th Day



Mo a 28 °C : Q224 a 98.185

Mo a 43 °C : Q224 a 83.828

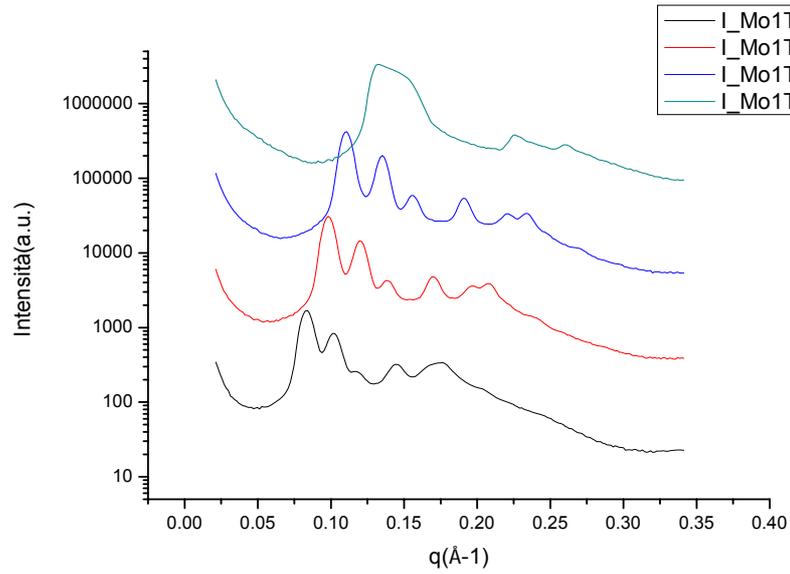
Mo a 58 °C : ?

Mo a 73 °C : ?

Mo a 28 °C R: ?

2. Mo + 1 mg/ml Cyt (1° - 4°, 15° -16° days)

1st Da



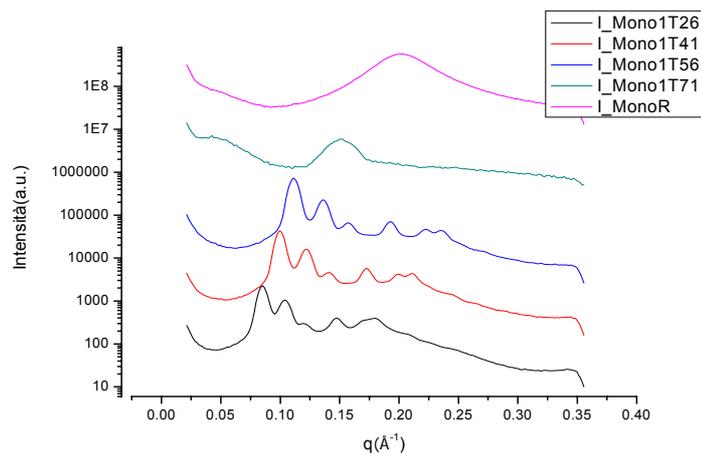
Mo+ Cyt at 25°C : Q224 a 106.4Å

Mo+ Cyt at 40°C : Q224 a 90.2Å

Mo+ Cyt at 55°C : Q224 a 80.4Å

Mo+ Cyt a 70°C : just one peak at q: 0.2 Å⁻¹

2nd Day



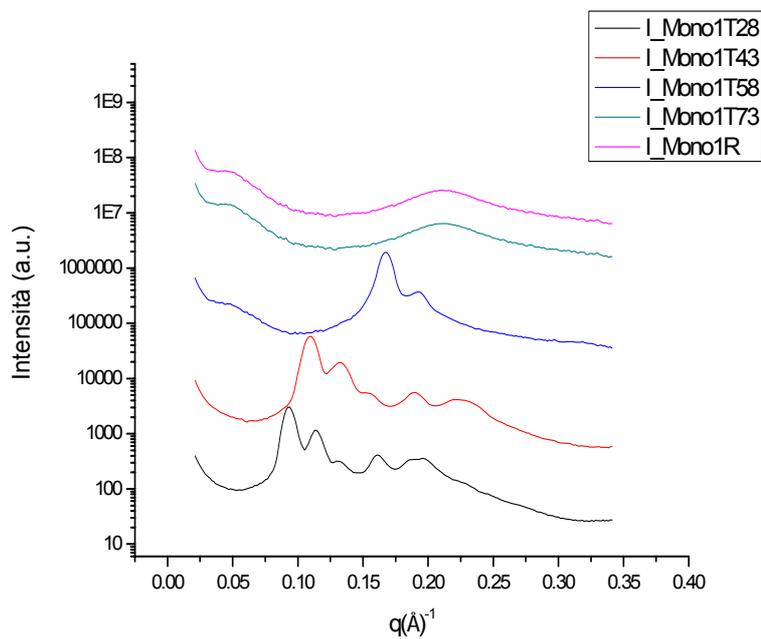
Mo+ Cyt at 26°C : Q224 a 104.5 Å

Mo+ Cyt at 41°C : Q224 a 88.8 Å

Mo+ Cyt at 56°C : Q224 a 79.7 Å

Mo+ Cyt a 71°C : just one peak at q: 0.15 Å⁻¹

Mo+ Cyt a 26°C R: just one peak at q: 0.15 Å⁻¹

3rd Day

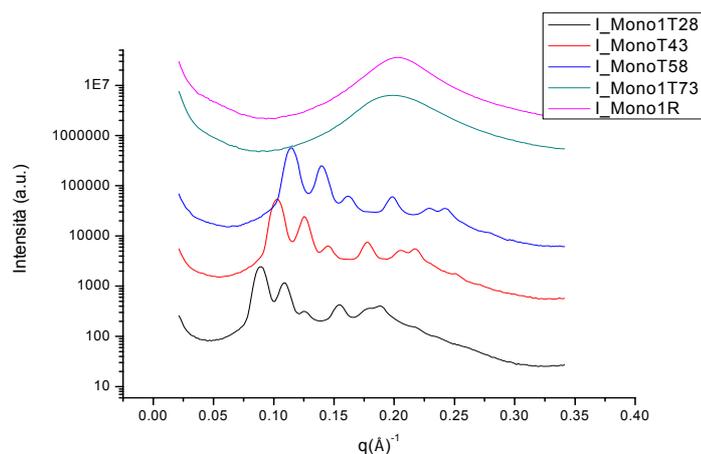
Mo+ Cyt at 28° C : Q224 a 95.4 Å

Mo+ Cyt at 43° C : Q224 a 80.7 Å

Mo+ Cyt at 58° C : just one peak at q: 0.17 Å⁻¹

Mo+ Cyt at 73° C : just one peak at q: 0.2 Å⁻¹

Mo+ Cyt at 28° C R: just one peak at q: 0.15 Å⁻¹

4th Day

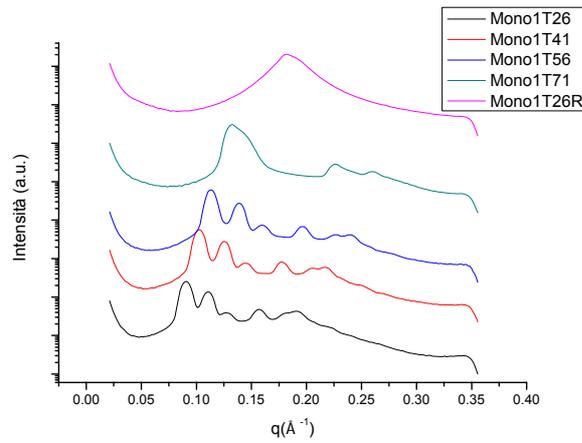
Mo+ Cyt at 28° C : Q224 a 99.2 Å

Mo+ Cyt at 43° C : Q224 a 86.2 Å

Mo+ Cyt at 58° C : Q224 a 77.6 Å

Mo+ Cyt at 73° C : just one peak at q: 0.2 Å⁻¹

Mo+ Cyt at 28° C R: just one peak at q: 0.2 Å⁻¹

15th Day

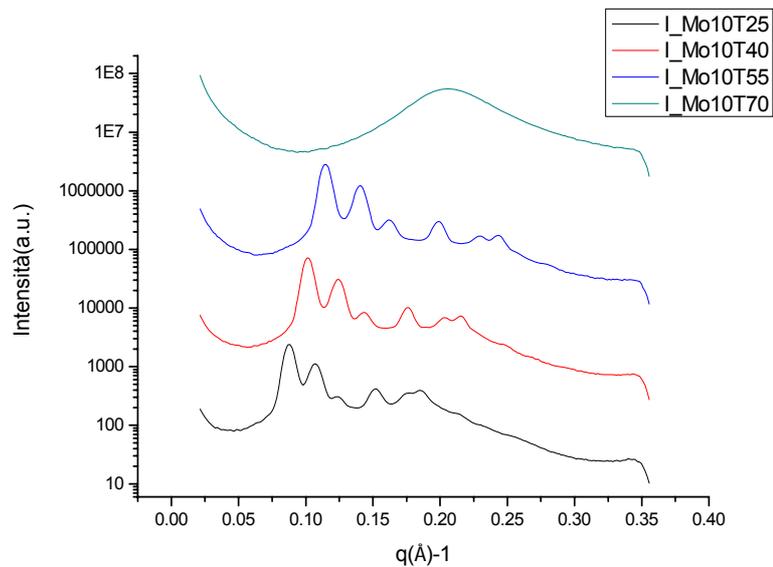
Mo+ Cyt at 26 °C : Q224 a 97.6 Å

Mo+ Cyt at 41 °C : Q224 a 86.2 Å

Mo+ Cyt at 56 °C : Q224 a 78.4 Å

Mo+ Cyt at 71 °C : H a 54.5 Å

Mo+ Cyt a 26 °C R: just one peak at $q: 0.2 \text{\AA}^{-1}$

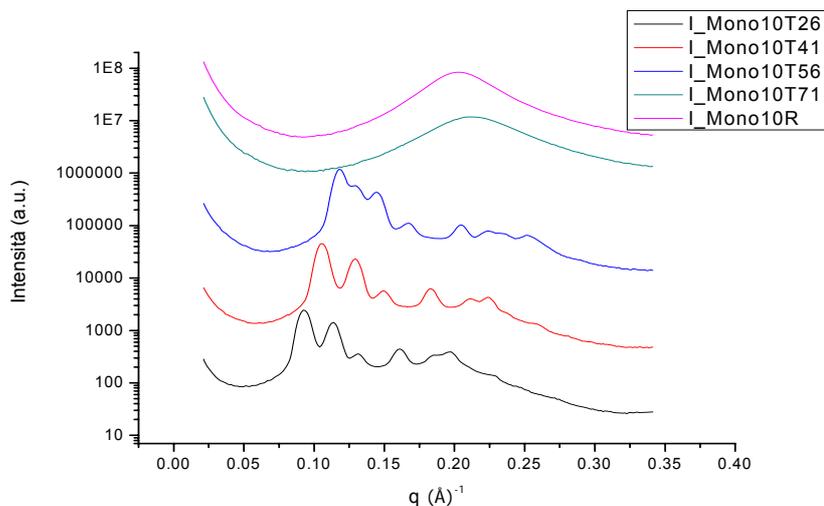
3. Mo + 10 mg/ml Cyt (1st- 4th, 15th Days)1st- Day

Mo+ Cyt at 25 °C : Q224 a 100.9 Å

Mo+ Cyt at 40 °C : Q224 a 87.2 Å

Mo+ Cyt at 55 °C : Q224 a 77.2 Å

Mo+ Cyt a 70 °C : just one peak at $q 0.2 \text{\AA}^{-1}$

2nd Day

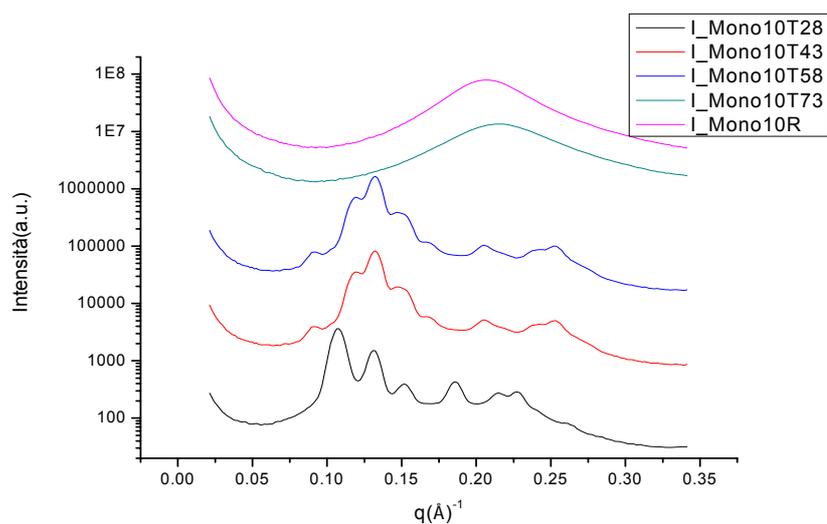
Mo+ Cyt a 26 °C : Q224 a 95.546

Mo+ Cyt a 41 °C : Q224 a 83.828

Mo+ Cyt a 56 °C : Q224 a 74.985 (nel secondo picco la simmetria non è centrata)

Mo+ Cyt a 71 °C : just one peak at q: 0.2 Å⁻¹

Mo+ Cyt a 26 °C R: just one peak at q: 0.2 Å⁻¹

3rd Day

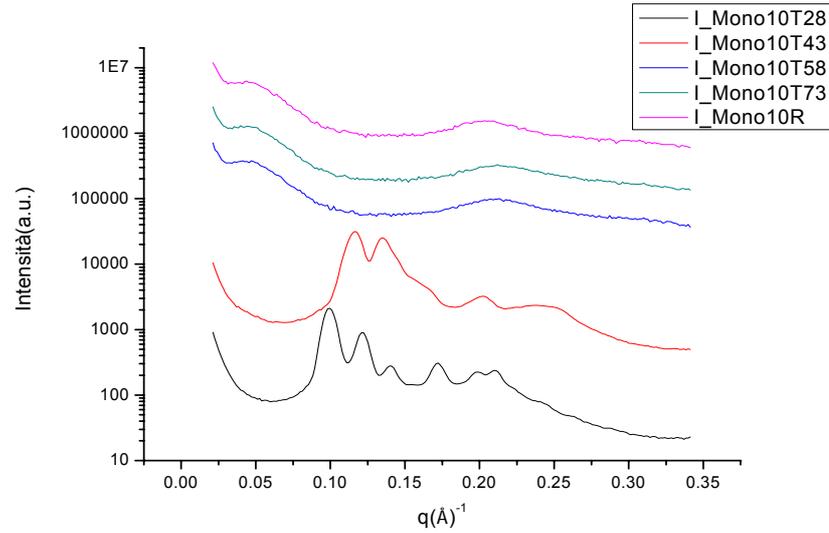
Mo+ Cyt a 28 °C : Q224 a 82.658

Mo+ Cyt a 43 °C : mixed systems

Mo+ Cyt a 58 °C : just one peak at q: 0.16 Å⁻¹

Mo+ Cyt a 73 °C : just one peak at q: 0.21 Å⁻¹

Mo+ Cyt a 28 °C R: just one peak at q: 0.2 Å⁻¹

4th Day

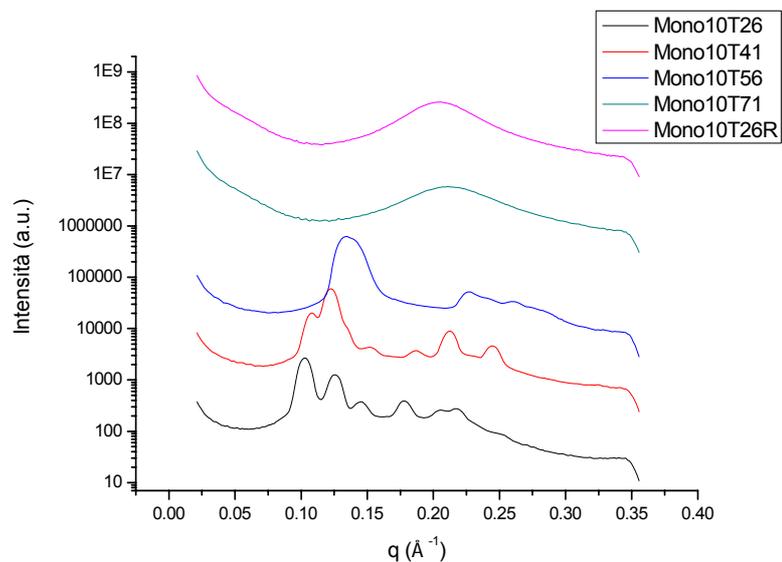
Mo+ Cyt a 28°C : Q224 a 89.304

Mo+ Cyt a 43°C : simmetria incerta?

Mo+ Cyt a 58°C : just one peak at q : 0.21 Å⁻¹

Mo+ Cyt a 73°C : just one peak at q : 0.2 Å⁻¹

Mo+ Cyt a 28°C R: just one peak at q : 0.2 Å⁻¹

15th Day

Mo+ Cyt a 26°C : Q224 a 86.270

Mo+ Cyt a 41°C : Q224 a 72.242 + H a 67.178 ?

Mo+ Cyt a 56°C : H a 54.143 ?

Mo+ Cyt a 71°C : just one peak at q : 0.2 Å⁻¹

Mo+ Cyt a 26°C R: just one peak at q : 0.2 Å⁻¹

As one can see on the figures above, it is possible to extract a general trend of these SAXS curves regardless the protein concentration. First, it is important to mention that in the absence of cyto-c Monoolein has a peculiar behavior, i.e., it undergoes to an isotropic fluid phase between 55 and 70 °C. Interesting, the presence of 1 and 10 mg/ml of cyto-c can change this behavior inducing such changes at minor temperatures. Moreover, along with each figure showed above, one can found the value of the cell dimension, supposing specific geometries, such as the cubic Q224, Q229 and Hexagonal.

Interestingly, the presence of cyto-c can induces the appearance of a mixed system. For instance, considering the system composed of Monoolein and 10 mg/ml cyto-c in the 4th day, one can notice the presence of small peaks in the small q region. This fact probably indicates that cyto-c disturbs the MO cubic cell. Moreover, at rook temperature and in the presence of cyto-c the unit cell parameter is equal to 123 Å, nevertheless, at 50 °C this value goes to 109 Å, almost a decrease of 15%. Mariani et al reported a structural analysis of the cubic monoolein/cyto-c water phases using small angle X-ray diffraction measurements. In this study, the authors suggest that monoolein undergoes a phase transition due to cyt c presence (from Pn3m to Im3m), in agreement with our results. This structure can be observed in terms of two 3-D networks of rods. Nevertheless, this phase transition kinetics is very slow, being necessary between 3 up to 9 day to complete the transition, and in some cases, we did not evidenced such a transition. We are now interested in characterizes the protein structure inside the cubic cell, in order to get more information on its conformation and folding states.

3. Conclusion

We are now studying the effect of temperature on the Mo-Cyt-Water system. Ours earlier results indicate that the cell parameter decreases with temperature, but the system keeps its cubic phase unaltered. We believe that this work can bring more information on the interaction of proteins with liquid-crystal structures. These SAXS curves are under analysis.

Apêndice 2

Estudo dos potenciais de interação de proteínas por espalhamento de Raios-X a baixos ângulos

Leandro R. S. Barbosa, Elisa Morandé Sales e Rosangela Itri .

Instituto de Física da USP Departamento de Física Aplicada, São Paulo, Brasil.

1. Introdução

Neste trabalho estudamos o efeito da adição sistemática de cloreto de sódio nos potenciais de interação de proteínas aquo-solúvies em solução, através da técnica de espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS). Este trabalho é continuação de um artigo recentemente aceito para publicação [1].

2. Resultados e Discussão

A figura 1 mostra as curvas de SAXS dos sistemas compostos por BSA (Albumina de Soro Bovino), normalizados pela concentração de proteína, em ausência e presença de concentrações crescentes de NaCl (50, 100, 300, 500 e 1000 mM) a três diferentes concentrações de BSA (10, 50 e 100 mg/ml). Como podemos ver na figura 1, as curvas de SAXS normalizadas pela concentração de proteína mostram um comportamento similar, para os sistemas a baixas concentrações de NaCl (< 300 mM). Nestes casos, podemos observar uma diminuição da intensidade de espalhamento para pequenos valores de q , na medida em que aumentamos a concentração de BSA. Este efeito é devido às interações entre proteínas vizinhas e deprime a intensidade espalhada na região de pequenos valores de q . Ainda considerando os sistemas compostos por pequenas quantidades de NaCl (< 300 mM), é interessante perceber que as curvas de SAXS (quando normalizadas pela concentração protéica) apresentam o mesmo espalhamento na região de médios e grandes valores de q . Este fato reforça a idéia anterior de que as alterações evidenciadas no início da curva de espalhamento são devidas às interações entre proteínas e que a forma da proteína não está sendo alterada. Esta informação é muito importante pois ela definirá nossa estratégia de análise dessas curvas.

Para tanto, utilizaremos o ajuste global, uma metodologia desenvolvida pelo grupo de pesquisa do prof. Dr. Paolo Mariani da università politecnica delle marche, Ancona, Itália. Esta metodologia permite o ajuste de diversas curvas de espalhamento ao mesmo tempo, sendo também capaz de ligar parâmetros experimentais de diferentes curvas de espalhamento. Este metodologia foi aplicada com extremo sucesso em um trabalho recente acerca da interação da albumina de soro bovino a diferentes valores de pH assim como diferentes concentrações [1].

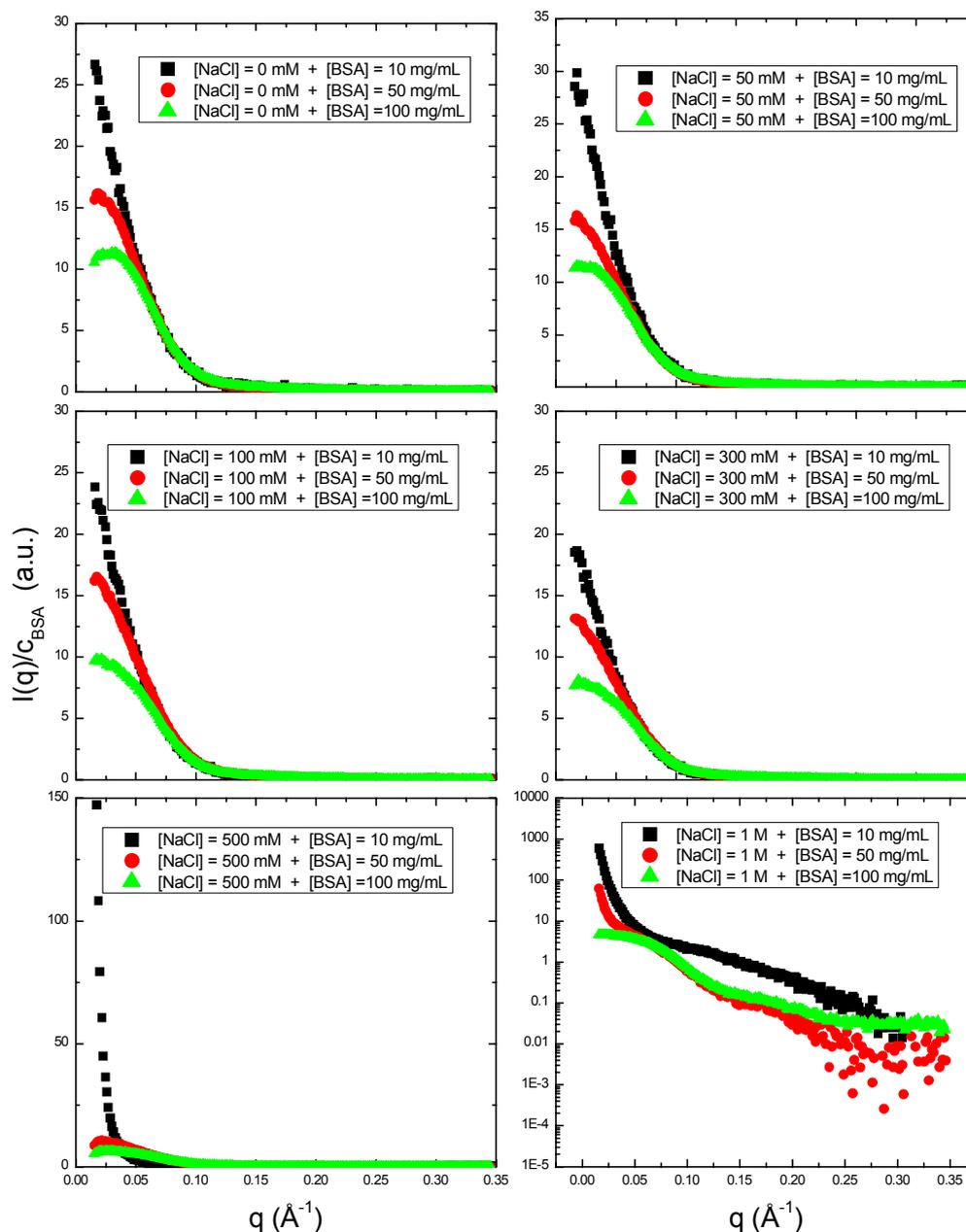


Figura 1 - Curvas de SAXs dos sistemas compostos por BSA (10, 50 e 100 mg/ml) em ausência e presença de concentrações crescentes de NaCl (50, 100, 300, 500 e 1000 mM).

3. Conclusões

O presente trabalho de pesquisa encontra-se em desenvolvimento e seus resultados serão submetidos a publicação em uma revista internacional com arbitragem.

4. Referências

- [1] Barbosa, L R S, Itri, R, et. A, *Biophysical Journal*, 98(1),(2010).

Apêndice 3

Protocolo de preparação e caracterização de sílica mesoporosa ordenada cúbica

Cíntia Fabiana Kanagussuko e Marcia C. A. Fantini

Instituto de Física da USP, Departamento de Física Aplicada, São Paulo, Brasil

1. Introdução

Nesse trabalho analisamos a dissolução do novo polímero Vorasurf 504 da Dow Chemical Co. em vários álcoois para a preparação de fases cúbicas de sílica mesoporosa ordenada e também o efeito da concentração do ácido nas propriedades estruturais desse sistema.

2. Resultados e Discussão

A seguir é exibida tabela com a descrição das amostras medidas e seus resultados. Todas as amostras medidas foram calcinadas em atmosfera de nitrogênio a 540 °C com velocidade 2 °C/min. para remoção do polímero.

Amostra	Data	Condições experim.
Amostra de Sílica produzida com vorasurf, TEOS, HCl (4mol/l) sem álcool	26/1/2009	20kV; 15mA - 900s
Amostra de Sílica produzida com vorasurf, TEOS, HCl (2mol/l) sem álcool	26/1/2009	20kV; 15mA - 900s
Amostra de Sílica produzida com vorasurf, TEOS, HCl (4mol/l) e dissolvida em metanol	27/1/2009	20kV; 15mA - 900s
Amostra de Sílica produzida com vorasurf, TEOS, HCl (2mol/l) e dissolvida em metanol	26/1/2009	20kV; 15mA - 900s
Amostra de Sílica produzida com vorasurf, TEOS, HCl (4mol/l) e dissolvida em etanol	27/1/2009	20kV; 15mA - 900s
Amostra de Sílica produzida com vorasurf, TEOS, HCl (2mol/l) e dissolvida em etanol	27/1/2009	20kV; 15mA - 900s
Amostra de Sílica produzida com vorasurf, TEOS, HCl (4mol/l) e dissolvida em isopropanol	27/1/2009	20kV; 15mA - 900s
Amostra de Sílica produzida com vorasurf, TEOS, HCl (2mol/l) e dissolvida em isopropanol	27/1/2009	20kV; 15mA - 900s
Amostra de Sílica produzida com vorasurf, TEOS, HCl (4mol/l) e dissolvida em butanol	26/1/2009	20kV; 15mA - 900s
Amostra de Sílica produzida com vorasurf, TEOS, HCl (2mol/l) e dissolvida em butanol	26/1/2009	20kV; 15mA - 900s

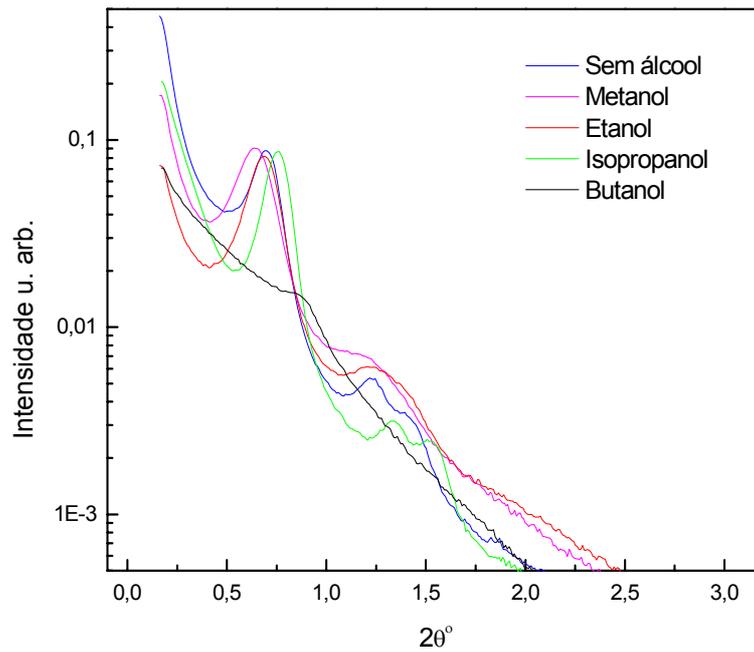


Fig. 1 : SAXS das amostras produzidas com 2 mol/L de HCl.

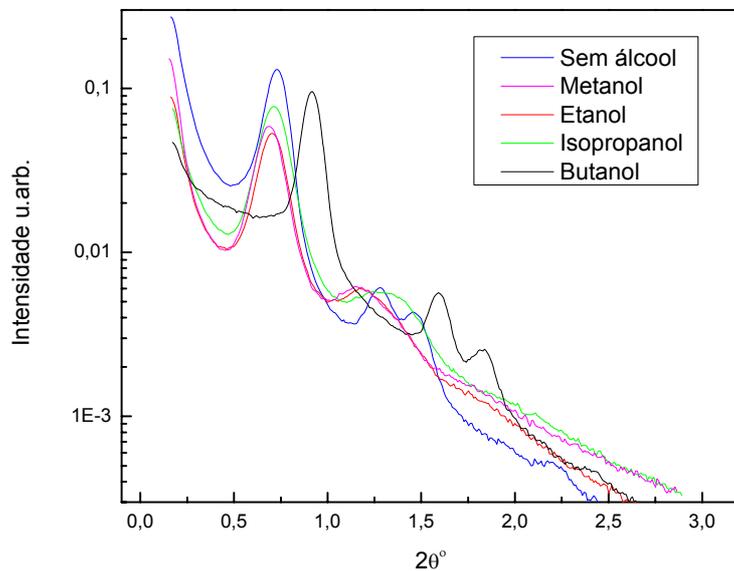


Fig. 2: SAXS das amostras produzidas com 4mol/L de HCl.

Outro resultado importante obtido foi a constatação de que o material é ordenado na ausência de álcool, ou seja, não é necessário dissolver o Vorasurf 504, menos viscoso que o B50-6600, para se obter o FDU-1. Esse resultado poderia sugerir a eliminação de uma etapa na preparação do material, ganhando-se em economia de reagentes. Entretanto, verificou-se que a dissolução do polímero na solução aquosa ácida é difícil e demorada.

A tabela 1 a seguir exhibe os valores de área, pico, largura, altura de pico, distância interplanar e parâmetro de rede de cada amostra.

Tabela 1: Resultados de SAXS

Amostra	Concentração de HCl	Área (u.arb.)	Pico (grau)	Largura (grau)	Altura (u.arb.)	Distância Interplanar (nm)	Parâmetro de rede (nm)
Sem álcool	2 mol/l	0,0095	0,70	0,14	0,06	12,6	21,9
Sem álcool	4 mol/l	0,0164	0,73	0,12	0,11	12,0	20,8
Metanol	2 mol/l	0,0129	0,65	0,18	0,07	13,7	23,7
Metanol	4 mol/l	0,0085	0,69	0,15	0,05	12,8	22,2
Etanol	2 mol/l	0,0125	0,69	0,16	0,07	12,8	22,2
Etanol	4 mol/l	0,0075	0,71	0,15	0,05	12,5	21,6
Isopropanol	2 mol/l	0,0108	0,76	0,13	0,07	11,6	20,1
Isopropanol	4 mol/l	0,0119	0,72	0,16	0,07	12,4	21,4
Butanol	4 mol/l	0,0106	0,92	0,11	0,09	9,6	16,7

Tabela 2: Resultados de adsorção.

Amostra	Área Superficial (m ² /g)	Volume de poro (cm ³ /g)	Diâmetro de poro (nm) [#]	Diâmetro de poro (nm) [*]	Espessura da Parede (nm) [*]
Sem álcool - 2M	454	0,81	11,3	13,7	4,3
Sem álcool - 4M	541	0,77	10,2	12,9	4,3
Metanol - 2M	510	0,98	13,0	15,1	4,2
Metanol - 4M	549	0,80	10,2	13,9	4,4
Etanol - 2M	479	0,92	11,2	14,1	4,1
Etanol - 4M	445	0,92	10,2	13,7	4,0
Isopropanol - 2M	512	0,70	9,6	12,3	4,0
Isopropanol - 4M	543	0,84	10,2	13,4	4,2
Butanol - 2M	534	0,88	8,7	-	-
Butanol - 4M	468	0,98	9,5	10,7	3,0

Pela tabela 1 é possível ver que todas as distâncias interplanares e conseqüentemente, os parâmetros de rede, são bem similares, com exceção da amostra diluída em butanol, cuja única vantagem é o pico de grande intensidade (área) o que demonstra um bom ordenamento em presença de solução mais ácida.

As sílicas foram também analisadas por NAI, os resultados estão mostrados nas Figuras 3 e 4. A Tabela 2 apresenta os dados de adsorção, mostrando as diferenças estruturais das várias amostras.

A tabela 2 mostra que o metanol com menor concentração de ácido e o butanol com maior concentração de ácido apresentam o maior volume de poros, mas com diâmetro médio de poros diferente, o que é importante quando se pretende armazenar maiores quantidades de substâncias de diferentes tamanhos, ou seja, adequar a estrutura ao composto a ser encapsulado. Além disso, a presença de álcool na síntese induz uma menor espessura de parede.

Diferenças em diâmetros de poros, determinados pelo método BJH e através dos dados de BJH+SAXS, apresentam discrepâncias associadas a aproximações no método de cálculo BJH e/ou avaliação do conteúdo de microporos (0.2).

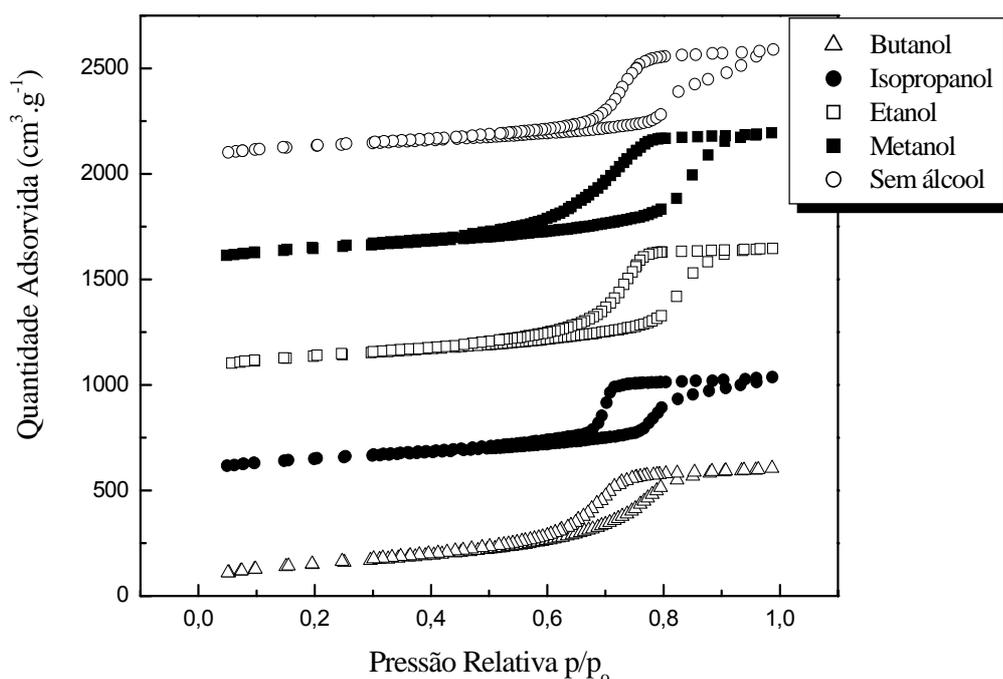


Fig. 3: Gráfico de isothermas tratadas em nitrogênio das amostras calcinadas sintetizadas com concentração de HCl 2 mol.L⁻¹.

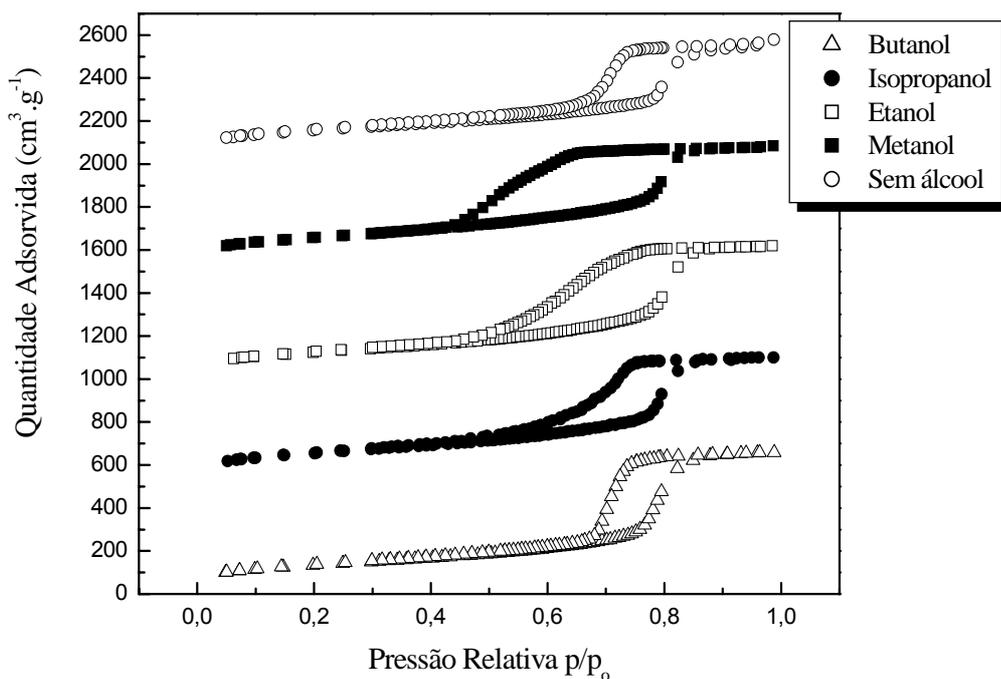


Fig. 4: Gráfico de isothermas tratadas em nitrogênio das amostras calcinadas sintetizadas com concentração de HCl 4 mol.L^{-1} .

As isothermas de adsorção/desorção (apresentadas com um deslocamento vertical) e os dados da Tabela 2 comprovam que a amostra diluída em metanol, o álcool menos hidrofóbico da série analisada, e preparada com 4 mol.L^{-1} de ácido clorídrico fornece a estrutura de sílica cúbica tipo gaiola (tinteiro) mais característica, ou seja, com grande poro interno e pequenos poros no gargalo. Entretanto o volume de poros é menor que o obtido para amostra preparada com 2 mol.L^{-1} de HCl e a área sob o pico de difração (111) também, indicando, portanto, que o aumento na concentração de ácido implica numa pior ordenação dos poros.

A tabela 2 não mostra o valor do parâmetro de rede para a amostra preparada com butanol e 2 mol.L^{-1} de HCl, pois não houve estruturação possível de ser detectada na medida de SAXS.

Pela tabela 1 pode-se observar que, com exceção da amostra preparada com isopropanol de maior hidrofobicidade, concentrações menores de ácido resultam em sílicas com maior parâmetro de rede. Uma possível explicação é que o meio mais ácido promove o encolhimento das micelas, bem como induz desordem estrutural na presença de álcoois mais hidrofílicos. Efeito oposto é observado na presença de álcoois hidrofóbicos.

3. Conclusões

O que se procurou nesse trabalho foi determinar a síntese que conduz a picos de difração com maior intensidade integrada, o que indica uma melhor estrutura e maiores parâmetros de rede para encapsulamento de maior quantidade de material em aplicações práticas. À exceção dos processos com diluição do polímero em butanol, os parâmetros de rede são comparáveis, da ordem de $(22 \pm 2) \text{ nm}$, sendo superiores aos valores da síntese com butanol. Verificou-se também que a maioria das amostras apresenta uma tendência de ter parâmetro de rede maior quando preparadas em meio menos ácido. O meio mais ácido promove o encolhimento das micelas. Um resultado importante é a possibilidade de formação da

estrutura cúbica sem dissolução do polímero em álcool, dando origem a um processo de síntese mais barato, com parâmetro de rede adequado e boa ordem estrutural. É importante salientar que o polímero tem baixa solubilidade na solução aquosa ácida, portanto, como não foi obtido um resultado distintamente melhor sem álcool, a remoção do processo de diluição em álcool não é aconselhada.

O uso de álcoois mais hidrofóbicos também contribui para um encolhimento das micelas, dando origem a poros de menor diâmetro.

Os resultados mostraram que a diluição do polímero em metanol é o procedimento mais adequado para preparar o material com maior área superficial e estrutura mais próxima da cúbica do tipo gaiola, que é o fator mais relevante.

Quanto a concentração de ácido clorídrico, para a obtenção da estrutura cúbica com poros de entrada menores, o mais adequado é a concentração de 4 mol.L^{-1} , porém, a concentração menor de 2 mol.L^{-1} fornece uma estrutura mais ordenada e de maior volume de poros; a decisão quanto à acidez da síntese dependerá da substância a ser encapsulada na sílica.

A síntese da sílica mesoporosa ordenada com estrutura FDU-1 com molde de Vorasurf 504 ainda precisa ser mais investigada, através de um estudo do tipo de ácido, e da quantidade de álcool para dissolver o polímero, bem como deve-se ainda avaliar se a temperatura de síntese pode influenciar nos resultados, pois sabe-se que esse polímero pode induzir um melhor ordenamento micelar quando aquecido a 50°C .

[1] Mark. E. Davis, Nature 417 (2002) 813.

[2] D.Zhao et al., Science 279 (1998) 548.

[3] C. Yu et al., Chem. Comm. (2000) 575.

Apêndice 4

Estudo de óxidos de Zr-Ce mesoporosos ordenados por SAXS

Rebeca Bacani e Márcia C. A. Fantini

Instituto de Física da USP, Departamento de Física Aplicada, São Paulo, Brasil

1. Introdução

Neste trabalho foram desenvolvidas sínteses de $ZrO_2-x\%CeO_2$, baseadas na preparação da sílica mesoporosa ordenada SBA-15, utilizando um molde de co-polímero tribloco Pluronic P-123, diversos precursores de zircônio e cério e diferentes métodos. Os métodos de síntese testados foram com: precursores de cloreto hidratado (com $x=50,70$ e 90), precursores de cloreto anidro ($x=50$ e 90), precursores nitrato ($x=90$), solução supersaturada de nitrato ($x=90$), do tipo híbrido com Zr, Ce e Si (com 10%mol de Si e $x=90$), paliçada de Si (com 10 e 30%mol de Si e $x=90$) e paliçada de Si com temperatura de síntese de 40_C (com 30%mol de Si e $x=90$), visando obter paredes compostas por fase cristalina única e grande área superficial, para futuras aplicações em catálise.

2. Resultados e Discussão

Todos os experimentos relacionados ao projeto descrito na solicitação de uso do NANOSTAR são descritos pela Tabela 1.

Tabela 1 - Descrição das amostras analisadas no período de Jan/09 a Jun/09

Descrição das amostras analisadas (síntese e calcinação)	Data do experimento de SAXS	Condições experimentais
90% de CeO ₂ + solução super saturada. de acetona (como sintetizada)	30/01/2009	40KV, 30mA, 4horas, parasita CW
90% de CeO ₂ + solução super saturada de acetona (calcinação em ar até 300°C, 1°C/min)	12/02/2009	40KV, 30mA - 2000s, parasita CW
90% de CeO ₂ + solução super saturada de acetona (calcinação em N ₂ até 540°C, 1°C/min + 2h em N ₂ + 2h em ar)	06/03/2009	40KV, 30mA - 1hora, parasita CW
90% de CeO ₂ e com 10% de SiO ₂ , P123+TEOS+Zr-Ce agitado 24 h (como sintetizada)	16/03/2009	40KV, 30mA - 30min, parasita CW
90% de CeO ₂ e com 10% de SiO ₂ , P123+TEOS+Zr/Ce agitado 24h (calcinação em N ₂ até 540°C, 1°C/min + 2h em N ₂ + 2h em ar)	19/03/2009	40KV, 30mA - 60s, parasita CW
90% de CeO ₂ e com 10% de SiO ₂ -TEOS +P123+TEOS agitado 6h, adicionado Zr-Ce agitado 24h (calcinação em N ₂ até 540°C, 1°C/min + 2h em N ₂ + 2h em ar)	31/03/2009	40KV, 30mA - 2horas, parasita CW
90% de CeO ₂ e com 10% de SiO ₂ -TEOS +P123+TEOS agitado 6h, adicionado Zr-Ce agitado 24h (calcinação em N ₂ até 540°C, 1°C/min + 2h em N ₂ + 2h em ar)	03/04/2009	40KV, 30mA - 60s, parasita CW
90% de CeO ₂ e com 10% de SiO ₂ -TEOS +P123+TEOS agitado 6h, adicionado Zr-Ce agitado 24h (calcinação em N ₂ até 540°C, 1°C/min + 2h em N ₂ + 2h em ar)- testes com t e T.	26-28/06/2009 1,8/07/2009	40KV, 30mA - 60s, parasita CW

Os resultados de SAXS encontram-se a seguir.

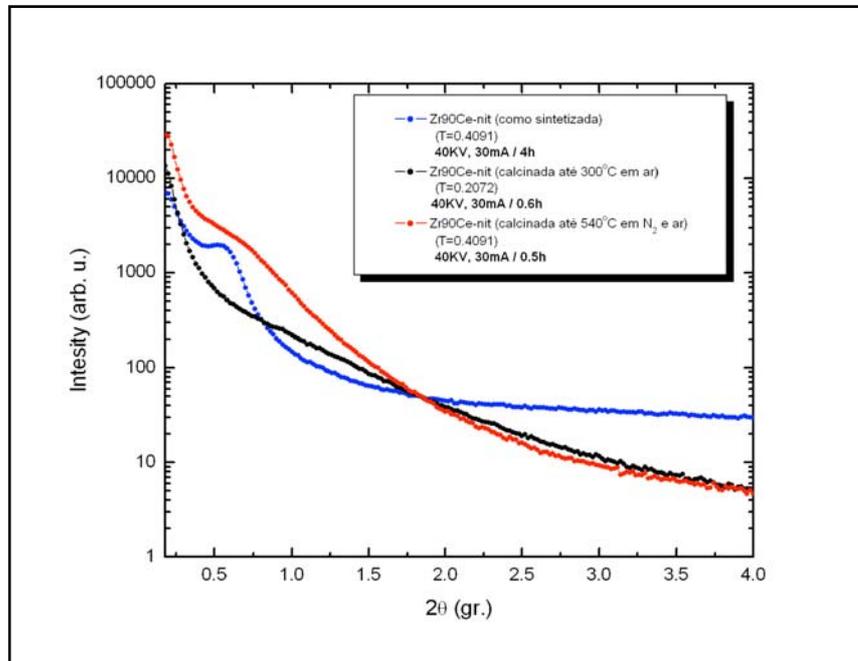


Fig. 1 - Resultados para a amostra de 90% de Ce colocada na solução super saturada (como sintetizada e calcinada).

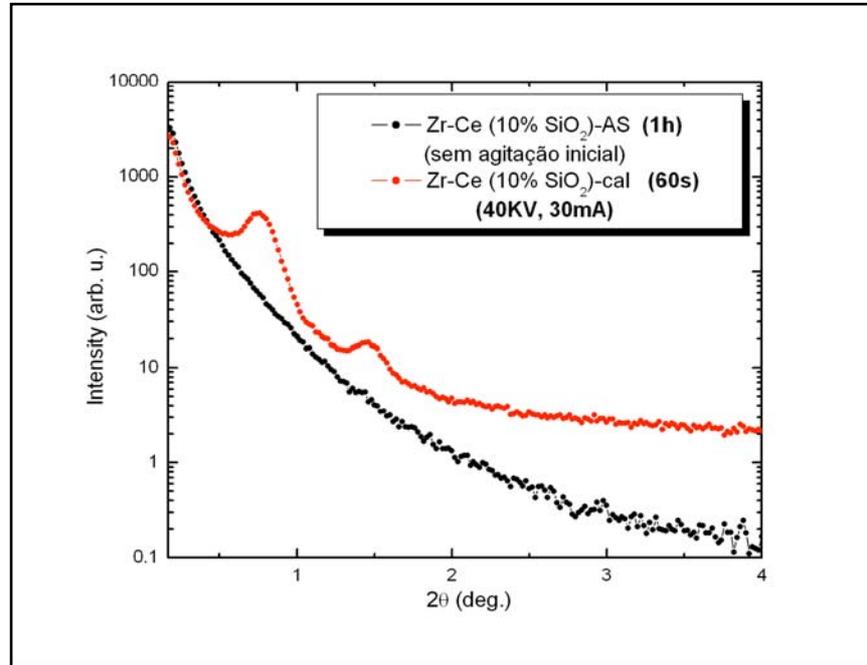


Fig. 2 - Resultados para a amostra de 90% de Ce sintetizada com 10% de Si, onde todos os precursores foram juntamente agitados por 24h (como sintetizada e calcinada).

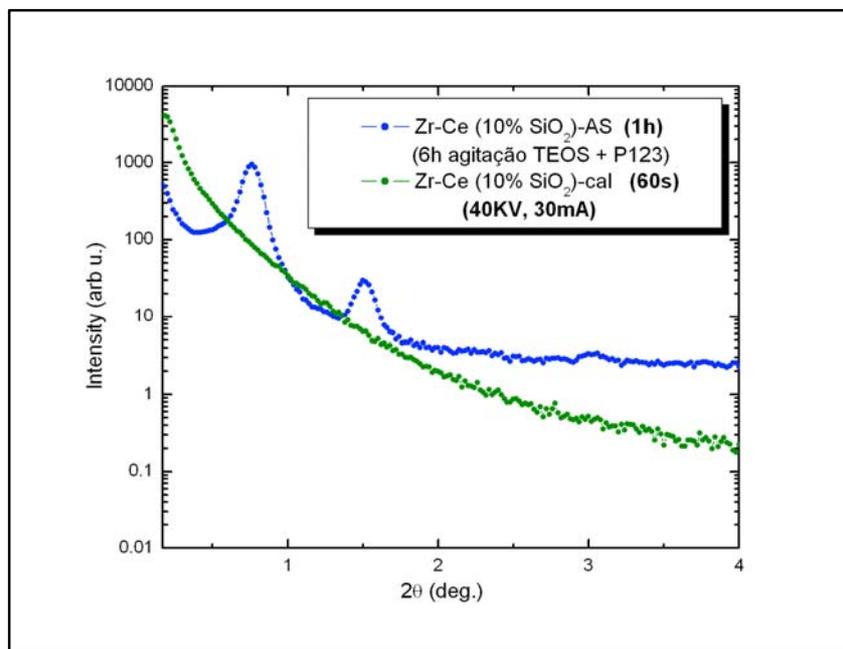


Fig. 3 - Resultados para a amostra de 90% de Ce sintetizada com 10% de Si, onde o P123 e o TEOS, polímero e precursor de Si, respectivamente, foram agitados por 6h. Após esse processo, os precursores de Zr-Ce foram adicionados e agitados por mais 24h (como sintetizada e calcinada).

3. Conclusões

As amostras sintetizadas possuem estrutura mesoporosa ordenada, que colapsa quando ocorre a transformação de estrutura das paredes de amorfa para cristalina, verificada por difração de raios X a alto ângulo em amostras submetidas a tratamento térmico com $T > 300^{\circ}\text{C}$. Os compósitos polímero/(zircônio-cério) sintetizados a partir de cloretos formam uma estrutura lamelar organizada, que se transforma num sistema poroso desordenado após a calcinação para a retirada do molde. O processo de decomposição/remoção do molde até 540°C produz mudanças de fase nos precursores metálicos, além das transformações morfológicas. Para uma concentração de 90% de CeO_2 obtém-se um material poroso com paredes homogêneas de estrutura fcc e de maior estabilidade mecânica. Os valores de área superficial e volume de poros dependem fundamentalmente do método de preparação do material e independem da concentração de CeO_2 . Aumentos significativos da área superficial ($100\text{m}^2/\text{g}$) e do volume de poros ($0,4\text{cm}^3/\text{g}$) são obtidos a partir da introdução de sílica nesses sistemas. Foram alcançados área superficial 6 vezes maior e tamanho de cristalito 4 vezes superior à do material similar nanocristalino preparado por gel-combustão. Esses valores também são iguais aos reportados para os melhores materiais porosos a base de zircônia-céria, preparados por outros métodos, encontrados na literatura.

Apêndice 5

Estudo de sistemas de relevância biológica por SAXS - Aplicações e possibilidades do equipamento Nanostar - Bruker

Hector Milani^a, Leandro R.S.Barbosa^b, Rosangela Itri^b

^aCentro de Biotecnologia, Havana, Cuba

^bInstituto de Física, USP, São Paulo, Brasil

1. Introdução

Neste trabalho estudamos três diferentes sistemas de relevância biológica. O primeiro dele trata-se da formação de agregados de peptídeos do GHRP-6 (Growth hormone releasing peptide, cujo seqüência é: His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-CONH₂), em função da composição do meio no qual está inserido o peptídeo, tais como: composição do tampão e pH do meio. No segundo estudamos a possibilidade de se obter curvas de SAXS de proteínas de baixo peso molecular em altas concentrações. Para tanto utilizamos a LBP (peptídeo derivado da proteína Lipopolysaccharide-binding protein, cujo seqüência é: Ac-His-Ala-Arg-Ile-Lys-D-Pro-Thr-Phe-Arg-Arg-D-Leu-Lys-Trp-Lys-Tyr-Lys-Gly-Lys-Phe-Trp-NH₂, sendo seu peso molecular igual a 2.6 kDa. E por fim, estudamos o efeito do Zinco na estrutura de uma proteína relacionada também, ao fator de crescimento rh-EGF Epidermal Growth Factor, cuja seqüência é: NH₂-Asn-Ser-Asp-Ser-Glu-Cys-Pro-Leu-Ser-His-Asp-Gly-Tyr-Cys-Leu-His-Asp-Gly-Val-Cys-Met-Tyr-Ile-Glu-Ala-Leu-Asp-Lys-Tyr-Ala-Cys-Asn-Cys-Val-Val-Gly-Tyr-Ile-Gly-Glu-Arg-Cys-Gln-Tyr-Arg-Asp-Leu-Lys-Trp-Trp-Glu-Leu-Arg-COOH e seu peso molecular é de cerca 6.2 kDa.

2. Resultados e Discussão

Considerando o primeiro sistema estudado, foram testados diferentes meios tamponantes, são eles:

- a) Peptídeo em tampão Citrato + NaCl (Peptídeo Agregado)
- b) Peptídeo em Ácido. Acético (Peptídeo Nativo)
- c) Peptídeo em tampão Citrato (pH 6.0)
- d) Peptídeo em tampão Fosfato (pH 6.0)
- e) Peptídeo em tampão Acetato de Sódio
- f) Peptídeo em tampão Tartrato de Sódio

Gostaríamos de ressaltar que as medidas foram realizadas no novo equipamento Nanostar - Bruker, pertencente ao Laboratório de Cristalografia do IFUSP. As medidas duraram entre 4 e 7 horas, dependendo do sistemas. Após as medidas as curvas de SAXS foram corrigidas pela

transmissão da amostra, tempo de medida e também pelo espalhamento do tampão. É importante salientar que estamos em fase de análise dos presentes resultados, além de também utilizar outras técnicas espectroscópicas de caracterização para estes mesmos sistemas. Todos os tampões foram feitos a 100 mM e os resultados obtido foram dispostos de acordo com as medidas realizadas.

a) Peptídeo em tampão Citrato + NaCl (Peptídeo Agregado) - É interessante que a curva de SAXS deste sistema se mostrou compatível com a presença de agregados cilíndricos “ocos”. É como se o peptídeo estivesse presente apenas nas paredes de tal cilindro. A figura 1 mostra esta curva de SAXS, juntamente com os melhores ajustes obtidos supondo um cilindro oco e também uma geometria qualquer. Esta última análise chama-se IFT (Indirect Fourier Transform) e utilizamos o programa desenvolvido pelo prof. Otto Glatter (Áustria) chamado GIFT.

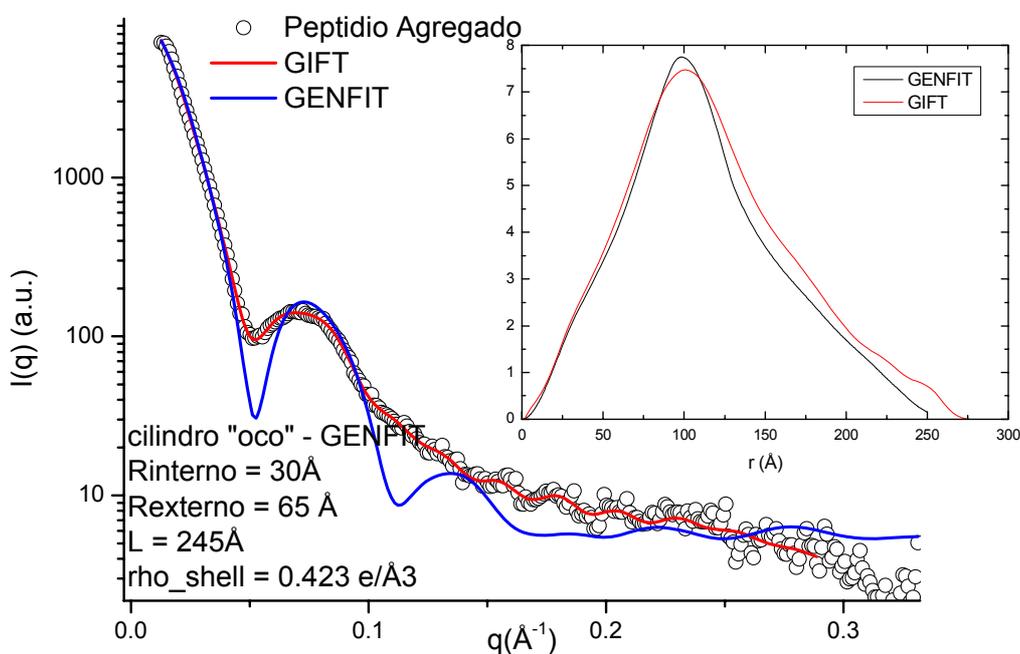


Figura 1 - Curva de SAXS do sistema composto pelo Peptídeo (GHRP-6) em tampão Citrato + NaCl.

b) Peptídeo em Ácido. Acético (Peptídeo Nativo) - Já no caso do peptídeo em presença de Ácido acético observamos um efeito diverso na curva de SAXS. A figura 2 mostra a comparação entre as curvas de SAXS do mesmo peptídeo, sob duas diferentes condições: em tampão Citrato + NaCl (linha cheia preta) e em presença de Ácido Acético (linha cheia vermelha).

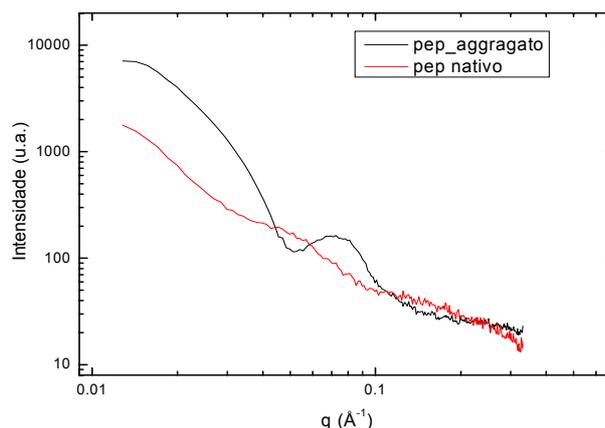


Figura 2 - Comparação entre as curvas de SAXS do peptídeo em duas diferentes condições (ver texto para detalhes).

Não conseguimos esclarecer qual seria a forma do agregado formado pelo peptídeo em presença de ácido acético, estamos ainda tentando alguns modelos, se sucesso até o presente momento.

c) Peptídeo em tampão Citrato (pH 6.0) (Semelhante ao item a), mas em ausência de NaCl)

Neste caso a curva de SAXS se torna ainda mais complexa, pois temos que considerar a presença de agregados, provavelmente cilíndricos, considerando também a correlação entre estes.

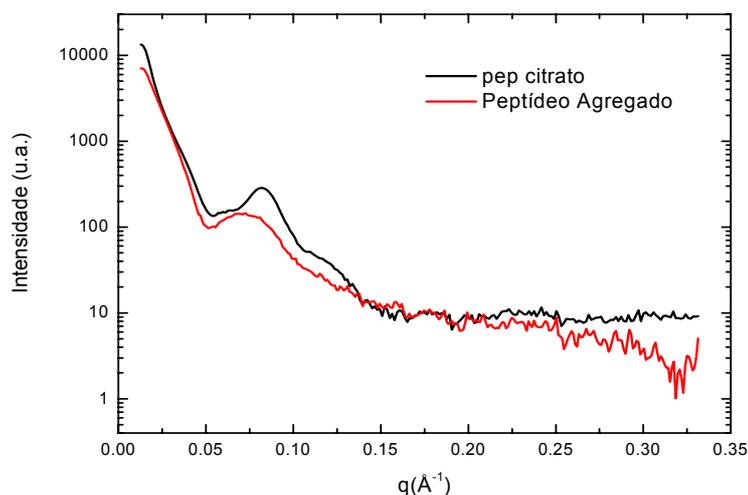


Figura 3 - Curvas de SAXS do peptídeo em presença de em tampão Citrato (pH 6.0) em ausência (preta) e presença de NaCl (vermelha).

c) Peptídeo em tampão fosfato (pH 6.0)

Neste caso, obtivemos uma curva de SAXS muito semelhante à obtida para o peptídeo agregado em presença de NaCl. Podemos ver que as curvas de SAXS possuem um início semelhante, inclusive com a mesma posição de mínimo local (seta preta na figura). No entanto, na regiões de médios valores de vetor de espalhamento, q , estas curvas são bem diferentes. Em conjunto, estes fatores indicam que o agregado nessa condição (i.e., em tampão fosfato) possui um tamanho similar ao encontrado em tampão Citrato e em presença de NaCl, mas a forma de ambos agregados deve ser diferente.

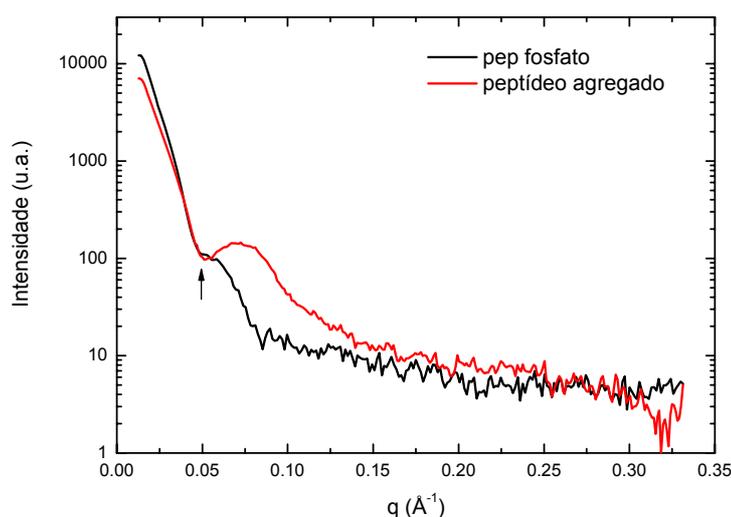


Figura 4 - Curvas de SAXS do peptídeo em tampão Citrato (vermelha) e em tampão fosfato (preta).

d), e) e f) As curvas compostas pelo peptídeo em tampão Acetato e tartrato não mostraram um sinal detectável por SAXS, indicando que sob tais condições não ocorre a formação de tal agregado, ou que esta necessita de um maior tempo para ocorrer.

2. Passaremos agora ao estudo do segundo sistema biologicamente relevante que estudamos dentro deste projeto de pesquisa. Esta etapa do projeto conta com somente uma curva experimental, gostaríamos de saber se seria possível obter uma curva de SAXS para uma proteína de baixo peso molecular com o equipamento Nanostar e mais ainda, evidenciar as possíveis interações entre proteínas para um sistema concentrado. Para tanto utilizamos o peptídeo LBP (peptídeo derivado da proteína Lipopolysaccharide-binding protein, cujo seqüência é: Ac-His-Ala-Arg-Ile-Lys-D-Pro-Thr-Phe-Arg-Arg-D-Leu-Lys-Trp-Lys-Tyr-Lys-Gly-Lys-Phe-Trp-NH₂, sendo seu peso molecular igual a 2.6 kDa.

Como podemos ver na figura abaixo, mesmo uma proteína com baixo peso molecular pode ser estudada por SAXS nessas condições, ou seja em altas concentrações (cerca de 28 mg/ml). A curva de SAXS é condizente com um sistema de esferas de baixa polidispersão interagindo via um potencial repulsivo (do tipo Coulombiano) de médio alcance. O raio de tal esfera é de cerca 15 Å, e existem cerca de 3 cargas na superfície de tal esfera.

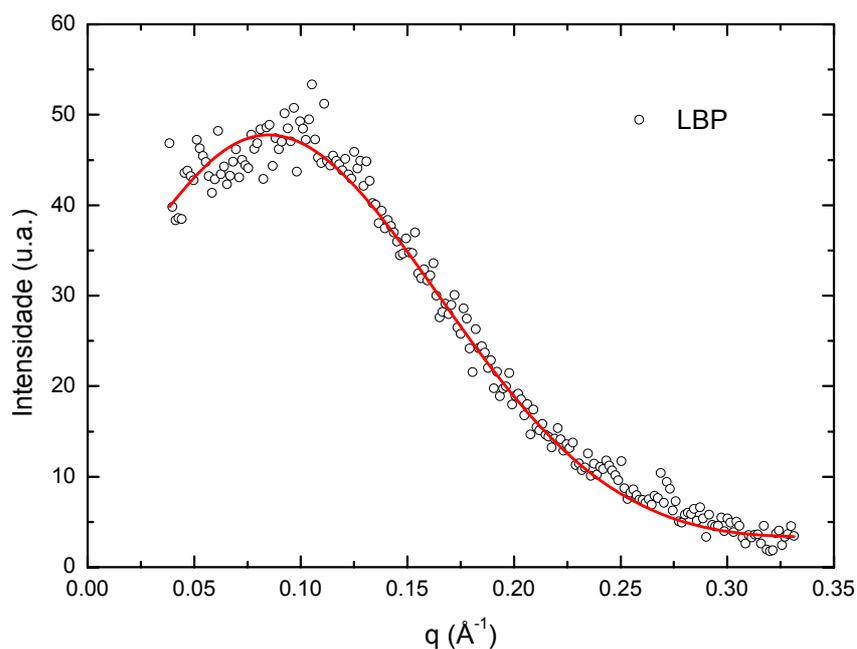


Figura 5 - Curva de SAXS da proteína LBP (28 mg/ml), mostrando que é possível realizar medidas de SAXS de proteínas muito pequenas, se estas estiverem em altas concentrações.

3. Por fim, estudamos a influência do Zinco na estrutura de uma proteína também relacionada ao fator de crescimento rh-EGF Epidermal Growth Factor, cuja seqüência é: NH₂-Asn-Ser-Asp-Ser-Glu-Cys-Pro-Leu-Ser-His-Asp-Gly-Tyr-Cys-Leu-His-Asp-Gly-Val-Cys-Met-Tyr-Ile-Glu-Ala-Leu-Asp-Lys-Tyr-Ala-Cys-Asn-Cys-Val-Val-Gly-Tyr-Ile-Gly-Glu-Arg-Cys-Gln-Tyr-Arg-Asp-Leu-Lys-Trp-Trp-Glu-Leu-Arg-COOH e seu peso molecular é de cerca 6.2 kDa. Neste caso, as curvas de SAXS apresentam resultados bem distintos dependendo da presença de Zinco na solução, que provavelmente induz um agregamento protéico, evidenciado em menor escala no sistema em ausência de Zn.

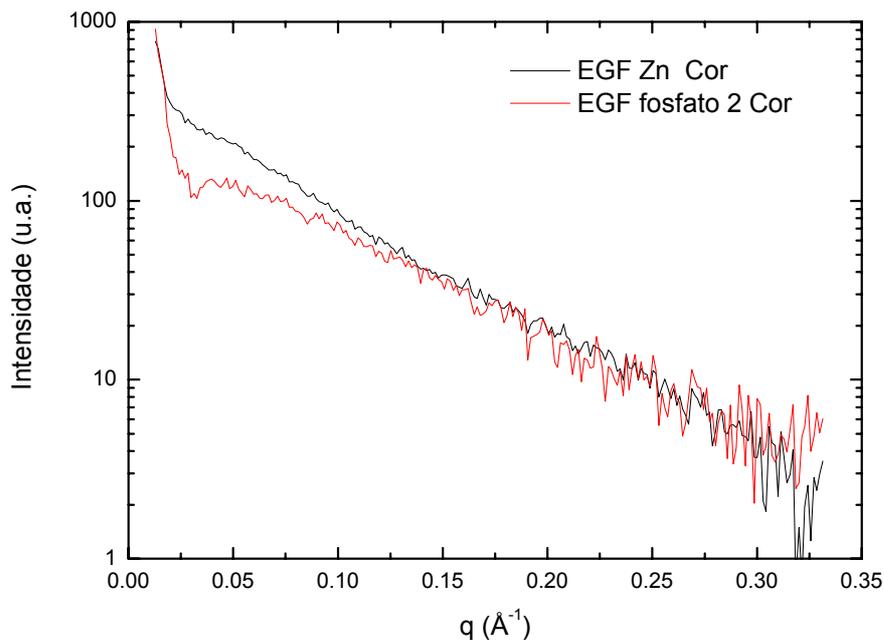


Figura 6 - Curva de SAXS da proteína EGF, em ausência (vermelha) e presença de Zinco (preta).

3. Conclusões

De um modo geral, podemos afirmar que o equipamento Nanostar, adquirido pelo Laboratório de Cristalografia do IFUSP se mostrou altamente eficaz no estudo de sistemas de relevância biológica. Em especial no estudo da formação de agregados formados por peptídeos, no estudo dos fatores de forma e de interferência de proteínas de baixo peso molecular em solução, assim como no estudo da influência de metais na estrutura de hormônios de crescimento.

Apêndice 6

Transição de fase em membranas de lipídio e transição de fase em soluções de fragmentos de DNA

E. A. Oliveira (IFUSP), B.B. Gerbelli (IFUSP), R.N. Bicev (IFUSP))

Resumo

O objetivo desse estudo é caracterizar dois sistemas liquido-cristalinos; i) mesofases lamelares de lecitina e água e ii) soluções de fragmentos de DNA (150 pares de base) combinando técnicas de difração de raios X e microscopia de luz polarizada e fluorescência. A etapa posterior do trabalho consiste na preparação de complexos de lipídios e DNA para estudar a organização supramolecular formada pelo encapsulamento do DNA na fase lamelar e, sobretudo os efeitos de confinamento. Os resultados obtidos nesses ensaios são essenciais para a preparação dos complexos e para comparação da organização do DNA em solução e no complexo. Neste relatório são apresentados os resultados de experimentos de raios X, em fases nas fases lamelares e nas soluções de DNA. São apresentados também os resultados obtidos nas observações em microscopia de luz polarizada e de fluorescência. Explorando a diluição do sistema lamelar, determinamos a espessura da bicamada de lipídios, e o limite de diluição desse sistema, que corresponde ao máximo de hidratação da bicamada, com cerca de 60% de água (em massa). O estudo das soluções de DNA permitiu a determinação da distância de repetição entre os fragmentos de DNA, que varia de acordo com a concentração da solução, passando da fase isotrópica para a fase colestérica. Também é apresentado o resultado de um experimento em um complexo de lipídeo/DNA, onde observa-se a coexistência de duas fases, também confirmado pelas observações em microscopia.

Introdução

A preparação de sistemas lamelares incorporando biomoléculas oferece uma grande oportunidade de preparar sistemas supramoleculares que podem ser usados como sistema modelo para a compreensão de processos biológicos e também para estudos mais fundamentais de sistemas confinados. A etapa inicial desse estudo consiste em caracterizar os sistemas individualmente, ou seja a fase lamelar e a solução da biomolécula que se pretende incorporar, que nesse estudo serão fragmentos de DNA de 150 pares de base. Os resultados apresentados a seguir consistem na determinação dos parâmetros microscópicos que caracterizam os arranjos microscópicos, ou seja a periodicidade lamelar, a espessura da bicamada de lipídios, e para a solução de DNA, a distância média entre os fragmentos de DNA, aqui encarados como bastões rígidos, em função da concentração da solução. Esses resultados são fundamentais para a preparação dos complexos, e para a compreensão dos arranjos que surgem em função do confinamento imposto pelas bicamadas aos bastões de DNA. Ambos os sistemas são considerados cristais líquidos liotrópicos, pois as transições de fase ocorrem por variação da concentração (de lipídeo ou DNA), e apresentam propriedades anisotrópicas.

Materiais

As soluções de DNA com baixa concentração apresentam-se como uma fase isotrópica, e aumentando-se a concentração, ocorrem transições para a fase colestérica e em seguida, para a fase hexagonal. A interação relevante entre os bastões de DNA é de origem eletrostática, uma vez que o DNA é uma molécula altamente carregada (2 elétrons\par de base), o que resulta em um diâmetro efetivo maior do que o diâmetro nú, da molécula, que é da ordem de 2nm (Figura 1). Na preparação das amostras utilizadas nesse trabalho, o DNA é adquirido da Sigma, extraído de timus de boi, e submetido a sonicação para quebra da molécula em fragmentos menores. Para as observações em microscopia de fluorescência, o DNA é marcado com uma prova fluorescente, YOYO (Molecular Probes). As soluções foram preparadas com água ultra pura variando as concentrações entre 0,084mg / mL e 0,45mg / mL.

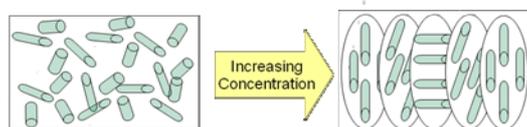


Figura. 1:- Representação da molécula de DNA como um bastão rígido, e da transição de fase isotrópico-colestérico, formando uma estrutura helicoidal.

As fases lamelares são preparadas com lecitina de soja, (Avanti-polar), que misturamos com simulsol (para dar maior flexibilidade a membrana) numa proporção de 70% e 30%, respectivamente. A mistura é solubilizada em ciclo-hexano e liofilizada. Esse material depois de seco, é então utilizado na preparação das amostras, pesando-se as quantidades desejadas de lipídio e água, que são misturados em tubo fechado. Foram preparadas amostras com concentração de lipídio variando 30% a 70 % em massa.

As amostras de DNA/água foram preparadas com DNA da Sigma (Tymus de boi) marcado com fluorescência (YOYO) que se intercalam entre os pares de base

Resultados

a) Fase Lamelar

Em uma fase lamelar, a partir de parâmetros geométricos, espera-se que a periodicidade lamelar D seja inversamente proporcional a fração volumétrica de lipídio ϕ_{lip} ; $D = \delta_m / \phi_{lip}$, onde δ_m é espessura da bicamada de lipídio. A periodicidade lamelar, por sua vez, é determinada por meio de expedimentos de espalhamento de raios X, onde espera-se um pico de espalhamento; $q_{01} = 2\pi/D$, e picos de ordem superior; $q_{02} = 2q_{01}$, $q_{03} = 3q_{01}$, etc. A figura 3

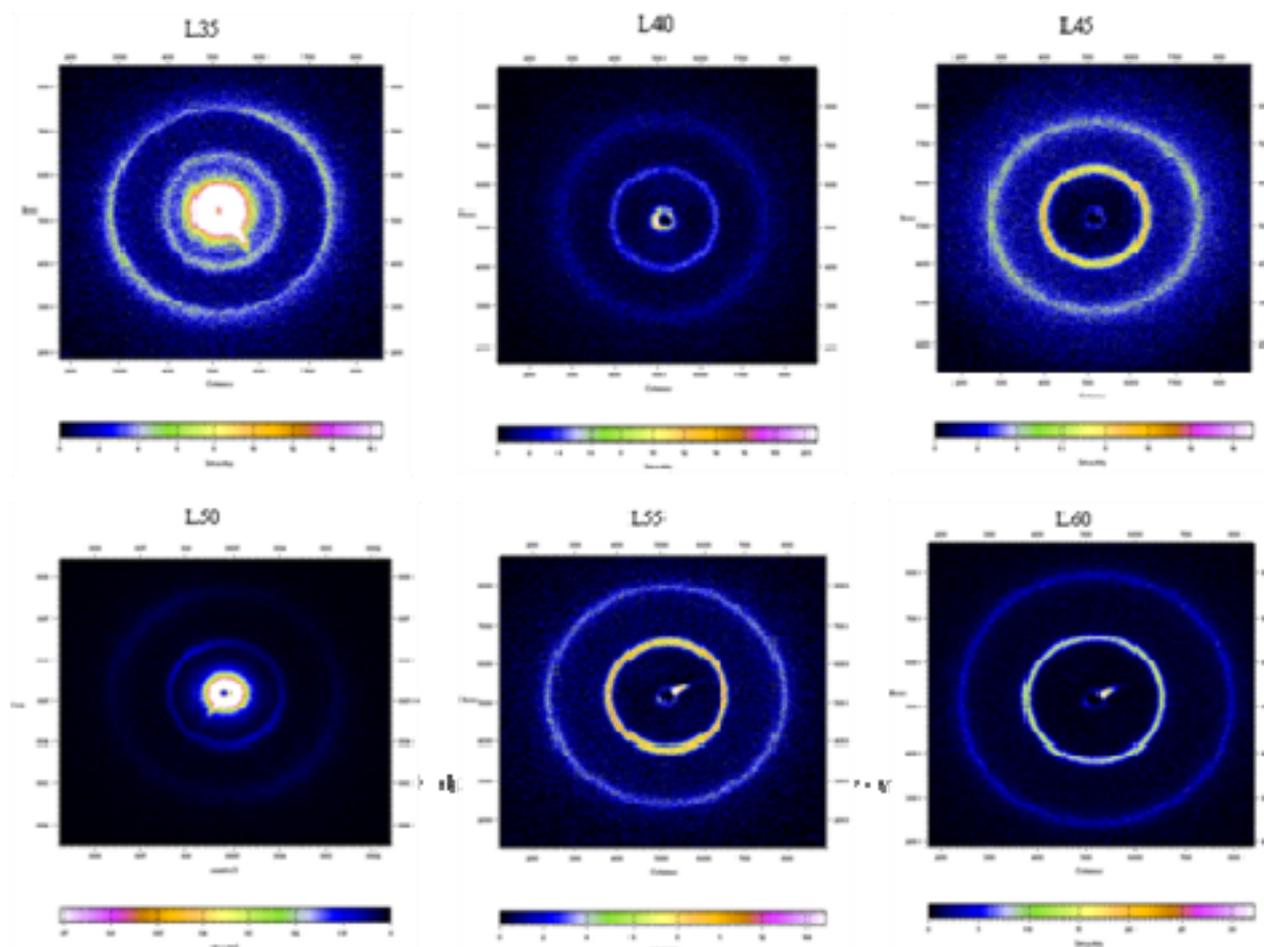
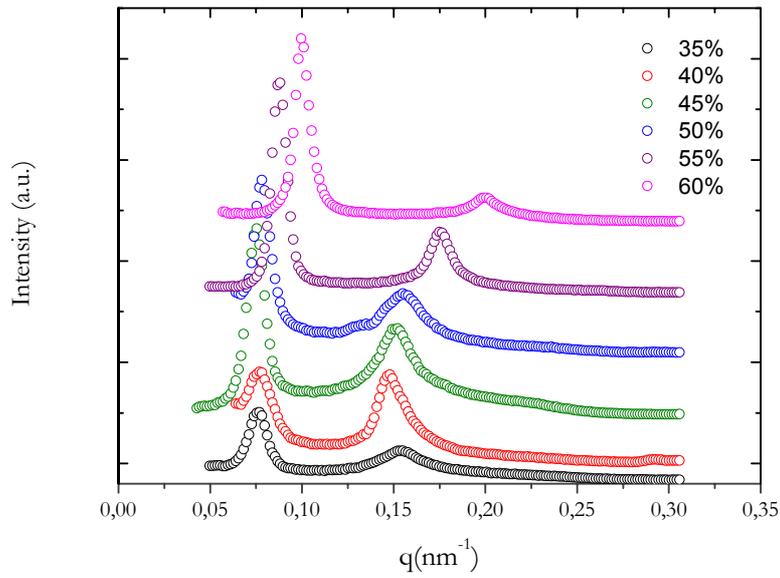
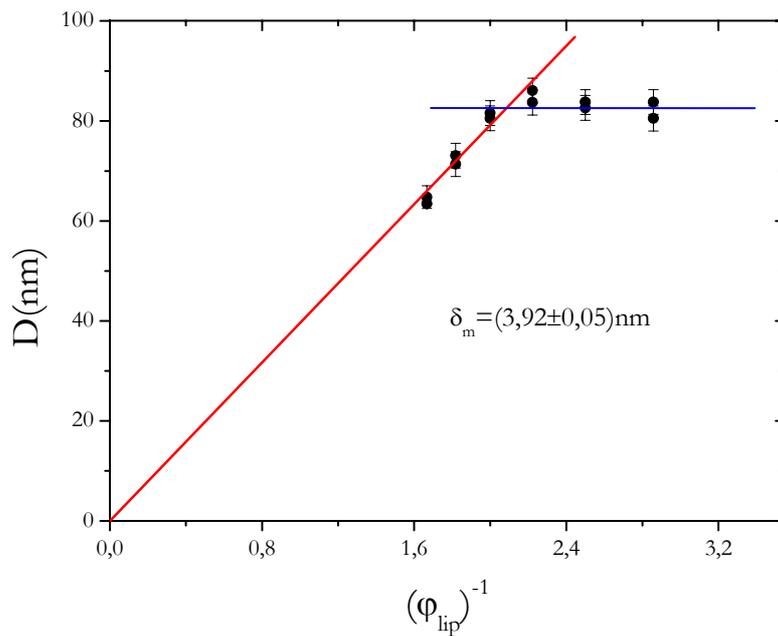


Figura 2: Espalhamentos observados para as fases lamelares de lecitina não orientadas, onde observa-se a presença de picos de primeira e segunda ordem.

Na figura 3a, é apresentada a evolução da periodicidade lamelar em função da concentração de lipídios. Observa-se que à medida que a quantidade de água diminui, os picos de espalhamento deslocam-se para valores de q maiores, o que corresponde à uma diminuição da periodicidade lamelar. O resultado final é apresentado na figura 3b, ilustrando o valor da periodicidade lamelar, em função de $1/\phi_{lip}$. Por meio desse gráfico, podemos determinar a espessura da bicamada de lipídio, que é dependente do tamanho da cadeia hidrocarbônica do lipídio utilizado. A lecitina de soja utilizada nesse trabalho, é composta na sua maior parte de DMPC (dimiristoil fosfatidil colina), e a espessura obtida é igual $(3,92 \pm 0,05) \text{ nm}$. Observa-se ainda na figura 3b, que a partir de uma certa concentração de lipídios, a periodicidade lamelar não varia mais. Isso corresponde ao limite de hidratação, aumentando-se a quantidade de água, as bicamadas se hidratam e ficam mais afastadas, e a periodicidade lamelar aumenta. No limite de hidratação, a fase lamelar passa a coexistir com excesso de água, e para esse sistema o limite de hidratação corresponde a aproximadamente 67% de água, em massa. Esse limite de hidratação depende do grupo polar do lipídio.



(a)



(b)

Figura 3: (a) Evolução da periodicidade lamelar com a concentração de lipídios em solução (% em massa). (b) Periodicidade lamelar em função do inverso da fração volumétrica de lipídios, mostrando o limite de diluição.

b) Soluções de DNA

Nas soluções de DNA mais diluídas observa-se um anel isotrópico de espalhamento, bastante difuso que se desloca para valores de q maiores. À medida que a solução torna-se mais concentrada.

Isso é ilustrado na figura 4(a) e 4(b). Essa mudança corresponde a uma transição de fase; da fase isotrópica para a fase colestérica. Os experimentos foram realizados em amostras não orientadas, inseridas em capilares ou colocadas entre espaçadores.

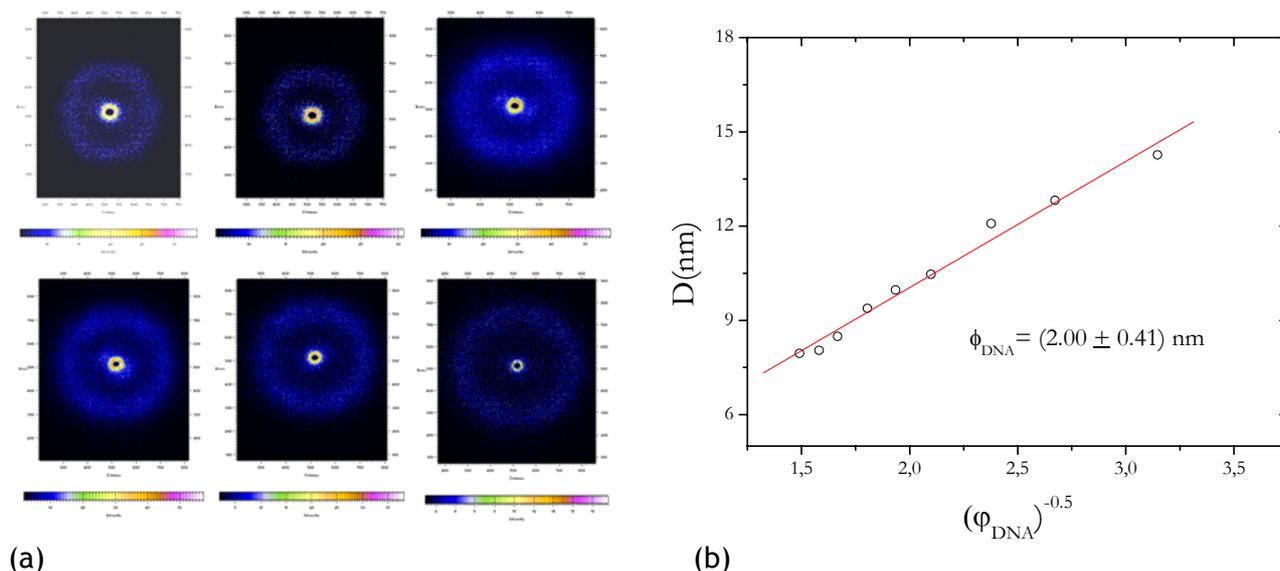


Figura 4: Espalhamento de raios X obtidos para soluções de DNA em água, variando-se a concentração de DNA. (a) difratogramas obtidos e (b) distância média entre bastões em função da concentração. O valor extrapolado para concentração 100% de bastões, é igual ao diâmetro do DNA “nu”, que corresponde a 2nm.

Os resultados obtidos nos experimentos de raios X são confrontados com observações em microscopia de luz polarizada e de fluorescência (no caso do DNA marcado com prova fluorescente). Na figura 5(a) observa-se a textura em luz polarizada para uma solução de DNA na fase colestérica, com domínios onde a estrutura helicoidal tem seu eixo perpendicular à direção de propagação da luz, formando um padrão de linhas claras e escuras alternadas, como uma impressão digital. A partir da distância entre essas linhas, determinamos o passo da hélice, que corresponde a $1 \mu\text{m}$.

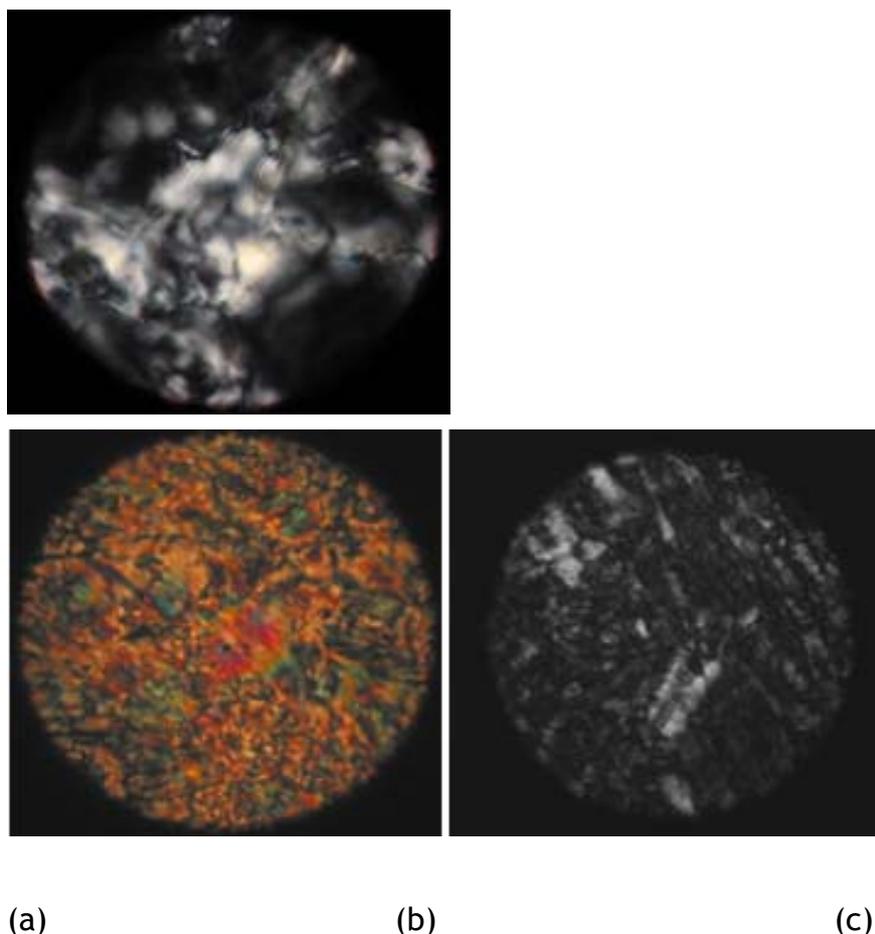


Figura 5: (a) DNA na mesofase colestérica com meio passo da hélice 1 μm . (b) e (c) Textura típica de uma fase lamelar de lipídios, para amostras com diferentes espessuras. Na amostra mais espessa a birrefringência é maior e se apresenta mais colorida.

Conclusões e Perspectivas

Os resultados apresentados acima consistem na primeira etapa de caracterização das fases lamelares e do solução de DNA. O passo seguinte consiste na preparação de complexos, que possam incorporar o DNA intercalado entre as bicamadas de lipídios e verificar as organizações possíveis, em função da composição do complexo; concentração de lipídios e DNA. Um exemplo é mostrado a seguir, para uma única amostra que foi preparada, com a seguinte composição: ,8 mg de DNA, 54,9 mg de lipídio e 32,3 mg água. Na figura 6, observa-se a textura da amostra entre polarizadores cruzados, que corresponde a uma textura de fase lamelar e na figura (b) a mesma região é observada em fluorescência, mostrando uma fluorescência bastante homogênea. Isso indica a presença do DNA incorporado na fase lamelar, sem uma coexistência de fases.

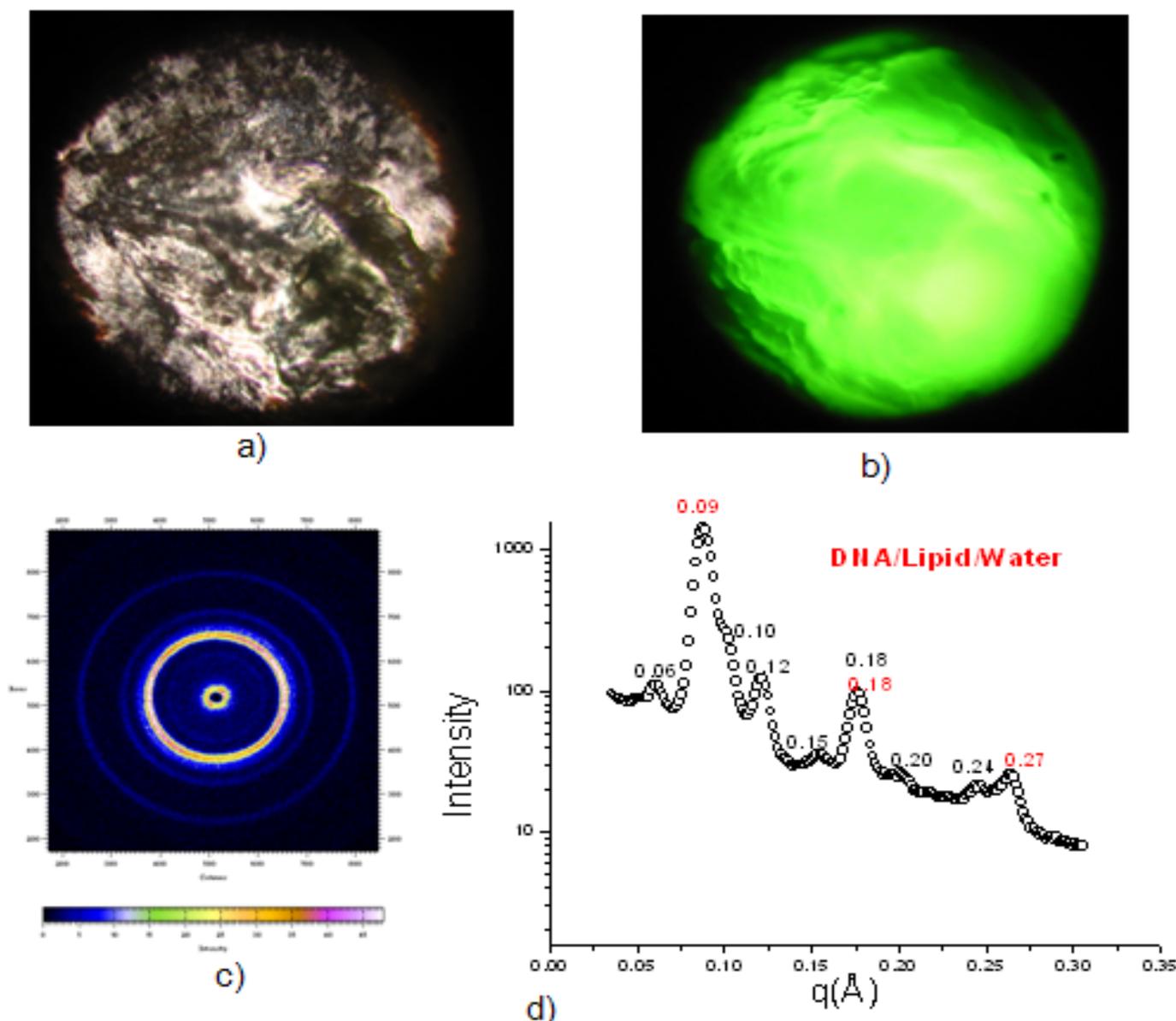


Figura 6: (a)- Textura do complexo de lipídio/DNA em microscopia de luz polarizada e (b) mesma região observada em microscopia de fluorescência, onde identifica-se uma fluorescência homogênea. (c) difratograma obtido para a mesma amostra e (d) picos correspondentes.

No experimento de raios X, observam-se picos isotrópicos, característicos de uma amostra não orientada, e a presença de vários picos de espalhamento. Porém não foi possível identificar de maneira inequívoca os picos observados. Os picos presentes podem ser interpretados como correspondentes a uma fase lamelar (indicados em vermelho) porém surgem vários outros picos que podem ser associados à presença do DNA. Isso mostra a necessidade de combinar esses experimentos com experimentos em amostras bem orientadas.

De fato, experimentos em amostras orientadas tem sido feitas em filmes suportados, em geometria de reflexão (GISAX). Para poder realizar esses experimentos, os filmes devem ser colocados em uma câmara com umidade controlada e esse dispositivo está sendo adaptado para que possamos realizar experimentos de ensaio no Nanostar. Para isso está sendo adquirido um goniômetro (recursos FAPESP) para que a amostra possa ser colocada no feixe, com ângulo de incidência igual ao ângulo de Bragg para a estrutura lamelar.

Outro aspecto relevante das atividades desenvolvidas até o momento, é a formação de pessoal. Todas as atividades descritas nesse relatório foram desenvolvidas por duas alunas em projeto de iniciação científica, que foram treinadas para trabalhar com o equipamento e estão desenvolvendo acessórios para os experimentos de GISAXS.

Apêndice 7

Estudos Estruturais de Ligninas Obtidas em Diferentes Condições de Oxidação

Oliveira Neto M.^a Maziero P.^b Golçalves A.R.^b Craievich, A.F.^c Polikarpov I^a .

^a*Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, Brasil.*

^b*Escola de Engenharia de Lorena-Departamento de Biotecnologia, Universidade de São Paulo, Lorena, Brasil.*

^c*Instituto de Física de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.*

1. Introdução

Estima-se que a produção nacional de cana-de-açúcar destinada à indústria sucroalcooleira é de 473,16 milhões de toneladas, das quais 46,92% (221,99 milhões de toneladas) são para a fabricação de açúcar e 53,08% (251,17 milhões de toneladas) são para a produção de álcool. Quando comparada à safra 2006/07, verifica-se um crescimento de 11,1% [1].

Para cada tonelada de cana produzida são gerados 140 kg de bagaço seco e também 140 kg de palha [1]. A grande parte desse bagaço é aproveitada como fonte energética dentro da própria usina. Porém, ainda assim há um grande volume de bagaço acumulado nos pátios das usinas, gerando vários problemas, como a disposição do material e o risco de incêndio [2]

Os constituintes do bagaço estão dispostos em microfibrilas de celulose envolvidas em uma matriz amorfa de polioses e lignina, que agem como barreira natural tornando esses materiais estruturalmente rígidos e pouco reativos [3]. Portanto, para a utilização de bagaço, são necessárias etapas de separação dos componentes lignocelulósicos, e consequentemente aproveitamento das frações separadas.

Biorrefinaria é o processo de conversão da biomassa em uma variedade de produtos, com pouco desperdício e mínimas emissões. Através da biorrefinaria é possível transformar materiais brutos de fonte renovável, como bagaço de cana, em produtos de maior valor agregado, como combustíveis, materiais, produtos químicos, etc [4]. Dentro deste contexto, a lignina possui um potencial para obtenção de produtos de maior valor agregado dependendo do tipo de reação a qual é submetida.

A oxidação é utilizada para obtenção de ligninas com características dispersantes e quelantes, que podem ser aplicadas desde tratamento de efluentes a produtos auxiliares têxteis.

A oxidação pode ser conduzida utilizando-se peróxido de hidrogênio, que em meio alcalino sob aquecimento reage com a lignina promovendo a abertura dos anéis fenólicos e incorporação de grupos carboxílicos na estrutura da macromolécula, promovendo um aumento da solubilidade da lignina em água. Dependendo das condições de pH e concentração de agente oxidante na reação, as oxiligninas podem ter variações na eficiência de quelação de metais e dispersão, como também de outras características.

Essas duas variáveis de processo alteram significativamente o comportamento em solução das oxiligninas, que pode ser observado através de ferramentas de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS). Através de análises de SAXS é possível correlacionar as

melhores condições de pH e concentração de oxidante para se obter eficiência acentuada nas características finais das oxiligninas.

2. Resultados e Discussão

Foram realizadas duas análises para as curvas de SAXS de soluções de lignina “*in natura*” e oxiligninas em diferentes condições de pH e agente oxidante (30 e 40 vol H_2O_2):

(i) $\log I(q)$ vs $\log q$

As curvas de SAXS podem ser divididas em três regiões: $I(q) \rightarrow I(0)$, intermediária e a altos q_s e ser analisada de acordo com a lei de potência $I(q) = q^p$. Nos gráficos *di-log* foram calculadas as inclinações das três regiões para lignina “*in natura*” e oxiligninas em diferentes pHs e concentração de agente oxidante (tabela 1).

As regiões a mais baixo ângulo, $I(q) \rightarrow I(0)$ não mostrma um perfil típico de Guinier. O cálculo do R_g pelo método de Guinier, levando-se em conta o caso de partículas tendendo a globularidade mostrou um $R_g=105.82$ A para a lignina “*in natura*” não satisfazendo a relação $q_{max} * R_g < 1.3$. (dados não mostrados).

As regiões a mais alto ângulo mostram inclinações que vão de 2.04 para lignina “*in natura*” até valores menores do que 1 para as oxiligninas, características de cilindros em solução. Sendo as oxiligninas mais fragmentadas, aquelas em pH 12.5 - 40 vol. e pH 13.3 - 30 vol.

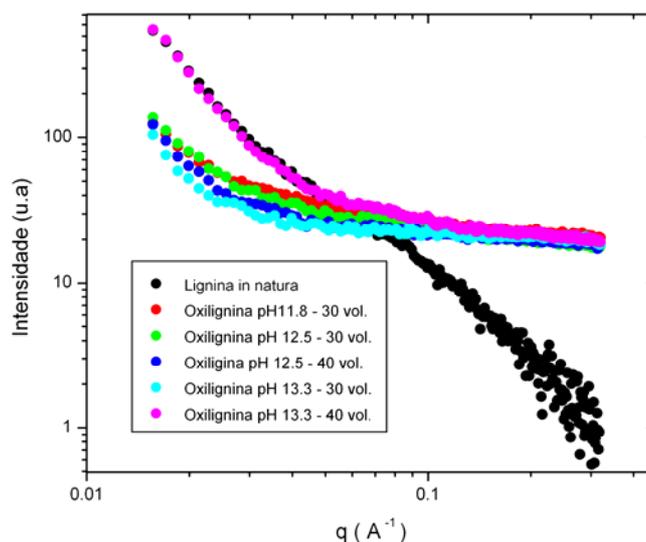


Figura 1: $\log I(q)$ vs $\log q$. Curvas de SAXS de lignina “*in natura*” e oxiligninas em diferentes condições de pH e agente oxidante.

Tabela: Lei de potências. Inclinações nas três regiões selecionadas das curvas de SAXS. (1) região a mais baixo ângulo, (2) intermediária, (3) região a mais alto ângulo

	Inclinação (1)	" $q_{min} - q_{max}$ " (1)	Inclinação (2)	" $q_{min} - q_{max}$ " (2)	Inclinação (3)	" $q_{min} - q_{max}$ " (3)
"lignina in natura"	-1.729	0.016 - 0.034	- 1.5052	0.034- 0.087	-2.04	0.087- 0.78
Oxiligni na pH 11.8 - 30 vol.	-1.67	0.016- 0.028	-0.51 0	.028- 0.07	-0.23	0.07- 0.32
Oxiligni na pH 12.5 - 30 vol.	- 1,88	0.016 - 0.029	- 0.65	0.029 - 0.063	- 0.26	0.063- 0.32
Oxiligni na pH 12.5 - 40 vol.	- 2.19	0.016 - 0.026	- 0.66	0.026 - 0.057	- 0.16	0.057 - 0.32
Oxiligni na pH 13.3 - 30 vol.	- 2.14	0.016 - 0.026	- 0.79	0.026 - 0.04	- 0.11	0.04 - 0.32
Oxiligni na pH 13.3 - 40 vol.	- 2.7	0.016 - 0.034	- 1.05	0.034 - 0.067	- 0.30	0.067 - 0.32

(ii) Análise de globularidade

Análise de Globularidade foi realizada utilizando o gráfico de Kratky ($I(q) \cdot q^2$ vs q), onde partículas globulares deveriam possuir um perfil ascendente na região a mais baixo ângulo com um posterior máximo e um perfil descendente a mais alto ângulo, se assemelhando a uma função gaussiana. Verificamos que a lignina "in natura" possui perfil característico de partículas globulares em solução ao passo que as oxiligninas tem perfil de partículas alongadas.

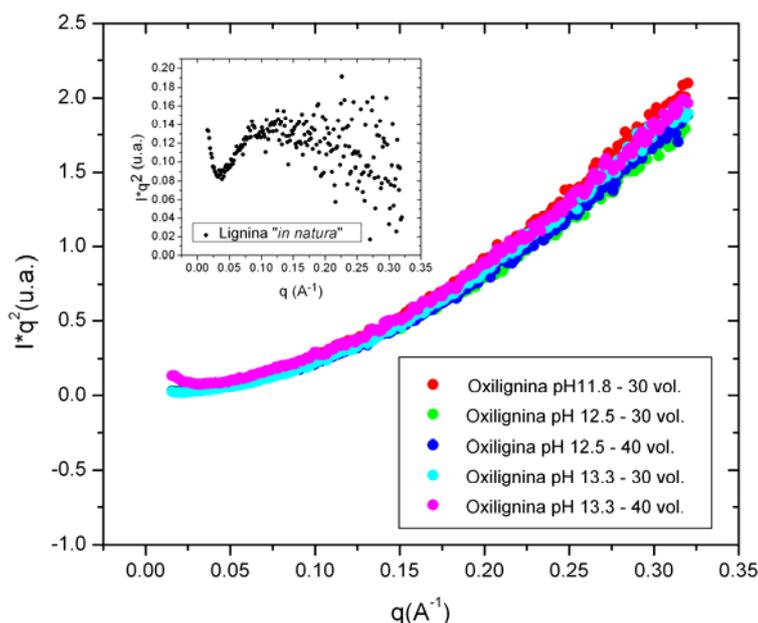


Figura 2: $\log I(q) \cdot q^4$ vs $\log q^4$. Gráfico de Porod de lignina "in natura" e oxiligninas em diferentes condições de pH e agente oxidante.

3. Conclusões

De acordo com os dados apresentados, as oxiligninas possuem perfil alongado em relação a lignina "in natura", que possui perfil globular. As oxiligninas, pH 13.3 - 30 vol. e pH 12.5 - 40 vol. são as melhores condições de oxidação, visto que apresentam curvas com menores inclinações, características de moléculas mais fragmentadas.

4. Referências

[1] Conab (2007), Acompanhamento da Safra Brasileira de Cana-de-Açúcar Safra 2007/2008, segundo levantamento, agosto/2007, Companhia Nacional de Abastecimento. - Brasília.

[2] IPT, Disponível em:

<http://www.ipt.br/institucional/imprensa/midia/?ID=5864> - acesso em 10 de outubro de 2008.

[3] Fengel D, Wegener G (1989), *Wood Chemistry Ultra structure reactions*, Editora Walter de Gruyter, Alemanha.

[4] Celulose On Line: Disponível em:

<http://www.celuloseonline.com.br/pagina/pagina.asp?IDItem=18947&IDNoticia=15980> - Acesso em 10 de novembro de 2008.

Apêndice 8

Implantação Iônica de Baixa Energia em Polímeros para Desenvolvimento de Camadas Compósitas Condutoras Litografáveis

F. S. Teixeira^{1,2}, M. C. Salvadori¹, M. Cattani¹

¹ Instituto de Física, USP, São Paulo, Brasil.

² Escola Politécnica, USP, São Paulo, Brasil.

1. Introdução

O grupo de Filmes Finos tem realizado diversos trabalhos explorando as propriedades de um composto metal-polímero formado pela sub-implantação de íons de Au por plasma no polímero PMMA (polimetilmetacrilato). Os principais estudos já realizados foram sobre comportamento elétrico^{1,2}, propriedades litográficas³, atividade óptica⁴ e estrutura^{5,6}.

Antes de discutir maiores detalhes sobre o composto, vamos localizá-lo numa amostra macroscópica (ver figura 1). Depositamos em um substrato, por *spinner*, um filme fino de PMMA com aproximadamente 50 nm de espessura. Esta amostra foi colocada como alvo de uma fonte de plasma por arco catódico, em vácuo, em que os íons de Au formados tem energia intrínseca de 49 eV.

O resultado é um composto polímero-metal consistindo de nanogrãos de Au (aglomerados a partir dos íons implantados) enterrados próximos à superfície (aproximadamente 7 nm abaixo) no polímero. Dessa forma, macroscopicamente temos um material de 3 camadas sobre um substrato, composto por uma seqüência, do substrato para a amostra, de um filme fino de PMMA, o composto de Au-PMMA formado por nanogrãos dispersos no polímero e um filme ultra-fino de PMMA inalterado.

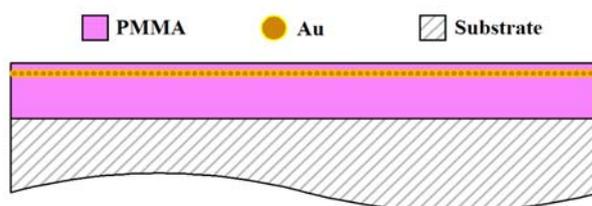


Figure 1 - Amostra macroscópica com a representação do composto de Au-PMMA

Para o presente estudo utilizamos diferentes doses de Au para a preparação de 3 amostras: Filme 1 ($1.52 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$), Filme 2 ($1.00 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$) e Filme 3 ($0.80 \times 10^{16} \text{ cm}^{-2}$). A escolha dessas doses baseou-se no prévio conhecimento das propriedades elétricas correspondentes a cada uma delas^{1,2} dada pelo modelo de percolação elétrica. O Filme 1 é condutor, o Filme 2 está bem próximo ao estado de transição entre isolante e condutor e o Filme 3 é um isolante. Além da variação da dose, também realizamos tratamento térmico, em que colocamos um primeiro conjunto de Filme 1, Filme 2 e Filme 3 e em uma placa quente, a 150° C durante 3 horas. Um segundo conjunto dos mesmos filmes (mesmas doses) foi tratado da mesma forma, mas por 6 horas. A temperatura de 150° C foi escolhida por ser aproximadamente a temperatura de transição vítrea do PMMA, em que o polímero ganha

mobilidade. Desta forma, temos 9 amostras diferentes, os três filmes originais, os três filmes tratados termicamente por 3 horas e os três filmes tratados termicamente por 6 horas.

O objetivo do estudo foi obter informações estruturais detalhadas de cada um destes filmes. Para este fim realizamos medidas de Espalhamento de Raios-X a Baixos Ângulos (*Small Angle X-Ray Scattering*)^{7,8}. A camada compósita tem espessura de praticamente 1 nanopartícula. Dessa forma, a quantidade de Au que deveria ser analisada era extremamente pequena, o que requeria o uso de um equipamento que tenha sensibilidade adequada para o estudo de Espalhamento de Raios-X a Baixos Ângulos. O equipamento adequado foi o sistema SAXS Nanostar da Bruker Instruments, que forneceu medidas experimentais de qualidade de nossas amostras. Cada uma das amostras foi lida por 3 horas.

A interpretação dos dados experimentais de SAXS utilizando modelos teóricos adequados (uma revisão completa desses modelos pode ser visto em Cattani et al⁶) nos permitiu determinar a estrutura dos filmes estudados. Os modelos teóricos utilizados, chamados de “abordagem de fatores de forma de estrutura” (*structure form factors approach*)^{7,8,9-11} leva em conta características de sistemas reais, como fractalidade^{12,13}, percolação¹⁴ e outras correlações físicas^{15,16}.

É importante estabelecer aqui as definições de estruturas monodispersivas e polidispersivas⁶ dadas por estes modelos. Em uma amostra monodispersiva temos as seguintes condições: (a) todos os grãos têm aproximadamente o mesmo número de monômeros e portanto têm o mesmo raio de giro R_g , (b) os grãos são formados por monômeros esféricos com raio r_o e densidade eletrônica uniforme ρ , (c) os monômeros formam grãos densos com fractalidade de massa e (d) todos os grãos tem a mesma dimensão fractal D , portanto a mesma distância de correlação ξ .

O raio de giro $R_g = [D(D+1)/2]^{1/2}\xi$ define o raio dos clusters dentro do qual os efeitos de correlação são importantes. A distância de correlação ξ representa a distância característica acima da qual a distribuição de massa na amostra não é mais descrita por uma lei fractal. Assim, é válido esclarecer que o raio de giro não é a mesmo que tamanho do grão, embora os valores de ambos sejam da mesma ordem de grandeza.

Uma amostra polidispersiva ou um agregado polidispersivo diluído é formado por uma coleção diluída de grãos fractais que têm mais de um raio de giro R_g , portanto mais do que uma distância de correlação, cada grão com um número diferente de monômeros.

2. Resultados e Discussão

Os dados experimentais de SAXS dos filmes 1, 2 e 3, como depositados, são apresentados na figura 2. As figuras 3a, 3b e 3c correspondem as medidas SAXS feitas para analisar os filmes tratados termicamente Filme 1, Filme 2 e Filme 3, respectivamente.

Percebemos nas figuras 2 e 3 que aproximadamente pra $q > 1 \text{ nm}^{-1}$ todas as curvas convergem para a mesma situação. Isto significa que as menores estruturas da amostra são muito similares para todas as doses de implantação (Filme 1, Filme 2 ad Filme 3), e, importante, elas permanecem inalteradas mesmo após o tratamento térmico, o que sugere que as estruturas correspondentes a esta faixa de vetor de espalhamento sejam formadas por somente ouro ou ouro com muito pouca quantidade de polímero, não susceptível à mobilidade do polímero durante o tratamento térmico. Diferentemente, para aproximadamente $q < 1 \text{ nm}^{-1}$ podemos ver claramente as mudanças devido às diferentes quantidades de ouro e também ao tratamento térmico.

Vamos primeiramente discutir as diferenças entre os filmes originais (sem tratamento térmico) 1, 2 e 3 (figura 2) que obtivemos ajustando os modelos teóricos aos dados experimentais^{6,17} para essa faixa de vetor de espalhamento. Todos os filmes têm o mesmo tamanho de monômero $r_0 = 1.3$ nm. A tabela 1 mostra os valores obtidos pela abordagem de melhor ajuste para todos os filmes originais. Para o filme 3, de menor dose de implantação, temos mais do que 1 raio de giro e podemos classificá-lo como polidispersivo. Da mesma maneira o filme 2 pode ser ajustado com 2 raios de giro, sendo também polidispersivo. O filme 1 é monodispersivo, sendo ajustado com facilidade utilizando-se apenas 1 raio de giro⁵. A partir desses resultados podemos concluir que com aumento da quantidade de Au implantado o filme passa de um estado mais desordenado para um agragado monodispersivo. O resultado fica ainda mais significativo quando notamos que o filme está em um estado mais desordenado quando o filme é isolante elétrico, ordenando-se até um estado monodispersivo quando é condutor.

Tabela 1 - Raio de giro e dimensão fractal para o Filme 1 antes e após o tratamento térmico

Filme	D_f	f_1	R_{g1} (nm)	f_2	R_{g2} (nm)
Filme 1	1,68	100%	19,00		
Filme 2	1,78	42%	17,00	58%	4,30
Filme 3	1,71	49%	16,40	51%	4,70

No momento ainda estamos analisando os resultados de tratamento térmico utilizando os modelos teóricos e um método de otimização em desenvolvimento. Sendo assim, vamos discutir a seguir os resultados apenas qualitativamente, sem ainda apresentar valores fechados.

Na figura 3a, podemos ver o resultado do tratamento térmico do filme 1. Após o tratamento térmico, o filme permanece com o caráter monodispersivo, mas com aumento do raio de giro com o aumento da temperatura. A figura 3b mostra os dados de espalhamento para o filme 2. Após 3 horas de tratamento térmico o filme começa a transitar para um estado monodispersivo, mas ainda mantém a polidispersividade. Após 6 horas de tratamento térmico observamos um aumento do raio de giro e o fato de que o filme torna-se monodispersivo. Para o filme 3 (figura 3c) vemos o mesmo comportamento, ou seja, um aumento no raio de giro com o tratamento térmico e a transição para um estado monodispersivo após 6 horas de tratamento térmico.

A dimensão fractal D que obtivemos para os filmes originais também nos sugere informações revelantes sobre a estrutura do compósito. Sabemos^{3,4} que a espessura do compósito Au-PMMA é cerca de 7 nm, mas obtivemos raios de giro maiores do que esse valor. Tomando-se o filme na direção z (“cortando” a espessura do compósito) podemos inferir que este raio de giro ocorre devido a correlações entre grãos no plano x,y . Portanto, nosso sistema não se comporta exatamente nem como um sistema 2D nem como um sistema 3D, o que sugerimos já que temos dimensões fractais na faixa de $D = 1,7 \pm 0.1$. Contudo, isso ainda será melhor estudado.

Observamos também que todos os filmes, após tratamento térmico de 6 horas, tornam-se monodispersivos e tem valores muito similares de raio de giro, o que pode indicar que eles têm propriedades elétricas e ópticas muito similares, o que deve ainda ser confirmado experimentalmente.

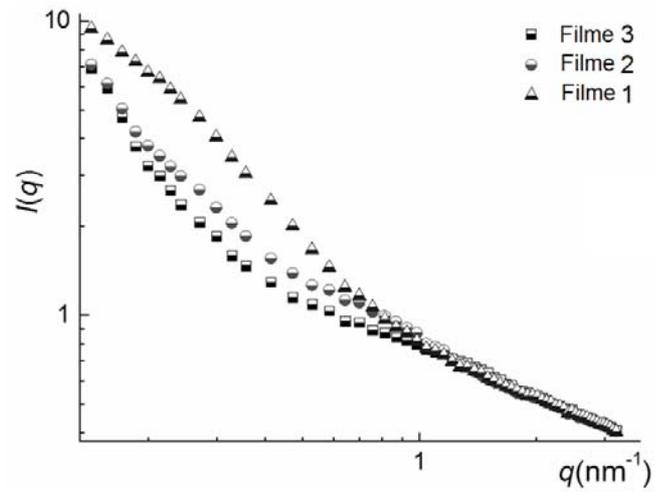
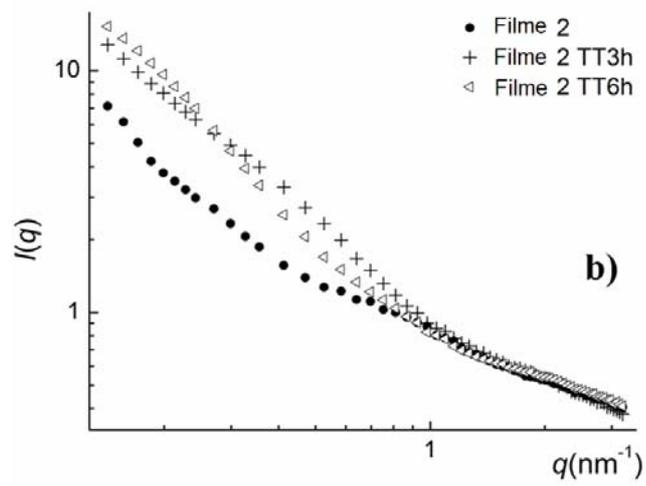
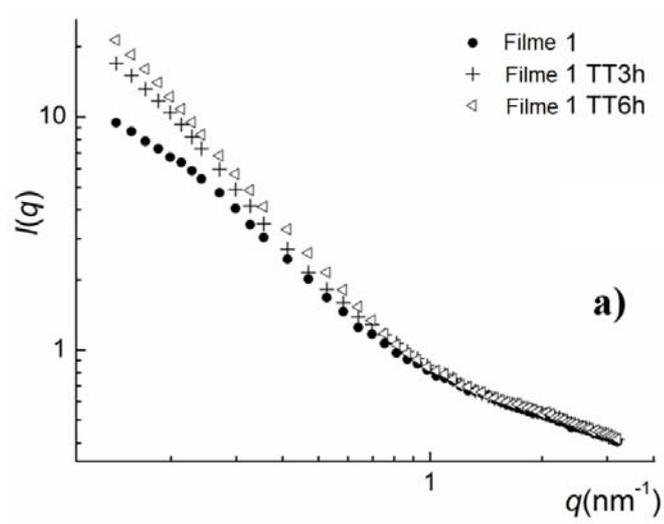


Figura 2: Medida SAXS dos filmes 1, 2 e 3 originais



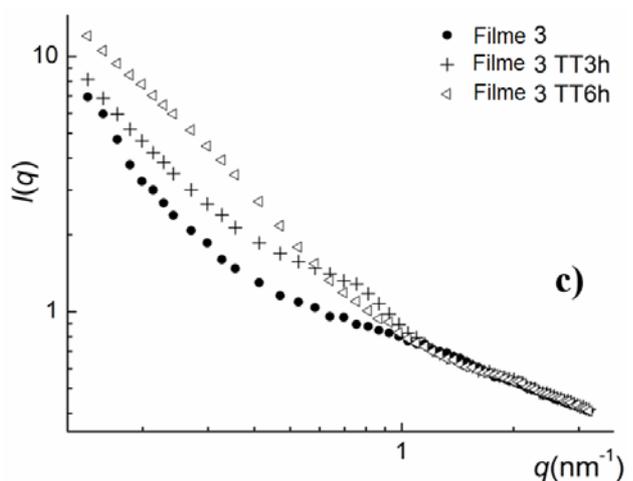


Figure 3 - Medidas de SAXS do a) Filme 1, Filme 1 TT3 h (tratado termicamente a 150°C por 3 horas) e Filme 1 TT6 h (tratado termicamente a 150°C por 6 horas); b) Filme 2, Filme 2 TT3 h (tratado termicamente a 150°C por 3 horas) e Filme 2 TT6 h (tratado termicamente a 150°C por 6 horas); c) Filme 3, Filme 3 TT3 h (tratado termicamente a 150°C por 3 horas) e Filme 3 TT6 h (tratado termicamente a 150°C por 6 horas)

3. Conclusões

Os dados de SAXS de nossas amostras nos permitiu determinar quantitativamente algumas propriedades estruturais dos nossos compósitos de Au-PMMA, determinando raios de giro, distâncias de correlação e dimensões fractais para os filmes originais, assim como foram depositados. Também mostramos que a estrutura do metal-polímero pode ser alterada utilizando uma temperatura relativamente baixa, para a qual o polímero tem a mobilidade necessária para permitir o rearranjo dos grãos de ouro. Desta forma, foi possível modificar a estrutura do compósito de um agregado polidispersivo para um compósito monodispersivo.

4. Referências

- ¹ M. C. Salvadori, M. Cattani, F. S. Teixeira, and I. G. Brown, *Appl. Phys. Lett.* **93**, 073102 (2008).
- ² M. Cattani, M. C. Salvadori and F. S. Teixeira. <http://arxiv.org/abs/0903.3587>
- ³ F. S. Teixeira, M. C. Salvadori, M. Cattani, and I. G. Brown, *J. Appl. Phys.* **105**, 064313 (2009).
- ⁴ F. S. Teixeira, M. C. Salvadori, M. Cattani, S. M. Carneiro and I. G. Brown, *J. Vac. Sci. Technol. B.* **27(5)** (2009).
- ⁵ F. S. Teixeira, M. C. Salvadori, M. Cattani and I. G. Brown, *J. Appl. Phys.* **106**, 056106 (2009).
- ⁶ M. Cattani, M. C. Salvadori and F. S. Teixeira. <http://arxiv.org/abs/0907.3131>
- ⁷ A. Guinier and G. Fournet, *Small Angle Scattering X-Rays* (Wiley, New York, 1955).
- ⁸ O. Glatter and O. Kratky. *Small Angle Scattering X-Rays*. (Academic Press, New York, 1982).
- ⁹ T. Freltoft, J. K. Kjems and S. K. Sinha, *Phys. Rev.* **B33**, 269 (1986).

- ¹⁰ J.Teixeira, J. Appl.Cryst. **21**, 781 (1988).
- ¹¹ S.H. Chen and J.Teixeira, Phys.Rev.Lett. **20**(1986).
- ¹² B.B.Mandelbrot. *The Fractal Geometry of Nature* (Freeman, San Francisco, 1982).
- ¹³ J.Feder, *Fractals*. (Plenum Press, New York, 1988).

Apêndice 9

Efeitos da anisotropia nas propriedades reológicas de nanocompósitos de copolímeros em bloco

Leice G. Amurin¹; Danilo J. Carastan¹; Aldo F. Craievich²; Nicole R. Demarquette^{1*}.

¹ Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo - USP, *nick@usp.br ² Departamento de Física Aplicada - Instituto de Física da Universidade de São Paulo - USP

1. Introdução

Copolímeros em bloco são materiais muito versáteis, com diversas aplicações nas áreas de elastômeros termoplásticos, adesivos, selantes, entre outras. Suas propriedades peculiares são devidas às características moleculares e morfológicas exclusivas deste grupo de copolímeros. Os blocos que compõem as suas moléculas são geralmente imiscíveis, formando microestruturas de fases separadas. O tamanho das fases formadas está limitado pelo comprimento de cada bloco, de modo que os domínios resultantes possuem dimensões nanométricas, que geralmente têm um alto grau de ordem morfológica nesta escala [1]. Os copolímeros em bloco podem formar diversas morfologias no estado ordenado, sendo as mais observadas a esférica, a cilíndrica e a lamelar, de acordo com o comprimento relativo de cada bloco [2].

Mais recentemente, diversos grupos de pesquisa têm incorporado nanopartículas em copolímeros em bloco para melhorar ainda mais suas propriedades [3]. Em particular existem trabalhos que estudam a adição de argilas em copolímeros em bloco, avaliando a termodinâmica de intercalação/esfoliação [4,5], efeitos das interações entre os blocos e as nanopartículas [6,7] e, principalmente, a morfologia das fases resultantes, na escala nanométrica [8,9]. Os nanocompósitos de copolímeros em bloco geralmente têm microestruturas complexas, compostas pelos domínios das fases do estado ordenado combinados com a fase dispersa de argila, que pode apresentar diversos graus de dispersão.

As propriedades de um copolímero em bloco e de seus nanocompósitos podem ser altamente dependentes da orientação de suas estruturas, causada geralmente por processamento em solução ou no estado fundido [10,11]. Neste trabalho foram preparadas amostras de copolímeros em bloco e de seus nanocompósitos pela adição de argila no estado fundido, via extrusão. Os copolímeros de estireno-etileno/butileno-estireno (SEBS) estudados têm estrutura cilíndrica, e o efeito da orientação de seus domínios e das partículas de argila pela extrusão foi estudado por espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) e por ensaios reológicos.

Tradicionalmente, ensaios de cisalhamento em reômetros rotacionais têm sido os mais utilizados para estudar as propriedades reológicas de materiais poliméricos. Mas devido à geometria discoidal de suas amostras, estes ensaios não permitem estudar as propriedades reológicas em mais de uma direção de materiais com estrutura alinhada. Além da reometria

em cisalhamento, é possível estudar as propriedades reológicas extensionais de polímeros, também com grande utilidade prática, pois se pode avaliar, por exemplo, a resistência dos materiais ao fundido, propriedade extremamente importante em processos como extrusão e fiação. A reometria extensional muitas vezes revela comportamentos peculiares, exclusivamente observados em fluxos de extensão, principalmente quando se está no regime da viscoelasticidade não-linear. No entanto, tradicionalmente, ensaios de extensão têm sido pouco estudados por dificuldades de ordem prática [12]. Entretanto, mais recentemente foi desenvolvido um acessório que permite realizar ensaios de reometria extensional quando acoplado a um reômetro rotacional, facilitando a realização de ensaios reológicos extensionais [13]. Este equipamento, chamado Sentmanat Extensional Rheometer (SER), foi utilizado neste trabalho para estudar as propriedades reológicas dos materiais em mais de uma direção, pois a geometria retangular dos corpos-de-prova facilita os estudos dos efeitos da anisotropia microestrutural.

2. Parte Experimental

Materials

Foram utilizados neste trabalho dois copolímeros tribloco SEBS (Kraton G 1652, com 30% de estireno, denominado simplesmente SEBS, e Kraton FG 1901, com 30% de estireno e cerca de 2% de anidrido maléico no bloco de EB, denominado SEBS-MA). O copolímero modificado (SEBS-MA) foi comparado ao copolímero não modificado (SEBS) para verificar o efeito da presença de anidrido maléico na dispersão das partículas de argila. Para preparo dos nanocompósitos foram utilizadas as argilas Cloisite 20A e a Cloisite 30B, que são montmorilonitas que contêm sais orgânicos distintos, podendo interagir diferentemente com cada copolímero, como pode ser visto na Tabela 1.

Tabela 1 - Especificação das argilas utilizadas.

Argilas	Modificador orgânico	Concentração do modificador [meq/100g de argila]	Massa perdida na ignição (%) [14]	Fornecedor
Cloisite 20A	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_2 - \text{N}^+ - \text{HT} \\ \\ \text{HT} \end{array}$ $\left\{ \begin{array}{l} \sim 65\% \text{ C}_{18}\text{H}_{37} \\ \sim 30\% \text{ C}_{18}\text{H}_{33} \\ \sim 5\% \text{ C}_{14}\text{H}_{29} \end{array} \right.$	95	38	
Cloisite 30B	$\begin{array}{c} (\text{CH}_2)_2 - \text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 - \text{N}^+ - \text{T} \\ \\ (\text{CH}_2)_2 - \text{OH} \end{array}$ $\left\{ \begin{array}{l} \sim 85\% \text{ C}_{18} \\ \sim 30\% \text{ C}_{18} \\ \sim 5\% \text{ C}_{14} \end{array} \right.$	90	30	Southern Clay

Processamento

Os copolímeros tribloco e os nanocompósitos foram processados no estado fundido em extrusora dupla rosca Haake modelo Rheomix PTW-16, acoplada a um reômetro de torque ThermoHaake PolyLab 900, com uma matriz de fita Ribbon Die-557-2301 (largura 25 mm e espessura 1 mm), disponível no Laboratório de Processamento de Polímeros do

Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da Escola Politécnica da USP. As condições de processamento foram: temperatura de 220° C em todas as zonas das extrusoras, velocidade da rosca de 100 rpm e velocidade do alimentador de 20 rpm. As composições dos nanocompósitos foram de 5% de Cloisite 20A e 4,4% de Cloisite 30B, para manter proporcional o conteúdo inorgânico.

Caracterização

Avaliação morfológica: Para verificar o espaçamento do plano basal das argilas utilizou-se a técnica de difração de raios x (DRX). O equipamento utilizado foi um difratômetro Rigaku com geometria Theta-Theta e gerador de raios-x de 3 kW, com tubo de radiação Cu K α (comprimento de onda de 1,5405 Å), do Laboratório de Cristalografia do Instituto de Física da USP.

A morfologia dos materiais foi estudada por SAXS. As análises também foram realizadas no Laboratório de Cristalografia do Instituto de Física da USP, no equipamento NanoSTAR fabricado pela Bruker, com radiação Cu K α de 1,5 KW, detector bidimensional e distância entre detector e amostra de 65 cm

Medidas Reológicas: Os ensaios reológicos extensionais (extensão estacionária - EE) foram realizados utilizando uma geometria SER-HV-P01 da XPANSION Instruments acoplada ao reômetro MCR-501 da Anton Paar, disponível no laboratório de Reologia de Materiais Poliméricos do Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da Escola Politécnica da USP. Todos os ensaios reológicos foram realizados à temperatura de 200° C.

3. Resultados e Discussão

Estrutura do Nanocompósito em Relação à Dispersão da Argila: Na Figura 1 são apresentadas as curvas obtidas do ensaio de DRX: a Figura 1a mostra as curvas das amostras SEBS/20A e SEBS-MA/20A comparadas com a argila 20A pura. Os valores das distâncias interlamelares ($d_{(001)}$) estão apresentados na Tabela 2. Para o nanocompósito SEBS/20A é possível observar que ocorreu intercalação da argila, pois se verifica um aumento do espaçamento interlamelar. Já o nanocompósito SEBS-MA/20A não apresenta o pico referente à difração do plano (001), podendo indicar uma estrutura esfoliada.

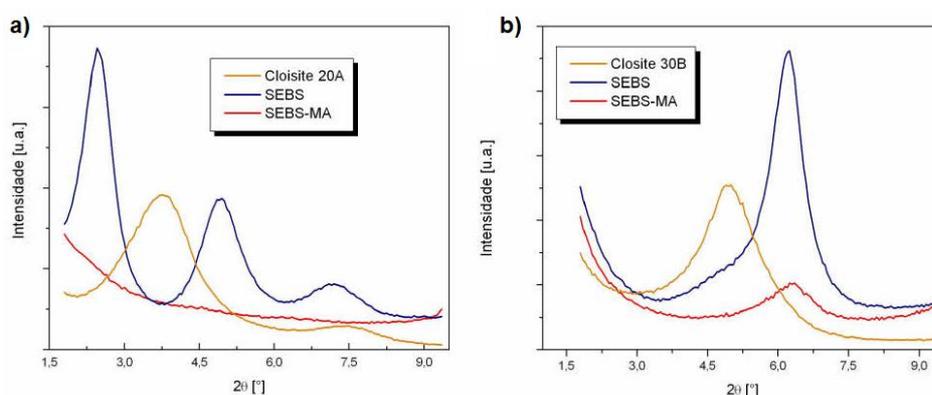


Figura 1 - Curvas DRX: a) SEBS/20A e SEBS-MA/20A comparadas com a argila 20A; b) SEBS/30B e SEBS-MA/30B comparadas com a argila 30B;

A Figura 1b mostra as curvas de difração de raios x para as amostras SEBS/30B e SEBS-MA/30B comparadas com aquela da argila 30B. Nesse caso é possível observar que não houve intercalação da argila para os nanocompósitos SEBS/30B e SEBS-MA/30B, pois ocorreu uma diminuição no espaçamento interlamelar, provavelmente pela degradação do sal.

Tabela 2 - Valores de $d_{(001)}$.

<i>Amostra</i>	<i>d(001)</i> (nm)	<i>d(001)</i> (nm)
SEBS/20A	3,60	0,97
SEBS-MA/20A	*	*
Argila 20A	2,63	*
SEBS/30B	1,41	- 0,35
SEBS-MA/30B	1,39	-0,37
Argila 30B	1,76	*

Propriedades Reológicas e SAXS

Os copolímeros e seus nanocompósitos extrudados em forma de fita foram ensaiados por reometria extensional em duas direções: a direção do fluxo de extrusão, chamada de direção longitudinal, e a direção perpendicular ao fluxo, chamada de transversal. A Figura 2 mostra as curvas de viscosidade extensional (η_E^+) obtidas por EE para os corpos-de-prova longitudinais do copolímero SEBS e seus nanocompósitos ensaiados em quatro taxas de deformação de Hencky diferentes. Também está incluída a curva obtida por cisalhamento estacionário (CE) de uma amostra de SEBS sem orientação preferencial medida a $0,001 \text{ s}^{-1}$ (η^+). Pode-se observar que as curvas extensionais não diferem significativamente de amostra para amostra e equivalem ao triplo da curva obtida em cisalhamento (razão de Trouton).

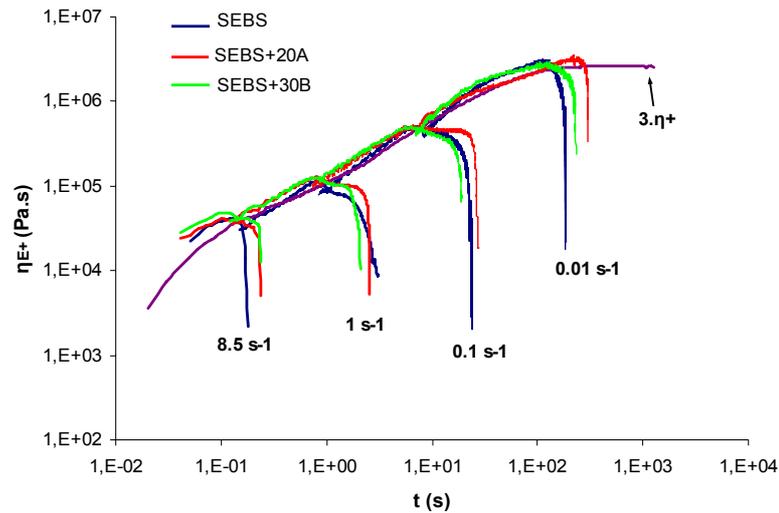


Figura 2 - Curvas de EE de SEBS e seus nanocompósitos na direção longitudinal, comparados com a curva de CE para o copolímero puro ($3.\eta^+$).

A Figura 3 mostra duas imagens bidimensionais de SAXS de SEBS/20A após o ensaio de EE na direção longitudinal a $0,01 \text{ s}^{-1}$ para elucidar qual foi o papel do fluxo de alongação na mudança de morfologia durante o ensaio. A imagem de SAXS da Figura 3a mostra os picos de difração de raios x associados a uma região do corpo de prova correspondente ao início do ensaio de extensão, ainda pouco deformada. O feixe incidente de raios x foi dirigido na mesma direção que a de extrusão, que é também a mesma do ensaio reológico. Os picos marcados com a letra P são originados pela difração de raios x por famílias de planos definidas pelos eixos de cilindros paralelos entre si, com empacotamento em rede hexagonal bidimensional. Os picos observados na imagem correspondem às reflexões de Bragg associadas aos planos do tipo (10), (11), etc da rede cristalográfica hexagonal bidimensional. Esses picos de difração estão alinhados em direção aproximadamente perpendicular à do feixe incidente de raios X, que é também a direção de extrusão. Os picos marcados com A correspondem ao plano (001) do empacotamento lamelar das partículas de argila. Como as partículas de argila têm uma forma externa também lamelar, com dimensões maiores na direção dos planos das lamelas, pode-se afirmar que elas também se encontram alinhadas com seus planos externos preferencialmente na mesma direção que a de extrusão. A Figura 3b mostra uma região bastante deformada, perto do ponto de ruptura no final do ensaio. Os dois padrões de espalhamento são bastante semelhantes entre si, apenas é possível observar que as estruturas tendem a se alinhar ainda mais durante o ensaio de extensão. Como as partículas de argila estão alinhadas na direção da extensão, elas não agem como barreiras mecânicas contra a deformação, explicando assim porque o comportamento reológico dos nanocompósitos não difere significativamente do comportamento do copolímero puro. Resultados semelhantes também foram obtidos para as amostras de SEBS-MA.

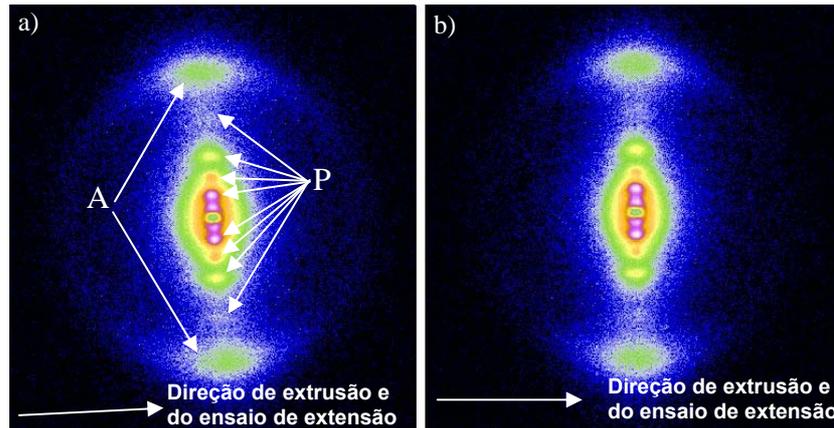


Figura 3 - Padrões de SAXS de corpo-de-prova de SEBS-MA/20A após ensaio de EE a $0,01 \text{ s}^{-1}$ na direção longitudinal: a) região de início do ensaio, b) região de fim do ensaio. O feixe incidiu na direção perpendicular ao plano do corpo-de-prova em forma de fita.

A Figura 4 mostra as curvas de viscosidade extensional obtidas para as amostras de SEBS e seus copolímeros na direção transversal. Pode-se ver que as curvas a cada taxa de deformação deixam de seguir a tendência da curva obtida por cisalhamento ($3\eta^+$) a partir de determinado tempo de ensaio, mostrando uma queda no valor de viscosidade e aumento subsequente. As curvas de SEBS puro e seu nanocompósito com 30B são essencialmente semelhantes, já as curvas de SEBS/20A mostram valores de η_E^+ ligeiramente mais altos. As amostras de SEBS-MA (não apresentadas) tiveram comportamento parecido, exceto pelo fato de que a amostra contendo argila 30B também exibe valores de viscosidade mais altos do que os do copolímero puro.

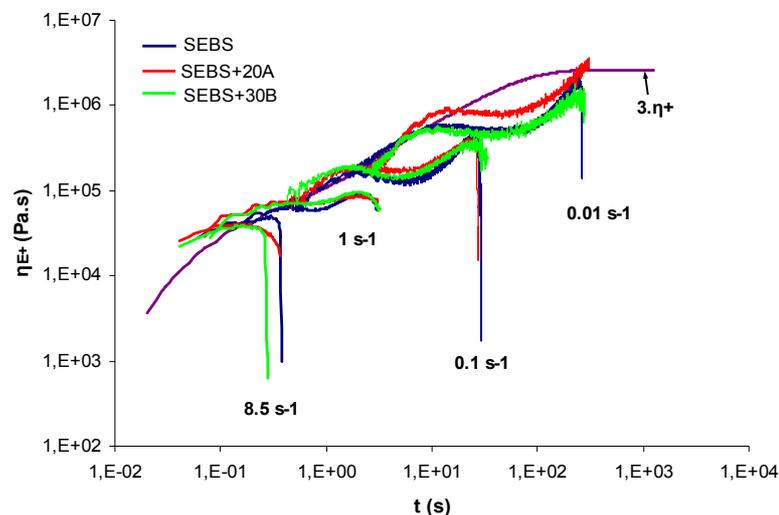


Figura 4 - Curvas de EE de SEBS e seus nanocompósitos na direção transversal, comparados com a curva de CE para o copolímero puro ($3\eta^+$).

Esse comportamento também pode ser explicado com o auxílio de análises de SAXS, como exemplifica a Figura 5 através das imagens de espalhamento de raios x do corpo-de-prova de SEBS/20A ensaiado por EE na direção transversal a $0,1 \text{ s}^{-1}$. A Figura 5a corresponde a uma região no início do ensaio, mostrando como os cilindros estão alinhados perpendicularmente à direção de extensão. O halo do plano (001) da argila é quase uniforme, mostrando que nesta direção inicialmente há partículas de argila orientadas em todas as direções perpendiculares ao plano da Figura. A Figura 5b mostra o padrão de SAXS em uma região

próxima da ruptura, mostrando que houve um realinhamento tanto dos domínios dos blocos do copolímero como das partículas de argila na direção de extensão. Este realinhamento ocorreu em todas as amostras estudadas e explica a queda inicial do valor de η_E^+ e posterior aumento até a ruptura, como visto na Figura 4. A amostra SEBS/20A tem comportamento ligeiramente mais viscoso por causa do realinhamento das partículas de argila, que no início provavelmente formaram uma barreira contra a deformação, por estarem orientadas em diversas direções. A baixa afinidade entre a argila 30B e o SEBS explica porque o comportamento reológico deste compósito é semelhante ao do copolímero puro. Provavelmente as partículas de argila em seu interior são grosseiras demais para afetarem as propriedades reológicas, e o material obtido não é um nanocompósito. Já no caso das amostras de SEBS-MA, o anidrido maléico aumentou a afinidade entre o polímero e ambas as argilas, e o realinhamento das nanopartículas na direção de extensão foi responsável pelo aumento de viscosidade nos nanocompósitos, se comparados com o SEBS-MA puro.

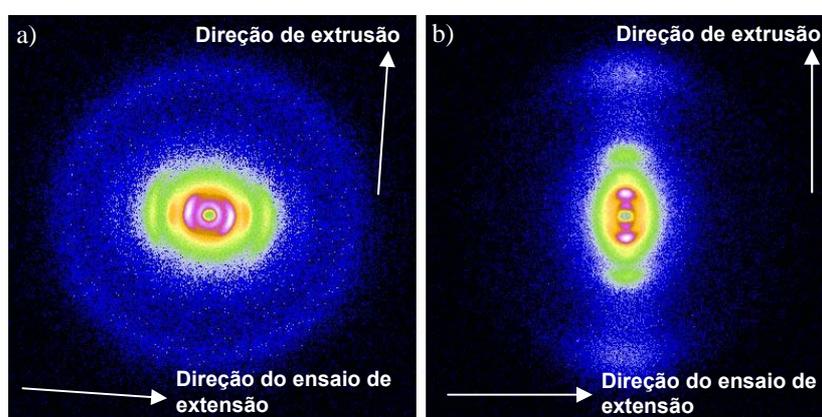


Figura 5 - Padrões de SAXS de corpo-de-prova de SEBS-MA/20A após ensaio de EE a $0,1 \text{ s}^{-1}$ na direção transversal: a) região de início do ensaio, b) região de fim do ensaio. O feixe incidiu na direção perpendicular ao plano do corpo-de-prova em forma de fita.

Conclusões

Neste trabalho foi possível preparar amostras de copolímeros em bloco e seus nanocompósitos com estruturas alinhadas por processamento em extrusão e estudar o efeito da anisotropia microestrutural nas propriedades reológicas extensionais. A presença de argila afetou o comportamento reológico apenas nas amostras que foram ensaiadas na direção perpendicular ao alinhamento original da microestrutura.

Agradecimentos

À Fapesp e CNPq pelo apoio financeiro; à Kraton pelo fornecimento do material; Ao Laboratório de Cristalografia do Instituto de Física da USP para utilização dos equipamentos de SAXS e DRX.

Referências Bibliográficas

1. D. J. Carastan, Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo - Escola Politécnica de São Paulo, 2007.
2. I. W. Hamley, *The Physics of Block Copolymers*, Oxford University Press, New York, 1998.
3. S. Choi; K. M. Lee; C. D. Han; *Macromolecules*, 2004, 37, 7649.
4. J. Y. Lee; A. R. C. Baljon; D. Y. Sogah; R. F. Loring; *J. Chem. Phys.* 2000, 112, 9112.
5. J. Groenewold; G. H. Fredrickson; *Eur. Phys. J. E.* 2001, 5, 171.
6. N. Hasegawa; A. Usuki; *Polym. Bull.* 2003, 51, 77.
7. A. S. Silva; C. A. Mitchell; M. F. Tse; H. -C. Wang; R. Krishnamoorti; *J. Chem. Phys.* 2001, 115, 7166.
8. J. Y. Lee; M. S. Park; H. C. Yang; K. Cho; J. K. Kim; *Polymer*, 2003, 44, 1705.
9. Y. -H. Ha; Y. Kwon; T. Breiner; E. P. Chan; T. Tzianetopoulou; R. E. Cohen; M. C. Boyce; E. L. Thomas; *Macromolecules*, 2005, 38, 5170.
10. Y. -H. Ha; E. L. Thomas; *Macromolecules*, 2002, 35, 4419.
11. T. Kotaka; M. Okamoto; A. Kojima; Y.K. Kwon; S. Nojima; *Polymer*, 2001, 42, 3223.
12. J. M. Dealy; K. F. Wissbrun; *Melt Rheology and Its Role in Plastics Processing - Theory and Applications*, Van Nostram Reynhold, New York, 1990.
13. M. Sentmanat ; B. N. Wang ; G. H. McKinley ; *J. Rheol.* 2005, 49, 585.
14. Southern Clay Products; Catálogos de dados das argilas Cloisite, disponíveis em <www.nanoclay.com>. Acesso em 28 de maio de 2009.

Apêndice 10

Análise da Orientação e Desorientação de Copolímeros em Bloco e Seus Nanocompósitos

D. J. Carastan^a, L. G. Amurin^a, A. F. Craievich^b, N. R. Demarquette^a

^a*Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.*

^b*Instituto de Física, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.*

1. Introdução

Copolímeros em bloco são materiais poliméricos formados geralmente por blocos termodinamicamente imiscíveis. Por essa razão, esses materiais apresentam morfologias de fases separadas à temperatura ambiente, cujos domínios nanométricos formam estruturas ordenadas, sendo as mais comuns a estrutura de esferas em arranjo cúbico de corpo centrado, a de cilindros em arranjo hexagonal e a lamelar [1]. A estrutura ordenada geralmente persiste dentro de certa faixa de temperaturas, mesmo quando ambas as fases estão no estado fundido. Apenas acima de determinada temperatura, chamada de transição ordem-desordem (ODT), os blocos passam a ser miscíveis, e os copolímeros tornam-se monofásicos. A adição de nanopartículas, como partículas de argila, a esses sistemas forma materiais com microestruturas ainda mais complexas, que dependerão das interações entre cada bloco do copolímero e as nanopartículas [2].

Nanopartículas lamelares, como as argilas, são bastante anisotrópicas, assim como os principais domínios que compõem os copolímeros em bloco, com exceção do caso da morfologia esférica. Desse modo, é possível alinhar essas estruturas usando uma série de técnicas durante o processamento dos materiais. Uma das maneiras é através da extrusão, que pode alinhar tanto os domínios ordenados do copolímero, se for realizada abaixo da ODT, assim como as nanopartículas lamelares.

Neste estudo foram preparadas amostras de copolímeros em bloco e seus nanocompósitos pela adição de 5% em massa argila organofílica durante o processo de extrusão. Os copolímeros utilizados foram dois materiais comerciais com estrutura tribloco de estireno-etileno/butileno-estireno (SEBS). Ambos contêm 30% em massa de blocos de poliestireno. Uma das amostras é um SEBS puro (Kraton G1652, chamado aqui simplesmente de SEBS) e a outra contém 1 a 2% em massa de anidrido maleico no bloco intermediário (Kraton FG1901, chamado de SEBS-MA). As argilas utilizadas foram duas montmorilonitas comerciais contendo sais quaternários de amônio (Cloisite 20A e 30B, da Southern Clay). As amostras foram processadas em extrusora dupla rosca Haake modelo Rheomix PTW-16, acoplada a um reômetro de torque ThermoHaake PolyLab 900 a 220 °C e 100 rpm de velocidade da rosca. Na saída da extrusora foi utilizada uma matriz de fita com dimensões de 25 mm de largura e 1mm de espessura.

Os materiais assim preparados foram analisados por reologia extensional usando o acessório SER HV-P01 acoplado ao reômetro Anton Paar MCR 501 [3]. Os ensaios foram realizados a 200 °C e diferentes taxas de extensão em amostras retangulares retiradas das fitas extrudadas em duas direções diferentes: longitudinal (na direção do fluxo de extrusão) e transversal (perpendicular ao fluxo de extrusão).

Testes de SAXS no Nanostar foram realizados nas amostras em fita antes e depois dos ensaios extensionais para avaliar a anisotropia das estruturas. Os ângulos de espalhamento varridos pelo equipamento permitem identificar os picos de difração referentes à estrutura

ordenada dos copolímeros e o pico do plano basal da argila 20A. As amostras analisadas tinham cerca de 1 mm de espessura, e o tempo de irradiação para cada medida foi de 45 min.

2. Resultados e Discussão

As amostras em fita foram analisadas nas três direções principais, de modo que um panorama da estrutura de cada material pudesse ser obtido. A direção x corresponde à direção de extrusão, a y , à direção perpendicular a x dentro do plano da fita e a z , à direção perpendicular ao plano da fita. A Figura 1 mostra as imagens de espalhamento da fita de SEBS puro e de SEBS com a argila 20A. De acordo com os resultados, é possível ver que o copolímero tem estrutura cilíndrica de arranjo hexagonal, sendo que os cilindros estão alinhados na direção de extrusão (x). As partículas de argila formam o halo mais externo nas figuras d , e e f , que corresponde ao plano 001 da argila, indicando a formação de um nanocompósito intercalado. De acordo com as medidas de SAXS pode-se verificar que as partículas encontram-se principalmente alinhadas ao longo do plano da fita (x,y), mas também há algumas orientadas nas demais direções, como comprovado pelo halo externo da Figura 1f.

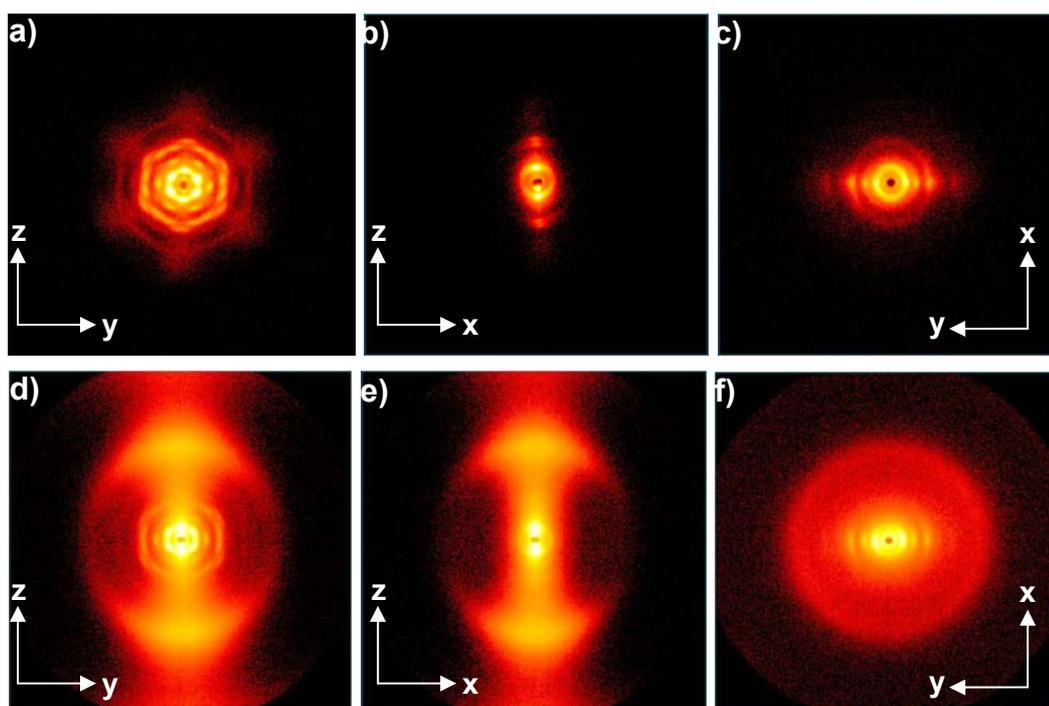


Figura 1: Imagens de SAXS da amostra de SEBS puro (a, b e c) e SEBS + 20A (d, e e f) em fita nas três direções.

As demais amostras apresentaram resultados semelhantes, sendo que não foi possível verificar o pico de difração da argila 30B, por estar além do limite mensurável por SAXS a essa distância amostra-detector (para tal seria necessário realizar medida simultânea de WAXS). A amostra de SEBS-MA + 20A também não apresentou pico de argila, indicando que o nanocompósito tem, provavelmente, estrutura esfoliada, por causa das interações entre a argila e o anidrido maleico.

Algumas amostras puderam ser avaliadas depois da deformação por extensão. Nessas amostras foi realizado um mapeamento na direção z utilizando a função de nanografia do Nanostar, como exemplificado na Figura 2.

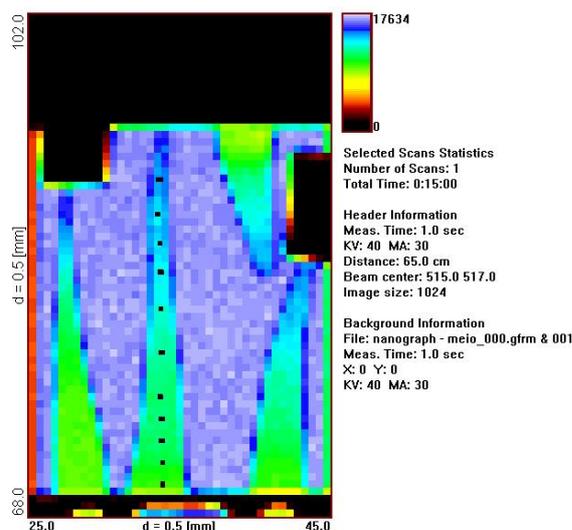


Figura 2: Nanografia de quatro amostras ensaiadas por reologia extensional. Os pontos marcados na segunda amostra indicam as regiões em que foram obtidas as medidas de SAXS.

As medidas de mapeamento por SAXS foram realizadas em amostras deformadas nas duas direções (longitudinal e transversal). A direção de deformação foi chamada de u, e a perpendicular a ela no plano da fita, de v. A Figura 3 mostra imagens obtidas para a amostra de SEBS puro deformada na direção longitudinal. É possível ver que a amostra, que foi deformada na mesma direção que a de extrusão, não muda significativamente de estrutura, os cilindros continuam alinhados na mesma direção. Nas amostras com argila foi possível verificar um alinhamento das partículas de argila que se encontravam orientadas em direções diferentes da de extensão.

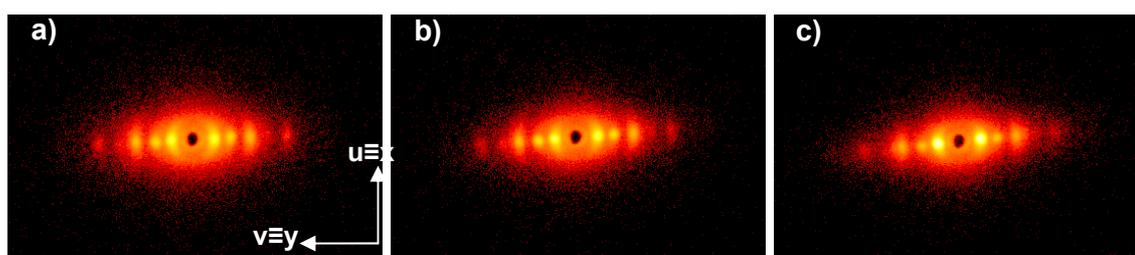


Figura 3: Imagens de SAXS de SEBS ensaiado por extensão a $0,01s^{-1}$ na direção longitudinal em três posições diferentes: a) posição de referência, b) 2 mm de distância de (a), c) 4 mm de distância.

A Figura 4 mostra as imagens de espalhamento da amostra de SEBS ensaiado por extensão na direção transversal. Nesse caso pode-se ver claramente que ocorre a rotação dos cilindros durante o ensaio, pois eles encontravam-se inicialmente perpendiculares à direção de extensão. Nas amostras com argila uma rotação semelhante também foi observada para as partículas de argila.

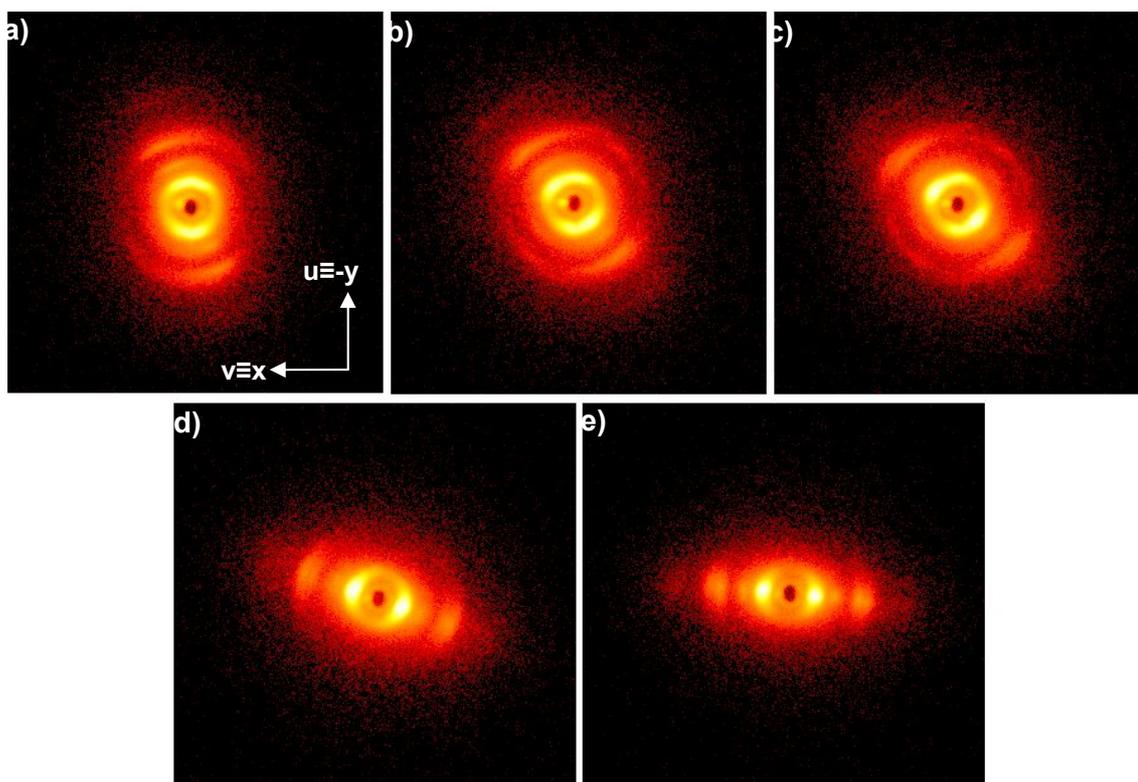


Figura 4: Imagens de SAXS de SEBS ensaiado por extensão a $0,01s^{-1}$ na direção transversal em cinco posições diferentes: a) posição de referência, b) 1 mm de distância de (a), c) 1,5 mm, d) 3 mm, e) 5 mm.

Esse comportamento pode ser associado aos resultados de reologia extensional para explicar o comportamento viscoso de cada amostra em função da deformação. Novos ensaios de SAXS deverão ser realizados para mapear o comportamento das amostras que ainda não foram analisadas, e ainda serão avaliadas amostras de copolímeros com estruturas diferentes da cilíndrica. Esses ensaios estão programados para o início de 2010.

3. Conclusões

Neste trabalho foi possível obter o mapeamento da estrutura de amostras anisotrópicas de copolímeros em bloco e seus nanocompósitos por SAXS utilizando o equipamento Nanostar. A função de nanografia mostrou-se particularmente útil para realizar um mapeamento preciso das amostras ensaiadas por reologia extensional. Foi possível analisar simultaneamente a estrutura da matriz de copolímero e das partículas de argila.

4. Referências

Referências são indicadas entre colchetes; há diferentes formatos para artigos em revistas[1], artigos em livros[2] e livros[3].

[1] Hamley, I. W.; *The Physics of Block Copolymers*; Oxford University Press, Oxford - New York - Tokyo, 1998.

[2] Ha, Y. -H.; Kwon, Y.; Breiner, T.; Chan, E. P.; Tzianetopoulou, T.; Cohen, R. E.; Boyce, M. C.; Thomas, E. L.; *Macromolecules*, **38**, 5170, 2005.

[3] Sentmanat, M. L.; Wang, B. N.; McKinley, G. H.; *J. Rheol.* **49**, 585, 2005.

Apêndice 11

Estudos Conformacionais da Interação de Peptídeos Correspondentes à Região N-terminal das Toxinas Protéicas Sticholisina I e II com Membranas Modelo

Joana Paulino^a Leandro R S Barbosa^b, Shirley Schereier^a Rosângela Itri^b .

^aInstituto de Química da USP, São Paulo, Brasil.

^bInstituto de Física da USP, São Paulo, Brasil.

1. Introdução

Toxinas formadoras de poros (PFTs, pore forming toxins), que tem como alvo a membrana celular, são produzidas por uma variedade de organismos, bactérias a organismos superiores, como anêmonas marinhas, minhocas e plantas (1). Essas toxinas classificadas como α -PFTs e β -PFTs, possuem trechos hidrofóbicos que se estruturam em α -hélices, que poderiam atravessar a membrana (α -PFTs) ou fitas β com caráter anfipático que, quando combinadas em estruturas multi-proteicas, permitem a penetração na membrana (β -PFTs) (2,3). Existem vários mecanismos pelos quais PFTs e alguns peptídeos antimicrobianos promovem o rompimento da membrana plasmática: 1) ação detergente (fig 1A); 2) formação de um poro que tem sua superfície totalmente recoberta pela estrutura polipeptídica, como no modelo “barril de estacas” (barrel stave) (fig1B) ou em PFTs que possuem estrutura do tipo barril β e 3) formação de um poro toroidal, no qual tanto a proteína quanto as cabeças polares dos fosfolipídios fazem parte do poro (fig1C) (1,4).

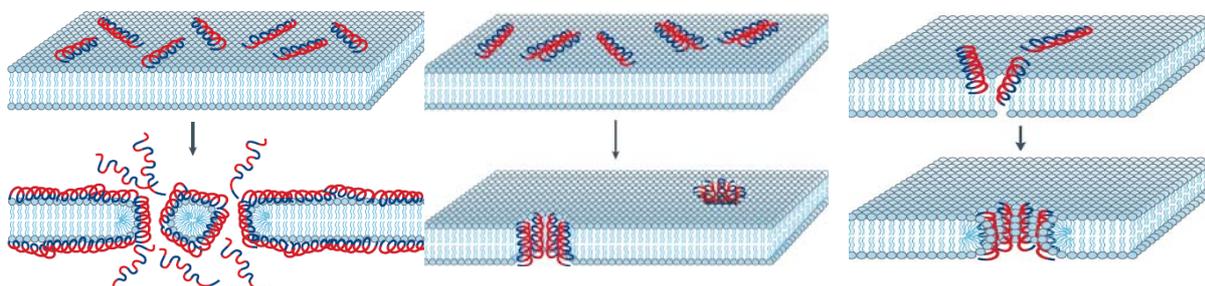


Figura 1. Mecanismos de permeabilização de membranas por peptídeos. (A) Ação detergente; (B) modelo de um poro do tipo “barril de estacas”; (C) modelo de um poro toroidal (tirado da ref. 4).

As Sticholisinas I e II (St I e St II), toxinas purificadas da anêmona marinha *Sticholidacta heliantus* (5,6), classificadas como α -PFTs (1), pertencem à família das actinoporinas (6,7). Essa família caracteriza-se pelo peso molecular ao redor de 20 kDa, alto grau de homologia entre as proteínas, ausência de resíduos de cisteína, conservação da α -hélice N-terminal anfipática e de uma região rica em resíduos aromáticos, pl ao redor de 9 e capacidade de formar poros em membranas biológicas e modelo. Também, pertencem a essa família as toxinas Eqüinatoxina II (Eq II) (8) e Tenebrosina C (9). A ligação destas toxinas à membrana é mediada por lipídios; é proposto que SM seja o receptor putativo das toxinas na membrana (10,11).

St I e St II possuem 93% de homologia, com substituição de apenas 13 aminoácidos, sendo três modificações não conservativas na porção N-terminal (Glu2/Ala1, Asp9/Ala8, Gly23/Glu22). Outra diferença entre St I e St II é a atividade hemolítica, 21.700 UH/mg e 30.000 UH/mg (UH = unidades de hemólise), respectivamente, sendo St II a mais hemolítica de todas as actinoporinas (6, 7, 12).

A resolução da estrutura cristalina (13) e em solução (14) da Eq II, bem como a resolução da estrutura cristalina da St II (15), revelou que ambas possuem estruturas ricas em folhas β . As proteínas apresentam uma estrutura rígida de sanduíche de folhas β , empacotadas contra duas α -hélices. O alto conteúdo de folhas β e baixo conteúdo de α -hélice da St II foi também indicado por estudos de dicróismo circular (CD) (16,17) e de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) (18).

A região contendo os resíduos 1-10 de St II é composta principalmente de aminoácidos hidrofóbicos e sem alta probabilidade de adquirir estrutura α -helicoidal, a região correspondente aos resíduos 11-30 da porção N-terminal apresenta caráter altamente anfipático e possui alta propensão a adquirir conformação α -helicoidal (15,19). Comportamento semelhante é observado para a região N-terminal de St I.

Vários estudos tem contribuído para a proposta de que a região N-terminal das toxinas está envolvida no mecanismo de permeabilização de membranas e de que esse processo ocorreria através da formação de um poro de natureza toroidal. Experimentos de mutação sítio-dirigida e de deleção dos 33 primeiros resíduos da Eq II (20,21) mostraram que, sem a região N-terminal, a toxina se liga a membranas, mas não é capaz de permeabilizá-las. Ainda, tanto no caso da Eq II como da St II, a α -hélice N-terminal seria a única região que poderia se movimentar com certa liberdade sem que o agrupamento de folhas β fosse afetado, já que a α -hélice C-terminal, compreendida entre os resíduos 129-134, em Eq II, e 128-135, em St II, encontra-se fixada à estrutura em ambas as extremidades pelo esqueleto peptídico (13,15).

Estudos de CD e FTIR da ligação de St I e St II a bicamadas lipídicas sugerem que a ligação das toxinas promove um ganho de estrutura α -helicoidal entre 6-8% (17,18). Além disso, estudos com St I e fosfolipídios marcados com sondas fluorescentes mostraram que a toxina induz o movimento transmembranar de fosfolipídios (flip-flop) (22). Por outro lado, experimentos de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^{31}P com a Eq II na presença de vesículas multilamelares (multilamellar vesicles, MLV) mostraram a formação de estruturas não-lamelares (23).

Em base a esses resultados, os mecanismos propostos para a alteração da permeabilidade de membranas por actinoporinas sugerem que esse processo ocorre em consequência da formação de um poro e que esse poro seria de natureza toroidal (5,10,15, 23-25). Nesse contexto, tem sido proposto que as etapas iniciais consistiriam no ancoramento da proteína na bicamada lipídica, através de uma região rica em aminoácidos aromáticos e na dissociação do N-terminal do corpo da proteína. Posteriormente, este se ligaria à membrana, com a α -hélice anfipática localizada na interface água-membrana (ver Figura 1C). Em seguida, quatro monômeros dariam origem ao poro pela formação de uma curvatura positiva, cuja superfície seria formada pelos resíduos polares e carregados da α -hélice anfipática e pelas cabeças polares dos lipídios (Figura 1C). Nossos resultados sugerem que os resíduos hidrofóbicos anteriores à hélice anfipática poderiam contribuir para o ancoramento desta à região das cadeias acila dos lipídios (ver abaixo).

Tendo em vista a importância da região N-terminal de St I e St II para a formação do poro e que a resolução atômica da estrutura tri-dimensional de proteínas é bastante desafiadora, devido a dificuldades na aplicação de técnicas de alta resolução (cristalografia de raios X e RMN) a essas proteínas, foi proposta a investigação da conformação e dinâmica de fragmentos protéicos da região N-terminal das toxinas.

Essa proposta é baseada em estudos da estrutura e topografia de proteínas de membrana realizados através dessa abordagem. Vários estudos tem mostrado que os fragmentos possuem a propensão de adquirir a conformação predita para essas sequências na proteína inteira. Em nosso laboratório vários estudos foram realizados com fragmentos de receptores

acoplados a proteínas G (GPCR), tanto alças extracelulares e citosólicas, como regiões transmembranares (26- 31, ver também revisão na ref. 32).

2. Resultados e Discussão

A figura 1 mostra as curvas de SAXS dos sistemas compostos por LPC em ausência de peptídeo, normalizadas pela concentração de LPC. Como podemos ver na figura, as curvas de SAXS possuem um comportamento muito similar umas com as outras na região de médios e grandes valores de q (ou seja, para valores de $q > 0.04 \text{ \AA}^{-1}$). No entanto, devemos perceber, que estas curvas de SAXS possuem uma pequena diferença na região de pequenos valores de q ($< 0.04 \text{ \AA}^{-1}$). Este fato se deve ao aparecimento de uma função de interferência entre as micelas, devido ao aumento da concentração para 120 mM. Mesmo as micelas sendo eletricamente neutras, um aumento de concentração pode gerar o aparecimento da função de interferência, devido ao volume excluído. As micelas começam a sentir a presença uma das outras.

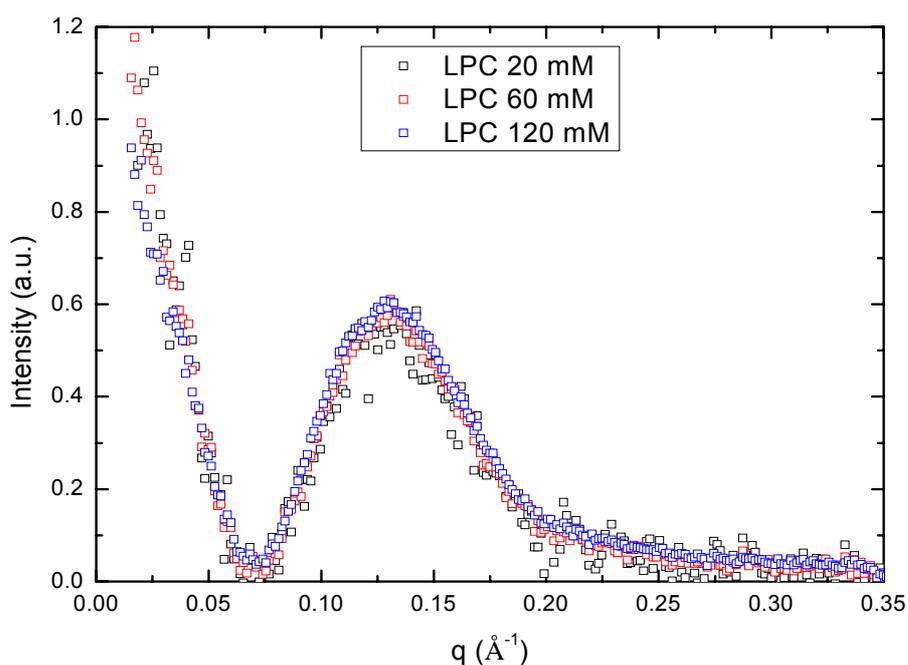


Figura 1 - Curvas de SAXS de micelas de LPC (20, 60 e 120 mM) em solução, normalizadas pela concentração micelar.

Como mencionamos anteriormente, as curvas de SAXS da figura 1 indicam que a micela de LPC não é alterada pela concentração de surfactante. Assim, podemos ajustar os fatores de forma de uma destas curvas de SAXS e impor estes mesmos parâmetros estruturais para as demais curvas. Neste caso, utilizaremos o ajuste Global, através de um programa desenvolvido pelo grupo de pesquisa liderado pelo prof. Paolo Mariani da Università Politecnica delle Marche, Ancona, Itália. Este programa é capaz de analisar diversas curvas

de SAXS ao mesmo tempo, possibilitando inclusive a união de diferentes parâmetros de ajustes de diferentes curvas experimentais, este procedimento garante a unicidade da solução final. No entanto, antes de iniciarmos a análise dessas curvas de SAXS, faremos uma discussão acerca das curvas de SAXS. A análise destas curvas encontra-se atualmente em andamento e será melhor discutida em um relatório posterior.

A Figura 2 mostra as curvas de espalhamento dos sistemas compostos por Lisofosfatidilcolina (LPC) em três diferentes concentrações (20, 60 e 120 mM) em ausência e presença de 2 mM de peptídeo. É interessante perceber que alterando a concentração do surfactante e mantendo a concentração do peptídeo constante, estamos, na verdade, alterando a razão molar LPC:Peptídeo. Assim, os gráficos abaixo estão organizados em função da razão molar da LPC com o peptídeo, sendo que para 120, 60 e 20 mM temos razões molares iguais a 0.017, 0.034 e 0.100, respectivamente. Em primeiro lugar, antes de investigar a influência do peptídeo na estrutura das micelas zwitteriônicas, iremos investigar o efeito da concentração de surfactante na estrutura das micelas. Deste modo a Figura 2 mostra as curvas de SAXS dos sistemas compostos por LPC a 20, 60 e 120 mM de surfactante, normalizadas pela concentração do mesmo.

Ainda na figura 2, podemos perceber que a presença do peptídeo induz um deslocamento das curvas de SAXS, independente da concentração micelar, para a região de altos valores de q . Este fato sugere que a presença do peptídeo, de alguma maneira, induz uma diminuição do tamanho da micela (indicado pelo deslocamento para maiores valores de q). Além do mais, a presença de tal peptídeo induz o aparecimento de uma função de interferência (ou seja, a presença do peptídeo induz o aparecimento de um pico na região de $q \approx 0.025 \text{ \AA}^{-1}$) entre micelas. Tal função provavelmente é oriunda de um desbalanço de cargas na superfície micelar.

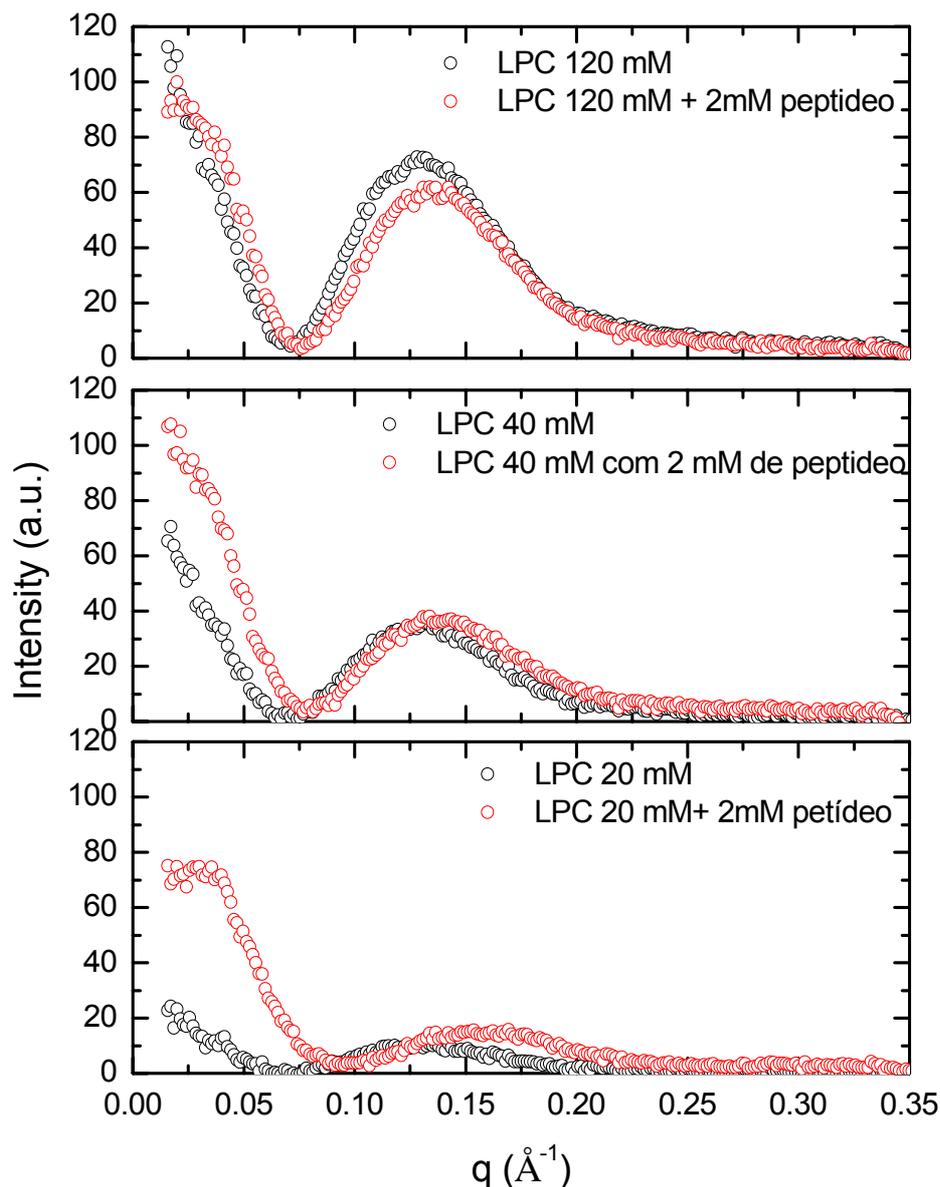


Figura 2 - Curvas de SAXS dos sistemas compostos por LPC em ausênça e presença de peptídeos.

Dando continuidade a nossas análises, escolhemos um sistema para melhor exemplificar o efeito da presença do peptídeo em micelas zwitteriônicas de LPC. Neste contexto, a figura 3 mostra as curvas de SAXS do sistema composto por 20 mM de LPC em presença de 2 mM do peptídeo, juntamente com os ajustes respectivos, sendo que tanto as micelas de LPC quanto as micelas mistas de LPC/peptídeo são analisadas dentro do modelo de elipsóide prolato.

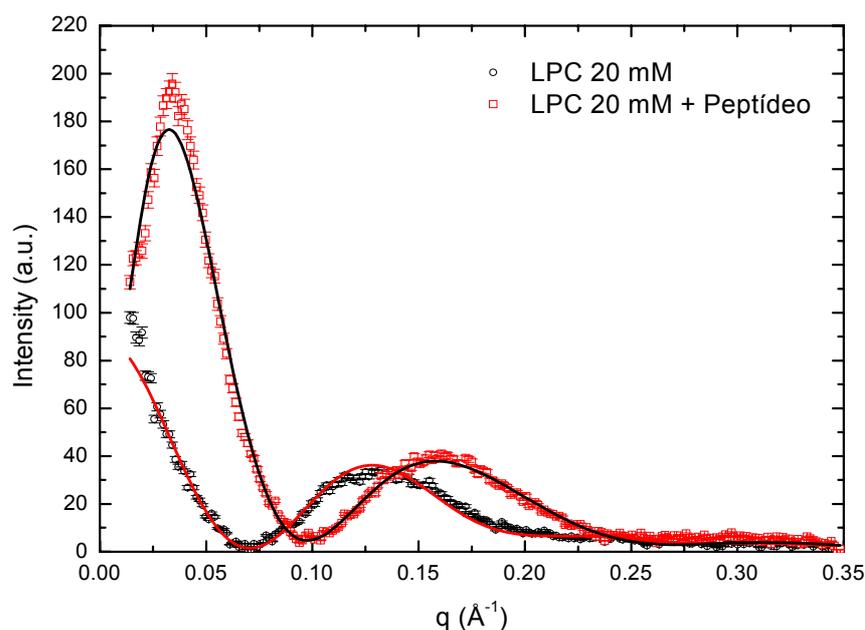


Figura 3 - Curvas de SAXS dos sistemas compostos por 20 mM de LPC em ausência (círculos pretos) e presença (quadrados vermelhos) do peptídeo, juntamente com os respectivos melhores ajustes através do modelo de elipsóide prolato.

Dentro deste modelo de análise, os parâmetros de ajuste são: o raio parafínico, R_{par} , a anisometria (razão axial) e a densidade eletrônica da cabeça polar, ρ_{pol} , assim como sua espessura, Δ . Com esta análise, evidenciamos que existe uma diminuição do R_{par} de 18,5 Å (em ausência de peptídeo) para cerca de 15,0 Å em presença do mesmo. Evidenciamos também um pequeno aumento na anisometria, de 1,7 para 2,0 assim como um aumento da espessura da cabeça polar, de 7,8 para 11,8 Å. Estas análises indicam que o peptídeo deve se localizar, preferencialmente, na interface polar/apolar da micela de modo a alterar a distribuição de cargas na superfície da mesma. Além dos parâmetros estruturais mencionados aqui, a presença do peptídeo induz o aparecimento de uma função de interferência. Nossa análise indica que devem existir cerca de 5 a 6 cargas na superfície micelar. Atualmente estamos dando continuidade a estas análises.

3. Conclusões

Neste trabalho estudamos a interação de peptídeo com micelas zwitteriônicas de LPC. Evidenciamos que o peptídeo deve localizar-se, preferencialmente, na região hidrofílica da micela de LPC, alterando assim sua distribuição de cargas que por fim gera o aparecimento de uma função de interferência. Além do mais a presença de tal peptídeo induz uma diminuição do tamanho da micela, provavelmente alterando de certa forma o empacotamento do surfactantes zwitteriônicos. Este trabalho encontra-se em desenvolvimento e será, assim que possível, enviado para publicação em uma revista internacional com arbitragem.

REFERÊNCIAS

1. Iacovache, I., van der Goot, F.G., Pernot, L. (2008) *Biochim Biophys Acta.* 1778, 1611-23.
2. Lesieur, C., Vecsey-Semjn, B., Abrami, L., Fivaz, M., van der Goot, F.G. (1997) *Mol. Membr. Biol.* 14, 45-64.
3. Gouaux, E. (1997) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7, 566-573.
4. Brogden, K.A. (2005) *Nature Reviews* 3, 238-250.
5. de los Ríos, V., Mancheño, J.M., Martínez Del Pozo, A., Alfonso, C., Rivas, G., Onaderra, M., Gavilanes, J.G. (1999) *FEBS Lett.* 455, 27-30.
6. Lanio, M.E., Morera, V., Alvarez, C., Tejuca, M., Gomez, T., Pazos, F., Besada, V., Martínez, D., Huerta, V., Padron, G., Chavez, M.A. (2001) *Toxicon* 39, 187-194.
7. Anderluh, G., Macek, P. (2002) *Toxicon* 40, 111-124.
8. Ferlan, I., Lebez, D. (1974) *Toxicon* 12, 57-61.
9. Galettis, P., Norton, R.S. (1990) *Toxicon* 28, 695-706.
10. Tejuca, M., Serra, M.D., Ferreras, M., Lanio, M.E., Menestrina, G. (1996) *Biochemistry* 35, 14947-14957.
11. de los Ríos, V., Mancheño, J.M., Lanio, M.E., Onaderra, M., Gavilanes, J.G. (1998) *Eur. J. Biochem.* 252, 284-289.
12. Huerta, V., Morera, V., Guancho, Y., China, G., Gonzalez, L.J., Betancourt, L., Martínez, D., Alvarez, C., Lanio, M.E., Besada, V. (2001) *Toxicon* 39, 1253-1256.
13. Athanasiadis, A., Anderluh, G., Macek, P., Turk, D. (2001) *Structure* 9, 341-346.
14. Hinds, M.G., Zang, W., Anderluh, G., Hansen, P.E., Norton, R.S. (2002) *J. Mol. Biol.* 315, 1219-1229.
15. Mancheño, J.M., Benito, J.M., Martínez-Ripoll, M., Gavilanes, J.G., Hermoso, J.A. (2003) *Structure* 11, 1319-1328.
16. Mancheño, J.M., de los Ríos, V., Martínez del Pozzo, A., Lanio, M.E., Onaderra, M., Gavilanes, J.G. (2001) *Biochim. Biophys. Acta* 1545, 122-131.
17. Alvarez, C., Casallanovo F., Shida, C.S., Nogueira, L.V., Martínez, D., Tejuca, M., Pazos, I.F., Lanio, M.E., Menestrina, G., Lissi, E., Schreier, S. (2003) *Chem. Phys. Lipids.* 122, 97-105.
18. Menestrina, G., Cabiaux, V., Tejuca, M. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 254, 174-180.
19. Casallanovo, F., Oliveira, F.J.F., Souza, F.C., Ros, U., Martínez, Y., Pentón, D., Tejuca, M., Martínez, D., Pazos, F., Pertinhez, T. A., Spisni, A., Cilli, E.M., Lanio, M.E., Alvarez C., Schreier, S. (2006) *Biopolymers* 84, 169-180.
20. Anderluh, G., Pungencar, J., Krizaj, I., Strukelj, B., Gubensek, F., Macek, P. (1997) *Protein Eng.* 10, 751-755.
21. Anderluh, G., Barlic, A., Podlesek, Z., Macek, P., Pungencar, J., Gubensek, F., Zecchini, M.L., Serra, M.D., Menestrina, G. (1999) *Eur. J. Biochem.* 263, 128-136.
22. Valcarcel, C.A., Dalla Serra, M., Potrich, C., Bernhart, I., Tejuca, M., Martínez, D., Pazos, F., Lanio, M.E., Menestrina, G. (2001) *Biophys. J.* 80, 2761-2774.

23. Malovrh, P., Viero, G., Serra, M.D., Podlesek, Z., Lakey, J.H., Macek, P., Menestrina, G., Anderluh, G. (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 22678-22685.
24. Gutierrez-Aguirre, I., Podlesek, Z., Barlic, A., Macek, P., Anderluh, G., Gonzalez-Manas, J.M. (2004) *Biochem. J.* 384, 421-428.
25. Anderluh, G., Dalla Serra, M., Viero, G., Guella, G., Macek, P., Menestrina, G. (2003) *J. Biol. Chem.* 46, 45216-45223.
26. Pertinhez, T.A., Nakaie, C.R., Carvalho, R.S., Paiva, A.C., Tabak, M., Toma, F., Schreier, S. (1995) *FEBS Lett.* 375, 239-242.
27. Franzoni, L., Nicastro, G., Pertinhez, T.A., Tatò, M., Nakaie, C.R., Paiva, A.C., Schreier, S., Spisni, A. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 9734-9741.
28. Franzoni, L., Nicastro, G., Pertinhez, T.A., Oliveira, E., Nakaie, C.R., Paiva, A.C.M., Schreier, S., Spisni, A. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 227-235.
29. Grijalba, M.T., Schreier, S., Oliveira, E., Nakaie, C.R., Miranda, A., Tominaga, M., and Paiva, A.C. (2000) In *Peptides for the New Millennium* (Fields, G.B., Tamm, J.P., and Barany, G., Eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 385-386.
30. Salinas, R.K., Shida, C.S., Pertinhez, T.A., Spisni, A., Nakaie, C.R., Paiva, A.C., Schreier, S. (2002) *Biopolymers* 65, 21-31.
31. Pertinhez, T.A., Krybus, R., Cilli, E.M., Paiva, A.C., Nakaie, C.R., Franzoni, L., Sartor, G., Spisni, A., Schreier, S. (2002) *J. Pept. Sci.* 8, 23-35.
32. Yeagle, P.L., Albert, A.D. G (2007) *Biochim. Biophys. Acta* 1768, 808-824.

Apêndice 12

Caracterización por SAXS de la morfología de nanopartículas bifásicas en solución

L.J. Giovanetti^a, J. M. Ramallo López^a, F.G. Requejo^a, E.V. Shevchenko^b and A.F. Craievich^c

^a*Departamento de Física, Facultad de Ciencias Exactas UNLP.*

INIFTA, Facultad de Ciencias Exactas UNLP.

^b*Lawrence Berkeley National Laboratory-Berkeley CA United States of America*

^c*Institute of Physics, University of Sao Paulo, CEP 05508-900 Sao Paulo, SP, Brazil.*

1. Introdução

Estudamos diversas soluções diluídas de nanopartículas metálicas estabilizadas com hexadecylamina, adamantane ácido carboxílico, imersas em matriz líquida (tolueno) e uma delas em estado seco (após evaporação do solvente). O objetivo foi determinar as características morfológicas em escala nanométrica, visando em particular determinar o tamanho e também o grau de agregação de agregação das nanopartículas. Este estudo está relacionado com linha em andamento que visa a caracterização de nanopartículas metálicas em solução e depositadas em substratos sólidos, de interesse em catalysis e outras aplicações [1, 2].

Os sistemas estudados por SAXS utilizando o aparelho NanoStar são os seguintes:

i) Solução diluída de nanopartículas de Au.

ii) Solução diluída de nanopartículas de CoPt3/Au (I), composta por uma mistura de nanopartículas de CoPt3 e de Au.

iii) Solução diluída de nanopartículas de CoPt3/Au (II), composta por uma mistura de nanopartículas de CoPt3 e de Au, preparadas em condições químicas diferentes às da amostra CoPt3/Au(I).

iv) Pó formado por nanopartículas de CoPt3 (em estado seco, após evaporação do tolueno).

2. Resultados e Discussão

Apresentaremos a seguir os resultados experimentais das experiências de SAXS das quatro amostras estudadas. Fizemos uma análise preliminar dos resultados experimentais considerando a hipótese mais simples, segundo a qual as nanopartículas básicas são considerados esféricas e monodispersas. A forma esférica foi estabelecida a partir de observações de imagens de microscopia eletrônica de transmissão em amostras secas. Uma análise mais completa dos resultados de SAXS deverá levar em conta o efeito da distribuição de tamanhos das nanopartículas.

(i) *Solução diluída de nanopartículas de Au.* A curva experimental de SAXS das nanopartículas de Au é apresentada na Fig. 1. Percebe-se que a curva decresce monotonamente com o aumento de q . Na mesma figura é representada a curva de intensidade fitada com GNOM[3] de SAXS correspondente a um conjunto de esferas com $\langle R \rangle = 3,1 \text{ nm}$ y .

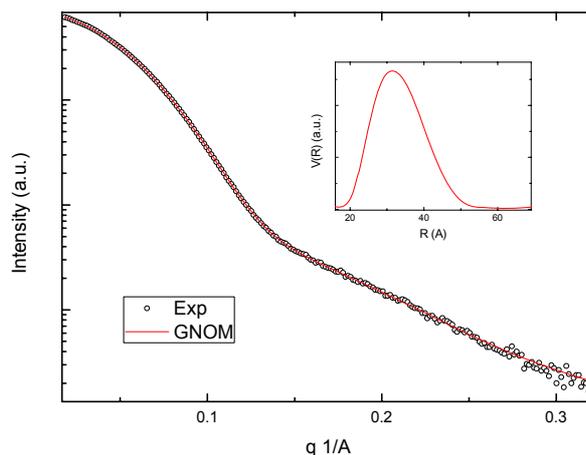


Fig. 1 - Curva experimental de SAXS e curva fitada supondo um sistema de esferas monodisperso com $R=3,1\text{nm}$.

(ii) *Solução diluída de nanopartículas de CoPt3/Au (I)*. A curva de SAXS correspondente à amostra CoPt3/Au(I) composta por uma mistura de nanopartículas de CoPt3 e de Au em estado de solução diluída em tolueno, é apresentada na Fig. 2. Percebe-se na curva experimental uma oscilação a ângulos baixos que atribuímos ao fator de estrutura das nanopartículas básicas formando clusters de CoPt3/Au com conformação dimérica.

Calculamos a curva de intensidade de SAXS supondo a presença de dímeros idênticos. Consideramos que a densidade eletrônica média de ambos os tipos de nanopartículas (CoPt3 e Au) é similar. O modelo utilizado foi o de dímeros compostos por monômero de raio idêntico R a uma distância única d entre eles. A curva de intensidade de SAXS mostrada na figura corresponde a um conjunto diluído de dímeros formado por nanopartículas de raio $R=5,2\text{nm}$ separadas por uma distância $d=15,0\text{nm}$.

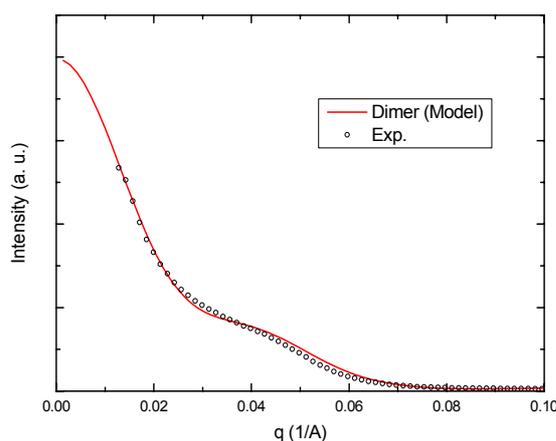


Fig. 2 - Curva experimental de SAXS e curva fitada supondo um sistema de de monodisperso de “dumbbells” ou dímeros de nanopartículas esféricas com $R=5,2\text{nm}$ separados por uma distância $d=15,0\text{nm}$.

(iii) *Solução diluída de nanopartículas de CoPt3/Au (II)*. A curva experimental de SAXS correspondente à amostra CoPt3/Au(II) é mostrada na Fig. 3. Visualmente percebe-se que esta curva possui características diferentes das correspondentes à amostra CoPt3/Au(I). Fizemos um cálculo da curva de intensidade de SAXS assumindo, neste caso, um modelo de clusters maiores que o dimérico, formado por uma mistura de trímeros e tetrâmeros. A curva calculada que é mostrada na Fig. 3 corresponde ao melhor fitting que obtivemos para uma mistura de 40% de trímeros e 60% de tetrâmeros, formados por nanopartículas esféricas de CoPt3 e de Au de raio equivalente, $R=4,3\text{nm}$, com distância entre elas $d=140\text{nm}$.

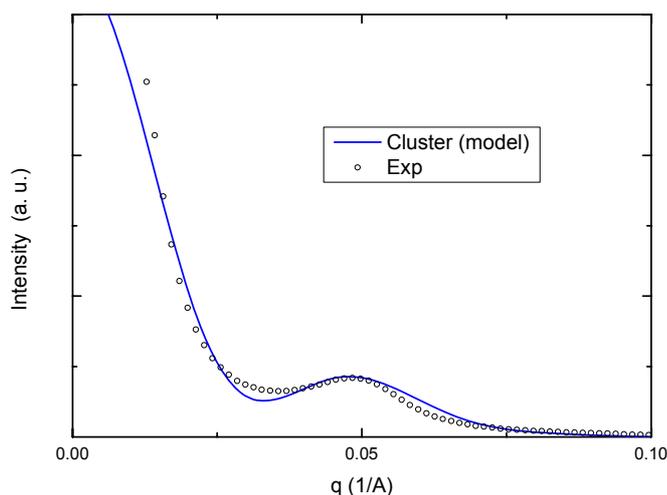


Fig. 3 - Curva experimental de SAXS e curva fitada correspondente à amostra CoPt3/AU(II) supondo uma mistura de trímeros e tetrâmeros compostos por nanopartículas esféricas de CoPt3 e de Au, de raio $R=4,3\text{nm}$ separados por uma única distância $d=14,0\text{nm}$.

(iv) *Pó formado por nanopartículas de CoPt3*. A curva experimental obtida para o sistema de nanopartículas de CoPt3 em estado seco (após evaporação do tolueno) está representada na Fig. 4. Percebe-se na curva um conjunto de picos de Bragg associados a uma estrutura cristalina cúbica, com rede fcc. Apesar de um certo “overlapping” entre várias das reflexões de Bragg, o diagrama de difração pode ser indexado de acordo ao mostrado na Fig. 4. O parâmetro de rede que determinamos é $a=16,5\text{nm}$. Isso implica que a distância entre nanopartículas primeiras vizinhas ($d=a \cdot 2^{1/2}/2$) resulta $d=11,7\text{nm}$. Um estudo adicional mais preciso será feito mediante um único fitting do diagrama de difração total.

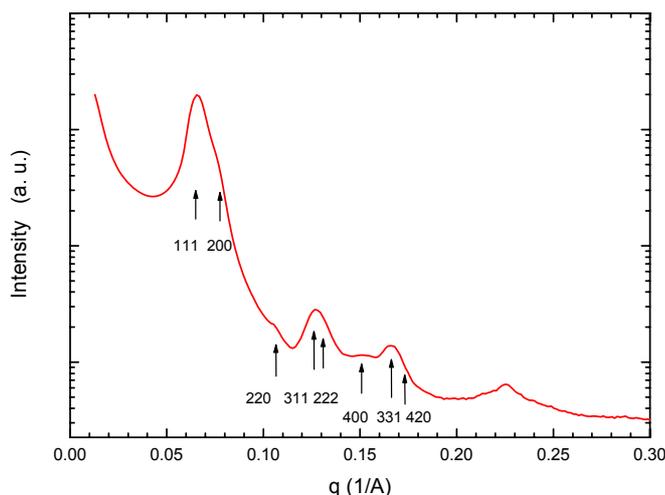


Fig. 4 - Curva de difração a baixos ângulos referentes a um conjunto de nanopartículas de CoPt₃ em estado seco. As posições dos picos de Bragg de baixos índices de Miller, correspondentes a uma rede cristalográfica fcc, são indicadas na figura. O valor calculado do parâmetro da célula cúbica é $a=16.5$ nm.

3. Conclusões

O estudo de SAXS realizado permitiu determinar o tamanho de nanopartículas em soluções diluídas e em forma de pó, e caracterizar diferentes tipos de estado de agregação. Estabelecemos que os sistemas estudados em solução diluída, dependendo do tipo e das condições físico-químicas de preparação, estão compostos por nanopartículas isoladas ou monoméricas, ou por nanoclusters, (dímeros, ou trímeros + tetrâmeros). Após evaporação do solvente, nanopartículas de CoPt₃ formam agregados de estrutura cristalina com rede cristalográfica fcc. O conjunto de informação derivada do presente estudo está resumido na Tabela 1.

Tabela 1 - Resumo dos resultados obtidos.

Amostra #	Composição	Estado	Conformação	R (nm)	d (nm)
(i)	Au	Solução diluída	Monômeros	3,1	-----
(ii)	CoPt ₃ +Au	Solução diluída	Dímeros	5,2	15,0
(iii)	CoPt ₃ +Au	Solução diluída	40% trímeros + 60% tetrâmeros	4,3	14,0
(iv)	CoPt ₃	Pó	Policristal	---	11,67

4. Referências

1-JM. Ramallo Lopez, L. Giovanetti, A.F. Craievich, F.C. Vicentin, M Marin-Almazo, M J.

Yacaman, F.G. Requejo. *Physica. B, Condensed Matter*, **389**, 150-154 (2007).

2-L. Giovanetti, J.M.R. Lopez, F.G. Requejo, D.I. Garcia-Gutierrez, M. J. Yacaman, A.F. *Craievich*. *Journal of Physical Chemistry C*, **111**, 7599-7604 (2007).

3-Svergun D.I. (1991). *J.Appl.Cryst.*, **24**, 485-492

Apêndice 13

Estudo de emulsões dermatológicas por raios X de baixo e alto angulo

Erika Cristina Vargas de Oliveira^a, Pedro Alves da Rocha Filho^a e Lia Queiroz do Amaral^b

^aFaculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da USP, SP, Brasil

^bInstituto de Física da USP, São Paulo, SP, Brasil

1. Introdução

Emulsão é a mistura de dois líquidos imiscíveis onde um líquido está disperso em outro na forma de pequenos glóbulos. Esta é possível devido à ação do emulsificante, um tensoativo, que forma um filme com propriedades eletrostáticas ao redor dos glóbulos do líquido disperso impedindo que eles coalesçam e se separem do dispersante [1]. Quando o líquido disperso (fase interna) é um óleo e o líquido dispersante (fase externa) é a água, a emulsão é classificada como O/A e no caso inverso como A/O. As emulsões mais adequadas para uso cosmético são as do tipo O/A por terem aspecto menos oleoso sendo, portanto mais confortáveis. Também são mais facilmente espalhadas e têm maior afinidade com as camadas da pele.

Diversos estudos empregam a difração de raios-X para caracterização, não só de sistemas água / tensoativo [2] como também de emulsões e micro emulsões [3], inclusive estudos já efetuados por um dos autores [4]. Tal técnica tem se mostrado muito útil na elucidação da interação entre as porções parafínicas e aquosas em sistemas complexos submetidos à variação de temperatura, como as emulsões. Por meio desta técnica é possível verificar se os glóbulos das mesmas são estabilizados por filme monomolecular ou por estruturas lamelares, determinar a distância entre as lamelas e ainda, a disposição das cadeias carbônicas destas.

Estruturas lamelares na fase gel consistem em bicamadas de moléculas do tensoativo separadas por água livre. Estas podem ser formadas em meio aquoso por uma gama de agentes de superfície, como por exemplo os tensoativos não iônicos derivados de álcoois ou ácidos graxos de cadeia longa, quando submetidos a condições específicas. Elas conferem à emulsão propriedades como proteção de ativos incorporados, aumento do poder hidratante e aumento da estabilidade físico-química. As cadeias carbônicas na bicamada estão agrupadas em uma sub-célula hexagonal onde as cadeias estão ordenadas.

2. Amostras

Os tensoativos são moléculas anfifílicas, que possuem uma parte com características hidrofílicas e outra com características lipofílicas. Para quantificar a relação existente entre as porções hidrofílicas e lipofílicas, Griffin, em 1948, introduziu o conceito de EHL, que é o valor numérico usado para expressar a hidrofília e lipofília [5]. Um tensoativo ou par de tensoativos é usado para a determinação do EHL da fase oleosa que corresponde ao EHL da emulsão. O EHL crítico, é aquele onde há maior estabilidade do sistema. Este valor numérico pode ser determinado por meio de fórmulas que se aplicam muito bem à tensoativos não iônicos. Estes são menos irritantes para a pele e apresentam menos incompatibilidades com outros componentes da formulação (óleos vegetais) além de provavelmente facilitarem a

formação de estruturas lamelares anisotrópicas. Sabe-se que a quantidade de água presente na formulação tem influência sobre a formação e espessura das estruturas lamelares [3]. Pesquisou-se então a influência da variação quantitativa das fases aquosa e oleosa sobre as estruturas lamelares.

Para a produção das amostras, foram adotados os valores de EHL 7 e 9, que correspondem a diferentes proporções do par de tensoativos empregado, o *PEG-80 Sorbitan Laurate* / *Steareth-2*. A composição das amostras referentes ao trabalho de mestrado do primeiro autor estão descritas na tabela 1. Os resultados dessas amostras constam de resumo submetido em setembro de 2009 ao World Congress on Emulsion 2010, a realizar-se em Lyon, França. Foi também medida outra amostra, designada N, cujos resultados constam de um segundo resumo submetido ao mesmo congresso (vide informações adicionais no final deste relatório).

Tabela 1: Composição das amostras analisadas para ambos os valores de EHL.

Componentes	Composição das amostras (% p/p)		
	36	35	03
Óleos (andiroba e copaíba 2:1)	7,0	14,0	3,5
Manteiga de cacau	2,0	4,0	1,0
Manteiga de cupuaçu	1,0	2,0	0,5
Tensoativos*	10,0	10,0	10,0
Água purificada	80,0	70,0	85,0

* *tensoativos*: EHL = 7 *PEG-80 Sorbitan Laurate* (16,28%) / *Steareth-2*. (83,72%); EHL = 9 *PEG-80 Sorbitan Laurate* (31,78%) / *Steareth-2*. (68,22%)

3. Resultados e Discussão

As duas series de medidas, separadas por 2 meses, permitiram estudar o efeito do envelhecimento das preparações. Todas as medidas foram efetuadas no Nanostar com 40 Kv/30mM, com amostras em capilar cilíndrico de vidro com diâmetro interno de 1.5 mm. Foi usado dodecyl sulfato de sódio em pó como padrão para calibrar a distancia amostra - filme. Medidas de alto e baixo ângulo foram efetuadas na temperatura ambiente.

Alem disso foi feita uma medida a mais alta temperatura, com vedação a fogo do capilar. Foi confirmada alteração no padrão de difração, como esperado pelas alterações vistas na amostra no microscópio óptico, acima da temperatura de transição ordem-desordem das cadeias carbônicas. Mas o foco do trabalho são as estruturas na temperatura ambiente, de uso dermatológico.

Resultado obtidos com a amostra 36 são vistos na figura 1A (baixo ângulo) e 1B (alto ângulo). Em SAXS aparecem 4 ordens de picos lamelares, com pouca variação em função do envelhecimento da amostra : a intensidade dos picos diminui cerca de 20%, apesar da intensidade na posição do feixe direto ser um pouco maior, o que pode indicar um deslocamento do zero, com pouca diferença na posição dos picos, conforme visto na tabela 2. A distancia de repetição é da ordem de 200 Å.

A literatura reporta [3] que em emulsões à base de tensoativos não-iônicos foram observadas diferentes distâncias interplanares de acordo com o conteúdo de água do sistema. Observou-se que o aumento da distância era proporcional ao aumento da quantidade de água. variando de 77Å à 357Å para 28% e 90% de água respectivamente.

O conteúdo de água das amostras analisadas nesta pesquisa variou entre 70 e 85% (amostra 36 = 80%, amostra 35 = 70%, amostra 03 = 85%). As distâncias interplanares calculadas são compatíveis com os resultados obtidos em [3], porém, não foi observada grande diferença entre as amostras com 70% e 85% de água.

Observando as distâncias interplanares entre T0 e Tf nas amostras analisadas nesta pesquisa não é observada grande variação. Isto sugere que não ocorreu a entrada de água entre as lamelas proposta pelos resultados de Eccleston [3].

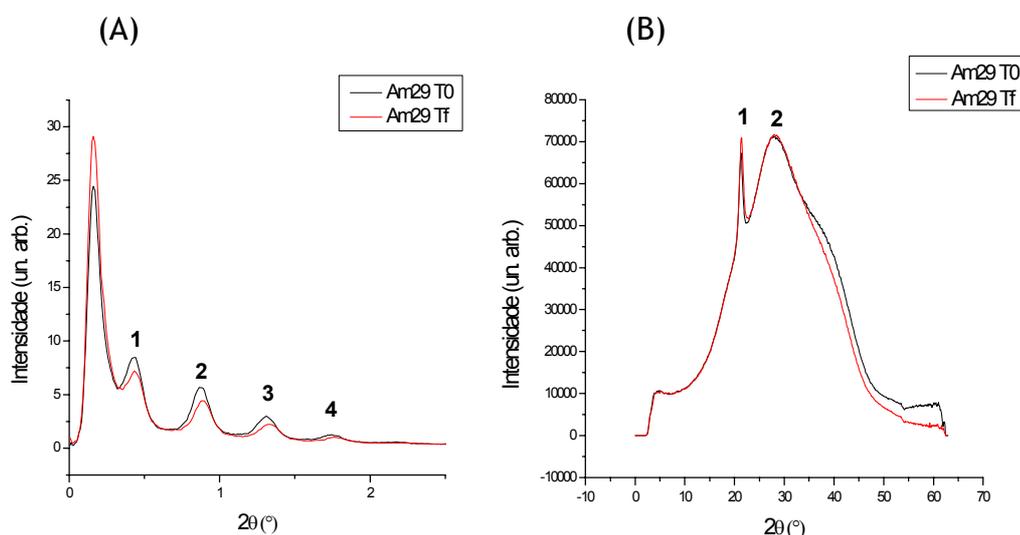


Figura 1 - Amostra 36 EHL = 9 - SAXS(A) e WAXS(B)

Tabela 2 - Picos lamelares da amostra inicial T0 e envelhecida Tf

Picos	SAXS			
	T0		Tf	
	2θ (°)	d (Å)	2θ (°)	d (Å)
1	0,43	205,5	0,43	205,5
2	0,87	202,9	0,89	198,9
3	1,31	202,0	1,33	199,4
4	1,75	202,2	1,78	198,3

Os resultados das medidas de alto ângulo (WAXS) na mesma amostra, vistos na Figura 1B, revelam um pico definido em torno de 4,1 Å e outro mais largo em torno de 3,3 Å, correspondentes aos bem conhecidos picos de bicamadas lipídicas cujas cadeias carbônicas estão organizadas na fase gel e à banda da água [2]. O resultado se repete em todas as amostras analisadas e nos dois tempos do teste.

Tabela 3 - Picos em alto ângulo da amostra inicial T0 e envelhecida Tf

Am36 EHL9 Picos	WAXS			
	T0		Tf	
	2θ (°)	d (Å)	2θ (°)	d (Å)
1	21,3	4,1	21,4	4,15
2	28,0	3,2	28,0	3,2

A literatura [3] de amostras preparadas com água e surfactantes não-iônicos indicam que amostras com conteúdo de água a partir de 47% apresentam em alto ângulo um pico largo em 4,04 Å, indicando a presença de bicamadas lipídicas na fase gel organizadas em sub-células hexagonais. Sistemas formados por água e lipídios cujas cadeias estão organizadas como cristais líquidos quando submetidos a medidas de difração de raios-X exibem pico largo na região de 4,5 Å [2].

4. Conclusões

As emulsões dermatológicas estudadas apresentam estruturas lamelares em fase gel na temperatura ambiente, que não se alteram de forma marcante com envelhecimento de 2 meses. Este resultado é bastante positivo pois demonstra estabilidade do sistema. A água armazenada entre as bicamadas do tensoativo e sua permanência ao longo do tempo de armazenamento garantem o potencial hidratante diferenciado que as emulsões com estruturas lamelares em fase gel apresentam em relação às emulsões comuns.

Tendo em vista que as distâncias interplanares calculadas mostraram que não houve aumento da água interlamelar ao longo de dois meses, estão previstos estudos reológicos para verificar mudanças na viscosidade do sistema. Um aumento na viscosidade da emulsão é esperado quando há aumento da água interlamelar e pode representar maior estabilidade. Entretanto, uma grande variação da consistência pode acarretar em problemas farmacotécnicos como de escoamento do produto.

4. Referencias

[1] Lachman, L.; Lieberman, H. A.; Kanig, J.L. *Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica*. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, v. 2, 2001.

[2] Luzatti, V.; Mustacchi, H.; Skoulios, A. *Nature* **180**, 600-601, 1957.; Luzatti, V.; Husson, F. *The Journal of Cell Biology* **12**, 207-219, 1962.

[3] Eccleston, G. M. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists* **41**, 1-22, 1990; Eccleston, G. M. et al. *International Journal of Pharmaceutics* **203**, 127-139, 2000.

[4] Polizelli, A.; Telis, V. R. N.; Amaral, L. Q.; Feitosa, E. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Eng. Aspects* **281**, 230-236, 2006;

[5] Pasquali, R. C.; Sacco, N., Bregni, C. *Latin America Journal of Pharmacy* **28(2)**, p.313-317, 2009.

Apêndice 14

Investigação das propriedades morfológicas e estruturais de nanopartículas de cobalto produzidas pelo método de agregação gasosa

G. T. Landi^a, M. C. A. Fantini^b e A. D. Santos^a

^aLaboratório de Materiais Magnéticos, Instituto de Física da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

^bLaboratório de Cristalografia, Instituto de Física da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

1. Introdução e descrição do sistema de produção de amostras

Ao longo dos últimos anos iniciou-se um projeto no Laboratório de Materiais Magnéticos (LMM) com o intuito de produzir e caracterizar nanopartículas (NPs) compostas de diferentes materiais [1,2]. As NPs são produzidas pelo método de agregação gasosa que consiste em uma adaptação de um sistema de “magnetron sputtering” para comportar uma câmara de alta pressão sobre um dos canhões do sistema.

Possuímos no LMM um “magnetron sputtering” comercial (AJA International) de quatro canhões que opera em alto vácuo. Utilizamos fontes DC para metais e de radio frequência para isolantes.

A adaptação desse sistema consiste em uma câmara de condensação (CC) de 10 cm de diâmetro por 15 cm de comprimento fixado em um dos canhões do sistema (figura 1). Esta câmara é completamente selada, exceto por uma abertura na sua extremidade. Na sua parte inferior, perto do alvo, insere-se um fluxo da ordem de 80 sccm de Ar que segue uma trajetória lamelar em direção a abertura guiada pela diferença de pressão resultante do bombeamento das bombas de vácuo. A pressão dentro da CC é da ordem de 1 Torr e a pressão fora dela da ordem de 5 mTorr (pressão usual de trabalho de um sistema de “sputtering”).

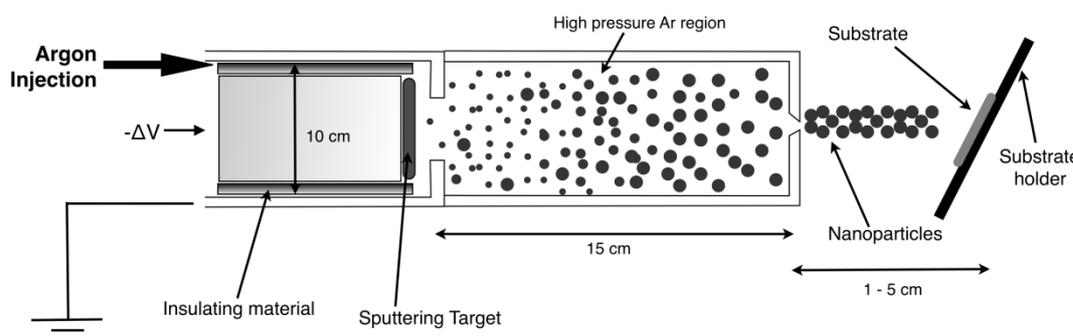


Figura 2: esquema da adaptação em um dos canhões do "sputtering" para comportar a câmara de agregação gasosa.

O Ar inserido no sistema tem três funções. Primeiramente, ele é responsável por remover o vapor atômico do alvo do “sputtering” através de uma diferença de potencial aplicada entre o alvo e uma capa metálica que o contorna. Em segundo lugar, ele termaliza este vapor ainda nas regiões iniciais da câmara. Finalmente, devido à diferença de pressão dentro e fora da CC, o Ar também é capaz de carregar o vapor atômico ao longo da câmara em direção a abertura. Durante esta trajetória, os átomos condensam em NPs através de colisões com outros átomos. Fixando os substratos a alguns centímetros da saída da CC é possível então coletar estas nanopartículas que chegam na forma de um feixe colimado de material.

Apenas um dos quatro canhões do “sputtering” é utilizado para produzir as NPs. Os outros três podem ser utilizados para co-depositar outros materiais de interesse a fim de incrustar as partículas em uma matriz. Devido ao vasto número de materiais que pode ser usado em um sistema de “sputtering”, a combinação NP-matriz é extremamente vasta. Atualmente, já utilizamos Co, Cu, Au, Ag e SmCo como material para as NPs e Al, Cu, Cr, Nb, Au, Ag, NiO, SiO₂ e Si₃N₄ como matrizes. A escolha da matriz, tanto quanto a escolha do substrato, dependem da análise de interesse. A influência da matriz nas propriedades das NPs também tem que ser considerada.

2. Utilização do espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)

As informações que podem ser obtidas utilizando SAXS para analisar sistemas compostos de esferas são amplamente conhecidas [3]. A habilidade de incrustar as NPs em matrizes torna SAXS uma técnica interessante para analisar a morfologia e as propriedades eletrônicas das partículas.

Além disso, já foi observada por microscopia eletrônica, a agregação entre as NPs. Não sabemos ao certo se esta ocorre durante o processo de agregação, dentro da CC, ou já no substrato. Esta questão também pode ser investigada utilizando SAXS. As estruturas formadas podem ser interpretadas como objetos de dimensão fractal [4].

3. Preparação das amostras e procedimento experimental

A escolha conveniente da matriz a ser utilizada foi demorada. As condições necessárias são que esta não interaja com as NPs e que suas taxas de deposição sejam maiores que a do feixe de partículas a fim de diluir os objetos. Tentativas foram feitas com Cu (não é transparente ao feixe de raios X) e Si₃N₄ (baixíssima taxa de deposição). Eventualmente, o elemento escolhido foi Al que, na espessura depositada, é transparente ao feixe e mesmo assim possui taxa alta o suficiente (por ser metálico). O substrato escolhido foi o Kapton.

Para estas medidas, o elemento escolhido para as NPs foi o Co. As amostras foram produzidas co-depositando NPs de Co com Al. O fluxo utilizado foi de 80 sccm e as potências aplicadas foram de 30 W para o Co e 250 para o Al. Este, por ser uma deposição usual de “sputtering” é consideravelmente homogêneo ao longo do substrato. As NPs, no entanto, consistem em um feixe colimado de alguns mm. Assim, para um substrato de aproximadamente 15x15 mm² a concentração atômica relativa de NPs na matriz varia de alguns por cento até aproximadamente 50 % seguindo uma distribuição Gaussiana. O tempo de deposição foi de 30 minutos o que resultou em ~270 nm de Al e 108 nm de espessura efetiva de Co no máximo da distribuição de material. Uma amostra de controle, contendo apenas o substrato e a matriz de Al na mesma espessura, também foi produzida para futura

subtração da curva de espalhamento. Em ambas as amostras, uma cobertura de 4 nm de Si_3N_4 foi depositada a fim de proteger a amostra contra oxidação.

Curvas de SAXS foram obtidas em diferentes regiões da amostra (e na amostra de controle) utilizando o equipamento NanoStar da Bruker. As condições de medida foram 30 kV e 40 mA para o filamento ($\text{Cu K}\alpha$, $\lambda=1.540$ nm). O tempo de coleta foi de 4 horas em um detector bi-dimensional. As curvas foram posteriormente integradas e calculadas em termos do número de onda. Finalmente, a curva de espalhamento da amostra de controle foi subtraída de tal forma a obtermos apenas o espalhamento resultante das NPs.

4. Resultados e discussão

A figura 2 ilustra as curvas de espalhamento obtidas para as diferentes posições no substrato. Algumas conclusões podem ser imediatamente obtidas. Em primeiro lugar, nota-se que a intensidade do espalhamento é de fato proporcional a quantidade de partículas. Em segundo lugar, nota-se que mesmo nas regiões mais afastadas do centro da deposição (curvas E e F), ainda há espalhamento mostrando que também há NPs nesta região, mesmo que em quantidades baixas.

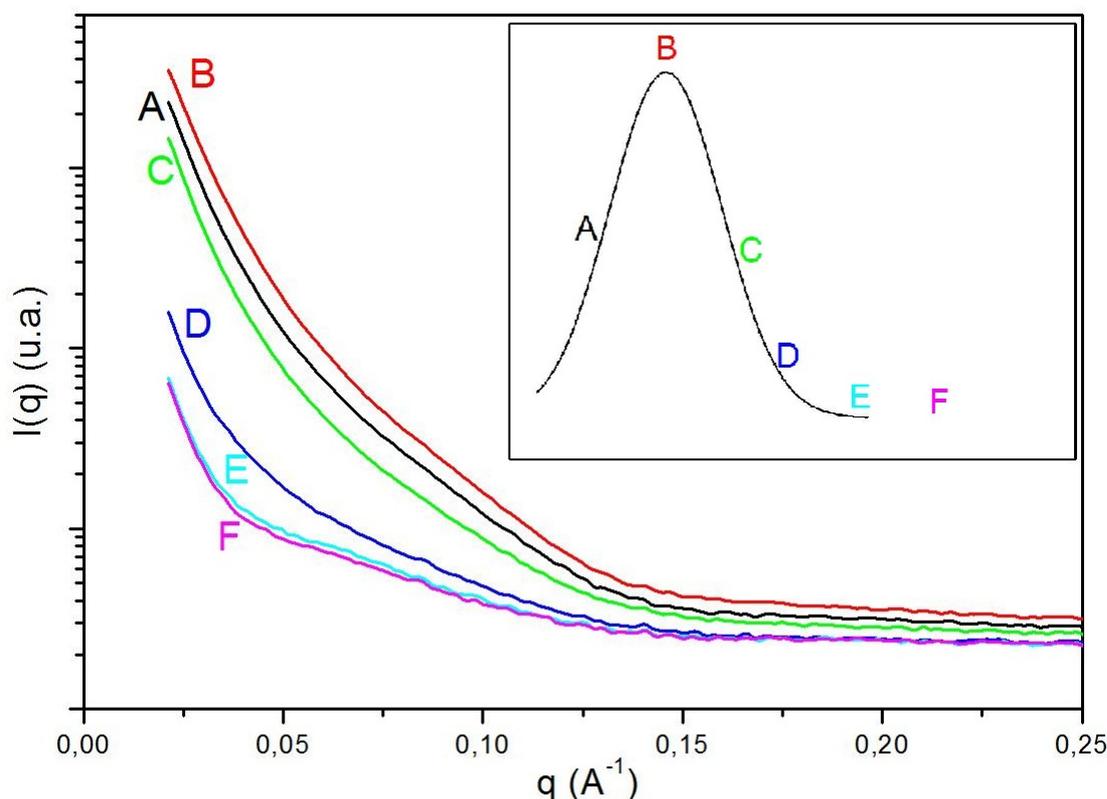


Figura 3: curvas de espalhamento obtidas em diferentes regiões da amostra. A figura interna diz respeito à concentração de NPs em função da posição no substrato. As cores das letras correspondem à curva correspondente.

Analisando a forma da curva é possível notar que a inclinação do espalhamento não é constante variando com q . Isso significa que os objetos espalhadores não são esferas isoladas, mas sim objetos agregados. Isto é um indício de que há a aglomeração entre NPs como já previamente mencionado. Finalmente, é possível observar que o aspecto geral das

curvas é diferente nos diferentes pontos. Isso significa que a forma como as partículas estão distribuídas e/ou ligadas é diferente nas diferentes regiões do substrato.

Análises clássicas de SAXS, usando o GNOM demonstraram que os arranjos nanoparticulados habituais como distribuição de nanopartículas esféricas mono ou polidispersas isoladas, não são capazes de descrever os resultados experimentais acima. Considerando as particularidades do método de preparação das amostras, estamos considerando a necessidade de utilizar uma abordagem onde as nanopartículas possuam uma estrutura interna, provavelmente de caráter fractal [4].

Uma análise mais aprofundada destes dados envolverá o uso de simulações específicas das equações do espalhamento. Tal ainda está em desenvolvimento.

3. Conclusões

Este trabalho descreveu a aplicação da técnica de espalhamento de raios X a baixos ângulos para estudar a morfologia de sistemas nanoparticulados produzidos através da técnica de agregação gasosa.

Através de uma análise inicial foi possível concluir que há diferenças marcantes nas curvas de espalhamento para as diferentes concentrações relativas de NPs na matriz de Al. Isso é um forte indício de que a forma como estes objetos estão agregados deva ser complexa variando ao longo do substrato.

4. Referências

[1] G. T. Landi, S. A. Romero e A. D. Santos, *submetido ao Review of Scientific Instruments*, 2009.

[2] G. T. Landi e A. D. Santos, *submetido ao Journal of Materials Science*, 2009.

[3] A. Guinier, G. Fournet, *Small Angle Scattering of X Rays*, New York: Wiley, 1955.

[4] J. Teixeira, *J. Appl. Cryst.*, **21**, 781 (1988)

Apêndice 15

Estudo da complexação do íon K^+ por poliglicóis de peso molecular 400 e 3000.

Baixo, Rogério; Tsunoda, Mitsukimi; Oliveira, Abel.

Departamento de Pós Graduação, UFSCar, São Carlo, Brasil.

Instituto de Física, USP, São Paulo, Brasil.

1. Introdução

Íons metálicos podem complexar com determinados polieteres^{[1] [2]} a fim de formar complexos que podem ser estudados através de diversas técnicas. A complexação do íon potássio por poliglicóis, foi estudada através de diversas técnicas conhecidas a fim de comprovar a complexação bem como os meios e formas de sua ocorrência. Neste estudo, utilizamos polímeros poliglicóis (Polieter) de peso molecular 400 e 3000. Amostras dos polímeros são amostras industriais sendo que os íons foram adicionados em laboratório em forma de sal ou já estavam contidos nas amostras industriais.

As amostras analisadas estão descritas abaixo:

- Amostra de metanol puro (Parasita);
- Amostra de uma solução de MeOH com KCl;
- Amostra de uma solução de metanol com P400 (sem potássio);
- Amostra de uma solução de metanol com P400 Industrial;
- Amostra de uma solução de metanol com P400 e KCl;
- Amostra de uma solução de metanol com P3000 (s/ potássio);
- Amostra de uma solução de metanol com P3000 Industrial;
- Amostra de uma solução de metanol com P3000 e KCl;

Utilizamos o método de espalhamento de raio X baixo ângulo (SAXS) ^{[3][4][5]} para determinar a morfologia ou conformação da interação das moléculas de poliglicóis com o íon potássio e correlacioná-la com resultados de outras técnicas a fim de comprovar a complexação destes íons com os polímeros estudados.

2. Resultados e Discussão

Na Figura 1 abaixo, podem ser observadas as curvas de espalhamento das amostras analisadas. As amostras com metanol puro e com MeOH+KCl têm espalhamento similar, mas bem diferente ao das outras amostras. Isto nos leva a deduzir que o KCl puro está diluído de forma homogênea em metanol. Os dados de SAXS dessas duas amostras podem ser definidos como “espalhamento parasita”. Para eliminar a interferência do solvente nos resultados de interesse subtrai-se das intensidades espalhadas pelas amostras com polímero os dados do “espalhamento parasita”, ou seja, da amostra de metanol com KCl. Com esse procedimento é possível analisar as flutuações de densidade eletrônica do polímero e seus aditivos.

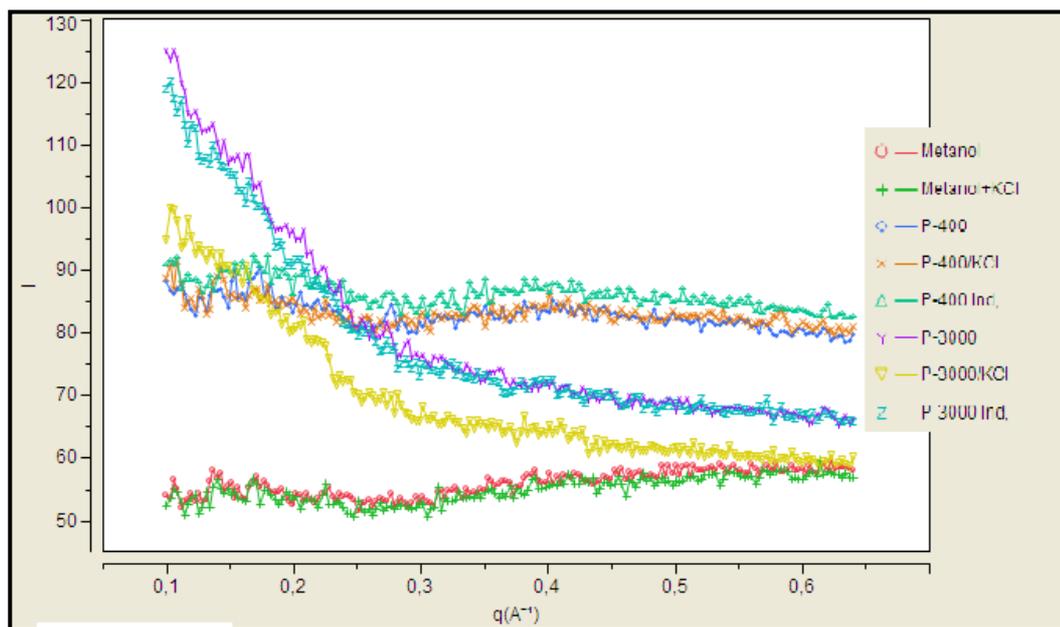


Fig 1 - Dados do Nanostar considerando todas as amostras analisadas já descontando o capilar vazio.

As Figuras 2 e 3 mostram os gráficos de Guinier de duas amostras (P3000 e P400 com KCl) e os valores de raio de giro, relacionado às dimensões das flutuações de densidade eletrônica.

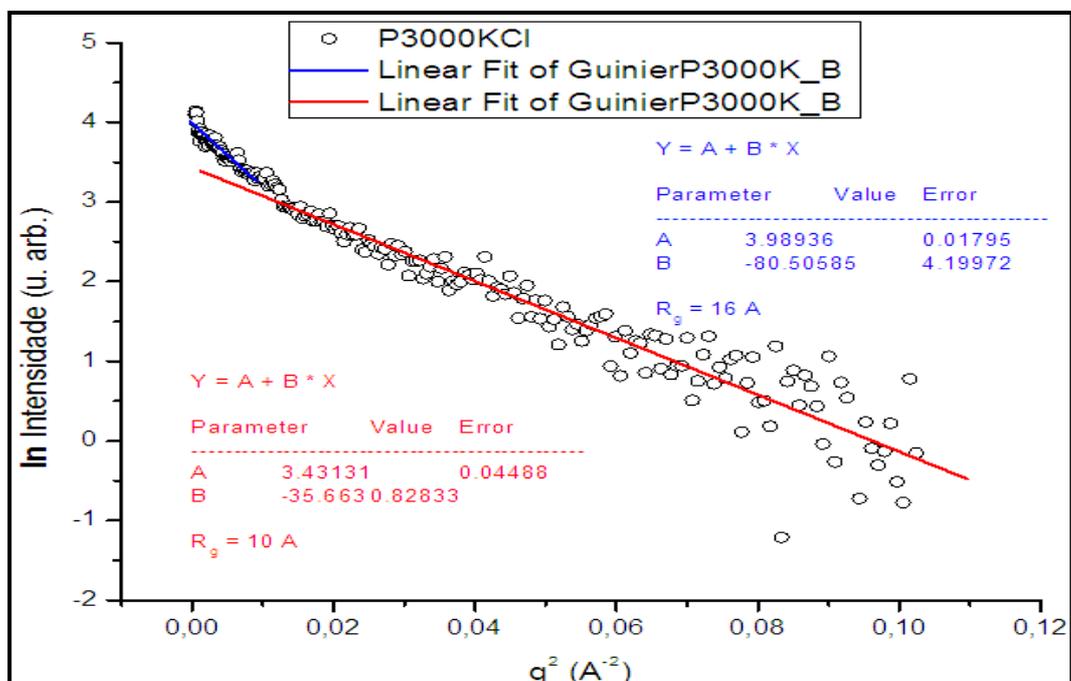


Fig 2 - Gráfico de Guinier do Polímero P3000 KCl. Íons K^+ adicionados através de KCl.

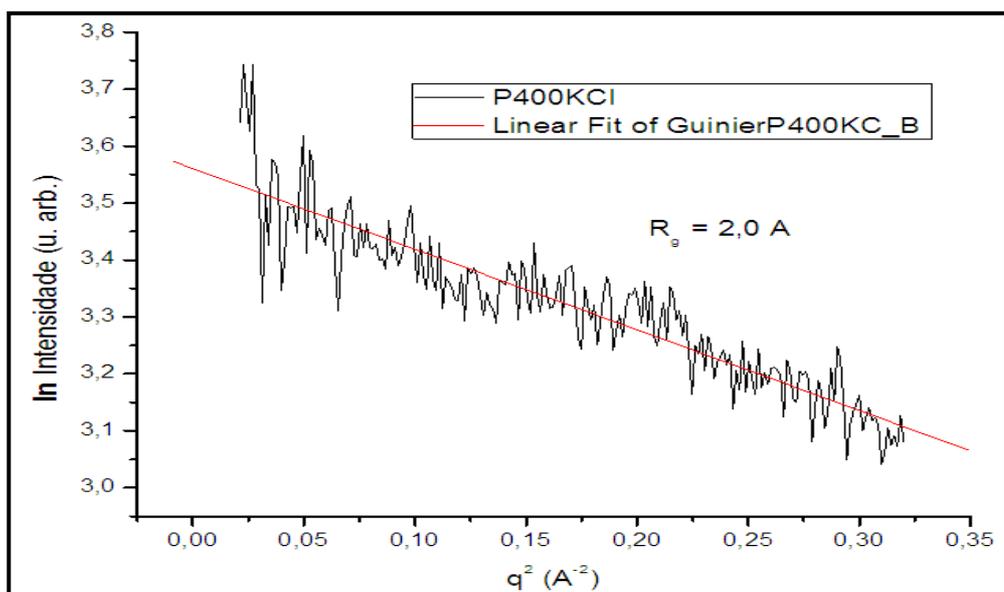


Fig 3 - Gráfico de Guinier do Polímero P400KCl. Íons K⁺ adicionados através de KCl.

A Figura 4 mostra o cálculo do invariante, que é proporcional ao volume de espalhadores dentro das amostras preparadas com o polímero P3000.

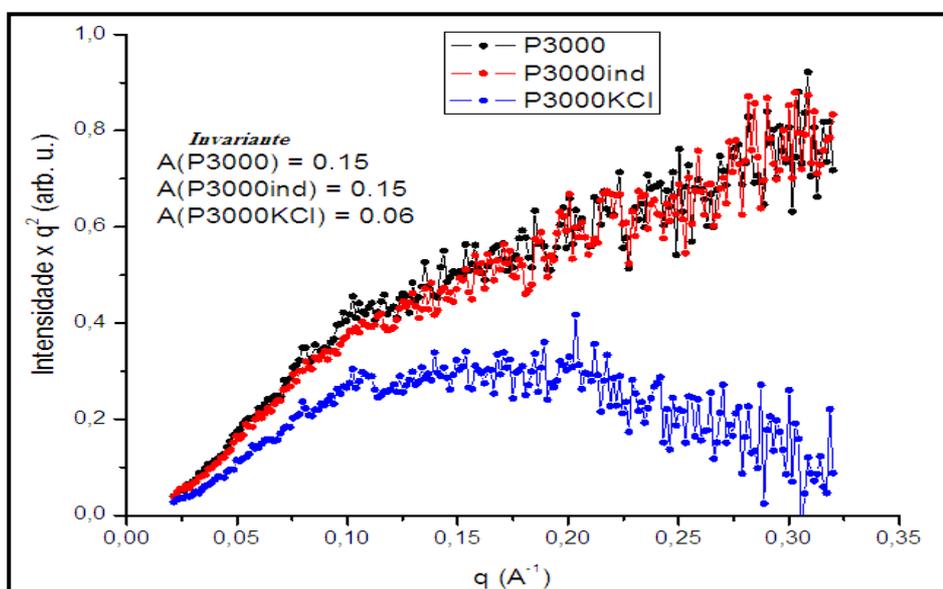


Fig 4 - Gráfico do “invariante” dos polímeros de peso molecular 3000.

3. Conclusões

Dos resultados obtidos podemos concluir que todas as amostras estudadas possuem pequenos aglomerados (2 - 20 Å) com densidade eletrônica diferente da matriz.

O polímero P400, além de possuir flutuações de densidade eletrônica menores, apresenta menor variação em torno do raio de giro médio de 3,5 Å. Por outro lado, para o polímero P3000 há uma variação grande com relação à dimensão dos aglomerados, que apresentam com raio de giro médio de 5 Å a 16 Å.

Quando comparamos os dados das amostras estudadas, observamos que praticamente não há diferença nas curvas de espalhamento das amostras dos polímeros P400, P400Ind e P400KCl. Contudo, a amostra P400KCl apresenta uma redução na média do seu raio de giro mostrando alguma interação do polímero com o íon K⁺, tornando o material eletronicamente mais homogêneo.

As curvas de espalhamento das amostras P3000, P3000Ind e P3000KCl também possuem a mesma forma quando comparadas entre si, mas bastante diferente da série com P400. A maior massa molecular desse polímero deve estar relacionada ao maior espalhamento e às maiores variações de densidade eletrônica observadas para a série P3000 comparadas à série P400. Novamente, a amostra de P3000KCl mostra uma redução no seu raio de giro médio, apontando a influência do íon K⁺ adicionado à solução através do sal de cloreto de potássio na distribuição de carga eletrônica do polímero original. O invariante da amostra P3000KCl é menor, portanto, há nessa amostra uma menor densidade de aglomerados, o que implica que ela é eletronicamente mais homogênea que as outras duas, efeito atribuído à presença dos íons K⁺.

4. Referências

- [1] Altoé, P.A. - SÍNTESE E PROPRIEDADES DE IONOFOROS NEUTROS, R.Janeiro (1979).
- [2] Novack, K.;Sanches, Oliveira, C.; Polímeros: Ciência e Tecnologia - Jan/Mar Pg 16 (1993).
- [3] O.Glatte, O.Kratky, Small Angle X-Ray Scattering (1982).
- [4] Y. Nakamura, Small-angle X-ray scattering from polystyrene with relatively short main chains (2006)
- [5] H.Yamakawa, Helical Wormlike chains in Polymer solutions (1997).

Apêndice 16

Estudo estrutural de lipossomas estabilizados com ácido polilático-coglicólico (PLGA) para liberação intravitreal de Bevacizumabe

Bruno, C^a, Chiavacci, L^a; Barbosa, L R S^b, Itri, R^b.

^a*Departamento de Ciências Farmacêuticas, Unesp Araraquara, Brasil.*

^b*Instituto de Física, USP, São Paulo, Brasil.*

1. Introdução

Recentemente foi autorizado pelo FDA o uso de um anticorpo monoclonal anti-VEGF denominado Bevacizumab, que vem sendo utilizado com resultados promissores no tratamento de alguns tipos de câncer. Devido ao mecanismo de ação como antitumoral, também vem sendo utilizado paralelamente no tratamento de doenças do segmento posterior do olho, como a Degeneração Macular Relacionada com a idade (AMD) e a Retinopatia Diabética Proliferativa (PDR). A AMD é a principal causa de cegueira nos pacientes com mais de 50 anos de idade e a PDR afeta cerca de 80% dos pacientes do diabetes com mais de 20 anos de doença. A administração sistêmica do **Bevacizumab** causa sérios efeitos adversos que muitas vezes impede a sua utilização, principalmente porque os efeitos adversos estão diretamente relacionados com a idade do paciente e, ambas as doenças, ocorrem em pessoas com idade avançada. A administração do medicamento diretamente no vítreo é uma das alternativas para contornar os efeitos colaterais, mas, devido ao alto índice de reincidência de ambas as doenças, os sistemas de liberação prolongada parecem ser um caminho seguro para, além de aumentar o tempo de ação terapêutica, diminuir a frequência de administração e aumentar a eficiência do fármaco. O objetivo deste trabalho é analisar a estrutura por espalhamento de raios X a baixo ângulo de um sistema recentemente desenvolvido para encapsulamento do **Bevacizumab** em lipossomas *recobertos ou não por PLGA*. As informações obtidas por SAXS serão muito úteis na determinação das condições ideais de desenvolvimento da formulação mais adequada e segura para a aplicação intravitreal do Bevacizumab e também nos permitirá correlacionar os aspectos estruturais com o tempo de residência do fármaco no segmento posterior do olho e tempo de meia-vida do Bevacizumab nas formas livre e encapsulada em lipossomas recobertos ou não por PLGA

2. Resultados e Discussão

A figura 1 mostra as curvas de SAXS dos sistemas compostos por Lipossomas em ausência e presença de Pluronic e Proteína. Além disso, a curva de espalhamento da proteína em ausência de Pluronic e também de lipossomas pode ser apreciada na mesma figura. Como podemos ver na figura abaixo, e considerando a curva de espalhamento do lipossoma em ausência de pluronic e também de proteína, esta se mostra com um espalhamento padrão de lipossomas (sistemas vesiculares), ou seja, um rápido decaimento a pequenos valores de q (que deve ser proporcional a q^2) e também contando com a presença de um pico na região de médios valores de q (veja seta na figura 1). Este pico é característicos de sistemas onde

as partículas espalhadoras apresentam um contraste na densidade eletrônica em seu interior. Um bom exemplo deste caso são os sistemas micelares.

É interessante perceber agora, que a inserção do pluronic, altera de forma significativa a curva de espalhamento. Em primeiro lugar, podemos perceber um deslocamento para pequenos valores de q do pico principal, presente em médios valores de q . Além disso, é interessante perceber que a inserção do pluronic também dá origem a um pico na região de pequenos valores de q . A presença de tal pico indica que o sistema em estudo passa a ser interagente e que devemos considerar esta interação.

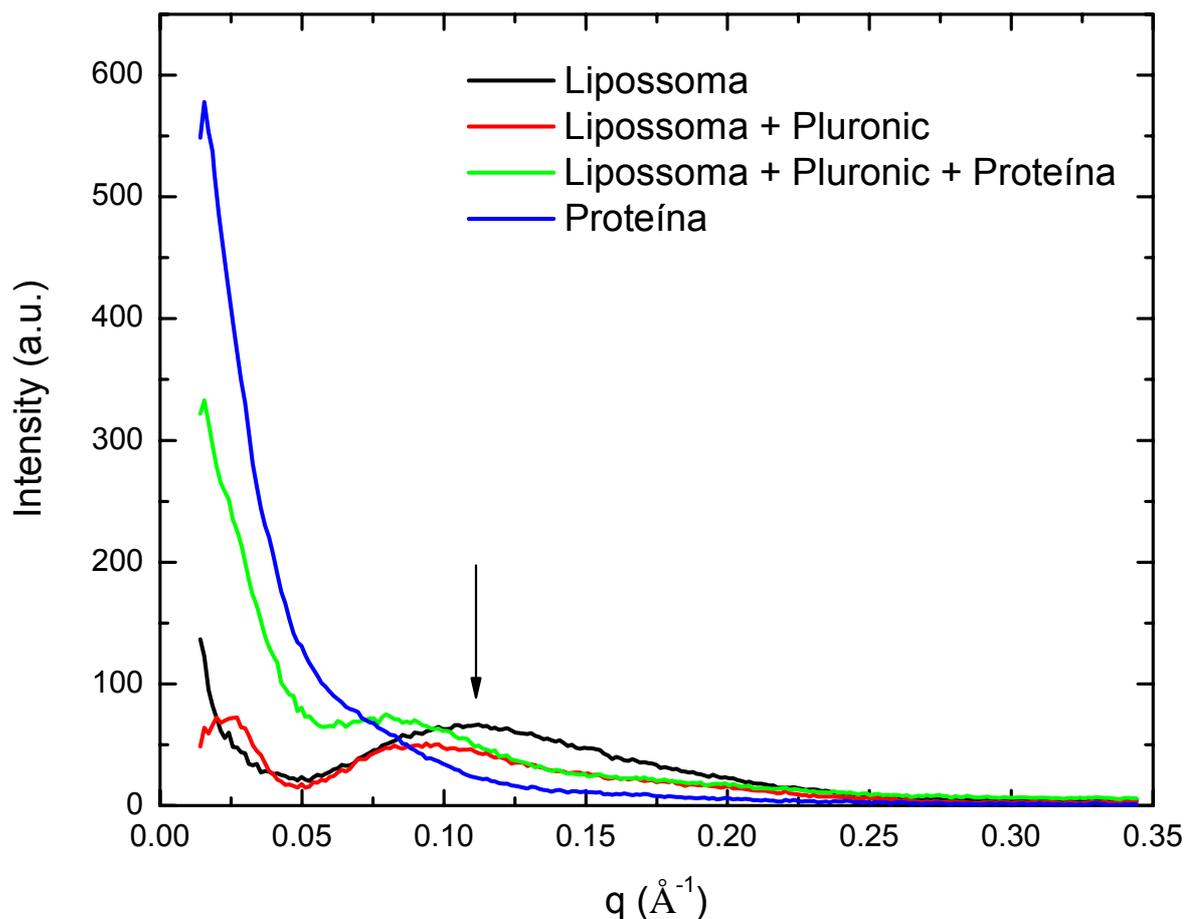


Figura 1 - Curvas de SAXS dos sistemas estudados.

É interessante perceber que a presença de proteínas, em nosso caso, induz alterações significativas na curva de espalhamento, em comparação com a curva de SAXS dos sistemas em ausência de proteína. Em primeiro lugar, temos que perceber que a função de interferência, indicada pela presença de um pico na região de pequenos valores de q desaparece. Este efeito indica que as interações entre lipossomos (em presença de pluronic) se anulam. Provavelmente as proteínas se ligam a superfície do lipossomo e reduzem a carga da superfície do lipossomo. Entretanto, não podemos obter maiores informações acerca deste sistema, pois não foi possível realizar a medida de SAXS do pluronic em ausência de lipossomo e de proteína. Esta curva de SAXS é vital para a consolidação e para a análise dessas curvas de SAXS.

Por fim, podemos também perceber na figura 1 que a curva de espalhamento da proteína tem um decaimento monotônico, característico de sistemas compostos por uma única densidade eletrônica. Em uma análise inicial, podemos constatar que esta proteína, em ausência de qualquer outro agente possui uma estrutura globular, com raio de giro de cerca de 52 Å. No entanto, não podemos excluir a possibilidade de que a proteína e os lipossomas (estes em presença de pluronic) não sejam interagentes entre si, ou seja de que esta curva de SAXS seja, na verdade formada, pelo espalhamento de cada uma dessas entidades separadamente. Poderemos apenas confirmar, ou negar tal afirmação quando realizarmos outras medidas de SAXS destes mesmos sistemas, mas agora em um modo mais sistemático, i.e., realizando tais medidas em diferentes concentrações para que possamos realmente definir qual é a estrutura deste agregado e realmente poder inferir se este poderá ou não, do ponto de vista estrutural, ser utilizado como um carreador de drogas em sistemas *drug delivery*.

3. Conclusões

Como mencionamos anteriormente, possuímos um interessante sistema de estudo, no qual realizamos medidas de SAXS para verificar a real potencialidade de um sistema vesicular como carreador de drogas, em sistemas *drug delivery*. Evidenciamos que o lipossoma tem uma curva de SAXS característica de sistemas compostos por vesículas unilamelares em ausência de qualquer interação entre partículas. No entanto, a presença de pluronic altera de forma significativa esta curva de espalhamento, dando origem à interações entre sistemas. É importante mencionar que este trabalho encontra-se em andamento e que devemos ainda ter que realizar algumas medidas de SAXS para completá-lo. Estas serão realizadas assim que possível.

Apêndice 17

Influência da distribuição de pesos moleculares sobre o "ponto de névoa" de surfactantes do tipo poliéter glicóis

Y.A. Marques^a e M. Tsunoda^a

^a*Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brasil.*

1. Introdução

Poliéter glicóis são macromoléculas poliméricas tensoativas de características anfifílicas não-iônicas, que contém em sua estrutura química duas regiões: uma polar hidrofílica e outra apolar lipofílica. São polímeros orgânicos compostos por carbono, hidrogênio e oxigênio. Na cadeia polimérica estão presentes grupos hidrocarbonetos e ligações éteres, e nas extremidades da molécula do polímero, pelo menos um grupo hidroxila. O polipropileno glicol é um diol (duas hidroxilas terminais), e copolímeros de poloxipropileno e polioxietileno são exemplos de poliéter glicóis. Do ponto de vista da composição dos poliéter glicóis, os monômeros mais utilizados são: Óxido de Etileno (EO) e Óxido de Propileno (PO). Em alguns casos existe também o Óxido de Butileno (BO). O balanço entre as partes polar e apolar desta família de surfactantes não iônicos é extremamente importante, pois determina a solubilidade do mesmo em um determinado solvente.

Como surfactantes os poliéter glicóis apresentam uma descontinuidade de solubilidade em soluções a partir de uma temperatura superior crítica. Em temperaturas específicas, o aquecimento de soluções destes polímeros causa uma separação em duas fases líquidas. As duas fases são soluções micelares isotrópicas. O início deste processo de separação é observado com a turvação da solução. Assim essa temperatura crítica é denominada "ponto de névoa" ou de turbidez [1].

As técnicas de determinação de "ponto de névoa" se baseiam na observação de turbidez em soluções que são transparentes à luz visível em temperaturas abaixo do "ponto de névoa". Essas soluções são padronizadas para a determinação desta propriedade, mas não refletem os sistemas reais onde são utilizados os poliéter glicóis.

Recentemente, estudos de estruturas em transições de fase em polímeros e copolímeros têm utilizado a análise de espalhamento de raios-X de baixo ângulo (SAXS) [2-7]. A técnica tem se mostrado eficiente para a caracterização estrutural e demonstração de existência de fases distintas em sistemas de copolímeros em solução. Adicionalmente, são evidenciadas diferenças morfológicas entre as transições de fase de diferentes estruturas moleculares. SAXS permite que sejam identificadas as estruturas geométrica dos agregados de moléculas, identificando estruturas que podem ser micelares cúbicas, hexagonais ou lamelares [7].

Desta maneira, SAXS se apresenta como uma técnica que pode ser utilizada para estudos estruturais de macromoléculas e conseqüentemente os fenômenos de transição de fase apresentados por esta família de materiais. No caso de macromoléculas do tipo dos poliéter

glicóis, SAXS pode ser utilizado para avaliação de tamanhos de aglomerados de moléculas e seu mecanismo de “ponto de névoa” em soluções. Além disso, a influência da composição, tanto dos poliéter glicóis quanto do meio solvente, contendo ou não espécies iônicas, no mecanismo que governa a transição de fase no “ponto de névoa”, pode ser investigado com esta técnica.

Diante do exposto, o conhecimento dos mecanismos e fatores que governam o fenômeno denominado como “ponto de névoa” de macromoléculas como os poliéter glicóis é de grande interesse tecnológico e científico.

2. Resultados e Discussão

Neste trabalho foram inicialmente testados dois poliéteres glicóis disponíveis comercialmente como FLUENT-CANE™ 149 e Poliglicol Experimental XB 81508.00. Estes polímeros tem composições químicas e pesos moleculares distintos, entretanto apresentam o mesmo “ponto de névoa” conforme demonstrado da Tabela I:

Tabela I: Pontos de Névoa dos polímeros testados:

** solução 1% Poliéter glicol / 99% H2O*

*** solução 5g Poliéter glicol / 25g (25% dibutil glicol / 75% H2O)*

Material	Ponto de Névoa 1% aquoso *	Ponto de Névoa DB **
FLUENT-CANE™ 149	39°C	55°C
Poliglicol Experimental XB 81508.00	39°C	55°C

As análises de SAXS foram realizadas com os polímeros em uma concentração de 1% em peso em água deionizada. As amostras foram preparadas em porta-amostras de capilares de vidro e submetidas à análise à temperatura ambiente.

Os primeiros resultados de SAXS obtidos no equipamento NANOSTAR à temperatura ambiente (25°C) estão apresentados na Figura 1. A solução contendo 1% do poliéter glicol FLUENT-CANE™ 149 em água deionizada foi denominada FC149, a solução contendo o poliéter glicol XB 81508.00 denominada como XB508, enquanto que a amostra contendo apenas água deionizada como o controle para o contraste de espalhamento foi denominada simplesmente por H2O.

Observa-se que, para os sistemas avaliados, não existe uma diferença significativa de contraste de espalhamento entre a água e a solução contendo os poliéter glicóis. Desta maneira os resultados não permitem uma análise estrutural detalhada dos arranjos espaciais dos agregados moleculares ou das micelas para nenhum dos poliéter glicóis.

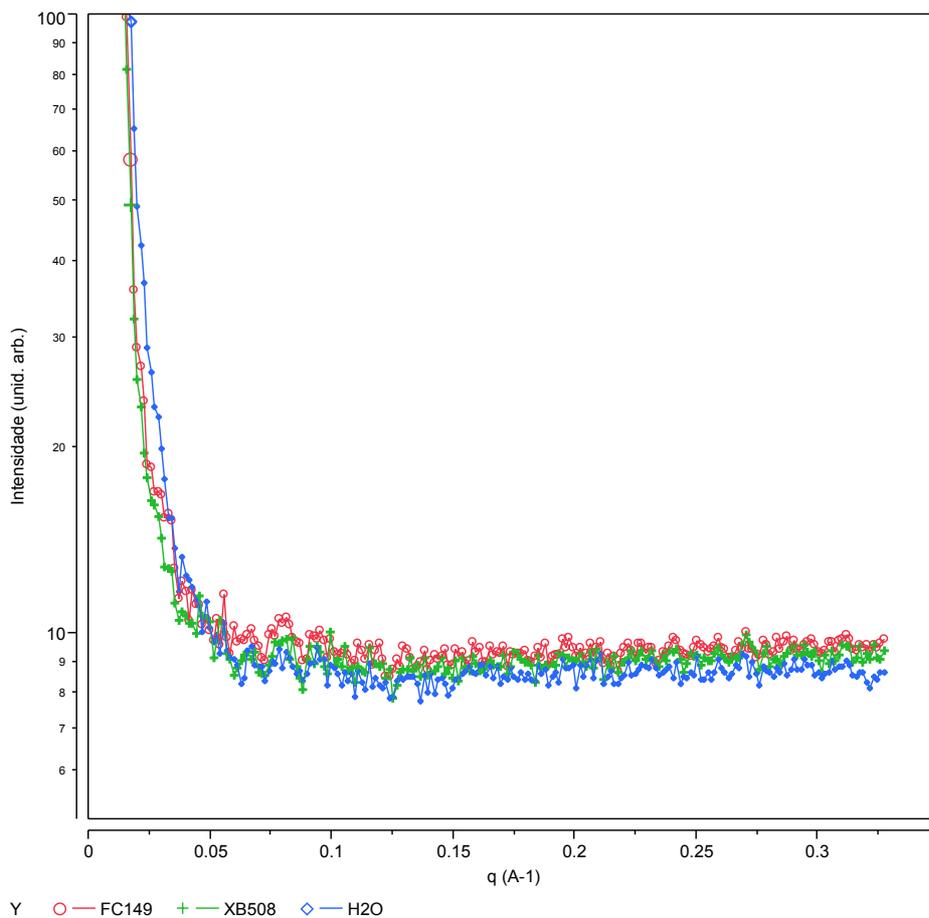


Figura 1: Resultados de SAXS para os sistemas de polímeros glicóis em água.

Uma hipótese é que a água não tenha sido um contraste ideal para gerar diferenças de espalhamento que permitam e evidenciem a formação de estruturas de agregados de moléculas dos polímeros estudados. Além disso, pode-se esperar que este baixo contraste seja observado pelo fato da concentração do poliéter glicol ser demasiadamente baixa. O prosseguimento e próximas etapas deste estudo serão realizadas utilizando outras soluções que possam apresentar melhores contrastes para análise dos dados de espalhamento, assim como sistemas com maior concentração do polímero em solução. Este trabalho apresenta-se em etapa inicial de desenvolvimento.

3. Conclusões

Os resultados preliminares de SAXS deste estudo de soluções aquosas dos poliéters glicóis FLUENT-CANE™ 149 e Poliglicol Experimental XB 81508.00 não apresentaram resultados que permitam uma análise e interpretação das estruturas dos agregados moleculares ou das micelas formadas neste sistema. O trabalho prosseguirá com a proposta de estudos diferentes concentrações e diferentes soluções com os poliéters glicóis para serem analisados pela técnica de SAXS.

4. Referências

Referências são indicadas entre colchetes; há diferentes formatos para artigos em revistas[1] , artigos em livros[2] e livros[3] .

[1] Nakagawa, T., in *Solubilization in: Nonionic Surfactants*, ed Schick, M.J., Marcel Dekker, New York, p. 558-603 (1967).

[2] Alexandridis, P., Holmqvist, P., Lindman, B., Poly(ethylene oxide)-containing amphiphilic block copolymers in ternary mixtures with water and organic solvent: effect of copolymer and solvent type on phase behavior and structure. *Colloids and Surfaces A*, **129-30**, 3-21 (1997).

[3] Tan, S., Zhang, D., Zhou, E., Use of SAXS to Characterize the Morphology of Poly(polyethylene glycol diacrylate)/Epoxy Resin Interpenetrating Networks. *Polymers International*, **42**, 90-94 (1999).

[4] Alexandridis, P., Zhou, D., Kahn, A., Lyotropic Liquid Crystallinity in Amphiphilic Block Copolymers: Temperature Effects on Phase Behavior and Structure of Poly(ethylene oxide)-b-Poly(propylene oxide)-b-Poly(ethylene oxide) Copolymers of Different Compositions, *Langmuir*, **12**, 2690-2700 (1996).

[5] Hadjuk, D.A., Kossuth, M.B., Hillmyer, M.A., Bates, F.S., Complex Phase Behavior in Aqueous Solutions of Poly(ethylene oxide)-Poly(ethylene) Block Copolymers, *J. Phys. Chem. B*, **102**, 4269-4276 (1998).

[6] Alexandridis, P., Ivanova, R., Lindman, B., Effect of Glycols on the Self-Assembly of Amphiphilic Block Copolymers in Water. 2. Glycol Location in the Microstructure, *Langmuir*, **16**, 3676-3689 (2000).

[7] Alexandridis, P., Olsson, U., Lindman, B. A., Record Nine Different Phases (Four Cubic, Two Hexagonal, and One Lamellar Lyotropic Liquid Crystalline and Two Micellar Solutions) in a Ternary Isothermal System of an Amphiphilic Block Copolymer and Selective Solvents (Water and Oil). *Langmuir*, **14**, 2627-2638 (1998).

Apêndice 18

Estudo de membranas lipídicas de DOPC e cardioplipina com azul de metileno por espalhamento de raios-x a baixos ângulos

Thaís F. Schmidt^a, Leandro Barbosa e Rosângela Itri^b.

^aUniversidade Federal do ABC, Santo André, SP..

^bInstituto de Física, Universidade de São Paulo, SP..

1. Introdução

Este projeto de pesquisa teve como objetivo estudar os efeitos de um fotossensibilizador fenotiazínico, azul de metileno (AM), em modelos de biomembrana. Para isso, utilizamos como modelos de membrana celular, vesículas lipídicas unilamelares (LUVs) feitas de cardioplipina (CL) e DOPC. Essas vesículas foram preparadas a diferentes concentrações tanto dos fosfolípidios a pH fisiológico e temperatura ambiente, no intuito de mimetizar a membrana interna da mitocôndria e para avaliar a influência do azul de metileno na parede da membrana. Neste contexto, poderemos contribuir na avaliação dos mecanismos de um dos possíveis alvos de morte celular por apoptose, através da fotossensibilização de membranas lipídicas.

2. Resultados e Discussão

A técnica de raios-x a baixos ângulos (SAXS)[1] permitiu verificarmos possíveis mudanças estruturais nas vesículas sob a presença do AM. Podemos observar que as concentrações de azul de metileno não foram suficientes para provocar uma mudança no perfil das curvas de espalhamento para todas as proporções dos lipídios. Estes resultados mostram curvas tipicamente de membranas sob ação do tampão na Figura 1 em função de q e corrigidas na Figura 2 em função de θ .

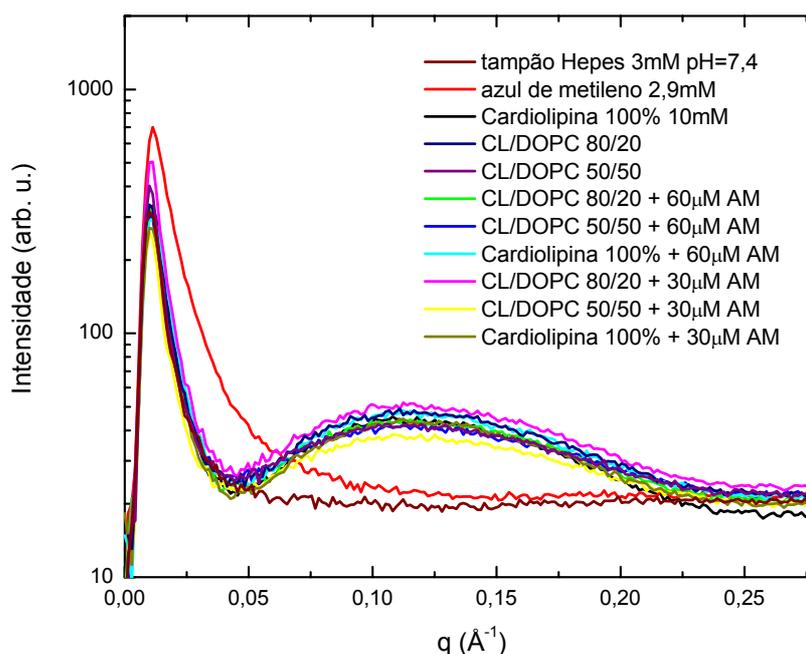


Figura 1: curvas de espalhamento para diferentes tipos de LUV's a diferentes proporções em tampão e em azul de metileno. Curvas não corrigidas

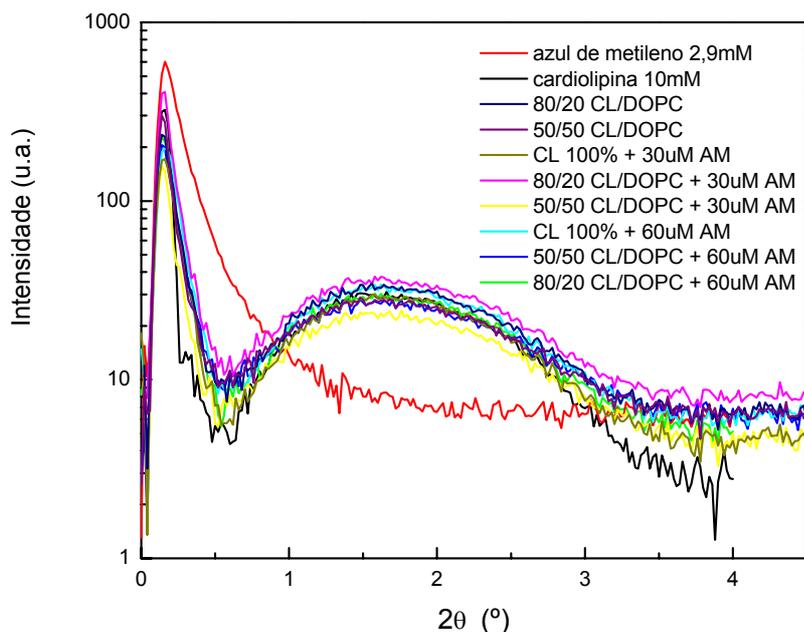


Figura 2: Curvas de espalhamento para vesículas de CL e mistas de CL-DOPC em solução tampão e AM.

O modelo utilizado para as curvas de SAXS segue o modelo para uma partícula plana, no nosso caso, uma membrana, dado por Glatter[1]. Na figura 3 ilustramos uma curva com o ajuste.

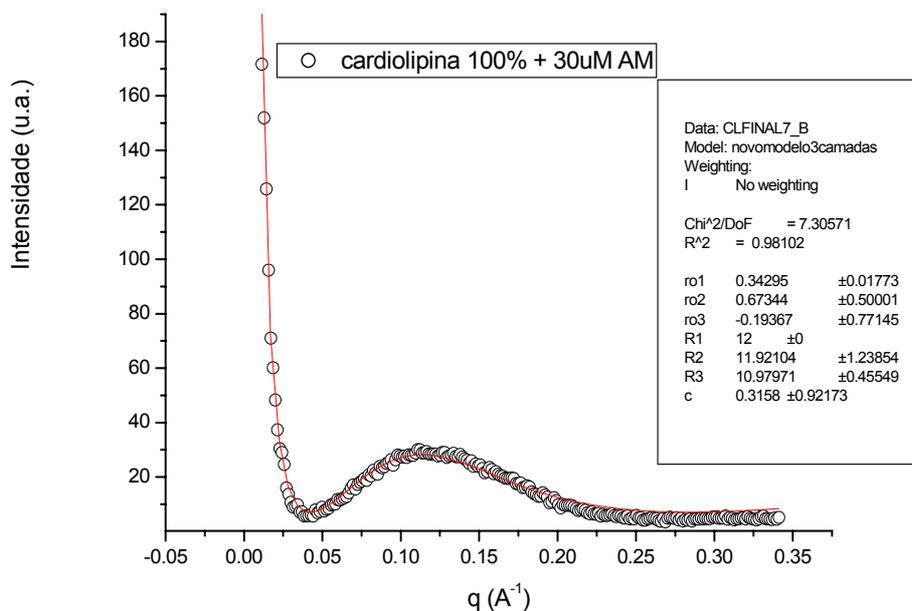


Figura 3: Ajuste do modelo teórico de bicamada lipídica à curva 100% CL com azul de metileno.

3. Conclusões

Não foi possível concluir todas as medidas de espalhamento no período fornecido, assim pretendemos dar continuidade no experimento em medidas futuras.

4. Referências

[1] GLATTER, O., KRATKY, O. in: Small Angle X-Ray Scattering, Academic Press, New York, 1982.

Apêndice 19

Vesículas lipídicas de DOPC e cardioplipina sob ação do fotossensibilizador azul de metileno.

Thaís F. Schmidt^a, Leandro Barbosa e Rosangela Itri^b.

^aUniversidade Federal do ABC, Santo André, SP..

^bInstituto de Física, Universidade de São Paulo, SP..

1. Introdução

Este projeto de pesquisa teve como objetivo dar continuidade ao estudo dos efeitos do fotossensibilizador azul de metileno (AM) em vesículas lipídicas unilamelares (LUVs) feitas de cardioplipina e DOPC. Essas vesículas foram preparadas a diferentes concentrações tanto de cardioplipina quanto de DOPC a pH fisiológico e temperatura ambiente, no intuito de mimetizar a membrana interna da mitocôndria e para avaliar a influência do azul de metileno na parede da membrana. A técnica de raios-x a baixos ângulos (SAXS) foi utilizada para verificar se houveram mudanças estruturais nas vesículas lipídicas variando proporções de cardioplipina (CL), DOPC e AM.

2. Resultados e Discussão

Os dados apresentados a seguir mostram as curvas de espalhamento para vesículas unilamelares grandes mistas de DOPC e CL com azul de metileno. Todas as vesículas apresentaram uma proporção mínima de 80% de DOPC.

Podemos observar que o aumento da concentração de DOPC nas vesículas causa a formação de multilamelas, como também na presença de AM.

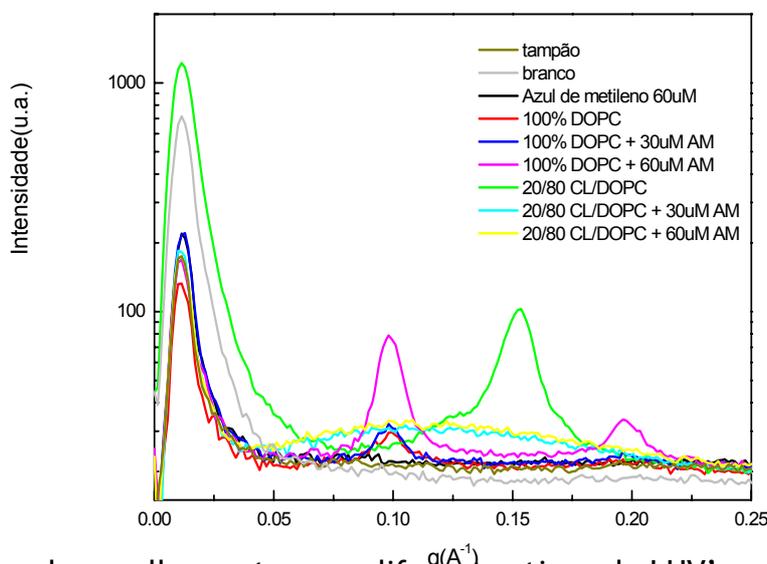


Figura 1: curvas de espalhamento para diferentes tipos de LUV's a diferentes proporções de DOPC e CL em tampão e em azul de metileno.

3. Conclusões

Será necessário repetir algumas medidas no mês de janeiro para confirmar o perfil das curvas de espalhamento para vesículas com altas concentrações de DOPC. Até o momento, as curvas se encontram em fase de análise de dados.

Apêndice 20

Transição de fase em membranas de lipídio

E. A. Oliveira (IFUSP), B.B. Gerbelli (IFUSP), R.N. Bicev (IFUSP)

Resumo

O objetivo desse estudo consiste na preparação e caracterização de complexos de lipídios e DNA para estudar a organização supramolecular formada pelo encapsulamento da biomolécula no sistema hospedeiro, e sobretudo os efeitos de confinamento. Os resultados obtidos nesses ensaios são essenciais para a preparação dos complexos e para comparação da organização do DNA em solução e no complexo. Neste relatório são apresentados os resultados de experimentos de raio X, revelaram a presença de dois tipos de simetria: retangular centrada e hexagonal. As simetrias retangular centrada e hexagonal foram identificadas por meio da indexação de alguns picos do espectro a esses respectivos tipos de rede. São apresentados também os resultados obtidos nas observações em microscopia de luz polarizada e de fluorescência.

Introdução

A preparação de sistemas lamelares incorporando biomoléculas oferece uma grande oportunidade de preparar sistema supramolecular que podem ser usados como sistema modelo para a compreensão de processos biológicos e também para estudos mais fundamentais de sistemas confinados. A etapa inicial desse estudo consistiu em caracterizar os sistema individualmente, ou seja a fase lamelar e a solução da biomolécula que se pretende incorporar, que nesse estudo serão utilizados fragmentos de DNA de 150 pares de base (50nm) que com esse comprimento a persistência da cadeia nos permite encará-los como bastões rígidos, e assim pode se calcular a distância média entre os fragmentos de DNA,. Esses resultados são fundamentais para a preparação dos complexos, e para a compreensão dos arranjos que surgem em função do confinamento imposto pelas bicamadas aos bastões de DNA. Ambos os sistemas são considerados cristais líquidos liotrópicos, pois as transições de fase ocorrem por variação da concentração (de lipídio ou DNA), e apresentam propriedades anisotrópicas.

Os resultados apresentados a seguir consistem na determinação dos parâmetros microscópicos que caracterizam os arranjos microscópicos, ou seja, a partir da identificação do tipo de simetria, é possível propor um modelo geométrico da célula unitária. Os modelos para cada estrutura são esquematizados na figura 1.

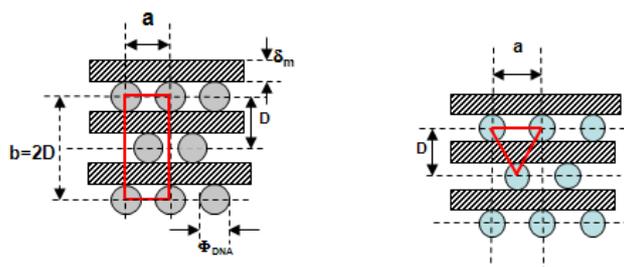


Fig. 1: Representações esquemáticas do modelo geométrico de cada célula unitária (da esquerda para a direita: retangular centrada e hexagonal). D é a distância de repetição lamelar, a é a distância entre bastões de DNA dentro de uma mesma camada de água, Φ_{DNA} é o diâmetro dos cilindros de DNA e δ_m é a espessura da bicamada lipídica.

A partir de considerações geométricas feitas sobre esses modelos, foram determinadas expressões para as frações volumétricas de cada componente do sistema (tabela 1).

	Retangular Centrada	Hexagonal
Φ_{DNA}	$\frac{\pi\Phi_{ADN}^2}{4Da}$	$\frac{\pi\sqrt{3}\Phi_{ADN}^2}{8D^2}$
ϕ_m	$\frac{\delta_m}{D}$	$\frac{\delta_m}{D}$
ϕ_w	$1 - (\phi_m + \phi_{ADN})$	$1 - (\phi_m + \phi_{ADN})$

Tabela. 1 : Expressões para cálculo das frações volumétricas de cada componente do sistema obtidas a partir de considerações geométricas feitas sobre os modelos exibidos na figura 1.

Métodos e Materiais

O estabelecimento de um protocolo para a preparação dos complexos constitui de grande importância para o projeto, pois inicialmente foram feitas amostras preparadas com lipídeo, fragmentos de DNA e água. As fases lamelares são preparadas com lecitina de soja, (Avanti-polar), que misturamos com simulsol (para dar maior flexibilidade a membrana) numa proporção de 70% e 30%, respectivamente. A mistura é solubilizada em ciclo-hexano e liofilizada. Esse material depois de seco, é então utilizado na preparação das amostras. Os fragmentos de DNA utilizados nesse trabalho são adquiridos da Sigma, extraído de timus de boi, e submetido a sonicação para quebra da molécula em fragmentos menores. Para as observações em microscopia de fluorescência, o DNA é marcado com uma prova fluorescente, YOYO (Molecular Probes). As amostras são preparadas através do estabelecimento das frações volumétricas pré-determinada para cada amostra e essas passam por processos de centrifugação durante aproximadamente 3 a 4 vezes por semana em média, durante 2 meses e mantidas a temperatura de 20° á 25°. Ao fim do processo notamos que algumas amostras não se apresentava homogêneas, isto é, não se solubilizavam, pois

havia ocorrido contaminação bacteriana. E a partir disso teríamos que mudar o protocolo de preparação dessas amostras, com parceria do aluno de doutorado Emerson da Silva que esta desenvolvendo parte do seu projeto em uma instituição parceira (CRPP-França) estabeleceu-se um novo protocolo de preparação. As mudanças significativas foram de armazenar as amostras em temperaturas mais baixas em torno de 0° e notou-se que o tempo para o equilíbrio entrópico das amostras diminuiu para duas semanas em média. As amostras foram preparadas a partir do cálculo das considerações geométricas apresentadas na tabela 1.

Nome	fração volumétrica		
	φ_{DNA}	φ_{LIP}	φ_{water}
E1	0,025	0,688	0,287
E2	0,230	0,532	0,239
E3	0,079	0,538	0,383
E4	0,084	0,755	0,161
E5	0,084	0,556	0,360
E6	0,124	0,843	0,033
E7	0,125	0,679	0,196
E8	0,052	0,440	0,510
E9	0,060	0,500	0,440
E10	0,144	0,728	0,128
E11	0,145	0,731	0,124

Tabela 2. Amostras preparadas com suas respectivas frações volumétricas de DNA, lipídeo e água.

A seguir o diagrama ternário das amostras preparadas está apresentado.

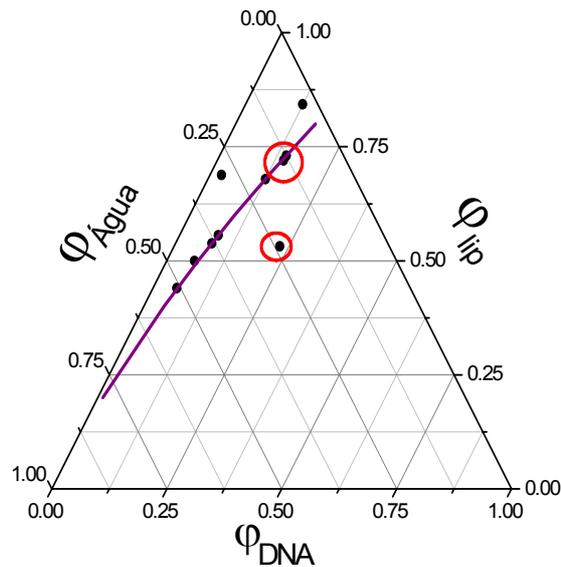


Figura 2: Diagrama ternário das amostras preparadas. Nos eixos, estão representadas as frações volumétricas de cada componente. a linha roxa representa onde se espera uma estrutura hexagonal. Os pontos que estão circulados correspondem à composição das amostras que não apresentaram equilíbrio entrópico (coexistência de fases) e por isso foram descartadas.

Resultados

a) Estrutura Retangular centrado

Quando falamos em simetria hexagonal ou retangular centrada ou hexagonal, estamos falando de uma fase bi-dimensional de DNA (no plano xy) intercalada na estrutura lamelar de membranas. Ao longo do eixo z, esses fragmentos formam uma fase colunar. De acordo com a figura 1, para uma estrutura retangular centrada, espera-se que o parâmetro “b” corresponda ao dobro da periodicidade lamelar D. A determinação desses parâmetros é feita pela indexação dos picos de de raios X, de acordo com a seguinte equação:

$$q_{l,k} = \sqrt{\frac{l^2}{a^2} + \frac{k^2}{b^2}}, \quad l + k = n^\circ \text{ par} \quad , \quad (1)$$

onde o parâmetro “a” corresponde ao espaçamento entre os bastões de DNA no interior da camada aquosa. Podemos distinguir três situações diferentes, dependendo da hidratação da bicamada, ou seja, do grau de confinamento imposto aos bastões de DNA na camada aquosa. Essas situações são ilustradas na figura 3.

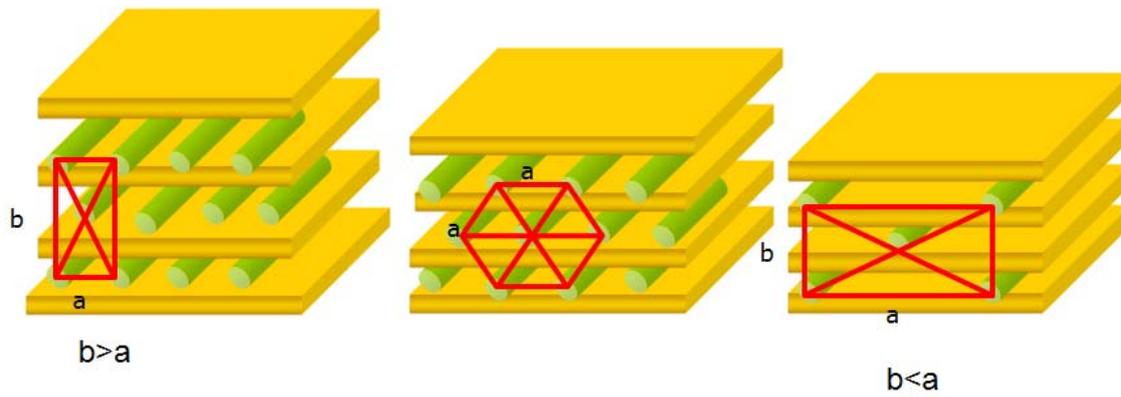


Figura 3: Da esquerda para a direita, temos um sistema retangular centrado com o parâmetro $b > a$, na segunda figura temos a célula unitária formando um hexágono de lado “a” e a terceira situação onde $a > b$.

Para cada amostra foi feito uma exposição de raio X (SAXS), com o objetivo de estabelecer a estrutura do complexo.

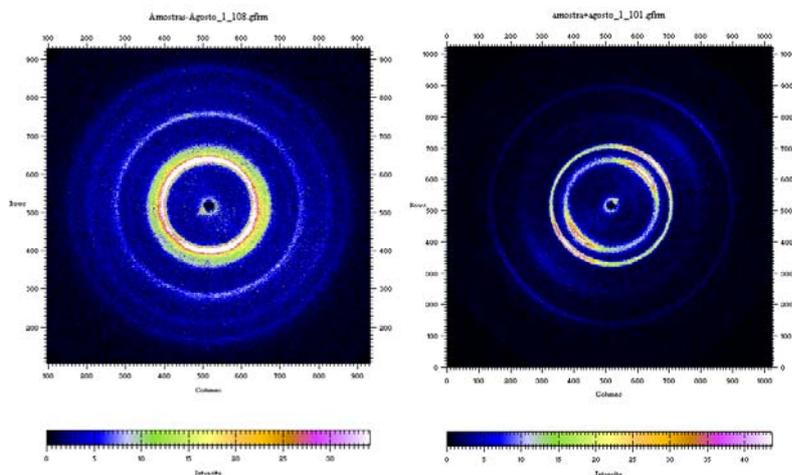


Figura 4: Difractogramas das amostras E1 e E8 onde observa-se a presença de picos de diversas ordens e um certo grau de ordenamento da fase lamelar ilustrado pelo espalhamento mais intenso em uma dada direção.

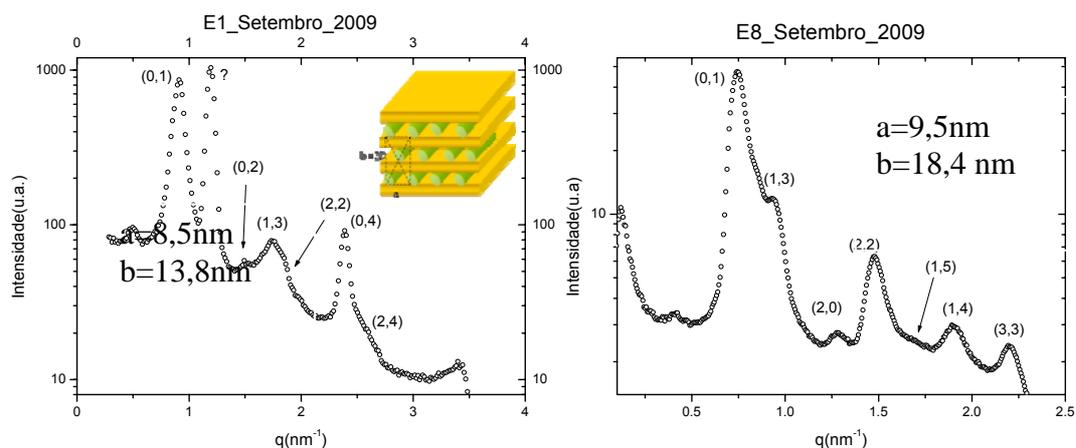


Figura 5: Exemplos de espectros e esquemas de organização das simetrias encontradas. No espectro referente à simetria retangular centrada, os números entre parênteses indicam os planos cristalográficos correspondentes aos picos.

O conjunto de picos de espalhamento observados para as amostras E1 e E8 pode ser indexado para uma estrutura retangular centrada, com $b > a$. A amostra E1 visualmente apresentava uma coexistência de duas fases, com uma fase menos densa, e menos fluorescente e outra mais densa e mais fluorescente. Tentamos retirar do tubo separadamente cada uma das fases para o estudo estrutural. Na figura 6 é apresentado o difratograma correspondente a uma das fases presentes na amostra E1.

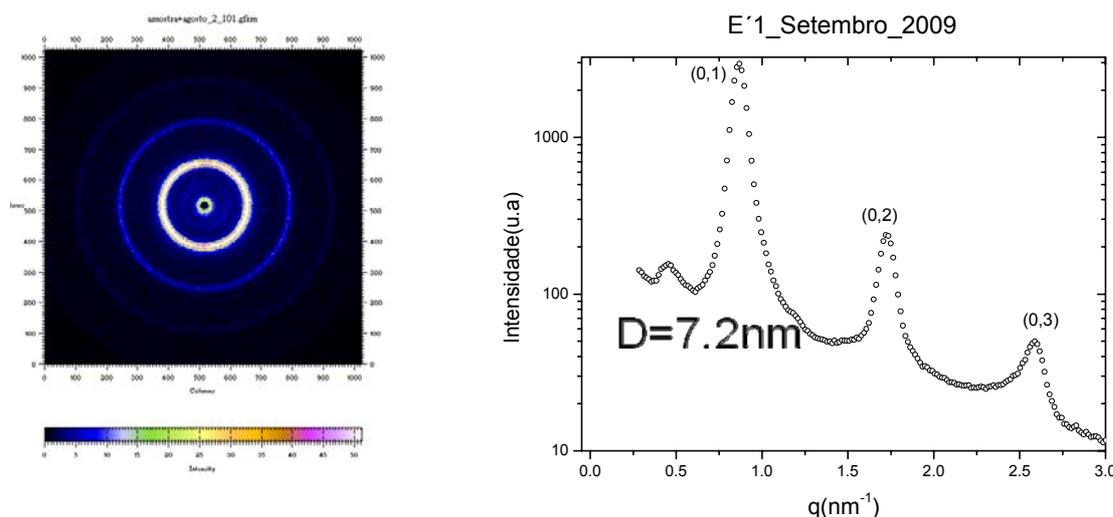


Figura 6: Espectro da amostra E'1 com seu difratograma e os picos referentes a ele, apresentando uma periodicidade lamelar de 7,2nm.

Notemos que para esta fase temos uma estrutura típica de uma fase lamelar, onde o vetor de onda tem uma razão de $q:1:2:3$, porém para termos certeza que se apresentam uma fase lamelar sem um pico particular que possa ser atribuída a presença de DNA. Foram feitas também observações em microscopia de polarização e fluorescência (figura 7) que confirmam a textura de uma fase lamelar e uma fluorescência uniforme, indicando a presença de DNA. Assim podemos supor que nessa fase, o DNA está presente, sem um tipo de organização bem definida, isto é sem ordem orientacional ou posicional.

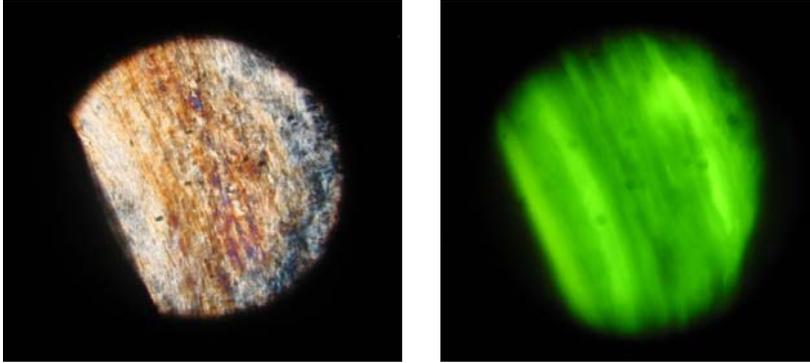


Figura 7: (a) Imagens de microscopia de luz polarizada evidenciando uma textura birrefringente característica de uma fase lamelar. (b) Mesma região observada em microscopia de fluorescência, a distribuição homogênea dos fragmentos de DNA no seio da fase hospedeira.

A partir da combinação dessas técnicas pudemos concluir que a amostra E1 apresentava uma coexistência de duas fases lamelares contendo DNA, uma com periodicidade igual a 6,9 nm, com DNA intercalado em uma estrutura retangular centrada, com correlação de posição intercamada. A segunda fase presente na mesma amostra seria uma fase lamelar, mais hidratada, com periodicidade igual a 7,2 nm com DNA porém não organizado, ou em uma fase isotrópica. E a E8 uma fase retangular centrada com os parâmetros $b > a$.

b) Hexagonal

Agora iremos estudar a estrutura hexagonal, que constitui um caso particular de uma estrutura retangular centrada. Para essa estrutura espera-se que a o parâmetro “a” que esteja relacionado com a periodicidade lamelar D ; $a = 2D/\sqrt{3}$. Assim, os picos de espalhamento devem ser indexados da seguinte forma:

$$q_{l,k} = \frac{4\pi}{\sqrt{3}a} \sqrt{l^2 + k^2 - kl} \quad (2)$$

$$l, k = \pm 1, \pm 2, \dots$$

Onde espera-se encontrar $q:1: \sqrt{3}:2: \sqrt{7}:3$, segue abaixo um exemplo de amostra que apresentou tal estrutura.

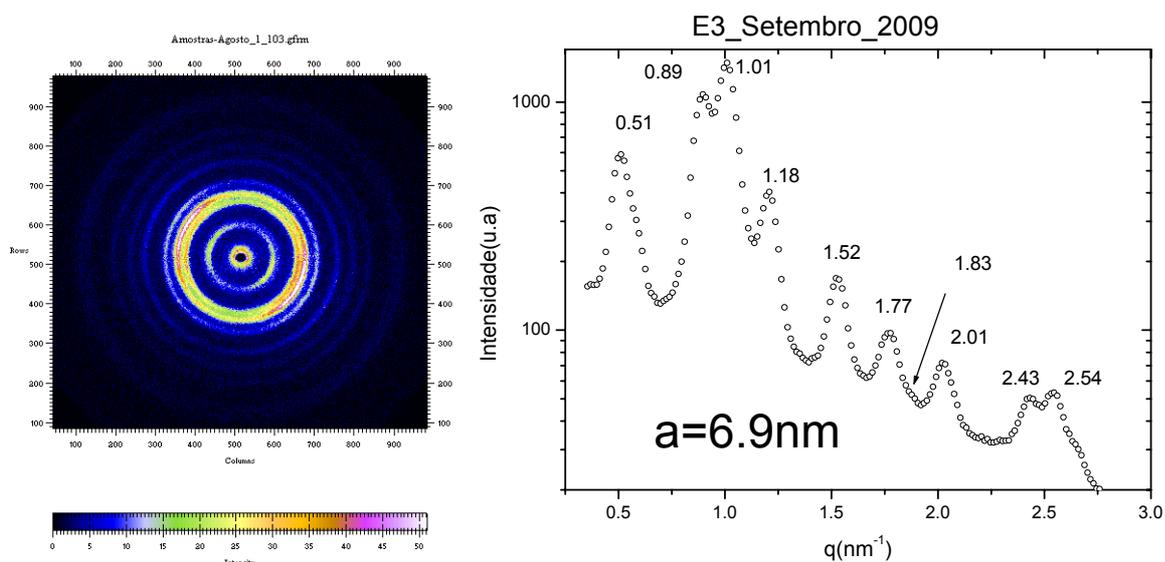
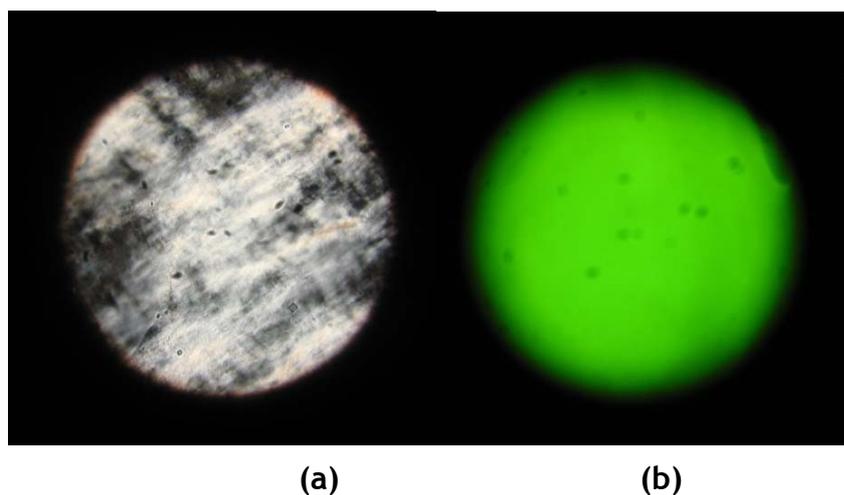


Figura 8: Exemplos de espectros e esquemas de organização das simetrias encontradas. No espectro referente à simetria retangular centrada, os números entre parênteses indicam os planos cristalográficos correspondentes aos picos na simetria hexagonal os valores indicam a posição relativa à q_0 . A amostra E3 indexada com uma estrutura hexagonal com parâmetro $a=6,9\text{nm}$.

Os resultados obtidos nos experimentos de raios X são confrontados com observações em microscopia de luz polarizada e de fluorescência (no caso do DNA marcado com prova fluorescente). Na figura 8(a), pode observar que a amostra apresenta textura característica de uma fase lamelar planar, e na figura 8(b), a homogeneidade da amostra representa que o DNA esta distribuído uniformemente na amostra. Isso confirma que de fato, temos uma estrutura lamelar, com o DNA intercalado entre as bicamadas formando uma estrutura hexagonal, com correlação de posição intercamada.



(a)

(b)

Figura 9: Imagens de microscopia de luz polarizada e de fluorescência. O padrão caótico birrefringente indica a textura de uma fase lamelar planar enquanto a uniformidade de fluorescência, a distribuição homogênea dos fragmentos de DNA no seio da fase hospedeira.

Notamos que muitas amostras ao verificarmos as frações volumétricas a partir dos parâmetros obtidos através dos espectros de raio-X mostraram-se diferentes do que aqueles que foram originalmente calculados.

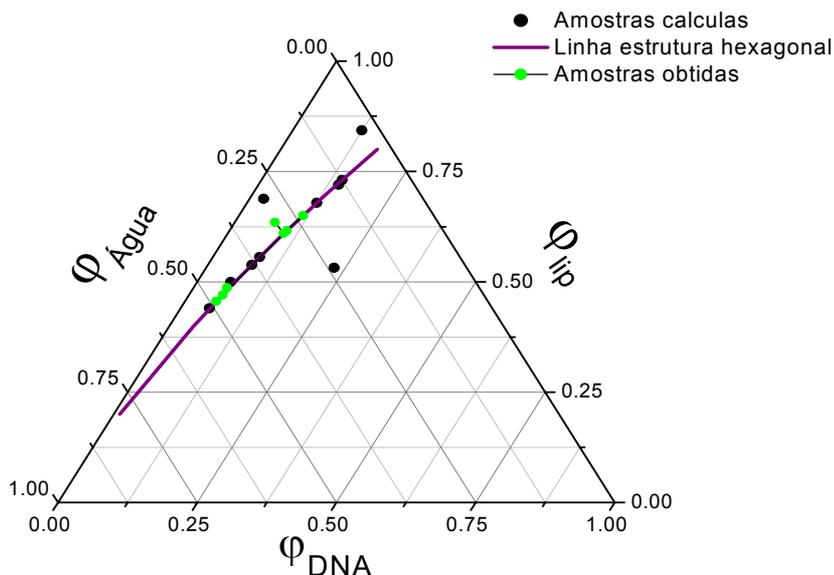


Figura 11: Diagrama ternário das amostras preparadas e obtidas. Nos eixos, estão representadas as frações volumétricas de cada componente. a linha roxa representa onde se espera uma estrutura hexagonal, os pontos pretos são as amostras com suas respectivas frações volumétricas calculadas, e os pontos verdes são de acordo com os parâmetros obtidos através dos espectros de raio-X.

Isso indica que o equilíbrio termodinâmico levou a uma estrutura diferente daquela esperada na formulação. Esse ponto será investigado no futuro e para isso será necessário a preparação de uma série de amostras explorando regiões do diagrama de fases.

Conclusões e Perspectivas

Os resultados apresentados neste relatório mostram o progresso na implementação de um protocolo de preparação das amostras ternárias e que a partir de uma formulação esperada, observamos uma evolução para uma determinada organização dos fragmentos de DNA incorporadas às fases lamelares, que pode levar a diferentes estruturas, desde um sistema com coexistência de fases até um estrutura altamente organizada, com estrutura com ordem hexagonal 2D.

A combinação das técnicas de espalhamento de raios X com técnicas de microscopia permite identificar bem a estrutura lamelar e a presença de DNA. Os experimentos de espalhamento de raios X realizados no Nanostar permitiram a identificação de pelo menos 3 tipos diferentes de organização do DNA intercalados na fase lamelar e agora podemos tentar explorar uma linha no diagrama de fases que nos permita acompanhar a transição de fase de uma organização para outra.

Está em andamento a implementação de um dispositivo de umidade controlada que nos permitirá, a partir de uma única amostra, variar o grau de hidratação e acompanhar as mudanças estruturais. Para isso aguardamos ainda um goniômetro, que permitirá a realização dos experimentos em filmes suportados, em geometria de incidência rasante.

Outro aspecto relevante das atividades desenvolvidas até o momento, é a formação de pessoal. Todas as atividades descritas nesse relatório foram desenvolvidas por duas alunas em projeto de iniciação científica, que foram treinadas para trabalhar com o equipamento e estão desenvolvendo acessórios para os experimentos de GISAXS.

Apêndice 21

Caracterização de fios de cabelos submetidos a tratamentos diversos

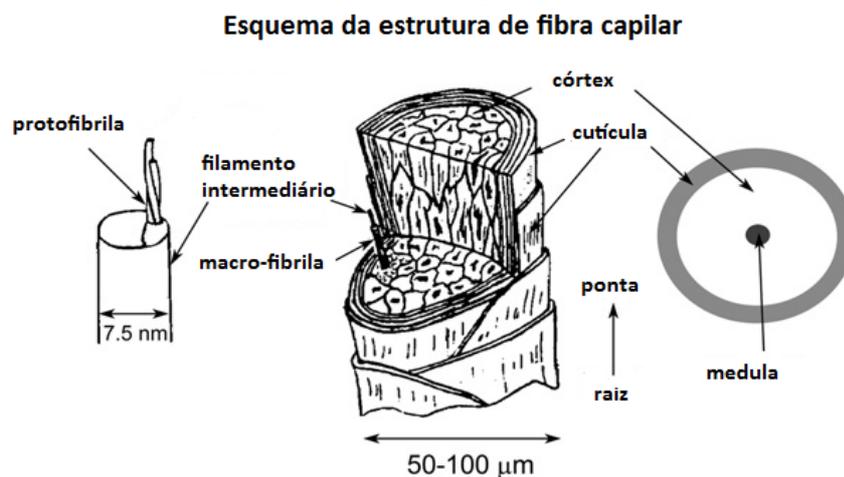
F. V. Gozzo^a e S. L. Morelhão^a

^aLaboratório de Cristalografia, Instituto de Física, Universidade de São Paulo, Brasil.

1. Introdução

O cabelo humano possui uma estrutura interna de fibras queratinizadas, sendo sua superfície coberta pelas cutículas [1].

A proposta deste estudo era verificar a estrutura do cabelo, tais como abertura de cutículas de cabelos tratados de três diferentes formas e verifica se há possibilidade de avaliar alterações na estrutura externa dos fios de acordo com cada tratamento aplicado.



Esquema da estrutura sub-lamelar da cutícula capilar

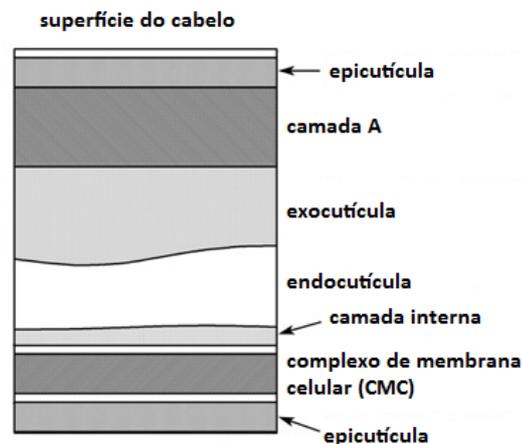


Figura 1: Estrutura capilar, esquema interno da fibra capilar e esquema estrutural da cutícula [2].

As medidas foram feitas em três mechas com diferentes tratamentos: mecha tratada com clorofórmio-etanol, mecha tratada com lauril-sulfato e mecha tratada com shampoo e condicionador.

2. Resultados e Discussão

As mechas foram colocadas no porta-amostra, utilizando uma média de 25 fios por mecha de cada tratamento.



Figura 2: Mechas posicionadas no porta-amostra.

As mechas foram colocadas no porta-amostra, utilizando uma média de 25 fios por mecha de cada tratamento, como indicado na imagem da figura 2, posicionados a 90° do feixe. Após a integração as imagens das figuras 3, 4 e 5 com os padrões de espalhamento de cada mecha foram transformadas em medidas bidimensional de intensidade por modulo de vetor de espalhamento, representadas no gráfico da figura 6.

De acordo com o gráfico da figura 6, os resultados para as mechas com diferentes tratamentos não apresentaram diferenças significativas de intensidade. O padrão de espalhamento apresentado revelou informação sobre a estrutura interna do cabelo de ordem nanométrica. Os tratamentos utilizados neste estudo influenciam de forma mais significativa a estrutura externa do cabelo, tais como deposição de elementos entre as cutículas ou até mesmo o fechamento/abertura destas estruturas, não apresentando desta forma influências significativas na estrutura interna capilar. Além disso, as diferenças apresentadas, apesar de ínfimas, podem estar relacionadas à forma como as mechas foram montadas no porta-amostra.

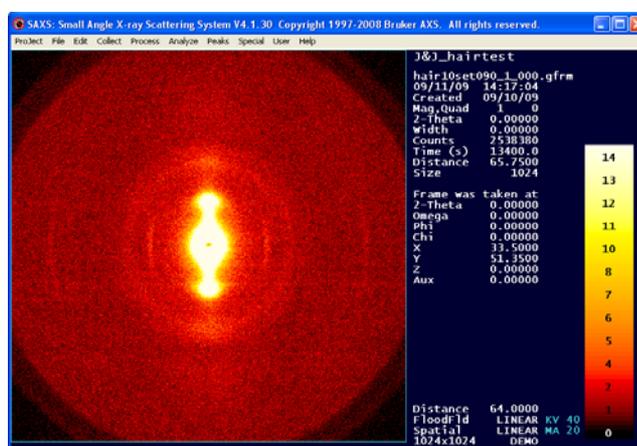


Figura 3: Padrão da mecha tratada com clorofórmio-etanol.

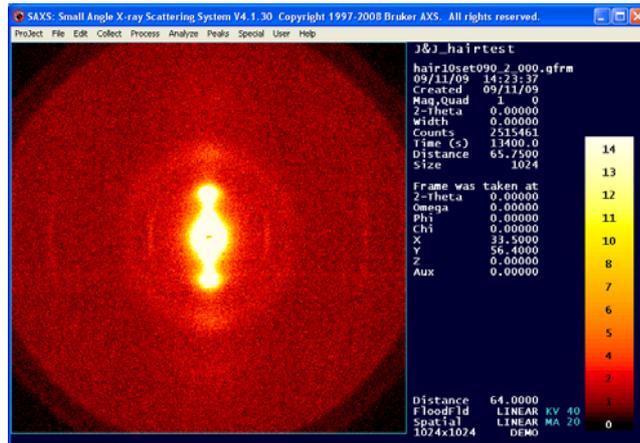


Figura 4: Padrão da mecha tratada com lauril-sulfato.

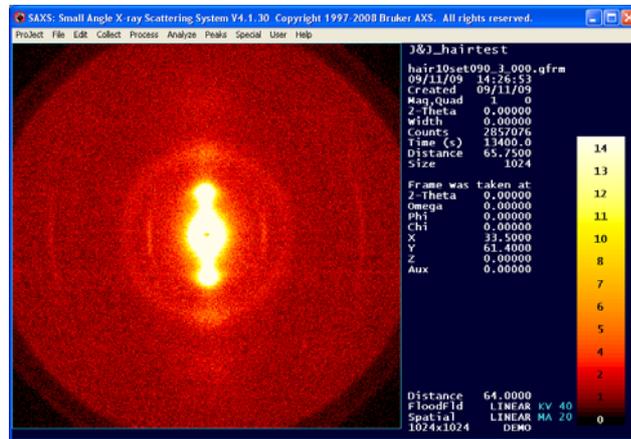


Figura 5: Padrão da mecha tratada com shampoo e condicionador.

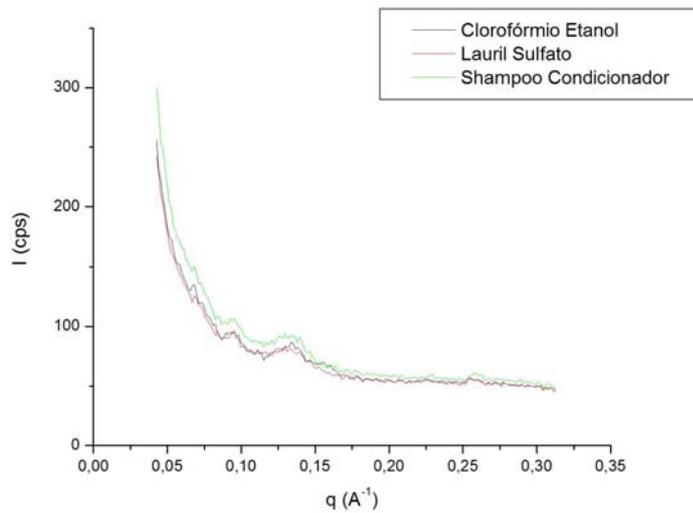


Figura 6: Gráfico de intensidade por modulo de vetor de espalhamento.

3. Conclusões

De acordo com os resultados de SAXS, não houve diferenças significativas em relação aos tratamentos.

Investigações futuras utilizando posicionamento diferentes das mechas no porta-amostra e padronização da montagem das amostras, possivelmente podem revelar padrões diferentes de espalhamento ao se comparar distintos tratamentos.

4. Referências

[1] Bhushan, B., *Progress in Materials Science*, **53**, 585-710 (2008).

[2] Kajiura, Y., Watanabe, S., Itou, T., Nakamura, K., Iida, A., Inoue, K., Yagi, N., Shinohara, Y., Amemiya, Y., *Journal of Structural Biology*, **155**, 438-444, (2006).

Apêndice 22

Estudo das propriedades estruturais, mecânicas, ópticas e magnéticas de elastômeros de uretano/uréia.

C. Sena^a e A.M. Figueiredo Neto^a.

^aDepartamento de Física Experimental, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

1. Introdução

Este trabalho visa o estudo de elastômeros de uretano/uréia (PU/PBDO) [1], preparados por reação dos grupos isocianetos tri-funcionais pré-polímeros poliuretano (PU), baseado em óxido de polipropileno, com massa molecular de aproximadamente 6000 g/mol, e o polímero hidroxilado polibutadienodiol (PBDO), com massa molecular de aproximadamente 2800 g/mol (Figura 1), puros e dopados com grãos magnéticos. Além disso, aplicamos um campo magnético homogêneo em algumas amostras dopadas com o intuito de orientar as partículas magnéticas na direção paralela ou perpendicular à direção de cisalhamento do filme de elastômero. O papel dos grãos magnéticos na matriz elastomérica e seus efeitos nas propriedades físicas desse material são investigados através da técnica de ressonância magnética nuclear, ensaios de tensão x deformação, e utilizamos a técnica de difração de raios X para fazer as análises estruturais.

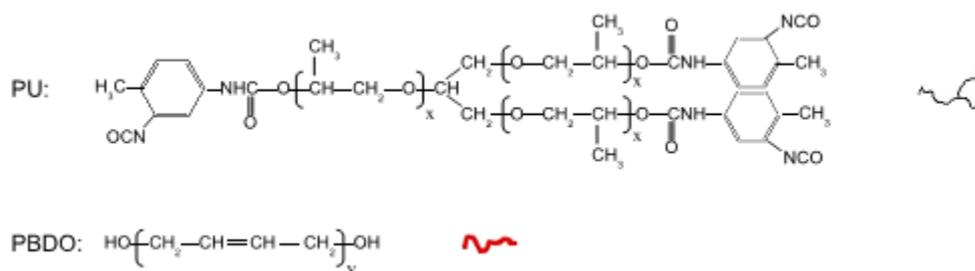


Figura 1: Estrutura química do poliuretano (PU), $x=34$, e polibutadienodiol (PBDO), $y=50$.

Elastômeros dopados com ferrofluidos são chamados de ferrogéis [2]. Os ferrofluidos [3] são suspensões coloidais de grãos magnéticos da ordem de 100 Å dispersos em um fluido de transporte (água, óleo, solventes orgânicos)[4]. Na ausência de campos magnéticos externos esses fluidos são opticamente isotrópicos, e possuem elevada susceptibilidade magnética. Porém, podemos induzir uma birrefringência óptica nesses materiais através da aplicação de campos magnéticos externos e campos de superfície. Existem dois tipos de ferrofluidos, os surfactados (SFF) e os iônicos (IFF). Neste trabalho usamos os SFF que são obtidos com grãos de magnetita (Fe_3O_4) ou maghemita ($\gamma - \text{Fe}_2\text{O}_3$), envolvidos por uma camada de surfactante (como o ácido oleico, aerosol AOT) que impedem a agregação desses grãos.

No processo de síntese [1], os pré-polímeros com concentração relativa de PU e PBDO igual a 60/40 são codissolvidos com tolueno (ou solução de ferrofluido diluído em tolueno) em um balão, com agitação e adaptado para passar um fluxo de nitrogênio. Depois da solução estar homogênea é adicionado o dibutil dilaurato de estanho (DBTDL) usado como catalizador que, sob atmosfera de nitrogênio, reage durante aproximadamente 30 minutos. A

mistura é então espalhada sobre um substrato de vidro tratado com silano, com a ajuda de uma régua calibrada (*Gardner casting knife*) que se desloca com velocidade constante (5 mm/s). O cisalhamento provocado pela régua induz uma ordem orientacional no processo de ligações cruzadas. Assim, fica definida uma anisotropia mecânica preferencial. Desta forma, as propriedades mecânicas do elastômero dependem da direção em que é feito o filme, isto é, da direção do cisalhamento. O filme (no substrato) é colocado em uma estufa à temperatura de 70 °C durante 3 horas. Depois é retirado e deixado a curar à temperatura ambiente durante aproximadamente 3 dias. Os filmes possuem espessuras entre 100 e 450 μm . Esse elastômero é um polímero de uretano/uréia e recebe esse nome devido aos grupos uretano, originados da reação entre o isocianato do PU e o hidroxil do PBDO, e grupos uréia, originados da reação entre os isocianatos do PU.

No presente trabalho mostramos apenas os resultados obtidos através da difração de raios X de elastômeros puros e dopados com duas concentrações diferentes de partículas magnéticas ($c_{FF} = 0,013$ e $0,08$ %Vol) aleatoriamente dispersas na matriz elastomérica. Além disso, aplicamos uma deformação mecânica uniaxial ($\Delta L/L_0 = 0,22$ ou $0,25$) na mesma direção do cisalhamento dos filmes com o objetivo de observar alguma alteração estrutural na matriz elastomérica com e sem partículas magnéticas.

2. Resultados e Discussão

Os padrões de difração mostraram que a amostra pura (Figura 2 (a)) apresenta apenas uma banda (banda 1) isotropicamente disposta em torno do eixo z. A Figura 3 (a) mostra o gráfico da intensidade difratada em função de $2\theta_x$ para esta amostra no estado relaxado. A distância característica (d_{1i} com $i = x, y$), calculada de acordo com a lei de Bragg [5], associada a esta banda é de $\sim 0,452 \pm 0,001$ nm, independente da direção de estiramento e cisalhamento do filme (eixo y). A largura na meia altura da intensidade (Δ_{1i} - em graus) da banda 1 é de $\sim 1,121 \pm 0,068$ nm em ambas as direções x e y. Este valor de Δ_{1i} , de acordo com a fórmula de Scherrer [5], corresponde ao comprimento de correlação (D_{1i} com $i = x, y$) igual a aproximadamente $1,121 \pm 0,068$ nm, também independente da direção de estiramento e cisalhamento do filme.

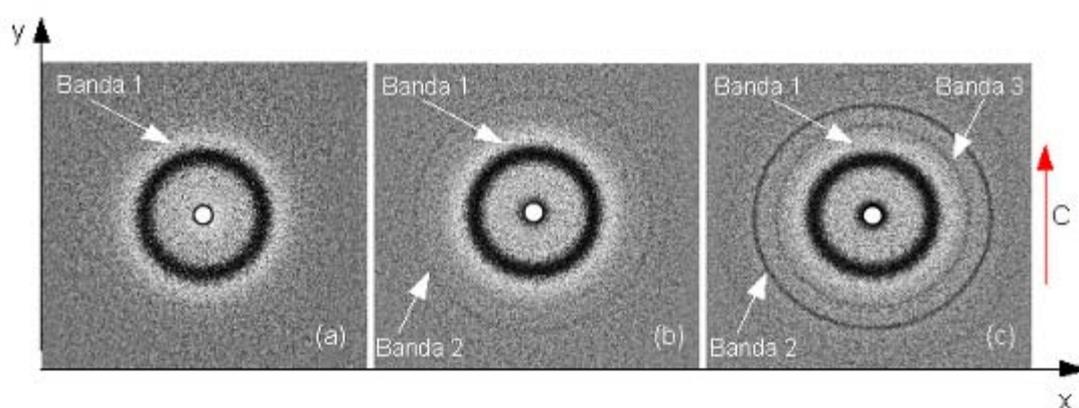


Figura 2: Difratomogramas das bandas de difração das amostras de elastômeros no estado relaxado. Amostra pura (a), amostras dopadas com $c_{FF} = 0,013$ % vol (b) e $0,08$ %vol (c). A seta vermelha indica a direção do cisalhamento (C) aplicado aos filmes no momento de sua confecção.

A amostra dopada com $c_{FF} = 0,013$ %vol (Figura 1 (b)) além de apresentar a banda 1, referente aos segmentos poliméricos de PU e PBDO, apresenta uma segunda banda (banda 2) também isotropicamente disposta em volta do eixo z. A Figura 3 (b) mostra o gráfico da intensidade difratada em função de $2\theta_x$ para esta amostra no estado relaxado. O parâmetro de rede (a) calculado com $d_{hkl} = d_{311} = d_2 = 0,253 \pm 0,001$ nm (hkl são os índices de Miller) é da ordem de $a \sim 0,839$ nm, relacionado ao plano [311] do arranjo espinélio da magnetita [6], com comprimento de correlação da ordem de $D_2 \sim 13,894 \pm 1,123$ nm também independentes da direção do estiramento e cisalhamento do filme elastomérico. A banda 1 não sofreu nenhuma alteração significativa em relação a amostra pura.

A amostra dopada com $c_{FF} = 0,08$ %vol (Figura 1 (b)) além de apresentar a banda 1 e 2 apresenta uma terceira banda (banda 3), intermediária entre a banda 1 e 2, também isotropicamente disposta em volta do eixo z. A Figura 3 (c) mostra o gráfico da intensidade difratada em função de $2\theta_x$ para esta amostra no estado relaxado. O parâmetro de rede calculado com $d_{220} = d_3 = 0,296 \pm 0,001$ nm é da ordem de $a \sim 0,837$ nm, relacionado ao plano [220] do arranjo espinélio da magnetita, com comprimento de correlação da ordem de $D_3 \sim 9,356 \pm 0,545$ nm também independentes da direção do estiramento e cisalhamento do filme elastomérico.

Vale informar que o plano [111] do arranjo espinélio da magnetita, para $d_{111} = 0,484$ nm [6], está sobreposta a banda 1 referente aos segmentos poliméricos de PU e PBDO. As bandas 1, 2 e 3 também foram observadas no difratograma de difração de raios X da amostra líquida composta de ferrofluido diluído em tolueno com $c_{FF} = 0,08$ %vol.

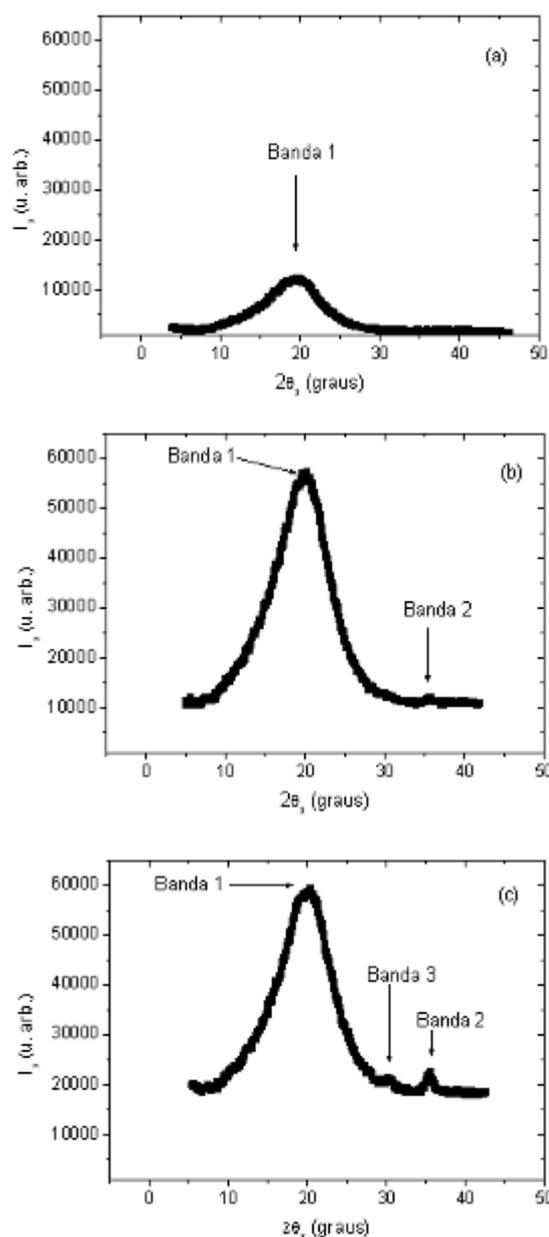


Figura 3: Gráficos da intensidade difratadas ao longo do eixo x em função de 2θ para as amostras pura (a) e dopadas com $c_{FF} = 0,013$ % vol (b) e 0,08 %vol © no estado relaxado.

3. Conclusões

Esperávamos observar alguma alteração estrutural na matriz elastomérica devido ao cisalhamento imposto aos filmes no momento de sua fabricação, com a dopagem com as partículas magnéticas e com a aplicação de uma deformação mecânica uniaxial. Pois, esses filmes apresentam birrefringência óptica com comportamento linear em função do estiramento e do aumento da concentração de partículas magnéticas [7, 8]. Porém, não foi observado nenhuma mudança estrutural indicando que as possíveis reorganizações das cadeias poliméricas de PU e PBDO só podem ser observadas em escala macroscópica devido as cadeias poliméricas serem muito longas.

4. Referências

- [1] Zhao, C.T., Pinho, M.N., *Polymer*, **40**, 6089 (1999).
- [2] Zrínyi, M., Barsi, L., Szabó, D., *J. Chem. Phys.*, **106**, 5685 (1997).
- [3] Rosensweig, R.E., *Ferrohydrodynamics*, Cambridge University Press, Cambridge, 7 (1985).
- [4] Bacri, J.C., Perzynski R., Salin, D., Cabuil V., Massart R., *J. Magn. Magn. Mater.*, **85**, 27 (1990).
- [5] Cullity, B.D., *Elements of X-Ray Diffraction*, second ed., Addison-Wesley Publ. Co. Inc. USA, 98(1978).
- [6] Ma, M., Zhang, Y., Yu, W., Shen, H., Zhang, H. Gu, N., *Colloids and Surfaces A*, **212**, 219 (2003)
- [7] Figueiredo Neto, A.M., Godinho, M.H., Toth-katona, T., Palffy-Muhoray, P., *Braz. J. Phys.*, **35**, 184(2005).
- [8] Sena, C., Godinho, M.H., Figueirinhas, J.L., Palffy-Muhoray, P., Figueiredo Neto, A.M., *J. Magn. Magn. Mater.*, **85**, 27 (1990).

Apêndice 23

Estudo das propriedades estruturais de filmes de elastômeros derivados de celulose (HDI/APC).

C. Sena^a e A.M. Figueiredo Neto^a.

^a*Departamento de Física Experimental, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.*

1. Introdução

Filmes derivados de celulose preparados com soluções precursoras anisotrópicas de (*acetoxypopyl*) celulose (APC) termotrópica ou liotrópica, em um solvente isotrópico adequado, podem exibir propriedades mecânicas anisotrópicas que refletem o estado de orientação molecular resultante do fluxo da solução precursora sob a tensão de cisalhamento aplicada durante a preparação do filme. A natureza das soluções precursoras influencia fortemente as propriedades mecânicas de filmes cuja base é APC preparados com a técnica de tensão de cisalhamento. Soluções líquido cristalinas dão origem as propriedades mecânicas anisotrópicas. Os filmes são frágeis quando esticados paralelamente à direção de cisalhamento e dúcteis quando esticados perpendicularmente a ele [1, 2].

Pretendemos estudar filmes de 75% de APC com diferentes proporções de 1.6-*hexamethylenediisocyanate* (HDI). Sob atmosfera de nitrogênio, o HDI é utilizado para efetuar as ligações cruzadas nos filmes de APC. O processo de síntese desses filmes é feita de acordo com as referências [1, 2]. Inicialmente mostraremos alguns resultados com filmes de 0,5% HDI / 75% APC. Nos quais observaremos a orientação do diretor devido ao estiramento na mesma direção ou perpendicular ao cisalhamento. Com isto, pretendemos deformar o filme até a região de patamar (máxima orientação do diretor nemático) e em seguida analisar a evolução dos padrões de difração em função do tempo à medida que o filme recupera suas dimensões iniciais. Por fim, verificar se a estrutura inicial é recuperada. No presente trabalho mostraremos apenas os resultados dos estiramentos até a região de máxima orientação do diretor.

As amostras estudadas foram expostas aos raios X por 3h, usando a geometria de Laue por transmissão. A deformação (estiramento) aplicada aos filmes é calculada através da relação $\Delta L/L_0$, onde $\Delta L = L - L_0$, L é o comprimento da região útil do material no instante a ser medida a deformação, e L_0 é o comprimento inicial da região útil.

2. Resultados e Discussão

A Figura 1 mostra os padrões de difração do filme de 0,5% HDI/70% APC para diferentes estiramentos na direção paralela ou perpendicular a direção média do diretor nemático. A banda interna relacionada ao empacotamento da cadeia lateral da APC nos fornece uma distância de repetição de $1,13 \pm 0,01$ nm, calculada de acordo com a lei de Bragg [3], similar a outros filmes derivados de celulose anisotrópica [1,4]. A banda externa nos fornece uma distância de repetição de $0,46 \pm 0,01$ nm relacionada a matriz elastomérica. Ambas distâncias de repetição são independentes dos estiramentos aplicados ao filme elastomérico. Os padrões de difração observados mostram o contínuo crescimento da ordem do diretor nemático quando aplicamos um campo mecânico uniaxial (estiramento) ao longo da direção média do diretor (Figura 1a). Evidentemente, já esperávamos que ao esticar o sistema da cadeia nemática principal seria realmente suprimir as bandas originadas pelo cisalhamento e reforçar a ordem. Na sequência de padrões de difração para estiramentos perpendiculares à direção média do diretor nemático, vemos que a banda interna vai

perdendo intensidade e ordem com o aumento do estiramento e esperamos observar uma forte ordem do diretor, com sua direção média rotacionada de 90° , se aplicarmos um estiramento superior a $\Delta L/L_0 = 4$ (Figura 1b). Este resultado é semelhante ao observado nas referências [1, 5] e teoricamente descrito na referência [6]. As correspondentes intensidades difratadas da banda interna em função do ângulo azimutal para direção de estiramento paralela ou perpendicular ao diretor são mostradas na Figura 2a e 2b. O comportamento do parâmetro de ordem orientacional foi estimado através da relação $PO = (\pi - \Delta\varphi)/\pi$, onde $\Delta\varphi$ é a largura na meia altura da máxima intensidade da difração em função do ângulo azimutal φ . No estado inicial, relaxado, o filme de APC apresenta um parâmetro de ordem de $\sim 0,6$. Para sucessivos estiramentos paralelos ao eixo do diretor, a magnitude do parâmetro de ordem pode aumentar até $\sim 0,82$ (Figura 3a). Para sucessivos estiramentos perpendiculares ao eixo do diretor, observamos um contínuo decréscimo do parâmetro de ordem (Figura 3b). A máxima deformação aplicada até o momento foi de $\Delta L/L_0 = 4$ para a qual obtemos um parâmetro de ordem de $\sim 0,44$. O parâmetro de ordem da banda externa nas direções paralela ou perpendicular é de $\sim 0,55$, independente do estiramento.

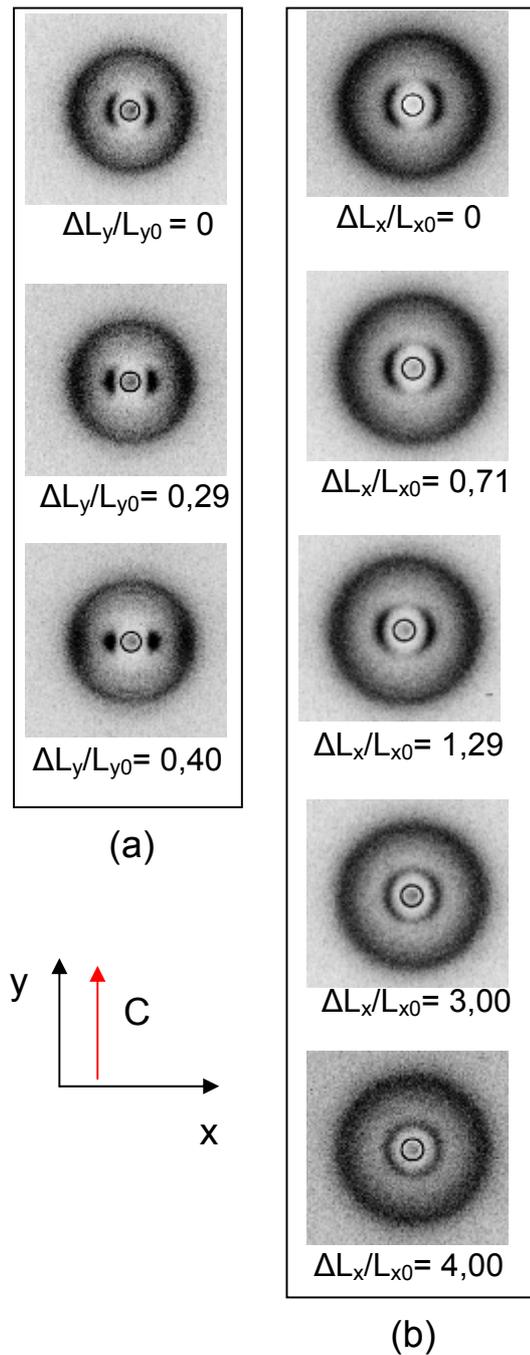


Figura 1: Difratoigramas das bandas de difração obtidos para diferentes valores de deformação: (a) direção de estiramento paralelo ao eixo do diretor nemático; (b) direção de estiramento perpendicular ao eixo do diretor nemático. A seta vermelha indica a direção de cisalhamento aplicado ao filme no momento de sua preparação.

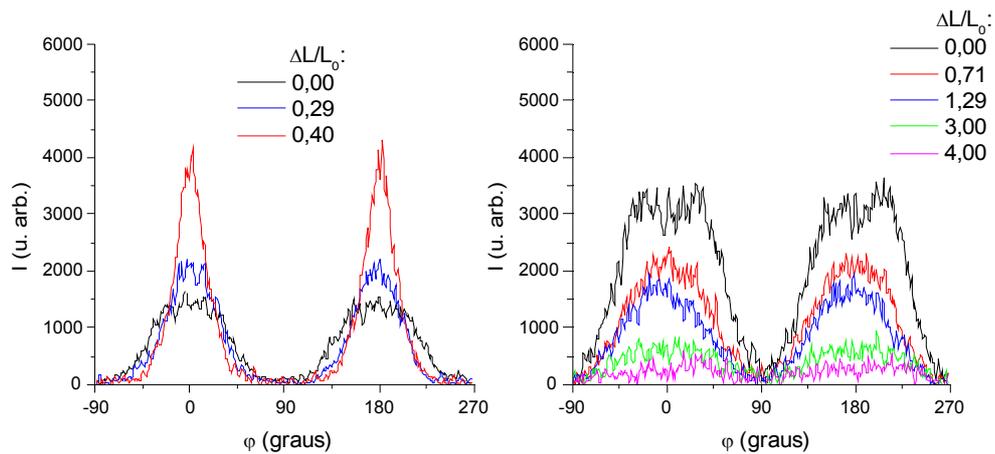


Figura 2: Gráficos das intensidades difratadas da banda interna em função do ângulo azimutal para diferentes valores de deformação. (a) direção de estiramento paralelo ao eixo do diretor nemático; (b) direção de estiramento perpendicular ao eixo do diretor nemático.

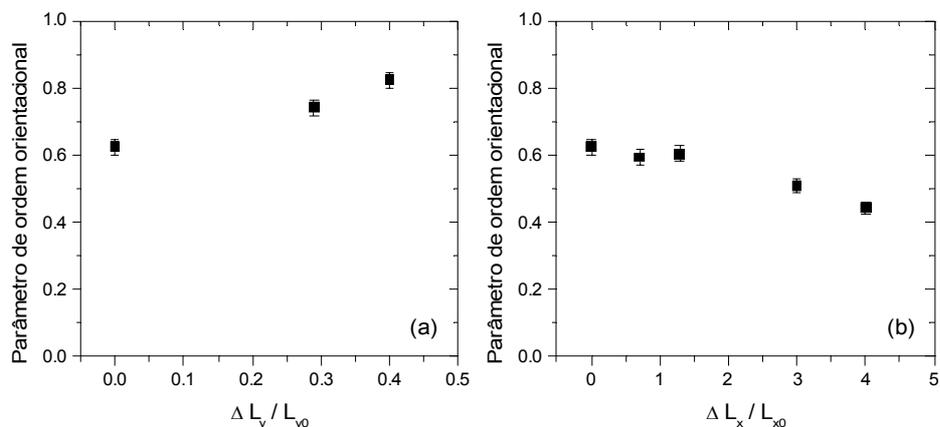


Figura 3: Gráfico do parâmetro de ordem orientacional da banda interna em função da deformação. (a) direção de estiramento paralelo ao eixo do diretor nemático; (b) direção de estiramento perpendicular ao eixo do diretor nemático.

3. Conclusões

Todos os resultados apresentados estão em acordo com o que esperávamos. Porém, a deformação perpendicular ao cisalhamento do filme de celulose ainda não foi suficiente para observarmos a inversão da direção média do diretor nemático. Assim, temos como perspectivas fazer mais um estiramento para observar esta inversão do diretor. Em seguida, relaxar o filme para analisarmos a evolução dos padrões de difração em função do tempo à medida que o filme recupera suas dimensões iniciais. Com isto, verificar se a estrutura elastomérica recupera seu estado inicial. Finalizada esta etapa, repetiremos este procedimento (deformação-relaxação) para as diferentes proporções de HDI/70% APC.

Também temos como perspectiva calcular o parâmetro de ordem orientacional utilizando a fórmula desenvolvida por Deutsch [7] para cristais líquidos.

4. Referências

[1] Godinho, M.H., Filip, D., Costa, I., Carvalho, A.-L., Figueirinhas, J.L., Terentjev, E.M., *Cellulose*, **16**, 199 (2009).

[2] Costa, I., Filip, D., Figueirinhas, J.L., Godinho, M.H., *Carbohydrate Polymers*, **68**, 159 (2007).

[3] Cullity, B.D., *Elements of X-Ray Diffraction*, second ed., Addison-Wesley Publ. Co. Inc. USA, 98(1978).

[4] Evmenenko, G., Yu, C.-J., Kewalramani, S., Dutta, P., *Langmuir*, **20**, 1698 (2004).

[5] Roberts, P.M., Mitchell, G.R., Davi, F.J., *J. Phys. II*, **7**, 1337 (1997).

[6] Bladon, P., Warner, M., Terentjev, E.M., *Macromolecules*, **27**, 7067 (1994).

[7] Deutsch, M., *Physical Review A*, **44**, 8264 (1991).

Apêndice 24

The influence of fluoreate and hydrogenate surfactants on bovine fibrinogen structure

Leandro R. S. Barbosa^a, Juan M. Ruso^b, Rosângela Itri^a

^a DIFUSP - Dpto de Física Aplicada, USP, São Paulo, Brasil.

^b Faculty of Physics University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain.

Introduction

In the present work we study the influence of hydrogenate and fluorinated surfactants on the shape of bovine fibrinogen.

Results and discussion

First of all, samples composed of 0.5 mg/ml bovine fibrinogen (BF) and 10 mM of C8HONa (Surf I), C8FONa (Surf II) and C12HONa (Surf III), as suggested by yours, were measured by small angle X-ray scattering (SAXS) (Nanostar, Bruker). However, we did not observe any detectable scattering. So, we increased the protein concentration to 3 mg/ml as well as the surfactant concentration to 60 mM, in order to keep the protein-surfactant molar ratio. All samples were done in 50 mM of Glycine buffer at pH 8.6(1). Besides, we also made a test preparing a sample of BF at 6.6 mg/ml, in the absence of surfactant, to investigate the protein concentration effect over the SAXS curve. Fig 1 shows the concentration-normalized SAXS curves of BF at three increasing concentrations: 1, 3 and 6.6 mg/ml.

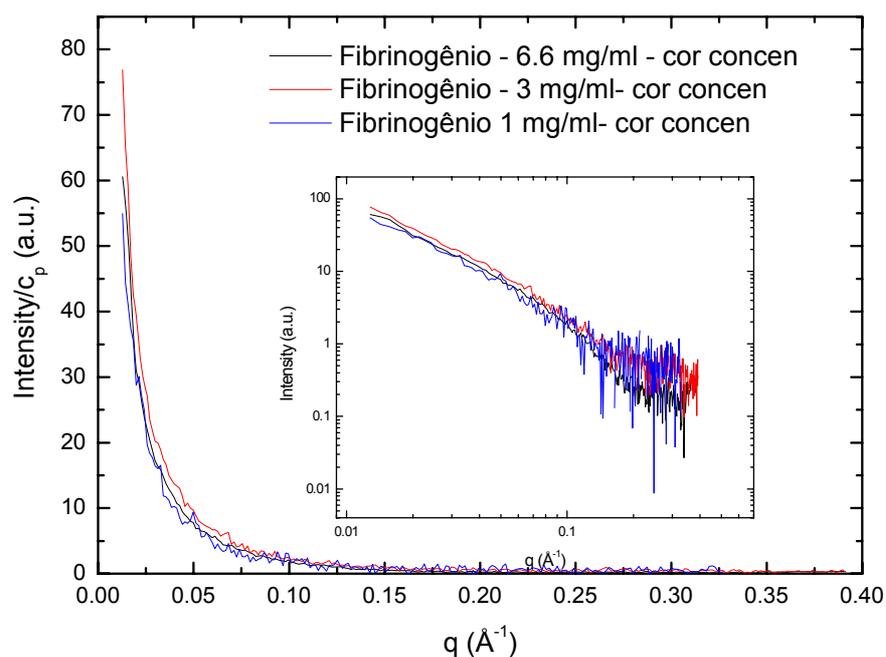


Fig. 1 - Concentration-normalized SAXS curves of Fibrinogen at three different protein concentrations: 1 (blue), 3 (red) and 6.6 (black) mg/ml. c_p is the protein concentration.

Therefore, as one can see from these SAXS curves, the scattering profiles are almost the same for the three concentrations. This fact indicates that the protein has a similar conformational state from 1 up to 6.6 mg/ml studied in this data set. So, we decided to proceed by using 3 mg/ml of BF to have a good signal-to noise ratio in the absence and presence of 60 mM of surfactant.

Figure 2 shows now the scattering measurements from C8HONa (Surf I), C8FONa (Surf II) and C12HONa (Surf III) in BF-free buffer solutions. What we see is that the hydrogenated samples did not produce any detectable scattering signal at 60 mM. On the other hand, the fluorinated surfactant (Surf II) shows a nice scattering (red line), typical of surface-charged micelle scattering. This is evidenced by a intermicellar interaction peak at $q \approx 0.075 \text{ \AA}^{-1}$, that is in good agreement with previous SANS work [1] According to your information, the *cmc* of the fluorinated surfactant is smaller than that of the corresponding hydrogenated surfactant, justifying the micelle formation for Surf II.

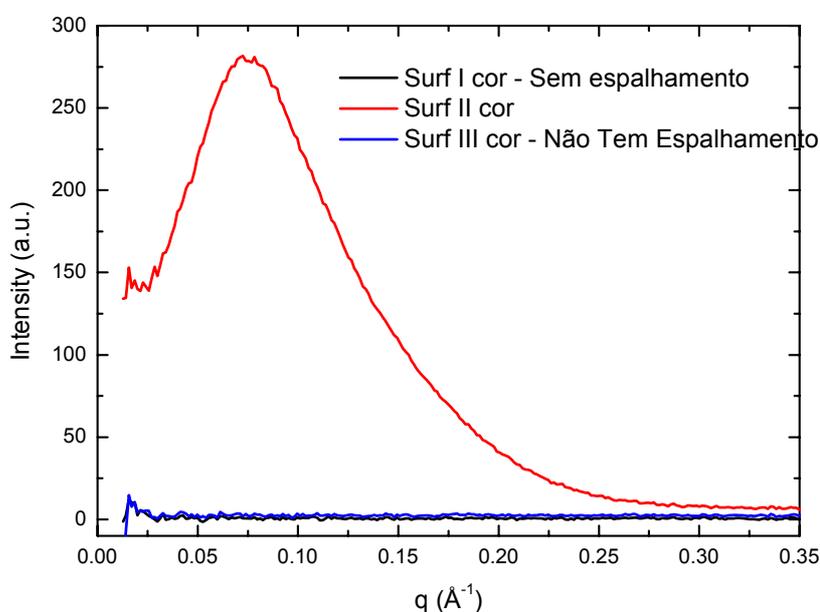


Fig 2 - SAXS curves of surfactants in buffer solution.

In order to analyse this SAXS curve, we consider that the micelle shape can be described as a prolate ellipsoid-like aggregate made up of two shells with different electron density contrast in respect to the solvent: in inner paraffinic medium with smallest dimension equal to R_{par} and an outer shell containing the polar heads and hydration water [2]. The intermicellar interference function $S(q)$ is modeled by considering the micelle as a surface-charged equivalent sphere in a Mean Spherical Approximation. Thus, the scattering intensity $I(q)$ is modeled as a product of the micelle shape and the intermicellar interference function. Figure 3 below shows the best fitting to the experimental data. The fitting parameters are: $R_{\text{par}} = 15.4 \text{ \AA}$ and the micelle anisometry (axial ratio between the largest and the smallest axis) of 1.74. The shell thickness and its electron density are equal to 2.2 \AA and 0.383 e/\AA^3 , respectively. Besides, as this surfactant is not composed of CH_2 but CF_2 , the paraffinic volume of a single surfactant was also taken as a free parameter resulting to be

323 \AA^3 , in accordance with the value of the literature, 343 \AA^3 (Berr et al). An aggregation number of 82 can be calculated from the inner paraffinic volume/medium. From the interference function, we can extract the number of charges on the micelle surface as 16 e . If we consider an aggregation number of 82, it is possible to infer that around 20 % of the surfactants that compose the micelle are ionized.

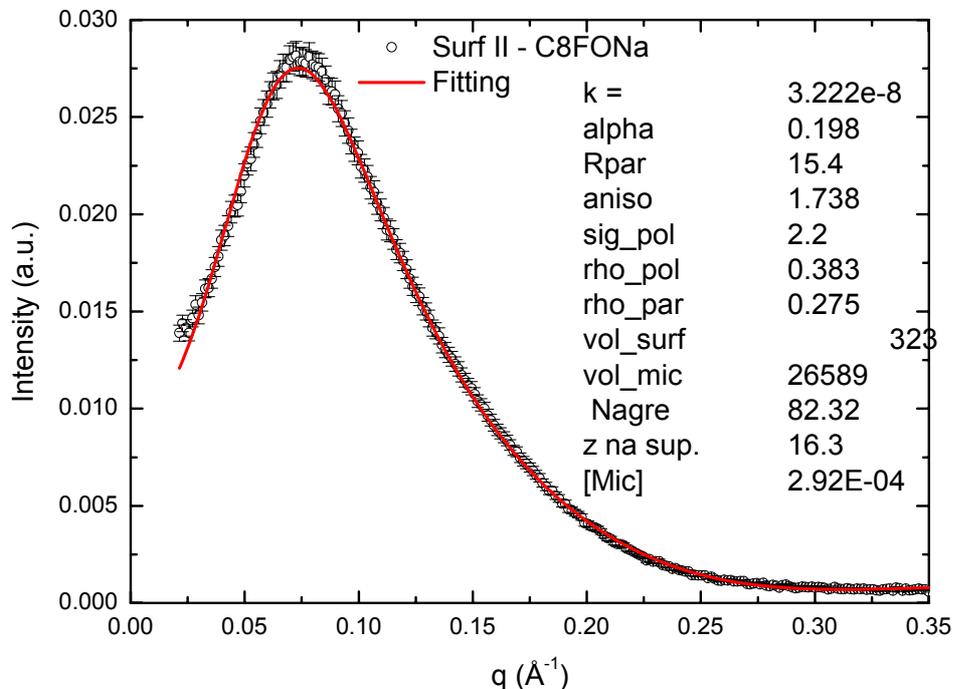


Figure 3 - SAXS curve of C8FONa 60 mM at glycine (50 mM pH 8.6) Buffer. The solid line represents the best fit obtained with the model described in the text.

Concerning the fibrinogen scattering curve analysis, we apply the protein crystallographic structure to analyze the corresponding SAXS curve. Figure 4 shows the SAXS data of Fibrinogen 3 mg/ml along with the theoretical SAXS curves generated from the dimer (inset of Fig. 4) and the monomer. As we can see, the SAXS profile simulated with the dimer crystallographic structure represents quite well the SAXS data.

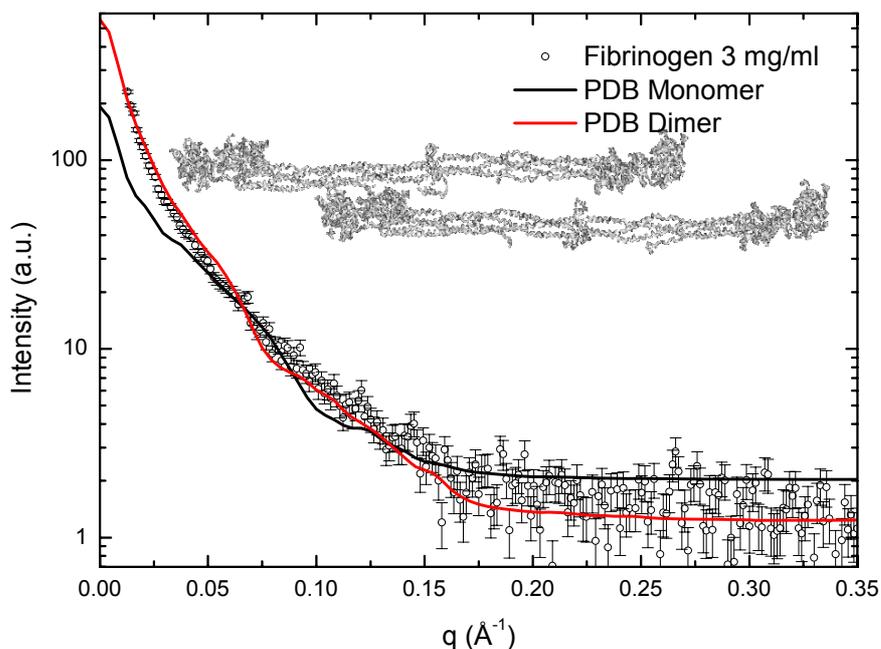


Figure 4 - SAXS curve of Fibrinogen 3 mg/ml along with the theoretical SAXS curves generated from the protein crystallographic structure from the monomer (black line) and the dimer (red line). The dimer crystallographic structure can be appreciated in the inset.

The influence of the surfactants on the Bovine Fibrinogen

Figures 5 and 6 present the SAXS curves of Bovine Fibrinogen (3 mg/ml of BF) in the absence and presence of 60 mM of C_8HONa (Surf I), C_8FONa (Surf II) and $C_{12}HONa$ (Surf III) in the linear and log scales, respectively, for comparison.

As we can observe in the figures 5 and 6, the presence of Surf I, C_8HONa , did not promote any change in BF SAXS profile (Figs 1 and 4), reminding that it did not present the typical scattering of micelles at 60 mM in the protein-free buffer solution. Therefore, the results give support to conclude that C_8HONa does not affect the protein conformation in solution.

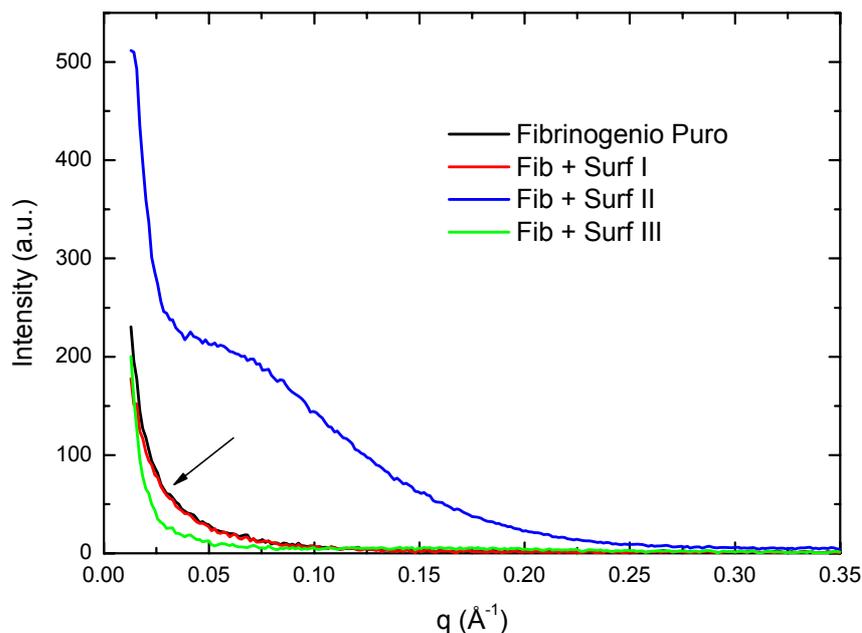


Fig. 5 - SAXS curves of Fibrinogen in the absence (black line) and in the presence of Surf I (red line), Surf II (blue line) and Surf III (green line).

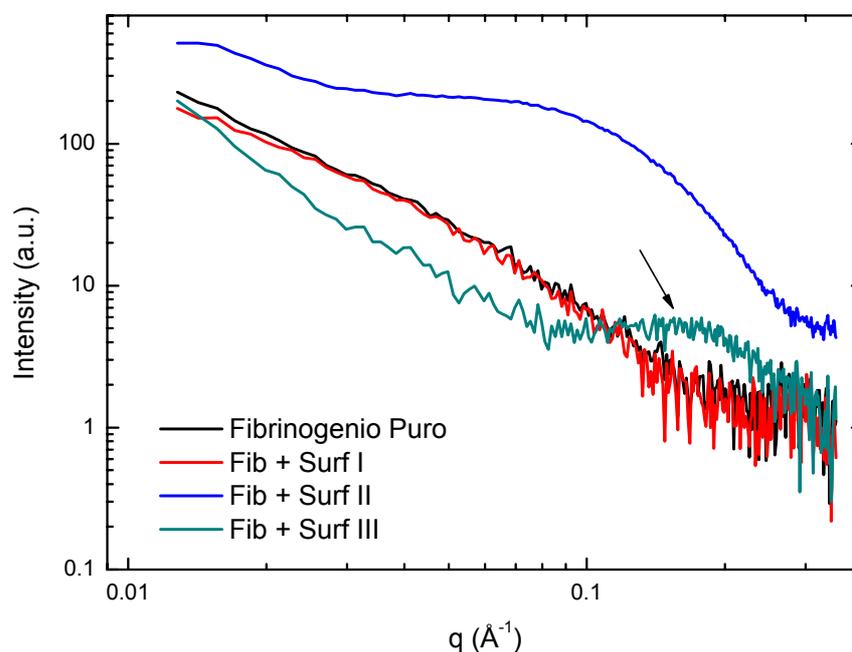


Fig. 6 - SAXS curves of BF in absence (black) and presence of 60 mM of C₈HONa (Surf I - red), C₈FONa (Surf II - blue) and C₁₂HONa (Surf III - green).

On the other hand, the presence of surf III changes the scattering profile and induces the appearance of a broad peak around $q \approx 0.17 - 0.18 \text{ \AA}^{-1}$ (black arrow on Fig 6), in contrast to the sample without protein. Such a peak is due the presence of micelles in solution (Itri et al, 1993, 2006). Interestingly, the presence of fluorinated surfactants (Surf II) in the protein

solution leads to a very different scattering profile: an increase in the intensity in the small q region as well as the appearance of a peak around 0.06 \AA^{-1} .

Focusing firstly on the influence of Surf II (C12 hydrogenated surfactants): we try to apply the necklace model (Itri et al, Journal of Colloid and Interface Science, v. 262, p. 400-408, 2003). In such model, protein sites act as nucleus for micelle formation in such a way that some micelle-like aggregates are randomly distributed around the polypeptide chain. Figure 7 shows the modeling to the experimental data.

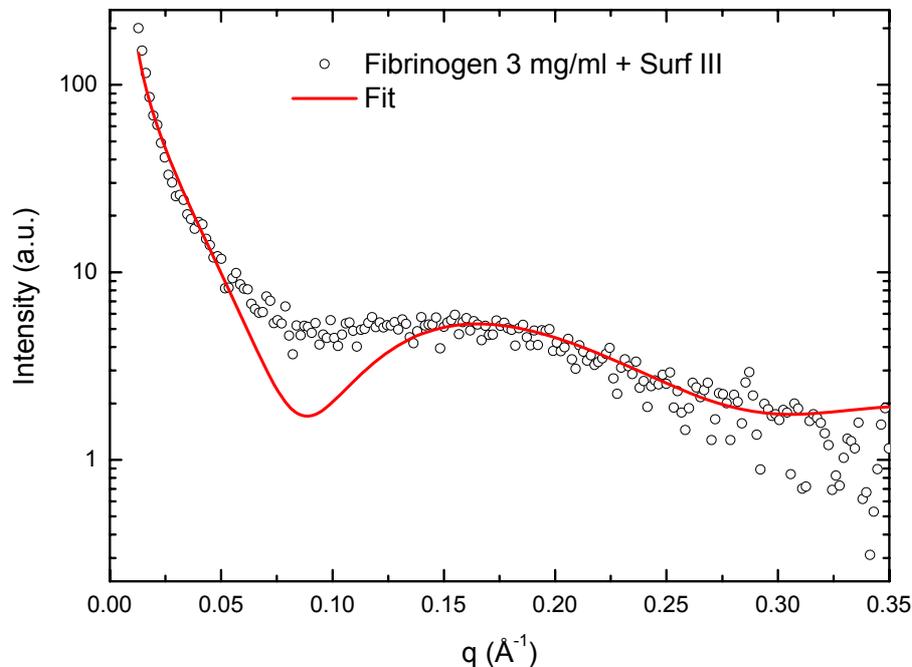


Figure 7 - SAXS curve of BF 3 mg/ml in the presence of Surf III 60 mM in the glycine buffer. The solid line represents the best fit obtained with the pearl necklace model.

The fitting parameters are: small prolate ellipsoidal-like micelles with $R_{par} = 16.2 \text{ \AA}$, anisometry = 1.8, Polar shell thickness = 5.05 \AA , $d_{frac} = 1.5$ (fractal dimension of the protein), $R_{eff} = 27.0 \text{ \AA}$ (effective micelle radius) and correlation length = 100 \AA . Based on this model, we can infer that BF and Surf III may interact and the surfactant self-assembles around the protein.

In respect to the influence of the fluorinated surfactant Surf II on the fibrinogen (Figs. 5 and 6), the scattering data can be modeled (at least, as a first feeling) as a sum of the protein and micelles scattering independently (Figure 8). Both parameters (from the fibrinogen and prolate-like micelles previously analysed, figs. 3 and 4) do not change significantly. Only the micelle charge is screened a little bit. Does it mean that the fluorinated surfactants are interacting with the fibrinogen? Second: I do not understand the intensity increasing... I am still thinking in another possibility.

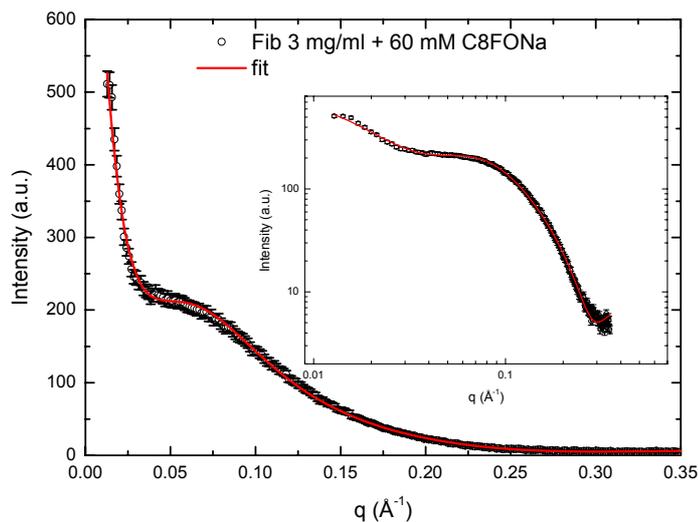


Figure 8 - SAXS curve of Fibrinogen 3 mg/ml in the presence of 60 mM of Surf II.

Conclusions

In the present work we studied the effect of hydrogenated and fluorinated surfactants on bovine fibrinogen. As we evidenced above, the presence of fluorinated induces the formation of surfactant complex

References

- [1] - Berr *et al*, J. Phys. Chem., 93, 2555-2558 (1989)
- [2] - Itri *et al*, Phys. Rev. E, v. 47, p. 2551-2557, 1993; Journal of Physical Chemistry B, v. 110, p. 13086-13093, 2006