Universidade de São Paulo

Instituto de Física

**Implementação da Técnica de Correlações
Angulares Perturbadas no Laboratório
Pelletron para Estudo de Estruturas e
Interações de Biomoléculas**

Jairo Cavalcante de Souza

Dissertação apresentada ao Instituto
de Física da Universidade de São
Paulo para a obtenção do título de
mestre em Ciências

Orientador

Prof. Dr. Nelson Carlin Filho

Banca Examinadora

Prof. Dr. José Mestnik Filho (IPEN)

Prof. Dr. Rajendra Norain Saxena (IPEN)

Prof. Dr. Nelson Carlin Filho (orientador - IFUSP)

São Paulo

2007

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Souza, Jairo Cavalcante de

Implementação da técnica de correlações angulares
perturbadas no laboratório Pelletron para estudo de estruturas e
interações de biomoléculas. São Paulo, 2007.

Dissertação(Mestrado) - Universidade de São Paulo.
Instituto de Física. Depto. de Física Nuclear.

Orientador: Prof. Dr. Nelson Carlin Filho

Área de Concentração: Física

Unitermos: 1. Física Moderna; 2. Física Nuclear;
3. Espectroscopia Atômica.

USP/IF/SBI-008/2007

Sumário

Agradecimentos	i
Resumo	iii
Abstract	v
1 Introdução	1
2 Técnica PAC	5
2.1 Correlações Angulares	5
2.2 Correlações Angulares Perturbadas	6
2.2.1 Interações Hiperfinas Magnéticas	7
2.2.2 Interações de Quadrupolo Elétrico Estáticas	8
2.2.3 Interações Quadrupolares Dependentes do Tempo	12
2.2.4 Função Perturbação Experimental	13
3 Configurações de Espectrômetros PAC	15
3.1 Configuração <i>lento-rápido</i>	15
3.2 Configuração <i>rápido-lento</i>	17
3.3 Configuração <i>rápido-rápido</i>	18
3.4 Espectrômetro PAC Digital	19
4 Espectrômetro PAC do Lab. Pelletron	21
4.1 Descrição Geral	21
4.2 Unidades Eletrônicas	29

5	Caracterização do Novo Espectrômetro	35
5.1	Calibração Temporal	35
5.2	Medidas com ^{111}In e Func. Perturb. Experimental	37
5.3	Medidas com ^{181}Hf	43
5.4	Resolução Temporal do Sistema	46
5.5	Resolução em Energia	48
5.6	Vantagens e Limitações	50
6	Medidas no IPEN	51
6.1	Medidas com Amostras de Vesículas Lipídicas	52
6.2	Amostras de SDS (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)	56
6.2.1	Soluções com Metanol	56
6.2.2	Soluções Aquosas	62
6.3	Medidas com a Proteína Calmodulina	66
7	Conclusões	77
	Referências Bibliográficas	79

Lista de Figuras

2.1	Decaimentos do ^{111}In e ^{111m}Cd . A ampliação mostra os três possíveis níveis de energia do estado intermediário de spin $5/2$ devido à influência de gradientes de campos elétricos extranucleares. . . .	9
2.2	Gráfico das transformadas de Fourier de funções $G_{22}(t)$ em função do parâmetro de assimetria (η) e das frequências dos níveis do estado intermediário ($5/2$) do decaimento de um núcleo de prova. Neste exemplo as frequências ($\omega_1 = 600$ Mrad/s, $\omega_2 = 1200$ Mrad/s e $\omega_3 = 1800$ Mrad/s para $\eta = 0$) e suas amplitudes variam como função do parâmetro de assimetria do gradiente de campo elétrico [10].	11
2.3	Efeito de interações dependentes do tempo em funções perturbadas [2].	13
3.1	Esquema de um circuito utilizado para realizar coincidências entre dois detectores com um espectrômetro PAC na configuração <i>lento-rápido</i> . No esquema apresentado, PRE representa um pré-amplificador; SAMP corresponde a um amplificador de sinal lento; FAMP é um amplificador de sinal rápido; TSCA é um analisador monocanal com marca de tempo; CFD é um discriminador de fração constante; LA é uma unidade de atraso; AND é uma unidade de coincidência; TAC é um conversor de tempo em amplitude e MCA é um analisador multicanal.	16

3.2	Esquema de um circuito eletrônico para um espectrômetro na configuração <i>rápido-lento</i> . No esquema apresentado, PRE representa um pré-amplificador; SAMP corresponde a um amplificador de sinal lento; FAMP é um amplificador de sinal rápido; TSCA é um analisador monocanal com marca de tempo; CFD é um discriminador de fração constante; TAC é um conversor de tempo em amplitude e MCA é um analisador multicanal.	17
3.3	Esquema do circuito utilizado para realizar coincidências entre dois detectores na configuração <i>rápido-rápido</i> . Neste caso FAMP representa um amplificador de pulso rápido; DWCFD é um discriminador de fração constante de janela dupla; TAC é um conversor de tempo em amplitude e MCA é um analisador multicanal.	18
3.4	Esquema do circuito utilizado para realizar coincidências entre detectores com o espectrômetro PAC digital [18].	19
4.1	Estrutura construída para acomodar os 6 detectores de BaF ₂ que compõem o espectrômetro PAC no Laboratório Pelletron.	22
4.2	Esquema do circuito utilizado para realizar coincidências entre dois detectores apenas.	23
4.3	Foto do sistema eletrônico e de aquisição de dados do espectrômetro PAC do Laboratório Pelletron. Na parte é possível visualizar o <i>crate</i> CAMAC com o LT, QDC e TDC. Logo abaixo está o PSD seguido do bastidor NIM com o G&DG, LFIFO, CFD e LAMP. Em seguida está a linha de atraso seguida da fonte de tensão. . . .	25
4.4	Esquema do circuito utilizado para adquirir espectros de energia sem o uso de pré-amplificador. As unidades eletrônicas utilizadas são as mesmas apresentadas na Figura 4.2.	28
4.5	Esquema do circuito utilizado para realizar medidas com pré-amplificador. Neste caso, PRE é um pré-amplificador modelo 113 da ORTEC; AMP é um amplificador modelo 572 da ORTEC e ADC é um conversor analógico digital modelo 7164 da Phillips Scientific. As outras unidades eletrônicas são as mesmas apresentadas na Figura 4.2.	28

LISTA DE FIGURAS

4.6	À esquerda, histograma para o detector de NaI com fonte de ^{60}Co utilizando pré-amplificador - amplificador - ADC. À direita, histograma do detector de NaI com fonte de ^{60}Co utilizando amplificador - PSD - QDC.	28
4.7	Foto do pulso característico do detector 1. O fundo de escala temporal é de 100ns e o de amplitude é de 100mV.	30
4.8	Espectro de QDC para o detector 1 à esquerda e espectro de TDC para o detector 1 à direita. A escala para eventos está em forma logarítmica. Os dois gráficos apresentados foram obtidos com uma medida utilizando uma amostra de solução aquosa de ^{111}In	33
5.1	Coincidências com o quarto canal do TDC para a calibração temporal, com escala de 200ns.	36
5.2	Reta de calibração temporal correspondente ao quarto canal do TDC, com escala de 200ns, à esquerda. A reta que passa pelos pontos representa o ajuste realizado para os dados experimentais. À direita, gráfico de resíduos correspondente à reta ajustada.	36
5.3	Espectro de QDC para o detector 3, à esquerda. As linhas verticais indicam as regiões, determinadas visualmente, que correspondem aos dois raios γ do decaimento do núcleo ^{111}In . À direita é apresentado o espectro de TDC correspondente. Ambos os espectros foram obtidos com uma medida utilizando-se uma amostra de solução aquosa de $^{111}\text{InCl}_3$	39
5.4	Curva levantada a partir do resultado da subtração do TDC1 pelo TDC3.	40
5.5	Funções perturbação experimentais para o núcleo ^{111}In em solução aquosa à temperatura ambiente. À esquerda, primeira função perturbação experimental obtida com o novo espectrômetro no Laboratório Pelletron. À direita, um gráfico obtido por meio de uma medida com o espectrômetro PAC do CRPq-IPEN.	41

5.6	Esquema simplificado do decaimento do ^{181}Hf , no qual são mostradas as energias dos raios gama da cascata e o tempo de meia vida do estado intermediário. Para este núcleo $\mu(5/2^+)=+3.24(5)\mu_N$; $Q(5/2^+)=+2.36(5)\text{b}$; $A_{22}=-0.288$ e $A_{44}=-0.076$ [12].	43
5.7	À esquerda, espectro de energia típico (QDC1). À direita resultado da subtração do TDC2 pelo TDC1. Os picos correspondentes aos raios gama da cascata são o segundo e o quarto. As energias dos picos são, da esquerda para direita, respectivamente, 80keV, 133keV, 345keV e 482keV.	44
5.8	Função perturbação para ^{181}Hf com o espectrômetro PAC do Laboratório Pelletron. O gráfico foi construído com o eixo das ordenadas multiplicado por -1.	45
5.9	À esquerda, espectro de energia para o detector 6 obtido com uma fonte de ^{60}Co . À direita, espectro de coincidências para uma fonte de ^{60}Co . Também é apresentada uma curva gaussiana ajustada ao pico para se determinar a largura do mesmo.	47
5.10	Reta de calibração em energia para o QDC1 para ^{181}Hf	49
6.1	Representação estrutural bidimensional da molécula cardiolipina [25].	53
6.2	Função perturbação para as coincidências das emissões do decaimento do ^{111}In ligado à cardiolipina:fosfatidilcolina à temperatura ambiente, à esquerda, e a 77K à direita.	53
6.3	Espectro para micela formada a partir da solução de cardiolipina:fosfatidilcolina à temperatura ambiente, à esquerda, e a 77K à direita.	54
6.4	Representação estrutural em duas dimensões da molécula de SDS.	56
6.5	Funções perturbação para medidas com amostras de SDS que continham metanol, à temperatura ambiente. É possível identificar cada amostra pela respectiva concentração de SDS. Neste caso tem-se gráficos da amostra 0,22mM até a 4,7mM.	58

LISTA DE FIGURAS

6.6	Funções perturbação para medidas com amostras de SDS que continham metanol, à temperatura ambiente. É possível identificar cada amostra pela respectiva concentração de SDS. Neste caso tem-se gráficos da amostra 5,49mM até a 50,0mM.	59
6.7	Funções perturbação experimentais para amostras de SDS compostas de soluções aquosas, à temperatura ambiente.	63
6.8	Representação tridimensional da proteína calmodulina [28]. As esferas indicam os íons Ca^{2+}	67
6.9	Funções perturbação para as três primeiras amostras de calmodulina com 40 μL a 295K.	69
6.10	Quarta amostra de calmodulina com 5 μL , 10 μL e 40 μL a 295K e 40 μL a 77K.	70
6.11	Esquema simplificado do funcionamento de um espectrômetro de massas MALDI com tempo de voo. Na região de voo sem a ação de forças são representadas moléculas carregadas positivamente de tamanhos diferentes para indicar que as mais leves chegam antes no detector em D.	73
6.12	Medidas com espectrômetro de massas MALDI. São apresentados espectros de massa sobre carga para amostras com ^{111}Cd (preto) e sem (vermelho). Os dois picos mais intensos (m/z aproximadamente 8400 e 16800) indicam as massas de voo da proteína para duas cargas e para uma carga.	75

LISTA DE FIGURAS

Lista de Tabelas

5.1	Coeficientes angulares e lineares para os seis canais do TDC utilizados para uma escala temporal de 200ns.	37
5.2	Resultados para o ajuste da função perturbação obtida com o espectrômetro do Laboratório Pelletron para a fonte de ^{181}Hf . t_0 é o instante inicial; p é a probabilidade de os núcleos popularem determinado sítio.	46
5.3	Estimativas de resolução temporal para cada combinação de pares formados pelos seis detectores.	48
5.4	Resultados para resolução em energia para os raios gama da cascata do ^{181}Hf , 133 keV e 482 keV.	49
6.1	Resultados para as medidas com vesículas à temperatura ambiente e a 77K. Amostra 1 corresponde à amostra de cardiolipina e amostra 2, à amostra de cardiolipina com SDS. Para todas as medidas o valor do parâmetro de assimetria (η) é nulo.	55
6.2	Dados sobre as soluções preparadas para a primeira série de medidas. Na primeira coluna, as amostras são identificadas pela concentração molar da respectiva solução aquosa de SDS.	57
6.3	Resultados para a primeira série de medidas, na qual as amostras continham metanol. Na primeira coluna, as amostras são identificadas pela concentração molar da respectiva solução aquosa de SDS. Na tabela, p_1 e p_2 representam a probabilidade de ocupação do sítio 1 e 2, respectivamente. Para todas as amostras o valor do parâmetro de assimetria (η) é nulo. ν_q1 e ν_q2 são as frequências ajustadas para cada um dos sítios.	61

6.4	Resultados para a segunda série de medidas, na qual as amostras eram compostas apenas por solução aquosa. Na primeira coluna, as amostras são identificadas pela concentração molar da respectiva solução de SDS. Na tabela, p_1 e p_2 representam a probabilidade de ocupação do sítio 1 e 2, respectivamente. Para todas as amostras o valor de η é nulo. ν_q1 e ν_q2 são as frequências ajustadas para cada um dos sítios.	65
6.5	Resultados para as medidas com calmodulina. Na primeira coluna, as amostras são identificadas pelo nome correspondentes aos apresentados nos gráficos. Na tabela, p_1 e p_2 representam a probabilidade de ocupação do sítio 1 e 2, respectivamente. ν_q1 e ν_q2 são as frequências ajustadas para cada um dos sítios.	72

Agradecimentos

A realização deste trabalho só foi possível graças a participação direta ou indireta de várias pessoas as quais cito a seguir.

Eu Gostaria de iniciar agradecendo àqueles que participaram diretamente deste trabalho. Primeiramente, ao professor Dr. Nelson Carlin Filho, que mesmo sabendo que seria um projeto difícil de se concretizar em dois anos, apostou no meu empenho e responsabilidade, me orientando nesta empreitada. Também gostaria de agradecer à FAPESP pelo apoio financeiro, pois sem ele não seria possível a elaboração deste projeto. Uma pessoa que merece destaque é o professor Dr. Artur Wilson Carbonari do CRPq-IPEN, ao qual agradeço por toda ajuda e empenho dedicados ao projeto. Sem dúvida seu apoio foi digno de um co-orientador.

A outros professores que ajudaram diretamente, também ficam aqui minhas considerações: Alexandre Suaide, pelas ajudas com o programa de aquisição e eletrônica; Maria Aparecida Camillo, com as amostras de calmodulina; Maurício S. Baptista, com as amostras de SDS e vesículas; Carlos Bloch, com as medidas de espectrometria de massas.

Aos técnicos que tiveram fundamental importância: Otávio e Pedro, da oficina geral; Edu do LAL, pela conversão dos divisores de tensão; Edmilson, da oficina do Pelletron.

Aos colegas Gabriel Pasca, Fábio, Luciano e Cláudio do CRPq-IPEN, pelo apoio e ajuda com os programas de análise.

Agradeço aos amigos que participaram, apoiaram (ou mal influenciaram) em todos os momentos: Diogo B. Tridapalli, Jailson V. do Nascimento, Diógenes Kassaoka, Gabriel R. S. Zarnauskas, Francisco de A. Souza, Mauro Cosentino, Leticia Cocciolito, Roberto Paiva, Ludmila Brochini e Adriana

Mancini.

Também gostaria de agradecer aos novos familiares e amigos, que ganhei nos últimos anos com o pacote União Estável com a Pri, e que proporcionaram vários momentos agradáveis: Luiz, Kika, Ana, Dona Ana, Renata, Bento, Bete, Tiza, Glória, Jayme, Mariana e Daniel.

Ao meus irmãos, Gustavo e principalmente ao Jardel, que abdicou de seu bem mais precioso para que eu pudesse atravessar São Paulo todos os dias de forma mais rápida.

Agradeço à Pri por toda a compreensão e o incentivo nas horas difíceis. As farras nas horas fáceis, em fim, a tudo que faz sem se quer ter jurado a um representante religioso que consagra o matrimônio.

Por fim, aos meus pais, que à sua maneira tentaram ao máximo incentivar seus filhos a estudar e buscar uma boa formação, e mesmo sem compreender muito bem minha escolha profissional, sempre apoiaram e acreditaram no meu discernimento.

Resumo

Este trabalho de mestrado trata da implementação de um espectrômetro de correlações angulares perturbadas no Laboratório do Acelerador Pelletron do Instituto de Física da Universidade de São Paulo. O espectrômetro é formado por seis detectores cintiladores com cristais de BaF_2 , de 3 polegadas de diâmetro por 6 de comprimento, com um sistema eletrônico e de aquisição de dados multiparamétrico padrão CAMAC. Diferentemente do usual, os espectros de energia dos raios gama dos núcleos de prova são adquiridos para cada detector, o que permite manter um controle maior sobre todo o experimento. Além disso, um mesmo experimento pode ser revisto com diferentes abordagens por diversas vezes, pois todas as informações sobre ele são armazenadas. Com a configuração eletrônica adotada, os espectros de energia são obtidos por meio de um QDC (*charge to digital converter*), dispensando o uso de pré-amplificadores. Os espectros de tempo são adquiridos com um TDC (*time to digital converter*). A seleção dos eventos de coincidência é realizada computacionalmente, procedimento que pode ser realizado durante a aquisição dos dados. Como a motivação para a implementação desse espectrômetro é o estudo de estruturas e interações de biomoléculas por meio da técnica de correlações angulares (PAC), foram realizadas medidas exploratórias, com o uso do espectrômetro do Laboratório de Interações Hiperfinas (LIH) do Centro do Reator de Pesquisas (CRPq) no IPEN, paralelamente à implementação do espectrômetro. As primeiras medições foram realizadas com amostras de vesículas lipídicas. Com essas medidas foi possível notar a influência da variação de tamanho das moléculas (diminuição de tamanho em uma ordem de grandeza) no tempo de correlação rotacional à temperatura ambiente, quando adicionado SDS (*sodium dodecyl sulfate*) na suspensão para

formação de um agregado micelar. As duas séries de medidas seguintes foram realizadas com amostras de SDS nas quais variaram-se as concentrações para se tentar verificar alterações na geometria ou na mobilidade das moléculas em função desse parâmetro. Foi possível notar que o comportamento das funções perturbação experimentais variaram com as amostras, porém não foi possível notar sistemática no comportamento. Outro fator notado foi a influência do meio. O comportamento das moléculas quando na presença de metanol nas amostras era bem diferente das soluções aquosas. Também não foi possível obter uma conclusão clara quanto à concentração micelar crítica para soluções aquosas. Por fim foram realizadas medidas com amostras de proteína calmodulina. Foram feitas medidas à temperatura ambiente e a 77K. Notou-se que essa proteína é passível de ser estudada por meio da técnica PAC. Para confirmar a presença da proteína nas amostras e também tentar verificar um deslocamento na massa devido à presença do íon $^{111}\text{Cd}^{2+}$ foram realizadas medidas de espectrometria de massas no Laboratório de Espectrometria de Massas na Embrapa em Brasília. Foi possível confirmar a presença da proteína nas amostras, porém não foi possível notar a presença de ^{111}Cd devido à baixa concentração de íons utilizados com a técnica PAC.

Abstract

This work is related to the implementation of a perturbed angular correlation (PAC) spectrometer at the University of São Paulo Pelletron Laboratory. The spectrometer consists of 6 cylindrical BaF₂ scintillator detectors, with 3 inches diameter and 6 inches length and a multiparameter CAMAC data acquisition system. Different from usual, the gamma ray energy spectra of the cascade nuclei are acquired for each detector, which allows us to have more control of the experiment. Besides, the same experiment can be revised with different approaches at any time. With the adopted electronics configuration, the energy spectra are obtained through a QDC (charge to digital converter) module, which dispenses the use of pre-amplifiers. The time spectra are acquired with a TDC (time to digital converter) module. The selection of coincidence events is performed computationally, and this procedure can be evaluated during the data acquisition. The main motivation for implementing this spectrometer is the study of the structure and interactions of biomolecules through the perturbed angular correlation technique. Test measurements were performed, parallel to the spectrometer construction, with the use of the Hyperfine Interactions Laboratory spectrometer at the Centro do Reator de Pesquisas do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (CRPq-IPEN). The first measurements were performed with lipidic vesicles samples. In this case it was possible to observe the influence of the molecule dimension change (decrease in one order) on the rotational correlation time at room temperature, when SDS (sodium dodecyl sulfate) was added in the suspension to form micellar aggregation. The two following series of measurements were performed with SDS samples in which the concentration was varied in order to verify modifications in the geometry or mobility of

the molecules as a function of that parameter. The behavior of the experimental perturbation functions varied with the samples. However, it was not possible to point out any systematics in their behavior. The molecules behavior when in presence of methanol in the samples was very different from the aqueous solutions. Also, it was not possible to obtain a clear conclusion about the critical micellar concentration for the aqueous solutions. Finally, the last measurements were performed with calmodulin protein samples, at room temperature and at 77K. In this case we concluded that this protein can be studied through the PAC technique. In order to confirm the presence of the protein in the samples and at same time to verify if any mass displacement occurred due to the presence of the $^{111}\text{Cd}^{2+}$, mass spectrometry measurements were performed at the Laboratório de Espectrometria de Massas – Embrapa in Brasília. It was possible to confirm the presence of the protein in the samples, but it was not possible to observe the mass displacement due to the presence of the ^{111}Cd , since the ions concentration used with the PAC technique is very low.

Capítulo 1

Introdução

O estudo de interações hiperfinas envolve técnicas espectroscópicas que utilizam os momentos elétricos e magnéticos nucleares para medir a ação de um meio extranuclear específico [1]. São exemplos de tais técnicas a técnica de ressonância magnética nuclear (NMR), a de ressonância nuclear de quadrupolo (NQR), a de ressonância paramagnética de elétrons, a de rotação do spin de muon (MSR), a de efeito Mössbauer (ME) e a de correlações angulares perturbadas (PAC), que é a técnica utilizada neste trabalho de mestrado para o estudo de estruturas e interações de biomoléculas. Cada uma dessas técnicas possui vantagens e desvantagens para determinadas medidas. Por exemplo, a espectroscopia NMR pode ser particularmente útil para medir deslocamentos químicos. Contudo, interações de quadrupolo elétrico nuclear associadas a alguns núcleos NMR ativos não são apenas difíceis de medir, mas também costumam obscurecer muitas informações dos deslocamentos químicos por meio de produção de linhas espectrais.

A espectroscopia PAC pode ser usada para medir com acurácia as interações de quadrupolo elétrico nuclear em sítios dos núcleos atômicos que são dopantes traço em cristais. No entanto, a técnica PAC não é sensível aos efeitos das distribuições de cargas que produzem os deslocamentos químicos NMR. Já a espectroscopia ME pode ser usada para medir esses dois efeitos, interações de quadrupolo elétrico nuclear e efeitos das distribuições locais de cargas que produzem deslocamentos químicos NMR, bem como interação

magnética de dipolo nuclear. Contudo, medidas com ME são factíveis somente em cristais que são majoritariamente constituídos por Fe ou Sn. Além disso, a sensibilidade da técnica ME depende da temperatura, assim como NMR e EPR (ressonância paramagnética de elétrons). Porém, as medidas de PAC são independentes da temperatura, o que é uma grande vantagem para o estudo de fenômenos como transições de fase, por exemplo. Além disso, a técnica PAC pode ser utilizada em medidas com amostras constituídas por soluções para o estudo de dinâmica de biomoléculas [2].

Embora cada uma dessas técnicas envolva a medida de interações de núcleos, cada uma requer uma quantidade diferente de núcleos de prova. Por exemplo, espectroscopia ME requer aproximadamente 10^{14} núcleos de prova para experimentos de absorvedor, NQR tipicamente requer cerca de 10^{18} e PAC, por outro lado, requer somente cerca de $10^{11} - 10^{12}$ núcleos.

De acordo com as considerações acima, percebe-se que, diferentemente de outras técnicas de espectroscopia, a técnica PAC é capaz de fornecer informações sobre uma determinada molécula quando ela é submetida tanto a um regime estático quanto a um regime governado por interações dinâmicas. Além disso, é possível realizar medidas com diferentes núcleos de prova e também variar a temperatura da amostra, o que permite a realização de uma série de modificações nas condições de meio do material ou molécula em estudo.

Experimentalmente a espectroscopia PAC é baseada na substituição de uma pequena quantidade de átomos de uma amostra por núcleos radioativos, cujos decaimentos se dão por meio de cascata $\gamma - \gamma$, em ambientes bem definidos. Durante o tempo de vida do estado intermediário os momentos nucleares podem interagir com o meio extranuclear que os cerca. Subseqüentemente, o estado intermediário decai para o estado fundamental por meio da emissão de um segundo raio gama. Aqui a interação hiperfina do estado intermediário envolve tanto o momento de quadrupolo nuclear com o gradiente de campo elétrico (EFG), quanto o momento de dipolo nuclear com o campo hiperfino magnético (MHF), ou com ambos. Neste caso, o EFG e o MHF são gerados por todos os elétrons e núcleos que rodeiam o núcleo de prova.

A emissão dos primeiros raios gama da cascata (γ_1) tem direção preferencial, associada ao spin do estado intermediário. A subsequente depopulação desses estados preferenciais por meio da emissão do segundo raio gama (γ_2) está correlacionada com a direção de emissão do primeiro. Quando a interação hiperfina do estado intermediário com o meio extranuclear ocorre, esta distribuição espacial é perturbada e o segundo raio gama é emitido em uma direção diferente. Este efeito é mensurável e é a base da espectroscopia PAC.

A primeira aplicação de PAC a problemas biológicos foi efetuada em 1968 [3] no estudo do comportamento dinâmico de macromoléculas biológicas em solução. Mais tarde, em 1974, foi mostrado que informações estruturais poderiam ser extraídas sobre sítios metálicos de proteínas por meio desta técnica [4]. Já a primeira aplicação de PAC no estudo de DNA foi em 1979 [5]. Ao longo dos anos que se seguiram diversos trabalhos têm sido realizados no estudo de DNA e proteínas. Exemplos mais recentes podem ser encontrados nas referências [6, 7].

Desde a publicação do trabalho de Bauer em 1985 [8], as aplicações à bioquímica de metalo-proteínas têm progredido substancialmente tanto experimentalmente quanto em termos de interpretação dos resultados experimentais. Além disso, um grande número de aplicações bem sucedidas em diferentes problemas em química inorgânica biológica tem sido realizado [2].

Este trabalho de mestrado trata da implementação da técnica PAC no Laboratório Pelletron do Instituto de Física da Universidade de São Paulo para estudo de estrutura e interações de biomoléculas. O espectrômetro construído possui 6 detectores cilíndricos, cujos cristais cintiladores são compostos de BaF_2 , dispostos em forma de octaedro. A partir das coincidências dos dois raios gama emitidos pelo núcleo de prova é possível gerar 30 espectros de coincidências, 6 para combinações de 180° e 24 para combinações de 90° . Para aquisição de dados é utilizado um sistema multiparamétrico padrão CAMAC, que permite adquirir os espectros de energia e separar os eventos de coincidências computacionalmente.

Esta dissertação está dividida em 7 capítulos. No Capítulo 2 são apresentados apenas os tópicos gerais da teoria de correlações angulares necessários

para compreensão do trabalho apresentado. No Capítulo 3 é apresentada uma breve descrição de configurações de espectrômetros PAC mais utilizados. No Capítulo 4 é apresentada uma descrição detalhada do espectrômetro PAC construído no Laboratório Pelletron. Em seguida, no Capítulo 5, são apresentados resultados experimentais que caracterizam o espectrômetro construído e atestam o seu adequado funcionamento, bem como um detalhamento do procedimento utilizado para obtenção da função perturbação experimental. No Capítulo 6 são apresentados resultados obtidos com medidas PAC realizadas no Laboratório de Interações Hiperfinas (LIH) do Centro de Pesquisas do Reator (CRPq) no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), paralelamente à construção do espectrômetro do Laboratório Pelletron. Foram utilizadas amostras de vesículas, de SDS (*sodium dodecyl sulfate*) e da proteína calmodulina. Para esta última também foram realizadas medidas de espectrometria de massas no Laboratório de Espectrometria de Massas da Embrapa em Brasília. Por fim, o Capítulo 7 constitui as conclusões obtidas com este trabalho.

Capítulo 2

Técnica de Correlações Angulares Perturbadas

Neste capítulo são apresentados apenas os tópicos sobre a técnica PAC mais relevantes para se compreender o trabalho experimental desenvolvido. Uma descrição detalhada da teoria de correlações angulares γ - γ pode ser encontrada nas referências [9, 10]. Um tratamento mais simplificado e com diferentes exemplos pode ser encontrado em [11, 12].

2.1 Correlações Angulares

Em geral, a probabilidade de emissão de radiação por um núcleo radioativo depende do ângulo entre o eixo do spin nuclear e a direção de emissão. Para condições ordinárias, a radiação é emitida isotropicamente, pois os núcleos estão orientados aleatoriamente no espaço.

Se o núcleo radioativo em questão (núcleo de prova) decai por meio da emissão de dois raios gama em cascata, γ_1 e γ_2 , a observação de γ_1 em uma direção fixa r_1 seleciona um conjunto de núcleos que têm um mesmo alinhamento de spin. Dessa forma, γ_2 apresenta uma *correlação angular* definida pela direção r_1 . Neste sentido, a expressão teórica para a probabilidade de γ_2 ser emitido a um ângulo θ em relação a r_1 , $W(\theta)$, para raios gama, é dada por:

$$W(\theta) = \sum_k A_k(1)A_k(2)P_k(\cos\theta), \quad (2.1)$$

em que P_k é o polinômio de Legendre de ordem k . Para esta função, as amplitudes $A_k(1)$ e $A_k(2)$ são dependentes dos spins dos estados nucleares e também das multipolaridades das transições dos raios gama. A amplitude da anisotropia da correlação angular é dada pelo produto desses dois termos, sendo denotada por A_{kk} .

Normalmente o valor máximo adotado para k é 4, pois geralmente as interações observadas são dipolares ou quadrupolares e os termos de ordem superior tornam-se desprezíveis. Além disso, apenas os termos com k pares aparecem devido à conservação de paridade em transições eletromagnéticas. Assim, uma maneira mais conveniente de expressar a função correlação $W(\theta)$ é:

$$W(\theta) = 1 + A_{22}P_2(\cos\theta) + A_{44}P_4(\cos\theta) \quad (2.2)$$

Para se chegar a esta expressão é realizada uma normalização em função de A_{00} .

2.2 Correlações Angulares Perturbadas

A correlação angular do decaimento em cascata de γ_1 e γ_2 é alterada, por exemplo, se quando o núcleo de prova está em seu estado intermediário ele é submetido a torques devidos tanto à interação do dipolo magnético μ com um campo magnético extranuclear, como à interação do momento de quadrupolo elétrico com gradientes de campos elétricos externos.

O que torna a técnica PAC possível é o fato de os raios gama emitidos sempre carregarem seus vetores momentos angulares ao longo ou opostamente às suas direções de propagação. Ao se detectar ambos os raios gama em um experimento de coincidência, são obtidas informações sobre as respectivas orientações do spin nuclear I em dois instantes que são definidos pela emissão de γ_1 (fornecendo a direção inicial) e γ_2 (fornecendo a orientação depois de

um intervalo Δt). Da variação da orientação do spin ΔI , medida por meio de uma amostra de núcleos de prova durante o intervalo de tempo Δt entre a emissão dos dois raios gama, a frequência de precessão (em uma representação clássica) do spin (ω) é determinada. Por razões experimentais, Δt precisa ser observável durante um intervalo de tempo comparável com uma revolução do spin nuclear, por isso o estado intermediário tem que possuir um tempo de vida τ adequado.

2.2.1 Interações Hiperfinas Magnéticas

Quando um campo magnético B age sobre o núcleo de prova, a interação do campo magnético com o momento magnético nuclear μ provoca uma precessão do spin nuclear em torno da direção do campo magnético B , com uma frequência ω_L (frequência de Larmor), isto em uma representação clássica. Por consequência, após um tempo t , o spin nuclear sofre uma rotação dada pelo ângulo $\omega_L t$. Se a permanência do núcleo no estado intermediário da cascata gama for suficientemente longa, a interação magnética provoca uma mudança na direção do spin do estado intermediário e conseqüentemente altera a direção de emissão da segunda radiação gama da cascata. Se a direção do campo magnético externo for perpendicular ao plano de emissão das radiações da cascata, a função correlação angular é dada por:

$$W(\theta, t, B) = \sum_k A_{kk} P_k[\cos(\theta - \omega_L t)], \quad (2.3)$$

com a frequência ω_L dada por:

$$\omega_L = -\frac{g\mu_N B}{\hbar} \quad (2.4)$$

em que g é o fator giromagnético do estado intermediário e μ_N , o magneton nuclear ($\mu_N = 5,05 \times 10^{-31}$ J/Gauss).

Para casos em que há ausência de campo magnético externo mas o meio

é composto de algum material ferromagnético, a função correlação angular (Equação (2.3)) deve ser modificada. Neste caso, para cada domínio magnético, ela é dada por:

$$W(\theta, t, B) = \sum_k G_{kk}(t) A_{kk} P_k \cos(\theta) \quad (2.5)$$

Neste caso, $G_{kk}(t)$ fica da seguinte maneira:

$$G_{kk}(t) = \frac{1}{2k+1} \left[1 - 2 \sum_{n=1}^k \cos(n\omega_L t) \right] \quad (2.6)$$

Vale observar que embora nesta situação não exista uma rotação resultante da correlação angular, oscilações harmônicas ocorrem no padrão da correlação angular em função do tempo com mais de uma frequência.

É possível, então, caracterizar o campo hiperfino magnético a partir da frequência de Larmor ω_L e conhecendo-se o valor de g .

2.2.2 Interações de Quadrupolo Elétrico Estáticas

Se o núcleo de prova está em presença de um gradiente de campo elétrico, a interação do momento de quadrupolo nuclear Q do estado intermediário com este gradiente de campo elétrico provoca um desdobramento energético característico deste estado nuclear. Este desdobramento, que é proporcional à maior componente do gradiente de campo elétrico, V_{zz} , está relacionado à precessão do spin I com frequências ω_i em uma representação clássica.

O gradiente de campo elétrico pode ser descrito por sua componente V_{zz} e pelo parâmetro de assimetria η . Ao se fazer uma escolha adequada de sistema de coordenadas, de tal forma que $|V_{zz}| \geq |V_{yy}| \geq |V_{xx}|$ e $V_{xx} + V_{yy} + V_{zz} = 0$, restringe-se o valor de η ao intervalo $0 \leq \eta \leq 1$. O parâmetro de assimetria é dado então por:

$$\eta = \frac{V_{xx} - V_{yy}}{V_{zz}} \quad (2.7)$$

É conveniente introduzir a frequência quadrupolar ω_Q dada por:

$$\omega_Q = -\frac{eQV_{zz}}{4I(2I-1)\hbar} \quad (2.8)$$

em que e é a carga do elétron e $\hbar$ é a constante de Planck dividida por 2π . Desde que se conheça previamente o valor de Q e de I é possível determinar V_{zz} por meio da Equação (2.8).

Para o átomo ^{111}In , por exemplo, o decaimento radioativo ocorre por meio de captura eletrônica, gerando um núcleo em um estado excitado que por sua vez decai para seu estado fundamental por meio da emissão de dois raios gama em cascata, sendo o primeiro de 171keV e o segundo de 245keV, como pode ser observado na Figura 2.1.

Figura 2.1: Decaimentos do ^{111}In e ^{111m}Cd . A ampliação mostra os três possíveis níveis de energia do estado intermediário de spin 5/2 devido à influência de gradientes de campos elétricos extranucleares.

Após a emissão do primeiro raio gama, a interação entre o momento de quadrupolo nuclear do estado intermediário e o campo elétrico externo altera a direção de emissão do segundo raio gama, perturbando assim a correlação angular. Dessa forma, a densidade de probabilidade de se medir o segundo

raio gama em relação à direção do primeiro, a um tempo t do mesmo, e em função do ângulo θ entre eles é dada por:

$$W(\theta, t) = \sum_k A_{kk} G_{kk}(t) P_k(\cos\theta) \quad (2.9)$$

$G_{kk}(t)$ descreve a evolução temporal da probabilidade de se detectar o segundo raio gama em um tempo t . Se a interação de quadrupolo nuclear for independente do tempo, a função $G_{kk}(t)$ oscila com o tempo, e pode ser escrita da seguinte forma:

$$G_{kk}(t) = \sum_n s_{kn} \cos(n\omega_0 t) \quad (2.10)$$

com $\omega_0 = 3\omega_Q$ para I inteiro e $\omega_0 = 6\omega_Q$ para I semi-inteiro. Os coeficientes s_{kn} dependem do parâmetro de assimetria η . O índice n é determinado pelo valor de I do estado intermediário.

Geralmente os termos para $k > 2$ são desprezíveis. Sendo assim, a função correlação angular pode ser escrita da seguinte maneira:

$$W(\theta, t) = \frac{e^{-t/\tau_N}}{4\pi\tau_N} (1 + A_2 G_2(t) P_2(\cos\theta)), \quad (2.11)$$

em que τ_N é a vida média do estado intermediário e $P_2(\cos\theta) = \frac{1}{2}(3\cos^2\theta - 1)$. $G_{22}(t)$ fica da seguinte maneira:

$$G_{22}(t) = a_0 + a_1 \cos(\omega_1 t) + a_2 \cos(\omega_2 t) + a_3 \cos(\omega_3 t) \quad (2.12)$$

com as frequências ω_1 , ω_2 e ω_3 diretamente relacionadas aos três possíveis níveis de energia do estado intermediário do decaimento do núcleo ^{111m}Cd (Figura 2.1). Quando o parâmetro η é nulo, as frequências ω_1 , ω_2 e ω_3 da Equação (2.12) são proporcionais a ω_q , porém quando η é diferente de zero a relação entre elas não é linear.

Ao se aplicar uma transformada de Fourier na Equação (2.12) é possível observar diretamente as frequências ω_1 , ω_2 e ω_3 . A partir destas frequências e do parâmetro η é possível caracterizar o gradiente de campo elétrico ao redor do núcleo de prova.

Além de determinar essas frequências, há também um parâmetro importante que é a medida da largura da distribuição das mesmas, δ . Em geral este parâmetro é dado por uma fração do tipo $\Delta\omega_q/\omega_q$. Quanto menor for o valor desse parâmetro mais bem definida será a interação, pois ter-se-á uma distribuição de frequências com uma média melhor determinada. Dessa forma, para os dados experimentais, a função $G_{22}(t)$ ajustada é a seguinte:

$$G_{22}(t) = a_0 + \sum_1^3 a_n \cos(\omega_n t) \exp\left(-\frac{\omega_n^2 t}{2\delta^2}\right) \quad (2.13)$$

Experimentalmente, a curva da função perturbação (Equação (2.15)) obtida quando a amostra está sob um regime estático, de forma geral é representada por uma oscilação em torno de uma constante. Para um caso em que a interação quadrupolar é muito bem definida, teoricamente espera-se, para um núcleo cujo spin do estado intermediário é $5/2$, um comportamento da transformada de Fourier em função das frequências ω_1 , ω_2 e ω_3 (Equação (2.12)) como o apresentado na Figura 2.2 [2].

Figura 2.2: Gráfico das transformadas de Fourier de funções $G_{22}(t)$ em função do parâmetro de assimetria (η) e das frequências dos níveis do estado intermediário ($5/2$) do decaimento de um núcleo de prova. Neste exemplo as frequências ($\omega_1 = 600$ Mrad/s, $\omega_2 = 1200$ Mrad/s e $\omega_3 = 1800$ Mrad/s para $\eta = 0$) e suas amplitudes variam como função do parâmetro de assimetria do gradiente de campo elétrico [10].

O comportamento das frequências observado na Figura 2.2 funciona como

uma impressão digital da distribuição eletrônica na vizinhança do núcleo de prova, ou seja, uma estrutura local da molécula em estudo.

2.2.3 Interações Quadrupolares Dependentes do Tempo

Se há uma dependência temporal do gradiente de campo elétrico, ou seja a orientação do gradiente de campo elétrico muda enquanto o núcleo está em seu estado intermediário, as Equações (2.12 e 2.13) devem ser modificadas [2]. Esta dependência temporal pode ocorrer no caso de moléculas que estão submetidas a uma difusão rotacional devido ao movimento Browniano no meio, ou ainda pode ser o caso de moléculas não rígidas, que mudam de conformação ou sofrem outro processo dinâmico durante o intervalo de tempo entre a emissão dos dois raios γ . O termo $G_{22}(t)$ passa a ter uma dependência exponencial com o tempo, pelo fator e^{-t/τ_c} , em que τ_c é denominado tempo de correlação rotacional, que para moléculas simetricamente esféricas depende da viscosidade do meio (ξ), da temperatura (T) e do volume da molécula (V), da seguinte maneira:

$$\tau_c = \frac{V \cdot \xi}{T \cdot k_B}, \quad (2.14)$$

em que k_B é a constante de Boltzmann.

Para o caso em que se tem predominantemente interações dinâmicas na amostra, podem ser observados diversos comportamentos da função perturbação. A Figura 2.3 [2] ilustra algumas situações para diferentes valores de τ_c (Equação 2.14).

Figura 2.3: Efeito de interações dependentes do tempo em funções perturbações [2].

Para o caso da Figura 2.3 é apresentado o efeito da difusão rotacional [2]. As Curvas são funções perturbação ($A_2G_2(t)$) para o núcleo de prova ^{111}Cd , obtidas por meio de uma simulação. A reorientação do spin do núcleo varia de 100ns a 0,1ns. Para difusão rotacional lenta, a reorientação implica em uma função perturbação correspondente a um regime de interações estáticas (oscilações) atenuada por uma exponencial. No caso de reorientação rápida, o núcleo perde coerência de fase e a função perturbação torna-se um simples decaimento exponencial.

2.2.4 Função Perturbação Experimental

É possível medir a densidade de probabilidade $W(\theta, t)$ por meio da coincidência temporal entre pares de detectores. No total, para o caso de 6 detectores, são 6 combinações para $\theta = 180^\circ$ e 24 combinações para $\theta = 90^\circ$, coletadas simultaneamente. A função perturbação experimental é dada então, por:

$$A_2 G_2(t) = 2 \frac{W(180^\circ, t) - W(90^\circ, t)}{W(180^\circ, t) + 2W(90^\circ, t)} \quad (2.15)$$

em que $W(180^\circ, t)$ representa a média geométrica das medidas para 180° e $W(90^\circ, t)$, das medidas para 90° . Sendo assim, $W(180^\circ, t)$ é dada por:

$$W(180^\circ, t) = \sqrt[6]{\prod_{i=1}^6 N_i(180^\circ, t)} \quad (2.16)$$

em que $N_i(180^\circ, t)$ corresponde ao número de eventos para cada canal do histograma obtido com as medidas de coincidências.

A incerteza de $W(180^\circ, t)$, $s_{W(180^\circ, t)}$, é dada por:

$$s_{W(180^\circ, t)} = \frac{W(180^\circ, t)}{6} \sqrt{\sum_{i=1}^6 \frac{1}{N_i(180^\circ, t)}} \quad (2.17)$$

Neste caso, a incerteza pode ser obtida por meio de propagação de incertezas diretamente, dependendo apenas dos números de eventos, pois devido à simetria do sistema as incertezas devido aos ângulos sólidos dos detectores são canceladas.

Similarmente ao caso das coincidências para 180° , $W(90^\circ, t)$ é dado por:

$$W(90^\circ, t) = \sqrt[24]{\prod_{i=1}^{24} N_i(90^\circ, t)} \quad (2.18)$$

e $s_{W(90^\circ, t)}$ é dado por:

$$s_{W(90^\circ, t)} = \frac{W(90^\circ, t)}{24} \sqrt{\sum_{i=1}^{24} \frac{1}{N_i(90^\circ, t)}} \quad (2.19)$$

Como são obtidos 30 histogramas de coincidência, as Equações 2.15 a 2.19 acima devem ser aplicadas a cada canal dos mesmos. Vale observar que essas expressões representam as coincidências dos raios gama da cascata sem serem consideradas as coincidências casuais. Estas por sua vez são eliminadas por meio de um ajuste de uma função exponencial combinada com uma reta.

Capítulo 3

Configurações de Espectrômetros PAC

Usualmente para os espectrômetros PAC são utilizadas configurações eletrônicas nas quais os sistemas são compostos por pré-amplificadores, amplificadores, TACs (conversores de tempo para amplitude) e de alguma forma, uma unidade eletrônica (*router*) para selecionar as coincidências [13, 14, 15, 16]. Normalmente as energias dos raios γ são avaliadas por meio de um analisador monocal e os espectros correspondentes não são adquiridos. Geralmente, o pulso que contém informação de energia do raio γ é denominado *lento* e o sinal que contém informação de tempo é denominado de *rápido*. Há três configurações mais comuns definidas pela forma de utilização dos sinais de tempo (*rápido*) e energia (*lento*): *lento-rápido*, *rápido-lento* e *rápido-rápido*.

3.1 Configuração *lento-rápido*

Para esta configuração o sinal proveniente do dinodo do detector é pré-amplificado e em seguida passa por um amplificador (Figura 3.1). A seleção em energia é realizada por meio de um analisador monocal com marca de tempo (TSCA), no qual é definida uma janela em torno de uma das energias da cascata, originando o sinal lento [13, 14].

Figura 3.1: Esquema de um circuito utilizado para realizar coincidências entre dois detectores com um espectrômetro PAC na configuração *lento-rápido*. No esquema apresentado, PRE representa um pré-amplificador; SAMP corresponde a um amplificador de sinal lento; FAMP é um amplificador de sinal rápido; TSCA é um analisador monocanal com marca de tempo; CFD é um discriminador de fração constante; LA é uma unidade de atraso; AND é uma unidade de coincidência; TAC é um conversor de tempo em amplitude e MCA é um analisador multicanal.

O sinal do anodo passa por um discriminador de fração constante (CFD) gerando um sinal de tempo (sinal *rápido*). O pulso correspondente à energia de cada um dos detectores é utilizado para validar o sinal de tempo. Assim, são feitas coincidências entre o sinal *rápido* e o sinal *lento* sem alterar a informação de tempo. Antes de efetuar a coincidência, o sinal do ramo *rápido* é atrasado de modo a compensar o intervalo de tempo necessário à análise do sinal em energia. O pulso resultante da coincidência entre o sinal *lento* e o sinal *rápido* é caracterizado como um registro do instante da emissão da radiação, e simultaneamente, da sua energia. Este pulso é designado como START se corresponder à primeira radiação gama da cascata (γ_1), ou é designado como STOP se corresponder à segunda radiação gama da cascata (γ_2).

Na configuração *lento-rápido* a validação do sinal *rápido* é feita pelo sinal *lento* antes de chegar ao TAC. Esse sistema apresenta como vantagem o fato de só serem aplicados no TAC sinais do ramo *rápido* que foram previamente

validados pelo ramo *lento*, e que correspondem às radiações da cascata. Deste modo, o TAC funciona a uma taxa relativamente baixa, proporcionando um número reduzido de coincidências casuais [14].

3.2 Configuração *rápido-lento*

A configuração *rápido-lento* difere da configuração *lento-rápido* pelo fato de todos os sinais de tempo, provenientes do CFD, serem enviados diretamente ao TAC. Os sinais de energia, correspondentes às radiações da cascata, são aplicados a uma unidade de coincidências que gera uma janela temporal (*gate*), validando o sinal de saída do TAC sem alterar a referência de tempo. Portanto, nessa configuração a validação do sinal *rápido* é feita pelo sinal *lento* após os sinais passarem pelo TAC.

Na Figura 3.2 é apresentado um esquema de um circuito utilizado para um sistema *rápido-lento*.

Figura 3.2: Esquema de um circuito eletrônico para um espectrômetro na configuração *rápido-lento*. No esquema apresentado, PRE representa um pré-amplificador; SAMP corresponde a um amplificador de sinal lento; FAMP é um amplificador de sinal rápido; TSCA é um analisador monocal com marca de tempo; CFD é um discriminador de fração constante; TAC é um conversor de tempo em amplitude e MCA é um analisador multicanal.

O sistema *rápido-lento* apresenta como vantagem a utilização de um menor número de unidades eletrônicas. Entretanto, o conversor de tempo em amplitude trabalha com uma taxa elevada de conversões, resultando em uma diminuição da eficiência do sistema [15]. Por outro lado, não é necessário atrasar o sinal de tempo para compensar o processamento do sinal de energia, o que melhora a resolução temporal do sistema.

3.3 Configuração *rápido-rápido*

No caso *rápido-rápido* as informações de tempo e energia são obtidas simultaneamente por um discriminador de fração constante de janela dupla (DWCFD) [16]. O sinal do anodo do detector é amplificado (sem passar por um pré-amplificador), e enviado ao DWCFD onde os sinais de energia são selecionados, ao mesmo tempo em que se obtém uma informação do instante da emissão da radiação. Os sinais de saída dos DWCFDs são enviados para um TAC e o pulso de saída deste é enviado para um analisador multicanal.

Figura 3.3: Esquema do circuito utilizado para realizar coincidências entre dois detectores na configuração *rápido-rápido*. Neste caso FAMP representa um amplificador de pulso rápido; DWCFD é um discriminador de fração constante de janela dupla; TAC é um conversor de tempo em amplitude e MCA é um analisador multicanal.

A configuração *rápido-rápido* utiliza um número reduzido de unidades, o que torna o espectrômetro muito compacto. Além disso, os sinais não precisam ser atrasados, o que melhora a resolução em tempo. Contudo, a resolução em energia da componente rápida dos sinais do detector é inferior à apresentada pela componente lenta por um fator de aproximadamente 3

vezes [17], o que dificulta a seleção das energias dos raios gama. Dessa forma, o sistema *rápido-rápido* não é adequado para aplicações cujas energias dos raios γ da cascata apresentem valores muito próximos.

3.4 Espectrômetro PAC Digital

Recentemente foi construído um espectrômetro com uma configuração alternativa às citadas anteriormente [18]. Todo o processo de tratamento dos sinais provenientes dos detectores não passa por unidades eletrônicas como amplificadores e também não são utilizados conversores de tempo em amplitude. Neste sistema são usadas interfaces eletrônicas acopladas a computadores pessoais, um em cada detector. Além disso é usado um computador mestre que realiza a análise dos eventos de coincidências. Neste caso, os espectros de energia dos raios gama são adquiridos.

Figura 3.4: Esquema do circuito utilizado para realizar coincidências entre detectores com o espectrômetro PAC digital [18].

Esse sistema apresenta como vantagens a possibilidade de se poder armazenar todas as informações do experimento e permitir o aumento do número de detectores sem um grande aumento de complexidade estrutural.

Capítulo 4

Espectromêtro PAC do Laboratório Pelletron

4.1 Descrição Geral

O espectrômetro PAC construído no Laboratório Pelletron apresenta mais uma configuração alternativa de se realizar medidas de coincidência γ - γ para experimentos de correlações angulares perturbadas. Os eventos são adquiridos com um sistema de aquisição multiparamétrico padrão CAMAC e as coincidências são selecionadas computacionalmente. Assim como no espectrômetro apresentado na seção 3.4, os espectros de energia são adquiridos, o que permite um controle maior sobre os experimentos.

Para acomodar os detectores, compostos de cristais cintiladores de BaF_2 , foi construída uma estrutura em forma de octaedro para que todos apontassem para o centro, podendo formar ângulos de 90° e 180° entre si, como pode ser observado na Figura 4.1.

Figura 4.1: Estrutura construída para acomodar os 6 detectores de BaF_2 que compõem o espectrômetro PAC no Laboratório Pelletron.

Como pode ser observado, a estrutura tem a forma de um cubo. Os detectores são posicionados no centro de suas faces. Contudo, o cubo está posicionado de forma que uma de suas diagonais seja perpendicular à horizontal para que se possam posicionar amostras com um sistema na vertical que permita uma detecção equânime das radiações gama por todos os detectores. É possível variar as distâncias dos detectores em relação ao centro, sendo a mínima distância possível em relação a ele de 40mm, devido às dimensões dos detectores.

O sistema de aquisição de dados e eletrônica utilizados para se medir

as coincidências dos raios gama é representado esquematicamente na Figura 4.2. Neste caso é apresentado um diagrama para dois detectores apenas. Contudo o uso dos 6 pode ser diretamente inferido por meio dele. Algumas unidades eletrônicas são representadas em número diferente do de unidades físicas utilizadas (ver Figura 4.3), pois o objetivo é apenas ilustrar a lógica utilizada para medir as coincidências.

Figura 4.2: Esquema do circuito utilizado para realizar coincidências entre dois detectores apenas.

No esquema apresentado na Figura 4.2 o TDC utilizado é um *Time to Digital Converter 7186* da Phillips Scientific. LA-156ns é uma linha de atraso de 156ns, composta por cabos coaxiais. LA-Aj é uma linha de atraso, também composta por cabos coaxiais, facilmente ajustável de acordo com o fundo de escala utilizado no TDC. LAMP é um amplificador linear 612AM da LeCroy; PSD é um módulo de *pulse shape discrimination* [20], usado para atenuar o sinal de energia; QDC é um *charge to digital converter 7166H* Phillips Scientific. CFD é um discriminador de fração constante CF8000 da ORTEC; LFIFO é um *Logic Fan-in-Fan-out 429A* da LeCroy; G&DG é um *gate & delay generator GG8010* da ORTEC; LT é um *Level Translator 7126* da Phillips

Scientific.

De acordo com as configurações apresentadas anteriormente (Capítulo 3), o circuito apresentado na Figura 4.2 pode ser associado à configuração *rápido-lento* unida a uma parte do espectrômetro digital (seção 3.4). A associação à configuração *rápido-lento* pode ser feita porque as coincidências entre os sinais de energia e os de tempo ocorrem por último, pois os sinais provenientes do CFD são enviados diretamente ao TDC. Em relação ao espectrômetro digital, é possível fazer esta associação porque no caso do espectrômetro do Laboratório Pelletron os espectros de energia são adquiridos e os eventos de coincidência são selecionados computacionalmente.

O circuito apresentado na Figura 4.2 pode ser dividido em dois ramos: o lógico (tempo) e o analógico (energia). O módulo responsável pela divisão inicial dos pulsos de cada detector é o LAMP, pois para cada canal de entrada que ele possui existem dois correspondentes de saída (ver Figura 4.3). O pulsos dos detectores, que se dirigem ao ramo lógico, chegam primeiramente ao CFD, onde existe um nível de discriminação de amplitudes que deve ser ajustado de forma a se obter uma relação adequada de sinal/fundo para cada detector.

O CFD possui 8 canais individuais, sendo utilizados apenas 6, e também uma saída OR, que é comum a todos os canais. Para cada canal (correspondente a cada detector) há um pulso de saída que é enviado a um canal de entrada correspondente no TDC para gerar os sinais de START. Os sinais de STOP são gerados pelos pulsos provenientes da saída OR do CFD, que pode enviar à entrada *Common* do TDC um sinal correspondente a qualquer um dos detectores. Este sinal sofre um atraso conveniente, de acordo com o fundo de escala utilizado no TDC. Para isto, é utilizada a linha de atraso (LA-Aj). O sinal OR também é utilizado para gerar, por meio do G&DG, uma janela temporal (*gate*) que é necessária para que o QDC integre o pulso de energia dos detectores, provenientes do ramo analógico do circuito. Para que o pulso proveniente do PSD chegue ao QDC dentro dessa janela temporal, é utilizada a linha de atraso de 156ns (LA-156ns na Figura 4.2).

Figura 4.3: Foto do sistema eletrônico e de aquisição de dados do espectrômetro PAC do Laboratório Pelletron. Na parte é possível visualizar o *crate* CAMAC com o LT, QDC e TDC. Logo abaixo está o PSD seguido do bastidor NIM com o G&DG, LFIFO, CFD e LAMP. Em seguida está a linha de atraso seguida da fonte de tensão.

Como para cada sinal OR do CFD há um correspondente proveniente de

uma das saídas dos seus canais, existe sempre um evento de auto-coincidência que corresponde à coincidência entre o sinal proveniente da saída de um dos canais e o sinal OR. Este evento tem um valor correspondente em tempo ao atraso adotado para a LA-Aj. Sendo assim, mesmo que não ocorra um evento de coincidência dentro deste intervalo, ou até mesmo uma coincidência casual, haverá um evento processado pelo TDC devido à auto-coincidência, que será armazenado em um histograma de contagens em função do canal, sendo este proporcional ao intervalo de tempo correspondente ao fundo de escala utilizado. Esses eventos correspondem ao pico na extremidade direita do espectro de TDC na Figura 5.3.

O fato de todos os eventos serem processados pode causar um inconveniente que é o uso excessivo de memória em disco rígido do computador. Durante as medidas teste isto foi um fator limitante, pois o computador não tinha uma quantidade de espaço suficiente. Porém, este problema foi resolvido de duas formas: foram adquiridos mais discos rígidos para o computador e também foi utilizado um método para filtrar eventos que não gerassem pelo menos dois sinais de TDC, ou seja, mais de um canal acionado em um mesmo evento. Sendo assim, o computador salva em seu disco rígido apenas os eventos que geram algum tipo de coincidência, verdadeira ou casual.

Dependendo da fonte utilizada e da atividade da mesma é possível fazer as seleções dos eventos de coincidência durante a aquisição, apesar de esta ser uma atividade que juntamente com a aquisição de eventos requer muito processamento do computador.

Para melhorar a relação fonte/fundo nos detectores, foram produzidas capas de chumbo para envolver os mesmos, circundando as bordas laterais dos cristais, pois estas ficavam expostas ao meio ambiente, sendo que só estamos interessados na incidência frontal das radiações provenientes das amostras. O objetivo era reduzir a incidência de radiação de fundo de até 500keV de energia, pois ela prejudica a resolução em energia nos espectros do QDC para as medidas com ^{111}In e ^{181}Hf que emitem raios γ de energias menores que 250keV. Sendo assim, foram utilizadas chapas de 5mm de espessura. Foi possível notar uma diminuição geral de eventos de radiação de fundo com a proteção de chumbo em até 30%.

Um ponto crítico nas medições de coincidência era se certificar de que o sistema estava adquirindo os eventos gerados pelo raio γ de menor energia do decaimento do ^{111}In , pois os detectores não possuem boa resolução em energia. Para conseguir isto, foi necessário realizar muitas medidas nas quais eram variados os ganhos dos amplificadores, os níveis de discriminação do CFD e também as tensões nos detectores. Estas por sua vez também influenciavam o ganho à medida em que eram aumentadas. Nestas variações era importante verificar se a relação fonte/fundo estava razoável. Se o nível de discriminação estava muito baixo ou o ganho do amplificador estava muito alto, esta relação ficava muito desfavorável e o sistema de aquisição era saturado.

Nota-se no circuito apresentado na Figura 4.2 que não são utilizados pré-amplificadores para integração da carga dos pulsos provenientes dos detectores. Ao invés disso, é utilizado um módulo (QDC) que é capaz de realizar esta tarefa diretamente e em seguida converter esse pulso para sinal digital. Antes de adotar o uso de do QDC, foi realizado um teste comparativo para verificar se haveria alguma desvantagem em termos de resolução em energia ao se integrar o sinal proveniente do detector diretamente com ele ao invés de se utilizar um sistema composto por pré-amplificador, amplificador e ADC. Para realizar estas comparações foi utilizada uma fonte de ^{60}Co emprestada pelo Laboratório do Acelerador Linear.

Foram utilizados duas montagens eletrônicas representadas nos esquemas de circuitos das Figuras 4.4, que não utiliza pré-amplificador, e 4.5, que utiliza. Esta comparação foi realizada por meio do uso de um detector de NaI(Tl) do grupo Gama do Laboratório Pelletron, pois ainda não tinham-se determinadas as tensões de operação mais adequadas para os detectores de BaF_2 . Também foi conseguido um pré-amplificador adequado para fotomultiplicadoras (modelo 113 da ORTEC) com o grupo do Laboratório de Interações Hiperfinas do CRPq-IPEN e um amplificador (572 - ORTEC) do Laboratório Pelletron.

Um espectro obtido para a fonte de ^{60}Co , utilizando o circuito da Figura 4.5, pode ser observado na Figura 4.6 à esquerda. Na mesma Figura à direita é apresentado um espectro obtido com o circuito com QDC (Figura 4.4).

Figura 4.4: Esquema do circuito utilizado para adquirir espectros de energia sem o uso de pré-amplificador. As unidades eletrônicas utilizadas são as mesmas apresentadas na Figura 4.2.

Figura 4.5: Esquema do circuito utilizado para realizar medidas com pré-amplificador. Neste caso, PRE é um pré-amplificador modelo 113 da ORTEC; AMP é um amplificador modelo 572 da ORTEC e ADC é um conversor analógico digital modelo 7164 da Phillips Scientific. As outras unidades eletrônicas são as mesmas apresentadas na Figura 4.2.

Figura 4.6: À esquerda, histograma para o detector de NaI com fonte de ^{60}Co utilizando pré-amplificador - amplificador - ADC. À direita, histograma do detector de NaI com fonte de ^{60}Co utilizando amplificador - PSD - QDC.

É possível verificar com os histogramas da Figura 4.6 que as resoluções em energia nas duas situações são similares. Vale observar que o primeiro espectro tem um número maior de eventos (2,5 vezes mais), pois nesta situação o sistema ficou adquirindo por mais tempo. Outro fator é o ganho dos amplificadores utilizados em cada situação. No segundo histograma, ele está um pouco maior, o que acaba comprimindo o espectro. De qualquer forma, os histogramas são suficientes para notar que não haveria desvantagem no uso do QDC.

4.2 Unidades Eletrônicas

Nesta seção são descritos em mais detalhes cada unidade apresentada no esquema da Figura 4.2. São apresentadas apenas as características mais relevantes para o uso de cada unidade no espectrômetro PAC.

Detectores

Os detectores utilizados são cintiladores com cristais cilíndricos compostos de BaF_2 , com 3 polegadas de diâmetro e 6 de comprimento. Foram fabricados pela Bicron. A resolução em energia nominal para 1400V é de cerca de 14% para ^{137}Cs . Atualmente a tensão utilizada em cada um é de cerca de 2100V, o que gera uma condição mais favorável para as medidas de PAC.

Os sinais emitidos pelos detectores de BaF_2 possuem características muito favoráveis para medidas de coincidência temporal. A forma do pulso característico apresenta uma componente rápida com tempo de subida de cerca de 3 ns que permite resultados com boa resolução em tempo. Ao mesmo tempo, a componente lenta do pulso permite a obtenção de uma resolução em energia não muito inferior à de um detector de NaI(Tl) . Na Figura 4.7 é apresentado uma fotografia do pulso característico de um dos detectores que formam o espectrômetro PAC do Laboratório Pelletron.

Figura 4.7: Foto do pulso característico do detector 1. O fundo de escala temporal é de 100ns e o de amplitude é de 100mV.

Ao longo desta dissertação, os detectores utilizados são identificados pelos números inteiros de 1 a 6. Os números de série correspondentes são respectivamente 445, 446, 771, 772, 773 e 770. Dessa forma pode-se fazer uma fácil associação aos detectores em relação aos resultados individuais encontrados.

Fonte de Tensão

É utilizada uma fonte de tensão CAEN modelo SY127. Este sistema é capaz de alimentar diferentes tipos de detectores, como fotomultiplicadoras, detectores de silício, câmaras de ionização, etc.

O sistema é modular e pode ser utilizado em experimentos com diferentes graus de complexidade. Todo o controle pode ser realizado remotamente, pois é possível conectar a fonte de tensão a um computador pessoal. Ela é organizada em *crates*. No caso do espectrômetro PAC do Laboratório Pelletron, são usados dois módulos com 4 canais cada. Um deles alimenta os detectores de tensão positiva e o outro, os de tensão negativa.

Os módulos utilizados são os modelos A300. O sistema fonte mais módulos pode fornecer tensões de até 4kV com correntes de até 3mA. A resolução de tensão varia de 0,1V até 3V dependendo da tensão de operação utilizada. Para a corrente vale o mesmo princípio, sendo a resolução de 0,1 μ A até 1 μ A.

Amplificador

É utilizado um amplificador linear, modelo 612AM da LeCroy, que é adequado ao uso de fotomultiplicadoras. Ele é capaz de amplificar diretamente o sinal proveniente do detector sem alterar sua forma. É otimizado para amplificar sinais rápidos, o que favorece seu uso na espectroscopia PAC, pois é desejado um amplificador que não prejudique a qualidade da resolução em tempo dos detectores. Possui 6 entradas com duas saídas para cada uma. Cada canal possui ajuste de ganho contínuo que pode chegar a 40 vezes. O uso de ganho variável é muito importante para ajustar a integração da carga no QDC, assim como o ajuste de nível de discriminação para o CFD.

Discriminador de fração constante (CFD)

O discriminador de fração constante é utilizado para limitar a amplitude do sinal de entrada, o que permite utilizar uma relação sinal-ruído adequada e ao mesmo tempo é utilizado para determinar uma marca de tempo para cada raio gama que é detectado. O modelo utilizado é um *Octal Constant Fraction Discriminator* CF8000 da ORTEC. Ele possui oito canais independentes; ajuste automático de *walk*; ajustes individuais de *threshold*, que podem variar de -10mV a -1V. Os sinais de entrada podem ter amplitude máxima de 5V. Também possui uma saída OR, que fornece um pulso lógico que pode corresponder a qualquer um dos 8 canais. Esta saída é usada para gerar o sinal de *gate* para o QDC e também o sinal de STOP no TDC. As larguras dos pulsos de saída são ajustáveis de 20 a 200ns.

Logic Fan-In/Fan-Out

Utilizado para gerar duas saídas lógicas a partir do pulso que chega da saída OR do CF8000. Uma é para alimentar o *Gate & Delay Generator* e a outra, para o TDC. O modelo adotado para o espectrômetro PAC do Laboratório Pelletron é o *Quad Logic Fan-In/Fan-Out* 429A da LeCroy. Ele possui 4 canais cada qual com 4 entradas lógicas independentes, mais 4 saídas normais e duas complementares.

Gate & Delay Generator

É capaz de variar a largura de um pulso lógico, que recebe de entrada, assim como atrasá-lo. Pode ser usado em escala de atraso de 70 a 1000ns ou de $0,35\mu\text{s}$ a $10\mu\text{s}$. A largura pode ser variada de 50ns a 1000ns ou de $0,35\mu\text{s}$ a $10\mu\text{s}$. No caso do espectrômetro PAC, é usado somente para variar a largura do pulso lógico proveniente do Fan-In/Fan-Out. Não é utilizado para gerar atraso. O modelo utilizado é o GG8010 da ORTEC. Ele possui 8 canais independentes para executar as funções acima citadas. Cada canal possui 2 saídas padrão NIM negativas e uma saída padrão TTL positiva.

Level Translator

Utilizado para converter o pulso padrão NIM que chega do *Gate & Delay Generator* para formato ECL. A saída ECL gerada é enviada para a entrada *gate* do QDC. O modelo utilizado é o 7126 *Level Translator* da Phillips Scientific. Ele é capaz de receber um pulso de entrada padrão NIM, TTL ou ECL e fornecer um sinal de saída em qualquer um desses três tipos pulsos.

TDC

Time to Digital Converter. É composto por 16 canais de conversão de tempo em amplitude padrão NIM seguidos por uma seção de processamento digital e uma interface CAMAC. Em modo *Common STOP* utiliza como sinal de START os sinais provenientes das saídas de cada canal do CF8000. Para o sinal de STOP é usado o pulso proveniente da saída OR do mesmo. Sendo assim, para cada canal é acionado um cronômetro que pára quando um evento de STOP chega na entrada *common*. Após isto, ele converte a diferença de tempo em um sinal digital para o computador, que é proporcional à diferença de tempo entre o START e o STOP. O evento é histogramado para o respectivo canal que gerou o START. O modelo do TDC utilizado é o 7186 da Phillips Scientific. Seu tempo de conversão é de até $7,2\mu\text{s}$.

Observação sobre módulos da Phillips Scientific

Os módulos da Phillips da linha utilizada no Espectrômetro PAC do Laboratório Pelletron, TDC 7186 e QDC 7166H, por exemplo, apresentam uma peculiaridade nos circuitos. Dependendo da situação experimental pode-se obter espectros tipicamente como o da Figura 4.8 a seguir, nos quais são observadas linhas verticais com uma distância fixa em todo o espectro.

Figura 4.8: Espectro de QDC para o detector 1 à esquerda e espectro de TDC para o detector 1 à direita. A escala para eventos está em forma logarítmica. Os dois gráficos apresentados foram obtidos com uma medida utilizando uma amostra de solução aquosa de ^{111}In .

Para eliminar este efeito é necessário desligar o *jumper* J900 presente nos circuitos para acionar o circuito *Gatti* [19].

Linha de atraso

É composta por 16 unidades de atraso compostas de cabos, que geram cada uma um atraso de 156ns. Dependendo da necessidade, de acordo com a núcleo de prova utilizado, pode-se utilizar um atraso de até cerca de $1,2\mu\text{s}$. É atrasado apenas o sinal proveniente da saída OR do CFD. O atraso usado é ajustado de acordo com o fundo de escala utilizado no TDC. Isto é feito para se utilizar o máximo possível do alcance temporal do fundo escala.

PSD

É um módulo projetado para ser utilizado com a técnica de *pulse shape discrimination* [20] e está sendo usado para atenuar a amplitude do pulso proveniente do amplificador (padrão NIM) quando necessário. Ele fornece dois tipos de saídas para um dado pulso de entrada, a componente rápida ou a carga total do pulso. Ambas podem ser atenuadas de acordo com a necessidade experimental. Neste espectrômetro, é usada a saída de carga total com atenuação de 4 vezes para o núcleo de prova ^{111}In e de 8 vezes para ^{181}Hf .

QDC

Modelo 7166H 16 *Channel QDC*. Este módulo possui 16 canais de conversão digital de carga seguidos por uma seção de processamento digital e uma interface CAMAC em um módulo simples. Ele integra diretamente a carga do pulso proveniente do PSD para gerar o espectro de energia dos detectores. Ou seja, ele converte diretamente a carga do pulso em um sinal digital com amplitude proporcional à energia do raio γ , em canais. Assim como o TDC, este módulo leva cerca de $7\mu\text{s}$ para processar um evento.

Capítulo 5

Caracterização do Novo Espectrômetro

Neste capítulo é detalhado o procedimento para a obtenção da função perturbação experimental com o espectrômetro do Laboratório Pelletron e também são apresentadas medidas experimentais que o caracterizam e atestam seu adequado funcionamento.

5.1 Calibração Temporal

Para determinar com boa precisão as interações hiperfinas observadas com a técnica PAC é necessário conhecer bem a escala temporal utilizada para medir as coincidências dos raios gama. Dessa forma, torna-se imprescindível uma boa determinação da calibração temporal do TDC para cada escala de tempo a ser utilizada. Ela foi realizada utilizando-se cabos calibrados e um osciloscópio para monitorar os intervalos de tempo. Para gerar sinais de coincidências com intervalos de tempo conhecidos, foram utilizados os sinais de saída de um dos detectores, que por sua vez eram divididos em dois com o LFIFO. Alterava-se o atraso entre as duas saídas lógicas obtidas em um intervalo de tempo conhecido e obtia-se o espectro correspondente, em canais, para o TDC. Um exemplo é o da Figura 5.1, obtido com o quarto canal com escala de 200ns.

Figura 5.1: Coincidências com o quarto canal do TDC para a calibração temporal, com escala de 200ns.

Foram obtidos 6 histogramas como o da Figura 5.1 para a escala de 200ns e mais 6 para a escala de 800ns. A partir dos histogramas como o da figura anterior, foram construídas curvas de tempo (em ns) em função da posição dos picos em canais, como o gráfico da Figura 5.2, assim como seus respectivos gráficos de resíduos.

Figura 5.2: Reta de calibração temporal correspondente ao quarto canal do TDC, com escala de 200ns, à esquerda. A reta que passa pelos pontos representa o ajuste realizado para os dados experimentais. À direita, gráfico de resíduos correspondente à reta ajustada.

Realizando-se ajustes de reta pelo método dos mínimos quadrados [22], foram obtidas retas cujos coeficientes são apresentados na Tabela 5.1. Nesta

tabela são apresentados os coeficientes para as retas de calibração para a escala de tempo de 200ns. Como pode ser notado no gráfico de resíduos apresentado, o TDC se comporta linearmente.

Tabela 5.1: Coeficientes angulares e lineares para os seis canais do TDC utilizados para uma escala temporal de 200ns.

TDC	angular(ns/canal)	linear(ns)
1	0.049060(35)	9,481(82)
2	0.049082(31)	9,421(72)
3	0.049097(31)	9,336(72)
4	0.049072(35)	9,283(82)
5	0.049095(33)	9,492(77)
6	0.049053(31)	9,336(72)

Como pode ser notado na Tabela 5.1 os coeficientes angulares são todos compatíveis entre si, o que indica que todos os canais do TDC são equivalentes. Os coeficientes lineares também são compatíveis entre si, o que indica que os canais podem ser ajustados para um mesmo tempo zero. Pequenas diferenças podem ser compensadas quando são selecionados os eventos de coincidência e deslocam-se os espectros de subtração de TDC em relação ao zero, como é explicado na seção 5.2. Sendo assim, não é necessário aplicar a calibração antes de se obter a curva experimental da função perturbação experimental (Equação (2.15)), pois pode-se utilizar a mesma curva de calibração para todos os canais do TDC.

5.2 Medidas com ^{111}In e Função Perturbação Experimental

Uma maneira de verificar se o sistema eletrônico apresenta um funcionamento correto é realizar uma medida com a qual não se tenha presença de gradientes de campos elétricos extranucleares ou campo magnético externo. Dessa forma, espera-se que a função perturbação experimental obtida seja compatível com uma constante, que é a anisotropia da correlação angular,

não apresentando estruturas caracterizadas por alguma oscilação, por exemplo. Um tipo de amostra que foi utilizado e que obedece a estes requisitos é uma composta por uma solução aquosa de $^{111}\text{InCl}_3$, pois os átomos de ^{111}In ficam distribuídos aleatoriamente na solução aquosa sem sofrerem algum tipo de interação elétrica ou magnética com o meio, pois os íons de $^{111}\text{In}^{3+}$ não têm com o que reagir.

Além de verificar o adequado funcionamento da eletrônica tinha-se ainda para essa medida o objetivo de ajustar a eletrônica do sistema de tal forma que se conseguisse obter coincidências com boa eficiência entre os detectores. Ou seja, era necessário atingir o máximo de eventos de coincidências por unidade de tempo, pois ainda esperava-se atingir uma configuração melhor.

Um fator que de certa forma prejudicou a medida foi que quando se conseguiu atingir uma configuração adequada da eletrônica para a fonte de ^{111}In , a mesma já estava com sua intensidade muito baixa. Porém, ainda assim foi possível realizar uma medida com a qual se conseguiu extrair uma função perturbação experimental, que é apresentada mais adiante.

Durante as medidas, os eventos são armazenados em um arquivo texto, em modo fila. Em cada um deles ficam registradas as informações sobre energia (QDC) e tempo (TDC) para cada canal de ambos os módulos. Com estas informações é possível gerar um histograma de energia e um de tempo para cada detector. Ou seja, cada detector tem um histograma de QDC (energia) e um de TDC (tempo). Na Figura 5.3 são apresentados exemplos de histogramas obtidos para o QDC e TDC de um dos seis detectores, para a medida com solução aquosa de $^{111}\text{InCl}_3$.

Na Figura 5.3 as linhas verticais indicam as regiões utilizadas para selecionar os eventos de coincidência entre os dois raios gama provenientes da fonte. Ainda não foi possível determinar com precisão a influência da variação das larguras das janelas de energia na qualidade dos resultados para a função perturbação experimental. Isto porque as medidas obtidas não atingiram uma quantidade de eventos suficiente. Com os dados obtidos percebe-se pouca influência da variação das janelas, além do efeito estatístico de aumentar ou diminuir o número de eventos válidos.

Figura 5.3: Espectro de QDC para o detector 3, à esquerda. As linhas verticais indicam as regiões, determinadas visualmente, que correspondem aos dois raios γ do decaimento do núcleo ^{111}In . À direita é apresentado o espectro de TDC correspondente. Ambos os espectros foram obtidos com uma medida utilizando-se uma amostra de solução aquosa de $^{111}\text{InCl}_3$.

Como pode ser observado, o espectro de TDC na Figura 5.3 apresenta uma forma descendente para a esquerda. Isto se deve ao fato de o módulo *TDC* utilizado estar em modo *Common Stop*, ou seja, em cada canal ocupado pelos seis detectores é gerado o sinal de START e na entrada *Common* do módulo é gerado o sinal de STOP. O pico mais intenso à extremidade direita representa as auto-coincidências citadas na seção 4.1.

Com base nos seis histogramas de QDC e nos seis de TDC são selecionados os eventos de coincidência com um programa que foi escrito para buscar as informações necessárias no arquivo fila gerado durante o experimento. São utilizadas para isso as bibliotecas do sistema Root [21]. Nesse programa são passadas instruções que verificam no arquivo fila, no qual estão registrados todos os eventos, duas condições essenciais para cada um deles: i) se ocorreram sinais de TDC provenientes de dois canais diferentes e ii) se para esta condição de TDC sendo satisfeita, os sinais de energia registrados para os QDCs correspondentes estão dentro dos picos de energia da cascata $\gamma_1 - \gamma_2$. Respeitadas essas condições, subtrai-se o valor em canal do TDC_i do TDC_j .

Após ser percorrido todo o arquivo fila são gerados 30 histogramas como o da Figura 5.4, 6 para combinações de pares de detectores formando 180°

entre si e 24 para pares de detectores formando 90° entre si. Porém em geral eles não apresentam um instante inicial da exponencial, correspondente ao decaimento do estado intermediário, compatível com zero como este. Esse efeito é devido a uma pequena diferença de zero entre os canais do TDC. Sendo assim, após realizar as subtrações dos TDCs é necessário reposicionar todos os espectros similares ao da Figura 5.4, que não possuem o instante inicial compatível com zero. Um critério utilizado para isto leva em consideração o pico de auto-coincidência, pois este representa com muito boa precisão a posição inicial em tempo para cada canal do TDC. Outra maneira é utilizar por exemplo uma fonte como a de ^{60}Co cujo estado intermediário possui uma meia vida muito curta. Dessa forma obtêm-se espectros de subtração de TDC como o da Figura 5.9 da seção 5.4. A partir deles usam-se os valores de deslocamento em relação ao zero para cada uma das 30 combinações. Foi verificado posteriormente que é possível ajustar o parâmetro pedestal de cada canal do TDC, o que permite deixar todos os canais com o mesmo tempo zero.

Figura 5.4: Curva levantada a partir do resultado da subtração do TDC1 pelo TDC3.

Vale observar que para os espectros similares ao da Figura 5.4 assim como para ela foi usado um número de canais quatro vezes menor do que o gráfico apresenta. Na verdade este gráfico contém 2048 canais que ocupam o “espaço” de 4 canais cada um. Nesse gráfico são apresentados também valores negativos, pois são realizadas subtrações de TDCs dois a dois com

1024 canais cada. Dessa forma o resultado da subtração apresenta o dobro de canais. O número de canais foi reduzido em 4 vezes para se realizar uma comparação entre um espectro de $A_2G_2(t)$ obtido com o espectrômetro do CRPq-IPEN, pois neste sistema são utilizados 1024 canais para os espectros de coincidência.

Com os 30 histogramas similares ao da Figura 5.4 é possível obter a função perturbação experimental (Equação 2.15). Isto é feito aplicando-se separadamente as relações 2.16 e 2.17 para as combinações de 180° e as relações 2.18 e 2.19 para as combinações de 90° , canal a canal dos histogramas de coincidência similares ao da Figura 5.4. Em seguida aplicam-se os resultados na Equação 2.15, também canal a canal. No momento de gerar o gráfico da função perturbação é também aplicada a calibração temporal para obtê-la com a escala temporal adequada. Para a medida com solução aquosa de $^{111}\text{InCl}_3$ em questão foi obtida a função perturbação experimental apresentada na Figura 5.5. Na mesma figura é apresentada também uma curva obtida com o espectrômetro do CRPq-IPEN.

Figura 5.5: Funções perturbação experimentais para o núcleo ^{111}In em solução aquosa à temperatura ambiente. À esquerda, primeira função perturbação experimental obtida com o novo espectrômetro no Laboratório Pelletron. À direita, um gráfico obtido por meio de uma medida com o espectrômetro PAC do CRPq-IPEN.

Para o espectro da Figura 5.5, era esperado que a curva obtida fosse compatível com uma constante, que corresponde à anisotropia da correlação angular. Como este valor depende da geometria utilizada, resolveu-se com-

parar com uma curva obtida com o espectrômetro do CRPq-IPEN, com uma amostra similar. Observando-se as duas curvas é possível verificar que o resultado obtido no Pelletron é bem próximo do obtido no CRPq-IPEN. Vale observar que para esta medida o número de eventos ainda não foi o ideal pois ainda tinha-se um problema de ocupação de memória de disco rígido, além de a fonte estar com uma intensidade muito baixa. Como já citado anteriormente, este problema já foi resolvido, porém é necessário conseguir uma nova fonte de ^{111}In para se realizar uma medida que contenha mais eventos, cerca de 30000 eventos no ponto de máximo das exponenciais referentes ao decaimento do estado intermediário nos núcleos de prova. Devido ao número não tão bom de eventos, os pontos apresentam uma flutuação maior. É importante frisar que com esse espectro é possível notar que não há aparentemente presença de ruído eletrônico, pois a flutuação dos dados não apresenta uma sistemática que evidencie isto. Devido às diferenças nas geometrias dos sistemas comparados, o valor obtido com o espectrômetro do Laboratório Pelletron fica mais próximo de $-0,07$, enquanto que o do CRPq-IPEN fica em torno de $-0,1$. Vale observar que para um sistema ideal o valor esperado é de $-0,18$.

O gráfico da figura 5.5 apresenta uma leve inclinação. Este efeito pode ser devido ao fato de a medida ter sido longa, com duração de alguns dias, pois a fonte já estava com uma atividade muito baixa quando atingimos uma configuração eletrônica adequada para realizar a medida. Com esta duração longa, efeitos como variação da temperatura, que não foi controlada, podem influenciar a medida, pois o núcleo de prova estava em uma solução aquosa.

Foi feito uso de amostras de solução aquosa de $^{111}\text{InCl}_3$ em todo o processo de implementação do espectrômetro no Laboratório Pelletron. O uso da fonte radioativa composta de ^{111}In facilitou o ajuste da eletrônica do sistema, pois ela decai quase que somente pela emissão dos raios gama de 171keV e 245keV em cascata. A ausência de outras linhas de decaimento permitiu que se ajustassem os níveis de discriminação, ganho dos canais do amplificador e tensões dos detectores sabendo-se o que esperar dos espectros de energia e de tempo. No caso dos detectores utilizados, a limitação da resolução em energia não permitia o uso de uma fonte de Hf , por exemplo, para ajustar os

equipamentos eletrônicos, para os raios gama da cascata desejada, pois esta fonte emite outros raios gama com diferentes energias. Porém, após o sistema ser ajustado de forma conveniente, pôde-se usá-la de uma forma mais fácil, na qual foi possível separar bem as energias dos raios gama desejados. Isto pode ser observado na seção seguinte.

5.3 Medidas com ^{181}Hf

Após ter-se o sistema ajustado com tensões mais adequadas para as medidas de interações hiperfinas, foi possível utilizar uma fonte de ^{181}Hf para tentar observar uma interação quadrupolar que é bem conhecida na literatura [23]. Um esquema simplificado do decaimento deste núcleo é apresentado na Figura 5.6. Nela são indicados apenas os raios gama da cascata medida com a técnica PAC.

Figura 5.6: Esquema simplificado do decaimento do ^{181}Hf , no qual são mostradas as energias dos raios gama da cascata e o tempo de meia vida do estado intermediário. Para este núcleo $\mu(5/2^+) = +3.24(5)\mu_N$; $Q(5/2^+) = +2.36(5)\text{b}$; $A_{22} = -0.288$ e $A_{44} = -0.076$ [12].

Para usar essa fonte, foi necessário desenvolver um colimador de chumbo para a mesma, pois a intensidade era muito alta para o sistema de aquisição.

A eficiência dos detectores aliada ao tamanho dos cristais proporcionava uma taxa de eventos muito alta. Além disso, devido ao fato de o sistema só ter um nível de discriminação inferior para todas as faixas de energia, todos os eventos com energia acima do nível de discriminação chegam ao TDC, o que além de saturar o sistema, também aumenta a taxa de coincidências casuais drasticamente.

Para essa medida, foram obtidos espectros de energia e coincidências tipicamente como os da Figura 5.7. Também foram obtidos seis espectros de TDC similares ao da Figura 5.3.

Figura 5.7: À esquerda, espectro de energia típico (QDC1). À direita resultado da subtração do TDC2 pelo TDC1. Os picos correspondentes aos raios gama da cascata são o segundo e o quarto. As energias dos picos são, da esquerda para direita, respectivamente, 80keV, 133keV, 345keV e 482keV.

Como pode ser notado nos histogramas acima, o número de eventos não é estatisticamente suficiente para se obter uma função perturbação com boa precisão, mesmo tendo-se realizado vários dias de medidas. Assim como no caso das medidas com ^{111}In , seriam necessários cerca de 30 mil eventos no máximo de cada exponencial referente ao decaimento do estado intermediário dos núcleos de prova. Além disso, assim como o espectro da Figura 5.4, o histograma é composto por 2048 canais, o que ajuda no aumento de eventos a serem considerados por canal.

A função perturbação obtida é apresentada na Figura 5.8. Devido ao baixo número de eventos não foi possível obter uma curva com boa definição

para tempos maiores que 50 ns. Para esse gráfico foi realizado um ajuste utilizando-se o programa *Fitlast*, que é usado pelo grupo do Laboratório de Interações Hiperfinas no CRPq-IPEN. Ele foi desenvolvido por um estudante da Universidade de Bohn na Alemanha sob orientação do Professor M. For-ker. Ele é capaz de ajustar até quatro sítios metálicos para o núcleo de prova. Para isso, ele ajusta uma composição de funções similares à Equação (2.13), com uma para cada sítio. Em cada um deles é possível ajustar a frequência quadrupolar em MHz (ν_q), o parâmetro de assimetria (η), a probabilidade de o núcleo de prova ocupar determinado sítio e caso haja dependência do gra-diente de campo elétrico com o tempo, um parâmetro (λ) que é proporcional ao parâmetro τ_c apresentado na seção 2.2.3.

Figura 5.8: Função perturbação para ^{181}Hf com o espectrômetro PAC do Laboratório Pelletron. O gráfico foi construído com o eixo das ordenadas multiplicado por -1.

No caso da curva da Figura 5.8, no ajuste realizado foi necessário o uso de três sítios metálicos para o ^{181}Hf . Isto pode ser explicado pelo fato de a fonte utilizada não ter sido preparada com alto grau de pureza. Os resultados obtidos com o espectrômetro do Laboratório Pelletron são apresentados na tabela 5.2.

Observando-se os resultados apresentados, pode-se notar que para o sítio majoritário ajustado, com 57,9% de probabilidade os resultados para a frequência quadrupolar e o parâmetro de assimetria são compatíveis com os resultados da literatura [13, 23] dentro de 3 incertezas. Esses resultados

mostram que mesmo com a dificuldade de se obter um número apreciável de eventos foi possível obter verificar um adequado funcionamento do espectrômetro construído no Laboratório Pelletron. O valor da anisotropia está positivo devido ao fato de o gráfico estar invertido.

Tabela 5.2: Resultados para o ajuste da função perturbação obtida com o espectrômetro do Laboratório Pelletron para a fonte de ^{181}Hf . t_0 é o instante inicial; p é a probabilidade de os núcleos popularem determinado sítio.

	anisotropia 0,281(30)	a_0 -0,0132(10)	$t_0(\text{ns})$ -9(5)	χ_{red} 1,05
Sítio	$\nu_q(\text{MHz})$	η	δ	p
1	315,8(15)	0,221(11)	0,133(3)	0,579(11)
2	419(6)	0,60(5)	0,130(16)	0,327(23)
3	461(4)	0	0,057(18)	0,093(21)

5.4 Resolução Temporal do Sistema

Foi realizada uma estimativa para a resolução temporal do sistema por meio da calibração temporal apresentada acima (na verdade com a média obtida para os coeficientes angulares), junto com a medida da largura à meia altura dos picos de coincidência obtidos como TDC, como na Figura 5.9, para uma fonte de ^{60}Co .

Para medidas de coincidências com a fonte de ^{60}Co , era esperado que fosse obtido, após a subtração dos TDCs, um pico estreito localizado em uma posição em canais compatível com zero, isto porque a meia vida do estado intermediário do decaimento do núcleo de ^{60}Co é muito pequena se comparada com a resolução temporal esperada para o sistema.

Figura 5.9: À esquerda, espectro de energia para o detector 6 obtido com uma fonte de ^{60}Co . À direita, espectro de coincidências para uma fonte de ^{60}Co . Também é apresentada uma curva gaussiana ajustada ao pico para se determinar a largura do mesmo.

Assim como para um experimento PAC usual, foram obtidos 6 espectros de energia (QDC) e 6 de tempo (TDC), um para cada detector. Para se obter os espectros de coincidência é utilizado o mesmo procedimento descrito na seção 5.2. São gerados 30 histogramas das combinações de 90° e 180° entre os seis detectores. Na Figura 5.9, é apresentado um exemplo de espectro de energia para um dos detectores, à esquerda. À direita, um espectro de subtração de TDC para a combinação entre os detectores 6 e 1 (90°) na qual o 6 é START e o 2 é STOP.

Na situação da Figura 5.9 o fundo de escala utilizado para o TDC era de 200ns. Para a curva gaussiana ajustada nesse gráfico, por exemplo, foi obtida uma média de 57,31(5) canais e um desvio-padrão de 10,73(4) canais. Para estimar a resolução temporal, foi usado o valor do desvio-padrão multiplicado pelo fator $2\sqrt{2\ln 2}$ para se obter a largura à meia altura da curva [20]. Este procedimento foi adotado para todas as trinta combinações.

Os resultados para as larguras dos 30 espectros similares ao da Figura 5.9 são apresentados na Tabela 5.3. Nela é possível notar diferenças significativas de resolução temporal para alguns detectores. Um exemplo são as combinações nas quais estão envolvidas o detector 6, para o qual as resoluções são mais baixas.

Tabela 5.3: Estimativas de resolução temporal para cada combinação de pares formados pelos seis detectores.

Combinação	FWHM (ns)	Combinação	FWHM (ns)
1 - 2	0,9	4 - 1	1,2
1 - 3	1,1	4 - 2	1,2
1 - 4	1,1	4 - 3	1,2
1 - 5	1,1	4 - 5	1,2
1 - 6	1,2	4 - 6	1,4
2 - 1	0,9	5 - 1	1,1
2 - 3	1,0	5 - 2	1,2
2 - 4	1,2	5 - 3	1,1
2 - 5	1,1	5 - 4	1,2
2 - 6	1,3	5 - 6	1,2
3 - 1	1,1	6 - 1	1,2
3 - 2	1,1	6 - 2	1,3
3 - 4	1,2	6 - 3	1,3
3 - 5	1,1	6 - 4	1,4
3 - 6	1,3	6 - 5	1,2

Foi estimada uma resolução média para o sistema por meio de uma média simples, pois apesar de serem notadas diferenças entre as resoluções, os detectores são usados em conjunto, de forma que nenhum deve ser privilegiado. Sendo assim, a resolução média fica: 1,175(21)ns.

5.5 Resolução em Energia

A partir dos espectros de energia para a fonte de ^{181}Hf (Figura 5.7) foram levantadas curvas de energia em função da posição dos picos como o gráfico da Figura 5.10, para se efetuar uma calibração em energia. Neste caso, tinha-se como objetivo final avaliar a resolução em energia dos detectores para a faixa de energia dos raios gama emitidos por essa fonte e verificar se os valores nominais apresentados pelo fabricante são coerentes.

Para construir os gráficos de energia em função da posição dos picos em canais, foram utilizadas as posições dos três raios gama mais energéticos, pois é difícil determinar um valor de referência para o primeiro pico, já que existem diversas possibilidades de origem para ele [24].

Figura 5.10: Reta de calibração em energia para o QDC1 para ^{181}Hf .

Com os mesmos espectros de energia para o ^{181}Hf citados foram determinadas as larguras à meia altura do segundo, terceiro e quarto picos para os 6 espectros de QDC. Multiplicando-se essas larguras pelo coeficiente angular das calibrações e dividindo-se pelo valor correspondente em energia, obtém-se uma estimativa para resolução.

Na Tabela 5.4 são apresentados os resultados para a resolução em energia de cada detector para os picos 133keV e 482keV. Os valores utilizados como referência foram 133,03 KeV e 482,193 keV obtidos por meio da referência [24].

Tabela 5.4: Resultados para resolução em energia para os raios gama da cascata do ^{181}Hf , 133 keV e 482 keV.

Detector	$\Delta E/E(\%)$ - 133,03 keV	$\Delta E/E(\%)$ - 482,193 keV
1	39,27(16)	17,86(4)
2	43,86(12)	19,02(5)
3	41,95(19)	16,97(4)
4	47,68(21)	19,33(5)
5	51,37(17)	19,83(6)
6	52,12(20)	20,08(5)

Os resultados para o pico de 482 keV estão dentro do esperado em relação aos valores nominais que ficam em torno de 15%, pois a tendência observada é de melhora da resolução em energia para um raio gama da ordem de 650keV.

5.6 Vantagens e Limitações

A maior limitação do sistema construído está no fato de não se ter um discriminador para amplitudes de tensão acima do desejado, o que prejudica a eficiência do mesmo. Porém isto não deve afetar a eficiência com ^{111}In , pois este núcleo decai sempre por meio da captura eletrônica emitindo os dois raios gama citados com cerca de 99% de probabilidade. Para o caso de núcleos de prova como ^{181}Hf seria muito interessante o uso de algum módulo eletrônico similar ao analisador monocanal, pois pode-se selecionar as faixas de energia desejadas sem que os raios gama que não são interessantes para o estudo de interações hiperfinas atinjam o TDC, o que diminui a eficiência do sistema.

Outra limitação é o tamanho dos detectores, que são muito grandes para o uso em um espectrômetro de correlações angulares perturbadas. Esse fator limita o sistema em resolução em tempo e em eficiência, pois a taxa de coincidências verdadeiras diminui muito com o aumento da distância dos detectores à amostra.

Por outro lado tem-se uma grande vantagem de se adquirir os espectros de energia, o que facilita uma eventual retomada do experimento, assim como garante um controle maior sobre o que ocorre durante a tomada de dados. Além disso, o circuito eletrônico é significativamente mais compacto, pois as unidades eletrônicas são multicanais. Outra vantagem é o uso de TDC ao invés de TAC, que dispensa o uso de um módulo roteador para selecionar as coincidências, o que torna o sistema mais prático.

Capítulo 6

Medidas no IPEN

Paralelamente à construção do espectrômetro de correlações angulares perturbadas do Laboratório Pelletron, foram realizadas diversas medidas exploratórias com moléculas bem conhecidas quimicamente, pois desta forma não se teria de controlar muitos parâmetros químicos e ao mesmo tempo já se tentaria conhecer algumas limitações da técnica PAC em relação a esses tipos de amostras e também seria possível se familiarizar com a mesma. Outro ponto seria buscar uma primeira sistemática a ser seguida, variando-se um parâmetro químico ou físico das amostras e verificando-se o que ocorre com os parâmetros físicos obtidos com a técnica. As 4 primeiras séries de medidas foram realizadas com amostras de preparação mais simples, com vesículas, micelas e *sodium dodecyl sulfate* (SDS). Depois foram realizadas medidas com uma proteína (calmodulina). Para esta também foram realizadas medidas de espectrometria de massas.

Essas medidas foram realizadas com o espectrômetro no Laboratório de Interações Hiperfinas (LIH) do Centro do Reator de Pesquisas (CRPq) no IPEN. O espectrômetro é composto por 4 detectores. Eles são constituídos por cristais de BaF_2 cônicos de 2 polegadas de diâmetro e 2 polegadas de comprimento. Neste caso é utilizada uma configuração *lento-rápido*. Um esquema da eletrônica utilizada é apresentado na Figura 3.1 ([13]).

O espectrômetro do Laboratório de Interações Hiperfinas (LIH) do CRPq-IPEN possui somente um TAC e um analisador multicanal. Os sinais de

START e STOP são misturados na unidade OR e aplicados na entrada START do TAC. O mesmo procedimento é realizado para os sinais de STOP. Para extrair a informação sobre qual detector originou o sinal é utilizado um roteador [13] que recebe todos os sinais individuais de START e STOP para determinar o par de detectores que originou os sinais de coincidência. Após essa determinação o roteador envia um comando para o TAC liberar o sinal de saída. O sinal de saída do TAC é aplicado ao roteador que o envia para uma das 12 entradas do MCA, de acordo com a combinação dos detectores que originaram a coincidência. A conversão do sinal analógico em digital é efetuada pelo ADC e seu resultado é armazenado em uma determinada região de memória do MCA.

6.1 Medidas com Amostras de Vesículas Lipídicas

Primeiramente foram realizadas medidas no LIH no CRPq - IPEN com amostras que consistiam de suspensão aquosa de membranas de lipídios (vesículas) de cardiolipina: fosfatidilcolina 1:1. Estes tipos de amostras, além de serem simples de preparar, como já citado, também podem ser uma ponte importante para atingir o objetivo de estudar estruturas de proteínas, por exemplo, pois muitos mecanismos de interações deste tipo de molécula ocorrem com membranas [25]. Esperava-se que os íons radioativos $^{111}\text{In}^{3+}$ se ligassem à região externa da vesícula, que, em princípio, é carregada negativamente. Uma representação da molécula cardiolipina é apresentada na Figura 6.1.

O objetivo principal desta medida era verificar se a técnica PAC seria sensível à variação do tamanho dos aglomerados moleculares utilizados. Primeiramente foram realizadas medidas com as vesículas e depois com micelas que consistiam basicamente das mesmas moléculas, porém com uma organização diferente.

Para preparar as amostras de vesículas foram pesados 5mg de fosfatidilcolina 98% e de cardiolipina, ambos em pó. Adicionaram-se estes dois compostos em 0,5 mL de clorofórmio em um recipiente para diluí-los e para

que eles reagissem. Em seguida evaporou-se o clorofórmio com gás argônio. Finalmente, foram depositados 2,0 mL de água MiliQ no mesmo recipiente onde estavam as moléculas de lipídios e em seguida passou-se esta solução em um filtro para que adquirissem um tamanho determinado, que no caso foi de 100 nm.

Figura 6.1: Representação estrutural bidimensional da molécula cardiolipina [25].

A amostra a ser colocada no espectrômetro foi preparada simplesmente depositando-se uma solução aquosa, traço, de $4,0 \mu\text{L}$ de InCl_3 sobre $40,0 \mu\text{L}$ de suspensão de vesículas. Foram, então, realizadas uma medida à temperatura ambiente e outra a 77K. Os espectros de função perturbação para os decaimentos do ^{111}In obtido são apresentados na Figura 6.2.

Figura 6.2: Função perturbação para as coincidências das emissões do decaimento do ^{111}In ligado à cardiolipina:fosfatidilcolina à temperatura ambiente, à esquerda, e a 77K à direita.

A tendência no dados observada no espectro para a temperatura am-

biente, indicando uma queda assintótica a zero, é um indicativo da predominância de interações dinâmicas das moléculas compatível com uma reorientação de spin da ordem de 1ns, como apresentado na Figura 2.3 [2]. A medida a 77K (nitrogênio líquido) foi realizada para reduzir a mobilidade das mesmas. Nele pode-se observar que não ocorre o comportamento de os pontos irem a zero, o que é característico de predominância de interações estáticas. O gráfico apresenta um trecho em que há uma pequena subida dos pontos após a queda exponencial, que logo cessa, passando a apresentar um comportamento de uma constante. É um indicativo de que a frequência quadrupolar sofre uma forte atenuação.

Para a segunda medida foi adicionado 0,57mg de um surfactante (SDS) a uma porção da mesma solução de vesículas para formar um agregado micelar. Dessa forma, as moléculas compondo um sistema com 100nm passaram a se organizar em um complexo com cerca de 10nm.

Foram realizados os mesmos procedimentos que na primeira amostra, sendo obtidos os seguintes espectros apresentados na Figura 6.3.

Figura 6.3: Espectro para micela formada a partir da solução de cardiopina:fosfatidilcolina à temperatura ambiente, à esquerda, e a 77K à direita.

Por meio de análises realizadas, com o programa *Fitlast*, para os espectros das amostras à temperatura ambiente (Figuras 6.2 e 6.3), verificou-se que o parâmetro τ_c (Equação (2.14)) relacionado à mobilidade das moléculas às quais os núcleos radioativos se ligaram sofreu uma alteração significativa

de uma amostra para a outra. Foram realizados ajustes para os quais se obtiveram valores para um parâmetro λ , que é proporcional ao inverso de τ_c . Para a primeira amostra $\lambda = 15,6(7)\text{ns}^{-1}$ e para a segunda, $\lambda = 22,9(19)\text{ns}^{-1}$. Estes resultados mostram que o valor de τ_c para a primeira amostra é maior, enquanto que para a segunda, é menor, indicando que o tempo de correlação para as moléculas maiores é maior, enquanto que para as menores, é menor. Desse modo o parâmetro τ_c obtido a partir da técnica PAC, pode ser um sensor para detectar mudanças nos tamanhos das moléculas.

Na Tabela 6.1 são apresentados os resultados para os ajustes dos parâmetros mais relevantes relacionados às curvas apresentadas nas Figuras 6.2 e 6.3.

Tabela 6.1: Resultados para as medidas com vesículas à temperatura ambiente e a 77K. Amostra 1 corresponde à amostra de cardiolipina e amostra 2, à amostra de cardiolipina com SDS. Para todas as medidas o valor do parâmetro de assimetria (η) é nulo.

Amostra	a_0	anisotropia	$\nu_q(MHz)$	δ	$\lambda(\text{ns}^{-1})$	$\chi^2_{reduzido}$
1-295K	0,0100(3)	0,1240(20)	81,4(5)	0,770(10)	15,6(7)	1,17
1-77K	0,0053(6)	0,097(3)	127,6(11)	0,570(10)	0	1,06
2-295K	0,0170(4)	0,109(3)	82,1(10)	0,620(20)	22,9(19)	0,98
2-77K	0,0052(10)	0,100(4)	127,7(10)	0,620(10)	0	1,02

Pode-se notar nos resultados apresentados na Tabela 6.1 que as frequências quadrupolares não sofreram alteração em relação às duas amostras, o que indica que não houve mudança na estrutura eletrônica em volta no núcleo de prova. Ou seja, para as medidas à temperatura ambiente elas são compatíveis entre si, assim como a 77K. Como a técnica PAC é uma técnica de espectroscopia local ela não é capaz de notar mudança em relação à agregação das moléculas. Isto é melhor observado com as amostras de SDS, descritas adiante.

6.2 Amostras de SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*)

O objetivo das medidas com amostras de SDS era verificar se os parâmetros físicos obtidos com a técnica PAC seriam sensíveis à variação da concentração dessas moléculas. Em caso afirmativo, uma possibilidade seria tentar verificar se também seriam sensíveis às mudanças no sistema quando este se encontrasse a uma concentração próxima à concentração micelar crítica (CMC) [26]. Esta molécula tem uma propriedade de aumentar a agregação molecular com a variação de sua concentração. Dessa forma, esperava-se que uma mudança de mobilidade fosse notada em função desse parâmetro.

Nas duas séries de medidas realizadas as preparações das amostras foram feitas a partir da preparação de uma solução estoque de 25mL de SDS 50,0mM, preparada a partir de 0,3604g de SDS diluídos em água MiliQ. Vale observar que a massa molar de SDS é de 288,3239 g/mol, cuja fórmula molecular é $C_{12}H_{25}O_4SNa$. Uma representação gráfica pode ser observada na Figura 6.4.

Figura 6.4: Representação estrutural em duas dimensões da molécula de SDS.

Para cada amostra era primeiramente verificado qual o volume de água necessário para se conseguir uma atividade de ^{111}In suficiente para a medida. Depois era determinado qual o volume de solução estoque necessário para se formar uma solução com a concentração desejada de SDS.

6.2.1 Soluções com Metanol

Para esta série de medidas são apresentados os resultados com as amostras organizadas de acordo com as concentrações de SDS em relação ao volume de

água das soluções. Os valores para as concentrações das amostras assim como os respectivos volumes tanto de solução aquosa de SDS quanto de metanol são apresentados na Tabela 6.2. As amostras estão organizadas dessa maneira devido ao fato de quando preparadas inicialmente pensava-se que os núcleos de ^{111}In estavam diluídos em uma solução aquosa. Após descobrir-se que estavam na verdade diluídos em metanol, reorganizaram-se as amostras de acordo com a concentração de SDS em solução aquosa.

Tabela 6.2: Dados sobre as soluções preparadas para a primeira série de medidas. Na primeira coluna, as amostras são identificadas pela concentração molar da respectiva solução aquosa de SDS.

Amostra	Volume de SDS (μL)	Volume de metanol (μL)
0,22mM	1,0	1,0
1,0mM	10,0	10,0
2,63mM	19,0	1,0
3,08mM	26,0	1,0
4,50mM	5,0	5,0
4,70mM	19,0	1,0
5,49mM	5,0	5,0
5,96mM	20,0	1,0
6,49mM	5,0	5,0
10,0mM-1	5,0	1,0
10,0mM-2	9,0	1,0
50,0mM	20,0	2,0

Nas Figuras 6.5 e 6.6 são apresentadas as funções perturbação experimentais em relação ao tempo para cada amostra desta série de medidas. Os gráficos são apresentados na ordem correspondente à da Tabela 6.2. Neles também é explicitado o volume de metanol contido em cada amostra e o valor de concentração corresponde somente à concentração de solução aquosa de SDS. Vale observar que todas as medidas foram realizadas à temperatura ambiente.

Figura 6.5: Funções perturbação para medidas com amostras de SDS que continham metanol, à temperatura ambiente. É possível identificar cada amostra pela respectiva concentração de SDS. Neste caso tem-se gráficos da amostra 0,22mM até a 4,7mM.

Figura 6.6: Funções perturbação para medidas com amostras de SDS que continham metanol, à temperatura ambiente. É possível identificar cada amostra pela respectiva concentração de SDS. Neste caso tem-se gráficos da amostra 5,49mM até a 50,0mM.

É possível notar visualmente mudanças de comportamento para as amostras. Porém a forma das curvas são diferentes das observadas com as medidas que haviam sido realizadas utilizando-se amostras de lipídios (Figuras 6.2 e 6.3), nas quais havia uma presença clara de interações dinâmicas, ou seja,

o gradiente de campo elétrico variava com o tempo. Visualmente notava-se que a curva tinha uma tendência de queda assintótica a zero. No caso das amostras de SDS, este comportamento não pode ser notado visualmente. Em geral, o que pode ser percebido nestas amostras é, por exemplo, uma variação da frequência quadrupolar em alguns casos. Um indicador para este parâmetro é a inclinação inicial nas curvas. Quanto mais acentuada, maior será a frequência quadrupolar, ou seja, maior será o gradiente de campo elétrico na vizinhança do núcleo de ^{111}In . Aparentemente, para a maior parte dos casos a curva tem a forma esperada para uma solução na qual não há interação quadrupolar, como na Figura 5.5. É possível fazer esta identificação com as amostras 0,22mM, 5,49mM e 6,49 com mais firmeza. Para as amostras 4,5mM, 4,7mM, 5,96mM, 10,0mM e 50,0mM parece haver interação, porém com uma frequência baixa.

Apenas visualmente é difícil verificar alguma sistemática de comportamento, pois o volume de metanol, por exemplo, é um parâmetro que varia para cada amostra. É possível notar que nas amostras com 10,0mM de SDS (Figura 6.6) há uma pequena diferença nas curvas obtidas, o que pode indicar que talvez a proporção de metanol na amostra possa ser um parâmetro que influencie na estrutura das moléculas. Para verificar esta hipótese seria necessário realizar medidas variando este parâmetro com uma sistemática bem definida.

Foram realizados ajustes para os espectros das Figuras 6.5 e 6.6. Os resultados são apresentados na Tabela 6.3. Foi utilizado também o programa (*Fitlast*) que é utilizado no CRPq-IPEN.

Tabela 6.3: Resultados para a primeira série de medidas, na qual as amostras continham metanol. Na primeira coluna, as amostras são identificadas pela concentração molar da respectiva solução aquosa de SDS. Na tabela, p_1 e p_2 representam a probabilidade de ocupação do sítio 1 e 2, respectivamente. Para todas as amostras o valor do parâmetro de assimetria (η) é nulo. ν_q1 e ν_q2 são as frequências ajustadas para cada um dos sítios.

Amostra	a_0	anisotropia	$\nu_q1(MHz)$	δ_1	$\lambda_1(ns^{-1})$	p_1	$\nu_q2(MHz)$	δ_2	p_2	$\chi^2_{reduzido}$
0,22mM	0,0415(4)	0,0063(5)	11,6(12)	0,2	—	1	—	—	—	1,12
1,0mM	0,0304(7)	0,0537(24)	72,6(22)	0,3	0	0,482(13)	12,8(6)	0,3	0,518(13)	1,03
2,63mM	0,0589(14)	0,076(3)	128,1(20)	0,752(25)	9,4(19)	1	—	—	—	1,08
3,08mM	0,0544(5)	0,0317(16)	69,0(19)	0,2	0	0,489(17)	12,3(6)	0,2	0,511(17)	1,68
4,50mM	0,08914(25)	0,0067(4)	12,8(8)	0,2	0	1	—	—	—	0,97
4,70mM	0,0732(4)	0,0126(9)	53,6(26)	0,2	0	0,456(28)	9,8(9)	0,2	0,544(28)	1,36
5,49mM	0,0909(5)	0,0058(6)	10,4(12)	0,2	0	1	—	—	—	1,09
5,96mM	0,07912(19)	0,0064(4)	18,6(12)	0,2	0	1	—	—	—	0,99
6,49mM	0,08595(5)	0,0054(6)	10,1(13)	0,2	0	1	—	—	—	0,83
10,0mM-1	0,0826(6)	0,0146(9)	45,5(16)	0,2	0	0,490(23)	8,7(9)	0,2	0,510(22)	1,00
10,0mM-2	0,0804(4)	0,0058(10)	13,8(16)	0,2	0	1	—	—	—	0,99
50,0mM	0,0625(3)	0,0167(6)	46,9(11)	0,2	0	0,420(15)	10,0(5)	0,2	0,579(15)	0,83

Para essas curvas, em geral não era possível obter uma estimativa para o parâmetro δ (Equação (2.13)), pois não há uma distribuição de frequências muito bem definida para a frequência quadrupolar. As distribuições de frequências quadrupolares não são compatíveis com distribuições gaussianas, o que impede a obtenção da largura desta distribuição, que é o parâmetro em questão. Este efeito já era esperado pela forma das curvas. Isto pode ocorrer devido a uma interação muito fraca ou aos efeitos, citados no capítulo 2, que podem causar variação do gradiente de campo elétrico. A segunda opção foi verificada e não foi possível ajustar um decaimento exponencial acoplado. Sendo assim, nestes casos foram usados valores fixos que permitiam a convergência do ajuste. Um fator limitante que dificultou a realização dos ajustes para estes gráficos é que a maioria deles apresenta interações muito fracas. Apenas as amostras 1,0mM, 2,63mM e 3,08mM (Figura 6.5) apresentaram uma interação mais definida. Nos outros casos a função perturbação se comporta como se os núcleos de ^{111}In não estivessem ligados às moléculas de SDS, ou seja, como se estivessem em meio a uma solução sem ligantes como é o caso das amostras da Figura 5.5.

É possível concluir com estes resultados que para algumas situações ocorre uma interação mais intensa com o núcleo de prova. O que pode ser feito em uma próxima abordagem é congelar as amostras para verificar se as ligações do $^{111}\text{In}^{3+}$ estão ou não ocorrendo realmente com as moléculas de SDS para os casos em que aparentemente não estão.

6.2.2 Soluções Aquosas

Para a segunda série de medidas diluiu-se o ^{111}In somente em água. Nesta série de medidas tentou-se realizar uma espécie de varredura de concentrações, preparando-se amostras desde 0,05mM até 10,0mM, para tentar atingir uma grande variedade de concentrações.

Tinha-se como objetivo tentar verificar se com a técnica PAC seria possível observar algum efeito devido ao sistema atingir a concentração micelar crítica.

As curvas para função perturbação são apresentadas na Figura 6.7. Em cada gráfico é indicado qual a concentração de SDS usada.

Figura 6.7: Funções perturbação experimentais para amostras de SDS compostas de soluções aquosas, à temperatura ambiente.

Para as amostras correspondentes aos espectros das figuras acima todas as medidas também foram realizadas à temperatura ambiente.

É possível notar visualmente mudanças na função perturbação em função da concentração das soluções. Porém são mudanças sutis. É possível notar que a partir da amostra 4,0mM até 10,0mM as curvas podem ser mais identificadas com uma situação na qual não ocorreu ligação entre os íons $^{111}\text{In}^{3+}$ e as moléculas de SDS. Até a amostra 2,67mM é observada uma interação, porém com uma frequência não muito bem definida, tanto que novamente não foi possível ajustar o parâmetro δ para os gráficos (Tabela 6.4).

Como as frequências obtidas para as amostras, na maior parte dos casos, são compatíveis entre si, não é possível concluir quantitativamente a respeito da concentração micelar crítica. Porém, observando os gráficos pode-se dizer que há uma mudança de comportamento da concentração 2,67mM para a de 4,0mM, a partir da qual o regime se mantém. Isto pode ser um indício de que o sistema tenha sofrido uma mudança de comportamento. Porém ainda não foi possível quantificar. Dessa forma, este é o indicativo mais próximo da concentração micelar crítica que pôde ser observado. Talvez seja necessário realizar mais medidas em torno dessas concentrações à temperatura ambiente. A concentração crítica esperada é de aproximadamente 8mM para solução aquosa a essa temperatura[26].

Na Tabela 6.4 são apresentados os resultados obtidos por meio de ajustes das funções correspondentes aos gráficos da Figura 6.7. Como pode ser observado, os parâmetros obtidos para as curvas variam pouco, porém não é possível notar comportamentos sistemáticos claros. Para estas amostras também ocorre o mesmo efeito que para as amostras com metanol: as curvas têm a forma de uma constante o que indica que aparentemente o os íons $^{111}\text{In}^{3+}$ não se ligaram às moléculas de SDS.

Tabela 6.4: Resultados para a segunda série de medidas, na qual as amostras eram compostas apenas por solução aquosa. Na primeira coluna, as amostras são identificadas pela concentração molar da respectiva solução de SDS. Na tabela, p_1 e p_2 representam a probabilidade de ocupação do sítio 1 e 2, respectivamente. Para todas as amostras o valor de η é nulo. ν_q1 e ν_q2 são as frequências ajustadas para cada um dos sítios.

Amostra	a_0	anisotropia	$\nu_q1(MHz)$	δ_1	p_1	$\nu_q2(MHz)$	δ_2	p_2	$\chi^2_{reduzido}$
0,05mM	0,0833(5)	0,0208(16)	78(4)	0,4	0,514(18)	10,4(9)	0,4	0,486(18)	0,96
0,20mM	0,0719(5)	0,0244(17)	69(3)	0,3	0,562(23)	12,6(13)	0,3	0,438(23)	0,79
1,0mM	0,06683(27)	0,0249(9)	74,3(17)	0,3	0,541(11)	13,5(6)	0,3	0,459(11)	1,12
2,67mM	0,0667(5)	0,0308(15)	71,8(25)	0,3	0,510(16)	12,6(8)	0,3	0,490(16)	0,95
4,0mM	0,09120(29)	0,0094(5)	50,6(23)	0,3	0,458(19)	8,7(8)	0,3	0,542(19)	0,98
8,0mM	0,0886(6)	0,0134(19)	72(7)	0,3	0,50(4)	11,6(18)	0,3	0,50(4)	0,97
10,0mM	0,0807(6)	0,0131(11)	55,3(4)	0,3	0,434(30)	8,8(11)	0,3	0,566(30)	0,96

Os resultados apresentados tanto para esta série de medidas quanto para a série anterior, mostram interações com dois sítios. Isto provavelmente se deve ao fato de o ^{111}In possuir carga 3+ o que permite que este íon se ligue a mais de uma molécula de SDS ao mesmo tempo. Por outro lado o fato as interações não serem bem definidas, pode ser simplesmente uma questão estatística para que o ajuste convirja. Outra possibilidade são os modelos que podem ser adotados para ajustar no programa, pois as curvas não são compatíveis com simples decaimentos exponenciais, por exemplo.

De qualquer forma, ficou claro que a técnica é sensível à variação da concentração das soluções e também à presença de metanol. Ainda pode-se abordar este assunto verificando características de SDS para diferentes meios. Uma possibilidade seria realizar medidas com soluções compostas somente de metanol para comparar com os resultados obtidos.

Um fator importante pode ter sido foi a temperatura. Como estávamos interessados na determinação de CMC, este parâmetro não foi variado. Para melhorar os resultados, poder-se-ia também formar um meio que não prejudicasse a agregação das moléculas ao mesmo tempo impedisse a mobilidade das mesmas para se ter certeza que este efeito não interferiu.

6.3 Medidas com a Proteína Calmodulina

A proteína calmodulina possui quatro sítios metálicos por meio dos quais pode se ligar com o íon Ca^{2+} ou pode se ligar ou regular outras proteínas. Em células eucariotas sua expressão é essencial para realização de mitose. A calmodulina funciona como receptora intracelular de Ca^{2+} e também atua como segundo mensageiro de sinais deste íon, ligando-se ou alterando a atividade de outras proteínas, participando assim, do mecanismo de resposta celular a estímulos externos [27]. Na Figura 6.8 é apresentada uma representação em três dimensões dessa proteína [28].

No caso de se trabalhar com a técnica PAC, dependendo de como ocorre a ligação do núcleo de prova, pode-se extrair informações sobre os mecanismos de regulação, já que a calmodulina é capaz de interagir com um número muito grande de proteínas. Outra possibilidade seria produzir alterações estruturais

nas proteínas por meio de radiações ionizantes, com o uso da nova linha de feixe, e acompanhar sua atuação posterior, por meio da técnica de correlações angulares perturbadas ou ainda por meio de espectrometria de massas. Para um contato inicial com esta técnica, foi estabelecida uma colaboração com o professor Dr. Carlos Bloch da Embrapa em Brasília para que se tentasse iniciar um estudo complementar entre ela e a técnica PAC.

Figura 6.8: Representação tridimensional da proteína calmodulina [28]. As esferas indicam os íons Ca^{2+} .

Para a primeira medida o objetivo principal em relação à técnica PAC era verificar se ocorreria uma interação bem definida entre o núcleo de prova (^{111}In) e a proteína. Foram então realizadas medidas à temperatura ambiente e a 77K. As mesmas amostras foram depois levadas à Embrapa para se realizar uma medida com um espectrômetro de massas MALDI TOF-TOF modelo *Ultraflex II* fabricado pela Bruker (ver seção 6.3). Neste caso as medidas tinham como objetivo verificar primeiramente se na amostra realmente havia a proteína calmodulina (resultado essencial para validar os resultados obtidos com a técnica PAC) e depois verificar se haveria um deslocamento de massa em relação à massa da proteína proporcional à massa do ^{111}Cd .

Preparação Inicial das Amostras

A calmodulina utilizada foi comprada da empresa Sigma. Ela estava liofilizada num frasco que continha cerca de $60\mu g$. Primeiramente era necessário realizar um processo de diálise para se remover os íons Ca^{2+} , de forma que quando fossem realizadas as medidas com ^{111}In não houvesse competição entre eles. O processo de diálise das amostras foi realizado no Centro de Biologia Molecular do IPEN-SP, com o auxílio da professora Dra. Maria Aparecida Camillo.

Inicialmente era necessário tratar a membrana semi-permeável para diálise, que tinha porosidade entre 10 e 12kDa. Para isso, ela foi submetida a uma solução de bicarbonato de amônio 2% e EDTA 1,0mM a $95^{\circ}C$ por 10 minutos. Em seguida foi lavada com água MiliQ. Paralelamente a este procedimento, foi preparada uma solução 100mM de EDTA de diálise com um volume de 2L.

Após o tratamento da membrana a proteína foi solubilizada em 1,0mL de água MiliQ. Foi separado um volume de $100\mu L$ de solução para controle que logo em seguida foi levada a uma centrífuga de evaporação a vácuo para promover o secamento da solução de forma que ficasse no frasco apenas a proteína. O restante foi depositado na membrana de diálise, que por sua vez foi colocada na solução de EDTA.

O processo de diálise com EDTA foi realizado em duas etapas com uma solução de diálise de 1L de cada vez, ambas a $4^{\circ}C$. A primeira etapa durou cerca de 6 horas e a segunda, cerca de 14 horas. Após estes dois processos, foi realizado mais um processo de diálise com água MiliQ por mais 8 horas para se remover o EDTA que havia dentro da membrana.

Terminado esse processo, retirou-se a solução do saco de diálise, que agora era de 2,2mL. Esta solução foi dividida em 5 frascos com $40\mu L$ para as medidas de PAC, 2 frascos com $800\mu L$ e 1 frasco com $400\mu L$ para medidas de espectrometria de massas. Todos os frascos foram colocados na centrífuga de evaporação para que a água fosse eliminada, pois era mais adequado para esta proteína. Após a secagem os frascos foram mantidos a uma temperatura de cerca de $-20^{\circ}C$.

Medidas no CRPq-IPEN

No CRPQ-IPEN foram realizadas primeiramente três medidas à temperatura ambiente com amostras em iguais condições, pois tinha-se como objetivo medir em triplicatas em um espectrômetro de massas posteriormente. Para elas foram depositados, nos frascos que continham a calmodulina liofilizada após passar pela diálise, $40\mu L$ de solução (traço) aquosa de InCl_3 .

As funções perturbação experimentais para essas três amostras são apresentadas na Figura 6.9.

Figura 6.9: Funções perturbação para as três primeiras amostras de calmodulina com $40\mu L$ a $295K$.

Pode-se observar visualmente que as três curvas na Figura 6.9 são muito parecidas, o que indica que as amostras eram similares. Mais adiante isto é mostrado em análise quantitativa.

Para uma quarta amostra, primeiramente foi realizada uma medida com uma solução menos diluída, com $5\mu\text{L}$ de volume. Em seguida adicionaram-se mais $5\mu\text{L}$ para realizar uma segunda medida. Como não foi possível observar alteração visual de uma para a outra e nem em relação às três primeiras, adicionaram-se mais $30\mu\text{L}$ para formar uma solução de $40\mu\text{L}$ similar às anteriores. Por fim, realizamos uma medida à temperatura de nitrogênio líquido (77K) para tentar verificar o comportamento da molécula sob um regime de menor mobilidade. Na Figura 6.10 são apresentados os quatro espectros de $A_2G_2(t)$ obtidos. Vale observar que após serem realizadas as medidas com a técnica PAC, as amostras foram novamente secadas.

Figura 6.10: Quarta amostra de calmodulina com $5\mu\text{L}$, $10\mu\text{L}$ e $40\mu\text{L}$ a 295K e $40\mu\text{L}$ a 77K .

Como pode ser notado na Figura 6.10, com as medidas de PAC foi possível observar uma interação mais bem definida a 77K . Foram obtidos dois compor-

tamentos bem distintos para a temperatura ambiente e para a de nitrogênio líquido, o que indica que há uma mobilidade significativa das moléculas à temperatura ambiente.

Foram realizados ajustes, também com o programa *Fitlast*, para as medidas com calmodulina e os resultados podem ser observados na Tabela 6.5. Para as medidas à temperatura ambiente não há distribuições de frequências quadrupolares bem definidas e novamente foi necessário fixar o parâmetro δ para que se tivesse um ajuste que convergisse. De qualquer forma as amostras que foram medidas à temperatura ambiente e preparadas de forma equivalente, com volume de $40\mu L$ de solução, apresentam resultados compatíveis entre si dentro das incertezas experimentais.

A amostra que foi medida a $77K$ apresenta uma frequência quadrupolar mais bem definida e de maior intensidade. Neste caso, o parâmetro δ pôde ser ajustado. As proporções para as probabilidades de população dos dois sítios ajustados são muito diferentes das obtidas para as outras amostras. Além disso, o parâmetro de assimetria é diferente de zero, o que indica uma geometria não axial.

Tabela 6.5: Resultados para as medidas com calmodulina. Na primeira coluna, as amostras são identificadas pelo nome correspondentes aos apresentados nos gráficos. Na tabela, p_1 e p_2 representam a probabilidade de ocupação do sítio 1 e 2, respectivamente. ν_q1 e ν_q2 são as frequências ajustadas para cada um dos sítios.

Amostra	a_0	anisotropia	$\nu_q1(MHz)$	η_1	δ_1	p_1	$\nu_q2(MHz)$	δ_2	p_2	$\chi^2_{reduzido}$
1	0,0524(9)	0,044(14)	42,1(44)	0	0,4	0,304(15)	7,71(15)	0,4	0,696(15)	1,19
2	0,0522(10)	0,0432(13)	35,7(14)	0	0,3	0,325(14)	7,03(38)	0,3	0,675(14)	0,90
3	0,0512(7)	0,0443(12)	42,8(16)	0	0,3	0,316(11)	7,5(3)	0,3	0,684(11)	0,81
4-5 μL	0,0444(10)	0,0498(23)	53,9(34)	0	0,3	0,300(16)	8,4(4)	0,3	0,700(16)	0,87
4-10 μL	0,0415(9)	0,0508(11)	33,0(12)	0	0,4	0,320(11)	6,02(26)	0,4	0,680(11)	1,24
4-40 μL	0,0488(9)	0,0444(13)	36,4(18)	0	0,4	0,317(15)	6,68(38)	0,4	0,683(15)	0,84
4-77K	-0,004(7)	0,097(34)	150(3)	0,444(23)	0,591(24)	0,9444(8)	10,4(26)	0,5	0,056(8)	1,08

Espectrometria de Massas

A técnica de espectrometria de massas tem ganho uma grande aceitação como ferramenta para o estudo de proteínas nos últimos anos, pois é capaz de fornecer informações adicionais às obtidas por meio de técnicas como a técnica de ressonância magnética nuclear (NMR) e cristalografia.

Existem diversos tipos de técnicas de espectrometria de massas utilizadas, tais como *Matrix-assisted laser desorption ionization* (MALDI), *Electrospray* (ESI), *Hydrogen/deuterium exchange* (HDX), etc. Cada uma delas possui vantagens e desvantagens específicas. A técnica MALDI, por exemplo, possui uma sensibilidade superior (sensível a sub-picomolar) em relação às técnicas ESI [29].

A técnica de espectrometria de massas utilizada para fazer medidas com a proteína calmodulina foi a técnica MALDI. Foi utilizado um espectrômetro fabricado pela Bruker, modelo *Ultraflex II* MADI TOF-TOF, que usa a técnica MALDI aliada à medida de tempo de voo.

Para essa técnica é usado um feixe de laser que incide sobre a amostra para que as moléculas sejam lançadas ao tubo de voo (Figura 6.11).

Figura 6.11: Esquema simplificado do funcionamento de um espectrômetro de massas MALDI com tempo de voo. Na região de voo sem a ação de forças são representadas moléculas carregadas positivamente de tamanhos diferentes para indicar que as mais leves chegam antes no detector em D.

No caso da Figura 6.11, a amostra é fixada em uma placa juntamente com uma solução de matriz, que é composta de substâncias que têm facilidade em

perder prótons. Ao incidir sobre a amostra o feixe de laser fornece energia para o sistema amostra mais matriz, o que provoca uma ejeção de moléculas ligadas a um ou mais prótons, dependendo da amostra, em direção à região de aceleração (região entre B e C na Figura 6.11). Quando a molécula carregada passa pela região C inicia-se a contagem do tempo de voo que é cessada quando a mesma atinge o detector em D. Durante o trajeto entre os pontos C e D não existe força atuando sobre as moléculas, o que permite se fazer uma relação entre o tempo que elas levam para atravessar o tubo de voo e a carga que elas possuem.

Para análises futuras de amostras de calmodulina, por exemplo, utilizando a técnica PAC e a técnica MALDI, pode-se fragmentar as moléculas e com isto verificar em qual sítio metálico ocorre maior substituição de Ca^{2+} por $^{111}\text{Cd}^{3+}$. A partir dessa informação pode-se extrair informações adicionais sobre as interações observadas com a técnica PAC, e conseqüentemente obter informações mais detalhadas sobre a proteína em estudo. É possível também irradiar as amostras e realizar medidas antes e após a irradiação para estudar as alterações das moléculas. Neste caso, medidas tanto por meio da técnica PAC quanto espectrometria de massa.

Medidas Realizadas na Embrapa

Para realizar medidas com espectrômetro de massa primeiramente foram preparadas soluções estoque adicionando um volume de $10\mu\text{L}$ de água destilada em cada frasco descrito anteriormente que continha calmodulina. Em seguida foi realizada uma diluição fracionada com proporções 1:10, 1:100 e 1:1000 a partir de cada frasco. Isto foi feito para garantir que haveria pelo menos uma série de cada amostra com concentração adequada para se formar a solução de matriz.

A matriz utilizada foi preparada com 5mg de Alfaciano, $250\mu\text{L}$ de acetoneitrilo, $200\mu\text{L}$ de água destilada e $50\mu\text{L}$ de TFA 3% em água.

Cada amostra a ser utilizada na placa do espectrômetro foi preparada com $2\mu\text{L}$ de solução de proteína mais $6\mu\text{L}$ de matriz. Em cada *spot* era depositado um volume de $0,5\mu\text{L}$ desta solução, sempre em triplicata de cada frasco.

Sendo assim, para cada frasco inicial foram utilizados 12 *spots* da placa, três para cada diluição contando com a solução inicial. Eram preparadas em triplicata para garantir que pelo menos um dos *spots* sofresse uma cristalização adequada.

Um espectro típico para as medidas realizadas pode ser observado na Figura 6.12.

Figura 6.12: Medidas com espectrômetro de massas MALDI. São apresentados espectros de massa sobre carga para amostras com ¹¹¹Cd (preto) e sem (vermelho). Os dois picos mais intensos (m/z aproximadamente 8400 e 16800) indicam as massas de vôo da proteína para duas cargas e para uma carga.

É possível notar entre os picos mais intensos (Figura 6.12) a existência de picos que não encontram correspondentes ao se comparar o gráfico da amostra que continha ¹¹¹Cd da que não continha. Ainda não foi possível tirar alguma conclusão em relação eles, pois estão em uma posição que não condiz com uma possibilidade de ligação entre ¹¹¹Cd e a proteína que produzisse um elemento com estas massas.

Era esperado que se observasse os picos da calmodulina deslocados de 111 unidades de massa no caso do pico *single charge* (mais à direita), por

exemplo. Porém isto não pôde ser observado. Uma explicação para isto é o fato de se utilizar uma quantidade de íons $^{111}\text{In}^{3+}$ nas amostras muito inferior à quantidade de proteínas. O espectrômetro de massa não é capaz de diferenciar as amostras que continham ^{111}Cd das que não continham nesta situação. Para melhorar este retrospecto, pode-se diminuir a concentração molar de proteína por amostra, pois o espectrômetro de massas é capaz de quantificar uma amostra com concentração bem inferior à que foi preparada. Outra possibilidade seria preparar amostras de comparação que contenham CdCl_2 na mesma proporção que a proteína.

De qualquer forma, com as medidas preliminares realizadas com calmodulina foi possível verificar que é possível estudar esta proteína por meio da técnica PAC. Também é possível fazer um estudo com amostras irradiadas na nova linha de feixe. Além disso, como as amostras foram preparadas sob uma única condição de meio, é possível verificar variações dos parâmetros obtidos com a técnica em função de características como pH, por exemplo.

Capítulo 7

Conclusões

Neste trabalho foi apresentado o novo espectrômetro PAC construído no Laboratório do Acelerador Pelletron do Instituto de Física da Universidade de São Paulo, com o objetivo de se estudar estruturas e interações de biomoléculas. Seu sistema de aquisição de dados e eletrônica é baseado no conceito de aquisição multiparamétrica padrão CAMAC. Diferentemente do usual, com esse espectrômetro é possível adquirir os espectros de energia dos raios gama da cascata do núcleo de prova. As coincidências são obtidas computacionalmente, processo que pode ser realizado durante o período de medidas. O espectrômetro também tem como diferencial o uso de QDC para integração de carga do sinal, dispensando o uso de pré-amplificadores. Para os espectros de tempo é usado um TDC que é capaz de obter as 30 combinações dos seis detectores em um único módulo. Como todas as informações do experimento ficam salvas em um computador pessoal, é possível reavaliar o mesmo de diferentes formas, pois tem-se total controle sobre ele.

A resolução em tempo do sistema como um todo é de $1,175(21)\text{ns}$. Este valor pode ser considerado um bom resultado dadas as dimensões dos detectores utilizados, com 3 polegadas de diâmetro por 6 polegadas de comprimento. A principal limitação do sistema está no fato de não haver um sistema de nível de discriminação superior para os sinais provenientes dos detectores, o que permitiria selecionar previamente as energias desejadas para análise, sendo usado apenas um nível de discriminação inferior. Dependendo do núcleo de

prova a ser utilizado, a eficiência do sistema pode ficar muito baixa, devido à alta taxa de eventos casuais.

Paralelamente à construção do espectrômetro do Laboratório Pelletron foram realizadas medidas com amostras de vesículas lipídicas, SDS e a proteína calmodulina. Para esta última também foram realizadas medidas de espectrometria de massas na Embrapa em Brasília.

Para as amostras de vesículas foi possível observar quantitativamente com a técnica PAC alterações na dinâmica das moléculas ao passá-las da conformação de vesículas para micelas. A diminuição no tamanho das moléculas causou um aumento de mobilidade que pôde ser notado pela variação do tempo de correlação rotacional. Ao mesmo tempo, a interação quadrupolar não sofreu alteração com a reorganização estrutural.

Em relação às amostras de SDS, foi possível notar variações no comportamento das curvas de função perturbação experimental, porém não foi possível notar variações sistemáticas. Verificou-se que há uma diferença clara de comportamento quando se altera o meio de água para água com metanol. No que diz respeito à concentração micelar crítica, não foi possível obter conclusões claras com as curvas obtidas.

Com a calmodulina foi possível notar uma diferença drástica de comportamento em relação à temperatura ambiente e a 77K, assim como para as amostras de vesículas. Os resultados obtidos foram satisfatórios, pois indicam que esta molécula é passível de ser estudada com a técnica PAC. As medidas de espectrometria de massas foram cruciais para verificar a presença da proteína nas amostras. Dessa forma, já se tem informações estruturais e dinâmicas sobre ela para uma situação simples, em meio aquoso.

Referências Bibliográficas

- [1] G. L. Catchen, MRS Bulletin, 20, No.07, 37-46 (1995);
- [2] L. Hemmingsen, K. Nárcisz Sas and E. Danielsen, Chemical Reviews, 104, 4027-4061 (2004);
- [3] T. K. Leipter, J. D. Baldeschwieler and D. A. Shirley, Nature, 220, 907-909 (1968);
- [4] R. Bauer, P. Limkilde and O. Glomset, Physical Review Letters, 32, 340-342 (1974);
- [5] R. D. Vis, A. J. J. Bos, S. Idzenga and H. Verheul, Nuclear Instruments and Methods, 163, 265-267 (1979);
- [6] C. Damblon, M. Jensen, A. Ababou, I. Barsukov, C. Papamichael, C. J. Schofield, L. Olsen, R. Bauer and G. C. K. Roberts, The Journal of Biological Chemistry, 278, 29240-29251 (2003);
- [7] E. Tsoulou, C. A. Kalfas and E. G. Sideris, Radiation Research, 159, 33-39 (2003);
- [8] R. Bauer, Quartely Review of Biophysics, 18, 1-64 (1985);
- [9] H. Frauenfelder and R. M. Steffen, Alpha-,Beta and Gamma-Ray Spectroscopy, North-Holland, Amsterdam, p997 (1965);
- [10] T. Butz, Hyperfine Interactions, 52, 189-228 (1989);
- [11] T. Wichert, Identification of Defects in Semiconductors, Volume 51B, Academic Press, San Diego, p297 (1999);

- [12] G. Schatz, A. Weidinger and J. A. Gardner, Nuclear Condensed Matter Physics - Nuclear Methods and Applications, John Wiley & Sons (1996);
- [13] C. Domienikan, Uma interface eletrônica para aquisição de 12 espectros de coincidências gama-gama atrasadas, São Paulo, Dissertação de Mestrado, CNEN-IPEN/SP (2001);
- [14] A. Baudry, P. Boyer, S. Choulet, C. Gamrat, P. Peretto, D. Perrin and R. Van Zurk, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A260, 160-164 (1987);
- [15] T. Butz, S. Saibene, TH. Fraenzke and M. Weber, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, A284, 417-421 (1989);
- [16] A. Bartos, K. Schimmerling, Th. Wenzel and M. Uhrmacher, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, A330, 132-139 (1993);
- [17] W. Klamra, Th. Lindblad and M. Moszyń and L. O. Norlin, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, A254, 85-87 (1987);
- [18] C. H. Herden, M. A. Alves, K. D. Becker and J. A. Gardner, Hyperfine Interactions, 159, 379-383 (2004);
- [19] C. Cottini, E. Gatti and V. Svelto, Nuclear Instruments and Methods, 24, 241-242 (1963);
- [20] W. R. Leo, Techniques for Nuclear and Particle Physics Experiments, Springer-Verlag, Berlin. Heidelberg (1987);
- [21] <http://www.root.cern.ch/>
- [22] O. A. M. Helene and V. R. Vanin, Tratamento Estatístico de Dados em Física Experimental, Edgard Blücher, 2^a ed., São Paulo, Brasil (1991);
- [23] R. L. Rasera, T. Butz, A. Vasquez, H. Ernst, G. K. Shenoy, B. D. Dunlap, R. C. Reno and G. Schmidt, J. Phys. F: Metal Phys., v8, n7, 1579-1589 (1978);

- [24] Yu. S. Popov, L. V. Zakharova, M. N. Markushin and G. A. Timofeev, Radiochemistry, 43, 6, 481-484 (2001);
- [25] Thomas H. Haines and Norbert A. Dencher, FEBS Letters 528, 35-39 (2002);
- [26] F. H. Quina, P. M. Nassar, J. B. S. Bonilha and B. L. Bales, J. Phys. Chem., 99, 17028-17031 (1995);
- [27] R. E. Zielinski, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 49, 697 (1998);
- [28] C. Ban, B. Ramakrishnan, K. Y. Ling, C. Kung, M. Sundaralingam, Acta Crystallographica, D50, 50-63 (1994);
- [29] I. A. Kaltashov and S. J. Eyles, Mass Spectrometry Reviews, 21, 37-71 (2002).