UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

TRANSIÇÃO SOL-GEL EM SOLUÇÕES ORGÂNICO-AQUOSAS DE
LISOZIMA E O EFEITO INDUTOR DO SOLVENTE:
CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA E ESTRUTURAL

MARCELO ALVES DA SILVA

TESE DE DOUTORADO

ORIENTADORA:
PROFA. DRA. ELIZABETH PINHEIRO GOMES ARÊAS

SÃO PAULO

2006

Agradecimentos

Aos meus pais, por onde tudo começou,

À Profa. Elizabeth P. G. Arêas pelo orientação e suporte ao longo do projeto,

Ao grupo do Prof. Omar El Seoud pela oportunidade de agregar uma visão nova dos sistemas por meio dos ensaios solvatocrômicos,

Ao grupo do Prof. John Mitchell, da Universidade de Nottingham pela oportunidade de usufruir da instalações e especialidades do seu grupo,

Ao Prof. E. Anoardo da Universidade Nacional de Córdoba pelos dados de relaxometria (FFC-NMR),

Ao LNLS pelo uso de suas instalações,

Às agências de fomento CNPq, pela bolsa de doutorado, e CAPES, pela bolsa de doutorado-sandwich.

Índice

Resumo	i
Abstract	ii
1. Objetivos	1
2. Introdução	2
2.1. Considerações iniciais	2
2.2. Sistemas de estudo	4
2.2.1. Proteínas	4
2.2.1.1. Aminoácidos	6
2.2.1.2. Ligações peptídicas	8
2.2.1.3. Conformação	9
2.2.1.4. Lisozima	9
2.2.2. Gelificação de proteínas globulares	11
2.2.2.1. Modelos de gelificação	12
2.2.2.1.1. Modelo clássico	12
2.2.2.1.2. Modelo de percolação	14
2.2.2.1.3. Métodos computacionais	15
2.2.3. Misturas binárias	17
2.2.3.1. Água	19
2.2.3.2. Tetrametiluréia	21
2.3. Técnicas empregadas	23
2.3.1. Reologia	23
2.3.1.1. Conceitos básicos	23
2.3.1.1.1. Sistemas de medidas reológicas	33

2.3.1.1.2. Principais testes reológicos	37
2.3.1.1.2.1. Testes rotacionais	37
2.3.1.1.2.2. Testes oscilatórios	39
2.3.2. Técnicas espectroscópicas	41
2.3.2.1. Termosolvatocromismo	42
2.3.2.2. Espectroscopia vibracional no infravermelho	45
2.3.2.2.1. Refletância total atenuada no infra- vermelho (ATR-IR)	46
3. Experimental	48
3.1. Materiais	48
3.1.1. Proteínas	48
3.1.2. Compostos deuterados	48
3.1.3. Solventes orgânicos	49
3.1.4. Sondas solvatocrômicas	49
3.2. Métodos	49
3.2.1. Reologia	49
3.2.1.1. Caracterização reológica dos géis de lisozima em TMU/água	49
3.2.1.1.1. Dependência do comportamento reológico em função da concentração e tempo	50
3.2.1.1.2. Análise da fractalidade	50
3.2.1.2. Cinética de gelificação dos sistemas lisozima/TMU/água por indução do meio	52
3.2.1.3. Cinética de gelificação dos sistemas lisozima/TMU/água por aquecimento	53

3.2.1.4. Energia de ativação aparente para o processo de gelificação	56
3.2.2. Espectroscopia vibracional no infravermelho	56
3.2.3. Microcalorimetria diferencial de varredura	57
3.2.4. Ressonância magnética nuclear de ciclagem rápida de campo (Fast-Field-Cycling NMR)	58
3.2.5. Solvacromismo	58
4. Resultados	60
4.1. Ensaios reológicos	60
4.1.1. Caracterização estrutural	60
4.1.1.1. Influência da composição do meio nas propriedades viscoelásticas dos géis	61
4.1.1.2. Fractalidade	72
4.1.2. Cinética de gelificação	76
4.1.2.1. Agregação por indução do solvente	76
4.1.2.2. Agregação por aquecimento	81
4.1.3. Energia de ativação	84
4.2. Técnicas espectroscópicas	88
4.2.1. Espectroscopia vibracional no infravermelho	88
4.2.2. RMN de ciclagem rápida (FFC-NMR)	93
4.2.3. Solvatocromismo	95
4.3. Ensaios Calorimétricos	108
5. Discussão	113
5.1. Interação solvente proteína	114
5.1.1. Dinâmica dos géis de lisozima em água/TMU	114

5.1.2. Análise da dimensionalidade dos géis de lisozima em TMU/água_____	118
5.1.3. Microestrutura dos géis de lisozima em TMU/água_____	120
5.1.4. Cinética de gelificação_____	123
5.1.4.1. Gelificação induzida por ação do meio_____	123
5.1.4.2. Gelificação induzida por calor_____	128
5.2. Microheterogeneidade do meio solvente binário: correlações com o processo de gelificação do sistema lisozima/TMU/água_____	131
6. Conclusões_____	135
7. Bibliografia_____	137

Índice de figuras

Fig. 2.1 - Estrutura básica de um aminoácido	6
Fig. 2.2 - Ligação peptídica	8
Fig. 2.3 - Efeito de ressonância da ligação peptídica	9
Fig. 2.4 - Estrutura cristalográfica da lisozima de clara de ovo Hélices α , folhas β e hélices 3_{10} são indicadas em vermelho, amarelo e ciano, respectivamente. Imagem adaptada de Schwalbe, <i>et al.</i> , 2001	10
Fig. 2.5 - Exemplo de estrutura em árvore utilizada pelo modelo clássico	13
Fig. 2.6 - Processo de gelificação visto pelo modelo de percolação	14
Fig. 2.7 - Exemplo de uma simulação em duas dimensões para o modelo de agregação monômero-agregado limitado por difusão (Meakin, 1988)	16
Fig. 2.8 - Tetrametiluréia	22
Fig. 2.9 - Modelo de placas paralelas	26
Fig. 2.10 - Exemplos de comportamentos reológicos para sistemas newtonianos e não-newtonianos	27
Fig. 2.11 - Esquemas de possíveis efeitos causados em sistemas pseudoplásticos sob uma dada tensão de cisalhamento (adaptado de Mezger, 1998)	28
Fig. 2.12 - Representação do comportamento segundo o modelo de Kelvin-Voigt	30
Fig. 2.13 - Representação do comportamento segundo o modelo de Maxwell	31
Fig. 2.14 - Representação esquemática de uma geometria de cilindros concêntricos	33

Fig. 2.15 - Representação esquemática de uma geometria de placas paralelas	34
Fig. 2.16 - Representação esquemática de uma geometria de cone-placa	35
Fig. 2.17 - Representação esquemática de um experimento oscilatório em um líquido Newtoniano	36
Fig. 2.18 - Representação esquemática de um experimento oscilatório em um sólido elástico Hookeano	37
Fig. 2.19 - Exemplo de curvas de fluência-recuperação (“creep-recovery”) para (a) sólido elástico, (b) líquido newtoniano e (c) material viscoelástico	38
Fig. 2.20 - Exemplo de relaxamento para sólidos elásticos (a), líquidos newtonianos (b) e materiais viscoelásticos (c)	39
Fig. 2.21 - Representação esquemática do efeito solvatocrômico da betaína de Reichardt (Reichardt, 1992)	44
Fig. 2.22 - Representação esquemática do efeito de reflexão total atenuada, com uma única reflexão interna	47
Fig. 3.1 - Perfil típico para os experimentos de determinação de tempo de gelificação para os sistemas lisozima/TMU/água. Nesse exemplo, $w_{TMU}=0,90$ e lisozima a 3,5 mmol/L. Os pontos indicados são resultados da média de 5 pontos experimentais	55
Fig. 3.2 - Curva típica da dependência dos módulos de armazenagem (G') e perda (G'') com o tempo. A linha preta representa o ajuste, por uma função exponencial, que guiou a escolha do tempo de gelificação (t_{gel}). A linha azul tracejada indica o valor arbitrário tomado para a determinação do t_{gel}	55

Fig. 4.1 - Varredura de amplitude para o sistema lisozima 6,0 mmol/L TMU/água a $w_{\text{TMU}}=0,90$. Amostra com 35 dias	63
Fig. 4.2 - Dependência de G' e G'' em função da concentração de lisozima para o sistema lisozima/TMU/água a $w_{\text{TMU}}=0,60$	63
Fig. 4.3 - Dependência de G' e G'' em função da concentração de lisozima para o sistema lisozima/TMU/água a $w_{\text{TMU}}=0,70$	64
Fig. 4.4 - Dependência de G' e G'' em função da concentração de lisozima para o sistema lisozima/TMU/água a $w_{\text{TMU}}=0,80$	64
Fig. 4.5 - Dependência de G' e G'' em função da concentração de lisozima para o sistema lisozima/TMU/água a $w_{\text{TMU}}=0,90$	65
Fig. 4.6 - Influência da w_{TMU} na variação dos de G' e G'' nos géis de lisozima/TMU/água (dados extraídos das Figuras 4.2 a 4.5)	65
Fig. 4.7 - Varreduras de frequência para o sistema lisozima/TMU/água a $w_{\text{TMU}}=0,60$ e lisozima: (a) 5,0 mmol/L, (b) 6,0 mmol/L, (c) 7,0 mmol/L e (d) 8,0 mmol/L	68
Fig. 4.8 - Varreduras de frequência para o sistema lisozima/TMU/água a $w_{\text{TMU}}=0,70$ e lisozima: (a) 4,0 mmol/L, (b) 5,0 mmol/L, (c) 6,0 mmol/L e (d) 7,0 mmol/L	68
Fig. 4.9 - Varreduras de frequência para o sistema lisozima/TMU/água a $w_{\text{TMU}}=0,80$ e lisozima: (a) 4,0 mmol/L, (b) 5,0 mmol/L, (c) 6,0 mmol/L e (d) 7,0 mmol/L	69
Fig. 4.10 - Varreduras de frequência para o sistema lisozima/TMU/água a $w_{\text{TMU}}=0,90$ e lisozima: (a) 4,0 mmol/L, (b) 5,0 mmol/L, (c) 6,0 mmol/L e (d) 7,0 mmol/L	69

Fig. 4.11 - Dependência dos tempos de relação (t_1 e t_2) em função da concentração de TMU no sistema lisozima (6,0 mmol/L)/TMU/água__70

Fig. 4.12 - Dependência dos tempos de relaxação (t_1 e t_2) em função da concentração de lisozima no sistema lisozima/TMU/água a: (a) $w_{\text{TMU}}=0,60$, (b) $w_{\text{TMU}}=0,70$, (c) $w_{\text{TMU}}=0,80$ e (d) $w_{\text{TMU}}=0,90$ _____70

Fig. 4.13 - Dependência dos módulos de armazenagem e perda (G' e G'') em função do tempo para o sistema lisozima (6 mmol/L)/TMU/água a: (a) $w_{\text{TMU}}=0,60$, (b) $w_{\text{TMU}}=0,70$, (c) $w_{\text{TMU}}=0,80$ e (d) $w_{\text{TMU}}=0,90$ _____71

Fig. 4.14 - Dependência dos tempos de relaxação (t_1 e t_2) com o tempo para os sistemas lisozima/TMU/água a: (a) $w_{\text{TMU}}=0,60$, (b) $w_{\text{TMU}}=0,70$, (c) $w_{\text{TMU}}=0,80$ e (d) $w_{\text{TMU}}=0,90$ _____71

Fig. 4.15 - Dependência da dimensão fractal (D_f) com o tempo para os sistemas lisozima/TMU/água a várias concentrações de TMU_____73

Fig. 4.16 - Dependência da tangente de perda ($\tan \delta$) com: (a) a fração de massa de TMU e (b) concentração de lisozima para os sistemas lisozima TMU/água_____74

Fig. 4.17 - Dependência do limite da região viscoelástica linear (γ_0) com concentração de lisozima para os sistemas lisozima/TMU/água a várias concentrações de TMU_____75

Fig. 4.18 -Influência da composição da mistura binária na dimensão fractal dos géis de lisozima em TMU/água_____75

Fig. 4.19 - Dependência dos tempos de gelificação com a concentração de lisozima no sistema lisozima/TMU/água a várias concentrações de TMU_____77

Fig. 4.20 - Dependência dos tempos de gelificação com a concentração de TMU no sistema lisozima/TMU/água a várias concentrações de lisozima_____	78
Fig. 4.21 - Dependência dos tempos de gelificação com a temperatura no sistema lisozima/TMU/água a várias concentrações de TMU_____	78
Fig. 4.22 - Curvas do ln do tempo de gelificação pelo recíproco da temperatura absoluta. Os valores de energia de ativação foram obtidos a partir dessas curvas_____	79
Fig. 4.23 - Influência da concentração de TMU na temperatura de gelificação (T_{gel}) do sistema lisozima/TMU/água_____	82
Fig. 4.24 - Dependência dos tempos de gelificação (t_{gel}) em função da concentração de lisozima a várias concentrações de TMU_____	83
Fig. 4.25- Dependência dos tempos de gelificação (t_{gel}) em função da concentração de TMU a várias temperaturas. A 10% (m/m) de lisozima nos sistemas_____	83
Fig. 4.26 - Curvas do ln do tempo de gelificação pelo recíproco da temperatura absoluta. Para os sistemas TMU/NaCl 100 mmol/L/lisozima a uma concentração de 10% (m/m) de proteína. Os valores de energia de ativação foram obtidos a partir dessas curvas_____	86
Fig. 4.27 - Dependência da energia de ativação (E_a) com a concentração de TMU para os sistemas lisozima/TMU/água com concentração de lisozima a 5,5 mMol/L. Gelificação induzida unicamente pela ação do solvente_____	86
Fig. 4.28 - Dependência da energia de ativação de gelificação do sistema lisozima/TMU/NaCl 100 mmol/L com a concentração de TMU. Gelificação induzida por aquecimento, facilitada por ação do solvente. A 10 % (m/m) de lisozima_____	87

- Fig. 4.29 - Dependência da energia de ativação de gelificação do sistema lisozima/água/TMU com a concentração de TMU. São apresentados os valores de E_a obtidos para os dois processos estudados _____ 87
- Fig. 4.30 - Espectros no infravermelho do sistema lisozima/água/TMU. Espectros coletados após 24 horas da preparação das amostras: (a) Amostras sem tratamento térmico. (b) Amostras submetidas a aquecimento a 85°C por 6 horas _____ 89
- Fig. 4.31 - Espectros no infravermelho deconvoluídos do sistema lisozima/água/TMU: (a) Amostras sem tratamento térmico. (b) Amostras submetidas a aquecimento a 85°C por 6 horas _____ 89
- Fig. 4.32 - Intensidades dos componentes da banda amida I no infravermelho atribuídas a hélices α (■) e folhas β (●) para lisozima (10% m/m) em TMU/NaCl 100 mmol/L. (a) Sistemas sem tratamento térmico. (b) Sistemas aquecidos a 85°C por 6 horas. Espectros registrados a temperatura ambiente _____ 91
- Fig. 4.33 - Espectros no infravermelho de: (a) lisozima 10% (m/m) em TMU/NaCl 100 mmol/L a $w_{TMU}=0,30$ e a 40°C; (b) lisozima 7% (m/m) em água/TMU a $w_{TMU}=0,60$ a 25°C. Espectros registrados a cada 7 minutos por períodos longos o suficiente para garantir a gelificação do sistema: (a) 4500 s e (b) 3000 s _____ 92
- Fig. 4.34 - Perfil de dispersão de relaxação magnética nuclear (nuclear magnetic relaxation dispersion NMRD) para o sistema lisozima (5,0 mmol/L)/DMSO_{d6}/D₂O à várias concentrações de DMSO_{d6} _____ 94
- Fig. 4.35 - Estruturas das sondas (a) RB e (b) MC _____ 96

Fig. 4.36 - Polaridade microscópica da mistura TMU/água em escala reduzida a várias temperaturas. Polaridades medidas a partir da observação do efeito solvatocrômico da sonda RB. A linha reta contínua indica o valor da polaridade caso os sistemas apresentassem comportamento ideal_____97

Fig. 4.37 - Polaridade microscópica da mistura TMU/metanol (MeOH) em escala reduzida a várias temperaturas. Polaridades medidas a partir da observação do efeito solvatocrômico da sonda RB. A linha reta contínua indica o valor da polaridade caso os sistemas apresentassem comportamento ideal_____98

Fig. 4.38 - Polaridade microscópica da mistura TMU/1-propanol (1-PrOH) em escala reduzida a várias temperaturas. Polaridades medidas a partir da observação do efeito solvatocrômico da sonda RB. A linha reta contínua indica o valor da polaridade caso os sistemas apresentassem comportamento ideal_____99

Fig. 4.39 - Polaridade microscópica da mistura TMU/2-butoxietanol em escala reduzida a várias temperaturas. Polaridades medidas a partir da observação do efeito solvatocrômico da sonda RB. A linha reta contínua indica o valor da polaridade caso os sistemas apresentassem comportamento ideal_____100

Fig. 4.40 - Polaridade microscópica da mistura TMU/água em escala reduzida a várias temperaturas. Polaridades medidas a partir da observação do efeito solvatocrômico da sonda MC. A linha reta contínua indica o valor da polaridade caso os sistemas apresentassem comportamento ideal_____101

Fig. 4.41 - Polaridade microscópica da mistura TMU/metanol em escala reduzida a várias temperaturas. Polaridades medidas a partir da observação do efeito solvatocrômico da sonda MC. A linha reta contínua indica o valor da polaridade caso os sistemas apresentassem comportamento ideal_____102

Fig. 4.42 - Polaridade microscópica da mistura TMU/1-propanol em escala reduzida a várias temperaturas. Polaridades medidas a partir da observação do efeito solvatocrômico da sonda MC. A linha reta contínua indica o valor da polaridade caso os sistemas apresentassem comportamento ideal_____103

Fig. 4.43 - Polaridade microscópica da mistura TMU/2-butoxietanol em escala reduzida a várias temperaturas. Polaridades medidas a partir da observação do efeito solvatocrômico da sonda MC. A linha reta contínua indica o valor da polaridade caso os sistemas apresentassem comportamento ideal_____104

Fig. 4.44 - Polaridade microscópica da mistura binária TMU/cossolvente, onde o co-solvente é: (a) água, (b) metanol, (c) 1-propanol e (d) 2-butoxietanol, em escala empírica $E_T(30)$ a várias temperaturas. Polaridades obtidas a partir da observação do efeito solvatocrômico da sonda RB_____106

Fig. 4.45 - Polaridade microscópica da mistura binária TMU/cosolvente, onde o co-solvente é: (a) água, (b) metanol, (c) 1-propanol e (d) 2-butoxietanol, em escala empírica $E_T(MC)$ a várias temperaturas. Polaridades obtidas a partir da observação do efeito solvatocrômico da sonda MC_____107

Fig. 4.46 - Termogramas de micro-DSC obtidos para lisozima (a) 0,5% e (b) 10% em TMU/NaCl 100 mmol/L_____110

Fig. 4.47 - Comportamento calorimétrico da lisozima em TMU/NaCl 100 mmol/L. (a) Temperatura de denaturação da lisozima, a duas concentrações de lisozima, no sistema TMU/NaCl 100 mmol/L. (b) Entalpias de denaturação de lisozima, a duas concentrações de lisozima, no sistema TMU/ NaCl 100 mmol/L_____111

Fig. 4.48 - (a) Termogramas de DSC indicando a reversibilidade do processo de denaturação da lisozima (0,5 % m/m) em água/TMU a $w_{\text{TMU}}=0,30$. Amostra submetida a sete ciclos completos de aquecimento e resfriamento. (b) Entalpia de denaturação da lisozima em TMU/ NaCl 100 mmol/L para cada ciclo_____112

Índice de tabelas

Tabela 2.1 - Frequências características de estruturas secundárias para proteínas em soluções aquosas. (Dong, <i>et al.</i> , 1990)	46
Tabela 4.1 - Tempos de gelificação, em minutos, para o sistema lisozima/TMU/água em função da composição dos sistemas	80
Tabela 4.2 - Tempos de gelificação, em minutos, para o sistema lisozima (5,5mol/L) /TMU/água em função da temperatura	80
Tabela 5.1 - Dimensão fractal do sistema lisozima/TMU/água em função de w_{TMU}	120
Tabela 5.2 - Valores de dimensão fractal (D_f) obtidos por simulação computacional	125
Tabela 5.3 - Dimensão fractal do sistema lisozima/TMU/água em função de w_{TMU} calculados a partir de dados reológicos obtidos nesta Tese	127
Tabela 5.4 - Valores de dimensão fractal (D_f) experimentais para diversos sistemas disponíveis na literatura	128
Tabela 5.5 - Valores de dimensão fractal (D_f) obtidos por simulação computacional considerando-se a possibilidade de reestruturação dos monômeros ou agregados, após uma colisão. O valor de R indica o número de reestruturações permitidas	128

Resumo

A transição sol-gel de lisozima dispersa em tetrametiluréia/água foi investigada em profundidade. Tais dispersões geraram sistemas de alta viscosidade que evoluíram para a formação de géis “físicos”, *i.e.*, sistemas de redes viscoelásticas mantidas por interações do tipo forças de van der Waals e ligações de hidrogênio. O enfoque deste trabalho foi dividido em duas frentes: a) estudo do sistema lisozima nas misturas binárias; b) estudo das misturas binárias indutoras do efeito de gelificação na ausência da proteína.

Realizou-se um estudo cinético e dinâmico das dispersões e géis por meio de experimentos reológicos, espectroscópicos e calorimétricos. A partir dos resultados reológicos procurou-se correlacionar as propriedades mecânicas macroscópicas dos géis com suas propriedades microscópicas, tendo sido possível estabelecer o caráter fractal dos agregados formados. Os estudos espectroscópicos no infravermelho permitiram acompanhar mudanças estruturais da proteína durante o processo de gelificação, revelando o efeito do meio na estruturação secundária da lisozima. Observou-se que a mistura binária tende a causar um aumento de conteúdo de folhas β na proteína quando acima da concentração crítica de fração de massa de tetrametiluréia em água ($w_{TMU} > 0,6$), com uma concomitante redução no teor de hélices alfa. Estudos calorimétricos revelaram uma dependência inversamente linear das entalpias e temperaturas de denaturação da lisozima com a concentração do co-solvente orgânico no sistema, observando-se ausência de qualquer evento térmico na região acima da concentração crítica do solvente misto.

Com a finalidade de se sondar as características dinâmicas e estruturais das misturas binárias responsáveis pela indução do efeito de gelificação em lisozima, foram realizados estudos solvatocrômicos envolvendo as misturas binárias tetrametiluréia/co-solvente, em que os co-solventes ensaiados foram água e alguns álcoois. A comparação entre o efeito solvatocrômico das misturas TMU/água e TMU/álcool permitiu verificar o caráter estruturador da TMU em meio aquoso e seu efeito desestruturador nos meios alcoólicos.

Abstract

Lysozyme sol-gel transition in tetramethylurea/water was investigated in depth. These dispersions produced highly viscous systems, which evolved to physical gels, *i.e.*, systems where the gel backbone is maintained by van der Waals forces and hydrogen bonding. The work was conducted in two fronts: a) the study of lysozyme dispersions in binary mixtures; b) the study of the binary mixtures themselves.

A kinetics and dynamical characterization of the dispersions and gels was undertaken by means of rheological, spectroscopic and calorimetric assays. In the light of the rheological data, correlations were proposed between the gel mechanical macroscopic behaviour and its microscopic properties. The fractal character of the gels was established and their dimensionality calculated. Infrared spectroscopic experiments revealed changes in the protein secondary structure during and well after the sol-gel transition induced by the binary solvent mixture. It was found that the binary mixture induces an increase in the β -sheet content with a concomitant reduction of the α -helix, when above its critical concentration, as expressed in mass fraction of tetramethylurea in the binary mixture ($w_{\text{TMU}} > 0.6$). Calorimetric studies revealed that both denaturation temperature and enthalpy decrease linearly with the increase of TMU mass fraction in the mixed solvent, with no thermal effect being noticed above the binary mixture critical concentration.

In order to investigate the dynamic and structural characteristics of the binary mixtures responsible for lysozyme sol-gel transition, solvatochromic assays were carried out for several TMU/co-solvent systems, where the co-solvents assayed were water and a few alcohols. Results revealed that TMU has structure-maker behaviour in water and structure-breaker behaviour in alcohol systems.

1. Objetivos

Este projeto teve por objetivo geral o estudo de misturas líquidas binárias, de caráter orgânico-aquoso, quanto à sua capacidade indutora de transições sol-gel em um sistema proteico globular. A finalidade do estudo foi a de se ampliar e aprofundar o conhecimento sobre a relação entre a dinâmica das transições observadas e características das redes viscoelásticas produzidas.

Como objetivos específicos, procurou-se:

- Caracterizar reologicamente as dispersões e os géis obtidos a partir dos sistemas lisozima em água/ tetrametiluréia;
- Investigar a cinética de gelificação desses sistemas;
- Investigar a influência da temperatura e da composição do meio no processo sol-gel;
- Caracterizar aspectos estruturais dos géis formados;
- Caracterizar a polaridade microscópica das misturas binárias água/tetrametiluréia e sistemas correlatos com capacidade indutora de gelificação.

2. Introdução

2.1. Considerações iniciais

O foco de estudo desta Tese é a transição sol-gel sofrida por lisozima em sistemas água/tetrametiluréia (TMU), gerando redes viscoelásticas mantidas por interações de caráter transiente (géis físicos). Trata-se de um sistema não usual, consistindo de proteína em um meio não biológico e uma mistura binária pouco estudada, quando comparada por exemplo com sistemas água/álcoois e água/dimetilsulfóxido (Marcus, 2002). Apesar disso, o estudo do processo sol-gel induzido pela TMU se insere em um contexto mais amplo e de relevância, qual seja, o complexo equilíbrio de forças que sustenta o enovelamento proteico e o papel da estrutura da água e da presença de solutos nesse equilíbrio.

A escolha desse sistema para estudo nesta Tese decorreu do desdobramento de investigações espectroscópicas a respeito da ação da uréia na denaturação de proteínas (Arêas, *et al.*, 1996b). O efeito denaturante da uréia é bem conhecido. Embora alvo de extensas investigações, o mecanismo da denaturação não é, no entanto, completamente compreendido. Na literatura encontram-se basicamente duas vertentes: de um lado sugere-se que haja uma interação preferencial entre a proteína e a uréia levando a uma de-solvatação da proteína (Schellman, 2002); de outro, sugere-se que a uréia quebre a rede de ligações de hidrogênio que estrutura a água. Essa desestruturação da água reduz o custo energético da formação de cavidades nesse líquido a fim de acomodar domínios apolares na solução (Frank e Franks, 1968; Franks, 2002). Dessa forma, torna-se mais fácil acomodarem-se regiões hidrofóbicas da proteína no meio aquoso, diminuindo a diferença de estabilidade entre a forma nativa e a desenovelada.

Um estudo do sistema lisozima em água/uréia por meio de espectroscopia vibracional Raman (Arêas, *et al.*, 1996b) evidenciou mudanças no perfil espectral da água induzidas pelos componentes do sistema. Sobreposições de contribuições espectrais da água e da uréia na região de 1650 cm^{-1} inviabilizaram a análise espectroscópica conforme inicialmente pretendido. A tetrametiluréia, em substituição à

uréia, surge como uma tentativa de se simplificar o estudo, removendo tais sobreposições, focalizando o estudo de interações por ligações de hidrogênio na região carbonílica da molécula orgânica. Como resultado da introdução da TMU no sistema, observou-se um acréscimo considerável da viscosidade das soluções de lisozima levando à formação de sistemas pseudoplásticos, posteriormente identificados como géis ‘físicos’ quando atingidas certas condições de concentração dos componentes do sistema (Arêas, *et al.*, 1996a). O enovelamento da lisozima mostrou-se bastante perturbado quando exposto ao meio água/TMU acima da concentração crítica de TMU necessária para deflagrar a pseudoplasticidade (Arêas, *et al.*, 1996a; Castelletto, *et al.*, 1998). Investigações a respeito da natureza da mistura binária mostraram que o efeito não se restringe apenas à TMU, mas inclui outros solventes orgânicos com certas características estruturais similares que também são capazes de deflagrar o processo (Arêas, *et al.*, 1996a; Arêas, *et al.*, 1999).

A respeito do papel da mistura binária como agente indutor do processo sol-gel, propôs-se a ocorrência de uma microestruturação da mistura binária, caracterizada por eventos de solvatação preferencial, levando à formação microdomínios de um dos componentes dispersos no componente em maior concentração (Arêas e Arêas, 1999). A perda da estrutura nativa da proteína e conseqüente agregação e gelificação do sistema a partir de uma concentração crítica do componente orgânico da mistura seria uma resposta da proteína a uma inversão de configuração da mistura binária, onde a partir de uma dada concentração os componentes dispersos coalescem e passam a formar a fase contínua, segregando o meio, antes contínuo, em microdomínios.

Em nosso projeto de Mestrado, realizado neste grupo (da Silva, 2001), ampliou-se a caracterização dos sistemas formados. Investigou-se o comportamento reológico dos géis (da Silva e Arêas, 2002) e, por espalhamento de raios X a baixo ângulo, sua estrutura microscópica (da Silva, *et al.*, 2002). Através de espectroscopia Raman e ensaios calorimétricos (da Silva e Arêas, 1999; da Silva, *et al.*, 2001) investigou-se a estruturação da mistura binária TMU/água.

Neste projeto de Doutorado, ampliaram-se os estudos sobre a estruturação microscópica do sistema binário TMU/água através de estudos solvatocrômicos.

Investigou-se também o comportamento de sistemas correlatos, mais especificamente algumas misturas TMU/álcool. A cinética do processo sol-gel e o efeito da temperatura na indução do processo na região subcrítica de TMU foram investigados por ensaios reológicos. Experimentos de microcalorimetria diferencial de varredura e espectroscopia no infravermelho foram também empregados na abordagem de aspectos termodinâmicos e estruturais do processo de gelificação, respectivamente.

2.2. Sistemas de estudo

2.2.1. Proteínas

A palavra proteína deriva do grego *proteios* (primário, em grego). Esse termo foi cunhado pelo químico Gerardus Johannes Mulder em 1838, a partir de uma sugestão de Jöns Jakob Berzelius para descrever uma nova substância que, segundo Mulder, estaria presente em todos os constituintes do corpo animal e provavelmente dos vegetais também (Mulder, 1839). Atualmente, o termo se refere a uma classe bem definida de biomoléculas formada a partir da combinação sequencial de aminoácidos através das chamadas ligações peptídicas, de forma similar a polímeros em relação aos seus monômeros. Devido a essa peculiar característica proteínas também são classificadas como biopolímeros.

Proteínas estão envolvidas em praticamente todos os processos biológicos, *e.g.*, contribuindo para o controle e andamento de reações bioquímicas na forma de enzimas, como arcabouço para estruturação de células e tecidos no papel de elementos estruturais, na resposta imunológica, no transporte de vários ligantes, entre outros. Elas possuem um papel indispensável ao funcionamento da vida como ela é conhecida, desde formas tão simples quanto vírus, quanto para organismos mais complexos como os animais. Juntamente com polissacarídeos, ácidos nucleicos e lipídios, as proteínas são os constituintes biológicos primários. Devido à sua óbvia importância para a vida, proteínas são alvo de extensas pesquisas científicas.

Dentre as características mais peculiares das proteínas está a sua capacidade de auto-organização. Proteínas são capazes de adquirir uma organização espacial única e

bem-definida, própria de cada tipo individual de proteína quando em condições similares ou bem próximas do ambiente ao qual a proteína está originalmente exposta. Essa capacidade de se auto-organizar é chamada de enovelamento. A forma final da estruturação da proteína em sua condição natural é chamada de enovelamento nativo ou estrutura nativa. O processo de enovelamento é claramente um processo rápido. A síntese da proteína *in vivo* pode chegar a taxas de 20 resíduos por segundo, e o tempo para a duplicação de uma célula bacteriana pode ser de não mais que 20 minutos. Levando em conta que o número de combinações possíveis para uma dada proteína chegar à forma nativa é gigantesco (por exemplo, para uma proteína genérica formada por 100 resíduos calcula-se aproximadamente 10^{18} conformações distintas; postulando-se que cada resíduo possa assumir apenas uma de duas conformações possíveis a uma velocidade de 10^{-11} s por conformação, para atingir um mínimo de energia por tentativa e erro seriam necessários 10^{30} anos (Dobson, *et al.*, 1998)) e que o processo de enovelamento ocorre em geral em frações de segundos, vemos-nos diante uma incongruência. Essa incongruência entre o número desproporcional de conformações possíveis que uma proteína pode assumir e o curtíssimo tempo que a mesma leva para encontrar uma específica conformação é normalmente chamado de paradoxo de Levinthal, devido a uma apresentação feita por Cyrus Levinthal em 1969 (Levinthal, 1969) sobre o assunto. Com base no paradoxo de Levinthal, fica claro que o enovelamento segue um processo bem específico.

Como demonstrado na literatura (Anfinsen, 1973), certas proteínas quando expostas a condições que induzem a perda da estruturação nativa, processo chamado de desnaturação, recuperam espontaneamente a conformação nativa quando recolocadas no ambiente original, similar ao da condição nativa, sem a necessidade de intermediários. Essas observações levaram alguns autores a postularem que o enovelamento da proteína é definido apenas pela sua composição química. (Ngo, *et al.*, 1994). Em alguns casos, proteínas são capazes de manter sua conformação nativa em meios distintos do da água, (Rariy e Klibanov, 1999; Griebenow e Klibanov, 1996) como é o caso da lisozima, capaz de manter sua estrutura nativa em glicerol (Rariy e Klibanov, 1996), indicando uma forte correlação entre a estrutura nativa e as propriedades do meio. Aparentemente,

as informações determinantes da estrutura nativa estão de alguma forma codificadas tanto na seqüência peptídica como na sua relação com o meio.

2.2.1.1. Aminoácidos

Proteínas são formadas pela ligação seqüencial de uma classe de moléculas denominadas de L- α -aminoácidos, ou simplesmente aminoácidos. Os aminoácidos possuem uma composição similar. Como o nome indica, possuem uma amina primária e um grupo carboxílico ligados ao mesmo carbono (carbono α) (Fig. 2.1). Uma exceção é a prolina, a qual é na verdade um iminoácido, uma vez que contém uma amina secundária ao invés de uma amina primária em sua estrutura, mas que por simplicidade também é denominada aminoácido. Também ligado ao carbono α há um hidrogênio e um grupo lateral (R). Os aminoácidos são classificados em função das características químicas e estruturais dos grupos R. Na natureza encontram-se vinte diferentes aminoácidos, *i.e.*, vinte diferentes grupos R.

Fig. 2.1 - Estrutura básica de um aminoácido.

Em pH fisiológico, os grupo amina e carboxílico estão completamente ionizados, logo, apresentam carga positiva e negativa. Moléculas com essas características são denominadas de zwitterions ou íons dipolares. Essa característica zwitteriônica dos aminoácidos lhes confere propriedades características de substâncias iônicas, como alta solubilidade em solventes polares e baixa em solventes apolares. A condição de pH que leva a uma neutralização das cargas da proteína chama-se ponto isoelétrico ou pI.

Os vinte aminoácidos básicos podem ser classificados em três grandes grupos, dependendo das características da cadeia lateral (R).

- Aminoácidos com cadeia lateral apolar.

- Aminoácidos com cadeia lateral sem carga.
- Aminoácidos com cadeia lateral ionizada.

As características das cadeias laterais são responsáveis pela capacidade de auto-organização das proteínas. A coexistência de domínios polares e apolares numa mesma molécula induz à segregação desses domínios do contato com o meio polar. A presença de espécies carregadas, doadoras e receptoras de ligações de hidrogênio, permite a formação de uma extensa rede de interações entre as cadeias laterais levando a uma estabilização da forma nativa (Voet e Voet, 1990). O delicado equilíbrio de todas essas interações, definidas pelo tipo da cadeia lateral e pela sua posição espacial, resulta na estabilização da estrutura nativa da proteína. Logo se percebe que elementos que possam perturbar esse equilíbrio, como, por exemplo, sais, exemplificado pela série de Hoffmeister (Cacace, *et al.*, 1997), mudanças das propriedades físico-químicas do meio, pH, polaridade do solvente, entre outros, podem ser utilizados como forma de se modular o comportamento da proteína através de modificações em sua conformação.

As proteínas podem ser divididas em dois grandes grupos: proteínas globulares e fibrosas. As proteínas globulares são macromoléculas aproximadamente esféricas e compactas, diversas quanto a aspectos de tamanho e função. Enzimas, proteínas de transporte e receptores constituem exemplos típicos. São solúveis em meios aquosos, com características coloidais. Proteínas fibrosas constituem sistemas em geral autoassociados, insolúveis em meio aquoso e de maior complexidade estrutural. Entre as proteínas fibrosas de origem animal, citamos o colágeno, a queratina e a elastina. Dentre aquelas de origem vegetal, temos como exemplo as proteínas do glúten e as ligninas, entre outras. Suas funções são muitas vezes estruturais, mas podem exercer outras funções como as de proteínas de reserva.

2.2.1.2. Ligações peptídicas

Os aminoácidos formam proteínas através da formação de ligações peptídicas entre o grupo amina de um aminoácido e grupo carboxílico de outro, seguido da eliminação de uma molécula de água (Fig. 2.2) (condensação) (Voet e Voet, 1990). Após a condensação, os aminoácidos passam a serem chamados de resíduos (pois não são mais aminoácidos, mas sim os resíduos dos aminoácidos originais) ou de unidades peptídicas. A ligação peptídica é metaestável, logo, em presença de água, a ligação sofre hidrólise espontaneamente, porém com uma velocidade de reação muito baixa. A cadeia peptídica possui uma direção determinada, devido à existência de terminações distintas no aminoácido, representadas pelos grupos amina e carboxílico. Por convenção, indica-se a o grupo amina terminal como o início da cadeia peptídica. Moléculas formadas por dois aminoácidos são chamadas de dipeptídeos, por três, tripeptídeos, por vários, oligopeptídeos. Usualmente, indica-se o peso molecular de proteínas em Daltons (D), sendo que 1 D equivale a 1 unidade de massa atômica.

Fig. 2.2 - Ligação peptídica.

A ligação peptídica possui uma estrutura planar rígida oriunda do efeito de ressonância da ligação peptídica (Fig. 2.3), a qual lhe confere um caráter de ligação dupla. Em consequência, a liberdade de torção da cadeia polipeptídica fica limitada às ligações $\text{C}_\alpha\text{-N}$ e $\text{C}_\alpha\text{-C}$, em torno portanto do carbono α . Devido a efeitos estéricos, a maioria dos grupos peptídicos tende a assumir a forma trans, pois esta apresenta uma energia mais favorável de cerca de 8 kJ.mol^{-1} em relação à conformação cis. Essa rigidez da cadeia polipeptídica juntamente com o favorecimento da conformação trans em relação à cis limitam as conformações acessíveis à cadeia peptídica. É possível especificar a conformação da cadeia por meio dos ângulos de torção das ligações $\text{C}_\alpha\text{-N}$

(ângulo ϕ) e C_{α} -C (ângulo ψ). Esse tipo de informação é comumente indicado via gráficos de Ramachandran, assim chamados em homenagem ao seu idealizador, G. N. Ramachandran.

Fig. 2.3 - Efeito de ressonância da ligação peptídica.

2.2.1.3. *Conformação*

A estrutura da proteína define a sua função biológica. Tradicionalmente, divide-se a estrutura da proteína em quatro níveis: primária, secundária, terciária e quaternária.

A estrutura primária é definida pela sequência de aminoácidos ao longo da cadeia polipeptídica. A estrutura secundária é dada pelo arranjo espacial da cadeia polipeptídica, sem se considerar as cadeias laterais. Esses arranjos podem se dar na forma de hélices, folhas, dobras (turns) e alças (loops), de geometrias diversas. A estrutura terciária é definida pelo arranjo tridimensional de toda a proteína, isto é, a disposição espacial de suas estruturas secundárias e de suas cadeias laterais. No caso de proteínas formadas por mais de uma unidade polipeptídica, *e.g.*, a hemoglobina, o arranjo espacial das subunidades é chamado de estrutura quaternária.

2.2.1.4. *Lisozima*

Lisozima é uma enzima antibacteriana, que destrói a parede celular de bactérias. Seu substrato é a ligação glicosídica $\beta(1 \rightarrow 4)$ entre o ácido N-acetilmurâmico e a N-acetilglicosamina. Ela é comumente encontrada em células e em secreções de vertebrados.

Das espécies existentes de lisozima, a obtida a partir da clara de ovo de galinha é a mais estudada. É uma proteína relativamente pequena (14,4 kD) formada por apenas uma unidade. A cadeia polipeptídica possui 129 resíduos e quatro pontes dissulfeto. A

estrutura da lisozima de clara de ovo foi elucidada, via difração de raios X, por David Philips na década de 60 (Blake, *et al.*, 1965; Blake, *et al.*, 1965b) com uma resolução de 2,0 Å. Foi a segunda enzima a ser elucidada com este grau de resolução. O enovelamento da lisozima em solução é bem similar à sua estrutura cristalográfica (Smith, *et al.*, 1993). Ela contém dois domínios, denominados α e β . O domínio α contém quatro hélices e uma hélice 3_{10} . O domínio β contém três folhas β antiparalelas, uma hélice 3_{10} e uma região de alça (loop) (Fig. 2.4) (Schwalbe, *et al.*, 2001). O ponto isoelétrico da lisozima é por volta de pH=11. Em pH fisiológico, a proteína apresenta uma carga líquida de +8 (Tanford e Wagner, 1954). A lisozima é razoavelmente estável numa faixa ampla de pH (Tanford e Wagner, 1954; Alderton, *et al.*, 1945). Quatro pontes de enxofre estabilizam o enovelamento da proteína impedindo a perda completa do enovelamento exceto em condições drásticas de denaturação.

Fig. 2.4 - Estrutura em solução por ressonância magnética nuclear da lisozima de clara de ovo. Hélices α , folhas β e hélices 3_{10} são indicadas em vermelho, amarelo e ciano, respectivamente. Imagem adaptada de Schwalbe, *et al.*, 2001.

2.2.2. Gelificação de proteínas globulares

Soluções aquosas de proteínas globulares, mesmo em altas concentrações de proteína, se comportam essencialmente como sistemas newtonianos. O caráter globular dessas proteínas leva-as a se comportarem como esferas rígidas em suspensão, não apresentando nenhum caráter viscoelástico.

Alterações nas características do meio podem levar à denaturação da proteína seguida de agregação e, em alguns casos, gelificação. As formas de indução de agregação protéica podem ser as mais diversas, desde variações de temperatura (Gosal e Ross-Murphy, 2000), pH (Lucey e Singh, 1997), composição do meio (Arêas, *et al.*, 1996a; Montalvo e Khan, 2005; Dufour, *et al.*, 1998).

Nos primeiros trabalhos sobre o tema, postulava-se que os géis eram formados a partir de proteína totalmente denaturada, onde o arcabouço do gel surgia de uma malha formada pelo emaranhamento das moléculas de proteína (Ferry, 1948), de forma similar ao observado para géis de macromoléculas não-biológicas. Embora esse seja o caso para gelatina, por exemplo, para géis induzidos por calor (Gosal e Ross-Murphy, 2000) e para alguns sistemas induzidos pelo solvente (Dufour, *et al.*, 1998) observa-se que em vários casos a estrutura nativa da proteína é apenas levemente perturbada pelo efeito indutor. Por exemplo, o raio de giro da lisozima nativa em solução aquosa é de 15 Å (Castelletto, *et al.*, 1998) enquanto os valores para esse parâmetro referentes à forma denaturada por calor e por ação do solvente são 22 Å (Nicoli e Benedek, 1976) e 26 Å (Castelletto, *et al.*, 1998), respectivamente. Logo, esses géis não são formados por longas cadeias peptídicas emaranhadas, mas por glóbulos inchados (*molten globule*) da proteína denaturada. Nessa condição domínios hidrofóbicos, antes protegidos no interior da proteína, são parcialmente expostos ao meio, podendo levar à formação de agregados. A agregação é modulada pelo meio, sendo observadas duas morfologias principais: géis transparentes e homogêneos e géis opacos particulados. Os primeiros são formados por finos filamentos, que se assemelham a um colar de contas. Esses géis se formam em condições de baixa blindagem das cargas da proteína ou longe do pI, induzindo uma agregação mais dirigida e uniforme. Também se observam géis opacos particulados e heterogêneos que apresentam, em alguns casos, *sinerese* (expulsão do

solvente). Esses géis são formados em condições de alta blindagem de cargas (alta força iônica) ou próximo ao pI da proteína (Gosal e Ross-Murphy, 2000).

Uma característica comum observada, tanto para géis obtidos por aquecimento quanto por ação do solvente, é a tendência ao aumento, ou aparecimento, de folhas β durante o processo de agregação. Essa ocorrência é observada para vários sistemas, principalmente por meio de espectroscopia no infravermelho, como por exemplo géis de soro-albumina bovina obtidos por calor (Clark e Lee-Tuffnell, 1986), β -lactoglobulina em etanol/água (Dufour, *et al.*, 1998) e lisozima em TMU/água (da Silva, *et al.*, 2006). Alguns autores (Haris e Severcan, 2003) inclusive propõem que as folhas β observadas sejam folhas β intermoleculares formadas a partir da agregação da proteína. Embora essas folhas β intermoleculares estejam presentes na maioria dos casos observados de gelificação de proteínas globulares, seja por calor ou por ação do solvente, elas não devem ser a única, ou nem mesmo a mais importante, forma de associação intermolecular. Alguns autores observaram que o comprimento das fibras formadas, no caso de géis homogêneos, independe do conteúdo de folhas β na proteína (Clark e Lee-Tuffnell, 1986). Outros autores observaram que o máximo de conteúdo das folhas β intermoleculares é atingido muito antes do ponto de gelificação, *i.e.*, do momento em que o arcabouço do gel é formado (da Silva, *et al.*, 2006).

2.2.2.1. Modelos de gelificação

2.2.2.1.1. Modelo clássico

O modelo clássico, teoria formulada por Flory e Stockmayer no início da década de 40, foi uma primeira tentativa de se apresentar uma base quantitativa para o fenômeno de gelificação (Flory, 1953). O modelo utiliza-se da aproximação de Bethe (Bethe, 1935), onde o crescimento dos agregados se dá por meio de uma estrutura em árvore (Fig. 2.5).

O modelo supõe que o agregado se forme a partir de ligações entre monômeros. Cada monômero pode realizar um número z de ligações, sendo p a probabilidade de um

dado monômero se ligar a outro. A probabilidade p independe da natureza do sítio de ligação ou do número de ligações já estabelecidas pelo monômero, logo a probabilidade de um novo monômero se ligar a um dado agregado é $(z-1)p$. Só ligações intermoleculares ocorrem, logo não se formam anéis fechados e todo novo monômero agregado amplia o número de sítios de ligações possíveis. O modelo também não considera nenhum efeito de exclusão de volume, *i.e.*, novos monômeros podem se ligar aos agregados independentemente de impedimentos estéricos.

Fig. 2.5 - Exemplo de estrutura em árvore utilizada pelo modelo clássico.

O modelo clássico falha justamente por conta dessas simplificações. Ao considerar a probabilidade p idêntica e independente da natureza do sítio ou do número de ligações já estabelecidas, a natureza química dos sítios e os efeitos de cooperação ou saturação na agregação dos monômeros são ignorados. A exclusão de ligações intramoleculares leva a que se subestime a fração de monômeros agregados pois as ligações intramoleculares não contribuem para a formação do gel, desperdiçando assim sítios reativos. Esse fator é fortemente influenciado pela concentração. Em sistemas diluídos, a probabilidade de um monômero se chocar com outro é baixa o suficiente para reações intramoleculares se tornarem importantes, enquanto, em sistemas concentrados, as reações intermoleculares são mais favorecidas, tornando-se predominantes. Esse efeito da concentração foi observado por Stockmayer e Weil em 1945 (Stockmayer, 1945). No entanto, a falha mais importante do modelo é devido à não inclusão do efeito de exclusão de volume. Pelo modelo clássico a massa, M , do agregado cresce numa taxa maior que o volume, V , em relação ao raio do agregado, $M \approx R^4$ e $V \approx R^3$, respectivamente, levando a densidade do sistema a crescer indefinidamente com o crescimento do

agregado, o que não é fisicamente plausível. Logo, o modelo clássico falha em descrever de forma realística o processo de gelificação.

2.2.2.1.2. Modelo de percolação

O modelo de percolação repara alguns dos pontos fracos do modelo clássico, considerando nas suas premissas as contribuições das ligações intramoleculares e efeitos de exclusão de volume. O modelo de percolação, como o clássico, também é um modelo de grade. Supõe-se que o sistema seja formado a partir de uma grade onde cada nó representa um monômero capaz de realizar z ligações. A conexão de cada nó com o vizinho é representada pela linha escura na Fig. 2.6. As ligações ocorrem aleatoriamente entre os diversos nós sem nenhuma restrição ou preferência. A fração de ligações possíveis realizadas é chamada de p . A valores baixos de p apenas agregados desconectados existem no sistema. A um dado valor de p , chamado de limite de percolação (p_c) obtém-se um agregado que conecta todo o sistema. Atingida essa condição, o sistema gelifica. Impedimentos estéricos estão representados pela distância mínima entre os nós da rede (monômeros). Esse modelo foi introduzido inicialmente por Hammersley (Broadbent e Hammersley, 1957).

Fig. 2.6 - Processo de gelificação visto pelo modelo de percolação.

2.2.2.1.3. Métodos computacionais

Uma abordagem simples do processo de gelificação por meio de simulações computacionais (Fig. 2.7) consiste no acompanhamento da agregação via monômero a monômero. Por exemplo, um monômero é colocado no centro do sistema e outros monômeros são adicionados ao sistema um a um a uma dada distância r . O monômero difunde pelo sistema seguindo um padrão aleatório. Caso ele se afaste mais do que uma distância r_{max} do centro do sistema, o monômero é descartado e outro adicionado ao sistema. Caso o mesmo se choque com o monômero central, ou com o agregado central, a agregação ocorre e outro monômero é adicionado ao sistema. Os modelos computacionais baseados na adição de um monômero de cada vez ao agregado central são denominados modelos do tipo agregação monômero-agregado (monomer-cluster aggregation, MCA, em inglês). Outro perfil de simulação consiste na inserção no momento zero de todos os monômeros participantes da reação que em seguida são liberados para se difundirem no meio e agregarem conforme os choques forem ocorrendo. Esses modelos são denominados de agregação agregado-agregado (cluster-cluster aggregation, CCA, em inglês). Em ambos os casos, a agregação é dominada pela difusão dos elementos pelo sistema. Um refinamento de ambos os modelos inclui um fator de adesão, de forma a representar a reatividade dos monômeros ou agregados. A inclusão do fator de adesão implica que nem todo choque resultará em agregação, limitando, desse modo, a agregação pela extensão da reatividade dos monômeros ou dos agregados. Assim, os modelos computacionais também podem ser classificados pelo fator limitante da agregação em: agregações limitadas por difusão monômero-agregado (diffusion limited monomer-cluster aggregation, DLMCA, em inglês) e agregado-agregado (diffusion limited cluster-cluster aggregation, DLCCA, em inglês); e agregações limitadas pela reação monômero-agregado (reaction limited monomer-cluster aggregation, RLMCA, em inglês) e agregado-agregado (reaction limited cluster-cluster aggregation, RLCCA, em inglês) (Brinker e Scherer, 1990).

Fig. 2.7 - Exemplo de uma simulação em duas dimensões para o modelo de agregação monômero-agregado limitado por difusão (Meakin, 1988).

Os modelos obtidos a partir de simulação computacional oferecem vantagem em relação aos modelos clássico e de percolação, bem como aos modelos de base estatística (fundamentados na equação de Smoluchowski) (Ernst, 1986) por permitirem a determinação de dados estruturais e de distribuição de tamanho dos agregados formados. A análise dos objetos obtidos pelos diferentes modelos computacionais revela que em cada caso os agregados possuem características estruturais próprias.

As simulações revelam que os agregados obtidos são objetos fractais, *i.e.*, objetos que não seguem os perfis esperados para objetos euclidianos. Por exemplo, para um objeto euclidiano em três dimensões espera-se que o volume seja proporcional ao cubo do seu raio, enquanto para objetos fractais observam-se valores menores de três. Para os agregados obtidos por simulação observam-se tipicamente valores de dimensão fractal (d_f) 1,80 e 2,09 para agregados do tipo DLCCA e RLCCA, respectivamente (Jullien e Meakin, 1988).

2.2.3. Misturas binárias

A matéria em sua forma líquida não deve ser considerada apenas como um contínuo homogêneo, que possa ser plenamente caracterizado por parâmetros macroscópicos, *e.g.*, densidade, constante dielétrica, índice de refração, entre outros. É importante levar-se em conta que se trata de um ambiente complexo e não-uniforme caracterizado por interações intermoleculares, que no caso de misturas incluem o solvente, as quais podem gerar distintos ambientes locais. Assim, uma visão microscópica faz-se necessária para uma melhor compreensão do papel do solvente em processos em solução.

Líquidos podem apresentar uma estruturação microscópica complexa dependente da forma como as moléculas do mesmo interagem entre si. Por exemplo, sugere-se para a água uma complexa estruturação microscópica decorrente de forte interação entre suas moléculas (Kriendel e Elizer, 1971). Por outro lado em hidrocarbonetos, por exemplo, as interações são menos intensas gerando líquidos desestruturados (Reichardt, 1988). Os líquidos tendem a apresentar um nível organizacional intermediário entre sólidos e gases, *i.e.*, não se comportam como um meio onde as moléculas têm total liberdade de se difundir e ocupar homogeneamente o espaço, como num gás ideal, nem apresentam uma estruturação rígida, bem definida espacialmente, como nos sólidos.

As interações intermoleculares podem ser divididas em dois grupos: interações não específicas e interações específicas. Entre as interações não específicas incluem-se: interações eletrostáticas devidas a forças de Coulomb entre espécies carregadas e dipolos, *i.e.*, interações íon-íon, dipolo-dipolo e dipolo-íon; forças de polarização, devidas ao aparecimento de dipolos induzidos por espécies carregadas e dipolos instantâneos (forças de dispersão). Como interações específicas, podemos citar interações por meio de ligações de hidrogênio e transferência de elétrons.

A introdução do soluto no meio adiciona complexidade ao já complexo equilíbrio de forças envolvidas na estruturação do líquido, podendo ocorrer profundas alterações na estruturação do meio líquido como consequência. Por exemplo, tem-se o caso da

solvatação hidrofóbica, onde a presença de um soluto hidrofóbico em água induz um aumento da estruturação da água nas regiões ao redor do soluto.

A esse conjunto de todas as interações moleculares envolvendo moléculas do soluto e do solvente convencionou-se chamar polaridade do solvente, como proposto por Reichardt, em 1965 (Reichardt, 1965). Embora qualitativamente este seja um conceito de fácil entendimento, ainda não há uma forma quantitativa universal de se expressar a capacidade de solvatação do solvente devido à complexidade do conjunto de forças envolvidas.

Quando o solvente é composto por duas ou mais espécies, tem-se uma situação ainda mais complexa. O novo meio, agora uma mistura binária, ternária ou multicomponente, pode apresentar um comportamento que não se resume apenas a uma simples adição das características dos componentes puros. O comportamento pode refletir uma nova estruturação do meio induzida por interações entre as moléculas dos componentes da mistura. Por exemplo, para a mistura água/2-butoxietanol sugere-se a ocorrência de formação de aglomerados de 2-butoxietanol em água, dispersos em um ambiente de butoxietanol puro. Assim, em uma mesma solução macroscopicamente homogênea de água/butoxietanol teríamos ambientes tipicamente aquosos, outros tipicamente alcoólicos e ainda ambientes com os agregados acima mencionados. Esses agregados apresentariam uma organização similar ao observado para micelas (Koga, 1996). Segregação de microambientes líquidos sem configurar mudança macroscópica de fase é também descrita para a mistura TMU/água (Arêas, *et al.*, 1996a). Outro fator importante a se considerar no caso de misturas é a solvatação preferencial ou seletiva, situação onde a composição da esfera de solvatação do soluto não corresponde à composição da solução. Devido a interações específicas ou afinidade química, o soluto tende a interagir preferencialmente com um dos componentes da mistura em detrimento dos demais.

2.2.3.1. Água

A relevância da água para a vida é de importância indiscutível. A expressiva quantidade de trabalhos acumulados sobre o tema demonstra a vigorosa atividade de pesquisa voltada para seu estudo (Franks, 1979). As propriedades físicas da água, como alto ponto de fusão e ebulição e alta constante dielétrica, indicam a ocorrência de extensiva rede de ligações de hidrogênio. A água em estado líquido apresenta uma série de características distintas do observado para outros líquidos. Outras características peculiares da água incluem valores particularmente altos para viscosidade, ponto de ebulição e fusão, calor de fusão, entre outros.

Vários modelos foram propostos na literatura visando explicar as características peculiares da água (Kriendel e Eliezer, 1971). Inicialmente tentou-se justificar esse comportamento especial da água em termos de equilíbrios entre moléculas de água livre e agregados de água (Chadwell, 1927), modelo posteriormente abandonado sob a luz de resultados de difração de raios X que indicaram que a estruturação da água se dá por interações de curta distância (Stewart, 1931).

Os modelos que se seguiram (Kriendel e Eliezer, 1971) tentaram explicar a estruturação da água não em termos de equilíbrios de espécies de água, mas em termos da interação da molécula de água com as suas vizinhas e sua distribuição espacial. Os modelos existentes na literatura podem ser divididos em dois grupos: modelos contínuos, onde se assume que a rede de ligações de hidrogênio é contínua; e modelos descontínuos (*mixture models*, em inglês), onde se propõe que a estruturação da água envolva um conjunto de duas ou mais espécies.

Como exemplo de um modelo contínuo podemos citar o modelo de ligação-torcida (*Bent-bond*, tradução livre do inglês) (Leonard-Jones e Pople, 1951). Segundo esse modelo não é plausível considerar, por razões termodinâmicas, a existência de moléculas de água não ligadas por ligações de hidrogênio no sistema. O modelo propõe que a água líquida esteja totalmente conectada por meio de ligações de hidrogênio, em uma situação similar ao gelo, porém com ligações mais flexíveis permitindo um certo grau de torção da ligação. Assim, em qualquer dado momento a água se encontra

praticamente totalmente conectada através de ligações de hidrogênio as quais se quebram e se refazem a uma mesma taxa.

Como modelos descontínuos podemos citar o modelo de agregação flutuante (flickering-cluster) e o modelo de redes (network). O modelo de agregação flutuante (Frank e Wen, 1957) considera que haja um máximo de torsão bem definido que define a interação entre duas moléculas de água como uma ligação de hidrogênio, logo, apenas moléculas unidas por ligações de hidrogênio lineares ou quase lineares são consideradas ligadas. Moléculas interagindo por ligações torcidas são consideradas não associadas. Também é proposto que a ligação de hidrogênio é cooperativa, de forma que a formação de uma ligação induz à formação de um aglomerado de moléculas ligadas, e a quebra de uma ligação leva ao desmonte do aglomerado. Logo, a água pode ser descrita como uma mistura de agregados dispersos num meio de moléculas não associadas onde há um contínuo rearranjo do sistema entre agregados e moléculas livres. O modelo de rede (Kriandel e Eliezer, 1971) considera que a água em estado líquido possui uma estruturação similar ao gelo, com a diferença da existência de moléculas não associadas à rede e a existência de buracos na rede tridimensional.

Os modelos aqui descritos, tanto quanto outros deixados de fora por questão de brevidade mas disponíveis na literatura (Kriandel e Eliezer, 1971), foram construídos tendo como base as peculiaridades da água, de forma que apresentam uma boa base para uma discussão qualitativa de suas propriedades. Não se pretendeu aqui uma aplicação quantitativa das teorias mencionadas. Nesta Tese, as discussões envolvendo a estrutura da água foram desenvolvidas em termos qualitativos, tomando-se como base o modelo de redes.

2.2.3.2. Tetrametiluréia

A tetrametiluréia (TMU), ao contrário da maioria dos outros derivados de uréia, é um líquido incolor à temperatura ambiente e totalmente miscível em água em quaisquer proporções. A TMU é um solvente aprótico que apresenta em sua estrutura a coexistência de um domínio polar, representado pelo grupamento C=O, e um domínio apolar representado pelas regiões metila, contrapondo tendências fortemente distintas de solvatação em um sistema molecular de dimensões relativamente pequenas (Fig. 2.8). Tais características bimodais (hidrofílico/hidrofóbico) são também observadas em outros sistemas apróticos, nos quais um grupamento polar ou polarizável coexiste com domínios apolares na mesma molécula. Este é o caso, por exemplo, de dimetilsulfóxido (DMSO) e hexametilfosfotriamida, ambos solventes capazes de induzir o processo sol-gel em proteínas, em condições similares às da TMU (Arêas, *et al.*, 1996a).

Em estudos de simulação de Monte Carlo, a tetrametiluréia apresenta uma curva larga de distribuição radial, indicando tratar-se de um sistema com baixo grau de organização molecular (Belletato *et al.*, 1999). Esse aspecto entrópico é provavelmente o responsável pela alta temperatura de ebulição desse composto (175,2⁰C) quando comparada à da água.

Em solução aquosa a baixas concentrações, observa-se a ocorrência de ligações de hidrogênio entre duas moléculas de água e o oxigênio carboxílico da TMU. A ocorrência de ligações de hidrogênio envolvendo os sítios de nitrogênio da TMU e moléculas de água é no entanto controversa na literatura (Belletato, *et al.*, 1999; Bezzabotnov, *et al.*, 1992; Ansell, *et al.*, 1997; Tóth, *et al.*, 1996). Nessas regiões diluídas sugere-se a formação de pares de contato TMU-TMU, que se tornam gradativamente mais estáveis que os pares separados por moléculas de água, levando à formação de dímeros com o aumento da concentração de TMU (Bezzabotnov, *et al.*, 1992). A formação de dímeros TMU-TMU é sugerida em diversos outros trabalhos (Borbély, *et al.*, 1995; Cser, 1995). Foi também verificado por simulações de Monte Carlo que em soluções diluídas de TMU em água, as ligações de hidrogênio nos pares água-TMU são bem mais estáveis que nos pares água-água (Belletato, *et al.*, 1999). Na

mesma direção, estudos de solvatação preferencial utilizando fatores de solvatação preferencial obtidos de integrais de Kirkwood-Buff (Marcus, 2002) indicam que a TMU aumenta o coeficiente de auto-interação da água. O mesmo trabalho sugere que as contribuições hidrofóbicas entre moléculas de TMU são mais importantes do que as interações por dipolo-dipolo ou ligações de hidrogênio entre as moléculas de água e TMU. Estudos de dinâmica molecular indicam ainda o aumento de mobilidade das moléculas de água na região de hidratação do oxigênio carboxílico em comparação com aquela observada na região em torno dos grupos metila (Tovchigrechko, *et al.*, 1999). Estudos calorimétricos sugerem que a TMU aumenta a rede de ligações de hidrogênio na vizinhança das moléculas de TMU, concomitantemente diminuindo a formação de ligações de hidrogênio longe dos solutos (Chen, *et al.*, 2001). Em suma, o conjunto de dados disponível na literatura aponta fortemente para a ocorrência de microestruturação em soluções TMU/água.

Fig. 2.8 - Tetrametiluréia.

2.3. Técnicas empregadas

2.3.1. Reologia

2.3.1.1. Conceitos básicos

Reologia é a ciência que estuda a deformação e o fluxo dos materiais. Constitui um ramo da Mecânica, em Física. O nome reologia se originou do grego *rheos*, que significa fluxo ou fluir, nome proposto pelo Professor E. Bingham. Literalmente, Reologia significa a ciência do fluxo. Como ramo independente da ciência, a Reologia é relativamente nova. A primeira sociedade de Reologia foi fundada em 1929 nos EUA (Barnes, *et al.*, 1989).

De uma forma simplificada, a Reologia estuda a resposta de materiais à perturbação mecânica. Essa perturbação pode se manifestar de várias formas, *e.g.*, esticando-se ou comprimindo-se o material (deformação elongacional ou extensional), ou submetendo-o a cisalhamento.

O comportamento reológico pode ser dividido em dois perfis extremos de comportamento: o de sólidos elásticos e o de líquidos ideais. Os primeiros quando submetidos a uma perturbação mecânica se deformam elasticamente, *i.e.*, seguem a lei de Hooke (Eq. 2.1). A energia empregada na deformação é armazenada pelo sistema e recuperada após cessada a perturbação, com a recuperação de sua forma original. No caso dos líquidos ideais, também denominado de fluidos viscosos, observa-se que quando submetidos à perturbação mecânica, fluem segundo a lei de Newton (Eq. 2.2). A energia empregada na deformação é dissipada pelo sistema e ao cessar da perturbação o sistema mantém a sua configuração pós-perturbação. Neste caso, diz-se que o sistema fluiu ao invés de se deformar. Ambos os comportamentos se referem a casos ideais. Na realidade, a grande maioria dos materiais apresenta um comportamento intermediário entre sólidos elásticos e líquidos ideais, o chamado comportamento viscoelástico, assim denominado por apresentar características dos dois comportamentos ideais mencionados.

- Lei de Hooke: descreve o comportamento da deformação elástica:

$$F = -k.x \quad \text{Eq. 2.1}$$

onde, F = força (N),

k , constante de força do material (kg.s^{-2}),

x , extensão da deformação (m).

- Lei de Newton: descreve o comportamento de fluxo de um fluido viscoso:

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} \quad \text{Eq. 2.2}$$

onde, η , viscosidade (Pa.s),

τ , tensão de cisalhamento (Pa),

$\dot{\gamma}$, taxa de cisalhamento (s^{-1}).

Outra característica importante dos perfis de comportamento reológico é a forte dependência com o tempo de observação. Por exemplo, a observação do efeito da gravidade, uma perturbação mecânica, sobre o comportamento de fluxo do vidro indicará um comportamento típico de sólido se for realizado em um período curto de tempo. No entanto, se a observação for feita por um período mais longo, de décadas ou mais, irá mostrar que o vidro escoar como um líquido viscoso. A quantificação dessa característica se dá pelo chamado número de Deborah (Eq. 2.3) proposto pelo Prof. Marcus Reiner. O nome Deborah se refere a uma passagem bíblica, versículo cinco do quinto capítulo do livro dos Juízes em que é atribuída a Débora a frase: “Os montes se abalaram diante do Senhor ...”, ou na tradução inglesa “The mountain flowed before the Lord...”, reproduzindo a idéia de que tudo fluirá dado tempo suficiente, mesmo as montanhas. O número de Deborah correlaciona o tempo característico do material (λ_T), que está relacionado com o tempo necessário para que o material realize os movimentos moleculares mais lentos, e o tempo de aplicação da perturbação mecânica. Valores altos do número de Deborah correspondem a comportamento do tipo sólido elástico,

enquanto valores baixos correspondem a fluidos viscosos. Por exemplo, o tempo característico da água líquida é de 10^{-12} s (Barnes, *et al.*, 1989). Logo, exceto para tempos experimentais curtíssimos, a água se comporta como um fluido viscoso.

- Número de Deborah:

$$D_e = \frac{\lambda_T}{t} \quad \text{Eq. 2.3}$$

onde, D_e , número de Deborah,

λ_T , tempo característico do material (s),

t , tempo do experimento (s).

Deve-se ressaltar a diferença entre deformação elástica e fluxo. Quando um sistema é submetido a uma deformação mecânica e sua natureza inicial é preservada, diz-se que ele sofreu uma deformação elástica. Nesse tipo de deformação, toda a energia utilizada na deformação é armazenada na estrutura do material e posteriormente utilizada na recuperação de sua forma original ao cessar a aplicação da força. Quando a intensidade ou duração da perturbação mecânica é grande o suficiente para causar uma reestruturação do sistema, seja por quebra da estrutura inicial ou acomodação da mesma, diz-se que o sistema fluiu ou escoou. Neste caso, parte da energia mecânica foi utilizada para provocar a reestruturação do sistema. A deformação sempre precede um evento de escoamento, e todos os materiais apresentam algum nível de deformação antes de ceder ao escoamento. Logo, é importante ter-se em mente que as propriedades reológicas de um dado material são válidas dentro das condições de aplicação da perturbação mecânica.

Nesta discussão, será abordada apenas a reologia de cisalhamento. As principais grandezas envolvidas serão apresentadas a seguir, tomando-se como base o modelo de placas paralelas (Fig. 2.9).

Fig. 2.9 - Modelo de placas paralelas.

Para sólidos elásticos, define-se a tensão de cisalhamento, τ , (Pa) (Eq. 2.4) como a razão entre a força F (N) aplicada sobre uma placa de área A (m²) e a área dessa placa. A deformação, γ , é definida como a razão entre o deslocamento da placa (v) e o seu espaçamento (h) (Eq. 2.5):

$$\tau = \frac{F}{A} \quad \text{Eq. 2.4}$$

$$\gamma = \frac{v}{h} \quad \text{Eq. 2.5}$$

O módulo de cisalhamento, que é o equivalente à viscosidade para uma situação de deformação e não de fluxo, é definido como:

$$G = \frac{\tau}{\gamma} \quad \text{Eq. 2.6}$$

Para fluidos viscosos, a tensão de cisalhamento depende da evolução temporal da deformação (γ) e não da quantidade de deformação sofrida. A tensão é definida como uma função dessa dependência temporal multiplicada por uma constante, a viscosidade, η (Pa.s):

$$\tau = \eta \cdot \frac{d\gamma}{dt} \quad \text{Eq. 2.7}$$

A dependência temporal da deformação é denominada de taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$, expressa em s⁻¹) e é definida como:

$$\dot{\gamma} = \frac{d\gamma}{dt} \quad \text{Eq. 2.8}$$

Fluidos viscosos são, em geral, classificados pelo perfil das curvas de tensão de cisalhamento pela taxa de cisalhamento, chamadas de curvas de fluxo. Esses perfis são divididos em dois grupos: fluidos Newtonianos e não-Newtonianos.

Fluidos newtonianos seguem a lei de Newton (Eq. 2.2), *i.e.*, a razão da tensão de cisalhamento pela taxa de cisalhamento é constante, independentemente da duração ou da magnitude do cisalhamento. Fluidos não-newtonianos não obedecem à lei de Newton, de modo que a viscosidade desses materiais depende da taxa de cisalhamento aplicada ou da duração de sua aplicação. Por isso, a viscosidade desses materiais é chamada de viscosidade aparente (η') (Fig. 2.10).

De acordo com o seu comportamento reológico, os fluidos não-newtonianos podem ser subdivididos em sistemas cujo comportamento depende da intensidade do cisalhamento aplicado e sistemas cujo perfil depende do tempo pelo qual o cisalhamento é aplicado.

Fig. 2.10 - Exemplos de comportamentos reológicos para sistemas newtonianos e não-newtonianos.

Os sistemas cujo comportamento depende da intensidade do cisalhamento aplicado são divididos em dois grupos:

a) Fluidos pseudoplásticos: são aqueles que apresentam uma diminuição da viscosidade aparente com o aumento da taxa de cisalhamento.

O comportamento pseudoplástico pode ser atribuído a uma reorganização ou reorientação das moléculas ou partículas do sistema observada com o aumento da intensidade do cisalhamento, levando a uma diminuição da resistência do material ao fluxo (Fig. 2.11). Em tensões muito baixas, antes de o sistema começar a se reorganizar, e a tensões muito altas, após o sistema ter se reorganizado, o sistema poderá apresentar comportamento newtoniano.

Fig. 2.11 - Esquemas de possíveis efeitos causados em sistemas pseudoplásticos sob uma dada tensão de cisalhamento (adaptado de Mezger, 1998).

b) Fluidos dilatantes: são sistemas que apresentam um aumento da viscosidade aparente com o aumento da taxa de cisalhamento.

Suspensões de cerâmica e dispersões de amido em altas concentrações são exemplos de sistemas com comportamento dilatante. Esse comportamento é observado em sistemas densamente empacotados e é causado pelo aumento do contato entre as partículas quando aplicada uma tensão. A fase líquida nesses sistemas, que originalmente é apenas suficiente para preencher os vazios, torna-se insuficiente para preenchê-lo após a quebra do empacotamento causado pelo aumento do cisalhamento. Um aumento no volume do sistema é observado e um efeito de ressecamento é percebido sob essas circunstâncias. Como exemplo de sistemas dilatantes citamos a areia úmida que se torna firme e com aspecto seco quando pisada.

Em relação à dependência temporal, pode-se dividir os fluidos em dois grupos:

a) Fluidos tixotrópicos: são aqueles que apresentam uma diminuição da viscosidade aparente ao longo do tempo quando sob cisalhamento.

O comportamento tixotrópico implica numa degradação da estrutura do material sob uma dada tensão e sua posterior recuperação quando deixado em repouso. Materiais que sofrem diminuição de viscosidade com cisalhamento e não recuperam a viscosidade após um descanso infinitamente longo não apresentam comportamento tixotrópico, mas sim uma mudança permanente em sua estrutura devida à aplicação da tensão.

b) Fluidos reopéxicos: são fluidos que apresentam o comportamento oposto ao dos fluidos tixotrópicos. Sua viscosidade aparente aumenta com o tempo quando sob cisalhamento. Como no caso do comportamento tixotrópico, o comportamento reopéxico é totalmente reversível.

Um material pode apresentar comportamentos dependentes da intensidade do cisalhamento e do tempo de cisalhamento simultaneamente, bem como apresentar comportamentos distintos em função do cisalhamento e do tempo de cisalhamento aplicado. Por exemplo, materiais pseudoplásticos podem apresentar comportamento newtoniano sob cisalhamentos pouco ou muito intensos. No primeiro caso, o cisalhamento não induz uma acomodação do sistema e portanto não afeta a resistência do sistema ao fluxo, e no outro, o sistema se encontra na sua máxima acomodação oferecendo uma resistência constante ao fluxo.

Os materiais viscoelásticos são aqueles que apresentam o comportamento de sólido elástico e fluido viscoso simultaneamente. Todos os materiais apresentam em alguma extensão comportamento viscoelástico, como já discutido na definição do número de Deborah, mas para fins de classificação considera-se um material viscoelástico aquele que apresente as características de sólido elástico e fluido viscoso simultaneamente em uma janela temporal laboratorial.

A resposta viscoelástica à perturbação mecânica pode ser descrita como a combinação das respostas elástica e viscosa. O modelo de Kelvin-Voigt (Fig. 2.12) e o modelo de Maxwell (Fig. 2.13) se valem da combinação dessas propriedades representadas na forma de um amortecedor (contribuição viscosa) e de uma mola (contribuição elástica), para descrever o comportamento reológico. Assume-se que a mola comporte-se de forma ideal, de acordo com a lei de Hooke, com toda a energia empregada na deformação da mola sendo devolvida ao sistema na forma da recuperação

de sua forma original, após cessada a aplicação da força. Enquanto o amortecedor deve dissipar toda a energia mecânica empregada para fazer o material fluir, sem restabelecimento de sua forma original ao cessar a perturbação mecânica.

O modelo de Kelvin-Voigt apresenta um sistema que emprega esses componentes em uma montagem em paralelo, como indicado na Fig. 2.12.

Fig. 2.12 - Representação do comportamento segundo o modelo de Kelvin-Voigt.

Quando aplicada uma tensão constante, o componente elástico não pode se deformar instantaneamente, pois o componente viscoso, representando pelo amortecedor, oferece uma resistência à deformação. O sistema irá se deformar até o limite de deformação do componente elástico. Após a retirada da tensão, o sistema tende a se re-deformar completamente. O componente elástico, representado pela mola, puxa o sistema de volta à situação original, apresentando um comportamento similar a um sólido elástico. Alguns autores referem-se a esse modelo como modelo de um sólido viscoelástico, pois o sistema apresenta o comportamento de um sólido elástico, retornando à condição inicial após o fim da perturbação mecânica, porém com um retardo.

Assumindo que a tensão de cisalhamento é dividida igualmente entre os componentes elástico e viscoso, temos que:

$$\tau = \tau_v + \tau_e \quad \text{Eq. 2.9}$$

A deformação do sistema será dada por:

$$\gamma = \gamma_v = \gamma_e \quad \text{Eq. 2.10}$$

Temos que, para o componente viscoso:

$$\tau_v = \eta \cdot \frac{d\gamma}{dt} \quad \text{Eq. 2.11}$$

e para o componente elástico:

$$\tau_e = G \cdot \gamma_e \quad \text{Eq. 2.12}$$

Somando-se (Eq. 2.11) e (Eq. 2.12) temos que:

$$\tau = \eta \cdot \frac{d\gamma_v}{dt} + G \cdot \gamma_e \quad \text{Eq. 2.13}$$

O modelo de Maxwell também se utiliza das aproximações da mola/amortecedor para descrever o comportamento viscoelástico. Nesse modelo os componentes são montados em série, como indicado na Fig. 2.13.

Fig. 2.13 - Representação do comportamento segundo o modelo de Maxwell.

Durante a aplicação de uma dada tensão, o componente elástico se deformará instantaneamente, atingirá um valor constante e não sofrerá mais mudanças. O componente viscoso continuará se deformando (fluindo) ao longo do tempo. Após a retirada da tensão, o componente elástico retoma sua configuração original instantaneamente, enquanto o componente viscoso permanecerá deformado. Esse modelo também é identificado como o modelo de um líquido viscoelástico, devido ao fato deste sistema não se recuperar totalmente da deformação após o fim da perturbação mecânica.

A deformação total do sistema é dada pela soma das deformações viscosa e elástica:

$$\gamma = \gamma_v + \gamma_e \quad \text{Eq. 2.14}$$

A tensão de cisalhamento do sistema será dada por:

$$\tau = \tau_v = \tau_e \quad \text{Eq. 2.15}$$

Segundo a lei de Newton, aplicada ao componente viscoso:

$$\frac{d\gamma}{dt} = \frac{\tau_v}{\eta} \quad \text{Eq. 2.16}$$

Segundo a lei de Hooke, aplicada ao componente elástico:

$$\gamma_e = \frac{\tau_e}{G} \quad \text{Eq. 2.17}$$

Derivando Eq. 2.17 em relação ao tempo:

$$\frac{d\gamma_e}{dt} = \frac{1}{G} \cdot \frac{d\tau_e}{dt} \quad \text{Eq. 2.18}$$

Derivando Eq. 2.14:

$$\frac{d\gamma}{dt} = \frac{d\gamma_v}{dt} + \frac{d\gamma_e}{dt} \quad \text{Eq. 2.19}$$

Substituindo Eq. 2.18 e Eq. 2.16 em Eq. 2.19:

$$\frac{d\gamma}{dt} = \frac{\tau_v}{\eta} + \frac{1}{G} \cdot \frac{d\tau_e}{dt} \quad \text{Eq. 2.20}$$

Substituindo Eq. 2.15 em Eq. 2.20:

$$\frac{d\gamma}{dt} = \frac{\tau}{\eta} + \frac{1}{G} \cdot \frac{d\tau}{dt} \quad \text{Eq. 2.21}$$

O tempo de relaxação (t_r) pode ser expresso como:

$$t_r = \frac{\eta}{G} \quad \text{Eq. 2.22}$$

Substituindo Eq. 2.22 em Eq. 2.21:

$$\frac{d\gamma}{dt} = \frac{\tau}{t_r G} + \frac{1}{G} \frac{d\tau}{dt} \quad \text{Eq. 2.23}$$

O modelo de Maxwell (Fig. 2.13) considera apenas um componente, portanto, apenas um tempo de relaxação. Uma expansão desse modelo considera a presença de n componentes gerando uma distribuição de tempos de relaxação, perfil mais próximo à maioria dos sistemas reais.

2.3.1.1.1. Sistemas de medidas reológicas

As propriedades e parâmetros reológicos discutidos foram apresentados utilizando-se o modelo de placas paralelas, apresentado na Fig. 2.9. Para uso prático, essa montagem se mostra pouco conveniente. Uma montagem mais prática utiliza geometrias circulares onde a tensão é aplicada na forma de um torque. Entre as geometrias circulares mais comuns podemos citar os cilindros concêntricos (Fig. 2.14), placas paralelas (Fig. 2.15) e cone-placa (Fig. 2.16). Uma breve discussão sobre elas será apresentada abaixo. Uma discussão mais detalhada dessas geometrias é apresentada por Macosko (Macosko, 1993).

Fig. 2.14 - Representação esquemática de uma geometria de cilindros concêntricos.

O primeiro sistema prático para medições reológicas foi desenvolvido por Maurice Couette em 1890 (Couette, 1890). Esse sistema consiste em um reômetro de cilindros

concêntricos, também chamado cela de Couette. Nessa montagem ambos os cilindros podem girar ou apenas um deles gira e em sentidos iguais ou opostos, gerando quatro combinações possíveis correspondentes a diferentes tipos de regimes de fluxo que podem influenciar nas medidas realizadas (Koeltzsch, *et al.*, 2003). A geometria de cilindros concêntricos oferece bons resultados para sistemas de baixa viscosidade e para suspensões ou situações onde se necessita de altas taxas de cisalhamento. Por outro lado, requer grande quantidade de amostra, apresentando além disso o problema dos diferentes regimes de fluxo.

O sistema de placas paralelas (Fig. 2.15) é formado por dois discos paralelos onde o torque é aplicado a um dos discos e o outro permanece em repouso. O sistema de placas paralelas oferece algumas vantagens em relação ao de cilindros concêntricos: menor volume de amostra, maior facilidade na colocação e na limpeza de amostras de alta viscosidade e possibilidade de variação do espaçamento entre as placas de forma a se obterem diferentes valores de taxa ou tensão de cisalhamento para um mesmo torque, entre outras. Entre as desvantagens da geometria de placas paralelas, encontra-se o fato da taxa de cisalhamento aplicada variar ao longo do raio do disco, podendo causar problemas em determinados tipos de amostra. A taxa de cisalhamento está relacionada com a velocidade angular da placa, a qual depende do raio. Logo, no centro da geometria a amostra será submetida a uma taxa nula, enquanto ela será máxima nas bordas. Neste caso, a taxa medida será uma média das taxas aplicadas ao longo do raio da geometria. Na maioria dos casos isto não gera problemas, mas pode ocorrer da diferença de taxa ser grande o suficiente para submeter a amostra a diferentes regimes, gerando artefatos nas medidas.

Fig. 2.15 - Representação esquemática de uma geometria de placas paralelas.

O sistema de cone-placa (Fig. 2.16) foi proposto por Mooney e Ewart em 1934 (Mooney e Ewart, 1934) e consiste de dois discos onde o disco superior é um cone. A ponta do cone é truncada e o espaçamento entre as placas corresponde à distância que a placa deveria ter para os discos se tocarem, caso a ponta do cone não houvesse sido truncada. A geometria de cone-placa oferece vantagens similares à placa-placa, exceto pelo fato do espaçamento entre os discos ser fixo, com a vantagem adicional da taxa de cisalhamento ser constante ao longo do raio do disco devido ao efeito do espaçamento variável provido pelo cone.

Fig. 2.16 - Representação esquemática de uma geometria de cone-placa.

Toda a discussão até o momento baseou-se nos conceitos de tensão, ou taxa, de cisalhamento aplicada de forma não-oscilatória. Outra abordagem consiste na aplicação de uma perturbação senoidal ao sistema. As Figs. 2.17 e 2.18 ilustram o princípio da aplicação da perturbação oscilatória nos dois comportamentos-modelo: fluido viscoso e sólido elástico. Se o material se comporta como um sólido elástico ideal, a deformação mecânica resultante estará em fase com a perturbação mecânica aplicada (Fig. 2.18). Caso o material se comporte como um fluido viscoso ideal haverá uma diferença de fase de 90° entre a tensão aplicada e a deformação observada (Fig. 2.17). No caso dos materiais viscoelásticos se observa uma diferença de fase, δ , entre 0° e 90° . Logo, o ângulo de fase δ , mais comumente expresso em termos da tangente δ , fornece a razão entre as contribuições elásticas e viscosas do sistema. A perturbação mecânica obtida é expressa pelo módulo complexo (G^*), o qual pode ser decomposto em termos do componente em fase, denominado módulo de armazenagem (G'), representativo da contribuição elástica, e o componente fora de fase, ou módulo de perda (G''),

representativo da contribuição viscosa. G' e G'' constituem, respectivamente, a parte real e imaginária do módulo complexo.

$$|G^*| = \frac{\tau}{\gamma} \quad \text{Eq. 2.24}$$

$$|G^*| = G' + iG'' \quad \text{Eq. 2.25}$$

$$\text{tg } \delta = \frac{G''}{G'} \quad \text{Eq. 2.26}$$

Em termos da diferença de fase (δ), G' e G'' são expressos como:

$$G' = |G^*| \cos \delta \quad \text{Eq. 2.27}$$

$$G'' = |G^*| \sin \delta \quad \text{Eq. 2.28}$$

Fig. 2.17 - Representação esquemática de um experimento oscilatório em um líquido Newtoniano.

Fig. 2.18 - Representação esquemática de um experimento oscilatório em um sólido elástico Hookeano.

2.3.1.1.2. Principais testes reológicos

2.3.1.1.2.1. Testes rotacionais

Entres os principais testes rotacionais podemos citar curvas de fluxo, testes de fluência e recuperação ('creep-recovery') e testes de relaxação. Como discutido anteriormente, as curvas de fluxo consistem na monitoração da dependência da taxa de cisalhamento em função da tensão aplicada, ou vice-versa, em condições estacionárias. Esses experimentos fornecem o perfil de comportamento do sistema quando em fluxo.

O teste de fluência e recuperação ("creep-recovery") consiste na aplicação de uma tensão constante por um tempo suficiente para que se atinja a condição estacionária de fluxo, seguida da remoção da tensão. A deformação em função do tempo é observada ao longo do experimento. Durante a primeira etapa, a deformação observada é composta de duas contribuições: uma parte advém da deformação da componente elástica presente e uma parte é devida ao fluxo do componente viscoso do material. O valor da deformação

da componente elástica é constante e independe do tempo enquanto a contribuição viscosa depende do tempo de aplicação da tensão. Na segunda fase do experimento, chamada de fase de recuperação, a perturbação mecânica é removida e observa-se a recuperação da deformação da componente elástica. No caso de um material que se comporte como um sólido viscoelástico, a recuperação será total após um dado tempo, enquanto para um líquido viscoelástico a curva atingirá um patamar correspondente à parcela da deformação vinda do fluxo do componente viscoso (Fig. 2.19).

Fig. 2.19 - Exemplo de curvas de fluência-recuperação (“creep-recovery”) para (a) sólido elástico, (b) líquido newtoniano e (c) material viscoelástico.

O teste de relaxação consiste na aplicação de uma dada deformação, dentro da região viscoelástica linear, e na monitoração das tensões necessárias para a manutenção da deformação aplicada. Dependendo do comportamento reológico do material, observam-se perfis de curvas diferentes. Sólidos elásticos não apresentam relaxação: para manter a deformação constante será necessário manter uma tensão constante. Líquidos newtonianos apresentam uma relaxação instantânea, isto é, após a deformação ser atingida, a tensão necessária cai instantaneamente para zero. Materiais viscoelásticos irão apresentar um decaimento exponencial da tensão necessária para manter a deformação constante (Fig. 2.20).

Fig. 2.20 - Exemplo de relaxamento para sólidos elásticos (a), líquidos newtonianos (b) e materiais viscoelásticos (c).

2.3.1.1.2.2. Testes oscilatórios

Os testes oscilatórios consistem na aplicação de uma perturbação mecânica senoidal ao sistema (Figs. 2.17 e 2.18). Essa perturbação mecânica oscilatória é modulada na sua amplitude, controlando-se a intensidade da tensão ou deformação aplicadas, e na frequência da oscilação. Nesse modo de operação dois tipos de teste são amplamente utilizados: a varredura de amplitude e a varredura de frequência.

Na varredura de amplitude, submete-se o material a uma perturbação mecânica de frequência constante e varia-se a amplitude de deformação, ou a tensão aplicada. A dependência do módulo complexo com a variação da amplitude de deformação permite definir-se a região viscoelástica linear. Enquanto o log de G^* permanecer independente da tensão ou deformação aplicada, o sistema estará na região viscoelástica linear. A região viscoelástica linear corresponde à região na qual o sistema mantém sua estrutura original preservada.

A varredura de frequência consiste na aplicação de uma perturbação mecânica de frequência variável com uma amplitude de deformação constante, dentro da região viscoelástica linear. O estudo da dependência do módulo complexo com a frequência pode nos oferecer diversas informações dependendo da composição do sistema em estudo. Para fluidos de Maxwell compostos de um único elemento ou de vários elementos com baixa polidispersividade e sem ligações cruzadas, aplicam-se as relações abaixo (Barnes, 1989):

$$G'(\omega) = G \left(\frac{\omega^2 t_r^2}{1 + \omega^2 t_r^2} \right) \quad \text{Eq. 2.29}$$

$$G''(\omega) = G \left(\frac{\omega t_r}{1 + \omega^2 t_r^2} \right) \quad \text{Eq. 2.30}$$

onde, G , módulo de cisalhamento (Eq. 2.6),

t_r , tempo de relaxação (Eq. 2.22),

ω , frequência angular,

G' , módulo de armazenagem,

G'' , módulo de perda.

Como mencionado anteriormente, as características viscoelásticas são dependentes do tempo experimental, na forma do número de Deborah. Em testes oscilatórios, o tempo experimental é representado pela frequência da oscilação, de forma que é possível cobrir uma ampla região de tempos experimentais em uma varredura de frequência. Para valores limites de frequência, as relações abaixo são aplicáveis (Eqs. 2.31, 2.32, 2.33, 2.34). Deve-se notar que para o limite de alta frequência, isto é, tempos experimentais muito curtos, o material se comporta como um sólido elástico, em que o módulo de perda é igual a zero e o módulo de armazenagem é igual ao módulo de cisalhamento. Para o limite de baixa frequência, isto é, tempos experimentais muito longos, o sistema se comporta como um fluido viscoso, no qual o módulo de armazenagem é igual a zero e a razão entre o módulo de perda e a frequência é igual à viscosidade a zero de cisalhamento (η_0) (Eq. 2.33).

$$\lim_{\omega \rightarrow 0} G' = 0Pa \quad \text{Eq. 2.31}$$

$$\lim_{\omega \rightarrow \infty} G' = G \quad \text{Eq. 2.32}$$

$$\lim_{\omega \rightarrow 0} \frac{G''}{\omega} = \eta_0 \quad \text{Eq. 2.33}$$

$$\lim_{\omega \rightarrow \infty} G'' = 0Pa \quad \text{Eq. 2.34}$$

2.3.2. Técnicas espectroscópicas

O uso da luz como sonda investigativa de propriedades da matéria tem se mostrado uma ferramenta poderosa. Com a observação de fenômenos simples, uma vasta quantidade de informações pode ser obtida. Quando a luz interage com um objeto, três tipos de fenômenos podem ocorrer, não incluindo fenômenos fotoquímicos: emissão, absorção e espalhamento da radiação incidente. Essas interações carregam consigo informações relativas tanto da estrutura da matéria como da sua interação com o meio ao qual está exposta (Campbell e Dwek, 1984).

Sabe-se que a energia de uma molécula consiste da soma de suas energias translacional, rotacional, vibracional e eletrônica, sendo que as energias correspondentes a cada uma dessas parcelas são bem distintas. Energias de transições eletrônicas ocorrem na faixa do visível e ultravioleta, vibrações moleculares na faixa do infravermelho e rotações puras na região de microondas. Focalizando-se numa particular faixa espectral é possível monitorar-se eventos de forma pouco invasiva, utilizando-se o sistema de estudo como a própria sonda de estudo. Por exemplo, pode-se monitorar as concentrações de reagentes por meio da coloração do meio reacional (transições eletrônicas) em tempo real e sem necessidade de perturbar o sistema com agentes estranhos ao mesmo.

Dentre os fenômenos decorrentes da interação da radiação eletromagnética com a matéria, a emissão da radiação pode ocorrer quando uma espécie passa de um estado energeticamente excitado para um estado de mais baixa energia. Técnicas de espectroscopia de fluorescência se ocupam da análise desses eventos. Caso o feixe incidente possua elementos com energias coincidentes com diferenças energéticas entre dois níveis energéticos da espécie irradiada, ocorrerão processos de absorção. A análise da variação da luz transmitida, e por correspondência da parcela absorvida, a partir da diferença da intensidade entre luz incidente e transmitida é a base das espectroscopias de absorção.

O espalhamento da radiação resulta da oscilação da nuvem eletrônica da espécie irradiada, em consonância com a onda aplicada. O oscilador (eletrônico ou nuclear) resultante emite radiação em todas as direções, em um plano perpendicular à oscilação

produzida. Classicamente, os choques que geram o espalhamento podem ser elásticos ou inelásticos. No primeiro caso, temos o efeito Rayleigh. As técnicas de espalhamento tradicionais utilizam-se desse tipo de espalhamento, *e.g.*, espalhamento de luz no visível e espalhamento de nêutrons. No segundo caso, temos o efeito Raman, em que se tem ganho (anti-Stokes) ou perda (Stokes) de energia. No efeito Raman, a luz espalhada apresentará portanto uma variação de frequência em relação à frequência do feixe incidente.

2.3.2.1. *Termo-solvatocromismo*

Quando expostos a diferentes meios, certos cromóforos tendem a apresentar grandes mudanças espectrais, *e.g.*, intensidade, forma ou posição da banda associada à transição. Por exemplo, soluções da betaína de Reichardt (2,6-difenil-4-(2,4,6-trifenil-1-piridina) fenolato), um cromóforo comumente utilizado como indicador solvatocrômico, apresentam coloração vermelha em metanol, violeta em etanol, azul em álcool isoamílico e verde am acetona. Esse fenômeno denomina-se solvatocromismo e advém da solvatação preferencial do meio por um dado estado eletrônico em relação a outro, modificando a diferença energética entre o estado fundamental e o excitado em função das interações soluto-solvente. Esse efeito pode ser utilizado como uma ferramenta quantitativa de dimensionamento da capacidade de solvatação do solvente, *i.e.*, a polaridade do solvente. Utilizando-se de substâncias que apresentam significativo efeito solvatocrômico, normalmente denominadas sondas solvatocrômicas, pode-se construir escalas empíricas de polaridade. Como a polaridade medida a partir do uso dessas sondas carrega informações a respeito do micro ambiente do solvente, em geral denominam-se essas escalas de escalas de polaridade microscópica. Contudo, não há uma teoria quantitativa que permita usar a escala de forma universal. As polaridades microscópicas medidas são fortemente dependentes de características das sondas utilizadas, não havendo uma maneira universal de separar as contribuições próprias do meio e efeitos induzidos pela presença da sonda no sistema.

Numa mistura binária não estruturada, onde os componentes se encontrem distribuídos aleatoriamente ao longo do sistema (comportamento ideal) e onde não

ocorra solvatação preferencial da sonda por nenhum componente da mistura, o efeito solvatocrômico deve apresentar uma variação linear em função da composição do sistema, em termos da fração molar dos componentes. Desvios da linearidade, ou da idealidade, indicam a presença de algum nível de organização da mistura binária ou efeitos de solvatação preferencial. Misturas estruturadas podem apresentar desvios positivos ou negativos, dependendo do ambiente ao qual a sonda esteja exposta. As contribuições da solvatação preferencial podem ser divididas em interações não-específicas e específicas, da mesma forma como discutido no item sobre misturas binárias (2.2.3.). De fato, a classificação entre soluto e solvente é totalmente arbitrária, em termos de interações entre as moléculas, não havendo distinção entre quais moléculas são solutos e quais são solventes. As interações não-específicas, originárias de interações eletrostáticas, são normalmente denominadas de enriquecimento dielétrico, e se caracterizam por interações preferenciais entre o soluto e o componente mais polar da mistura, logo, tornando a camada de solvatação do soluto mais populada pelo componente mais polar. As sondas utilizadas nesse trabalho são sondas polares cuja polaridade diminui do estado fundamental para o excitado. Nelas, o enriquecimento dielétrico contribui com um desvio positivo da idealidade (Suppan e Ghoneim, 1997). Entre as interações específicas, a mais relevante para os sistemas aqui estudados é a interação por ligação de hidrogênio, que também contribui para um desvio positivo.

A escala empírica mais amplamente utilizada para medição do efeito solvatocrômico se baseia na transição de transferência de carga da betaína de Reichardt, ou simplesmente RB. A diferença de polaridade da betaína no estado fundamental (forma zwitteriônica, 15 D) para o excitado (forma neutra, 6 D) é de cerca de 9 D. Isto implica em um aumento da energia da transição com o aumento da polaridade do solvente (Reichardt, 1988) (Fig. 2.21).

A polaridade do solvente, $E_T(30)$, é definida como a energia da transição de transferência de carga do oxigênio para o anel:

$$E_T(kcal.mol^{-1}) = 28591,5 / \lambda_{max} (nm) \quad \text{Eq. 2.35}$$

O uso da escala $E_T(30)$ apresenta duas grande vantagens: grande sensibilidade e alta solubilidade em ampla gama de solventes. A sonda RB apresenta um dos maiores

efeitos solvatocrômicos observados, uma variação de 357 nm em casos extremos ($\lambda_{\text{max}}=810$ nm em éter difenílico e $\lambda_{\text{max}}=453$ nm em água), permitindo a visualização até mesmo de pequenas variações na polaridade do meio. A sonda RB também apresenta boa solubilidade em vários solventes polares e não-polares.

Fig. 2.21 - Representação esquemática do efeito solvatocrômico da betaína de Reichardt (Reichardt, 1992).

2.3.2.2. Espectroscopia vibracional no infravermelho

A espectroscopia de absorção no infravermelho se baseia no fenômeno de absorção da luz na região de energia referente a vibrações moleculares, cobrindo aproximadamente a faixa de 10 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} (1000 nm a 780 nm). As energias, e portanto a posição das bandas no espectro, são sensíveis à natureza do grupo químico responsável pela vibração bem como à vizinhança do mesmo, tornando a espectroscopia no infravermelho uma ferramenta útil na caracterização estrutural molecular e na monitoração do microambiente de regiões moleculares bem determinadas.

Devido ao seu tamanho e complexidade, o espectro vibracional de uma proteína apresenta muitas bandas. Dentre as bandas características de proteínas, as bandas amida, resultantes do acoplamento de modos vibracionais vizinhos, são de grande relevância na análise das estruturas secundárias. A banda amida I é formada principalmente pelo estiramento C=O (80%), pelo estiramento CN (10%) e pela deformação angular NH no plano (10%). A banda amida II é constituída por contribuições da deformação angular N-H (60%) e do estiramento C-N (40%). Ambas são ativas no infravermelho (Arêas e Kawano, 1991). As estruturas secundárias são mantidas principalmente por interações via ligações de hidrogênio entre os grupos C=O e N-H da proteína. Cada estrutura secundária possui um padrão particular de distribuição dessas interações gerando ambientes nitidamente distintos que provocam mudanças nas frequências vibracionais características (Jackson e Mantsch, 1992). Embora distintas, as contribuições de cada estrutura geram bandas largas numa região estreita resultando numa sobreposição das contribuições de cada estrutura secundária, impedindo assim uma separação experimental de cada contribuição. Utilizando-se de ferramentas matemáticas que permitam a separação de cada contribuição, por exemplo, deconvolução por transformada de Fourier ou cálculo da segunda derivada (Surewicz, *et al.*, 1993), é possível avaliar de forma semiquantitativa as contribuições relativas de cada estrutura secundária para a estruturação global da proteína.

Tabela 2.1 - Frequências características de estruturas secundárias para proteínas em soluções aquosas (Dong, *et al.*, 1990).

Frequência (cm ⁻¹)	Atribuição
1620 a 1640	folhas β
1650	estruturas desordenadas
1656	hélices α
1666 a 1688	dobras

2.3.2.2.1. Refletância total atenuada no infravermelho (ATR-IR)

A técnica de refletância total atenuada no infravermelho (ATR-IR) foi inicialmente desenvolvida por Harrick e colaboradores (Harrick, 1967). Uma cela típica de ATR consiste de um material de alto índice de refração (meio ATR), *e.g.*, diamante ($n = 2,4$) ou germânio ($n = 4,0$). A amostra a ser estudada entrará em contato com uma das faces desse meio durante a medida. O feixe incide internamente na interface meio/amostra a um ângulo maior do que o ângulo crítico, *i.e.*, em uma situação em que ocorra reflexão total. Nessa situação, ocorre o aparecimento da chamada onda evanescente. Embora a reflexão seja total, observa-se o aparecimento de uma onda eletromagnética no outro lado da interface. Esta onda se propaga paralelamente à interface e sua intensidade decai exponencialmente com a distância da interface, logo o termo onda evanescente - algo que se esvaece, que desaparece. Essa onda interage com a amostra e parte de sua energia refletida é absorvida pela amostra atenuando o sinal do feixe refletido, o que explica o nome dado à técnica (refletância total atenuada) (Fig. 2.22). O feixe refletido carrega informações similares às do espectro de absorção, sendo possível, através de algoritmos disponíveis na literatura, converter-se o espectro de refletância em transmitância ou absorção.

A técnica de ATR é especialmente útil para se investigar eventos de superfícies, pois a onda evanescente tem uma penetração de cerca de 10 μm . Além disso, elimina-se o problema de alta absorção do feixe de infravermelho pela água, devido ao seu reduzido “caminho óptico”. O uso de meios de ATR com múltiplas reflexões internas permite um aumento da intensidade do espectro obtido. Como desvantagens, podemos

citar que a penetração da onda evanescente é proporcional ao inverso do número de onda, logo a intensidade das bandas não é uniforme ao longo da região espectral, tendendo a ser maior a número de onda mais baixos. Outra desvantagem surge dos deslocamentos de frequência provenientes de efeitos ópticos. Esses dois efeitos, em geral, são corrigidos quando da conversão de refletância para absorbância (Urban, 1996).

Fig. 2.22 - Representação esquemática do efeito de reflexão total atenuada, com uma única reflexão interna.

3. Experimental

3.1. Materiais

Água deionizada 18 MΩ.cm (Mili-Q) foi utilizada no preparo de todas as soluções.

As amostras de TMU/água/proteína foram preparadas a partir da adição de proteína à água seguida da adição do volume de TMU correspondente à fração de massa desejada.

3.1.1. Proteínas

Utilizou-se lisozima de dois fornecedores distintos. Para os trabalhos realizados no Brasil, a lisozima empregada foi obtida da Pharmacia (lote 4040267021, cod. 27-0267-02). Para os trabalhos realizados na Universidade de Nottingham - Inglaterra, utilizou-se lisozima obtida da Sigma (lote 093k1455, cod. L6876). Em todos os casos, as proteínas foram utilizadas sem qualquer tratamento adicional e armazenadas sob refrigeração, a -20⁰C, em dessecador sobre sílica gel.

3.1.2. Compostos deuterados

Dimetilsulfóxido-d₆ e D₂O foram obtidos da Aldrich e estocados ao abrigo de umidade e luz.

Lisozima deuterada foi obtida a partir de lisozima comercial. Soluções de lisozima em D₂O foram continuamente ultrafiltradas (5.000 g) em celas do tipo Centricon (Amicon) com massa molecular de corte de 10 KDa, com repetidas adições de D₂O por um período de cerca de vinte horas. Essas soluções foram posteriormente liofilizadas e a lisozima deuterada recuperada e estocada sob refrigeração (-20⁰C) em dessecador sobre sílica gel.

3.1.3. Solventes orgânicos

Os solventes orgânicos utilizados nos experimentos solvatocrômicos, a saber, tetrametiluréia (TMU), metanol (MeOH), 1-propanol (1-PrOH), 2-butoxietanol (2-BuEtOH) foram obtidos da Acros ou Merck, destilados a baixa pressão e estocados com peneira molecular ativada em dessecador sobre sílica gel.

3.1.4. Sondas solvatocrômicas

As sondas solvatocrômicas utilizadas foram a betaína de Reichardt (RB), obtida da Merck, e a merocianina, sintetizada em laboratório, fornecidas pelo Prof. Omar El Seoud (IQ-USP). O armazenamento foi feito em dessecador ao abrigo da luz.

3.2. Métodos

3.2.1. Reologia

3.2.1.1. Caracterização reológica dos géis de lisozima em TMU/água

A caracterização reológica consistiu na determinação da influência da composição do meio, *i.e.*, composição da mistura binária e concentração da proteína, sobre vários parâmetros reológicos ao longo do tempo, cobrindo um período logo após a formação do gel até 1 mês de idade da amostra. Para esses ensaios reológicos, bem como para as investigações cinéticas dos mesmos sistemas utilizou-se um aparelho MCR-300 da Physica com geometria cone-placa de 25 mm de diâmetro e ângulo de 1° . A temperatura dos experimentos foi controlada com precisão superior a $0,05^\circ\text{C}$ através de um sistema Peltier.

3.2.1.1.1. Dependência do comportamento reológico em função da concentração e tempo.

Sistemas lisozima/tetrametiluréia/água gelificados a w_{TMU} de 0,6 a 0,9 e concentrações de proteína na faixa de 2 mmol/L a 9 mmol/L foram estudados via varreduras de amplitude e frequência, testes de relaxação e testes de fluência ("creep") ao longo do tempo. Os testes de varredura de amplitude foram realizados de 0,1 a 1000 % de amplitude de deformação a 5 Hz. Varreduras de frequência a 0,1 a 40 Hz foram realizadas a 5 % de deformação nos sistemas com região linear viscoelástica acima de 10 %; nos outros casos utilizou-se uma deformação de 1%. Os testes de relaxação foram realizados com deformações de 5 % e 1 %, seguindo o mesmo critério dos testes de varredura de frequência. Para os testes de fluência, aplicou-se uma tensão suficiente para causar uma deformação restrita à região linear viscoelástica por um tempo longo o suficiente para se atingir uma situação de estado estacionário, no caso dos sistemas estudados, cerca de 1 minuto. O ciclo de experimentos foi repetido para todo o conjunto de amostras ao longo de um período de um mês em intervalos de aproximadamente 7 dias. Os experimentos foram realizados a 20°C e as amostras estocadas a temperatura ambiente ($\approx 20^\circ\text{C}$) entre os experimentos.

3.2.1.1.2. Análise da fractalidade

Para os ensaios de fractalidade, utilizou-se o modelo proposto por Shih (Shih *et al.*, 1990). Nesse modelo, a estrutura do gel é considerada como um conjunto de flocos empacotados, onde o comportamento elástico é definido pelos flocos. Em função da força de coesão entre os flocos e as forças interna dos flocos, os sistemas podem ser classificados como géis de ligação forte ou fraca. No caso dos géis de ligação forte, as ligações interflocos possuem maior elasticidade do que as ligações intraflocos, enquanto no regime de ligação fraca, ocorre o contrário.

Nos géis em regime de ligação forte, a elasticidade dos géis, dada pelo parâmetro G' (módulo de armazenagem), e o limite da região linear viscoelástica (γ_0) em função da concentração da partícula formadora do gel são dados por:

$$G' \approx \phi^{(d+x)/(d-D_f)} \quad \text{Eq. 3.1}$$

$$\gamma_0 \approx \phi^{-(1+x)/(d-D_f)} \quad \text{Eq. 3.2}$$

onde,

G' , módulo de armazenagem, parâmetro reológico relacionado com a elasticidade,

ϕ , concentração da unidade formadora do gel, nesse caso relativo à concentração da proteína,

d , dimensão euclidiana, no nosso caso, $d=3$,

x , dimensão fractal dos flocos, onde $1 \leq x \leq 3$ (Shih, *et al.*, 1990),

D_f , dimensão fractal,

γ_0 , limite da região viscoelástica linear.

Para o regime de ligação fraca, temos:

$$G' \approx \phi^{(d-2)/(d-D_f)} \quad \text{Eq. 3.3}$$

$$\gamma_0 \approx \phi^{1/(d-D_f)} \quad \text{Eq. 3.4}$$

Os experimentos consistiram no acompanhamento do valor de G' e do valor γ_0 em função da concentração de proteína no sistema. Escolheu-se arbitrariamente o valor de G' a 1% de deformação, valor situado dentro da região viscoelástica linear para todos os géis estudados. Para γ_0 , considerou-se a deformação correspondente a um G' limite, imediatamente anterior a um valor de G' a partir do qual se observam variações maiores que 5 % em relação ao valor escolhido. A partir de um gráfico de $\ln G'$ contra $\ln \phi$ obtém-se o valor da dimensão fractal.

3.2.1.2. Cinética de gelificação dos sistemas lisoзима/TMU/água por indução do meio

Nestes ensaios de gelificação utilizou-se o mesmo perfil de experimento para todas as determinações. O equipamento utilizado foi o mesmo empregado na caracterização dos géis (itens 3.2.1.1.1 e 3.2.1.1.2), a saber, um reômetro Physica MCR300. A geometria de medida foi também um conjunto cone-placa de 25 mm de diâmetro e ângulo de 1° . As amostras foram expostas a um grupo de cinco perturbações a 0,1 % de deformação a 1 Hz, pelo tempo necessário para aquisição de cinco pontos (tempo determinado pelo aparelho) seguido de um período de cinco minutos de repouso. O processo é repetido até cerca de trinta minutos após o tempo de gelificação. Decidiu-se por utilizar um perfil de experimento pulsado ao invés de um contínuo devido à fragilidade da amostra, que se mostrou incapaz de resistir a uma perturbação contínua. A escolha da amplitude de deformação e frequência de oscilação foi determinada a partir da monitoração do efeito desses parâmetros na gelificação do sistema lisoзима/TMU/água a $w_{\text{TMU}}=0,6$, pois este é um dos sistemas mais frágeis com que se trabalhou, buscando encontrar-se um conjunto de parâmetros que fornecesse reprodutibilidade adequada e uma boa relação sinal/ruído.

Como critério para definição do ponto de gelificação adotou-se o ponto de cruzamento de G' e G'' , critério esse de uso corrente na literatura (Rodriguez, *et al.*, 2003; Nijenhuis, 1981; da Silva e Arêas, 2005). Esse critério baseia-se na hipótese de que a contribuição de G' advém das redes tridimensionais que formam o arcabouço do gel e que os agregados formadores desse arcabouço não contribuem para o aumento de G' antes da formação do gel. Desse modo, os valores de G' devem permanecer próximos de zero e subir rapidamente a partir do momento em que a rede se forma e atinge um patamar dentro de um certo tempo após a formação da rede. Um exemplo típico dos experimentos de cinética de gelificação é apresentado na Fig. 3.1. Como pode ser observado, os valores de G' tendem a permanecer em valores próximos de zero em regiões distantes do ponto de gelificação e apresentam um aumento gradativo quando se aproximam do momento de formação do gel, dentro da janela de tempo experimental, não apresentando uma tendência clara de estabilização. Esse aumento pode ser atribuído à contribuição elástica dos agregados já presentes na solução, os quais embora ainda não

tenham formado uma rede tridimensional que permeie todo o volume do sistema, já se encontram em dimensões que geram contribuições mensuráveis à elasticidade do meio. Dessa forma faz-se necessária a escolha de um determinado ponto no qual assume-se a presença do arcabouço do gel. No caso do presente trabalho, como já mencionado, esse ponto correspondeu ao ponto de cruzamento de G' e G'' . A não estabilização dos módulos após a formação do gel se deve, como discutido anteriormente, ao fato de que a maioria das moléculas de proteína não se encontra agregada ao arcabouço do gel mesmo após a formação do mesmo. A posterior agregação de mais moléculas de proteína às redes leva a um aumento contínuo de ambos os módulos ao longo do tempo.

3.2.1.3. Cinética de gelificação dos sistemas lisozima/TMU/água por aquecimento

Os experimentos reológicos foram realizados num reômetro Bohlin CVO equipado com uma geometria do tipo placas paralelas de 20 mm de raio, equipamento disponível na Divisão de Food Sciences da Universidade de Nottingham - Inglaterra. O controle de temperatura foi feito por meio de um sistema Peltier com precisão de $0,1^{\circ}\text{C}$. Para evitar perda de água por evaporação, cerca de 0,5 mL de óleo de silicone de baixa viscosidade (Fluka AR 20) foi pipetado ao redor da geometria. Para a determinação das temperaturas de gelificação, as amostras ensaiadas foram submetidas a um aquecimento constante a uma taxa de $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Para os experimentos de determinação dos tempos de gelificação, as amostras foram submetidas a uma temperatura constante durante o experimento. Ambos os tipos de experimentos consistiram no acompanhamento da variação dos módulos de armazenagem (G') e de perda (G'') em função da temperatura e do tempo, respectivamente.

Em sistemas submetidos a aquecimento, não se utilizou o cruzamento dos módulos como critério para determinação do ponto de gelificação, diferentemente dos experimentos envolvendo gelificação apenas por indução do solvente (Fig. 3.1), como já visto. Na gelificação induzida por aquecimento, o sistema apresenta um fraco sinal pré-gelificação (Fig. 3.2), fato que dificulta a determinação exata do t_{gel} , pois não é possível se definir com clareza o ponto de cruzamento de G' e G'' . Assim, para esses casos utilizou-se um procedimento sugerido na literatura (Kavanagh, *et al.*, 2000) que consiste

no ajuste do sinal pós-gelificação por uma equação exponencial (Eq. 3.5). A forma da equação baseia-se em observações empíricas do comportamento cinético da gelificação de proteínas globulares por aquecimento, obtido pelos autores em vários estudos. O perfil da curva consiste num crescimento exponencial que tende a atingir um patamar em um certo intervalo de tempo após o ponto de gelificação (Fig. 3.2). Esse perfil segue o comportamento esperado para a variação de G' , como descrito anteriormente, considerando-se uma contribuição mensurável dos agregados mesmo antes do ponto de formação das redes tridimensionais que formam o gel. O rápido crescimento exponencial reflete a agregação inicial das moléculas de proteína para formar a rede tridimensional do gel, seguida por um lento aumento de G' que representa a posterior inclusão de moléculas ainda não agregadas ao arcabouço do gel. Após um tempo longo o suficiente para que todo esse estoque de proteína seja incorporado às redes, o valor de G' deve chegar a um patamar. Na janela experimental usada, não se alcançou esse patamar de G' . O valor de 1 Pa foi escolhido como indicador do tempo de gelificação, pois para a grande maioria dos sistemas o início do comportamento ascendente de G' se torna visível em torno desse valor.

Para essa série, as amostras foram submetidas a uma deformação de 0,1% e frequência de 1 Hz. Varreduras de amplitude e de frequência, a 20°C, foram realizadas nas amostras após o término dos experimentos, para controle. As varreduras de amplitude indicaram que a deformação utilizada se encontrava na região viscoelástica linear. Foram estudados os sistemas lisozima/TMU/água cobrindo a faixa de composição de $w_{TMU}=0,0$ a $w_{TMU}=0,5$ e de lisozima de 4% a 12% (m/m). Utilizou-se uma concentração constante de 100 mmol/L de NaCl ao longo dos experimentos.

A equação utilizada para determinação do t_{gel} foi a seguinte:

$$G' = G'_{\infty} e^{\left(\frac{-B}{t}\right)} \quad \text{Eq. 3.5}$$

onde, G' , módulo de armazenagem,
 G'_{∞} módulo de armazenagem a um tempo infinito,
 B , um parâmetro empírico,
 t , tempo.

Fig. 3.1 - Perfil típico para os experimentos de determinação de tempo de gelificação para os sistemas lisozima/TMU/água, sem aquecimento. Nesse exemplo, $w_{\text{TMU}}=0,90$ e lisozima a 3,5 mmol/L. Os pontos indicados são resultados da média de 5 pontos experimentais.

Fig. 3.2 - Curva típica da dependência de G' e G'' com o tempo para um sistema lisozima/TMU/água (10% de lisozima em $w_{\text{TMU}} = 0,3$, submetido a aquecimento a 48°C). A linha preta representa o ajuste, por uma função exponencial, que guiou a escolha do tempo de gelificação (t_{gel}). A linha azul tracejada indica o valor arbitrário tomado para a determinação do t_{gel} .

3.2.1.4. Energia de ativação aparente para o processo de gelificação

Assumindo que o processo global de gelificação, que inclui como etapas básicas o desenovelamento da proteína, difusão da mesma pelo sistema e a associação das moléculas para formação do gel, possa ser descrito por uma energia de ativação global, ou aparente, temos que:

$$\ln t_{gel} = A + \frac{E_a}{RT} \quad \text{Eq. 3.6}$$

onde,

t_{gel} , tempo de gelificação (s),

A , constante (s),

E_a , energia de ativação global, ou aparente, do processo de gelificação (J/mol),

R , constante universal dos gases ($\text{J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$),

T , temperatura absoluta (K).

3.2.2. Espectroscopia vibracional no infravermelho (ATR-IR)

Espectros vibracionais na região do infravermelho foram coletados utilizando-se um espectrômetro IFS48 (Bruker Optics) equipado com uma cela de refletância total atenuada (attenuated total reflectance - ATR), equipamento disponível na Divisão de Food Sciences da Universidade de Nottingham - Inglaterra. A cela consiste de uma janela de diamante e uma cela de pressão de safira (anvil). Essa montagem permite apenas uma reflexão interna. A temperatura do sistema pode ser controlada através de um sistema de aquecimento conectado à janela de diamante. O caminho óptico foi submetido a uma purga constante de ar seco para reduzir as contribuições do vapor da água.

Dois perfis de experimentos foram conduzidos. Em um caso, coletaram-se espectros, com 400 repetições, a 4 cm^{-1} de resolução, de: (a) sistemas lisozima/TMU/NaCl 100 mmol/L sem tratamento térmico e (b) sistemas lisozima/TMU/NaCl 100 mmol/L submetidos a tratamento térmico, 6 horas a 85°C . Em

ambos os casos utilizaram-se sistemas com lisozima a 10% (m/m), concentração de TMU de 0,0 a 0,9 em fração de massa (w_{TMU}) e concentração constante de 100 mmol/L de NaCl na fase aquosa. Paralelamente, coletaram-se espectros do vapor da água (cela vazia) e do solvente, para posterior subtração da contribuição dos mesmos. Os espectros foram coletados a 25°C. Subtraíram-se as bandas em 1684, 1670, 1662, 1653, 1646 e 1617 cm^{-1} , atribuídas ao vapor de água (Dong, *et al.*, 1990). Obteve-se uma linha base entre 2000 e 1720 cm^{-1} (Dong, *et al.*, 1990), eliminando-se assim as contribuições do vapor de água e da água. Procurou-se também subtrair a intensidade da banda em 714 cm^{-1} , atribuída ao estiramento simétrico CNC da TMU (Colthup, *et al.*, 1990), a fim de se eliminar a contribuição da TMU. Utilizando uma rotina de autodeconvolução por transformada de Fourier nos espectros resultantes, melhorou-se a resolução das bandas na região amida I, de 1600 a 1700 cm^{-1} .

Um segundo grupo de experimentos consistiu no acompanhamento das variações dos espectros durante o processo de gelificação. Nessa série, utilizaram-se dois sistemas: lisozima 10% (w/w) em TMU/ NaCl 100 mmol/L, com $w_{\text{TMU}}=0,3$ a 40°C; e lisozima 7% em TMU/ NaCl 100 mmol/L, com $w_{\text{TMU}}=0,6$ a 25°C. Os espectros foram coletados em intervalos de 5 minutos, 400 repetições a 4 cm^{-1} de resolução, por um período equivalente ao dobro do tempo esperado para a gelificação do sistema. Os tempos foram determinados reologicamente, conforme exposto no item 3.2.1.3. Dos espectros obtidos, foram subtraídas as contribuições do vapor de água e do solvente, conforme indicado anteriormente.

3.2.3. Micro calorimetria diferencial de varredura (Micro-DSC)

Temperaturas e entalpias de denaturação foram determinadas para os sistemas lisozima/TMU/água utilizando-se um calorímetro Setaram micro-DSC III, equipamento disponível na Divisão de Food Sciences da Universidade de Nottingham - Inglaterra. Dois grupos de amostras foram estudados. Um grupo foi formado por sistemas com lisozima 10% (m/m) em TMU/100 mmol/L NaCl, com a concentração de TMU variando de $0,0 \leq w_{\text{TMU}} \leq 0,5$ em passos de 0,1. Nessas condições, observou-se gelificação dos sistemas. O outro grupo consistiu de sistemas com lisozima 0,5% (m/m) em

TMU/água, 100 mmol/L NaCl, e w_{TMU} variando de 0,0 a 0,9 em passos de 0,1. Nessas condições, não se observou formação de géis. Para ambos os tipos de sistemas estudados, as amostras foram submetidas a uma varredura de 2^oC a 120^oC, a uma taxa de 1^oC/min. Água deionizada foi utilizada como material de referência. Um experimento extra foi realizado a fim de se determinar a reversibilidade da denaturação induzida pelo meio. Para isso, escolheu-se o sistema lisozima/TMU/água a $w_{\text{TMU}}=0,3$ e realizou-se uma corrida de 20^oC a 70^oC, faixa de temperatura extensa o suficiente para garantir a denaturação da proteína, mas não alta o suficiente para levar à quebra de suas pontes de dissulfeto (acima de 90^oC) (Renkema, *et al.*, 2000).

3.2.4. Ressonância magnética nuclear de ciclagem rápida de campo (FFC-NMR: Fast-Field-Cycling NMR)

Ensaio de relaxometria foram realizados empregando-se a técnica de FFC-NMR em sistemas lisozima deuterada/dimetilsufóxido- d_6 /D₂O. Detalhes experimentais da técnica podem ser obtidos no trabalho de revisão (Anoardo, *et al.*, 2001).

Os experimentos foram realizados em colaboração com o Prof. E. Anoardo da Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina e Eng^o. G. Ferrante da Stelar, Itália, onde os dados foram obtidos.

3.2.5. Solvacromismo

Foram realizadas determinações de polaridade microscópica em soluções de tetrametiluréia/co-solvente, onde os co-solventes foram água, 1-propanol e 2-butoxietanol a 15^oC, 25^oC, 40^oC e 60^oC e metanol a 15^oC, 25^oC e 40^oC. As sondas utilizadas foram a betaína de Reichardt (RB) e merocianina (MC). A concentração final das sondas nas misturas binárias foi de aproximadamente 2 a 5 x 10⁻⁴ mmol/L. As medidas espectroscópicas foram realizadas em um espectrofotômetro Beckman DU-70 V, equipado com banho termoestático com circulação externa de água, sendo o controle de temperatura realizado através de um termômetro digital acoplado ao porta-cela do espectrofotômetro. O valor de λ_{max} foi obtido através da primeira derivada do espectro de absorção, utilizando-se a média de duas medidas consecutivas.

Utilizaram-se dezoito amostras de TMU em mistura com o co-solvente (S_2), com fração molar de S_2 (χ) de 0,00 a 1,00 em intervalos de aproximadamente 0,05. As amostras foram preparadas a partir da pesagem de uma massa de S_2 em balão volumétrico próxima à massa desejada para cada fração molar esperada e adição de quantidade de S_1 suficiente para completar-se o volume do balão. Desta maneira, obtém-se o valor da molaridade e da fração molar. As medidas espectroscópicas para as soluções foram realizadas num espectrofotômetro Beckman DU-70 V, a $25,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$. O valor de λ_{max} foi obtido através da primeira derivada do espectro de absorção.

O valor da micropolaridade é calculado através da posição da banda de absorção de transferência de carga intramolecular da sonda utilizando-se a equação Eq. 2.35, onde a escala para RB é denominada $E_T(30)$ e para merocianina $E_T(\text{MC})$. Para possibilitar a comparação entre valores de micropolaridade em diferentes escalas, os valores foram convertidos para uma escala reduzida, indicada abaixo para o caso específico da TMU:

$$E_T^r = \frac{E_T(\text{mistura}) - E_T(\text{TMU})}{E_T(S_2) - E_T(\text{TMU})} \quad \text{Eq. 3.7}$$

4. Resultados

4.1. Ensaios reológicos

Os experimentos reológicos realizados focalizaram o estudo estrutural e cinético dos sistemas lisozima/TMU/água cobrindo uma ampla gama de composição dos mesmos. As amostras estudadas podem ser divididas em dois grupos em função da concentração de TMU (expressa em fração de massa de TMU, w_{TMU}) nos sistemas: um grupo a concentrações de TMU abaixo da concentração crítica ($w_{TMU} < 0,6$) e outro a concentrações iguais ou acima da concentração crítica ($w_{TMU} \geq 0,6$). À temperatura ambiente, sistemas lisozima/TMU/água não gelificam quando em concentrações menores que cerca de $w_{TMU} = 0,6$, dentro das condições experimentais utilizadas. Logo, investigando-se ao longo da faixa de concentração de TMU de $0,0 \leq w_{TMU} \leq 0,9$, lida-se com sistemas em dois estados, soluções e géis. Para os sistemas gelificados em temperatura ambiente, a $w_{TMU} \geq 0,6$, realizou-se uma caracterização das propriedades reológicas dos géis em função de sua composição e um acompanhamento do processo de seu envelhecimento pelo período de um mês. Para ambos os tipos de sistemas, acompanharam-se reologicamente a cinética de gelificação e a sua dependência em relação à composição do meio e temperatura. No caso dos sistemas a $w_{TMU} < 0,6$, utilizou-se de aquecimento para induzir a gelificação e verificou-se o efeito da composição da mistura binária nesse processo. Nesses casos, trabalhou-se com a fase aquosa em meio salino, a uma concentração constante de 100 mmol/L de NaCl, a fim de se produzir géis menos frágeis.

4.1.1. Caracterização estrutural

A caracterização estrutural se deu através da monitoração das características reológicas dos géis obtidos em função da composição do sistema através de experimentos oscilatórios: varreduras de amplitude e de frequência, e experimentos rotacionais: relaxação e testes de fluência (“creep”). Através da aplicação de um modelo apresentado na literatura (Shih, *et al.*, 1990), que correlaciona as propriedades elásticas

dos géis à estrutura de seu arcabouço, investigaram-se aspectos microscópicos da estrutura dos géis produzidos.

4.1.1.1. Influência da composição do meio nas propriedades viscoelásticas dos géis

Na Fig. 4.1 temos um exemplo de uma típica curva de varredura de amplitude para os géis de lisozima em TMU/água. Os valores dos módulos de armazenagem (G') e de perda (G'') utilizados foram extraídos a partir desses experimentos conforme descrito na seção de Métodos. Como pode ser observado, os géis possuem uma extensa região viscoelástica linear e uma boa relação sinal ruído. Os géis estudados possuem uma limitada memória mecânica sendo possível obter curvas idênticas em varreduras subseqüentes com um tempo de espera relativamente pequeno, menor que 3 minutos. Os géis também se mostraram estáveis ao longo de toda seqüência de experimentos, não apresentando perda de suas características reológicas mesmo após longas seqüências de medidas.

Um estudo centrado nos efeitos da concentração de TMU sobre o comportamento reológico desses sistemas foi realizado em trabalho anterior (da Silva, 2001; da Silva e Arêas, 2002). Nesta Tese, estudou-se a influência da concentração da proteína em meios TMU/água a diversas composições, sobre o comportamento mecânico dos sistemas. Nas Figs 4.2 a 4.5 são apresentados os valores de G' e G'' obtidos em função da concentração de lisozima nos sistemas, a diferentes concentrações de TMU. Os dados indicam uma dependência exponencial dos módulos com a concentração da proteína. Na Fig. 4.6 são apresentados os valores dos coeficientes angulares das curvas apresentadas nas Figs 4.2 a 4.5, *i.e.*, as taxas de variação dos valores de G' e G'' em função da concentração de proteína no meio, a diversas concentrações de TMU. Como pode ser observado, os módulos tendem a ser menos influenciados pela presença de proteína no meio com o aumento da concentração de TMU no sistema (Fig. 4.6), indicando uma possível saturação das mudanças estruturais sofridas pelo mesmo. De fato, quando se analisa o comportamento reológico dos géis em diferentes regiões de concentração de TMU, verifica-se que quando maior essa concentração, menor o impacto relativo do acréscimo de proteína ao sistema.

Alguns autores constataram que para gelificação de proteínas globulares por ação de calor, a maior parte das moléculas de proteína se encontra numa forma não agregada (Verheul e Roefs, 1998). Investigações por meio de espalhamento de raios X em baixo ângulo (SAXS) dos sistemas estudados no presente trabalho também sugerem a presença de proteína não agregada na região de w_{TMU} , $0,6 \leq w_{TMU} \leq 0,8$, indicado pela presença de um pico de interferência, e o seu provável desaparecimento na região de alta concentração de TMU ($w_{TMU}=0,9$), marcado pelo desaparecimento desse pico (da Silva, *et al.*, 2002). Nessa região de alta concentração do componente orgânico da mistura solvente foi sugerida a ocorrência de completa interdigitação da proteína no meio gelificado, justificando a conseqüente perda da correlação e do pico de interferência (da Silva, *et al.*, 2002).

Os valores de G' tendem a crescer mais rapidamente com o aumento da concentração de lisozima no sistema do que os valores de G'' , dando portanto um caráter mais elástico ao sistema. Na região de $0,6 \leq w_{TMU} \leq 0,8$, os valores de G'' tendem a um valor constante a concentrações mais altas de proteína (Figs. 4.2 a 4.4). O mesmo não parece ser o caso de G' . Utilizou-se a concentração de 9,5 mmol/L de proteína como limite a fim de se evitar eventos de agregação da proteína induzidos apenas pela alta concentração da mesma no sistema. No caso dos sistemas a $w_{TMU}=0,9$, observa-se uma situação distinta: G' e G'' tendem a crescer sem aparentemente tender a um valor constante (Fig. 4.5). Devido às limitações de solubilidade da proteína nessa região de concentração, a tendência ao não aparecimento de um patamar pode ser um reflexo de uma janela estreita de investigação.

Fig. 4.1 - Varredura de amplitude a 5 Hz para o sistema lisozima 6,0 mmol/L/TMU/água a $w_{TMU}=0,90$. Amostra com 35 dias.

Fig. 4.2 - Dependência de G' e G'' em função da concentração de lisozima para o sistema lisozima/TMU/água a $w_{TMU}=0,60$.

Fig. 4.3 - Dependência de G' e G'' em função da concentração de lisozima para o sistema lisozima/TMU/água a $w_{\text{TMU}}=0,70$.

Fig. 4.4 - Dependência de G' e G'' em função da concentração de lisozima para o sistema lisozima/TMU/água a $w_{\text{TMU}}=0,80$.

Fig. 4.5 - Dependência de G' e G'' em função da concentração de lisozima para o sistema lisozima/TMU/água a $w_{\text{TMU}}=0,90$.

Fig. 4.6 - Influência da w_{TMU} na variação dos de G' e G'' nos géis de lisozima/TMU/água (dados extraídos das Figuras 4.2 a 4.5).

Os perfis das varreduras de frequência (Figs. 4.7 a 4.10) reproduzem os perfis obtidos anteriormente na ausência de sal (da Silva e Arêas, 2002) e não parecem ser significativamente afetados pela concentração da proteína no sistema. Os valores de G' e G'' tendem a aumentar monotonicamente com o aumento da frequência, comportamento característico para géis físicos, onde as interações predominantes são interações transientes, *e.g.*, ligações de hidrogênio e forças fracas de van der Waals (Dickinson, 1997). Esse comportamento se coloca em contraposição ao comportamento de géis químicos, onde o arcabouço do gel é formado principalmente por ligações covalentes cruzadas. Nesse último caso, espera-se que os módulos sejam independentes da frequência. As Figs. 4.7 a 4.10 indicam que a dependência dos módulos com a frequência sofre uma diminuição com o aumento da concentração de TMU. As mesmas Figuras mostram que os valores dos módulos apresentam um nítido aumento com o aumento da concentração de proteína e de TMU.

Em trabalhos anteriores verificou-se a dependência dos tempos de relaxação com a concentração de TMU no sistema (da Silva, 2001; da Silva e Arêas, 2002). Neste projeto ampliou-se a investigação, verificando-se o efeito da concentração de lisozima e o efeito do tempo. Os testes apresentaram resultados similares aos já obtidos anteriormente. Há indicação da presença de pelos menos duas espécies dinamicamente distintas, pois as curvas se ajustam bem por um decaimento exponencial duplo. Os tempos de relaxação apresentam uma dependência exponencial em função da concentração de TMU (Fig. 4.11) (da Silva, 2001; da Silva e Arêas, 2002) que advém da mudança estrutural no sistema ao longo da faixa de concentração estudada. Em relação à dependência dos valores de t_1 e t_2 com a variação da concentração de proteína, Fig. 4.12, obteve-se uma grande flutuação dos valores no sistema a $w_{TMU}=0,6$, provavelmente devido à fragilidade dos géis nessa região, *i.e.*, baixos valores de G^* . Observa-se, no entanto, uma leve tendência de aumento de t_1 e t_2 com o aumento de concentração de lisozima, tendência mais evidente a $w_{TMU}=0,8$ (Fig. 4.12c). A $w_{TMU}=0,9$, novamente se observa um comportamento distinto (Fig. 4.12d): os tempos de relaxação apresentam-se relativamente estáveis dentro da faixa de concentração estudada, forte indicativo de que o sistema já se encontra num estado final de acomodação.

A variação de G' e G'' ao longo do período observado (Fig. 4.13) indica um aumento contínuo dos valores dos módulos ao longo do tempo sem tendência a se estabilizarem em um dado valor, exceto para os sistemas a $w_{\text{TMU}}=0,9$ (Fig. 4.13d), onde os valores dos módulos sofrem um aumento menos intenso durante o período avaliado. Contrariamente, os valores de t_1 e t_2 (Fig. 4.14), bem como os valores de dimensão fractal (D_f), Fig. 4.15, que serão discutidos posteriormente, apresentam uma baixa sensibilidade ao envelhecimento dos géis.

A variação da tangente do ângulo de perda, $\tan \delta$, (Fig. 4.16) indica que os géis estudados tendem a adquirir um carácter mais sólido com o aumento da concentração de TMU (Fig. 4.16a) e de proteína (Fig. 4.16b) no sistema, *i.e.*, o aumento desses componentes no sistema leva a uma diminuição da razão entre o módulo de perda e de armazenagem, indicando que o sistema se torna mais elástico em regiões de alta concentração de proteína ou TMU.

Fig. 4.7 - Varreduras de frequência a 5 % de deformação para o sistema lisozima/TMU/água a $w_{\text{TMU}}=0,60$ e lisozima: (a) 5,0 mmol/L, (b) 6,0 mmol/L, (c) 7,0 mmol/L e (d) 8,0 mmol/L.

Fig. 4.8 - Varreduras de frequência a 5% de deformação para o sistema lisozima/TMU/água a $w_{\text{TMU}}=0,70$ e lisozima: (a) 4,0 mmol/L, (b) 5,0 mmol/L, (c) 6,0 mmol/L e (d) 7,0 mmol/L.

Fig. 4.9 - Varreduras de frequência a 5% de deformação para o sistema lisozima/TMU/água a $w_{\text{TMU}}=0,80$ e lisozima: (a) 4,0 mmol/L, (b) 5,0 mmol/L, (c) 6,0 mmol/L e (d) 7,0 mmol/L.

Fig. 4.10 - Varreduras de frequência a 5 % de deformação para o sistema lisozima/TMU/água a $w_{\text{TMU}}=0,90$ e lisozima: (a) 4,0 mmol/L, (b) 5,0 mmol/L, (c) 6,0 mmol/L e (d) 7,0 mmol/L.

Fig. 4.11 - Dependência dos tempos de relaxação (t_1 e t_2) em função da concentração de TMU no sistema lisozima (6,0 mmol/L)/TMU/água.

Fig. 4.12 - Dependência dos tempos de relaxação (t_1 e t_2) em função da concentração de lisozima para os sistemas lisozima/TMU/água a: (a) $w_{TMU}=0,60$, (b) $w_{TMU}=0,70$, (c) $w_{TMU}=0,80$ e (d) $w_{TMU}=0,90$.

Fig. 4.13 - Dependência dos módulos de armazenagem e perda (G' e G'') em função do tempo para o sistema lisozima (6,0 mmol/L)/TMU/água a: (a) $w_{TM}=0,60$, (b) $w_{TM}=0,70$, e (d) $w_{TM}=0,90$.

Fig. 4.14 - Dependência dos tempos de relaxação (t_1 e t_2) com o tempo para os sistemas lisozima/TMU/água a: (a) $w_{TM}=0,60$, (b) $w_{TM}=0,70$, (c) $w_{TM}=0,80$ e (d) $w_{TM}=0,90$.

4.1.1.2. Fractalidade

Como apresentado na seção de Metodologia, através do uso do modelo proposto por Shih (Shih, *et al.*, 1990) é possível utilizar-se da dependência das propriedades elásticas dos géis em função da concentração da proteína para se calcular um valor de dimensão fractal para os agregados formados durante o processo de gelificação, assumindo-se que os géis formam estruturas fractais. Como já apresentado em trabalho anterior empregando a técnica de SAXS (espalhamento de raios X em baixo ângulo) (da Silva, *et al.*, 2002) há sustentação para a hipótese de que os géis formados formem estruturas fractais.

O modelo de Shih pressupõe a existência de dois tipos de agregados, o de ligação forte e o de ligação fraca. A distinção entre eles é feita através da dependência do limite da região viscoelástica linear (γ_0) em função da concentração do elemento formador do gel - a lisozima, no caso dos sistemas estudados. Para os géis do tipo ligação forte espera-se uma dependência inversamente linear, em escala logarítmica, e no regime de ligação fraca, uma dependência linear direta. Como pode ser observado na Fig. 4.17 todos os sistemas estudados apresentam uma dependência inversa, logo, seguem o regime característico de ligação forte.

Na Fig. 4.18 encontram-se os valores das dimensões fractais (D_f) obtidos para os sistemas lisozima/TMU/água com w_{TMU} de 0,6 a 0,9. Pode ser observado que os valores da dimensão fractal tendem a diminuir linearmente com o aumento da concentração de TMU no sistema e apresentam uma aparente estabilidade com o envelhecimento dos géis (Fig. 4.15).

Os valores de D_f obtidos neste trabalho diferem dos valores obtidos anteriormente para o mesmo sistema por SAXS (da Silva, *et al.*, 2002). Entre as possíveis causas da diferença, podemos indicar que no trabalho de SAXS não foi possível identificar com clareza a unidade espalhadora. Pelas características próprias da técnica, a unidade espalhadora deve ser o floco e não o esqueleto do gel. Portanto, as análises reológica e espectroscópica indicam dimensões fractais de objetos distintos. Também deve ser levado em conta que o SAXS apresenta uma média das contribuições de todas as

unidades espalhadoras presentes no sistema enquanto o conjunto das investigações reológicas sugere a presença tanto de moléculas de proteína agregada quanto não agregada nos géis estudados. O modelo proposto por Shih baseia-se nas propriedades elásticas do gel, que provem majoritariamente das moléculas agregadas.

Fig. 4.15 - Dependência da dimensão fractal (D_f) com o tempo para os sistemas lisozima/TMU/água a várias concentrações de TMU.

Fig. 4.16 - Dependência da tangente de perda ($\text{tg } \delta$) com: (a) a fração de massa de TMU e (b) concentração de lisozima para os sistemas lisozima/TMU/água.

Fig. 4.17 - Dependência do limite da região viscoelástica linear (γ_0) com concentração de lisozima para os sistemas lisozima/TMU/água a várias concentrações de TMU.

Fig. 4.18 - Influência da composição da mistura binária na dimensão fractal dos géis de lisozima em TMU/água.

4.1.2. Cinética de gelificação

Os estudos das cinéticas de gelificação da lisozima em TMU/água foram realizados em dois regimes diferentes. Em um caso, foram examinados os sistemas que gelificam espontaneamente a temperatura ambiente. Nesse regime, incluem-se sistemas acima da concentração crítica de TMU, $w_{\text{TMU}} \geq 0,6$, na ausência de sal. Inicialmente decidiu-se não se utilizar sais devido a problemas de solubilidade causados pela alta concentração do componente orgânico. Em um segundo caso, estudaram-se sistemas que não gelificam à temperatura ambiente. Para esses sistemas, utilizou-se de aquecimento para induzir o processo de gelificação. Devido às características mecânicas dos géis formados em que baixos valores de G^* são observados, optou-se por trabalhar em um ambiente de força iônica não nula.

4.1.2.1. Agregação por indução do solvente

Nas Figs. 4.19 e 4.20 são apresentados os valores de tempo de gelificação (t_{gel}) obtidos em função da composição do sistema. Os t_{gel} s seguem um decaimento exponencial com a concentração de proteína e uma dependência inversamente linear com a concentração de TMU no sistema. Na Fig. 4.19 observa-se uma grande diferença entre os tempos de gelificação na região de $0,6 \leq w_{\text{TMU}} \leq 0,8$ e a $w_{\text{TMU}} = 0,9$. Como se pode ver claramente na figura os t_{gel} s a $w_{\text{TMU}} = 0,9$ encontram-se em uma região visivelmente distinta do gráfico. Na Fig. 4.20, onde se apresenta a dependência dos t_{gel} s com a fração de massa de TMU, não foi possível incluir um conjunto de dados que representasse toda a faixa de concentração de TMU estudada, $0,6 \leq w_{\text{TMU}} \leq 0,9$.

Em relação à influência da temperatura na cinética de gelificação desses sistemas, observou-se que os t_{gel} s seguem um decaimento exponencial do tipo lei de Arrhenius (Figs. 4.21 e 4.22). Novamente observou-se um grande salto nos valores de t_{gel} na faixa de temperatura ensaiada, na região de $w_{\text{TMU}} = 0,9$, diferença grande o suficiente para impedir a determinação de t_{gel} s nessa concentração de TMU nas mesmas condições experimentais usadas para os outros sistemas. Nas tabelas 4.1 e 4.2 encontram-se os valores de t_{gel} determinados em função das condições experimentais ensaiadas, onde se

pode observar uma clara separação dos t_{gel} s determinados a $w_{TMU}=0,9$ dos outros sistemas estudados.

Fig. 4.19 - Dependência dos tempos de gelificação com a concentração de lisozima no sistema lisozima/TMU/água a várias concentrações de TMU.

Fig. 4.20 - Dependência dos tempos de gelificação com a concentração de TMU no sistema lisozima/TMU/água a várias concentrações de lisozima.

Fig. 4.21 - Dependência dos tempos de gelificação com a temperatura no sistema lisozima/TMU/água a várias concentrações de TMU.

Fig. 4.22 - Curvas do $\ln$ do tempo de gelificação pelo recíproco da temperatura absoluta.
Os valores de energia de ativação foram obtidos a partir dessas curvas.

Tabela 4.1 - Tempos de gelificação, em minutos, para o sistema lisozima/TMU/água em função da composição dos sistemas.

Concentração de proteína (mmol/L)	W _{TMU}			
	0,60	0,70	0,80	0,90
2,5				48
3,0				33
3,5				25
4,0			91	<3
4,5		139	78	
5,0	131	109	41	
5,5	99	62	22	
6,0	65	37	13	
6,5	60	30		
7,0	32	21		
7,5				

Tabela 4.2 - Tempos de gelificação, em minutos, para o sistema lisozima (5,5mmol/L) /TMU/água em função da temperatura.

W _{TMU}	Temperatura (°C)						
	5	10	15	20	25	30	35
0,60				99	18	8,5	5,7
0,65				88	27	14	8,9
0,70				62	27	13	3,9
0,75				49	18	13	
0,80	154	87	36	22	16		

4.1.2.2. Agregação por aquecimento

Na Fig. 4.23 encontram-se os valores obtidos para a temperatura de gelificação dos sistemas (T_{gel}). De todos os géis obtidos nos experimentos visando a determinação dos T_{gel} s, apenas os géis formados em solução aquosa sem a presença de TMU formaram géis opacos particulados. Em todos os outros casos, obtiveram-se géis homogêneos transparentes, embora a $w_{TMU}=0,1$ e $w_{TMU}=0,2$ os géis obtidos tenham apresentado uma leve opalescência.

Para a determinação dos tempos de gelificação (t_{gel}), trabalhou-se com dois grupos de experimentos. Em um primeiro grupo, estudaram-se os sistemas a uma dada concentração constante da mistura binária determinando-se os t_{gel} s em função da concentração de proteína a várias temperaturas. Esse procedimento foi realizado para cinco concentrações da mistura (TMU/ NaCl 100 mmol/L) na região pré-crítica. Os valores de t_{gel} s sofreram um decaimento exponencial em função da concentração de lisozima (Fig. 4.24). Devido à alta influência da TMU no processo de gelificação, não foi possível cobrir a variação dos t_{gel} s com a concentração de proteína e da fração de massa da TMU nas mesmas condições de temperatura. A fim de viabilizar uma investigação de uma ampla faixa de concentrações de proteína foi necessário variar a temperatura juntamente com a w_{TMU} .

Em um segundo grupo, trabalhou-se a uma concentração fixa de proteína, de 10% (m/m) e determinaram-se os t_{gel} s em função de temperatura e da composição da mistura binária. Como pode ser observado (Fig. 4.25), os t_{gel} s seguem um decaimento exponencial com o aumento da fração de massa de TMU e com o aumento da temperatura no sistema.

Fig. 4.23 - Influência da concentração de TMU na temperatura de gelificação (T_{gel}) do sistema lisozima/TMU/água.

Fig. 4.24 - Dependência dos tempos de gelificação (t_{gel}) em função da concentração de lisozima a várias concentrações de TMU.

Fig. 4.25 - Dependência dos tempos de gelificação (t_{gel}) em função da concentração de TMU a várias temperaturas, a 10% (m/m) de lisozima nos sistemas.

4.1.3. Energia de ativação

Nas Figs. 4.22 e 4.26 são apresentadas as curvas dos $\ln(t_{\text{gel}})$ s com o recíproco da temperatura absoluta a várias concentrações de TMU para os dois processos distintos de gelificação estudados, induzido somente pelo solvente (Fig. 4.22) e induzido por aquecimento (Fig. 4.26). Os t_{gel} s obtidos em ambos os casos seguem relações do tipo Arrhenius e através dessa relação (Eq. 3.6) obtiveram-se os valores de energia de ativação aparente (E_a) para o processo global de gelificação. Deve-se ressaltar que na grandeza de energia de ativação aparente estão inclusos todos os processos que ocorrem durante o processo de gelificação, *e.g.*, denaturação da proteína, formação dos primeiros agregados, difusão dos agregados pelo sistema, formação do arcabouço do gel, entre outros. Por isso essa grandeza é indicada como energia aparente. Por simplicidade, ao longo da discussão essa grandeza será referida apenas como energia de ativação.

Para os sistemas onde a gelificação foi induzida pela ação do solvente, as energias de ativação do processo de gelificação dos sistemas lisozima/TMU/água foram obtidas para as concentrações de TMU na região $0,6 \leq w_{\text{TMU}} \leq 0,8$ com concentrações de lisozima a 5,5 mmol/L. Nessas determinações houve um compromisso entre concentração de proteína, tempos de gelificação e faixa de concentração de TMU a ser estudada. Não é praticável com a instrumentação disponível cobrir toda a faixa de concentração de TMU. Para concentrações superiores a $w_{\text{TMU}} \approx 0,85$, os t_{gel} s são muito baixos, sendo necessário reduzir as concentrações de lisozima para compensar os baixos valores desse parâmetro, o que eleva, em muito, os tempos de gelificação para as faixas menores de TMU. Por isso, escolheu-se trabalhar na faixa de $0,6 \leq w_{\text{TMU}} \leq 0,8$ em passos de 0,05, devido a limitações práticas no preparo dos sistemas. Não foi possível se trabalhar de forma reprodutiva com passos menores. Os valores de energia de ativação obtidos para os sistemas gelificados por ação apenas do solvente constam da Fig. 4.27. Como pode ser observado, os pontos apresentam uma grande dispersão, sendo que o ponto a $w_{\text{TMU}}=0,7$ foge da tendência observada para os demais pontos. Excetuando-se este ponto, no entanto, verifica-se uma dependência decrescente da E_a com w_{TMU} , que está de acordo com as expectativas, considerando-se a variação no regime cinético em

regiões de w_{TMU} mais altas. Os pontos tendem a seguir um decaimento exponencial, mas o número reduzido de pontos experimentais não permite uma conclusão precisa.

Para os sistemas na região de concentração de $w_{TMU} < 0,6$, como discutido anteriormente, o processo de gelificação não ocorre espontaneamente nas condições experimentais ensaiadas. Logo, nessa região trabalhou-se com os sistemas sob aquecimento. Devido também às características mecânicas dos géis obtidos, empregou-se força iônica não nula. O fato de a força iônica não ser idêntica nos dois regimes impede uma comparação direta dos valores de E_a . A presença de sais na solução afeta diretamente a blindagem das cargas superficiais das proteínas, logo interferindo na barreira energética que controla a aproximação dessas moléculas e conseqüentemente o processo de agregação (Gosal e Ross-Murphy, 2000). Sabe-se que a força iônica afeta tanto os t_{gel} s quanto os valores de G' de géis de proteínas globulares obtidos por aquecimento (Tobitani e Ross-Murphy, 1997). Desse modo, é inapropriada uma comparação direta entre os valores de E_a obtidos nos diferentes regimes. Ainda assim, não deixa de interessante notar a coerência entre os dois grupos de E_a obtidos para as duas situações. Na Fig. 4.28 são apresentados os valores de E_a obtidos para o processo de gelificação induzido por calor na presença do solvente. Devido à dificuldade operacional em se determinar t_{gel} s para sistemas com $w_{TMU} < 0,2$, não foi possível obter número suficiente de pontos nessa região para calcular-se valores de E_a . Na Fig. 4.29, é apresentado para fins ilustrativos o conjunto dos valores de energia obtidos para ambos os regimes estudados.

Fig. 4.26 - Curvas do $\ln$ do tempo de gelificação pelo recíproco da temperatura absoluta para sistemas TMU/NaCl 100 mmolL⁻¹/lisozima a uma concentração de 10% (m/m) de proteína. Os valores de energia de ativação foram obtidos a partir dessas curvas.

Fig. 4.27 - Dependência da energia de ativação (E_a) com a concentração de TMU para os sistemas lisozima/TMU/água com concentração de lisozima a 5,5 mMol/L. Gelificação induzida unicamente pela ação do solvente.

Fig. 4.28 - Dependência da energia de ativação de gelificação do sistema lizozima/TMU/NaCl 100 mmol/L com a concentração de TMU. Gelificação induzida por aquecimento, facilitada por ação do solvente. Sistemas a 10 % (m/m) de lizozima.

Fig. 4.29 - Dependência da energia de ativação de gelificação do sistema lizozima/água/TMU com a concentração de TMU. São apresentados os valores de E_a obtidos para os dois tipos de processos estudados (vide texto).

4.2. Técnicas espectroscópicas

4.2.1. Espectroscopia vibracional no infravermelho

Os estudos vibracionais envolveram a monitoração do perfil espectral na região de 1600 a 1700 cm^{-1} onde se encontra a banda amida I. Essa banda é formada pela sobreposição de componentes distintos, que são associados a elementos específicos da estrutura secundária da proteína. Componentes na região de 1620 a 1640 cm^{-1} são normalmente atribuídos a folhas β , sendo que componentes a frequências inferiores a 1620 cm^{-1} podem ser atribuídos a folhas β intermoleculares (Dufour, *et al.*, 1998). Componentes na região de 1650 a 1660 cm^{-1} são atribuídos a hélices α (Haris e Severcan, 1999). Como pode ser observado no conjunto de espectros apresentados na Fig. 4.30, não é possível atribuir as contribuições individuais de cada componente de estrutura secundária presente nos sistemas devido às características dos envelopes espectrais. Por isso, utilizou-se de uma ferramenta matemática, autodeconvolução por transformada de Fourier, como forma de permitir uma melhor separação da contribuição de cada componente. Os espectros resultantes desse tratamento são apresentados na Fig. 4.31. Nesse conjunto de espectros, dois componentes dominantes são evidenciados. O componente na região de cerca de 1620 cm^{-1} foi atribuído à contribuição esperada das folhas β da proteína. O componente na região cerca de 1650 cm^{-1} foi atribuído às hélices α . Mesmo com o tratamento matemático, não é seguro basear uma análise quantitativa utilizando os espectros obtidos. O processo de subtração das contribuições do meio, como solvente e vapor da água, tende a criar artefatos no espectro dada a dificuldade de uma subtração quantitativamente precisa de cada contribuição, principalmente no caso das contribuições do solvente, pois este contribui com a maior parcela da intensidade do sinal. O tratamento de autodeconvolução tende a aumentar a separação das bandas, aumentando, no entanto, concomitantemente a contribuição do ruído no espectro. Dessa forma, a análise dos dados limitou-se a uma interpretação qualitativa das tendências nas mudanças estruturais sofridas pela proteína em função das condições experimentais às quais foi exposta.

Fig. 4.30 - Espectros no infravermelho do sistema lisozima/água/TMU. Espectros coletados após 24 horas da preparação das amostras. (a) Amostras sem tratamento térmico. (b) Amostras submetidas a aquecimento a 85°C por 6 horas.

Fig. 4.31 - Espectros no infravermelho deconvoluídos do sistema lisozima/água/TMU. (a) Amostras sem tratamento térmico. (b) Amostras submetidas a aquecimento a 85°C por 6 horas.

Nos estudos vibracionais foram realizadas duas abordagens distintas. No caso dos espectros já apresentados (Fig. 4.30 e 4.31), estudou-se o efeito do solvente na estrutura secundária da proteína em uma situação de repouso, em duas condições: a) os sistemas foram preparados e deixados em repouso; b) os sistemas foram submetidos a um aquecimento prolongado a 85⁰C por 6 horas. No primeiro grupo, apenas os sistemas a $w_{TMU} \geq 0,6$ se encontravam gelificados. Na Fig. 4.32 encontram-se apresentadas as variações das intensidades de ambos os componentes em função da fração de massa de TMU no sistema, para as duas situações estudadas. Para os sistemas sem tratamento térmico, dentro da resolução experimental, o teor de folhas β e hélices α da proteína tende a se manter inalterado até $w_{TMU} \sim 0,6$; a partir desse ponto, há um aumento significativo do teor de folhas β concomitantemente com uma redução no teor das hélices α . Esse perfil de comportamento já foi observado para gelificação induzida por aquecimento para outras proteínas globulares em solução aquosa (Gosal e Ross-Murphy, 2000) e em soluções alcoólicas (Dufour, *et al.*, 1998). Essa região de transição espectral ocorre na mesma região da transição sol-gel. Para os sistemas que sofreram tratamento térmico, nota-se apenas a perda de estruturação com o aumento da concentração de TMU no sistema, sendo que essa perda de estruturação tende a se estabilizar na região de $w_{TMU} \sim 0,3$. Na comparação entre os sistemas submetidos a tratamento térmico e sistemas não tratados, Figs. 4.32a e 4.32b, observa-se que na região de baixa concentração de TMU, $w_{TMU} \leq 0,3$, os sistemas submetidos a aquecimento apresentam teores maiores das duas estruturas secundárias monitoradas do que os sistemas não-tratados termicamente. Com o aumento da concentração de TMU, as diferenças entre os teores das estruturas secundárias tendem a diminuir.

Uma segunda abordagem consistiu no acompanhamento das mudanças espectrais na região da banda amida I ao longo do processo de gelificação, tanto numa situação induzida apenas pelo solvente, quanto numa onde aquecimento se faz necessário. Na Fig. 4.33 são apresentados os espectros referentes à monitoração da cinética de gelificação da lisozima nos dois grupos estudados: a $w_{TMU}=0,3$ (Fig. 4.33a) e a $w_{TMU}=0,6$ (Fig. 4.33b). A $w_{TMU}=0,3$, a gelificação só ocorre sob aquecimento, portanto o sistema é mantido a temperatura constante de 40⁰C. Pode-se observar uma gradual mudança nas alturas dos dois componentes principais da banda amida I em função do

tempo. A variação é monotônica e não oferece nenhum indicativo do momento em que a gelificação ocorre. Na segunda amostra, a $w_{TMU}=0,6$, a gelificação ocorre à temperatura ambiente (25°C). Não foram observadas mudanças significativas nos espectros obtidos ao longo do processo de gelificação nesse caso.

Fig. 4.32 - Intensidades dos componentes da banda amida I no infravermelho atribuídas a hélices α (■) e folhas β (●) para lisozima (10% m/m) em TMU/NaCl 100 mmol/L. (a) Sistemas sem tratamento térmico. (b) Sistemas aquecidos a 85°C por 6 horas. Espectros registrados a temperatura ambiente.

Fig. 4.33 - Espectros no infravermelho de: (a) lisozima 10% (m/m) em TMU/NaCl 100 mmol/L a $w_{\text{TMU}}=0,30$ e a 40°C; (b) lisozima 7% (m/m) em água/TMU a $w_{\text{TMU}}=0,60$ a 25°C. Espectros registrados a cada 7 minutos por períodos longos o suficiente para garantir a gelificação do sistema: (a) 4500 s e (b) 3000 s.

4.2.2. Ressonância magnética nuclear de ciclagem rápida (*Fast-field cycling NMR-FFC-NMR*)

Para os ensaios de relaxação utilizaram-se amostras de lisozima em dimetilsulfóxido (DMSO) ao invés de TMU, pela facilidade de se obter DMSO deuterado, comercialmente disponível. Em trabalhos anteriores (Arêas, *et al.*, 1996a; Arêas, *et al.*, 1999) verificou-se que o DMSO também apresenta a capacidade de promover gelificação de sistemas com lisozima, gerando perfis comportamentais similares àqueles dos géis formados em TMU/água. Dessa forma, pode considerar o sistema DMSO/água como um análogo ao sistema TMU/água em termos do efeito de indução da transição sol-gel.

Os perfis de relaxação apresentados pelas amostras indicaram a presença de três regimes dinâmicos distintos (Fig. 4.34). Para as amostras em $w_{\text{DMSO}} = 0,0$ e $0,2$, tem-se um comportamento típico de moléculas que apresentam uma forte dinâmica rotacional, comportamento característico de soluções líquidas. Nessa faixa de concentração, o sistema é líquido. O sistema a $w_{\text{DMSO}} = 0,6$ apresenta um comportamento levemente diferente em relação às amostras anteriores, diferença caracterizada por um regime mais restrito oriundo do desenovelamento das moléculas de proteína. A concentração de $w_{\text{DMSO}} = 0,6$ corresponde ao início da região de transição entre os sistemas gelificados e não gelificados. Os perfis das amostras a $w_{\text{DMSO}} = 0,8$ e $0,9$ indicam fases mais organizadas com menor liberdade de movimento. Nessa faixa de concentração, o sistema já se encontra completamente gelificado.

Fig. 4.34 - Perfil de dispersão de relaxação magnética nuclear (nuclear magnetic relaxation dispersion NMRD) para o sistema lisozima (5,0 mmol/L)/DMSO_{d6}/D₂O a várias concentrações de DMSO_{d6}.

4.2.3. Solvatocromismo

Os ensaios solvatocrômicos foram centrados nas misturas binárias TMU/co-solvente, onde os co-solventes usados foram: água, metanol, 1-propanol e 2-butoxietanol. Utilizaram-se as sondas RB e MC para estes ensaios (Fig. 4.35). Nas Figs. 4.36 a 4.39 são apresentados os respectivos valores de polaridade microscópica (E_T^r) para a sonda RB, e nas Fig. 4.40 a 4.43, para a sonda MC. Os dados são apresentados em escala reduzida a fim de se facilitar a comparação entre sistemas diferentes e entre sondas diferentes para um mesmo sistema. Como os valores das polaridades microscópicas refletem interações específicas entre a sonda e o solvente bem como características próprias da mistura binária, como microheterogeneidades, não são comparáveis diretamente os valores de E_T obtidos de sondas distintas.

O uso de uma escala normalizada permite uma comparação direta dos resultados obtidos por sondas diferentes. No entanto, a escala reduzida apresenta o inconveniente de mascarar o efeito da temperatura. Por isso, os dados são apresentados também nas escalas empíricas para RB, $E_T(30)$, (Fig. 4.44) e MC, $E_T(MC)$, (Fig. 4.45), a fim de facilitar a visualização do efeito da temperatura na polaridade microscópica de um dado sistema.

A fim de se possibilitar a melhor definição das contribuições específicas da sonda e das interações provenientes da própria estruturação da mistura binária, utilizaram-se duas sondas para a monitoração do efeito solvatocrômico.

Fig. 4.35 - Estruturas das sondas (a) RB e (b) MC.

Ambas as sondas possuem capacidades similares de aceitar ligações de hidrogênio, como se percebe de seus valores de pKa em água, 8,65 e 8,37 para RB e MC, respectivamente. Assim, a contribuição das ligações de hidrogênio deve ser comparável entre as duas sondas, apesar da MC ser espacialmente menos obstruída que a RB. Essa característica é de peculiar importância, pois o efeito solvatocrômico dessa sondas é extremamente sensível à capacidade dos sistemas de formar ligações de hidrogênio (Marcus, 1993). As sondas apresentam caráter hidrofóbico bem distinto, sendo a RB a mais hidrofóbica, praticamente insolúvel em água ($\log P \approx 5$) e MC mais hidrofílica ($\log P = -1,94$), com baixa solubilidade em acetona.

Um dos co-solventes utilizados em mistura com a TMU foi a água, co-solvente base dos trabalhos já realizados e portanto de grande interesse. Estudou-se também uma série de álcoois como co-solventes, começando pelo metanol, o álcool de estrutura mais próxima à da água. Na sequência, 1-propanol, o álcool de cadeia linear mais longa ainda totalmente miscível em água, e 2-butoxietanol, um solvente bifuncional com já bem estabelecida capacidade de gerar misturas microheterogêneas com a água.

Fig. 4.36 - Polaridade microscópica da mistura TMU/água em escala reduzida a várias temperaturas. Polaridades medidas a partir da observação do efeito solvatocrômico da sonda RB. A linha reta contínua indica o valor da polaridade caso os sistemas apresentassem comportamento ideal.

Fig. 4.37 - Polaridade microscópica da mistura TMU/metanol (MeOH) em escala reduzida a várias temperaturas. Polaridades medidas a partir da observação do efeito solvatocrômico da sonda RB. A linha reta contínua indica o valor da polaridade caso os sistemas apresentassem comportamento ideal.

Fig. 4.38 - Polaridade microscópica da mistura TMU/1-propanol (1-PrOH) em escala reduzida a várias temperaturas. Polaridades medidas a partir da observação do efeito solvatocrômico da sonda RB. A linha reta contínua indica o valor da polaridade caso os sistemas apresentassem comportamento ideal.

Fig. 4.39 - Polaridade microscópica da mistura TMU/2-butoxietanol em escala reduzida a várias temperaturas. Polaridades medidas a partir da observação do efeito solvatocrômico da sonda RB. A linha reta contínua indica o valor da polaridade caso os sistemas apresentassem comportamento ideal.

Fig. 4.40 - Polaridade microscópica da mistura TMU/água em escala reduzida a várias temperaturas. Polaridades medidas a partir da observação do efeito solvatocrômico da sonda MC. A linha reta contínua indica o valor da polaridade caso os sistemas apresentassem comportamento ideal.

Fig. 4.41 - Polaridade microscópica da mistura TMU/metanol em escala reduzida a várias temperaturas. Polaridades medidas a partir da observação do efeito solvatocrômico da sonda MC. A linha reta contínua indica o valor da polaridade caso os sistemas apresentassem comportamento ideal.

Fig. 4.42 - Polaridade microscópica da mistura TMU/1-propanol em escala reduzida a várias temperaturas. Polaridades medidas a partir da observação do efeito solvatocrômico da sonda MC. A linha reta contínua indica o valor da polaridade caso os sistemas apresentassem comportamento ideal.

Fig. 4.43 - Polaridade microscópica da mistura TMU/2-butoxietanol em escala reduzida a várias temperaturas. Polaridades medidas a partir da observação do efeito solvatocrômico da sonda MC. A linha reta contínua indica o valor da polaridade caso os sistemas apresentassem comportamento ideal.

Para as duas sondas estudadas, observou-se a ocorrência de dois comportamentos distintos. No sistema TMU/água, os sistemas apresentam um desvio negativo da idealidade (Figs. 4.36 e 4.40), *i.e.*, os valores mensurados de polaridade microscópica são menores do que a média ponderada dos valores de polaridade dos componentes puros. Quando o co-solvente é um álcool, observa-se um comportamento oposto, ou seja, todas as composições dos sistemas apresentam um desvio positivo da idealidade, sendo que no caso do TMU/MeOH com MC (Fig. 4.41) o sistema tende a apresentar um comportamento perto da idealidade na região de alta concentração do álcool. No caso do sistema TMU/2-butoxietanol (Fig. 4.39 e 4.43), um efeito de sinergismo é observado na região pobre em TMU, *i.e.*, observaram-se nessa região valores de polaridade microscópica maiores do que os valores dos componentes puros.

Para todos os sistemas estudados, o aumento da temperatura leva a uma diminuição dos valores de polaridade medidos, sendo que a redução é mais visível nos álcoois de menor polaridade e nas regiões pobres em TMU (Fig. 4.44 e Fig. 4.45).

Os perfis das curvas de polaridade microscópica observados entre as duas sondas utilizadas são similares para todos os pares estudados com a exceção do sistema TMU/metanol, onde observa-se um comportamento muito próximo do ideal para a sonda MC (Fig. 4.41) a partir de $\chi_{\text{MeOH}} > 0,6$, enquanto para a RB o sistema apresenta um desvio positivo da idealidade ao longo de toda a faixa de concentração estudada (Fig. 4.37).

Fig. 4.44 - Polaridade microscópica da mistura binária TMU/co-solvente, onde o co-solvente é: (a) água, (b) metanol, (c) 1-propanol e (d) 2-butoxietanol, em escala empírica $E_T(30)$ a várias temperaturas. Polaridades obtidas a partir da observação do efeito solvatocrômico da sonda RB.

Fig. 4.45 - Polaridade microscópica da mistura binária TMU/co-solvente, onde o co-solvente é: (a) água, (b) metanol, (c) 1-propanol e (d) 2-butoxietanol, em escala empírica $E_T(\text{MC})$ a várias temperaturas. Polaridades obtidas a partir da observação do efeito solvatocrômico da sonda MC.

4.3. Ensaios Calorimétricos

Nos experimentos de micro-DSC, duas concentrações de proteína foram estudadas: 0,5 % e 10 % (m/m). A 0,5 % de lisozima, considera-se que a contribuição da agregação para os valores de entalpia medidos seja desprezível, pois não se espera gelificação dos sistemas nessa concentração de proteína. A 10% de lisozima, observa-se gelificação em todos os sistemas estudados, de forma que a entalpia medida apresenta contribuições tanto da denaturação da proteína quanto do processo de gelificação.

Na Fig. 4.46 encontram-se os termogramas referentes aos ensaios de micro-DSC para o sistema lisozima (0,5%)/TMU/água. Observa-se nesses termogramas a presença de um pico endotérmico, ao qual se atribui o processo de denaturação da proteína. Para os sistemas a 10% de lisozima (Fig. 4.46b), novamente observa-se apenas um único pico endotérmico resultante das contribuições de ambos os processos, quais sejam, de denaturação (endotérmico) e agregação da proteína (exotérmico, sugerido). A partir dos picos endotérmicos, obtiveram-se os valores de temperatura de denaturação dos sistemas estudados. Dentro do erro experimental, as temperaturas de denaturação de lisozima em TMU/água em função de w_{TMU} (Fig. 4.47a) coincidem com as temperaturas de gelificação dos mesmos sistemas obtidos reologicamente (Fig. 4.23).

Observando-se os termogramas apresentados na Fig. 4.46, pode-se notar que as entalpias de denaturação da lisozima, calculadas a partir das áreas das endotermas, são fortemente afetadas pela presença de TMU no sistema (Fig. 4.47b). A partir de $w_{\text{TMU}}=0,6$ (termogramas não apresentados) não é mais possível se discernir qualquer evento térmico nos termogramas obtidos. Os valores de temperatura de denaturação obtidos apresentam uma variação linear decrescente com a concentração de TMU, tanto nos sistemas onde apenas a contribuição da denaturação é relevante como naqueles em que a contribuição da agregação é significativa (sistemas onde ocorre gelificação) (Fig. 4.47a). As entalpias de denaturação também mostram variação linear decrescente para sistemas não agregados (Fig. 4.47b). Nos sistemas com maior concentração de proteína, no entanto, onde o processo de gelificação também é relevante, uma tendência à formação de um patamar na região rica em água ($w_{\text{TMU}} \leq 0,3$) é observada.

O processo de gelificação da lisozima induzido por calor em presença de TMU mostrou ser um processo reversível (Fig. 4.48a) para um sistema de lisozima a 0,5%, condição essa que garante a não ocorrência de agregação da proteína em água/TMU a $w_{\text{TMU}}=0,3$. Observou-se que a entalpia de denaturação do sistema tende a variar em torno de um valor constante (Fig. 4.48b), mesmo após vários ciclos de aquecimento e resfriamento. Ao contrário dos outros termogramas, nesses experimentos limitou-se à temperatura máxima a 70°C a fim de não levar à quebra das pontes de dissulfeto da proteína, uma vez que a quebra e posterior reformação das mesmas poderiam levar a uma reestruturação irreversível da proteína, induzida única e exclusivamente pelo calor e não pela ação do meio. Como o papel do meio é o foco dessa investigação, procurou-se limitar esse evento.

Fig. 4.46 - Termogramas de micro-DSC obtidos para lisozima (a) 0,5% e (b) 10% em TMU/NaCl 100 mmol/L.

Fig. 4.47 - Comportamento calorimétrico da lisozima em TMU/NaCl 100 mmol/L. (a) Temperatura de denaturação da lisozima, a duas concentrações de lisozima, no sistema TMU/NaCl 100 mmol/L. (b) Entalpias de denaturação de lisozima, a duas concentrações de lisozima, no sistema TMU/ NaCl 100 mmol/L.

Fig. 4.48 - (a) Termogramas de DSC indicando a reversibilidade do processo de denaturação da lisozima (0,5 % m/m) em água/TMU a $w_{\text{TMU}}=0,30$. Amostra submetida a sete ciclos completos de aquecimento e resfriamento. (b) Entalpia de denaturação da lisozima (0,5 % m/m) em TMU/ NaCl 100 mmol/L para cada ciclo.

5. Discussão

O tema central deste trabalho é a investigação da transição sol-gel induzida pela ação da tetrametiluréia (TMU) no sistema lisozima/TMU/água. Investigações anteriores (Arêas, *et al.*, 1996a) revelaram que certos solventes orgânicos, entre eles a TMU, levam a um aumento marcante da viscosidade de soluções aquosas de lisozima à temperatura ambiente, as quais, dependendo das condições de composição do meio, evoluem para sistemas gelificados transparentes e homogêneos de caráter fractal. Estudos posteriores indicaram que as misturas binárias orgânico-aquosas indutoras desse fenômeno constituem sistemas não ideais com certas características estruturais em comum (Arêas, *et al.*, 1999). Apresentou-se uma hipótese de inversão de microdomínios nessas misturas binárias como evento indutor do processo sol-gel observado (Arêas, *et al.*, 1996a; Arêas e Arêas, 1999). Tais sistemas são microheterogêneos, *i.e.*, apresentam uma distribuição não aleatória das moléculas dos componentes da mistura. A disposição espacial é preferencial, com as moléculas de um componente solvatadas preferencialmente por ele mesmo, formando microrregiões do componente em menor quantidade dispersas num contínuo formado pelo segundo componente. No caso em estudo, tem-se uma situação de pequenas concentrações locais de TMU dispersas no meio aquoso contínuo, as quais, com o incremento da concentração de TMU, tendem a coalescer numa dada concentração crítica, $w_{TMU} \approx 0,6$. A partir desse ponto de coalescência ou colapso da microfase ocorre uma inversão de domínios, com a TMU passando a formar o contínuo e a água tornando-se a microfase dispersa. Esse tipo de evento tem analogia com a inversão observada em emulsões. A mudança drástica da microestruturação do meio solvente binário que ocorre na região da concentração crítica se revela na desestabilização da proteína e posterior formação do gel. Embora, como os dados do presente trabalho mostram, seja possível induzir a formação do gel em regiões subcríticas, os resultados indicam diferenças de regime cinético entre os processos sol-gel antes e após a região crítica do meio solvente.

Dessa forma, neste trabalho a investigação do fenômeno buscou ampliar os conhecimentos sob dois aspectos básicos. Parte do trabalho centrou-se no estudo das interações entre a proteína e o sistema binário, investigando-se as características dos

géis formados e a sua cinética de formação. Em outra frente, procurou-se ampliar a caracterização das misturas binárias na ausência de proteína, de forma a se buscar entender as características da mistura responsáveis pela mudança na estruturação da proteína, levando à gelificação da mesma. Assim, a discussão será abordada em dois tópicos: inicialmente, será apresentada uma discussão sobre os estudos do processo sol-gel de lisozima no sistema binário TMU/água; em seguida, trataremos das investigações centradas nos sistemas binários, onde foram estudados várias misturas TMU/co-solvente por meio do efeito solvatocrômico, numa tentativa de se entender como esses sistemas se estruturam e que papel desempenham quando em contato com sistemas proteicos.

5.1. Interação solvente proteína

Nessa parte do projeto, os estudos foram centrados em sistemas proteína/água/solvente orgânico, especificamente o sistema lisozima/TMU/água. Parte das investigações focalizou a caracterização do gel formado, tanto do ponto de vista macroscópico como microscópico. A cinética de gelificação também foi investigada. Duas situações distintas foram abordadas: num caso, o meio foi o fator indutor da gelificação; em outro, o efeito do aquecimento, facilitado pela composição do meio, foi investigado. Nesse particular caso da indução por aquecimento, procurou-se traçar paralelos entre os dois processos, pois enquanto a gelificação por ação do meio é um fenômeno pouco estudado (Arêas, *et al.*, 1996a; ElyseeCollen e Lencki, 1996; Dufour, *et al.*, 1998; Iwase, *et al.*, 1999; Renard, *et al.*, 1999; Montalvo e Khan, 2005), muito já se sabe sobre a gelificação induzida por aquecimento (Gosal e Ross-Murphy, 2000; Clark, *et al.*, 2001). Especula-se se o efeito desagregador do meio segue um mecanismo similar ao promovido pelo aumento da temperatura.

5.1.1. Dinâmica dos géis de lisozima em água/TMU

Os géis obtidos neste trabalho são sistemas com capacidade de auto-reorganização, mantidos através de interações de caráter transiente como forças de van der Waals e ligações de hidrogênio. Géis com essas características são normalmente denominados de “géis físicos”. Os perfis de varredura de frequência evidenciam a

natureza “física” do gel, na forma de uma dependência de G' e G'' com a frequência (Dickinson, 1997). Essa dependência tende a diminuir com o aumento da concentração de TMU, sendo essa tendência um reflexo do aumento da força das ligações responsáveis pela agregação. A baixa memória reológica dos géis reflete essa natureza transiente das forças que respondem pela agregação da proteína. Mesmo que a estrutura do gel seja destruída, mantida a composição do sistema, o gel irá recuperar a sua estrutura anterior em um curto intervalo de tempo. Caso a TMU seja retirada do sistema, a proteína tende a recuperar o seu estado anterior (Castelletto, *et al.*, 1998).

O conjunto dos dados acumulados indica uma forte variação das características morfológicas dos sistemas lisozima em TMU/água, desde sistemas fluidos de alta viscosidade (Arêas, *et al.*, 1996a; da Silva, 2001) até os géis estudados neste projeto e em outros trabalhos (da Silva, 2001; da Silva e Arêas, 2002; Castelletto, *et al.*, 1998). Na Fig. 4.1 temos um exemplo de uma típica curva de varredura de amplitude de deformação para os géis de lisozima em TMU/água. Como pode ser observado, os géis possuem uma extensa região viscoelástica linear, representada por um alto valor do limite da região viscoelástica linear (γ_0). Para fins de comparação, polímeros termoplásticos apresentam um γ_0 em torno de 1% e polímeros fundidos, $\gamma_0 = 100\%$. Os géis estudados neste projeto possuem uma ampla faixa de γ_0 (Fig. 4.17) em função da concentração de proteína, apresentando valores de $\gamma_0=5\%$ até 50%, em alguns casos. Essa extensão relativamente grande da região viscoelástica linear indica a capacidade dos géis de lisozima em TMU/água de resistir à deformação sem perda da estrutura. A região viscoelástica linear tende a diminuir com o aumento da concentração de proteína (Fig. 4.17), o que é compatível com o aspecto mais quebradiço dos sistemas obtidos a altas concentrações da biomolécula. Em relação à concentração de TMU (Fig. 4.17), dentro do que é possível afirmar devido à alta dispersão dos dados, a região viscoelástica linear parece ser insensível à concentração de TMU no sistema. Como pode ser observado, a elasticidade do gel, que pode ser acompanhada tanto em termos de G' (Figs. 4.2 a 4.5) com em termos de $\tan \delta$ (a razão entre G'' e G' , Fig. 4.16), aumenta com a concentração de lisozima. Ambos os resultados seriam esperados, uma vez que uma maior quantidade de proteína fornece mais material para a formação dos agregados que dão a sustentação ao arcabouço do gel. Sugere-se que a TMU leve a uma

perda parcial da estrutura nativa da proteína, levando à exposição de suas regiões hidrofóbicas, normalmente protegidas do meio. Essa perda é dependente da concentração do TMU no sistema. Uma maior desestabilização da proteína cria uma situação mais favorável para a agregação, dando origem a agregados mais fortes. A altas concentrações de TMU no solvente misto, as mudanças reológicas tendem a se estabilizar (Fig. 4.6). Sob a luz dos dados já obtidos, esse comportamento pode ser explicado levando-se em conta o grau de compactação em função da concentração de TMU. Como será discutido adiante, os géis formados possuem um grau de compactação distinto em função da composição do meio, indicado pelo valor da dimensão fractal (D_f), Fig. 4.18. A compactação do sistema diminui com o aumento da concentração de TMU no sistema.. Pode-se especular que no sistema mais compacto (menor teor de TMU) o acréscimo de novos flocos ao esqueleto do gel contribui muito mais para a elasticidade geral do sistema (G') do que novos flocos em um sistema menos compacto (maior teor de TMU) devido à quantidade de ligações, pois se espera que em ambientes mais compactos haja mais ligações entre flocos vizinhos. Os valores de G'' , referentes ao caráter viscoso do sistema, também se comportam de maneira similar, *i.e.*, apresentam uma tendência à saturação com o aumento da fração de massa de TMU no sistema binário.

Perfis de relaxação foram obtidos reologicamente (Fig. 4.11) e por ensaios de relaxação por FFC-RMN (Fig. 4.34). Os ensaios de RMN indicaram que a dinâmica dos géis obtidos em DMSO assemelha-se àquela observada em meio de TMU, com a ocorrência de géis mais estruturados com o aumento da fase orgânica no sistema. Essa maior estruturação é caracterizada por regimes de fluxo mais restritos e tempos mais longos de resposta às perturbações. Nos géis obtidos em TMU/água, os módulos de armazenagem e de perda apresentam uma menor dependência com a frequência à medida que a concentração de TMU aumenta no sistema, como indicado pela inclinação das curvas apresentadas nas Figs. 4.7 a 4.10. Essas características são indicativas de uma tendência à formação de uma estruturação mais restritiva.

Na Fig. 4.12 observa-se a grande flutuação nos valores de t_1 e t_2 com a variação da concentração de proteína. Uma leve tendência de aumento desses parâmetros com o aumento de concentração de lisozima é percebida, tendência mais evidente a $w_{\text{TMU}}=0,8$

(Fig. 4.12c). Os tempos de relaxação aumentam na direção do aumento da rigidez do sistema. Os tempos de relaxação apresentam uma certa estabilidade temporal (Fig. 4.14). Apesar da grande dispersão dos dados, é possível observar-se uma tendência de relativa estabilidade dos valores ao longo do tempo. Comportamento distinto é observado para os módulos (Fig. 4.13) até $w_{TMU}=0,8$, que claramente apresentam uma tendência de aumento em relação ao tempo. Os valores de dimensão fractal (Fig. 4.15) apresentam também pouca variação com o tempo. A pequena variação temporal desses parâmetros (t_1 , t_2 e D_f) indica que o arcabouço do gel uma vez formado não deve sofrer mudanças estruturais apreciáveis com o tempo. Essa estabilidade temporal dos tempos de relaxação é indicativa da facilidade de acomodação do sistema uma vez formado o gel. Isso também se reflete na dimensão fractal, também mantida relativamente constante, confirmando a estabilidade da estrutura espacial da rede uma vez formada. A dependência temporal dos módulos de armazenagem e de perda sugere a deposição de agregados livres no arcabouço já estruturado, aumentando sua rigidez mecânica sem mudar o padrão estrutural do mesmo.

A dependência temporal dos módulos de armazenagem e de perda é um processo comum a vários sistemas gelificados (Chen e Dickinson, 2000), normalmente referido como envelhecimento do gel. Esse envelhecimento, marcado pelo aumento dos módulos com o tempo, surge do fato de que para a formação do arcabouço necessita-se apenas da incorporação de parte dos agregados disponíveis do meio, de forma que uma grande quantidade de moléculas da proteína se encontra em forma de agregados livres, *i.e.*, agregados que não fazem parte das redes que mantêm o gel. Por exemplo, para géis de proteínas do soro do leite formados por aquecimento, estima-se que até cerca de 70 % das moléculas de proteína não estão agregadas (Verheul e Roefs, 1998). Esses agregados livres lentamente se incorporam ao gel gerando a dependência temporal monitorada. O processo geral de gelificação pode ser dividido em três etapas gerais. Uma etapa extremamente rápida promovida pelo meio, que envolve a desestruturação da proteína, a qual pode ser seguida ou não de uma pré-agregação da proteína. Uma segunda etapa de cinética intermediária, onde as redes tridimensionais que formam o arcabouço do gel surgem. E uma terceira etapa, o envelhecimento, que consiste na contínua inclusão dos agregados não ligados à estrutura do gel. No caso dos sistemas

aqui estudados, como a indução se dá por efeito do meio, a força indutora da gelificação está sempre presente, ao contrário de géis gerados por aquecimento, por exemplo. Dessa forma, espera-se que agregados livres sejam incorporados até a consumação total dos mesmos. Por esta razão, as dependências temporais não tendem a um valor estável, na janela de tempo observada.

5.1.2. Análise da dimensionalidade dos géis de lisozima em TMU/água

Através da aplicação do modelo proposto por Shih (Shih, *et al.*, 1990) calculou-se a dimensão fractal dos géis. O modelo de Shih considera que o gel é formado por um agregado de flocos. Esses flocos podem ser considerados como objetos fractais, com dimensão fractal não necessariamente idêntica à do gel, de complexidade variada. Os flocos são definidos a partir de uma dada distância de correlação, abaixo da qual não ocorre interação entre os flocos. O modelo proposto por Shih pressupõe dois tipos de géis, de ligação forte ou fraca. Nos géis do tipo ligação forte, o limite da região viscoelástica linear (γ_0) diminui com o aumento da concentração. Na fig. 4.17 temos a dependência do γ_0 (%) com a concentração de lisozima a várias concentrações de TMU, onde pode-se observar que γ_0 diminui com a concentração de proteína, identificando o nosso sistema como de ligação forte. Em géis do tipo ligação forte, as ligações entre os flocos que formam o gel são mais fortes do que as ligações intraflocos. Sabe-se que a formação de folhas β intermoleculares é evento comum durante a gelificação de proteínas globulares por calor (Gosal e Ross-Murphy, 2000), sendo também observada para os sistemas aqui estudados (Arêas, *et al.*, 1996a). As investigações espectroscópicas revelam (Figs. 4.31, 4.32 e 4.33) a formação de folhas β durante o processo de gelificação, mas indicam que a formação da folhas β pode não estar associada ao processo de agregação que forma o arcabouço do gel. Na verdade, como pode ser observado na evolução temporal dos espectros (Fig. 4.33), a formação das folhas ocorre em um ritmo que independe da formação do gel, ocorrendo portanto provavelmente numa etapa anterior à formação do arcabouço do gel. Alguns autores sugerem que para géis de proteínas globulares formados por aquecimento, o processo de gelificação ocorra em várias etapas, sendo que entre elas haveria a formação dos

agregados a partir da proteína denaturada, evento marcado pelo aparecimento das folhas β intermoleculares, seguido de uma posterior agregação formando o arcabouço dos géis (Gosal e Ross-Murphy, 2000). Para os sistemas estudados, pode-se especular que os flocos propostos pelo modelo de Shih estariam sendo representados pelos agregados formados inicialmente, agregados esses estabilizados pelas folhas β intermoleculares observadas nos espectros vibracionais. Em um momento posterior, os agregados se uniriam, por meio de interações de van der Waals ou ligações de hidrogênio, para formar o arcabouço do gel, gerando estruturas onde as interações interflocos são mais fortes do que as interações entre os flocos, interações essas que levam à construção da estrutura tridimensional do gel.

Na tabela 5.1 encontram-se os valores das dimensões fractais (D_f) obtidas para os sistemas lisozima/TMU/água na faixa de w_{TMU} de 0,6 a 0,9. Como se pode observar, o valor da dimensão fractal diminui com o aumento da concentração da TMU no sistema. Como discutido anteriormente, propõe-se que a TMU leve a uma desestabilização da estrutura terciária da proteína, ocasionando uma exposição de regiões hidrofóbicas da proteína, antes protegidas no interior da estrutura nativa. Quanto maior essa exposição, mais facilmente ocorrerá a agregação. Logo, na faixa de alta concentração de TMU os agregados livres se combinam muito facilmente, não permitindo uma maior penetração dos agregados no interior das redes que formam o gel, gerando estruturas com uma dimensionalidade fractal menor, *i.e.*, estruturas mais vazadas. Com a diminuição da concentração de TMU no sistema, a agregação se torna mais impedida, permitindo uma maior permeação dos agregados através do arcabouço do gel e por consequência formando estruturas mais densas, com dimensionalidade fractal maior. Esse fator de impedimento para a ocorrência da gelificação também se reflete nos valores de energia de ativação medidos, Fig. 4.27, onde se percebe que a energia de ativação (E_a) tende a diminuir com o aumento da concentração de TMU até atingir a região de $w_{TMU} \approx 0,9$, onde não é mais possível se obter valores de E_a mensuráveis.

Em relação à evolução temporal de D_f (Fig. 4.15), nota-se que ela tende a apresentar uma estabilidade dentro da janela experimental investigada. Esse é um forte indicativo de que a estrutura do gel se altera pouco ao longo do tempo, pois a

dimensionalidade do sistema possui uma forte correlação com a sua estruturação espacial (Vicsek, 1992). Imaginando as redes tridimensionais que dão origem ao arcabouço do gel como o esqueleto metálico de um edifício, os agregados livres quando se adicionam às redes não devem adicionar novas “vigas” ao esqueleto, pois isso se refletiria numa estrutura mais densa, logo um D_f maior com o envelhecimento do gel. A adição dos agregados livres pode ser vista como um reforço das ‘vigas’ já existentes, tornando o esqueleto mais forte, logo, causando um aumento de G' e G'' com o envelhecimento do sistema, mas sem causar uma mudança perceptível do esqueleto do gel.

Tabela 5.1 - Dimensão fractal do sistema lisozima/TMU/água em função de w_{TMU} .

w_{TMU}	D_f
0,6	2,5
0,7	2,3
0,8	2,1
0,9	1,9

5.1.3. Microestrutura dos géis de lisozima em TMU/água

A fim de se obter informações a respeito da estruturação microscópica dos géis, realizou-se uma investigação por espectroscopia no infravermelho dos géis obtidos e do processo de gelificação. Como indicado na seção de Metodologia, por meio dessa técnica pode-se obter informações a respeito das estruturas secundárias encontradas na proteína. Num primeiro conjunto de amostras, observou-se o efeito da composição do sistema a temperatura ambiente na estrutura secundária da proteína (Fig. 4.30a). Observando-se as intensidades das bandas atribuídas às folhas β e hélices α (Fig. 4.32a), percebe-se um marcante aumento da contribuição das folhas β na estrutura secundária na região de $w_{TMU} \approx 0,6$ e uma redução da contribuição das hélices α , em menor intensidade, na mesma região. Na região de concentração menor que $w_{TMU} \approx 0,6$, observa-se uma relativa estabilidade das intensidades. Nessa região de $w_{TMU} < 0,6$, nas

condições estudadas, o sistema não gelifica à temperatura ambiente, indicando portanto uma correlação entre o aumento do teor de folhas β com a formação dos géis. Nota-se que a banda atribuída às folhas β encontra-se numa região de frequência mais baixa do que a normalmente atribuída às folhas β . A banda espectral nessa região de 1620 cm^{-1} é em geral atribuída a folhas β intermoleculares. No entanto, quando se compara o perfil espectral observado com o perfil de evolução dos espectros em função do tempo de reação (Fig. 4.33b) percebe-se que a contribuição das folhas β já se encontra muito próxima de seu máximo logo no início da gelificação, mesmo antes da formação do gel. Assim, a formação das folhas β intermoleculares se mostra como uma etapa intermediária do processo de gelificação uma vez que ela não se manifesta de maneira mensurável em situações onde não ocorra a gelificação. Portanto, ela não aparenta ser o processo chave para a formação das redes de sustentação do gel. O mesmo perfil espectral, qual seja, aumento da contribuição de folhas β e presença de folhas β intermoleculares, também é observado para gelificação de proteínas globulares induzida por calor (Clark, *et al.*, 2001).

Em um segundo momento, observou-se o perfil espectral dos mesmos sistemas estudados anteriormente, mas agora submetidos a um tratamento térmico a fim de promover a gelificação dos sistemas a $w_{TMU} < 0,6$, sistemas esses não gelificados na situação anterior. Observa-se uma forte presença de folhas β em toda a faixa de concentração estudada (Figs. 4.30b e 4.32b), diferentemente da série anterior, indicativo de que a formação de folhas β é uma etapa necessária para a constituição do gel. A monitoração da evolução temporal do processo de gelificação induzido por calor (Fig. 4.33a) permite visualizar a direção das mudanças espectrais, representadas pela diminuição gradual da contribuição das hélices α e por um aumento concomitante das folhas β . Novamente, a variação das intensidades não apresenta correlação com o tempo de gelificação, *i.e.*, o momento em que o arcabouço do gel se forma não é marcado por qualquer mudança no perfil de variação de intensidade das bandas monitoradas. O ponto de gelificação é estimado a partir dos t_{gel} s obtidos reologicamente. Na série de repetições realizadas, não se observou correlação entre os t_{gel} s determinados reologicamente e alterações nas tendências de variação das intensidades. Essa insensibilidade do perfil

espectral em relação aos tempos de gelificação pode ser explicada postulando-se que as folhas β estão indicando apenas a presença de agregados no sistema. As condições experimentais não permitem, entretanto, distinguir se esses agregados estão livres no sistema ou já se encontram incorporados ao arcabouço do gel.

Uma diferença visível é observada entre os processos de gelificação induzidos apenas por solvente (à temperatura ambiente) e aqueles na presença de solvente com indução mediada por calor. No primeiro caso, o perfil espectral já se encontra na sua forma final no início do processo de gelificação (Fig. 4.33b), enquanto no processo induzido por calor é possível observar as mudanças espectrais (Fig. 4.33a).

O estudo calorimétrico da influência da composição da mistura binária no processo de denaturação da lisozima (Figs. 4.46 e 4.47b) indica que a partir da $w_{\text{TMU}} \geq 0,6$, a variação da entalpia para o processo de denaturação é zero ou desprezível. A diminuição da entalpia de denaturação ocorre de forma progressiva, apresentando uma dependência linear inversa com a concentração de TMU no sistema até $w_{\text{TMU}}=0,6$, na faixa de concentração de lisozima onde só se observa o processo de denaturação, sem ocorrência de gelificação. Para as variações de entalpia em função de w_{TMU} nos sistemas com lisozima a 10%, onde ocorre gelificação, o perfil esperado seria de valores sistematicamente menores que os obtidos quando da ocorrência apenas do processo de denaturação, o que não foi observado (Fig. 4.47b). O processo de denaturação envolve a quebra de interações fracas e ligações de hidrogênio que estabilizam a estrutura protéica. Este é um processo endotérmico, enquanto durante a agregação ocorre o processo inverso de formação de novas interações fracas e ligações de hidrogênio, o que sugere um processo exotérmico. Portanto, a variação da entalpia global deveria ser menor quando os dois processos, denaturação e agregação, estivessem presentes, quando comparado à situação envolvendo apenas denaturação sem agregação. Os valores medidos de ΔH não confirmam no entanto essa expectativa, com valores de entalpia para os sistemas que gelificam estáveis e menores que os de denaturação na região de baixa concentração de TMU ($0,0 \leq w_{\text{TMU}} \leq 0,1$). Entre $0,2 \leq w_{\text{TMU}} \leq 0,4$ os valores de ΔH são decrescentes e levemente superiores aos da entalpia de denaturação, seguidos de um decréscimo a $w_{\text{TMU}}=0,5$.

As temperaturas de gelificação e de denaturação ocorrem na mesma região, dentro do erro experimental, indicando que a gelificação ocorre tão logo os agregados se formem. Nota-se também que o efeito da TMU no sistema exerce sua influência ao longo de toda a faixa de concentração de TMU, quando visto através da calorimetria (Fig. 4.47), mas o mesmo não se observa via infravermelho (Fig. 4.32). No caso do infravermelho, o sistema se mostra insensível até a região de $w_{TMU} \approx 0,3$, como indicado pela relativa estabilidade das intensidades das bandas monitoradas no infravermelho, o que reflete uma certa preservação da estrutura secundária da proteína nessa região de concentração. Por outro lado, as entalpias e temperaturas de denaturação (Fig. 4.47) indicam que a estrutura da proteína é afetada pela presença de TMU no sistema mesmo em concentrações baixas, dentro da faixa estudada. O processo de denaturação da proteína provavelmente envolve uma série de mudanças estruturais progressivas ao longo da faixa de composição de TMU, alterações essas com um possível caráter cooperativo, pois essas mudanças tendem a afetar a estrutura da proteína de forma não linear (Fig. 4.32). Como a entalpia e temperaturas de denaturação refletem o fino equilíbrio de forças que mantém a estrutura nativa da proteína, essas alterações são percebidas antes. No caso do infravermelho, monitoramos estruturas específicas e mais estáveis, capazes de acomodar melhor pequenas mudanças, o que exige que se promova uma maior perturbação para que haja um efeito mensurável.

5.1.4. Cinética de gelificação

5.1.4.1. Gelificação induzida por ação do meio

Nas tabelas 4.1 e 4.2 são apresentados os valores de tempo de gelificação (t_{gel}) determinados para a gelificação induzida pelo solvente em função da composição do meio e da temperatura. Como já mencionado, uma característica marcante dos t_{gel} s obtidos é a forte dependência deles em relação à concentração da fase orgânica. Em especial, observa-se uma nítida separação entre os tempos de gelificação a $w_{TMU}=0,9$ em relação às concentrações menores de TMU. O processo de gelificação apresenta um perfil distinto na região de concentração alta de TMU. O reflexo dessa diferença pode

ser bem evidenciado em uma caracterização por espalhamento de raios X realizada anteriormente (da Silva, *et al.*, 2002), onde padrões distintos de espalhamento foram verificados entre os géis na região de $0,6 \leq w_{TMU} \leq 0,8$ e $w_{TMU}=0,9$.

Estudos de simulação computacional indicam uma forte correlação entre a dimensionalidade dos agregados formados e o perfil cinético da agregação (Brinker e Scherer, 1990). Na maioria dos estudos de simulação, os modelos propostos geram agregados fractais. Esses modelos podem ser divididos em dois grandes grupos.

O modelo mais simples propõe um sistema onde haja um núcleo de agregação e as partículas que formam os agregados, identificadas como monômeros, entram no sistema a partir de uma dada distância seguindo uma trajetória aleatória, representando o movimento browniano da partícula pelo sistema. Em um dado momento, a partícula atinge o núcleo de agregação e se agrega a ele com uma eficiência de cem por cento (Brinker e Scherer, 1990). Esse modelo foi denominado de agregação monômero-agregado limitado por difusão (DLMCA, sigla em inglês) e representa sistemas onde a agregação ocorra preferencialmente no sentido monômero-agregado, e não monômero-monômero, onde haja uma oferta contínua de monômeros e não exista uma barreira de qualquer tipo, *e.g.*, energética ou estérica, para a agregação, sendo a difusão do monômero pelo meio a etapa determinante. Uma variação desse modelo considera um sistema onde todos os monômeros que irão participar da agregação já estejam no sistema num tempo zero e tenham liberdade de interagir com outros monômeros ou agregados conforme se difundem pelo sistema. Esse modelo foi denominado de agregação agregado-agregado limitado por difusão (DLCCA) e representa sistemas onde não haja uma interação preferencial entre qualquer dos elementos participantes (Brinker e Scherer, 1990).

O segundo grupo incorpora barreiras para a agregação de forma que a agregação não ocorra com cem por cento de eficiência (Brinker e Scherer, 1990). Por esse modelo, atribui-se um fator de adesão para a agregação de tal maneira que cada choque entre os monômeros, ou monômeros e agregados, não resulte necessariamente em agregação. Agora não mais a agregação é limitada apenas pela difusão das partículas pelo sistema, mas também por características da reação que estiver gerando a agregação, representada

pelo fator de adesão. Da mesma forma que para o modelo limitado por difusão, nas simulações limitadas por reação existem duas condições iniciais para as partículas. Num caso os monômeros são inseridos no sistema um a um e a agregação sempre se dá com o monômero se ligando ao agregado principal. Neste caso, o modelo é denominado de RLMCA (sigla em inglês), agregação monômero-agregado limitado por reação. Em um outro caso todos os monômeros envolvidos na reação já estão presentes no sistema e são livres para interagir entre si. Este segundo regime cinético é denominado de RLCCA (sigla em inglês), agregação agregado-agregado limitado por reação.

Os agregados obtidos nessas simulações são objetos fractais cuja dimensionalidade é particular para cada modelo (Tabela 5.2). Sistemas gerados a partir de processos limitados por difusão formam agregados menos compactos. Como todo choque resulta em adesão, a probabilidade de um monômero penetrar profundamente na estrutura do agregado é pequena, gerando estruturas mais vazadas, com grandes espaços vazios. Para processos limitados por reação, o fato de cada choque não necessariamente resultar em agregação permite uma penetração maior dos monômeros ou agregados envolvidos na reação. Como consequência, são geradas estruturas mais densas, com dimensões fractais maiores. Trabalhos experimentais associam tempos de reação distintos para os modelos limitados por difusão e aqueles limitados por reação, sendo os sistemas limitados por reação caracteristicamente mais lentos do que os limitados por difusão (Bremer, *et al.*, 1989; Lin, *et al.*, 1990; Vreeker, *et al.*, 1992).

Tabela 5.2 - Valores de dimensão fractal (D_f) obtidos por simulação computacional.*

Regime cinético	D_f	
	monômero-agregado	agregado-agregado
limitado por difusão	2,5	1,8
limitado por reação	3,0	2,09

* Jullien e Meakin (1988)

Observa-se uma boa correlação entre os valores de dimensão fractal calculados a partir dos experimentos reológicos (Tabela 5.3) e os valores obtidos a partir de simulações computacionais disponíveis na literatura (Tabela 5.2). Pode-se considerar a ocorrência de dois regimes cinéticos distintos, um ocorrendo na região em torno de $0,6 \leq w_{TMU} \leq 0,8$ e outro a $w_{TMU} \approx 0,9$. Na primeira região, observam-se valores de D_f compatíveis com os esperados para processos limitados por reação, modelo caracterizado pela presença do fator de adesão que no caso estudado pode ser interpretado pela energia de ativação mensurada (Fig. 4.27). Neste caso, observa-se um valor de E_a que diminui com a presença de TMU no sistema, tendência também seguida pelos tempos de gelificação. Como esperado, a cinética de gelificação nessa faixa é bem mais lenta do que o observado na região de $w_{TMU} \approx 0,9$ (Tabela 4.1). Não se registram valores de E_a mensuráveis na região de $w_{TMU} \approx 0,9$, indicando que a energia de ativação da reação é pequena nessa região e de menor importância em relação à difusão dos agregados pelo sistema. Nessa região, os valores de t_{gel} são sensivelmente menores do que os observados em outras concentrações de TMU. Tomando-se como base os valores de D_f obtidos, os valores de energia de ativação e as diferenças relativas entre os t_{gel} s observados, propõe-se a existência de dois regimes cinéticos para o processo de gelificação na região acima da concentração crítica da mistura solvente: um regime na faixa de concentração em torno de $0,6 \leq w_{TMU} \leq 0,8$ do tipo limitado por reação, e um regime do tipo limitado por difusão a $w_{TMU} \approx 0,9$. Em ambos os casos, supõe-se que o regime cinético seja do tipo agregado-agregado.

Nota-se que os valores de D_f obtidos (Tabela 5.3) diferem dos valores teóricos apresentados esperados para o regime agregado-agregado (Tabela 5.2) principalmente na região de $w_{TMU} \approx 0,6$, onde se obteve o valor esperado para um regime do tipo monômero-agregado. Devido à natureza esperada para as forças que geram a agregação, que se supõem sejam dominadas por interações fracas, e devido à reversibilidade da gelificação, fato já verificado experimentalmente (Arêas, *et al.*, 1996a), pode-se interpretar que a diferença entre os valores obtidos e os valores teóricos de D_f surja da reestruturação dos géis. Os valores de D_f distintos daqueles esperados pelas simulações podem ser atribuídos a uma limitação dos modelos utilizados, pois esses modelos

consideram uma situação estática: uma vez ocorrido o choque entre o monômero e o sítio de agregação, não se considera a possibilidade de rearranjos estruturais. Quando a possibilidade de rearranjo é incluída no modelo (Jullien e Meakin, 1988), os valores de D_f tendem a crescer, formando estruturas mais densas. Na tabela 5.5 são apresentados valores de D_f considerando-se a possibilidade de rearranjo. No caso dessa simulação, o rearranjo consiste na rotação das partículas agregadoras em torno dos seus eixos, rotação essa que tende a aproximar as partículas agregadoras. Os valores de R (rotação) indicam quantas vezes se permitiu a rotação, e por consequência o rearranjo, das partículas agregadoras. Considerando-se a natureza transiente das interações que sustentam o processo de agregação, é mais provável que ocorram rearranjos no arcabouço do gel do que seria esperado em uma situação estática. Logo, os altos valores de D_f obtidos seriam um reflexo do rearranjo dos agregados durante o processo de formação do gel.

Devido a essa possibilidade de rearranjo após o choque, não é possível delimitar qual modelo cinético é aplicável para os géis utilizando-se apenas o valor da D_f , pois os rearranjos levam a um aumento dos valores característicos da D_f em função da extensão do rearranjo, tornando impossível se distinguir uma reação do tipo limitada por difusão com extensivo rearranjo de uma limitada por reação com menor rearranjo. Logo, a escolha do modelo mais adequado deve basear-se em um conjunto de parâmetros que inclua mais informações além da dimensionalidade do sistema.

Tabela 5.3 - Dimensão fractal do sistema lisozima/TMU/água em função de w_{TMU} calculados a partir de dados reológicos obtidos nesta Tese.

w_{TMU}	D_f
0,6	2,5
0,7	2,3
0,8	2,1
0,9	1,9

Tabela 5.4 - Valores de dimensão fractal (D_f) experimentais para diversos sistemas disponíveis na literatura.

Sistema	D_f	Regime cinético	Autores
gel de caseína em meio ácido	2,0	RLCCA	Bremer, <i>et al.</i> , 1989
ouro coloidal	1,86	DLCCA	Lin, <i>et al.</i> , 1990
ouro coloidal	2,13	RLCCA	Lin, <i>et al.</i> , 1990
agregados de triestearato de glicerol	1,7	DLCCA	Vreeker, <i>et al.</i> , 1992

Tabela 5.5 - Valores de dimensão fractal (D_f) obtidos por simulação computacional considerando-se a possibilidade de reestruturação dos monômeros ou agregados, após uma colisão. O valor de R indica o número de reestruturações permitidas.*

Regime cinético	D_f			
	R=0	R=1	R=2	R=3
DLCCA	1,80	2,09	2,17	2,18
RLCCA	2,09	2,18	2,24	2,25

*Jullien e Meakin (1988)

5.1.4.2. Gelificação induzida por calor

Na seção anterior apresentou-se uma discussão a respeito do processo de gelificação da lisoizima induzida pela ação da TMU no meio. Como forma de se ampliar a compreensão dos fenômenos básicos por trás do processo de desestabilização da proteína e conseqüente gelificação, realizaram-se investigações sobre a cinética de gelificação dos sistemas na região subcrítica de TMU ($w_{TMU} < 0,6$). Nessa região, nas condições experimentais utilizadas, a gelificação só ocorre quando o sistema é aquecido. Dessa forma, pode-se utilizar o conhecimento já bem estabelecido sobre o processo de gelificação de proteínas globulares por ação do calor (Clark, *et al.*, 2001; Gosal e Ross-Murphy, 2000). Comparando-se as características do processo de gelificação induzido por calor com o processo induzido pelo solvente procurou-se avaliar a contribuição

relativa da temperatura e do co-solvente orgânico no processo de gelificação. Por exemplo, a literatura sugere que a uréia possa ter um efeito desestruturador da rede de ligações de hidrogênio da água similar ao efeito causado pelo aumento da temperatura (Finer, *et al.*, 1972). Desse modo, semelhanças e diferenças entre os processos gerais do processo de gelificação por aquecimento e por ação do meio podem servir como uma forma indireta de se sondar os mecanismos envolvidos em ambos os casos.

Nos sistemas na região subcrítica, $w_{\text{TMU}} < 0,6$, obtiveram-se géis muito frágeis, com valores muito baixos de G^* na condição de força iônica nula. A fragilidade dos géis não só dificulta a determinação adequada do ponto de gelificação como também, no caso de géis muito frágeis, permite que a própria perturbação mecânica imposta pelo reômetro possa interferir no processo de gelificação. Logo, utilizou-se do efeito da força iônica de modo a induzir a formação de géis mais fortes a fim de se viabilizar as medidas. Sabe-se que a força iônica tem profunda influência no processo de gelificação. A presença de sal tende a facilitar o processo de gelificação e induzir a formação de géis com valores mais altos de G^* (Tobitani e Ross-Murphy, 1997b).

A dependência dos tempos de gelificação com a temperatura e concentração de proteína verificada para o processo de gelificação da lisozima no meio água/TMU induzido por calor é comparável com os perfis apresentados na literatura para outras proteínas globulares, *e.g.*, soro-albumina bovina (Tobitani e Ross-Murphy, 1997a) ou β -lactoglobulina (Tobitani e Ross-Murphy, 1997b) e com os géis de lisozima formados a partir da ação do solvente, discutidos na seção anterior (da Silva e Arêas, 2005). Em todos os casos, os t_{gel} s dos sistemas investigados nesta Tese apresentam um crescimento exponencial com o aumento da concentração de lisozima ou da temperatura. O perfil da dependência dos t_{gel} s com a concentração de lisozima (Fig. 4.24) e com a composição do meio (Fig. 4.25) não parece ser fortemente influenciado pela concentração de TMU. Os coeficientes angulares obtidos a partir das curvas de t_{gel} em função da concentração de lisozima a várias frações de massa de TMU oscilam em torno de um mesmo valor sem apresentar nenhuma tendência discernível.

Presume-se que na faixa de concentração $w_{\text{TMU}} < 0,6$ a gelificação siga um mesmo mecanismo de gelificação. Comportamento diferente é observado para a gelificação na

região supercrítica, $w_{TMU} \geq 0,6$, onde se supõe, como discutido na seção anterior, a existência de dois regimes cinéticos. Analisando-se os perfis das curvas de variação de t_{gel} contra concentração de TMU, nota-se que os mesmos são distintos nas regiões subcrítica (Fig. 4.25) e supercrítica (Fig. 4.20).

O conjunto dos dados obtidos para ambos os processos de gelificação, induzido pelo meio e por calor, indica uma complementaridade dos dois processos, sendo possível em certa extensão substituir o efeito indutor da TMU por um aumento da temperatura do sistema. A dependência linear dos t_{gel} s (Fig. 4.20), T_{gel} s (Fig. 4.23), temperatura (Fig. 4.47a) e entalpias de denaturação (Fig. 4.47b) com w_{TMU} na região subcrítica corroboram essa visão de complementaridade. No entanto, vale ressaltar que há certas diferenças marcantes entre os processos de gelificação acima e abaixo da concentração crítica do meio solvente. Os géis formados na região subcrítica são mais frágeis, de menor G^* , do que os obtidos na região supercrítica para a mesma força iônica, fato esse que levou à elevação da força iônica para os experimentos realizados a $w_{TMU} < 0,6$, empregando-se soluções de 100 mmol/L de NaCl. A dependência dos t_{gel} s em relação à composição do meio também apresenta diferenças em função da região de concentração do solvente binário considerada, como já mencionado no parágrafo anterior. A mudança do perfil de variação dos t_{gel} s em função da concentração de TMU pode estar correlacionada com a inversão de domínios proposta como fator indutor das mudanças que levam à gelificação da proteína. Na região supercrítica, supõe-se que a proteína esteja exposta a um ambiente contínuo de TMU em que microdomínios aquosos encontram-se dispersos, enquanto na região subcrítica espera-se uma situação oposta, *i.e.*, um contínuo aquoso com microdomínios descontínuos de TMU. Considerando que o ambiente ao qual a proteína é exposta na região supercrítica seja basicamente um contínuo de TMU, deve-se esperar que o aumento de concentração de TMU leve apenas a pequenas mudanças no sistema, o que se reflete em uma dependência linear dos t_{gel} s com a TMU nessa região, *i.e.*, uma dependência relativamente mais suave. Na região subcrítica ocorre o oposto: o impacto de adições contínuas de TMU causa um efeito mais marcante devido ao fato do ambiente ser primariamente um ambiente aquoso.

Na literatura, encontram-se duas grandes frentes na discussão sobre o mecanismo denaturante da uréia. Em uma delas sugere-se uma ação indireta por meio de efeitos da uréia na estruturação da água (Frank e Franks, 1968) e em outra especula-se sobre a possibilidade de interações preferenciais entre os grupos peptídicos da proteína e a uréia (Makhatadze e Privalov, 1992). Extrapolando-se a existência de interações preferenciais para a TMU, um derivado da uréia, é provável que o efeito da TMU no sistema na região subcrítica possa ter um efeito mais notável no processo de gelificação devido a uma distribuição preferencial dos microdomínios na proximidade da proteína, refletindo-se numa dependência mais acentuada dos t_{gel} s com a concentração do TMU nessa região.

5.2. Microheterogeneidade do meio solvente binário: correlações com o processo de gelificação do sistema lisozima/TMU/água

Os valores de T_{gel} obtidos (Fig. 4.23) e de temperatura de denaturação de lisozima (Fig. 4.47a) indicam que a presença do TMU afeta a estabilidade da proteína em toda a faixa de concentração estudada. Como pode ser observado a partir dos valores de entalpia obtidos (Fig. 4.47b), a presença de TMU diminui a energia necessária para que o processo de perda da estrutura nativa da proteína se inicie. A desestabilização da estrutura nativa da proteína poderia ocorrer através de interações preferenciais entre a TMU e o esqueleto peptídico da proteína, de forma análoga ao sugerido por alguns autores no caso da uréia (Makhatadze e Privalov, 1992). Sua ação poderia também se dar através do favorecimento à melhor acomodação dos domínios hidrofóbicos da proteína no meio aquoso, em razão da capacidade da TMU em romper parcialmente a rede intermolecular da água gerando cavidades no meio líquido. Essa redução de energia promovida pelo co-solvente na formação de cavidades no meio aquoso foi também sugerida para o caso da uréia (Frank e Franks, 1968). Uma diminuição na diferença entre as estabilidades da forma nativa e da forma desenovelada ocorreria nesses casos como consequência.

A fim de se avaliar as contribuições dos processos acima citados, utilizaram-se sondas como representações de regiões protéicas, a saber, RB (a sonda mais hidrofóbica

utilizada) como análogo das regiões hidrofóbicas da proteína e MC, o análogo das regiões mais hidrofílicas. O efeito solvatocrômico surge do efeito do meio na diferença de energia entre o estado fundamental e o estado excitado da transição observada. No caso das sondas RB e MC, essa transição consiste na transferência de carga intramolecular envolvendo o oxigênio ligado ao anel aromático e o nitrogênio piridínico. Solventes que estabilizem a carga no oxigênio, *e.g.*, formando ligações de hidrogênio com o oxigênio, levam a um aumento da energia da transição e, portanto, a um aumento do valor da polaridade medida. Solventes que estabilizem o estado excitado em relação ao estado fundamental tendem a reduzir o valor da polaridade medida. Por exemplo, solventes apolares tendem a interagir melhor com a forma não carregada, característica do estado excitado, do que com o estado fundamental. Em misturas binárias ideais, o valor da polaridade esperada seria uma média ponderada, onde os pesos são a concentração de cada componente no meio e as polaridades dos componentes puros (Suppan e Ghoneim, 1997). O valor esperado caso o sistema se comporte de maneira ideal é representado nas Figs. 4.36 a 4.43 pela linha reta contínua.

Os ensaios solvatocrômicos do sistema TMU/água (Figs. 4.36 e 4.40) indicaram um desvio negativo da idealidade, *i.e.*, ambas as sondas utilizadas percebem um meio de polaridade menor do que seria esperado caso não houvesse nenhuma interação preferencial entre a sonda e o meio e/ou entre os componentes do meio. A origem desse desvio pode ser devida a uma solvatação preferencial da sonda por moléculas de TMU, componente de menor polaridade do sistema. Essa solvatação preferencial pode surgir tanto por interações específicas TMU-sonda quanto por existência de microdomínios na mistura binária que levariam a sonda a perceber um meio mais rico em TMU do que o esperado. O efeito solvatocrômico das sondas RB e MC advem principalmente de interações de ligações de hidrogênio. Logo, um valor reduzido de polaridade indica pouca interação via ligações de hidrogênio, tanto pelo fato de a sonda interagir preferencialmente com a TMU, que não é capaz de formar ligações de hidrogênio com a sonda, como pela diminuição da disponibilidade de ligações de hidrogênio no meio. Pode-se especular que as sondas utilizadas possam interagir preferencialmente com a TMU devido ao seu caráter hidrofóbico. No entanto, embora as sondas possuam caráter hidrofóbico/hidrofílico distintos, o efeito solvatocrômico de ambas em água é muito

próximo. Quando se examinam os resultados obtidos para os álcoois (Figs. 4.37 a 4.39) (Figs. 4.41 a 4.43) observa-se o comportamento oposto, indicando que a sonda estaria sendo solvatada preferencialmente pelo componente menos hidrofóbico. Logo, o caráter hidrofóbico/hidrofílico deve contribuir menos para a polaridade medida do que a capacidade de formar ligações de hidrogênio.

Estudos calorimétricos sobre o efeito da TMU na água sugerem que a TMU leva a um aumento da rede de ligações de hidrogênio entre as moléculas de água nas redondezas das moléculas de TMU, concomitantemente reduzindo a probabilidade de ocorrência de ligações de hidrogênio no seio da solução (Chen, *et al.*, 2000). O aumento da estruturação da água em torno das moléculas de TMU é confirmado por trabalhos de modelagem molecular (Tovchigrechko, *et al.*, 1999). Isso explicaria os resultados dos experimentos solvatocrômicos em água e a capacidade da TMU de levar ao desenovelamento da proteína. A desestabilização da estrutura nativa da proteína ocorreria devido à diminuição da interação da proteína com a água, com uma conseqüente estabilização da forma desenovelada. É importante considerar que a exposição dos domínios hidrofóbicos da proteína numa água menos coesa representaria um custo entrópico significativamente menor. Para a uréia, foi proposto que a ação denaturante é causada pelo fato da uréia romper a rede de ligações de hidrogênio da água (Frank e Franks, 1968) de forma a diminuir o custo entrópico de criar uma cavidade na água a fim de se acomodar um elemento hidrofóbico. A ação denaturante da TMU pode seguir um mecanismo distinto ao da uréia: ao invés de causar uma desestruturação da água, causa uma estruturação local seguido de uma perda de coesão global, afetando o enovelamento da proteína no meio.

No caso dos sistemas TMU/álcoois, observa-se a situação oposta, *i.e.*, as sondas percebem um meio de polaridade maior do que seria esperado para um sistema ideal, sendo o desvio tanto maior quanto maior o caráter hidrofóbico do álcool. Nesse caso, as sondas podem estar sendo solvatadas preferencialmente pelos álcoois, já que o aumento do efeito solvatocrômico claramente indica uma interação preferencial com o componente capaz de realizar ligações de hidrogênio. No caso do álcool de maior caráter hidrofóbico percebe-se claramente um efeito sinérgico nas regiões ricas em álcool, nas quais a mistura binária possui uma polaridade maior do que os solventes

puros. Alguns autores atribuem esse efeito à interação da sonda com componentes livres da mistura, *i.e.*, não intermolecularmente ligados a outros componentes da mistura (Suppan e Ghoneim, 1997). Por exemplo, para a mistura binária nitrometano/1-butanol observa-se o efeito de sinergismo. Para este sistema, propôs-se que o sinergismo provém da interação, por meio de ligações de hidrogênio, entre moléculas de 1-butanol e da sonda (RB), sendo que essas interações são favorecidas pela presença de moléculas livres de 1-butanol oriundas da desestruturação do álcool induzida pela presença de nitrometano (Suppan e Ghoneim, 1997).

Dessa forma, o efeito sinérgico observado em nossos sistemas poderia ser um indicador de um efeito desestruturador da TMU sobre a estrutura dos álcoois. Para o metanol, sugere-se que a adição de solventes básicos apróticos leve a uma quebra de sua estrutura linear. Isso ocorreria, pois o co-solvente sendo capaz apenas de receber ligações de hidrogênio não é capaz de dar continuidade à estruturação original do metanol (Robinson e Symons, 1985). A desestruturação do álcool induzida pela presença da TMU aumentaria a disponibilidade de moléculas do álcool para formação de ligações de hidrogênio com a sonda, criando um ambiente de polaridade maior do que a esperada para um sistema ideal. O efeito de sinergismo observado pode ser um indicador do progresso dessa desestruturação

A contribuição da solvatação preferencial induzida pela sonda mescla-se com as possíveis contribuições da estruturação da mistura binária para o valor mensurado da polaridade microscópica, tornando impossível uma separação quantitativa das duas contribuições. O perfil dos dados obtidos, somado ao conhecimento já estabelecido na literatura, apontam para um papel determinante da TMU na estruturação da água, levando a uma diminuição de sua capacidade de solvatação. Essa redução advém do aumento da interação entre as moléculas da água induzido pela presença da TMU, reduzindo a disponibilidade das moléculas de água para interagir com solutos. No caso da lisozima, a ação da TMU se refletiria na desestabilização da forma nativa da proteína, devida a efeitos de de-solvatação, e na sua conseqüente denaturação.

6. Conclusões

O efeito de gelificação observado em alguns sistemas proteína/água/solvente orgânico foi investigado sob o ponto de vista da transição sol-gel envolvida e das características tanto das misturas binárias indutoras do efeito como dos géis produzidos. Os resultados permitiram uma melhor compreensão da dinâmica dos sistemas líquidos solventes e seus efeitos na estrutura da proteína e nas características reológicas dos géis, bem como uma melhor compreensão de transições sol-gel envolvendo proteínas em ambientes não-aquosos.

O conjunto das investigações sobre as misturas binárias corrobora a hipótese de formação de microheterogeneidades no sistema TMU/água. O perfil solvatocrômico da TMU em água indicou claramente uma preferência pelo componente mais hidrofóbico (TMU), enquanto em meio alcoólico há uma preferência pelo álcool independente da hidrofobicidade relativa. Sabendo-se do efeito estruturante da TMU sobre a água, postulou-se a formação de domínios locais de TMU onde a sonda possa estar protegida da água, enquanto o mesmo não ocorre nos álcoois devido ao efeito desestruturador da TMU e à interação preferencial das sondas com solventes próticos.

As investigações espectroscópicas (infravermelho) mostraram que o solvente induz um aumento de folhas β intermoleculares e uma redução do conteúdo de hélices α nos géis. Embora as primeiras sejam importantes para o processo de agregação, os dados indicam que o arcabouço do gel não é formado diretamente por esse tipo de estrutura, a qual provavelmente se forma em uma etapa anterior de pré-agregação.

Os dados calorimétricos indicam que a TMU perturba a conformação nativa da proteína mesmo em baixas concentrações, mas como evidenciado pelos estudos espectroscópicos e reológicos, as mudanças mais marcantes ocorrem a $w_{TMU} \sim 0,6$.

As investigações reológicas evidenciaram a natureza fractal dos géis obtidos a partir do sistema lisozima/TMU/água, revelando tratar-se de um tipo gel onde as interações inter-agregados são mais fortes do que as intra-agregados, ao qual convencionou-se denominar de gel de ligação forte. A morfologia dos géis mostrou-se dependente do regime cinético no qual os mesmos foram formados, como evidenciado

por suas dimensões fractais. O trabalho permitiu a proposição de dois regimes distintos para a gelificação induzida pelo solvente: na região de $0,60 \leq w_{TMU} \leq 0,80$ admite-se um regime cinético onde a etapa limitante é determinada por uma barreira à agregação que precisa ser vencida; e na região de $w_{TMU} > 0,80$ tem-se um regime em que não mais se observa essa barreira energética e a gelificação passa a ser limitada pela difusão dos agregados pelo meio.

A avaliação do impacto do meio na estrutura nativa da proteína indicou a existência de uma região crítica para a gelificação. Os resultados dos estudos solvatocrômicos indicaram um possível caminho pelo qual o meio leva à perda da estrutura nativa da proteína e subsequente à gelificação do sistema. A presença de TMU causaria uma profunda mudança estrutural da água, levando a um aumento de suas interações a curta distância e a uma diminuição a longa distância. Em consequência, a água se reorganizaria em domínios pequenos mas fortemente ligados internamente. Essas mudanças causariam uma dessolvatação da proteína, devido à menor interação água-proteína, e uma melhor acomodação dos domínios hidrofóbicos da proteína no meio, devido à segmentação dos domínios aquosos, levando a uma maior estabilização da estrutura denaturada que torna a agregação possível.

7. Bibliografia

Alderton, G., Ward, W. H., Fevold, H. L. (1945) Isolation of lysozyme from egg white. *Journal of Biological Chemistry*: **157** (1), 43-58.

Anfisen, C. B. (1973) Principles that governs folding of protein chains. *Science*: **181** (4096), 223-230.

Anoardo, E., Galli, G., Ferrante, G. (2001) Fast-field-cycling NMR: applications and instrumentation. *Applied Magnetic Resonance*: **20**, 365-404.

Arêas, E. P. G., Arêas, J. A. G. (1999) Mesoscopic segregation in binary liquid solutions: application of model for block copolymers to non-macromolecular systems, *Journal of Molecular Structure (Theochem)*: **464**, 199-209

Arêas, E. P. G., Arêas, J. A. G., Hamburger, J., Peticolas, W. L., Santos, P. S. (1996a) On the high viscosity of aqueous solution of lysozyme induced by some organic solvents. *Journal of Colloid and Interface Science*: **180** (2), 578-589.

Arêas, E. P. G., Kawano Y. (1991) Aplicações de técnicas espectroscópicas vibracionais ao estudo conformacional de proteínas. *Química Nova*: **14** (1), 31-43.

Arêas, E. P. G., Menezes, H. H. A., Santos, P. S., Arêas, J. A. G. (1999) Hydrodynamic, optical and spectroscopic studies of some organic-aqueous binary systems. *Journal of Molecular Liquids*: **79** (1), 45-58.

Arêas, E. P. G., Ribeiro, M. C. C., Santos, P. S. (1996b) Raman band-shape analysis of urea-lysozyme interaction in aqueous solution. *Journal of Molecular Structure*: **378**, 111-119.

Ansell, S., Cser, L., Grosz, T., Jovari, P., Soper, A. K. (1997) Solute-solute correlation in aqueous solution of tetramethylurea. *Physica B*: **234**, 347-348.

Barnes, H. a., Hutton, J. F., Walters, K. (1989) *Introduction to rheology*, Amsterdam, Elsevier.

- Belletato, P., Freitas, L. C. G., Areas, E. P. G., Santos, P. S. (1999) Computer simulation of liquid tetramethylurea and its aqueous solution. *Physical Chemistry Chemical Physics*: **1** (20), 4769-4776.
- Bethe, H. A. (1935) Statistical theory of superlattices. *Proceedings of the Royal Society London Series A*: **150**, 552-575.
- Bezzabotnov, V. Y., Cser, L., Grosz, T., Jancso, G., Ostanevich, Y. M. (1992) Small-angle neutron scattering in aqueous-solutions of tetramethylurea. *Journal of Physical Chemistry*: **96** (2), 976-982.
- Blake, C. C. F., Koenig, D. F., Mair, G. A., North, A. C. T., Phillips, D. C., Sarma, V. R. (1965) Structure of hen egg-white lysozyme. A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Angstrom resolution. *Nature*: **206** (986), 757-761
- Blake, C. C. F., Mair, G. A., North, A. C. T., Phillips, D. C., Sarma, V. R. (1965) Conformation of the hen egg-white lysozyme molecule. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*: **167** (1009), 365-377.
- Borbely, s., Cser, L., Grosz, T., Jancso, G. (1995) Neutron scattering on dense solutions of tetramethylurea. *Physica B*: **213**, 513-514.
- Bremer, L. G. B., van Vliet, T., Walstra, P. (1989) Theoretical and experimental study of the fractal nature of the structure of casein gels. *Journal of the Chemical Society - Faraday Transactions I*: **85**, 3359-3372.
- Brinker, C. J., Scherer, G. W. (1990) *Sol-gel science: the physics and chemistry of sol-gel processing*, San Diego, Academic Press.
- Broadbent, S., R., Hammersley, J., M. (1957) Percolation processes. I. Crystals and mazes. *Proceedings of the Cambridge Philosophical Society*: **53**, 629-641.
- Cacace, M. G., Landau, E., M., Ramsden, J. J. (1997) The Hofmeister series: salt and solvent effects on interfacial phenomena. *Quarterly Reviews of Biophysics*: **30** (3), 241-277.

Campbell, I. D., Dwek, R. A. (1984) *Biological Spectroscopy: Concepts Applications and Problems (Benjamin/Cummings Series in Structured Programming)* Menlo Park, Benjamin/Cummings Pub. Co.

Castelletto, V., Arêas E. P. G., Arêas J. A. G., Craievich, A. F. (1998) Effects of tetramethylurea on the tertiary structure of lysozyme in water, *Journal of Chemical Physics*: **109** (14), 6133-6139.

Chadwell, H. M. (1927) The molecular structure of water. *Chemical Reviews* : **4**, 375-398.

Chen, D. h. C., Liu, A. P. C., Koga, Y. (2001) Excess partial molar enthalpy of 1-propanol in 1-propanol-acetone (or tetramethyl urea)-H₂O at 25⁰C: effect of acetone (or tetramethyl urea) on H₂O. *Fluid Phase Equilibria*: **189**, 31-38.

Chen, J. S., Dickinson, E. (2000) On the temperature reversibility of the viscoelasticity of acid-induced sodium caseinate emulsion gels. *International Dairy Journal*: **10** (8), 541-549.

Clark, A. H., Kavanagh, G. M., Ross-Murphy, S. B. (2001) Globular protein gelation - theory and experiment. *Food Hydrocolloids*: **15** (4-6), 383-400.

Clark, A. H., Lee-Tufnell, C. D. (1986) Gelation of globular proteins. In Mitchell, J. R., Ledward, D. A., *Functional properties of food macromolecules*. London, Elsevier Applied Science.

Colthup, N. B., Daly, L. H., Wiberly, S. E. (1990) *Introduction to infrared and raman spectroscopy*, 3rd ed., New York, Academic Press.

Couette, M. M. (1890) Études sur le Frottement des Liquides. *Annales de Chimie et de Physique*: **21**, 433-510.

Cser, L. (1995) Small-angle neutron scattering study of tetramethylurea solutions. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*: **190** (2), 529-533.

da Silva, M. A., Arêas, E. P. G. (1999) Estudo espectroscópico Raman do sistema tetrametiluréia/água. 22^a Reunião anual da sociedade brasileira de química - livro de resumos: **1**, FQ-14.

da Silva, M. A. (2001) *Redes viscoelásticas de proteínas: estudos dinâmicos e estruturais do sistema lisozima/tetrametiluréia/água*, Dissertação de Mestrado, IQ-USP, São Paulo.

Da Silva, M. A., Farhat, I. A., Arêas, E. P. G., Mitchell, J. R. (2006) Solvent-induced lysozyme gels: Effects of system composition and temperature on structural and dynamic characteristics. *Biopolymers*: **83** (5), 443-454.

da Silva, M. A., Silva, L. H. M., Loh, W., Itri, R., Arêas, E. P. G. (2001) Lysozyme/cytochrome-c viscoelastic matrices in tetramethylurea/water medium. *Biophysical Journal*: **80**, 413a.

da Silva, M. A., Arêas, E. P. G. (2002) Rheological study on lysozyme/tetramethylurea viscoelastic matrices. *Biophysical Chemistry*: **99**, 129-141.

da Silva, M. A., Itri, R., Arêas, E. P. G. (2002) Lysozyme viscoelastic matrices in tetramethylurea/water media: a small angle X-ray scattering study. *Biophysical Chemistry*: **99**, 169–179.

da Silva, M. A., Arêas, E. P. G. (2005) Solvent-induced lysozyme gels: Rheology, fractal analysis, and sol-gel kinetics. *Journal of Colloid and Interface Science*: **289** (2), 394-401.

Dickinson, E. (1997) Enzymic crosslinking as a tool for food colloid rheology control and interfacial stabilization. *Trends in Food Science & Technology*: **8** (10), 334-339.

Dobson, C. M., Sali, A., Karplus, M. (1998) Protein folding: A perspective from theory and experiment. *Angewandte Chemie - International Edition*: **37** (7), 868-893.

Dong, A., Huang, P., Caughey, W. S. (1990) Protein secondary structures in water from second-derivative amide I infrared spectra. *Biochemistry*: **29**, 3303-3308.

Dufour, E., Robert, P., Renard, D., Llamas, G. (1998) Investigation of beta-lactoglobulin in water/ethanol solutions. *International Dairy Journal*: **8** (2), 87-93.

ElyseeCollen, B., Lencki, R.W. (1996) Protein ternary phase diagram .1. Effect of ethanol, ammonium sulfate, and temperature on the phase behavior of type B gelatin. *Journal of Agricultural and Food chemistry*: **44** (7), 1651-1657.

- Ernst, M. (1986) *Fractal physics*, eds Pietronero, Tosatti, E. New York, North Holland.
- Ferry, J. D. (1948) Protein gels. *Advances in Protein Chemistry*: **4**, 1-78.
- Flory, P. J. (1953) *Principles of polymer chemistry*, New York, Cornell University Press.
- Frank, H. S. e Franks, F. (1968) Structural approach to solvent power of water for hydrocarbons - urea as a structure breaker. *Journal of Chemical Physics*: **48** (10), 4746-4757.
- Frank, H. S., e Wen, W. Y., (1957) Structural aspects of ion-solvent interaction in aqueous solutions - a suggested picture of water structure. *Discussions of the Faraday Society*: **24**, 133-140.
- Franks, F. (1979) *Water, a comprehensive treatise*. New York, Plenum Press.
- Franks, F. (2002) Protein stability: the value of 'old literature'. *Biophysical Chemistry*: **96**, 117-127.
- Finer, E. G., Franks, F., Tait, M. J. (1972) Nuclear magnetic resonance studies of aqueous urea solutions. *Journal of the American Chemical Society*: **94** (13), 4424-4429.
- Griebenow, K., Klibanov, A. M. (1996) On protein denaturation in aqueous-organic mixtures but not in pure organic solvents. *Journal of the American Chemical Society*: **118** (47), 11695-11700.
- Gosal, W. S., Ross-Murphy, S. B. (2000) Globular protein gelation. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*: **5** (3-4), 188-194.
- Haris, P. I., Severcan, F. (1999) FTIR spectroscopic characterization of protein structure in aqueous and non-aqueous media. *Journal of Molecular Catalysis: B-Enzymatic*: **7** (14), 207-221.
- Harrick N.J. (1967) *Internal reflection spectroscopy*. New York, Interscience.
- Iwase, H., Hirai, M., Arai, S., Mitsuya, S., Shimizu, S., Otomo, T., Furusaka, M. (1999) Comparison of DMSO-induced denaturation of hen egg-white lysozyme and bovine alpha-lactalbumin. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*: **60** (8-9), 1379-1381.

- Jackson, M., Mantsch, H. H. (1992) Halogenated alcohols as solvents for proteins: FTIR spectroscopic studies. *Biochimica et Biophysica Acta, Protein Structure and Molecular Enzymology*: **1118** (2), 139-143.
- Jullien, R., Meakin P., (1988) Ballistic deposition and segregation of polydisperse spheres. *Europhysics Letters*: **6** (7), 629-634.
- Katz, E. D., Ogan, K., Scott, R. P. W. (1986) Distribution of a solute between 2 phases - The basic theory and its application to the prediction of chromatographic retention. *Journal of Chromatography*: **352**, 67-83.
- Kavanagh, G. M., Clark, a. H., Ross-Murphy, S. B. (2000) Heat-induced gelation of globular proteins: 4. Gelation kinetics of low pH beta-lactoglobulin gels. *Langmuir*: **16** (24), 9584-9594.
- Koeltzsch K., Qi Y., Brodkey R.S., Zakin J.L. (2003) Drag reduction using surfactants in a rotating cylinder geometry. *Experiments in Fluids*: **34** (4), 515-530.
- Koga, Y. (1996) Mixing schemes in aqueous solutions of nonelectrolytes: A thermodynamic approach. *Journal of Physical Chemistry*: **100** (13), 5172-5181.
- Krindel, P., Eliezer, I. (1971) Water structure models. *Coordination Chemistry Reviews*: **6** (2-3), 217-246.
- Lennard-Jones, J., Pople, J. A. (1951) Molecular association in liquids. I. Molecular association due to lone-pair electrons. *Proceedings of the Royal Society (London)*: **A205**, 155-162.
- Levinthal, C. (1969) How to Fold Graciously. In DeBrunner J. T. P., Munck, E., *Mossbauer spectroscopy in biological systems*. Illinois, University of Illinois Press.
- Lin, M. Y., Klein, R., Lindsay, H. M., Weitz, D. A., Ball, R. C., Meakin, P. (1990) *Journal of Colloid and Interface Science*: **137** (1), 263-280.
- Lucey, J. A., Singh, H. (1997) Formation and physical properties of acid milk gels: a review. *Food Research International*: **30** (7), 529-542.
- Macosko, C. W. (1993) In Rheology: principles, measurements, and applications. New York, Wiley-VCH.

- Makhatadze, G. I., Privalov, P. L. (1992) Protein interactions with urea and guanidinium chloride - a calorimetric study. *Journal of Molecular Biology*: **226** (2), 491-505.
- Marcus, Y. (1993) The properties of organic liquids that are relevant to their use as solvating solvents. *Chemical Society Reviews*: **22** (6), 409-416.
- Marcus, Y (2002a) *Solvent mixtures: properties and selective solvation*. New York, Marcel Dekker.
- Marcus, Y (2002b) Preferential solvation in mixed solvents. *Physical Chemistry Chemical Physics*: **4**, 4462-4471.
- Meakin, P. (1988) Models for colloidal aggregation. *Annual Review of Physical Chemistry*: **39**, 237-267.
- Mezger, T. (1998) *A little course in rheology*, Stuttgart, Physica.
- Montalvo, G., Khan, A. (2005) Rheological properties of a surfactant-induced gel for the lysozyme-sodium dodecyl sulfate-water system. *Colloid Polymers Science*: **283**, 402-412.
- Mooney, M., Ewart, R., H. (1934) The conicylindrical viscometer. *Physica (The Hague)*: **5**, 350-354.
- Mulder, G. J. (1839) On the composition of some animal substances. *Journal für Praktische Chemie*: **16**, 129.
- Ngo, J. T., Marks, J., Karplus, M. (1994) Computational complexity, protein structure prediction and the Levhintal paradox. In Merz, K. M., Le Grand, S. N., *The protein folding problem and tertiary structure prediction*. Boston, Birkhäuser.
- Nicoli, d. F., Benedek, G. B. (1976) Study of thermal-denaturation of lysozyme and other globular proteins by light-scattering spectroscopy. *Biopolymers*: **15** (12), 2421-2437.
- Nijenhuis, K. T. (1981) Investigation into the aging process in gels of gelatin-water systems by the measurement of their dynamic moduli .2. Mechanism of the aging process. *Colloid and Polymer Science*: **259** (10), 1017-1026.

- Rariy, R. V., Klibanov, A. M. (1996) Correct protein folding in glycerol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*: **94** (25) 13520-13523.
- Rariy, R. V., Klibanov, A. M. (1999) Protein refolding in predominantly organic media markedly enhanced by common salts. *Biotechnology and Bioengineering*: **62** (6), 704-710.
- Reichardt, C. (1992) Solvatochromism, thermochromism, piezochromism, halochromism, and chiro-solvatochromism of pyridinium n-phenoxide betaine dyes. *Chemical Society Reviews*: **21** (3), 147-153.
- Reichardt, C. (1965) Empirical parameters of polarity of solvents. *Angewandte Chemie - International Edition*: **4** (1), 29-40.
- Reichardt, C. (1988) *Solvent effects in organic chemistry*, 2nd ed., VCH Publishers, Weinheim.
- Renard, D., Lefebvre J., Robert, P., Llamas, G., Dufour, E. (1999) Structural investigation of beta-lactoglobulin gelation in ethanol/water solutions. *International Journal of Biological Macromolecules*: **26** (1), 35-44.
- Renkema, J. M. S., Lakemond, C. M. M., de Jongh, H. H. J., Gruppen, H., van Vliet, T. (2000) The effect of pH on heat denaturation and gel forming properties of soy proteins. *Journal of Biotechnology*: **79** (3), 223-230
- Robinson, H.L., Symons, M. C. R. (1985) Infrared Spectroscopic Studies Of The Solvation Of Aprotic-Solvents And Ions In Methanol. *Journal Of The Chemical Society-Faraday Transactions I*: **81**, 2131-2144.
- Rodríguez, R., Alvarez-Lorenzo, C, Concheiro, A. (2003) Cationic cellulose hydrogels: kinetics of the cross-linking process and characterization as pH/ion-sensitive drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*: **86** (2-3), 253-265.
- Schellman, J. A. (2002) Fifty years of solvent denaturation. *Biophysical Chemistry*: **96**, 91-101.

- Schwalbe, H., Grimshaw, S. B., Spencer, A., Buck, M., Boyd, J., Dobson, C. M., Redfield, C., Smith, L. J. (2001) A refined solution structure of hen lysozyme determined using residual dipolar coupling data. *Protein Science*: **10** (4), 677-688.
- Severcan, F., Haris, P. I. (2003) Fourier transform infrared spectroscopy suggests unfolding of loop structures precedes complete unfolding of pig citrate synthase. *Biopolymers*: **69** (4), 440-447.
- Shih, W-H., Shih, W. Y., Kim, S-I., Liu, J., Aksay, I.A. (1990) Scaling behavior of the elastic properties of colloidal gels. *Physical Review A*: **42**, 4772-4779.
- Smith, L. J., Sutcliffe, M. J., Redfield, C., Dobson, C. M. (1993) Structure of hen lysozyme in solution. *Journal of Molecular Biology*: **229** (4), 930-944.
- Stewart, G. W. (1931) X-ray diffraction in water: the nature of molecular association. *Physical Review*: **37**, 9-16.
- Stockmayer, W. H. (1945) *Advancing fronts in chemistry, Vol I: high polymers*, ed Twiss, S. B., New York, Reinhold.
- Suppan, P., Ghoneim N. (1997) *Solvatochromism*. Cambridge, The Royal Society of Chemistry.
- Surewicz, W., K., Mantsch, H. H., Chapman, D. (1993) Determination of protein secondary structure by Fourier transform infrared spectroscopy: a critical assessment. *Biochemistry*: **32** (2), 389-394.
- Tanford, C., Wagner, M. L. (1954) Hydrogen ion equilibria of lysozyme. *Journal of the American Chemical Society*: **76** (12), 3331-3336.
- Tobitani, A., Ross-Murphy, S. B. (1997a) Heat-induced gelation of globular proteins .1. Model for the effects of time and temperature on the gelation time of BSA gels. *Macromolecules*: **30** (17), 4845-4854.
- Tobitani, A., Ross-Murphy, S. B. (1997b) Heat-induced gelation of globular proteins: 2. Effect of environmental factors on single-component and mixed protein gels. *Macromolecules*: **30** (17), 4855-4862.

Toth, K., Bopp, P., Jancso, G. (1996) Ab initio studies on the interactions of water with tetramethylurea and tetramethylthiourea. *Journal of Molecular Structure*: **381** (1-3), 181-187.

Tovchigrechko, A., Rodnikova, M., Barthel J. (1999) Comparative study of urea and tetramethylurea in water by molecular dynamics simulations. *Journal of Molecular Liquids*: **79** (3), 187-201.

Urban M.W. (1996) *Attenuated total reflectance spectroscopy of polymers*. Polymer Surfaces and Interfaces Series. Washington DC: American Chemical Society.

Verheul, M. Roefs, S. P. F. M. (1998) Structure of whey protein gels, studied by permeability, scanning electron microscopy and rheology. *Food Hydrocolloids*: **12** (1), 17-24

Vicsek, T. (1992) *Fractal growth phenomena*. Singapura, Word Scientific.

Voet, D., Voet, J. G. (1990) *Biochemistry*. New York, John Wiley & Sons.

Vreeker, R., Hoekstra, L. L., Denboer, D. C., Agterof, W. G. M. (1992) The fractal nature of fat crystal networks. *Colloids and Surfaces*: **65** (2-3), 185-189.