BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo
20.285

rec. 14/10/95
4/1/1
1312290
25902

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

REDES VISCOELÁSTICAS DE PROTEÍNAS:
ESTUDOS DINÂMICOS E ESTRUTURAIS DO SISTEMA LISOZIMA/
TETRAMETILURÉIA/ÁGUA

MARCELO ALVES DA SILVA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ORIENTADORA:
PROFA. DRA. ELIZABETH P. G. ARÊAS

SÃO PAULO

2001

1.3451
5862

DEDALUS - Acervo - CQ

30100005148

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

S586r Silva, Marcelo Alves da
Redes viscoelásticas de proteínas : estudos dinâmicos e
estruturais do sistema lisozima /tetrametiluréia /água /
Marcelo Alves da Silva. -- São Paulo, 2001.
111p.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.

Orientador: Arêas, Elizabeth Pinheiro Gomes

1. Química coloidal I. T. II. Arêas, Elizabeth Pinheiro
Gomes, orientador.

541.3451 CDD

**“Redes Viscoelásticas de Proteínas: Estudos
Dinâmicos e Estruturais do Sistema
Lisozima/Tetrametiluréia/Água”**

MARCELO ALVES DA SILVA

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos
necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências - Área:
Físico-Química.

Aprovado por:

Profa. Dra. ELIZABETH PINHEIRO GOMES ARÊAS
IQ - USP
(Orientadora e Presidente)

Profa. Dra. MARIA TERESA LAMY FREUND
IF - USP

Profa. Dra. MARIA ELISABETE DARBELLO ZANIQUELLI
FFCLRP- USP

SÃO PAULO
30 DE NOVEMBRO 2001.

Índice

Resumo	i
Abstract	iii
1 - Objetivos	1
2 - Introdução	2
2.1 - Considerações iniciais	2
3 - Sistemas de estudo	4
3.1 - Proteínas	4
3.1.1 - Introdução	4
3.1.2 - Aminoácidos	5
3.1.2.1 - Ligações peptídicas	6
3.1.3 - Conformações	6
3.1.4 - Proteínas globulares e prot. não globulares (estendidas ou fibrosas)	7
3.1.5 - Mudanças na estrutura nativa	7
3.1.6 - Proteínas de estudo	8
3.1.6.1 - Lisozima	8
3.1.6.2 - Citocromo-c	8
3.2 - Sistemas líquidos binários	11
4 - Aspectos teóricos das principais técnicas empregadas	14
4.1 - Técnicas espectroscópicas	14
4.1.1 - Espectroscopia vibracional Raman	15
4.1.1.1 - Razões de depolarização	16
4.1.1.2 - Efeito de não-coincidência	17
4.1.2 - Espalhamento de raios X	18

4.1.2.1 - Espalhamento por partículas pequenas	18
4.1.2.2 - Espalhamento por partículas grandes	21
4.1.2.2.1 - Leis de Guinier e Porod	22
4.1.2.2.2 - Interfaces difusas	23
4.1.2.2.3 - Sistemas fractais	23
4.1.2.2.4 - Leis de potências dimensionais	24
4.1.2.2.5 - Curvas de interferência	24
4.2 - Reologia	25
4.2.1 - Definições	26
4.2.2 - Comportamentos reológicos	28
4.2.3 - Dependência com a temperatura	31
4.2.4 - Tensão de escoamento aparente	32
4.2.5 - Comportamento viscoelástico	32
4.2.5.1 - Modelo de Kelvin-Voigt	33
4.2.5.2 - Modelo de Maxwell	34
4.2.6 - Testes estáticos	36
4.2.7 - Testes transientes	36
4.2.7.1 - Testes de “creep”	36
4.2.7.2 - Testes de relaxação	37
4.2.8 - Testes dinâmicos	39
4.2.8.1 - Dependência com a amplitude de deformação	41
4.2.8.2 - Dependência com a frequência	41
4.2.8.2.1 - Sistemas monodispersos	41
4.2.8.2.2 - Sistemas polidispersos	43
4.2.8.3 - Curva mestra	43
5 - Parte experimental	45
5.1 - Materiais e preparação das amostras	45
5.2 - Metodologias experimentais e de análise	45
5.2.1 - Calorimetria	45

5.2.2 - Espectroscopia vibracional Raman	46
5.2.3 - Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)	47
5.2.3.1 - Modelo unificado de Beaucage	48
5.2.3.2 - Modelo bicontínuo	50
5.2.4 - Ensaios reológicos	50
6 - Resultados e discussão	52
6.1 - Calorimetria	52
6.2 - Espectroscopia vibracional Raman	55
6.2.1 - Comportamento espectral do sistema TMU/água	55
6.2.1.1 - Razões de depolarização e efeitos de não coincidência	60
6.2.2 - Demais derivados de uréia	62
6.3 - Ensaios reológicos	69
6.3.1 - Testes de “Creep”	69
6.3.2 - Testes de relaxação	74
6.3.3 - Testes dinâmicos	78
6.3.4 - Dependência com a frequência	83
6.4 - Espalhamento de raios X a baixo ângulo.	86
6.4.1 - Sistemas lisozima/água.	86
6.4.2 - Sistemas lisozima/TMU/água.	89
6.4.3 - Sistemas lisozima/citocromo-c/TMU/água	98
7 - Discussão final e conclusões	105
8 - Bibliografia	108

Agradecimentos

À minha amada companheira Andréia pelo apoio irrestrito e carinho durante esta jornada.

À Prof. Dra. Elizabeth P. G. Arêas pela orientação e paciência além do dever.

À Prof. Dra. Rosângela Itri pela colaboração nos estudos de SAXS.

Ao Prof. Dr. Watson Loh e Prof. Dr. Luiz Henrique pela ajuda na obtenção das curvas calorimétricas.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (Campinas) e ao Laboratório de Espectroscopia Molecular (IQ-USP) pelo uso de suas dependências.

À agência de fomento CNPq.

Resumo

Lisozima mostrou-se capaz, quando dispersa em certos meios orgânico-aquosos, de gerar sistemas pseudoplásticos que evoluem espontaneamente para redes de caráter viscoelástico. Esse fenômeno foi investigado neste estudo, para lisozima dispersa em uma série de misturas binárias contendo derivados de uréia como componente orgânico. Devido aos notáveis efeitos observados para um de tais derivados, a saber, tetrametiluréia (TMU), especial atenção foi dedicada aos sistemas contendo esse composto. O enfoque experimental incluiu espectroscopia Raman, microcalorimetria, reologia e espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS).

O trabalho envolveu o estudo dos sistemas orgânico-aquosos isolados e na presença de proteína. No primeiro caso, foi feita uma investigação espectroscópica e microcalorimétrica dos sistemas quanto a aspectos relativos à segregação de microdomínios na fase líquida e sua conseqüente relação com a deflagração da transição viscoelástica na proteína. Foram observadas descontinuidades nos valores de entalpias de excesso de mistura para o sistema TMU/água em torno de $w_{\text{TMU}} = 0,6$, assim como padrões peculiares de comportamento espectral em torno dessa concentração da mistura binária.

No segundo caso, os sistemas complexos de proteínas gerados foram investigados sob o ponto de vista morfológico e dinâmico, através das técnicas reológicas e de SAXS. Energias de ativação de fluxo determinadas na região sub-crítica, de comportamento Newtoniano, mostraram uma dependência exponencial direta com w_{TMU} , indicando que mudanças estruturais nos fluidos complexos já ocorrem em regiões de composição do solvente bem abaixo da região de transição em $w_{\text{TMU}} = 0,6$. Na região viscoelástica, $0,6 < w_{\text{TMU}} < 0,9$, ensaios de relaxação indicaram a presença de duas populações distintas. A tangente de perda ($\tan \delta = G''/G'$) apresentou valores menores que a unidade para todos os casos, indicando o caráter “solid-like” das redes nas condições de ensaio. Apesar de seu caráter sólido, as redes mostram-

se bastante flexíveis, suportando grandes deformações antes da ruptura, como inferido a partir da larga região viscoelástica linear. A variação nos módulos elástico (G') e de perda (G'') com a composição do solvente indica a dependência do caráter viscoelástico com a fração de massa de TMU na mistura binária. Na região de baixo conteúdo de água ($w_{\text{TMU}} = 0,9$), um aumento em G'' após a região viscoelástica linear é observado, indicando aumento da estruturação antes da ruptura da rede.

As curvas de SAXS foram modeladas em seus fatores de forma e de interferência com uma equação unificada para objetos aleatoriamente distribuídos em um continuum. Os resultados permitiram a construção de um modelo, compatível com as demais evidências experimentais, segundo o qual as moléculas de lisozima encontram-se em duas conformações distintas nas matrizes: uma de conformação estendida e caráter fractal, predominante em $w_{\text{TMU}} > 0,6$, com dimensão máxima de ca. de 160 Å, responsável pela interdigitação com espécies fractais vizinhas e uma espécie compacta, minoritária em $w_{\text{TMU}} > 0,6$ (porém predominante em $w_{\text{TMU}} < 0,6$), com raio de giro de ca. 48 Å, presente nos microdomínios intersticiais aquosos da matriz. Verificou-se ainda a viabilidade de incorporação homogênea de uma metaloproteína, o citocromo-c, às matrizes de lisozima, sem perturbação significativa de sua morfologia, o que constitui um evento de potencial interesse biotecnológico.

Os resultados deste trabalho trazem novos suportes experimentais à hipótese de correlação entre inversão na microconfiguração do meio solvente binário e deflagração do processo de transição sol-gel da proteína.

Abstract

Lysozyme was found to be able, when dispersed in certain organic/aqueous media, to generate pseudoplastic systems that spontaneously evolve to three-dimensional networks with viscoelastic character. This phenomenon was investigated in this study, for lysozyme dispersed in a series of binary mixtures containing urea derivatives as the organic component. Due to the remarkable effects obtained in one of such derivatives, namely, tetramethylurea (TMU), special attention was given to systems containing that compound. The experimental approach included Raman spectroscopy, microcalorimetry, rheology and small angle X ray scattering (SAXS).

The work involved the study of the organic/aqueous systems on their own and in the presence of protein. The former consisted of binary liquid mixtures that were spectroscopically and microcalorimetrically investigated as to aspects concerning microdomain segregation in the liquid phase and its consequent relationship with the threshold of the protein viscoelastic transition. Discontinuities in the excess enthalpy of mixture were observed for TMU/water system around $w_{\text{TMU}} = 0.6$, as well as peculiar spectral patterns around that same binary mixture concentration.

The latter comprised complex protein systems that were investigated both under a morphological and dynamical point of view. Flow activation energies determined in the sub-critical (Newtonian) region showed an exponential increase with w_{TMU} , indicating that structural changes in the complex fluids are under way at solvent concentration regions well below that of the transition, at $w_{\text{TMU}} = 0.6$. In the viscoelastic region, $0.6 < w_{\text{TMU}} < 0.9$, relaxation studies indicated the presence of two distinct populations. The loss tangent ($\tan \delta = G''/G'$) presented values lower than the unity for all cases, indicating the solid-like character of the matrices, in the assay conditions. Despite their solid character the networks are quite flexible, standing large strains before rupture, as inferred from the large linear viscoelastic region. The

variation in elastic (G') and loss (G'') moduli with solvent composition indicates a dependence of the viscoelastic character on TMU mass fraction in the binary mixture. In the region of low water content ($w_{\text{TMU}} = 0.9$), an increase in G'' after the LVR is observed, indicating increase in network structuring before rupture.

SAXS curves were modeled with a unified equation for randomly distributed objects in a *continuum*. Results allowed the proposal of a model, which is compatible with the experimental evidence obtained through the other techniques in this work, according to which lysozyme molecules occur in two distinct conformations: one expanded and with fractal character, prevailing at $w_{\text{TMU}} > 0.6$, with maximum dimension *ca.* 160 Å and interdigitated with neighbouring fractal species; and a compact conformation, of minor prevalence at $w_{\text{TMU}} > 0.6$ (but prevailing at $w_{\text{TMU}} < 0.6$), with radius of gyration *ca.* 48 Å, present in the matrix microdomain interstices. It has also been verified the feasibility of homogeneous incorporation of cytochrome-c into the lysozyme matrices, an event of potential biotechnological interest.

Results from this work bring further experimental support to our hypothesis on the correlation between microconfigurational inversion in the binary solvent medium and the sol-gel transition in the protein.

1- Objetivos

O objetivo deste projeto consiste em ampliar a compreensão da dinâmica de associação interdomínios em sistemas binários aquosos de derivados de uréia e da capacidade destas associações de deflagrar mudanças na estrutura de proteínas, levando-as à formação de redes viscoelásticas.

Para este fim, nos propusemos a:

- Acompanhar espectroscopicamente e microcalorimetricamente o comportamento de certos derivados de uréia em soluções aquosas.
- Caracterizar reologicamente os sistemas proteína/água/tetrametiluréia na região de fluxo newtoniano, região de transição e região viscoelástica.
- Determinar parâmetros morfológicos, via espalhamento de raios X a baixo ângulo, dos sistemas proteína/água/tetrametiluréia em rede.
- Apresentar um modelo preliminar do que ocorre com os sistemas binários ao longo de sua faixa de concentração e o seu efeito sobre a proteína.

2- Introdução

2.1 - Considerações Iniciais

Para uma melhor compreensão dos aspectos estruturais e dinâmicos de proteínas, fatores que controlam sua termodinâmica e cinética de denaturação e enovelamento tem sido extensamente investigados. Apesar dos avanços teóricos obtidos, os mecanismos de enovelamento e denaturação de proteínas não são conhecidos em toda a sua extensão (Cleland,1993; Creighton,1992; Dill *et al.*,1995; Kim e Baldwin,1990).

A compreensão destes mecanismos não só é de reconhecida importância científica, como é também relevante sob o ponto de vista tecnológico em diversas áreas de atividade como, por exemplo, na indústria farmacêutica (Hlodan *et al.*,1991).

Sabe-se que a estrutura e função de proteínas em meio aquoso é fortemente influenciada pela presença de sais e moléculas orgânicas, que podem tanto levar à denaturação da proteína ou à sua estabilização (Cacace *et al.*, 1997). Logo, podem-se utilizar esses elementos como sondas dos processos de denaturação e enovelamento de proteínas.

Entre os agentes denat urantes comumente usados, a uréia tem recebido especial atenção por sua ampla aplicação em Bioquímica. Embora a uréia seja largamente empregada como denaturante e alvo de intensa investigação, o mecanismo pelo qual a uréia age ainda é desconhecido em vários de seus aspectos. Especula-se que a uréia possa agir diretamente nos grupos peptídicos (Makhatadze e Privalov, 1992; Sijpkens *et al.*,1993; Breslow e Guo, 1990; Hedwig *et al.*, 1991; Stokes, 1967), embora outros autores sugiram sua atuação na desestruturação da água (Franks e Franks, 1968).

Dentro desse tema, o laboratório de Biofísico-Química do IQ-USP vem desenvolvendo um estudo sobre as interações de certas moléculas orgânicas (uréia e dimetilsulfóxido, entre

outras) na estrutura de proteínas em soluções aquosas (Arêas *et al.*, 1996a, 1999, Casteletto *et al.*, 1998, Arêas e Arêas, 1999).

Ao longo desses estudos, foi observado um fenômeno peculiar, no qual certas misturas binárias orgânico-aquosas mostravam-se capazes de induzir a formação de sistemas de fluxo pseudoplástico de alta viscosidade quando em presença de proteína (mais especificamente lisozima) em certa faixa de concentração, os quais evoluíam espontaneamente ao longo do tempo para sistemas viscoelásticos com aparência de gel. Foi observada uma correlação entre a deflagração desse processo e certas características estruturais dos componentes orgânicos nas misturas binárias empregadas e suas concentrações nos sistemas binários (Arêas *et al.*, 1996b e 1999). Verificou-se que tais sistemas constituem rede tridimensionais semi-sólidas que se organizam a partir de múltiplas ligações de caráter transiente (não covalente) entre moléculas parcialmente desenoveladas de lisozima (Arêas *et al.*, 1996a)

Neste projeto, ampliamos o estudo deste fenômeno e realizamos uma primeira caracterização dos sistemas viscoelásticos produzidos. Numa primeira etapa, o sistema binário foi estudado visando avaliar o seu papel na drástica mudança conformacional da proteína no que se refere às mudanças de ambiente que o componente orgânico experimenta ao longo da faixa de concentração da mistura líquida binária (Da Silva *et al.*, 2001b; Da Silva e Arêas, 1999). Numa segunda etapa, os sistemas protéicos pseudoplásticos/viscoelásticos foram estudados, visando-se determinar aspectos de forma, estrutura e dinâmica das populações presentes nas unidades formadoras dos sistemas complexos (Da Silva *et al.*, 2001a).

3 - Sistemas de estudo

3.1 - Proteínas

3.1.1 - Introdução

Dentre os sistemas moleculares classificados como biomoléculas, o grupo das proteínas é um dos melhor estudados. Devido às suas características peculiares, proteínas possuem propriedades físico-químicas bem definidas e um papel biológico evidente, como por exemplo as proteínas com ação enzimática e proteínas com função estrutural.

Proteínas possuem a capacidade de auto-organização, isto é, algumas proteínas recém formadas são capazes de assumir a sua estrutura nativa espontaneamente. Em alguns casos, a perda de sua estrutura nativa (denaturação) é um processo reversível, com a restauração das condições nativas e conseqüente recuperação de suas funções quando em condições adequadas. Algumas delas são capazes de manter sua conformação nativa em meios distintos da água, como é o caso da lisozima, capaz de manter sua estrutura nativa em glicerol (Rairy e Klinabov, 1997).

Aparentemente, a cadeia polipeptídica especifica em grande parte a estrutura tridimensional geral da proteína, ou seja, suas características essenciais de enovelamento, das quais decorrem suas características funcionais. O papel do meio muitas vezes é relegado a um segundo plano, nem sempre sendo adequadamente considerado. Sua relevância, no entanto, revela-se essencial em muitos contextos, como por exemplo naqueles referentes a estrutura e funcionalidade de proteínas em meios não convencionais (Klibanov, 2001).

Para uma melhor compreensão das peculiaridades desta classe de biomoléculas se faz necessário conhecer um pouco mais sobre as mesmas, como se verá no item a seguir.

3.1.2 - Aminoácidos

Proteínas são formadas pela união sequencial de uma classe de moléculas chamadas aminoácidos. Os aminoácidos possuem uma composição similar, onde R é a cadeia lateral. Os aminoácidos são classificados em função das características químicas e estruturais dos grupos R (Fig.3.1).

Na natureza, todas as proteínas são formadas por vinte diferentes aminoácidos. Pode-se observar que os aminoácidos possuem um grupo amina e um grupo carboxílico ligados ao carbono α . Esses grupos, em pH fisiológico, estão completamente ionizados. Logo, um aminoácido pode agir como base ou como ácido. Moléculas que possuem grupos carregados com cargas opostas são chamados 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.

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

- Aminoácidos com cadeia lateral apolar (Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, Val).
- Aminoácidos com cadeia lateral sem carga (Asn, Cys, Gln, Ser, Thr, Tyr).
- Aminoácidos com cadeia lateral ionizada (Arg, Asp, Glu, His, Lys).

As características das cadeias laterais são responsáveis pela capacidade de auto-organização das proteínas, uma vez que essa capacidade é largamente influenciada pela tendência da proteína segregar as regiões apolares do contato com o meio polar (Voet e Voet, 1990).

Fig. 3.1 - Estrutura básica de um aminoácido.

3.1.2.1 - Ligações peptídicas

Os aminoácidos formam proteínas através da formação de ligações peptídicas entre o grupo amina de um aminoácido e grupo carboxílico de outro aminoácido com a eliminação de uma molécula de água (condensação) (Voet e Voet, 1990) (Fig. 3.2).

Moléculas formadas por dois aminoácidos são chamadas de dipeptídeos, por três, tripeptídeos, por vários, oligopeptídeos.

Após a condensação os aminoácidos passam a ser chamados de resíduos (pois não são mais aminoácidos, mas sim os resíduos dos aminoácidos originais) ou de unidades peptídicas.

A condensação sempre se dá entre os grupos amino e carboxílico terminais, logo as proteínas são moléculas lineares, do ponto de vista de sua estrutura covalente.

Fig.3.2 - Reação de condensação de dois aminoácidos

3.1.3 – Conformação

A estrutura da proteína define a sua função biológica. Tradicionalmente, a estrutura da proteína é dividida em quatro níveis estruturais.

A estrutura primária é definida pela sequência dos 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 e dobras (turns), 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, como por exemplo a hemoglobina, o arranjo espacial das subunidades é chamado de estrutura quaternária.

3.1.4 - Proteínas globulares e proteínas não globulares (estendidas ou fibrosas)

Proteínas globulares são macromoléculas aproximadamente esféricas e compactas, diversas quanto aos aspectos de tamanho e função. Enzimas, proteínas de transporte e receptores constituem exemplos dessa classe de biomoléculas. São sistemas macromoleculares solúveis em meios aquosos, com características coloidais.

Proteínas não globulares constituem sistemas em geral autoassociados, insolúveis em meio aquoso e de maior complexidade estrutural. Entre as proteínas não globulares de origem animal podemos citar o colágeno, a queratina e a elastina. Dentre aquelas de origem vegetal, temos como exemplo as proteínas do glúten, as ligninas, entre outras. Suas funções são muitas vezes estruturais, mas podem exercer outras funções como a de proteínas de reserva.

3.1.5 – Mudanças na estrutura nativa

Apesar da extraordinária capacidade das proteínas de se auto-organizar, a estrutura nativa apresenta muitas vezes baixa estabilidade, podendo ser facilmente perdida com variação da temperatura, pH, composição do meio, etc.

O processo de perda da estrutura nativa de uma proteína é chamado de denaturação. Substâncias que deflagram a denaturação de proteínas são chamadas de agentes denat urantes. A perda da estrutura nativa leva a proteína a adquirir uma estrutura aleatória onde as estruturas secundárias não existem mais. Proteínas globulares podem não se denaturar totalmente e permanecer na forma de “molten globule”. Nessas condições, as estruturas secundárias se mantêm, porém numa forma mais expandida do que na forma nativa.

Embora proteínas sejam obtidas e ensaiadas universalmente em meios aquosos, meios solventes não convencionais (meios orgânicos) são também referidos como meios dispersantes de proteínas. Inusitadas alterações catalíticas são relatadas nessas condições para proteínas com ação enzimática (Klibanov, 2001). Tais alterações funcionais encontram-

se correlacionadas com mudanças conformacionais específicas.

3.1.6 - Proteínas de estudo

Neste trabalho foram estudadas duas proteínas globulares, lisozima e citocromo-c, em meios orgânico-aquosos contendo derivados de uréia como componente orgânico. Os desvios das formas originais globulares e conseqüente formação de sistemas autoassociados em rede foram acompanhados por técnicas diversas.

3.1.6.1 - Lisozima

Lisozima é uma enzima antibacteriana, que destrói a parede celular de bactérias. Seu substrato é a ligação glicosídica $\beta(1\rightarrow4)$ 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 molécula possui uma forma elipsoidal de dimensões de 30 x 30 x 45 Å. A cadeia polipeptídica possui estruturação secundária representada por vários segmentos helicoidais e três folhas β anti-paralelas (Fig. 3.3). A estrutura da lisozima de clara de ovo foi elucidada, via difração de raios-X, por David Philips em 1965 (Blake *et al.*, 1965, Blake *et al.*, 1967) com uma resolução de 2,0 Å. Foi a segunda enzima a ser elucidada com este grau de resolução.

3.1.6.2 - Citocromo-c

Citocromos mitocondriais do tipo-c, ou citocromo-c, são proteínas globulares, relativamente pequenas em torno de 12,4 kD. Estas proteínas participam de uma das etapas da transferência de elétrons dentro da cadeia respiratória dos eucariotos (Pettigrew e Moore, 1987).

Dentre os diversos citocromos-c, o primeiro a ter sua estrutura elucidada por raios X foi a forma oxidada do citocromo-c obtido de coração de cavalo (Dickerson *et al.*, 1971).

Aspectos estruturais da molécula do citocromo-c tem sido amplamente estudados através de numerosos trabalhos, seja por difração de raios X para a proteína na forma cristalina como por RMN da proteína em solução (Takano e Dickerson, 1981a,b; Bushnell *et al.*, 1990; Louie e Brayer, 1990, Gao *et al.*, 1990, Berguis e Brayer, 1992, Banci *et al.*, 1997 e 1999).

A cadeia polipeptídica do citocromo-c de coração de cavalo é composta por apenas um única unidade polipeptídica com 104 resíduos. A esta cadeia está ligado um grupo heme, uma protoporfirina IX complexada com Fe, via duas ligações tioetér (Margoliash e Schejter, 1966). O citocromo-c possui dimensões aproximadas de 25x25x37 Å (Fig.3.4).

Fig. 3.3 - Estrutura da molécula de lisozima determinada por raios X a partir de sua forma cristalina (Prange et al., 1998)

Fig. 3.4 - Estrutura da molécula de citocromo-c determinada por raios X a partir de sua forma cristalina, grupo heme omitido. (Banci et al., 1997)

3.2 - Sistemas líquidos binários

O estudo de interações intermoleculares em misturas líquidas binárias constitui ampla e relevante área de pesquisa em Físico-Química. No que se refere à importância desses estudos em áreas de interesse biológico, a investigação de misturas binárias contendo amidas secundárias ou N-monosubstituídas de ácidos carboxílicos apresenta particular relevância. Isto se dá pela natureza semelhante de tais compostos com os constituintes básicos de moléculas de proteínas, onde ligações amida (ligação peptídica) constituem os elos fundamentais de ligação entre os resíduos de aminoácidos. Dentro dessa classe encontram-se as alquil-uréias, estudadas neste trabalho. Nelas verifica-se 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 sistemas moleculares de dimensões relativamente pequenas. Tais características bimodais (hidrofílico/hidrofóbico) são também observadas em outros sistemas nos quais um grupamento polar ou polarizável não carboxílico coexiste com domínios apolares na mesma molécula. Este é o caso, por exemplo, de dimetilsulfóxido e hexametilfosfotriamida.

Em trabalhos anteriores de nosso laboratório, foi observada a capacidade de vários dos sistemas acima citados, em certas regiões de composição de suas soluções binárias com a água, de induzir uma transição sol-gel em lisozima dispersa nesses meios, gerando fluidos pseudoplásticos que mostraram uma evolução espontânea para redes tridimensionais semi-sólidas de caráter viscoelástico (Arêas *et al.*, 1996a). Estudos reológicos, espectroscópicos (ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C e espalhamento Raman), refratométricos e condutivimétricos foram realizados para vários desses sistemas, em função da fração de massa do componente orgânico na mistura aquosa (Arêas *et al.*, 1999). Os resultados indicaram a ocorrência de uma transição configuracional em concentrações críticas das misturas.

Em particular, o sistema TMU/água mostrou-se de interesse a nosso estudo, devido à sua adequação a algumas das medidas experimentais aplicadas neste trabalho, mais especificamente às medidas de espalhamento de raios X a baixo ângulo. Cumpre portanto destacar alguns aspectos físico-químicos descritos para esse sistema binário.

Em estudos de simulação de Monte Carlo, a TMU (um líquido à temperatura ambiente, miscível com a água em todas as proporções) apresenta uma curva larga de distribuição radial, indicando tratar-se de um sistema com baixo grau de organização molecular (Belletato *et al.*, 1999). Esse efeito entrópico é provavelmente o responsável pela alta temperatura de ebulição desse composto (175,2^oC) quando comparada à da água, embora as entalpias de vaporização dos dois líquidos tenham valores muito próximos.

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 inicia-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 confirmada 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). 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).

Dados termodinâmicos e de ressonância magnética nuclear em sistemas TMU/água sugerem um modelo no qual as moléculas de TMU podem ser consideradas estruturantes até uma concentração de 2 Mol/L à temperatura ambiente, enquanto em concentrações mais altas tornam-se desestruturantes. Isso gera anomalias nas difusões da água nesses sistemas binários: os coeficientes de difusão determinados por espalhamento de nêutrons quasi-elástico para a água em TMU são significativamente menores que em água pura, enquanto os coeficientes de difusão da TMU se mantêm praticamente constantes (Cser *et al.*, 1989 Cser *et al.*, 1992). Um modelo de gaiola, comumente aceito para clatratos, é proposto para explicar os dados observados. Tais gaiolas seriam formações dinâmicas, não estáveis, formadas pela água mais

estruturada em torno da TMU. Essas formações levariam a uma diminuição nos coeficientes de difusão da água pela menor mobilidade dessas espécies decorrente do aumento no número de ligações de hidrogênio. Não afetariam, no entanto, o coeficiente de difusão da TMU em razão de sua difusibilidade depender primordialmente não das colisões intermoleculares, como é usual, mas da superação da barreira do clatrato de água onde está aprisionada, através de sua quebra (Cser *et al.*, 1997). Dados de velocidade do som e de absorção de ultra-som indicam um máximo para densidade, viscosidade e absorção em cerca de 0,2 de fração molar ($w_{TMU}=0,6$) para soluções aquosas de TMU, enquanto valores de excesso de compressibilidade mostram valores mínimos nessas mesmas concentrações (Sasaki e Arakawa, 1973).

4 - Aspectos teóricos das principais técnicas empregadas

4.1 - 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, normalmente podemos ver apenas a radiação refletida ou transmitida. No entanto, mais precisamente, quando se irradia um meio, três tipos de fenômenos podem ocorrer: a emissão, a absorção e o espalhamento da radiação. A interação da radiação eletromagnética com a matéria pode resultar em fenômenos fotoquímicos, de grande relevância em Biologia (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 do microondas, as quais podem ser estudadas independentemente (Atkins, 1990) através do uso de técnicas espectroscópicas.

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 a parcela absorvida, em função 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. No segundo caso, temos o efeito Raman, em que se pode ter ganho (anti-Stokes) ou perda (Stokes) de energia. No efeito Raman, parte da luz espalhada apresentará portanto uma variação de frequência em relação à frequência do feixe incidente. A análise da variação da frequência entre a luz incidente e a luz espalhada é a base da espectroscopia Raman.

4.1.1 - Espectroscopia vibracional Raman

O efeito Raman, de uma maneira simplificada, pode ser comparado a um choque inelástico entre o fóton incidente e uma molécula que resulta numa alteração nos níveis energéticos vibracional e rotacional da molécula. Devido às transições serem quantizadas, essas alterações equivalem a uma quantidade ΔE_{tr} . Como a energia do sistema permanece constante, a energia do fóton espalhado será de $h\nu_i \pm \Delta E_{tr}$, onde $h\nu_i$ é a energia do fóton incidente. No caso do fóton transferir energia para a molécula, teremos que a energia do fóton espalhado ($h\nu_e$) será menor do que o fóton incidente por um fator de $-\Delta E_{tr}$, o que dará origem às linhas Stokes. No caso do fóton ganhar energia da molécula, teremos que,

$$h\nu_e = h\nu_i + \Delta E_{tr} \quad (4.1)$$

dando origem às linhas anti-Stokes. Transições deste tipo são menos abundantes, pois só ocorrem quando o fóton interage com uma molécula que já esteja num estado vibracional excitado. A ocupação dos estados excitados depende da energia térmica do sistema e pode ser descrita pela distribuição de Boltzmann (Atkins, 1990). À temperatura ambiente, há um número reduzido de moléculas nos estados excitados, o que torna a intensidade das linhas anti-Stokes baixa quando comparada às linhas Stokes. A intensidade das linhas anti-Stokes é consideravelmente sensível à variação da temperatura.

O fóton incidente, em geral, possui energia muito superior à faixa das energias dos

estado vibracionais, mas abaixo da energia necessária para uma transição eletrônica. Quando esse fóton interage com a molécula, ele é aniquilado, a molécula é promovida para um nível energético muito alto e instável e rapidamente perde energia na forma de um fóton, este com direção não necessariamente igual ao do incidente. Na grande maioria das vezes, o fóton espalhado possui a mesma energia do incidente (espalhamento Rayleigh). Uma pequena parcela dos fótons espalhados possui energia distinta dos fótons incidentes (espalhamento Raman).

4.1.1.1 - Razões de depolarização

Quando submetidos ao campo eletromagnético da radiação incidente, prótons e elétrons da molécula sofrem um deslocamento relativo. Esse deslocamento induz a formação de um dipolo. A razão momento do dipolo induzido, μ , pela intensidade do campo elétrico, E , é denominada polarizabilidade, p . Para que um modo vibracional seja capaz de transferir energia do fóton incidente, a vibração molecular deve causar uma mudança na polarizabilidade da molécula (regra de seleção) (Colthup, 1990).

Em moléculas com alta simetria, *e.g.*, simetria octaédrica ou tetraédrica, o momento de dipolo induzido independe da orientação do campo elétrico da radiação incidente. Neste caso, a orientação do campo elétrico da radiação espalhada possui apenas um componente com a mesma orientação da radiação incidente, independentemente da orientação da molécula. O modo vibracional responsável por esse espalhamento é chamado de modo vibracional isotrópico. No caso de outras moléculas de mais baixa simetria, a polarizabilidade pode ser distinta nas direções x , y ou z . Nesse caso, a orientação do campo eletromagnético da radiação espalhada pode possuir componentes em orientações diferentes da orientação do campo eletromagnético da radiação incidente. Esse modo vibracional é chamado anisotrópico. Nesses modos, a orientação do campo elétrico da radiação espalhada depende da orientação da molécula.

Quando se utiliza uma fonte de luz polarizada, *e.g.*, luz laser, a orientação do campo elétrico da radiação espalhada por um modo isotrópico será paralela ao campo da radiação incidente. No caso de modos anisotrópicos, a radiação espalhada apresentará componentes não paralelos ao da radiação incidente. Experimentalmente, pode-se utilizar um analisador

para coletar espectros com a contribuição de cada um dos modos. Quando o analisador estiver paralelo à orientação do campo incidente, geometria VV (vertical-vertical), será possível coletar contribuições dos componentes isotrópicos e anisotrópicos (lembrar que os modos anisotrópicos possuem componentes não-paralelas e paralelas à orientação da radiação incidente). Caso o analisador esteja perpendicular à orientação da radiação incidente, geometria VH (vertical-horizontal), será possível coletar apenas contribuições de modos anisotrópicos.

A razão de depolarização (ρ) é definida como sendo a razão da intensidade da radiação espalhada perpendicularmente ao plano da radiação incidente pela intensidade da radiação espalhada paralelamente ao plano da radiação incidente (Rothschild, 1976).

$$\rho = I_{VH}/I_{VV} \quad (4.2)$$

Medidas da razão de depolarização fornecem meios para se investigar a simetria dos modos vibracionais.

4.1.1.2 - Efeito de não-coincidência

O fenômeno de não coincidência Raman das frequências dos componentes paralelos e perpendiculares ao plano da luz incidente de um modo vibracional é chamado de efeito de não coincidência (ENC) (Torii e Tasumi, 1993; Torii e Tasumi, 1998, Torii, 1999). Esse efeito é atribuído a interações vibracionais determinadas pelo mecanismo de acoplamento de dipolos de transição (transition dipole coupling, TDC) (Logan 1986; Torii e Tasumi, 1995). Esse fenômeno fornece informações a respeito da orientação relativa das moléculas envolvidas no acoplamento, portanto pode-se esperar que o sinal e magnitude do ENC sejam sensíveis a mudanças estruturais do solvente e da molécula solvatada.

O ENC é definido como a diferença da frequência de uma banda em geometria VH pela frequência da mesma banda em geometria VV.

4.1.2 - Espalhamento de raios X

Quando se expõe uma solução ou outro material transparente a um feixe de luz cujo comprimento de onda seja distante de qualquer faixa de absorção, as moléculas do material serão polarizadas. Classicamente, a radiação eletromagnética é descrita como um campo eletromagnético com variação senoidal. Esta variação induz uma oscilação senoidal dos elétrons da molécula irradiada. Essas cargas oscilantes farão com que cada molécula do sistema disperse uma parte da energia incidente em direções diferentes da original (van Holde, 1971). Esse fenômeno é a base das técnicas de espalhamento, sempre aplicável para luz, raios X ou neutrons, com pequenas modificações (Glatter e Kratky, 1982). Estaremos aqui focalizando mais particularmente a técnica de espalhamento de raios X a baixo ângulo, de interesse no estudo morfológico de sistemas de dimensões relativamente grandes quando comparados a dimensões atômicas, como é o caso de sistemas auto-associados ou agregados, de relevância biológica.

4.1.2.1 - Espalhamento por partículas pequenas

Considerando-se um sistema formado por duas partículas com dimensões muito menores que o comprimento de onda da radiação incidente (espalhamento Rayleigh), teremos que cada partícula será uma fonte de espalhamento (Fig.4.1). Para um observador situado em P, as ondas deverão apresentar uma diferença de fase: $\phi_1 - \phi_2$, onde ϕ_1 e ϕ_2 são as fases das ondas espalhadas, relativas à um referência arbitrária, pois estas percorrem distâncias diferentes antes

Fig.4.1 - Espalhamento por duas partículas (van Holde, 1971).

de chegar ao observador.

Os campos elétricos (E) das ondas espalhadas pelas duas partículas serão dados por:

$$\text{partícula 1: } A \cos(2\nu t + \phi_1) \quad (4.3)$$

$$\text{partícula 2: } A \cos(2\nu t + \phi_2) \quad (4.4)$$

Onde A é a amplitude da onda espalhada, ν é a frequência e t , tempo.

Logo, o campo elétrico resultante em P será:

$$E = A \cos(2\nu t + \phi_1) + A \cos(2\nu t + \phi_2) \quad (4.5)$$

Reescrevendo 4.5, temos:

$$E = 2A \cos(1/2)(\phi_1 - \phi_2) \cos((2\nu t + \phi_1 + \phi_2)/2), \quad (4.6)$$

sendo que a amplitude da onda resultante em P é dada por:

$$2A \cos(1/2)(\phi_1 - \phi_2) \quad (4.7)$$

A intensidade é dada por:

$$i = 4A^2 \cos^2(\Delta\phi/2) \quad (4.8)$$

Reescrevendo (4.8), temos:

$$i = 2i(1 + \cos\Delta\phi) \quad (4.9)$$

A análise da Eq. (4.9) nos indica que a intensidade do espalhamento (i) depende da posição P , sendo que esta pode variar de 0 (diferença de fases de π , interação destrutiva) a $4i$ (diferença de fases de 2π , interação construtiva). Caso as unidades espalhadoras possam se mover aleatoriamente uma em relação à outra, todos os valores para ϕ serão igualmente prováveis. Logo, o valor médio de ϕ será zero e a intensidade média será de $2i$. Esta conclusão pode ser estendida para n espalhadores que possam se mover livremente em relação uns aos outros. Nesse caso, a intensidade do espalhamento total será a soma das intensidades de espalhamento de cada unidade espalhadora. Este é o espalhamento de um gás ideal (van Holde, 1971).

Para fases condensadas, temos uma situação diferente. Consideremos um cristal perfeitamente ordenado (Fig.4.2). Se o cristal for grande o suficiente e o comprimento de onda da radiação incidente for muito maior do que a distância interpartículas, para cada unidade espalhadora i , teremos uma outra unidade espalhadora j localizada de tal forma que as ondas espalhadas estejam defasadas por um múltiplo ímpar de π , exceto para a direção do feixe

Fig.4.2 - Espalhamento por um cristal perfeito. (van Holde, 1971).

incidente. Nessa direção, as ondas espalhadas estarão em fase.

Para um líquido puro ideal, a situação será semelhante. Consideremos que o líquido ideal seja dividido em n células (Fig. 4.3). Nessas células pode haver uma ou mais moléculas do líquido, mas consideremos que a célula toda seja responsável pelo espalhamento. Se todas as células forem iguais, não haverá espalhamento exceto na direção do feixe incidente. Para que ocorra espalhamento será necessário que essas células não sejam iguais, de forma que as intensidades de espalhamento sejam diferentes, e portanto mesmo que espalhem fora de fase, o espalhamento resultante será diferente de zero.

Para espalhamento de raios X, essa distinção das células é dada por diferenças de densidade eletrônica. Logo, para ocorrer o efeito de espalhamento de raios X é necessário haver um contraste de densidades eletrônicas na amostra estudada.

Fig.4.3 - Espalhamento por um líquido ideal. (van Holde, 1971).

4.1.2.2 - Espalhamento por partículas grandes

No caso de espalhamento de macromoléculas, as dimensões das partículas espalhadoras não são muito menores que o comprimento de onda da radiação incidente. Em geral, a partícula espalhadora apresentará dimensões maiores que o comprimento de onda da radiação incidente. Por exemplo, o comprimento de onda da radiação de $\text{Cu}\alpha$ (radiação de raios X comumente usada) é de $1,54 \text{ \AA}$, enquanto uma molécula de lisozima (uma proteína de pequenas dimensões) possui dimensões de $30 \times 30 \times 45 \text{ \AA}$.

Na Fig. 4.4 temos uma descrição do que ocorre quando uma partícula de grandes dimensões, quanto comparada à radiação incidente, é irradiada. A radiação incidente induz a formação de dipolos locais na molécula, cuja distância de separação é uma fração apreciável do comprimento de onda da radiação incidente. Como a distância entre essas unidades espalhadoras é fixa em relação uma à outra, não podemos considerar que o espalhamento seja produzido por partículas independentes. Logo, deve-se levar em conta a interferência entre a radiação espalhada por todos os pontos dentro da molécula.

As ondas espalhadas pela molécula só estarão em fase quando o ângulo de espalhamento (θ) (Fig.4.5) for igual zero. Para valores de θ maiores que zero, haverá uma progressiva diferença de fase entre as ondas espalhadas, o que causará uma diminuição progressiva da intensidade das ondas espalhadas. Logo, quando a partícula espalhadora tiver dimensões maiores que a radiação incidente, a intensidade do espalhamento decairá com o

Fig.4.4 - Espalhamento por uma partícula de dimensões maiores que o comprimento de onda da radiação incidente. (van Holde, 1971).

Fig.4.5 - Espalhamento por uma partícula de dimensões maiores que o comprimento de onda da radiação incidente (van Holde, 1971).

aumento do ângulo de espalhamento. Nessas condições, as curvas de espalhamento se limitam a uma faixa estreita na região de baixos ângulos.

4.1.2.2.1 - Leis de Guinier e Porod

A curva de espalhamento pode ser dividida em duas regiões. A baixos ângulos temos um decaimento exponencial. Este decaimento exponencial está relacionado com o tamanho da partícula espalhadora. Em 1939, Guinier (Guinier, 1939) derivou uma fórmula que descreve esse decaimento exponencial onde o único parâmetro é o raio de giro (R_g). O raio de giro é definido como o momento de inércia da partícula utilizando-se a densidade eletrônica da partícula ao invés da massa.

$$\text{Lei de Guinier} = I(q) = N_p n_e^2 \exp(-q^2((R_g^2)/3)) \quad (4.10)$$

onde,

$$q = (4\pi/\lambda) \sin\theta,$$

N_p , número de partículas espalhadoras

n_e , densidade eletrônica

R_g , raio de giro.

A ângulos maiores, o decaimento exponencial dá lugar a um decaimento que

segue uma lei de potências. Esse decaimento está relacionado com a superfície da partícula espalhadora.

Em 1951, Porod (Porod, 1951) derivou uma equação que descreve o decaimento para partículas com interfaces lisas bem definidas.

$$\text{Lei de Porod:} \quad I(q) = I_e 2\pi \rho^2 S / q^4 \quad (4.11)$$

onde,

S , área da esfera.

ρ , diferença de densidade eletrônica entre os domínios

I_e , uma constante.

Existem outras leis de potências descritas na literatura para diferentes tipos de sistemas (Beaucage, 1996).

4.1.2.2.2 - Interfaces difusas

Interfaces difusas são observadas em sistemas onde ocorre um gradiente de concentração na interface, por exemplo, sistemas onde haja partículas se dissolvendo. Esses sistemas podem ser descritos por uma lei de potências onde o expoente apresenta um desvio positivo em relação à lei de Porod (Porod, 1951).

4.1.2.2.3 - Sistemas fractais

Sistemas fractais são sistemas auto-similares, de baixa dimensionalidade, que não possuem superfícies lisas. Esses sistemas, em geral, são descritos por leis de potência onde a área é função da resolução da medição. Por exemplo, a extensão da costa de um continente será tão grande quanto maior a resolução da medida, pois serão medidas reentrâncias e saliências. Para superfícies lisas $S(r) = r^2$, para superfícies fractais $S(r) = r^{d_f}$, onde d_f é a dimensão fractal do sistema (Beaucage, 1995).

4.1.2.2.4 - Leis de potências dimensionais

Partículas podem ser descritas em termos de suas dimensões, por exemplo, um bastão é um estrutura de uma dimensão, um disco é bidimensional e uma esfera tridimensional. Essa dimensionalidade se reflete no decaimento da lei de potências (Glatter e Kratky, 1982).

4.1.2.2.5 - Curvas de interferência.

Como descrito anteriormente, quando um cristal é irradiado e a distância entre as partículas espalhadora é muito menor que o comprimento de onda da radiação incidente, não ocorre espalhamento. Mas quando a distância entre partículas é da ordem de grandeza do comprimento de onda da radiação incidente, haverá interferência construtiva entre as ondas espalhadas (Bragg, 1913).

Num cristal, esse fenômeno se manifesta na forma de picos finos nas curvas de espalhamento a ângulos definidos. A posição desses ângulos segue a Lei de Bragg:

$$\text{Lei de Bragg: } n\lambda = 2d \sin\theta \quad (4.12)$$

onde,

θ , ângulo de espalhamento,

d , distância entre os planos cristalinos,

λ , número inteiro qualquer.

Sistemas líquidos não apresentam a mesma rigidez e uniformidade de um sistema sólido, logo, os picos são mais largos e difusos do que em sistemas sólidos.

A presença desses picos, comumente chamados de picos de interferência, indica a presença de uma organização de longa distância, onde as distâncias envolvidas são da ordem de grandeza do comprimento de onda da radiação utilizada.

As curvas de espalhamento podem ser descritas como a superposição de uma curva formada pela combinação das leis de Guinier e de potências e pela adição do efeito de interferência.

4.2 - Reologia

Reologia é a ciência que estuda a deformação e o fluxo dos materiais (Macosko, 1994, Rohn, 1995). Constitue um ramo da Mecânica, em Física. O nome reologia foi proposto pelo Professor E. Bingham em 1920, se originou do grego rheos, que significa fluxo ou fluir. 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.

Em certos casos, através do estudo da resposta do material à tensão aplicada pode-se inferir a respeito de sua organização estrutural.

No contexto reológico, duas leis da Física são de grande importância:

- Lei de Hooke: que descreve o comportamento de um sólido puramente elástico.

$$F = -k \cdot x \quad (4.13)$$

onde,

F , força aplicada (N); k , constante de força do sistema ($\text{kg} \cdot \text{s}^{-2}$) e x , distância percorrida (m).

- Lei de Newton: que descreve o comportamento de um fluido viscoso (fluido newtoniano).

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} \quad (4.14)$$

onde,

η , viscosidade ($\text{Pa} \cdot \text{s}$), τ , tensão de cisalhamento (Pa), $\dot{\gamma}$, taxa de cisalhamento (s^{-1}).

Esses dois comportamentos descrevem os extremos de uma faixa de comportamento que materiais reais podem apresentar. Usualmente, o comportamento reológico pode ser representado por modelos mecânicos, onde o comportamento elástico é representado por uma mola, o comportamento viscoso por um amortecedor e o comportamento viscoelástico por uma combinação de molas e amortecedores (Fig. 4.6).

Um sólido elástico deforma-se instantaneamente sob a aplicação de uma tensão e retorna à sua forma original assim que a tensão é removida. Toda energia envolvida na deformação é liberada

Fig.4.6 - Representação mecânica dos comportamentos reológicos.

quando do retorno à forma original, como por exemplo, no caso da borracha.

Um fluido viscoso deforma-se enquanto estiver sob a aplicação de uma tensão e com o cessar da mesma a deformação cessa e o fluido não retorna à situação original. Neste caso costuma-se dizer que o material fluiu ao invés de se deformar. Toda energia envolvida no processo foi gasta na deformação do material. Um exemplo de fluido viscoso é a água.

Todos os materiais reais podem ser descritos por esses dois comportamentos ou por um situação intermediária entre eles. Materiais que possuem um comportamento intermediário são chamados de materiais viscoelásticos.

4.2.1 - Definições

Para uma melhor compreensão dos estudos reológicos, faz-se necessário conhecer alguns termos e grandezas comuns aos processos reológicos. Utilizaremos o modelo de duas placas paralelas para definir alguns dos parâmetros envolvidos. Esse modelo consiste em duas placas paralelas de área A , dispostas a uma distância h , com a amostra de análise preenchendo totalmente o volume entre as placas. Uma força F é aplicada a uma das placas. O deslocamento, v , dessa placa gera uma tensão de cisalhamento sobre a amostra. (Fig.4.7).

Fig. 4.7 - Esquema do modelo de placas paralelas.

As principais grandezas reológicas envolvidas estão definidas a seguir:

a) Deformação:

$$\gamma = \frac{v}{h} \quad (4.15)$$

onde,

γ , deformação,

v , deslocamento da placa (m),

h , distância entre as placas (m).

b) Tensão de cisalhamento:

$$\tau = \frac{F}{A} \quad (4.16)$$

onde:

τ , tensão de cisalhamento (Pa),

F , força aplicada (N),

A , área do material (m²).

c) Taxa de cisalhamento:

$$\dot{\gamma} = \frac{d\gamma}{dt} \quad (4.17)$$

$d\gamma/dt$, taxa de cisalhamento (s⁻¹),

γ , deformação,

t , tempo (s).

d) Viscosidade:

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} \quad (4.18)$$

que é a lei de Newton, onde:

η , viscosidade (Pa.s),

τ , tensão de cisalhamento (Pa),

dy/dt , taxa de cisalhamento (s^{-1}).

É usual encontrar-se a viscosidade expressa em Poise (P), embora esta não seja uma unidade do Sistema Internacional de medidas. Tem-se que $1cP = 1 \text{ mPa.s}$.

e) Módulo de Cisalhamento (Macosko, 1994):

Definido para sistemas puramente elásticos quando dentro da faixa não destrutiva.

$$G = \frac{\tau}{\gamma} \quad (4.19)$$

onde:

τ , tensão de cisalhamento (Pa),

γ , deformação (adimensional).

4.2.2 - Comportamentos Reológicos

O comportamento reológico dos materiais pode ser descrito através de suas curvas de fluxo. Uma curva de fluxo é um gráfico da tensão de cisalhamento pela taxa de cisalhamento ou da viscosidade pela taxa de cisalhamento.

Os comportamentos reológicos podem ser divididos em dois grupos: fluidos newtonianos e fluidos não-newtonianos.

Fluidos newtonianos seguem a lei de Newton, isto é, a razão da taxa de cisalhamento pela tensão de cisalhamento é constante, independentemente da duração ou magnitude do cisalhamento. Um comportamento típico desse último caso é exemplificado na Fig. 4.8.

Fluidos não-newtonianos não obedecem à lei de Newton, isto é, 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.4.8 - Exemplos de comportamentos reológicos para sistemas newtonianos e não newtonianos.

Fluidos não-newtonianos cujo comportamento depende da taxa aplicada podem ser classificados em (Fig. 4.8):

a) Fluidos plásticos – são fluidos que apresentam uma resistência inicial ao fluxo. Enquanto uma dada tensão limite não for atingida, o material não fluirá. Acima da tensão limite o material começará a fluir, podendo apresentar características de fluido newtoniano ou pseudoplástico. Abaixo da tensão limite, fluidos plásticos apresentam características de sólido elástico.

b) 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. Com o aumento da taxa de cisalhamento ocorre uma reorganização ou reorientação do sistema, levando a uma diminuição da resistência do material ao fluxo. A Fig 4.9 descreve alguns dos efeitos da tensão de cisalhamento sobre a estrutura dos sistemas. Em tensões muito baixas, antes do sistema começar a se reorganizar, e a tensões muito altas, após o sistema ter se reorganizado, o sistema poderá apresentar comportamento newtoniano (Fig. 4.8).

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

Fig.4.9- Esquemas de possíveis efeitos causados em sistemas pseudoplásticos sob uma dada tensão de cisalhamento.

Suspensões de cerâmica em altas concentrações 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 da taxa de cisalhamento. Esse efeito causa o aparente ressecamento desses materiais quando cisalhados, ex.: areia úmida que se torna firme e com aspecto seco quando pisada.

Fluidos não-newtonianos cujo comportamento depende da duração da aplicação da taxa de cisalhamento podem ser classificados em (Fig.4.10):

a) Fluidos tixotrópicos: são aqueles que apresentam uma diminuição da viscosidade aparente ao longo da aplicação de uma dada tensão no material. Fluidos tixotrópicos recuperam as suas características iniciais após um certo tempo de repouso, o qual depende do material.

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

Fig.4.10 - Exemplos de curvas de fluxo para sistemas tixotrópicos (a) e reopéxicos (b).

diminuição de viscosidade com uma aplicação de tensão 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 ao longo da aplicação de uma dada tensão. Fluidos reopéxicos também retornam a suas características iniciais quando deixados em repouso. Como no caso do comportamento tixotrópico, o comportamento reopéxico é totalmente reversível.

Deve-se ressaltar que um mesmo material pode apresentar comportamentos dependentes da taxa e do tempo simultaneamente.

Um mesmo material pode também apresentar comportamentos dependentes da taxa, que são distintos em função da faixa de tempo ou da taxa aplicada. Por exemplo, materiais pseudoplásticos podem apresentar comportamento newtoniano a taxas de cisalhamento muito baixas ou muito altas.

A velocidade da deformação é um fator determinante do comportamento reológico dos materiais. Sistemas deformados rapidamente tendem a se comportar mais elasticamente do que quando deformados mais lentamente, isto é, um mesmo sistema pode se comportar como um sólido elástico, um fluido viscoelástico ou um fluido newtoniano dependendo da velocidade de aplicação da tensão. Esse comportamento está refletido em um parâmetro, o número de Deborah (D_e):

$$D_e = \tau/T \quad (4.20)$$

onde: τ = tempo característico do material;

T = tempo de estímulo

4.2.3 - Dependência com a temperatura

A viscosidade é dependente da temperatura. Na maioria dos casos, a viscosidade decresce com o aumento da temperatura.

Para sistemas que apresentam comportamento newtoniano, a variação da viscosidade com a temperatura obedece à equação de Arrhenius. Nesse caso, pode-se determinar a energia de ativação de fluxo do fluido (Rohn, 1995).

$$\eta = Ae^{-\frac{E_a}{RT}} \quad (4.21)$$

onde:

A é uma constante específica do material,

E_a , energia de ativação,

R , constante universal dos gases,

T , temperatura absoluta (K).

4.2.4 - Tensão de escoamento aparente

Materiais que apresentam tensão de escoamento aparente são aqueles que abaixo de uma dada tensão se comportam como um sólido elástico e acima dessa dada tensão como fluidos viscosos ou viscoelásticos.

A tensão de escoamento aparente surge da interação interpartículas do sistema. O material tenderá a ter um comportamento elástico até que a tensão aplicada supere as forças envolvidas nas interações interpartículas.

A tensão de escoamento é denominada de aparente, pois esta é dependente de como o experimento é realizado, como por exemplo no que se refere aos seguintes aspectos:

Limites de detecção do aparelho: dada uma tensão suficiente, tudo fluirá. Caso o material não apresente uma tensão de escoamento detectável, pode ser que esta seja muito baixa ou muito alta para ser medida.

Duração do teste: testes muito curtos ou muito longos podem apresentar resultados diferentes. Em testes muito curtos o material pode não ter tempo de responder à tensão. Testes muito longos podem causar mudanças estruturais permanentes no material.

4.2.5 - Comportamento Viscoelástico

Materiais viscoelásticos apresentam simultaneamente comportamento de um sólido elástico e de um fluido newtoniano. A grande maioria dos materiais apresenta características viscoelásticas (Tadros, 1996).

A componente elástica de um sistema viscoelástico obedece à lei de Hooke, enquanto a

componente viscosa obedece à lei de Newton. Logo, um sistema que apresente comportamento viscoelástico pode ser descrito como uma combinação dos comportamentos elástico e viscoso.

4.2.5.1 - Modelo de Kelvin-Voigt

Usando o modelo de mola/amortecedor, o modelo de Kelvin-Voigt apresenta um sistema que emprega esses componentes em uma montagem em paralelo (Fig.4.11).

Fig.4.11 - Representação mecânica do modelo de Kelvin-Voigt

Quando aplicada uma tensão constante, o componente elástico não pode se deformar instantaneamente, pois o componente viscoso, representando por um 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. A componente elástica, representada 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 porém com um retardo.

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

$$\tau = \tau_v + \tau_e \quad (4.22)$$

E assumindo-se também que cada componente apresentará a mesma deformação:

$$\gamma = \gamma_v + \gamma_e \quad (4.23)$$

Temos que, para o componente viscoso:

$$\tau_v = \eta \frac{d\gamma}{dt} \quad (4.24)$$

e para o componente elástico:

$$\tau_e = G\gamma_e \quad (4.25)$$

Somando-se (4.24) e (4.25) temos que:

$$\tau = \eta \frac{d\gamma}{dt} + G\gamma_e \quad (4.26)$$

4.2.5.2 - Modelo de Maxwell

Em 1866, James C. Maxwell postulou o mais simples modelo de comportamento viscoelástico.

Uma maneira simples de se visualizar o modelo de Maxwell é considerar que a componente elástica pode ser representada por uma mola e o componente viscoso por um dispositivo amortecedor unidos em série (Fig. 4.12).

Fig.4.12 - Representação mecânica do 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 se re-deformará instantaneamente, enquanto o componente viscoso permanecerá deformada.

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

$$\gamma = \gamma_v + \gamma_e \quad (4.27)$$

onde,

γ , deformação

γ_v , deformação viscosa,

γ_e , deformação elástica.

Assumindo que a mesma tensão de cisalhamento atue sobre cada componente, temos que:

$$\tau = \tau_v = \tau_e \quad (4.28)$$

Aplicando a lei de Newton para o componente viscoso:

$$\eta = \frac{\tau_v}{\frac{d\gamma}{dt}} \quad \rightarrow \quad \frac{d\gamma}{dt} = \frac{\tau_v}{\eta} \quad (4.29)$$

Para o componente elástico,

$$G = \frac{\tau_e}{\gamma_e} \quad \rightarrow \quad \gamma_e = \frac{\tau_e}{G} \quad (\text{derivando em relação ao tempo}) \quad \frac{d\gamma_e}{dt} = \frac{1}{G} \frac{d\tau_e}{dt} \quad (4.30)$$

Reescrevendo (4.27) e substituindo (4.29) e (4.30) em (4.27), temos:

$$\frac{d\gamma}{dt} = \frac{\tau_v}{\eta} + \frac{1}{G} \frac{d\tau_e}{dt} \quad (4.31)$$

Sendo o tempo de relaxação (t_r):

$$t_r = \frac{\eta}{G} \quad (4.32)$$

Podemos reescrever (4.31):

$$\frac{d\gamma}{dt} = \frac{1}{t_r} \frac{\tau_v}{G} + \frac{1}{G} \frac{d\tau_e}{dt} \quad (4.33)$$

Integrando a Eq. (4.33) em termos de tensão e taxa, obtemos:

$$\tau(t) = \gamma G e^{(-t/t_r)} \quad (4.34)$$

Esse modelo considera apenas um tempo de relaxação, *i.e.*, o sistema é composto por apenas uma espécie. A maioria dos sistemas reais é formada por mais de uma componente, logo, haverá mais de um tempo de relaxação. Para esse fim, uma função de distribuição de tempos foi adicionada a (4.34):

$$\tau(t)\gamma = \int_0^{\infty} G(t)e^{-t/t_r} dt_r \quad (4.35)$$

4.2.6 - Testes estáticos

Testes estáticos são aqueles onde o sistema se encontra em regime de estado estacionário. Constituem testes estáticos os testes rotacionais.

4.2.7 - Testes transientes

4.2.7.1 - Testes de “creep”

Um dado material quando submetido a tensão constante poderá apresentar diferentes perfis de deformação. Um sólido elástico irá se deformar instantaneamente até um valor limite, proporcional à tensão aplicada, e permanecerá deformado até que a tensão cesse. Um líquido newtoniano irá se deformar enquanto estiver sob tensão e permanecerá deformado após cessar a aplicação da tensão. Um material viscoelástico apresentará uma combinação das duas situações descritas acima.

O teste de “creep” consiste na aplicação de uma tensão constante por um dado tempo e remoção da tensão após esse tempo. A deformação em função tempo é observada ao longo do experimento (Fig.4.13).

Quando a tensão é aplicada, o componente elástico do material se deforma instantaneamente até um certo limite, após o qual o material continuará se deformando enquanto a tensão for aplicada, o que constitui a contribuição do componente viscoso. Ao se remover a tensão haverá uma re-deformação devido ao componente elástico. Após a re-deformação, a curva permanecerá num patamar correspondente à não re-deformação do componente viscoso.

Fig.4.13 - Exemplo de um curvas de “creep” para (a) sólido elástico, (b) líquido newtoniano e (c) material viscoelástico.

O teste de “creep” nos permite determinar a razão relativa entre os componentes elásticos e viscosos do sistema.

4.2.7.2 - Testes de relaxação

O teste de relaxação consiste em aplicar uma deformação constante ao sistema e acompanhar a variação das tensões internas de cisalhamento do sistema, enquanto submetido a essa deformação, em função do tempo.

Dependendo do comportamento, teremos um perfil de curva diferente. 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. 4.14).

Fluidos simples de Maxwell decaem segundo uma exponencial simples, com a tensão de cisalhamento igual a zero a t_{∞} :

$$\frac{d\tau}{dt} = -k\tau \quad (4.36)$$

onde:

τ é o inverso do tempo de relaxação (t_r).

Essa equação considera que o sistema possui apenas um tempo de relaxação, o que corresponde a um sistema de Maxwell formado por um único elemento. Sistemas macromoleculares, em geral, são polidispersos, logo, o sistema terá vários tempos de relaxação. Embora proteínas, objeto de estudo deste trabalho, constituam sistemas macromoleculares tipicamente monodispersos, graus variáveis de polidispersividade podem ter lugar quando formas associadas ocorrem em sistemas complexos. Neste caso, deve-se somar a contribuição de cada elemento de Maxwell distinto representado na forma da somatória adicionada a Eq. (4.34):

$$G(t) = \sum_{i=1}^n G_i e^{-t/t_r} \quad (4.37)$$

Para sistema que possuam um número muito grande de espécies relaxando a tempos diferentes, a somatória em Eq. (4.37) deve ser substituída por uma integral:

$$G(t) = G_e + \int_{-\infty}^{+\infty} H e^{(-t/t_r)} d \ln t_r \quad (4.38)$$

onde,

G_e , o valor de equilíbrio de G a t_{∞}

H , o espectro de relaxação.

Fig.4.14 - Curvas de relaxamento para sólidos elásticos (a), fluidos newtonianos (b) e materiais viscoelásticos (c).

4.2.8 - Testes dinâmicos

Nesses experimentos, uma tensão de cisalhamento ou deformação com amplitude senoidal a uma frequência f (Hz) ou frequência angular ω (rad.s⁻¹) é aplicada ao sistema e a resposta do sistema é acompanhada simultaneamente.

Quando uma amplitude de tensão (τ_0) é aplicada a um sistema, uma resposta senoidal com amplitude de deformação (γ_0) é obtida com a mesma frequência e com uma diferença de fase δ . A diferença de fase (δ) é definida como o produto da diferença de fase entre as duas ondas pela frequência das mesmas (Fig. 4.15 e 4.16).

Para um sistema perfeitamente elástico, o sistema apresenta um máximo de deformação simultaneamente com um máximo de tensão, sem diferença de fase entre a deformação e a tensão. Para um sistema perfeitamente viscoso, o máximo de tensão ocorre junto a um máximo da taxa de cisalhamento, gerando uma diferença de fase, de $\pi/2$, entre a deformação e a tensão. Sistemas viscoelásticos apresentam um comportamento intermediário.

Experimentos dinâmicos, em geral, são expressos em função do módulo complexo ($|G^*|$), definido por:

$$|G^*| = \frac{\tau_0}{\gamma_0} \quad (4.39)$$

O módulo complexo pode ser separado em dois componentes, o módulo de armazenagem (G'), a parte real do módulo complexo, e o módulo de perda (G''), a parte imaginária do módulo complexo.

$$|G^*| = G' + iG'' \quad (4.40)$$

Em termos da diferença de fase (δ):

$$G' = |G^*| \cos \delta \quad (4.41)$$

$$G'' = |G^*| \sin \delta \quad (4.42)$$

O módulo de armazenagem fornece uma medida da energia armazenada elasticamente no sistema por ciclo enquanto o módulo de perda fornece uma medida da energia dissipada pelo sistema.

Fig. 4.15 - Modelo de placas em um experimento oscilatório para um sólido elástico

Fig. 4.16 - Modelo de placas em um experimento oscilatório para um líquido newtoniano

A razão entre G' e G'' é definida por:

$$\operatorname{tg} \delta = \frac{G''}{G'} \quad (4.43)$$

conhecida por ângulo de perda ou fator de amortecimento.

4.2.8.1 - Dependência com a amplitude de deformação

A dependência do módulo complexo com a variação da amplitude de deformação permite definir a região linear viscoelástica. Enquanto o módulo permanecer independente da tensão aplicada, o sistema estará na região viscoelástica linear. As equações descritas nesse trabalho só são válidas enquanto o sistema permanecer dentro dessa região.

A região linear viscoelástica corresponde à região na qual o sistema mantém sua estrutura original preservada.

4.2.8.2 - Dependência com a frequência

4.2.8.2.1 - Sistemas monodispersos

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):

$$G'(\omega) = G_1 \left(\frac{\omega^2 t_r^2}{1 + \omega^2 t_r^2} \right) \quad (4.44)$$

$$G''(\omega) = G_1 \left(\frac{\omega t_r}{1 + \omega^2 t_r^2} \right) \quad (4.45)$$

onde,

G_1 , valor de G no patamar,

t_r , tempo de relaxação,

ω , frequência angular,

Como foi dito anteriormente, as características viscoelásticas são dependentes da velocidade com que o estímulo é aplicado. Em testes oscilatórios, essa velocidade é representada pela frequência do estímulo aplicado. Para valores limites de frequência, as relações abaixo são aplicáveis. Deve-se notar que para o limite de alta frequência, o material se comporta como um sólido elástico, em que o módulo de perda é igual a zero. Para o limite de baixa frequência o sistema se comporta como um fluido viscoso, no qual o módulo de armazenagem é igual a zero.

$$\lim_{\omega \rightarrow 0} G' = 0 \text{ Pa} \quad (4.46)$$

$$\lim_{\omega \rightarrow \infty} G' = G_1 \quad (4.47)$$

$$\lim_{\omega \rightarrow \infty} G'' = 0 \text{ Pa} \quad (4.48)$$

As seguintes relações podem ser determinadas graficamente:

$$\lim_{\omega \rightarrow 0} \frac{G''}{\omega} = \eta_0 \quad (4.49)$$

onde,

η_0 , é a viscosidade atribuída à componente viscosa do sistema.

$$\lim_{\omega \rightarrow 0} \frac{G'}{(G'')^2} = \frac{1}{G_0} \quad (4.50)$$

onde,

G_0 , é o módulo de cisalhamento do estado estacionário, que está relacionado ao módulo de cisalhamento da componente elástica.

$$\lim_{\omega \rightarrow 0} \frac{G'}{\omega G''} = t_r \quad (4.51)$$

onde,

t_r é o tempo de relaxação.

4.2.8.2.2 - Sistemas polidispersos

Para sistemas polidispersos a resposta de G' e G'' em função da frequência apresenta uma resposta diferente. Moléculas grandes tendem a se emaranhar umas às outras, criando obstáculos temporários ao seu movimento. A frequências baixas, há tempo suficiente para as moléculas grandes se moverem, criando uma certa fluidez. A valores médios de frequência, as moléculas grandes já não possuem tempo suficiente para se mover, formando assim uma rede estática, o que dá ao sistema uma característica quase elástica. Essa região é comumente chamada de região elástica. A valores maiores de frequência, moléculas menores, de maior mobilidade, causam um aumento na fluidez do sistema. A valores de frequência ainda mais altos, cessa toda a fluidez do sistema. Caso a frequência aumente ainda mais, pode haver a destruição da estrutura do sistema (Rohn, 1995).

Esse tipo de comportamento acima descrito só se observa para sistemas formados por partículas com tamanhos bem distintos. Para sistemas onde ocorra uma grande distribuição de massas, a região elástica pode não ser visível, pois ocorrerá a sobreposição de diversas regiões elásticas.

Dessa maneira, pode-se utilizar a dependência do módulo complexo com a frequência para se estudar a polidispersividade dos sistemas.

4.2.8.3 - Curva Mestra

A dependência do módulo complexo com a frequência se estende por muitas ordens de grandeza, tornando inviável a realização de uma varredura em toda a extensão de frequência necessária, ou por limitação física do aparelho, em casos de frequências muito altas, ou no caso de frequências muito baixas, pela simples inadequação do registro de medidas em tempos excessivamente longos para certas amostras.

Caso o sistema em estudo obedeça ao princípio de superposição de temperatura (Graessly, 1993), uma mudança nessa variável causará um deslocamento das funções viscoelásticas ao longo da escala de frequência e módulo sem causar mudanças no sistema.

$$G'(\omega, T) = \frac{G'(\omega a_T, T_0)}{b_T} \quad (4.52)$$

$$G''(\omega, T) = \frac{G''(\omega a_T, T_0)}{b_T} \quad (4.53)$$

onde:

T_0 , temperatura de referência,

$a_T b_T$ razões empíricas de rescalonamento da frequência e do módulo para a temperatura T , sendo que $a_T = b_T = 1$ a T_0 .

O aumento da temperatura desloca as curvas para valores de frequências maiores, enquanto a diminuição da temperatura desloca a curva para valores menores de frequência.

Dessa maneira, pode-se montar uma curva mestra através da superposição de várias curvas a temperaturas diferentes.

5 - Parte Experimental

5.1 - Materiais e preparação das amostras

Citocromo-c e lisozima foram obtidos da Sigma e da Pharmacia, respectivamente, e utilizados sem tratamento adicional.

Tetrametiluréia (TMU), monometiluréia (MMU) e monoetiluréia (MEU) foram obtidos da K & K Laboratories, Inc.; 1,1-dietiluréia, 1,3-dietiluréia, 1,1-dimetiluréia e 1,3-dimetiluréia foram obtidos da Sigma e armazenados em condições apropriadas. As amostras de proteína foram armazenadas em dessecador sob refrigeração, a -20°C.

Água deionizada (18 Mohm.cm) de alta pureza foi utilizada na preparação de todas as soluções.

As amostras de derivados de uréia/água foram preparadas adicionando volumes de derivados de uréia e água correspondentes aos valores de fração de massa (w) desejadas.

As amostras de TMU/água/proteína foram preparadas a partir da cuidadosa dispersão da proteína em água. Após completa solubilização da proteína, adicionou-se TMU a fim de atingir as composições de interesse das misturas binárias.

5.2 - Metodologias experimentais e de análise

5.2.1 - Calorimetria

As entalpias molares parciais de excesso da TMU em água foram determinadas por titulação calorimétrica a 298,15 K, medindo-se as entalpias envolvidas na dissolução de 5,0 μL

de TMU puro em soluções de 18,0 mL TMU/água com w_{TMU} variando de 0 a 1, em intervalos de 0,1, num calorímetro isotérmico Thermometric 2277.

A escolha dos volumes adicionados de TMU (5,0 μL) e do volume usado na cubeta (18,0 mL) foi feita de maneira a garantir que a condição de diluição infinita fosse atingida, *i.e.*, que o volume de TMU adicionado não causasse alterações mensuráveis na concentração da solução na cubeta. Na Fig.6.2 podemos verificar que a situação de diluição infinita foi atingida. Caso a situação não fosse de diluição infinita, a cada nova adição as entalpias envolvidas seriam progressivamente menores.

A área de cada pico corresponde à quantidade de calor envolvida na dissolução, em mJ. Essas áreas foram calculadas pelo programa Digitam da Thermometric, programa que opera o calorímetro.

Cada valor de entalpia calculado corresponde à média aritmética de pelo menos cinco medidas a cada concentração.

5.2.2 - Espectroscopia vibracional Raman

Foram obtidos espectros em geometria VV e VH para os sistemas de derivados de uréia/água em função de w_{derivado} variando de 0 ao limite de solubilidade do derivado em água (1 para TMU), em intervalos de 0,1. Os derivados de uréia utilizados foram: monometiluréia, monoetiluréia, 1,1-dimetiluréia, 1,3-dimetiluréia, 1,1-dietiluréia, 1,3-dietiluréia e tetrametiluréia.

O conjunto de espectros obtido foi analisado. Acompanhou-se o comportamento das bandas presentes, visando identificar quais foram sensíveis à mudança de concentração do componente orgânico. Buscou-se determinar quais bandas apresentavam efeito de não coincidência (ENC) e quais reuniam condições para poder-se acompanhar as razões de depolarização.

Para o sistema TMU/água acompanhou-se o efeito da temperatura.

Os espectros foram obtidos em espectrômetro Jobin-Yvon e Renishaw equipados com diversos tipos de lasers no visível. Em ambos os aparelhos todas as medidas foram realizadas em temperatura controlada através de circulação de água de banho externo termostatizado. Os espectros foram registrados de 400 cm^{-1} a 1800 cm^{-1} . Espectros em geometria VV e VH foram colhidos em ambos os aparelhos.

No espectrômetro Jobin Yvon trabalhou-se em uma faixa de temperatura de 5°C a 50°C em intervalos de 5°C (até 30°C) e de 10°C (de 30°C em diante). Utilizou-se um laser de íons Ar^+ , com potência nominal de 500 mW, fenda espectral de 1,5 cm^{-1} e comprimento de onda de 514 nm. Esse aparelho utiliza uma fotomultiplicadora como detector.

No espectrômetro Renishaw trabalhou-se na faixa de temperatura de 20°C a 41°C em intervalos de 3°C, com potência nominal do laser a 1,5 mW. O espectrômetro possui um microscópio acoplado ao sistema, de modo que o feixe do laser é focalizado sobre a amostra, expondo portanto a amostra a uma “potência” maior do que a nominal. O Renishaw usa um CCD para aquisição dos dados. A linha utilizada foi a de 632 nm de um laser de He-Ne. O uso desse comprimento de onda se deve ao fato de que, neste aparelho, o laser de He-Ne possui a maior potência operacional.

A atribuição das frequências vibracionais foi feita por comparação com dados da literatura (Colthup *et al.*, 1990, Lin-Vien *et al.*, 1991).

5.2.3 Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)

Curvas SAXS foram coletadas para os quatro grupos de sistemas com proteínas descritos abaixo:

- Lisozima em água a concentrações de 0,25 mMol/L, 0,50 mMol/L, 1,0 mMol/L, 3,0 mMol/L e 5,0 mMol/L de proteína.
- Lisozima/TMU/água em concentrações de $w_{\text{TMU}}=0,6$; 0,7; 0,8 e 0,9, com concentração de lisozima fixa em 5,0 mMol/L.
- Citocromo-c/lisozima/TMU/água em concentrações de $w_{\text{TMU}}=0,6$; 0,7; 0,8 e 0,9, com concentração de lisozima fixa em 5,0 mMol/L e citocromo-c em 1,0 mMol/L.
- Citocromo-c/lisozima/TMU/água em concentração de $w_{\text{TMU}}=0,8$, com concentração de lisozima fixa em 5,0 mMol/L e citocromo-c em concentrações de 0,06 mMol/L, 0,12 mMol/L, 0,60 mMol/L, 0,90 mMol/L e 1,2 mMol/L.

As curvas foram coletadas à temperatura ambiente (22°C). As celas utilizadas consistiam de um suporte de acrílico com paredes de mylar (5 μm de espessura), de volume aproximado de 40 μL . O comprimento da radiação utilizada foi de 1,608 Å. O tempo de

acumulação utilizado foi de quinze minutos. Foram aplicadas correções para espalhamento parasítico, intensidade do feixe (que decai com o tempo) e homogeneidade do detector. Utilizaram-se soluções de água/TMU como branco, embora pudesse ser utilizada apenas água, pois as soluções de água/TMU não oferecem contraste discernível por SAXS. As curvas foram obtidas na linha de SAXS do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, em Campinas.

Os experimentos com sistemas lisozima em água foram usados como controle e como fator de comparação com dados da literatura (Minezaki *et al.*, 1996), visando aferir a qualidade da coleta de dados. Os resultados obtidos foram utilizados como referência no trabalho de modelagem.

Para os sistemas proteína/TMU/água a $w_{TMU}=0,9$ utilizou-se o programa GNOM para gerar curvas de distribuição de distâncias. Para esses sistemas foram também geradas curvas de Kratky ($I(q)^2$ versus q).

Os sistemas proteína/TMU/água foram analisados via dois modelos, descritos nos itens a seguir.

5.2.3.1 - Modelo unificado de Beaucage

O modelo unificado de Beaucage (Beaucage, 1995; Beaucage, 1996) consiste da unificação da lei de Guinier e da lei de potências em uma única equação de forma ($P(q)$). Deste modo, esse modelo fornece informações sobre as características de forma e de superfície da partícula espalhadora. O modelo, na forma em que é apresentado, pode ser utilizado em sistemas formados por estruturas discretas distribuídas aleatoriamente em um meio contínuo, com apenas uma única distância presente. Para sistemas onde exista mais de uma distância, mais de uma partícula espalhadora ou uma mesma partícula espalhadora mas que possua diferentes níveis estruturais a diferentes escalas dimensionais, devem-se adicionar funções de forma referentes a cada nível estrutural ou partícula, conforme descrito na literatura (Beaucage, 1996):

$$P(q) \approx Ge^{\frac{-q^2 R_g^2}{3}} + B \left[\frac{(\text{erf}(q \frac{R_g}{\sqrt{6}}))^3}{q} \right]^4 \quad (5.1)$$

onde:

G , pré-fator de Guinier, proporcional a $n_p V^2 \Delta \rho^2$

R_g , raio de giro,

B , pré-fator específico para cada regime da lei potência,
no caso de $A < 3$,

$$B = \left(\frac{GA}{R_g^A}\right) \Gamma\left(\frac{A}{2}\right) \quad (5.2)$$

A , natureza da superfície da unidade espalhadora, onde,

$A > 4$, interface difusa,

$A = 4$, interface rígida.

$3 < A < 4$, fractal de superfície,

$A < 3$, fractal de volume,

$A = 2$, polímero gaussiano.

Para os sistemas que apresentaram pico de interferência adicionou-se um termo semi-empírico referente à função de interferência ($S(q)$).

$$S(q) = \frac{1}{1 + k\varphi(qd)} \quad (5.3)$$

onde,

d , distância média entre as unidades espalhadoras,

$\varphi(qd)$ é o fator de forma esférica para correlações estruturais ocorrendo a uma distância média, d , e com um grau de correlação k ($0 < k < 6$). É matematicamente descrito por:

$$\varphi(qd) = 3 \frac{(\sin(qd) - qd \cos(qd))}{(qd)^3} \quad (5.4)$$

5.2.3.2 - Modelo bicontínuo

O modelo bi-contínuo considera o sistema formado por duas fases contínuas emaranhadas. Esse modelo fornece informações sobre a distância média interdomínios entre dois domínios do mesmo componente e a polidispersividade do tamanho dos domínios (Chen *et al.*, 1991 e 1993). De acordo com esse modelo, a intensidade de espalhamento $I(q)$ é dada por:

$$I(q) = \frac{8\pi/\xi}{[(s^2 + \frac{1}{\xi^2})^2 - 2(s^2 - \frac{1}{\xi^2})q^2 + q^4]} \quad (5.4)$$

onde:

ξ , fator de correlação,

$s=2\pi/d$, onde d é distância entre dois domínios da mesma espécie.

5.2.4 - Ensaios Reológicos

Sistemas lisozima/TMU/água com w_{TMU} variando de 0 a 0,9, em intervalos de 0,1, foram estudados reologicamente.

Para os sistemas com $w_{TMU} < 0,5$, os quais apresentam comportamento newtoniano em tempos curtos após a dispersão da proteína no meio orgânico-aquoso, curvas de fluxo a várias temperaturas foram determinadas.

As curvas de fluxo foram medidas a temperaturas de 5 °C a 25 °C, com 5 °C de intervalo. A taxa de cisalhamento variou de 1000 s⁻¹ a 3000 s⁻¹. Foram medidos 50 pontos dentre desse intervalo, com tempo de aquisição de 3 s.

Os sistemas com w_{TMU} entre 0,4 e 0,5 evoluem para sistemas pseudoplásticos em um intervalo de tempo não muito longo, na ordem de horas, embora não se estruturam na forma de gel. Curvas de fluxo desses sistemas foram novamente coletados após 16 dias a fim de se verificar a eventual formação de gel, o que não foi observado.

Das curvas de fluxo resultantes calculou-se o valor médio da viscosidade para cada

temperatura. Com esses dados, traçou-se um gráfico da variação de $\ln \eta$ com o inverso da temperatura, determinando-se a partir da inclinação das retas obtidas os valores das energias de ativação de fluxo.

Para os sistemas com $w_{TMU} > 0,6$, sistemas com comportamento viscoelástico, foi realizada uma série de testes.

As características reológicas desses sistemas variam com tempo. Quando não especificado em contrário, todos os experimentos foram realizados após 31 dias da preparação da amostra.

Utilizaram-se nos testes de “creep” tensões de cisalhamento que causassem deformações dentro da faixa de linearidade do sistema. Em geral, procurou-se manter as deformações dentro do limite de $\gamma = 8\%$, onde $\gamma_{max} = 16\%$.

Nos testes de relaxação utilizou-se $\gamma = 5\%$ para todos os sistemas e acompanhou-se a evolução das curvas até que se obtivesse um número suficiente de pontos.

Varreduras de amplitude, com a amplitude de deformação variando de 0,1 a 1000% e frequência mantida constante em 5 Hz, foram realizadas e a região viscoelástica linear foi determinada para cada sistema através de recursos incorporados ao próprio programa de aquisição de dados do aparelho.

Varreduras de frequência de 0,1 a 40 Hz com amplitude de deformação constante a 5% e a temperaturas de 5 °C a 25 °C, com intervalo de 5 °C, foram realizadas visando-se construir uma curva mestra da variação do módulo complexo com a frequência.

Os testes reológicos foram realizados em um reômetro MCR 300 da Paar Physica, equipado com um sistema cone-placa de 25 mm de raio e ângulo de 1°. A temperatura do sistema foi controlada com precisão superior a 0,05 °C através de um sistema Peltier. Parte do tratamento de dados foi realizada através do programa US200 v2.1, programa que opera o reômetro. O restante do tratamento foi feito no programa Origin da Microcal.

6 - Resultados e Discussão

6.1 - Calorimetria

O evento de formação das redes viscoelásticas de lisozima é uma exteriorização de mudanças na estruturação do sistema binário ao longo de sua faixa de concentração. Com o intuito de se investigar essas mudanças, acompanhou-se a variação das energias de diluição do TMU puro em soluções TMU/água na faixa de concentração de $w_{\text{TMU}}=0$ a $w_{\text{TMU}}=1,0$.

Os dados obtidos através da titulação calorimétrica do sistema TMU/água são apresentados na Fig. 6.1. Podemos constatar a presença de três regiões ao longo da faixa de concentração de TMU, uma em $0,0 < w_{\text{TMU}} < 0,3$, outra em $0,3 < w_{\text{TMU}} < 0,5$, e uma terceira de $0,5 < w_{\text{TMU}}=1,0$. Como poderá ser visto na discussão abaixo, atribuímos a ocorrência dessas regiões à existência de três ambientes distintos aos quais as moléculas de TMU estão expostas.

O primeiro ambiente engloba a região de baixo conteúdo de TMU, até $w_{\text{TMU}} = 0,2$, onde se supõe ocorra a formação de espécies diméricas TMU-TMU. A curva nessa região mostra suave inclinação descendente. A sugestão de ocorrência de dímeros nessa região encontra sustentação em trabalhos da literatura, tanto experimentais quanto teóricos, que apontam a ocorrência dessas associações para o sistema TMU/água nessa mesma faixa de composição da mistura binária (Cser, 1995; Bezzabotnov *et al.*, 1992 e Belletato *et al.*, 1999).

Na segunda região, que se estende de $w_{\text{TMU}} > 0,2$ até $w_{\text{TMU}} = 0,5$, é razoável supor-se que se verifique o crescimento desses microdomínios orgânicos a partir dos agregados diméricos que vinham se formando desde a fase anterior, até o limite de composição da mistura solvente em $w_{\text{TMU}} = 0,5$. Tais microdomínios orgânicos estariam organizados como formações dispersas em um meio aquoso contínuo, prevalente nessa faixa de composição da mistura solvente.

Fig.6.1 - Entalpias molares parciais de excesso de diluição de TMU em sistemas TMU/água em função da composição dos sistemas binários.

Fig.6.2 - Resultados calorimétricos da adição de TMU em água pura, sob condições de diluição infinita.

O próximo ponto da curva, em $w_{\text{TMU}} = 0,6$, mostra uma intrigante descontinuidade no comportamento do sistema. A partir daí, no entanto, a curva segue um perfil descendente monotônico. Essa descontinuidade indicaria o ponto de ocorrência de uma inversão dos microdomínios polares/apolares. Essa inversão consistiria do colapso dos microdomínios de TMU, resultando na formação de um contínuo apolar, e na segregação da água em microdomínios polares.

Caso a diluição de TMU em água envolvesse apenas uma distribuição aleatória no meio, sem apresentar nenhuma organização preferencial, obteríamos valores monotonicamente decrescentes de entalpia de excesso com o aumento da concentração de TMU.

Os dados experimentais que geraram a curva da Fig. 6.1 estão apresentados na Fig 6.2, para uma das composições do solvente. Pode-se observar a adequação do procedimento experimental adotado, através da observação do perfil da curva obtida ao longo das microtitulações efetuadas.

6.2 - Espectroscopia vibracional Raman

A técnica de espectroscopia vibracional Raman nos permitiu investigar os sistemas utilizando como sondas regiões da própria molécula de TMU. Desta forma, foi possível investigar-se o comportamento com um mínimo de perturbação. Utilizando-se de modos vibracionais correspondente a regiões hidrofóbicas e hidrofílicas da molécula foi possível inferir sobre como a mudança na organização dessas regiões pode influir na estruturação de proteínas e disparar o fenômeno de formação das redes observado.

6.2.1 - Comportamento espectral do sistema TMU/água

O conjunto de espectros e dados espectrais obtidos para o sistema TMU/água e para as misturas binárias aquosas contendo os demais derivados de uréia em suas diversas composições é apresentado nas figuras constantes deste sub-item e discutido a seguir.

Para o sistema TMU/água, a análise das bandas vibracionais atribuídas aos modos vibracionais δCNC (Fig.6.3), $\nu_s\text{CNC}$ (fig. 6.4), νCN (Fig. 6.5), νCH (Fig. 6.6) indica a presença de três ambientes distintos percebidos pela molécula de TMU. Os limites superiores de tais ambientes, em termos das composições das misturas binárias, são $W_{\text{TMU}}=0,3$ e $W_{\text{TMU}}=0,6$, com pequenas variações observadas entre os modos analisados.

Verifica-se que os modos vibracionais referentes a grupos com características apolares na molécula apresentam um deslocamento para números de onda menores com o aumento da concentração de TMU. Atribui-se essa variação à diminuição na densidade de empacotamento da fase apolar, resultante da menor influência da água nas regiões de alto conteúdo de TMU. É conhecido que espécies em fases menos condensadas tem suas frequências vibracionais desviadas para valores mais baixos de número de onda, em razão da diminuição da ordem de ligação.

O modo amida I (Fig.6.7), predominantemente $\nu\text{C=O}$, apresenta um comportamento inverso, sofrendo deslocamentos para números de ondas maiores com o aumento da concentração de TMU. Uma análise cuidadosa da banda amida I permite identificar a presença de um único componente a $w_{\text{TMU}}=0,1$. À medida em que se aumenta a concentração de TMU, pode-se notar o aparecimento de um segundo componente, o qual atinge a mesma intensidade a $w_{\text{TMU}}=0,6$. A

Fig. 6.3 - Variação do número de onda para a banda correspondente ao modo δCNC .

Fig. 6.4 - Variação do número de onda para a banda correspondente ao modo $\nu_s CNC$.

partir desse ponto, o primeiro componente perde intensidade até desaparecer em $w_{\text{TMU}}=1,0$.

A análise dos espectros em função da temperatura para esses sistemas não revelou nenhuma dependência do sistema com a temperatura na faixa estudada (de 5°C a 50°C).

Os espectros obtidos para os demais derivados de uréia não apresentaram as mesmas características dos sistemas TMU/água no que diz respeito à sua sensibilidade em relação às mudanças de concentração das misturas-solvente (Fig. 6.10 a Fig. 6.14). Vale lembrar, no entanto, que nem todos os derivados de uréia ensaiados apresentam grande solubilidade em água (Tabela 6.1).

Em trabalhos realizados por outros grupos (Cser *et al.*, 1989; Cser *et al.*, 1992; Cser, 1995; Jancsó, *et al.* 1994), foi verificado que em soluções diluídas de TMU ocorrem mudanças estruturais com o aumento da concentração, caracterizadas pela formação de dímeros de contato em detrimento a dímeros separados por duas moléculas de solvente. Esses experimentos foram realizados em concentrações relativamente baixas (0,05-0,1 mol/L), concentrações estas que não chegam próximas à primeira inflexão de nossas curvas espectroscópicas. Extrapolando essa tendência de reorganização estrutural, podemos supor que essas mudanças levariam a um aumento da população desses dímeros até uma região em que sua concentração force uma nova reestruturação, quebrando a tendência até então seguida. Postulamos que esta nova

Fig.6.5 - Variação do número de onda para a banda correspondente ao modo ν_{CN} .

Fig.6.6 - Variação do número de onda para a banda correspondente ao modo ν_{CH} .

Fig.6.7 - Região amida I dos espectros Raman polarizados em função da fração de massa do componente orgânico na mistura binária.

forma de organização consistiria em microdomínios de TMU, criando pequenos ambientes apolares no contínuo aquoso. Esse ambiente rico em microdomínios orgânicos dispersos perduraria até $w_{\text{TMU}} = 0,6$, onde ocorreria uma inversão de domínios, com o colapso dos microdomínios de TMU e subsequente formação de um contínuo apolar com segregação das moléculas de água no meio de TMU.

Esse comportamento, revelado pelos dados espectroscópicos, mostra-se coerente com o comportamento termodinâmico observado para esses mesmos sistemas, em termos de suas entalpias de excesso de mistura, conforme discutido no item anterior. É importante ressaltar que essa segregação de microambientes no meio líquido não leva a separação macroscópica de fases: o sistema TMU/água é mutuamente solúvel em quaisquer proporções. Os demais sistemas, embora não apresentem essa mesma característica, foram apenas ensaiados nas regiões em que sua solubilidade era completa.

A atribuição da inversão de domínios na mistura binária TMU/água ao ambiente microconfiguracional em $w_{\text{TMU}} = 0,6$ encontra sustentação em uma observação peculiar: quando lisozima é acrescentada a sistemas TMU/água em regiões de $w_{\text{TMU}} > 0,6$, formam-se sistemas de fluxo altamente restrito e de caráter viscoelástico, como apresentado e discutido adiante neste trabalho. Acreditamos que a formação dessas redes se deva à exposição da proteína a esse ambiente especial, que levaria a um extensivo desenovelamento da lisozima. Esse desenovelamento possibilitaria a formação de redes trimensionais transientes de lisozima, a partir da interação entre moléculas vizinhas de lisozima, conformacionalmente modificadas pela transição do solvente.

Dos derivados de uréia estudados apenas a 1,1-dietiluréia foi capaz de deflagrar a formação das redes de lisozima, embora com uma cinética de formação significativamente mais lenta que o sistema TMU/água. A $w_{\text{TMU}}=0,8$, o sistema evolue para a formação de redes em aproximadamente 2 horas, enquanto a mesma proteína no sistema 1,1-dietiluréia/água em concentração equivalente requer de seis a sete dias para atingir essa mesma condição.

6.2.1.1 - Razões de depolarização e efeitos de não coincidência

A variação observada nas razões de depolarização (ρ) para a banda em ca. 740 cm^{-1} ($\nu_s\text{CNC}$) em função de w_{TMU} (Fig. 6.8) mostra o agrupamento de duas populações em regiões distintas de fração de massa. Esses dois grupos de valores se segregam em torno de $w_{\text{TMU}} = 0,55$. Para composições do solvente acima de $w_{\text{TMU}} = 0,6$, ρ apresenta valores mais baixos, indicando uma menor contribuição de termos não diagonais da matriz de polarizabilidade, o que indica a maior contribuição relativa de geometrias menos elipsoidais, mais esféricas em solução. Embora o efeito da temperatura seja menos evidente, percebe-se uma tendência, nas duas regiões, de diminuição em ρ pelo aumento da temperatura, o que é compatível com um aumento relativo do caráter isotrópico do meio, decorrente da maior mobilidade molecular a temperaturas mais altas.

Efeitos de não coincidência, indicativos de ordem local, foram medidos para a banda a ca. 740 cm^{-1} ($\nu_s\text{CNC}$) como função da concentração (Fig. 6.9). Esse efeito é resultante da transferência de energia ressonante pelo mecanismo de acoplamento de dipolos de transição quando o alinhamento das moléculas não é aleatório (Logan, 1986). Nos sistemas estudados, o efeito de não coincidência mostrou-se presente para o modo vibracional analisado, embora a magnitude das variações tenha sido pequena. Apesar das diferenças serem sutis, o perfil observado é muito intrigante: nota-se que para uma região central de composição do solvente os valores de ENC apresentam valores em torno de zero, enquanto na região de baixo w_{TMU} , os resultados são francamente negativos e em alto w_{TMU} , situam-se na região de desvios positivos para o efeito. É interessante notar que a magnitude dos desvios negativos e positivos para as duas regiões nos extremos de composição do sistema TMU/água é semelhante, com máximos de variação em $-0,7$ e $+0,7$. Tal comportamento sugere e reforça a visão de uma possível reversão de microdomínios no meio líquido. A tendência de desvios para valores negativos tem sido atribuída a efeitos de ligações de hidrogênio (Torii, 1999). Em nosso caso, tais ligações são prevalentes na região de contínuo hidrofílico em regiões de baixo w_{TMU} , onde efeitos de não coincidência negativos foram de fato observados (Fig. 6.9).

As larguras a meia-altura das bandas polarizadas e depolarizadas (não

Fig. 6.8 - Razão de depolarização ρ da banda ν_s CNC a várias temperaturas, em função da fração de massa do componente orgânico na mistura binária.

Fig. 6.9 - Efeito de não coincidência da banda a 740 cm^{-1} em função da fração de massa de TMU na mistura binária.

mostradas) correspondentes a esse modo vibracional apresentaram ligeira tendência de diminuição com o aumento de w_{TMU} . Também aqui, a dependência com a temperatura mostrou-se pouco significativa.

6.2.2 - Demais derivados de uréia

Além da TMU, estudou-se a capacidade de outros derivados de uréia de induzir a formação de redes de lisozima. Os derivados estudados foram: monometiluréia (MMU), 1,1-dimetiluréia (1,1-DMU), 1,3-dimetiluréia (1,3-DMU), monoetiluréia (MEU), 1,1-dietiluréia (1,1-DEU) e 1,3-dietiluréia (1,3-DEU).

Procurou-se examinar a dependência da capacidade formadora das redes com o grau de substituição dos derivados e com sua geometria.

Devido a diferenças na solubilidade dos diversos derivados, não foi possível efetuar uma comparação direta entre todos os sistemas estudados. Na Tabela 6.1 estão apresentadas as capacidades ou não capacidades de cada derivado de formar redes e as concentrações máximas nas quais os experimentos foram realizados. Essas concentrações correspondem aos limites de solubilidade de cada derivado em água. A capacidade de formar redes foi avaliada visualmente. Para os sistemas que não formaram redes, a viscosidade percebida foi aproximadamente da mesma ordem de grandeza que a viscosidade da água. No caso onde ocorreu formação das redes, os sistemas adquiriram a aparência de gel com alta viscosidade, suficientemente alta para impedir fluxo devido à gravidade.

Do grupo de derivados estudados, apenas a TMU e a 1,1-DEU foram capazes de deflagrar a formação das redes. A comparação entre as características desses dois derivados com os outros, nos sugere que a capacidade de formação das redes não é fortemente afetada pela capacidade de formação de ligações de hidrogênio ou pelo grau de substituição. No entanto, a disposição espacial dos grupos apolares parece exercer grande influência sobre esta capacidade pois apenas os derivados que possuem um grupo NR_2 foram capazes de formar redes, independentemente do R. Este fato sugere que há a necessidade de que os grupos apolares estejam próximos, o que significa, no caso dos derivados de uréia investigados, que eles sejam substituintes no mesmo átomo de N, para que haja a possibilidade de formação de redes. É necessário que para a formação das redes

haja uma aproximação favorável entre as espécies moleculares. No caso da 1,3-dimetiluréia, a disposição estérica dos grupos metila não torna contíguos os dois domínios, desfavorecendo tal aproximação. A formação de domínios apolares intermoleculares fica por sua vez dificultada, inviabilizando por consequência a formação das redes.

Tabela 6.1 - Relação dos derivados de uréia estudados e a sua capacidade de formar redes.

derivado	capacidade de formar redes	concentração máxima utilizada (w_{TMU})	concentração máxima utilizada (χ_{TMU})
MMU	não forma	0,65	0,3
MEU	não forma	0,6	0,2
1,3-DMU	não forma	0,75	0,4
1,1-DMU	não forma	0,2	0,05
1,3-DEU	não forma	0,2	0,04
1,1-DEU	forma	0,8	0,4
TMU	forma	0,9	0,6

Fig. 6.10 - Espectros Raman do sistemas água/monometiluréia (MMU) a várias concentrações de MMU.

Tabela 6.2 - Atribuição de frequências Raman (400 cm^{-1} a 1800 cm^{-1}) para o sistema MMU/água na faixa de composição $w_{\text{MMU}}=0,1$ a $w_{\text{MMU}}=0,6$

Atribuição	Número de onda (cm^{-1})
wNH ₂	655
vNCO	912
vCN	996-971
wCH ₃	1360-1350
δCH ₃	1468-1422

w- wagging,
v - estiramento,
δ - deformação angular.

Fig. 6.11 - Espectros Raman do sistemas água/monoetiluréia (MEU) a várias concentrações de MEU.

Tabela 6.3 - Atribuição de frequências Raman (400 cm^{-1} a 1800 cm^{-1}) para o sistema MEU/água na faixa de composição $w_{\text{MEU}}=0,1$ a $w_{\text{MEU}}=0,6$.

Atribuição	Número de onda (cm^{-1})
$w\text{NH}_2$	655
$v\text{NCO}$	912
$v\text{CN}$	997-973

w - wagging,
 v - estiramento.

Fig. 6.12 - Espectros Raman do sistemas água/1,3-dimetiluréia (1,3-DMU) a várias concentrações de 1,3-DMU.

Tabela 6.4 - Atribuição de frequências Raman (400 cm^{-1} a 1800 cm^{-1}) para o sistema 1,3-DMU/água na faixa de composição $w_{1,3-DMU}=0,1$ a $w_{1,3-DMU}=0,7$.

Atribuição	Número de onda (cm^{-1})
νNCO	925-886
νCN	1056-1031

ν - estiramento.

Fig. 6.13 - Espectros Raman do sistemas água/1,1-dietiluréia (1,1-DEU) a várias concentrações de 1,1-DEU.

Tabela 6.5 - Atribuição de frequências Raman (400 cm^{-1} a 1800 cm^{-1}) para o sistema 1,1-DEU/água na faixa de composição $w_{1,1-DEU}=0,1$ a $w_{1,1-DEU}=0,8$.

Atribuição	Número de onda (cm^{-1})
δCNC	598-577
$\nu_s\text{CNC}$	740
νNCO	968-936

ν - estiramento,
 ν_s - estiramento simétrico,
 δ - deformação angular.

Fig. 6.14 - Espectros Raman do sistemas água/tetrametiluréia (TMU) a várias concentrações de TMU.

Tab. 6.6 - Atribuição de frequências Raman (400 cm^{-1} a 1800 cm^{-1}) para o sistema TMU/água na faixa de composição $w_{\text{TMU}}=0,1$ a $w_{\text{TMU}}=1,0$.

Atribuição	Número de onda (cm^{-1})
δCNC	562-552
$\nu_s\text{CNC}$	745-738
νNCO	914
νCN	1040-1020
amida III	1260-1256
$w\text{CH}_3$	1330-1318
δCH_3	1466-1458
amida I	1636-1574

w - wagging,
 ν - estiramento,
 ν_s - estiramento simétrico,
 δ - deformação angular.

6.3 - Ensaios reológicos

Os sistemas estudados apresentam dois comportamentos reológicos distintos: na faixa de $0,1 < w_{TMU} < 0,5$ o comportamento é newtoniano (em tempos curtos), como pode ser visto na Fig.6.15. Em tempos mais longos alguns destes sistemas evoluem para sistemas pseudoplásticos (Fig. 6.16). Para esses sistemas, imediatamente após o preparo das amostras, curvas de fluxo foram registradas a diferentes temperaturas e as energias de ativação de fluxo foram determinadas através da relação de Arrhenius (Eq. 4.21). Como podemos observar na Fig.6.17, as energias de ativação aumentam de forma exponencial com o aumento da concentração de TMU no sistema. Esse comportamento indica que alterações estruturais já estão em curso nos sistemas bem antes da região de transição, em cerca de $w_{TMU} = 0,6$.

A partir de $w_{TMU} > 0,5$, os sistemas apresentam comportamento pseudoplástico, de caráter viscoelástico, com aparência de um gel de alta viscosidade. Esses sistemas foram submetidos a uma série de experimentos, descritos a seguir, com o objetivo de se investigarem suas características dinâmicas, em experimentos transientes e oscilatórios (Da Silva e Arêas, 2001).

6.3.1 - Testes de "Creep"

Os testes de "creep" indicam que os sistemas em rede na faixa de concentração em $w_{TMU} < 0,9$ apresentam comportamento comparável a um fluido de Maxwell, *i.e.*, podem ser mecanicamente descritos como sendo formados por dois elementos montados em série, um amortecedor, responsável pelo componente viscoso, e uma mola, responsável pelo componente elástico. Esse comportamento é bem ilustrado nas Figs. 6.18 e 6.19, que mostram as respostas reológicas das redes de lisozima em w_{TMU} igual a 0,7 e 0,8. Observa-se que na fase de recuperação da curva, após a remoção da tensão, o sistema tende para um valor diferente do original, correspondendo à porção viscosa do material. Essa energia é dissipada na deformação do material.

O sistema em $w_{TMU} = 0,9$ apresenta um comportamento de sólido viscoelástico que se pode descrever por um modelo de Kelvin-Voigt. Alternativamente, poderíamos considerar

Fig. 6.15 - Curva de fluxo para o sistema lisozima/TMU/água a $w_{TMU}=0,5$ logo após o preparo.

Fig. 6.16 - Curva de fluxo para o sistema lisozima/TMU/água a $w_{TMU}=0,5$ após 16 dias.

Fig. 6.17 - Variação da energia de fluxo do sistema lisozima/TMU/água a várias concentrações de TMU, abaixo da região de formação das redes.

Fig. 6.18 - Curva de "creep" para o sistema lisozima/TMU/água a $w_{TMU}=0,7$.

Fig. 6.19 - Curva de "creep" para o sistema lisozima/TMU/água a $w_{TMU}=0,8$.

Fig.6.20 - Curva de "creep" para o sistema lisozima/TMU/água a $w_{TMU}=0,9$.

um modelo de Maxwell em que o componente viscoso fosse desprezível. A Fig. 6.20 mostra o comportamento apresentado pela rede formada em $w_{TMU} = 0,9$. O perfil da curva obtida é típico de um sistema com comportamento predominantemente elástico, observando-se uma quase instantânea e completa recuperação após remoção da tensão. Na primeira fase da curva, a baixa inclinação observada na região estacionária (onde a inclinação da curva sob tensão passa a ser constante) também aponta para o forte caráter elástico da rede nessa condição.

Na Tabela 6.7, são apresentadas as contribuições relativas dos componentes elástico e viscoso, nas condições dos experimentos. Os resultados foram calculados pelo programa US2000, programa que opera o reômetro.

6.3.2 - Testes de relaxação

A análise das curvas de relaxação para os sistemas lisozima/TMU/água ao longo da faixa de $0,6 < w_{TMU} < 0,9$ indicou que os sistemas possuem duas espécies presentes. Nas Figs. 6.21, 6.22, 6.23 e 6.24 temos as curvas de relaxação com o ajuste por um decaimento exponencial duplo, Eq. 6.1. É possível observar-se nas figuras a qualidade dos ajustes obtidos.

$$G(t) = G_0 + G_1 e^{\frac{-t}{\tau_1}} + G_2 e^{\frac{-t}{\tau_2}} \quad (6.1)$$

A inspeção visual das curvas já permite que se percebam as distinções de comportamento para as redes obtidas nas diferentes condições de meio. A relaxação da curva a $w_{TMU} = 0,9$ mostra uma relaxação consideravelmente mais lenta que aquelas observadas a valores mais baixos de w_{TMU} .

Essa análise corrobora as conclusões da análise das curvas de “creep”, que acabamos de apresentar, em que o sistema a $w_{TMU} = 0,9$ se destacava dos demais por seu comportamento elástico preponderante.

A existência de duas espécies dinamicamente distintas corrobora a hipótese que será discutida na seção 6.4, referente aos experimentos de espalhamento. Nesta hipótese, propomos que o sistema seja formado por duas espécies de lisozima, uma forma compacta globular e uma forma expandida grandemente desenovelada. Supõe-se que a forma compacta da lisozima seja a responsável pelo tempo de relaxação mais curto, devido à sua forma pequena e compacta, a qual deve apresentar maior mobilidade no sistema. A forma expandida é a responsável pelo tempo

mais longo de relaxação. Tratando-se esta de uma espécie maior e com mobilidade mais restrita devido às interações com as outras moléculas expandidas é de se esperar que a relaxação ocorra em um tempo consideravelmente maior.

Tabela 6.7 - Porcentagem dos componentes elásticos e viscosos para os sistemas lisozima/TMU/água a várias concentrações de TMU.

	% do componente elástico	% do componente viscoso
$w_{\text{TMU}}=0,9$	92	8
$w_{\text{TMU}}=0,8$	79	21
$w_{\text{TMU}}=0,7$	60	40
$w_{\text{TMU}}=0,6$	33	67

Tabela 6.8 - Tempos de relaxação calculados para os sistemas lisozima/TMU/água a várias concentrações de TMU.

	τ_1 (s)	τ_2 (s)
$w_{\text{TMU}}=0,6$	1,0	15
$w_{\text{TMU}}=0,7$	1,2	17
$w_{\text{TMU}}=0,8$	2,3	23
$w_{\text{TMU}}=0,9$	20	260

Fig.6.21 - Curva de relaxação e curva teórica para o sistema lisozima/TMU/água a $w_{TMU}=0,6$.

Fig.6.22 - Curva de relaxação e curva teórica para o sistema lisozima/TMU/água a $w_{TMU}=0,7$.

Fig.6.23- Curva de relaxação e curva teórica para o sistema lisozima/TMU/água a $w_{TMU}=0,8$.

Fig.6.24 - Curva de relaxação e curva teórica para o sistema lisozima/TMU/água a $w_{TMU}=0,9$.

6.3.3 - Testes dinâmicos

A análise da dependência do módulo de armazenagem (G') e de perda (G'') com a amplitude indica (Fig. 6.25 a Fig. 6.28) que a região viscoelástica linear é pouco sensível à mudança da concentração de TMU, persistindo até cerca de $\gamma_{\max}=0,16$ para todos os sistemas ensaiados. Isso é indicativo de que a estrutura das redes, embora distinta em termos de seus componentes elásticos e viscosos a cada composição do solvente binário, apresenta uma resistência pouco variável, dentro das condições de ensaio.

A longa extensão da região viscoelástica linear indica um sistema com estrutura relativamente flexível, capaz de acomodar grandes deformações sem perda de sua estrutura original. Para fins de comparação, para polímeros termoplásticos, sistemas rígidos, a região linear perdura em média até $\gamma_{\max}=0,01$ e para polímeros fundidos $\gamma_{\max}=1$.

No final região viscoelástica linear, observa-se, apenas para as redes formadas em w_{TMU} igual a 0,8 e 0,9 (mais acentuado neste último), um aumento em G'' em função da amplitude de deformação, em discrepância ao observado para as redes obtidas nas duas concentrações mais baixas de TMU. Tal comportamento pode ser interpretado como um aumento na estruturação da rede antes da sua ruptura e perda completa de estrutura, para aquelas nas quais o componente elástico é predominante.

Os módulos de armazenagem e de perda aumentam com o aumento da concentração de TMU, porém o módulo de armazenagem aumenta com uma velocidade muito maior, indicando a importância do papel dos microambientes apolares no componente elástico do sistema (Fig. 6.29 e Fig. 6.30).

Os ângulos de perda ($\tan \delta$) mostraram-se consistentemente menores do que a unidade, indicativo de que os sistemas possuem comportamento predominante do tipo sólido ("solid-like") (Fig. 6.31).

Fig.6.25 - Varredura de amplitude para o sistema lisozima/TMU/água a $w_{TMU}=0,6$.

Fig.6.26 - Varredura de amplitude para o sistema lisozima/TMU/água a $w_{TMU}=0,7$.

Fig. 6.29 - Variação de G' e G'' com a concentração de TMU, no sistema lisozima/TMU/água.

Fig. 6.30 - Variação do módulo de perda (G') com a concentração de TMU.

Fig. 6.31 - Variação da tangente de perda ($tg \delta$) com a concentração de TMU.

6.3.4 - Dependência com a frequência

Nas Figs. de 6.32 a 6.35 são apresentadas as curvas referentes à dependência de G' , G'' e η^* com a frequência.

Aparentemente, a faixa investigada não foi suficientemente abrangente para que se pudessem extrair informações relevantes dos sistemas. Mesmo tendo-se obtido os dados a diversas temperaturas, não foi possível construir-se uma curva mestra. Os desvios obtidos, necessários para a construção da curva-mestra, foram de pequena magnitude, indicando que a faixa de temperatura utilizada (de 50°C a 350°C) não foi ampla o suficiente. Como nossos sistemas são termo-sensíveis, isso criou uma limitação prática. Embora não tenha sido possível determinar a região em que se encontram os dados, para se poder proceder à sua análise, o perfil das mesmas não parece corresponder ao perfil característico das curvas de sistemas monodispersos (vide Eqs. 4.43 e 4.44), uma vez que as inclinações referentes a G' e G'' , nas retas mostradas nos gráficos das Figs. 6.32 a 6.35, não correspondem à inclinações esperadas segundo as equações acima referidas.

Dentro da faixa de temperatura estudada (50°C a 350°C), os sistemas não apresentaram mudanças na sua dependência com a frequência, indicativo de que nessa faixa de temperatura não ocorre nenhuma mudança estrutural significativa nas redes.

Fig. 6.32 - Varredura de frequência para o sistema lisozima/TMU/água a $w_{TMU}=0,6$

Fig. 6.33 - Varredura de frequência para o sistema lisozima/TMU/água a $w_{TMU}=0,7$

6.4 - Espalhamento de raios X a baixo ângulo.

Com o intuito de se investigar o estado conformacional da proteína nas redes utilizou-se a técnica de SAXS para determinação de parâmetros de forma da proteína. Além do tratamento tradicional para determinação de raio de giro, os dados obtidos foram modelados afim de se enriquecer a análise do sistema. Sistemas lisozima em água foram também ensaiados, como controle e referência para a modelagem dos sistemas.

6.4.1 - Sistemas lisozima/água.

As curvas SAXS dos sistemas lisozima/água são apresentadas na Fig.6.36. As curvas foram normalizadas pela concentração molar de proteína. Pode-se observar o decréscimo da intensidade das curvas de SAXS com o aumento da concentração de proteína, situação esperada para sistemas com presença de forças repulsivas (exclusão de volume). O deslocamento dos picos de interferência para regiões de maior q com o aumento da concentração de proteína é indicativo da diminuição da distância intermolecular do sistema com o aumento do número de moléculas de proteína, uma vez que q é inversamente proporcional à distância.

Deve-se notar que não há diferenças notáveis entre as curvas de SAXS para valores de q após o pico de interferência, indicativo de que as moléculas de lisozima não sofrem grandes mudanças na sua forma ao longo da faixa de concentração ensaiada.

Na Fig.6.37 apresentamos a curva experimental de SAXS junto a uma curva teórica de espalhamento para a molécula de lisozima, gerada a partir de sua estrutura cristalográfica pelo programa Crysol (Svergun *et al.*, 1995). A qualidade da sobreposição das curvas indica que a curva experimental foi de fato gerada por moléculas de lisozima.

Os resultados finais da análise das curvas de SAXS pelo modelo unificado de Beaucage (Eq. 5.1 e 5.3) são apresentados na Fig.6.38. Na Tabela 6.9 constam os valores médios obtidos no trabalho de modelagem para as curvas experimentais analisadas.

Fig.6.36 - Curvas normalizadas de SAXS para o sistema lisozima/água a várias concentrações molares de lisozima.

Fig.6.37 - Curva de SAXS e curva teórica para o sistema lisozima em água.

Tabela.6.9 - Resultados da análise via modelo unificado de Beaucage para os sistemas lisozima/água a várias concentrações de lisozima.

	1 mMol/L	3 mMol/L	5 mMol/L
$G(10^{-3})$	$3,4 \pm 0,1$	$8,9 \pm 0,2$	$15,0 \pm 0,3$
$R_g (\text{\AA})$	$14,0 \pm 0,1$	$14,0 \pm 0,1$	$14,0 \pm 0,1$
k	$1,6 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,1$	$2,2 \pm 0,3$
$d (\text{\AA})$	95 ± 1	$69,2 \pm 0,4$	$60,8 \pm 0,3$
$B(10^{-7})$	6 ± 4	6 ± 4	6 ± 4
A	$4,0 \pm 0,2$	$4,0 \pm 0,2$	$4,0 \pm 0,2$

Fig.6.38 -Dados de SAXS e curvas resultantes da modelagem para os sistemas lisozima/água a várias concentrações de lisozima.

6.4.2 - Sistemas lisozima/TMU/água.

Para os sistemas lisozima/TMU/água podemos observar dois comportamentos distintos (Fig.6.39): para sistemas com $0,6 < w_{TMU} < 0,8$, temos curvas de SAXS com a presença de pico de interferência; a $w_{TMU}=0,9$, o pico de interferência não está mais presente.

Pode se observar que o pico de interferência não sofre mudanças de forma e posição mensuráveis ao longo da faixa de concentração onde ele está presente, mas sofre variação em sua intensidade. A variação da intensidade do pico de interferência não é linear, apresentando uma maior diferença entre $w_{TMU}=0,6$ e $w_{TMU}=0,7$ do que entre $w_{TMU}=0,7$ e $w_{TMU}=0,8$. A manutenção da posição do pico de interferência ao longo da faixa de concentração é indicativo de que a distância interpartículas não muda ao longo da faixa de concentração.

Os sistemas com pico de interferência foram analisados via dois modelos: um de configuração bicontínua (Eq. 5.4) (Chen *et al.*, 1993 e 1993) e outro, o modelo unificado de Beaucage (Eq. 5.1 e 5.3) (Beaucage, 1995 e 1996 e Beaucage *et al.*, 1995), que considera uma distribuição aleatória de objetos dispersos em um contínuo.

Os resultados da análise pelo modelo bicontínuo podem ser vistos na Fig.6.40. Como pode ser constatado, a curva teórica falha em descrever corretamente a curva de SAXS. A forma do pico da curva teórica não descreve corretamente a forma do pico de interferência experimental. A valores intermediários de q , tampouco se tem uma boa concordância. A distância entre domínios das mesma espécie (d) e a distância de correlação (ξ) obtidas foram de 170 Å e 55 Å, respectivamente, os quais não possuem significado físico. Assim, o modelo bicontínuo foi descartado.

Da Fig.6.41 a Fig 6.43, pode-se observar o resultado da análise pelo modelo de Beaucage (Eq. 5.1 e 5.3). Este modelo apresentou bons resultados ao descrever as curvas de SAXS. Os valores médios dos parâmetros do modelo de Beaucage são apresentados na Tabela 6.10.

Para os sistemas analisados pode-se notar que o parâmetro A apresentou valores menores que 3, indicativo de caráter fractal. Deve-se ressaltar que o parâmetro A e B se compensam mutuamente, causando o inconveniente de que um grande número de combinações

de A e B ser capaz de gerar curvas de similar qualidade. Contudo, para sistemas de caráter fractal de volume ($A < 3$) e de caráter polimérico, A e B podem ser correlacionados (Eq. 5.2) (Beaucage, 1996). Isso nos permitiu determinar um valor único para A e B . Nos casos onde essa relação não se aplica, se faz necessário atribuir um valor para A . Pode-se encontrar na literatura valores de A para sistemas onde se conheça a estrutura da unidade espalhadora (Beaucage, 1996). Caso a estrutura não seja conhecida, para sistemas onde não haja função de interferência, pode-se obter o valor de A diretamente da curva de espalhamento, medindo-se o expoente com o qual a função de forma decresce na região de q dominada pela lei de potências.

O valor do parâmetro de correlação k permaneceu próximo a 2,0, indicando que o sistema não está em máxima compactação ($0 < k < 6$). A distância interpartículas espalhadoras (d) situa-se em torno de 156 Å e o raio de giro em 44 Å.

Comparando-se o sistema lisozima/água e lisozima/TMU/água pode-se notar que:

- O pico de interferência aparece a valores de q significativamente menores para os sistemas com TMU, indicando que as distâncias entre as unidades geradoras de interferência são significativamente maiores em sistemas com TMU: em torno de 156 Å para os sistemas com TMU e 60,8 Å para o sistema lisozima/água a 5 mMol/L.

- O valor do parâmetro G das curvas de SAXS dos sistemas lisozima/TMU/água é cerca de quatro ($w_{TMU}=0,6$) a oito vezes ($w_{TMU}=0,8$) superior ao das curvas referentes ao sistema lisozima/água a 5mMol/L de lisozima, o que poderia ser indicativo de agregação. Lembrando que G é proporcional a $\eta_p J^2 \Delta \rho^2$, um aumento de quatro vezes no valor de G poderia ser explicado pela formação de um agregado de quatro moléculas de lisozima. O aumento no volume da unidade espalhadora seria compensado pela redução no número de partículas espalhadoras. O raio de giro do agregado seria de 42,6 Å ($R_g^2 = 56 R^2/10$ para agregados lineares, usando $R_g = 18$ Å para lisozima), valor consistente com o obtido via modelagem. Contudo, a formação de agregados não é compatível com o aumento de G e com a manutenção de R_g ao longo da faixa de concentração.

Para o sistema lisozima/TMU/água a $w_{TMU}=0,9$, em que não se tem o efeito de interferência, utilizamos apenas a parte referente à função de forma do modelo de Beaucage (Eq. 5.1 e 5.3) para a análise (Fig. 6.44). Os resultados estão na Tabela 6.11.

Fig. 6.39 - Curvas SAXS dos sistemas lisozima 5 mMol.L⁻¹/TMU/água a várias concentrações de TMU.

Fig. 6.40 - Curva SAXS e curva de modelagem via modelo bicontínuo do sistema lisozima 5 mMol.L⁻¹/TMU/água.

Fig. 6.41 - Curva de SAXS e curva de modelagem via modelo de Beaucage do sistema lisozima 5 mMol.L⁻¹/TMU/água.

Fig.6.42 - Curva SAXS e teórica, via modelo unificado de Beaucage, para o sistema lisozima 5 mMol.L⁻¹/TMU/água.

Fig.6.43 - Curva SAXS e teórica, via modelo unificado de Beaucage, para o sistema lisozima 5 mMol.L⁻¹/TMU/água.

Fig.6.44 - Curva SAXS e teórica, via modelo unificado de Beaucage, para o sistema lisozima 5 mMol.L⁻¹/TMU/água.

Tabela 6.10 - Resultados da modelagem pelo modelo unificado de Beaucage para os sistemas lisozima 5 mMol.L⁻¹/TMU/água a várias concentrações de TMU.

	lisozima $w_{TMU}=0,6$	lisozima $w_{TMU}=0,7$	lisozima $w_{TMU}=0,8$
G (10 ⁻³)	58 ± 4	105 ± 5	124 ± 5
Rg (Å)	44 ± 3	43,5 ± 1,5	43 ± 2
k	2,0 ± 0,2	2,0 ± 0,2	2,0 ± 0,2
d (Å)	156 ± 3	154 ± 1	156 ± 2
A	2,4 ± 0,1	2,7 ± 0,1	2,8 ± 0,1

Tabela 6.11 - Resultados da análise, pelo modelo unificado de Beaucage, do sistema lisozima/TMU/água a $w_{TMU}=0,9$.

	lisozima 5 mMol/L - $w_{TMU}=0,9$
Rg (Å)	50,7 ± 0,5
A	2,7 ± 0,1
G (10 ⁻³)	152 ± 5

É interessante notar que o raio de giro (49 Å) e o tipo de interface (fractal) são comparáveis ao dos sistemas onde o pico de interferência está presente.

A análise da curva de Kratky (Fig.6.45) para o sistema a $w_{\text{TMU}}=0,9$ indica que a proteína mantém uma certa globularidade. Para uma proteína completamente desenovelada, a curva de Kratky apresentaria uma curva ascendente. De fato, o desenovelamento total da proteína não seria esperado, entre outras razões, pela ocorrência das pontes dissulfeto. Dados de Raman (Arêas *et al.*, 1996a) indicam que a proteína desenovelada mantém suas estruturas secundárias, embora em uma conformação tridimensional menos usual (mais expandida ou inchada).

A função de distribuição de distâncias para o mesmo sistema (Fig.6.46) fornece uma distância máxima (D_{max}) de 160 Å e R_g de 48,5 Å. Os valores são um pouco maiores do que os valores obtidos para o sistema lisozima/água/TMU, em regime diluído (Castelletto *et al.*, 1998).

A análise do conjunto de dados nos leva a uma aparente contradição. Pelos resultados obtidos da curva de espalhamento a $w_{\text{TMU}}=0,9$, temos uma distância máxima (D_{max}) para a unidade espalhadora de aproximadamente 160 Å. Pela análise do pico de interferência, nos sistemas a concentrações menores de TMU, obtivemos uma distância interpartículas de aproximadamente 156 Å entre os centros de massa das partículas geradoras de interferência, caracterizando uma impossibilidade física, pois a maior dimensão da partícula (D_{max}) não pode ser maior que a distância entre as partículas. Logo, a partícula que gera a interferência não pode ser a mesma que gera o espalhamento.

Em um trabalho anterior (Castelletto *et al.*, 1998) estudou-se o sistema lisozima/TMU/água em regime diluído. Nele, propôs-se que o desenovelamento da lisozima causado pela ação da TMU envolveria duas espécies, uma espécie globular compacta e uma outra espécie expandida. Calculou-se que a $w_{\text{TMU}}=0,6$ metade das moléculas de proteína se encontrava na forma expandida e a outra metade na forma compacta. Acima e abaixo desta concentração, as formas expandidas e compactas eram respectivamente predominantes. Em princípio, pode-se esperar que em regime concentrado, regime de concentração investigado neste trabalho, o mecanismo de desenovelamento se mantenha.

A análise de curvas de espalhamento de sistemas coloidais, onde espécies de geometria distintas estão presentes, deve levar em conta o fator de forma ($P(q)$) de cada espécie presente e os fatores de correlação ($S(q)$) entre as partículas presentes, tanto entre partículas da mesma espécie, quanto em correlações cruzadas.

Os fatores de correlação entre moléculas na forma expandida e entre moléculas nas formas expandida e compacta devem ser igual a um pois se supõe que a forma expandida não possua um contorno molecular definido, estando as moléculas nessa conformação entremeadas umas às outras. Desse modo, não se espera correlação envolvendo essa população. Logo, o único termo de correlação de importância no sistema de redes seria entre moléculas de lisozima na forma compacta.

Para os fatores de forma, $P(q)$, a curva resultante seria uma média ponderada dos fatores de forma de cada espécie, onde os pesos seriam o número de partículas de cada espécie. A $w_{TMU}=0,6$, as populações de cada espécie são numericamente iguais entre si (50% da forma expandida e 50% da forma compacta). Com o aumento da concentração de TMU, tem-se um aumento da população expandida, seguido da diminuição da espécie compacta na mesma proporção. Considerando-se que o número de moléculas de lisozima se mantém constante durante o processo, o aumento observado no parâmetro G leva-nos a concluir que a espécie expandida possui uma capacidade de espalhamento consideravelmente maior que a espécie compacta.

A manutenção da distância interpartículas, obtida do pico de interferência, pode ser explicada por um decréscimo da população da espécie compacta, seguido de perda da compactação com o aumento da concentração de TMU. Em algum momento, toda a população restante da forma compacta evoluiria para a forma expandida, levando ao perfil de curva obtido a $w_{TMU}=0,9$.

Dessa maneira, podemos concluir que as curvas de SAXS dos sistemas lisozima/TMU/água são geradas por duas espécies diferentes de lisozima, uma compacta responsável pela função de interferência, e uma expandida que domina o processo de espalhamento. A forma expandida é predominante em concentrações maiores de TMU, sendo que a $w_{TMU}=0,9$ a espécie compacta não é mais capaz de gerar o pico de interferência.

Fig.6.45 - Curva de Kratky para o sistema lisozima/TMU/água a $w_{TMU}=0,9$.

Fig.6.46 - Curva de distribuição de distâncias para o sistema lisozima/TMU/água.

6.4.3 - Sistemas lisozima/citocromo-c/TMU/água

A principal questão relativa à incorporação de citocromo-c nesses sistemas é saber se a metaloproteína participará efetivamente da formação das redes ou permanecerá apenas inclusa nos interstícios das mesmas. Vale ressaltar que o citocromo-c não é capaz de formar redes viscoelásticas estáveis quando se encontra como a única espécie proteica em meio de TMU/água, floculando em soluções de $w_{TMU} > 0,3$. Porém, soluções de citocromo-c e lisozima formam redes estáveis quando as duas proteínas estão presentes, em condições semelhantes às empregadas na geração das matrizes contendo unicamente lisozima. A investigação da estrutura das redes contendo citocromo-c pode ser de grande utilidade na definição do mecanismo de formação dessas matrizes.

Na Fig.6.47 temos uma série de curvas com a concentração de citocromo-c variando de 0,06 mMol/L a 1,2 mMol/L e os demais componentes com concentrações fixas. Pode-se constatar que as curvas de SAXS não apresentam diferenças mensuráveis, em termos de interferência ou forma, ao longo da faixa de concentração de citocromo-c. Na faixa de concentração estudada, a presença de citocromo-c não modifica as características da curva de espalhamento e da função de interferência.

Na Fig.6.48 temos curvas do sistemas citocromo-c/lisozima/TMU/água com $0,6 < w_{TMU} < 0,9$ e os demais componentes com concentrações fixas. Quando comparadas a curvas equivalentes (Fig.6.49, Fig.6.50 e Fig.6.51) dos sistemas lisozima/TMU/água, pode-se observar que as curvas dos sistemas com citocromo-c possuem intensidade maior, sendo que as diferenças entre as intensidades é maior a concentrações menores de TMU. A diferença de intensidade será melhor discutida a seguir. Em princípio, poderia ser atribuída ao fato de que os sistemas com citocromo-c possuem maior quantidade de moléculas, embora possam haver outros fatores envolvidos. Os sistemas com lisozima possuem 5 mMol/L de proteína (lisozima), enquanto os sistemas com citocromo-c possuem 1,0 mMol/L adicionais de proteína (citocromo-c).

Os valores médios dos parâmetros obtidos via modelagem (modelo de Beaucage) (Eq. 5.1 e 5.3) são apresentados na Tabela 6.12.

Fig.6.47 - Curvas SAXS para o sistema citocromo-c/lisozima 5 mMol.L⁻¹/TMU/água a várias concentrações de citocromo-c e $w_{\text{TMU}}=0,8$.

Fig.6.48 - Curvas SAXS do sistema citocromo-c 1 mMol.L⁻¹/lisozima 5 mMol.L⁻¹/TMU/água a várias concentrações de TMU.

Fig.6.49 - Curvas SAXS dos sistemas lisozima/TMU/água com e sem citocromo-c a $w_{TMU}=0,6$.

Fig.6.50 - Curvas SAXS dos sistemas lisozima/TMU/água com e sem citocromo-c a $w_{TMU}=0,7$.

Fig.6.51 - Curvas SAXS dos sistemas lisozima/TMU/água com e sem citocromo-c a $w_{TMU}=0,8$.

Tabela 6.12 - Resultados da análise dos sistemas citocromo-c/lisozima/TMU/água a várias concentrações de TMU pelo modelo unificado de Beaucage.

	$w_{TMU}=0,6$	$w_{TMU}=0,7$	$w_{TMU}=0,8$
G (10^{-3})	85 ± 1	127 ± 1	148 ± 1
Rg (Å)	45 ± 3	44 ± 2	48 ± 2
k	$2,0 \pm 0,2$	$2,0 \pm 0,2$	$2,0 \pm 0,2$
d (Å)	153 ± 2	150 ± 2	145 ± 2
A	$2,6 \pm 0,2$	$2,7 \pm 0,2$	$2,7 \pm 0,2$

Para todos os sistemas, o parâmetro A possui valores menores que 3, indicando caráter fractal. O parâmetro de correlação k possui valores em torno de 2,0 indicando que o sistema não está em máxima compactação. Os valores médios de raio de giro e distância interpartículas espalhadoras são um pouco superiores aos dos sistemas onde apenas lisozima está presente, 44 Å e 150 Å, respectivamente. Esses resultados indicam que, do ponto de vista da função de forma, os sistemas em rede com citocromo-c apresentam grande similaridade com aqueles sem citocromo-c.

A curva de Kratky para esse sistema (Fig. 6.52) apresenta características muito semelhantes às observadas na curva para o mesmo sistema sem citocromo-c.

Os sistemas citocromo-c/lisozima/TMU/água apresentam um fator complicador em relação aos sistemas anteriores, no que se refere à modelagem: sua presença implica na inclusão de novos fatores de forma e de correlação na análise das curvas de SAXS.

Pode-se considerar que os fatores de correlação da forma expandida das moléculas de lisozima entre si e com as outras espécies presentes seja igual à unidade pelos mesmos motivos discutidos anteriormente. Também pode-se considerar que os fatores de correlação das espécies compactas entre si e cruzadas (lisozima e citocromo-c) sejam iguais, pois apenas um pico de interferência foi observado, e este pico apresenta grande similaridade quando comparado aos dos sistemas sem citocromo-c. Assim, nossa análise se resume às contribuições de forma das espécies expandidas. Faz-se necessário determinar se o citocromo-c também se manifesta em duas espécies, expandida e compacta, *i.e.*, se o citocromo-c participa ou não da formação das redes.

Na Tabela 6.13, apresentamos os dados da parametrização das curvas de SAXS pelo modelo unificado de Beaucage.

O parâmetro G não apresenta uma tendência definida com a variação de concentração de citocromo-c. A variação do parâmetro G deve ser atribuída a limitações da análise, pois as variações se encontram dentro da faixa de erro do método de análise.

Sendo G proporcional a $\eta_p V^2 \Delta \rho^2$, um aumento no número de partículas implicaria necessariamente em um aumento de G . Nos sistemas citocromo-c/lisozima/TMU/água, temos na concentração mais baixa de citocromo-c, 0,06 mMol/L da metaloproteína e 5 mMol/L de

lisozima e no sistema de maior concentração de citocromo-c, 1,2 mMol/L de citocromo-c e 5 mMol/L de lisozima. Considerando-se que as funções de forma de ambas as proteínas sejam similares e que lisozima e citocromo-c possuam aproximadamente as mesmas dimensões e massa, seria de se esperar um aumento de aproximadamente 20% em G , aumento esse que não foi observado. Embora a flutuação de G seja considerável, é seguro afirmar que a presença de moléculas de citocromo-c não colabora diretamente com o aumento do espalhamento nos sistemas a $w_{TMU}=0,8$.

Comparando-se as curvas dos sistemas com e sem citocromo-c ao longo da faixa de concentração, Fig.6.49 a Fig.6.51, podemos perceber que a presença de citocromo-c exerce maior influência no valor de G em concentrações menores de TMU, Tabela 6.12. Isso nos leva a crer que o citocromo-c se encontra na forma compacta, pois, se considerarmos que a $w_{TMU}=0,6$ temos contribuições das formas expandidas e compactas da lisozima e da forma compacta do citocromo-c, teremos valores de G maiores para os sistemas com citocromo-c. Conforme se aumenta a concentração de TMU, tem-se um aumento da forma expandida da lisozima em relação à forma compacta. Supõe-se que a forma expandida tenha maior contribuição no valor de G , pelos motivos descritos anteriormente. Com isso, teríamos uma diminuição da importância relativa da contribuição das moléculas de citocromo-c para o valor de G , fazendo com que a diferença de G entre os dois sistemas diminuísse com o aumento da concentração de TMU, fato que foi observado.

Fig.6.52 - Curva de Kratky para o sistema citocromo-c/lisozima/TMU/água a $w_{TMU}=0,9$.

Tabela.6.13 - Resultados da modelagem via modelo unificado de Beaucage para os sistemas citocromo-c/lisozima/TMU/água a várias concentrações de citocromo-c.

	0,06 mMol/L	0,12 mMol/L	0,6 mMol/L	0,9 mMol/L	1,2 mMol/L
Rg (Å)	43 ± 2	42 ± 2	47 ± 2	48 ± 2	45 ± 2
d (Å)	150 ± 2	151 ± 2	142 ± 2	142 ± 2	148 ± 2
k	2,0 ± 0,2	2,0 ± 0,2	2,0 ± 0,2	2,0 ± 0,2	2,0 ± 0,2
A	2,9 ± 0,1	2,9 ± 0,1	2,6 ± 0,1	2,6 ± 0,1	2,7 ± 0,1
G (10 ⁻³)	138 ± 9	121 ± 9	162 ± 9	165 ± 9	150 ± 9

Tabela 6.14 - Variação do parâmetro G para os sistemas lisozima/TMU/água com e sem citocromo-c ao longo da faixa de concentração de TMU e suas respectivas razões.

	G(10 ⁻³) _{SC}	G(10 ⁻³) _{CC}	razão G _{SC} /G _{CC}
w _{TMU} =0,6	58±04	85±1	0,682
w _{TMU} =0,7	105±5	127±1	0,827
w _{TMU} =0,8	124±5	148±1	0,838
w _{TMU} =0,9	152±5	164±1	0,927

SC - Sem citocromo-c
CC - Com citocromo-c

7. *Discussão final e Conclusões*

Os resultados dos ensaios Raman e de microcalorimetria corroboram a hipótese de segregação de microdomínios no meio orgânico/aquoso TMU/água, com inversão da microconfiguração a $w_{\text{TMU}} = 0,6$. A análise dos dados indicou que a molécula de tetrametiluréia (TMU) é submetida a microambientes distintos ao longo de sua faixa de concentração, tendo sido possível identificar-se três regiões bastante características.

Os resultados de Raman nos apontam quais seriam as mudanças sofridas nesses meios: as bandas vibracionais sensíveis às mudanças de composição da mistura binária e referentes aos domínios apolares da molécula sofrem um desvio de suas frequências vibracionais para valores mais baixos com o aumento da concentração de TMU, o que é compatível com o esperado pela diminuição de densidade das fases apolares causada pelo aumento do teor de TMU nas misturas. Bandas referentes a grupos polares, como o C=O presente no modo amida I, sofrem no entanto desvios para valores mais altos de frequência. Nessa região da banda amida I observa-se na verdade uma separação em dois componentes, o de frequência mais baixa predominante na região abaixo da região de transição e o de frequência mais alta predominante na região acima da região de transição. Esses dois componentes espectrais representam sondas dos dois ambientes característicos em torno da concentração de transição, apresentando contribuições equivalentes a cerca de $w_{\text{TMU}} = 0,6$, a região em que se dá a transição. Essa mesma região é aquela em que as entalpias de excesso de mistura para o sistema TMU/água mostram um perfil inusitado. Além do brusco aumento nos valores de entalpia de excesso em $w_{\text{TMU}} = 0,6$, também a região de formação de oligômeros na região de baixo teor de TMU é evidenciada.

Para o sistema TMU/água, a concentração crítica da mistura binária em $w_{\text{TMU}} = 0,6$ corresponde àquela na qual esse sistema binário é capaz de deflagrar o processo de transição

viscoelástica em lisozima. As análises dos demais derivados de uréia estudados não indicaram a ocorrência dos eventos de inversão na configuração de microdomínios, conforme verificado para TMU. Dentre os vários derivados estudados, apenas a 1-1, dietiluréia levou à formação das redes, porém com uma cinética muito mais lenta.

Os resultados de Reologia indicaram que as redes tridimensionais transientes de lisozima possuem duas populações que relaxam a tempos distintos, com a população mais rápida relaxando cerca de dez vezes mais rapidamente que a outra. Indicaram também que com o aumento da concentração de TMU no sistema, as redes tendem a adquirir um caráter mais sólido, representado pelo crescimento mais rápido do módulo de armazenagem em relação ao módulo de perda. A região linear viscoelástica não se mostrou sensível à variação da concentração de TMU, indicativo de que as redes, embora distintas do ponto de vista estrutural e dinâmico não tem sua resistência mecânica significativamente alterada dentro das condições de ensaio.

Expandindo a análise feita em um trabalho anterior (Castelletto *et al.*, 1998), as redes de lisozima e lisozima/citocromo-c tiveram suas curvas de SAXS analisadas através da aplicação de um modelo de duas populações: uma população globular compacta, predominante em concentrações baixas de TMU, e uma espécie expandida, predominante em concentrações altas de TMU. Determinou-se que a componente expandida possui caráter fractal e dimensão máxima de cerca de 160 Å.

Embora tenha se mostrado incapaz de gerar redes estáveis em meios de TMU/água, citocromo-c pôde ser incorporado de forma homogênea a matrizes de lisozima. A análise desses sistemas indicou que a metaloproteína não altera de forma significativa a morfologia das redes tridimensionais, o que nos leva a crer que o citocromo-c não esteja interdigitado aos elementos fractais da rede, mas que se encontre localizado nos interstícios aquosos da matriz.

Analisando todo o conjunto de dados, apresentamos um modelo para a formação das redes de lisozima, descrito a seguir.

O sistema binário TMU/água é capaz de segregar microdomínios apolares/polares, os quais, embora não levem à separação macroscópica de fases, criam no entanto regiões de microheterogeneidades no meio líquido. Em concentrações baixas de TMU, tem-se a

segregação de microdomínios de TMU, de carácter apolar, em um contínuo aquoso. Com o aumento da concentração de TMU, dá-se um aumento progressivo nos microdomínios de TMU, que a um valor de composição crítica da mistura ($w_{\text{TMU}}=0,6$) colapsam, formando um contínuo apolar. Nesse ambiente prevalente apolar, as moléculas de água agora passam a se segregar, formando microdomínios polares, caracterizando-se uma inversão na microconfiguração da mistura líquida.

A molécula de lisozima quando no ambiente do contínuo polar ($w_{\text{TMU}}<0,6$) apresenta-se numa conformação compacta ainda globular (Castelletto *et al.*, 1998). Quando exposta ao ambiente de carácter apolar prevalente ($w_{\text{TMU}}>0,6$), sofre um desenovelamento parcial, adquirindo uma conformação expandida. Essa espécie expandida de lisozima mostra-se capaz, quando acima de um limiar de concentração, de interagir com outras moléculas na mesma conformação, formando uma rede tridimensional transiente de carácter fractal. Uma vez formada, a estrutura da rede não muda seu arcabouço básico em função da variação da composição da mistura líquida na qual foi gerada. Ocorre, no entanto, uma conversão de unidades da espécie proteica compacta para a forma expandida à medida que diminui o teor de água na mistura binária. Isso leva a um aumento da população da espécie expandida, aumentando consequentemente a rigidez da rede, fato caracterizado pelo aumento da contribuição elástica ao sistema. A concentrações de $w_{\text{TMU}}>0,6$, a espécie compacta torna-se restrita aos microdomínios polares (interstícios da rede), tendendo a desaparecer a $w_{\text{TMU}} = 0,9$.

8 - Bibliografia

- Ansell, S., Cser, L., Grósz, T., Jancsó, G., Jóvári, P. e Soper, A. K. (1997) *Physica B*, **234&236**, 347.
- Arêas, E. P. G. e Arêas, J. A. G. (1999) *J. Molec. Structure(Theochem)* , **464**, 199.
- Arêas, E. P. G., Arêas, J. A. G., Hamburger, J., Peticolas, W. L. e Santos P. S. (1996a) *J. Coll. Interface Sci.*, **180**, 578.
- Arêas, E. P. G., Ribeiro, M. C. C. e Santos, P. S. (1996b) *J. Molec. Structure*, **378**, 111.
- Arêas, E. P. G., Menezes, H. H. A., Santos, P. S. e Arêas, J. A. G. (1999) *J. Molec. Liquids* , **79**, 45.
- Atkins, P. W. (1990) *Physical Chemistry*, 4a ed, New York, W. H. Freeman and Company.
- Banci, L., Bertini, I., Gray, H. B., Luchinat, C., Reddig, T., Rosata, A. e Turano, P. (1997) *Biochemistry* , **36**, 9867.
- Banci, L., Bertini, I., Huber, J. G. e Spyroulias, G. A. (1999) *J. Biol. Inorg. Chem.*, **4**, 21.
- Barnes, H. A. , Hutton, J. F. e Walters, K (1989) *An Introduction to Rheology*, Amsterdam, Elsevier.
- Beaucage, G. (1995) *J. Appl. Cryst.*, **28**, 717.
- Beaucage, G. (1996) *J. Appl. Cryst.*, **29**, 134.
- Beaucage, G., Ulibarri, T. A., Black, E. P. e Schaefer, D. W. (1995) *Hybrid Organic-Inorganic Composites, Series 585*, 97.
- Belletato, P., Freitas, L. C. G., Arêas, E. P. G. e Santos, P. S. (1999) *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **1**, 4769.
- Berghuis, A. M. e Brayer, G. D. (1992) *J. Mol. Biol.*, **223**, 959.
- Bezzabotnov, V.Yu., Cser, L., Grósz, T., Jancsó, G. e Ostanovich, Yu.M. (1992) *J. Phys. Chem.*, **96**, 976.

- Blake, C. C. F., Koenig, D. F., Mair, G. A., North, A. C. T., Philips, D. C. e Sarma, V. R. (1965) *Nature*, **206**, 757.
- Blake, C. C. F., Mair, G. A., North, A. C. T., Philips, D. C. e Sarma, V. R. (1967) *Proc. R. Soc. London*, **b 167**, 365.
- Bórbely, S. Cser, L., Grósz, T. e Jancsó, G (1995) *Phys. B*, **213&214**, 513.
- Bragg, W. L. (1913) *Proc. Cambridge Philos. Soc.*, **17**, 43.
- Breslow, R. e Guo, T. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **87**, 167.
- Bushnell, G.W., Louie, G.V. e Brayer, G.D.(1990) *J. Mol. Biol.*, **214**, 585.
- Cacace, M. G., Landau, E. M. e Ramsden, J. J. (1997) *Q. Rev. of Biophys.*, **30**, 241.
- Campbell, I. D. e Dwek, R. A., (1984) *Biological Spectroscopy*, Menlo Park, The Benjamin/Cummings Publishing Company.
- Castelleto, V., Arêas, E. P. G., Arêas, J. A. G. e Craievich, A. F. (1998) *J. Chem. Phys*, **109**, 6133.
- Chen, S. -H., Chang, S. -L. e Strey, R. (1991) *J. Appl. Cryst.*, **24**, 721.
- Chen, S. -H., Lee, D. e Chang, S. -L. (1993) *J. Mol. Struct.*, **296**, 259.
- Cleland, J. L. (1993) *Protein folding. In vivo and in vitro (ACS Symposium series)*, Washington D.C., ACS.
- Colthup, N. B., Daly, L. H. e Wiberley, S. E. (1990) *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy*, 3a ed., New York, Academic Press.
- Cser, L. (1995) *J. Radioanalyt. Nuclear Chem.*, **190**, 529.
- Cser, L., Farago, B., Grosz, T., Jancsó, G. E., Ostanevich e Yu.M. (1992) *Phys. B*, **180&181**, 848.
- Cser, L., Grósz, T., Jancsó, G. e Káli, G. (1997) *Phys. B*, **234&236**, 349.
- Cser, L., Jancsó, G., Papoular, R. e Grósz, T. (1989) *Phys. B*, **156&157**, 145.
- Creighton, T. E. (1992). *Protein Folding*, New York, Freeman.
- Da Silva, M.A. e Arêas, E.P.G. (1999) Resumos da 22^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, **1**, FQ-014.
- Da Silva, M. A. e Arêas, E. P. G. (2001) *Proceedings of the International Workshop on Spectroscopy for Biology*, **1**, 27.

- Da Silva, M. A., Arêas, E. P. G. e Itri, R. (2001a) *Resumos da XI Reunião Anual de Usuários – LNLS*, **1**, 161.
- Da Silva, M. A., da Silva, L. H. M., Loh, W., Itri, R. e Arêas, E. P. G. (2001b) *Biophys. J.*, **80**, 1750.
- Dickerson, R. E., Takano, T., Eisenberg, D., Kallai, O. B., Samson, L., Cooper, A. e Margoliash, E. (1971) *J. Biol. Chem.*, **246**, 1511.
- Dill, K. A., Bromberg S., Yue, K., Fiebig, K. M., Yee, D. P., Thomas, P. D. e Chan, H. S. (1995) *Prot. Sci.*, **4**, 561.
- Frank, H. S. e Franks, F. (1968) *J. Chem. Phys.*, **48**, 4746.
- Gao, Y., Boyd, J., Williams, R. J. P. e Pielak, G. J. (1991) *Biochem.*, **30**, 7033.
- Glatte, O. e Kratky, O. eds. (1982) *Small Angle X-ray Scattering*, London, Academic Press.
- Graessley, W. W. in Mark, J. E., ed.(1993) *Physical Properties of Polymers*, Washington, ACS.
- Guinier, A. (1939) *Ann. Phys*, **12**, 161.
- Hedwig, G. R., Lilley, T. H. e Lindsell, H. (1991) *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, **87**, 2975.
- Hlodan, R., Craig, S. e Pain, R. (1991) *Biotechnol. Gen. Eng. Rev.*, **Rev 9**, 47.
- Jancsó, G., Cser, L., Grósz, T. e Ostanevich, Yu.M. (1994) *Pure and Appl. Chem.*, **66**, 515.
- Lin-Vien, D., Grasselli J. G., Colthup N. B. (1991) *The Handbook of infrared and Raman characteristic frequencies of organic molecules*, Boston, Academic Press.
- Logan, D.E. (1986) *Chem. Phys.*, **103**, 215.
- Louie, G. V. e Brayer, G. D. (1990) *J. Mol. Biol.*, **214**, 527.
- Kim, P. S. e Baldwin, R. L. (1990) *Ann. Rev. Biochem.*, **59**, 631.
- Klibanov, A. M. (2001) *Nature*, **409**, 241.
- Macosko, C. W., (1994) *Rheology: Principle, Measurements and applications*, New York, Wiley-VCH.
- Makhatadze, G. I. e Privalov, P. L. (1992) *J. Mol. Biol.*, **226**, 491.
- Margoliash, E. e Schejter, A. (1966) *Advan. Protein, Chem.*, **21**, 113.

- Minezaki, Y., Niimura, N., Ataka, M. e Katsura, T. (1996) *Biophys. Chem.*, **58**, 355.
- Pettigrew, G. W., Moore, G. R. , (1987) *Cytochrome c - Biological Aspects*, Berlin, Springer-Verlag.
- Porod, G. (1951) *Kolloid-Z*, **124**, 83.
- Prange, T., Schiltz, M., Pernot, L., Colloc, H. N., Longhi, S., Bourguet, W., Fourme, R. (1998) *Proteins: Struct., Funct., Genet.*, **30**, 61.
- Rairy, R. V. e Klibanov, A. M. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **94**, 13520.
- Rohn, C. L. (1995) *Analytical Polymer Rheology:Structure, Processing, Property Relationships*, Munique, Carl Hanser Verlag.
- Rothschild, W.G. (1976) *J. Chem. Phys.*, **65**, 455.
- Sasaki, K. e Arakawa, K. (1973) *Bull. Chem. Soc. Japan*, **46**, 2738.
- Stokes, R. H. (1967) *Aust. J. Chem.*, **20**, 2087.
- Sijpkens, A. H., van de Kluet, G. J. e Gill, S. C. (1993) *Biophys. Chem.*, **46**, 171.
- Svergun, D. C., Barberato, C. e Koch, M J. H. (1995) *J. App. Crystallogr.*, **28**, 768.
- Tadros, Th. F. (1996) *Adv. Colloid Interfac.*, **68**, 97.
- Takano, T. e Dickerson, R. E. (1981a) *J. Mol. Biol.*, **153**, 79.
- Takano, T. e Dickerson, R. E. (1981b) *J. Mol. Biol.*, **153**, 95.
- Torii, H. (1999) *J.Phys.Chem.A* , **103**, 2843.
- Torii, H. e Tasumi, M. (1993) *J. Chem. Phys.*, **99**, 8459.
- Torii, H. e Tasumi, M. (1995) *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **68**, 128.
- Torii, H. e Tasumi, M. (1998) *J. Phys. Chem. B*, **102**, 315.
- Tóth, K., Bopp, P. e Jancsó, G. (1996) *J. Mol. Struc.*, **381**, 181.
- Tovchigrechko, A., Rodnika, M. e Barthel, J. (1999) *J. Mol. Liq*, **79**, 187.
- van Holde, K. E. (1971) *Physical Biochemistry*, New York, ACS.
- Voet, D. e Voet, J. G., (1990) *Biochemistry*, New York, John Wiley & Sons.