

REVISTA **Processos Químicos**

Revista científica da Faculdade de
Tecnologia SENAI Roberto Mange

Ano 5
nº 10
Jul/Dez
2011

Desenhos de Novos Compostos com
Potencial Atividade Biológica



**10 EDIÇÕES
COM RIGOR
ACADÊMICO E
COMPROMISSO
COM O SETOR
PRODUTIVO
BRASILEIRO.**

ISSN 1981-8521

REVISTA **Processos**
Químicos

Revista Científica da Faculdade de
Tecnologia SENAI Roberto Mange



Goiânia, v.5, n.10, ano 5, jul/dez 2011.

REVISTA **Processos Químicos**

Ano 5
nº 10
Jul/Dez
2011

Pedro Alves de Oliveira

Presidente do Conselho Regional do SENAI

Paulo Vargas

Diretor Regional do SENAI

Manoel Pereira da Costa

Diretor de Educação e Tecnologia

Ítalo de Lima Machado

Gerente de Educação Profissional

Francisco Carlos Costa

Diretor da Faculdade de Tecnologia SENAI Roberto Mange

Joana Darc Silva Borges

Coordenadora da Área de Química

Corpo Editorial

Ademir João Camargo

Anselmo Eucana de Oliveira

Carlito Lariucci

Carlos Kleber Zago de Andrade

Eurípedes de Almeida Ribeiro Júnior

Gilberto Lúcio Benedito Aquino

Guilherme Roberto de Oliveira

Hamilton Barbosa Napolitano

Joana Darc Silva Borges

José Daniel Gonçalves Vieira

Kleber Carlos Mundim

Manoel Pereira da Costa

Maria Assima Bittar Gonçalves

Roberta Signini

Solemar Silva Oliveira

Revista Processos Químicos / SENAI.

Departamento Regional de Goiás - v.5,
n.10 (jul/dez, 2011). Goiânia: SENAI/
DR. Gerência de Educação Profissional /
Faculdade de Tecnologia SENAI Roberto
Mange, 2011.
v.: il.

Semestral

Capa e diagramação: Lads Design.

ISSN 1981-8521

1. Educação Profissional - Periódicos. 2.
Processos Químicos.

I. SENAI. Departamento Regional de Goiás

CDD - 540

Tiragem: 2.000 exemplares

Faculdade de Tecnologia SENAI Roberto Mange

Av. Engenheiro Roberto Mange, nº 239

Bairro Jundiá - CEP 75113-630 - Anápolis-GO

Fone: (62) 3902-6200 - Fax: (62) 3902-6226

e-mail: revistapq.senai@sistefieg.org.br



www.senaigo.com.br

ARTIGO CONVIDADO

- 09 *Desenhos de Novos Compostos com Potencial Atividade Biológica*
Ricardo Gargano, Alexandre A. N. Paula, Luiz A. S. Romeiro, Érica C. M. Nascimento, Alessandra S. Kiametis, Maria L. Santos, Newton G. Castro, Luciana C. Nascente & João B. L. Martins

ARTIGOS GERAIS

- 25 *Imobilização Covalente na Superfície de Sílica Gel da Enzima β -1,3-Glucanase Produzida por Trichoderma Harzianum.*
Fernando A. Silva, Edésio F. C. Alcântara & Valdirene N. Monteiro
- 35 *Dietary and Socioeconomic Factors Associated with Iron Concentration in Human Colostrum*
Renata M. Gonçalves, José R. Gonçalves & Nélide S. Fornés
- 44 *Identificação do Flavonóide 7,4'-Dimetoxi-Quercentina-3-O-B-D-Glicopiranosídeo e Avaliação da Atividade Antitumoral dos Frutos*
Guilhermina C. Nascimento, Antônio C. S. Menezes & Elizangela P. P. Lacerda
- 56 *Estudo dos Processos de Intercalação de Água em Nanosilicatos Sintéticos Utilizando Radiação Síncrotron*
Luciano Ribeiro, Geraldo J. Silva, Maria S. P. Mundim, Marcelo H. Sousa, Jon O. Fossum & Kleber C. Mundim

RESUMO ESTENDIDO

75

Análise do Desempenho de Inibidores de Corrosão à Base de Misturas de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, ZnSO_4 e Uréia na Proteção do Aço-Carbono

João P. Pina, Kenia F. Barbosa, Leonardo R. Almeida, Rafaella S. Costa, Tatiane P. Cardoso & Valéria C. Silva

OPINIÃO

81

Inovação Tecnológica

Ivan G. Teixeira

84

SENAI: Resultados e Visão de Futuro

Gustavo L. S. Filho

86

Contribuição da FATEC Senai Roberto Mange para o Desenvolvimento Tecnológico

João F. S. Mendes

88

Porque Investir em Tecnologia no Setor Farmoquímico?

Angelo H. L. Machado & Wender A. Silva

Apresentação

O Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial - SENAI, com a missão de *promover a educação profissional e tecnológica, a inovação e a transferência de tecnologias industriais, contribuindo para elevar a competitividade da indústria brasileira*, tem assumido buscar soluções para demandas socialmente definidas de qualificação, P&D e inovação tecnológica. Nesse contexto, os projetos de P&D tornam-se uma importante possibilidade de transferência de tecnologia para os diversos setores produtivos que fazem uso da biotecnologia em seus processos produtivos. No campo da inovação, o Programa SENAI de Inovação busca integrar a rede de serviços tecnológicos dos centros da entidade às demandas da indústria brasileira. Essa ação conjunta vem permitindo uma nova abordagem da produção e difusão do conhecimento para a competitividade nacional.

A inovação tecnológica é a introdução no mercado de um novo produto ou processo, ou de uma versão melhorada de um produto ou processo existente e, de forma geral, compreende: (1) as atividades internas e externas de Pesquisa e Desenvolvimento (P&D), (2) a aquisição externa de P&D e outros conhecimentos externos, (3) o projeto industrial e (4) outras preparações técnicas para a produção e a distribuição. Inovação tecnológica, portanto, pode ser vista como sinônimo de geração de riquezas para uma região, especialmente para seus segmentos produtivos, e para a sociedade e suas entidades privadas e públicas. As atividades de P&D englobam a pesquisa em ciências básicas e aplicadas visando obter novas aplicações inovadoras, a instalação de novos processos, sistemas e serviços, e ainda a melhora substancial do que já existe ou está instalado, com base no conhecimento disponibilizado através das pesquisas básica e aplicada.

A Revista Processos Químicos (RPQ) chega ao seu Décimo Volume apresentado, como Artigo Convidado, o texto *Desenhos de Novos Compostos com Potencial Atividade Biológica* que descreve uma importante ferramenta para o desenvolvimento de novos candidatos a inibidores da enzima acetilcolinesterase. Os seguintes temas são abordados nos Artigos Gerais: imobilização enzimática, isolamento e identificação de flavonóides e análise do desempenho de inibidores de corrosão. Todos os temas são relevantes para o setor produtivos a fim à Química Industrial. Na Seção de Opinião, temos três textos: *SENAI: Resultados e Visão de Futuro*; *Contribuição da FATEC SENAI Roberto Mange para o Desenvolvimento Tecnológico*; e *Inovação Tecnológica*. Fica evidente que a trajetória da RPQ corrobora e fortalece a atuação do SENAI alinhada como a Inovação Tecnológica.

Francisco Carlos Costa
Diretor da FATEC SENAI RM

Desenhos de Novos Compostos com Potencial Atividade Biológica

Ricardo Gargano, Alexandre A. N. Paula, Luiz A. S. Romeiro, Érica C. M. Nascimento, Alessandra S. Kiametis, Maria L. Santos, Newton G. Castro, Luciana C. Nascente & João B. L. Martins

Neste trabalho apresentamos um estudo sobre novos candidatos a inibidores da enzima acetilcolinesterase obtidos a partir dos lipídeos fenólicos não-isoprenóides do líquido da casca da castanha de caju (*Anacardium occidentale*). Foram investigados, através do cálculo de estrutura eletrônica, Padrões de Estruturas Moleculares (PEM) composto por 15 moléculas derivadas do cardanol (PEM2) com os grupos substituintes O-metila, O-acetila, O-(N,N-dimetilcarbamoila), N,N-dimetilamina, N,N-dietilamina, pirrolidina, piperidina e N-benzilamina em seu carbono benzílico. As propriedades eletrônicas, tais como energias (HOMO, LUMO, HOMO-1, LUMO+1 e derivados), distribuições de cargas (anel benzênico, oxigênio 56, carbono 11, nitrogênio das aminas secundárias, entre outras), foram obtidas usando os níveis de cálculos RHF e B3LYP com os conjuntos de funções de base 6-31G, 6-31G(d), 6-31+G(d),6-311G(d,p) 6-311G(2d,p) e 6-311+G(2d,p). Os resultados obtidos revelam que os derivados do PEM2, formadas com as substituições acetila, N,N-dimetilformamida, N,N-dimetilamina e pirrolidina, são as estruturas que mais se correlacionam com o fármaco amplamente utilizado como inibidor da acetilcolinesterase contra a doença de Alzheimer (rivastigmina).

Palavras-chave: *Inibidores da Acetilcolinesterase, Análise de Componentes Principais, Doença de Alzheimer, Cardanol.*

In this work, we have studied new potential candidates of acetylcholinesterase (AChE) inhibitors designed from cardanol, a non-isoprenoid phenolic lipid of cashew *Anacardium occidentale* nut-shell liquid. From electronic structure calculations, we investigated fifteen molecules derivative from cardanol (PEM2) with the methyl, acetyl, O-(N,N-dimethylcarbamoil), N,N-dimethylamine, N,N-diethylamine, piperidine, pyrrolidine, and N,N-methylbenzylamine substitute groups. Electronic properties such as energies (HOMO, LUMO, HOMO-1, LUMO+1 and derivatives) and charge distributions (charge of aromatic ring, charge of C₁₁, charge of O₅₆, and charge of nitrogen), were performed using both Restricted-Hartree-Fock and B3LYP methods with the following basis sets: 6-31G, 6-31G(d),6-31+G(d),6-311G(d,p) 6-311G(2d,p) and 6-311+G(2d,p). The obtained results show that PEM2 derivatives (formed with acetyl, O-(N,N-dimethylcarbamoil), N,N-dimethylamine and pyrrolidine groups) are the structures that were better correlated to and represent possible AChE inhibitors against Alzheimer disease.

Palavras-chave: *Acetylcholinesterase Inhibitors, Principal Component Analysis, Alzheimer Disease, Cardanol.*

Introdução

O aumento da expectativa de vida da população brasileira nas últimas décadas tem contribuído para maior prevalência no diagnóstico de casos da doença de Alzheimer (DA), considerada a principal causa de demência entre pessoas de faixa etária acima dos 65 anos de idade (com faixas de 50% a 60% dos casos)¹ (forma esporádica) e até mesmo em pessoas mais jovens, de forma precoce de 40 anos. Sua natureza crônica e progressiva e compromete gravemente a qualidade de vida dos portadores. Com a evolução da doença, há um declínio cognitivo contínuo, instalando-se múltiplas perturbações, incluindo memória, atenção, aprendizado, pensamento, orientação, compreensão, cálculo, linguagem e julgamento. O comprometimento dessas funções vem normalmente acompanhado, e ocasionalmente precedido, por deterioração do controle emocional e comportamento social.

A demência interfere nas atividades do dia-a-dia do paciente, tais como: atividades fisiológicas, vestimenta, alimentação e higiene pessoal entre outras. A DA também compromete gravemente a relação do paciente com a família, pois muitas vezes o paciente não reconhece seus familiares, que acaba por ser uma das causas de abandono e transferência destes pacientes para asilos de idosos. Segundo dados de projeção do IBGE para o período de 1980-2050², o Brasil possuirá cerca de 18,6 milhões de pessoas em 2009 com mais de 60 anos de idade. Estimativas de 2001³ mostram que 4, 6% da população com mais de 60 anos de idade da América Latina apresentam casos de demência onde particularmente a partir dos 75 anos, taxas bastante expressivas de até 36,7% tem sido encontradas³. Estima-se que 2% a 4% da população com mais de 65 anos apresentem DA, aumentando drasticamente com a idade a partir dos 75 anos^{1, 3, 4}.

Do ponto de vista histopatológico, a DA consiste em um distúrbio neurodegenerativo caracterizado pela presença de placas senis, acúmulos esféricos da proteína beta amiloide⁵, apresentando atrofia e degeneração dos neurônios colinérgicos subcorticais, principalmente aqueles na parte basal do prosencéfalo (núcleo basal de Meynert), que conferem inervação colinérgica a todo córtex cerebral⁵⁻⁸.

Bioquimicamente, a DA é uma patologia decorrente da redução dos níveis de acetilcolina (ACh) no processo

sináptico, diminuição da neurotransmissão colinérgica cortical e, em menor extensão, a diminuição de outros neurotransmissores como noradrenalina, dopamina, serotonina, glutamato e substância P^{9, 10}. A hipótese colinérgica¹¹⁻¹³ é a teoria bioquímica mais aceita mundialmente e a primeira forma racional de tratamento, para esta neuropatologia. Ela consiste na restauração do nível do neurotransmissor ACh encontrado em baixas concentrações no cérebro de pacientes portadores da DA. Esta restauração pode ser feita através da inibição reversível das colinesterase, acetilcolinesterase (AChE) e butilcolinesterase (BChE), enzimas que naturalmente catabolizam a acetilcolina liberada no processo de neurotransmissão^{12, 13}.

Entre os agentes químicos com perfil anti-colinesterásico que apresentaram resultados promissores para o tratamento da DA encontram-se os inibidores da acetilcolinesterase (AChEI), a exemplo da tacrina (Cognex), donepezil (Aricept), fisostigmina e o produto natural galantamina (Reminyl), recentemente aprovado pelo FDA (do inglês “Food and Drug Administration”) (Fig. 1). A tacrina foi o primeiro fármaco sintético aprovado pelo FDA, entretanto, devido aos sérios efeitos colaterais provocados, sua utilização está sendo bastante limitada⁵.

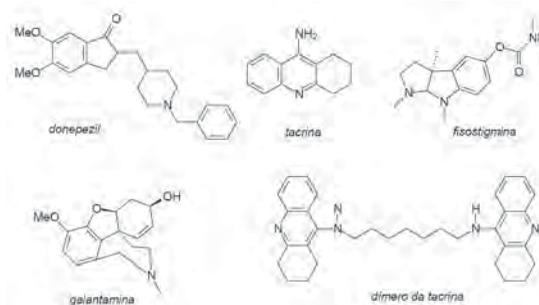


Figura 1. Inibidores da acetilcolinesterase (AChE).

A busca por novas entidades químicas úteis tratamento DA tem recebido grande atenção da Física e Química Medicinal. Entretanto, poucas entidades superaram as etapas de ensaios pré-clínicos e clínicos. As estratégias de modificação estrutural de protótipos naturais e/ou hibridização molecular tem sido muito exploradas e já lograram alguns protótipos mais eficientes (mais seletivos e menos tóxicos) que os fármacos comerciais¹⁴⁻²⁰.

No âmbito de uma linha de pesquisa que visa o

emprego dos lipídeos fenólicos não isoprenóides do cajueiro (*Anacardium occidentale*), como matéria-prima na preparação de compostos com maior valor agregado, o presente estudo objetiva a utilização destes lipídeos fenólicos não isoprenóides do líquido da casca da castanha (LCC), na obtenção racional de novos agentes terapêuticos inibidores da enzima AChE, candidatos úteis ao tratamento da DA.

O cajueiro, única espécie cultivada e de maior dispersão do gênero, pode ser em diversos ecossistemas do nordeste brasileiro, principalmente nas zonas costeiras, fazendo parte da vegetação de praias e dunas e nas formações de restinga. Apesar de cultivada em mais de vinte países, em termos de importância sua exploração restringe-se ao Brasil, Índia, Vietnã, Tanzânia, Indonésia, Moçambique e Guiné-Bissau, sendo a produção brasileira cerca de 19% em relação à mundial. O principal centro de diversidade do gênero *Anacardium* é a região amazônica (florestas úmidas, matas de galeria e cerrado), com um centro secundário de diversidade nos cerrados (Planalto Central)²¹. O cultivo do cajueiro representa para o Nordeste uma atividade de elevada importância econômica e social, com uma área plantada estimada em 680 mil hectares e uma produção de 150 mil toneladas de castanha de caju que proporciona uma exportação da ordem de 30 mil toneladas de amêndoas, gerando divisas de 140 milhões de dólares, tendo os estados do Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte como os mais representativos em termos de produção.

No processo de industrialização da castanha de caju para obtenção da amêndoa, fonte rica de proteínas e componentes graxos, isola-se o LCC, um material de grande interesse como matéria-prima na fabricação de inseticidas, germicidas, antioxidantes, isolantes térmicos, material de atrito, plastificantes, tensoativos, tintas, vernizes entre outros²²⁻²⁴. Recentemente, o LCC tem sido utilizado como aditivo para combustíveis e lubrificantes²⁵. Em função da excelência de mercado para a amêndoa, esse subproduto do processamento industrial da castanha de caju é um importante produto da pauta de exportação do Brasil. Entretanto, devido os preços irrisórios praticados pelo mercado de exportação por vezes torna-se rejeito da cajucultura²¹. O LCC é um óleo viscoso e acre que compreende 25% do peso do fruto *in natura*, sendo uma das fontes mais ricas de lipídeos fenólicos não isoprenóides, tais como ácidos anacárdicos,

cardóis, cardanóis e metilcardóis²⁶. Do ponto de vista químico, os lipídeos fenólicos do LCC configuram-se como uma matéria-prima versátil para uma série de transformações químicas, devido à natureza dualística - caráter aromático e acíclico -, aliado à existência de diversos grupos funcionais no anel aromático e múltiplas instaurações na cadeia alifática em C-8 (Fig. 2).

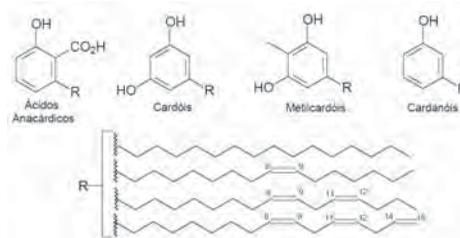


Figura 2. Lipídeos fenólicos não isoprenóides constituintes do LCC.

Os derivados fenólicos do LCC constituem um sistema biofórico natural compreendendo características eletrônicas e hidrofóbicas, as quais são requisitos estruturais relevantes ao reconhecimento molecular pela enzima acetilcolinesterase (AChE). Em adição, esses lipídeos fenólicos são susceptíveis a uma série de transformações químicas.

A importância industrial do LCC é refletida em centenas de patentes internacionais e trabalhos publicados, envolvendo a sua caracterização e utilização. Essa versátil matéria-prima vem sendo empregada em diversos projetos de pesquisa com resultados promissores²⁷⁻³⁴. Recentemente, foram solicitados pedidos de patente nacional e internacional para derivados úteis como absorvedores de radiação ultravioleta a partir do LCC, cuja titularidade da propriedade intelectual é compartilhada entre a UCB, a UnB e a UFRJ^{35, 36}.

Os compostos-alvo foram planejados a partir da estratégia de hibridação molecular de inibidores da enzima AChE de forma a gerar um novo padrão molecular pertencente a essa classe terapêutica.

O PADRÃO MOLECULAR 2

O padrão molecular 2 (PM2) envolve a hibridação molecular entre a subunidade farmacofórica primária da rivastigmina (a) e a subunidade farmacofórica secundária que compreende a cadeia alquílica lateral do acetato de espectralina (b) (Fig. 3).

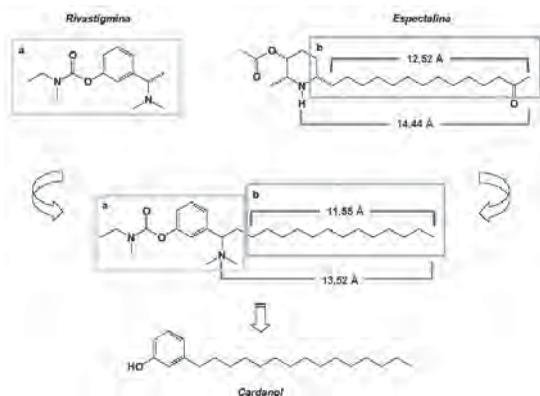


Figura 3. Planejamento estrutural de novos candidatos a AChEI do tipo PM2.

De modo a avaliar o perfil de reconhecimento molecular dos novos derivados foram planejadas algumas séries variando-se o padrão de substituição do grupo R para a hidroxila fenólica do cardanol bem como variação das aminas secundárias que compreende o reconhecimento molecular pelo resíduo Trp84. Quanto aos substituintes do grupo fenólico foram planejadas três séries com: metila, acetila e N,N-dimetilcarbamofila. Considerando as aminas secundárias foram selecionadas aminas alicíclicas e heterocíclicas tais como N,N-dimetilamina, N,N-dietilamina, pirrolidina e piperidina, visando estudar a liberdade conformacional destes compostos e aminas aromáticas como a N-metilbenzilamina, a qual apresenta um grupo aromático que pode interagir com o resíduo Trp84 (W84) ou Phe330 (F330) (Fig. 4) através de interações T ou empilhamento³⁷.

A partir dessas variantes planejadas do cardanol será feito um estudo de caracterização de padrões em relação à rivastigmina, um inibidor potencialmente ativo da AChE, para uma caracterização das possíveis estruturas no tratamento de DA. Este estudo se baseia no cálculo das propriedades eletrônicas, tais como HOMO, LUMO, GAP(HOMO-LUMO), carga, calor de formação entre outras dos derivados do cardanol e da rivastigmina usando o nível de cálculo Hartree-Fock-Restrito³⁸ e várias bases diferentes, a partir de estruturas otimizadas com método semi-empírico PM3³⁹ provenientes da aproximação NDDO. A partir da comparação dos resultados obtidos dos derivados do cardanol com os da rivastigmina será possível: identificar quais grupos substituintes mais contribuirão para tornar análogos

do cardanol inibidores potencialmente ativos para o reconhecimento molecular pela AChE, minimizando os possíveis efeitos indesejáveis.

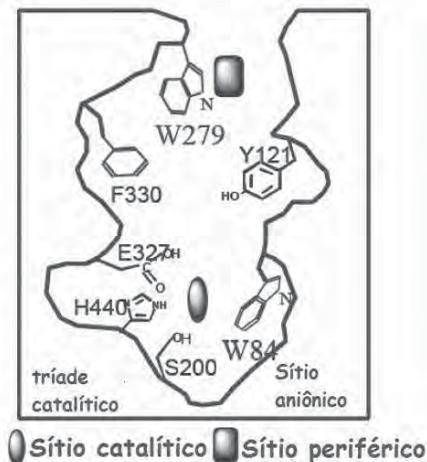


Figura 4. Esquema da AChE mostrando a tríade catalítica.

O Problema Molecular

Para descrever quanticamente um sistema molecular constituído por N elétrons e M núcleos, via equação de Schrödinger estacionária e sem correções relativísticas, podemos recorrer ao hamiltoniano (em unidades atômicas):

$$\hat{H} = - \sum_{i=1}^N \frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_{A=1}^M \frac{1}{2M_A} \nabla_A^2 - \sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{r_{iA}}, \quad (1)$$

$$+ \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j>i}^N \frac{1}{r_{ij}} + \sum_{A=1}^{M-1} \sum_{B>A}^M \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}},$$

onde os índices i e j referem-se aos elétrons, e os índices A e B , aos núcleos. As massas dos elétrons são indicadas por m_e , e as massas dos núcleos, por M_A . As distâncias entre dois núcleos, entre um núcleo e um elétron, e entre dois elétrons são, respectivamente, indicadas por R_{AB} , r_{iA} e r_{ij} .

Infelizmente, a interação elétron-núcleo é forte, e por isso não pode ser desprezada. Desta forma, o termo $\sum_{A=1}^M \sum_{i=1}^N \frac{Z_A}{r_{iA}}$, na expressão (1) não nos permite separar o hamiltoniano em uma parte eletrônica e outra nuclear, o que tornaria possível escrever a função de onda da molécula como um produto de duas funções de onda: uma nuclear e uma eletrônica.

A equação de Schrödinger molecular, com a hamiltoniana (1), é praticamente impossível de ser

resolvida sem aproximações, mesmo utilizando métodos numéricos. Entretanto, sabemos que os núcleos são muito mais massivos que os elétrons, e por isso, estes últimos movem-se muito mais rápido que os primeiros. Assim, podemos tornar paramétrica a dependência em \vec{R} do termo $\sum_{A=1}^M \sum_{i=1}^N \frac{Z_A}{r_{iA}}$, na expressão (1) e, então, propor a seguinte aproximação para a função de onda completa:

$$\Psi(\vec{r}, \vec{R}) = \phi(\vec{r}; \vec{R}) \xi(\vec{R}), \quad (2)$$

onde $\phi(\vec{r}; \vec{R})$ representa a função de onda eletrônica, dependente apenas parametricamente das coordenadas nucleares, e $\xi(\vec{R})$ representa a função de onda nuclear. A equação (2) é conhecida como expansão adiabática.

Substituindo a expressão (2) na equação (1) e considerando que $\nabla_A \phi(\vec{r}, \vec{R})$ e $\nabla_A^2 \phi$ sejam iguais a zero, podemos desacoplar a equação de Schrödinger, com a hamiltoniana (1), em duas outras: uma eletrônica, e outra nuclear. Este desacoplamento é conhecido como Aproximação de Born-Oppenheimer (A.B.O.). Dentro da A.B.O. a equação eletrônica é dada por:

$$\left[\sum_{i=1}^N \frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_{A=1}^M \sum_{i=1}^N \frac{Z_A}{r_{Ai}} + \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j>i}^N \frac{1}{r_{ij}} \right] \phi(\vec{r}; \vec{R}_a) = \epsilon(\vec{R}_a) \phi(\vec{r}; \vec{R}_a), \quad (3)$$

onde $\phi(\vec{r}; \vec{R}_a)$ e $\epsilon(\vec{R}_a)$ são, respectivamente, a função de onda eletrônica e sua correspondente energia eletrônica, para uma molécula cujos núcleos encontram-se numa determinada configuração \vec{R}_a .

A expressão (3) é a equação de Schrödinger eletrônica independente do tempo, que deve ser resolvida para cada configuração nuclear, fornecendo-nos um conjunto de funções de onda eletrônicas e suas respectivas energias eletrônicas.

A equação nuclear é dada por:

$$\left[\sum_{A=1}^M \frac{1}{2M_A} \nabla_A^2 + V(\vec{R}) \right] \xi(\vec{R}) = E \xi(\vec{R}), \quad (4)$$

onde

$$V(\vec{R}) = \sum_{A=1}^{M-1} \sum_{B>A}^M \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} + \epsilon(\vec{R}), \quad (5)$$

constitui a superfície de energia potencial (SEP), que é obtida a partir de um ajuste das energias eletrônicas para uma forma analítica.

A expressão (4) é a equação de Schrödinger nuclear independente do tempo. Suas solução $\xi(\vec{R})$ descrevem a

vibração, a rotação e a translação de uma molécula.

Assim, o movimento dos núcleos de uma molécula é regido pela SEP. Esta traz informações sobre o potencial de interação entre os núcleos e sobre a energia eletrônica. Na seção seguinte, serão descritos de forma resumida as duas metodologias utilizadas para resolver a equação de Schrödinger eletrônica para os derivados do cardanol e a rivastigmina.

SOLUÇÃO DA EQUAÇÃO DE SCHRÖDINGER ELETRÔNICA

Existem na literatura vários métodos para resolver a equação de Schrödinger eletrônica³⁸. Nesta seção, descreveremos de forma sucinta somente dois principais métodos que utilizamos neste trabalho: Hartree-Fock-Restrito e B3LYP. A equação de Hartree-Fock (6) é uma equação não-linear, visto que o operador de Fock depende de suas autofunções (deve ser resolvida de forma iterativa) e é dada por

$$f(\vec{r}_1) \phi_i(\vec{r}_1) = \epsilon_i \phi_i(\vec{r}_1). \quad (6)$$

Introduzindo um conjunto de K conhecidas funções de base $\{\psi_\mu(\vec{r}) \mid \mu = 1, 2, \dots, K\}$ e expandindo os desconhecidos orbitais moleculares numa expansão linear, obtemos a seguinte equação de Hartree-Fock-Roothaan⁴⁰

$$\phi_i = \sum_{\mu=1}^K C_{\mu i} \psi_\mu \quad i = 1, 2, \dots, K \quad (7)$$

em que, $C_{\mu i}$ são os coeficientes das K funções de bases a serem determinadas.

Se o conjunto $\{\psi_\mu\}$ fosse completo, esta seria uma expansão exata, e qualquer conjunto completo $\{\psi_\mu\}$ poderia ser utilizado. Infelizmente, este é sempre restrito, por razões práticas computacionais, as K funções de base são um conjunto finito. Como tal, é importante escolher uma base que irá proporcionar, tanto quanto for possível, uma expansão suficientemente “exata” para orbitais moleculares $\{\phi_i\}$, particularmente, para os orbitais moleculares $\{\phi_i\}$ que estão ocupados em $|\Phi_0\rangle$ e determinar o estado fundamental da energia E_0 . As funções mais utilizadas para estudos de sistemas moleculares são as funções do tipo gaussianas, que são definidas pela equação 8, como:

$$\psi(x, y, z)_\mu = \kappa x^l y^m z^n e^{-\alpha r^2} \quad (8)$$

em que, l , m e n são número inteiros que combinados representam as funções do tipo s , p , d e f , $r = (x^2 + y^2 + z^2)^{1/2}$ e κ é uma constante de normalização.

Nosso problema do cálculo orbitais moleculares de Hartree-Fock se reduz ao cálculo dos coeficientes de expansão $C_{\mu i}$. Podemos obter uma matriz $C_{\mu i}$ que substitui a expansão linear da Eq. (7) na equação Hartree-Fock (6) temos

$$f(1) \sum_{\mu}^K C_{\mu i} \psi_{\mu}(1) = \epsilon_i \sum_{\mu}^K C_{\mu i} \psi_{\mu}(1), \quad (9)$$

Multiplicando $\psi_{\nu}^*(1)$ pelo lado esquerdo e integrando, nos transformamos a equação diferencial numa equação matricial

$$\sum_{\mu}^K C_{\mu i} \int d\vec{r}_1 \psi_{\nu}^*(1) f(1) \psi_{\mu}(1) = \epsilon_i \sum_{\mu}^K C_{\mu i} \int d\vec{r}_1 \psi_{\nu}^*(1) \psi_{\mu}(1), \quad (10)$$

tomando $S_{\nu\mu} = \int d\vec{r}_1 \psi_{\nu}^*(1) \psi_{\mu}(1)$, uma matriz hermitiana (assumimos as funções de bases $\{\psi_{\mu}\}$ ortogonais), e a matriz $F_{\nu\mu} = \int d\vec{r}_1 \psi_{\nu}^*(1) f(1) \psi_{\mu}(1)$, também Hermitiana.

Reescrevendo a equação de Hartree-Fock na forma matricial, temos:

$$\sum_{\mu}^K F_{\nu\mu} C_{\mu i} = \epsilon_i \sum_{\mu}^K S_{\nu\mu} C_{\mu i} \quad i = 1, 2, \dots, K \quad (11)$$

ou de forma mais compacta como

$$FC = \epsilon SC. \quad (12)$$

O método utilizado na resolução da equação (12) é o chamado método do Campo Auto-Consistente³⁸. Esse método consiste em calcular, a partir de uma escolha inicial arbitrária de um conjunto de orbitais de *spin* moleculares χ_i , o potencial Hartree-Fock v^{HF} visto por cada elétron e então resolver a equação (6). Com esse novo conjunto de orbitais de *spin* moleculares repete-se o procedimento, de forma interativa, até que seja encontrado um valor que convirja a densidade de eletrônica e/ou a energia do sistema³⁸.

A essência da aproximação de Hartree-Fock está no fato de considerarmos que cada elétron de um átomo, ou de uma molécula, interage com os outros por meio de um campo médio. Utilizando esta aproximação é possível obter até 99% da energia do estado fundamental no cálculo de estrutura eletrônica molecular. Para a obtenção

do restante dessa energia, de extrema importância no estudo de muitas propriedades químicas das moléculas, é necessária a utilização de métodos mais precisos, que incluam os efeitos da correlação eletrônica. Entretanto, a importância da aproximação de Hartree-Fock não se reduz, já que a maioria dos métodos utilizados na busca dessa energia restante tem a método Hartree-Fock como ponto de partida (métodos pós Hartree-Fock).

Além do método Hartree-Fock, utilizamos o método do funcional de densidade na aproximação B3LYP. Este funcional densidade na aproximação B3LYP⁴¹⁻⁴³ é um método híbrido que utiliza a aproximação de Hartree-Fock para expressar a troca e fórmulas da teoria do funcional densidade para a correlação de troca. Esse funcional é composto pelo funcional de Becke, composto por três parâmetros de Becke⁴², que tem termos para a troca e correlação oriundos de outros funcionais e da teoria de Hartree-Fock, juntamente com o funcional de correlação de LYP (Lee, Yang e Parr)⁴³, que é a correlação não-local do funcional, incluindo termos de correlação local e não local.

Análise de Componentes Principais

O problema de muitos dados é comum em diversas áreas da ciência e tecnologia, onde encontramos sistemas com muitas variáveis, em que todas precisam ser analisadas. O homem possui capacidade de realizar este tipo de análise, uma vez que toda nossa aprendizagem está relacionada com a capacidade cerebral de identificar, isolar, associar objetos concretos e conceitos de forma a definir padrões. Essa capacidade humana é tema de pesquisas em várias áreas da ciências. Bons exemplos são redes neurais⁴⁴⁻⁴⁸ e a inteligência artificial⁴⁹.

Para um estudo de dados multivariados, existem inúmeras técnicas disponíveis na literatura⁵⁰, desta forma é necessária uma escolha cautelosa, pois cada método tem suas peculiaridades que podem trazer dificuldades na análise final dos dados. Existe uma diferença marcante entre os métodos, que podem ser classificados em dois grupos: os das “variável-dirigidas” onde o relevante, durante a análise, é a relação entre as variáveis, e os “indivíduo-dirigidas” que aborda principalmente as relações entre os indivíduos.

O papel principal da análise multivariada é reduzir

a grande quantidade de dados para um número menor de parâmetros significativos, para fornecer uma visão estatisticamente privilegiada do conjunto de dados. Por exemplo, em um composto orgânico, são necessários diferentes tipos de dados para determinação de algum processo de atividade biológica, como as energias dos orbitais LUMO e HOMO, a densidade de estados, o calor de formação, etc. Então, para realizar uma análise, nos perguntamos: quais desses dados são, ou não, relevantes para o processo? Para isso, escolhemos um método estatístico de análise multivariada, como a análise de componentes principais (PCA do inglês “*Principal Component Analysis*”)^{50,51}.

Para examinar as relações entre um conjunto de variáveis correlacionadas, transformamos o conjunto de variáveis originais para um conjunto de variáveis não correlacionadas, chamadas componentes principais (PC do inglês “*principal components*”). A técnica para obter as componentes principais é chamada PCA. As componentes principais são obtidas em ordem decrescente de importância, pois a primeira componente é a combinação linear das variáveis com maior variância nos dados originais.

A PCA foi desenvolvida por Karl Pearson início do século XX⁵², e aperfeiçoada em 1930 por Harold Hotelling e colaboradores⁵³. Em resumo, o objetivo desta técnica é verificar se algumas poucas componentes principais respondem pela maior parte das variáveis originais. Se isso ocorre, a dimensionalidade efetiva do problema é drasticamente reduzida se comparada com a dimensionalidade original. Em outras palavras, muitas das variáveis originais estavam correlacionadas. Assim poucas componentes são realmente significativas, podendo ajudar-nos na melhor compreensão dos dados que serão úteis nas análises subsequentes, uma vez que trabalharemos com um número muito menor de dados.

CÁLCULO DAS COMPONENTES PRINCIPAIS E SUAS RESPECTIVAS VARIÂNCIAS

Vamos descrever o nosso conjunto de dados constituído por N indivíduos (estruturas) caracterizados por M variáveis (propriedades das estruturas) do tipo medidas quantitativas. Este grupo de dados conduz a um quadro de partida dissimétrico X cujo termo geral x_{nm} representa o valor tomado pela m -ésima variável no indivíduo n .

Tabela 1. Matriz do conjunto de dados iniciais. As linhas representam os indivíduos (*indivíduos* n) e as colunas as variáveis (*variáveis* m).

	Variável 1	Variável 2	...	Variável M
Indivíduo 1	x_{11}	x_{12}	...	x_{1M}
Indivíduo 2	x_{21}	x_{22}	...	x_{2M}
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
Indivíduo N	x_{N1}	x_{N2}	...	x_{NM}

Frequentemente é necessária uma modificação do quadro de partida, quando a dispersão das variáveis é muito diferente ou quando as variáveis diferem quanto à sua natureza sendo expressas em unidades de medida não comparáveis. Para ultrapassar este problema vamos fazer um tratamento dos dados iniciais, reduzindo as variáveis, ou seja, tornando elas adimensionais com média nula e variância unitária.

O termo geral do conjunto de dados modificado, é dado por:

$$y_{nm} = \frac{x_{nm} - \bar{x}_m}{\sigma_m} \quad (13)$$

Onde \bar{x}_m é a média aritmética dos valores tomados pela variável m e σ_m é o desvio padrão da variável m .

$$\bar{x}_m = \frac{\sum_{n=1}^N x_{nm}}{N} \quad (14)$$

$$\sigma_m = \sqrt{\frac{\sum_{n=1}^N (x_{nm} - \bar{x}_m)^2}{N - 1}} \quad (15)$$

A partir deste tratamento inicial dos dados podemos chegar a matriz de covariância $C(Y)$, encontrada a partir do produto da matriz transposta Y^T pela matriz Y , formando uma matriz simétrica com ordem $M \times M$.

$$C(Y)_{M \times M} = Y_{M \times N}^T Y_{N \times M} \quad (16)$$

assim temos,

$$C(Y) = Y^T Y \quad (17)$$

$$C(Y) = \begin{pmatrix} c_{11} & c_{12} & \cdots & c_{1M} \\ c_{21} & c_{22} & \cdots & c_{2M} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ c_{M1} & c_{M2} & \cdots & c_{MM} \end{pmatrix} \quad (18)$$

O termo geral da matriz de covariância fica:

$$c_{mm'} = \sum_{n=1}^N \left(\frac{x_{nm} - \bar{x}_m}{\sigma_m} \right) \left(\frac{x_{nm'} - \bar{x}_{m'}}{\sigma_{m'}} \right), \quad (19)$$

onde $c_{mm'}$, para $m \neq m'$, representa a covariância da variável m com a variável m' para $m = m'$ representa a variância da variável m .

A matriz $C(Y)$ capta as correlações entre todos os pares de variáveis possíveis. Os termos da diagonal principal de $C(Y)$ são a variância de um tipo particular de variável. Quanto maior os valores da diagonal principal maior será a nossa variância, que é uma medida da sua dispersão estatística, indicando quão longe em geral os seus valores se encontram do valor esperado. Os termos de fora diagonal de $C(Y)$ são os termos da covariância (covariância é definida como uma medida de como duas variáveis variam conjuntamente) entre os termos da medição. Quanto menor o valor de um termo de fora da diagonal principal menor será a correlação entre duas variáveis. Então temos que maximizar os termo da diagonal principal e minimizar os de fora dela, como as covariâncias não podem ser negativas, então o ótimo dessa situação e diagonalizar está matriz. Para fazer isto da maneira mais fácil, o método escolhido por PCA é considerar que a matriz P (matriz formada pelas componentes principais) é formada por vetores de base ortogonais. Ou seja, a matriz P e uma matriz ortogonal. Para encontrarmos P , basta calcularmos os autovetores da matriz $C(Y)$ onde cada autovetor são os coeficientes de uma PC relacionada a um autovalor que é a variância desta componente principal. Então para termos a componente de maior relevância basta encontrar o autovetor do maior autovalor. Numa visão mais simples, funciona como uma rotação generalizada para alinhar a base com a máxima variância do eixo.

$$CP = VP, \quad (20)$$

A matriz P , de dimensão $M \times M$, contém M vetores dispostos em colunas, cada um com comprimento M , que representam os M autovetores da matriz de covariância C . Os autovalores e autovetores estão ordenados e pareados. O m -ésimo autovalor corresponde ao m -ésimo autovetor. Vamos reordenar os autovalores e autovetores mantendo a mesma relação entre eles. Colocando a matriz V , dos autovalores, em ordem decrescente de autovalor. Assim teremos,

$$V = \begin{pmatrix} \text{Variância da PC1} & 0 & \dots & 0 \\ 0 & \text{Variância da PC2} & \dots & 0 \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 0 & 0 & \dots & \text{Variância da PCM} \end{pmatrix} \quad (21)$$

onde $\text{Variância da PC1} \geq \text{Variância da PC2} \geq \dots \geq \text{Variância da PCM}$. Mantendo a mesma relação para a matriz P , teremos,

$$P = \begin{pmatrix} p_{11} & p_{12} & \dots & p_{1M} \\ p_{21} & p_{22} & \dots & p_{2M} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ p_{M1} & p_{M2} & \dots & p_{MM} \end{pmatrix} \quad (22)$$

onde os elementos de cada vetor coluna da matriz P são os coeficientes de uma PC. Assim temos,

	PC1	PC2	...	PCM
Peso da variável 1	p_{11}	p_{12}	...	p_{1M}
Peso da variável 2	p_{21}	p_{22}	...	p_{2M}
...
Peso da variável M	p_{M1}	p_{M2}	...	p_{MM}

(23)

então o termo geral de uma PC é construído a partir dos autovetores,

$$PCm' = \sum_{m=1}^M y_{mm'} * p_{mm'}. \quad (24)$$

Resultados e Discussões

Nesta seção, descrevemos os primeiros resultados teóricos, via cálculos de estrutura eletrônica, de candidatos a inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE) planejados a partir dos lipídeos fenólicos não isoprenóides do cajueiro (*anacardium occidentale*). Para tanto, otimizamos as geometrias, via métodos semi-empíricos PM3 e AM1 (do inglês “Austin Model 1”)⁵⁴, incluindo a análise conformacional para determinar as geometrias de menor energia, das séries obtidas variando-se o padrão de proteção da hidroxila fenólica do cardanol (substituinte “R” da figura 5) com grupos metila (1), acetila (2) e N,N-dimetilcarbomoíla (3), bem como as variações contendo aminas secundárias como substituintes no carbono benzílico da cadeia lateral (substituinte “W” da fig 5). Nesta seção, consideramos 5 aminas secundárias: N,N-dimetilamina (1), N,N-dietilamina (2), pirrolidina (3), piperidina (4) e N-benzilamina (5), como demonstrado na figura 5.

O grupo aromático presente nesta última variação poderá desempenhar importante papel no reconhecimento molecular pelo resíduo Trp84 ou Phe 330 da enzima. As estruturas foram construídas, pré-otimizadas e submetidas a uma análise conformacional utilizando o programa CaChe⁵⁵, que fornece um mapeamento

da SEP das estruturas estudadas. A Figura 6 mostra o mapeamento da estrutura formada colocando no radical “R” N,Ndimetilcarbomoíla e em “W” a pirrolidina.

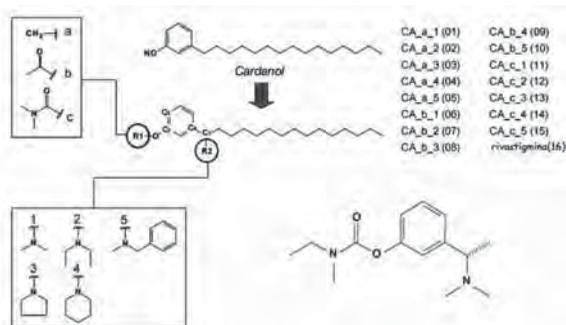


Figura 5. Representação esquemática dos possíveis candidatos a inibidores da enzima AchE, obtidos a partir dos lipídios fenólicos não isoprenóicos do cajueiro.

A partir deste mapeamento, selecionamos as geometrias de menor energia para as 15 estruturas representadas na Figura 5. Em seguida, estas geometrias foram reotimizadas (partindo das mesmas conformações de mínimo obtido via CaChe⁵⁵) utilizando o método HartreeFock-Restrito e as funções de base 6-31G, 6-31G(d), 6-31+G(d) e 6-311G(d,p). Todos estes cálculos foram realizados via pacote computacional Gaussian98⁵⁶. Utilizando estas novas conformações determinamos, também via Gaussian98, as propriedades eletrônicas tais como HOMO-1 (penúltimo orbital com energia mais alto ocupado), HOMO (orbital com energia mais alto ocupado), LUMO (orbital com energia mais baixa desocupado), LUMO+1 (segundo orbital com energia mais baixa desocupado), as cargas dos nitrogênios contidas nos radicais “R” e “W” (fig. 5) dos derivados do cardanol, além do calor de formação (via método semi-empírico) destas séries. A partir destas propriedades calculamos outras propriedades como; GAP (LUMO-HOMO), L1-H1 (LUMO+1 - HOMO-1), H-H1 (HOMO-HOMO-1) e L1-L (LUMO+1 - LUMO). Os resultados obtidos para estas propriedades foram comparados com os resultados que obtivemos isoladamente para o padrão rivastigmina, um inibidor ativo, a procura de correlações que nos permitam encontrar um padrão para a classificação dessas drogas quanto as suas atividades. Neste processo comparativo, verificamos que os resultados da classificação são muito similares. No

entanto, a base 6-311G(d,p) será usada na distinção dos inibidores, pois foi a que forneceu a menor energia para todas as estruturas.

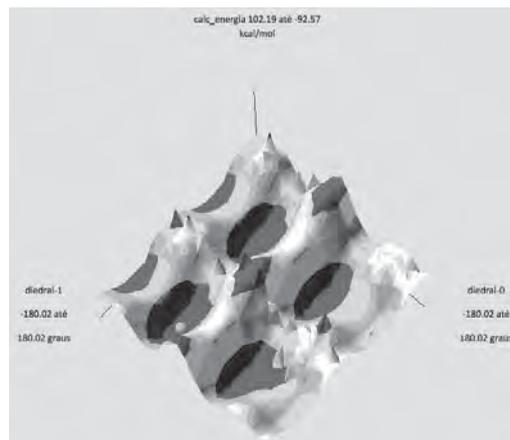


Figura 6. Mapeamento da SEP da estrutura formada colocando no radical “R” N,Ndimetilcarbomoíla e em “W” a pirrolidina, utilizando o pacote computacional Cache.

Com o objetivo de facilitar a identificação das 15 moléculas propostas, utilizamos uma notação para estas moléculas (CA_R_W), baseada nos radicais ligados, nas posições “R” e “W” do núcleo central (fig. 5) formado pelo cardanol. Desta forma, pegando como exemplo o símbolo CA_1_1 que indica a molécula obtida ligando os radicais metila e N,N-dimetila nos radicais “R” e “W”, respectivamente, no núcleo central do cardanol. A Tabela 2 mostra as 15 notações das moléculas estudadas.

Primeiramente, tentamos realizar uma análise binária das propriedades eletrônicas sem uso direto do método PCA. Algumas moléculas se agrupam com a rivastigmina, em relação a certas propriedades eletrônicas. Antes de discutirmos essas análises observemos as relações entre os orbitais, a primeira, Figura 7, apresenta a contribuição para a diferença LUMO+1 - HOMO-1 contra LUMO+1. Notamos, a partir deste gráfico, que as duas propriedades agrupam as estruturas (6), (8), (11) e (13) à (16), separando elas das restantes. Indicando que as propriedades dos eixos do gráfico funcionem como fator de distinção entre os inibidores ativos e inativos da AchE.

A Figura 8 representa as energias da diferença LUMO+1 -LUMO contra a do HOMO. Neste gráfico, podemos novamente notar que as estruturas (6), (8) e (13) se localizam próximo à (16), mostrando também que

as propriedades dos eixos auxiliam na distinção. Também observamos que a molécula (11) se encontra um pouco distante do aglomerado próximo à rivastigmina, mas do lado inverso de onde se encontram as outras estruturas que estão fora do aglomerado.

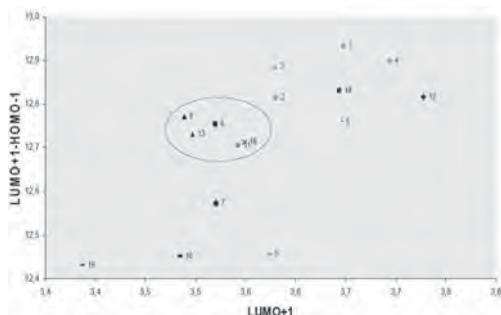


Figura 7. Contribuição para a diferença LUMO+1 -HOMO-1 vs LUMO+1, para os derivados do cardanol e rivastigmina.

Ao utilizarmos o método de reconhecimento de padrões PCA, reduzimos o número de propriedades que são mais relevantes à seleção das moléculas, ou seja, as que mais se correlacionam com a da rivastigmina. Além disto, este método auxilia na classificação através da separação das estruturas em um conjunto de variáveis não correlacionadas (PC) que são formadas pelas propriedades eletrônicas originais. As PCs são obtidas em ordem decrescente de importância, pois a primeira componente é a combinação linear das propriedades eletrônicas com maior variância.

A partir das 7 propriedades eletrônicas inicialmente determinadas, fizemos estudos sistemáticos, considerando a variância e o peso das mesmas e concluímos que as PCs podem ser escritas em termos de 4 propriedades eletrônicas descritas na tabela 3.

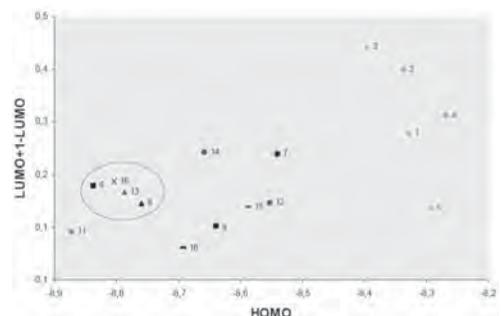


Figura 8. Contribuição para a diferença LUMO+1 -LUMO vs HOMO, para os derivados do cardanol e rivastigmina.

A análise de como a variância dos dados se distribui sobre as PCs pode ser vista na Figura 9. Desta figura podemos notar que as duas principais componentes, PC1 e PC2 são responsáveis, respectivamente, por 78, 34% e 16, 23% dos dados, totalizando 94, 57%. Este fato, que se faz necessário para que se tenha uma boa confiabilidade nos dados sobre PCA.

Tabela 2. Nomeclatura das 15 estruturas derivadas do padrão molecular 2. Notação utilizada para a substituição do hidrogênio a partir do grupo de fenolicos cardanol (R1 na 5) e carbono da cadeia lateral (R2 na Figura 5). CA representa cardanol.

Notação	Estrutura	Nomenclatura	Estrutura
01	CA_a_1	09	CA_b_4
02	CA_a_2	10	CA_b_5
03	CA_a_3	11	CA_c_1
04	CA_a_4	12	CA_c_2
05	CA_a_5	13	CA_c_3
06	CA_b_1	14	CA_c_4
07	CA_b_2	15	CA_c_5
08	CA_b_3	16	rivastigmina

Nesta primeira parte dos resultados, comparamos as propriedades eletrônicas (energias dos HOMO, LUMO, HOMO-1, LUMO-1 e seus derivados) dos lipídeos fenólicos modificados contra a rivastigmina, usando métodos semi-empíricos e RHF. Em seguida novas propriedades foram incluídas, como por exemplo a carga do anel aromático, carga do oxigênio 56, do carbono 11 e do nitrogênio pertencente ao radical R2, usando o nível de cálculo B3LYP com as funções de bases 6-31G, 6-31G(d) e 6-311+G(2d,p).

Tabela 3. Peso das propriedades eletrônicas que formam as PCs.

	PC1	PC2	PC3
HOMO-1	0,5526519	-0,1651031	-0,181517
LUMO+1	0,426917	0,7834858	-0,3924858
GAP	-0,4860612	0,5929316	0,3480295
H - H-1	0,5254161	0,8557445	0,8317944

Estas propriedades, tendo em conta efeitos de correlação, foram utilizadas na PCA. A fim de melhorar esta análise, os PCs foram obtidos em um modelo tridimensional PCA. Portanto, estes resultados B3LYP complementam nosso estudo discutido anteriormente. Além disso, estes resultados podem melhorar o conhecimento das propriedades importantes para a inibição da AChE.

Desta forma, foi proposto um conjunto de moléculas AChEI com base em uma substituição do hidrogênio a partir do grupo de fenólicos cardanol (R1 na Figura 5), por grupos, tais como (a) metil, (b) acetil, e (c) N, N-dimetilcarbamonila, bem como as substituições no benzílico carbono da cadeia lateral (R2 na Figura 5) por aminas secundárias, (1) N,N-dimetilamina (2), N,N-dietilamina (3) pirrolidina, (4) piperidina, e (5) N,Nmetilbenzilamina. As variações obtidas a partir das substituições rendeu quinze estruturas de cardanol derivados. A tabela 2 mostra a notação usada para os compostos derivados do cardanol utilizados neste trabalho.

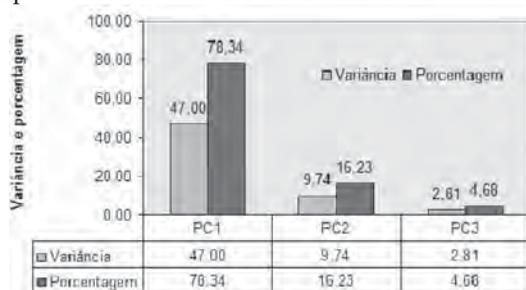


Figura 9. Distribuição da variância e porcentagem da variância nas PCs.

Geometrias destas quinze estruturas, bem como rivastigmina foram tomadas a partir do resultado otimizado da seção anterior⁵⁷ usando os métodos semi-empíricos AM1 e PM3. Análise conformacional da energia mínima foi feita utilizando-se o mapas da superfície de energia potencial (Fig. 6). Estas estruturas mínimas foram totalmente otimizadas e os procedimentos para este estudo utilizou as seguinte etapas:

- Cálculos single point das propriedades eletrônicas, ou seja, cálculos das duas energias de orbitais moleculares mais altos ocupados E(HOMO) e E(HOMO-1), as duas energias de orbitais moleculares mais baixos desocupados E(LUMO) e E(LUMO+1), carga dos anéis aromáticos, carga do C 11 (C-C11), carga do O56 (C-O56) e carga do nitrogênio pertencente ao grupo R2 (C-NR2) (ver Figura 5 para a notação). Estes cálculos foram realizados utilizando método B3LYP com grupo de funções de base: 6-31G, 6-31G (d) e 6-311+G(2d,p).
- A partir destes dados das propriedades eletrônicas derivamos outras propriedades GAP [E(LUMO) – E(HOMO)], GAP+1 [E(LUMO+1) – E(HOMO-1)], $\Delta H-1$ [E(HOMO) – E(HOMO-1)] and $\Delta L+1$ [E(LUMO+1) – E(LUMO)].

Todos estes cálculos foram também realizados utilizando o programa computacional Gaussian03⁵⁸. Para comparar as propriedades eletrônicas obtidas a partir dos quinze derivados do cardanol com a rivastigmina, utilizamos novamente o método PCA. Este método, como já mencionado, reduz o número inicial de parâmetros estabelecidos (propriedades eletrônicas) para os mais relevantes no que diz respeito a capacidade de selecionar compostos que são mais semelhantes com a rivastigmina. O dados do PCA foram redirecionadas, tornando elas adimensionais com média nula e variância unitária. Este procedimento foi utilizado a fim de eliminar efeitos artificiais, onde algumas propriedades eletrônicas com um grande valor poderia dominar a análise.

O próximo passo foi analisar cada propriedade dos quinze derivados com o objetivo de selecionar os compostos que mais se correlacionam com a rivastigmina. Também analisamos as relações entre pares de propriedade dos quinze compostos. Esta última análise foi importante para produzir as mais relevantes variáveis em relação à rivastigmina. Por exemplo, a Figura 10 mostra a contribuição de E(LUMO-1) versus C-N_{R2} para os derivados do cardanol e rivastigmina.

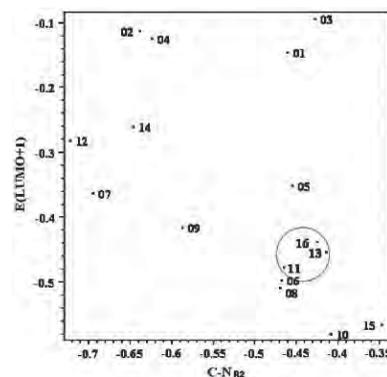


Figura 10. Contribuição da E(LUMO-1) versus C-N_{R2} para os derivados do cardanol e rivastigmina. Propriedades calculadas utilizando o método B3LYP com a função de base 6-311+G(2d,p) dos derivados do padrão molecular 2

A partir destes dados preliminares, as variáveis eletrônicas utilizadas para o cálculo de PCA foram refinadas e, em seguida, classificadas em componentes principais (PCs) em ordem de importância. A primeira componente é uma combinação linear das propriedades eletrônicas com a maior variância dos dados em relação às

outras. Os valores para as propriedades estudadas retirado das quinze estruturas foram muito próximos para todos os conjuntos de base considerados. Consequentemente, apresentamos os resultados apenas do conjunto da função de base mais extensa 6-311+G(2d,p), a fim de representar melhor os resultados finais.

O orbital HOMO-1 da rivastigmina em B3LYP/6-311+G(2d,p), utilizando geometria otimizada AM1 (Figura 11) mostra a principal contribuição dos orbitais π dos anéis aromáticos. A mesma contribuição do orbital HOMO-1 foi encontrada para todas as estruturas calculadas, ou seja, as contribuições estão centradas principalmente no fragmento análogo a rivastigmina para todos os compostos.

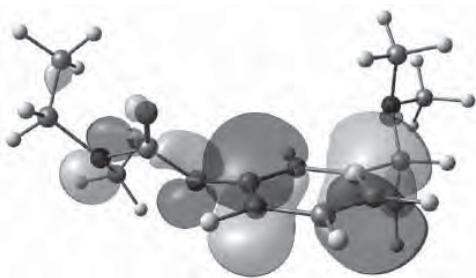


Figura 11. Geometria otimizada da rivastigmina. O orbital HOMO-1 da rivastigmina para o nível B3LYP/6-311+G(2d,p).

A Tabela 4 apresenta os resultados das energias HOMO-1, HOMO, LUMO e LUMO+1, e também das cargas do anel benzênico, C_{11} , O_{56} , e N_{R2} dos derivados do cardanol e rivastigmina. Um estudo sistemático de todas as propriedades foi realizado considerando a análise binária, PCs e peso da variância calculada dos dados. A Figura 10 mostra os derivados do cardanol (tabela 2) CA_c_1 e CA_c_3 como os que mais se assemelham à rivastigmina para E(LUMO-1) contra $C-N_{R2}$.

Inicialmente, usamos todas as propriedades de todas as estruturas na análise de PCA. Então excluímos algumas destas propriedades a partir desta análise tentando encontrar as mais relevantes. Isto permitiu-nos encontrar as três propriedades mais importantes divididas em três casos, chamado caso I, II e III (Figura 12). Identificamos que os descritores E(HOMO-1), E(LUMO+1) e C-O56 são comuns aos três casos. Elas parecem ser as principais propriedades

para uma boa agregação entre as estruturas melhores correlacionadas com a rivastigmina. Além dessas propriedades também identificamos C-NR2, usado nos casos I e III, LUMO, usado nos casos II e III, e $\Delta L+1$, usado no caso II, como descritores aptos. A Tabela 5 apresenta a variação de cada componente (PC1, PC2 e PC3), com seu respectivo percentual. No caso II, tivemos o maior valor em porcento para PC1 e tivemos o melhor percentual acumulado de variância, quase 97,5%, para as três primeiras PCs nos casos I e II. A Tabela 6 mostra os pesos das propriedades mais importantes para as três primeiras componentes.

Tabela 4. Valores da estrutura eletrônica E(HOMO-1), E(HOMO), E(LUMO), E(LUMO+1), carga do anel, C-C11, C-O₅₆ e C-NR2 dos 15 compostos derivados do cardanol e rivastigmina (16).

	energia dos orbitais (eV)				carga			
	HOMO-1	HOMO	LUMO	LUMO+1	anel	C ₁₁	O ₅₆	N _{R2}
01	-6,13	-5,74	-0,37	-0,15	0,20	0,35	-0,38	-0,46
02	-6,16	-5,45	-0,38	-0,11	0,22	0,15	-0,36	-0,64
03	-6,18	-5,43	-0,40	-0,09	0,29	-0,08	-0,35	-0,43
04	-6,11	-5,50	-0,35	-0,12	0,21	0,31	-0,38	-0,62
05	-6,11	-5,77	-0,49	-0,35	0,04	0,40	-0,35	-0,45
06	-6,77	-5,81	-0,55	-0,50	0,28	0,41	-0,54	-0,47
07	-6,50	-5,81	-0,78	-0,36	0,27	0,33	-0,52	-0,70
08	-6,83	-5,53	-0,56	-0,51	0,35	0,15	-0,54	-0,47
09	-6,67	-5,54	-0,50	-0,42	0,29	0,35	-0,54	-0,59
10	-6,80	-5,87	-0,59	-0,58	0,34	0,31	-0,54	-0,41
11	-6,76	-5,80	-0,49	-0,48	0,21	0,48	-0,43	-0,46
12	-6,62	-5,56	-0,34	-0,28	0,19	0,46	-0,45	-0,73
13	-6,78	-5,45	-0,51	-0,45	0,34	-0,10	-0,44	-0,42
14	-6,59	-5,50	-0,39	-0,26	0,21	0,26	-0,44	-0,65
15	-6,67	-5,69	-0,61	-0,57	0,33	0,05	-0,43	-0,35
16	-6,64	-5,99	-0,49	-0,44	0,19	0,33	-0,39	-0,42

Encontramos a partir da análise PCA (Figura 12), as estruturas que melhor se correlacionam com rivastigmina são os dimetilcarbamatos 11 (CA_C_1) e 13 (CA_C_3) para todos os três casos estudados. Estes resultados indicaram quais substituintes mais prováveis para os potenciais candidatos para o desenvolvimento de inibidores da AChE para o tratamento da DA a partir do cardanol.

As previsões da análise foram então avaliados experimentalmente para a série de dimetilcarbamatos 11-15. Os compostos foram sintetizados a partir do cardanol como hidrocloreto, utilizando métodos padrões. A inibição da enzima foi testada como descrito anteriormente, exceto que o purificado da AChE a partir do E. electricus foi usado em vez de tecido homogeneizados. Os compostos 11-13 inibiram

a AChE como descrito na concentração-dependente (Figura 13), ao passo 14 e 15 mostraram pouca atividade, inibindo a enzima pelo menos 25% a 100% μM . O dimetilamino 11 foi o mais potente, com uma IC_{50} de $50,0\mu\text{M}$, seguido de perto pelo pirrolidina 13 ($84,3\mu\text{M}$) e do dietilamino 12 ($251,1\mu\text{M}$). Assim, o procedimento PCA selecionou corretamente os dois compostos mais potentes da série.

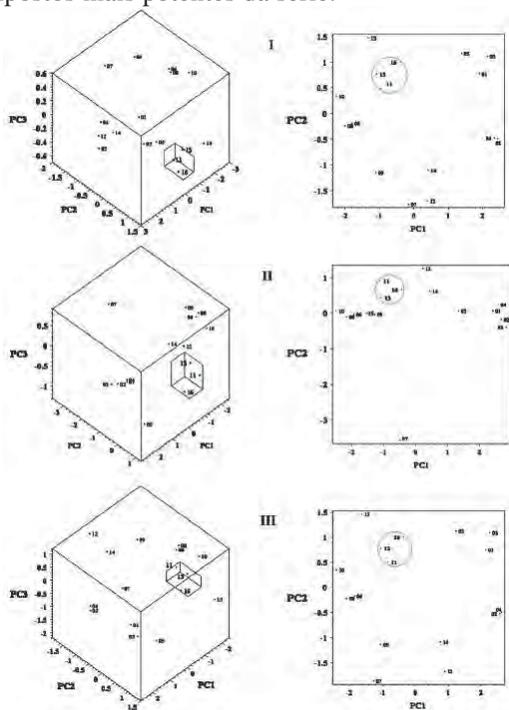


Figura 12. Gráficos dos casos I, II e III da separação das estruturas derivadas do cardanol e rivastigmina com as duas ou três PCs mas relevantes.

Tabela 5. Variância, porcentagem e acumulado da porcentagem nos casos I, II and III das PC1, PC2 e PC3 obtidos com PCA.

CASO I			
	Variância	Porcentagem	Acumulativo
PC1	39,35	65,59	65,59
PC2	16,48	27,47	93,06
PC3	2,65	4,41	97,47

CASO II			
	Variância	Porcentagem	Acumulativo
PC1	51,00	68,00	68,00
PC2	16,46	21,95	89,95
PC3	5,87	7,82	97,77

CASO III			
	Variância	Porcentagem	Acumulativo
PC1	47,01	62,68	62,68
PC2	16,50	22,00	84,68
PC3	8,13	10,84	95,52

Segundo a literatura⁶⁰⁻⁶² a rivastigmina atinge o fundo do sítio ativo do gorge, onde ela interage com o resíduo da Ser200 da tríade catalítica Ser200-His440-Glu327 através do seu agrupamento carbamoíla, enquanto os aromáticos e os grupos de amônio dirigem se para interagir com a conservação de resíduos Trp84 (adjacente à tríade catalítica) e um segundo resíduo aromático (Phe330), que parecem estar envolvidos com aromáticos de cátion- π ou interação hidrofóbica. Através de um mecanismo comum de inibição, o grupo carbamoíla é reversivelmente ligado ao sítio ativo da serina, enquanto o grupo livre ((-)-S3-[1-(dimetilamino)-etil]fenol (NAP)) que é um competitivo inibidor da AChE permanece ativo no gorge. Bar-On e colaboradores demonstraram que o grupo de fenol da NAP está distante da ligação de hidrogênio para interagir com a espinha dorsal do resíduo Gly118, enquanto grupos aromáticos e metil tornam-se aromáticos-hidrológicos e as interações π - π com Trp84 e Phe330⁶⁰.

Tabela 6. Peso das propriedades eletrônicas E(HOMO-1), E(LUMO+1), C-O56, C-NR2, E(LUMO) e $\Delta\text{L}+1$ das PC1, PC2 e PC3 dos casos I, II and III, obtidos com PCA.

	CASO I			CASO II			CASO III		
	PC1	PC2	PC3	PC1	PC2	PC3	PC1	PC2	PC3
E(HOMO-1)	0,58	0,12	0,61	0,51	-0,15	-0,22	0,50	0,10	-0,52
E(LUMO+1)	0,59	-0,17	0,13	0,52	-0,04	0,44	0,54	-0,18	-0,10
C-O ₅₆	0,51	0,44	-0,72	0,46	0,23	-0,74	0,47	0,43	-0,09
C-N _{R2}	-0,23	0,87	0,30				-0,20	0,88	0,05
E(LUMO)				0,36	0,66	0,43	0,44	0,03	0,84
$\Delta\text{L}+1$				0,36	-0,69	0,18			

Considerando a possibilidade de que os derivados do cardanol são capazes de penetrar profundamente até chegar ao fundo do sítio ativo do gorge, da mesma forma que a rivastigmina, e tendo em conta os resultados descritos por Sterling e colaboradores⁶³ (que mostrou que a atividade da AChEI é 30 vezes maior que da N,N-dimetilcarbamoíla - análogo da rivastigmina em comparação com o agrupamento N,N-etilmetilcarbamoíla), esperamos que haja um melhor acesso dos resíduos da Ser200 para os agrupamentos N,N-dimetilcarbamoíla CA_c_1 (11) e CA_C_3 (13).

A fim de avaliar a influência dos sítios hidrofóbicos, bem como a liberdade de conformação do agrupamento de amônio, a dimetilamina (11) e a conformação bis-homóloga da pirrolidina (13) destes grupos foram

selecionados. Neste caso, o aumento de uma região hidrofóbica na pirrolidina é esperado para interagir os resíduos Trp84 e Phe330 melhor com dimetilamina, salvo se houver uma restrição estérico na região adjacente ao tríade catalítica e que delimita o volume acessível ao grupo pirrolidino. No que diz respeito aos alifáticos ao longo cadeia lateral, era esperado que ficasse ao longo do gorge, onde são possíveis interações complementares hidrofóbicas/aromáticos dos resíduos aminoácidos.

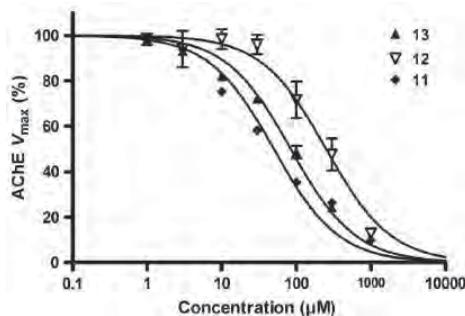


Figura 13. Curvas de inibição da acetilcolinesterase para selecionados derivados do cardanol. Símbolos são meios $\pm SD$ ($n = 3$) de *E. electricus* da velocidade máxima (V_{max}) de reação da AChE em relação ao controle (sem inibidor). O solvente teve efeitos negligenciáveis nas concentrações testadas. As linhas mostram a função regressão para o padrão sítio único completo do modelo de inibição. Figura do artigo produzido pelo grupo⁵⁹

Por outro lado, Castro e colaboradores⁶⁴ utilizando um acoplamento flexível nos experimentos salientou que derivados do natural alcalóide piperidina (–)–espectralina não eram susceptíveis de interagir com o sítio ativo da tríade, possivelmente devido ao volume longo da cadeia lateral de alifáticos. De modo semelhante, se os volumes da longa cadeia lateral dos alifáticos de CA_c_1 (11) e CA_c_3 (13) não permitirem os derivados de alcançar o fundo do sítio ativo, elas podem ser capazes de interagir de forma similar ao spectralina ou mesmo donepezil⁶⁵ por interações aromáticas cátion- π e π - π dos grupos de amônio e os agrupamentos aromáticos com os resíduos aromáticos do meio Phe330, Trp84 até a garganta Trp279 do sítio ativo ou no sítio aniônico periférico (SAP), enquanto são esperadas as ligações de hidrogênio de ocorrer com espinha dorsal dos grupos carbamato e amônio dos aromáticos e hidrofóbicas e ligações de hidrogênio doadores dos resíduos do SAP, por exemplo, Tyr70, Tyr121 e Trp279, e Phe288, Phe290, Phe331, Arg289 e Ser286

acima da SAP, na parte superior do gorge, bem como moléculas de água⁶⁵. Uma vez que as paredes do gorge são forradas predominantemente por cadeias laterais resíduos aromáticos, interações hidrofóbicas a partir da longa cadeia alifática destes derivados cardanol, espera-se que se-jam uma contribuição significativa para a identificação pela AChE e modulação das suas atividades.

Conclusões

Neste trabalho apresentamos, cálculos de estrutura eletrônica envolvendo 15 moléculas derivadas do cardanol, e da rivastigmina com o objetivo principal de utilizar os lipídeos fenólicos não isoprenóides do cajueiro como matéria prima para obtenção racional de novos candidatos a inibidores da enzima AChE. Para tanto foram utilizados os métodos HartreeFock-Restrito e B3LYP e as funções de base 6-31G, 6-31G(d), 6-31+G(d), 6-311G(d,p), 6-311G(2d,p) e 6-311+G(2d,p).

A partir das estruturas propostas fizemos uma análise binária das propriedades eletrônicas e verificamos uma maior correlação das estruturas (6), (8), (11) e (13) com a rivastigmina. Esta indicação de correlação destas estruturas ocorre para maioria das propriedades quando analisadas duas a duas. Além da análise binária foi feito um estudo de PCA, onde foi possível diminuir o número de propriedades eletrônicas iniciais para as propriedades mais relevantes, que foram HOMO-1, LUMO+1, GAP e a diferença HOMO - HOMO-1, a partir destas propriedades construímos as PCs e conseguimos selecionar as estruturas que mais se correlacionavam com a rivastigmina, que novamente foram as estruturas (6), (11) e (13), além da estrutura (8). Assim sendo, das duas análises podemos concluir que as estruturas (6), (8), (11) e (13) foram as que mais se correlacionam com a rivastigmina.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos órgãos financiadores FINATEC, CAPES e CNPq.

Referências Bibliográficas

- Francis, P. T. e Palmer, A. M. e Snape, M. e Wilcock, G. K., J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry, 66, **1999**, 137-147.

2. IBGE/Diretoria de Pesquisas. Coordenação de População e Indicadores Sociais. Gerência de Estudos e Análises da Dinâmica Demográfica., *Projeção da População do Brasil por Sexo e Idade para o Período 1980-2050, Revisão 2008*, www.ibge.gov.br/.
3. Global prevalence of dementia a Delphi consensus study Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H., Fratiglioni L., Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y, Jorm A, Mathers C, Menezes PR, Rimmer E, Sczufca M, for Alzheimer's Disease International, *The Lancet*, 366, 17 de dezembro de **2005**, 2112-2117.
4. Acessado em 22/11/2006, www.psiqweb.med.br/dsm/demencia.html#alzheimer.
5. Boyle, N. A. J., Talesa, V., Giovannini, E., Rosi, G. e Norton, S. J., *J. Med. Chem.*, 40, **1997**, 3009-3013.
6. Tanzi, R. E., GEORGE-HYSLOP, P. H., Haines, J. L., Polinsky, R. J., Nee, L., Foncin, J. F., Neve, R. L., McClatchey, A. I., Conneally, P. M. e Gusella, J. F., *Nature*, 329, **1987**, 156-157.
7. Joachim, C. L., Mori, H. e Selkoe, D. J., *Nature*, 341, **1989**, 226-229.
8. Schenk, D. B., Rydel, R. E., May, P., Little, S., Panetta, J., Lieberburg e Sinha, S., *J. Med. Chem.*, 38, **1995**, 4141-4154.
9. Hufani, M., Filocamo, L., Lappa, S. e Maggi, A., *Drugs in the future*, 22, **1997**, 397-410.
10. Coyle, J. T., Price, D. L., e Delong, M. R., *Science*, 219, **1983**, 1184-1190.
11. Bartus, R. T., Dean III, R. L., Beer, B. e Lippa, A. S., *Science*, 217, **1982**, 408-419.
12. Benzi, G. e Moretti, A., *Eur. J. Pharmacol.*, 346, **1998**, 1-13.
13. Giacobine, E. e Becker, R., In: *Alzheimer's disease: Molecular biology to therapy*, **1997**, 188-204.
14. Sugimoto, H., Iimura, Y., Yamanishi, Y. e Yamatsu, K., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2, **1992**, 871-876.
15. Villalobos, A., Blake, J.F., Biggers, C. K., Butler, T. W., Chapin, D. S., Chen, Y. L., Ives, J. L., Jones, S. B., Liston, D. R., Nagel, A. A., Nason, D. M., Nielsen, J. A., Shalaby, I. A. e White, W. F., *Journal of Medicinal Chemistry*, 37, **1994**, 2721-2734.
16. Kawakami, Y., Inoue, A., Kawai, T., Wakita, M., Sugimoto, H. e Hopfinger, A. J., *Chemistry Letters*, 4, **1996**, 1429-1446.
17. Yuan-Ping, P., Hong, F., Quiram, P., Jelacic, T. e Brimijoin, S., *Perkin Transactions 1*, 2, **1997**, 171-176.
18. Tabarrini, O., Cecchetti, V., Temperini, A., Filipponi, E., Lamperti, M. G. e Fravolini, A., *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 9, **2001**, 2921-2928.
19. Barreiro, E. J., Camara, C. A., Verli, H., Brazil-más, L., Castro, N. G., Cintra, W. M., Aracava, Y., Rodrigues, C. R. e Fraga, C. A. M., *Journal of Medicinal Chemistry*, 46, **2003**, 1144-1152.
20. Colombres, M., Inestrosa, N. C. e Sagal, J. P., *Current Pharmaceutical Design*, 10, **2004**, 3121-3130.
21. Cavalcanti, J. J. V., *Projeto Revitaliza do Caju: Programa de Reuperação e Desenvolvimento da Cajuicultura*, Secretaria da Agricultura e Pecuária, Governo do Rio Grande do Norte, 2000, Apoio: Fundo Brasileiro para a Biodiversidade/FUNBIO, EMBRAPA, São Paulo, 1998, Disponível em /www5.prossiga.br/caju/estudos/projetocaju.pdf . Acesso em 10 de setembro 2005.
22. Aggarwal, J. S., *Journal of the Colour Society*, **1975**, 1-9.
23. Ramaiah, M. S., *Fette-Seifen-Anstrichmittel*, 78, **1976**, 472-477.
24. Attanasi, O., Serra-zanetti, F., Perdomi, F., Scagliarini, A., *La Chimica & L'Industria*, 61, **1979**, 718-725.
25. *Pesquisas FUNCAP -Revista de Ciência e Tecnologia*, 2, **1999**, 14-18.
26. Tyman, J. H. P., Elsevier: Amsterdam, 9, **1991**, 313-381.
27. Santos, M. L. Dos, Universidade de Brasília -UnB, **1997**, Tese de Doutorado.
28. Logrado, L. P. L., Universidade de Brasília -UnB, **2004**, Dissertação de Mestrado.
29. Santos, M. L. DOS e Magalhães, Gouvan C. De, *J. Braz. Chem. Soc.*, 10, **1999**, 13-20.
30. Resck, I. S., Santos, M. L. dos e Romeiro, L. A. S., *Heterocycles*, 65, **2005**, 311-318.
31. Logrado, L. P. L., Santos, M. L. dos, Silveira, D., Romeiro L. A. S., Moraes, M. O., Cavalcanti, B. C., Lotufo, L. V. e Pessoa, C. do ó, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 16, **2005**, 1217-1225.
32. Santos, M. L., Magalhães, G. C. de e Brazilfilho, R., *Journal of Organometallic Chemistry*, 526, **1996**, C15-C19.
33. Santos, M. L. e Magalhães, G. C. de, *Química Nova*, 16, **1993**, 534-536.
34. Carvalho, M. G. and Brazilfilho, R., Santos, M. L. e Magalhães, G. C. de, *Journal Of The Brazilian Chemical Society*, 4, **1993**, 158-164.
35. Romeiro, L. A. S., Silva, V. C., Murta, M. M., Magalhães, G. C., Logrado, L. P. L., Santos, M. L., Resck, I. S., Araujo, E. M. De, Garcia, S. e Ortiz, G. M. D., *Pedido de Patente no INPI -PI 0304630-3*, 2003 e *PI 0406040-7*, **2004**.
36. Romeiro, L. A. S., Silva, V. C., Murta, M. M., Magalhães, G. C., Logrado, L. P. L., Santos, M. L., Resck, I. S., Araujo, E. M. De, Garcia, S., Ortiz, G. M. D., Leitão, A. A. C., Silva, C. S. da, Freitas, Z. M. F de, e Santos, E. P., *PCT WO 2006/042391 A2*.
37. Greenblatt H.M., Dvir H., Silman I. e Sussman J.L., *J Mol Neurosci*, 20, **2003**, 369-383.
38. Attila Szabo and Neil S. Ostlund, A. *Modern Quantum Chemistry -Introduction to advanced Eletronic Structure Treory*, Dover Publicações, **1996**.
39. Stewart, J. J. P., *J. Comp. Chem.*, 10, **1989**, 209-220.
40. Roothan C. C. J., *Rev. Mod. Phys.*, 23, **1951**, 69.
41. Becke, A. D., *Phys. Rev. A*, 38, **1988**, 3098.
42. Axel D. Becke, *The Journal of Chemical Physics*, 98, **1993**, 5648-5652.

43. Lee C. e Yang W. and Parr R. G., *Phys Rev. B*, **37**, **1988**, 785.
44. De Paula, A. A. N., Universidade Federal de Juiz de Fora -UFJF, Dissertação de Mestrado, Departamento de Física da Universidade Federal de Juiz de Fora.
45. Kovács, Zsolt László, *Redes Neurais Artificiais: Fundamentos e Aplicações*, Editora Livraria da Física, **3**, **2002**, São Paulo.
46. Sato, F., Universidade Estadual de Campinas -UNICAMP, Tese de Doutorado, Departamento de Física Aplicada -DFA, Instituto de Física Gleb Wataghin (IFGW).
47. Abreu, J. F. F., Universidade Federal de Juiz de Fora -UFJF, **2000**, Monografia de Bacharelado, Departamento de Física -Juiz de Fora-MG.
48. Beale, R., Jackson, e T., *Bristol and Philadelphia, Neural Computing: An Introduction*, Institute of Physics Publishing, **1992**.
49. Alferes J. J., Damásio C. V. e Pereira, L. M., *Principles and Practice of Semantic Web Reasoning*, **2003**, 16-32.
50. Chatfield, C. e Collins, A. J., *Introduction to Multivariate Analysis*, Chapman & Hall, **1980**, Cambridge University press.
51. Rezende, L. A., Universidade Federal de Juiz de Fora -UFJF, **2002**, Dissertação de Mestrado, Departamento de Física -Juiz de Fora-MG.
52. K. Pearson, *The London, Edinburgh and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, **2**, **1901**, 559-572.
53. Hotelling, H, *Journal of Psychology*, **24**, **1933**, 417-441 and 498-520.
54. Dewar, M. J. S., Zoebisch, E. G. e Healy, E. F., *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, **1985**, 3902-3909.
55. Chiba 2618588, Cache 5.0, Fujitsu Limited, Chiba City, Japan.
56. Frisch, M. J. e et al, *Gaussian98*, Technical Report, **1998**, Pittsburgh, PA, Revision A.9.
57. De Paula A. A. N., Martins J. B. L., Gargano R., Dos Santos M. L. e Romeiro L. A. S., *Chem. Phys. Lett.*, **446**, **2007**, 304-308.
58. M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery, T. V. Jr., K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, T. N. M. Ishida, Y. Honda, O. Kitao, M. K. H. Nakai, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, C. A. V. Bakken, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, A. J. A. O. Yazyev, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, K. M. P. Y. Ayala, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. D. V. G. Zakrzewski, A. D. Daniels, M. C. Strain, D. K. M. O. Farkas, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. V. O. J. B. Foresman, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, B. B. S. J. Cioslowski, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, R. L. M. I. Komaromi, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, A. N. C. Y. Peng, M. Challacombe, P. M. W. Gill, W. C. B. Johnson, M. W. Wong, C. Gonzalez, and J. A. Pople, *Gaussian03*, **2004**.
59. De Paula A. A. N., Martins J. B. L., Dos Santos M. L., Nascente L. de C., Romeiro L. A. S., Areas T. F. M. A. Vieira K. S. T., Gambo N. F., Castro N. G. e Gargano R., *European Journal of Medicinal Chemistry*, **44**, **2009**.
60. Bar-On P., Millard C. B., Harel M. and Dvir H., Enz A., Sussman J. L. e Silman I., *Biochem.*, **41**, **2002**, 3555-3564.
61. Bartolucci C., Siotto M., Ghidini E., Amari G., Bolzoni P. T., M. Racchi, Villetti G., Delcanale M. e Lamba D., *J. Med. Chem*, **49**, **2006**, 5051-5058.
62. Darvesh S., Darvesh K. V., McDonald R. S., Mataija D., Walsh R., Mothana S., Lockridge O. e Martin E., *J. Med. Chem.*, **51**, **2008**, 4200-4212.
63. Sterling J., Herzig y., Goren T., Finkelstein N., Lerner D., Goldenberg W., Miskolczi I., Molnar S., Rantal F., Tamas T., Toth G., Zagyva A., Zekany A., Lavian G., Gross A., Friedman R., Razin M., Huang W., Kraib B., Chorev M., Youdim M. B. e Weinstock M., *1463 J. Med. Chem.*, **45**, **2002**, 5260-5279.
64. Castro N. G., Costa R. S., Pimentel L. S. B., Danuello A., Romeiro N. C., Jr C. V., Barreiro E. J., Fraga C. A. M., Bolzani V. S. e Rocha M. S., *1438 Eur. J. Pharm.*, **508**, **2008**, 339-349.
65. Niu C. Y., Xu C. Y., Xu Y., Luo X. M., Duan W. H., Silman I., Sussman J. L., Zhu W. L., Chen K. X., Shen J. H. e Jiang H. L., *J. Phys. Chem. B*, **109**, **2005**, 23730-23738.

Ricardo Gargano^{1*}, Alexandre A. N. Paula¹, Luiz A. S. Romeiro², Érica C. M. Nascimento³, Alessandra S. Kiametis¹, Maria L. Santos³, Newton G. Castro⁴, Luciana C. Nascente⁵ e João B. L. Martins³

¹Instituto de Física, Universidade de Brasília, CP 4455, Brasília.

²Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Brasília, Brasília.

³Instituto de Química, Universidade Brasília, CP 4478, Brasília.

⁴Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

⁵Universidade Católica de Brasília, Brasília.

*e-mail: gargano@fis.unb.br

Imobilização Covalente na Superfície de Sílica Gel da Enzima β -1,3-Glucanase Produzida por *Trichoderma Harzianum*

Fernando A. Silva, Edésio F. C. Alcântara & Valdirene N. Monteiro

Neste trabalho, o suporte utilizado para imobilizar a enzima β -1,3-glucanase foi a sílica gel (Ξ Si-OH) com área superficial (S_{BET}) de $466,0 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$, volume (V) e diâmetro médio de poros (\check{D}) de $0,803 \text{ cm}^3.\text{g}^{-1}$ e $6,89 \text{ nm}$, respectivamente. A sílica foi modificada via reação de silanização com os grupos 3-aminopropiltrimetoxissilano (Ξ Si-NH₂), seguida de funcionalização com glutaraldeído (G) (2,5% v/v) (Ξ Si-NH-G). A enzima β -1,3-glucanase (extrato bruto) produzida por *Trichoderma harzianum*, na concentração de $0,069 \text{ mg}.\text{cm}^{-3}$ de proteína total, foi imobilizada covalentemente ao suporte funcionalizado com glutaraldeído (Ξ Si-NH-G-Enzima), obtendo-se $0,512 \text{ mg}$ de proteína imobilizada por grama de Ξ Si-NH-G. Os ensaios enzimáticos de atividades específicas forneceram $2,30 \text{ U}.\text{mg}^{-1}$ para a enzima imobilizada e de $1,88 \text{ U}.\text{mg}^{-1}$ para a enzima livre.

Palavras-chave: β -1,3-glucanase, imobilização, sílica gel.

In this work, silica gel (Ξ Si-OH) with surface area (S_{BET}), pore volume (V) and average pore diameter (\check{D}) of $466.0 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$, $0.803 \text{ cm}^3.\text{g}^{-1}$ and 6.89 nm , respectively, was used as support to immobilize β -1,3-glucanase enzyme. Silica gel was modified through silanization reaction with 3-aminopropyltrimetoxysilano (Ξ Si-NH₂). After that, functionalization was performed with glutaraldehyde (G) (2.5%) (Ξ Si-NH-G). A β -1,3-glucanase enzyme native extract was produced by *Trichoderma harzianum* with overall protein concentration of $0.069 \text{ mg}.\text{cm}^{-3}$. The enzyme was immobilized through covalent links on the support functionalized with glutaraldehyde (Ξ Si-NH-G-enzyme), producing 0.512 mg of immobilized enzyme per gram of Ξ Si-NH-G. Enzymatic assays showed specific activity of $2.30 \text{ U}.\text{mg}^{-1}$ and $1.88 \text{ U}.\text{mg}^{-1}$ for immobilized and free enzymes, respectively.

Keywords: β -1,3-glucanase, enzyme immobilization, silica gel.

Introdução

As enzimas são catalisadores biológicos, formadas por aminoácidos, que participam de um grande número de reações metabólicas que ocorrem nos seres vivos¹. Atuam de forma a acelerar a velocidade de uma reação bioquímica, reduzindo a energia de ativação sem, no entanto, alterar a constante de equilíbrio ou a energia livre da reação. Como a enzima não é consumida na reação, sua ação catalítica é semelhante à dos catalisadores inorgânicos. O que se distingue de um catalisador químico comum, é a sua capacidade de catalisar uma reação sob condições suaves, como em soluções aquosas à temperatura e pressão normais, com consequente diminuição do risco de desnaturação térmica dos compostos termolábeis¹.

Com a compreensão da natureza das enzimas e do seu potencial catalítico, houve uma ampliação do campo de utilização industrial, tal como para a produção de alimentos, cerveja, têxteis e produtos farmacêuticos. A química continua a ser o sustentáculo para a solução dos mecanismos envolvidos na catálise enzimática². Convencionalmente, as reações enzimáticas são conduzidas em processos de batelada onde se incuba a mistura do substrato com a enzima solúvel e no fim do processo, esta é separada do produto por meio de desnaturação térmica ou variação drástica de pH, devido a inviabilidade econômica de se recuperar a enzima ativa livre (em solução) para posterior reutilização. Assim apesar das vantagens catalíticas das enzimas livres em relação aos catalisadores químicos, as mesmas não têm sido amplamente utilizadas nos processos industriais devido, principalmente: i) à baixa estabilidade; ii) ao elevado custo de obtenção; iii) à dificuldade de separação da mistura reacional (substrato/produto) para uso contínuo, pois são moléculas hidrosolúveis¹.

Tem-se observado nas últimas décadas, que as enzimas industrialmente utilizáveis representam um mercado global da ordem de 340 milhões de dólares para uma produção de 70.000 toneladas/ano, sendo que os dois principais setores de aplicação são: a indústria de transformação do amido e a indústria de detergentes. Observa-se também, que estes dois segmentos industriais são responsáveis por 70% do mercado mundial de enzimas, sendo que os 30% restantes, são representados

por aplicações na indústria alimentícia onde se utilizam: proteases, pectinases, amilases e outras enzimas³.

Tabela 1. Enzimas utilizadas em diferentes segmentos industriais⁴.

Segmento Industrial	Enzima	Aplicação
Detergentes	Proteases, Amilases, Celulase	Remoção de manchas, lavagem e clarificação de cores
Álcool combustível	Amilase, Amidoglicosidase, Glucose isomerase	liquefação do amido; sacarificação e conversão da glicose a frutose.
Alimentos	Proteases, Amilases, Lactases, Transglutaminase, Lipoxigenase	Coagulação do leite (fórmulas infantis), queijo, remoção da lactose, branqueamento e amolecimento do pão, etc.
Bebidas	Amilase, β -glucanase, Acetolactato descarboxilase, Lactases	Tratamento de sucos, maturação de cervejas,
Têxtil	Celulase, Amilase, Catalase	Amolecimento do algodão, remoção de tintas em excesso
Higiene pessoal e beleza	Amiloglicosidase, Glicose oxidase, Peroxidase	Atividade antimicrobiana

Apesar de suas admiráveis características, a ampliação do uso de enzimas tem se deparado com a barreira econômica. O custo de purificação, mesmo que parcial, ou ainda da produção desses catalisadores tem barrado seu uso disseminado e, algumas vezes, tornado seu uso proibitivo em processos industriais⁵. Dentre as abordagens utilizadas na Tecnologia Enzimática na tentativa de solucionar esses problemas, a Imobilização de Enzimas desponta como uma das ferramentas mais versáteis. Segundo Cardoso *et al.*⁶, a imobilização é um termo genérico empregado para descrever a retenção de uma biomolécula no interior de um reator ou de um sistema analítico.

Um dos principais fatores que afetam a imobilização de uma enzima em um suporte é justamente a escolha ideal do mesmo, visto que, a sua escolha é fundamental para o bom desempenho da enzima imobilizada, pois um suporte bem selecionado pode aumentar o tempo de meia-vida da enzima imobilizada, por outro lado, uma escolha equivocada do suporte pode afetar não somente a sua estabilidade térmica, mas o desempenho global do sistema⁷.

A escolha do suporte é tão importante quanto à escolha do método de imobilização a ser utilizado em um determinado sistema^{5,8}. Alguns cuidados devem ser tomados nessa escolha, uma vez que, após a imobilização, o suporte será o principal constituinte do microambiente em que a enzima estará imobilizada. Neste sentido, é aconselhável que sejam avaliadas algumas características do sistema, que servirão de guia no processo de escolha do material mais adequado. Segundo Mendes⁷, as principais características a serem observadas na seleção de um suporte para uma determinada aplicação são: área superficial, permeabilidade, insolubilidade, capacidade de regeneração, morfologia e composição, natureza hidrofílica ou hidrofóbica, resistência ao ataque microbiano, resistência mecânica e custo, dentre outras. Eles podem ser classificados como orgânicos e inorgânicos, e conforme sua morfologia em materiais porosos, não porosos e de estrutura de gel.

Os suportes inorgânicos têm a sílica e vidros de poro controlado como seus principais representantes. A possibilidade de obtenção de materiais com propriedades morfológicas variadas, tais como diâmetros do poro, área superficial e forma das partículas, somada às propriedades mecânicas, particularmente, a baixa compressibilidade, tornaram tais suportes os elementos de escolha para montagem de reatores para aplicações industriais⁵.

Neste trabalho, a enzima: β -1,3-glucanase produzida por *Trichoderma harzianum*, isolado da região do Cerrado, foi imobilizada covalentemente na superfície de sílica gel previamente modificada via reação com 3-aminopropiltrimetoxissilano, seguida da funcionalização com glutaraldeído. No processo de imobilização enzimática, foi estudado o efeito da atividade da β -1,3-glucanase frente ao substrato β -glucana (laminarina). Uma vez caracterizada a β -1,3-glucanase imobilizada, exploram-se as potencialidades desta quando comparada

com a mesma livre (em solução), através dos seguintes parâmetros: i) tempo ideal de imobilização ao suporte; ii) efeitos de temperatura; iii) efeitos de pH; iv) de termoestabilidade; v) cinéticos K_M e $V_{MÁX}$; e, vi) estabilidade à estocagem.

Material e Métodos

ATIVACÃO DA SUPERFÍCIE DE SÍLICA GEL

A modificação da superfície envolve a reação entre os grupos silanóis (OH) da superfície com um agente modificador apropriado⁹. A ativação da superfície com a remoção de moléculas de água adsorvidas fisicamente¹⁰ ou ligadas por ligações de hidrogênio¹¹, facilita a reação destes grupos silanóis com o agente modificador apropriado.

Cerca de 40,0 g de sílica gel 60 (0,063-0,200 mm), com área superficial BET na faixa de 460 a 540 m².g⁻¹, foram ativadas através do aquecimento a 150°C em banho de óleo, sob vácuo durante 8 h^{10,12}. Após o tratamento, passou-se nitrogênio seco e em seguida, a sílica foi guardada em frasco vedado e mantida num dessecador contendo agente secante como cloreto de cálcio anidro e/ou sílica gel com indicador.

REAÇÃO DE MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DA SÍLICA GEL

Nesta síntese, os grupos silanóis reagem com o agente silanizante, 3-aminopropiltrimetoxissilano. Esta modificação da superfície foi efetuada de acordo com o método descrito por Vrancken *et al.*¹³, com algumas alterações. Para esta síntese, fez-se a suspensão de 35,0 g de sílica gel em 60,0 cm³ de xileno, em um balão de fundo redondo de três bocas de 500 cm³, contendo condensador de refluxo, funil de adição e agitador mecânico. Esta suspensão foi aquecida em banho de óleo a 80°C, sob agitação, seguindo-se à adição de 20,54 g (0,11 mol) de 3-aminopropiltrimetoxissilano, dissolvidos em 10,0 cm³ de xileno. Manteve-se a mistura reacional sob refluxo a 120°C por 48 h. A mistura reacional depois de resfriada, foi separada por filtração em funil de placa porosa, sendo primeiramente lavada com xileno e seguida de sucessivas lavagens com água deionizada, etanol, acetona e éter etílico. O produto obtido 3-aminopropilsílica gel (E-Si-NH_2), foi seco a vácuo a 120°C, durante 5 h.

REAÇÃO DE FUNCIONALIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE MODIFICADA ($\Xi\text{Si-NH}_2$) COM GLUTARALDEÍDO (G)

A reação de funcionalização da superfície ($\Xi\text{Si-NH}_2$) com glutaraldeído foi efetuada em dois erlenmeyer de 125 cm³. Em cada um dos erlenmeyer adicionamos 10,0 g do suporte ($\Xi\text{Si-NH}_2$) em seguida adicionamos 40,0 cm³ de solução glutaraldeído 2,5 e 5 %, respectivamente, que foi preparada em solução tampão hidrogenofosfato de potássio (0,10 mol.dm⁻³) em pH = 7,0¹⁴. Ambas, misturas foram colocadas sob agitação mecânica de batelada, em banho termostatizado na temperatura de 25°C, por 1h. Em seguida, a mistura reacional foi separada por filtração em funil de placa porosa, e lavada com água deionizada. O material $\Xi\text{Si-NH}_2\text{-G}$ (2,5 e 5 %) foi seco sob vácuo na temperatura ambiente, durante 2h.

IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA β -1,3-GLUCANASE NO SUPORTE FUNCIONALIZADO ($\Xi\text{Si-NH}_2\text{-G}$)

A imobilização da enzima β -1,3-glucanase no suporte funcionalizado $\Xi\text{Si-NH}_2\text{-G}$ (2,5 e 5 %) foi efetuada adicionando-se 0,5 g do suporte em erlenmeyer de 125 cm³, seguida da adição de 10,0 cm³ da solução da enzima β -1,3-glucanase (extrato bruto) contendo 0,069 mg.cm⁻³ de proteína total e 5,0 cm³ de solução tampão acetato de sódio (0,050 mol.dm⁻³) em pH = 4,5. A mistura foi colocada sob agitação mecânica (sistema de batelada) em banho termostatizado na temperatura de 4°C, por 22 h. Após a reação de imobilização o suporte contendo a enzima β -1,3-glucanase foi separado da solução sobrenadante por filtração em funil de placa porosa, seguida de lavagem com solução tamponada em pH = 4,5. Coletou-se as alíquotas do filtrado e do lavado em frascos vedados e guardadas a 4°C, para dosar proteína e atividade enzimática. Em seguida, o material imobilizado ($\Xi\text{Si-NH}_2\text{-G-Enzima}$), foi seco a vácuo, à temperatura ambiente, durante 1 h e estocado a seco (na ausência de solução tampão), em frascos vedados e guardados na temperatura de aproximadamente 4°C.

Caracterização das Superfícies

DETERMINAÇÃO DO TEOR DE NITROGÊNIO DE $\Xi\text{Si-NH}_2$

O teor de nitrogênio nas amostras de sílica modificada ($\Xi\text{Si-NH}_2$), foi determinado quantitativamente pelo

método de Kjeldhal¹⁵, utilizando um sistema de microdestilação. Nessas análises foram empregadas cerca de 0,10 g de sílica, seguido do tratamento com 2,0 cm³ de ácido sulfúrico concentrado, 0,40 g de sulfato de potássio, 0,50 g de sulfato de cobre e 3,0 cm³ de água deionizada. Em seguida, deixou-se essa mistura em digestão a 250°C, por 8 h. Após este tempo, a mistura foi resfriada e transferida quantitativamente para o microdestilador contendo água deionizada e aquecida. O sulfato de amônio formado na digestão foi hidrolisado com 20,0 cm³ de uma mistura de solução concentrada de tiosulfato de sódio 5,0% e hidróxido de sódio 40,0%, liberando o nitrogênio na forma de amônia, que foi destilada a vapor e recolhida em frascos com 10,0 cm³ de uma solução de ácido bórico a 0,5%, contendo indicador misto de vermelho de metila e verde de bromocresol. A amônia presente foi titulada com uma solução padrão de ácido clorídrico (0,010 mol.dm⁻³). As determinações foram efetuadas em triplicata.

DETERMINAÇÃO DA ÁREA SUPERFICIAL, DO VOLUME E DO DIÂMETRO MÉDIO DOS POROS

A determinação da área superficial específica (S_{BET}), do volume (V) e diâmetro (\bar{D}) dos poros da sílica gel ($\Xi\text{Si-OH}$), da sílica modificada ($\Xi\text{Si-NH}_2$) e da sílica funcionalizada ($\Xi\text{Si-NH}_2\text{-G}$), foi realizada através da técnica de adsorção de nitrogênio gasoso.

Caracterização da Enzima β -1,3-Glucanase

Determinação do tempo ideal de imobilização

No experimento de imobilização de uma enzima em um suporte, o tempo necessário para que o sistema atinja o equilíbrio é um fator importante. Assim procura-se determinar a quantidade de enzimas ligadas na superfície do suporte em função do tempo de agitação.

Neste sentido fez-se o estudo cinético da imobilização da enzima β -1,3-glucanase no suporte $\Xi\text{Si-NH}_2\text{-G}$ em função do tempo. Para isso, pesou-se cinco amostras de 0,25 g de suporte funcionalizado $\Xi\text{Si-NH}_2\text{-G}$ (2,5%), os quais foram transferidos para erlenmeyers de 125 cm³ em presença de uma mistura de 5,0 cm³ da solução do extrato bruto contendo 0,069 mg.dm⁻³ de proteína total e 3,0 cm³ de solução tampão acetato de sódio (0,050 mol.

dm⁻³) em pH = 4,5. Em seguida os erlenmeyers contendo as misturas reacionais foram colocados sob agitação mecânica em banha termostatizado à temperatura de 4°C, variando-se o tempo de agitação de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0 h. Após a reação de imobilização o suporte contendo a enzima β -1,3-glucanase imobilizada, foi separado da solução sobrenadante por filtração em funil de placa porosa, lavado com solução tamponada em pH = 4,5 e seco a vácuo, à temperatura ambiente, durante 1 h. Coletou-se as alíquotas do filtrado e do lavado em frascos vedados e guardadas a 4°C, para dosar a proteína. Em seguida o material imobilizado (Ξ Si-NH₂-G-Enzima), foi seco a vácuo, à temperatura ambiente, durante 1 h e estocado a seco (na ausência de solução tampão), em frascos vedados e guardados na temperatura de aproximadamente 4°C.

Ensaio de atividade enzimática da β -1,3-glucanase livre e imobilizada

As atividades de β -1,3-glucanase livre e imobilizada foram determinadas utilizando-se solução de laminarina como substrato na concentração de 0,5%, em solução tampão acetato de sódio (50,0 mmol.dm⁻³) pH = 5,0. Assim, amostras de 50,0 μ L da enzima livre e 10,0 mg da enzima imobilizada foram incubados com 100,0 μ L de solução de laminarina a 40°C por 60 min, sendo que a incubação da enzima imobilizada sofreu agitação (em sistema de batelada). A concentração de açúcar redutor liberado da laminarina, foi determinada pelo método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (ADNS), utilizando solução de glicose como padrão, por espectrofotometria de UV-visível em $\lambda = 550$ nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1 μ mol de açúcar redutor (A.R.) em um minuto de reação.

Determinação do teor de proteína total

As concentrações de proteína total nas amostras de enzima livre e imobilizada foram determinadas pelo método colorimétrico de Lowry *et al.*¹⁶, utilizando albumina sérica bovina (BSA-Sigma) como padrão.

Determinação do pH ótimo da enzima β -1,3-glucanase livre e imobilizada

O efeito do pH na atividade de β -1,3-glucanase livre

e imobilizada foi determinado incubando a enzima livre e imobilizada em tampões com diferentes valores de pH que variaram de 2,6 a 3,8 em tampão citrato de sódio; de 4,2 a 5,4 em tampão acetato de sódio e de 5,8 a 7,0 em tampão fosfato de sódio, todos na concentração de 100,0 mmol.dm⁻³. Os ensaios de atividade da enzima livre e imobilizada.

Determinação da temperatura ótima da enzima β -1,3-glucanase livre e imobilizada

O efeito da temperatura foi determinado incubando a enzima livre e imobilizada em diferentes temperaturas e no pH ótimo. As temperaturas testadas foram: 25, 30, 40, 45, 55 e 60°C. Os ensaios da atividade da enzima livre e imobilizada.

Efeito da temperatura na estabilidade da enzima β -1,3-glucanase livre e imobilizada

O estudo da estabilidade térmica da enzima livre e imobilizada foi feito incubando-se amostras da enzima livre na ausência do substrato por 90 min nas temperaturas de 45 e 50°C e da enzima imobilizada na ausência do substrato por 150 min nas temperaturas de 40 e 45°C. Alíquotas 50,0 μ L e 10,0 mg dessas amostras foram retiradas em intervalos de 15 min e os ensaios para se determinar as atividades residuais das enzimas, em ambos os casos foram realizados nas condições ótimas de temperatura e pH.

Determinação dos parâmetros K_M e $V_{MÁX}$

Os parâmetros cinéticos K_M aparente e $V_{MÁX}$ da β -1,3-glucanase livre e imobilizada, foram determinadas nas condições ótimas de temperaturas de 50°C para enzima livre e 40°C para enzima imobilizada e de pH 4,6 para enzima livre e 3,8 para a enzima imobilizada, respectivamente. Esses parâmetros foram calculados, através das medidas da velocidade da reação do substrato com a enzima β -1,3-glucanase livre e imobilizada, variando-se as concentrações iniciais da solução do substrato (laminarina) de 0,1 a 1,2 mg.dm⁻³.

Determinação do tempo de estocagem da enzima imobilizada

A estabilidade da enzima em relação ao tempo de estocagem é um dos parâmetros de fundamental

importância quando se pretende utilizar industrialmente uma enzima imobilizada. Considerando-se que uma das grandes vantagens de uma enzima imobilizada, está na possibilidade de manter a sua atividade durante um determinado tempo. Foram feitos estudos para se verificar a manutenção da atividade da β -1,3-glucanase imobilizada por um período de 60 dias quando estocadas em frascos vedados e secos (na ausência de tampão), na temperatura de 4°C.

Resultados e Discussão

Teor de nitrogênio na amostra de Ξ Si-NH₂

A análise de nitrogênio do grupo -NH₂ da superfície 3-aminopropilsílica gel (Ξ Si-NH₂), forneceu uma porcentagem de 1,76 de nitrogênio. Sabendo-se que esta superfície modificada apresenta apenas um átomo de nitrogênio (massa atômica = 14,0067 g.mol⁻¹), podemos dizer que $1,76 \times 10^{-2} / 14,0067 = 1,25$ mmol de N por grama de Ξ Si-NH₂, como também será a quantidade de grupos 3-aminopropil presentes por grama da sílica.

Determinação da área superficial, do diâmetro dos poros e do volume dos poros

A análise dos resultados da Tabela 2 mostra que ao efetuar a cobertura da superfície da sílica gel (Ξ Si-OH) com os grupos organofuncionais, ocorreu uma diminuição da área superficial como mostram os valores de ΔS_{BET} . Essa redução de área superficial, após a modificação, é explicada pelo recobrimento dos poros da superfície pelos grupos organofuncionais, impedindo assim, o acesso de moléculas de nitrogênio gasoso durante a medida de área. Verificou-se também que quanto menor for a área superficial específica (S_{BET}), volume (V) e diâmetro médio (\check{D}) dos poros de uma sílica modificada e/ou funcionalizada em relação ao material de partida, maior será a quantidade de grupos ligantes presentes na superfície¹⁷.

Determinação do tempo de imobilização

A partir dos resultados apresentados nos testes de imobilização da enzima β -1,3-glucanase quando se variou o tempo de 0,5 a 3 h. Podemos observar que a medida que aumentamos o tempo de 0,5 a 1,5 h, houve um aumento significativo na taxa de imobilização,

ficando evidente que o sistema suporte funcionalizado com glutaraldeído (2,5%) ainda não atingiu o equilíbrio com a enzima β -1,3-glucanase, como atestam os valores da atividade (U). Após o tempo de 1,5 h de imobilização da enzima, os valores de atividade (U) se mantiveram praticamente estáveis (Figura 1). Assim, podemos dizer que para imobilizar a enzima β -1,3-glucanase no suporte funcionalizado é necessário um tempo acima de 1,5 h. Evidenciando uma cinética de imobilização enzimática, relativamente rápida para este processo.

Tabela 2. Área superficial específica (S_{BET}); Volume dos poros (V) e Diâmetro médio dos poros (\check{D}) das superfícies

Superfícies	S_{BET} (m ² .g ⁻¹)	ΔS_{BET} (m ² .g ⁻¹)	V (cm ³ .g ⁻¹)	\check{D} (nm)
Ξ Si-OH	466,0	—	0,803	6,89
Ξ Si-NH ₂	332,0	134,0	0,542	6,53
Ξ Si-NH-G (2,5%)	323,0	9,0	0,470	5,13
Ξ Si-NH-G (5,0%)	318,0	5,0	0,390	4,90

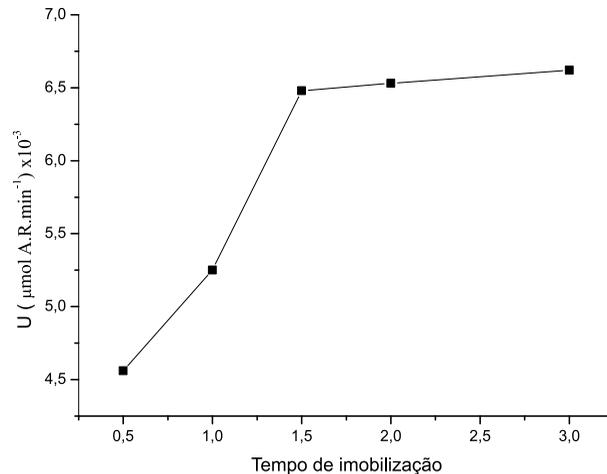


Figura 1. Tempo necessário para a reação de imobilização

Determinação de proteína total, concentração de enzima ligada ao suporte e atividade específica da β -1,3-glucanase livre e imobilizada

A concentração de proteína no extrato bruto apresentou um valor de 0,069 mg.cm⁻³ de proteínas totais e uma atividade específica de 1,88 U.mg⁻¹, para a enzima livre. A enzima imobilizada apresentou 0,0296 mg.cm⁻³

de proteínas totais e uma atividade específica de 2,30 U.mg⁻¹, como mostra a Tabela 3.

Tabela 3. Teor de proteína total, concentração de enzima ligada ao suporte e atividade específica da β -1,3-glicanase livre e imobilizada

Enzima	Proteína total (mg. cm ⁻³)	Concentração (mg.g ⁻¹)	Atividade específica (U.mg ⁻¹)
Livre	0,0690	—	1,88
Imobilizada	0,0296	0,592	2,30
Filtrado + lavado	0,0394	—	—

Efeito do pH na atividade da β -1,3-glicanase livre e imobilizada

O efeito do pH na atividade da enzima β -1,3-glicanase livre quando comparada com enzima imobilizada na mesma faixa de pH (2,6 a 7,0), na temperatura ótima de 50 e 40°C, respectivamente. Na Figura 2, notamos que os comportamentos das curvas são bastante similares em ambos os casos. Um deslocamento de 0,8 unidades do pH da enzima livre (pH ótimo 4,6) para o pH da enzima imobilizada (pH ótimo 3,8), caracterizando um deslocamento para a região mais ácida, indicando que os sítios ativos da enzima imobilizada encontram-se mais reativos no pH = 3,8. Isto também pode ser explicado devido às interações secundárias (como a força iônica da solução, interações polares e ligações de hidrogênio) entre a enzima β -1,3-glicanase e o suporte sílica gel. Observações similares para outras enzimas imobilizadas são descritas por vários autores^{18,19,20}.

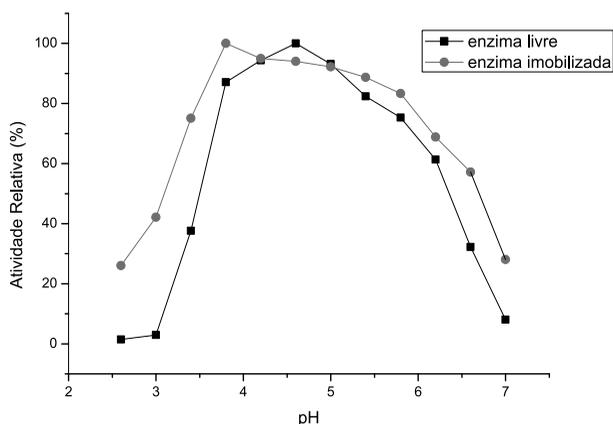


Figura 2. Efeito do pH na atividade da β -1,3-glicanase livre e imobilizada

Efeito da temperatura na atividade da β -1,3-glicanase livre e imobilizada

O efeito da temperatura na atividade da enzima β -1,3-glicanase livre quando comparada com enzima imobilizada na faixa de temperatura de 25 a 60°C é mostrado na Figura 3. O comportamento da curva da enzima livre exibe uma temperatura ótima de 50°C, com atividade relativa acima de 85% entre 40 e 55°C, e para a enzima imobilizada com atividade relativa acima de 75% entre 25 e 50°C, com temperatura ótima de 40°C. A enzima imobilizada apresenta, portanto uma faixa de temperatura maior, com atividade relativa acima de 75%. Em relação a enzima livre houve uma diminuição da temperatura ótima de 50 para 40°C. Resultados semelhantes foram encontrados por Cabral *et al.*²¹ para outras enzimas.

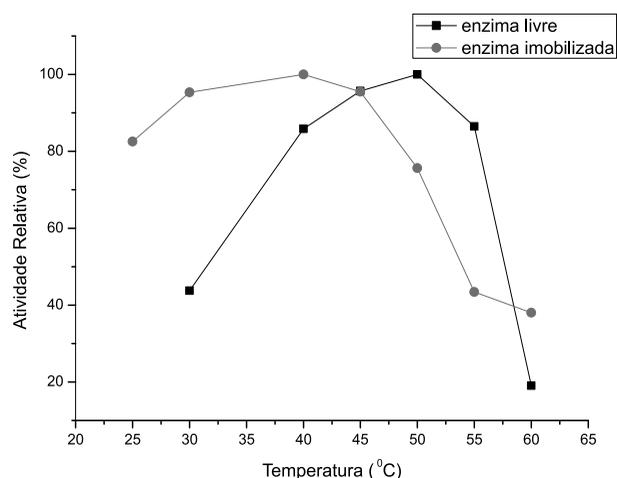


Figura 3. Efeito da temperatura na atividade da β -1,3-glicanase livre e imobilizada

Efeito da temperatura na estabilidade da β -1,3-glicanase livre e imobilizada

As Figuras 4 e 5, mostram a termoestabilidade da enzima livre nas temperaturas de 45 e 50°C por 90 minutos e da imobilizada nas temperaturas de 40 e 45°C por 150 minutos. A termoestabilidade da enzima livre e imobilizada foi calculada pela medida da atividade residual. Podemos observar que a enzima livre é estável a 45°C, pois mesmo após incubação por 90 minutos manteve 55% da atividade inicial. Entretanto a 50°C a atividade enzimática decresce rapidamente, perdendo totalmente a sua atividade após 60 minutos de incubação.

Entretanto, podemos observar na Figura 5, que a enzima imobilizada é estável tanto a 40 quanto a 45°C, pois mesmo após incubação por 150 minutos, manteve uma atividade residual em torno de 50%. Os resultados acima, sugerem que a termoestabilidade da enzima β -1,3-glicanase imobilizada sobre sílica gel, aumenta significativamente quando comparada com a enzima livre. Resultados semelhantes tem sido descritos para várias enzimas imobilizadas^{18,19}. Em geral o processo de imobilização de enzimas protege a enzima contra a inativação térmica²².

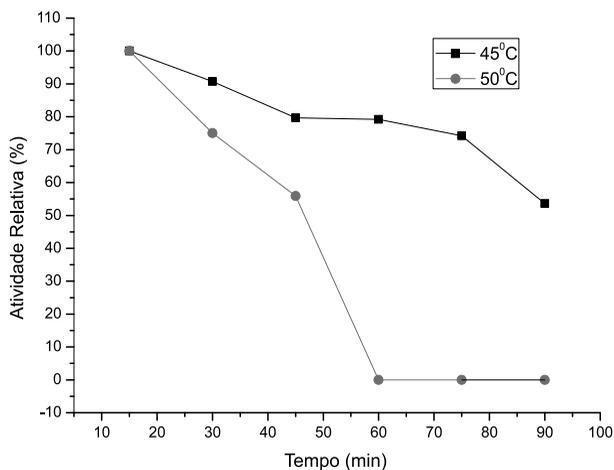


Figura 4. Efeito da temperatura na estabilidade da β -1,3-glicanase livre

Determinação dos parâmetros cinéticos K_M e $V_{MÁX}$ para β -1,3-glicanase livre e imobilizada

O valor do K_M encontrado foi de 0,148 mg.cm⁻³ e $V_{MÁX}$ de 0,159 U.cm⁻³. O valor de K_M foi maior do que o valor descrito por Ramon *et al.*²² para β -1,3-glicanase de *Trichoderma harzianum* (0,1 mg.cm⁻³). Os valores encontrados de K_M e $V_{MÁX}$ para a enzima imobilizada foram ligeiramente maiores (K_M foi de 0,154 mg.cm⁻³ e $V_{MÁX}$ de 0,162 U.cm⁻³) do que para a enzima livre. Este pequeno aumento dos valores nestes parâmetros pode ser devido à influência do suporte, por ter uma alta afinidade pela enzima-substrato. Esta troca na afinidade da enzima pelo seu substrato é provavelmente, causada pela mudança estrutural da enzima introduzida pelo processo de imobilização e pela baixa acessibilidade do substrato para o sítio ativo da enzima imobilizada¹⁸. O aumento dos valores das constantes cinéticas K_M e $V_{MÁX}$

da enzima imobilizada, tem sido descrito na literatura para diferentes enzimas por muitos autores^{23,24,25}.

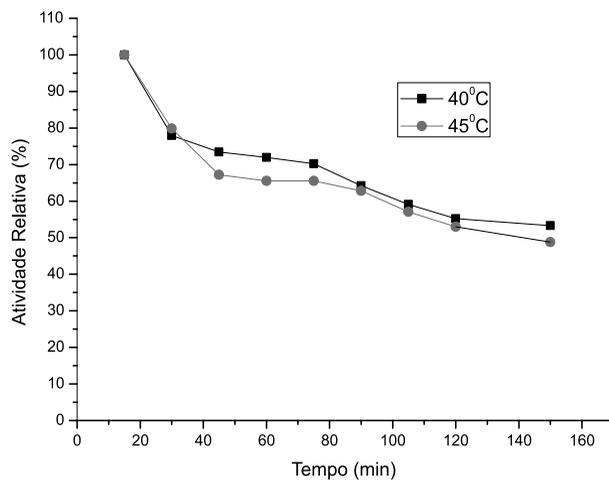


Figura 5. Efeito da temperatura na estabilidade da β -1,3-glicanase imobilizada

Determinação do tempo de estocagem da enzima imobilizada

Os resultados obtidos mostram que a enzima imobilizada quando estocada em frascos vedados a seco (na ausência de tampão) na temperatura de 4°C, após 35 dias, manteve 52% de sua atividade residual (próximo do tempo de meia vida que é de 50%) e, após 60 dias de estocagem, manteve 18% de sua atividade residual, com visto na Figura 6.

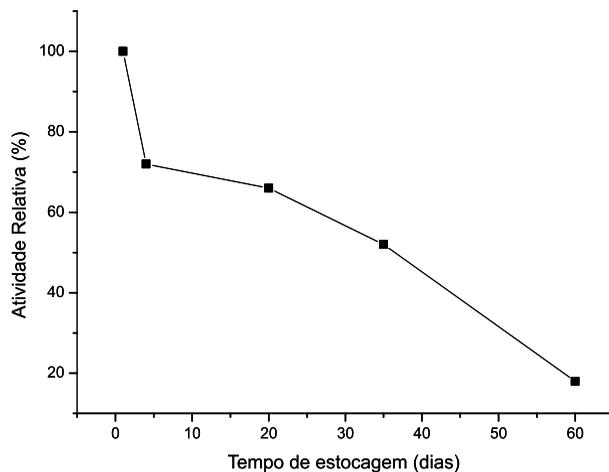


Figura 6. Tempo de estocagem da enzima imobilizada na temperatura de 4°C

Conclusões

O suporte sílica gel após sofrer modificação e funcionalização deve seus valores de área superficial, volume dos poro e diâmetro dos poros menores em relação à sílica gel usada inicialmente. A análise elementar de nitrogênio forneceu 1,75% de N por grama do suporte $\Xi\text{Si-NH}_2$, que permitiu estimar o grau de modificação do suporte, obtendo-se 1,25 mmol de N (grupos aminopropil) por grama do $\Xi\text{Si-NH}_2$.

A enzima β -1,3-glucanase produzida por *Trichoderma harzianum* (extrato bruto) na concentração de 0,069 mg.cm⁻³ de proteína total, foi imobilizada covalentemente ao suporte funcionalizado com glutaraldeído ($\Xi\text{Si-NH-G-Enzima}$), obtendo-se 0,0296 mg.cm⁻³ de proteína total. Isto quer dizer 0,512 mg de proteína imobilizada por grama do suporte $\Xi\text{Si-NH-G}$. Os ensaios enzimáticos forneceram os valores das atividades específicas (U) da β -1,3-glucanase de 2,30 U.mg⁻¹ para a imobilizada e de 1,88 U.mg⁻¹ para a enzima livre.

Evidenciou-se para este processo uma cinética de imobilização relativamente rápida, atingindo o equilíbrio com o suporte em cerca de 1,5 h. O pH de imobilização tem grande influência na retenção da atividade enzimática. Verificou-se que para a mesma faixa de pH 2,6 a 7,0 a enzima livre apresentou um pH ótimo de 4,6, enquanto que para a imobilizada um pH ótimo de 3,8. Indicando assim, um deslocamento de 0,8 unidade de pH para a região mais ácida em relação ao pH da enzima livre. O efeito da temperatura na atividade da enzima β -1,3-glucanase mostrou que a enzima imobilizada apresenta uma faixa de trabalho mais ampla (25 a 50°C) com atividade relativa acima de 75%.

O processo de imobilização da β -1,3-glucanase confere maior efeito de termoestabilidade em relação a enzima livre. Os parâmetros cinéticos obtidos mostraram que os valores de K_M e $V_{M\text{AX}}$ para a enzima imobilizada são ligeiramente maiores do que aquele da enzima livre.

A estabilidade à estocagem da enzima imobilizada a 4°C, na ausência de tampão, durante o período de 60 dias, mostrou que a enzima reteve 52% e 18% de sua atividade residual após 35 e 60 dias, respectivamente. Portanto, como pode ser observado pelos estudos realizados neste trabalho, que os conhecimentos sobre as propriedades de uma enzima imobilizada tendo a sílica

como suporte, fornecem perspectivas de novas aplicações destes materiais, para as mais diversas finalidades desde analíticas às cromatográficas e as catalíticas que precisam ser exploradas.

Referências Bibliográficas

1. Bailey, J.E. & Ollis, D.F. Biochemical eng. Fundamentals. 2nd. New York, McGraw-Hill, **1986**.
2. Fernandes, K.F., Lima, C.S., Lopes, F.M. Técnicas de Imobilização de Enzimas. Revista Processos Químicos, **2010**.
3. Hartemeier, W. Immobilized Biocatalysts – na Introduction, Trans. J. Wieser, Berlin, Springer-Verlag, **1988**.
4. Kirk, O., Borchert, T.V. & Fuglsang, C.C. Industrial enzyme application. Current opinion in biotechnology, vol.13 n^o 4, 345-351, **2002**.
5. Fernandes, K. F. Imobilização de Horseradish Peroxidase em Diferentes Polianilinas: Aplicações Analíticas. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, **2000**.
6. Cardoso, C. L.; Moraes, M. C. DE; Cass, Q. B. Imobilização de Enzimas em Suportes Cromatográficos: uma Ferramenta na Busca por Substâncias Bioativas, Química Nova, v. 32, n. 1, p. 175-187, **2009**.
7. Mendes, A. A.; Oliveira, P. C. DE; Castro, H. F. DE; Giordano, R. L. C. Aplicação de Quitosana como Suporte para a Imobilização de Enzimas de Interesse Industrial, Química Nova, No Prelo.
8. Alfaya, A. A. S.; Kubota, L. T. A Utilização de Materiais Obtidos pelo Processo de Sol-Gel na Construção de Biossensores, Química Nova, v. 25, n. 5, p. 835-841, **2002**.
9. Unger, K.K. Porous Silica, Elsevier. Amsterdam – New York, **1979**.
10. Iler, R.K. The Chemistry of Silica, John Wiley & Sons, New York, **1979**.
11. Scott, R.P.W. & Traiman, S.J. Chromatogr., 196: 193, **1980**.
12. Frye, J.S.; Hawkins, B.L. & Maciel, G.E. J. Catal., 98: 444, **1986**.
13. Vrancken, K.A.; Possemiers, K.; Voort, P. & Vansant, E.F. Surface modification of silica gels with aminoorganosilanes. J. Colloid Interface Sci. 235-241, **1994**.
14. Cestari, A.R. & Airoidi, C., Thiol-Anchored silica and its oxidized form- Some divalent cations chemisorbed in aqueous and non-aqueous solvents. J. Braz. Chem. Soc., vol.6, n^o 3, 291-296, **1995**.
15. Vogel, A.I. Química Orgânica, vol. 1, 3^a Ed. Livro Técnico S.A. e EDUSP, Rio de Janeiro, **1971**.
16. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.; Farr, A. & Randall, R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275, **1951**.
17. Airoidi, C. & Alcântara, E.F.C. Silica gel immobilized acetylacetone – some thermodynamic data in non-aqueous

- solvents, *Thermochim Acta*, 259: 95-102, **1995**.
18. Arica, M.Y. & Hasirci, V. Immobilization of glucose oxidase: A comparison of e entrapment and covalente bonding. *J. Chem. Tech. Biochnol.* 58: 287-292, **1993**.
 19. Uhlich, T; Uhlich, M. & Tomaschewski, G. Immobilization of enzyme in photochemically cross-linked polyvinyl alcohol. *Enzyme Microb. Technol.* 19: 124-131, **1996**.
 20. Arica, M.Y.; Alaeddinoglu, N.G. & Hasirci, V. Immobilization of glucoamylase onto activated pHEMA/EGDMA microspheres: properties and application to a packed-bed reactor. *Enzyme Microb. Technol.* 22: 152-155, **1998**.
 21. Cabral, J.M.S.; Kennedy, J.F. & Novais, J.M. Investigation of the operation stabilities and kinetics of glucoamylase immobilized on alkylamine derivatives of titanium (IV) – activated porous inorganic supports. *Enz. Microb. Technol.* 4: 343-348, **1982**.
 22. Ramon, O.; Kupiec-Conhen, R. & Chet, I. Regulation of β -1,3-gluconases by carbon starvation in the mycoparasite *Trichoderma harzianum*. *Mycol. Res.* 104 (4): 415-420, **2000**.
 23. Kazan, D.; Ertan, H. & Erarslan, A. Stabilization of *Escherichia coli* penicillin G acylase against thermal inactivation by cross-linking with dextran dialdehyde polymers, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 48: 191-197, **1997**.
 24. Mohamed, A. & Abdel, N. Immobilization of *Paenibacillus macerans* NRRL B-3186 cyclodextran glucosyltransferase and properties of the immobilized enzyme, *Process Biochem.* 34: 399-405, **1999**.
 25. Oh, J.O. & Kim, J.H. Preparation and properties of immobilized amyloglucosidase on nonporous PS/PnanSS microspheres, *Enzyme Microb. Technol.* 27: 356-361, **2000**.

Fernando A. Silva^{1,2*}, Edésio F. C. Alcântara¹ & Valdirene N. Monteiro¹

¹Universidade Federal de Goiás, Campus II Samambaia, CP 131, Goiânia, GO.

²Faculdade de Tecnologia SENAI Roberto Mange, Anápolis, GO.

*e-mail: fernandoa.senai@sistemafieg.org.br

Dietary and Socioeconomic Factors Associated with Iron Concentration in Human Colostrum

Renata M. Gonçalves, José R. Gonçalves & Nélida S. Fornés

Estudo transversal, que objetivou determinar fatores socioeconômicos, de estilo de vida e nutricionais associados ao ferro do colostro de puérperas. Utilizou-se questionário socioeconômico e demográfico para obter características pessoais e de estilo de vida, e outro questionário de frequência de consumo alimentar (QFCA) para avaliação dietética referente aos últimos seis meses de gestação. Coletaram-se amostras de colostro para quantificar o ferro por espectrometria de absorção atômica por chama. Empregou-se estatística descritiva, teste de Mann-Whitney, teste t de Student e coeficiente de correlação de Spearman. A média de ferro de 281,25 µg/L está compatível com outros estudos, indicando que o colostro é essencial para o bebê nos primeiros meses de vida. Não houve associações significativas entre ferro do colostro e variáveis socioeconômicas e nem correlação com consumo alimentar. Tais fatores não influenciaram o valor do ferro do colostro.

Palavras-chave: *absorção atômica; amamentação; ferro.*

Descriptive, cross-sectional study which aimed to determine socioeconomic, lifestyle and nutritional values of iron associated with human colostrum. It was used a questionnaire to obtain demographic and socioeconomic characteristics and personal lifestyle, and another Food Frequency Questionnaire (FFQ) for dietary assessment on the last six months of pregnancy. Samples were collected from colostrum to quantify the iron by flame-atomic absorption spectrometry. Descriptive statistics were applied, besides Mann-Whitney test, Student t test and correlation coefficient of Spearman. The average iron 281.25 µg/L is consistent with other studies indicating that the colostrum is essential food for the baby during the first months of life. There were no significant associations between iron colostrum and socioeconomic variables and dietary intake. These factors did not influence the amount of iron obtained from the colostrum.

Keywords: *atomic absorption; breastfeeding; iron.*

Introduction

Micronutrient deficiencies such as iron, vitamin A and iodine are considered large public health problems in many developing countries, causing great damage to health of people¹⁻³. These nutrients are important in maintaining vital bodily functions such as growth, reproduction, functions antioxidant and immune².

Among the problems involving micronutrients, the iron deficiency is the most common nutritional deficiencies, especially in childhood, affecting children in the first and second years of life⁴. Studies conducted throughout Brazil showed the prevalence of anemia in children aged 6 months to 5 years, ranging from 36.4% to 63.0%^{5,6}. In twenty day care centers of São Paulo, the prevalence of anemia was 68.8% in children aged 6 to 75 months⁷, affecting more than half of the studied population. In the city of Belo Horizonte, the prevalence of anemia among children aged 7 to 74 months was 28.8%⁸. In a study conducted in the city of Goiânia, the prevalence of anemia among children aged 6 to 24 months was 53.9%⁹.

During pregnancy, the micronutrient deficiency can cause adverse consequences for health of pregnant woman and fetal development. During the lactation period, the nutritional deficiencies of the puerpera may contribute to maintain low nutrient reserves in the infant, increasing the chance of nutritional deficiencies in early life, when there is a higher prevalence of health infantile problems^{10,11}, especially when the baby is being fed exclusively via breastfeeding.

It is believed that the needs of nutrient iron in the newborn is mostly covered by the mineral reserves accumulated during fetal development, especially in the third trimester of gestation¹². In breastfeeding, the concentrations of iron in human milk are considered below is required to satisfy the needs of the baby who needs special attention. It is recommended for babies up to 6 months 0.27 mg of iron daily, based on the consumption of 750 mL of milk per day, as directed by the Institute of Medicine (IOM)¹³.

Inequalities were observed in the mineral composition of breast milk by Oliveira¹⁴, noting that the biggest variations to the trace elements occurred in the stage of mature milk, followed by colostrum and

after by transition's milk. In all cases, the variations in mineral content are greater than 100%. The variation of iron's concentration on milk results mainly from the assumption that the composition of breast milk depends naturally of the particular nutritional requirements of term baby¹⁵, demonstrating that even amounts of iron in the colostrum considered low can meet the need of the newborn of each mother.

Therefore, it is important to maintain good nutritional status and health of the pregnant women as a whole, because part of the maternal condition can be transferred to the child via colostrum, which probably depends on the habits of pregnant women and breastfeeding, including food intake. Since the alimentation can provide adequate nutrition to mother and fetus, preventing anemia, for example, investigate the food intake during this phase can help to check whether factors related with the puerpera's lifestyle are related to iron content in colostrum.

Thus, with respect to food intake, some studies have evaluated the retrospective consumption of pregnant adolescents^{16,17} and others have checked the food intake of adult women during pregnancy, compared to post-partum period¹⁸. But none of these studies attempted to relate food and nutrient intake in the diet with iron levels present in human colostrum. Especially in the Midwest Region of Brazil there are no papers about the subject.

Therefore, knowing that there are few studies in Brazil to assess the dietary intake of women during the reproductive period associated with the quantities of iron from human colostrum awoke us to the need for more work. Moreover are high the prevalence rates in iron deficiency, especially among children, being a public health problem. Having breast milk as the main food source for infants and considering the relevance of iron's colostrum deficiency for the parental prevention of this element, the aims of this study were to determine socioeconomic factors, of lifestyle and nutritional associated with values of iron in the colostrum of mothers.

Methods

Cross-sectional descriptive study. The target population studied was comprised of eighty puerperium women hospitalized in rooming in care public Maternity

Hospital Nossa Senhora de Lourdes from the city of Goiânia, Goiás State. For convenience sample, was followed those inclusion criteria: maternal age no less than 18 years, mothers with uneventful pregnancy, natural childbirth, term newborn and that has not belonged to risk groups and neither were hospitalized in the Neonatal Intensive Care Unit and those that the colostrum was easily obtained in the first five postpartum days. There was no refusal.

Data were collected between July and December 2008, before the data collection the puerpera became aware of the objectives and procedures of the research and agreed to participate voluntarily, signing the Instrument of Consent. The research protocol number 110/2007 was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Goiás.

The data collection occurred through direct interviews and in the presence of the mother and consultation in records by the principal researcher. A socioeconomic and demographic questionnaire was applied, obtaining data such as age, parity, scholarship, income, region lived, use of nutritional supplements, lifestyle information, including alcohol consumption and smoking habits. Were also obtained data from retrospective food intake of the last six months of pregnancy, through semi-quantitative questionnaire that was developed and validated by Fornés et al.¹⁹, the Food Frequency Questionnaire (FFQ) for use in regional population and low income.

The FFQ¹⁹, containing 127 food items, divided into twelve groups (milk and derivatives; legumes, eggs and meat, cereals and derivatives, pasta and snack foods, sugars and sweets, fruits, vegetables, fats, spices and condiments, alcoholic beverages, soft drinks and infusions) with nine frequency categories²⁰ of consumption, namely: never or less than 1 time per month, 1 time per month, 2-4 times per month, 2-4 times per week, 5-6 times per week, 1 time per day, 2-3 times per day, 4-5 times per day and six or more times per day. Was calculated the average daily intake of nutrients consumed by the participants through a special program compiled from several composition tables foods²¹⁻²⁵, to meet the demands of the study.

Subsequent to the interviews, the colostrum samples were obtained by hand milking, proceeding initially the breast sanitize with deionized water. In this procedure

were used disposable gloves. The samples corresponded to 10 ml aliquots of colostrum directly placed in sterile polyethylene bottles labeled, previously treated (washed with distilled water, deionized water, nitric acid solution to 5%, and again washed with deionized water). The samples were transported in isothermal box at a temperature of 3° C to 4° C during the way to the laboratory and frozen at -20 ° C.

The samples preparation for quantitative analysis of the mineral studied consisted of homogenization of colostrum, followed by distribution in aliquots of 0.5 ml in duplicate, as analytical official standards²⁶. The technique used was flame-atomic absorption spectrometry, with equipment Perkin Elmer, brand Analyst 200, equipped with System 2 Electrodeless Discharge Lamps (electric discharge lamp - EDL System), of the official laboratory of physicochemical analysis of the National Agricultural Laboratory in Goiás, of the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply. The detection limit adopted for this factor was 0.005 µg/L. For each sample, was used the average calculated from the results of two tests performed.

For the analysis of results took place descriptive statistics of the data. Categorical variables were expressed as frequencies and percentages, the continuous variables, measures of central tendency. Was evaluated the distribution of continuous variables by the Kolmogorov-Smirnov test, considered normal when $p \geq 0.05$. The comparison of numerical variables with normal distribution according to the respective reference values, was performed by t-Student test. To compare means between two groups, was applied the Mann-Whitney test for nonparametric variables and the Kruskal Wallis test for more than two groups. Was used the Spearman's correlation coefficient to measure the correlation between continuous variables with non-normal distribution. It was established statistical significance level of 5% in all analysis. The statistical package used for analysis was Statistical Package for Social Sciences (SPSS), version 13.0.

Results

The eighty postpartum women who participated in the study, 70% were aged between 18 and 25, and 65% received up to half of the minimum wage jobs they worked

at the time. Single mothers were 36.3% and almost the same percentage had completed primary education as maximum level of scholarity (Table 1). The habits of smoking and alcohol consumption were not common in most cases, at least during the gestation period.

Table 1. Socioeconomic and lifestyle characteristics of the women of the Maternity Nossa Senhora de Lourdes (n = 80). Goiânia, Goiás, 2009.

Participants	n	%
Total	80	100
Age (years)		
18 to 25	56	70,0
25 to 38	24	30,0
Schooling		
Primary Education	28	35,0
Secondary Education	49	61,2
Higher Education	03	3,8
Per capita income (MW^a)		
< ¼	12	15,0
¼ to ½	40	50,0
½ to 1	20	25,0
1 to 2	6	7,5
No mention	2	2,5
Marital status		
Single	29	36,3
Married	51	63,7
Smoke habit		
Yes	5	6,3
No	75	93,7
Alcoholic beverage		
Yes	10	12,5
No	70	87,5
Use of nutritional supplements		
Yes	73	91,2
No	7	8,8
Used supplements^b		
Iron and folic acid	24	30,1
Multivitamin and polimineral	28	35,0
Ferrous sulfate	21	26,1
Not used	7	8,8

^a One Minimum Brazilian Wage = 250 US dollars. ^b Supplements reported by participants.

The mothers reported using nutritional supplements during pregnancy in 91.2% of the samples for at least four months. Of these 35% made use of multivitamin and polimineral supplements, and 30.1% said that used the compound based on iron and folic acid together. Had an average of 39 weeks of pregnancy before birth, and an median of two sons of puerperium women. The average of weight of birth infants was 3 240.61 g, classified in term newborns.

The iron content found in colostrum samples varied widely from one to the other mothers, with an average of 281.25 µg/L, and median 128.94 µg/L. Values were above average, considered plausible concentrations of iron in human colostrum, for example, the value obtained from a sample of 1 461.35 µg/L.

As regards the frequency of food consumption in Table 2 contains the most consumed foods reported by women, expressing those that contributed most to the nutrient values ingested daily, reported in Table 3. Among the foods mentioned by the mothers, who were part of the consumption at least once a day were whole: milk, beef, rice, French bread, crackers, bananas, oranges, lettuce, tomato, margarine, vegetable oil, coffee and soft drinks with sugar. Was perceived that the frequent consumption of foods rich in carbohydrates and proteins, which showed average values above to recommended by the Recommended Dietary Allowances (RDA)²⁷, in addition to cholesterol, which is also found in animal products consumed by women during pregnancy in greater quantity. It was observed relevant significance statistical to compare these nutrients with the reference values of literatura²⁷.

According to the socioeconomic and lifestyle, women were subdivided into two or more groups to test possible associations with the nine iron quantified the colostrum samples analyzed, according to Table 4. The results were not statistically significant not only for these examinations, as for the coefficients obtained in the Spearman correlations made between iron levels in colostrum and nutrients (Table 5).

Discussion

The variation of iron concentration on human milk can be found in this study, which was observed values

ranging from 0.86 to 4184.00 mg/L. Most of the values obtained showed that the colostrum has considerable quantities of mineral, probably due to diet of the puerperas during pregnancy, mainly from ingested meat products, especially meat and beef liver. The consumption of these products as well as dairy products, eggs and chicken, also contributed to the increase of the protein consumed by pregnant women studied above recommended. Another autor²⁸ found wide variation in results obtained for iron, however he have used samples of mature breast milk, which has lower concentrations of some nutrients than the initial milk (colostrum).

The average levels of iron are similar to other researches^{14,29}, that have obtained 250 µg/L at 800 µg/L, showing variability of results among a sample and other, as observed in this study. They have affirmed²⁹ that postpartum iron concentrations in colostrum is not associated with maternal mineral status. This was confirmed in this study, in which there was neither association of iron in colostrum with the fact of the puerpera have used or not nutritional supplements and nor with different types of supplements, based on iron or iron and folic acid, or still Multivitamin and Polimineral compounds.

Another study also showed no significant effect of supplementation during pregnancy on the metal concentrations in human milk. Thus, despite ingesting mineral supplements added to the diet neither the increase of iron intakes and nor the reduction affected the concentrations in human milk in the case of the study mentioned, like found in the analysis of this research with colostrum.

It is observed the same when we tried to correlate the iron with the intake of nutrients in the diet by the puerperas during the gestation period, that difference was not statistically significant. Therefore, although the proteins, carbohydrates, lipids, vitamins A and C are found, mostly above the RDA, except the iron that lies beneath, it is confirmed that really the supplementation and the increase of these nutrients intakes not reflect in the concentrations of iron in colostrum. As other authors this is an expected result because the concentrations of iron in human milk does not seem to be influenced by the nutritional iron status of women who breastfeeds^{29,30,31}.

Table 2. Frequency of food consumption by women of the Maternity of Our Lady of Lourdes (n=80). Goiânia, Goiás, 2009.

Food	Frequency of Food Consumption (%)				
	Never/ rare	2 - 4 times/ week	5 - 6 times/ week	1time/ day	2-3 times/ Day
Natural milk	32,5	8,8	3,8	27,5	21,3
Yogurt	18,8	28,8	2,5	11,3	3,8
Bean	1,3	2,5	3,8	10,0	82,4
Beef	5,0	53,8	5,0	7,5	-
Beef liver	28,8	27,5	2,5	1,3	-
Rice	-	-	-	3,8	96,2
Cassava flour	28,8	27,5	1,3	16,3	2,5
Simple cake	27,5	32,5	2,5	3,8	1,3
Cracker	18,8	31,3	10,0	21,3	2,5
French bread	15,0	31,3	6,3	41,3	3,8
Pasta	5,0	66,3	6,3	3,8	1,3
Sweet (guava)	41,3	15,0	2,5	3,8	1,3
Banana	18,8	26,3	7,5	35,0	1,3
Orange	2,5	48,8	12,5	26,3	1,3
Apple	15,0	38,8	8,8	20,0	-
Lettuce	3,8	42,5	12,5	27,5	2,5
Boiled potato	17,5	52,5	2,5	6,3	-
Boiled beet	27,5	45,0	3,8	2,5	-
Tomato	2,5	32,5	13,8	46,2	5,0
Margarine	15,0	15,0	16,3	42,5	6,3
Vegetable oil	2,5	1,3	-	11,3	83,8
Coffe	31,3	7,5	3,8	42,5	12,5
Soft drink	11,3	26,3	11,3	10,0	-
Juice	31,3	31,3	8,8	16,3	3,8

According to recommendation of the Institute of Medicine (IOM)¹³ for babies from birth to six months of age, the newborns of the participants puerperas ingested the amount of 0.21 mg of iron in 750 mL of milk received daily from the iron average obtained in this study. A value close to the one established as appropriate, that is 0.27 mg/day¹³. Therefore, despite the needs of the newborn be maintained by iron stored¹² during the period of development at the pregnancy, the human colostrum studied can meet the daily iron recommendations of the newborn.

It is noteworthy that iron of the colostrum is highly bioavailable in the infant body¹⁵, and even those

mothers who did not have values close to the indicated, values constitute the peculiar needs of the children¹⁵ because each mother produce the milk on ideal proportions of nutrients to meet his children, motive why are explaining the variabilities of concentrations of this mineral. This demonstrates that individual differences of iron in colostrum may therefore be due to the varied needs of each baby. Thus, it is the ideal food for newborns of this mothers.

Table 3. Nutrient intake and association with the recommendations of the women of the Maternity Our Lady of Lourdes. Goiânia, Goiás, 2009.

Variables	Average	median	Min.	Max.	Values	
					Reference ^a	p ^b
Macro nutrients						
Energy (Kcal)	4611,54	4462,40	2037,07	8957,30	-	-
Carbohydrate (g)	706,16	703,38	331,21	1328,29	175	<0,001
Lipids (g)	124,47	113,49	46,92	312,34	-	-
Protein (g)	165,79	157,06	72,50	337,68	60	<0,001
Micro nutrients						
Calcium (mg)	1314,33	1119,27	546,74	2988,35	1200	0,109
Iron (mg)	24,57	24,10	9,48	62,80	30	<0,001
Retinol (µg)	5784,87	2562,24	401,17	32479,94	800	<0,001
Vitamin C (mg)	439,42	388,51	81,87	1337,19	70	<0,001
Fatty acid						
Saturated (g)	40,35	36,31	12,43	113,59	-	-
Unsaturated (g)	71,56	67,51	26,56	172,23	-	-
Cholesterol (mg)	521,72	380,55	101,31	1948,76	-	-

+SD = Standard deviation. ^aRDA (NRC, 1989). ^bT-Student test for a sample.

Not only this, but other studies also show that breast milk is best for the newborn child that foods with infant formula using in the preparation cow's integral milk. Even with the fact of cow's milk have a average of iron's value (0.96 mg/L) higher than human milk, as the value obtained on the study at Goiás state³², being that high

concentrations of calcium in cow's milk may decrease iron absorption, giving signs of anemia to the baby during the first six months of vida³³.

Table 4. Iron's colostrum values associated with socioeconomic and lifestyle of the women of the Maternity Our Lady of Lourdes. Goiânia, Goiás, 2009.

Variable	Iron (µg/L)			p
	Average	Median	CI 95%+	
Mother's age				
<20 years	2,07	1,27	0,61 – 3,53	0,987a
≥20 years	2,89	1,17	1,27 – 4,52	
Rent				
<1 SM	189,85	129,35	58,15 – 321,54	0,706b
1 a <3 SM	339,53	114,10	128,84 – 550,23	
≥3 SM	225,40	150,99	63,88 – 386,92	
N° of children				
1	2,59	1,37	1,05 – 4,14	0,981 a
2 or more	2,77	1,16	0,77 – 4,76	
Lived in rural zone				
Yes	3,14	1,35	1,34 – 4,96	0,445 a
No	1,67	1,09	0,95 – 2,40	
Contaminated area				
Yes	2,10	1,27	0,72 – 3,48	0,939 a
No	2,81	1,18	1,30 – 4,32	
Smoke habit				
Yes	1,14	1,38	0,31 – 1,97	0,842 a
No	2,79	1,18	1,45 – 4,13	
Use of alcoholic beverage				
Yes	5,79	1,49	-3,29 – 14,80	0,206 a
No	2,24	1,16	1,35 – 3,13	
Use of supplements				
Yes	2,83	1,23	1,45 – 4,20	0,399 a
No	1,24	0,96	0,30 – 2,18	
Types of supplements				
Ferrous sulfate	364,73	137,42	112,24 – 617,22	0,297 b
Iron and folic acid	397,54	138,50	56,36 – 738,72	
Multivitamin and polimineral	158,21	108,78	95,76 – 220,66	

^aTest of Mann-Whitney. ^bTest of Kruskal Wallis. ^cCI = 95% Confidence interval.

An study found that higher concentrations of hemoglobin were observed among children who were exclusively breastfed, followed by those who were predominant breastfeeding pattern³⁴, reaffirming the theory that babies fed with breast milk rarely show any sign of anemia. Therefore, there is no clinical or scientific support for the need of extra iron to the newborn, in addition to amounts provided by breast milk of term lactating woman, at least during the first six months.

Table 5. Correlation between iron values in colostrum ($\mu\text{g/L}$) and nutrients of mothers of the Maternity Our Lady of Lourdes. Goiânia, Goiás, 2009.

Variables	ρ^a	p
Macronutrientes		
Energy (Kcal)	-0,007	0,952
Carbohydrate (g)	-0,068	0,548
Lipids (g)	0,064	0,572
Protein (g)	0,077	0,499
Micro nutrients		
Calcium (mg)	0,026	0,819
Iron (mg)	0,002	0,983
Retinol (μg)	0,113	0,317
Vitamin C (mg)	-0,031	0,787
Fatty acid		
Saturated (g)	0,082	0,467
Unsaturated (g)	0,059	0,605
Cholesterol (mg)	0,117	0,301

^aCorrelation Coefficient of Spearman.

Regarding income, there was no significant difference associated with the iron, this result was also observed among women in other research³⁵. The others factors socioeconomic, demographic and lifestyle tested showed no significant associations. Thus, in agreement with other studies^{15,29,30,31}. The concentration of iron in human milk was also did not associate with socioeconomic factors or to maternal nutritional status of iron. Consequently, the social and economic factor of puerpera did not influence on the iron content in colostrum, at least in the way that they were focused and researched.

Thus, in the present study, the factors evaluated were not significantly associated with values of iron, have not been determinative of the concentration of

this element in colostrum of puerperas assessed. However, there is evidence that iron levels can be affected in some way due to the variation found in each puerpera and on the different studies compared, which were conducted under various conditions. Because of this variability in the levels of iron in breast milk, it is not recommended to use just the quantification of this mineral to assess the dietetic state of the puerpera and may be searched other likely factors allied with the content of this element.

This proposition refers to several other issues that can justify making further work on the issue in Brazil and other countries to enable comparisons of the results, since this study provides important data as a starting point, confirming that human milk is always the best food for infants in their first months of life, supplying the physiological needs of this phase. Thus, we point out the exclusive breastfeeding like important measure for prevention of anemia and its consequences in childhood.

Acknowledgments

The Coordination of Improvement of Higher Level Personnel (Capes) by the PhD scholarship awarded to author R. M. Gonçalves. For the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply by the logistical support. To the women participants by their availability.

References

1. Diskhuizen, M. A.; Wieringa, F. T.; West, C. E. Muherdiyantiningsih M. Concurrent micronutrient deficiencies in lactating mothers and their infants in Indonesia. *Am. J. Clin. Nutr.* **2001**; 73:786-791.
2. Mason, J. B.; Lotfi, M.; Dalmiya, N.; Sethuraman, K.; Deitchler, M. The micronutrient report. *Current progress and trends in the control of vitamin A, iodine, and iron deficiencies*. Ottawa: The Micronutrient Initiative; 2001.
3. Ramakrishnan, U. Prevalence of micronutrient malnutrition worldwide. *Nutr. Rev.* **2002**; 60(suppl):46-52.
4. Murila, F. V.; Macharia, W. M.; Wafula, E. M. Iron deficiency anaemia in children of a peri-urban health facility. *East. Afr. Med. J.* **1999**; 76(9):520-523.
5. Brunken, G. S.; Guimarães, L. V.; Fisberg, M. Anemia em crianças menores de três anos que frequentam creches públicas em período integral. *J. Pediatr.* **2002**; 78(1):50-56.
6. Silva, D. G.; Franceschini, S. C. C.; Priore, S. E.; Ribeiro, S.

- M. R.; Szarfarc, S. C.; Souza, S. B. et al. Anemia ferropriva em crianças de 6 a 12 meses atendidas na rede pública de saúde do município de Viçosa, Minas Gerais. *Rev. Nutr.* **2002**; 15:301-308.
7. Bueno, M. B.; Selem, S. S. C.; Arêas, J. A. G.; Fisberg, R. M. Prevalência e fatores associado à anemia entre crianças atendidas em creches públicas de São Paulo. *Rev. Bras. Epidemiol.* **2006**; 9:462-470.
 8. Rocha, D. S.; Lamounier, J. A.; Capanema, F. D.; Franceschini, S. C. C. et al. Estado nutricional e prevalência de anemia em crianças que frequentam creches em Belo Horizonte, Minas Gerais. *Rev. Paul. Pediatr.* **2008**; 26(1):6-13.
 9. Beraldo, F. C. *Ingestão de nutrientes e anemia em crianças de creches municipais em Goiânia* [dissertação]. Goiânia, Goiás: Universidade Federal de Goiás; 2008.
 10. Canadian Paediatric Society. Nutrition Committee. Nutrient needs and feeding of premature infants. *Can. Med. Assoc. J.* **1995**; 12:1765-1785.
 11. Silva, L. S. V.; Thiapó, A. P.; Souza, G. G.; Saunders, C.; Ramalho, A. Micronutrientes na gestação e lactação. *Rev. Bras. Saúde Materno Infant.* **2007**; 7(3):237-244.
 12. Donangelo, C. M.; Trugo, N. M. F.; Dorea, J. G. Hepatic reserves of iron, copper and vitamin B12 in Brazilian fetuses and infants of different socioeconomic status. *Nutrition* **1993**; 9:430-436.
 13. Institute of Medicine (IOM). National Research Council. *Dietary Reference Intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc*. Washington, DC: National Academy Press; 2002.
 14. Oliveira, M. C. C. *Práticas de amamentação, teores de minerais e vitamina A no leite humano em diferentes fases de lactação segundo variáveis maternas* [dissertação]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2003.
 15. Dorea, J. G. Iron and copper in human milk. *Nutrition* **2000**; 16:209-220.
 16. Azevedo, D. V.; Sampaio, H. A. C. Consumo alimentar de gestantes adolescentes atendidas em serviços de assistência pré-natal. *Rev. Nutr.* **2003**; 16:273-280.
 17. Barros, D. C.; Pereira, R. A.; Gama, S. G. N.; Leal, M. C. O consumo alimentar de gestantes adolescentes no Município do Rio de Janeiro. *Cad. Saúde Pública* **2004**; 20(suppl 1):121-129.
 18. Castro, M. B. T.; Kac, G.; Sichieri, R. Padrão de consumo alimentar em mulheres no pós-parto atendidas em um centro municipal de saúde do Rio de Janeiro, Brasil. *Cad Saúde Pública* **2006**; 22(6):1159-1170.
 19. Fornés, N. S.; Stringhini, M. L. F.; Elias, B. M. Reproducibility and validity of a food-frequency questionnaire for use among low-income Brazilian workers. *Public Health Nutrition* **2003**; 6(8):821-827.
 20. Fornés, N. S.; Martins, I. S.; Hernan, M.; Velásquez-Meléndez, G.; Ascherio, A. Food frequency consumption and lipoproteins serum levels in the population of Cotia, São Paulo, Brazil. *Rev. Saúde Pública* **2000**; 4(34):380-387.
 21. Franco, G. *Tabela de composição química dos alimentos*. 9. ed. São Paulo: Atheneu; 2003.
 22. Ministério do Planejamento e Orçamento. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Estudo nacional da despesa familiar – ENDEF. *Tabelas de composição de alimentos*. 4. ed. Rio de Janeiro: IBGE; 1996.
 23. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação (NEPA). *TACO – Tabela Brasileira de Composição de Alimentos*. 2. ed. Campinas: Nepa-Unicamp; 2006.
 24. Philippi, S. T. *Tabela de composição de alimentos: suporte para decisão nutricional*. Brasília: Anvisa, Finatec, NUT-UnB; 2001.
 25. Pinheiro, A. B. V.; Lacerda, E. M. A.; Benzecry, E. H.; Gomes, M. C. S.; Costa, V. M. C. *Tabela para avaliação de consumo alimentar em medidas caseiras*. 4a ed. São Paulo: Atheneu; 2002.
 26. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instituto Adolfo Lutz. *Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos*. Brasília: Ministério da Saúde; 2005. 1018 p.
 27. National Research Council (NRC). *Recommended dietary allowances*. 10th ed. Washington, DC: National Academy Press; 1989. 285 p.
 28. Morgano, M. A.; Souza, L. A.; Neto, J. M.; Rondó, P. H. C. Composição mineral do leite materno de bancos de leite. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **2005**; 25(4):819-824.
 29. Domellöf, M.; Lönnnerdal, B.; Dewwey, K.G.; Cohen, R.J.; Hernell, O. Iron, zinc and copper concentrations in breast milk are independent of maternal mineral status. *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**; 79:111-115.
 30. Zapata, C.V.; Donangelo, C. M.; Trugo, N. M. F. Effect of iron supplementation during lactation on human milk composition. *J. Nutr. Biochem.* **1994**; 5:331-337.
 31. Shashiraj, Faridi, M. M.; Singh, O.; Rusia, U. Mother's iron status, breastmilk iron and lactoferrin: are they related? *Eur. J. Clin. Nutr.* **2006**; 60:903-908.
 32. Raj, S.; Faridi, M.; Rusia, U.; Singh, O. A prospective study of iron status in exclusively breastfed term infants up to 6 months of age. *Int. Breastfeed. J.* **2008**; 3:3.
 33. Gonçalves, J. R.; Mesquita, A. J.; Gonçalves, R. M. Determinação de metais pesados em leite integral bovino pasteurizado no Estado de Goiás. *Ci. Anim. Bras.* **2008**; 9(2):365-374.
 34. Oliveira, M. A. A.; Osório, M. M. Consumo de leite de vaca e anemia ferropriva na infância. *J. Pediatr.* **2005**; 81:361-367.
 35. Mello-Neto, J.; Rondó, P. H. C.; Morgano, M. A.; Oshiiwa, M.; Santos, M. L.; Oliveira, J. M. Iron Concentrations in Breast Milk and Selected Maternal Factors of Human Milk Bank Donors. *J. Human Lact.* **2009**; 20(10):1-5.

Renata M. Gonçalves^{1*}, José R. Gonçalves² & Nélida S. Fornés³

¹Faculty of Medicine, Federal University of Goiás, Goiânia, GO.

²School of Technology SENAI Roberto Mange and Ministry of Agriculture, Livestock and Supply, Anápolis, GO.

³School of Nutrition, Federal University of Goiás, Goiânia, GO.

*e-mail: renata.nut@gmail.com

Identificação do Flavonóide 7,4'-Dimetoxi-Quercentina- 3-O-B-D-Glicopiranosídeo e Avaliação da Atividade Antitumoral dos Frutos

Guilhermina C. Nascimento, Antônio C. S. Menezes & Elizangela P. P. Lacerda

Estudos fitoquímicos feitos com diferentes espécies do gênero *Erythroxylum* (pertencente à família Erythroxylaceae) levaram ao isolamento de vários metabólitos secundários como flavonóides e alcalóides, bem como taninos, terpenos e fenilpropanóides que apresentam atividades anti-oxidantes, anti-cancerígenas, atividade anti-inflamatória dentre outras. O presente trabalho teve como objetivo principal realizar o estudo fitoquímico das frações do extrato metanólico das folhas de *Erythroxylum deciduum* A. St.-Hill, visando o isolamento e identificação de substâncias, bem como avaliar a atividade antitumoral das células K562 de leucemia mielóide crônica do extrato metanólico dos frutos de *E. deciduum*.

Palavras-chave: *Erythroxylum deciduum*, 7,4'-dimetoxi-quercentina-3-O-β-D-glicopiranosídeo, atividade antitumoral.

Phytochemical studies made with different species of *Erythroxylum* (belonging to the family Erythroxylaceae) led to the isolation of several secondary metabolites such as flavonoids and alkaloids, and tannins, terpenes and phenylpropanoids activities that have anti-oxidant, anti-carcinogenic, anti-inflammatory activity among other. The present work was aimed at providing the phytochemical study of fractions of the methanol extract of leaves of *Erythroxylum deciduum* A. St.-Hill, aiming at the isolation and identification of substances, as well as evaluating the antitumor activity of K562 cells from chronic myeloid leukemia methanol extract of fruits of *E. deciduum*.

Keywords: *Erythroxylum deciduum*, antitumor activity, 7,4'-dimethoxy-quercentin-3-O-β-D-glucopyranoside.

Introdução

Estudos fitoquímicos feitos com diferentes espécies do gênero *Erythroxylum* (pertencente a família Erythroxylaceae que é uma das mais representativas do cerrado brasileiro) levaram ao isolamento de vários metabólitos secundários como flavonóides e alcalóides, bem como taninos, terpenos e fenilpropanóides que apresentam atividades anti-oxidantes, anti-cancerígenas, anti-inflamatória dentre outras^{1,2,3}.

Várias espécies *Erythroxylum* possuem propriedades medicinais, como as populares coca (*E. coca Lamk.* e *E. novogranatense* (D.Morris) Hieron.) e suas variedades as mais conhecidas e estudadas devido à presença de alcalóides em suas folhas⁴, onde a cocaína (Figura 1), pode chegar até 2% da folha de massa seca⁵, que foi empregada como anestésico local em pequenas cirurgias^{6,7}.

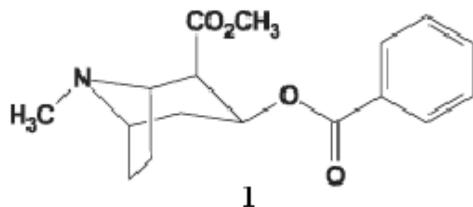
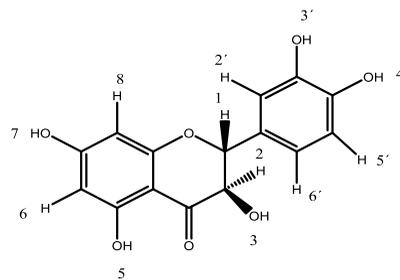


Figura 1. Fórmula estrutural da Cocaína

Na região do Alto Rio Grande, MG, *Erythroxylum campestre* e *Erythroxylum tortuosum* vêm sendo usados como fitoterápicos. Suas raízes são utilizadas na forma de infuso como laxante, enquanto a casca do caule da espécie *E. tortuosum* é indicada como adstringente no caso de hemorragias, também na forma de infuso⁸. Johnson (1998) identificou nas espécies *Erythroxylum novogranatense var. truxillense* e *E. coca var. ipadu* os seguintes flavonóides⁹:

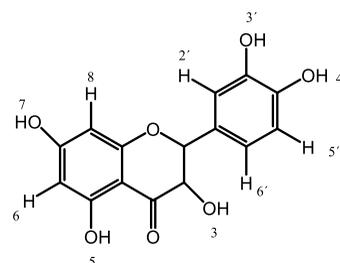
- Taxifolin, presente na fração polar do extrato foliar seco de *E. c. var. ipadu* (Figura 2), que apresenta atividades: inativação de substâncias citotóxicas e efeito anti-oxidante¹⁰, efeito anti-diabetes¹¹, efeito anti-oxidante, radicais livres que protegem a peroxidação lipídica, a redução do teor de lipoproteínas de baixa densidade no fígado e soroefeito anti-tumoral¹² e efeito anti-mutagênico¹³, efeito anti-viral¹⁴ dentre outros.



	3'	4'	3	5	7
<i>. E. c. var. ipadu 1</i>	OH	OH	H	OH	TetraAcil 1 Ramnosil
<i>. E. c. var. ipadu 3</i>	H	TetraAcil 1 Ramnosil 1	OH	OH	TetraAcil 1 Ramnosil
<i>. E. c. var. ipadu 4</i>	OH	TetraAcil 1 Ramnosil	OH	OH	TetraAcil 1 Ramnosil
<i>. E. c. var. ipadu 5</i>	OH	TetraAcil 1 Ramnosil	TetraAcil 1 Ramnosil	OH	OH
<i>. E. c. var. ipadu 6</i>	OH	TetraAcil 1 Ramnosil	TetraAcil 1 Ramnosil	OH	TetraAcil 1 Ramnosil

Figura 2. Fórmula estrutural da Taxifolin

*Quercentina (Figura 3) presente na fração polar do extrato das folhas de *E. c. var. ipadu* e *E. n. var. truxillense*, que apresenta atividade anti-tumoral¹², atividade anti-inflamatória¹⁵, bem como atividade anti-mutagênica¹⁶.



	3'	4'	3	5	7
<i>. E. c. var. ipadu 2</i>	TetraAcil 1 Ramnosil	OH	H	OH	TetraAcil 1 Ramnosil
<i>E. n. var. truxillense 1</i>	Ramnosil	OH	Glucosil	OH	Acetil Ramnosil

Figura 3. Fórmula estrutural da Quercentina

*Fisetina (Figura 4), presente na fração polar do extrato foliar de *E. n. var. truxillense*, possui atividade anticarcinogênica¹⁷, efeito anti-alérgico, atividade antioxidante¹⁸.

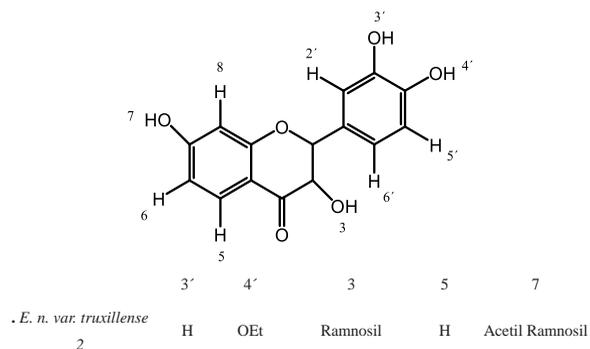


Figura 4: Fórmula estrutural da Fisentina

*Kaempferol (Figura 5) encontrado na fração polar do extrato foliar de *E. n. var. truxillense*, apresenta atividade anti-inflamatória¹⁹, atividade antioxidante, antialérgico, antiistamínico, inibidor de ciclooxigenase²⁰.

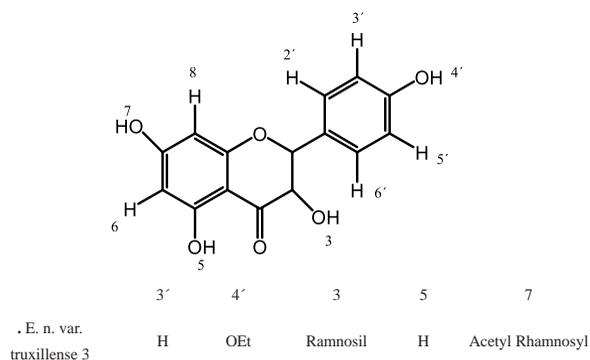


Figura 5. Fórmula estrutural da Kaempferol

*diidroxikaempferol (Figura 6) verificada na fração polar do extrato foliar de *E. n. var. truxillense*.

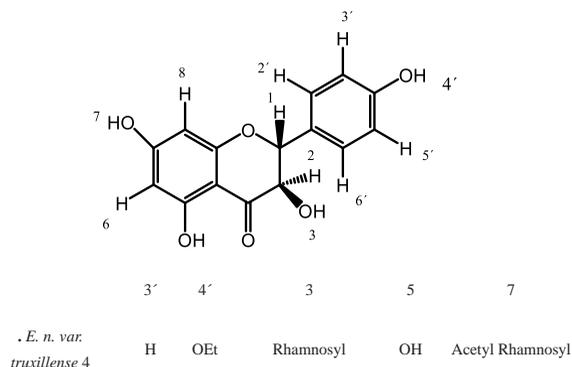


Figura 6. Fórmula estrutural da Diidroxikaempferol

Além disso, encontrou-se um novo flavonóide, Kaempferol ramnosil diglicosilado, isolado das folhas *Erythroxylum coca var. ipadu Plowman*, cultivadas na Amazônia, denominada kaempferol 4'-O-(ramnosil)-glucosídeo (Figura 7). Atualmente cultivado em áreas colombianas e é útil como marcador taxonômico²¹.

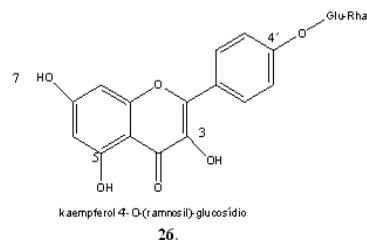


Figura 7. Kaempferol 4'-O-(ramnosil)-glucosídeo

Já o flavonóide glicosilado, foi isolado do caule de *Erythroxylum novogranatense*, e esta estrutura foi elucidada baseada no espectro de massa e RMN-¹H como (+)-catechin 3-O- α -L-ramnopiranosídeo. Numa base semelhante, de produtos químicos e provas espectroscópicas, a presença de ombuin 3-O-rutinosídeo foi estabelecida. Além disso, a ocorrência do biflavonóide procianidina (foi demonstrada pela caracterização de B1 e B3 como os primeiros representantes do tipo proantocianidina no gênero. As estruturas estão descritas na Figura 8²².

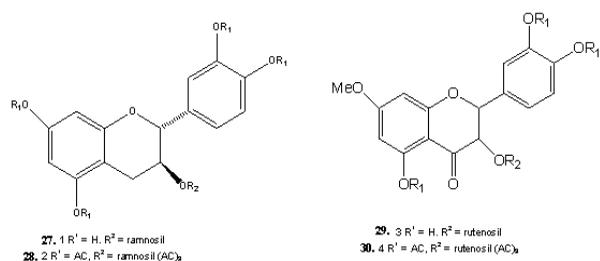


Figura 8. Flavonóide glicosilado do caule de *Erythroxylum novogranatense*.

COLODEL *et al.* (2004) estudaram os aspectos epidemiológicos, clínicos e patológicos da intoxicação natural pelos frutos de *Erythroxylum deciduum* em ovinos, que ocorreu de janeiro a março de 2004 no município de Lagoa Vermelha, RS. Os autores verificaram que a ingestão espontânea de frutos da planta vinha sendo a

causa de mortandade dos animais. Além disso, os frutos administrados por via oral nos ovinos foram tóxicos em dose única de 60g/Kg ou quando fracionado em pelo menos 4 doses de 17g/Kg a cada 12 horas. Os principais sinais clínicos nos animais intoxicados, natural e experimentalmente, foram neurológicos e caracterizados por ataxia, hiperexcitabilidade e tremores musculares que se pronunciavam durante o manejo. Próximo à morte, os ovinos apresentavam dispnéia com respiração abdominal e cianose²³.

Como o câncer é uma patologia que representa um dos principais problemas do mundo, causando temor na sociedade por ter se tornado um estigma de mortalidade e dor, viu-se a necessidade de se realizar o estudo da atividade antitumoral na planta *Erythroxylum deciduum*, pois esta atividade é uma característica do gênero *Erythroxylum*.

Produtos Naturais e Atividade Anticancerígena

Nos últimos 20 anos, alguns fármacos introduzidos na terapêutica, foram fundamentais para o ressurgimento do interesse nos produtos naturais por parte da indústria farmacêutica, com participação num mercado que movimenta cerca de 50 bilhões de dólares anualmente. Podendo citar os quimioterápicos para o câncer, como a vimblastina (31) e a vincristina (32) extraídas da espécie *Cataranthus roseus*, drogas utilizadas no tratamento de tumores hematológicos, o etoposídeo (33), o teniposídeo (34) e o taxol (35), (Figura 15)²⁴.

Outro exemplo de agente antineoplásico é a camptotecina (36, Figura 9), isolado por Wall, Wani e colaboradores em 1966, extraída de uma árvore chinesa, *Camptotheca acuminata*^{25,26}.

A ESPÉCIE *ERYTHROXYLUM DECIDUUM* A. ST.-HILL

A *Erythroxylum deciduum*, conhecida popularmente como cocão, baga-de-pomba, fruta de pomba, concon, (figuras 10 e 11) é uma árvore de grande porte, podendo chegar até 8 metros de altura, dotada de copa alongada e densa. Tronco curto e cilíndrico, de 20-35cm de diâmetro, com casca grossa e finamente fissurada de maneira um pouco oblíqua em relação ao eixo do fuste. No Brasil, essa espécie encontra-se do Piauí e Nordeste

até Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul, em várias formações vegetais. Também na Argentina e Paraguai²⁷.

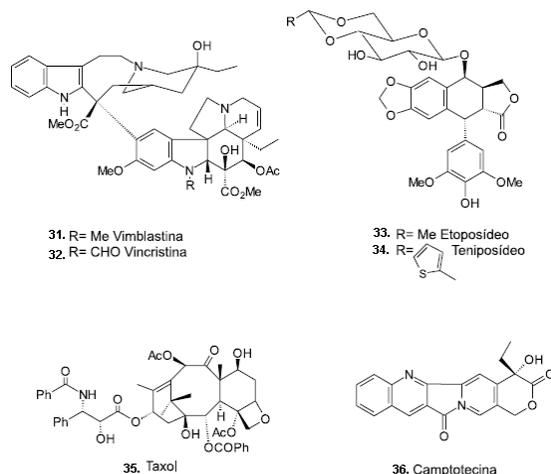
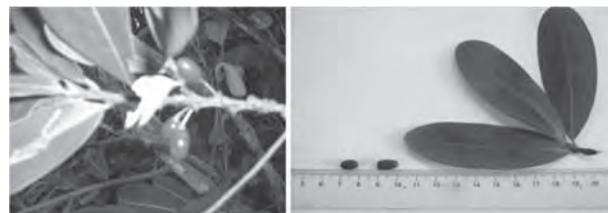


Figura 9. Alguns modelos e fármacos antineoplásicos importantes da terapêutica moderna



Figuras 10 e 11. Fotos de *E. deciduum*, Campus UEG, Anápolis,GO, NASCIMENTO, G. C., novembro de 2006.

E. deciduum floresce dos meses de agosto-outubro junto com o surgimento de novas folhas. Os frutos amadurecem de outubro a janeiro. A madeira é indicada para pequenas obras de construção civil, marcenaria leve, esquadrias, obras de torno e cabo de ferramentas. Os frutos são muitos consumidos por várias espécies de pássaros. A árvore pode ser empregada para arborização de ruas estreitas e sob redes elétricas. Também recomendada para reflorestamentos preservacionistas²⁷.

O presente trabalho teve como objetivo principal realizar o estudo fitoquímico das frações do extrato metanólico das folhas de *Erythroxylum deciduum* A. St.-Hill, visando o isolamento e identificação de substâncias, bem como avaliar a atividade antitumoral das células K562 de leucemia mielóide crônica do extrato metanólico dos frutos de *E. deciduum*.

Materiais e Métodos

Erythroxylum deciduum – coleta

As folhas (979 g) e frutos (75,2 g) da planta *Erythroxylum deciduum* foram coletados no mês de novembro de 2006, no Campus da Universidade Estadual de Goiás (UEG) na cidade de Anápolis-GO, Brasil. Sendo identificados pela Prof^a Dr^a. Mirley Luciene dos Santos de Biologia, da Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas da UEG. E as exsiccatas do material vegetal foram depositadas no herbário desta Unidade, cujos números de tombo são 5274, 5275 e 5276.

Obtenção dos extratos brutos

As folhas foram secas em estufa com circulação de ar a 40°C durante 48h, depois pulverizadas em moinho de facas. Em seguida colocou-as em erlenmeyers de 2L e o extrato foi extraído a frio com metanol P.A. durante 5 dias, repetindo-se o processo por 3 vezes. Ademais o solvente foi evaporado em um evaporador rotativo, sob pressão reduzida numa temperatura de 40°C, fornecendo o extrato bruto metanólico das folhas (EBMF).

Já os frutos frescos foram macerados com almofariz e pistilo, extraídos a frio inicialmente com hexano em erlenmeyer de 500 mL, durante 5 dias, repetindo-se o processo por 3 vezes. Após a extração exaustiva com hexano, o solvente foi evaporado em um evaporador rotativo, sob pressão reduzida numa temperatura de 40°C, fornecendo o extrato bruto hexânico das folhas. Depois, passou-se a extrair com metanol por 5 dias durante 3 vezes, repetindo-se o processo que realizou-se anteriormente com hexano.

Fracionamento dos extratos brutos com celulose

O extrato metanólico das folhas de *E. deciduum* (EDFM) foi fracionado por cromatografia em coluna, utilizando-se celulose microcristalina D, como fase estacionária, com o intuito de se retirar os pigmentos, e eluentes em ordem crescente de polaridade: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol. Obtiveram-se as seguintes frações das folhas: hexânicas (EDFM-H), diclorometânica (EDFM-D), acetato de etila (EDFM-A), bem como metanólica (EDFM-M)²⁸.

O método de separação utilizado para o isolamento da substância foi a cromatografia de adsorção em sílica gel.

Fracionamento da fração metanólica das folhas de E. deciduum

Da fração EDFMM após ter evaporado todo o solvente, foi pesado 30,0g, em seguida, esta foi submetida à cromatografia de adsorção em coluna de sílica gel, empacotada com mistura de diclorometano/metanol (2:8) e eluída com essa mistura de solventes em polaridade crescente até 100% de metanol. Coletou-se 122 frações, reunidas em 07 novas frações, de acordo os Rf observados nas placas de cromatografia em camada delgada (CCD) após serem reveladas com vanilina.

A amostra EDFMM (31-40 = F-1) foi recristalizada com metanol P.A., filtrada com pressão reduzida, obtendo-se sólido amarelo amorfo. Ademais a mesma foi submetidas à Ressonância Magnética nuclear (RMN) de ¹H e ¹³C.

Teste para alcalóides

Foi realizado teste para verificação da presença de alcalóides nas frações de hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, obtidas das folhas de *E. deciduum*, através de cromatografia em camada delgada – CCD, utilizando-se fase móvel Diclorometano/Metanol 5% e cromatofolhas de alumínio de sílica gel 60 F₂₅₄ MERC, em béqueres de 50 mL e como revelador o o reagente Dragendorff.

Preparação da fração vegetal e drogas controle para o teste de atividade antitumoral in vitro e citotoxicidade dos frutos

Para o ensaio de atividade antitumoral e citotóxica foram pesados 10 mg da fração metanólica dos frutos de *Erythroxylum deciduum* (EDFrM) a qual foi dissolvida em 2 mL de meio RPMI 1640 suplementado com Dimetil sulfóxido (DMSO) à 0,1 %. Posteriormente a EDFrM foi submetido à agitação vigorosa para dissolução completa, e por fim esterilizado em membranas de 0,22 µm. Após a diluição, o pH foi estabelecido em 7,2.

Como drogas controles foram utilizadas Taxol e Ciclofosfamida que foram dissolvidas em meio RPMI 1640.

LINHAGEM DE CÉLULAS TUMORAIS, OBTENÇÃO E CULTIVO

Para a realização do ensaio biológico com o método colorimétrico 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil

brometo de tetrazolium (MTT) foi utilizada a linhagem tumoral estabelecida K-562 (Leucemia mielóide crônica). As células K562 foram cedidas pelo Laboratório de Genética Molecular e Citogenética da Universidade Federal de Goiás, onde foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal, 2 M L-Glutamina, 100IU/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomina à 37°C, 5% CO₂ segundo protocolo estabelecido pela Coleção Americana de Cultura de Células (ATCC).

Ensaio da atividade antitumoral (leucemia mielóide crônica da célula K562) com o extrato metanólico dos frutos de *E. deciduum*

Para avaliar a atividade citotóxica e anti-tumoral da fração EDFrM foi utilizado o método colorimétrico (MTT). O princípio deste método descrito por Mosman (1983) consiste em medir indiretamente a viabilidade celular pela atividade enzimática mitocondrial das células vivas, em que as desidrogenases mitocondriais são capazes de agir sobre substratos como o MTT levando à quebra desta molécula bem como sua redução, produzindo assim o azul de formazan. Para o teste de redução do MTT, 2x10⁵ de células K562 foram semeadas em microplacas de 96 poços na ausência ou presença de EDFrM em concentrações variando de 0,039 a 5 mg. mL⁻¹ ou ciclofosfamida e taxol na concentração de 5 mg. mL⁻¹. Após o tratamento as células foram incubadas por 24 h em estufa a 37°C com atmosfera contendo 5% de CO₂. Ao final do período de incubação, foi adicionado aos poços de cultivo celular 10 µL de MTT na concentração de 5 mg.mL⁻¹, e seguido 3hs, foram acrescentados 50 µL de SDS a 10% diluído em HCL/0,01N. A quantificação da densidade óptica (DO) foi medida em espectrofotômetro utilizando-se filtro de interferência de 550 nm.

A análise de variância (ANOVA) foi aplicada aos dados, sendo considerado como diferença significativa valores onde o p-value era menor que 0,05 (p<0,05). Foram considerados significativos percentuais de citotoxicidade superiores a 30%.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise de variância nos indica que há uma diferença entre as médias, mas ela não diz qual média que difere. Existem procedimentos específicos chamados

de procedimentos de comparação múltipla, para testar as diferenças entre as médias específicas seguindo uma análise de variância. Dentre os testes mais conhecidos destacamos o teste Tukey que, está baseado na amplitude total estudada e pode ser usado para comparar todos os pares de contrastes que envolvem diferenças de médias e foi utilizado para Ensaio da atividade antitumoral (leucemia mielóide crônica frente a célula K562)²⁹.

Resultados e Discussões

Resultados da extração

Foram obtidos os extratos brutos metanólicos das folhas EDFM (168,3 g) 17,1% e dos frutos EDFrM (0,7 g) 0,93% de *E. deciduum*.

Resultados do fracionamento dos extratos brutos com celulose

A (Tabela 1) abaixo descreve a quantidade inicial do extrato metanólico das folhas de *E. deciduum*, bem como os valores obtidos das subfrações: hexânica, diclorometânica, acetato de etila e metanólica após o fracionamento com celulose.

Tabela 1. Resultados das partições do extrato metanólico das folhas de *E. deciduum*.

Extrato metanólico	Fração	Código	Quantidade
Folhas 168,3g	Hexano	EDFMH	14,9g
	Diclorometano	EDFMD	12,2g
	Acetato de etila	EDFMA	3,4g
	Metanólico	EDFMM	77,4g

Fracionamento da fração metanólica das folhas de *E. deciduum* utilizando-se sílica gel

Verifica-se na (Figura 12) as 122 frações, reunidas em 7 novas frações com suas respectivas massas, obtidas de 30,0 g de EDFMM que foi submetida à cromatografia de adsorção em coluna de sílica gel, empacotada com mistura de diclorometano/metanol (2:8) conforme descrito no procedimento. É interessante ressaltar a amostra F-1 se apresentou como sólido amarelo amorfo.

Fracionamento, Isolamento e Caracterização dos Constituintes Químicos

A fração metanólica EDFMM (77,4 g) foi submetida

à cromatografia em coluna de adsorção em sílica gel, com gradientes metanol/diclorometano. Após as frações serem coletadas em frascos coletores de 10 mL, foram analisadas, através de CCD e, depois de terem sido revelados com vanilina, foram reunidas, baseadas nos seus Rf.

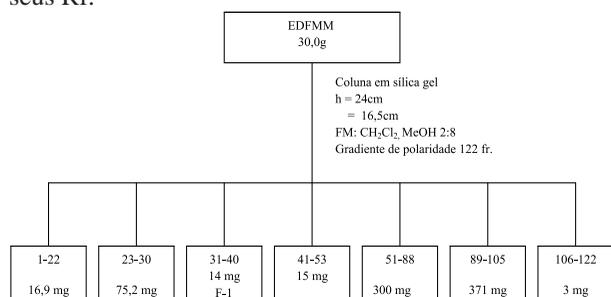


Figura 12. Fracionamento da fração do extrato metanólico das folhas de *E. deciduum*

Logo após foi feita análise espectroscópica através da Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C utilizando como solvente o DMSO para EDFMM (31-40 F-1). Depois da interpretação dos espectros, identificou-se o flavonóide 7,4'- dimetoxi-quercentina-3-O- β -D-glicopiranosídeo (F1).

Identificação estrutural do flavonóide 7,4'-dimetoxi-quercentina-3-O- β -D-glicopiranosídeo (F-1) por RMN de ^1H e de ^{13}C

O sólido amorfo amarelo da fração polar do extrato das folhas de *E. deciduum* foi submetido à análise por RMN de ^1H e de ^{13}C . Os resultados desta análise são apresentados a seguir:

No espectro de RMN de ^1H (F-1, Figura 13, figura 14 e Tabela 2) observou-se na região de hidrogênios aromáticos, um duplo dubleto em δ 7,61 ppm referente ao hidrogênio H-6' (J=2,0 e 9,0 Hz); dubleto em δ 7,63 ppm referente ao hidrogênio H-2' (J=2,0 Hz) e em δ 6,86 ppm referente ao hidrogênio H-5' (J= 9,0 Hz). Além de dois dubletos largos em 6,42 e 6,22 ppm atribuídos aos hidrogênios H-6 e H-8 respectivamente.

A presença de multipletos relativos a hidrogênios carbinólicos, na região entre δ 3,0 e 3,8 ppm e um dubleto para cada substância, absorvendo em δ 5,5 ppm (J = 7,6 Hz;), atribuído ao hidrogênio anomérico, sugere a existência de unidade de açúcar ligado a este flavonóide, o valor da constante de acoplamento em torno de 7,6 Hz

entre os hidrogênios H-1'' (α) e H-2'' (β) indica um ângulo diedro de 0 – 20° ou 150 – 180 °, entre esses hidrogênios, o que sugere que o açúcar está ligado ao flavonóide pela face β . O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 15 e Tabela 3) desta substância, apresenta, sinais com deslocamentos químicos próximos a δ 177,4 ppm típico de carbonilas queladas em flavonóides³⁰.

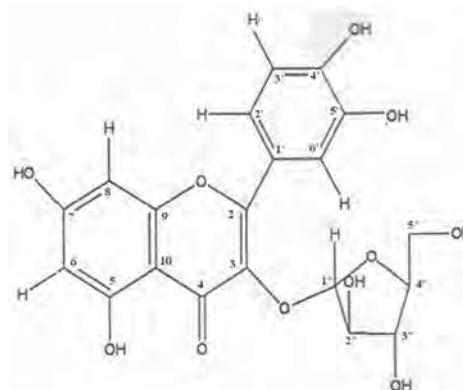


Figura 13. Fórmula estrutural do flavonóide 7,4'-dimetoxi-quercentina-3-O- β -D-glicopiranosídeo

A ocorrência de cinco sinais na região entre δ 61,4 e 77,8 ppm, e um sinal em δ 101,5 ppm referente ao carbono anomérico vem confirmar a existência de uma unidade de açúcar no flavonóide.

Tabela 2. Dados de RMN de ^1H (400MHz, em DMSO) para o flavonóide F-1

H	F-2
6	6,42 d (1,4 Hz)
8	6,22 d (1,4 Hz)
2'	7,63 d (2,0 Hz)
3'	-
5'	6,86 d (9,0 Hz)
6'	7,61 dd (2,0 e 9,0 Hz)
Açúcar	
1''	5,5 d (7,6 Hz)
2'' a 6''	3,0 – 3,8 m
-Ome	3,86 (s)

A unidade do açúcar presente é evidenciada através dos dados característicos observados no espectro RMN de ^{13}C glicopiranosídeo (F-1) está ligado ao flavonóide.

Além disso, as análises dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C e posterior comparação com os dados descritos na literatura resultou na identificação do flavonóide quercetina-3-O- β -D-glicopiranosídeo (F-1) ³¹.

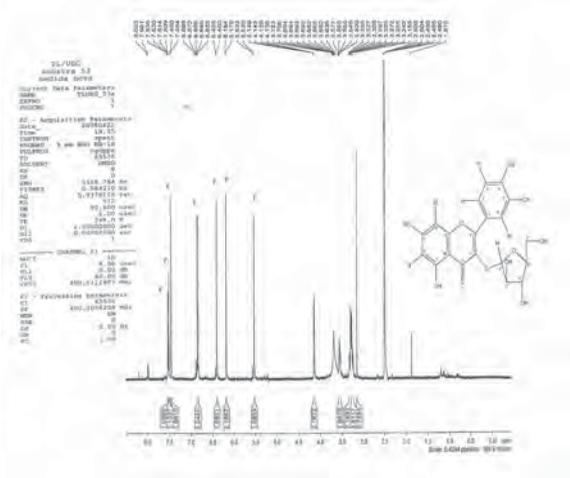


Figura 14. Espectro de RMN ^1H do flavonóide F-1 (DMSO, 400MHz)

Resultados do teste de alcalóides nas frações de folhas de *Erythroxyllum deciduum*

O gênero *Erythroxyllum* é caracterizado pela presença de alcalóides e flavonóides, constituintes químicos provenientes do metabolismo secundário de vegetais. O teste para verificação de alcalóides, utilizando o reagente de Dragendorff (específico para alcalóides), apresentou resultado negativo para todas as frações metanólica, diclorometânica, hexânica e acetato de etila das folhas de *E. deciduum*. Então se concluiu que não há presença de alcalóides nesta planta, apesar deste metabólito secundário ser um marcador taxonômico deste gênero. Porém não podemos afirmar que nenhuma planta *E. deciduum* não apresente alcalóide, pois pode-se inferir que haja diferença sazonal ou até mesmo estação do ano na qual a planta foi coletada.

Avaliação da atividade citotóxica da fração metanólica do extrato dos frutos (EDFrM) de *Erythroxyllum deciduum* sobre a linhagem tumoral K562

Para análise dos tratamentos observados através do método colorimétrico MTT, conforme descrito na metodologia, e das drogas padrões, foi realizada uma análise descritiva para se ter indícios da diferença entre os tratamentos. Em seguida fez-se uma análise de

variância com planejamento aleatorizado com um único fator que comprovasse esta diferença entre os mesmos, e a partir do teste de Tukey foi possível comprovar quais amostras eram realmente diferentes. E foi aceito que o tratamento possui citotoxicidade significativa somente se apresentasse valores superiores a 30% ²⁹.

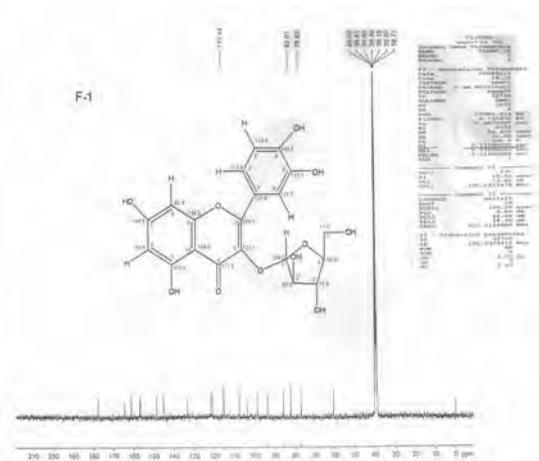


Figura 15. Espectro de RMN ^{13}C do flavonóide F-1 (DMSO, 400MHz)

As médias das densidades óticas (DO) encontradas na placa realizada através do método MTT, estão demonstradas na Tabela 4, juntamente com o percentual de crescimento e de citotoxicidade, conforme concentrações da fração dos extratos de EDFrM para tratamento sobre as células K562. Através dos resultados apresentados neste trabalho, verificou-se que a fração metanólica de EDFrM apresentou citotoxicidade elevada sobre as células tumorais, quando comparados com o percentual das drogas controles.

Analisando os resultados apresentados na (Tabela 4), pode-se dizer que há indícios de que o taxol apresenta uma porcentagem de citotoxicidade de 91,74%, ou seja, é muito eficaz no tratamento de leucemia mielóide crônica. Já a ciclofosfamida forneceu um resultado menos satisfatório quando comparada ao taxol e as frações dos extratos de EDFrM, nas concentrações que variam de 0,62 a 5,0 mg. mL⁻¹, pois evidenciou-se uma porcentagem de 40,3% de citotoxicidade, destruindo uma quantidade menor de células tumorais.

Os resultados deste teste são apresentados na (Figura 16) para a fração metanólica dos frutos de *Erythroxyllum deciduum* nas concentrações de 0,039 a 5,0 mg.mL⁻¹

sobre a linhagem tumoral do K562, que apresentaram citotoxicidade elevada sobre as células tumorais, quando comparados com o percentual dos controles positivos Taxol (100%) e Ciclofosfamida, na concentração 5,0 mg. mL⁻¹. É interessante ressaltar que as frações dos extratos nas concentrações que variam de 0,3 a 5,0 mg. mL⁻¹ possuem maior eficiência que a ciclofosfamida. Ademais, pode-se sugerir que as células se mostraram dose-dependente das frações de EDFrM, pois o aumento da citotoxicidade foi diretamente proporcional ao aumento da concentração das mesmas.

Tabela 3. Dados de RMN de ¹³C (100 MHz, em DMSO) para o flavonóide F-1

C	F-2	Literatura AGRAWAL et al., 1989
C-2	157,1	156,5
C-3	134,4	133,7
C-4	178,2	177,6
C-5	161,4	161,3
C-6	98,7	98,8
C-7	165,9	164,2
C-8	92,9	93,6
C-9	157,1	156,5
C-10	105,6	104,2
C-1'	123,0	121,4
C-2'	112,1	115,2
C-3'	146,3	144,8
C-4'	150,9	148,5
C-5'	116,4	116,5
C-6'	122,1	121,6
C-1''	101,5	101,4
C-2''	74,7	74,3
C-3''	76,9	76,8
C-4''	70,4	70,3
C-5''	77,8	77,5
C-6''	61,4	61,3

Verificou-se também que, quando a concentração da fração do extrato de EDFrM aumentava de 0,075 para 5,0 mg.mL⁻¹, aumentava-se gradativamente a porcentagem de citotoxicidade, indicando que há diferença relevante

entre as concentrações dos mesmos. Porém, como foi aceito que o tratamento possui citotoxicidade satisfatória, somente se apresentasse valores superiores a 30%, as frações com concentrações de 0,15, 0,0075 e 0,03 mg.mL⁻¹ demonstraram-se ineficazes nesta análise. Em seguida, para averiguar se estas diferenças entre os tratamentos são realmente significativas, fez-se a comparação entre as médias dos dados através da análise de variância, e as diferenças exatas entre os tratamentos foram quantificadas através do teste de Tukey, conforme descrito na (Tabela 4).

Tabela 4. Análise de Variância e Teste de Tukey entre as frações metanólicas e os padrões adotados

	Grau de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	Valor de p
Tratamento	12	2.68749	0.22396	129.77	<2.2e-16
Amostras mg. mL-1		Diferença		Valor de p	
Ciclofosfamida-Taxol-0.7		0,44033		0,0000000	
EDFrM 5.0-Taxol-0.75		0,15233		0,0066800	
EDFrM 2.5-Taxol-0.75		0,17367		0,0014000	
EDFrM 1.25-Taxol-0.75		0,24533		0,0000073	
EDFrM 0.62-Taxol-0.75		0,36700		0,0000000	
EDFrM 0.3-Taxol-0.75		0,44000		0,0000000	
EDFrM 5.0-ciclofosfamida		-0,28800		0,0000004	
EDFrM 2.5-ciclofosfamida		-0,26667		0,0000017	
EDFrM 1.25-ciclofosfamida		-0,19500		0,0002867	
EDFrM 0.62-ciclofosfamida		-0,07333		0,6237200	
EDFrM 0.3-ciclofosfamida		-3,33E-04		1,0000000	
EDFrM 2.5-EDFr5.0		0,02133		0,9999800	
EDFrM 1.25-EDFr5.0		0,09300		0,2865400	
EDFrM 0.62-EDFr5.0		0,21467		0,0000671	
EDFrM 0.3-EDFr5.0		0,28767		0,0000004	
EDFrM 0.15-EDFr5.0		0,44900		0,0000000	
EDFrM 0.075-EDFr5.0		0,47900		0,0000000	
EDFrM 0.03-EDFr5.0		0,45367		0,0000000	
EDFrM 1.25-EDFr2.5		0,07167		0,6547800	
EDFrM 0.62-EDFr1.25		0,12167		0,0554500	
EDFrM 0.3-EDFr0.62		0,07300		0,6299600	
EDFrM 0.15-EDFr0.3		0,16133		0,0034700	
EDFrM 0.075-EDFr0.15		0,03000		0,9993100	
EDFrM 0.03-EDFr0.075		-0,02533		0,9998700	

Como pode ser visto na (Tabela 5) há diferença significativa entre os tratamentos, pois o valor de p

Tabela 5. Distribuição dos valores de densidade ótica e suas médias, desvio padrão, coeficiente de variação, porcentagem de crescimento e porcentagem de citotoxicidade conforme concentrações da fração do extrato metanólico de *E. deciduum* sobre células K562, bem como das drogas padrão.

Descrição	DO1	DO2	DO3	Média	Desvio padrão	Coeficiente de variação	% de crescimento	% de citotoxicidade
Branco (meio)	0,157	0,172	0,174	0,168	0,009	5,542	-	-
Meio cell	0,954	0,913	0,905	0,924	0,026	2,845	-	-
SDS 10%	0,060	0,066	0,078	0,068	0,009	13,478	-	-
Taxol 0.5mg/mL	0,132	0,155	0,129	0,139	0,014	10,258	-	91,74
Ciclofosfamida 0.5mg/mL	0,562	0,577	0,598	0,579	0,018	3,123	-	40,3
EDFrM 5.0 mg/mL	0,265	0,317	0,291	0,291	0,026	8,935	26,05	73,95
EDFrM 2.5 mg/mL	0,284	0,323	0,330	0,312	0,025	7,936	28,54	71,46
EDFrM 1.25mg/mL	0,354	0,369	0,429	0,384	0,040	10,335	36,92	63,08
EDFrM 0.62mg/ml	0,515	0,527	0,475	0,506	0,027	5,385	51,13	48,87
EDFrM 0.3 mg/mL	0,641	0,660	0,435	0,579	0,125	21,564	59,66	40,34
EDFrM 0.15mg/mL	0,740	0,732	0,748	0,740	0,008	1,081	78,50	21,50
EDFrM								
0.075mg/mL	0,803	0,759	0,748	0,770	0,029	3,779	82,01	17,99
EDFrM 0.03mg/mL	0,719	0,779	0,736	0,745	0,031	4,153	79,05	20,95

apresentou um valor de 2.2×10^{-16} , assumindo o nível de significância de 5%. Além disso, há evidência que realmente existe diferença relevante entre as porcentagens de citotoxicidade, quando se compara o taxol com a ciclofosfamida, pois seu valor de p é ($p < 0,05$). Como também, pode ser averiguado que o taxol difere significativamente das concentrações da fração do extrato de EDFrM, que variam de 0,3 a 5,0 mg.mL⁻¹ e difere da ciclofosfamida em concentrações da fração do extrato de EDFrM, que variam de 1.25 a 5,0 mg. mL⁻¹. comprovando-se que há realmente um elevado potencial anti-tumoral destas frações.

Porém, quando se comparam as concentrações das frações dos extratos de EDFrM de 5,0 mg. mL⁻¹ com 2,5 e 1,25 mg. mL⁻¹, percebe-se que não há diferença significativa entre eles, pois os mesmos apresentam valores de p superiores a 5% ($p > 0,05$), ou seja, pode-se utilizar para destruir as células tumorais a concentração de 1,25 mg. mL⁻¹, já que esta é semelhante a concentração de 5,0 mg. mL⁻¹ da fração do extrato em questão.

A (Tabela 5) também mostra que não existe diferença relevante entre as concentrações 0.3 e 0.62 mg. mL⁻¹, 0.075 e 0.15 mg. mL⁻¹, 0.03 e 0.075 mg. mL⁻¹, pois seus valores de p são muito superiores a 5%.

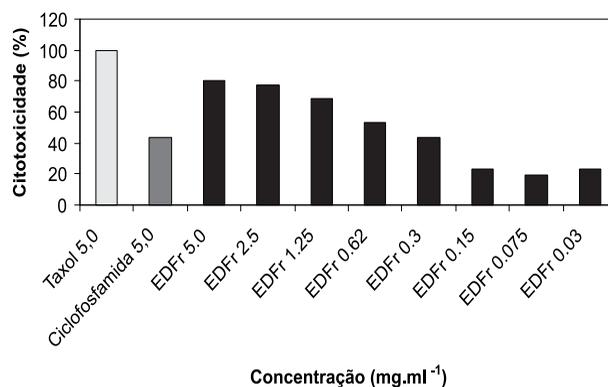


Figura 16. Percentual de citotoxicidade da fração metanólica *in vitro* sobre células tumorais de leucemia mielóide crônica K562, comparada com o taxol e a ciclofosfamida.

Mediante esses dados, os testes realizados *in vitro* para se verificar o possível potencial antitumoral da fração metanólica, obtida dos frutos de *Erythroxylum deciduum*, revelam ter atividade antineoplásica significativa frente ao modelo experimental utilizado. Com exceção das concentrações de 0,03 a 0,3 mg . mL⁻¹ da fração metanólica, as demais concentrações apresentaram citotoxicidade acima de 50%.

Assim fica demonstrada a importância da triagem

de extratos vegetais quanto às atividades biológicas, o que possibilita aos pesquisadores uma orientação no sentido de utilizar os melhores métodos de extração de substâncias com estas atividades em plantas para posterior isolamento e identificação química, além de concentrações otimizadas para que o extrato tenha sua máxima eficiência contra células tumorais. Até o presente momento, a literatura apresenta apenas 2 artigos referentes a esta espécie, já mencionados na revisão bibliográfica, porém nenhum sobre estudo dos constituintes químicos e possível potencial citotóxico e antitumoral. Viu-se então a necessidade de realização de mais estudos para se averiguar os potenciais terapêuticos e citotóxicos que a planta apresenta e não há dados na medicina popular.

Conclusão

O estudo fitoquímico das folhas de *E. deciduum* levou ao isolamento e identificação do flavonóide 7,4'-dimetoxi-quercentina-3-O- β -D-glicopiranosídeo obtido da fração metanólica (EDFMM) (31-40 F-1), substância já conhecida, mas não relatadas nesta espécie. Estudos da atividade antitumoral (leucemia mielóide crônica) demonstraram que há um elevado potencial citotóxico das frações metanólicas dos frutos de *E. deciduum*. Além disso, pode-se dizer que a fração do extrato a 5,0 mg. mL⁻¹ foi mais eficaz que a droga controle ciclofosfamida na mesma concentração, porém menos eficaz que o taxol. Não há presença de alcalóides nesta planta, apesar deste metabólito secundário ser um marcador taxonômico deste gênero, logo, pode-se inferir que haja diferença sazonal ou até mesmo estação do ano na qual a planta foi coletada.

Referências Bibliográficas

- Evans, W. C. The comparative phytochemistry of the genus *Erythroxylum*. *J. Ethnopharmacol.* 3, 265-277. **1981**.
- Ansel, S. M., Pegel, K. H., Taylor, D. A. H., **1993**. Diterpenes from the timber of 20 *Erythroxylum* species. *Phytochemistry* 32, 953-959.
- Nakamura, A. T. Morfologia e anatomia dos frutos e sementes de três espécies de *Erythroxylum* P.Browne (Erythroxylaceae); Dissertação de Mestrado; Instituto de Biociências de Botucatu; Universidade Estadual Paulista, **2003**.
- Bieras, A.C. Sajo, M.G. Ontogenia foliar de três espécies de *Erythroxylum* P.Browne (Erythroxylaceae) ocorrentes no cerrado; Revista Brasileira de Botânica; 27:71-77, **2004**
- Plowman, T., Rivier, L. Cocaine and cinnamoylcocaine content of *Erythroxylum* species. *Ann. Bot.* 51, 641-659. **1983**.
- Bohm, B. A.; Ganders, F. R. & Plowman, T. Byosystematics and evolution of cultivated coca (*Erythroxylaceae*). *Systematic Botany*; 7: 121-133. **1982**.
- Griffin, W.J., LIN, G.D., 2000. *Phytochemistry* 53, 623.
- Rodrigues, V. E.G. Carvalho, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado do Alto Rio Grande-Minas Gerais; *Ciências Agrotécnicas, Lavras*, v.25, n.1, p. 102-123, jan./fev., **2001**.
- Johnson, E.L.; Schmidt, W. F., Norman, H. A. Flavonoids as markers for *Erythroxylum* Taxa: *E. coca* var. *ipadu* and *E. novogranatense* var. *truxillense*. *Biochemical Systematics and ecology*, n. 26, p. 743- 759, mar. **1998**.
- Tukavkina, N.A., Rulenko, I.A., Kolesnik, Y.A. *Voprosy Pitaniya Feb. P.33* - Natural flavonoids - food antioxidants and biologically active additives. **1996**.
- Haraguchi, H., Ohmi, I., Fukuda, A., Tamura, Y., Mizutani, K., Tanaka, O., Chou, W.H. Apr. Inhibition of aldose reductase and sorbitol accumulation by astilbin and taxifolin dihydroflavonols in *Engelhardtia chrysolepis*. *Biosci Biotechnol Biochem*;61(4): 651-654. **1997**.
- Chu, S. C., Hsieh, Y. S., Lin, J.Y. Feb. Inhibitory effects of flavonoids on Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase activity. *J Nat Prod*;55(2): 179-183. **1992**.
- Huang, M.T., Wood, A.W., Newmark, H.L., Sayer, J.M., Yagi, H., Jerina, D.M., Conney, A.H. Dec. Inhibition of the mutagenicity of bay-region diol-epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons by phenolic plant flavonoids. *Carcinogenesis*;4(12):1631-1637. **1983**.
- Biziagos, E., Crance, J.M., Passagot, J., Deloince, R. May Effect of antiviral substances on hepatitis A virus replication in vitro. *J Med Virol*;22(1):57-66. **1987**.
- Schwartz, A., Middleton, E. Jr. Apr. Comparison of the effects of quercetin with those of other flavonoids on the generation and effector function of cytotoxic T lymphocytes. *Immunopharmacology*;7(2):115-126. **1984**.
- Bjeldanes, L.F., Chang, G.W. Aug. Mutagenic activity of quercetin and related compounds. *Science* 5;197(4303):577-578. **1977**.
- Lu, X., Jung, J., Cho, H. J., Lim, Y., Lee, H. S., Chun, H. S., Kwon, Y., Park, J. H. December. Fisetin Inhibits the Activities of Cyclin-Dependent Kinases Leading to Cell Cycle Arrest in HT-29 Human Colon Cancer Cells. *American Society for Nutrition J. Nutr.* 135:2884-2890. **2005**.
- Troup, G.J., Huttona, D.R., O'dea, L., Langfordb, S.J. Epr and Antioxidant Efficiency studies of Resveratrol, Quercitin and Fisetin. *Proceedings – 31st annual condensed matter and materials meeting.* **2007**.
- Hämäläinen, M., Nieminen, R., Vuorela, P., Heinonen, M.,

- Moilanen, E. 2007. Anti-Inflammatory Effects of Flavonoids: Genistein, Kaempferol, Quercetin, and Daidzein Inhibit STAT-1 and NF- κ B Activations, Whereas Flavone, Isorhamnetin, Naringenin, and Pelargonidin Inhibit only NF- κ B Activation along with Their Inhibitory Effect on iNOS Expression and NO Production in Activated Macrophages. *Mediators of Inflammation* Volume 2007 (2007), Article ID 45673, 10 pages doi:10.1155/2007/45673.
20. Duke J. A. *Journal of Medicinal Food Biological Activity Summary for Cocoa* (Theobroma cacao L.) June 1, 3(2): 115-119. doi:10.1089/109662000416302. Herbal Vineyard, Inc., 8210 Murphy Road, Fulton, MD 20759. Volume 3, number 2. Mary Ann Liebert, Inc. 2000.
21. Johnson, E. L.; Schmidt, W. F.; Emche, S. D.; Mossoba, M. M.; Musser, S. M. kaempferol (rhamnosyl) glucoside, a new flavonol from *Erythroxylum coca*. Var. ipadu. *Biochemical Systematics and Ecology* 31. 59-67. 2003.
22. Bonefeld, M., Friedrich, H., Kolodziej. (+) -Catechin 3 Rhamnoside from *Erythroxylum novogranatense*. *Phytochemistry*, Vol.25, nº 5, pp1205-1207. 1986.
23. Colodel, E. M. et al. Intoxicação por *Erythroxylum decuduim* (Erythroxylaceae) em ovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 24(3): 165-168 jul./set. 2004.
24. Pinto, A. C. Silva, D. H. S. Bolzani, V. S. Lopes, N. P., Epifanio, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Quím. Nova* vol.25, Supl. 1, 45-61 São Paulo. Maio 2002.
25. Wall, M.E.; Wani, M.C. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. *J Ethnopharmacol* 1996; 51:239-54.
26. OBERLIES, N. H.; KROLL, D. J.; *J. Nat. Prod.* 2004, 67, 129.
27. LORENZI, H. 2000. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas Arbóreas Nativas do Brasil.** (3.ed.).Instituto Plantarum, Nova Odessa, v.2, 352.p.
28. GAMBOA, T.P.R. **Estudo Químico de *Picramnia teapensis*, *Picramnia latifolia* e *Ipomoeae batatas* em associação ao controle de formigas cortadeiras *Atta sexdens* e seu fungo simbionte *Leucoagaricus gongylophorus*.** Tese de doutorado, PPGQ-UFSCar, São Carlos-SP, 2001, 269 p.
29. MONTGOMERY, D. C. **Introdução ao controle estatístico de qualidade**, 4ª edição. Rio de Janeiro. RJ, LTC, 2004.
30. SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, C. G.; MORRIL E. T. C. **Spectrometric Identification of organic compounds.** ISBN 0471134570, 6. Ed. John Wiley e Sons, 1998.
31. AGRAWAL, P. K. Carbon-13 NMR of flavonoids. New York: Elsevier Science Publishing Company Inc., 304-342, 1989.

Guilhermina C. Nascimento^{1*},
 Antônio C. S. Menezes¹, Elizangela
 P. P. Lacerda²

¹Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas, UEG, CP 459, Anápolis.GO.

²Universidade Federal de Goiás, CP 131, Goiânia, GO.

*e-mail: guilherminaquimica@hotmail.com

Estudo dos Processos de Intercalação de Água em Nanosilicatos Sintéticos Utilizando Radiação Síncrotron

Luciano Ribeiro, Geraldo J. da Silva, Maria S. P. Mundim, Marcelo H. Sousa, Jon O. Fossum & Kleber C. Mundim

Neste trabalho apresentamos resultados de processos de intercalação e difusão de água em argilas sintéticas expansíveis do grupo das Fluorohectoritas utilizando técnicas experimentais XRD e XAFS do LNLS em Campinas – SP. As argilas podem absorver ou perder água ocasionando uma mudança no espaçamento das plaquetas. Este processo, controlado pela temperatura e umidade sugerem estados estáveis de hidratação que são denominados como zero, 1, 2 ou mais camadas de água. A técnica de espalhamento de raios X de síncrotron (XRD/LNLS) foi utilizada para fornecer informações sobre os diferentes estados puros de hidratação, bem como sua coexistência, quando movemos de um estado de hidratação puro para outro. As análises foram feitas usando os programas FEFF, Athena e Artemis seguindo os procedimentos padrões. Para certos valores de umidade relativa a temperatura foi um parâmetro controlado. Os resultados das transformadas de Fourier dos dados de XAFS mostraram que a primeira esfera de coordenação em torno do níquel é do oxigênio e a segunda do níquel, mesmo para uma situação onde a umidade relativa foi mantida em torno de zero e a temperatura variou no intervalo de 125 °C a 20 °C.

Palavras-chave: *Intercalação de Água, Argila, Raios X Síncrotron.*

In this work we present the results of intercalation processes and distribution of water in the synthetic swelling clay Ni-Fluorohectorite by means of experimental techniques of XRD and XAFS at LNLS, Campinas-SP. The clay absorbs or loses water causing the distances between the platelets change. This process, which is controlled by temperature and humidity, yields stable hydration states referred to as having either 0, 1, 2 or more water layers. Synchrotron X-Ray Scattering technique (XRD/LNLS) was utilized to furnish information about the different pure hydration states as well their coexistence when we move from one state to the other. The standard procedure of analysis was accomplished via the programs FEFF, Athena and Artemis. For some given value of humidity the temperature was taken as the controlled parameter. The results of Fourier transformed XAFS data indicates that the first coordination sphere around the nickel is oxygen and the second one is nickel even for a situation where the relative humidity was maintained around zero and the temperature varied from 125 °C to 20 °C.

Keywords: *Water Intercalation, Clay, Synchrotron X-ray.*

Introdução

As argilas constituem um dos mais tradicionais materiais cujas aplicações tiveram papel principal na história evolutiva do homem, essencialmente como material de construção e cerâmica, e na história moderna através de modificações geológicas, catálise ou mesmo como armadilhas para lixo radioativo de alto nível de periculosidade. E hoje o seu uso passa por produtos de beleza até armamentos bélicos. Nenhum outro mineral atrai tanto interesse ou está sujeito a tanta pesquisa quanto a argila, a ponto de alguns proclamarem a argila como sendo o material do século XXI.

Os geólogos compreendem muito bem sua estrutura geológica, eles sabem analisar e conhecer os tipos de rochas presentes nos locais. Aproximadamente 5 % da superfície terrestre é formada pelas rochas sedimentares, rochas formadas a partir de outros tipos de rochas, alguns exemplos são as argilas, a areia, o calcário e outras. As rochas sedimentares são formações mais recentes, datadas da era Paleozoica. Diferentemente como as rochas ígneas ou magmáticas e as metamórficas que surgiram na era Pré-Cambriana e Paleozóica, respectivamente.

No Brasil, recentemente reservas de petróleo foram encontradas na camada pré-sal preenchidas pelas rochas sedimentares que se estende entre o litoral dos estados do Espírito Santo até Santa Catarina, com profundidades no mar que variam de 1 a 2 mil metros do leito do mar e entre 4 e 6 mil metros de profundidade no subsolo. A Petrobras deverá fazer poços através de estruturas e formações que realmente pode consistir de uma totalidade de argila. O processo de perfuração de poços são dispendiosos e caros. À medida que, a broca avança vão-se crescendo tubos. Normalmente, uma broca tem vida útil de dois dias de serviço. O processo de troca é feito retirando toda a tubulação. Para auxiliar o avanço da broca usam um fluido de perfuração que representa uma mistura de água, argila, aditivos químicos e outros produtos. Essa lama de perfuração tem a finalidade de manter a pressão ideal para a perfuração do poço, de modo que não haja um desmoronamento além, também de lubrificar a broca. O desmoronamento ou entupimento de alguns poços dessas perfurações representam uma perda de tempo e de dinheiro para a companhia. Dentre as argilas presente no solo existem aquelas que no processo de perfuração se

hidratam e expandem ao entarem em contato com água. Como consequencia podem contribuir para o entupimento do poço pretolífero. As argilas encontradas na natureza não são puras o que significa que elas contêm vários elementos químicos que alteram suas propriedades físico-químicas tornando extremamente difícil sua inclusão no campo da pesquisa de novos materiais. Felizmente nos últimos anos com o advento da industria química limpa, argilas ou de maneira mais apropriada, nanosilicatos sintéticos, estão sendo produzidos em larga escala para uso industrial nas suas diversa aplicações. Do ponto de vista da física estas amostras sintéticas podem ser usadas como modelo físico para o estudo de fenômenos universais principiamente no campo dos fluidos complexos.

Por outro lado, a região do Cerrado, segundo maior bioma do Brasil, praticamente 50 % desses são cobertos por latossolos. Que representa um tipo de solo muito intemperizados, com pequena reserva de nutrientes para as plantas e teores de fósforo extremamente baixos. A sua composição contem entre 15 e 80 % de argilas. A fração argila destes latossolos são compostas, principalmente por caulinita, óxidos de Fe (goethita e hematita) e óxidos de Al (gibbsita). Enriquecer essas argilas, com os elementos mais comumente incluídos nos fertilizantes comerciais, tais como, fósforo, potássio, nitrogênio e outros minerais são utilizados para compensar deficiências nutricionais do solo do Cerrado.

Um dos desafios da ciência atual neste campo consiste em tentar entender os processos difusão e hidratação de água nas argilas como função do íon intercalante, considerando situações distintas de umidade e temperatura. Tais parâmetros físicos permitem ao pesquisador quantificar modelos que permitam prever situações inéditas assim como poder aplicar estes resultados em situações reais, como por exemplo, para reduzir e controlar erosões com mais eficiência, conseguir prever desmoronamentos e enriquecer solos com nutrientes.

Nesse sentido, a proposta desse trabalho é mostrar como as técnicas de difração e absorção de raios X de síncrotron podem ser usadas no estudo de processos de intercalação e difusão de água em argilas sintéticas.

NANOSILICATOS LAMELARES

As argilas que ocorrem naturalmente são, em sua maioria misturas altamente heterogêneas de minerais e

quase invariavelmente contêm “impurezas” na forma de minerais associados e materiais amorfos. Entretanto, o aumento da disponibilidade de argilas quimicamente sintetizadas, fornecendo uma estrutura química bem controlada, tem levado a um interesse mais profundo pelas argilas como sendo modelo de sistemas interessantes, tanto do ponto de vista teórico, como experimental.

Recentemente, e com o advento de uma química capaz de elaborar argilas sintéticas, elas passaram a ter um grande interesse, pelos teóricos¹⁻³ e experimentais⁴⁻⁷. Atualmente há uma atividade científica crescente ligada a inclusão das argilas na ciência dos materiais modernos juntamente com os tradicionais materiais sintéticos complexos, tais como os coloides, polímeros, cristais-líquidos, biomateriais e muitas outras⁸⁻⁹.

ESTRUTURA DE CAMADAS

A unidade fundamental da maior parte das argilas é uma mesoestrutura em camadas de silicatos SiO4. Existem dois tipos fundamentais de camadas: tetraédrica, onde geralmente um átomo de silício (Si) é tetraedricamente ligado a quatro átomos de oxigênio (O), e octaédrica, onde geralmente alumínio (Al) ou magnésio (Mg) são octaedricamente ligados a seis átomos de oxigênio ou hidroxilas (-OH). A figura 1 apresenta um diagrama esquemático de um tetraedro e de um octaedro. Uma plaqueta é composta de diferentes associações desses dois tipos de camadas onde um cristalito de argila consiste em uma associação de plaquetas idênticas.

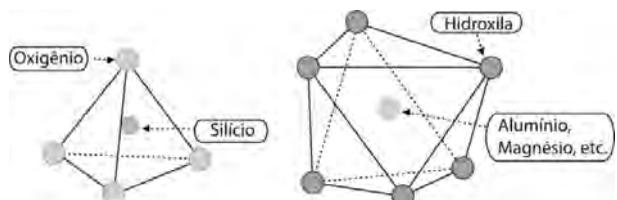


Figura 1. Diagrama esquemático que mostra um único tetraedro de silicato, à esquerda, e um único octaedro de alumínio ou magnésio, à direita.

Argilas e seus compostos de intercalação podem ser divididos, em subgrupos de acordo com a estrutura e a carga elétrica líquida das camadas; (i) estrutura de camada 1:1, (ii) estrutura de camadas 2:1 e (iii) estrutura de camadas 2:1+1. Na figura 2 apresenta os subgrupos com destaque para a distância basal característica de cada um.

Entretanto, quando duas camadas tetraédricas

constituem a superfície de plaquetas adjacentes, como no caso das argilas do tipo 2:1, não há átomos de hidrogênio presente para criar estas ligações, e as folhas são mantidas unidas por forças eletrostáticas atuando entre duas plaquetas devido às cargas elétricas destas. Para algumas argilas minerais (as chamadas estruturas com carga elétrica líquida alta) esta força é tão forte quanto o resultado da presença dos íons das intercadas. Por outro lado, nas estruturas denominadas de baixa carga elétrica, as camadas podem expandir devido ao influxo de água e/ou íons ou moléculas polares resultando no aumento da distância basal.

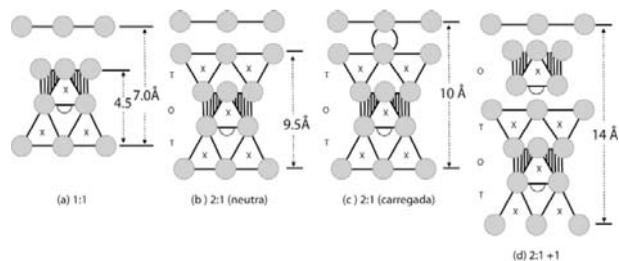


Figura 2. Diagrama esquemático da composição das diferentes plaquetas. X é o sítio de cátion. T e O referem-se às camadas tetraédricas e octaédricas, respectivamente. (a) Camada 1:1 que, usualmente não tem carga elétrica líquida ou esta é muito pequena. (b) Camada 2:1 com carga elétrica líquida nula. (c) Camada 2:1 com um cátion entre as camadas. (d) Camada 2:1+1 com a folha octaédrica entre as camadas positivamente carregadas.

INTERCALAÇÃO E EXPANSÃO

Como característica típica dos sólidos lamelares, as argilas formam compostos de intercalação, nos quais várias substâncias externas podem ser inseridas no espaçamento entre as camadas, de tal maneira que, a camada hospedeira permaneça praticamente inalterada. O número de substâncias externas que podem ser inseridas excede enormemente a qualquer outro tipo de sólido lamelar.

A água é atraída para as superfícies das argilas criando assim um reservatório de água na sua superfície. Este processo é chamado de adsorção, enquanto absorção é o termo utilizado para descrever a incorporação de moléculas de água na estrutura cristalina ou do grão. Portanto, a figura 3, ilustra os dois tipos de inserção de água nas argilas: (i) água cristalina presa na estrutura interna como as hidroxilas (OH-) e as (ii) águas absorvidas que ficam nos espaços interlamelares na forma de H₂O. A primeira contribuição só é perdida para temperaturas

acima de aproximadamente 500 °C e, para as segundas, em torno de 120 °C.

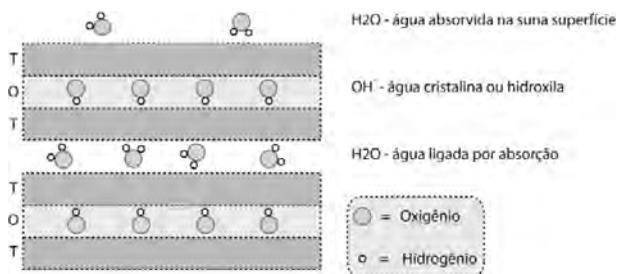


Figura 3. Localização da inserção de água em uma argila mineral. A figura apresenta a água adsorvida na superfície do grão, absorvida no espaçamento lamelar e cristalina (hidroxila) dentro da estrutura. T e O se referem às camadas tetraédricas ou octaédricas, respectivamente.

Todas as argilas adsorvem, embora não necessariamente absorvam água. Se uma argila mineral sofre uma expansão ou não, depende essencialmente da carga líquida das camadas e da contribuição das interações colombianas entre o cátion visitante e a camada hospedeira.

Devido, principalmente, ao fato das argilas possuírem pequenos grãos cristalinos e características de intercalação entre as folhas, as argilas apresentam uma razão *superfície/massa* (área superficial específica) alta. Como exemplo, argilas expansíveis podem ter uma área superficial específica de 800 cm² por grama, que é relativamente alta comparada a outras estruturas lamelares.

A substituição de metais no plano cristalino, ou mudanças do cátion entre as camadas, pode criar uma densidade superficial de carga que, no caso de alguns subgrupos de argilas, afeta a absorção de água no espaço entre as camadas permitindo, assim, controlar o espaço entre as plaquetas.

A habilidade de adsorver/absorver água é possivelmente a característica mais importante das argilas, daí, serem classificadas como expansíveis ou não expansíveis. Argila expansível, como as esmectitas, permite uma variação considerável de seu volume.

Um sistema hidratado é um sistema complexo, a interação detalhada entre os cátions entremeados por camadas, as moléculas de água coordenadas e a superfície carregada dos silicatos levam a características estruturais estáticas ou dinâmicas de hidratação que ainda não são completamente entendidas⁵.

ARGILAS ESMECTITAS

Entre as famílias de argilas, os silicatos lamelares 2:1 são os mais frequentemente estudados devido a sua enorme variedade de composições químicas, das possibilidades de intercalação de água, moléculas e íons polares além das características de expansibilidade e de poderem ser empilhadas (pilarizadas)¹⁰. As argilas 2:1 baseando-se na magnitude da carga elétrica líquida lamelar por cela unitária são divididas em talco-pirofilitas, esmectitas, vermiculitas e, finalmente, micas e micas quebradiças, cada qual sendo diferenciada pelo tipo e localização dos cátions.

Esmectita é o nome do grupo de minerais onde todos apresentam a propriedade de se expandir e contrair suas estruturas enquanto mantém a integridade cristalográfica bidimensional. A carga elétrica líquida da camada é suficientemente alta para que as plaquetas individuais sejam empilhadas ao compartilhar os cátions e ao mesmo tempo suficientemente moderadas para permitir intercalações de moléculas de água. As folhas de silicato 2:1 das esmectitas são geralmente compostas de três camadas atômicas: uma camada hidroximetálica octaédrica entremeadando duas camadas tetraédricas de silício. Cada plaqueta tem aproximadamente 1,0 nm de espessura e a carga elétrica líquida por cela unitária varia de 0,20 a 1,2 elétron/por cela unitária. A espessura de cada cristalito é tipicamente 0,10 μm, correspondendo a aproximadamente 100 plaquetas empilhadas. O número de plaquetas pode ser determinada pela técnica apresentada em⁴⁻⁵.

INTERCALAÇÃO DE ÁGUA

O baixo valor de carga líquida de uma camada implica em duas características importantes: (i) os cátions entremeados pelas camadas não são fixos e (ii) é possível incorporar íons polares e moléculas. Os cátions podem ser solvatados, tendo como parâmetro de controle a umidade e a temperatura. Dependendo da característica química do cátion, o íon será hidratado com três, quatro ou seis moléculas de água.

Como exemplo, a situação com quatro moléculas gera o estado de hidratação de uma camada de água (1WL)¹ e a distância entre as placas da esmectita aumenta cerca de 2,5 Å. Para o estado de hidratação de duas camadas de água (2WL) o número de moléculas de água aumenta

para oito e a distância entre as placas aumenta cerca de 5,0 Å. Na figura 4 é ilustrado as situações de nenhuma (OWL), uma (1WL) e duas (2WL) camadas de água.

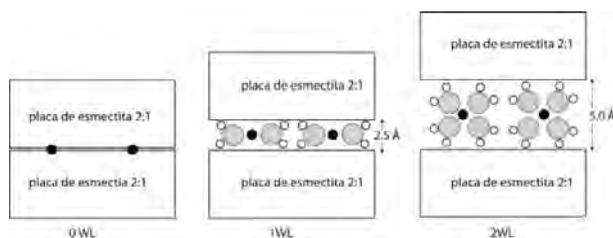


Figura 4. Diferentes estados de hidratação: 0WL = 0 camadas de água, 1WL = 1 camada de água e 2WL = 2 camadas de água

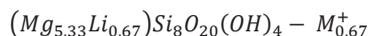
SUBGRUPOS

Com respeito às estruturas do tipo esmectitas a cela unitária padrão é composta de uma camada octaédrica entremeadada por duas camadas tetraédricas idênticas, possuindo basicamente, a seguinte composição: 20 átomos de oxigênio e 4 grupos hidroxila em um arranjo com 8 tetraedros, 6 octaedros e 4 cavidades hexagonais formadas por átomos de oxigênio na superfície.

Diferenciado pelo tipo e proporção dos elementos das camadas tetraédricas e octaédricas as esmectitas são divididas em subgrupos, cada qual com um nome próprio: montemorilonitas, bedeitas, hectoritas, saponitas etc.¹¹⁻¹² Estes subgrupos, por sua vez podem ser subclassificados. Por exemplo, fluorohectoritas e laponitas são subdivisões das hectoritas as quais estão relacionadas à nossa pesquisa e das quais falaremos um pouco mais.

HECTORITAS

As hectoritas são compostas de tetraedros de (SiO₄) e octaedros de hidroxila com magnésio (Mg) e lítio (Li) no seu centro. Estas argilas minerais, nos Estados Unidos, se originam dos depósitos localizados em Hector, Califórnia e no Amargosa Valley, Nevada. Uma fórmula típica para sua cela unitária cristalina é:



onde M⁺ é geralmente Na⁺. A hectorita sódica tem propriedades reológicas (viscosidade, principalmente) no sistema (argila + água) superiores às da bentonita sódica de Wyoming, além da cor branca das dispersões e géis. É usada em aerossóis, colas e adesivos, látex de borracha,

clarificação de cervejas e vinhos, esmaltes cerâmicos, cosméticos e produtos para higiene pessoal, produtos de limpeza doméstica, tintas de emulsão e para eletrodeposição, para revestimento de agregados e para fabricação de argilas organofílicas etc. Cerca de 2000 toneladas de hectoritas organofílicas são produzidas, nos EUA, por ano¹³.

A seguir exemplificaremos dois tipos de argilas hectoritas, sintéticas, com as quais trabalhamos: a laponita e a fluorohectorita.

LAPONITAS

A laponita, figura 5⁸, é uma argila sintética em forma de um disco de diâmetro em torno de 25 nm e espessura de 1 nm, quase monodispersa em distribuição de tamanhos, apresenta uma fórmula geral por cela unitária M⁺_{0,7}-[Si₈Mg_{5,3}Li_{0,3}H₄O₂₄]^{-0,7}, onde, neste caso, M⁺ se refere ao cátion entremeadado pelas camadas, normalmente o Na⁺.

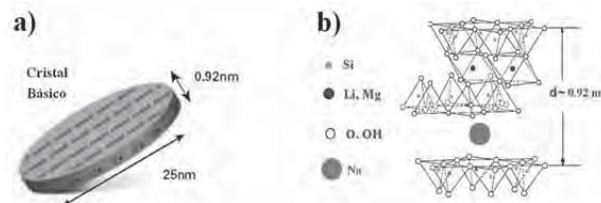


Figura 5. Estrutura básica da Laponita: a) forma de disco com as dimensões características e b) forma cristalográfica com os elementos químicos principais

O intervalo de pH de estabilidade química da laponita é estreito: abaixo do pH 9, os íons magnésio dissolvem em solução e, acima de pH 10, é observada a dissolução da sílica. A carga elétrica líquida da borda depende do comportamento ácido-base do Si-OH e Mg-OH e dos grupos anfotéricos hidroxila que são os principais componentes das bordas. Em virtude das suas dimensões reduzidas a contribuição dos efeitos de borda leva a um único diagrama de fase. Na figura 6 ilustra-se a dependência da força iônica e da concentração que leva a argila aos comportamentos de (i) líquido isotrópico, (ii) gel isotrópico, (iii) gel nemático e (iv) floculado¹⁴.

FLUOROHECTORITA

A fluorohectorita (M-FHT) é uma argila mineral sintetizada quimicamente considerada pura, onde as hidroxilas “normais” das hectoritas são substituídas

pelos íons flúor (F⁻). A sua fórmula química é dada pela semi-cela unitária $M_x-(Mg_{3-x}Li_x)Si_4O_{10}F_2$, onde M se refere ao cátion entremeadado por camadas. Ela é também classificada com uma esmectita trioctaédrica, com íons de Li⁺ substituindo íons de Mg²⁺, e tem a folha octaédrica completamente cheia. A proporção x dos átomos de Li determina a carga superficial das plaquetas, que são mantidas unidas entre si, em uma estrutura de pilhas pela presença do cátion M entremeadado por camadas.

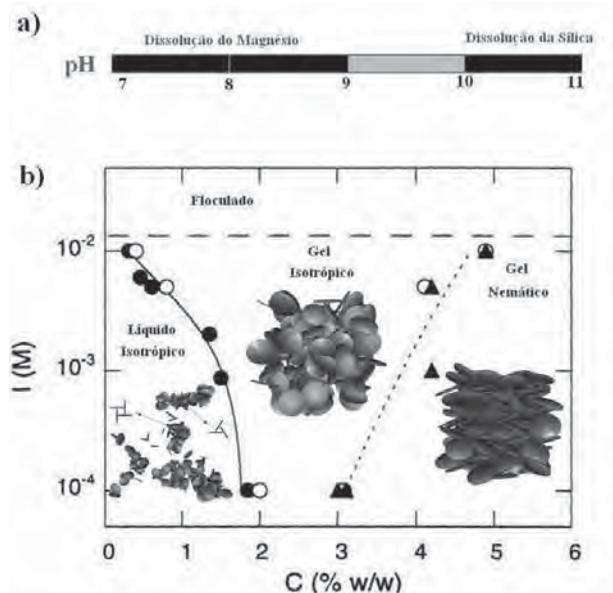


Figura 6. Diagrama de fase típico da laponita⁵: a) estabilidade em função do pH; b) diferentes fases, à temperatura ambiente, como função da força iônica e da concentração em massa da laponita. As figuras dentro do diagrama mostram os tipos de interação (face-borda, borda-borda e face-face) predominantes em cada fase.

Diferentemente da laponita, o tamanho das suas placas apresenta uma enorme polidispersão chegando a ter dimensões superficiais de até 10 μm, veja figura 7. Portanto, efeitos de borda não são os predominantes em uma amostra de M-FHT. A água pode intercalar-se entre suas plaquetas fazendo com que estas se expandam, adquirindo uma estrutura bem ordenada, ao longo da direção de empilhamento, de 0, 1, 2 ou mais camadas de água intercaladas, ou simplesmente 0WL, 1WL, 2WL e nWL. A figura 7 retirada da referência⁵ apresenta os estados de hidratação de 1WL e 2WL, juntamente, com a estrutura cristalográfica básica da laponita.

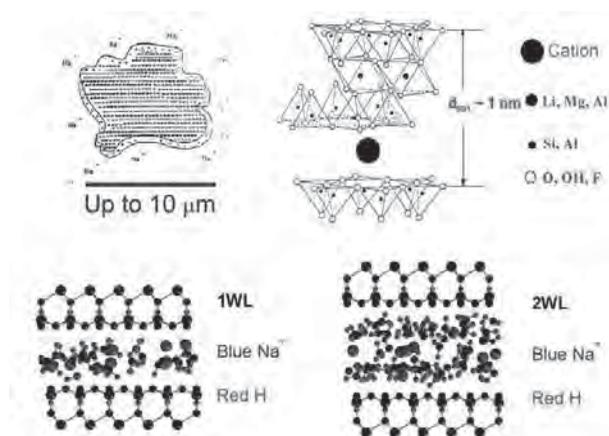


Figura 7. Tamanho e forma típica da fluorohectorita. Estrutura cristalográfica básica e os respectivos estados de hidratação⁵.

A M-FHT tem uma densidade superficial de carga elétrica de 1,2 elétrons/cela unitária, considerada grande em relação a outras esmectitas sintéticas como, por exemplo, a laponita (0,40 elétrons/cela unitária) ou montemorilonita (0,60 elétrons/cela unitária). Dados fornecidos pela técnica de espalhamento de raios X⁶ mostram que as fluorohectoritas suspensas em água não são facilmente esfoliadas, mantendo cerca de 80 folhas unidas. Isto se deve ao fato de que o valor da densidade de carga superficial é grande. Sob condições apropriadas, a água pode entremear entre as camadas fazendo com que a distância entre as placas aumente. Para o caso das Ni-FHT e Na-FHT o processo de intercalação pode ser controlado pela umidade ou temperatura. Especificamente para a Na-FHT⁵ os estados de hidratação de 0WL, 1WL e 2WL estão apresentados na figura 8 juntamente com as distâncias basais de empilhamento que se aproximam de 10 Å, 12 Å e 15 Å, respectivamente.

NA-FLUROHECTORITA

A fluorohectorita de sódio, Na-FHT, é um filossilicato 2:1 com várias lamelas cristalinas elementares empilhadas formando partículas/grãos de quase-cristal contendo em média 80-100 plaquetas mantidas juntas por atração eletrostática dos cátions entremeados que compartilham as camadas. Como mencionado anteriormente elas são altamente polidispersas. Possuem um peso específico (densidade em g/cm³) determinado experimentalmente por Knudsen *at al*⁷ reproduzido na tabela 2.

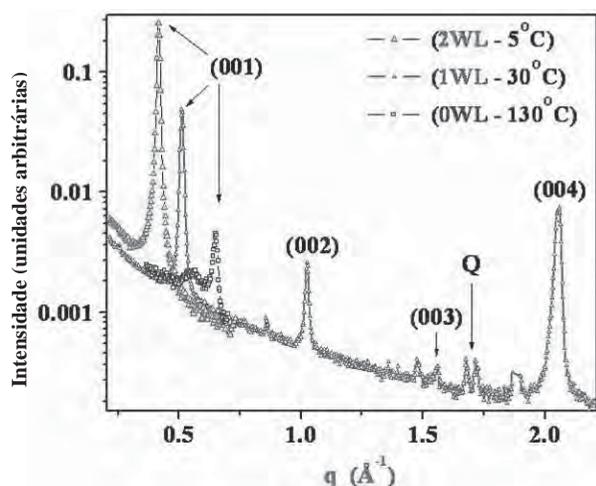


Figura 8. Intensidade de espalhamento versus q da Na-FHT. Em destaque, as posições referente ao pico [001].

Tabela 1. A partir da análise da figura 8, calculou-se o espaçamento basal para cada regime de intercalação de água na argila.

Camadas de água	Distância Basal (Å)
0WL	9,69± 0,06
1WL	12,38± 0,07
2WL	15,17± 0,08

É interessante observar que a densidade diminui à medida que água é inserida na argila, o que parece contraditório, mas isto pode ser explicado por dois efeitos contrários: (i) à medida que a argila expande, o espaço entre duas camadas cresce consideravelmente, aumenta o volume entre as camadas, tornando assim a densidade menor e (ii) neste mesmo tempo, os mesoporos são preenchidos com água (na sua característica macroscópica), que por sua vez tem densidade maior que o ar, mas também faz com que o volume desses mesoporos diminua. O efeito final, como se vê na tabela 1, é diminuir a densidade com o aumento do estado de hidratação.

Tabela 2. Densidades em função do estado de hidratação para a Na-FHT.

Regime de Hidratação	Densidade (g/cm ³)
0WL	2,80
1WL	2,31
2WL	2,02

A inserção de espécies externas entremendo as camadas, praticamente bidimensionais, é facilitada pelas

fracas interações entre-camadas e fortes interações nas intra-camadas é isto permite intercalar íons, moléculas e, até mesmo, polímeros. Neste ponto é importante diferenciar entre altura da galeria e espaçamento ou distância basal.

A espessura de uma lamela é definida como a distância entre duas superfícies basais de oxigênio em cada lado da mesma folha. Para a fluorohectorita esta tem um valor de 6,54 Å. A distância basal é cerca de 9,69 Å para o caso 0WL, e é definida como sendo a distância entre as superfícies basais de oxigênio de duas camadas ou lamelas sucessivas. É a distância obtida diretamente do espectro de espalhamento de raios X no espaço basal (representado por d_{001} na figura 7). Para o exemplo citado, a altura da galeria seria, portanto, 3,15 Å. Este seria o espaço que os cátions intercalados teriam no confinamento. Para os casos de 1WL e 2WL a altura das galerias seriam 5,84 Å e 8,63 Å respectivamente. Ou seja, o incremento na altura da galeria seria de 2,69 Å para a transição desidratado-monohidratado e de 2,79 Å para a transição monohidratado-bihidratado, distâncias estas comparáveis com o valor de 2,82 Å para o diâmetro de van der Waals da molécula de água. Isto explica a denominação 0,1, 2 etc camadas de água.

Isotermas de sorção de água para a Na-FHT apresentam um comportamento de histerese no regime de absorção/desorção, típicos dos meios porosos. Estudos do comportamento da distância basal, em experimentos de raios X⁵, mostram um salto em forma de degrau no ponto de transição de um regime de intercalação para outro. A figura 9 apresenta o ponto de transição, ou melhor, região de transição, em função da temperatura, da umidade, ou equivalentemente da pressão parcial de vapor.

A figura 10 presente na referência⁵, destaca um comportamento observado no processo de intercalação e difusão de água em argilas, que é a coexistência de diferentes estados de hidratação. Note que, com a mudança da temperatura ocorrem mudanças nas posições picos, ou seja, o nanosilicato salta de um estado de hidratação para outro.

Observe que na figura 10b, para a temperatura de 30 °C vê-se claramente que a forma de linha de espalhamento apresenta 3 picos bem definidos: os

picos de 1WL e 2WL coexistindo com um pico bem alargado e intermediário. Este é um comportamento geral neste tipo de amostra, tendo o Na⁺ como íon intercalante. Não tão bem definido, mas visível, observa o mesmo tipo de pico intermediário na figura 10a para a temperatura de 27 °C. Uma sugestão de modelo utilizado para explicar a coexistência destes estados de hidratação é baseado no modelo de intercalação aleatório de Hendrix-Teller (HT)¹⁵.

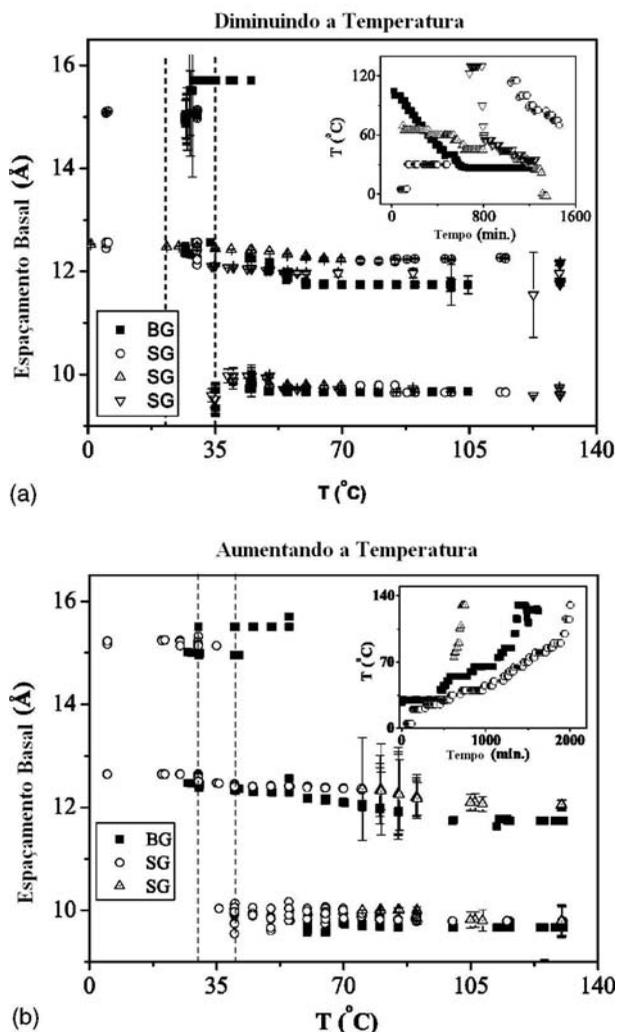


Figura 9. Espaçamento basal versus temperatura a partir da análise dos picos [001]. (a) Diminuindo a temperatura e (b) aumentando a temperatura. As linhas verticais tracejadas delimitam o intervalo de temperatura onde o regime 1WL domina. As siglas BG e SG significam o modo como foi feita a difração por “bulk scattering geometry” e “surface-scattering geometry”, respectivamente.

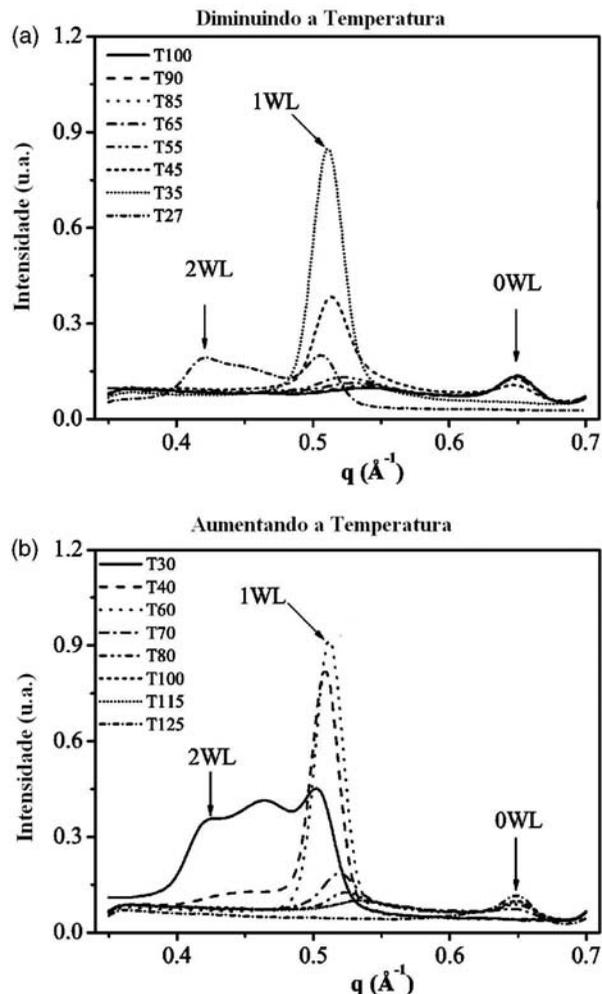


Figura 10. Intensidade de difração versus q para o pico (001) nos processos de aumento e diminuição da temperatura. Cada símbolo diferente corresponde a uma temperatura.

NI-FLUROHECTORITA

A amostra original de argila é proveniente da Corning Inc. USA. É uma amostra sintética de Na-flurohectorita cuja fórmula química por meia cela unitária é $Na_{0,3}(Mg_{2,4}Li_{0,6})Si_4O_{10}F_2$. O método de obtenção da amostra Ni-FHT é feita através de diálise, que consiste na troca do íon intercalado Na por Ni. O processo consiste em diluir a amostra de argila, originalmente em pó, em água destilada e colocá-la em membranas de diálise e por diferença de concentração vão trocando um íon por outro.

USO DE LUZ SÍNCROTRON

Essa seção é uma compilação de alguns trabalhos

originais e revisões existentes na literatura, em uma sistemática tal que permita transmitir informações necessárias relativas à espectroscopia de absorção de raios X (XAS, do inglês *X-ray Absorption Spectroscopy*) e a difração de raios X (XRD, do inglês *X-ray diffraction*) a um leitor leigo nas técnicas espectroscópicas. Concomitantemente, na escrita do texto houve uma preocupação em introduzir os conceitos da forma mais simples possível e tornar este texto uma referência na área. Com o objetivo de um maior aprofundamento no assunto abordado neste capítulo, a leitura adicional das referências¹⁶⁻¹⁹ é indicada, de forma a auxiliar a uma maior compreensão do assunto.

A luz síncrotron, batizada com esse nome, por ser produzida a partir de um acelerador síncrotron é simplesmente uma radiação eletromagnética emitida por partículas carregadas com velocidades relativísticas (tipicamente, elétrons ou pósitrons altamente energéticos com energia na faixa de 100 MeV à 10 GeV) que circulam em um acelerador circular ou anel de armazenamento. Quando esses elétrons mudam de direção (defletidos por campos magnéticos) – ou são acelerados (por campos elétricos) – eles emitem ondas eletromagnéticas, que chamamos de luz branca. Esta emissão é de várias ordens de grandeza mais intensa que a radiação produzida por fontes convencionais de raios X e varre um faixa espectral onde não existem lasers sintonizáveis disponíveis. Faz da luz síncrotron uma luz extremamente importante e valiosa para as mais variadas áreas do conhecimento que tenham principalmente interesse em dimensões nanométricas.

FONTES DE LUZ SÍNCROTRON

O principal item das fontes de luz síncrotron é o anel de armazenamento de elétrons, o qual faz a radiação síncrotron uma fonte especial de raios X. O anel de armazenamento consiste em uma câmara de ultra alto vácuo. Neste anel, os elétrons estão confinados em órbitas circulares de energia constante mantida por uma série de dispositivos. Na realidade, os elétrons movem-se em seções retas, onde nas extremidades existem dipolos magnéticos, os quais defletem os elétrons de modo a terem uma órbita fechada. Enquanto os elétrons são defletidos pelos dipolos magnéticos, emite radiação eletromagnética tangente a curvatura deles. Esta é então,

extraída do anel por meio de linhas de vácuo, que são as linhas de luz, e chegam à estação experimental, onde está montado o experimento para o estudo do seu material.

Uma das principais características das radiações síncrotrons está na alta intensidade do feixe (alto brilho), uma grande banda de energia (largo espectro de energia), colimação vertical do feixe (focalização – alta intensidade e pequenas dimensões espaciais e angulares), polarização, entre outras. Um esclarecimento maior das vantagens das radiações síncrotron pode ser encontrado na referência²⁰. Detalhes adicionais, bem como aplicações da luz síncrotron^{17,21-22} e uma interessante revisão da história das fontes síncrotron pode ser encontrada na referência²³.

LABORATÓRIO NACIONAL DE LUZ SÍNCROTRON

As medidas apresentadas nesse trabalho na sua maioria foram feitas no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) que é um laboratório aberto a usuários do Brasil e do Exterior, que oferece condições excepcionais para os cientistas realizarem pesquisas com nível de competitividade mundial. Mantido com recursos financeiros do Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT), o laboratório possui uma infraestrutura que inclui linhas de luz com estações experimentais instaladas na fonte de luz síncrotron, figura 10. Está localizado no distrito de Barão Geraldo da cidade de Campinas, São Paulo. Ele foi o primeiro deste gênero no hemisfério Sul e o único existente ainda hoje em toda a América Latina é operado desde 2 de julho de 1997 pela Associação Brasileira de Tecnologia de Luz Síncrotron (ABTLuS) mediante um contrato de gestão assinado com o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e o MCT do Governo Federal.



Figura 11. Foto do Hall Experimental do LNLS pode-se ver o Anel de Armazenamento e saídas para as linhas de luzes.

Para finalizar essa seção, a referência²⁴ mostra como foi o processo de construção do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron. Como foi discutida a estratégia e filosofia de sua implantação, traça os caminhos seguidos da instalação do primeiro laboratório nacional aberto à comunidade. Finaliza, com uma discussão sobre os desafios da segunda fase do LNLS, quando ele se consolidará como instituição de pesquisa de classe mundial. O livro²⁵ também descreve a criação e a implantação do LNLS.

Experimentação nas Linhas de Luz Síncrotron

ESPALHAMENTO DE RAIOS X SÍNCROTRON

Na figura 8 é representativa do padrão típico de espalhamento de argilas compactadas, considerando os processos de difusão e intercalação de água. Ela mostra várias ordens dos picos [001] para cada estado de hidratação, 0WL, 1WL e 2WL da argila Na-FHT.

Uma análise típica da intensidade espalhada $I(q)$ requer que se considere essencialmente três parâmetros de espalhamento: o fator de estrutura $G(q)$, a função de interferência (q) e os fatores de polarização-Lorentz $L_p(q)$, numa relação

$$I(q) \propto |G(q)|^2 L_p(q) \Phi(q). \quad (1)$$

Em nossa análise consideramos a fluorohectorita como sendo um sistema centro-simétrico, o que permite escrever o fator de estrutura como:

$$G(q) = 2 \sum_j n_j f_j \exp(-W_j q_j / 4\pi^2) \cos(qZ_j), \quad (2)$$

onde a soma é feita sobre todos os átomos j da cela unitária e n_j se refere ao número de átomos do tipo j localizados a uma distância Z_j tomando como referência o plano dos átomos de Mg e Li como sendo a origem do sistema. Onde f_j são os fatores de espalhamento atômico dos constituintes e W_j são as correções devido à temperatura ou fatores de Debye-Waller. Uma aproximação usada para a FHT é considerar $W_j = W = 1,6^4$. Os fatores de Polarização-Lorentz são expressos por

$$L_p(q) = \frac{P}{\sqrt{1 - \xi^2 q^2 (\xi q)^{\exists+1}}} \quad (3)$$

onde $\exists \equiv \lambda/4\pi$ e P é a contribuição da polarização que depende da fonte de raios X. No síncrotron os raios X são linearmente polarizados no plano horizontal e usualmente se escolhe o plano que permita $P = 1$. O expoente está relacionado ao número de cristais favoravelmente orientados para que a intensidade seja coletada no detector num ângulo de Bragg. No limite das medidas de alta resolução, $\exists = 0$, para o cristal perfeito, e $\exists = 1$, para o pó perfeito. Para as argilas naturais o valor correto de \exists é desconhecido e o máximo que se pode dizer é que ele está entre estes dois valores.

Usualmente os picos [001] das argilas são alargados além da resolução instrumental e para obter a largura de pico intrínseca da amostra o que se faz é utilizar uma pseudo-Voigt como sendo a função que vai ajustar a forma dos picos. A pseudo-Voigt é a convolução de funções Gaussianas e Lorentzianas dada por

$$\Phi(q) = \frac{2\eta}{\pi\Gamma(1 + q(4q - q_c)^2)} + 2 \frac{1 - \eta}{\Gamma} \left(\frac{\ln 2}{\pi}\right)^{1/2} \exp(-4 \ln 2 (q - q_c)^2 / \Gamma^2), \quad (4)$$

onde Γ é a largura experimental à meia altura e η é constante de mistura que varia de zero a um é a responsável pela mudança da forma da curva resultante de Gaussiana para Lorentziana. As larguras das componentes Gaussianas e Lorentziana, denotados por Ω_G e Ω_L , respectivamente, estão relacionadas à Γ e η por

$$\Gamma = (\Omega_G^2 + 2,6927\Omega_G^4\Omega_L + 2,4284\Omega_G^3\Omega_L^2 + 4,471\Omega_G^2\Omega_L^3 + 0,00784\Omega_G\Omega_L^4 + \Omega_L^5)^{1/5} + \Omega_L^5)^{1/5} \quad (5)$$

e

$$\eta = 1,36603 \frac{\Omega_L}{\Gamma} - 0,47719 \frac{\Omega_L^2}{\Gamma^2} + 0,11116 \frac{\Omega_L^3}{\Gamma^3}. \quad (6)$$

A componente Gaussiana é geralmente atribuída à resolução instrumental e a componente Lorentziana permite que se determine o tamanho ou espessura dos domínios cristalinos assim como seus “strain” ou desordem (definido por $\xi = \Delta d/d$) no espaçamento de rede. O alargamento devido ao tamanho dos cristalitos e ao “strain” podem ser determinados graficamente por um procedimento conhecido como de Williamson-Hall⁴ o qual escritos em termos do vetor q corresponde a:

$$\Omega_L = 2 \frac{2\pi}{Nd} + \xi q. \quad (7)$$

Onde, a declividade da curva fornece o “strain” e o ponto de intercessão em $\Omega_L = 0$ permite que se estime N_d .

Para maiores detalhes, sobre o procedimento que fornece o “strain”.

Como exemplo a figura 12, mostra o resultado desta análise de Williamson-Hall para a Na-FHT⁴.

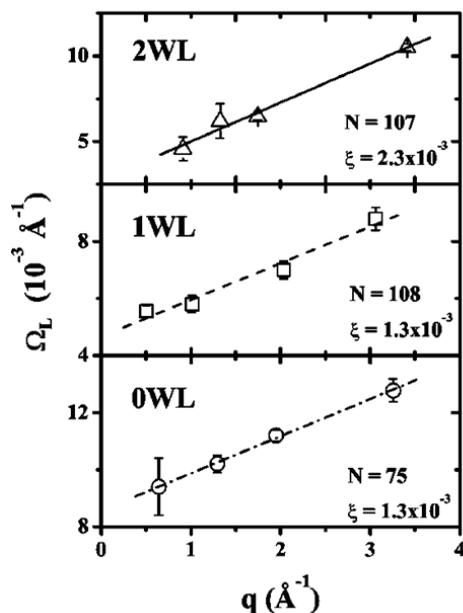


Figura 12. Gráfico de Williamson-Hall para a Na-FHT. Os triângulos, quadrados e círculos são as larguras Lorentzianas obtidas a partir de procedimentos de ajuste usando a convolução pseudo-Voigt descrita acima. A variável N representa o número de plaquetas empilhadas na amostra.

Com este procedimento foi possível estimar valores para o “strain” da referida amostra assim como determinar o número de plaquetas empilhadas nesta amostra em função do estado de hidratação.

ABSORÇÃO DE RAIOS X SÍNCROTRON

Na década de 70, começaram a ser construídos anéis de armazenamento como fontes de luz síncrotron dedicadas, propiciando, assim o desenvolvimento de novas técnicas espectroscópicas, principalmente XAFS (do inglês: *X-ray Absorption Fine Structure*), em uma tradução livre, espectroscopia de absorção de estrutura fina de raios X, que engloba as técnicas de EXAFS (*Extended X-ray Absorption Fine Structure*) e XANES (*X-ray Absorption Near Edge Spectroscopy*). Um excelente e completo trabalho histórico sobre a espectroscopia de absorção de raios x pode ser encontrado na referência²³, enquanto que

um breve histórico está na referência²⁶. Já o trabalho²⁷ é uma boa referência na língua portuguesa. Um excelente artigo de revisão da análise de absorção de raios X pode ser encontrado na referência²⁸ e uma crítica científica para os próximos 50 anos pode ser encontrada na referência²⁹.

Na figura 13 é apresentado o espectro de absorção do níquel, que mostra a relação da absorvância em função da energia dos fótons incidentes.

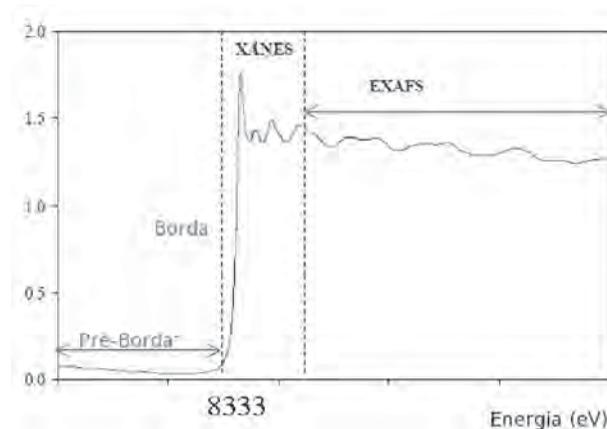


Figura 13. Representação esquemática de um espectro de absorção de raios X, adquirido no modo transmissão do níquel. O espectro XAS da borda K do níquel apresentado na figura pode ser dividido em três regiões principais apresentadas na figura.

O espectro XAS da borda K do níquel apresentado na figura 13 pode ser dividindo em três regiões principais:

Região de Pré-borda (*pre-edge*): trata-se das transições eletrônicas com absorção de energia menor que a energia de ligação é só ocorrerão quando o átomo absorvedor possuir orbitais vazios. Tais transições têm pequena probabilidade e, portanto, produzem somente pequenas oscilações no espectro de absorção.

Borda de Absorção (*edge*): região caracterizada pelo aumento abrupto da absorção quando a energia absorvida é suficiente para retirar elétrons do átomo absorvedor.

Transições Contínuas: corresponde a absorção de energias dos fótons incidentes maiores que a energia de ligação, ocorrendo, assim transições para o estado do contínuo, não localizados no átomo absorvedor e o excesso de energia é carregada pelo fotoelétron na forma de energia cinética. Esta região, chamada de XAFS é subdividida em:

Região de XANES: está compreendida na faixa de até 50 eV acima da borda de absorção, a qual apresenta

variações estreitas e intensas da absorção. O espectro XANES trabalha na região onde o comprimento de onda do fotoelétron é da ordem das distâncias interatômicas e, portanto, o seu livre caminho médio é longo o suficiente para que possam ocorrer espalhamentos múltiplos antes que ele retorne ao átomo central. Dessa maneira, o espectro XANES envolve espalhamentos múltiplos e transições para níveis desocupados, sendo rico em informações cristaloquímicas do átomo absorvedor, como o estado de oxidação, a densidade de estados desocupados e a estrutura cristalina em que está inserido o átomo absorvedor. Essa região, que compreende o domínio de baixas energias cinéticas dos fotoelétrons e ela não são discutidas nesse trabalho.

Região de EXAFS: a absorção de energia ocorre na faixa de 50 a 1000 eV acima da borda de absorção e apresenta oscilações mais suaves na absorção. No espectro EXAFS estão envolvidos apenas dois átomos, um absorvedor e outro retroespalhador, ocorrendo o chamado espalhamento simples, sendo possível obter informações a respeito da distância, da agitação e do número de vizinhos ao redor do átomo central. Nesta região, o livre caminho médio do fotoelétron é curto e os espalhamentos múltiplos se tornam improváveis e compreende o domínio de elevadas energias cinéticas dos fotoelétrons.

A técnica de *Extended X-ray Absorption Fine Structure* basicamente aparece do processo físico que envolve a interferência entre a onda emitida pelo átomo emissor e a onda retroespalhada pelo átomo vizinho. Nessa região, que ocorre a interferência entre a onda do fotoelétron pelo átomo emissor e a onda retroespalhada pelo átomo vizinho, figura 14.

Se o átomo absorvedor não possuir nenhum vizinho suficientemente próximo, o espectro de absorção terá um aumento abrupto na borda de absorção e, acima da borda, uma queda suave como ilustrado na figura 15a. As mudanças no coeficiente de absorção aparecem ao considerar uma molécula diatômica, figura 14b.

O fotoelétron emitido pelo átomo emissor é suficientemente rápido para ser tratado como um elétron livre e sua função de onda pode ser considerada como uma onda quase plana. Quando atinge o potencial do átomo vizinho, a onda é espalhada em todas as direções com uma amplitude, a qual depende da direção e da

energia cinética do elétron. A onda retroespalhada retorna ao átomo absorvedor com uma diferença de fase total dada pelo caminho óptico percorrido até átomo vizinho (ida e volta), mais uma diferença de fase causada por atravessar duas vezes o potencial do átomo central.

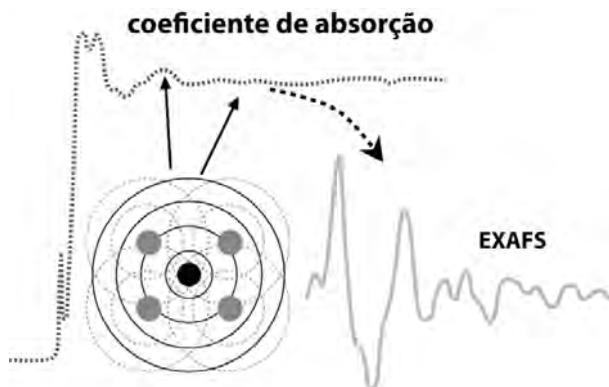


Figura 14. Representação esquemática da extração do sinal de EXAFS, com destaque para as ondas retroespalhadas com a vizinhança.

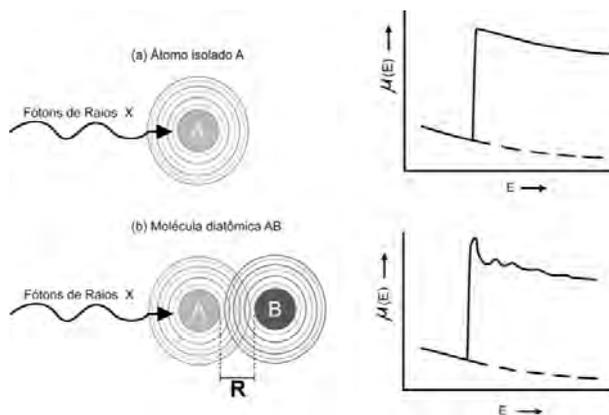


Figura 15. Espectro de absorção (a) de um átomo isolado e (b) de uma molécula diatômica.

A partir do sinal de absorção é necessário extrair as oscilações de EXAFS, isso se faz classicamente através da equação,

$$\chi(E) = \frac{\mu(E) - \mu_0(E)}{\mu_0(E)} \quad (8)$$

onde $\mu(E)$ corresponde a absorção de raios X de um elemento previamente escolhido da amostra que será estudada e $\mu_0(E)$ representa a absorção de raios X de um átomo isolado, onde não existe retroespalhamento acompanhe a ausência de retroespalhamento na figura

15a, e nesse caso representa a referência padrão da medida, ou seja, aquele elemento que foi previamente escolhido na amostra.

Detalhes adicionais, bem como uma compilação de vários trabalhos sobre os desenvolvimentos de XAFS, mas precisamente de XANES e EXAFS estão nos trabalhos³⁰⁻³² e nas referências dos livros³³⁻³⁴.

Com o objetivo de obter informações estruturais do espectro de absorção de uma amostra, deve-se adotar um modelo que leve em conta o espalhamento do fotoelétron pelos átomos vizinhos com o átomo absorvedor. Na região de EXAFS, essa análise é feita após a borda de absorção em um intervalo de 50 a 1000 eV do espectro em questão. Nessa faixa de energia, o livre caminho médio do fotoelétron criado é menor que 10 Å, esse fato leva o fotoelétron a ter um espalhamento simples pelos átomos vizinhos. Note que essa consideração vem em oposição à teoria de XANES. Essa última requer uma análise que leve em consideração o espalhamento múltiplo do fotoelétron, o que torna complexa a obtenção de resultados quantitativos dessa faixa do espectro de absorção.

Partindo de uma construção heurística e fenomenológica³⁴, são feitas as seguintes observações, que se faz necessário para criar o modelo teórico:

- Hamiltoniano dipolar elétrico para a interação entre os fótons e os átomos: necessária, pois a técnica chega aos níveis profundos dos átomos (camadas K ou L). Essa aproximação é sempre válida quando se trabalha com raios X duros;
- Espalhamento simples do fotoelétron: considera-se apenas a trajetória de ida e volta da função de onda do fotoelétron até o átomo espalhador. A sua validade é garantida, desde que não se inclua na análise a região próxima à borda do espectro de absorção, onde provavelmente o fotoelétron tem um grande livre caminho médio (energia cinética pequena);
- Átomo espalhador pequeno: se faz necessária para desconsiderar a curvatura da função de onda e assim utilizar-se aproximação de onda planas, já que, a função de onda do fotoelétron possui simetria esférica. A sua validade é maior quanto maior for a energia cinética do fotoelétron. Sua

veracidade fica mais forte quanto maior for a energia cinética do fotoelétron;

- Simetria esférica do potencial do átomo absorvedor: essa aproximação se faz necessária para que ocorra uma simplificação na equação 15. Sua validade fica comprometida para sistemas altamente anisotrópicos.

A partir dessas aproximações, pode-se seguir um caminho para uma argumentação fenomenológica^{18,31-32} ou utilizar teoria de espalhamento^{19,33,35} para chegar a equação de EXAFS. Ela corresponde a uma soma das oscilações da função de onda dos fotoelétrons emitidas pelo átomo absorvedor, e depois retroespalhadas pelos átomos vizinhos de mesmo tipo, e que estão situados na mesma distância. Desta forma, define-se uma esfera de coordenação.

$$\chi(k) = \sum_i \chi_i(k). \quad (9)$$

Em uma construção simples do modelo que leva à equação 7, inicia-se com o caráter ondulatório do fotoelétron com o seu comprimento de onda (λ_e), descrito pela equação de *de Broglie*, relaciona-se, respectivamente, com o momento linear e energia cinética.

A partir de uma relação simples das relações de *de Broglie*, momento linear e energia cinética do fotoelétron, tem-se a expressão que relaciona o vetor de onda do fotoelétron com as energias do fóton incidente (E) e a energia da borda de absorção do átomo absorvedor E_0 ,

$$k = \sqrt{\frac{2m(E - E_0)}{\hbar^2}}, \quad (10)$$

onde k é vetor de onda do fotoelétron e \hbar a constante de Planck.

A partir do pré-suposto na construção do modelo teórico, a onda esférica que emerge do átomo absorvedor, é descrita pela função exponencial,

$$\psi(k, R) = \frac{1}{kR_j} \exp(ikR_j). \quad (11)$$

Assim, a amplitude da onda espalhada será proporcional ao produto de uma constante que representa o retroespalhamento $F_j(k)$ devido ao tipo de espalhador com a onda propagante 4 na posição R_j do átomo espalhador.

Portanto, a onda espalhada pode ser reescrita como,

$$\psi(k, R) = F_j(k) \cdot \frac{\exp(ikR_j)}{kR_j} \cdot \frac{\exp(ik|\vec{R} - \vec{R}_j|)}{|\vec{R} - \vec{R}_j|} \quad (12)$$

com o referencial, no átomo absorvedor ($\vec{R} = 0$), será proporcional a:

$$\psi[k, (R = 0)] = F_j(k) \cdot \frac{\exp(i2kR_j)}{kR_j^2}. \quad (13)$$

Como o fotoelétron, de vetor de onda k , se desloca dentro do átomo, esse interage com o potencial devido ao átomo absorvedor e da mesma forma sente o potencial devido aos átomos espalhadores. Desta forma, o termo presente na exponencial da equação 13 deve ser acrescido de um fator de fase ϕ , justificado pela defasagem da trajetória de ida e volta do fotoelétron ao átomo vizinho.

O sinal de EXAFS $\chi(k)$ é diretamente proporcional à parte real da onda retroespalhada por um átomo. Para chegar ao sinal total, deve-se somar sobre todos os átomos espalhadores (j) com distâncias (R_j) assim a equação fica,

$$\chi(k) = F_j(k) \cdot \frac{\sin[2kR_j + \Phi_j(k)]}{kR_j^2}. \quad (14)$$

A equação de EXAFS na forma da equação 14, ainda necessita de algumas considerações importantes com relação ao amortecimento do sinal, tal como a vida média do fotoelétron, os efeitos de desordem térmica e estática do sistema e mais um fator que reduz a amplitude, relacionado ao efeito de muitos corpos. Em consideração a vida média do fotoelétron, o seu livre caminho médio, é uma função de sua energia esta relacionado com a probabilidade de o fotoelétron conseguir partir do átomo absorvedor e voltar sem sofrer espalhamentos inelásticos no trajeto, e sem que o buraco criado na sua emissão sofra recombinação. Essa consideração pode ser representada na forma do termo $\exp(-2R_j/\lambda)$. Ao levar em conta a desordem térmica e estática do material, se faz necessário admitir que a posição dos átomos (R_j) pode variar em torno de uma posição média. Será considerado que essa desordem seja pequena e que pode-se modelar as mudanças nas posições com uma distribuição Gaussiana em torno de uma posição média (R_j). Então essa desordem participará da equação 14 da forma $N_j \exp(2k^2\sigma^2)$, onde σ^2 representa a largura da distribuição e é chamado como fator de Debye-Waller, e é o número

de vizinhos do tipo j . Para finalizar, como últimos ajustes na equação 14, acrescentar-se o fator S_0^2 , que depende do átomo absorvedor e, ainda, ao invés de somar sobre todos os átomos espalhadores (j) e somam-se todas as esferas de coordenação j de átomos, tem-se

$$\chi(k) = \sum_j S_0^2 \cdot N_j \cdot F_j(k) \cdot \exp(-2k^2\sigma_j^2) \cdot \exp\left(-\frac{2R_j}{\lambda}\right) \cdot \frac{\sin[2kR_j + \Phi_{ij}(k)]}{kR_j^2} \quad (15)$$

onde:

- i. $\chi(k)b$: coeficiente de absorção normalizado, ele representa o espectro de absorção ligado somente às oscilações de EXAFS. É obtido experimentalmente, conforme a equação 6;
- ii. k : módulo do vetor de onda do fotoelétron criado no processo de fotoabsorção;
- iii. j : índice referente a cada esfera de vizinhos do átomo absorvedor;
- iv. R_j : compreende a distância entre os átomos na j -ésima esfera de coordenação;
- v. N_j : número de átomos do tipo j em uma distância R_j do absorvedor da j -ésima camada;
- vi. S_0^2 : representa o fator de redução da amplitude devido a efeitos de correlação eletrônica;
- vii. $F_j(k)$: função de amplitude de espalhamento característica do j -ésimo átomo;
- viii. σ^2 : fator de Debye-Waller e representa às flutuações das distâncias médias devido à desordem estrutural e/ou térmica;
- ix. $\lambda(k)$: representa o livre caminho médio do fotoelétron;
- x. $\Phi_{ij}(k)$: defasagem total produzida no processo de retroespalhamento: $\Phi_{ij}(k) = 2\phi(k) + \theta_j(k)$, sendo ϕ a defasagem devida ao átomo absorvedor e θ a defasagem devida ao átomo vizinho.

Usando a equação 15 é possível modelar os dados experimentais e assim obter algumas grandezas estruturais da amostra. Os parâmetros presentes na equação de EXAFS são divididos em dois grupos distintos:

- I. N_j , R_j e σ_j como os parâmetros estruturais;
- II. λ , $F_j(k)$ e $\Phi_{ij}(k)$ como os parâmetros atômicos.

A princípio, com o valor experimental de $\chi(k)$ e o conhecimento prévio de um dos conjuntos dos parâmetros, pode-se determinar o outro desconhecido. Para isso, obtém-se o espectro de absorção para um composto padrão, cujos parâmetros estruturais sejam conhecidos, e desse padrão extrair os parâmetros atômicos que serão utilizados na determinação dos parâmetros estruturais de sistemas não conhecidos. É evidente que os sistemas devem ser semelhantes ao padrão, para que possam ser aplicados os parâmetros atômicos obtidos a partir do mesmo. Se não, o procedimento é obter as funções de fase e amplitude a partir de cálculos teóricos via mecânica quântica *ab-initio*.

Uma consequência natural na análise de EXAFS, está na utilização da equação 15 e, a partir dela, fazer uma inversão espacial, como foi apresentado na referência³⁷. Com esse procedimento é possível obter uma pseudo distribuição radial em torno do átomo absorvedor. Ele fornece o número de vizinhos do átomo absorvedor em função das distâncias R_j . Desta forma, cada pico da transformada de Fourier está centrado em uma distância R_j que correspondente à n ésima esfera de coordenação e, então, sua amplitude é proporcional ao número de átomos nessa esfera j .

Usualmente a análise de EXAFS é realizada através da técnica conhecida, como Método de Ajustes, que permite calcular diretamente os parâmetros estruturais (N_j , R_j e σ_j^2), e utilizando os parâmetros atômicos (λ_j , $F_j(k)$ e $\Phi_{ij}(k)$). O método utiliza-se de um ajuste não linear na equação 15 de EXAFS.

Antes de iniciar os ajustes é necessário escolher um padrão experimental que fornece os parâmetros atômicos. Às vezes, não é possível encontrar um padrão que se assemelha ao sistema estudado. Então, a outra possibilidade é simular, por cálculos teóricos, o sinal de absorção usando informações estruturais conhecidas sobre o sistema. Atualmente, o programa FEFF¹⁹ combinado com os programas ATHENA e ARTEMIS³⁸ representa a referência de análises de EXAFS mais utilizados no meio científico.

É fornecido como parâmetros de ajuste os valores N_j , R_j e σ_j^2 para cada esfera de coordenação o fator de redução de amplitude do sistema S_0^2 e uma correção da energia ΔE_0 da E_0 determinada anteriormente. O critério de Nyquist³⁵ que determina o número de parâmetros que podem ser

ajustados em um sistema e esse número não pode exceder o número de pontos, independentes do sinal.

Os espectros de absorção, na borda do níquel da Ni-fluorohectorita, foram obtidos em função da temperatura num intervalo de 5 °C à 125 °C, tanto num processo de hidratação como de perda de água. Os experimentos de absorção foram realizados na linha de luz DXAS do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron.

Os dados de EXAFS foram obtidos no modo transmissão. Os espectros estão no intervalo de 8200 à 8700 eV, figura 16.

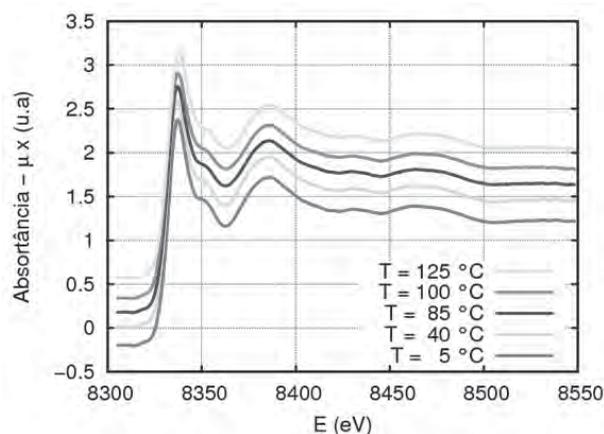


Figura 16. Espectros de absorção normalizados para a Ni-fluorohectorita em função da temperatura.

O processo de análise da normalização dos espectros seguiu os procedimentos padrões e o resultado está mostrado na figura 17 onde se tem o $k\chi(k)$ em função do vetor de onda k para os vários valores de temperatura no processo de hidratação desta amostra.

O único parâmetro controlado neste procedimento experimental foi a temperatura.

A tabela 3 a seguir, mostra os valores de umidade em função da temperatura na amostra.

A partir dos sinais de $\chi(k)$ a análise de EXAFS foi realizada de acordo com os procedimentos padrões. No procedimento de remoção da linha de base o intervalo de k , considerado de 2,0 à 9,5 Å⁻¹, foi utilizado. Nas transformadas de Fourier foi usada uma janela de apodização do tipo Kaiser-Bessel. O intervalo de k foi de 2,4 à 9,0 Å⁻¹. As FTs obtidas para a amostra Ni-FHT da figura 17 estão ilustradas na figura 18.

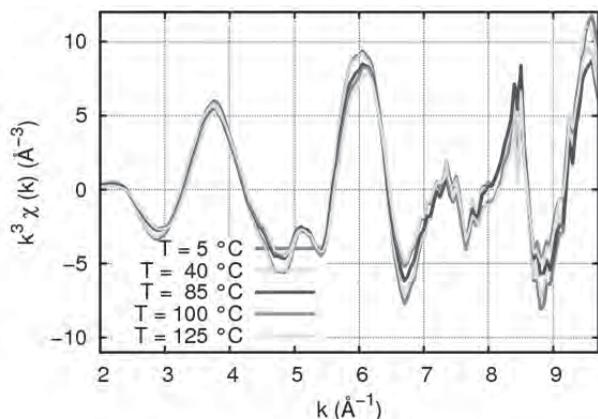


Figura 17. Oscilações de EXAFS isoladas, para a Ni-FHT no intervalo de temperatura de 125 °C para 5 °C.

Tabela 3. Valores de umidade relativa na atmosfera da câmara em função da temperatura.

Temperatura (°C)	Umidade Relativa (%)
120	0,0
100	0,4
85	3,5
40	28
5	50

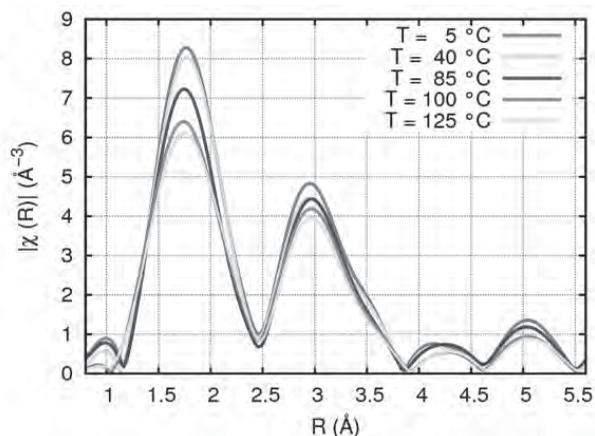


Figura 18. FT das oscilações de EXAFS, para a Ni-FHT como função da Temperatura.

Análises de Dados

Quão rápida ou lenta é a difusão de água neste sistemas? Do ponto de vista macro, pode-se afirmar que, este é um processo lento, mas deve-se levar em

consideração o fato de não ser fácil ter amostras homogêneas. Como já dissemos anteriormente, as amostra de Ni-FHT apresentam uma polidispersão em tamanho. E o que se vê experimentalmente são valores médios como, por exemplo os dados obtidos pela técnica de espalhamento de raios X. Neste caso o parâmetro de análise principal da dinâmica da difusão é a distância entre planos cristalinos. Tudo isto é completamente dependente do tipo de íon intercalante. Por exemplo, a existência ou não dos processos tipo Hendrix-Teller é íon dependente.

Na absorção de raios X o que se vê é a vizinhança de determinado elemento até um raio aproximado de 6-10 Å. Do ponto de vista deste elemento, em nosso caso o cátion Ni, veríamos a dinâmica da água no processo de solvatação e de dissolução do Ni em função dos parâmetros umidade e temperatura. Inicialmente optou-se pela técnica DXAS que permite a incidência simultânea de uma banda de energia, na amostra e, com isto, detectar possíveis processos dinâmicos rápidos. Dependendo do arranjo experimental a linha DXAS³⁹⁻⁴⁰ pode fornecer espectros com cerca de 400-600 elétrons-volts acima da borda de absorção. Entretanto, a confiabilidade numérica obtida a partir das transformadas de Fourier neste intervalo faz com que os seus valores possam ser considerados mais qualitativos.

A análise da figura 17, mostra a extensão (k_{MAX}) do sinal de EXAFS de aproximadamente 10 Å⁻¹. Devido aos efeitos de atenuação do sinal houve a necessidade de introduzir a função peso k^{-1} e, com isso, pode-se observar que para k acima de 7,0 Å⁻¹ a contribuição do ruído torna-se evidente. Nos dados de TF, figura 18 quando se compara os cinco espectros nas temperaturas 5, 40, 80, 100 e 125 °C, observa-se que a distância média entre os átomos de Ni e, sua vizinhança permanecem praticamente inalteradas. Na transformada de Fourier, é importante destacar a existência de diferentes amplitudes dos picos referentes aos primeiros e segundos vizinhos do átomo de níquel. Note que, para esses vizinhos, o primeiro pico na transformada do espectro refere-se a 5 °C é maior que o correspondente a 125 °C. A área abaixo do pico é proporcional ao número de átomos que compõe aquela esfera de coordenação. Esta redução só pode ser devida a duas causas: redução do número de vizinhos, além dos efeitos da temperatura que se refletem

no termo de Debye-Waller. Na literatura⁴¹, para amostra da argila montemorilonita, tanto o pico de 5 °C, como o pico de 125 °C e temperaturas intermediárias, mantêm-se inalterados e, iguais a 6, o número de átomos, tanto na primeira quanto na segunda esfera de coordenação. Com este argumento poderíamos atribuir essa diferença nas amplitudes à contribuição da desordem térmica devido ao aumento da temperatura. De fato, com o aumento da temperatura os íons possuem uma maior energia cinética, que leva a uma maior oscilação relativa em torno da posição de equilíbrio.

Assim, a pseudo função de distribuição radial, figura 18, mostra que a posição do primeiro pico corresponde à distância média entre o níquel e os oxigênios da primeira esfera de coordenação. Baseando-se apenas nestes dados, não há como distinguir se este oxigênio pertence à estrutura da Ni-FHT ou da água intercalada. Também, não se pode descartar a possibilidade de ter havido redução no número de vizinhos, ao se aumentar a temperatura. Afinal de contas, sabe-se pela técnica de espalhamento, que neste intervalo de temperatura é possível varrer vários estados de hidratação, ou seja, de 0WL até 3WL. Esses estados de hidratação correspondem às distâncias inter planares de 11,4 Å para (0WL) e 18,2 Å para $T=5^{\circ}\text{C}$ (3WL) obtidas pela posição dos picos de espalhamento de difração de raios X, realizados na mesma fluorohectorita, porém como íon intercalante níquel⁴².

A segunda esfera de coordenação pode ser atribuída às distâncias Ni-Ni⁴³ ou, até mesmo, às distâncias Ni-Si e requer uma análise mais rigorosa.

Conclusões dos Dados

A proposta de um tratamento térmico foi utilizada para que obtivéssemos informações da dinâmica de intercalação em função dos estados de hidratação na argila sintética Ni-FHT tendo como ponto de vista o íon intercalante Ni. A 125 °C, com umidade relativa de 0 %, dados de difração de raios X⁴ indicam 0 camadas de água, cujos dados correspondem às distâncias interplanares⁴² de 11,4 Å. A 5 °C a umidade é de aproximadamente 50 %, os dados de difração fornecem um estado de hidratação de 3 camadas de água com plaquetas separadas por uma distância⁴² de 18,2 Å. Os resultados de DXAS mostram claramente o

não desaparecimento dos picos para quaisquer destas temperaturas, somente a diminuição da amplitude. Como já anteriormente pode ser atribuído à mudança no número de vizinhos e/ou ao fator de Debye-Waller devido às variações de temperaturas.

Especificamente com relação ao primeiro pico dissemos não poder distinguir qual o oxigênio estaria contribuindo, o da água ou da estrutura cristalina da Ni-FHT. Devemos lembrar que, à medida que se retira água da amostra, as distâncias entre os planos das plaquetas diminuem, ou seja, a vizinhança de oxigênios tende a não se alterar muito.

Quanto aos segundos vizinhos, e de maneira semelhante ao primeiro pico, só se observa a diminuição na amplitude, mas não o seu desaparecimento. É claro que toda argumentação anterior de quem é a causa desta diminuição se mantém. A questão aqui é: Quem é este segundo vizinho? Ni-O devido à segunda camada de hidratação? Ni-Ni devido à interação entre os cátions livres entre as placas? Ou Ni-Si devido à possibilidade de se ter o íon Ni localizado na estrutura hexagonal formada pelos oxigênios da base cristalina das plaquetas da argila?

Por serem bem estáveis estes picos dos segundos vizinhos, poderíamos descartar a hipótese de uma segunda camada de hidratação, pelo menos como mecanismo principal. Dados de simulação¹ por Dinâmica Molecular em argilas do tipo montemorilonita mostram que estes íons intercalados estão livres para se moverem entre as camadas não se sustentando qualquer hipótese de rigidez nas distâncias Ni-Ni entre camadas. Na hipótese Ni-Si, o íon níquel mover-se-ia em distâncias quantizadas pela malha hexagonal dos oxigênios, explicando a estabilidade da existência destes picos. Entretanto, na situação de 2WL ou 3WL onde se sabe que há espaço para outras esferas de coordenação, esperaríamos uma mudança mais dramática na amplitude de tais picos. É uma hipóteses. Deve-se ressaltar aqui a necessidade da simulação como mecanismo único de elucidação destas hipóteses.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS): Projetos D06A-DXAS –

4815/2006 e 7118/2007) sem os quais essa pesquisa não teria sido viável.

Referências Bibliográficas

1. Skipper, N. T.; Soper, A. K.; McConnell, J. D. C.; Refson, K. *Chem. Phys. Lett.* **1990**, 166, 141–145.
2. Skipper, N. T.; Soper, A. K.; McConnell, J. D. C. *J. Chem. Phys.* **1991**, 94, 5751–5760.
3. Skipper, N. T.; Refson, K.; McConnell, J. D. C. *J. Chem. Phys.* **1991**, 94, 7434–7445.
4. da Silva, G. J.; Fossum, J. O.; DiMasi, E.; Maloy, K. J.; Lutnaes, S. B. *Phys. Rev. E* **2002**, 66, 1–6.
5. da Silva, G. J.; Fossum, J. O.; DiMasi, E.; Maløy, K. J. *Phys. Rev. B* **2003**, 67, 094114.
6. Løvoll, G.; Y. Méheust, B. S.; Maløy, K. J.; Fossum, J.; da Silva, G. J.; Mundim, M. S. P.; Jr., R. D.; Fonseca, D. *Physica B* **2005**, 370.
7. Méheust, I.; Sandnes, B.; Løvoll, G.; Maløy, K. J.; Fossum, J. O.; da Silva, G. J.; Mundim, M. S. P.; Jr., R. D.; Fonseca, D. *Clay Science* **2006**, 12, 66–70.
8. Paula, F.L.O., Silva, G.J. da, Aquino, R., Depeyrot, J., Fossum, J.O., Knudsen, K.D., Helgesen, G., Tourinho, F.A., *Braz. J. Phys.* **2009**, 39, 163–170.
9. Méheusta, Y.; Parmar, K. P. S.; Schjelderupsen, B.; Fossum, J. O.; *J. Rheol.* **2011**, 55(4), 809–833.
10. Kaviratna, P. D.; Pinnavaia, T. J.; Schroeder, P. A. *Journal of Physics and Chemistry of Solids* **1996**, 57, 1897 – 1906.
11. Solin, S. A. *Annual Review of Materials Science* **1997**, 27, 89–115, Cited By (since 1996): 38.
12. Velde, B. *Introduction to clay minerals : chemistry, origins, uses, and environmental significance*; Chapman & Hall: New York, New York, 1992.
13. Vieira, A. C.; Santos, P. d. S.; Santos, H. d. S. *Quím. Nova* **1997**, 30, 146–152.
14. Bakk, A.; Fossum, J. O.; da Silva, G. J.; Adland, H. M.; Mikkelsen, A.; Elgsaeter, A. *Phys. Rev. E* **2002**, 65, 021407.
15. Hendricks, S.; Teller, E. J. *Chem. Phys.* **1942**, 10, 147–167.
16. Vishnoi, A. N.; Agarwal, B. K. *Proceedings of the Physical Society* **1966**, 89, 799–804.
17. Stern, E. A.; Heald, S. *In Basic principles and applications of EXAFS*; Koch, I. E. E., Ed., *Handbook of Synchrotron Radiation* ed.; North Holland Publishing Company, 1988; pp 955–1014.
18. Stumm von Bordwehr, R. *Ann. Phys. Fr.* **1989**, 14, 377–465.
19. Rehr, J. J.; Albers, R. C. *Rev. Mod. Phys.* **2000**, 72, 621–654.
20. Jackson, J. D. *Classical Electrodynamics*, 2nd ed.; John Wiley: New York, 1975.
21. Margaritondo, G. *Introduction to Synchrotron Radiation*; Oxford University Press, 1988.
22. Nielsen, J. A.; McMorro, D. *Elements of modern x-ray physics*, 2nd ed.; John WilleySons, Ltd: Chichester – England, 2011.
23. Blewett, J. P. *Journal of Synchrotron Radiation* **1998**, 5, 135–139.
24. Brum, J. A.; Meneghini, R. *São Paulo Perspec* **2002**, 16, 48–56.
25. Burgos, M. B. *Ciência na periferia: a luz síncrotron brasileira*, 1st ed.; Editora Universidade Federal de Juiz de Fora: Juiz de Fora, 1999.
26. Lytle, F. W. *Journal of Synchrotron Radiation* **1999**, 6, 123–134.
27. Cezar, J.; Vicentin, F.; Tolentino, H. *Revista Brasileira de Ensino de Física* **2000**, 22, 363–377.
28. Binsted, N.; Hasnain, S. S. *Journal of Synchrotron Radiation* **1996**, 3, 185–196.
29. Lytle, F. *Synchrotron Radiation News* 2007, 20, 9–10(2).
30. Stern, E. A. *Journal of Synchrotron Radiation* **2001**, 8, 49–54.
31. Rehr, J. J.; Ankudinov, A. L. *Journal of Synchrotron Radiation* **2001**, 8, 61–65.
32. Ankudinov, A. L.; Rehr, J. J. *Journal of Synchrotron Radiation* **2003**, 10, 366–368.
33. Teo, B.-K.; Joy, D. C. *EXAFS spectroscopy: techniques and applications*, 1st ed.; Plenum Press: New York – EUA, 1981.
34. Newville, M. *Fundamentals of XAFS*; Technical Report, 2002, Versão 0.1.
35. Stern, E. A. *Phys. Rev. B* **1993**, 48, 9825–9827.
36. Eisberg, R.; Resnick, R. *Física Quântica - Átomos, Moléculas, Sólidos, Núcleos e Partículas*; Editora Campus, 1994.
37. Sayers, D. E.; Stern, E. A.; Lytle, F. W. *Phys. Rev. Lett.* **1971**, 27, 1204–1207.
38. Ravel, B.; Newville, M. *J. Synchrotron Rad.* **2005**, 12, 537–541.
39. Tolentino, H.; Dartyge, E.; Fontaine, A.; Tourillon, G. *Journal of Applied Crystallography* **1988**, 21, 15–22.
40. Tolentino, H. C. N.; Cezar, J. C.; Watanabe, N.; Piamonteze, C.; Souza-Neto, N. M.; Tamura, E.; Ramos, A. Y.; Neueschwander, R. *Physica Scripta* **2005**, T115, 977–979.
41. Dähn, R.; Scheidegger, A. M.; Manceau, A.; Schlegel, M. L.; Baeyens, B.; Bradbury, M. H.; Morales, M. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **2002**, 66, 2335 – 2347.
42. Aalerud, T. N. *Mestrado em Física, Norwegian University of Science and Technology - Faculty of Physics, Informatics and Mathematics Department of Physics: Trondheim*, 1999.
43. Pandya, K. I.; O’Grady, W. E.; Corrigan, D. A.; McBreen, J.; Hoffman, R. W. *The Journal of Physical Chemistry* **1990**, 94, 21–26.

Luciano Ribeiro^{1*}, Geraldo J. da
Silva², Maria S. Pedrosa Mundim²,
Marcelo H. Sousa³, Jon O. Fossum⁴
& Kleber C. Mundim⁵

¹Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Estadual de Goiás, CP 459, Anápolis, GO.

²Instituto de Física, Universidade de Brasília, Brasília.

³Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília, Brasília.

⁴NTNU, Departamento de Física, Høgskoleringen 5, N-7491 Trondheim, Norway.

⁵Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília.

*e-mail: lribeiro@ueg.br

Análise do Desempenho de Inibidores de Corrosão à Base de Misturas de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, ZnSO_4 e Uréia na Proteção do Aço-Carbono

João P. Pina, Kenia F. Barbosa*, Leonardo R. Almeida, Rafaella S. Costa, Tatiane P. Cardoso & Valéria C. Silva

A corrosão é uma reação de oxi-redução que causa alterações indesejáveis nos elementos industriais. Para reduzir o efeito corrosivo são utilizados os inibidores que, em concentração adequada, reduzem o processo corrosivo. O presente trabalho tem como finalidade verificar a melhor combinação de inibidores para o aço-carbono, em solução de NaCl 3% e HCl 3mol/L. Os testes foram conduzidos durante sete dias em três etapas distintas, com o uso de misturas de inibidores anódico, catódico e adsorção. Durante o período considerado verificou-se que as misturas de inibidores, em meio salino e ácido, apresentaram uma eficiência pouco significativa nas amostras de aço-carbono.

Palavras-chave: *Corrosão, Inibidores, Aço-carbono.*

Corrosion is an oxidation-reduction reaction that causes undesirable changes in the industrial elements. To reduce the corrosion inhibitors that are used in proper concentration, reduce the corrosive process. This study aims to determine the best combination of inhibitors for carbon steel in 3% NaCl solution and HCl 3mol/L. Tests were conducted for seven days in three distinct stages, with the use of mixtures of inhibitors anode, cathode and adsorption. During the period considered to be mixtures of inhibitors, and acid in saline, showed a minor efficiency in carbon steel samples.

Keywords: *Corrosion, Inhibiting, carbon steel.*

Introdução

A corrosão é um processo espontâneo e resulta na real tendência dos metais reverterem para sua forma mais estável, normalmente óxidos. A maioria dos metais é encontrada na natureza na forma de minérios (óxidos, sulfetos, silicatos), e estes minérios passam por um processo de absorção de calor através de processos metalúrgicos - para serem transformados em metais. Portanto para retornar do estado inicial os metais sofrem oxidação. Dentre as muitas maneiras de definição de corrosão, pode-se dizer que, a corrosão é uma reação de oxidação-redução que gera desgaste de um material que mantém contato com diferentes meios, formando um produto de corrosão (GENTIL, 2007).

Nos setores industriais o processo corrosivo causa problemas ligados à custos de manutenção, forçando a troca de equipamentos devido ao desgaste ou paralisação inesperada do equipamento, causando transtornos no planejamento de produção, perda de um produto por contaminação com os resíduos da corrosão, impactos ambientais decorrentes de vazamento em tanques e tubulações corroídas e principalmente as vidas humanas colocadas em riscos de acidente, seguido de incêndio de grandes proporções ou explosões (MERÇON *et al*, 2004).

Um dos grandes problemas associados ao processo de corrosão está presente na indústria de petróleo, pois o ataque das superfícies metálicas de tanques de armazenamento, tubulações e outros equipamentos ocasionam um acúmulo de substâncias sólidas que obstruem os espaços porosos e canais da matriz rochosa, o que dificulta a capacidade do fluxo de gás ou óleo (NETO *et al*, 2005). Uma solução ácida, normalmente o ácido clorídrico é usado para dissolver as substâncias sólidas (minerais) presentes na formação rochosa (CARDOSO *et al*, 2005).

A presença elevada de sais em estruturas submersas apresenta elevada taxa de corrosão, com a alta movimentação da água do mar pode ocorrer mais concentração de oxigênio acelerando o processo corrosivo (DUTRA, 2006). A solução salina presente na água do mar é a única responsável pelo processo corrosivo, podendo encontrar também outros constituintes como matéria orgânica e gases dissolvidos. Nos aços e ligas de

ferro em geral, o ataque é mais agressivo, danificando a estrutura do material (NUNES, 2007).

Os aços-carbono são ligas metálicas de ferro e carbono com teor de carbono inferior a 2%. Além de ferro e carbono, pode conter pequenas quantidades de manganês, enxofre, silício dentre outros (NUNES, 2007). É um dos materiais de construção industrial de maior importância, sendo empregado na maioria dos equipamentos industriais e, além de ser um material de fácil manuseio, de boa soldabilidade, é um material metálico de menor preço em relação a sua resistência mecânica. Os aços-carbono em contato, principalmente com soluções ácidas ou salinas em temperatura ambiente sofrem corrosão (ROSSI *et al*, 2007).

Nas indústrias a utilização de materiais metálicos em equipamentos é de extrema importância, justificando a necessidade de estudos sobre o processo corrosivo, tendo como objetivo principal conhecer e caracterizar os meios agressivos que são responsáveis pelas reações químicas e eletroquímicas causadas em materiais de elevada importância industrial. Para reduzir este efeito corrosivo são utilizados os agentes antioxidantes chamados de inibidores de corrosão (GENTIL, 2007).

De uma forma geral Gentil (2007) define inibidor de corrosão como uma substância ou mistura de substâncias que quando presentes em concentrações adequadas no meio corrosivo reduzem a corrosão. É importante salientar que os inibidores são específicos em termos de metal a proteger, do meio corrosivo, da temperatura e da sua faixa de concentração. É essencial usar uma quantidade adequada de inibidor, já que muitos agentes inibidores podem acelerar a corrosão provocando em especial um ataque localizado, como corrosão por pontos, se a concentração for abaixo da correta (FREIRE, 2005).

O objetivo deste trabalho foi analisar o desempenho de combinações de inibidores de corrosão em diferentes proporções, visando a proteção do aço-carbono em meio ácido e salino.

Materiais e Métodos

Este trabalho constitui em três etapas distintas:

- 1) Preparo de soluções e amostras de aço-carbono com comprimento 35mm x 2,5mm de largura;
- 2) Teste com amostras de aço-carbono em meios

ácidos e salinos com misturas de inibidores anódico (Molibdato de Sódio 10%), catódico (Sulfato de Zinco 10%) e por adsorção (Uréia 0,1g);

3) Análises dos resultados obtidos.

PREPARO DE SOLUÇÕES E AMOSTRAS DE AÇO-CARBONO

Neste trabalho todos os reagentes utilizados foram empregados sem purificação prévia. Foram preparadas as seguintes soluções: cloreto de sódio 3%, ácido clorídrico 3mol/L, sulfato de zinco 10%, molibdato de sódio 10% e utilizou-se o reagente uréia PA. Os aços-carbono foram pesados individualmente antes de serem colocados em solução.

Tabela 1. Proporção de inibidores anódico e catódico utilizado nos meios NaCl 3% e HCl 3mol/L.

NaCl			
Anódico (molibdato de sódio)		Catódico (sulfato de zinco 10%)	
100%	2,0 mL	0%	0,0 mL
80%	1,6 mL	20%	0,4 mL
50%	1,0 mL	50%	1,0 mL
20%	0,4 mL	80%	1,6 mL
0%	0,0 mL	100%	2,0 mL
HCl			
Anódico (molibdato de sódio)		Catódico (sulfato de zinco 10%)	
100%	2,0 mL	0%	0,0 mL
80%	1,6 mL	20%	0,4 mL
50%	1,0 mL	50%	1,0 mL
20%	0,4mL	80%	1,6 mL
0%	0,0mL	100%	2,0 mL

Testes com amostras de aço-carbono em meios ácidos e salinos com mistura de inibidores anódico, catódico e por adsorção.

Para comparação dos resultados dos experimentos realizados em laboratório as amostras de aço-carbono foram colocadas em contato com os meios (ácido clorídrico 3mol/L e cloreto de sódio 3%) sem a presença de inibidores, verificando as suas respectivas eficiências.

Foram feitos três experimentos em combinações diferentes de inibidores. Em cada experimento utilizou-

se 10 béqueres, sendo que em cinco béqueres o meio utilizado foi o cloreto de sódio 3% e nos outros cinco o meio utilizado foi ácido clorídrico 3mol/L com a respectiva combinação de inibidores, conforme Tabelas 1, 2 e 3. Em cada béquer foi adicionado a peça de aço carbono e os sistemas foram mantidos à temperatura ambiente durante 7 dias.

Tabela 2. Proporção de inibidores anódico e adsorção utilizado nos meios NaCl 3% e HCl 3mol/L.

NaCl			
Anódico (molibdato de sódio 10%)		Adsorção (uréia)	
100%	2,0 mL	0%	0,00 g
80%	1,6 mL	20%	0,02 g
50%	1,0 mL	50%	0,05 g
20%	0,4 mL	80%	0,08 g
0%	0,0 mL	100%	0,10 g
HCl			
Anódico (molibdato de sódio 10%)		Adsorção (uréia)	
100%	2,0 mL	0%	0,00 g
80%	1,6 mL	20%	0,02 g
50%	1,0 mL	50%	0,05 g
20%	0,4 mL	80%	0,08 g
0%	0,0 mL	100%	0,10 g

ANÁLISES DOS RESULTADOS OBTIDOS

Os aços-carbono utilizados nos experimentos em meio ácido e salino sofreram corrosão parcial, conforme dados da Tabela 4, 5 e 6. Após uma semana houve formação de incrustação sobre os aços-carbono em meio salino, que é um indício de corrosão no sistema, conforme a Equação 1,



O produto dessa reação é o cloreto de ferro III que é o responsável pelas incrustações sobre as amostras.

Observou-se que o aço carbono com a combinação de inibidores na proporção de 50% anódico (molibdato de sódio) e 50% catódico (sulfato de zinco) em meio salino foi o sistema que obteve maior índice de incrustação, ou seja, o que sofreu maior corrosão,

constatando que essa combinação não é eficaz para o sistema proposto. Nesse sistema a combinação de 20% anódico (molibdato de sódio) e 80% catódico (sulfato de zinco) é o que apresentou menor índice de corrosão, considerando assim o sistema de maior eficiência de inibição.

Os aços carbono presentes na solução de ácido clorídrico sofreram maior desgaste com deformação em toda à superfície, obtendo uma coloração grafite, devido ao meio ser agressivo, conforme a Equação 2,



O produto formado (cloreto de ferro II) é responsável pelo início de corrosão. À medida que foi diminuindo a proporção de inibidor anódico (molibdato de sódio) e aumentando a proporção de inibidor catódico (sulfato de zinco) a cor da solução foi clareando de marrom para verde claro.

Tabela 3. Proporção de inibidores catódico e adsorção utilizado nos meios NaCl 3% e HCl 3mol/L.

NaCl			
Catódico (sulfato de zinco 10%)		Adsorção (uréia)	
100%	2,0 mL	0%	0,00 g
80%	1,6 mL	20%	0,02 g
50%	1,0 mL	50%	0,05 g
20%	0,4 mL	80%	0,08 g
0%	0,0 mL	100%	0,10 g
HCl			
Catódico (sulfato de zinco 10%)		Adsorção (uréia)	
100%	2,0 mL	0%	0,00 g
80%	1,6 mL	20%	0,02 g
50%	1,0 mL	50%	0,05 g
20%	0,4 mL	80%	0,08 g
0%	0,0 mL	100%	0,10 g

A combinação de inibidores 20% anódico (molibdato de sódio) e 80% catódico (sulfato de zinco), foi a proporção que obteve maior índice de corrosão nos aços carbono, portanto a proporção de inibidores 100% anódico (molibdato de sódio) e 0% catódico (sulfato

de zinco) foi considerada a melhor combinação para o sistema em estudo.

No decorrer de uma semana de observação constatou-se a presença de incrustações sobre os aços-carbono em meio salino, sendo que a combinação de inibidores com proporção de 80% anódico (molibdato de sódio) e 20% adsorção (uréia) foi a que apresentou maior índice de corrosão, sendo assim essa combinação não é adequada para o sistema proposto.

Em contrapartida a melhor combinação de inibidores foi na proporção 0% anódico (molibdato de sódio) e 100% adsorção (uréia), no qual resulta uma eficiência maior de inibição. No sistema os aços-carbonos utilizados na solução de ácido clorídrico sofreram deformação em toda superfície com uma coloração gráfitica.

Tabela 4. Variação da massa das amostras durante a realização do experimento, catódico (sulfato de zinco) e anódico (molibdato de sódio).

NaCl				
Pregos	Peso inicial	Peso final	Peso s/ inc.	Variação s/ inc.
1	1,4421 g	1,4437 g	1,4371g	-0,0050g
2	1,4417 g	1,4480 g	1,4406g	-0,0011g
3	1,4395 g	1,4448 g	1,3900g	-0,0495g
4	1,4107 g	1,4154 g	1,4106g	-0,0001g
5	1,4354 g	1,4341 g	1,4306g	-0,0048g
HCl				
Pregos	Peso inicial	Peso final	Variação de peso	
1	1,4413 g	0,4609 g	-0,9804 g	
2	1,4163 g	0,2611 g	-1,1552 g	
3	1,4462 g	0,2526 g	-1,1936 g	
4	1,4413 g	0,2200 g	-1,2213 g	
5	1,4267 g	0,2647 g	-1,1620 g	

Determinou-se que a combinação de inibidores em meio ácido com proporção 20% anódico (molibdato de sódio) e 80% adsorção (uréia) não possui uma boa eficiência, entretanto não é interessante para o processo de inibição. Portanto a melhor combinação desse sistema foi a proporção 100% anódico (molibdato de sódio) e 0% adsorção (uréia), considerando-a eficaz para o sistema proposto.

Após uma semana observou-se que os aços-carbono presentes na solução de cloreto de sódio apresentaram incrustações, sendo que a combinação de inibidores com proporção 20% catódico (sulfato de zinco) e 80% adsorção (uréia) resultou-se em um elevado índice de corrosão, portanto pode-se dizer que essa combinação não é viável para o sistema realizado. Na combinação de inibidores cuja proporção de 0% catódico (sulfato de zinco) e 100% adsorção (uréia) foi o sistema que obteve menor índice de corrosão.

Tabela 5. Variação da massa das amostras durante a realização do experimento, anódico (molibdato de sódio) e adsorção (uréia).

NaCl				
Pregos	Peso inicial	Peso final	Peso s/ inc.	Variação s/ inc.
1	1,4027 g	1,4033 g	1,3990 g	-0,0037 g
2	1,4392 g	1,4364 g	1,4325 g	-0,0067 g
3	1,4388 g	1,4380 g	1,4340 g	-0,0048 g
4	1,4370 g	1,4392 g	1,4315 g	-0,0055 g
5	1,4357 g	1,4377 g	1,4324 g	-0,0033 g
HCl				
Pregos	Peso inicial	Peso final	Variação de peso	
1	1,4324 g	0,3523 g	-1,0801 g	
2	1,3757 g	0,2751 g	-1,1006 g	
3	1,3899 g	0,2800 g	-1,1099 g	
4	1,4559 g	0,2735 g	-1,1824 g	
5	1,3997 g	0,2401 g	-1,1596 g	

Os aços-carbono em meio ácido apresentaram os mesmos indícios de corrosão dos sistemas anteriores, a combinação de inibidores com proporção de 0% catódico (sulfato de zinco) e 100% adsorção (uréia) atuaram com menor proteção sobre o aço carbono, não sendo adequado para o teste realizado. Entretanto a melhor combinação de inibidores foi a com proporção de 20% catódico (sulfato de zinco) e 80% adsorção (uréia), apresentando para o sistema um maior nível de eficiência de inibição.

De acordo com a Tabela 7 verificou-se que o aço-carbono presente em meio ácido sem a presença de inibidores apresentou deformação em toda superfície e uma variação brusca em seu peso, em contrapartida o aço-carbono em meio salino apresentou incrustação e uma pequena variação de peso, como mostra a Figura 1.

Tabela 6. Variação da massa nas amostras durante a realização do experimento, catódico (sulfato de zinco) e adsorção (uréia).

NaCl				
Pregos	Peso inicial	Peso final	Peso s/ inc.	Variação s/ inc.
1	1,4339g	1,4359g	1,4332g	+0,0003g
2	1,4319g	1,4325g	1,4323g	+0,0004g
3	1,4530g	1,4545g	1,4531g	+0,0011g
4	1,4518g	1,4549g	1,4485g	-0,0033g
5	1,4445g	1,4402g	1,4388g	-0,0027g
HCl				
Pregos	Peso inicial	Peso final	Variação de peso	
1	1,4420g	0,1605g	-1,2815g	
2	1,4352g	0,1212g	-1,3140g	
3	1,4675g	0,1899g	-1,2776g	
4	1,4503g	0,1843g	-1,2660g	
5	1,4409g	0,1051g	-1,3358g	

Ao se comparar os resultados dos experimentos realizados em diferentes combinações de inibidores com a amostra branco, verificou-se que o segundo experimento (Tabela 2) foi o sistema que houve uma melhor eficiência da ação dos inibidores anódico (molibdato de sódio) e adsorção (uréia) em meio ácido, conforme a Figura 2.

Já o terceiro experimento (Tabela 3), foi o sistema onde o inibidor catódico (sulfato de zinco) e adsorção (uréia), atuaram com maior eficiência em meio salino.

Pode-se dizer que os inibidores molibdato de sódio, sulfato de zinco e uréia utilizados neste sistema não apresentaram concentrações adequada para proteção das amostras de aços-carbono em meio salino, as concentrações utilizadas de inibidores em meio salino aceleram o processo corrosivo.

Conclusão

Considerando os resultados apresentados no artigo pode-se concluir que a corrosão é uma reação química de oxidação-redução que causa a deterioração de um material, apresentando alterações indesejáveis tais como o desgaste, variação de massa, e modificação estrutural, tornando-o inadequado para o uso. Para reduzir o processo corrosivo são utilizados inibidores, compostos químicos que em concentração adequada formam uma película protetora aumentando a resistência do material.

Tabela 7. Variação da massa nas amostras de aço-carbono em meio ácido e salino sem adição de inibidores (Amostra Branco).

Meio	Peso inicial	Peso final	Variação de peso
HCl	1,4254 g	0,2329 g	-1,1925 g
NaCl	1,4185 g	1,4186 g	+0,0001 g

Com relação aos experimentos realizados pode-se dizer que o emprego dos inibidores (molibdato de sódio, sulfato de zinco e uréia) nas concentrações utilizadas não apresentou eficiência desejada nas amostras de aço-carbono, tornando o método pouco viável para a utilização em indústrias petrolíferas. É de fundamental importância a continuidade de estudos sobre o processo corrosivo buscando a melhoria na aplicação dos inibidores nos processos industriais.

Referências Bibliográficas

- Cardoso, S. P.; Reis, F. A.; Massapust, F., C.; Costa, J. F.; Tebaldi, L. S.; Araújo, L. F. L.; Silva, M. V. A.; Oliveira, T.S. Avaliação de Inibidores de uso diverso como Inibidores de corrosão. *Quim. Nova*, v. 28, n. 5, 756-760, **2005**.
- Dutra, A. C. Proteção Catódica: Técnica de combate a corrosão. 4ª ed. Rio de Janeiro: Editora Interciência, **2006**.
- Freire, K.R.R. Avaliação do desempenho de inibidores de corrosão em armaduras de concreto. 2005. 211 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, **2005**.
- Gentil, V. **Corrosão**. 5ªed. Rio de Janeiro: LTC Editora, **2007**.
- Merçon, F.; Guimarães, P. I. C.; Mainier, F. B. Corrosão: Um exemplo usual de fenômeno químico. *Quim. Nova*. v. 19, **2004**.
- Neto, A. O. W.; Vale, T. Y. F.; Dantas, T. N. C.; Moura, E. F.; Neto, A. A. D. Novo Inibidor de corrosão para aplicação em oleodutos. 2005. Trabalho apresentado ao 3º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás, Salvador, **2005**.
- Nunes, L. P. Fundamentos de Resistência à corrosão. Rio de Janeiro: Editora Interciência, **2007**.
- Rossi, C. G. F. T.; Júnior, H. S.; Maciel, M. A. M. Estudo comparativo da eficiência da difenilcarbazida e do óleo de coco saponificado microemulsionados na inibição da corrosão de aço-carbono. *Quim. Nova*. v. 30, n. 5, 1128-1132, **2007**.

João P. Pina, Kenia F. Barbosa*,
Leonardo R. Almeida, Rafaella S.
Costa, Tatiane P. Cardoso & Valéria
C. Silva

Faculdade de Tecnologia Senai Roberto Mange, Anápolis, GO.
*e-mail: keniafb.senai@sistemafieg.org.br

Inovação Tecnológica

A ciência, a tecnologia e a inovação são fatores imprescindíveis para o desenvolvimento de um país. Através de sua ampliação, aperfeiçoa-se a habilidade de criação e comercialização de novos produtos e serviços; torna-se possível o progresso material, a consolidação do bem-estar social e a melhoria do nível educacional e técnico da mão-de-obra. A forma como os países organizam seus processos de inovação (e indução à inovação) tem mostrado uma variedade de arranjos exitosos, mas não uma fórmula única. Os sistemas de inovações são caracterizados por uma diversidade de interações entre empresas e instituições.

No Brasil, os Fundos Setoriais desempenham, neste contexto, um papel fundamental, funcionando como um instrumento de indução à inovação e à articulação entre empresas e centros produtores de C&T. Para incentivar a pesquisa científica e a inovação tecnológica no País, houve um esforço para se consolidarem os marcos legais regulatórios, como a aprovação e regulamentação da Lei de Inovação nº 10.903/04; da Lei do Bem, nº 11.196/05; e da Lei nº 11.540, de 12 de novembro de 2007, as quais possibilitaram a diversificação de instrumentos de apoio à PD&I no País.

Por outro lado, temos um número elevado de empresas, principalmente as pequenas, que desconhecem o processo de acesso ao financiamento da pesquisa e o apoio à inovação, bem como a interação com os Institutos ou Centros Tecnológicos e as Universidades.

O problema do financiamento inovativo está na alavancagem de investimento de alto risco, diversamente de outros, como ampliação de capacidade instalada. Esse elevado risco tende a reduzir o volume privado de recursos e a elevar os critérios para a qualificação dos pedidos de empréstimos. Nesse sentido, frequentemente as fontes de investimentos das empresas ficam dependentes de recursos próprios ou de financiamentos públicos. No caso do financiamento público, a disponibilidade de recursos advém majoritariamente do BNDES, da FINEP e, em menor medida, das Fundações de Amparo à Pesquisa (FAP's), com a diferença de que o primeiro é

voltado para investimentos produtivos, o segundo para investimentos inovativos (quer seja em P&D, infraestrutura, treinamento, etc), e o terceiro para ambos. Mesmo sendo o BNDES garantidor de investimentos em outras áreas que não o foco tecnológico, a criação de infraestrutura para as empresas atinge de alguma forma seu fluxo de caixa e permite um maior autofinanciamento nas inovações.

Quanto à FINEP, o financiamento acontece via fundos setoriais, com o intuito de promover capacitação em ciência e tecnologia para indústrias, universidades e Institutos de Pesquisa. Um dos objetivos desta política de Ciência, Tecnologia e apoio à Inovação é incentivar a implementação de projetos de pesquisa científica e tecnológica cooperativa entre universidades, centros de pesquisas e o setor empresarial; estimular a ampliação dos gastos em pesquisa e desenvolvimento realizados por empresas. Um dos exemplos desta política é a Subvenção Econômica à Inovação, que se caracteriza como instrumento de concessão de recursos financeiros de natureza “não-reembolsável” para empresas privadas que desenvolvam projetos de inovação estratégicos para o País. Ela é operacionalizada pela FINEP. Em Goiás temos exemplos bem sucedidos de empresas que se utilizaram destes recursos.

Como membros do Conselho de Desenvolvimento Tecnológico e Inovação da FIEG, temos, dentre outras, a missão de promover a divulgação e conscientização destas políticas para as pequenas, médias e grandes indústrias filiadas aos Sindicatos, e para isso contamos com o apoio das universidades e dos centros tecnológicos, dentre eles o SENAI, que tem buscado melhorar sua infraestrutura de seus laboratórios de pesquisas, assim como contratando doutores e mestres para apoiar as indústrias na elaboração de projetos inovadores.

Se estamos falando de fontes de recurso para o fomento das atividades empresariais, não podemos esquecer da outra face do processo produtivo, que é a mão de obra, vital nas empresas, e também, é claro, naquelas que desenvolvem atividades afins com a

química industrial, o foco das atenções desta revista. O trabalhador da indústria química em geral, como as de produtos agrícolas, alimentícias, de plásticos, tratamento de couros e fabricação de tintas e vernizes, de cimento e de vidro, entre outras, opera equipamentos e controla processos industriais. Em laboratórios, segundo os fundamentos básicos da atividade, faz análises de qualidade da matéria-prima e de produtos finais, e controla resíduos da produção, de modo a não prejudicar o meio ambiente com poluentes.

Está esse trabalhador efetivamente qualificado no Estado de Goiás? Sabemos dos investimentos e dos esforços do SENAI e de sua magnífica equipe de instrutores. Mas será que isso basta? Não é preciso que a empresa se conscientize mais deste novo desafio e faça mais de sua parte? “Os empresários estão começando a conhecer a proposta de trabalho e a função do tecnólogo na cadeia produtiva, tornando-o um profissional requisitado em diferentes segmentos da indústria”, diz Nilva Aparecida Ressimetti Pedro, coordenadora do curso do UniAnchieta, conforme dados disponibilizados pela instituição na internet. Na área de gestão – ensinam os orientadores - cabe ao profissional garantir a qualidade do produto e a eficiência dos processos, da matéria-prima ao produto final. O eixo Rio-São Paulo, com seu grande parque fabril, é o que mais contrata. Estados do Sul, como Santa Catarina e Paraná, são potenciais empregadores, bem como os polos petroquímicos das regiões Sudeste e Nordeste. Mas Goiás também já o é. E como está a situação por aqui? Buscado o cenário nacional, percebe-se que algumas escolas oferecem o curso de Processos Químicos com ênfase em uma área específica. Dependendo da faculdade, o currículo pode estar voltado para Química Agroindustrial ou Industrial. No entanto, todos têm as mesmas disciplinas básicas, como cálculo, álgebra linear, estatística e física, e as de formação específica, que são química geral, orgânica, inorgânica e físico-química. Em geral, desde o primeiro semestre, o estudante tem contato com matérias práticas, como processos industriais e segurança e organização de laboratórios. Algumas universidades exigem que o aluno faça um estágio e apresente um trabalho de conclusão de curso.

Temos, portanto, um instigante processo produtivo, mas cercado de desafios variados, que vão das linhas de

financiamento e de estímulo à produção, à qualificação da mão de obra, e ao ímpeto inovativo das empresas. Neste seu 10º volume, que constitui uma edição histórica, Processos Químicos enseja a oportunidade de veiculação destas observações que agora nos ocorrem. No foco central desta preocupação, o processo de crescimento e desenvolvimento industrial pelo qual passa o Estado de Goiás. O segundo é a escassa informação que se disponibiliza para que os segmentos interessados da cadeia produtiva nacional se inteirem do conteúdo das plataformas oficialmente postas à disposição dos investimentos em ciência, qualidade, inovação e tecnologia. Se pouco sabemos, que caminhos vamos encontrar para empreender essa caminhada? Sem essa luz, continuaremos até quando na espera do maná – e exatamente quando está o País a demonstrar que a força motriz ele tem; não tem é o acesso aos recursos de estímulo e de fomento, e mais ainda da multiplicação do perfil qualificativo da mão de obra?

O discurso oficial é animador. Goiás, que agora investe num modelo ousado de dar alta qualificação à mão de obra, com o programa da Bolsa Futuro, está pondo o olho à frente e tentando vislumbrar o cenário avançado em que vai imperar o impulso da tecnologia. O Parque Tecnológico, em processo de gestação, é para se implantar logo em Anápolis, hoje o pólo avançado da indústria tecnologicizada no Estado. Mas é este também um terreno que requer a disponibilização mais farta de informações, para que se produza a interação, este elemento absolutamente essencial em qualquer processo de transformação, como este que agora se intenta.

Esta discussão é atualíssima. Mais que isso, é estratégica. Bom assim perceber esta intenção de Processos Químicos de suscitar opiniões a respeito do que possa ser melhor para o avanço das políticas de CT&I no Estado de Goiás. Esta preciosa publicação do SENAI-GO, sob o comando e a orientação competentes de Hamilton Barbosa Napolitano e Francisco Carlos Costa, tem dado uma contribuição forte para que melhor se divulguem os resultados originais de pesquisas, a difusão de trabalhos de revisão e a propagação de novos métodos ou técnicas de educação tecnológica. Desta forma, como está nos seus propósitos, estimula e promove processos de transferência de tecnologia para as empresas do setor produtivo, gerando ações que comprovam a eficácia

dos princípios da química industrial no processo do crescimento e do desenvolvimento econômico do nosso Estado. É uma publicação vitoriosa, sem dúvida, e disso dá prova a escalada crescente de sua afirmação de qualidade, como podemos ver no cenário da rigorosa qualificação desempenhada pelo CAPES.

Nesta décima edição de Processos Químicos, enfim, temos muito o que comemorar: a revista recebeu qualificação B para área de Engenharia IV pela CAPES, e se firma como um elo de sustentação na poderosa engrenagem do SENAI, que por sua vez continua marcando tentos na formação avançada da mão de obra no Brasil, o que é a referência maior de seus frutíferos 60 anos de existência.

Quanto à generosidade do espaço a nós disponibilizado nesta valiosa e qualificada publicação, pretendemos, com

estas explicações, que tenha sido pelo menos o embrião de um documento de estímulo a que mais conhecimentos se busquem no campo do fomento à pesquisa técnica e inovadora no Brasil, para que mais ganhos possam ter o Estado de Goiás e, sobretudo, o seu setor produtivo.

Ivan G. Teixeira

Vice-Presidente do Conselho de Desenvolvimento e Inovação da Federação das Indústrias do Estado de Goiás (FIEG).

e-mail: ivan@genix.ind.br

SENAI: Resultados e Visão de Futuro

Desde a sua fundação, há 70 anos, o Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial (SENAI) vem cumprindo sua missão de elevar a competitividade da indústria brasileira por meio da educação profissional e tecnológica, da inovação e da transferência de tecnologia. Como resultado, 55 milhões de brasileiros foram capacitados, transformando a entidade numa das maiores redes de educação profissional do mundo. Atuando em todas as áreas industriais, possui uma capacidade de oferecer mais de 2 milhões de matrículas anuais, além de prestar serviços tecnológicos a mais de 80 mil empresas por ano. Por meio da prestação de serviços técnicos e tecnológicos, como consultoria em processo produtivo, serviços laboratoriais, desenvolvimento de produtos e informação tecnológica, o SENAI busca prover soluções de qualidade para gargalos tecnológicos da indústria brasileira.

No campo da inovação, o Programa SENAI de Inovação busca integrar a rede de serviços tecnológicos dos centros da entidade às demandas da indústria. Essa ação conjunta vem permitindo uma nova abordagem da produção e difusão do conhecimento para a competitividade nacional. Dentro do Programa, o SENAI/DN criou instrumentos para operacionalizar ações de inovação, tais como o Edital SENAI Inovação, que desde 2004 atendeu mais de 340 empresas no desenvolvimento de soluções inovadoras, que permitiram a ampliação da capacidade produtiva, aumento de flexibilidade de produção e/ou redução dos custos de produção, redução de impactos ambientais, de segurança ou no consumo de energia e adequação do produto e/ou processo às regulamentações do país ou de mercado externo.

Agora, prepara-se para um novo desafio. De acordo com no Relatório Global de Competitividade 2010, do Fórum Econômico Mundial, o Brasil foi classificado como um país de economia de eficiência, ainda sem alcançar a competitividade direcionada para a inovação. Além disso,

o Instituto de Estudos para o Desenvolvimento Industrial divulgou o grau de dependência tecnológica da indústria brasileira, avaliando que a balança comercial brasileira dos bens típicos da indústria de transformação, apresentou expressivo déficit de US\$ 35,3 bilhões no acumulado dos três trimestres iniciais de 2011, demonstrando uma elevada demanda por serviços tecnológicos de alto valor agregado pelas indústrias brasileiras.

Frente a esses desafios de competitividade, o governo brasileiro lançou o Programa Brasil Maior (PBM), estabelecendo a nova política industrial, tecnológica, de serviços e de comércio exterior – cujo foco é a inovação tecnológica e o adensamento produtivo, visando intensificar a progressão tecnológica da indústria de transformação e impulsionar a qualificação profissional de nível técnico e superior, particularmente das engenharias. Dentro do programa, o Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI), apóia o PBM por meio de três programas federais voltados para a formação profissional e inovação, dois deles com participação expressiva do SENAI: o Programa Nacional de Acesso ao Ensino Técnico e Emprego (PRONATEC), e o Programa Ciência Sem Fronteiras (PCsF).

Em sinergia com o governo e as indústrias, a Confederação Nacional da Indústria (CNI), através da Mobilização Empresarial pela Inovação (MEI) assumiu a inovação como o tema mais importante a ser estimulado na prática empresarial do setor industrial. A agenda de inovação da MEI, levada pela CNI a diversas instâncias políticas, contempla dez tópicos de interesse do setor:

- 1) Atração de centros de P&D;
- 2) Internacionalizar as empresas, para ampliação da presença brasileira no exterior;
- 3) Disseminar a cultura da Propriedade Intelectual;
- 4) Formar recursos humanos, com ênfase em engenharia, ciências duras e ensino técnico;

- 5) Aprimorar o marco legal da inovação;
- 6) Apoiar projetos estruturantes de P&D em grande escala;
- 7) Definir instrumentos de apoio à projetos de P&D pré-competitivos;
- 8) Reduzir os diferenciais de produtividade entre grandes e pequenas empresas;
- 9) Articular inovação e comércio exterior
- 10) Atuar em Programas Setoriais de Inovação (políticas por setores e cadeias)

O financiamento à inovação é apontado como um gargalo estrutural, especialmente no desenvolvimento de P&D pré-competitivo, estágio entre a prova do conceito inovador e a exploração em escala comercial do novo produto, processo ou serviço, envolvendo investimentos representativos em estudos de mercado, construção de protótipos, plantas piloto, engenharia de processo, avaliação de ensaios e teste. Uma forma de contornar este cenário seria focar a atuação no P&D pré-competitivo, a exemplo do Instituto Fraunhofer na Alemanha ou Kaist na Coreia do Sul, para viabilizar a aproximação da infraestrutura científica à realidade da demanda empresarial, nos aspectos de acesso a fomento e redução do tempo de operacionalização.

Perante esse cenário, a CNI, em conjunto com o SENAI Departamento Nacional, vem estruturando duas grandes ações de ampliação do papel do SENAI como agente do avanço da competitividade da indústria brasileira, reforçando a sua atuação estratégica em apoio aos programas e políticas estruturantes de interesse da indústria.

A primeira ação é desenvolver um projeto piloto com vistas à constituição da Empresa Brasileira de Pesquisa e Inovação Industrial (EMBRAPII), por meio do fomento a projetos de cooperação envolvendo empresas nacionais, Instituições Tecnológicas ou Instituições de direito privado sem fins lucrativos, voltadas para atividades de pesquisa e desenvolvimento, que objetivem a geração de produtos e processos inovadores. A segunda ação é o Programa SENAI de Apoio à Competitividade da Indústria Brasileira, que prevê a formação de mão-de-obra para indústria e o aumento significativo da oferta de serviços técnicos e tecnológicos especializados em áreas estratégicas do conhecimento. Para elevar o patamar de atuação destes centros, serão implantados Institutos de Tecnologia com laboratórios de alto desempenho e Institutos de Inovação serão instalados, que desenvolverão pesquisa aplicada no estágio pré-competitivo.

Com essas ações, o SENAI estará cumprindo sua missão junto às empresas, ampliando a oferta de educação profissional e tecnológica de alta qualidade, serviços de alto desempenho e criando um ambiente favorável para o estabelecimento de uma economia baseada no conhecimento, tornando assim a indústria brasileira mais competitiva.

Gustavo L. S. Filho

Diretor de Operações do SENAI/DN.

e-mail: gfilho@dn.senai.br

Contribuição da FATEC Senai Roberto Mange para o Desenvolvimento Tecnológico

No início da década de quarenta (1940), como consequência da Grande Guerra Mundial, a importação de máquinas, equipamentos, e sobretudo a mão-de-obra, sofreu sérias restrições. A indústria brasileira era incipiente. O mundo e o Brasil teriam que se refazer. Foi neste contexto que nasceu o Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial (SENAI). Motivados pela necessidade de formar profissionais para os seus empreendimentos e sonhando com a estruturação de um parque industrial nacional promissor, empresários paulistas e cariocas da Confederação Nacional da Indústria criaram em 1942 o SENAI - Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial que, mantido e administrado por eles mesmos, cuidaria da formação profissional para atender suas necessidades.

Inicialmente as atividades da recém criada instituição destinavam-se à formação de quadros básicos para o processo produtivo. E era tão grande a necessidade de profissionais para o chão de fábrica que a imagem da entidade permaneceu durante décadas como instituição de formação profissional para o processo produtivo operacional: formação de jovens entre 14 e 18 anos (aprendizes) e capacitação de adultos para operar máquinas. Este era o perfil profissional exigido pela indústria brasileira da época. A história do SENAI em Goiás inicia-se em 1952 com a inauguração da primeira escola, na cidade de Anápolis, construída e administrada sob jurisdição do SENAI de S. Paulo, apenas dez anos após sua criação. A Escola SENAI de Anápolis surgiu e transformou-se no pólo de formação de profissionais para todo o Estado. Só em 1966 é que foi construída a segunda escola, agora na capital do Estado, já sob jurisdição da Federação das Indústrias do Estado de Goiás. Como no restante do Brasil, era necessário

criar em Goiás a cultura industrial e os princípios de organização, disciplina e exatidão. Este era o foco da formação profissional da época.

Dezenas de alunos formados na Escola SENAI de Anápolis, incentivados pelos seus instrutores e aproveitando as oportunidades da região, empreenderam seu próprio negócio em diversas regiões do Estado e fora dele. Só a história para contar! Mas voltemos à Escola SENAI de Anápolis, denominada Centro de Formação Profissional Roberto Mange, em homenagem ao extraordinário engenheiro e professor Roberto Mange, Diretor Regional do SENAI de S. Paulo, idealizador e estruturador da instituição SENAI. No final da década de 70 com a instalação da Base Aérea e com a criação do Distrito Agro Industrial de Anápolis (DAIA), grandes indústrias de outros estados começaram a chegar exigindo novos profissionais com formação mais sólida. O SENAI, sem abandonar a formação de aprendizes e a qualificação de adultos, intensificou a formação dos profissionais já qualificados anteriormente, proporcionando-lhes programas e cursos de aperfeiçoamento profissional, desde o nível técnico ao nível de supervisão e gestão, conforme demanda das indústrias. As áreas até então atendidas – construção civil, metal-mecânica e mobiliário – foram ampliadas para a elétrica, manutenção mecânica e mecânica veicular.

Nas décadas de 80 e 90 as indústrias passaram a demandar a formação de técnicos. De pronto o SENAI adequou suas dependências, oficinas e laboratórios de acordo com padrão da produção industrial e implantou os cursos técnicos em Segurança no Trabalho, Mecânica industrial, Eletrotécnica, Eletrônica e Química Industrial. Para áreas em que não havia viabilidade de criação de cursos técnicos em Goiás as empresas passaram a ser

atendidas mediante a concessão de bolsas de estudo (com duração de três anos) para alguns de seus funcionários em outras Escolas do SENAI pelo país afora, nas áreas: têxtil, vestuário, moda, gráfica, edificações, plástico, alimentos, curtume etc.

Na década de 90 a instituição adequou o conceito de servir a indústria traduzindo para uma linguagem mais compreensível e direta sua missão: *“Promover a educação profissional e tecnológica, a inovação e a transferência de tecnologias industriais, contribuindo para elevar a competitividade da indústria brasileira”*. Assim, por exigência da Missão e das empresas mantenedoras, também o Centro de Formação Profissional Roberto Mange, em Anápolis, se preparou para estender sua atuação na vertente tecnológica, melhorando sua estrutura de gestão, o processo de recrutamento de seus docentes e modernização das oficinas e laboratórios. No início deste século, foi a vez de rever e reorganizar seus procedimentos de gestão e suas práticas educativas de acordo com as normas internacionais do Sistema de Gestão de Qualidade e comemorou o seu cinquentenário (09/03/2002) obtendo a Certificação NRB ISO 9000:2000.

Em 2004, a Unidade é elevada à categoria de Faculdade de Tecnologia implantando o curso de Graduação Tecnológica em Química-Fármaco Industrial, posteriormente com a denominação de Tecnologia em Processos Químicos para atender a nomenclatura do Ministério da Educação. Como Faculdade foram recrutados profissionais com graduação acadêmica – mestres e doutores – e com conhecimento do processo produtivo, adquirido nas próprias empresas industriais.

Com um quadro de mestres, doutores e especialistas, expandiu sua ação também aos cursos de Pós-Graduação e à prestação de Serviços Técnicos e Tecnológicos em áreas de sua competência.

Se a indústria local, regional e nacional se moderniza para ser competitiva, a instituição SENAI que ela criou e mantém não poderia deixar de incorporar os avanços tecnológicos que invadem todos os setores da vida. É o que as empresas sempre cobraram do SENAI. Desta forma, sem abandonar os cursos básicos e técnicos que o mercado continua necessitando, a FATEC/RM vem preparando, também, profissionais para o campo da gestão, da tecnologia e da inovação, seja ministrando cursos, seja prestando Serviços Técnicos e Tecnológicos, Assessoria e Consultoria. Todas estas atividades são inerentes à Missão do SENAI. Poucas instituições de ensino terão contribuído tão significativamente para o desenvolvimento tecnológico, em Anápolis e no Brasil, e não poderia ser diferente, pois foi criada para servir a indústria. Os empresários anapolinos e brasileiros estão de parabéns pela criação e manutenção de sua Escola/Faculdade.

João F. S. Mendes

Diretor da Faculdade de Tecnologia SENAI de Desenvolvimento Gerencial.

e-mail: jfranciscomendes.senai@sistemafieg.org.br

Porque Investir em Tecnologia no Setor Farmoquímico?

O atual panorama de desenvolvimento econômico aponta mais uma vez para o fortalecimento industrial, em especial nos seguimentos que tangem a produtos derivados da Química Fina e Farmoquímico (Tabela 1). Neste contexto o Brasil tem se consolidado como um membro ativo no cenário econômico mundial. Além do mercado consumidor, apresenta importante atividade nas exportações, garantindo um saldo positivo de 13 bilhões de dólares em nossa balança comercial para o período de janeiro a junho de 2011.

Tabela 1. Participação da Indústria Química nas exportações Brasileiras em 2011.

Principais Produtos Exportados Janeiro-Junho – 2011 US\$ Milhões			
	Valor	Δ % 2011/10	Part. %
1 – Minérios	19.423	87,0	16,4
2 – Petróleo e combustíveis	14.861	32,1	12,6
3 – Complexo soja	12.717	33,0	10,7
4 – Material de transporte	11.827	24,2	10,0
5 – Produtos metalúrgicos	8.868	48,5	7,5
6 – Químicos	7.563	18,8	6,4
7 – Carnes	7.454	18,3	6,3
8 – Açúcar e etanol	5.797	11,5	4,9
9 – Máqs. e equipamentos	4.758	30,7	4,0
10 – Café	3.942	54,2	3,3
11 – Papel e celulose	3.560	7,1	3,0
12 – Equipamentos elétricos	2.187	-3,4	1,8
13 – Calçados e couro	1.870	6,5	1,6
14 – Metais e Pedras Preciosos	1.348	37,1	1,1
15 – Fumo e Sucedâneos	1.162	-0,7	1,0

Apesar desses resultados serem dignos de comemoração, os dados da Tabela 2 mostram que ainda houve uma intensa participação da Indústria Farmacêutica Nacional nas importações realizadas durante o ano de 2011. A contribuição nesses números se deve, em grande parte, à importação dos Ingredientes Farmacêuticamente Ativos (IFA's) necessários à produção nacional dos medicamentos. A análise desta situação nos leva a concluir que o crescimento do setor Farmoquímico e o consequente aumento na produção nacional dos IFA's, além de reduzir

a contribuição do setor Farmacêutico para as importações, têm o potencial de promover um significativo incremento em nossas exportações de produtos químicos, em especial aqueles com maior valor agregado, fato que contribuiria ainda mais para um superávit em nossa balança comercial.

Tabela 2. Participação dos Produtos Químicos e Farmacêuticos nas importações do Brasil em 2011.

Principais Produtos Importados Janeiro-Junho – 2011 US\$ Milhões			
	Valor	Δ % 2011/10	Part. %
1 – Combustíveis e Lubrificantes	19.183	36,4	19,2
2 – Equip. Mecânicos	15.984	29,7	15,2
3 – Equip. Eletrônicos e Eletrônicos	12.592	25,7	12,0
4 – Automóveis e partes	10.063	31,9	9,6
5 – Química Orgân. e Inorgânicos	5.565	23,3	5,3
6 – Plásticos e Obras	3.851	29,0	3,7
7 – Fertilizantes	3.640	102,2	3,5
8 – Ferro, Aço e Obras	3.463	0,3	3,3
9 – Farmacêuticos	3.083	-3,8	2,9
10 – Instr. Ótica e Precisão	3.023	2,6	2,9
11 – Borracha e obras	2.446	38,3	2,3
12 – Cereais e produtos de moagem	1.535	11,0	1,5
13 – Cobre e suas obras	1.497	32,7	1,4
14 – Aeronaves e Peças	1.186	21,1	1,1
15 – Filamen. e Fibras, Sintét. e Artif.	1.153	28,1	1,1

Em face da atual política nacional, é possível observar algumas ações do Governo Brasileiro para que haja um fortalecimento industrial, em especial nos seguimentos de química fina e farmoquímica. Este fato pode ser claramente observado à luz de três ações governamentais recentes:

- i. Chamadas públicas do FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos) para subvenções econômica de projetos privados relacionado à descoberta de novos IFA's e desenvolvimento de processos industriais de IFA's estratégicos ;
- ii. Licença Compulsória do Medicamento Efavirenz;
- iii. Parceiras Público-Privadas (PPP) para produção nacional de IFA's e medicamentos estratégicos.

Em 2006 a FINEP, vinculada ao Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT), publicou a primeira chamada pública com o intuito de capacitar as empresas nacionais na descoberta de novas drogas e no desenvolvimento de processos industriais de preparação das mesmas, em especial drogas utilizadas no tratamento de HIV e HCV (Hepatite C Viral). A título de curiosidade, vale ressaltar que a FINEP concedeu, nesta modalidade de financiamento, valores que giraram em torno de um terço do valor total investido no projeto submetido pela empresa contemplada.

Em maio de 2007, a Presidência da República, através do decreto 6.108, decretou a licença compulsória para comercialização do medicamento Efavirenz, cuja patente pertence à Merck Sharp & Dome. Por meio dessa medida ficou permitido, do ponto de vista legal, a produção local não somente da forma farmacêutica, mas também do ingrediente farmacêuticamente ativo (IFA). A partir desse precedente, houve uma corrida de empresas nacionais para se capacitarem na síntese deste IFA, uma vez que não se consumou o contrato entre o Ministério da Saúde (MS) e a empresa detentora da patente, mesmo após a declaração de “interesse público” do MS no Efavirenz por meio da portaria 886 de 24 de abril de 2007. Em negociações anteriores, os medicamentos Nelfinavir (da Roche) e a combinação de Lopinavir e Ritonavir (ARV Kaletra da Abbott) também tiveram seu “interesse público” decretados com objetivo da manutenção do Programa DST/AIDS do MS.

A declaração de “interesse público” e licenças compulsórias sobre medicamentos são temas de natureza controversa. Tal ação, quando analisada de forma isolada, leva a um desconforto uma vez que esta limita o direito de uma empresa de usufruir dos lucros oriundos desta tecnologia a ela garantido pela concessão de uma carta patente. Tal fato se torna ainda mais questionável quando são apresentadas as somas investidas pela empresa neste desenvolvimento. Todavia, além de trazer consigo a manutenção de políticas de saúde pública estratégicas ao Brasil, a declaração da licença compulsória aqui ocorrida impulsionou as empresas nacionais envolvidas na produção do Efavirenz a investirem na preparação de suas plantas produtivas e na capacitação de suas equipes de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (PD&I), Produção e Qualidade para que todos os requisitos de

qualidade exigidos por nossa legislação viessem a ser atendidos em suas produções.

Em dezembro de 2008, o Ministério da Saúde resolveu, por meio da portaria 3.031:

“Art. 1º Estabelecer que os Laboratórios Oficiais de produção de medicamentos, em suas licitações, devam dar preferência à aquisição dos ingredientes farmacêuticos ativos necessários à sua linha de produção de empresas que produzam essas matérias-primas no País.

Art. 2º Quando houver mais de um fornecedor que atenda às condições estabelecidas pelo artigo 1º desta Portaria, os laboratórios oficiais de produção de medicamentos deverão levar em conta, no processo licitatório, o grau de verticalização da produção no País, apresentado pelos fornecedores”.

Como resultado desta portaria, iniciou-se o estabelecimento das Parcerias Público-Privadas (PPP) que objetivam a produção nacional, tanto do IFA quanto da forma farmacêutica para medicamentos. Entre 2009 e 2011 foram estabelecidas 28 PPP para produção de 29 medicamentos estratégicos destinados ao tratamento de doenças como AIDS, tuberculose, asma e colesterol alto. Os IFA’s motivadores destas PPP têm sido cuidadosamente selecionados dentre os 80 medicamentos estratégicos encontrados na portaria nº 1.284, de 26 de maio de 2010, do Ministério da Saúde, atualização da portaria nº 978, de 16 de maio de 2008 do mesmo ministério.

Todas estas ações deixam claras as intenções do Governo Brasileiro sobre o fortalecimento do setor Farmoquímico e são, certamente, um incentivo para que empresas nacionais iniciem ou fortaleçam os investimentos neste segmento de nossa Indústria Química.

Na medida em que tal cenário foi se estabelecendo, os órgãos regulatórios também aperfeiçoaram a legislação que trata de insumos para o setor farmacêutico bem como a legislação sobre os medicamentos propriamente ditos. Em 13 de setembro de 2005, o MS publicou a (Resolução de Diretoria Colegiada) RDC 248, legislação específica para a concessão do certificado de Boas Práticas de Fabricação (BPF) para empresas envolvidas na produção e fracionamento para revenda de insumos farmacêuticos, incluindo os IFA’s.

Em 18 de novembro de 2009 o MS publicou a RDC

57/2009 e a IN 15/2009 que regulamentam o registro de 20 IFA's estratégicos para as políticas nacionais de medicamentos deste ministério:

1. Ciclosporina
2. Clozapina
3. Cloridrato de clindamicina
4. Ciclofosfamida
5. Ciprofloxacino
6. Metotrexato
7. Carbamazepina
8. Carbonato de lítio
9. Fenitoína
10. Fenitoína sódica
11. Lamivudina
12. Penicilamina
13. Tiabendazol
14. Efavirenz
15. Nevirapina
16. Rifampicina
17. Ritonavir
18. Zidovudina
19. Aciclovir
20. Ampicilina

Nesta regulamentação, se faz necessária apresentação de informações gerais sobre a substância para qual se requisita o registro (Nomenclatura: Denominação Comum Brasileira, ou na sua falta, Denominação Comum Internacional, número CAS, nome químico, sinonímia com referência completa, fórmula molecular e estrutural, peso molecular, forma física e outras propriedades físico químicas como pH, solubilidade, ponto de fusão e ponto de ebulição, tamanho da partícula, estruturas cristalina, amorfa e solvatos) assim como informações sobre o processo de fabricação e controle de qualidade do IFA (matérias primas, solventes, catalisadores, especificações

das matérias-primas e materiais de embalagem, escala de produção, rendimento, equipamentos, condições de operação, controles em processo, etapas críticas incluindo respectivos testes e critérios de aceitação, fluxograma do processo produtivo com indicação da formação de intermediários e de possíveis impurezas).

Duas questões importantes que são levantadas na legislação sobre BPF e registro de insumos dizem respeito ao perfil de impureza e à caracterização do estado sólido dos IFA's. O perfil de impurezas deve ser cuidadosamente investigado por meio do controle de qualidade dos materiais de partida empregados no processo de síntese do IFA, estudos de degradação forçada e estudos de estabilidade do IFA. Todas estas informações são fundamentais para que se desenvolva uma metodologia de análise que seja indicadora de qualidade deste produto.

Desde 1996 o estado sólido dos IFA's tem recebido uma especial atenção das empresas e dos órgãos regulatório. Nesta ocasião, o surgimento de uma nova forma cristalina menos solúvel do antiretroviral Ritonavir promoveu o recall do medicamento Norvir® da Abbot. Esta forma cristalina, 50% menos solúvel em etanol que a originalmente utilizada na fabricação das capsulas gelatinosas do Norvir®, levou à precipitação do IFA no interior das capsulas e redução da eficiência deste medicamento. Estas novas formas cristalinas, denominadas polimorfos, devem ser, de acordo com a legislação brasileira, investigadas e sua formação deve ser controlada durante o processo de produção e armazenamento dos IFA's, uma vez que polimorfos tem o potencial de apresentar diferenças significativas em propriedades físico-químicas importantes para a eficiência de um medicamento.

Sob esse prisma, a constante busca por processos industriais eficientes para produção dos IFA's que atendam a legislação brasileira e mundial, bem como as exigências de qualidade do mercado tem impulsionado as empresas a investir na consolidação de seus setores voltados à PD&I por meio da atualização tecnológica dos laboratórios onde essas equipes executam tais funções, bem como pela contratação de profissionais com alto grau de especialização em domínios estratégicos. Diferentemente do pensamento de muitos, um processo industrial utilizado na síntese de alguma substância

orgânica, por exemplo, não é a simples realização de reações químicas dentro de recipientes com volumes que comportem quantidades maiores dos insumos originalmente empregados no desenvolvimento em escala laboratorial desta substância. A transposição de escala compreende uma sucessão de eventos passíveis de acontecer e muitos deles são de difícil visualização em escala de laboratório, tais como demandas de troca de calor, gradientes de temperatura (hot spots), falta de homogeneidade como característica de agitação ineficiente. Tais eventos são indesejáveis e causam, durante o processo de produção de um IFA, a formação de impurezas químicas e físicas (polimorfos), geração de resíduos (efluentes) com elevada toxicidade, ausência de homogeneidade entre lotes e descontrole térmico.

Frente a todos estes desafios, cabe uma pergunta: Nossas instituições de ensino têm capacitado profissionais para atender as demandas deste setor? O Programa REUNI ampliou o número de cursos de graduação em química, química tecnológica e engenharia química nas Instituições de Ensino Superior (IES's), fato que trará em breve um expressivo aumento no número de profissionais necessários ao desenvolvimento do Setor Farmoquímico Nacional. Os últimos anos têm registrado um crescente número de profissionais da Química egressando de programas de pós-graduação com o título de mestre ou doutor em áreas como Química Analítica, Química Orgânica e Química Tecnológica, todas estas fundamentais em um grupo de PD&I de uma empresa Farmoquímica. A Escola Superior em Síntese Orgânica, iniciativa da Sociedade Brasileira de Química, cuja quarta edição foi realizada este ano no campus da Universidade de São Paulo da cidade de São Carlos, tem sido um ambiente frutífero para a interação entre professores das IES, alunos de pós-graduação e profissionais da Indústria Química. Assuntos como empreendedorismo, aspectos modernos de síntese orgânica, novas tecnologias para

execução de reações químicas e desafios relacionados ao cotidiano de um setor de PD&I de uma empresa são compartilhados e servem de estímulo para as novas gerações de profissionais da Química vislumbrarem meios de interagir ou ingressar neste setor produtivo.

Com base nas informações discutidas, fica difícil ignorar o fato de que o Brasil encontra-se em um momento privilegiado para o setor Farmoquímico. Ações governamentais têm impulsionado iniciativas do setor privado a investir na consolidação e crescimento dos setores de PD&I de empresas Farmoquímicas. Este fato, além de fortalecer as políticas públicas do Ministério da Saúde, ajuda a reduzir a contribuição do setor Farmacêutico nas importações, situação que viabiliza outros investimentos governamentais nestas ações de incentivo. O crescente número de profissionais da Química com qualificação para atuar nestes grupos de PD&I dão suporte a este crescimento e contribuem para que os processos industriais ali desenvolvidos atendam, além da competitividade no custo, os requisitos de qualidade, segurança e sustentabilidade que nossa legislação exige.

Angelo H. L. Machado¹ & Wender A. Silva^{2*}

¹Grupo de Tecnologia em Síntese Orgânica do Laboratório de Isolamento e Transformação de Moléculas Orgânicas, Instituto de Química, Universidade de Brasília, CP 4478, Brasília.

²Laboratório de Planejamento e Síntese de Compostos Ativos, Instituto de Química, Universidade de Brasília, CP 4478, Brasília.

*e-mails: wender@unb.br

Instruções para envio de artigos para a Revista **Processos Químicos**

Prezado(a) autor(a),

Para que seu artigo possa entrar em nosso processo de avaliação para possível publicação na revista *Processos Químicos*, o mesmo deverá satisfazer as seguintes condições:

- ▶ Utilizar somente o editor Microsoft Word, numerando todas as páginas;
- ▶ Conter no máximo 40 laudas, incluindo Figuras, Tabelas, Esquemas etc;
- ▶ Conter Resumo e Abstract, ambos com até 100 palavras;
- ▶ Conter Palavras-chave e Keywords, ambos com até 3 palavras;
- ▶ Título com no máximo 20 palavras;
- ▶ Titulação do autor (créditos). Dados pessoais do autor: endereço, telefone, e-mail;

- ▶ As figuras, tabelas, esquemas etc devem ser colocadas após as referências e devidamente identificadas. Se escaneadas, devem ser em alta resolução (800 dpi/bitmap para traços) com extensão TIF ou JPEG. As fotos ou desenhos com cor (300 dpi/grayscale) devem ser enviadas com extensão tif/jpg, para não termos problemas ao aplicá-las no padrão da Revista. Outras extensões possíveis: CDR, EPS ou CDX. No caso particular de esquemas contendo estruturas químicas, estas deverão ter sempre a mesma dimensão, para que possam ser reduzidas uniformemente. Considerar que as figuras deverão ter largura máxima de uma coluna (8,5 cm) ou, excepcionalmente, de 2 colunas (17,5 cm).

► As figuras (gráficos, esquemas, etc.) deverão ter qualidade gráfica adequada (usar somente fundo branco).

► A primeira página deverá conter o título do trabalho, nome e endereço dos autores (para a revista, a menor unidade é o departamento). Havendo autores com diferentes endereços estes deverão se seguir imediatamente ao nome de cada autor. Os autores devem ser agrupados por endereço. Indicar com asterisco(*) o autor para correspondência, colocando seu e-mail no rodapé desta página (um só e-mail). A segunda página deverá conter o título, o resumo e o abstract do trabalho;

► As referências bibliográficas deverão ser numeradas e todas citadas no final do artigo. Será utilizada a abreviatura da revista como definida no *Chemical Abstracts Service Source Index* (ver <http://www.cas.org/sent.html>). Caso a abreviatura autorizada de uma determinada revista não puder ser localizada e não for óbvio como o título deve ser abreviado, deve-se citar o título completo. Exemplos de citações:

1. Varma, R. S.; Singh, A. P.; *J. Indian Chem. Soc.* **1990**, *67*, 518.
2. Provstyanoi, M. V.; Logachev, E. V.; Kochergin, P. M.; Beilis, Y. I.; *Izv. Vyssh. Uchebn. Zadev.; Khim. Khim. Tekhnol.* **1976**, *19*, 708.
3. Lemos, T. L. G.; Andrade, C. H. S.; Guimarães, A. M.; Wolter-Filho, W.; Braz-Filho, R.; *J. Braz. Chem. Soc.* **1996**, *7*, 123;
4. Ângelo, A. C. D.; de Souza, A.; Morgon, N. H.; Sambrano, J. R.; *Quim. Nova* **2001**, *24*, 473.
5. Regitz, M. Em *Multiple Bonds and Low Coordination in Phosphorus Chemistry*; Regitz, M.; Scherer, O. J., eds.; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 1990, cap. 2.
6. Cotton, F.A.; Wilkinson, G.; *Advanced Inorganic Chemistry*, 5th ed., Wiley: New York, 1988.

► Espaço duplo entre linhas;

► Fonte: *Times New Roman* 12;

► Enviar uma cópia do artigo, acompanhada de carta de encaminhamento à Editoria da Revista Processos Químicos, para o seguinte endereço eletrônico: revistapq.senai@sistemafieg.org.br;



Faculdade de Tecnologia Senai Ítalo Bologna

R. Armogaste J. Silveira, n° 612, Setor Centro-Oeste
CEP 74560-020 - Goiânia-GO
Fone: (62) 3226-4500 - Fax: (62) 3226-4504
e-mail: fatecib.senai@sistemafieg.org.br

Núcleo de Confeção de Trindade

Rua 7, esquina com Rua 8, Quadra 10, n° 939
Setor Guarujá Parque
CEP 75380-000 - Trindade-GO
Fone: (62) 3505-1293

Núcleo de Confeção de Jaraguá

Av. Cristóvão Colombo de Freitas, Quadra 4
Lotes 1 e 2, Setor Aeroporto
CEP 76330-000 - Jaraguá-GO
Fone/Fax: (62) 3326-3737

Faculdade de Tecnologia Senai Roberto Mange

Rua Engenheiro Roberto Mange, n° 239
Bairro Jundiá - CEP 75113-630 - Anápolis-GO
Fone: (62) 3902-6200 - Fax: (62) 3902-6226
e-mail: fatecrm.senai@sistemafieg.org.br

Núcleo de Educação Profissional Senai Luziânia

Rua Bahia, s/n, Parque Viegas - Luziânia-GO
CEP 72800-000 - Fone: (61) 3622-1103

Núcleo Sesi/Senai Formosa

Rua Antonio Dutra, Qd. 94, s/n - Centro - Formosa-GO
CEP 73801-200 - Fone: (61) 3981-1075

Centro de Formação Profissional Bairro Filostro Machado

Rua Antonio de Souza Ramos, s/n - Anápolis-GO
CEP 75000-000 - Fone: (62) 3902-6200 - Fax: (62) 3902-6226

Faculdade de Tecnologia Senai de Desenvolvimento Gerencial

Rua 227-A, n° 95, Setor Leste Universitário
CEP 74610-060 - Goiânia-GO
Fone: (62) 3269-1200 - Fax: (62) 3269-1233
e-mail: fatesg.senai@sistemafieg.org.br

Escola Senai Itumbiara

Rua Olívia Garcia Fagundes, n° 32
Bairro Paranaíba - CEP 75503-970 - Itumbiara-GO
Fone/Fax: (64) 3404-2002

Escola Senai Vila Canaã e Unidades Móveis

Rua Prof. Lázaro Costa, n° 348, Vila Canaã
CEP 74415-420 - Goiânia-GO
Fone/Fax: (62) 3235-8100
e-mail: canaa.senai@sistemafieg.org.br

Escola Senai Catalão

Av. Dr. Lamartine P. Avelar, n° 1.400
Setor Universitário - CEP 75704-020 - Catalão-GO
Fone/Fax: (64) 3411-1065
e-mail: catalao.senai@sistemafieg.org.br



Unidade Integrada Sesi Senai Rio Verde

Av. Guanabara, n° 217, Setor Pausanes
CEP 75902-740 - Rio Verde-GO
Fone/Fax: (64) 3612-1110
e-mail: senaifb@sistemafieg.org.br

Unidade Integrada Sesi Senai Aparecida de Goiânia (Centro de Atividades Prof. Venerando de Freitas Borges)

Rua dos Pirineus, Quadra 1, Lote 1
Residencial Village Garavelo
CEP 74912-260 - Aparecida de Goiânia-GO
Fone/Fax: (62) 3283-1300
e-mail: aparecida.sesi@sistemafieg.org.br

Unidade Integrada Sesi Senai Niquelândia

Av. Brasil, Quadras 26 e 27,
Conjunto Habitacional Codemin, Jardim Atlântico, 1ª etapa
CEP 76420-000 - Niquelândia-GO
Fone/Fax: (62) 3354-1802 / (62) 3354-1750
e-mail: misclay.senai@sistemafieg.org.br

Núcleo Integrado Sesi Senai Barro Alto

Rua Américo Borges, Centro - CEP 76390-000
Barro Alto-GO - Fone: (62) 3347-6150
Fax: (62) 3354-1750

Unidade Integrada Sesi Senai Sama

Mina Cana Brava, Caixa Postal 04 - Minaçu-GO
CEP 76450-000 - Fone: (62) 3379-1039
Fax: (62) 3379-7012
e-mail: sama.senai@sistemafieg.org.br

edital **senai sesi** de inovação

Se a inovação está no DNA
da sua empresa, nós ajudamos
suas idéias a nascer.



Informações e inscrições:
www.editaldeinovacao.com.br



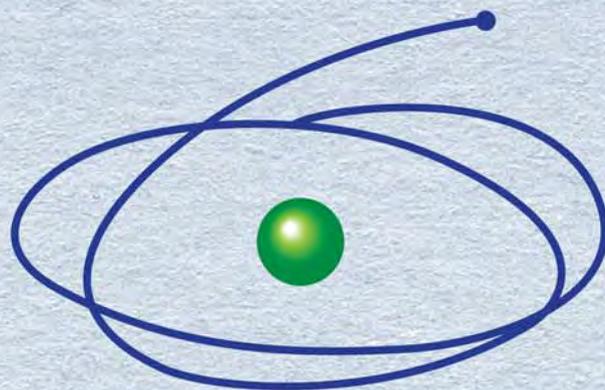
Ministério da
Ciência e Tecnologia

GOVERNO FEDERAL
BRASIL
PAÍS RICO E PAÍS SEM POBREZA



SESI SENAI

Em edição especial de aniversário,
a RPQ merece os parabéns.



10^a
Edição

C A P E S
Q U A L I S

Qualidade reconhecida ao longo dos anos.

