

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**GRAZIELI SIMÕES**

MODIFICAÇÃO ESTRUTURAL DE BIOMOLÉCULAS SULFURADAS  
UTILIZANDO FEIXES DE ELÉTRONS E CARACTERIZAÇÃO  
ESPECTROSCÓPICA NA REGIÃO DE RAIOS X

RIO DE JANEIRO

2013

GRAZIELI SIMÕES

MODIFICAÇÃO ESTRUTURAL DE BIOMOLÉCULAS SULFURADAS  
UTILIZANDO FEIXES DE ELÉTRONS E CARACTERIZAÇÃO  
ESPECTROSCÓPICA NA REGIÃO DE RAIOS X

Tese de Doutorado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Química,  
Instituto de Química, Universidade Federal  
do Rio de Janeiro, como requisito parcial à  
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Gerardo Gerson Bezerra de Souza

Rio de Janeiro

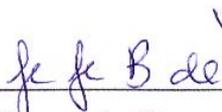
2013

GRAZIELI SIMÕES

MODIFICAÇÃO ESTRUTURAL DE BIOMOLÉCULAS SULFURADAS  
UTILIZANDO FEIXES DE ELÉTRONS E CARACTERIZAÇÃO  
ESPECTROSCÓPICA NA REGIÃO DE RAIOS X

Tese de Doutorado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Química,  
Instituto de Química, Universidade Federal  
do Rio de Janeiro, como requisito parcial à  
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovada em 03 de dezembro de 2013



---

Prof. Dr. Gerardo Gerson Bezerra de Souza / IQ – UFRJ  
(Presidente - Orientador)



---

Prof. Dr. Cássia Curan Turci / IQ – UFRJ



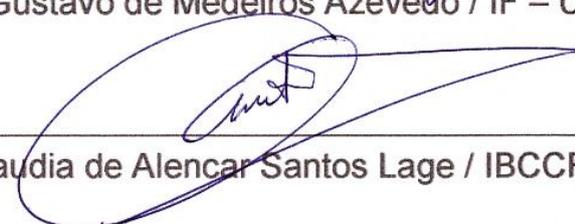
---

Prof Dr. Roberto de Barros Faria / IQ – UFRJ



---

Prof. Dr. Gustavo de Medeiros Azevedo / IF – UFRGS



---

Prof. Dr. Claudia de Alencar Santos Lage / IBCCF - UFRJ



---

Prof. Dr. Ênio Frota da Silveira / DF – PUC/RJ

S614

*Simões, Grazieli.*

*Modificação estrutural de biomoléculas sulfuradas utilizando feixes de elétrons e caracterização espectroscópica na região de raios X. / Grazieli Simões – Rio de Janeiro: UFRJ, 2013.*

138 f.

*Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro,*

*Instituto de Química, 2013.*

*.Orientador: Prof. Dr. Gerardo Gerson Bezerra de Souza.*

1. Biomoléculas. 2. Irradiação. 3. Fotoabsorção. 4. Fragmentação iônica. 5. NEXAFS. 6. XPS. 7. DMDS. 8. Luz síncroton. I. Souza, Gerardo Gerson Bezerra de. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Programa de Pós Graduação em Química. III. Título.

CDD 541.3

*Dedico esta tese*  
*À minha mãe Glória:*  
*A minha melhor amiga,*  
*O meu pilar de sustentação.*

## AGRADECIMENTOS

---

Primeiramente à Deus, pela sua constante presença em minha vida;

ao meu orientador Gerson, pela orientação, apoio, incentivo e paciência durante esses 5 anos em que trabalhamos juntos;

ao Catalin Miron, meu orientador na França, por todo o apoio e por me receber tão bem durante o período do doutorado sanduíche;

ao Fred, não só pelo apoio técnico mas também pelas nossas conversas e pelo incentivo ao meu trabalho;

ao Rafael, pela amizade, paciência e pela ajuda e participação nas análises e tratamento dos dados;

ao Flávio, pelo suporte experimental tanto no LIFE quanto no LNLS e no SOLEIL;

à Rycharda, que além de companheira de laboratório e conterrânea, tornou-se uma amiga e parceira nos melhores e nos piores momentos também;

ao Lautaro, pelos cafés compartilhados e pelas discussões científicas interessantes;

à Minna Patanen, pela amizade tipicamente finlandesa enquanto estive na França;

aos ex-companheiros do LIFE: Cláudia, Luiza, Ana Carolina, Rômulo, Lúcia, Gabriel, aos atuais: Joselaine, Érika e Luiz e aos demais que passaram pelo laboratório ao longo desses 5 anos;

ao LNLS, pelo apoio financeiro e suporte técnico, especialmente ao Flávio Vicentim e Paulo de Tarso;

ao SOLEIL, pelo apoio financeiro e técnico, especialmente ao Emmanuel Robert, Christophe Nicolas, Aleksandar Milosavljević, Alexandre Giuliani e Xiaojing-Liu;

à Luciana e Tatiane pela amizade há mais de 20 anos;

aos meus amigos Fernando, Suyane, Aline, Livia, Rodriguinho, Thiago, Ju, Malu, Ingrid e Luiza pelos momentos inesquecíveis que vivi na universidade e fora dela também;

à minha mãe, pelo seu apoio incondicional e por acreditar em mim sempre;

aos meus irmãos Mirreli e Jaime, por serem além de irmãos, meus melhores amigos;

aos meus sogros Paul e Brigitte, pelo incentivo nesses 5 anos;

ao Antoine, que desde 2008 enche a minha vida de alegria e felicidade;

à CAPES, pelos 4 anos de bolsa e pela bolsa de doutorado sanduíche;

aos membros da banca, por contribuírem para este trabalho.

## RESUMO

---

Simões, Grazieli. MODIFICAÇÃO ESTRUTURAL DE BIOMOLÉCULAS SULFURADAS UTILIZANDO FEIXES DE ELÉTRONS E CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA NA REGIÃO DE RAIOS X. Rio de Janeiro, 2013. Tese (Doutorado em Química) Instituto de Química - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

As moléculas de cisteína (Cys), cistina (CysCys) e insulina foram irradiadas utilizando feixes de elétrons e luz síncrotron como fontes ionizantes. O desenvolvimento de uma metodologia para irradiar essas amostras biológicas foi iniciado através da irradiação do polímero de poli cloreto de vinila (PVC) e análise do gás emitido durante o processo, neste caso, o ácido clorídrico (HCl). Da mesma forma, foram feitas análises em amostras de polímeros híbridos de polimetilmetacrilato (PMMA) e magnetita (PMMA-gama-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), visando a avaliação da estabilidade do polímero híbrido com diferentes concentrações de magnetita em sua constituição (0,1; 0,5 e 2,5%). As modificações estruturais causadas pelo dano induzido tanto nos polímeros quanto nas biomoléculas sulfuradas foram caracterizadas por meio da análise de emissão de gases utilizando-se um analisador de gás residual (RGA). Para as biomoléculas, além das análises de gases residuais, foram realizados também estudos espectroscópicos na região dos raios X, utilizando-se técnicas de fotoabsorção (na borda 1s do enxofre, nitrogênio e oxigênio) e fotoelétrons, no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, LNLS. Especialmente para a amostra de insulina, mudanças significativas nos espectros de fotoabsorção na borda 1s do enxofre foram observadas comparando-se os espectros antes e após a irradiação, indicando a possível quebra de uma das ligações dissulfeto da insulina. As análises de emissão de gases e fotoabsorção na borda 1s do enxofre foram realizadas ainda em temperatura criogênica (77K) com o objetivo de avaliar a contribuição térmica durante o processo de irradiação em que as amostras eram submetidas. Um dos objetivos relacionados à análise de biomoléculas sulfuradas é estudar os danos causados pela exposição à radiação nas pontes dissulfeto da insulina, pois elas desempenham um papel importante na conformação e estabilidade dessa proteína. Por se tratar de uma molécula de alto peso molecular e complexa, estudos de fotoabsorção e fragmentação iônica na

borda 2p do átomo de enxofre foram realizados para a molécula de dimetildissulfeto (DMDS,  $C_2H_6S_2$ ), que pode ser visto como protótipo para o estudo das ligação dissulfeto (-S-S-). Os estudos experimentais envolvendo o DMDS foram feitos no laboratório de luz síncrotron francês de terceira geração, o SOLEIL, utilizando as técnicas de espectroscopia de fotoelétrons, fotoabsorção e de coincidência com elétrons, em uma montagem experimental (EPICEA) que permite a caracterização da energia dos elétrons associados à formação de fragmentos iônicos. O uso do EPICEA permitiu ainda a obtenção de espectros de coincidência de fotoelétrons com fragmentos iônicos selecionados segundo suas relações carga/massa (MSPES).

Palavras Chave: biomoléculas, irradiação, fotoabsorção, fragmentação iônica, NEXAFS, XPS, DMDS, luz síncrotron

## ABSTRACT

---

Simões, Grazieli. STRUCTURAL MODIFICATIONS IN SULFUR CONTAINING BIOMOLECULES: USING ELECTRON BEAM AND X-RAY REGION SPECTROSCOPIC CHARACTERIZATION. Rio de Janeiro, 2013. Tese (Doutorado em Química) Instituto de Química Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Cysteine (Cys), cystine (CysCys) and insulin were irradiated using electron beam and synchrotron light source as ionizing sources. The development of a method to irradiate biological samples was initiated by irradiating the polymer poly vinyl chloride (PVC) and analysis of the gas emitted during the process, in this case, hydrochloric acid (HCl). Likewise, analyzes were conducted on samples of hybrid polymer polymethyl methacrylate (PMMA) and magnetite ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$  -gamma- PMMA) in order to evaluate the stability of hybrid polymer with different concentrations of magnetite in its constitution (0.1; 0.5 and 2.5%). The structural modifications caused by induced damage both in the polymer and sulfur biomolecules were characterized by analyzing the gases emitted using a residual gas analyzer (RGA). For the biomolecules, besides the residual gas analysis, spectroscopic studies were also carried out in the region of X-rays, using techniques of photoabsorption (K-edge of sulfur, nitrogen and oxygen) and photoemission, at the Brazilian National Synchrotron Light Laboratory, LNLS. Especially for insulin, significant changes in the photoabsorption spectra of sulfur 1s edge were observed by comparing spectra before and after irradiation, indicating a possible breakage of the disulfide bonds of insulin. Analyses of gas emission and photoabsorption on the 1s sulfur edge were also held in cryogenic temperature (77K) to evaluate the thermal contribution during the irradiation process in which the samples were submitted. One of the objectives related to the analysis of biomolecules is to study the damage caused by exposure to radiation in the insulin disulfide bridges because they play an important role in the formation and stability of the protein. As insulin is a molecule of high molecular weight and complex, for studies in gas phase, photoabsorption and ionic fragmentation at the sulfur 2p edge were performed to Dimethyldisulfide molecule (DMDS,  $\text{C}_2\text{H}_6\text{S}_2$ ), which can be seen as a prototype for the study of disulfide bonds (-SS-). Experimental studies involving DMDS were made in the French third

generation synchrotron light laboratory, SOLEIL, using the techniques of photoabsorption and photoelectron spectroscopy in coincidence with electrons in an experimental setup (EPICEA) that allows the characterization of energy electrons associated with the formation of ionic fragments. The use of EPICEA also allowed obtaining photoelectron spectra in coincidence with ion fragments (MSPES).

Keywords: biomolecules, irradiation, photoabsorption, ionic fragmentation, NEXAFS, XPS, DMDS, synchrotron light

## SUMÁRIO

---

|  |      |
|--|------|
| AGRADECIMENTOS .....   | vi   |
| RESUMO.....  | viii |
| ABSTRACT .....   | x    |
| SUMÁRIO.....   | xii  |
| LISTA DE FIGURAS .....   | xv   |
| LISTA DE TABELAS .....   | xx   |
| LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS .....   | xxi  |
| CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO .....  | 23   |
| CAPÍTULO 2 - FUNDAMENTOS TEÓRICOS E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....                          | 25   |
| 2.1 Interação da luz com a matéria (Fotoionização, fotoabsorção e processos Auger) ..... | 25   |
| 2.2 Estudos prévios do uso de técnicas espectroscópicas em biomoléculas .....            | 29   |
| 2.2.1 Danos causados por radiação.....   | 31   |
| CAPÍTULO 3 - OBJETIVOS .....   | 33   |
| CAPÍTULO 4 - EXPERIMENTAL.....   | 35   |
| 4.1 O Laboratório Nacional de Luz Síncrotron LNLS .....                                  | 35   |
| 4.1.1 Linha de luz SXS.....  | 37   |
| 4.1.2 Linha de luz SGM.....  | 38   |
| 4.2 O Laboratório de Luz Síncrotron Francês SOLEIL .....                                 | 39   |
| 4.2.1 Linha de luz PLEIADES .....  | 41   |
| 4.2.1.1 EPICEA .....   | 42   |
| 4.2.1.2 Scienta .....  | 44   |
| 4.2.1.3 Ion Trap.....  | 45   |
| 4.3. Metodologia Experimental – Biomoléculas .....                                       | 47   |

|   |     |
|---|-----|
| 4.3.1 – Desenvolvimento do método para irradiação de biomoléculas   | 47  |
| 4.4.2 – Aplicação da metodologia de irradiação em biomoléculas.....   | 48  |
| 4.4. Metodologia Experimental – DMDS .....  | 49  |
| CAPÍTULO 5 - BIOMÓLECULAS – ESPECTROMETRIA DE MASSAS,<br>ESPECTROSCOPIA DE FOTOELÉTRONS E FOTOABSORÇÃO .....              | 54  |
| 5.1 – A ligação dissulfeto .....  | 54  |
| 5.2 - Desenvolvimento de metodologia para irradiação de amostras sólidas<br>(LIFE – IQ/UFRJ).....                         | 56  |
| 5.3 – Resultados e Discussões.....  | 61  |
| 5.3.1 - Danos induzidos por elétrons.....   | 61  |
| 5.3.1.1 – Emissão de gases .....  | 61  |
| 5.3.1.2 Fotoabsorção na borda 1s do enxofre.....  | 66  |
| 5.3.1.3 XPS .....   | 72  |
| 5.3.2 Danos induzidos por luz.....  | 81  |
| 5.3.2.1 Emissão de gases .....  | 82  |
| 5.3.2.2 Fotoabsorção nas bordas O1s e N1s.....  | 84  |
| 5.3.3 Espectrometria de massas Tandem.....  | 89  |
| CAPÍTULO 6 - DMDS: FOTOIONIZAÇÃO, FOTOABSORÇÃO E FRAGMENTAÇÃO<br>IÔNICA NA BORDA S 2p .....                               | 94  |
| 6.1. Introdução .....   | 94  |
| 6.2 – Resultados e Discussões.....  | 95  |
| 6.2.1 – Fotoabsorção .....  | 95  |
| 6.2.2 – Decaimento eletrônico: S 2p Auger Ressonante.....   | 98  |
| 6.2.4 – Decaimento eletrônico: S 2p Auger Normal .....  | 101 |
| 6.2.5 – Fragmentação iônica.....  | 104 |
| 6.2.5.1 – Fragmentação iônica em coincidência com elétrons de<br>energia selecionada, abaixo da borda 2p do enxofre.....  | 105 |
| 6.2.5.2 – Fragmentação iônica em coincidência com elétrons de<br>energia selecionada acima da borda de ionização S2p..... | 116 |

|   |     |
|---|-----|
| CAPÍTULO 7 - CONCLUSÕES .....   | 120 |
| REFERÊNCIAS.....  | 123 |
| ANEXO 1 - CARACTERIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DO CANHÃO DE ELÉTRONS<br>PARA A IRRADIAÇÃO DE AMOSTRAS SÓLIDAS ..... | 127 |
| ANEXO 2 - ARTIGO PUBLICADO .....  | 130 |

## LISTA DE FIGURAS

---

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 2.1</b> Fotoexcitação e fotoionização de camada interna e diferentes tipos de mecanismos de decaimento Auger [2] .....   | 26 |
| <b>Figura 4.1</b> Vista superior do anel de armazenamento do LNLS .....  | 36 |
| <b>Figura 4.2</b> Características das linhas de luz do LNLS .....  | 36 |
| <b>Figura 4.3</b> Componentes da linha de luz SXS .....  | 37 |
| <b>Figura 4.4</b> Visão em 3D dos componentes da linha de luz SXS, mostrando apenas os componentes b, c, d, e correspondentes à Figura 4.3.....                            | 37 |
| <b>Figura 4.5</b> Linha de luz SXS .....   | 38 |
| <b>Figura 4.6</b> Componentes da linha de luz SGM .....  | 39 |
| <b>Figura 4.7</b> Vista superior do SOLEIL (St. Aubin – França) .....  | 40 |
| <b>Figura 4.8</b> Esquema da distribuição das linha de luz no SOLEIL .....   | 40 |
| <b>Figura 4.9</b> Desenho esquemático da linha de luz PLEIADES .....   | 41 |
| <b>Figura 4.10</b> Desenho esquemático do EPICEA.....  | 42 |
| <b>Figura 4.11</b> (a) Simulação das trajetórias dos elétrons no Epicea e (b) esquema tridimensional do espectrômetro (b) [34] .....                                       | 43 |
| <b>Figura 4.12</b> Esquema de funcionamento de um analisador hemisférico (adaptado de [36]) .....  | 45 |
| <b>Figura 4.13</b> <i>Ion trap</i> acoplado à linha de luz PLEIADES .....  | 46 |
| <b>Figura 4.14</b> Imagem do <i>shutter</i> montado em uma flange DN40CF (esquerda) (adaptado de [39]) e acoplado entre o <i>ion trap</i> e a linha de luz (direita) ..... | 47 |
| <b>Figura 4.15</b> Câmara de alto vácuo instalada no LIFE-IQ/UFRJ.....   | 48 |
| <b>Figura 4.16</b> Desenho esquemático do suporte de amostras sólidas .....  | 48 |
| <b>Figura 4.17</b> Exemplo de resultados obtidos no PSD. A escala de cores (à direita) indica a contagem de elétrons.....  | 51 |
| <b>Figura 5.1</b> Formação da ponte dissulfeto entre resíduos de cisteína .....  | 54 |
| <b>Figura 5.2</b> Química das pontes dissulfeto no cabelo [47] .....   | 55 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 5.3</b> Estrutura primária da insulina bovina .....  | 56 |
| <b>Figura 5.4</b> Espectro de emissão de gases no modo Pressãoxtempo do filme de PVC irradiado com elétrons de 1keV .....  | 57 |
| <b>Figura 5.5</b> Espectros de emissão de gases no modo Pxt do polímero de PMMA. Os espectros foram separados em 3 grupos para melhor visualização da emissão dos gases que emitiram pouco. ....       | 58 |
| <b>Figura 5.6</b> Espectros de emissão de gases no modo Pxt do polímero híbrido de PMMA-magnetita 2,5% .....   | 59 |
| <b>Figura 5.7</b> Espectro de emissão de gases (modo Pxt) da cisteína irradiada com elétrons de 800 eV e mantida em temperatura ambiente.....  | 63 |
| <b>Figura 5.8</b> Espectro de emissão de gases (modo Pxt) da cisteína irradiada com elétrons de 800 eV e mantida em baixa temperatura (77K) .....  | 63 |
| <b>Figura 5.9</b> Espectro de emissão de gases (modo Pxt) da cistina irradiada com elétrons de 800 eV e mantida em temperatura ambiente.....   | 64 |
| <b>Figura 5.10</b> Espectro de emissão de gases (modo Pxt) da cistina irradiada com elétrons de 800 eV e mantida em baixa temperatura (77K) .....  | 64 |
| <b>Figura 5.11</b> Espectro de emissão de gases (modo Pxt) da insulina irradiada com elétrons de 800 eV e mantida em temperatura ambiente.....   | 65 |
| <b>Figura 5.12</b> Espectro de emissão de gases (modo Pxt) da insulina irradiada com elétrons de 800 eV e mantida em baixa temperatura (77K) .....   | 65 |
| <b>Figura 5.13</b> Espectros de fotoabsorção na borda do S 1s da cisteína .....  | 67 |
| <b>Figura 5.14</b> Espectros de fotoabsorção na borda do S 1s da cistina.....  | 68 |
| <b>Figura 5.15</b> Espectros de fotoabsorção na borda do S 1s da insulina.....   | 68 |
| <b>Figura 5.16</b> Evolução da compilação da soma dos espectros de cisteína e cistina em diferentes proporções.....  | 71 |
| <b>Figura 5.17</b> Comparação entre os espectros de insulina irradiada e o espectro formado pela soma dos espectros de cisteína e cistina. A subtração entre os dois espectros também é mostrado ..... | 71 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 5.18</b> Espectro de XPS da amostra de ouro (Au) para fins de calibração em energia .....   | 73 |
| <b>Figura 5.19</b> Espectro de XPS da amostra de cisteína .....   | 74 |
| <b>Figura 5.20</b> Espectro de XPS da amostra de cistina .....  | 74 |
| <b>Figura 5.21</b> Espectro de XPS da amostra de insulina .....   | 75 |
| <b>Figura 5.22</b> Fórmula geral de um aminoácido em sua forma livre (1) e em forma de <i>zwitterion</i> (2).....   | 75 |
| <b>Figura 5.23</b> Detalhamento em torno da borda do C1s dos espectros de XPS das amostras de cisteína, cistina e insulina. À direita: amostras não-irradiadas e à esquerda: amostras irradiadas..... | 77 |
| <b>Figura 5.24</b> Detalhamento em torno da borda do O1s dos espectros de XPS das amostras de cisteína, cistina e insulina. À direita: amostras não-irradiadas e à esquerda: amostras irradiadas..... | 80 |
| <b>Figura 5.25</b> Espectro de emissão de gases (modo Pxt) da cisteína mantida em temperatura ambiente irradiada em ordem zero .....  | 82 |
| <b>Figura 5.26</b> Espectro de emissão de gases (modo Pxt) da cistina mantida em temperatura ambiente irradiada em ordem zero .....   | 83 |
| <b>Figura 5.27</b> Espectro de emissão de gases (modo Pxt) da insulina mantida em temperatura ambiente irradiada em ordem zero .....  | 83 |
| <b>Figura 5.28</b> Espectros de fotoabsorção na borda do O 1s da cisteína.....  | 84 |
| <b>Figura 5.29</b> Espectros de fotoabsorção na borda do O 1s da cistina .....  | 85 |
| <b>Figura 5.30</b> Espectros de fotoabsorção na borda do O 1s da insulina .....   | 85 |
| <b>Figura 5.31</b> Espectros de fotoabsorção na borda do N 1s da cisteína .....   | 87 |
| <b>Figura 5.32</b> Espectros de fotoabsorção na borda do N 1s da cistina .....  | 87 |
| <b>Figura 5.33</b> Espectros de fotoabsorção na borda do N 1s da insulina .....   | 88 |
| <b>Figura 5.34</b> Princípio do método experimental (adaptado de [37]) .....  | 90 |
| <b>Figura 5.35</b> Espectro de massas <i>tandem</i> . Fotoionização por eletrospray do íon 4+ da insulina (m/z 1443) obtido após 600ms de irradiação a 288,9 eV .....                                 | 91 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 5.36</b> Ionização simples e dupla em torno da borda C1s do estado carregado precursor ( $M^{4+}$ ) da proteína insulina.....   | 92  |
| <b>Figura 6.1</b> Ciclo biogeoquímico do enxofre [57]. .....  | 94  |
| <b>Figura 6.2</b> Representação estrutural da molécula de DMDS.....   | 95  |
| <b>Figura 6.3</b> Espectro de fotoabsorção da molécula de DMDS em torno da borda S 2p (superior). Detalhe do espectro de fotoabsorção da molécula de DMDS na faixa de energia de 167 eV a 169,5 eV (inferior) ..... | 96  |
| <b>Figura 6.4</b> Espectros de fotoelétrons medidos antes das ressonâncias e nas ressonâncias .....   | 99  |
| <b>Figura 6.5</b> Espectros de fotoelétrons medidos abaixo das ressonâncias (161,5 eV) e nas duas primeiras ressonâncias (164,6 e 165,9 eV) .....   | 100 |
| <b>Figura 6.6</b> Espectro Auger S 2p do DMDS .....   | 102 |
| <b>Figura 6.7</b> Fragmentação iônica da molécula de DMDS medido abaixo (161,5 eV) e nas cinco ressonâncias numeradas no espectro de fotoabsorção (Figura 6.3). .....   | 106 |
| <b>Figura 6.8</b> Dependência da energia dos fótons para os rendimentos dos fragmentos $CH_3SSCH_3^+$ , $CH_3S^+$ , $S^+$ e $S_2^+$ .....   | 107 |
| <b>Figura 6.9</b> Espectro de massas obtido a 161,5 eV em coincidência com electrons de energia selecionada. As energias de ligação correspondentes às regiões estão definidas no texto .....                       | 108 |
| <b>Figura 6.10</b> Espectro de massas obtido na terceira ressonância em coincidência com elétrons de energia selecionada. As energias de ligação correspondentes às regiões estão definidas no texto.....           | 109 |
| <b>Figura 6.11</b> Dependência da energia para os rendimentos dos ions selecionados, medidos em coincidência com os fotoelétrons com energias de ligação correspondentes a região I.....                            | 110 |
| <b>Figura 6.12</b> Dependência da energia para os rendimentos dos íons selecionados, medidos em coincidência com os fotoelétrons com energias de ligação correspondentes a região II.....                           | 111 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Figura 6.13</b> Dependência da energia para os rendimentos dos íons selecionados, medidos em coincidência com os fotoelétrons com energias de ligação correspondentes a região III.....                                 | 112 |
| <b>Figura 6.14</b> Dependência da energia e dos rendimentos para os íons selecionados, medidos em coincidência com os fotoelétrons com energias de ligação dentro da região IV.....  | 113 |
| <b>Figura 6.15</b> Dependência da energia e dos rendimentos para os íons selecionados, medidos em coincidência com os fotoelétrons com energias de ligação dentro da região V.....   | 114 |
| <b>Figura 6.16</b> Espectro de massas e fotoelétrons selecionado, ou MSPES.....  | 115 |
| <b>Figura 6.17</b> Espectro de massas obtido em 181,5 eV, em coincidência com elétrons de energia de ligação entre 8,0 e 22,0 eV (a) e em coincidência com elétrons Auger de energia cinética entre 130 e 150 eV (b) ..... | 117 |
| <b>Figura 6.18</b> Espectros de massas e fotoelétrons selecionados adquiridos a 181,5 eV. Íons medidos em coincidência com os elétrons Auger .....   | 119 |
| <b>Figura A.1</b> Canhão de elétrons comercial <i>Kimble</i> .....   | 127 |
| <b>Figura A.2</b> “Faraday Cup” acoplado ao porta-amostras .....   | 127 |
| <b>Figura A.3</b> Variação da energia do canhão em relação à corrente aplicada .....   | 128 |
| <b>Figura A.4</b> Variação da corrente aplicada no filamento em relação a corrente coletada no <i>Faraday cup</i> .....  | 128 |

## LISTA DE TABELAS

---

|  |     |
|--|-----|
| <b>Tabela 4.1</b> Descrição dos valores de energia correspondentes a cada ressonância atribuídas através do espectro de fotoabsorção do DMDS em torno da borda S2p.. | 50  |
| <b>Tabela 4.2</b> Regiões do PSD: relação de raio e energia de ligação .....   | 52  |
| <b>Tabela 5.1</b> Energias das transições em torno da borda S1s para as amostras estudadas.....  | 69  |
| <b>Tabela 5.2</b> Energias de ligação dos picos correspondentes ao C1s das amostras estudadas.....   | 78  |
| <b>Tabela 5.3</b> Energias dos picos de maior absorção das moléculas estudadas .....   | 86  |
| <b>Tabela 5.4</b> Energias dos picos de maior absorção das moléculas estudadas .....   | 88  |
| <b>Tabela 6.1</b> Energias e atribuições para as ressonâncias do S 2p, de acordo com a numeração da Figura 4.1 .....   | 97  |
| <b>Tabela 6.2</b> Valores de m/z relativos aos fragmentos iônicos do DMDS.....   | 104 |

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

---

CID - *Collision-induced dissociation* (dissociação induzida por colisão)

CYS – Cisteína

CYSCYS – Cistina

DMDS – Dimetildissulfeto

DMS – Dimetilssulfeto

DTA – *Double toroidal analyser* (analisador de elétrons duplo-toroidal)

EPICEA – *Étude des Photo-Ions en Coïncidence avec des Electrons Auger analysés Angulairement* (Estudo de fotoíons em coincidência com Elétrons Auger resolvidos em ângulo)

ES-AEPICO – *Energy selected Auger electron Photoion coincidence* (elétron Auger de energia escolhida em coincidência com fotoíon)

ESCA – *Electron spectroscopy for chemical analysis* (Espectroscopia de electrons para análises químicas)

INS – insulina

LINAC – *Linear Accelerator* (Acelerador Linear)

LNLS – Laboratório Nacional de Luz Síncrotron

LIFE – Laboratório de Impacto de Fótons e Elétrons

MPSC – *Multi Purpose Source Chamber* (Câmara de fonte multi propósito)

MSPES – Mass-selected photoelectron spectra (Espectro de fotoelétrons de massa selecionada)

NEXAFS – *Near Edge X-Ray Absorption Fine Structure* (Estrutura fina de absorção de raios X próxima à borda)

PLEIADES – *Polarized Light source for Electron and Ion Analysis from Diluted Excited Species* (Fonte de luz polarizada para análise de elétrons e íons de espécies excitadas diluídas)

PMMA – polimetilmetacrilato

PMMA-gama-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> – polímero híbrido de polimetilmetacrilato e magnetita

PSD – *Position sensitive detector* (detector sensível à posição)

PVC – policloreto de vinila

RGA – *Residual Gas Analyser* (Analisador de gás residual)

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

SGM – *Spherical Grating Monochromator* (Monocromador de grade esférica)

SXS - *Soft X-ray Spectroscopy* (Espectroscopia de raios X moles)

TDC - *Time-to-Digital Converter* (conversor de tempo digital)

TEY - *total electron yield* (rendimento total de elétrons)

TPES – *Threshold photoelectron spectroscopy* (Espectroscopia de fotoelétrons de limiar)

UPS – *Ultraviolet Photoelectron Spectroscopy* (Espectroscopia de fotoelétrons na região do Ultravioleta)

XAS – *X-ray Absorption Spectroscopy* (Espectroscopia de Absorção de raios X)

XPS – *X-ray Photoelectron Spectroscopy* (Espectroscopia de fotoelétrons na região dos raios X)

## CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

---

O alvo principal das análises realizadas nesta tese envolveu o estudo de danos causados por radiação ionizante em biomoléculas sulfuradas. Especificamente para a proteína insulina, foram avaliadas as consequências destes danos nas ligações dissulfeto.

As amostras biológicas de cisteína, cistina e insulina foram irradiadas com elétrons, tanto em temperatura ambiente quanto criogênica (77K). Os gases emitidos durante a irradiação foram monitorados através de medidas de espectrometria de massas. Como as pontes dissulfeto da insulina são formadas por 3 cistinas, que por sua vez, são formadas por 6 resíduos de cisteína, esses dois biocompostos foram utilizados como referência para este estudo por se tratarem de pequenos blocos constituintes desta proteína. Na irradiação com elétrons, os danos foram caracterizados por meio de medidas de fotoabsorção em torno da borda 1s do enxofre, assim como medidas de fotoelétrons.

Os danos causados nas amostras biológicas também foram induzidos utilizando-se fótons. Além de monitorar os gases emitidos, também foram realizadas medidas de fotoabsorção em torno da borda 1s do oxigênio e do nitrogênio.

Levando-se em consideração a complexidade do estudo espectroscópico da insulina em fase gasosa e com o objetivo de compreender mais fundamentalmente o dano causado nas ligações dissulfeto, foi feito um estudo espectroscópico em uma molécula que atuou como um protótipo dessas ligações: o DMDS. Para esta molécula, foram feitas análises de fotoabsorção e fotoelétrons em torno da borda 2p do enxofre assim como medidas de coincidência elétron-íon abaixo, acima e nas energias das ressonâncias observadas no espectros de fotoabsorção.

Como o estudo realizado nesta tese envolveu diferentes amostras e fez uso de diversas técnicas experimentais conduzidas em diferentes laboratórios, ela está dividida da seguinte forma: O capítulo 1 descreve as questões introdutórias da tese e o capítulo 2 aborda os fundamentos teóricos descrevendo a interação da luz com a matéria e estudos prévios do uso de técnicas espectroscópicas em biomoléculas. No capítulo 3, são apresentados os objetivos que motivaram o trabalho descrito na tese. Já as características técnicas dos laboratórios de luz síncrotron brasileiro e francês,

bem como as especificações das linhas de luz, técnicas utilizadas e os detalhes experimentais envolvendo a preparação das amostras são descritas no capítulo 4.

As técnicas experimentais utilizadas nesta tese foram desenvolvidas em 3 laboratórios diferentes. Os testes envolvendo o desenvolvimento do método de irradiação para amostras sólidas foram feitos no Laboratório de Impacto de Fótons e Elétrons (LIFE-IQ/UFRJ). Para que as biomoléculas fossem irradiadas em estado sólido, foi desenvolvida uma montagem experimental utilizando um canhão de elétrons como fonte ionizante acoplado à uma câmara de vácuo. Foram utilizadas amostras do polímero de PVC nos testes iniciais e posteriormente híbridos de PMMA-gama- $\text{Fe}_2\text{O}_3$  na otimização do método.

As medidas espectroscópicas envolvendo o estudo de biomoléculas em torno da borda 1s do enxofre, nitrogênio e oxigênio foram realizadas no LNLS e, no SOLEIL, foram feitas medidas em torno da borda 1s do carbono para a molécula de insulina. As etapas envolvendo o estudo de biomoléculas encontram-se no capítulo 5. Já os estudos espectroscópicos em torno da borda 2p do enxofre para a molécula de DMDS foram desenvolvidos no SOLEIL e os resultados obtidos são apresentados no capítulo 6.

Finalmente, no capítulo 7 são apresentadas as conclusões dos resultados obtidos e perspectivas relacionadas ao estudo espectroscópico de danos causados pela radiação em biomoléculas.

## CAPÍTULO 2 - FUNDAMENTOS TEÓRICOS E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

### 2.1 Interação da luz com a matéria (Fotoionização, fotoabsorção e processos Auger)

Da interação da radiação com a matéria podem resultar diversos efeitos. Dentre esses, serão discutidos com mais detalhes os relacionados à fotoabsorção e fotoionização, além de processos de decaimento do tipo Auger, pois apresentam relação direta com os resultados apresentados nesta tese.

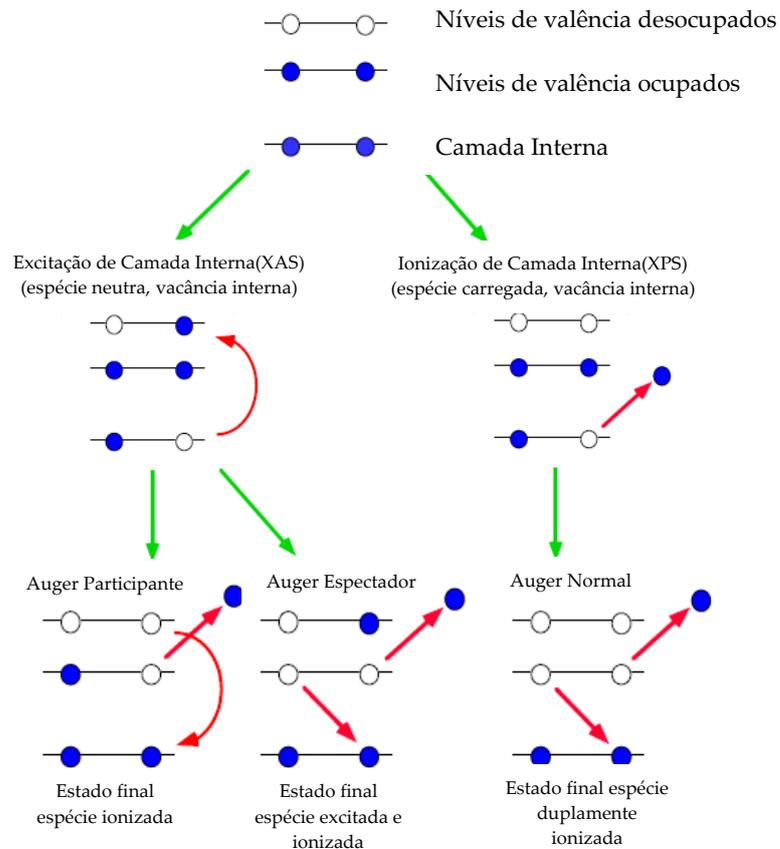
Dependendo da energia do fóton incidente, pode-se remover diretamente um elétron de valência ou de camada interna, levando a molécula a um estado eletrônico simplesmente ionizado (fotoionização) ou pode-se promover um elétron de camada interna para um orbital de valência não ocupado, levando a molécula a um estado eletrônico neutro, mas excitado.

O processo envolvido na excitação de camada interna é a fotoabsorção. Na fotoabsorção a molécula absorve exatamente a energia de um fóton incidente ( $E = h\nu$ ), promovendo um elétron para um orbital virtual vazio, dando origem a um estado excitado  $M^*$  (Equação 1.1). Consequentemente forma-se uma vacância numa camada interna. Assim, no espectro de fotoabsorção, que é obtido ao se variar a energia do fóton incidente, os picos observados (ressonâncias) podem ser relacionados a transições eletrônicas átomo-específicas [1].



Alguns destes processos estão apresentados, de forma esquemática na Figura 2.1.

## FOTOABSORÇÃO E FOTOIONIZAÇÃO DE CAMADA INTERNA



**Figura 2.1** Fotoexcitação e fotoionização de camada interna e diferentes tipos de mecanismos de decaimento Auger [2]

Como pode ser observado na Figura 2.1, tanto na fotoionização quanto na fotoabsorção de camada interna, ocorre a criação de uma vacância nesta última. Essa vacância possui um tempo de vida muito curto, da ordem de femtosegundos, sendo preenchida por elétrons mais externos através de processos de relaxação. A energia liberada como consequência do decaimento pode dar origem a um fóton (decaimento radiativo) ou ejetar um outro elétron do átomo (decaimento não-radiativo) [2]. Este último processo é conhecido como decaimento Auger por ter sido sugerido por Pierre Auger em 1925.

Quando o fóton incidente tem energia correspondente à região dos raios X, pode ocorrer excitação de elétrons de camadas internas, dando origem a uma técnica conhecida como espectroscopia de absorção de raios X (XAS – *X-ray absorption spectroscopy*). Variando-se a energia do fóton incidente, próximo à borda

de excitação de cada elemento químico, os espectros de XAS apresentam ressonâncias e a técnica é conhecida como NEXAFS (*Near Edge X-Ray Absorption Fine Structure*). As peculiaridades dos orbitais de camada interna (caráter atômico, alta localização e pequena participação nas ligações químicas) fornecem grande especificidade à técnica, já que as energias das camadas internas são bastante diferentes entre os diversos elementos químicos. Além disso, a técnica é bastante sensível ao ambiente químico, ou seja, átomos de um mesmo elemento formando diferentes ligações químicas terão energias de absorção de camada interna diferentes [3].

Obtendo-se um estado excitado a partir da excitação de um elétron de camada interna, forma-se um sistema com excesso de energia, e esta pode ser dissipada através da emissão de um elétron Auger. Este processo é conhecido como Auger ressonante. Nesse caso, o estado excitado  $M^*$  pode relaxar essencialmente através de dois processos diferentes: Auger espectador ou Auger participante (Figura 1.1). No Auger espectador, o elétron inicialmente excitado para o orbital vazio não participa do processo de decaimento eletrônico, enquanto que no Auger participante, o elétron excitado participa do processo [4]. Como consequência do decaimento Auger Ressonante, uma espécie de carga simples (cátion) é obtida. A energia do elétron Auger ( $E_{k_{Aug}}$ ) é dada pela diferença entre a energia do estado excitado a partir da camada interna ( $E^*_{camada\ interna}$ ) e a energia final do estado iônico ionizado ( $E_{final}$ ), conforme Equação 2.2 [2].

$$E_{k_{Aug}} = E^*_{camada\ interna} - E_{final} \quad (\text{Eq. 2.2})$$

Nos processos diretos de fotoionização (Figura 1.1), um íon é gerado a partir da ejeção de um elétron (Eq 2.3), cuja energia cinética é fornecida pela equação do efeito fotoelétrico (Eq 2.4) [5].

$$M + h\nu = M^+ + e^- \quad (\text{Eq 2.3})$$

$$h\nu = E_L + E_k \quad (\text{Eq 2.4})$$

Na Equação 1.4,  $h\nu$  corresponde à energia do fóton incidente,  $E_L$  é a energia de ligação (ou potencial de ionização) e  $E_k$  a energia cinética do elétron. Dependendo da montagem experimental e do tipo de análise realizada, a espectroscopia de fotoelétrons recebe diferentes denominações, tais como:

XPS (*X-Ray Photoelectron Spectroscopy*) ou ESCA (*Electron Spectroscopy for Chemical Analysis*) – a incidência de radiação nas regiões dos raios X promove a ejeção de elétrons de camada interna. Os termos XPS e ESCA normalmente são aplicados para análise a de superfície em substâncias sólidas.

UPS (*Ultraviolet Photoelectron Spectroscopy*) – a radiação incidente tem energia na região do Ultravioleta e causa a ejeção de elétrons de valência, envolvidos diretamente nas ligações químicas.

TPES (*Threshold Photoelectron Spectroscopy* ou espectroscopia de fotoelétrons de limiar) – detecção e análise de elétrons com energia cinética nula [6].

Quando o fóton tem energia suficiente para remover um elétron de camada interna, ou seja, quando possui energia maior ou igual ao potencial de ionização da camada interna de um determinado átomo, o íon formado pode liberar energia através do processo Auger Normal (ou Auger não-ressonante), esquematizado na Figura 1.1 [5]. Nesse processo, a vacância produzida pelo fóton é preenchida pelo decaimento de um elétron e a energia liberada nesse decaimento é suficiente para causar a emissão de um segundo elétron, sendo este chamado de elétron Auger, gerando uma espécie iônica duplamente carregada [7]. A energia do elétron Auger ( $E_{k_{Aug}}$ ) é dada pela diferença entre a energia do estado iônico com a vacância de camada interna ( $E_{camada\ interna}$ ) e a energia final do estado iônico duplamente ionizado ( $E_{final}$ ), conforme indicado na Equação 2.5 [2].

$$E_{k_{Aug}} = E_{camada\ interna} - E_{final} \quad (\text{Eq. 2.5})$$

Enfatizamos que tanto a Figura 1.1 quanto as descrições apresentadas correspondem apenas a simplificações ilustrativas para os complexos processos Auger Ressonante e Normal.

## 2.2 Estudos prévios do uso de técnicas espectroscópicas em biomoléculas

Os aminoácidos, bases nitrogenadas, proteínas e os ácidos nucléicos são muitas vezes submetidos a ambientes com elevada carga de radiações, como o ultravioleta, raios X e elétrons de alta energia. Estas radiações são, além disso, comumente empregadas na modificação estrutural de materiais utilizados na substituição de tecidos ou órgãos humanos (biomateriais), na busca de uma maior biocompatibilidade [8]. O conhecimento das mudanças químicas e físicas produzidas nestas moléculas e nestes materiais quando expostos a radiações ionizantes constitui-se, portanto, em fator de alta relevância para a proteção radiológica dos seres humanos e para o setor de biomateriais em geral.

Uma das vantagens do uso da luz síncrotron (ver Capítulo 4) no estudo de biocompostos é o brilho produzido pelo feixe de fótons. Esta vantagem está relacionada às dimensões reduzidas do feixe de luz bastante colimado. O alto brilho do feixe (densidade do fluxo) permite que pequenas regiões da amostra sejam exploradas com relação sinal-ruído aceitável [9]. Entretanto, devido à essas características, muitas vezes, a própria análise espectroscópica de biomoléculas requer uma longa exposição do feixe de luz síncrotron sobre a amostra acarretando em danos estruturais irreversíveis, mesmo em temperaturas criogênicas. Por esta razão, vários grupos de pesquisa mostram-se cada vez mais preocupados com a questão dos danos causados por radiação nesses compostos. Por outro lado, a investigação de danos induzidos por radiação em biomoléculas é extremamente importante nas áreas de difração de raios X em proteínas e até mesmo para a medicina em reações envolvidas no metabolismo humano e em testes de proteção radiológica [10].

Biomoléculas em geral são muito sensíveis quando submetidas à radiações ionizantes passando por profundas modificações químicas se expostas à feixes de luz prolongados ou intensos. Até mesmo quando submetidas à pequenas doses, a radiação ionizante pode inativar algumas proteínas ou até mesmo matar alguns organismos [11]. Por exemplo, uma das conseqüências de danos causados por radiação em biomoléculas contendo enxofre em sua composição é a clivagem de pontes dissulfeto [12]. Weik e co-autores [13] investigaram danos estruturais

específicos em enzimas causados pela radiação síncrotron. Eles observaram a clivagem de pontes dissulfeto mesmo em condições criogênicas. Schulze-Briese e colaboradores [14] estudaram os efeitos do tamanho do feixe nos danos causados por radiação em cristais de insulina e observaram mudanças significativas na ponte dissulfeto formada pelas cisteínas A7 e B7 (Figura 5.3).

A decomposição de cinco aminoácidos (alanina, serina, cisteína, ácido aspártico e asparagina) foi previamente estudada por Zubavichus e co-autores [10] usando as técnicas de NEXAFS, XPS e espectrometria de massas. Eles correlacionaram as mudanças observadas nos espectros de XPS com a composição dos gases emitidos pelos aminoácidos expostos a uma fonte de raios X e observaram processos de desidratação, descarbonilação, descarboxilação, desaminação e desulfurização, dependendo do aminoácido estudado. Levando-se em consideração a composição de gás residual, estequiometria e as modificações no formato dos picos nos espectros de XPS, pôde-se concluir que essas moléculas podem se decompor através de diferentes vias. Foi possível ainda estabelecer uma ordem crescente de estabilidade em relação à radiação.

Apesar dos compostos de enxofre serem de grande importância para diversos sistemas, algumas características bioquímicas desses compostos não foram completamente estudadas ainda, principalmente devido à limitações de algumas técnicas analíticas disponíveis para caracterizar espécies sulfuradas, como por exemplo RMN (Ressonância Magnética Nuclear). Entretanto, com o uso de técnicas como de NEXAFS e de espectrometria de massas, aliadas a fontes de luz síncrotron cada vez mais eficazes, a espectroscopia em torno da borda 1s do enxofre tem tornado-se uma ferramenta poderosa para a investigação de compostos sulfurados em diferentes tipos de amostras.

A técnica de NEXAFS é extremamente sensível ao ambiente químico e estrutural do enxofre, podendo até mesmo ser usada para distinguir entre formas orgânicas e inorgânicas deste elemento. A forma, intensidade e a posição das ressonâncias nos espectros de fotoabsorção na borda 1s do enxofre são originados de excitações eletrônicas do enxofre e dependem do seu estado de oxidação e dos átomos presentes em sua vizinhança. A energia dos picos nos espectros de

NEXAFS na borda K do enxofre pode variar em até 14 eV desde sulfetos ( $\text{Nox}^1 = -2$ ) a sulfatos ( $\text{Nox} = +6$ ) [15]. Esta característica pode ser extremamente importante para a análise de amostras biológicas. Por exemplo, a técnica de NEXAFS já foi empregada para determinar a especiação química do enxofre em amostras de sangue [16], combustíveis fósseis [17] e até mesmo plantas [18].

As técnicas de NEXAFS e XPS também já foram empregadas no estudo espectroscópico em torno das bordas de absorção do carbono, nitrogênio e oxigênio nos 22 aminoácidos proteinogênicos existentes [19], [20], [21]. Nesta tese, reportaremos pela primeira vez o espectro de fotoabsorção em torno da camada K do carbono, em termos de rendimento iônico relativo, da proteína insulina isolada em vácuo e o espectro de fotoabsorção no modo TEY (*Total Electron Yield* = rendimento total de elétrons) em torno da camada K do nitrogênio desta proteína em fase sólida.

### **2.2.1 Danos causados por radiação**

Danos físicos e químicos induzidos por elétrons podem limitar severamente a quantidade e a qualidade de informação que pode ser obtida sobre biomoléculas a partir de técnicas experimentais importantes como microscopia eletrônica, difração de elétrons, microscopia de raios X e difração de raios X [22], [23]. Quando são elétrons as partículas a interagirem com a matéria (difração de elétrons, microscopia eletrônica, espectroscopia por perda de energia de elétrons e outras), o espalhamento inelástico dá lugar a outros elétrons, alguns lentos e alguns rápidos, assim como radicais, espécies iônicas e elétrons secundários de baixa energia (<30eV). Esses elétrons secundários de baixa energia tem papel decisivo nas modificações químicas que ocorrem em amostras biológicas e têm sido alvo de muitos estudos importantes [24]. Com fótons na faixa de 0,1 a 12 keV, a fotoemissão torna-se o processo dominante e novamente elétrons lentos e rápidos serão produzidos e interagirão com as amostras. Lembremos que fótons de 12 keV correspondem aproximadamente a fótons com comprimento de onda de 1Å

---

<sup>1</sup> Nox = Número de oxidação. Número que representa o estado de oxidação de um átomo. Para um íon, ele é igual a carga positiva ou negativa do íon; para átomos ligados covalentemente, ele é um número positivo ou negativo atribuído ao átomo mais eletronegativo; em elementos livres, é igual a zero [68].

comumente utilizados em laboratórios de radiação síncrotron para análises de cristalografia de raios X em proteínas [13].

Considerando os principais constituintes atômicos dos aminoácidos, proteínas e ácidos nucleicos (carbono, nitrogênio, oxigênio e enxofre), nota-se que a fotoabsorção em camada interna pode dar origem a elétrons lentos ou rápidos (energia cinética desde centenas de eV a alguns keV). É preciso levar em consideração que enquanto elétrons de baixa energia basicamente interagem com a superfície das amostras, elétrons de energia intermediária penetram mais profundamente. Em uma publicação recente, Barnett e colaboradores [25] chamam atenção para a relevância desta propriedade para o estudo da sobrevivência de biomoléculas no meio astrofísico. Neste estudo, usando um canhão de elétrons, foi reportado que de em uma faixa de 0,1 a 2,0 keV a profundidade do dano aumenta linearmente em aproximadamente 110nm por 1keV. Estas informações são extremamente importantes para o estudo de danos em biomoléculas induzidos por elétrons de energia intermediária.

## CAPÍTULO 3 - OBJETIVOS

---

Devido à extrema importância das biomoléculas contendo enxofre, tal como a insulina no metabolismo humano, esta tese tem como objetivo principal estudar os danos causados por radiações ionizantes nestes compostos com ênfase na análise da possível clivagem de ligações enxofre-enxofre. Essas ligações desempenham papel relevante na estabilidade de proteínas contendo enxofre.

No LIFE, situado no Instituto de Química da UFRJ, realizamos análises de emissão de gases pelas amostras biológicas quando irradiadas com um canhão de elétrons. Para estas análises, montamos um sistema experimental consistindo fundamentalmente de uma câmara com sistema de vácuo, um canhão de elétrons e um espectrômetro de massas quadrupolar. Os testes de funcionamento deste sistema foram efetivados empregando-se amostras de PVC.

No LNLS, situado em Campinas, SP, foram realizadas medidas de fotoabsorção em torno da borda 1s do enxofre, 1s do nitrogênio e 1s do oxigênio com o objetivo de caracterizar o dano induzido em amostras sólidas de cisteína, cistina e insulina. Possíveis modificações estruturais das amostras foram analisadas obtendo-se espectros de XPS antes e após irradiações com feixes de elétrons ou com a luz síncrotron.

Dada a complexidade da insulina, iniciamos o estudo espectroscópico de compostos contendo pontes dissulfeto utilizando como protótipo a menor molécula orgânica que possui esta ligação: o dimetil dissulfeto, DMDS.

Foram investigados os padrões de fragmentação da molécula de DMDS em torno da borda S 2p através de medidas de coincidência elétron-ion, de fotoabsorção e fotoionização no laboratório de luz síncrotron francês SOLEIL, na linha de luz PLEIADES. Foram basicamente usadas duas montagens experimentais: uma baseada num analisador de energia de elétrons hemisférico (Scienta), para análise em alta-resolução de fotoelétrons, e outra na montagem EPICEA (analisador de elétrons Auger com seus íons, resolvidos em energia e ângulo). O EPICEA permite o estudo de coincidências elétron-íon, caracterizando simultaneamente a energia de elétrons e o tempo de voo de fragmentos iônicos relacionados ao mesmo evento de interação de radiação com a matéria. O conjunto de resultados no EPICEA permite a

construção de espectros de massa por energia do fóton, espectros tipo MSPES (Espectro de fotoelétrons com massa selecionada) e espectros de massa, por energia do fóton e por faixa de energia dos elétrons. As três dimensões de análise – energia do fóton, energia dos elétrons e tempo de voo dos fragmentos iônicos – permitem avaliar o padrão de formação dos íons gerados a partir da fragmentação do DMDS.

Finalmente, no laboratório francês SOLEIL, com o objetivo de obter informações espectroscópicas sobre a fotoionização da molécula de insulina em um determinado estado multiplamente carregado, fez-se uso da espectrometria de massas. Uma fonte de íons do tipo ESI (ionização por eletrospray) acoplada à linha de luz PLEIADES, nos permitiu estudar, pela primeira vez, a excitação da insulina em torno da borda 1s do carbono em fase gasosa.

## CAPÍTULO 4 - EXPERIMENTAL

---

Neste capítulo, serão abordadas as principais características dos dois laboratórios de luz síncrotron utilizados para as medidas das amostras envolvidas na tese (LNLS e SOLEIL) bem como a descrição das linhas de luz, as técnicas utilizadas nos dois laboratórios e a descrição das metodologias experimentais.

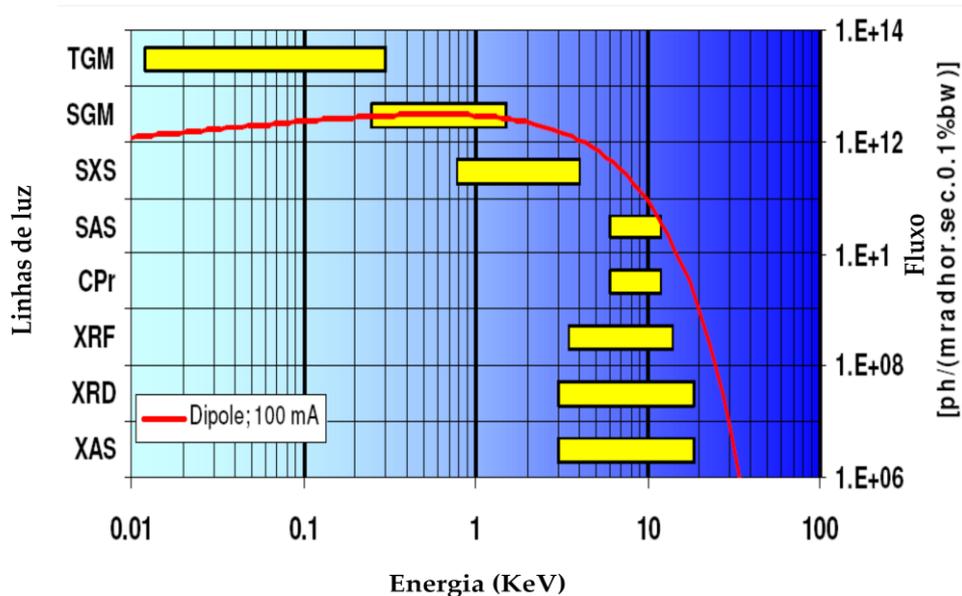
### 4.1 O Laboratório Nacional de Luz Síncrotron LNLS

A luz síncrotron é uma radiação eletromagnética emitida por elétrons de alta energia produzidos num acelerador de partículas. Abrange uma ampla faixa do espectro eletromagnético, ou seja, do infravermelho (0,1 eV) até o raio X, da ordem de dezenas de keV. Neste intervalo, estão incluídos o ultravioleta e o visível. Em geral, um laboratório de luz síncrotron, é constituído por cinco partes fundamentais: um acelerador linear, um acelerador circular intermediário, um anel de armazenamento, as linhas de luz e suas respectivas estações de trabalho. O acelerador linear do LNLS acelera elétrons com energia de 120 MeV (Figura 4.1). O acelerador circular intermediário, também chamado de *booster*, é constituído por câmaras de vácuo, ímãs dipolares e cavidades de rádio-freqüência. Possui 34 metros de perímetro e é utilizado para receber os elétrons provenientes do acelerador linear e ampliar a sua energia antes da inserção no anel principal. Após atingirem uma energia de 500 MeV, os elétrons são direcionados ao anel de armazenamento, que possui 93,2 m de circunferência. Os elétrons ao circularem nesse anel são reacelerados até atingir uma energia aproximada de 1,37 GeV [26], [27].



**Figura 4.1** Vista superior do anel de armazenamento do LNLS

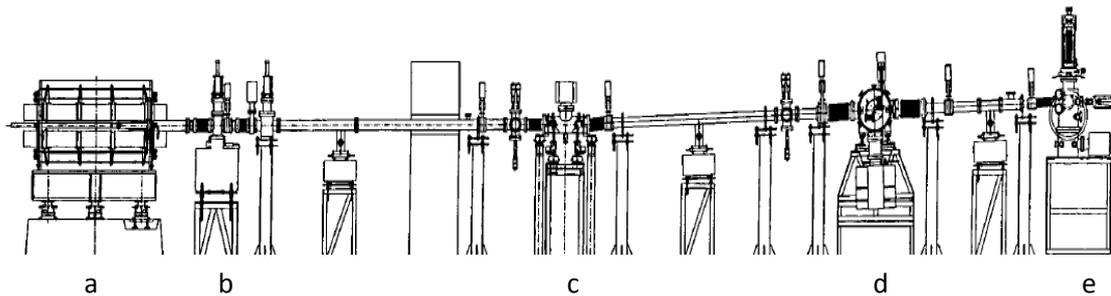
Os feixes de fótons (luz síncrotron), gerados pelos elétrons, que circulam no anel de armazenamento, são direcionados para as câmaras de experiências através de linhas de luz nas quais uma faixa de energia é selecionada para ser utilizada nas estações experimentais, através do uso de um monocromador. Na Figura 4.2 encontram-se características técnicas de fluxo, intensidade e faixas de energias de algumas das linhas de luz de Campinas.



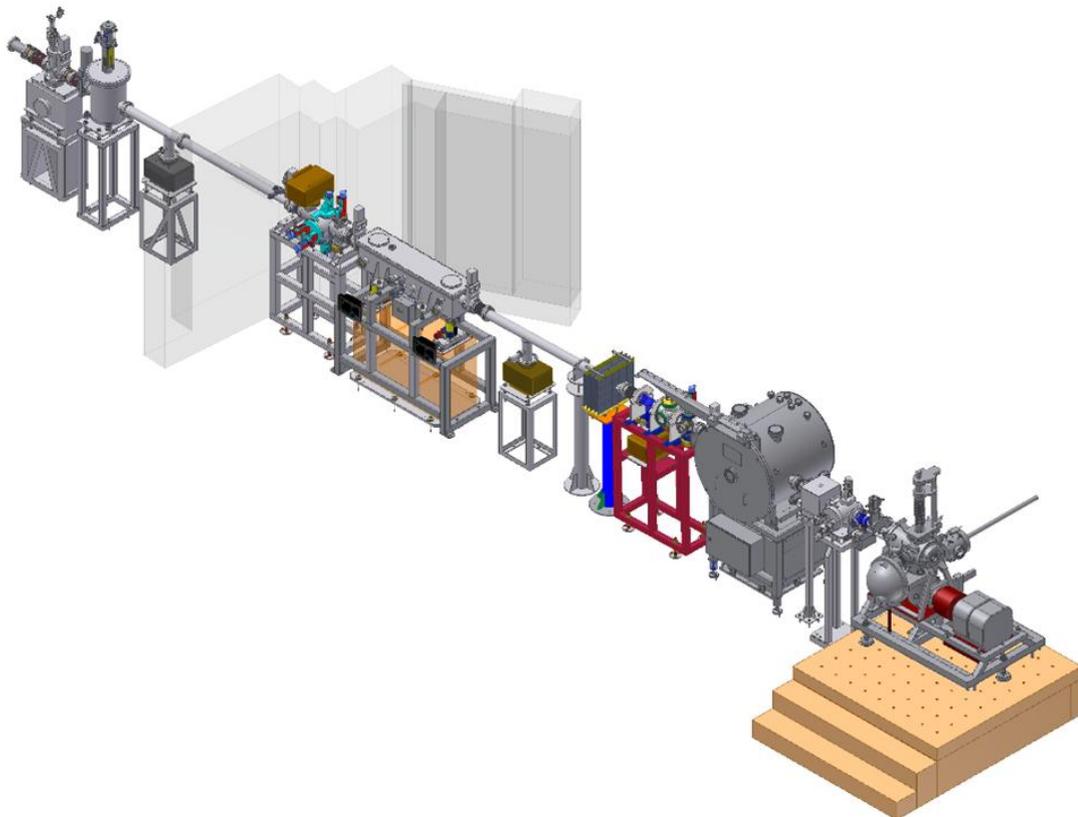
**Figura 4.2** Características das linhas de luz do LNLS

### 4.1.1 Linha de luz SXS

A linha de luz SXS (*Soft X-ray Spectroscopy*) é instalada em uma fonte de ímãs de deflexão no anel de armazenamento. Os componentes da linha, mostrados na Figura 4.3, correspondem a: (a) ímãs de deflexão (b) sessão inicial, (c) espelho focalizador (d) monocromador de duplo cristal e (e) estação de trabalho.



**Figura 4.3** Componentes da linha de luz SXS



**Figura 4.4** Visão em 3D dos componentes da linha de luz SXS, mostrando apenas os componentes b, c, d, e correspondentes à Figura 4.3



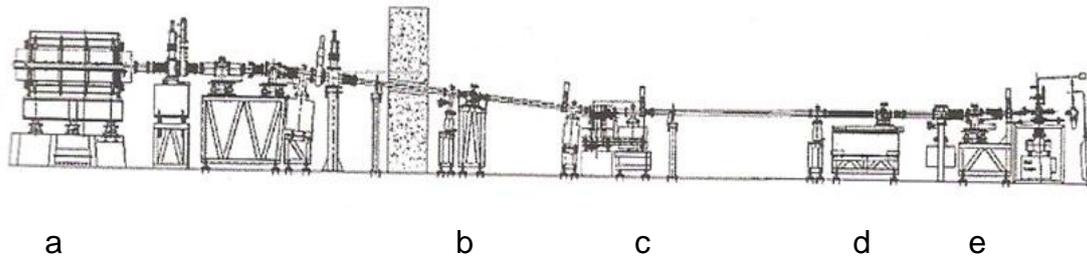
**Figura 4.5** Linha de luz SXS

A linha SXS (Figura 4.5) opera na faixa de raios X moles, de 900 a 5500 eV, com resolução em energia de  $\Delta E = 0,45$  eV a 900 eV ( $E / \Delta E = 2000$ ),  $\Delta E = 0,9$  eV a 5500 eV ( $E / \Delta E = 6000$ ) e tamanho de feixe (Horiz.xVert.) 3,0 mm x 1,0 mm. Devido à faixa de energia de trabalho, a SXS é a linha de luz ideal para estudos espectroscópicos em torno da borda 1s do enxofre, pois o pico de absorção máxima correspondente à camada K do enxofre possui energia em torno de 2472 eV. A linha SXS possui um monocromador duplo cristal, com altura de feixe de saída constante [28], [29]. Neste trabalho, as medidas foram feitas utilizando os cristais de antimoniato de índio (InSb) (faixa de energia: 1680 a 5500 eV) e Si (faixa de energia: 2010 a 5500 eV). Nesta linha de luz foram feitas também análises de emissão de gases, medidas de XPS e de fotoabsorção em torno da borda 1s do enxofre para as amostras de cisteína, cistina e insulina.

#### **4.1.2 Linha de luz SGM**

A linha SGM (*Spherical Grating Monochromator*) permite medidas na faixa de energia de raios X moles (250-1000eV), com resolução espectral  $E/\Delta E$  melhor que 3000 [30]. O monocromador consiste de duas grades esféricas que delimitam, cada uma, intervalos de energia iguais a 250-500 eV e 500-1000eV. Os elementos

focalizadores constituem-se de espelhos esféricos e toroidais. Um esquema da linha SGM é apresentado na Figura 4.6 destacando seus principais elementos: (a) dipolo magnético, (b) fenda de entrada, (c) monocromador, (d) fenda de saída, (e) estação experimental.



**Figura 4.6** Componentes da linha de luz SGM

## 4.2 O Laboratório de Luz Síncrotron Francês SOLEIL

O SOLEIL (Figura 4.7) atualmente possui 26 linhas de luz em operação desde 2009. Seu funcionamento é similar ao descrito anteriormente para o LNLS. Um feixe de elétrons extremamente fino emitido por um canhão de elétrons é acelerado em um acelerador linear (LINAC) de 16 metros de comprimento. Os elétrons atingem um primeiro nível de energia igual a 100 MeV.

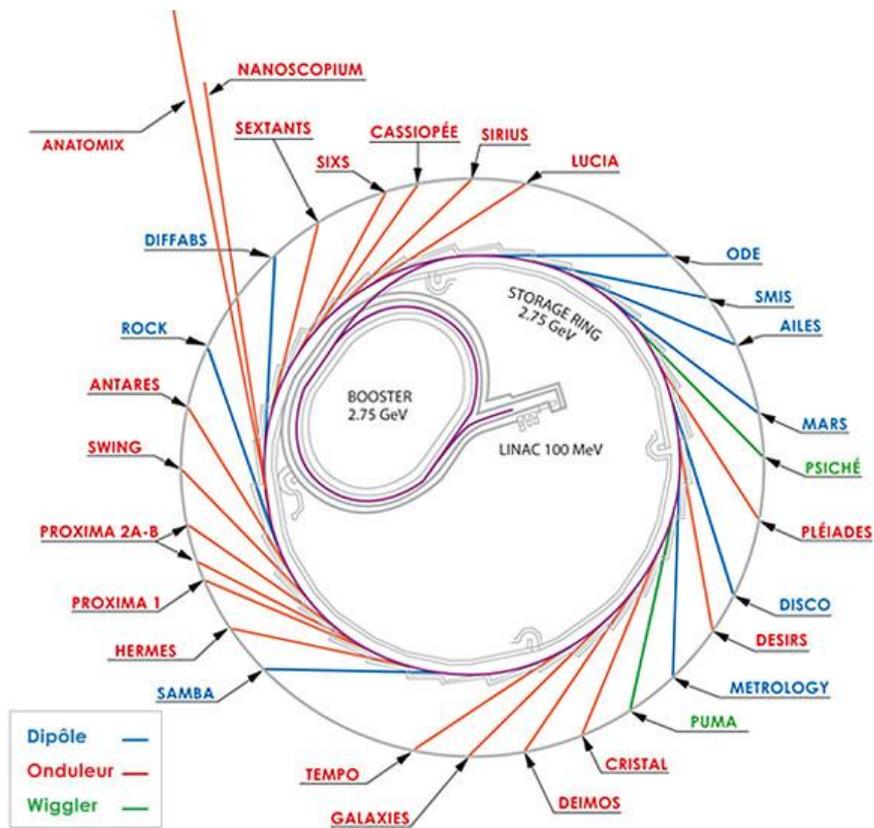
Após esta primeira aceleração, o feixe de elétrons é dirigido para um segundo acelerador circular (*Booster*) que possui a energia de funcionamento do SOLEIL: 2,75 GeV. Neste nível de energia, os elétrons são injetados em um anel de armazenamento de 354 metros de circunferência (113 metros de diâmetro) onde permanecem girando por horas. No Soleil, a corrente do feixe no anel de armazenamento permanece constante devido às injeções frequentes de elétrons, conhecido como injeção do tipo *Top-up* [31].

Ainda no anel de armazenamento, dispositivos magnéticos como dipolos, onduladores e *wigglers*, desviam a trajetória dos elétrons ou os fazem oscilar, perdendo energia sob a forma de luz. Esta energia perdida é compensada por cavidades de radiofrequência. A luz síncrotron produzida nos dipolos e elementos de inserção (onduladores e *wigglers*) é dirigida, selecionada e condicionada por

sistemas ópticos para as estações experimentais até as linhas de luz (Figura 4.8) [32].



**Figura 4.7** Vista superior do SOLEIL (St. Aubin – França)

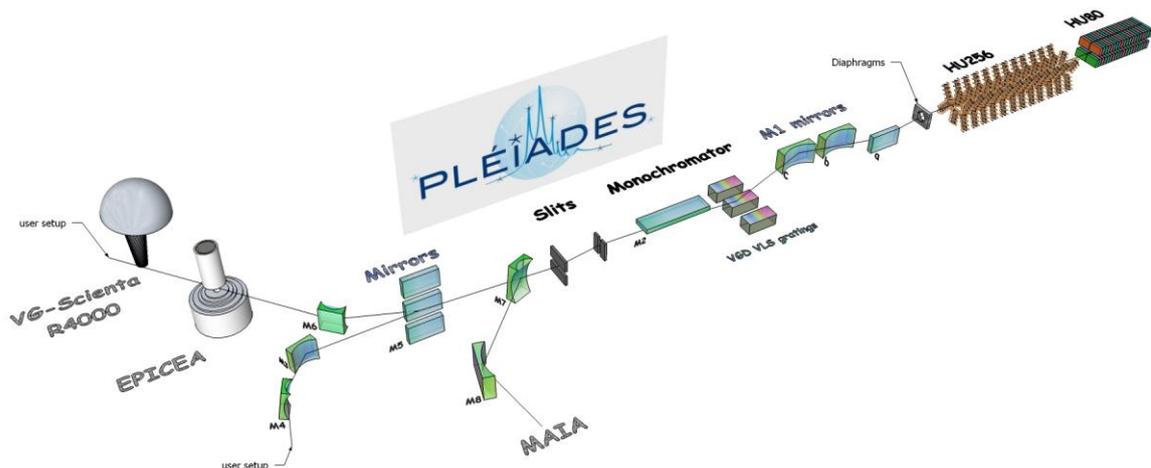


**Figura 4.8** Esquema da distribuição das linha de luz no SOLEIL

### 4.2.1 Linha de luz PLEIADES

A PLEIADES (Figura 4.9) é uma linha de luz de raios X moles de ultra alta resolução com cobertura espectral de 10 a 1000 eV e poder de resolução de 100.000 em 50 eV [32]. Ela é dedicada a estudos de física atômica e molecular em fase diluída (átomos, moléculas, íons, agregados, moléculas adsorvidas sob superfícies). Todos os estados de polarização horizontal, vertical, linear, circular e elíptica estão disponíveis a partir de 55 eV, graças ao ondulator de ímãs permanentes de 80 mm de período. Polarizações lineares horizontal e circular estão disponíveis a partir de 10 eV, graças a um segundo ondulator (256 mm de período) eletromagnético.

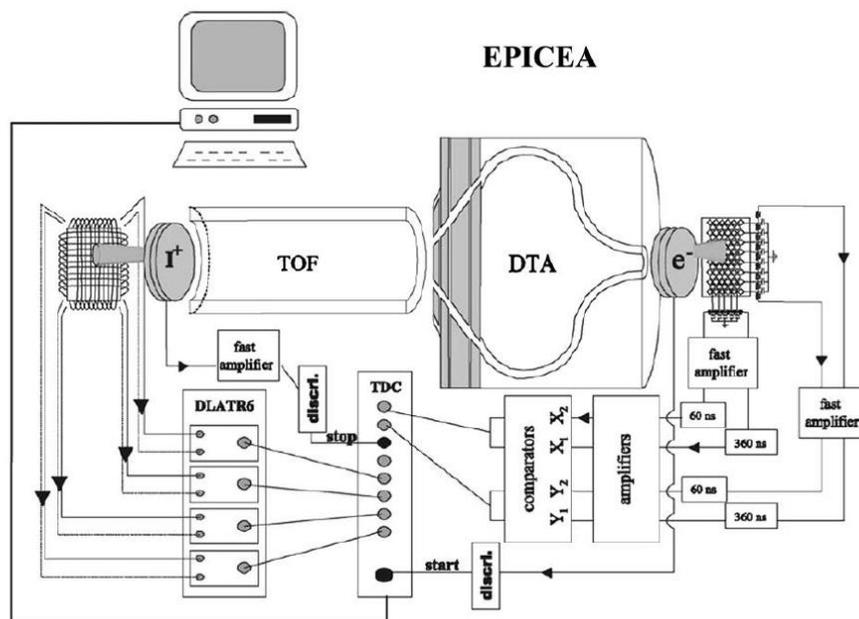
Na concepção da linha, três montagens experimentais estão instaladas de forma permanente na linha: um espectrômetro de elétrons de alta resolução (Scienta R4000), uma montagem de coincidência entre elétrons Auger e íons resolvidos em energia e ângulo (EPICEA) e uma montagem que permite o estudo de fotoionização de íons positivos e negativos (MAIA). Esta linha permite ainda a inserção de outras montagens experimentais dedicadas ao estudo de biomoléculas, como por exemplo o MPSC (*Multi Purpose Source Chamber*) e o aparato comercial de espectrometria de massas *Tandem (Ion Trap)*.



**Figura 4.9** Desenho esquemático da linha de luz PLEIADES

#### 4.2.1.1 EPICEA

O EPICEA (Figura 4.10) é um módulo instrumental que permite simultaneamente a caracterização da energia de elétrons e do tempo de voo de fragmentos iônicos relacionados ao mesmo evento de interação de radiação com a matéria, em uma técnica conhecida como ES-AEPICO (*Energy-Selected-Auger Electron Photoion Coincidence*). Ao se caracterizar os elétrons e fragmentos iônicos gerados no mesmo evento, o estado quântico do cátion é caracterizado, tendo-se acesso a uma ferramenta valiosa no estudo da dinâmica de fragmentação de moléculas excitadas/ ionizadas a partir da camada interna. O sistema EPICEA pode ser dividido em duas partes: um espectrômetro de elétrons duplo-toroidal (DTA) e um analisador de íons do tipo tempo de voo, sincronizados por um conversor de tempo digital (placa TDC - *Time-to-Digital Converter*).



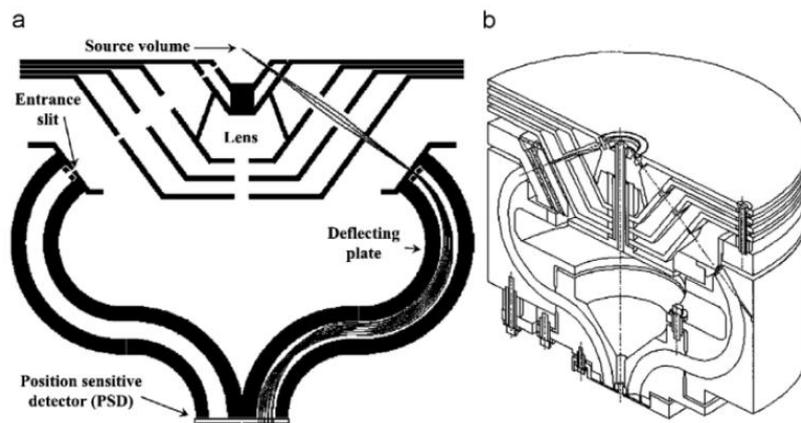
**Figura 4.10** Desenho esquemático do EPICEA

O DTA (Figura 4.11) foi desenvolvido com objetivo de ter uma grande eficiência na coleta dos elétrons, especialmente os de alta energia. Sua geometria toroidal foi idealizada de modo a permitir a coleta de elétrons num ângulo sólido cerca de dez vezes superior ao dos analisadores de energia de elétrons tradicionais. Nos testes,

atingiu-se uma resolução  $E/E = 5000$  e uma resolução de 180 meV com elétrons Auger [33].

Seu princípio de funcionamento baseia-se na aplicação de um campo elétrico toroidal dispersivo, onde os elétrons são dispersos de acordo com suas energias cinéticas, e na posterior diminuição da energia dos elétrons até a energia de análise (energia de passagem) por quatro lentes cônicas eletrostáticas [34]. Na Figura 3.10, pode-se observar o DTA em detalhes. Na parte (a), tem-se a simulação das trajetórias dos elétrons e na parte (b), a visão tridimensional do equipamento.

No DTA, a amostra, introduzida no sistema em fase gasosa através de uma agulha fina, interage com a radiação (*Source volume*, Figura 4.11), produzindo íons e elétrons. Os elétrons passam através de elementos colimadores e de focalização (*lens*) e atingem a fenda de entrada (*entrance slit*). Quatro defletoras toroidais (*deflecting plate*) dispersam o feixe, de acordo com as energias cinéticas dos elétrons, que depois são focalizados no detector sensível à posição (PSD). Através do PSD, podemos obter informações a respeito da energia e distribuição angular dos elétrons.

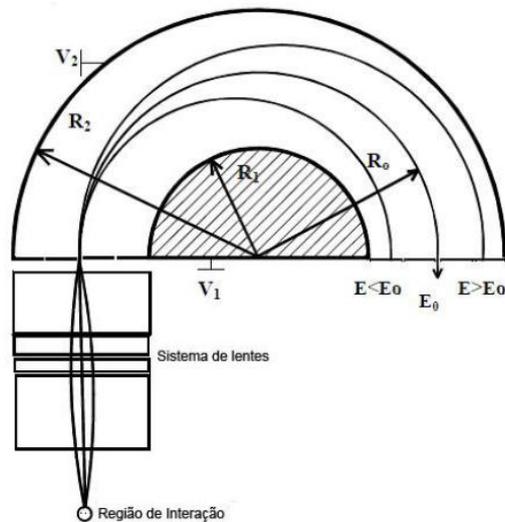


**Figura 4.11** (a) Simulação das trajetórias dos elétrons no Epicea e (b) esquema tridimensional do espectrômetro (b) [34]

Assim que um elétron é detectado, uma voltagem de extração pulsada acima de 1,8 keV é aplicada na região de ionização e extrai os cátions para o tubo de voo, onde os fragmentos iônicos são separados de acordo com a relação massa/carga. A aplicação de um campo pulsado após a detecção dos elétrons tem o objetivo de minimizar a perturbação que este campo causa na análise da energia dos elétrons. No sistema EPICEA apenas são considerados os íons em coincidência com os elétrons detectados, na faixa de energia limitada pelo PSD determinada em cada experimento.

#### **4.2.1.2 Scienta**

O Scienta R4000 é um analisador de energia de elétrons hemisférico, comercial, de alta resolução utilizado para a aquisição de espectros de fotoelétrons, com resolução que pode chegar a frações de meV [35]. Nesse tipo de analisador, de acordo com a Figura 4.12, os elétrons formados na região de interação são conduzidos por um sistema de lentes e adentram uma região formada por duas semiesferas concêntricas, de raios  $R_1$  e  $R_2$ , com campo elétrico gerado pelos potenciais elétricos  $V_1$  e  $V_2$ . Assim, apenas os elétrons de energia cinética  $E_0$  percorrem a trajetória circular completa atingindo o detector [7]. A mudança gradual dos potenciais  $V_1$  e  $V_2$  permite a passagem de elétrons de diferentes energias cinéticas, proporcionando a varredura em uma faixa de energia cinética.



**Figura 4.12** Esquema de funcionamento de um analisador hemisférico (adaptado de [36])

#### 4.2.1.3 Ion Trap

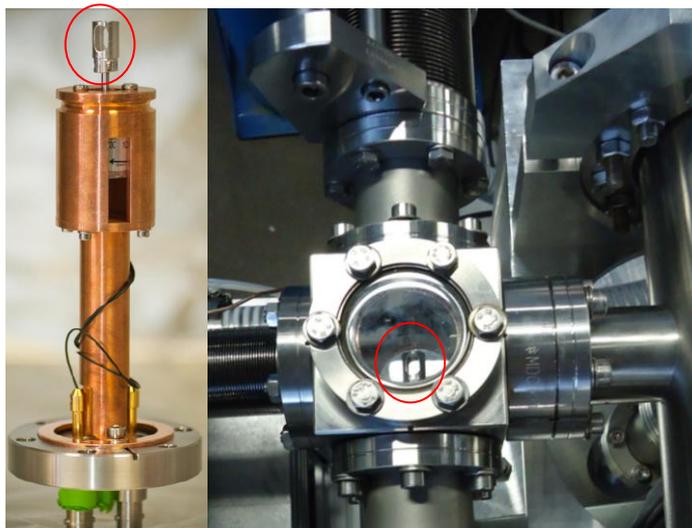
As medidas de insulina em fase gasosa foram feitas utilizando-se um espectrômetro de massas comercial quadrupolo linear do tipo *ion trap* (Thermo Finnigan LTQ XL) acoplado à linha de luz PLEIADES e equipado com uma fonte de ionização por eletrospray, conforme Figura 4.13.

A maioria dos experimentos espectroscópicos na região dos raios X envolvendo moléculas biológicas, como aminoácidos e proteínas, são adquiridos em fase sólida, sob a forma de filmes finos ou em fase líquida [37]. A montagem experimental envolvendo o acoplamento de um quadrupolo linear do tipo *ion trap* em uma linha de luz de raios X moles possibilita a obtenção de informações espectroscópicas provenientes de moléculas biológicas isoladas em fase gasosa. Neste estado físico, interferências como carregamento devido à superfície de deposição de amostras sólidas ou efeitos de solvente em amostras líquidas são inexistentes.



**Figura 4.13** *Ion trap* acoplado à linha de luz PLEIADES

Este sistema experimental formado pelo alinhamento do espectrômetro de massas ao feixe de luz síncrotron, conhecido como espectrometria de massas *Tandem* ( $MS^2$ ), baseia-se no isolamento e subsequente ionização do íon de interesse (íon precursor). A espectrometria de massas *Tandem* ou sequencial consiste em uma técnica na qual fragmentos do íon de interesse são gerados por dissociação induzida por colisão (CID, do inglês *collision-induced dissociation*), ou seja, pela colisão de espécies iônicas moleculares com uma molécula de gás (neste caso o hélio) em uma câmara de colisão [38]. Esta técnica tem por objetivo acessar propriedades físicas de moléculas biológicas de alto peso molecular ionizadas e isoladas em vácuo. O funcionamento deste sistema experimental baseia-se na introdução dos íons pela parte frontal do espectrômetro enquanto a radiação síncrotron chega diretamente no *ion trap* pela parte de trás do equipamento. Uma câmara com bombeamento diferencial equipada com uma bomba turbomolecular foi acoplada para compensar a diferença de pressão entre a linha de luz ( $10^{-8}$  mbar) e o LTQ ( $10^{-5}$  mbar devido a presença de Hélio na câmara principal). Um dispositivo que permite a passagem da luz em intervalos de no mínimo 1 milissegundo chamado *shutter* [39] também foi acoplado entre a linha de luz e o espectrômetro (Figura 4.14).



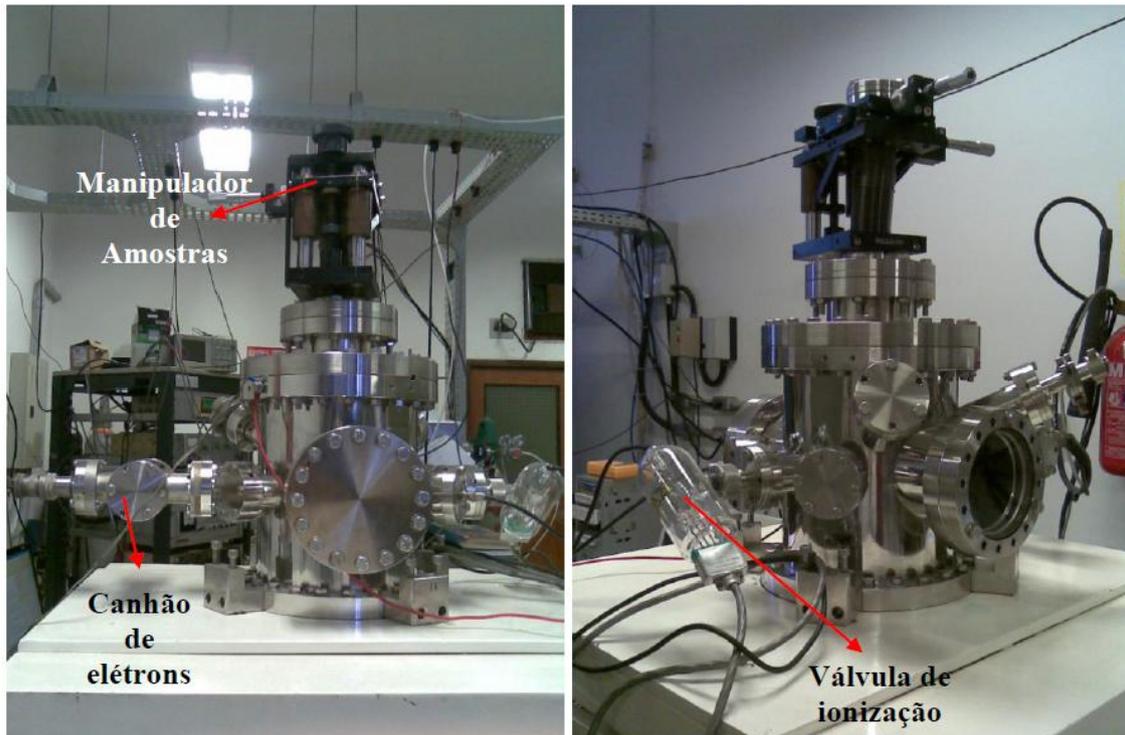
**Figura 4.14** Imagem do *shutter* montado em uma flange DN40CF (esquerda) (adaptado de [39]) e acoplado entre o *ion trap* e a linha de luz (direita)

### 4.3. Metodologia Experimental – Biomoléculas

#### 4.3.1 – Desenvolvimento do método para irradiação de biomoléculas

O desenvolvimento de uma técnica para irradiar amostras sólidas e analisar os gases emitidos durante o processo de irradiação foi desenvolvida no LIFE – IQ/UFRJ utilizando-se inicialmente amostras de polímeros.

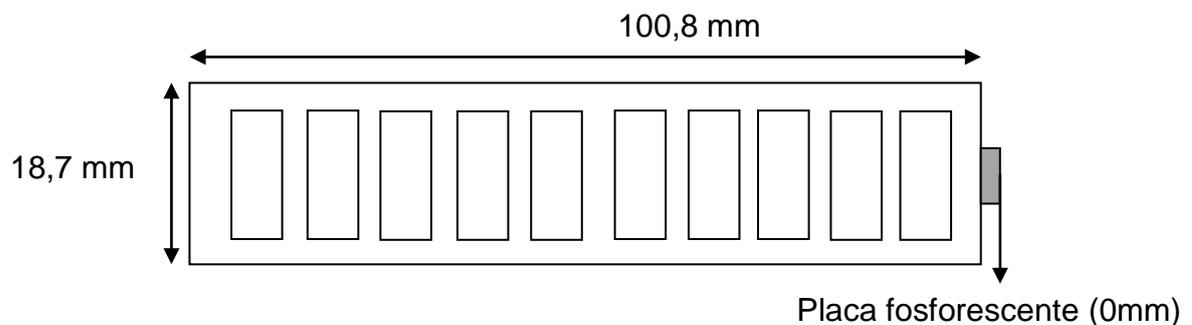
A irradiação de amostras com elétrons foi efetuada utilizando um canhão de alta emitância, da marca Kimble e os gases emitidos como consequência da irradiação das amostras foram monitorados utilizando um analisador de gás residual (RGA200, marca SRS) . Os testes de irradiação foram realizados no Laboratório de Impacto de Elétrons utilizando-se uma câmara de alto vácuo (Figura 4.15). Foram feitos vários testes variando-se a energia do canhão, a corrente e emissão e o tempo de irradiação (Anexo 1). Consideramos as condições ideais para a irradiação das amostras, levando-se em consideração a focalização do feixe de elétrons, o tempo de irradiação suficiente para que o dano pudesse ser visualizado a olho nu e a intensidade do sinal de cada espécie iônica monitorada no RGA.



**Figura 4.15** Câmara de alto vácuo instalada no LIFE-IQ/UFRJ

#### 4.4.2 – Aplicação da metodologia de irradiação em biomoléculas

As amostras sólidas de cistina, cisteína e insulina (*Sigma Aldrich*, pureza > 98%) foram depositadas sobre fita dupla face para vácuo (*STR tape* da *Shinto Paint Co.*) e aderidas a um suporte metálico frente e verso, com as seguintes características e dimensões, de acordo com a Figura 4.16:



**Figura 4.16** Desenho esquemático do suporte de amostras sólidas

Foram utilizados tanto uma placa fosforescente quanto uma suspensão alcoólica de sulfeto de zinco para visualizar o feixe de luz e posicioná-lo no porta-amostras. Para localizar corretamente as amostras, as distâncias eram medidas utilizando as placas fosforescentes como referência (0 mm). As fitas dupla-face possuíam em média 8,5 mm de comprimento.

As amostras foram irradiadas utilizando um canhão de elétrons acoplado à câmara experimental da linha de luz SXS e espectros de NEXAFS em torno da borda S1s foram adquiridos para as amostras antes e depois da irradiação. As mesmas amostras biológicas foram irradiadas em ordem zero na linha de luz SGM e espectros de NEXAFS em torno da borda O1s e N1s também foram adquiridos antes e depois da irradiação para fins de comparação.

Todos os espectros de fotoabsorção (NEXAFS) foram medidos antes e depois da irradiação, tanto com elétrons quanto com luz. Todos os dados referentes aos espectros de fotoabsorção desta tese foram tratados utilizando o programa BGAUSS [40] e plotados no software OriginPro 8.0. O tratamento dos dados consistiu basicamente de subtração da linha base, desconvolução dos picos utilizando funções gaussianas e funções erro correspondentes aos potenciais de ionização do S1s, N1s e O1s.

#### **4.4. Metodologia Experimental – DMDS**

As medidas envolvendo a molécula de DMDS foram realizadas na linha de luz PLEIADES, no SOLEIL. A montagem experimental utilizada para as medidas de coincidência foi o EPICEA e o Scienta foi utilizado para as medidas de fotoabsorção e fotoelétrons. A amostra de DMDS foi adquirida da Sigma-Aldrich, com 95 % de pureza e foi utilizada sem purificação prévia. A amostra líquida foi acoplada a um sistema de bombeamento de gases que, por diferença de pressão, faz com que a amostra se volatilize e seja admitida dentro da câmara experimental.

As medidas de fotoabsorção do DMDS foram obtidos no modo TEY (*Total electron yield*). Dois espectros foram medidos, um na região de 163,0 eV a 173,0 eV, com passo de 0,5 eV e outro na região 167,6 eV a 170,0 eV, com passo de 0,005

eV. Ambos os espectros foram normalizados em relação à pressão e à intensidade da radiação incidente. A escala de energia foi calibrada a partir do espectro de fotoabsorção do Argônio, que, por sua vez foi calibrado em relação ao espectro de perda de energia na região 2p do Argônio [41]. Em ambos os espectros foram ajustadas uma linha base, duas funções erro (correspondendo aos potenciais de ionização S 2p<sub>3/2</sub> e S 2p<sub>1/2</sub>) [1] e funções gaussianas para as ressonâncias.

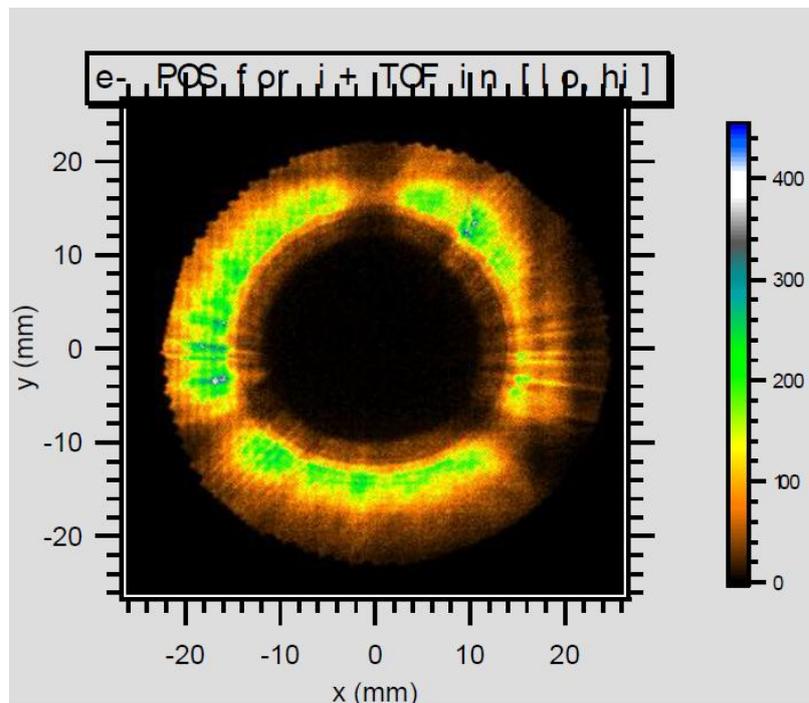
A partir das ressonâncias observadas nos espectros de NEXAFS, foram escolhidas as energias nas quais foram acumulados espectros de coincidência elétron-íon (EPICEA) e espectros de fotoelétrons (Scienta), como indicado na Tabela 4.1.

**Tabela 4.1** Descrição dos valores de energia correspondentes a cada ressonância atribuídas através do espectro de fotoabsorção do DMDS em torno da borda S2p

| <i>Ressonâncias</i>    | <i>Energia (eV)</i> |
|------------------------|---------------------|
| <b>Pré-ressonância</b> | 161,5               |
| <b>Ressonância 1</b>   | 164,6               |
| <b>Ressonância 2</b>   | 165,9               |
| <b>Ressonância 3</b>   | 167,0               |
| <b>Ressonância 4</b>   | 168,1               |
| <b>Ressonância 5</b>   | 169,1               |
| <b>Pós-ressonância</b> | 181,5               |

No sistema Epicea, para cada valor de energia, foram obtidos dados de coincidência de elétrons (discriminados em energia) com íons (caracterizados pelos seus respectivos tempos de voo). A partir desses dados, foram feitos três tipos de análises:

- i) espectros de tempo de voo / massas em cada uma das energias estudadas, sem discriminação de energia dos elétrons;
- ii) espectros MSPES (*Mass-selected photoelectron spectra*) – Espectros de fotoelétrons de massa selecionada, distribuição de energia de elétrons para íons selecionados e por energia do fóton (Pré-ressonância e ressonâncias);
- iii) espectros de tempo de voo / massas estudadas, separados em regiões (Tabela 4.2), na pré-ressonância e nas ressonâncias. A separação em regiões foi realizada de acordo com a distribuição dos elétrons no PSD (Figura 4.17).



**Figura 4.17** Exemplo de resultados obtidos no PSD. A escala de cores (à direita) indica a contagem de elétrons

**Tabela 4.2** Regiões do PSD: relação de raio e energia de ligação.

| Região | Raio do PSD (mm) | Energia de ligação (eV) |
|--------|------------------|-------------------------|
| I      | 11,84 a 13,13    | 8,0 a 10,5              |
| II     | 13,13 a 15,17    | 10,5 a 13,7             |
| III    | 15,17 a 17,02    | 13,7 a 16,3             |
| IV     | 17,02 a 20,0     | 16,3 a 19,7             |
| V      | 20,0 a 21,83     | 19,7 a 21,4             |

Os espectros de tempo de voo obtidos nas análises i e iii foram calibrados para relação linear  $m/z$  através da Equação 4.1, obtendo-se os parâmetros A e B a partir do espectro de tempo de voo da molécula de SF<sub>6</sub>. Além disso, todos os espectros de massa foram corrigidos em relação às falsas coincidências, obtendo-se um espectro através de um gerador de pulsos aleatórios. Os espectros obtidos para a análise ii foram calibrados de raio para energia de ligação dos elétrons, utilizando o fotoelétron emitido no primeiro potencial de ionização do átomo de argônio – 15,8 eV [7] – e posterior ajuste da escala de energia ao primeiro potencial de ionização da molécula de DMDS [42]. Os detalhes desse procedimento já foram descritos anteriormente por R. Bernini [43].

$$TDV = B\sqrt{m/z} + A \quad (\text{Eq. 4.1})$$

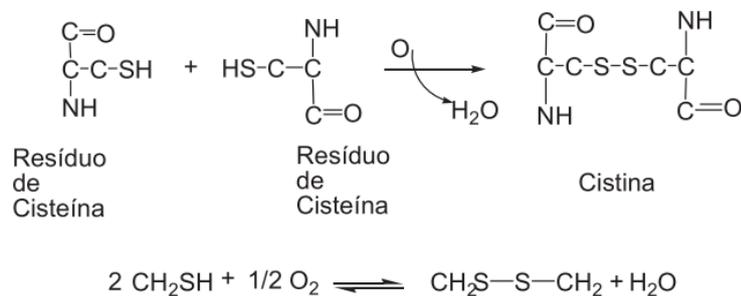
Os espectros de fotoelétrons (Scienta) foram obtidos na Pré-ressonância e nas ressonâncias 1 a 5 em passos de 50 meV, com uma resolução aproximada ( $E/\Delta E$ ) de 400. Um espectro de fotoelétrons foi obtido com maior estatística e com passos de 15 meV com energia de fóton de 181,5 eV. Esse último espectro foi normalizado à energia do primeiro potencial de ionização do DMDS [42] e a energia

de cada pico foi obtida através do ajuste de curvas Gaussianas. As abcissas de todos os espectros de fotoelétrons foram convertidas em energia de ligação.

## CAPÍTULO 5 - BIOMÓLECULAS – ESPECTROMETRIA DE MASSAS, ESPECTROSCOPIA DE FOTOELÉTRONS E FOTOABSORÇÃO

### 5.1 – A ligação dissulfeto

A ligação dissulfeto é fundamental para a manutenção da vida em nosso planeta, sendo responsável pela estabilidade de diversas proteínas como, por exemplo, a insulina, a tripsina, a ribonuclease A e a acetilcolinesterase. As pontes dissulfeto estabilizam as estruturas terciárias das proteínas, especialmente aquelas presentes em ambientes extracelulares, onde estão sujeitas a estresse químico e físico [44], [45]. Essas pontes são normalmente formadas pela oxidação entre duas moléculas de cisteína em posições não vicinais, o que resulta em uma molécula de cistina (Figura 5.1) [46].



**Figura 5.1** Formação da ponte dissulfeto entre resíduos de cisteína

Um dos danos relevantes causados pela radiação em biomoléculas consiste justamente na quebra das pontes dissulfeto.

A maioria das proteínas que encontram-se no meio extracelular contém pontes dissulfeto. Acredita-se que essas pontes atuam em duas funções distintas:

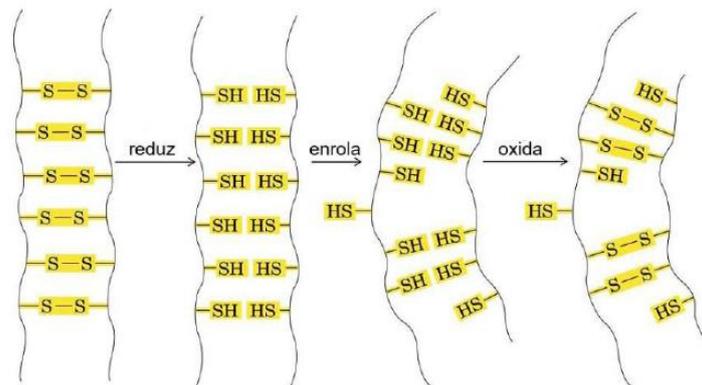
**a)** influenciam a termodinâmica do enovelamento das proteínas: as pontes dissulfeto tanto estabilizam a conformação nativa da proteína estabilizando a forma enovelada

quanto podem diminuir a estabilidade das proteínas enoveladas restringindo energeticamente mudanças conformacionais favoráveis;

**b)** elas mantêm a integridade da proteína: enzimas oxidantes e proteolíticas podem inativar proteínas no ambiente extracelular. Estabilizando a estrutura da proteína, as pontes dissulfeto podem protegê-la de possíveis danos, aumentando sua meia-vida.

Anteriormente, pensava-se que as pontes dissulfeto presentes nas proteínas nativas eram inertes, ou seja, uma vez formadas elas permaneceriam inalteradas durante toda a vida da proteína. Porém, hoje em dia acredita-se que este não seja bem o caso, pois pontes dissulfeto são clivadas em proteínas maduras e este fato traz consequências significativas para a função da proteína [12].

A formação de ligações dissulfeto também é relevante em processos químicos do cabelo já que a  $\alpha$ -queratina – presente em grande quantidade em cabelos e pêlos – é rica em resíduos de cisteína que se ligam através de pontes dissulfeto, dando forma aos cabelos. Em tratamentos estéticos, essas ligações podem ser clivadas e formadas em outras posições, propiciando a modelagem do cabelo na forma desejada (Figura 5.2).

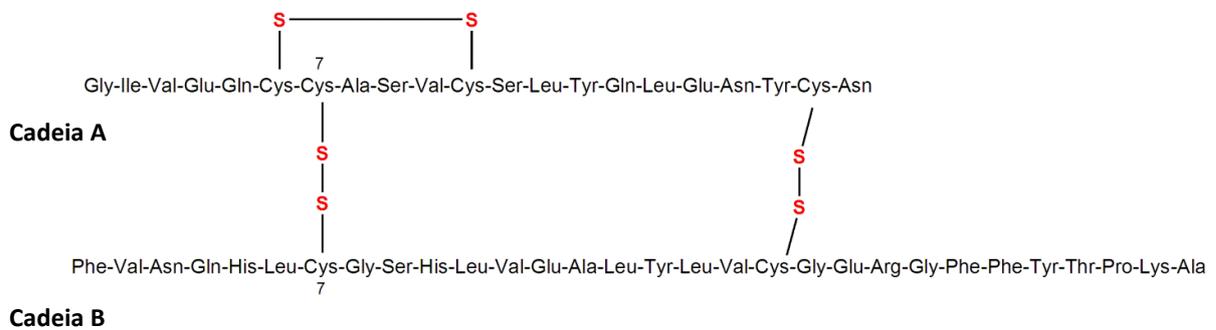


**Figura 5.2** Química das pontes dissulfeto no cabelo [47]

Proteínas regulatórias contendo pontes dissulfeto também podem ser encontradas em plantas, mais especificamente nos cloroplastos. Estas proteínas

são peças chave para sinalizar elementos nos cloroplastos e parecem ser geralmente independente das condições altamente redutoras intra-organelares [48].

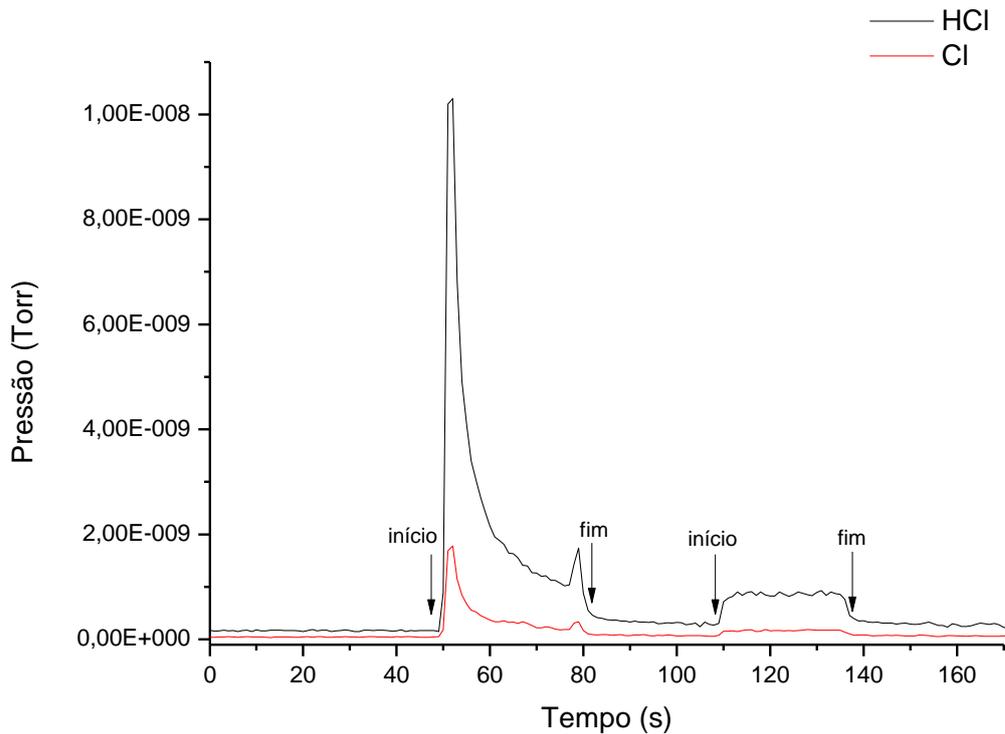
A insulina é um exemplo de proteína que possui pontes dissulfeto em sua estrutura e é extremamente importante para o metabolismo glicolítico. Esta proteína é sintetizada a partir de polipeptídeos simples, que são posteriormente clivados em duas ou mais cadeias que permanecem associadas denominadas cadeias A e B (Figura 5.3). Foi a primeira proteína a ter sua seqüência de aminoácidos determinada, em 1953, por Frederick Sanger.



**Figura 5.3** Estrutura primária da insulina bovina

## 5.2 - Desenvolvimento de metodologia para irradiação de amostras sólidas (LIFE – IQ/UFRJ)

Depois de estabelecidas as condições ideais de energia e corrente do canhão de elétrons (Anexo 1), o polímero utilizado como referência para os estudos de irradiação foi o PVC, pois durante o processo de irradiação, a emissão de HCl é muito expressiva e facilmente caracterizada utilizando tanto a luz síncrotron como fonte de radiação [49] quanto elétrons. Um resultado típico da irradiação do PVC pode ser visto na Figura 5.4.



**Figura 5.4** Espectro de emissão de gases no modo Pressão x tempo do filme de PVC irradiado com elétrons de 1 keV

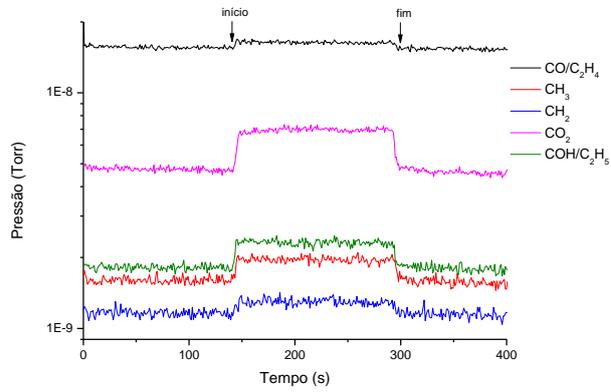
As setas marcadas como “início” e “fim” indicam o início da incidência do feixe sobre a amostra e o fim da irradiação, respectivamente.

A montagem experimental destinada ao estudo da emissão de gases foi a seguir utilizada na análise de estruturas poliméricas híbridas, numa colaboração com o grupo de Lavras do Professor Teodorico C. Ramalho.

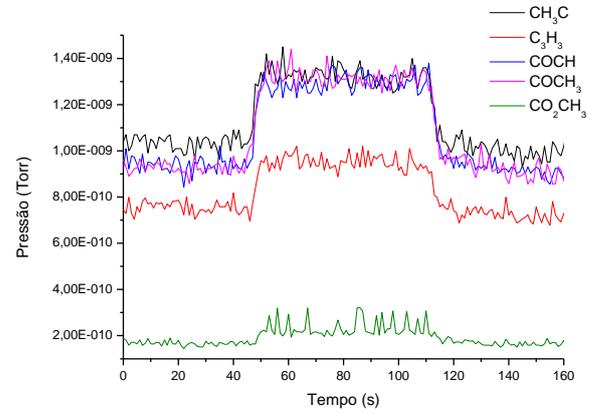
Os espectros de emissão de gases das amostras de PMMA puro e dos híbridos contendo 0,1; 0,5 e 2,5 % de magnetita podem ser observados no Anexo 2. Apenas para fins de comparação, são apresentados nas Figuras 5.5 e 5.6 os espectros de amostras de PMMA e do híbrido contendo 2,5% de magnetita respectivamente [50].

As espécies apresentadas nos espectros de emissão de gases dos polímeros foram separadas em grupos para melhor visualização e interpretação.

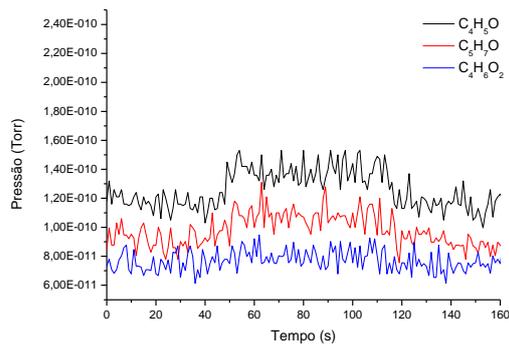
(A)



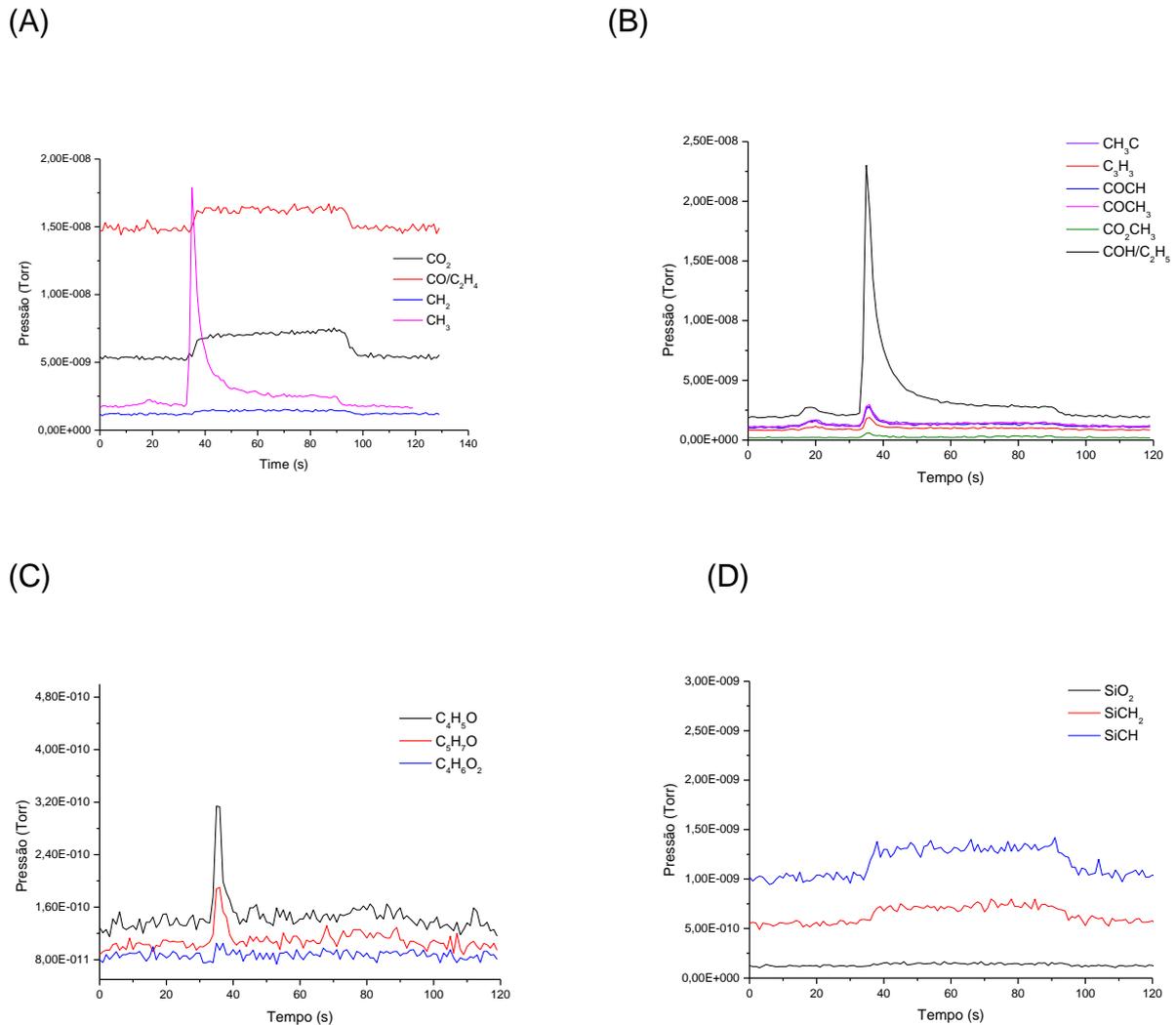
(B)



(C)



**Figura 5.5** Espectros de emissão de gases no modo Pxt do polímero de PMMA. Os espectros foram separados em 3 grupos para melhor visualização da emissão dos gases que emitiram pouco.



**Figura 5.6** Espectros de emissão de gases no modo Pxt do polímero híbrido de PMMA-magnetita 2,5%

As amostras foram irradiadas utilizando um canhão de elétrons com energia igual a 1,2 keV. As análises tinham por objetivo verificar o padrão de fragmentação do polímero e a influência da presença de magnetita na estabilidade do mesmo.

De acordo com o espectro de emissão do PMMA, observa-se a formação de fragmentos de baixo peso molecular como CH<sub>2</sub><sup>+</sup>; CH<sub>3</sub><sup>+</sup>, COH e/ou C<sub>2</sub>H<sub>5</sub><sup>+</sup> e CH<sub>3</sub>C<sup>+</sup> e também de fragmentos maiores como COCH<sup>+</sup> e/ou C<sub>3</sub>H<sub>5</sub><sup>+</sup>; COCH<sub>3</sub><sup>+</sup> e CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub><sup>+</sup>. Como espécies iônicas com m/z acima de 60 são formadas em quantidades desprezíveis, este fato pode indicar que a fragmentação do polímero inicia-se pela

ruptura de espécies menores no final da cadeia polimérica. Provavelmente, a formação de fragmentos correspondentes ao monômero metil metacrilato ( $C_5H_8O_2$ ) ocorra extraindo alto potencial ou aumentando o tempo de exposição do feixe de elétrons. Acredita-se que o principal processo que governa a desorção iônica nesses materiais expostos a elétrons de alta energia seja o processo Auger. Por exemplo, um mecanismo possível para a produção de  $CH_3^+$  seria a quebra da ligação O-CH<sub>3</sub> através da excitação do elétron do O1s. Isto é, a produção mais eficiente de  $CH_3^+$  é observado para a transição O1s (OCH<sub>3</sub>)  $\rightarrow$   $\sigma^*$  (O-CH<sub>3</sub>) enquanto que a produção eficiente do COH<sup>+</sup> é observada para a transição O1s (OCH<sub>3</sub>)  $\rightarrow$   $\sigma^*$  (C-OCH<sub>3</sub>) [51].

Comparando-se os espectros de emissão da amostra de PMMA puro e das amostras contendo magnetita, não é possível observar diferenças significativas nos espectros. Ou seja, a presença de magnetita na estrutura do polímero, mesmo em diferentes concentrações não acarreta aumento da estabilidade do mesmo levando-se em consideração os padrões de fragmentação.

Os resultados obtidos comprovam que a técnica desenvolvida para irradiação das amostras de poliméricas mostrou-se extremamente eficiente e reprodutível. Filmes de PVC foram usados como referência antes de cada análise e o padrão de emissão de HCl mostrou-se o mesmo, utilizando-se as mesmas condições de irradiação em dias diferentes.

Após a otimização do método, a irradiação das amostras biológicas deu-se de forma similar, contando apenas com adaptações devido à natureza das amostras. Enquanto as amostras poliméricas eram depositadas sob a forma de filme em uma fita dupla face aderida à uma placa metálica, as amostras biológicas eram depositadas sob a forma de pó sobre a fita. A reprodutibilidade tanto dos espectros de emissão de gases quanto dos espectros de fotoabsorção das amostras biológicas irradiadas comprovaram que a metodologia desenvolvida para irradiação de amostras sólidas pode ser considerada eficiente, prevendo-se sua aplicação futura em diferentes tipos de amostras.

## 5.3 – Resultados e Discussões

### 5.3.1 - Danos induzidos por elétrons

Os resultados a seguir tratam da irradiação das amostras biológicas com elétrons. Estes experimentos foram realizados na linha de luz SXS e envolveram medidas de emissão de gases, fotoabsorção em torno da borda 1s do enxofre (NEXAFS) e fotoelétrons (XPS).

#### 5.3.1.1 – Emissão de gases

As condições usadas na irradiação das amostras durante as medidas realizadas no LNLS foram as seguintes:

- Energia: 800 eV;
- Corrente: 1,6A;
- Tempo de irradiação: 4 - 5 minutos, com o feixe focalizado diretamente sob a amostra.

As medidas de emissão de gases e NEXAFS foram realizadas sob pressões da ordem de  $10^{-8}$  mbar.

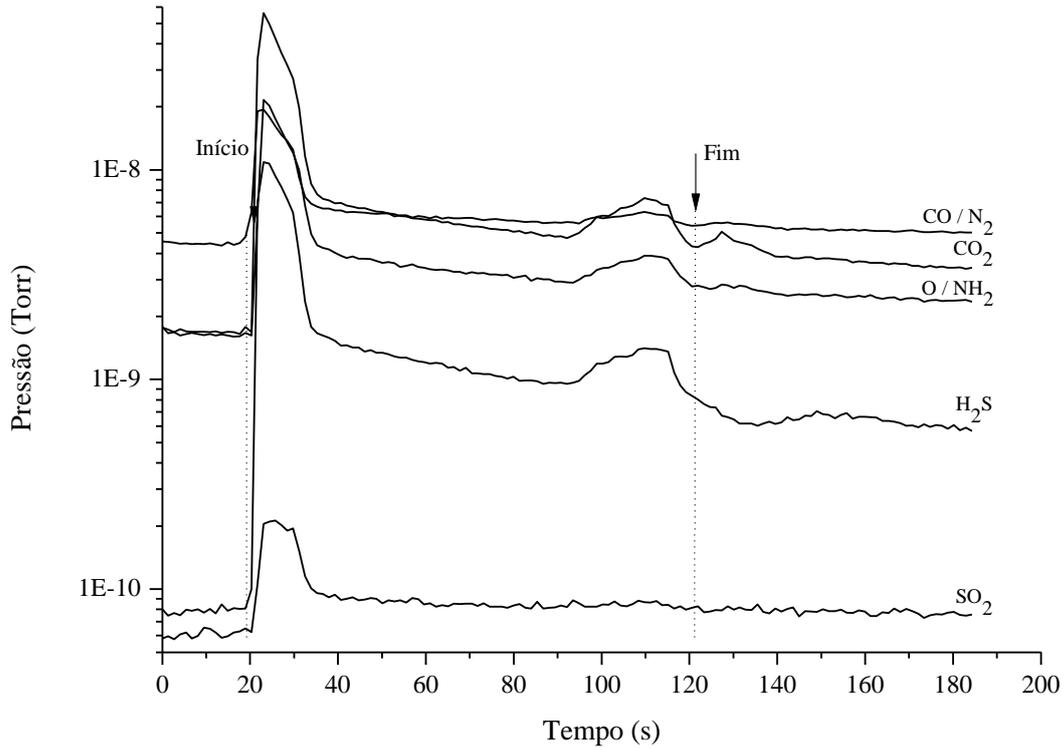
Conforme citado anteriormente, a irradiação de aminoácidos resulta principalmente em processos de desaminação e descarboxilação. Para aminoácidos sulfurados, o processo de desulfurização também é observado [23]. Com o objetivo de avaliar a emissão de gases durante o processo de irradiação das amostras, foram monitoradas cinco espécies iônicas diferentes com os seguintes valores de  $m/z$ : 16, 28, 34, 44 e 64, correspondentes aos íons  $O^+$  /  $NH_2^+$ ;  $CO^+$  /  $N_2^+$ ;  $H_2S^+$ ;  $CO_2^+$  e  $SO_2^+$ , respectivamente.

Embora o valor de  $m/z$  16 corresponda tanto para os íons  $O^+$  quanto para os íons  $NH_2^+$  este valor de massa foi escolhido preferencialmente para o estudo de processos de desaminação no lugar do valor de  $m/z$  17, correspondente ao íon  $NH_3^+$ , devido à grande interferência do íon  $OH^+$  formado pela dissociação da água durante a irradiação.

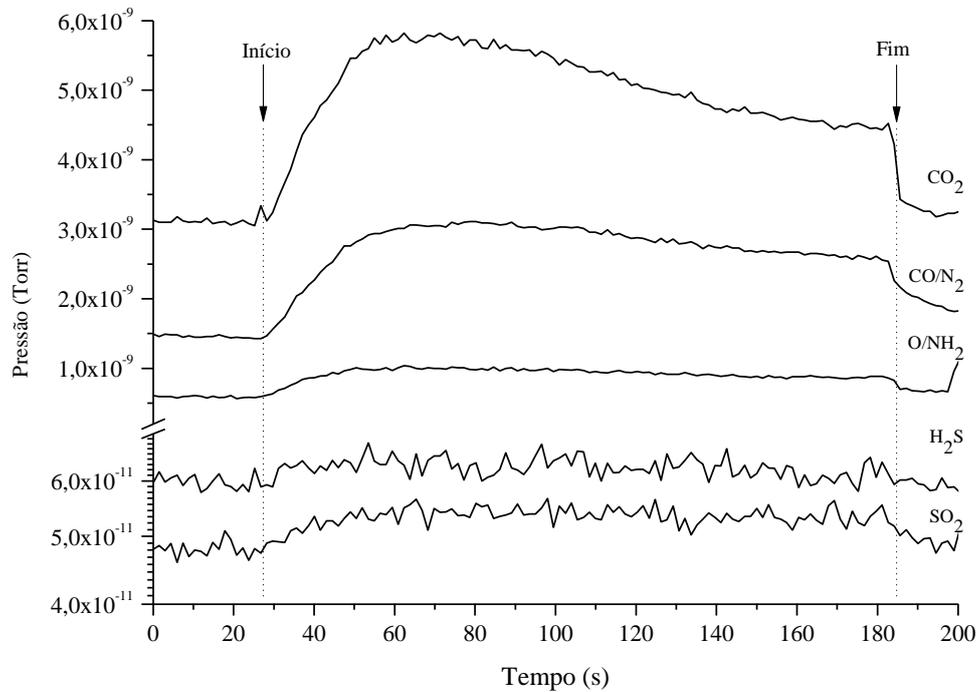
Os processos de descarbonilação e descarboxilação foram verificados através do monitoramento dos íons  $\text{CO}^+$  e  $\text{CO}_2^+$ , enquanto que os processos de desulfurização foram verificados através da investigação dos íons  $\text{SO}_2^+$  e  $\text{H}_2\text{S}^+$ . Como os valores de  $m/z$  para as espécies  $\text{CO}^+$  e  $\text{N}_2^+$  são iguais, assim como para as espécies  $\text{O}^+$  e  $\text{NH}_2^+$ , não é possível fazer uma interpretação totalmente independente dos processos de degradação envolvendo essas quatro espécies iônicas.

Os espectros de emissão de gases (Pxt) das amostras de cisteína, cistina e insulina adquiridos tanto em temperatura ambiente (Figuras 5.7; 5.9 e 5.11) quanto em temperatura criogênica (77K) (Figuras 5.8; 5.10 e 5.12) são apresentados a seguir.

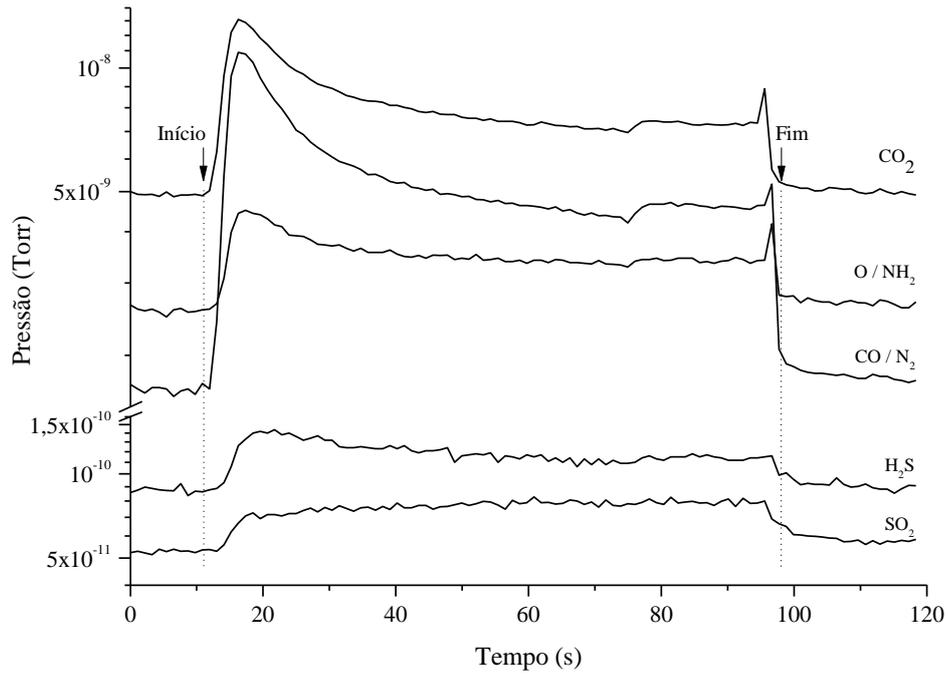
Para cada espectro obtido, foram monitoradas as pressões parciais iniciais dos gases antes da irradiação. Nos espectros, as setas assinaladas como “início”, indicam o instante em que o feixe foi direcionado à superfície das amostras e as setas assinaladas como “fim”, o instante em que o feixe de elétrons foi defletido para longe da superfície das amostras.



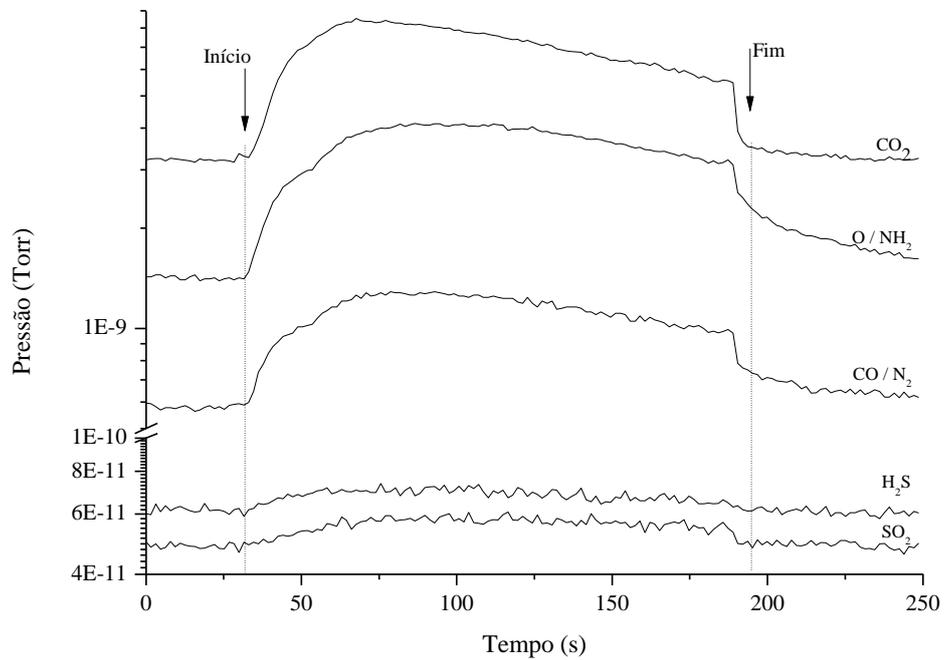
**Figura 5.7** Espectro de emissão de gases (modo Pxt) da cisteína irradiada com elétrons de 800 eV e mantida em temperatura ambiente



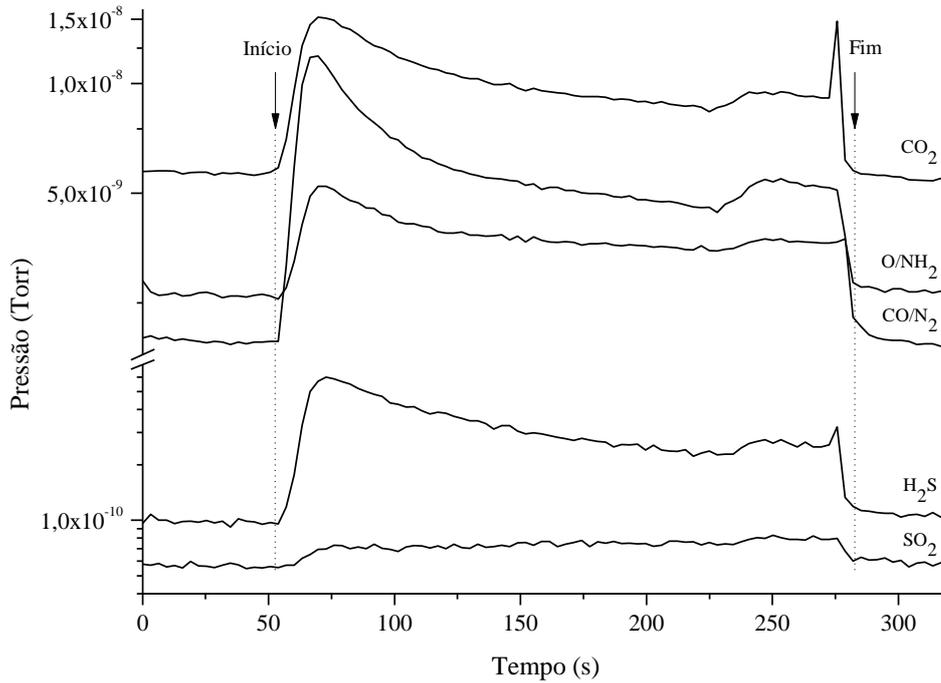
**Figura 5.8** Espectro de emissão de gases (modo Pxt) da cisteína irradiada com elétrons de 800 eV e mantida em baixa temperatura (77K)



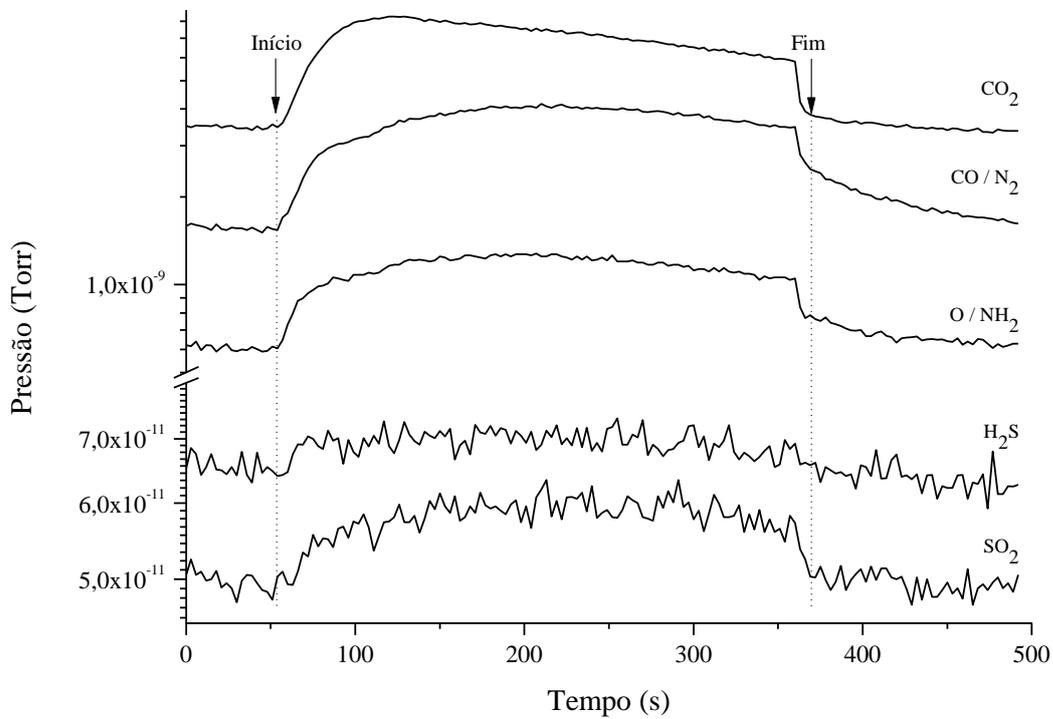
**Figura 5.9** Espectro de emissão de gases (modo Pxt) da cistina irradiada com elétrons de 800 eV e mantida em temperatura ambiente



**Figura 5.10** Espectro de emissão de gases (modo Pxt) da cistina irradiada com elétrons de 800 eV e mantida em baixa temperatura (77K)



**Figura 5.11** Espectro de emissão de gases (modo Pxt) da insulina irradiada com elétrons de 800 eV e mantida em temperatura ambiente



**Figura 5.12** Espectro de emissão de gases (modo Pxt) da insulina irradiada com elétrons de 800 eV e mantida em baixa temperatura (77K)

Em geral, as curvas de emissão de gases para as amostras estudadas tem um comportamento similar: quando a irradiação começa, a pressão parcial dos gases analisados aumenta rapidamente. No final da irradiação, a pressão parcial dos gases retorna aos valores iniciais. Como o processo de irradiação é interrompido desviando-se o canhão de elétrons das amostras, em alguns casos é possível verificar que a pressão parcial aumenta ligeiramente antes de retornar aos valores iniciais, pelo fato do feixe de elétrons passar por uma região não-irradiada da amostra.

Comparando-se as curvas de emissão de gases em relação a diferença de temperatura, observa-se que, no caso da emissão de gases em temperatura ambiente, a curva atinge um máximo instantes após o início da irradiação, decrescendo rapidamente logo após. Já no caso da irradiação a 77K, este decréscimo é mais lento. O comportamento das curvas obtidas em temperatura baixa pode ser um indicativo da influência da temperatura na quebra das ligações e formação dos fragmentos: a contribuição de cada componente cresce mais lentamente e mantem-se praticamente estável durante a irradiação.

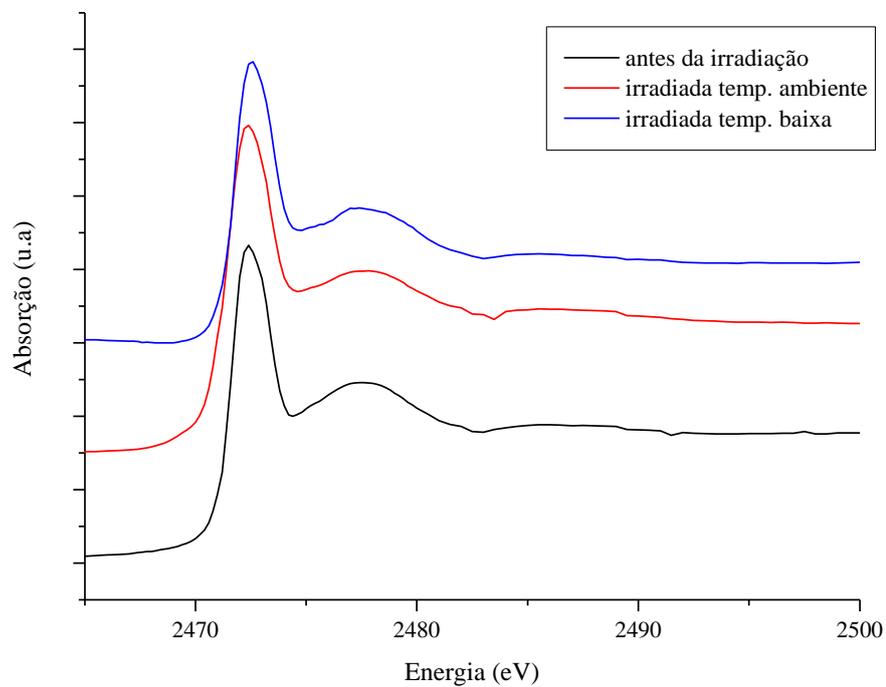
É possível verificar também que a intensidade das pressões parciais dos fragmentos correspondentes aos processos de descarbonilação e descarboxilação são as mais intensas e portanto mais sensíveis a irradiação que os outros processos, até mesmo em baixas temperaturas. Este fato é esperado visto que as moléculas analisadas são formadas majoritariamente por átomos de carbono e oxigênio em comparação com os outros átomos presentes nas amostras (S, N, H). Já os processos de desaminação e dessulfurização apresentam um decréscimo significativo da emissão dos gases correspondentes em baixa temperatura.

### **5.3.1.2 Fotoabsorção na borda 1s do enxofre**

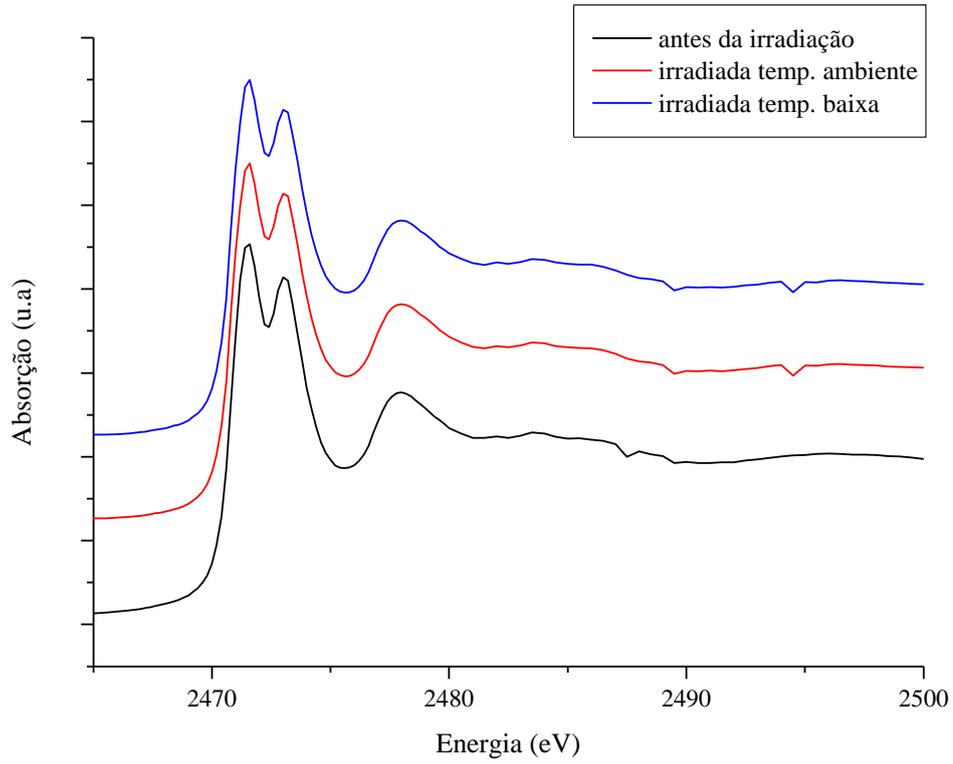
Os espectros de fotoabsorção na borda S1s foram medidos no LNLS na linha de luz SXS, em uma faixa de energia de 2465,0 a 2510,0 eV, com intervalos de energia de 0,5 eV de 2565,0 a 2467,0 eV, 0,2 eV de 2467,0 a 2480,0 eV e 0,5 eV de 2480,0 a 2510,0 eV, no modo corrente total de elétrons (TEY). Os valores de intensidade foram normalizados em relação à corrente no fotodiodo. O par de

cristais selecionado no monocromador foi Si/InSb devido a faixa de energia de trabalho.

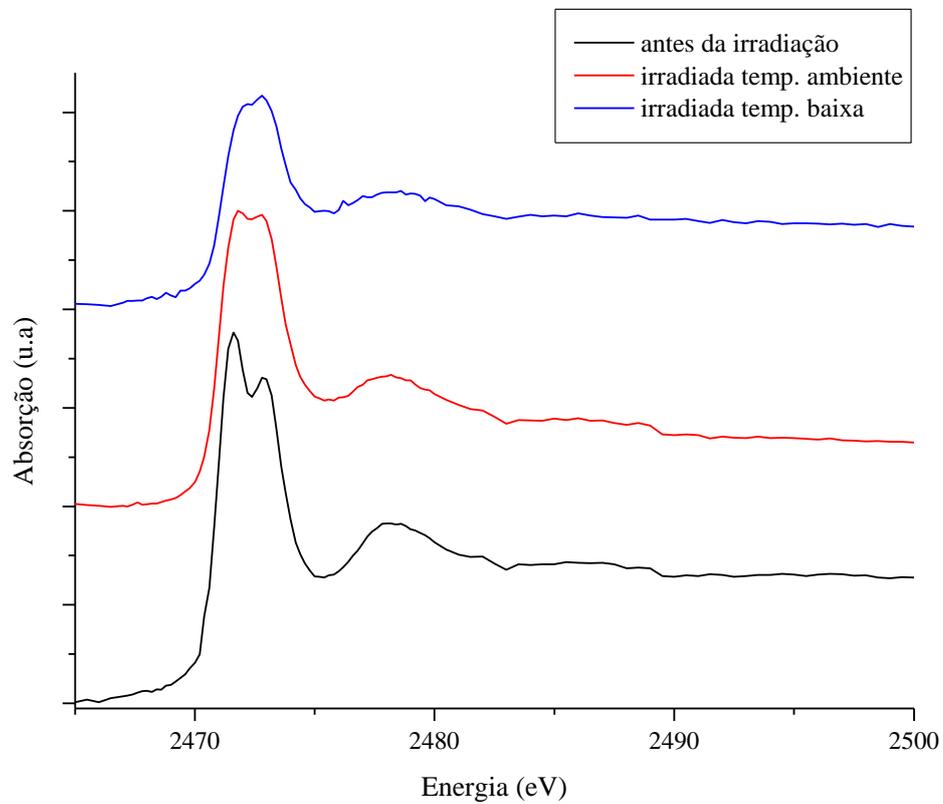
Os espectros de fotoabsorção das amostras de cisteína, cistina e insulina são apresentados nas Figuras 5.13 a 5.15, respectivamente. Os espectros foram adquiridos em temperatura ambiente antes e depois da irradiação e após a irradiação em baixa temperatura (77K).



**Figura 5.13** Espectros de fotoabsorção na borda do S 1s da cisteína



**Figura 5.14** Espectros de fotoabsorção na borda do S 1s da cistina



**Figura 5.15** Espectros de fotoabsorção na borda do S 1s da insulina

As energias das ressonâncias principais das moléculas estudadas encontram-se na Tabela 5.1.

**Tabela 5.1** Energias das transições em torno da borda S1s para as amostras estudadas

| Compostos               | Energia da transição $1s \rightarrow \sigma^*$ (S-S), (eV) |                |             | Energia da transição $1s \rightarrow \sigma^*$ (S-C), (eV) |                |             |
|-------------------------|--|----------------|-------------|--|----------------|-------------|
|                         | antes  | temp. ambiente | temp. baixa | antes  | temp. ambiente | temp. baixa |
| <b>Cisteína (Cys)</b>   | -  | -              | -           | 2472,4   | 2472,4         | 2472,6      |
| <b>Cistina (CysCys)</b> | 2471,6   | 2471,6         | 2471,6      | 2473,0   | 2473,0         | 2473,0      |
| <b>Insulina</b>         | 2471,6   | 2471,8         | 2472,2      | 2472,8   | 2472,8         | 2472,8      |

O átomo de enxofre está presente na cisteína em sua forma reduzida (S-H). Assim, observamos apenas uma ressonância centrada em 2472,4 eV (Figura 5.13). Este pico pode ser atribuído a transição  $1s \rightarrow \sigma^*$  (S-C) [52]. Pode-se observar também uma pequena diferença entre a energia referente a esta transição comparando-se o antes e o depois da irradiação em em baixa temperatura (0,2 eV).

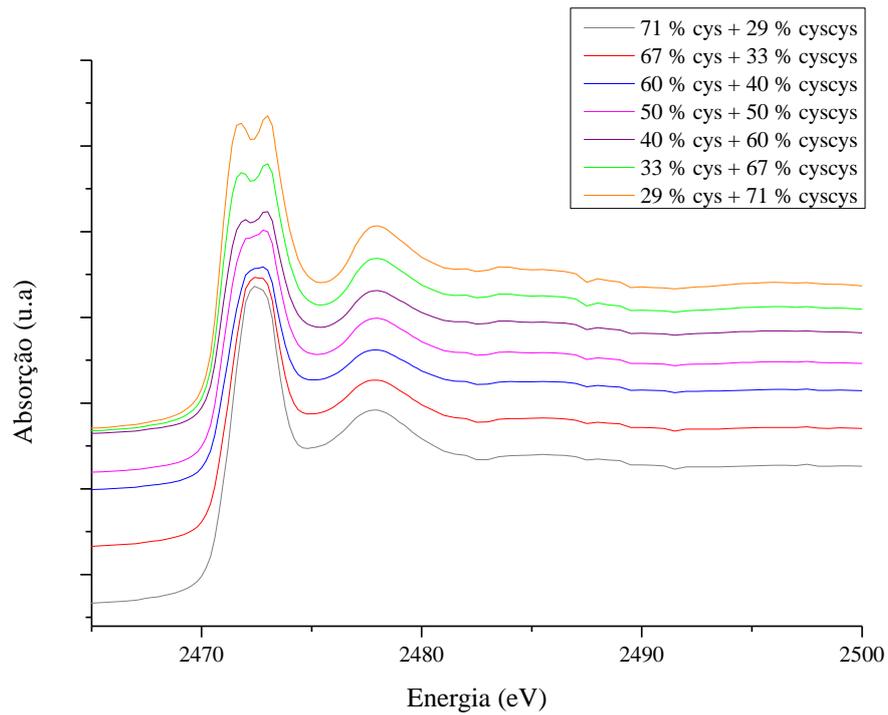
A cistina e a insulina por sua vez apresentam o enxofre em sua forma oxidada (S-S). Os espectros de fotoabsorção dessas espécies (Figuras 5.14 e 5.15) apresentam duas principais ressonâncias atribuídas a transições  $1s \rightarrow \sigma^*$  (S-S) e  $1s \rightarrow \sigma^*$  (S-C), em ordem crescente de energia, claramente bem resolvidas. De acordo com a literatura, a diferença de energia entre essas duas transições para a molécula de cistina é de 1,5 eV [53].

Já no caso da insulina, as diferenças podem ser observadas tanto em termos de energia, quanto forma e intensidade dos picos (Figura 5.15). No espectro de

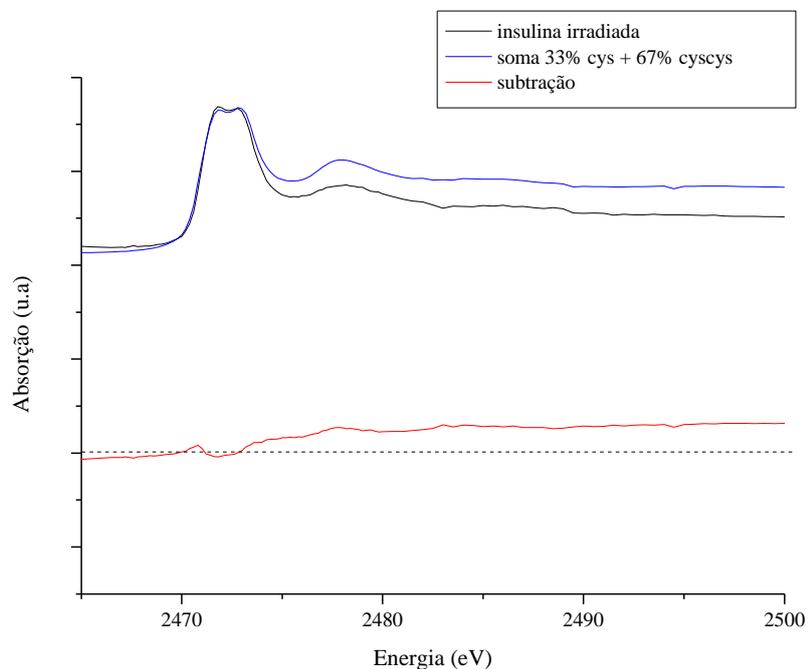
fotoabsorção da insulina antes da irradiação, pode-se observar uma diferença de intensidade entre as duas principais ressonâncias (a intensidade da transição  $1s \rightarrow \sigma^*$  (S-S) é maior do que da transição  $1s \rightarrow \sigma^*$  (S-C)). Se compararmos os espectros de insulina irradiadas com o espectro de fotoabsorção antes da irradiação, observamos que há um deslocamento de energia apenas para o pico correspondente à transição  $1s \rightarrow \sigma^*$  (S-S).

Este fato pode estar relacionadas a quebra de ligações dissulfeto na insulina. Quando as ligações ou pontes dissulfeto são quebradas, a forma oxidada do enxofre (S-S) da cistina dá lugar a forma reduzida (S-H) cujo espectro de fotoabsorção pode ser atribuído ao espectro da cisteína usado como referência.

Uma das vantagens da técnica de NEXAFS é que ela pode ser usada para investigar as intensidades relativas dos picos usando a contribuição de diferentes espécies para uma análise quantitativa [54], [55]. Com o objetivo de avaliar melhor as diferenças observadas nos espectros de fotoabsorção da insulina após a irradiação, foram feitas somas entre os espectros de fotoabsorção da cisteína e da cistina, com diferentes proporções de cada espécie também irradiadas para fins de comparação (Figura 5.16). De acordo com a Figura 6.16, a medida em que a proporção de cistina aumenta, observa-se o aparecimento do segundo pico referente a transição  $1s \rightarrow \sigma^*$  (S-S). Das compilações realizadas, a soma que reproduziu melhor o espectro de insulina irradiada, possibilitando assim sua comparação (Figura 5.17) foi aquela com contribuição de 33% dos valores das intensidades relativas do espectro da cisteína e 67% do espectro da cistina.



**Figura 5.16** Evolução da compilação da soma dos espectros de cisteína e cistina em diferentes proporções



**Figura 5.17** Comparação entre os espectros de insulina irradiada e o espectro formado pela soma dos espectros de cisteína e cistina. A subtração entre os dois espectros também é mostrado

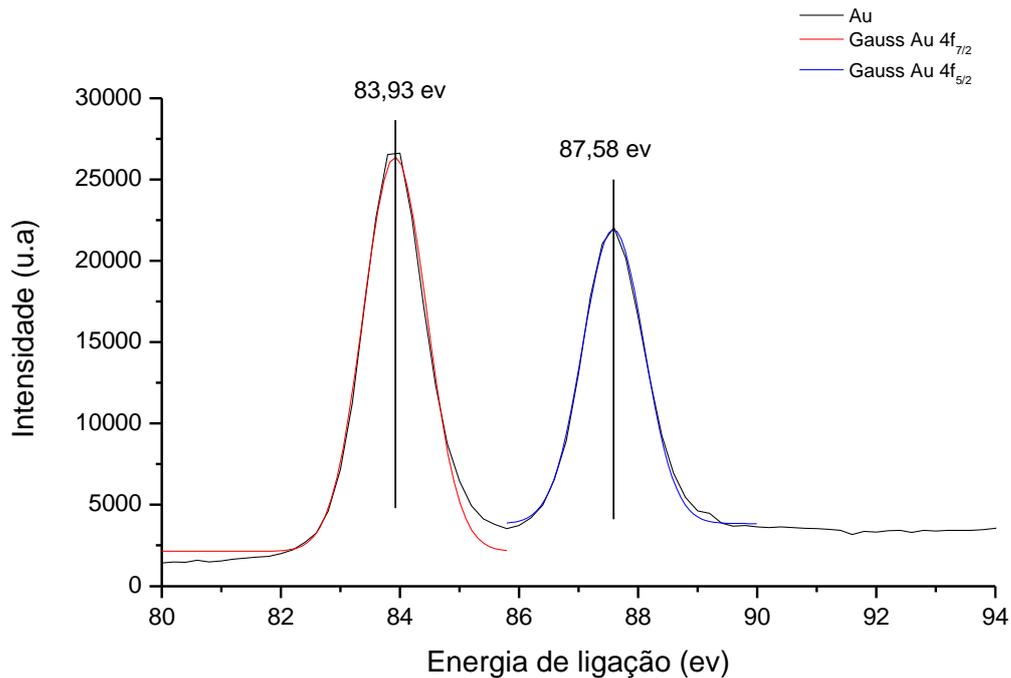
A proporção utilizada na soma dos espectros significa na verdade que um terço da forma reduzida do enxofre está presente no espectro da insulina irradiada. Levando-se em consideração que a insulina é composta por três pontes dissulfeto, é possível assumir que pelo menos uma das pontes foi quebrada pelo processo de irradiação.

A molécula de insulina é constituída por duas cadeias, A e B e apresenta três ligações dissulfeto. Uma das pontes é formada entre cisteínas da própria cadeia A enquanto que as outras duas pontes são formadas ligando a cadeias A e B. De acordo com a literatura, as cisteínas A7 e B7 são aquelas formadas pelo sétimo aminoácido, da esquerda para a direita das cadeias A e B, conforme Figura 5.3.

Embora Schulze-Biese e co-autores [14] tenham mostrado que a ligação dissulfeto formada pelas cisteínas A7 e B7 (Figura 5.3) é mais sensível a radiação que as outras ligações, apenas utilizando os resultados de NEXAFS obtidos para a insulina, não é possível identificar exatamente qual das ligações foi quebrada.

### 5.3.1.3 XPS

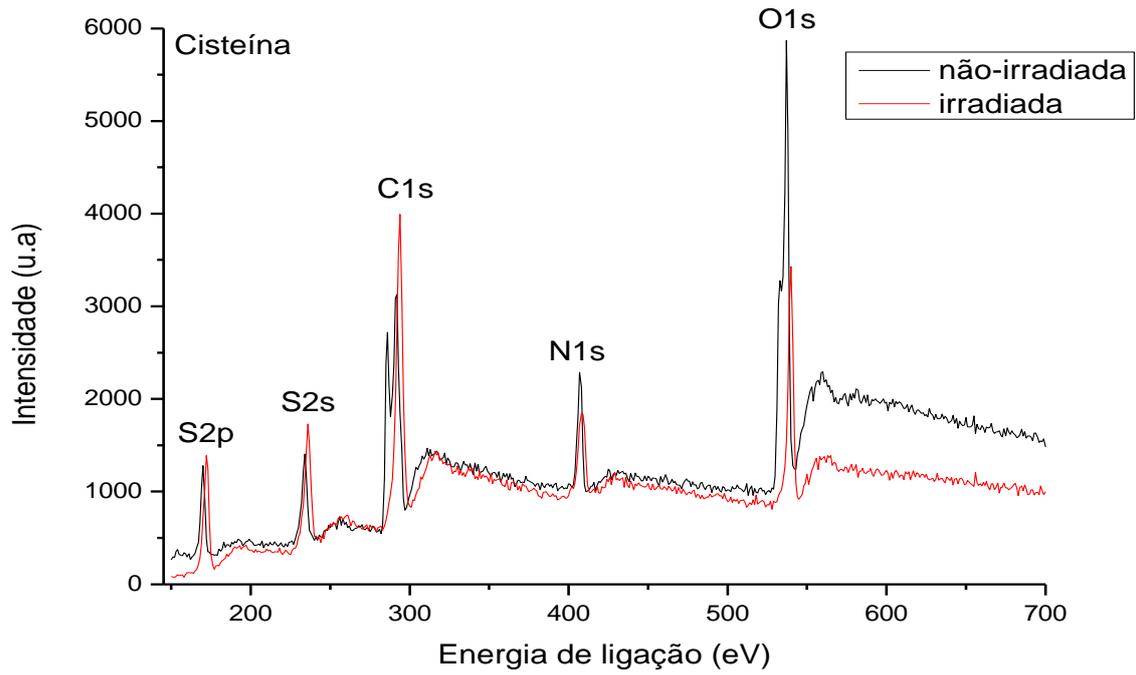
As medidas de fotoelétrons (XPS) foram adquiridas na linha de luz SXS. Os espectros foram obtidos com pressão residual na câmara em torno de  $1 \times 10^{-8}$  mbar e com uma energia de fótons incidentes igual a 1840 eV. Foi utilizado um analisador de energia de elétrons hemisférico PHOIBOS HSA3500 e um detector multi-channeltron. Os espectros foram adquiridos no modo analisador de transmissão fixa (FAT) com energia de passagem de 30 eV. A calibração em energia foi feita a partir das linhas do Au  $4f_{5/2}$  e Au  $4f_{7/2}$  com energias de 87,6 eV e 83,9 eV respectivamente (Figura 5.18).



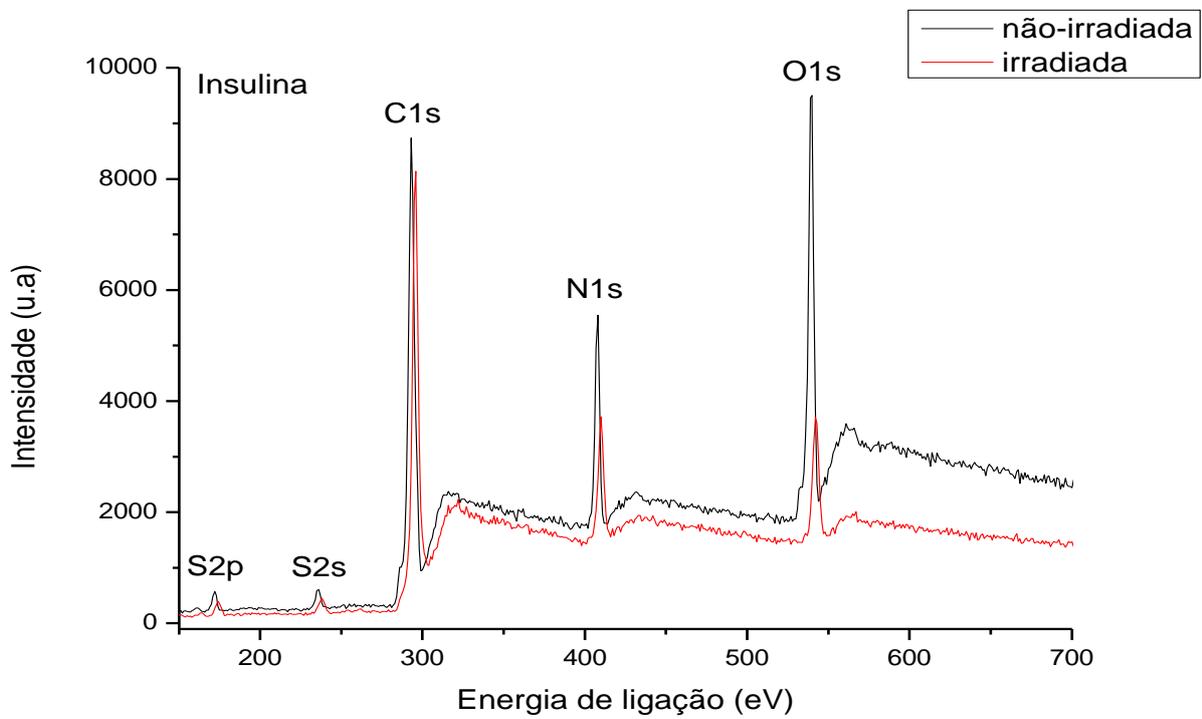
**Figura 5.18** Espectro de XPS da amostra de ouro (Au) para fins de calibração em energia

Os espectros de XPS foram medidos antes e depois da irradiação com canhão de elétrons com o objetivo de comparar modificações estruturais induzidas nas amostras. Os espectros foram tratados através da deconvolução dos picos utilizando uma função gaussiana. As intensidades dos picos foram normalizados em relação a linha de base e subtraídos do espectro de XPS da amostra de fita dupla face a fim de eliminar interferentes proveniente do suporte das amostras. Foi adicionado ainda às amostras grafite em pó com o objetivo de eliminar possíveis problemas de carregamento das amostras durante as medidas.

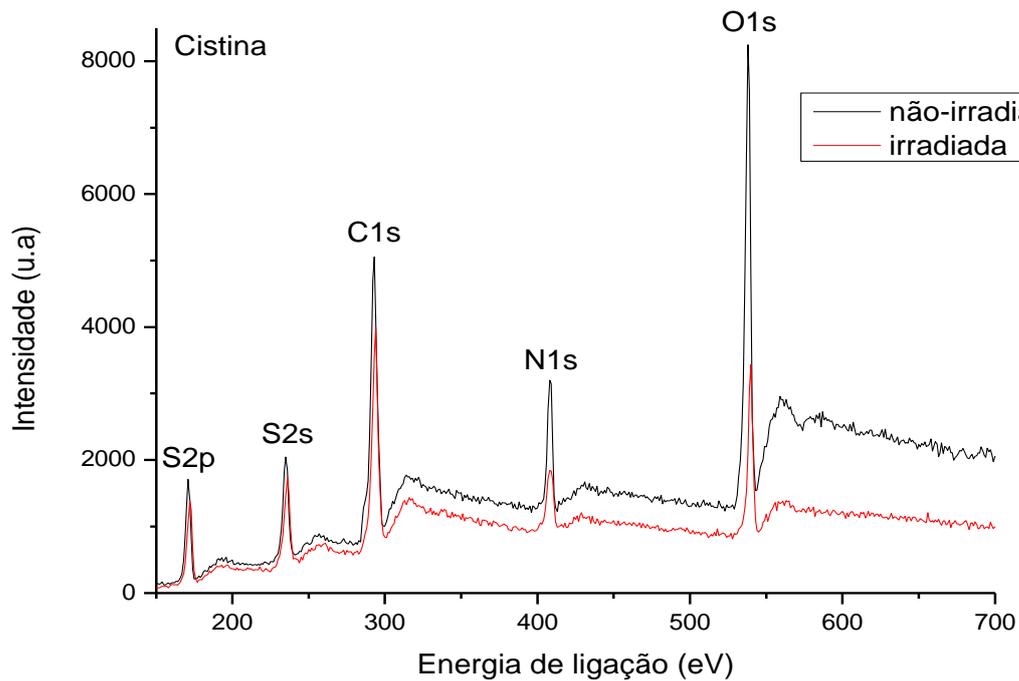
Os espectros foram medidos antes e depois da irradiação com canhão de elétrons para as amostras de cisteína, cistina e insulina. Os espectros das amostras não-irradiadas e irradiadas para cada amostra, foram sobrepostos para fins de comparação (Figuras 5.19 a 5.21).



**Figura 5.19** Espectro de XPS da amostra de cisteína

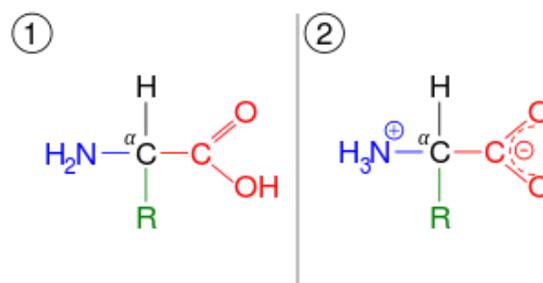


**Figura 5.20** Espectro de XPS da amostra de cistina



**Figura 5.21** Espectro de XPS da amostra de insulina

Antes de discutir os resultados dos espectros de XPS acima, é importante considerar que a forma mais estável de um aminoácido em solução é um *zwitterion* (Figura 5.22 (2)). No *zwitterion*, o composto químico é considerado eletricamente neutro, possuindo cargas opostas em diferentes átomos [47].

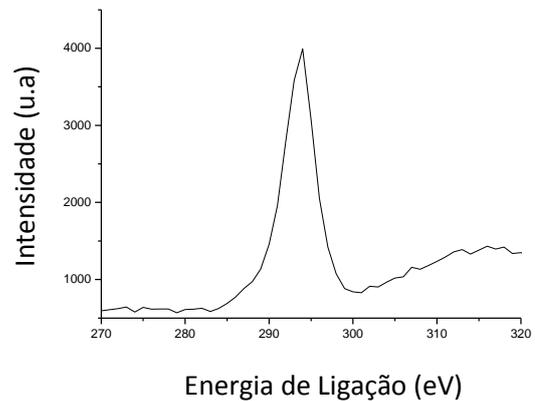
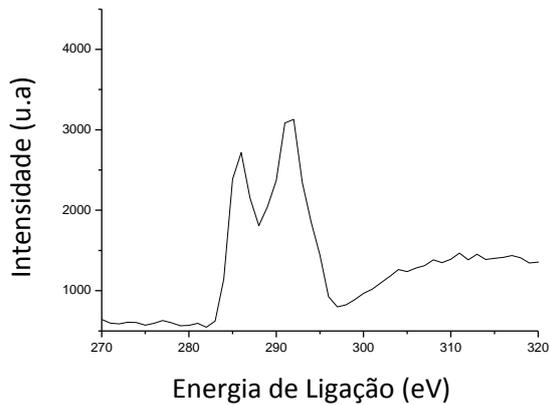


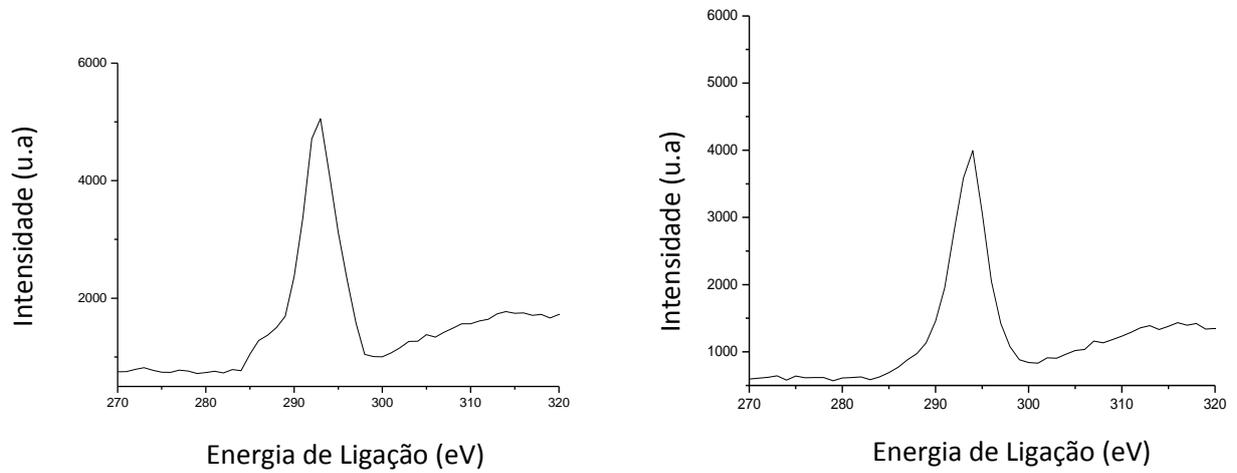
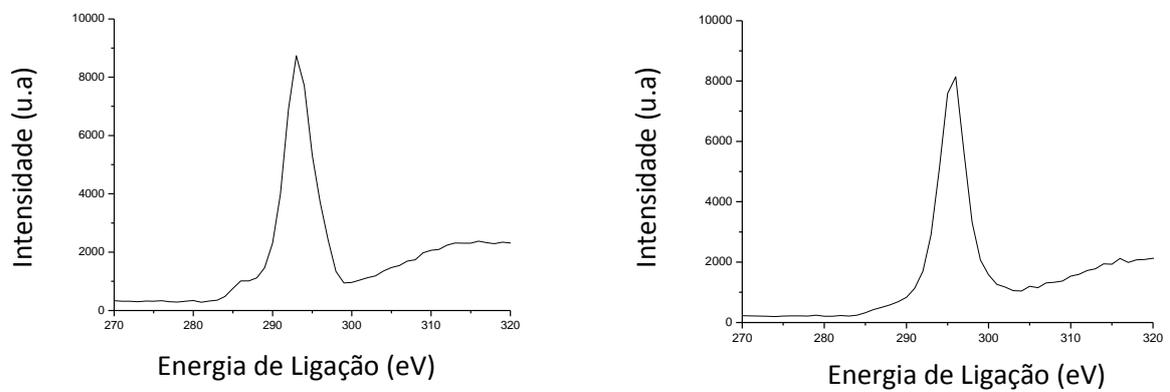
**Figura 5.22** Fórmula geral de um aminoácido em sua forma livre (1) e em forma de *zwitterion* (2)

Assim, como os experimentos foram realizados com os aminoácidos no estado sólido, acreditamos que os mesmos se encontravam sob a forma livre e, após a irradiação com elétrons, passariam então para a forma zwitteriônica.

Esta suposição pode ser explicada verificando-se com mais atenção os espectros de XPS das amostras detalhados para o C1s (Figura 5.23) e tomando-se como base os valores das energias dos picos após a deconvolução dos mesmos de acordo com a Tabela 5.2.

### (A) Cisteína



**(B) Cistina****(C) Insulina**

**Figura 5.23** Detalhamento em torno da borda do C1s dos espectros de XPS das amostras de cisteína, cistina e insulina. À direita: amostras não-irradiadas e à esquerda: amostras irradiadas.

**Tabela 5.2** Energias de ligação dos picos correspondentes ao C1s das amostras estudadas

|                             | <b>Energia de ligação<br/>C 1 (eV)<br/>não-irr.</b> | <b>Energia de ligação<br/>C 1 (eV)<br/>irr.</b> | <b>Energia de ligação<br/>C 2 (eV)<br/>não-irr.</b> | <b>Energia de ligação<br/>C 2 (eV)<br/>irr.</b> |
|-----------------------------|---|---|---|---|
| <b>Cisteína<br/>(Cys)</b>   | 285,8   | -   | 291,4   | 293,6   |
| <b>Cistina<br/>(CysCys)</b> | 287,1   | 290,4   | 292,9   | 291,0   |
| <b>Insulina</b>             | 283,1   | -   | 293,3   | 295,6   |

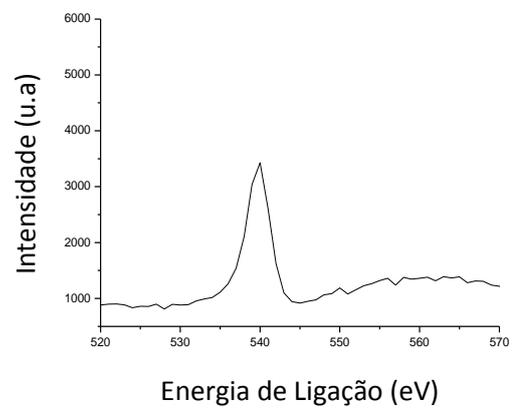
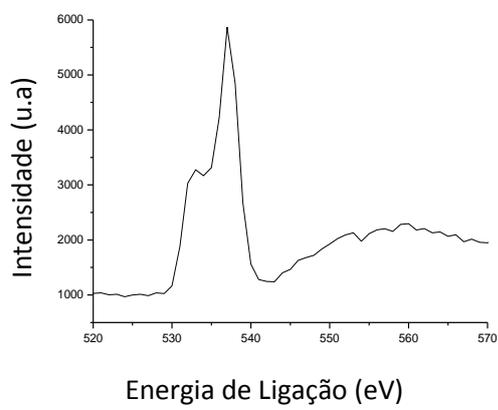
Para a amostra de cisteína, é possível verificar claramente a presença de dois picos bem resolvidos no espectro da mesma não-irradiado. O pico centrado em 291,4 eV corresponde ao carbono do grupo carboxil devido ao forte deslocamento químico em direção as energias de ligação mais altas e o pico centrado em 285,8 eV contém contribuição dos outros substituintes do carbono. Conforme discutido anteriormente, após a irradiação da amostra, a cisteína apresenta-se sob a forma de *zwitterion*, não sendo possível verificar a contribuição do carbono ligado à carboxila, justificando assim a presença de um pico apenas no espectro da amostra irradiada, centrado em 293,6 eV. A intensidade do pico após a irradiação é ligeiramente maior.

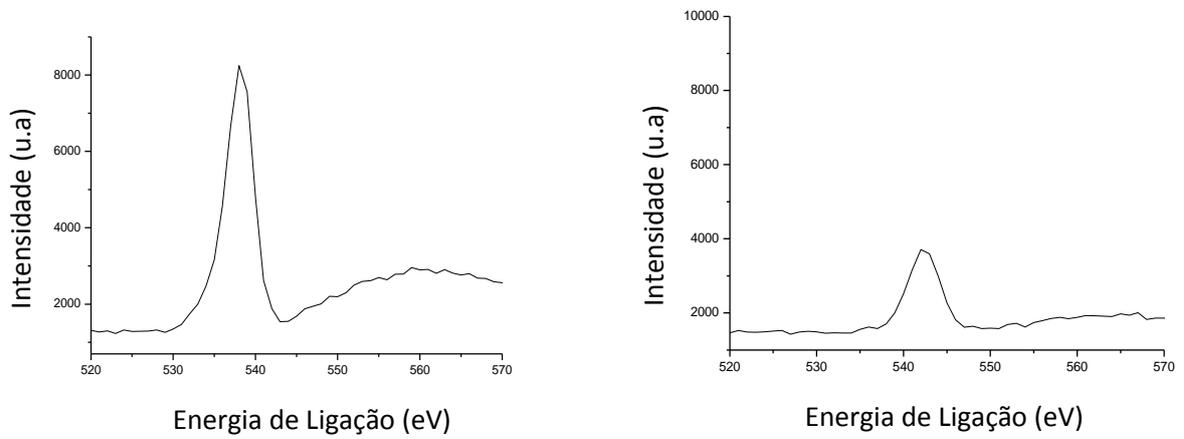
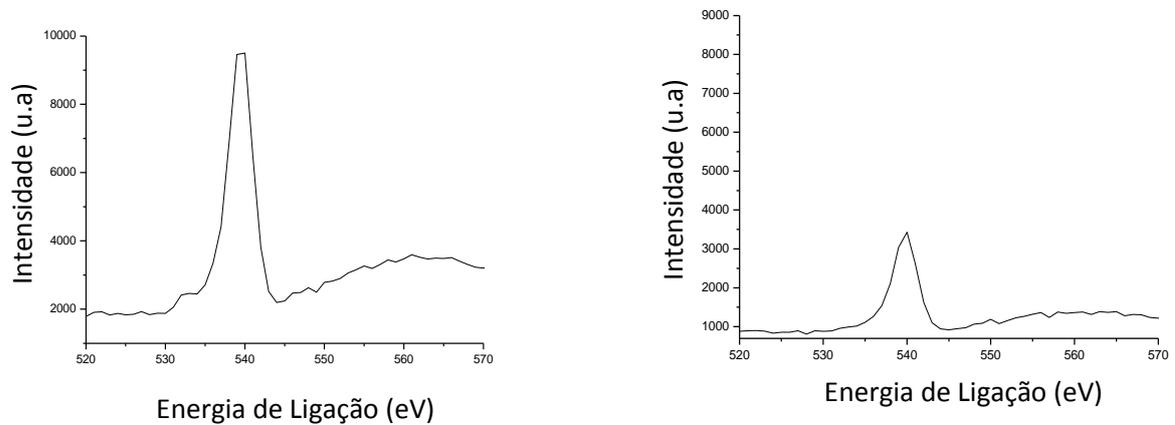
Para a amostra de cistina, ainda é possível verificar a presença do segundo pico mesmo após a irradiação, mas sua contribuição pode ser verificada como um “ombro” sobreposto ao pico principal centrado em 292,9 eV.

Para a amostra de insulina, assim como para a amostra de cisteína, a presença de apenas um pico é verificado no espectro após a irradiação. A diferença na intensidade do pico após a irradiação é muito pequena.

Os espectros de XPS das amostras detalhados em torno da borda do O1s (Figura 5.24) também apresentam modificações após a irradiação. Antes da irradiação, o espectro da cisteína apresenta 2 componentes centrados em 537,2 eV e 533,1 eV, que podem ser assinalados como os oxigênios do grupo carboxila (CO) e do grupo hidroxila (OH), respectivamente.

### (A) Cisteína



**(B) Cistina****(C) Insulina**

**Figura 5.24** Detalhamento em torno da borda do O1s dos espectros de XPS das amostras de cisteína, cistina e insulina. À direita: amostras não-irradiadas e à esquerda: amostras irradiadas.

Após a irradiação, observa-se apenas um componente no espectro da cisteína em torno da energia de ligação do O1s centrado em 539,7 eV.

No caso da cisteína, o pico centrado em 538,0 eV antes da irradiação diminuiu significativamente de intensidade após a irradiação deslocando-se para 542,3 eV.

A insulina por sua vez apresenta um pico centrado em 539,4 eV, embora seja possível visualizar a contribuição de uma pequena estrutura em 533,0 eV. Após a irradiação, a intensidade do pico diminuiu, agora centrado em 539,7 eV e a pequena estrutura observada antes desaparece.

Levando-se em consideração os espectros de emissão de gases das amostras em temperatura ambiente (Figuras 5.7; 5.9 e 5.11), nota-se que as espécies O/NH<sub>2</sub>, CO/N<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> são as que apresentaram maior intensidade nas curvas de emissão, justificando assim a diminuição da intensidade dos picos nos espectros de XPS para o C1s, O1s e N1s após a irradiação. No caso da cisteína, onde a intensidade do pico correspondente aos fotoelétrons do C1s aumentou, a explicação mais plausível é a de que após a irradiação não seria possível distinguir a contribuição dos diferentes tipos de carbono presentes na cisteína, com os dois picos claramente separados antes da irradiação sobrepondo-se após a irradiação, aumentando assim a sua intensidade.

Os picos correspondentes à energia de ligação do N1s apresentam um pequeno deslocamento em energia (1,0 eV para cisteína e 2,0 eV para insulina) e para S2s e S2p, as diferenças nos espectros foram em intensidade e deslocamento de 2,0 eV para cisteína e insulina e 1,0 eV para cistina.

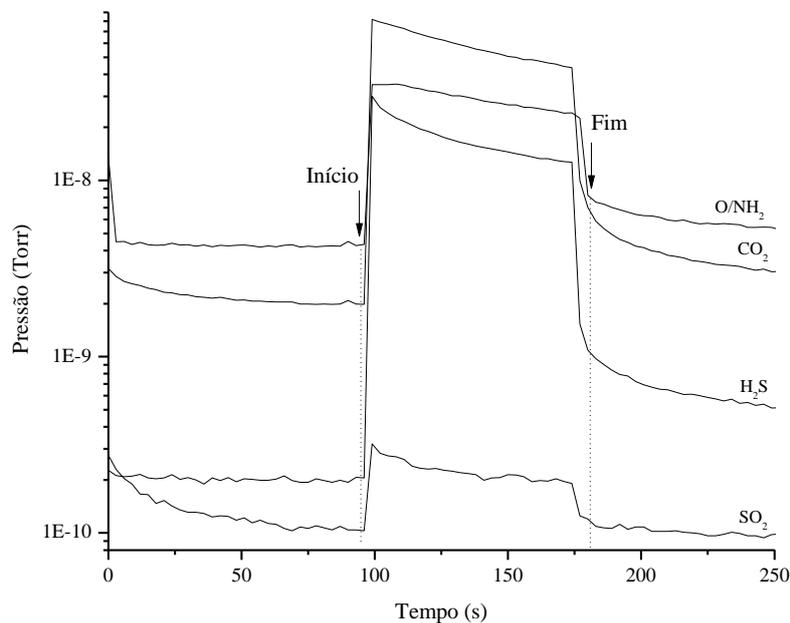
### **5.3.2 Danos induzidos por luz**

Os resultados a seguir tratam da irradiação das amostras biológicas com luz síncrotron, em ordem zero. Estes experimentos foram realizados na linha de luz SGM e envolveram medidas de emissão de gases e fotoabsorção em torno da borda 1s do nitrogênio e do oxigênio (NEXAFS).

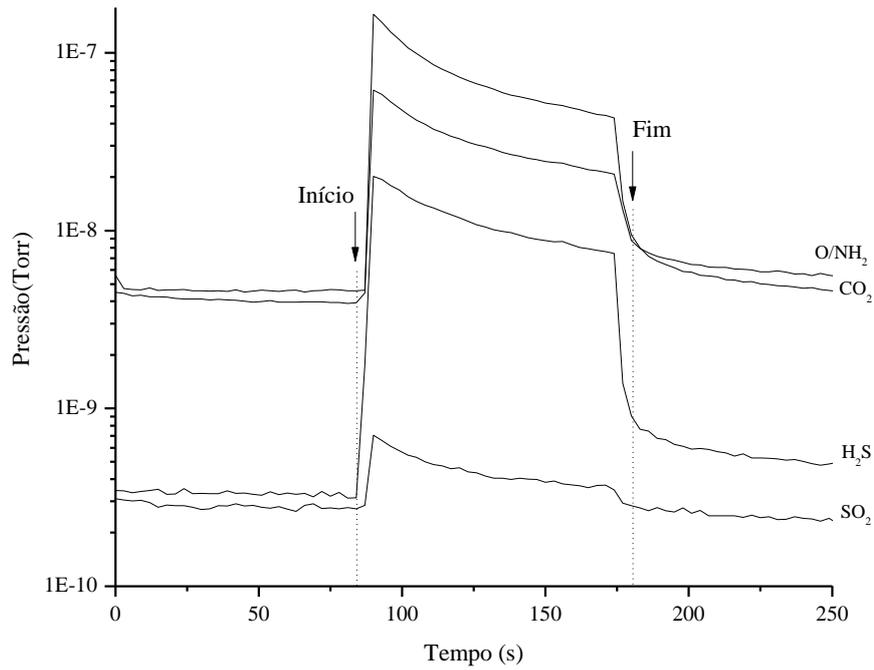
### 5.3.2.1 Emissão de gases

A irradiação das amostras de cisteína, cistina e insulina com luz em ordem zero foram realizadas na linha de luz SGM. As amostras foram irradiadas por 3 minutos, variando-se aberturas de fendas de 80 a 300  $\mu\text{m}$ . Este tempo de 3 minutos também foi estabelecido levando-se em consideração as curvas de emissão das espécies analisadas no RGA durante a irradiação.

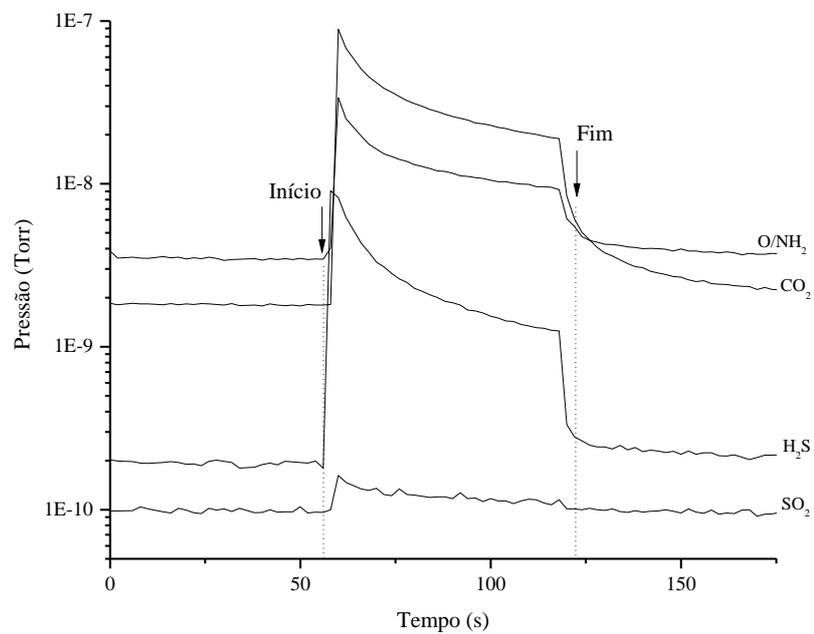
Os espectros de emissão de gases utilizando luz como fonte de irradiação para as amostras de cisteína, cistina e insulina são apresentados abaixo nas figuras 5.25 a 5.27, respectivamente.



**Figura 5.25** Espectro de emissão de gases (modo Pxt) da cisteína mantida em temperatura ambiente irradiada em ordem zero



**Figura 5.26** Espectro de emissão de gases (modo Pxt) da cistina mantida em temperatura ambiente irradiada em ordem zero

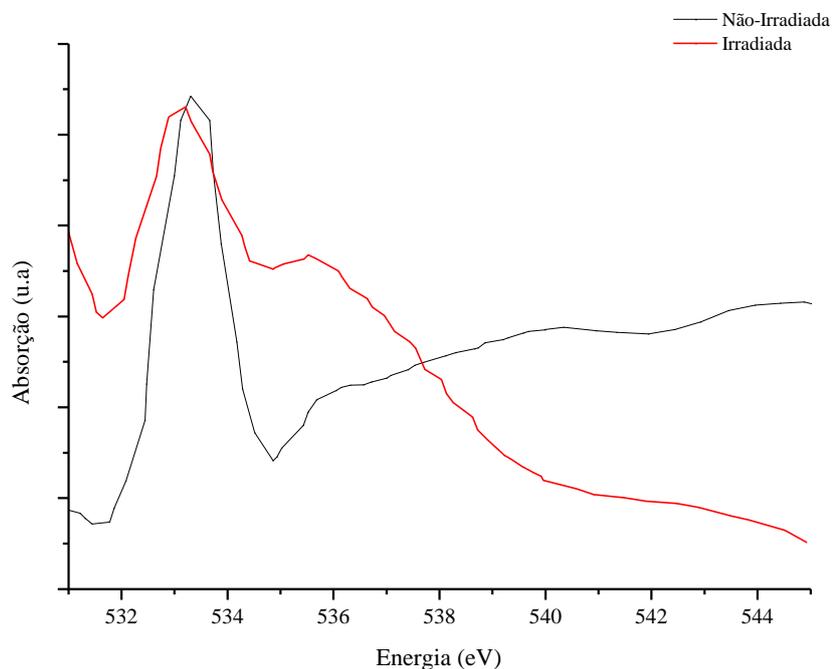


**Figura 5.27** Espectro de emissão de gases (modo Pxt) da insulina mantida em temperatura ambiente irradiada em ordem zero

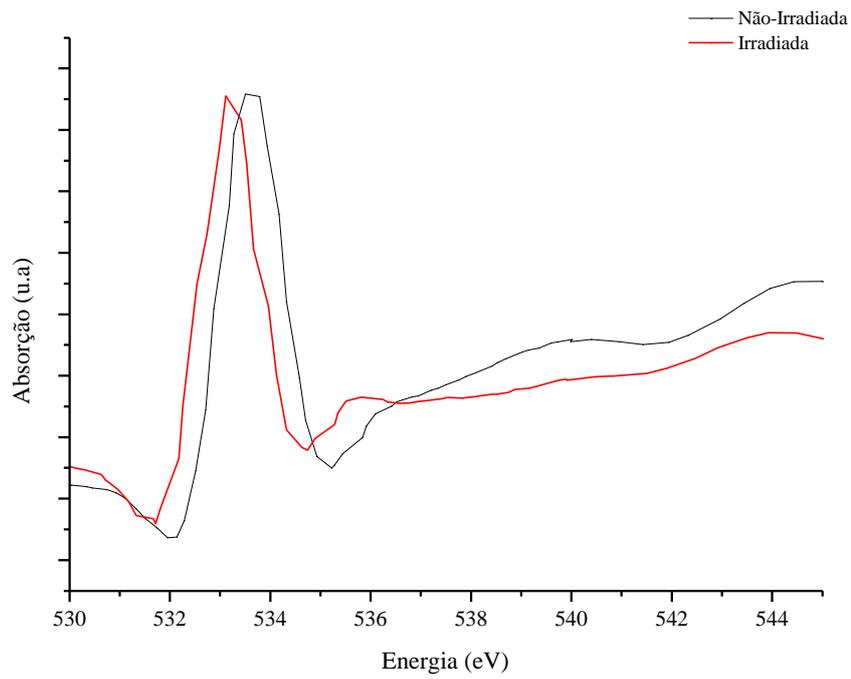
Em todos os espectros, o padrão de emissão é bem parecido, embora a emissão de  $\text{H}_2\text{S}$  seja maior na amostra de cisteína. Este fato é devido à composição deste aminoácido. Como a cisteína possui um grupo tiol terminal (Figura 5.1), é de se esperar que a molécula perca este grupo mais facilmente durante a irradiação, formando a espécie  $\text{H}_2\text{S}$ .

### 5.3.2.2 Fotoabsorção nas bordas O1s e N1s

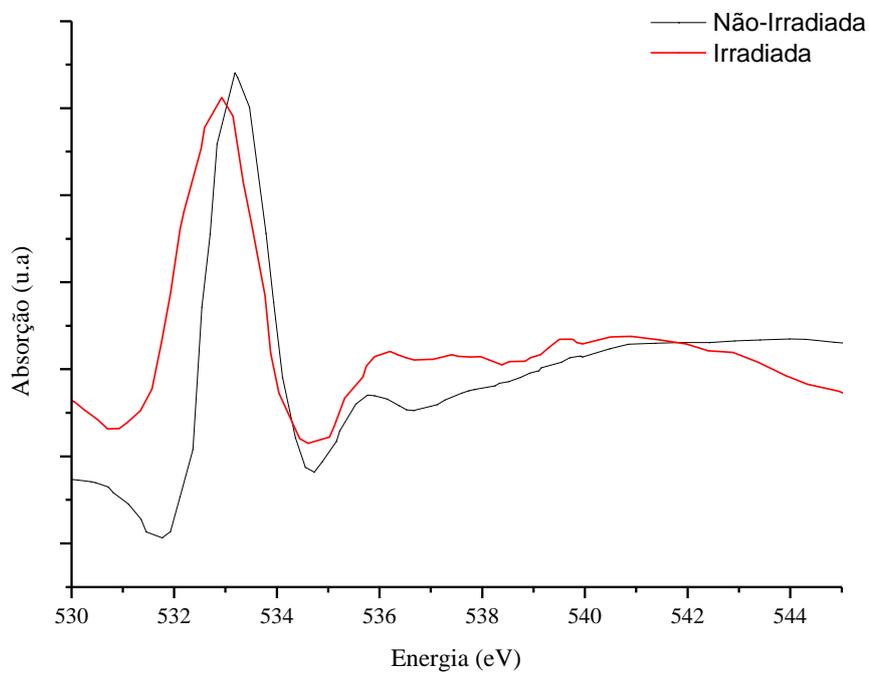
Os espectros de fotoabsorção das moléculas de cisteína, cistina e insulina foram medidos de 530,0 a 545,0 eV na borda do O1s e de 390,0 a 435,0 eV para o N1s, antes e depois da irradiação com luz (ordem zero). Os espectros estão apresentados abaixo (Figuras 5.28 a 5.33).



**Figura 5.28** Espectros de fotoabsorção na borda do O 1s da cisteína



**Figura 5.29** Espectros de fotoabsorção na borda do O 1s da cistina



**Figura 5.30** Espectros de fotoabsorção na borda do O 1s da insulina

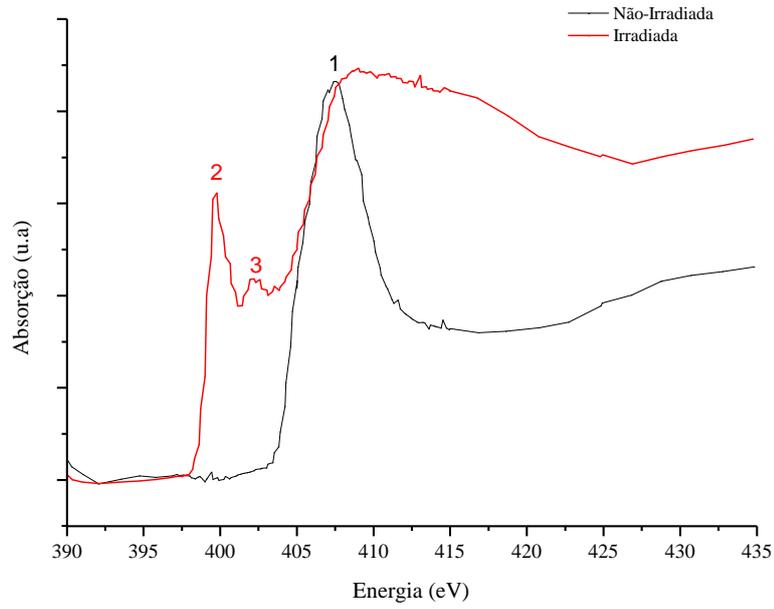
Na tabela abaixo, encontram-se os valores em energia dos picos correspondentes à transição  $1s \rightarrow \pi^*$  (COO/COOH/CONH<sub>2</sub>) [19] das moléculas estudadas.

**Tabela 5.3** Energias dos picos de maior absorção das moléculas estudadas

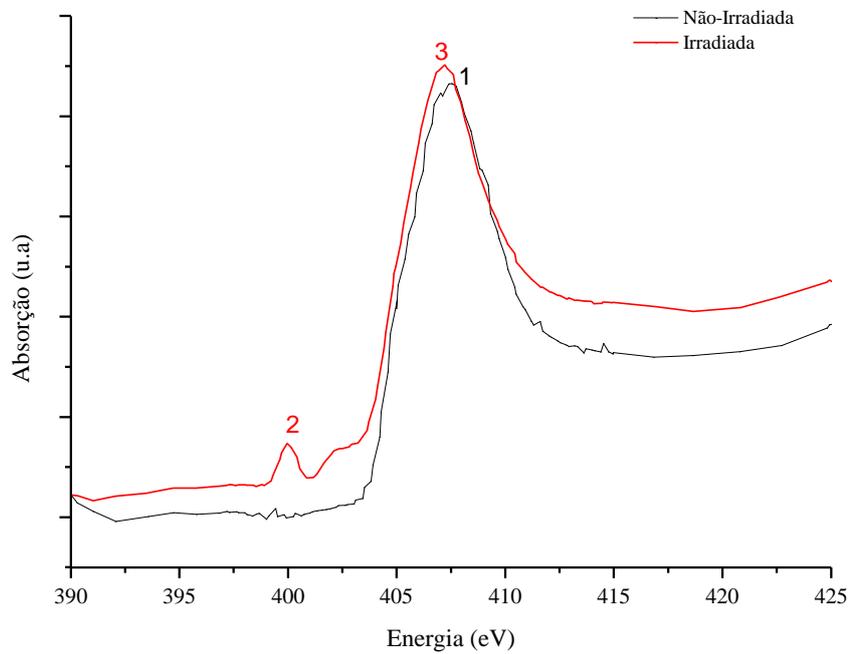
| Amostras         | Energia (eV) Não-irr. | Energia (eV) Irr. |
|------------------|-----------------------|-------------------|
| Cisteína (Cys)   | 533,3                 | 533,2             |
| Cistina (CysCys) | 533,5                 | 533,1             |
| Insulina         | 533,2                 | 532,9             |

Embora a diferença entre as energias dos picos da cisteína seja de apenas 0,1 eV (Tabela 5.3), observa-se claramente uma grande diferença no formato dos espectros assim como na intensidade dos picos. Já para os espectros de cistina, a diferença no formato dos espectros não é tão grande, embora a diferença entre as energias dos picos seja maior que na cisteína, de 0,4 eV. No caso da insulina, a diferença de energia entre os picos foi de 0,3 eV. Em todos os casos é possível observar mudanças significativas nos espectros comparando-se antes e depois da irradiação. Estas mudanças estão diretamente ligadas a danos na estrutura nas moléculas analisadas causados pela radiação.

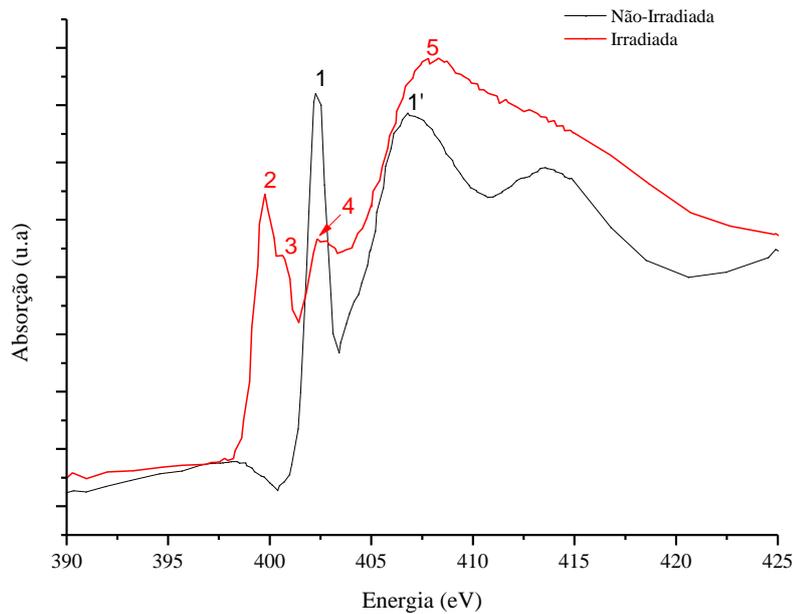
Já os espectros obtidos na borda do N1s para todas as amostras analisadas apresentam mudanças significativas não só em forma e energia, mas também como no aparecimento de novas estruturas nos espectros das amostras irradiadas.



**Figura 5.31** Espectros de fotoabsorção na borda do N 1s da cisteína



**Figura 5.32** Espectros de fotoabsorção na borda do N 1s da cistina



**Figura 5.33** Espectros de fotoabsorção na borda do N 1s da insulina

Na tabela 5.4 pode-se verificar as energias referentes não só às transições  $1s \rightarrow \sigma^*$  (C-N) (406,8 e 407,6 eV), como também outros picos referentes à outras transições nos espectros de fotoabsorção das moléculas.

**Tabela 5.4** Energias dos picos de maior absorção das moléculas estudadas

| Amostras            | Energia (eV) Não-irr.  | Energia (eV) Irr.                             |
|---------------------|------------------------|---|
| Cisteína<br>(Cys)   | (1) 407,6              | (2) 399,8 / (3) 402,2                         |
| Cistina<br>(CysCys) | (1) 407,6              | (2) 399,9 / (3) 407,2                         |
| Insulina            | (1) 402,2 / (1') 406,8 | (2) 399,8 / (3) 400,6 / (4) 402,3 / (5) 407,8 |

Trabalhos anteriores envolvendo espectroscopia de absorção de camada interna de diversos tipos de aminoácidos [19] assinalam a transição  $1s \rightarrow \pi^*$  (imidazol) para o aminoácido histidina correspondente aos picos de energias iguais a 399,8 e 401,3 eV. Já a transição  $1s \rightarrow \pi^*$  ( $\text{CONH}_2$ ) é atribuída para os aminoácidos asparagina e glutamina com energia igual a 400,7 eV e picos com energias centradas em 401,4 e 401,7 eV correspondentes às transições  $1s \rightarrow \pi^*$  (guanidina) e  $1s \rightarrow \pi^*$  (indol), para os aminoácidos arginina e triptofano, respectivamente.

A explicação para a existência dos picos de número 2 nos espectros da cisteína e da cistina, bem como o deslocamento do pico 3 no espectro da cisteína não é simples. Obviamente que as mudanças nos espectros são significativas e que o dano causado pela radiação mostra claramente que houveram alterações estruturais nessas moléculas.

Como a molécula de insulina possui todos os aminoácidos citados anteriormente (histidina, asparagina, glutamina, arginina e triptofano) em sua estrutura, o surgimento dos picos de número 2 e 3 podem ser provenientes de quebras das ligações peptídicas entre os aminoácidos histidina, asparagina e glutamina. Ao observarmos a estrutura da insulina bovina na figura 5.3, esses três aminoácidos encontram-se lado a lado na cadeia B separados apenas pelo aminoácido leucina da ligação dissulfeto formada entre as cisteínas A7 e B7. Conforme já discutido anteriormente, sabe-se que a ligação dissulfeto formada entre essas cisteínas é coincidentemente a mais fraca das três, o que corrobora ainda mais para possibilidade de que esta ligação em questão tenha sido quebrada.

### **5.3.3 Espectrometria de massas Tandem**

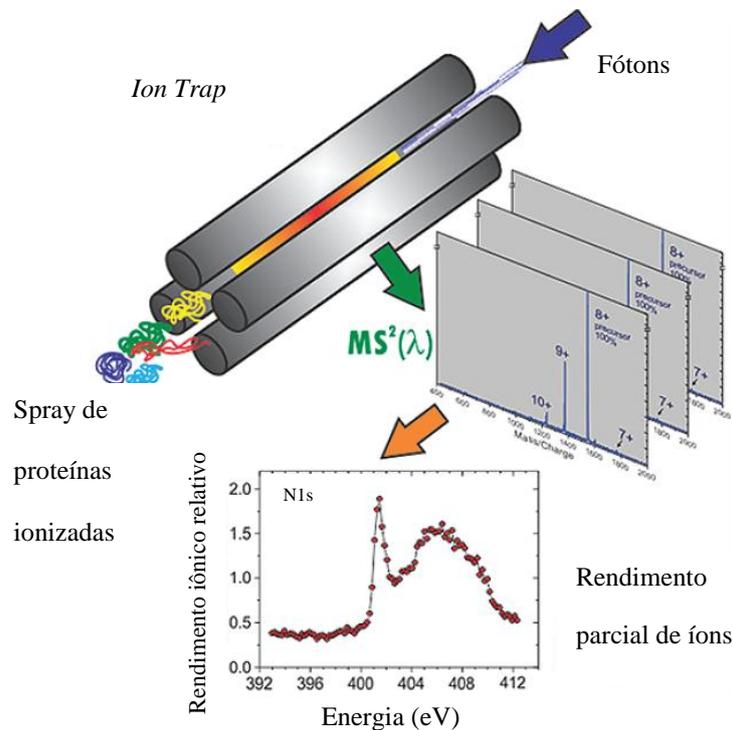
O estudo espectroscópico da insulina, isolada em fase gasosa, foi realizado no SOLEIL, através do acoplamento de um espectômetro de massas comercial com ionização por eletrospray à linha de luz PLEIADES.

As amostras de insulina foram injetadas no equipamento sob a forma líquida. As soluções concentradas foram preparadas tomando-se 1,0 mg de insulina em 1,0 mL de água (solução estoque). As soluções de trabalho foram preparadas tomando-se 100  $\mu\text{L}$  da solução estoque em 1050  $\mu\text{L}$  de água e 350  $\mu\text{L}$  de acetonitrila. O

volume final da solução de trabalho foi de 1,5 mL e a concentração 12  $\mu$ M. A adição de acetonitrila teve por objetivo manter a solução de insulina ligeiramente ácida, facilitando a ionização por eletrospray.

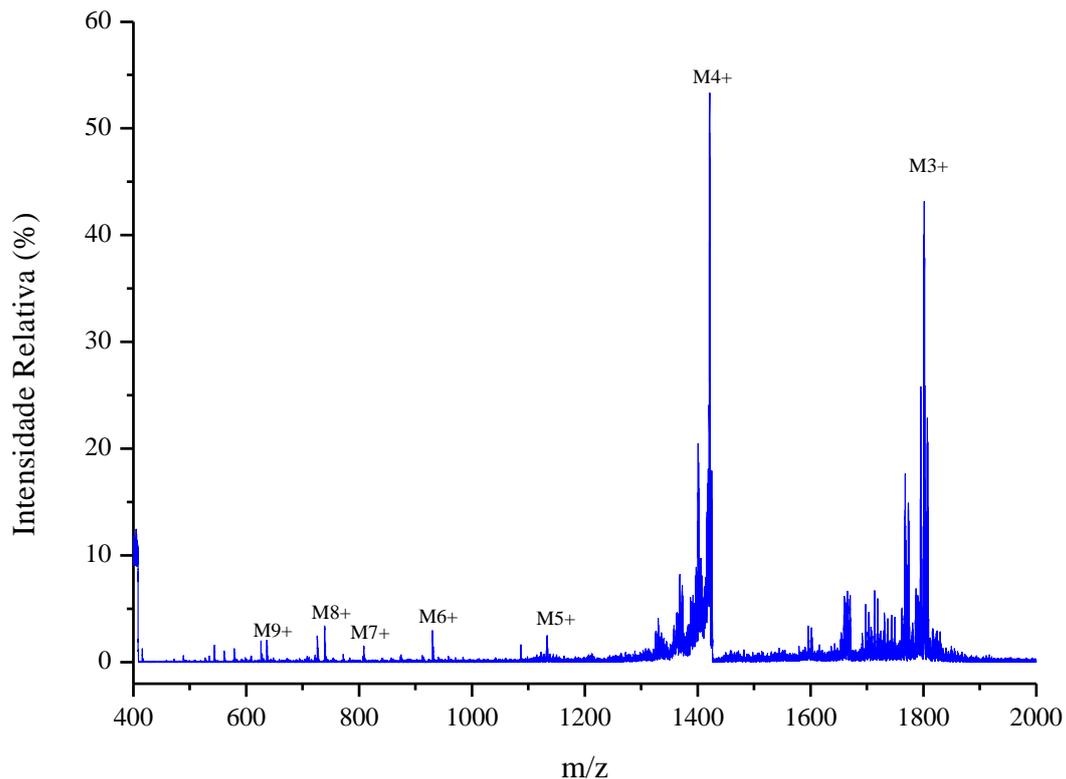
A sequência de eventos para este experimento ocorre através das seguintes etapas [37]:

- Primeiramente os íons são injetados e a massa da forma carregada de interesse é selecionada e aprisionada no *ion trap*.
- O *shutter* é então acionado permitindo a passagem da luz em intervalos pré-definidos de tempo, no caso deste trabalho, o tempo de irradiação da espécie aprisionada foi de 600 ms.
- Por fim, um espectro de massas é obtido para cada valor de energia dos fótons, conforme Figura 5.34.



**Figura 5.34** Princípio do método experimental (adaptado de [37])

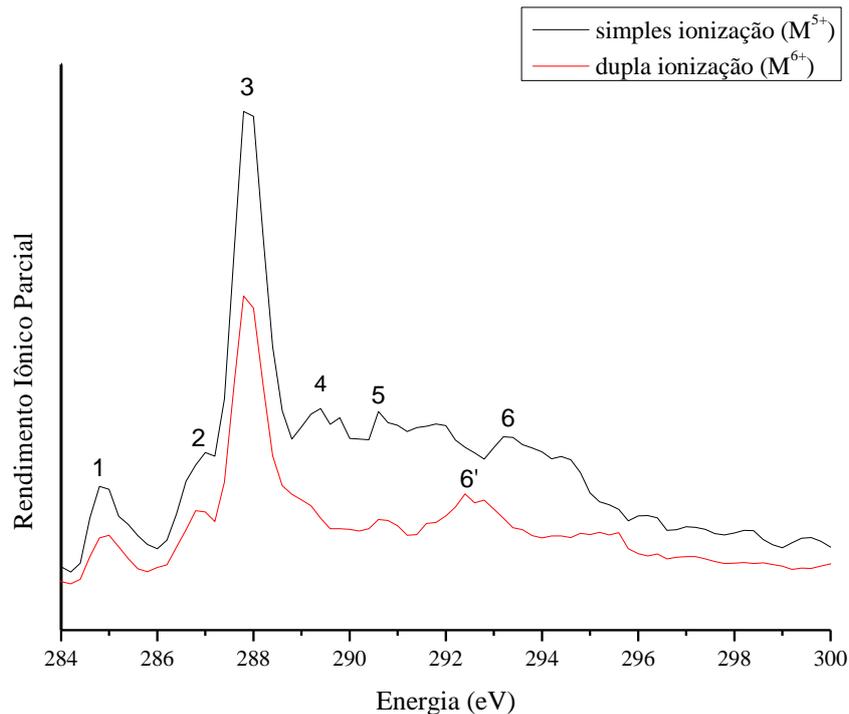
Inicialmente, com o objetivo de visualizar as espécies multiplamente protonadas da solução 12  $\mu\text{M}$  de insulina, foi medido um espectro de massas *tandem*. No espectro, observa-se a fotoionização por eletrospray do íon 4+ da insulina ( $m/z$  1443) obtido após 600ms de irradiação a 288,9 eV.



**Figura 5.35** Espectro de massas *tandem*. Fotoionização por eletrospray do íon 4+ da insulina ( $m/z$  1443) obtido após 600ms de irradiação a 288,9 eV

O íon de carga 4+ foi selecionado como íon de interesse por ser o mais intenso. Ele foi aprisionado no *ion trap* e irradiado em intervalos de 600ms. Para a obtenção dos espectros de massas em torno da borda 1s do carbono, os espectros de massa *tandem* foram adquiridos em função da energia dos fótons, com intervalo de energia de 283,2 eV a 300 eV, passo de energia de 0,2 eV, acumulados por 1 minuto em cada ponto. As intensidades dos picos correspondentes à simples e

dupla ionização foram normalizadas em relação a corrente total dos íons e ao fluxo dos fótons e plotadas em relação à energia dos fótons. O espectro resultante é apresentado na Figura 5.36.



**Figura 5.36** Ionização simples e dupla em torno da borda C1s do estado carregado precursor ( $M^{4+}$ ) da proteína insulina

Os rendimentos iônicos parciais extraídos dos espectros de massa em cada ponto foram plotados em relação à energia, levando-se em consideração as intensidades das espécies geradas pela simples e dupla ionização. De acordo com os espectros, o estado duplamente ionizado apresenta um rendimento iônico menor que o simplesmente ionizado. Este fato mostra uma alta estabilidade da molécula.

Como ainda não foi reportado na literatura espectros de NEXAFS em torno da camada K do carbono de filmes finos para a molécula de insulina, não foi possível comparar os resultados obtidos no espectro de simples ionização com dados

anteriores. Considerando que a insulina bovina apresenta 17 aminoácidos diferentes em sua composição (Figura 5.3), pode-se fazer uma correlação entre os 6 picos observados nos espectros de rendimento iônico com os picos observados nos espectros de NEXAFS dos aminoácidos existentes na literatura [19]. O pico assinalado como 1 de energia centrada em 284,9 eV corresponde à transição  $\pi^*$ (C-benzeno substituído) dos aminoácidos aromáticos fenilalanina e tirosina. Já o pico de absorção de número 2 (287,0 eV) corresponde à transição  $\sigma^*$  (C-S) nos aminoácidos sulfurados, neste caso, cisteína e conseqüentemente cistina. A transição 3 pode ser atribuída a  $\sigma^*$ (COO)/(COOH) e é observada nos espectros de fotoabsorção de todos os aminoácidos. O pico centrado em 289,4 eV (4) corresponde à transição  $\pi^*$  (guanidina) no aminoácido arginina. Nota-se que este pico diminui de intensidade no espectro de dupla ionização. As transições centradas em 5, 6 e 6' (290,6; 293,2 e 292,6 eV, respectivamente) são atribuídas às transições  $\sigma^*$ (C-N) C-NH<sub>3</sub><sup>+</sup> (5) e  $\sigma^*$ (C-C) (alquil, amina e carboxila) (6 e 6'), encontradas nos espectros de todos os aminoácidos. Pode ser verificado um deslocamento de energia (292,6 – 293,2eV) do pico 6 no espectro de dupla ionização (6'). Medidas complementares tanto em torno da borda 1s do carbono quanto do nitrogênio e oxigênio fazem-se necessárias para que este fato seja explicado e outras informações relacionadas à espectroscopia de camada interna da insulina em fase gasosa sejam investigadas.

Embora os resultados obtidos sejam iniciais, é necessário acentuar que esta é a primeira vez em que são apresentados estudos envolvendo espectroscopia de camada interna da insulina isolada em fase gasosa. Estes resultados são muito relevantes para estudos na área de radiobiologia e danos causados por radiação em sistemas complexos como proteínas.

## CAPÍTULO 6 - DMDS: FOTOIONIZAÇÃO, FOTOABSORÇÃO E FRAGMENTAÇÃO IÔNICA NA BORDA S 2p

### 6.1. Introdução

O enxofre é um elemento abundante na natureza e se apresenta não só nas formas inorgânica e orgânica, como também na sua forma livre [56]. Além da sua importância constitucional, compostos sulfurados são essenciais para o equilíbrio do nosso planeta pois atuam no ciclo oceano-atmosfera. Nesse ciclo, o enxofre inorgânico normalmente encontrado sob a forma de sulfatos ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) é transformado em enxofre orgânico. Em seguida, é liberado para a atmosfera, de onde é transportado para a superfície do planeta ou de volta para os mares (Figura 6.1). Os compostos de enxofre são indispensáveis para a vida no nosso planeta e correspondem a 1% de massa seca dos organismos [43].

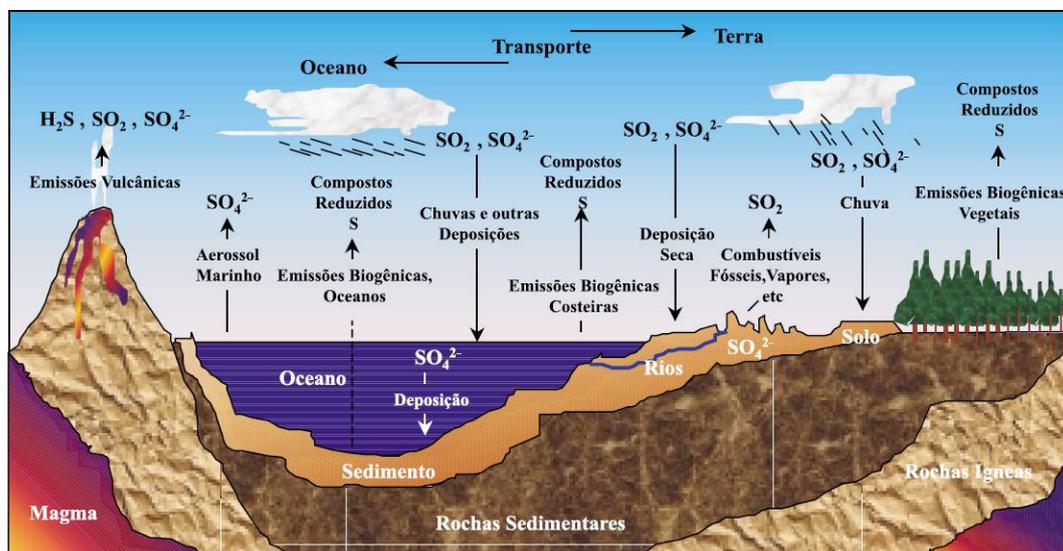


Figura 6.1 Ciclo biogeoquímico do enxofre [57].

O enxofre pode ser encontrado também sob a forma de ligação dissulfeto. Nas biomoléculas, estas ligações possuem um papel essencial no que diz respeito à forma e à estabilidade de diversas peptídeos e proteínas.

A menor molécula orgânica que possui uma ligação dissulfeto é o dimetil dissulfeto, ou DMDS ( $C_2H_6S_2$ , Figura 6.2). Por essa razão, esta molécula foi usada como protótipo para o estudo de moléculas que possuem ligação dissulfeto mais complexas, como por exemplo a insulina, principalmente por se apresentar sob a forma líquida, ser estável e volátil.



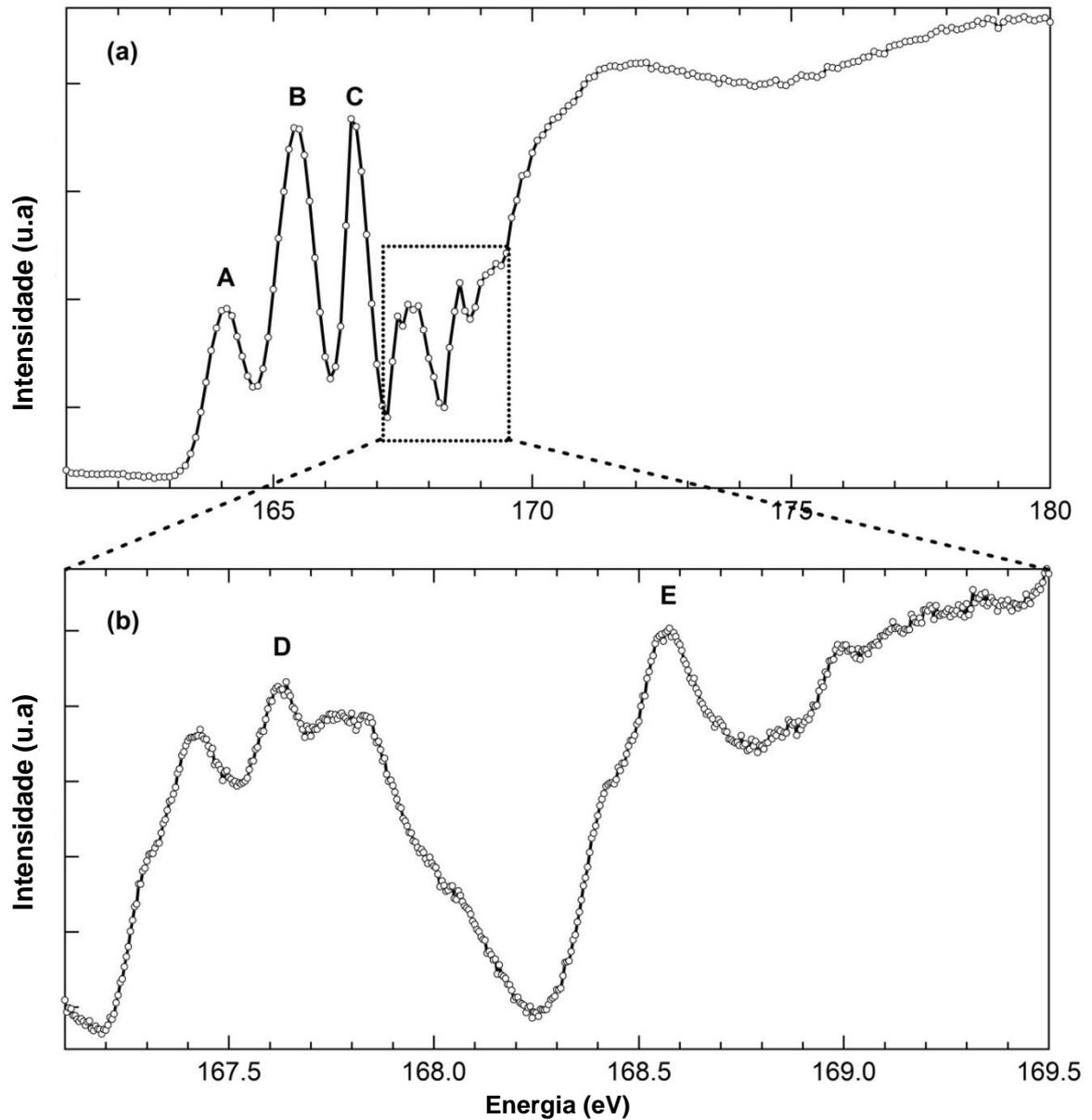
**Figura 6.2** Representação estrutural da molécula de DMDS

No DMDS, o enxofre está sob a forma reduzida assim como no sulfeto de hidrogênio, metil-mercaptana e dimetil-sulfeto. Estes compostos, assim como o DMDS, são apontados como poluentes atmosféricos e são, de maneira geral, os compostos de enxofre reduzido mais frequentemente emitidos em operações de refinarias de petróleo, fábricas de celulose e plantas de tratamento de esgoto. Os compostos que possuem enxofre reduzido em sua composição também podem ocorrer naturalmente no ambiente como resultado da degradação microbiológica de matéria orgânica contendo sulfatos, sob condições anaeróbias, e como resultado da decomposição bacteriológica de proteínas [57].

## 6.2 – Resultados e Discussões

### 6.2.1 – Fotoabsorção

O espectro de fotoabsorção em alta resolução do DMDS, medido entre 161 eV e 180 eV é mostrado na Figura 6.3. É possível também ver no detalhe, o espectro na faixa de 167,0 eV a 169,5 eV. Comparando-se com resultados anteriores [58], pode-se observar uma concordância em relação aos picos principais podendo-se também verificar estruturas adicionais, principalmente entre a faixa de energia de 167 eV a 170 eV devido à significativa melhora na resolução do espectro.



**Figura 6.3** Espectro de fotoabsorção da molécula de DMDS em torno da borda S 2p (superior). Detalhe do espectro de fotoabsorção da molécula de DMDS na faixa de energia de 167 eV a 169,5 eV (inferior)

**Tabela 6.1** Energias e atribuições para as ressonâncias do S 2p, de acordo com a numeração da Figura 6.3

| Ressonância | Energia (eV)          | Atribuição <sup>1</sup>                           |
|-------------|-----------------------|---|
| <b>A</b>    | 164,1                 | S 2p → $\sigma^*$ SS                              |
| <b>B</b>    | 165,4                 | S 2p → $\sigma^*$ SS<br>+<br>S 2p → $\sigma^*$ CS |
| <b>C</b>    | 166,5                 | 166.4 / 166.6<br>S 2p → $\sigma^*$ CS             |
| <b>D</b>    | 167,4 / 167,6 / 167,8 | -   |
| <b>E</b>    | 168,6                 | -   |

A molécula do DMDS pertence ao grupo de ponto  $C_2$  e possui distribuição eletrônica como a molécula de HF [59]: (1a)<sup>2</sup> (1b)<sup>2</sup> (2b)<sup>2</sup> (2a)<sup>2</sup> (3a)<sup>2</sup> (3b)<sup>2</sup> (4a)<sup>2</sup> (4b)<sup>2</sup> (5a)<sup>2</sup> (5b)<sup>2</sup> (6b)<sup>2</sup> (7a)<sup>2</sup> (7b)<sup>2</sup> (8a)<sup>2</sup> (8b)<sup>2</sup> (9a)<sup>2</sup> (9b)<sup>2</sup> (10a)<sup>2</sup> (10b)<sup>2</sup> (11a)<sup>2</sup> (11b)<sup>2</sup> (12a)<sup>2</sup>

$(12b)^2$   $(13a)^2$   $(14a)^\circ$   $(13b)^\circ$   $(14b)^\circ$   $(15a)^\circ$   $(15b)^\circ$   $(16a)^\circ$   $(16b)^\circ$   $(17a)^\circ$ . Neste grupo de ponto, todas as transições são permitidas por simetria.

De acordo com esta distribuição eletrônica,  $(11a)^2$   $(11b)^2$  são orbitais  $\sigma_{CS}$ ,  $(12a)^2$  é o orbital  $\sigma_{SS}$  enquanto que  $(12b)^2$  e  $(13a)^2$  possuem caráter S 3p e os elétrons S 2p ocupam os orbitais  $(4a)^2$   $(4b)^2$   $(5a)^2$   $(5b)^2$   $(6b)^2$   $(7a)^2$  [60]. Já os cinco primeiros potenciais de ionização são 8,96 eV ( $12b$ ); 9,26 eV ( $13a$ ); 11,26 eV ( $12a$ ); 12,31 eV ( $11a$ ); and 13,42 eV ( $11b$ ) [42].

As energias e as atribuições das principais ressonâncias encontram-se na Tabela 6.1. Esses valores foram obtidos da literatura, cujos cálculos utilizados são os melhores disponíveis atualmente [58].

### 6.2.2 – *Decaimento eletrônico: S 2p Auger Ressonante*

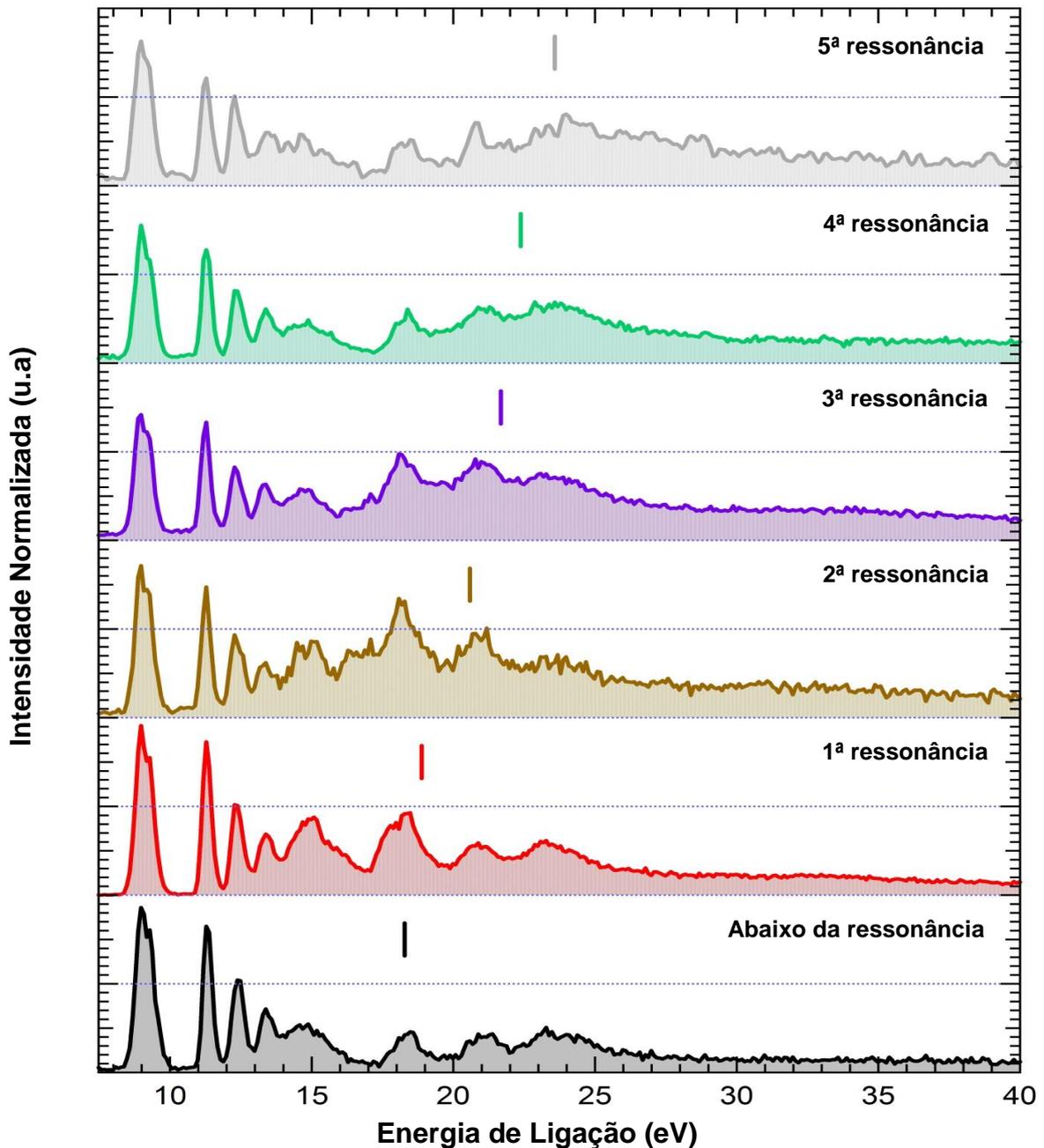
Na excitação eletrônica de camada interna de estados abaixo do potencial de ionização, a molécula pode gerar tanto um íon excitado de carga simples (Auger ressonante espectador) quanto apenas um íon de carga simples (Auger ressonante participante). Como já mencionado no capítulo 2, no primeiro caso, o elétron excitado não participa da relaxação do tipo Auger da molécula, enquanto que no segundo caso, o elétron excitado participa diretamente do processo de decaimento eletrônico.

Processos envolvendo elétrons Auger participante são, em princípio indistinguíveis dos processos de auto ionização pois a molécula é deixada no seu estado final como um cátion de carga simples.

Já no processo de decaimento Auger espectador, a molécula é deixada em seu estado final como um cátion excitado. Estes processos de decaimento eletrônico ocorrem em uma escala de femtosegundos e trazem consequências dramáticas para a estabilidade ou dissociação da molécula excitada.

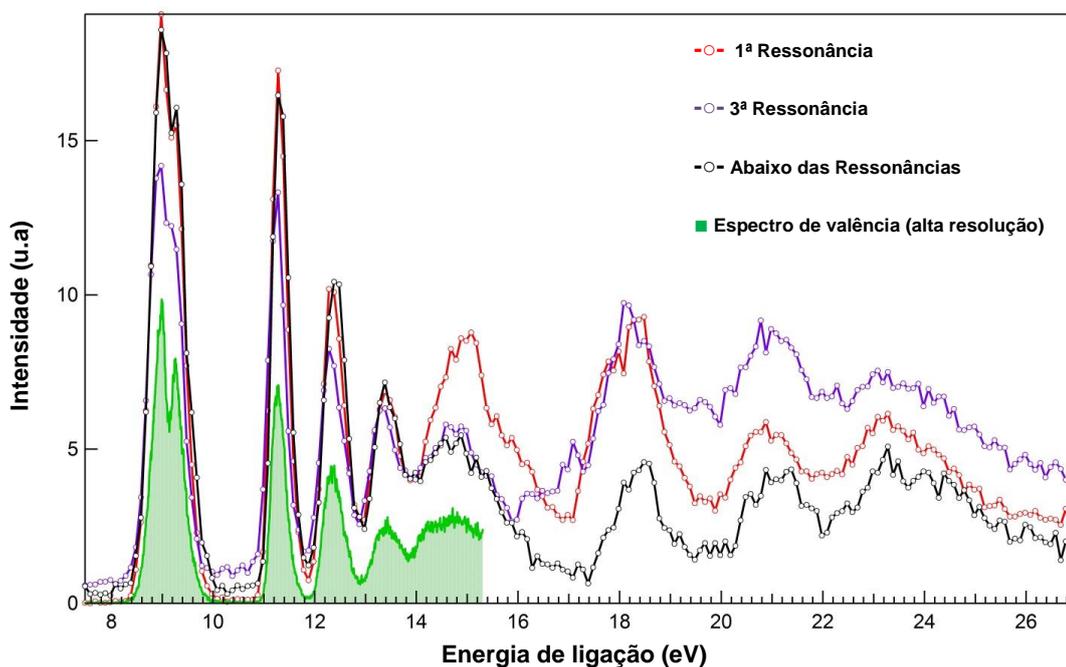
O estudo do decaimento eletrônico da molécula de DMDS, excitada abaixo do potencial do S 2p foi realizado adquirindo-se um espectro de fotoelétrons com energias iguais a  $h\nu = 161,5$  eV; 164,6 eV; 165,9 eV; 167,0 eV; 168,1 eV e 169,1 eV e com energias de ligação variando de 6 a 44 eV. A energia mais baixa corresponde à excitação da molécula abaixo das ressonâncias observadas no espectro de fotoabsorção em torno do S 2p. Ou seja, nesta energia, apenas processos de

ionização direta contribuem para o espectro. As outras cinco energias selecionadas, correspondem às estruturas ressonantes observadas no espectro de fotoabsorção (espectro Auger ressonante). Os seis espectros de fotoelétrons medidos experimentalmente são apresentados na Figura 6.4 em escala de energia de ligação.



**Figura 6.4** Espectros de fotoelétrons medidos antes das ressonâncias e nas ressonâncias

Pode-se observar que tanto o espectro de fotoelétrons medido em 161,5 eV (pré-ressonância) quanto todos os espectros de fotoelétrons medidos nas ressonâncias, na faixa de energia de ligação entre 8 e 14 eV, são praticamente idênticos. Pode-se assim inferir que parte da energia absorvida pela excitação de camada interna da molécula leva a ionização direta e a processos Auger participante. Os processos Auger espectador são muito importantes no decaimento eletrônico proveniente da excitação de camada interna pois os estados finais (íons excitados de carga simples) são identificados no espectro como bandas largas em regiões de energia de ligação mais altas. Os espectros obtidos nas duas energias de ressonância 164,6 eV (1ª ressonância) e 165,9 eV (2ª ressonância) foram normalizados em relação a primeira banda (energia de ligação de 8,9 eV) observada no espectro abaixo das ressonâncias, a 161,5 eV. Os três espectros podem ser observados na Figura 6.5.



**Figura 6.5** Espectros de fotoelétrons medidos abaixo das ressonâncias (161,5 eV) e nas duas primeiras ressonâncias (164,6 e 165,9 eV)

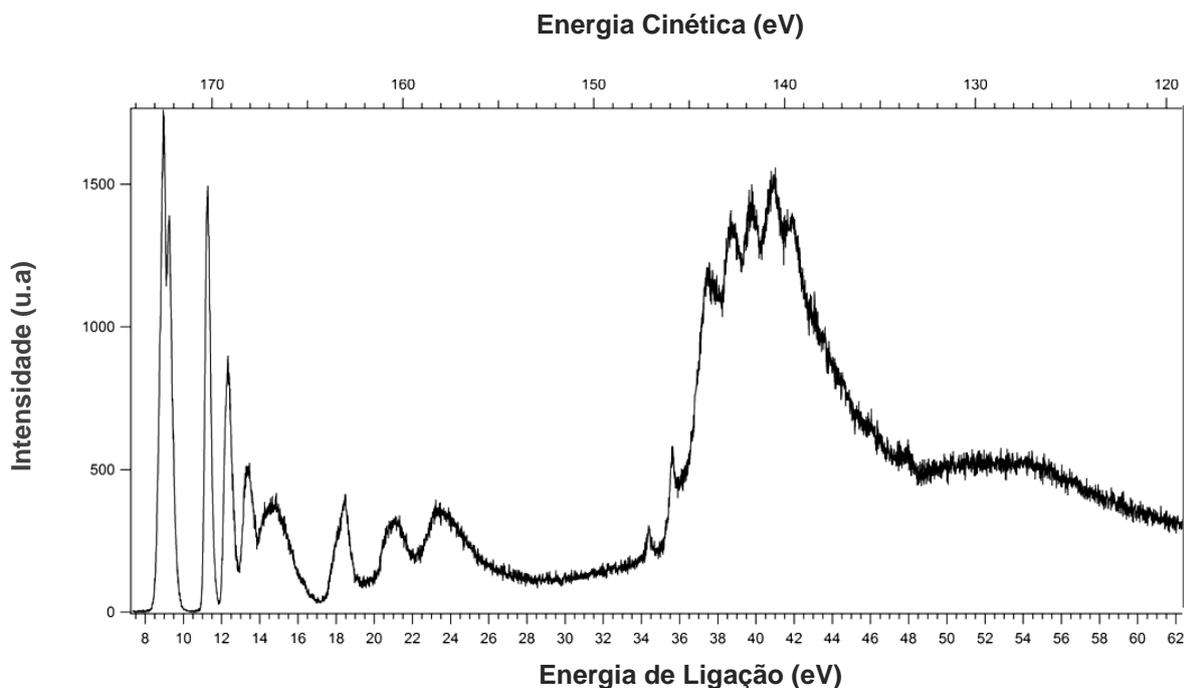
Tendo-se como referência cálculos teóricos anteriores [58], a ressonância observada em 164,6 eV corresponde a excitação da molécula para um orbital

antiligante com caráter S-S, enquanto que a ressonância em 167,0 eV corresponde à excitação para um estado antiligante com caráter C-S. Pode-se observar claramente tanto o espectro ressonante quanto o espectro abaixo das ressonâncias um aumento na intensidade das bandas acima de 16 eV, evidenciando a forte participação de processos Auger espectador. Embora os processos Auger espectador estejam presentes no decaimento de ambas as ressonâncias, de uma maneira geral, pode-se observar uma diferença na forma nos espectros obtidos nas duas ressonâncias acima de 16 eV, sugerindo que cada estado excitado decai através de um processo complexo e particular em espécies ionizadas de carga simples e íons excitados de carga simples.

Pode-se observar também que, em todos os casos, parte do processo de decaimento eletrônico deixa espécies ionizadas localizadas energeticamente acima do esperado para limite de dupla ionização.

#### **6.2.4 – Decaimento eletrônico: S 2p Auger Normal**

Seguindo a ionização de camada interna, uma molécula é normalmente deixada em um estado duplamente ou triplamente ionizado e este processo é conhecido como decaimento Auger Normal (ou duplo). Com o objetivo de compreender melhor os mecanismos de decaimento eletrônico seguidos da ionização de camada interna, obtivemos um espectro de fotoelétrons em 181,5 eV e o apresentamos na Figura 6.6.



**Figura 6.6** Espectro Auger S 2p do DMDS

Ao lado das bandas de baixa energia de ligação (observadas em todos os outros espectros de fotoelétrons apresentados anteriormente) que estão associados com estados iônicos excitados simplesmente carregados e íons de carga simples, observa-se também uma banda adicional intensa seguida de uma longa cauda em uma faixa de energia cinética de 148 eV a 135 eV. Picos bem definidos centrados em 147,1 eV; 145,9 eV; 144,0 eV; 142,81 eV; 141,7 eV; 140,6 eV e 139,6 eV podem ser observados no espectro Auger. Observando-se o espectro, pode-se verificar claramente que a relaxação da molécula de DMDS, criando uma vacância no S 2p dá origem a espécies iônicas simples e duplas, ou até possivelmente triplas.

De acordo com a literatura [43], sabe-se que a energia do potencial de ionização do S 2p é de 169,8 eV. Assim, verifica-se que os picos com valores de energia de ligação observados no espectro de 22,7 eV; 23,9 eV; 25,8 eV; 27,0 eV; 28,1 eV; 29,2 eV e 30,2 eV correspondem aos valores dos potenciais dos íons do DMDS duplamente carregado. Como mencionado anteriormente, de acordo com a regra empírica de Eland [61], o limite de dupla ionização do DMDS ocorreria em 25,2 eV. A discrepância entre o valor observado experimentalmente e o valor empírico pode ser explicado levando-se em consideração as limitações do modelo empírico e a complexidade da relaxação de uma molécula poliatômica, no qual as bandas

Auger estão associadas a efeitos intensos de correlação de elétrons. Na verdade, um estudo teórico detalhado sobre o processo Auger em moléculas poliatômicas feito por Cederbaum e colaboradores [62] mostrou que bandas observadas experimentalmente correspondem em geral a um grande número de estados dicatiônicos. A alta densidade de estados duplamente ionizados irá induzir conseqüentemente a efeitos de correlação mesmo para energias de ionização baixas. As duas bandas de mais baixa energia (22,7 eV e 23,9 eV) observadas na Figura 6.6, são mais finas comparando-se com outras bandas Auger. Este afinamento pode indicar uma remoção de elétrons de orbitais mais externos e a inalteração parcial das ligações químicas associadas, independente do elétron removido [63].

As outras bandas Auger estariam envolvidas na remoção dos elétrons de estados de valência mais internos. Processos de correlação tornam-se muito mais importantes neste caso, possivelmente dando origem a um novo formato para os orbitais moleculares. Os estados iônicos finais associados com o decaimento Auger são normalmente altamente dissociativos, levando a uma intensa fragmentação da molécula. De acordo com trabalhos anteriores [58], a energia de 181,5 eV corresponde a uma estrutura bem larga no espectro de fotoabsorção em torno do S 2p. Estruturas largas acima do limite de ionização de camadas internas de moléculas são geralmente associadas a ressonâncias de forma [64].

Sabe-se que estruturas finas foram previamente observadas no espectro Auger do O 1s para a molécula de H<sub>2</sub>O [65], [66] e foram atribuídas ao decaimento eletrônico do radical OH, resultado de uma dissociação ultra rápida da molécula de água duplamente ionizada. No nosso caso, não existem evidências teóricas nem experimentais sobre a existência de processos de dissociação ultra rápida para a molécula de DMDS.

### 6.2.5 – Fragmentação iônica

Estados moleculares de excitação e ionização de camada interna normalmente possuem um caráter dissociativo e como resultado, a molécula excitada é, em geral, submetida a uma fragmentação muito rápida gerando fragmentos iônicos e neutros. O uso da radiação síncrotron e técnicas de espectrometria de massas tornaram-se ferramentas extremamente poderosas para a observação dos padrões de fragmentação associados com a excitação das moléculas abaixo das ressonâncias, nas ressonâncias e acima das ressonâncias de camada interna (associados respectivamente com a ionização direta, processos Auger ressonante e Auger normal) [4], [5], [67].

Verificou-se recentemente [58] que a excitação da molécula de DMDS em torno da borda 2p do enxofre leva a uma intensa dissociação da molécula. Os picos majoritários observados foram  $H^+$  (m/z 1),  $CH_3^+$  (m/z 15),  $S^+$  (m/z 32),  $CH_nS^+$  (m/z 45-48),  $CH_3SCH_2^+$  (m/z 61),  $S_2^+$  (m/z 64),  $CH_3SS^+$  (m/z 79) e  $CH_3SSCH_3^+$  (m/z 94) (Tabela 6.2). Foi verificado ainda que a porcentagem na formação do íon  $CH_3S^+$  possui um máximo na primeira ressonância que, de acordo com cálculos teóricos, possui um caráter S-S antiligante. Claramente, este íon é a confirmação da quebra da ligação dissulfeto.

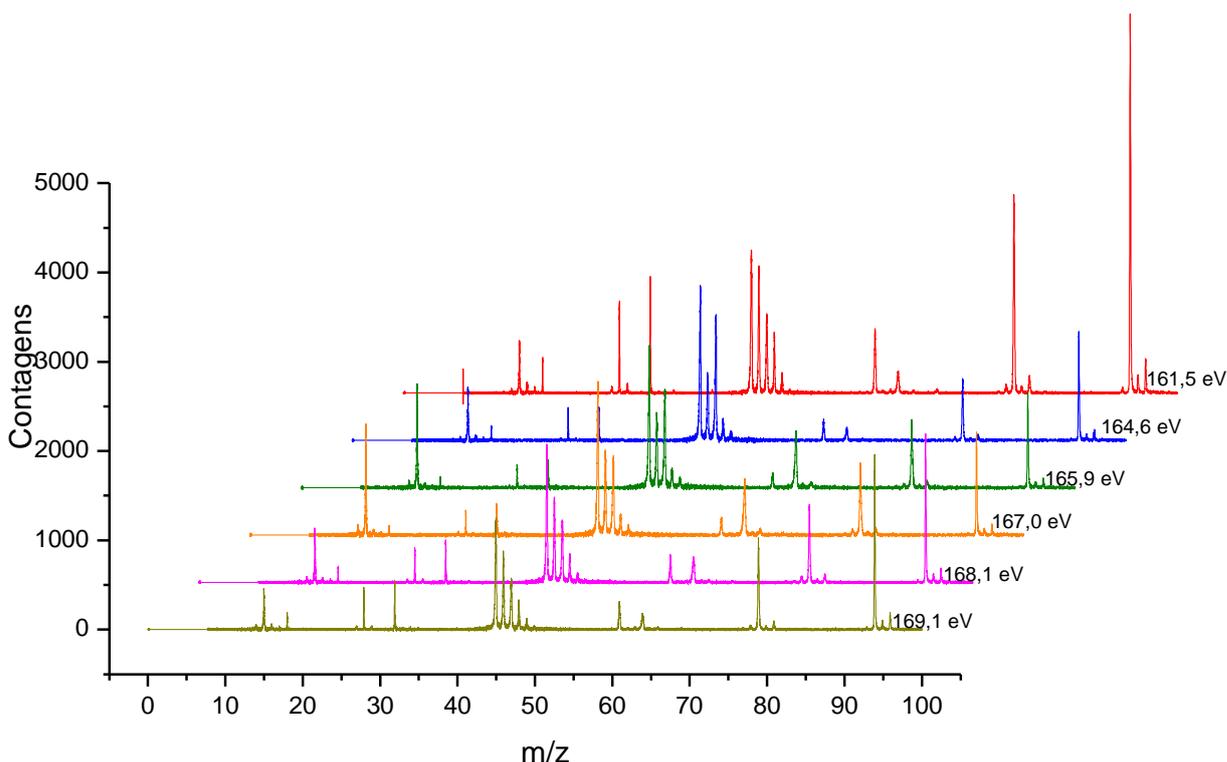
**Tabela 6.2** Valores de m/z relativos aos fragmentos iônicos do DMDS

| m/z            | Fórmula Molecular        |
|----------------|--------------------------|
| 1              | $H^+$                    |
| 15             | $CH_3^+$                 |
| 32             | $S^+$                    |
| 45, 46, 47, 48 | $CH_nS^+$ (n=1, 2, 3, 4) |
| 61             | $CH_3SCH_2^+$            |
| 64             | $S_2^+$                  |
| 79             | $CH_3SS^+$               |
| 94             | $CH_3SSCH_3^+$           |

Neste trabalho, o uso de uma técnica de coincidência entre íons e fotoelétrons resolvida em energia permitiu uma análise profunda para a compreensão da dissociação da molécula altamente excitada de DMDS. Basicamente, o uso de um analisador duplo toroidal (DTA) de alta transmissão em combinação com um espectrômetro de massas por tempo de voo permitiu a extração e a identificação dos íons formados em coincidência com os fotoelétrons de energia selecionada. Consequentemente foi possível após interpretação dos dados, mostrar a íntima associação entre certos estados eletrônicos e a formação de um íon ou íons.

#### ***6.2.5.1 – Fragmentação iônica em coincidência com elétrons de energia selecionada, abaixo da borda 2p do enxofre***

Espectros de massa da molécula de DMDS, utilizando energias abaixo das ressonâncias e nas cinco ressonâncias, foram medidos em coincidência com os fotoelétrons com energias de ligação na faixa de 8,0 eV a 23 eV. O resultado dessas medidas é apresentado na Figura 6.7.

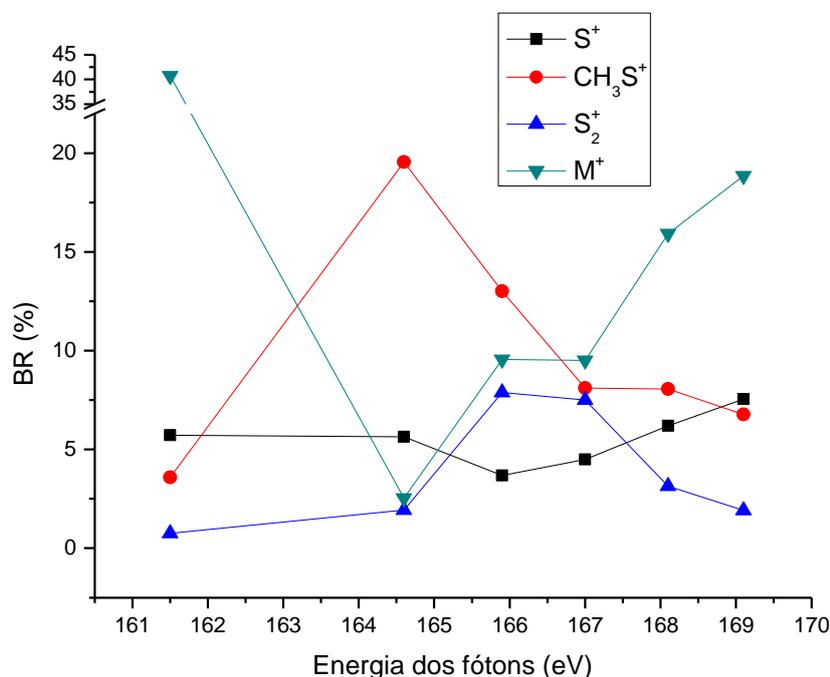


**Figura 6.7** Fragmentação iônica da molécula de DMDS medido abaixo (161,5 eV) e nas cinco ressonâncias numeradas no espectro de fotoabsorção (Figura 6.3).

Cada espectro foi normalizado em relação ao pico mais intenso e representa a soma de todos os fragmentos iônicos detectados em coincidência com os fotoelétrons que possuem energia de ligação na faixa de 8,0 eV a 23 eV. Em um primeiro momento, é observada uma similaridade ao longo dos espectros de massas e comparando-se com resultados anteriores [58], basicamente os mesmos fragmentos iônicos foram obtidos. Não foram observados picos referentes a espécies estáveis duplamente carregadas. É possível verificar também que a aplicação de um campo de extração pulsado impossibilita que os íons  $H^+$  possam ser observados nestes espectros.

Levando-se em consideração a presença do íon pai nos espectros como uma evidência da ionização sem dissociação, pode-se observar que ele permanece como o pico mais intenso no espectro abaixo das ressonâncias e na quarta e quinta ressonâncias. O fragmento  $CH_nS^+$  que, por outro lado, constitui a principal evidência no que diz respeito a quebra da ligação dissulfeto, apresenta o pico mais intenso na primeira, segunda e terceira ressonâncias. Já o cátion  $S^+$  que reflete a dissociação

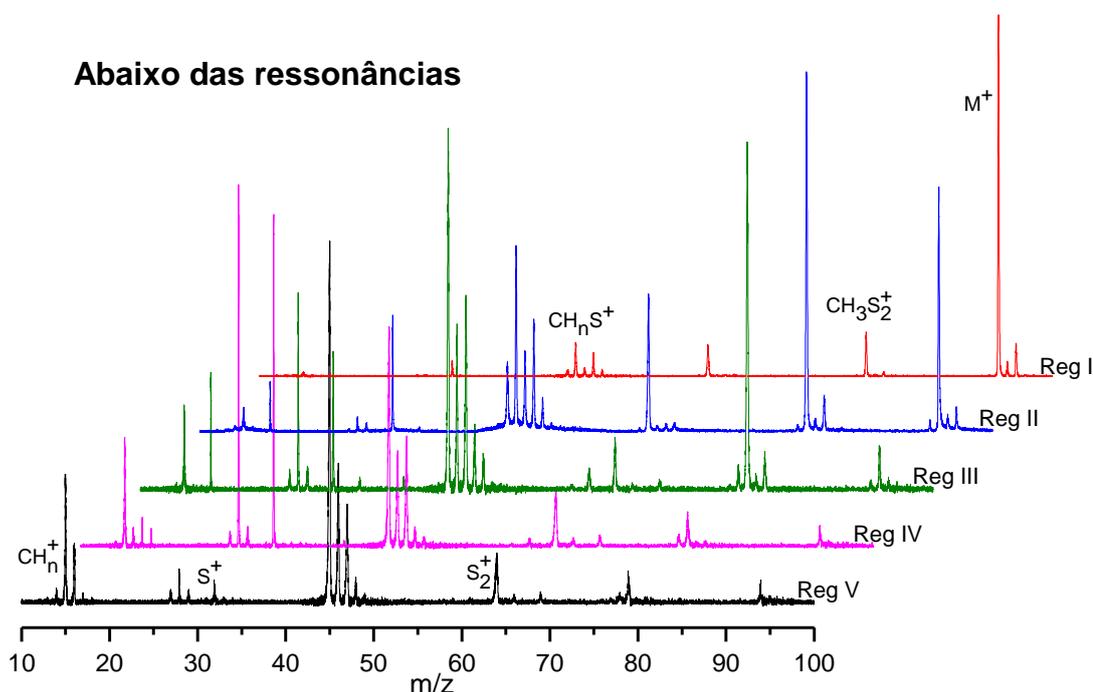
dos fragmentos  $\text{CH}_n\text{S}^+$  ou a completa atomização da molécula, é observado em todos os espectros juntamente com o cátion  $\text{S}_2^+$ . O cátion  $\text{S}_2^+$  por sua vez está associado simultaneamente com a quebra em dois estágios de ambas ligações C-S. A coexistência nos espectros de fragmentos em que a ligação dissulfeto permanece intacta ( $\text{M}^+$ ,  $\text{M-CH}_3^+$ ,  $\text{S}_2^+$ ) juntamente com fragmentos associados a quebra da ligação dissulfeto ( $\text{CH}_n\text{S}^+$ ,  $\text{S}^+$ ), implica em um mecanismo de fragmentação complexo neste regime de fótons com energia alta. A dependência em relação à energia dos fótons para o íon pai, os cátions  $\text{CH}_3\text{S}^+$ ,  $\text{S}^+$  e  $\text{S}_2^+$ , mostrado na Figura 6.8, confirma que enquanto o rendimento para o cátion  $\text{CH}_3\text{S}^+$  é maximizado na primeira ressonância, a contribuição do íon pai é muito maior abaixo das ressonâncias, um mínimo é atingido na primeira ressonância e aumenta continuamente com o aumento da energia dos fótons. A atomização da molécula, associada à presença do íon  $\text{S}^+$  pode ser observada em toda a faixa de energia.



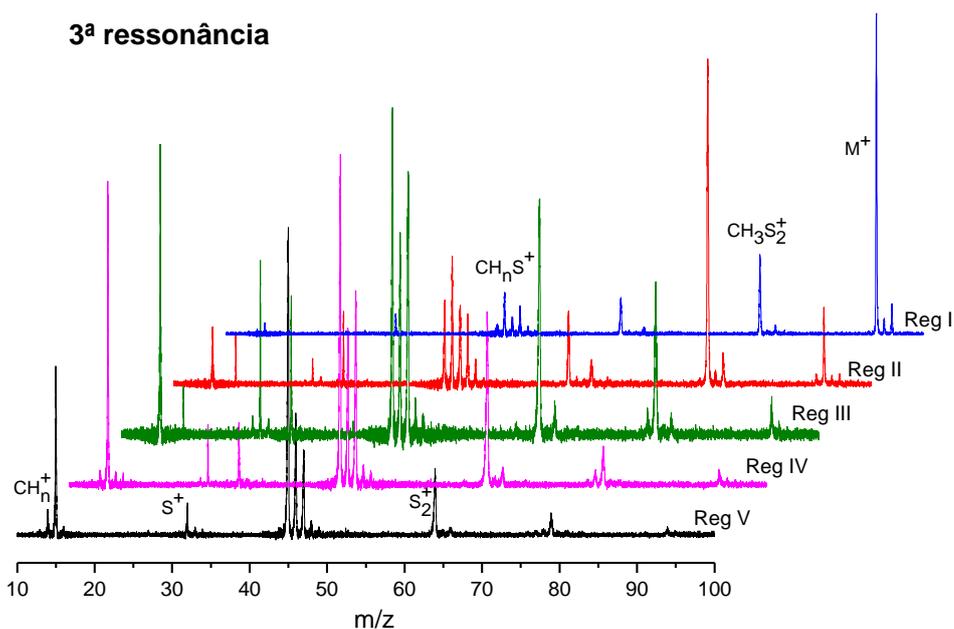
**Figura 6.8** Dependência da energia dos fótons para os rendimentos dos fragmentos  $\text{CH}_3\text{SSCH}_3^+$ ,  $\text{CH}_3\text{S}^+$ ,  $\text{S}^+$  e  $\text{S}_2^+$

Com o objetivo de explorar mais detalhes da relação entre os processos de fotoexcitação e da fragmentação iônica correspondente, foram obtidos espectros de massa nas mesmas energias dos fótons (abaixo e nas cinco ressonâncias) mas agora em coincidência com fotoelétrons com energias de ligação mais restritas: (8,0 – 10,5 eV, Região I); (10,5 – 13,7 eV, Região II); (13,7 – 16,3 eV, Região III); (16,3 – 19,7 eV, Região IV) e (19,7 – 21,4 eV, Região V). De forma ilustrativa, apenas os espectros abaixo das ressonâncias e 3ª ressonância são mostrados nas Figuras 6.9 e 6.10.

Esperava-se que fragmentos iônicos detectados em coincidência com fotoelétrons entre as regiões I e II estivessem associados principalmente com o esgotamento eletrônico dos orbitais de valência mais externos, enquanto os fragmentos detectados em coincidência com as regiões III, IV e V estaria relacionados a processos de ionização mais complexos envolvendo orbitais de valência mais internos.



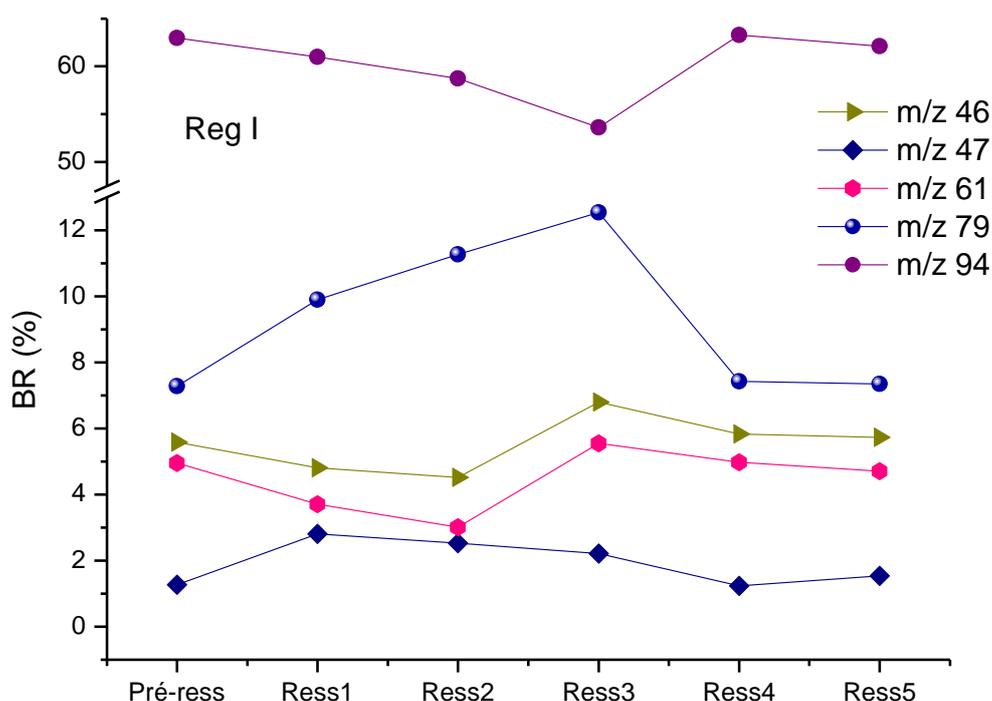
**Figura 6.9** Espectro de massas obtido a 161,5 eV em coincidência com electrons de energia selecionada. As energias de ligação correspondentes às regiões estão definidas no texto



**Figura 6.10** Espectro de massas obtido na terceira ressonância em coincidência com elétrons de energia selecionada. As energias de ligação correspondentes às regiões estão definidas no texto

A partir de uma análise detalhada da fragmentação iônica do DMDS associado aos fotoelétrons de cada região com as específicas energias de ligação é possível fazer as seguintes observações:

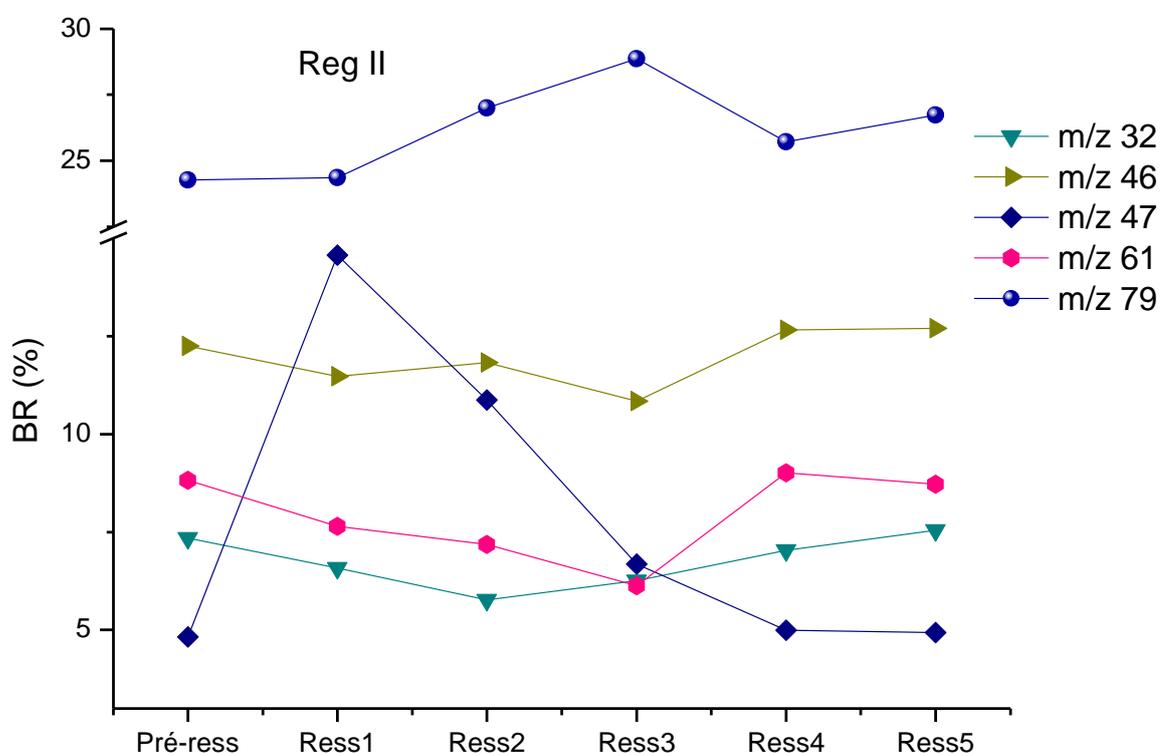
**Região I** (energia de ligação 8,0 a 10,5 eV): A dependência da energia para os rendimentos dos fragmentos selecionados pode ser visualizado na Figura 6.11. Um baixo grau de fragmentação pode ser observado nos espectros obtidos para todas as faixas de energia. O íon pai ( $M$ )<sup>+</sup> e o íon ( $M-CH_3$ )<sup>+</sup> apresentam picos dominantes nos espectros. Entretanto, é possível observar um ligeiro aumento na fragmentação molecular com o aumento da energia, avaliando-se desde o espectro obtido abaixo das ressonâncias (ionização direta) até os espectros obtidos para a quarta e quinta ressonâncias. Este fato pode ser exemplificado pelo lento aumento do rendimento para o fragmento ( $CH_2S$ )<sup>+</sup> ( $m/z$  46). O rendimento para o íon formado através de um rearranjo, ( $CH_3SCH_2$ )<sup>+</sup> ( $m/z$  61) também mostra uma certa



dependência em energia.

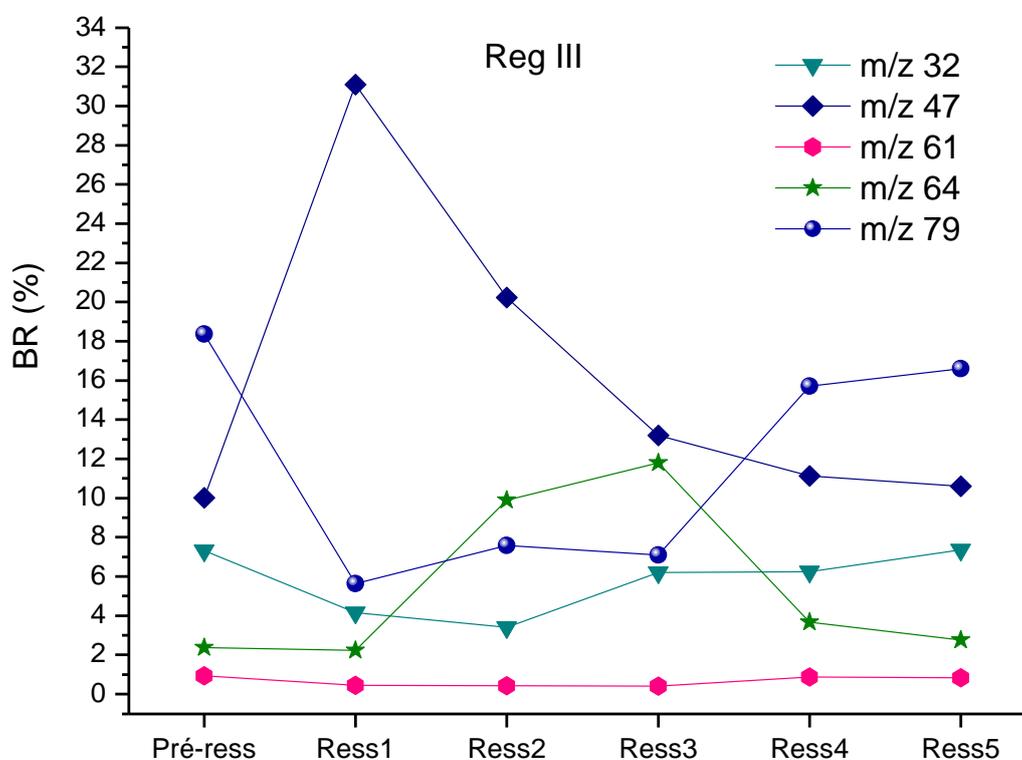
**Figura 6.11** Dependência da energia para os rendimentos dos íons selecionados, medidos em coincidência com os fotoelétrons com energias de ligação correspondentes a região I

**Região II** (energia de ligação 10,5 a 13,7 eV): A dependência da energia para os rendimentos dos fragmentos selecionados está representado na Figura 6.12. O cátion  $(M-CH_3)^+$  ( $m/z$  79) predomina em todas as energias. A contribuição do fragmento  $(CH_3S)^+$  ( $m/z$  47) é novamente maximizado na primeira ressonância. Nota-se que a formação do fragmento  $(CH_2S)^+$  ( $m/z$  46) é bem significativa (exceto para a energia correspondente a primeira ressonância, o rendimento para o fragmento  $(CH_2S)^+$  é sempre maior comparado ao rendimento do fragmento  $(CH_3S)^+$ ). Os íons  $S^+$  e  $(CH_3S-CH_2)^+$  podem ser observados em todas as energias.



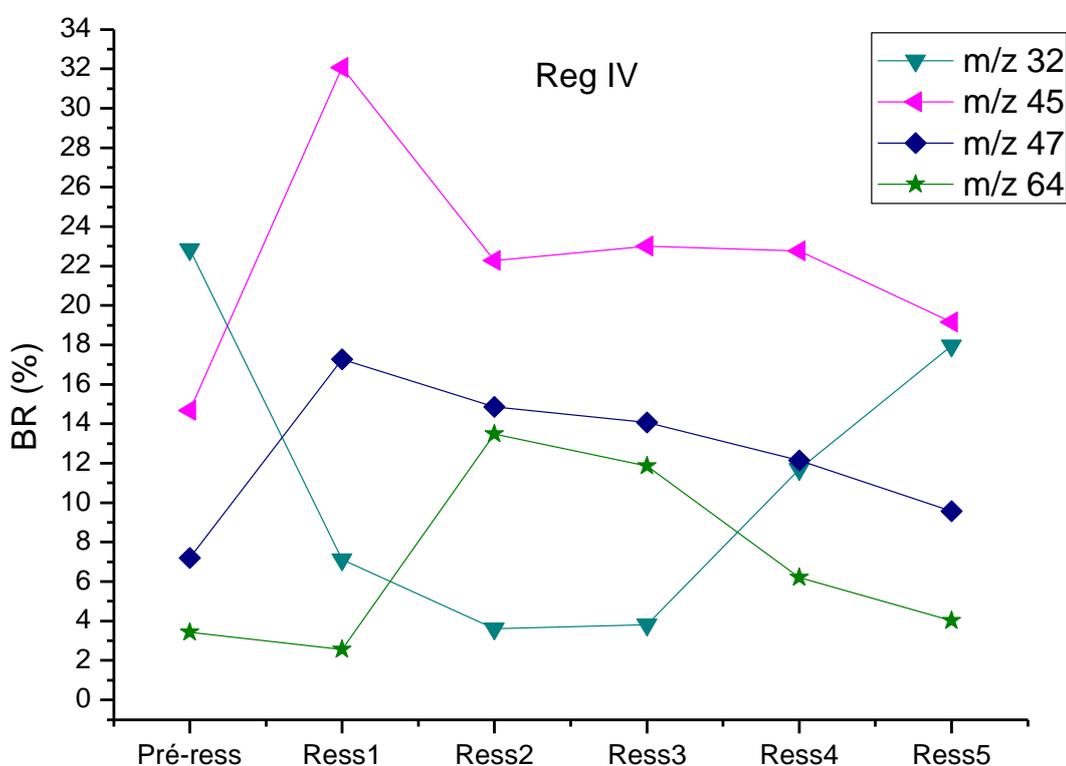
**Figura 6.12** Dependência da energia para os rendimentos dos íons selecionados, medidos em coincidência com os fotoelétrons com energias de ligação correspondentes a região II

**Região III** (energia de ligação 13,7 a 16,3 eV): A dependência da energia para os rendimentos dos fragmentos selecionados estão mostrados na Figura 6.13. A quebra da ligação química S-S nesta região torna-se o evento mais expressivo, com rendimento máximo para o íon  $\text{CH}_3\text{S}^+$  na primeira ressonância. A contribuição para o íon  $\text{S}_2^+$  é mais significativa nas segunda e terceira ressonâncias. Observa-se uma pequena contribuição do íon  $\text{CH}_3\text{SCH}_2^+$  formado por um rearranjo.



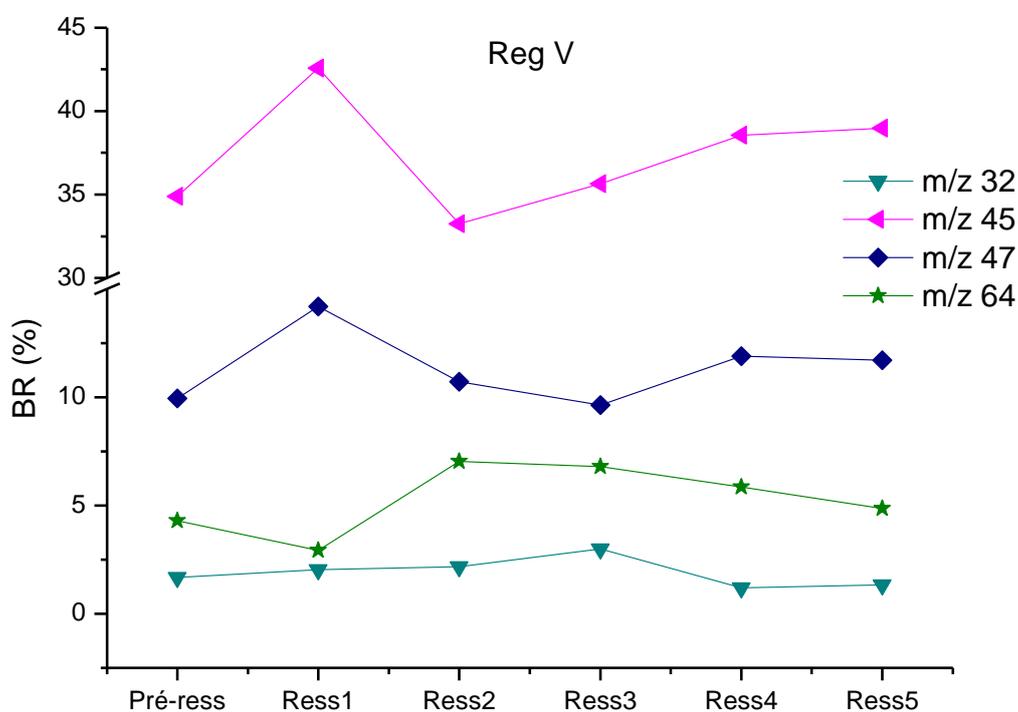
**Figura 6.13** Dependência da energia para os rendimentos dos íons selecionados, medidos em coincidência com os fotoelétrons com energias de ligação correspondentes a região III

**Região IV** (energia de ligação 16,3 a 19,7 eV): A dependência da energia para os rendimentos dos fragmentos selecionados estão mostrados na Figura 6.14. A quebra da ligação S-S também é bem significativa nesta faixa de energia, mas o rendimento para o íon  $\text{CHS}^+$  ( $m/z$  45) é maior do que o rendimento para o íon  $\text{CH}_3\text{S}^+$  ( $m/z$  47). O rendimento para o cátion  $\text{S}^+$  é mínimo para a segunda e terceira ressonâncias, enquanto que o rendimento do fragmento  $\text{S}_2^+$  mostra um comportamento oposto.



**Figura 6.14** Dependência da energia e dos rendimentos para os íons selecionados, medidos em coincidência com os fotoelétrons com energias de ligação dentro da região IV

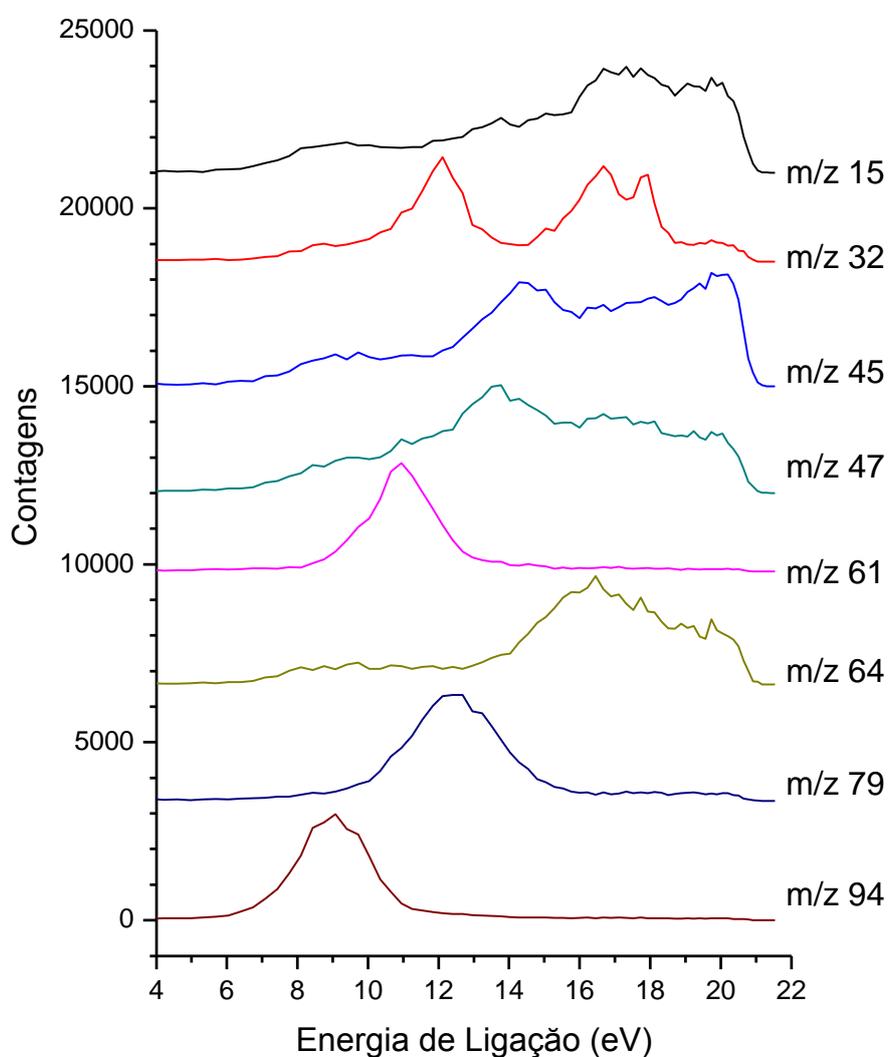
**Região V** (energia de ligação 19,7 a 21,4 eV): A dependência da energia para os rendimentos dos fragmentos selecionados estão mostrados na Figura 6.15. Similar a região IV, a quebra da ligação S-S é também significativa, com rendimento maior para o íon  $\text{CHS}^+$  (m/z 45) que para o íon  $\text{CH}_3\text{S}^+$  (m/z 47). Um pequeno grau de atomização ( $\text{S}^+$ ) pode ser observado.



**Figura 6.15** Dependência da energia e dos rendimentos para os íons selecionados, medidos em coincidência com os fotoelétrons com energias de ligação dentro da região V

O uso do equipamento experimental descrito anteriormente, nos permite também observar a dependência de espécies iônicas diferentes (espectro de massas e fotoelétrons selecionado, ou MSPES), como mostrado na Figura 6.16.

Verifica-se que cada curva iônica no espectro representa a soma dos rendimentos correspondentes, obtidos em função da energia de ligação do fotoelétron, para cada ressonância. Observa-se que, para um dado fragmento, a dependência da energia de ligação permanece praticamente constante, independente da energia do fóton.



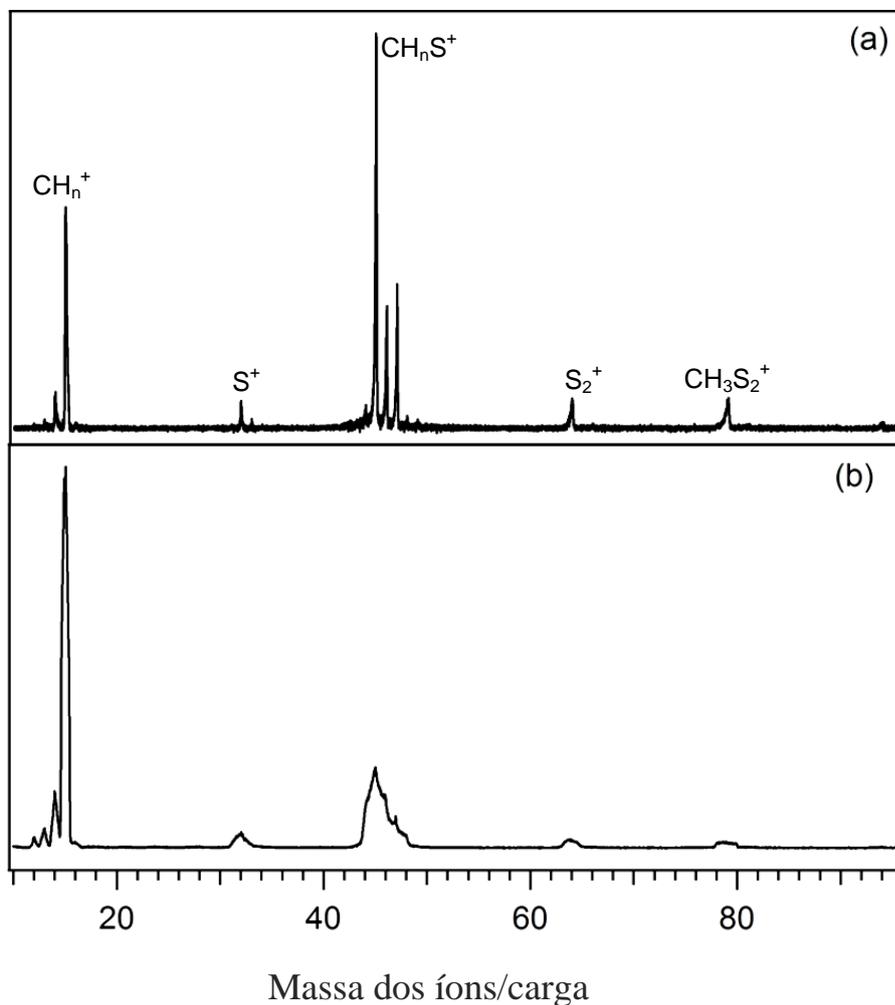
**Figura 6.16** Espectro de massas e fotoelétrons selecionado, ou MSPES

O espectro de massas selecionado confirma algumas das observações anteriores. A formação do íon pai  $(M)^+$  a partir do íon  $(M-CH_3)^+$  e do íon  $CH_3SCH_2^+$  proveniente de um rearranjo, estão basicamente associados com o esgotamento dos orbitais mais externos. A formação dos íons  $CH_nS^+$  por outro lado, mesmo espalhado por toda a faixa de energia de ligação, é muito maior seguindo a ionização dos orbitais com energias de ligação acima de 13 eV (orbitais de camada interna). Uma similaridade na forma dos espectros de fotoelétrons para  $S_2^+$  e  $CH_3^+$  pode ser observada. Esta similaridade pode indicar que o mecanismo de formação desses íons está associado com a criação dessas duas espécies. Uma possibilidade é que o íon  $S_2^+$  seria formado através de uma quebra simultânea entre as duas ligações C-S, originando os íons  $CH_3^+$ .

#### **6.2.5.2 – Fragmentação iônica em coincidência com elétrons de energia selecionada acima da borda de ionização S2p**

Seguindo a excitação acima da borda de ionização de camada interna, moléculas ou átomos geralmente decaem através de processos Auger normal, originando espécies moleculares multiplamente ionizadas e altamente dissociativas. Como consequência, essas espécies possuem um alto grau de fragmentação. Espectros de massa por tempo de voo obtidos em tais condições, mostram, geralmente, estruturas largas comparando-se a espectros de massas obtidos abaixo do potencial de ionização. A largura dos picos é normalmente atribuída a alta energia cinética dos íons, principalmente aqueles formados via explosão coulômbica de espécies duplamente ou multiplamente carregadas. Neste caso, com medidas utilizando o aparato experimental de coincidência elétron-ion com energia selecionada (EPICEA), é possível mostrar explicitamente, pela primeira vez, que o espectro de massas obtido acima de uma dada camada interna também contém, apesar dos fragmentos caracteristicamente largos formados em associação com elétrons Auger, fragmentos iônicos associados com a ionização de valência dos elétrons. Assim, espectros de massas foram medidos em 181,5 eV (acima da energia de ionização do S2p), ambos em coincidência com elétrons com energias de ligação baixas (8-23 eV) e em coincidência com elétrons Auger (130-150 eV de

energia cinética). Os resultados estão apresentados respectivamente nas figuras 6.17a e b.



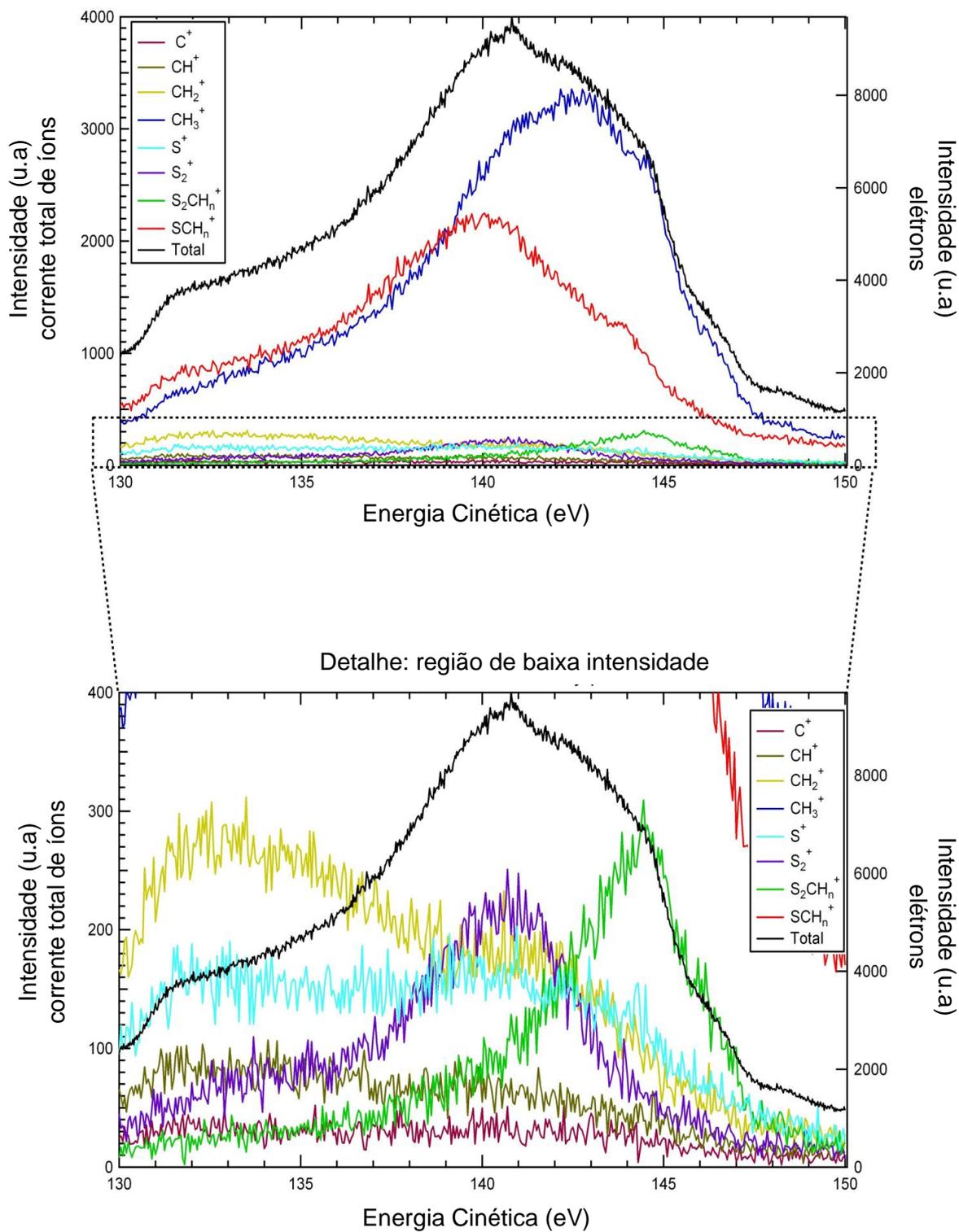
**Figura 6.17** Espectro de massas obtido em 181,5 eV, em coincidência com elétrons de energia de ligação entre 8,0 e 22,0 eV (a) e em coincidência com elétrons Auger de energia cinética entre 130 e 150 eV (b)

Os dois espectros foram obtidos na mesma energia dos fótons, nas mesmas condições experimentais dos espectros medidos abaixo do potencial de ionização do S2p como descrito anteriormente. Em ambos os casos, observa-se um alto grau de fragmentação. Considerando primeiramente, o espectro obtido em coincidência com elétrons de energia de ligação baixas, podemos observar que a estrutura mais intensa é  $CH_nS^+$ . Os fragmentos  $CH_3^+$ ,  $S^+$ ,  $S_2^+$  e  $(M-CH_3)^+$  também são observados

enquanto que o íon pai quase não é notado. O fragmento gerado através de um rearranjo ( $\text{CH}_3\text{SCH}_2^+$ ), não aparece nesta energia. É importante enfatizar que a largura dos picos é similar a dos observados nos espectros de fotoabsorção medidos abaixo e nas ressonâncias.

Considerando agora o espectro medido em coincidência com elétrons Auger (Figura 6.17b), agora tem-se o  $\text{CH}_3^+$  como fragmento dominante. Ao mesmo tempo, estruturas extremamente largas são observadas, associadas com os fragmentos  $\text{S}^+$ ,  $\text{CH}_n\text{S}^+$ ,  $\text{S}_2^+$  e  $\text{CH}_3\text{SS}^+$ . Este fato já era esperado, uma vez que considera-se que o processo Auger são, em geral, associados com a formação de íons de alta energia cinética, principalmente via explosão Coulômbica. Apenas um traço do íon pai pôde ser observado. Novamente, o fragmento originado de um rearranjo,  $\text{CH}_3\text{SCH}_2^+$  não é observado. A ausência desta estrutura provavelmente indica que a reação de rearranjo ocorre em uma escala de tempo muito lenta quando comparado ao decaimento Auger.

Os espectros de massas e fotoelétrons selecionados (MSPES) foram medidos na faixa de energia cinética dos elétrons Auger e os resultados estão mostrados na Figura 6.18. A corrente total de íons (curva em preto) também é mostrada para fins de comparação. Pelas medidas dos espectros de massa,  $\text{CH}_3^+$  e  $\text{CH}_n\text{S}^+$ , como já era esperado, constituem os principais canais de fragmentação. Como  $\text{CH}_3^+$  está necessariamente associado à dissociação do  $\text{CH}_n\text{S}^+$ , novamente pode-se verificar a evidência de um complexo e competitivo mecanismo de dissociação para a molécula de dimetil disulfeto quando submetido a fótons de alta energia.



**Figura 6.18** Espectros de massas e fotoelétrons selecionados adquiridos a 181,5 eV. Íons medidos em coincidência com os elétrons Auger

## CAPÍTULO 7 - CONCLUSÕES

---

Nesta tese, foi feito um estudo espectroscópico envolvendo danos causados por radiação em biomoléculas sulfuradas. Amostras de cisteína, cistina e insulina foram irradiadas tanto com elétrons quanto com fótons. Uma das técnicas experimentais utilizadas na caracterização do dano induzido nessas biomoléculas foi a espectrometria de massas. Esta técnica foi empregada na análise de gases emitidos pelas amostras provenientes do processo de irradiação.

Para que as amostras biológicas fossem irradiadas, foi necessário desenvolver uma metodologia que pudesse ser utilizada para irradiar amostras sólidas em geral. Esta metodologia mostrou-se eficiente e repetitiva tanto para aplicação em amostras de filmes poliméricos (PVC e PMMA) quanto em aminoácidos (cisteína), dipeptídeos (cistina) e proteínas (insulina) em pó. Para as análises envolvendo o PMMA e seus híbridos, os padrões de emissão de gases mostraram que a inserção de magnetita na constituição do polímero não interferia no aumento da estabilidade do mesmo. Já para as análises envolvendo as biomoléculas, através das medidas de emissão de gases pôde-se verificar a existência de uma influência térmica no processo de irradiação, pois as curvas de emissão de gases das amostras irradiadas em temperatura ambiente apresentaram um decaimento mais rápido do que das amostras irradiadas a 77K. Mesmo assim, a dependência térmica não controlava completamente o processo, visto que o dano causado pela irradiação na amostra de insulina pôde ser identificado por meio da técnica de NEXAFS.

Além de espectros de emissão de gases, foram obtidos espectros de fotoabsorção em torno da borda 1s do enxofre, oxigênio e nitrogênio das biomoléculas estudadas. Os espectros apresentaram diferenças antes e depois da irradiação tanto para as amostras irradiadas com elétrons quanto com fótons. Levando-se em consideração as diferenças significativas observadas nos espectros de NEXAFS em torno da borda S 1s da insulina irradiada com elétrons e dados da literatura que apontaram uma das pontes como sendo a mais sensível aos efeitos da radiação, pode-se afirmar que pelo menos uma das pontes dissulfeto da proteína foi quebrada. Já as diferenças observadas nos espectros de NEXAFS em torno das bordas O 1s e N 1s das amostras irradiadas com luz indicam danos mais drásticos

na estrutura das moléculas e mais complexos de serem interpretados. Os picos de absorção apresentaram diferenças significativas tanto no formato quanto no deslocamento de energia.

Medidas de fotoelétrons (XPS) também foram feitas para as biomoléculas irradiadas com elétrons. Foi possível observar diferenças tanto na forma quanto na intensidade e no deslocamento de energia dos picos correspondentes às energias de ligação do C1s, O1s e N1s. Essas diferenças mostraram relação direta com os resultados obtidos nos espectros de emissão de gases, complementando a interpretação dos dados.

Visando obter informações espectroscópicas de camada interna da insulina isolada em vácuo, foram realizadas medidas de espectrometria de massas *tandem* no laboratório francês SOLEIL. Um espectrômetro de massas comercial do tipo *ion trap* foi acoplado à linha de luz PLEIADES e os espectros foram adquiridos em função da energia dos fótons, na faixa de energia em torno da borda 1s do carbono, de 283,2 eV a 300 eV. As intensidades dos picos correspondentes à simples e dupla ionização foram normalizados em relação à corrente total dos íons e ao fluxo de fótons. O espectro obtido apresenta-se em termos de rendimento iônico relativo em função da energia. Foram identificadas seis transições nos espectros de simples e dupla ionização correspondentes à transições encontradas nos espectros de NEXAFS de amostras de aminoácidos presentes na literatura. É a primeira vez que estudos envolvendo espectroscopia em camada interna da insulina isolada em vácuo é reportada.

Devido à complexidade envolvida no estudo espectroscópico da insulina em fase gasosa e com o objetivo de compreender mais fundamentalmente o dano causado nas ligações dissulfeto, espectros de fotoabsorção, fragmentação iônica e fotoelétrons em torno da borda 2p do enxofre foram obtidos para a molécula de DMDS. O DMDS atuou como um protótipo para o estudo das pontes dissulfeto. Foram efetuadas medidas de fotoabsorção com alta-resolução e experiências de coincidência entre elétrons analisados em energia e íons. Os espectros de coincidência íon-elétron foram obtidas nas energias de 161,5 eV (Pré-Ressonância), 164,6 eV (1ª ressonância), 165,9 eV (2ª ressonância), 167,0 eV (3ª ressonância), 168,1 eV (4ª ressonância), 169,1 eV (5ª ressonância) e 181,5 eV (Pós-ressonância). Nesta experiência de coincidência, a energia dos elétrons estão restritas a um

intervalo de 8 a 22 eV. Os padrões de fragmentação da molécula em diferentes energias comprovaram a existência de uma fragmentação seletiva.

Os resultados obtidos nesta tese apresentam um estudo amplo sobre os danos causados por radiação em biomoléculas sulfuradas, fazendo uso de diferentes técnicas experimentais de caracterização e possibilita novas perspectivas na área de espectroscopia. No campo experimental, essas perspectivas incluem o uso de outras técnicas espectroscópicas para caracterizar modificações estruturais em proteínas, como por exemplo o dicroísmo circular e a espectrometria de massas *tandem*. Dando continuidade ao estudo espectroscópico de camada interna de proteínas em fase gasosa, a montagem experimental que utiliza um espectrômetro de massas do tipo *ion trap* acoplado a uma linha de luz que opera na faixa dos raios X moles também pode ser utilizada para o estudo de camadas internas de outros elementos como por exemplo o nitrogênio, o oxigênio e até mesmo o enxofre.

No campo teórico, um desafio para o estudo de danos causados por radiação em biomoléculas envolve a quantificação da dose absorvida pelas biomoléculas irradiadas com elétrons e com fótons. Neste caso, variáveis como espessura do filme depositado, densidade da amostra, tamanho do feixe, fluxo e corrente precisam ser monitorados para que a dose absorvida de radiação possa ser estimada.

Por fim, espera-se que este trabalho possa ser utilizado como base para estudos futuros relacionados a danos causados por radiação e estudos espectroscópicos envolvendo outros tipos de amostras, como por exemplo, amostras de plantas, cabelo e polímeros em geral, assim como outras biomoléculas.

## REFERÊNCIAS

---

1. STÖHR, J. **NEXAFS Spectroscopy**. Berlin: Springer-Verlag, 1992.
2. SVENSSON, S. **J. Phys. B.**, v. 38, p. S821, 2005.
3. BUNKER, G. **Introduction to XAFS**. Cambridge: Cambridge University Press, 2010.
4. NENNER, I.; MORIN, P. **VUV and Soft X-Ray Photoionization**. Nova York: Plenum Press, 1996.
5. MIRON, C.; MORIN, P. High resolution Inner-shell Photoionization Photoelectron and Coincidence Spectroscopy. In: \_\_\_\_\_ **Handbook of High-Resolution Spectroscopy**. Chichester, Inglaterra: John Wiley & Sons Ltd, 2011. p. 1655-1690.
6. MULLER-DETHLEFS, K.; SCHLAG, E. W. **Annu. Rev. Phys. Chem.**, v. 42, p. 109, 1991.
7. HOLLAS, J. M. **Modern Spectroscopy**. Chichester: Wiley, 2004.
8. ROMPEL, A. et al. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v. 95, p. 6122, 1998.
9. MILLERA, L. M.; DUMAS, P. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1758, n. 7, p. 846–857, 2006.
10. ZUBAVICHUS, Y. **Radiation Research**, v. 161, n. 3, p. 346-358, 2004.
11. WANG, J. et al. **J. Elec. Spec. Rel. Phen.**, v. 170, p. 25, 2009.
12. HOGG, P. J. **TRENDS in Biochemical Sciences**, v. 28, n. 4, p. 210, 2003.
13. WEIK, M. et al. **PNAS**, v. 97, p. 623, 2000.
14. SCHULZE-BRIESE, C. et al. **J. Synchrotron Rad.**, v. 12, p. 261, 2005.
15. PICKERING, I. J. et al. **Federation of European Biochemical Societies (FEBS) Letters**, v. 441, p. 11, 1998.
16. FRANK, P.; HEDMAN, B.; HODGSON, K. O. **Inorg. Chem.**, v. 38, p. 260, 1999.
17. GROSSMAN, M. J. et al. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, p. 181, 1999.
18. YU, E. Y. et al. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1527, p. 156, 2001.

19. ZUBAVICHUS, Y. et al. **J. Phys. Chem. A**, v. 109, p. 6998, 2005.
20. ZUBAVICHUS, Y. et al. **Nucl. Instr. Meth. Phys. Research A**, v. 603, p. 111, 2009.
21. KAZNACHEYEV, K. et al. **J. Phys. Chem. A**, v. 106, p. 3153, 2002.
22. HOWELLS, M. R.; HITCHCOCK, A. P.; JACOBSEN, C. J. **J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.**, v. 170, p. 1, 2009.
23. MISRA, M.; EGERTON, R. F. **Ultramicroscopy**, v. 15, p. 337, 1984.
24. SANCHE, L. **Eur. Phys. J. D.**, v. 35, p. 367, 2005.
25. BARNETT, I. L.; LIGNELL, A.; GUDIPATI, M. S. **The Astrophysical Journal**, v. 747, n. 13, p. 1, 2012.
26. TOLENTINO, H. et al. **J. Synchrotron Rad.**, v. 5, p. 521, 1998.
27. Disponível em: <<http://www.lnls.br>>. Acesso em: julho 2013.
28. TOLENTINO, H. et al. **J. Synchrotron Rad.**, v. 5, p. 539, 1998.
29. ABBATE, M. et al. **J. Synchrotron Rad.**, v. 6, p. 964, 1999.
30. CRAIEVICH, A. F.; RODRIGUES, A. R. **Braz. J. Phys.**, v. 27, p. 417, 1997.
31. COUPRIE, M. E. et al. **Nuc. Instrum. Meth. Phys. Res. A**, v. 575, p. 7, 2007.
32. Disponível em: <<http://www.synchrotron-soleil.fr>>. Acesso em: julho 2013.
33. MIRON, C. et al. **Rev. Sci. Instrum.**, v. 68, p. 3728, 1997.
34. MIRON, C.; MORIN, P. P. **Nucl. Instrum. Methods A**, v. 601, p. 66, 2009.
35. Disponível em:  
<[http://www.vgscienta.com/\\_resources/file/R4000%20data%20sheet%20V3.5%20+%20model%20overview%20V1.4%20web](http://www.vgscienta.com/_resources/file/R4000%20data%20sheet%20V3.5%20+%20model%20overview%20V1.4%20web)>. Acesso em: julho 2013.
36. Disponível em: <<http://es1.ph.man.ac.uk/research/facilities/IntroHDA.pdf>>. Acesso em: julho 2013.
37. MILOSAVLJEVIĆ, A. R. et al. **J. Phys. Chem. Lett.**, v. 3, p. 1191, 2012.

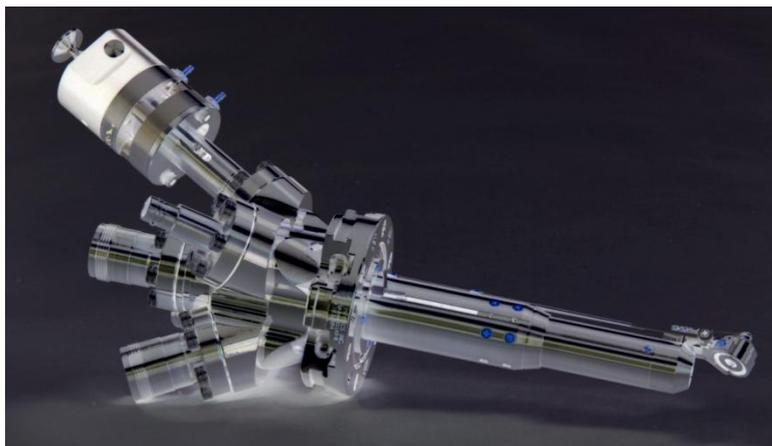
38. CHAPMAN, J. R. **Practical organic mass spectrometry: a guide for chemical and biochemical analysis**. 2<sup>a</sup>. ed. NY: John Wiley, 1993.
39. MILOSAVLJEVIĆ, A. R. et al. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, v. 279, p. 34, 2012.
40. TYLISZCZAK, T. BGAUSS-Version 3.05 Instrument, Ontario, 1994.
41. KING, G. C. et al. **J. Phys. B: Atom.Molec.Phys.** , v. 10, p. 2479, 1977.
42. CHIANG, S.-Y.; MA, C.-I.; SHR, D.-J. **J. Chem. Phys.**, v. 110, p. 9056, 1999.
43. BERNINI, R. B. **Tese de doutorado**. [S.l.]: Instituto de Química - UFRJ, 2012. 163 p. p.
44. VOET, D.; VOET, J. G. **Bioquímica**. 3<sup>a</sup>. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 263 p p.
45. KARP, G. **Cell and Molecular Biology, concepts and Experiments**. 5<sup>a</sup>. ed. Nova Jersey: John Wiley & sons, 2008. 53 - 57 p.
46. GOMES, E. et al. **Quím. Nova**, v. 30, n. 1, 2007.
47. NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5<sup>a</sup>. ed. Rio Grande do Sul: Artmed, 2011. 125 p p.
48. WITTENBERG, G.; DANON, A. **Plant Science**, v. 175, p. 459, 2008.
49. CASTRO, C. S. C. D. et al. **Polymer Degradation and Stability**, v. 71, p. 233, 2001.
50. ROCHA, M. V. J. et al. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 117, p. 276, 2014.
51. FUJII, K. et al. **Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. A**, v. 467, p. 1509, 2001.
52. PRANGE, A. et al. **Eur. Food. Res. Technol.**, v. 212, p. 570, 2001.
53. ALMKVIST, G.; BOYEB, K.; PERSSONA, I. **J. Synchr. Rad.**, v. 17, p. 683, 2010.
54. VAIRAVAMURTHY, A. **Spectroch. Acta A**, v. 54, p. 2009, 1998.
55. PRANGE, A. et al. **Eur. Phys. J. D.**, v. 20, p. 589, 2002.

56. RISBERG, E. D. **Tese de Doutorado**. [S.l.]: Department of Physical, Inorganic and Structural Chemistry - Stockholm University, 2007. 115 p. p.
57. CRUZ, L. P. S.; CAMPOS, V. P. **Quim. Nova**, v. 31, n. 5, p. 1180, 2008.
58. BERNINI, R. B. et al. **J. Chem. Phys.**, v. 136, p. 144307-1, 2012.
59. LUO, C. et al. **Chem. Phys. Lett.**, v. 469, p. 242, 2009.
60. TOKUE, I.; HIRAYA, A.; SHOBATAKE, K. **Chem. Phys.** , v. 130, p. 401, 1989.
61. MOLLOY, R. D. et al. **Chem. Phys.**, v. 335, p. 49, 2007.
62. TARANTELLI, F. et al. **J. Chem. Phys.**, v. 86, p. 2201, 1987.
63. OHRENDORF, E. M.-L.; TARANTELLI, F.; CEDERBAUM, L. S. **J. Chem. Phys.**, v. 92, p. 2984, 1990.
64. PIANCASTELLI, M. N. **J. Electr. Spectrosc. Rel. Phenom.**, v. 100, p. 167, 1999.
65. FEIFEL, R.; PIANCASTELLI, M. N. **J. Elect. Spectrosc. Rel. Phenom.**, v. 183, p. 10, 2011.
66. PIANCASTELLI, M. N. et al. **Phys. Rev. A**, v. 71, p. 010703, 2005.
67. LABLANQUIE, P. et al. **Phys. Rev. A**, v. 40, p. 5673, 1989.
68. HEIN, M.; ARENA, S. **Fundamentos de Química Geral**. 9ª. ed. Rio de Janeiro: LTC, 1998.

## ANEXO 1 - CARACTERIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DO CANHÃO DE ELÉTRONS PARA A IRRADIAÇÃO DE AMOSTRAS SÓLIDAS

---

O canhão de elétrons (marca *Kimble*) utilizado para a irradiação de amostras sólidas pode ser observado na Figura A.1.



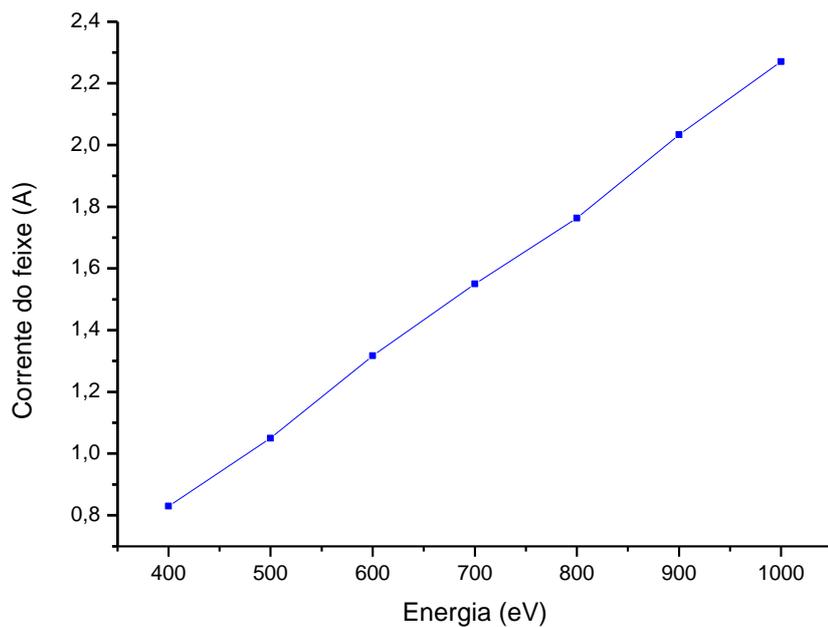
**Figura A.1** Canhão de elétrons comercial *Kimble*

A caracterização do canhão de elétrons foi feita variando-se os valores de energia, corrente de emissão e corrente coletada no porta-amostras. Esta última foi medida utilizando-se um coletor conhecido como *Farady Cup* ou coletor de Faraday (Figura A.2).

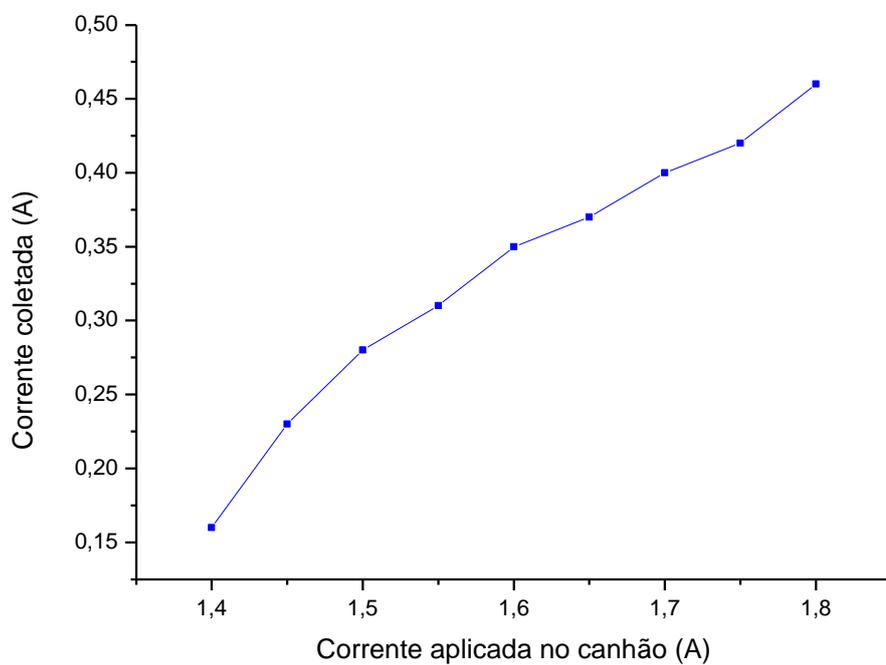


**Figura A.2** “Faraday Cup” acoplado ao porta-amostras

No gráfico apresentado na Figura A.3 observa-se a variação da corrente aplicada em relação à energia do canhão. Os valores apresentados nos gráficos são as médias dos valores coletados em triplicata.



**Figura A.3** Variação da energia do canhão em relação à corrente aplicada



**Figura A.4** Variação da corrente aplicada no filamento em relação a corrente coletada no *Faraday cup*

De acordo com os gráficos (Figuras A.3 e A.4), o valor de energia estabelecido como ideal foi de 1000 eV. A corrente aplicada ao filamento foi de 1,6 A, pois valores acima deste poderiam danificar o filamento do canhão. Essas condições foram atribuídas considerando a melhor focalização do feixe. Os valores atribuídos como ideais para a irradiação das amostras sólidas são suficientes para que o dano seja visualizado a olho nu.

## **ANEXO 2 - ARTIGO PUBLICADO**

---

Autores: Marcus V.J. Rocha, Hudson W.P. Carvalho, Lívia C.T. Lacerda, Grazieli Simões, Gerardo G.B. de Souza e Teodorico C. Ramalho.

Título: Ionic desorption in PMMA–gamma-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> hybrid materials induced by fast electrons: An experimental and theoretical investigation

Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 117 (2014);  
doi 10.1016/j.saa.2013.08.029



Contents lists available at ScienceDirect

# Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/saa](http://www.elsevier.com/locate/saa)

## Ionic desorption in PMMA–gamma-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> hybrid materials induced by fast electrons: An experimental and theoretical investigation



Marcus V.J. Rocha<sup>a,\*</sup>, Hudson W.P. Carvalho<sup>b</sup>, Lívia C.T. Lacerda<sup>a</sup>, Grazieli Simões<sup>c</sup>, Gerardo G.B. de Souza<sup>c</sup>, Teodorico C. Ramalho<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Chemistry, Federal University of Lavras, 37200-000 Lavras, Minas Gerais, Brazil

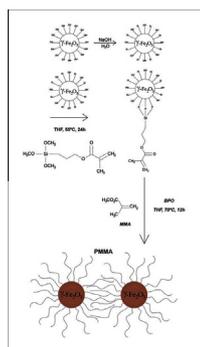
<sup>b</sup> Institute for Chemical Technology and Polymer Chemistry, Karlsruhe Institute of Technology, Engesserstr. 20, Campus Süd, 76131 Karlsruhe, Germany

<sup>c</sup> Chemistry Institute, Federal University of Rio de Janeiro, Cidade Universitária, Ilha do Fundão, 21949-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

### HIGHLIGHTS

- PMMA–maghemite hybrid material was investigated by the electron stimulated ion desorption (ESID) techniques.
- Fragmentation mechanism was studied by theoretical investigation.
- Electrostatic contributions were important in the stabilization of PMMA on maghemite after the grafting process.

### GRAPHICAL ABSTRACT



### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 25 May 2013

Received in revised form 20 July 2013

Accepted 2 August 2013

Available online 13 August 2013

#### Keywords:

PMMA–gamma-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

ESID

Theoretical study

### ABSTRACT

Poly(methylmetacrylate)–maghemite (PMMA–gamma-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) hybrid material was studied by the electron stimulated ion desorption (ESID) techniques coupled with time-of-flight mass spectrometry (TOF-MS) and theoretical investigation about its fragmentation. Moreover, atomic force microscopy was utilized to characterize the morphology before and after ionic desorption. ESID results indicated differences of pattern fragmentation for different compositions of hybrid material in comparison with neat PMMA. Theoretical studies suggest that kinetics effects can take place in the fragmentation process and electrostatic contributions were important in the stabilization of PMMA on maghemite after the grafting process.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

### Introduction

Organic–inorganic hybrid materials have attracted considerable interest because they usually combine some properties from the inorganic and organic components [1].

In general, polymethylmethacrylate (PMMA) is chosen for the preparation of organic–inorganic nanocomposites due to its

properties such exceptional optical clarity, high strength, and excellent dimensional stability [2]. Despite the importance of these methacrylate-based polymer films for the understanding of the processes involved in optical instruments and solar energy collector housings based on organic–inorganic thin films, photofragmentation studies are still rare. This outlook is aggravated by absence of studies involving the interaction of this kind of material with radiation as well as charged particles [3–5]. This landscape raises the intriguing question of what the influence of the inorganic phase on the physical–chemistry properties of the hybrid materials is. It should be kept in mind, however, that a deeper understanding

\* Corresponding author. Tel.: +55 35 38291271.

E-mail addresses: [mvjrocha@hotmail.com](mailto:mvjrocha@hotmail.com) (M.V.J. Rocha), [teo@dqj.ufla.br](mailto:teo@dqj.ufla.br) (T.C. Ramalho).

of this phenomenon requires an interplay of both experimental and theoretical evaluation of the degradation mechanism as well as investigation of thermodynamic and kinetic parameters.

In this context, mass spectrometry techniques can be used efficiently to characterize materials at the molecular level. In fact, mass spectrometry applications to polymer science and engineering have increased dramatically since the invention of soft ionization methods, in particular matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) [6,7], electrospray ionization (ESI) [8] and time-of-flight mass spectrometry (TOF-MS) [9–11], which have enabled the formation of gas-phase molecular ions from most classes of synthetic polymers. For confident structural assignments, the fragmentation mechanisms of polymer ions must be understood, as they provide guidelines on how to deduce the desired information from the fragments observed.

Electron stimulated ion desorption techniques are well known techniques based on the production of fragments (positive and negative), due to the impact of photons or electrons of known energy on a solid surface. The energy transfer process for both techniques occurs solely through electronic transitions [12]. This technique can provide important information regarding the fragmentation processes of different polymers [13,14]. It is believed that the main process that governs the ionic desorption these materials when exposed to high-energy radiation is the Auger process, which can be described in a simplified form as a relaxation process due to the excitation (Auger Resonant) or ionization (Auger Normal) of an electron from the inner layer. After the Auger electron emission, the formation of holes in the valence orbitals leading to fragmentation and desorption of positive ions occurs, due to coulombic repulsion between the holes formed (coulombic explosion), giving rise to the mechanism known as Auger Stimulated Ion Desorption (ASID) [15].

In general, the studies about electron and photon interactions with polymers (or hybrid materials) are fundamental to understand the degradation mechanism by radiation. In this line, in the present work we investigated the fragmentation of PMMA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> material by ionic desorption and theoretical calculations to correlate the intensity of desorbed fragments and magnetite concentration as well as to improve the discussion about the effect of the inorganic part on the fragmentation process of the hybrid materials.

## Experimental

### Preparation of PMMA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> films

Maghemite nanoparticles were obtained by the coprecipitation method. Firstly, 60 mL of FeCl<sub>3</sub> acid solution (HCl 1M) was mixed with 20 mL of Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 1M. A basic solution (51 mL of NH<sub>4</sub>OH + 870 mL) was added and then the mixture was kept stirring during 30 min. The resulting precipitate was filtered and washed until pH = 7. Finally the solid was dried during 24 h at 50 °C.

The nanoparticles were grafted with 3-(trimethoxysilyl) propyl-methacrylate (Aldrich) (TMSM) by dispersing 500 mg of dried nanoparticles in 25  $\mu$ L of NaOH 0.1M solution during 3 h in an ultrasound bath. A solution of 1 mL of TMSM and 2 mL of tetrahydrofuran (THF, Aldrich) was mixed with the nanoparticle dispersion and kept in a ultrasound bath for 24 h at 55 °C. The nanoparticles were washed three times in toluene (Aldrich) and recuperated by centrifugation (7000 g during 30 min), then dried for 24 h at 50 °C.

Finally, the grafted nanoparticles were dispersed by ultrasound during 4 h in 2 mL of THF and mixed with 2.015 mL of methyl-methacrylate (Aldrich) (MMA), 2 mL of THF and 5 mg of BPO. This mixture was then kept in ultrasound for 2 h. The polymerization of

MMA was carried out for 12 h at 70 °C. The nanocomposite was deposited on Teflon™ sheets and dried under air atmosphere and room temperature during 24 h. The resulting non-supported films were dried for 12 h at 70 °C.

### Characterization of morphology

The morphology was characterized by Atomic Force Microscopy (AFM). AFM measurements were performed using a Nanoscope IIIa (Digital/Veeco, United States) at Brazilian Synchrotron Light Laboratory. The topography and phase images were obtained in the tapping mode using Si-cantilevers. A sample area of 1  $\times$  1 mm<sup>2</sup> was scanned. The measurements were performed under air at room temperature at a humidity of 40–45%.

### Ionic desorption studies

The experimental system was based on time-of-flight mass spectrometry in the fragmentation study on a solid sample through an electron bundle interaction. Its main components are: (1) vacuum chamber; (2) electrons gun with variable energy from 0.1 keV to 2 keV; (3) sample handler; (4) quadrupole mass spectrometer (Stanford Research Systems, RGA 200) for residual gas monitoring. The TOFMS employed in the present work was developed in Laboratory of Photons and Electrons Impact at Federal University of Rio de Janeiro and has been described in detail elsewhere [16].

All the samples were inserted within vacuum chamber with a final pressure of  $7.5 \times 10^{-8}$  torr. The samples were attached to an aluminum support which was mounted onto a X–Y–Z sample manipulator. The electron gun energy was 1.2 keV and the fragments were been defined according previous experimental studies [16]. Time of sample exposition was 10 min from beginning of irradiation.

### Computational details

All calculations were carried out with DFT using the Amsterdam Density Functional (ADF 2012.01) program [17]. The performance for computing the geometries were done for the BLYP density functional [18]. The molecular orbitals (MOs) were expanded in a large uncontracted set of Slater-type orbitals (STOs) containing diffuse functions, TZ2P, which is of triple- $\zeta$  quality and was augmented with two sets of polarization functions: 2p and 3d on hydrogen, 3d and 4f on carbon, silicon and oxygen. The calculations were carried out on a home made Intel CPU based Linux-cluster.

## Results and discussion

The PMMA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> material has been characterized in previous studies [19]. The main goal of the current work is to investigate the fragmentation mechanism of PMMA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> under ionic desorption.

### Ionic desorption studies

A positive ion desorption spectrum of neat PMMA, induced by 1.2 keV, is shown in Fig. 1a–c. Pressure variance is related to the amount of fragments formed during the irradiation. In other words, the more fragments formed is proportional higher to the pressure inside the chamber. All the analyses were conducted at 1.2 keV, enough energy to stimulate the carbon 1s and the oxygen 1s electrons core. The 200 u.m.a. mass limit was determined. As mentioned previously, all the fragment sets were based on previous studies, in which the poly(methylmetacrilate) mass spectra were

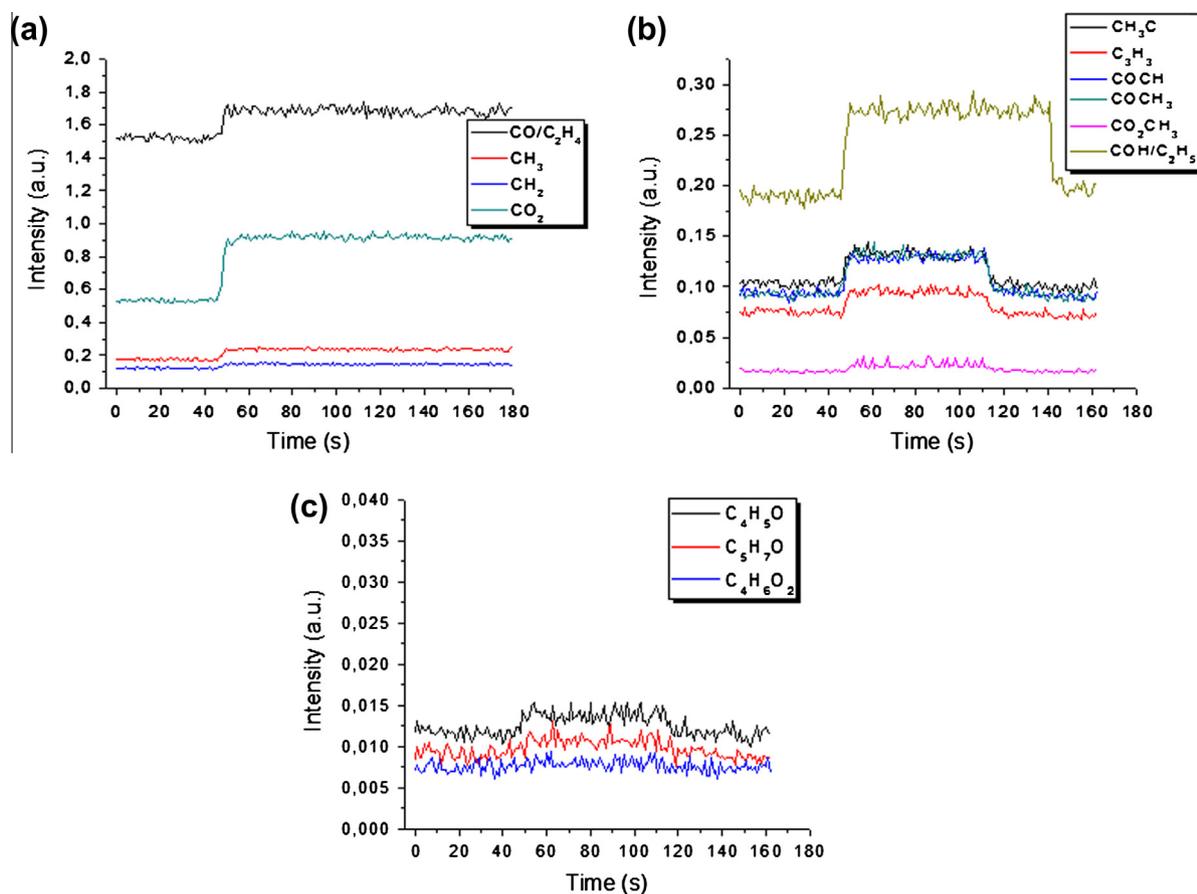


Fig. 1. ESID spectrum of neat PMMA.

obtained with the propose of reaching a fragmentation pattern. Then, analysis of the hybrid material was undertaken to check the influence of maghemite on the polymer fragmentation as well.

According to the data reported for the neat PMMA (Fig. 1a–c), a tendency is observed towards the formation of low molecular weight fragments such as,  $\text{CH}_2^+$ ,  $\text{CH}_3^+$ ,  $\text{COH}^+$  (and / or  $\text{C}_2\text{H}_5^+$ ) and  $\text{CH}_3\text{C}^+$ . Furthermore, we can also observe the formation of other ionic species and higher molecular weight, such as  $\text{COCH}^+$  (and/or  $\text{C}_3\text{H}_5^+$ ),  $\text{COCH}_3^+$  and  $\text{CO}_2\text{CH}_3^+$ . Species  $\text{H}^+$  were discarded for a more detailed analysis of other species due to the high intensity found in comparison with most of the fragments. Ionic species with largest mass/charge ratio equal to 60 are formed in negligible amounts. This may indicate that fragmentation is initiated by the rupture of minor species at the ends of the polymer chain. Probably, the formation of fragments corresponding to the methyl methacrylate monomer takes place by extracting high potential, or increasing exposure time to the electron beam gun.

It is believed that the main process governing ion desorption in these materials exposed to high energy photons is the Auger process, which can be described in a simplified form as a relaxation process following ionization or excitation of a core electron. For example, one possible mechanism for the  $\text{CH}_3^+$  ion production is believed to be scission of the O– $\text{CH}_3$  bond through O 1s excitation. That is, the most efficient production of  $\text{CH}_3^+$  observed for the transition of O 1s( $\text{OCH}_3$ )  $\rightarrow$   $\sigma^*(\text{O}-\text{CH}_3)$ , while the efficient production of  $\text{COH}^+$  is observed for the O1s( $\text{OCH}_3$ )  $\rightarrow$   $\sigma^*(\text{C}-\text{OCH}_3)$  transition [20].

It is important to mention that also the O– $\text{COCH}_3$  bond scissions at the O 1s edge are accelerated at the oxygen excitation due to the similar chemical environment around the C–O bond. This agrees

with some other studies [21,22], because according to their experiments, the yield of the  $\text{CH}_3^+$  ion was also enhanced in the same excitation energy region, suggesting that secondary bond scission from  $\text{COCH}_3^+$  ion occurs and CO and  $\text{CH}_3^+$  ions are produced.

The fragmentation patterns indicated that the hybrid material there is not a difference between the relative amounts of fragment with the increased concentration of maghemite in each sample (Figs. 2–4a–d). Table 1 shows the strength of fragment loss during the time of exposure to the fast electron beam.

From Table 1, we analyzed the influence of maghemite on fragment-loss during the ionic desorption. There is no significant difference between the pure polymer and the polymer grafted with maghemite during the first 20 s. From our experimental data, 2.5% of maghemite produces increased fragments related to peaks  $\text{C}_2\text{H}_4^+/\text{CO}^+$  in relation to others. However, from 40 s there is a jump in the intensity for the  $\text{CH}_3^+$ ,  $\text{COH}^+/\text{C}_2\text{H}_5^+$ ,  $\text{C}_2\text{H}_4^+/\text{CO}^+$  and  $\text{CO}_2^+$  fragments in the modified sample with magnetite (see Figs. 1–4). That might be because of modification occurred with the polymer during the hybrid formation process. The same happens after 1 min of radiation, when the intensities decrease a little. Generally, when the nanoparticles surfaces are modified by polymers, several intermolecular interactions or weak hydrogen bonding may take place between organic and inorganic phases, especially when the polymer has carbonyl groups, or a carboxyl or hydroxyl group in its chain. A previous study [23] indicated that the polymer nanoparticles can be strongly influenced by hydrogen bonding. This may help explain why the intensities of the fragments do not increase or decrease linearly over time.

In contrast, the signal intensity from 100 s, falls more steeply, especially in the larger sample containing maghemite content. This

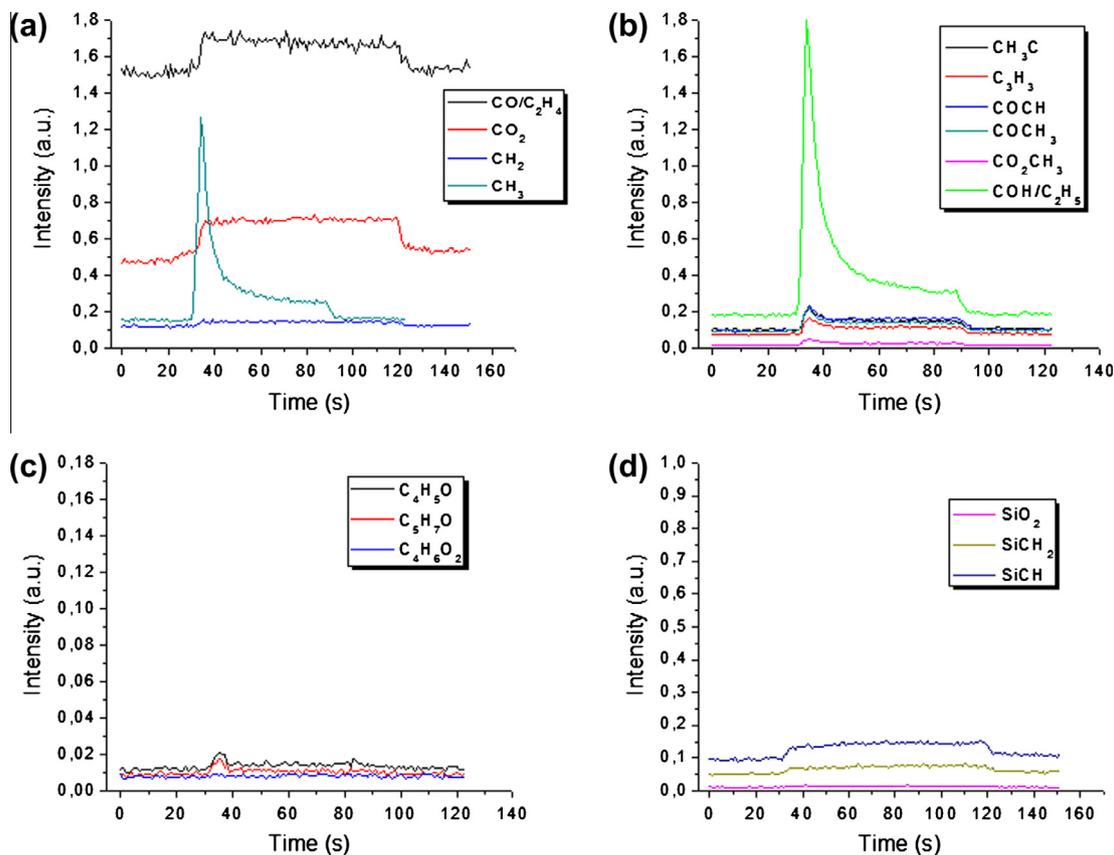


Fig. 2. ESID spectrum of PMMA-gamma-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 0.1%.

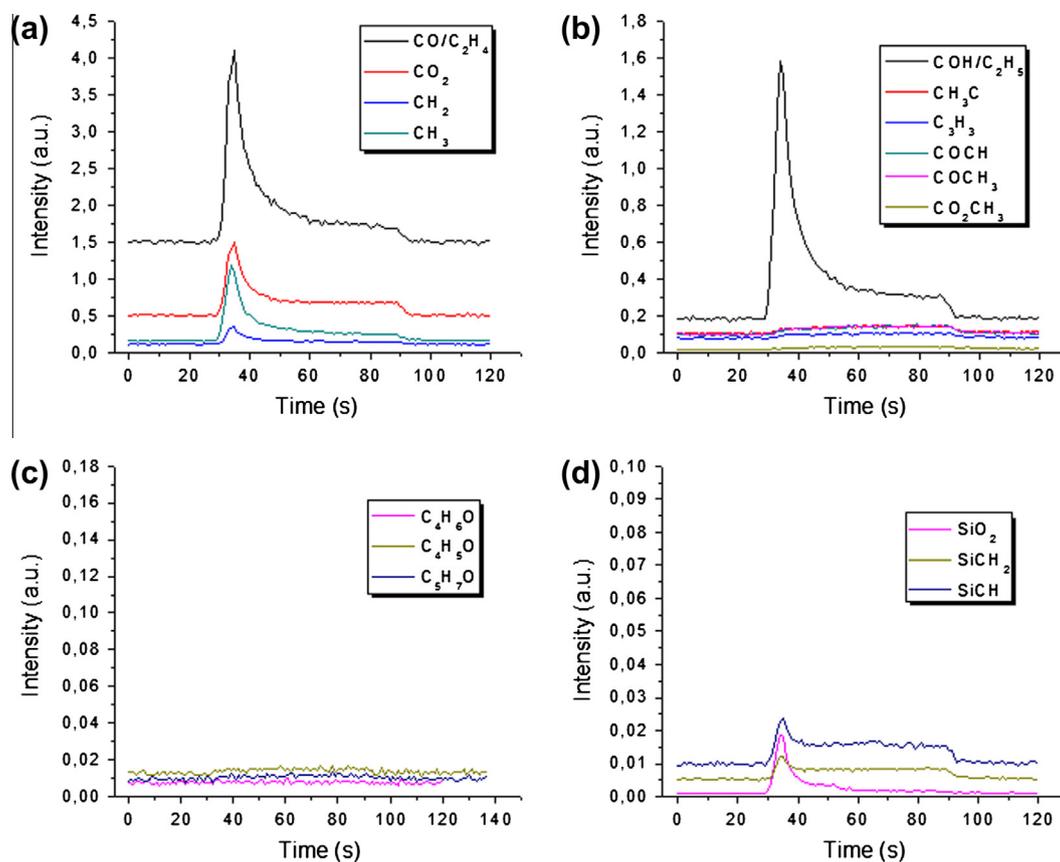


Fig. 3. ESID spectrum of PMMA-gamma-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 0.5%.

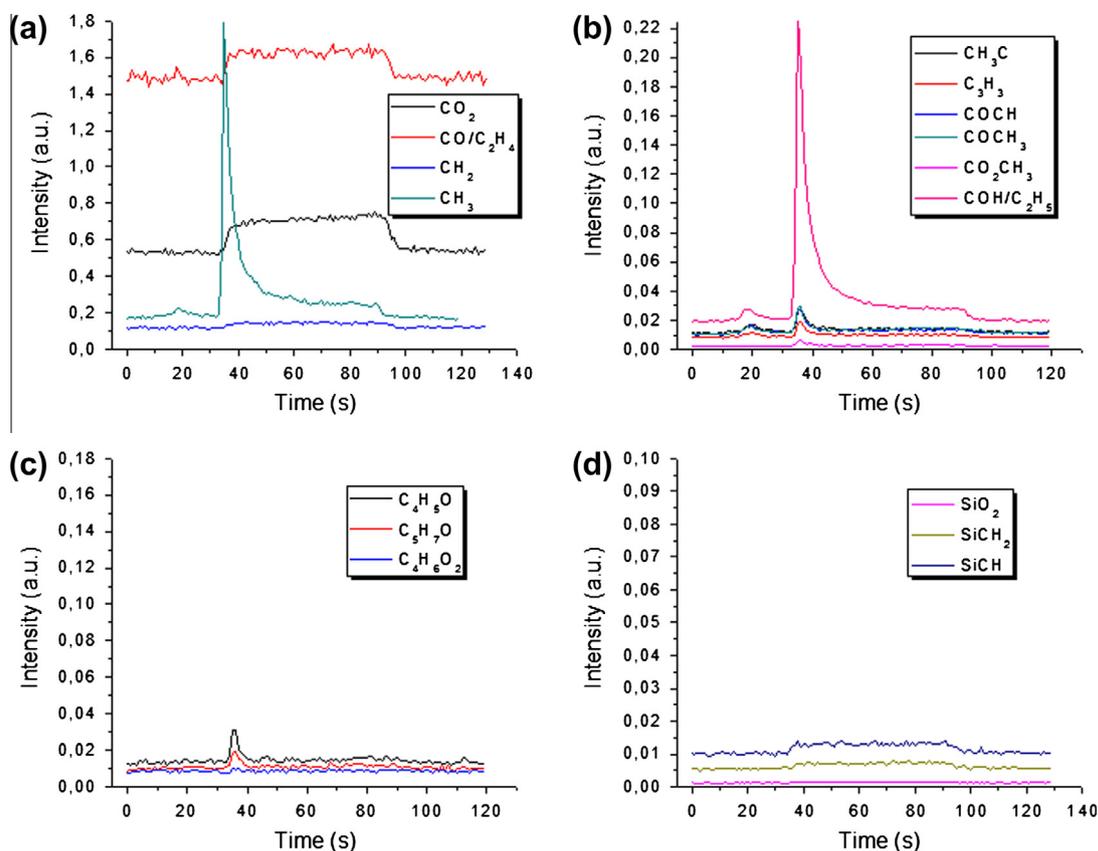


Fig. 4. ESID spectrum of PMMA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 2.5%.

**Table 1**  
Intensities of some ion fragments in ionic desorption process for neat PMMA and PMMA grafted with maghemite.

| TOF (s) | Sample       | Probable ionic fragments     |  |   |                              |  |
|---------|--------------|------------------------------|--|---|------------------------------|--|
| 20      | Neat PMMA    | CH <sub>3</sub> <sup>+</sup> | COH <sup>+</sup> /C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> <sup>+</sup> | C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> <sup>+</sup> /CO <sup>+</sup> | CO <sub>2</sub> <sup>+</sup> | CO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> <sup>+</sup> |
|         | PMMA-MN 0.1% | 0.18                         | 0.19   | 1.53  | 0.53                         | 0.016  |
|         | PMMA-MN 0.1% | 0.15                         | 0.17   | 1.53  | 0.48                         | 0.011  |
|         | PMMA-MN 0.5% | 0.15                         | 0.18   | 1.48  | 0.48                         | 0.011  |
|         | PMMA-MN 2.5% | 0.21                         | 0.025  | 1.49  | 0.52                         | 0.002  |
| 40      | Neat PMMA    | 0.18                         | 0.19   | 1.51  | 0.52                         | 0.016  |
|         | PMMA-MN 0.1% | 0.54                         | 0.72   | 1.71  | 0.68                         | 0.021  |
|         | PMMA-MN 0.5% | 0.50                         | 0.72   | 2.54  | 0.89                         | 0.025  |
|         | PMMA-MN 0.5% | 0.56                         | 0.075  | 1.61  | 0.68                         | 0.006  |
|         | PMMA-MN 2.5% | 0.56                         | 0.075  | 1.61  | 0.68                         | 0.006  |
| 60      | Neat PMMA    | 0.23                         | 0.28   | 1.7   | 0.92                         | 0.027  |
|         | PMMA-MN 0.1% | 0.28                         | 0.35   | 1.68  | 0.7                          | 0.028  |
|         | PMMA-MN 0.5% | 0.28                         | 0.35   | 1.81  | 0.7                          | 0.031  |
|         | PMMA-MN 0.5% | 0.26                         | 0.032  | 1.62  | 0.71                         | 0.004  |
|         | PMMA-MN 2.5% | 0.26                         | 0.032  | 1.62  | 0.71                         | 0.004  |
| 100     | Neat PMMA    | 0.25                         | 0.27   | 1.68  | 0.90                         | 0.022  |
|         | PMMA-MN 0.1% | 0.17                         | 0.18   | 1.65  | 0.7                          | 0.021  |
|         | PMMA-MN 0.5% | 0.18                         | 0.19   | 1.49  | 0.48                         | 0.025  |
|         | PMMA-MN 0.5% | 0.18                         | 0.021  | 1.49  | 0.54                         | 0.004  |
|         | PMMA-MN 2.5% | 0.18                         | 0.021  | 1.49  | 0.54                         | 0.004  |

observation leads to the conclusion that the maghemite, after long exposure to the electron beam gun, can help in the stability of the material. The decline is most evident when the fragments have oxygen in their structure.

#### Fragmentation mechanism for the PMMA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: a theoretical and experimental discussion

It was mentioned previously that the electron beam gun energy is enough to excite electron cores of C, Si, O and H atoms. According

to the fragmentation pattern the production of low molecular weight fragments is predominant. In order to shed more light on the experimental results, a fragmentation pathway from PMMA-maghemite hybrid material (Fig. S1) was proposed. Therefore, in order to rationalize experimental data as well as the fragmentation mechanism, we carried out theoretical calculations involving kinetic and thermodynamic parameters with the Amsterdam Density Functional (ADF) software [17]. The energy is calculated as the difference between the sum (s) of the fragment (s) formed plus energy of the fragmented polymer and energy of the polymer

before fragmentation. We consider the oligomer with two units of the polymer matrix from TMSM. Fig. S1 shows the energies in each pathway proposed.

A deeper analysis of the fragmentation patterns point out three pathways:  $\text{CH}_3^+$  (A),  $\text{CO}_2\text{CH}_3^+$  (B) or  $\text{COH}^+$  (C) loss. All pathways were based on dissociation caused by the excitation of the carbonyl oxygen 1s core. The paths A and C are divided into four steps, whereas Path B contains three steps. Other fragments formed from different molecular rearrangements after the excitation of the carbonyl oxygen can occur due to fragmentation of the intermediates previously generated by paths A, B or C. The large fragment proportion of  $\text{H}^+$  is due to the rearrangement of fragments formed upon impact of photons and dissociation species. We focused only on fragments of higher molecular weight for which high intensity was detected by mass spectrometry.

After leaving the carbonyl group, from electron impact, the remaining hydrocarbon groups as well as loss of  $\text{C}_2\text{H}_4^+$  species in the oligomer may occur. Since ethylene is a neutral molecule, Tilborg et al. [24] reported that the ethylene excitation can form chemical intermediates, such as  $\text{HC}-\text{CH}_3^+$ , due to photon absorption by a double chemical bond. Accordingly, this fragment gains reasonable stability for detection in a mass spectrometer. This rearrangement can occur in three ways and from this step, converges in one direction, resulting in (4). The oligomer in (4) can undergo further rearrangement due to the excitation of carbon 1s edge and a new dissociation occurs, where we have the  $\text{CH}_3^+$ ,  $(\text{C}_2\text{H}_3)^+$  and  $(\text{C}_2\text{H}_5)^+$  loss (Fig. S2).

Also, the ionic desorption yields for  $\text{CH}_3^+$  reflect the processes: (i) the break-up of the transient ethylidene configuration  $(\text{HC}-\text{CH}_3)^+$  or (ii) the rupture of the  $\text{O}-\text{CH}_3$  chemical bond due to excitation of oxygen 1s edge.

The detection of CO from molecular or fragment ions usually indicates the presence of carbonyl groups. In some cases, multistep rearrangements are necessary to “cut” the CO moiety out of the precursor ion.

After the hydrocarbon loss, the PMMA monomer is obtained and the dissociation restarts from (5). From (5), it is divided into two steps. For (D),  $\text{CO}^+$  and  $\text{COH}^+$  loss and (E)  $\text{CO}_2^+$  and  $\text{C}_2\text{H}_4^+$  loss.

The energy, from a thermodynamics perspective, for the products formation from reactants is reported in Fig. S1. Those data put in evidence that the fragment  $\text{CH}_3^+$  in Path A has a lesser dissociation energy ( $\Delta E$ ) than other pathways. Surprisingly, the pathway C has shown higher energy dissociation despite the bond scission energy to excite O 1s ( $\text{OCH}_3 \rightarrow \sigma^*(\text{O}-\text{CH}_3)$ ) to be less than C 1s ( $\text{C}-\text{C}-\text{O} \rightarrow \sigma^*(\text{C}-\text{C}-\text{O})$ ), determined experimentally [22].

It is well-known, from Takahashi's work [22], that most of the potential energy surfaces corresponding to C–C single bonds are attractive, while at least one of the potential energy surfaces for the C–O bond is repulsive, leading to an accelerated C–O bond scission. Thus, the repulsive potential is expected to contribute to the site-specific chemical reaction following core excitation.

From our experimental findings (Figs. 1–4), the intensity order of fragment loss would be:  $\text{COH}^+ > \text{CH}_3^+ > \text{CO}_2\text{CH}_3^+$ . The energy formation for the  $\text{CO}_2\text{CH}_3^+$  ion would be higher than the others, however, the stability order from theoretical calculations found was  $\text{COH}^+ > \text{CO}_2\text{CH}_3^+ > \text{CH}_3^+$ . This means that the  $\text{CH}_3^+$  fragments would be the most intense according to thermodynamics prediction. We can therefore notice that there is not a good agreement between theory and ionic desorption experiments for our material.

Theoretical calculations about the activation step for the  $\text{CH}_3^+$  (A),  $\text{CO}_2\text{CH}_3^+$  (B) and  $\text{COH}^+$  (C) losses were carried out to evaluate the kinetic parameters for the fragmentation mechanism. The transition states were characterized by one imaginary frequency. Actually, from Fig. 5, we can clearly observe a smaller activation barrier associated to generate  $\text{COH}^+$  and  $\text{CH}_3^+$  in opposition to ionic species  $\text{CO}_2\text{CH}_3^+$ . The activation energy ( $\Delta E^\ddagger$ ) values for  $\text{COH}^+$  loss

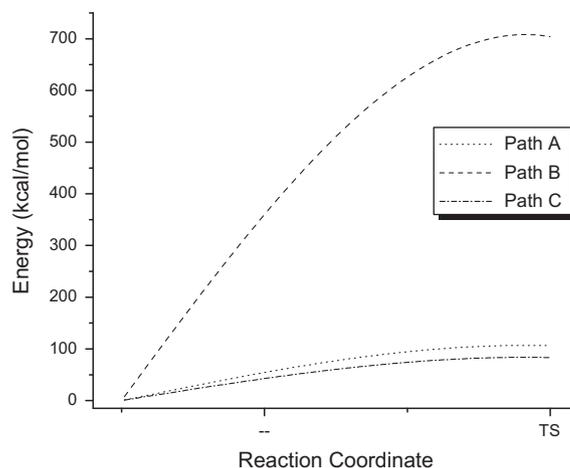


Fig. 5. Activation barrier calculated for ion fragments.

was  $23.05 \text{ kcal mol}^{-1}$  less than  $\text{CH}_3^+$  loss. In comparison with  $\text{CO}_2\text{CH}_3^+$  loss, the difference of  $\Delta E^\ddagger$  values is  $597.59$  and  $620.64 \text{ kcal mol}^{-1}$ , respectively.

In this line, we observed a good agreement between the intensities from ionic desorption experiments and theoretical activation energy barriers. Keeping this in mind, the kinetics control can take place in the fragmentation process of PMMA-maghemite.

#### Morphology comparison

It is known that the irradiation by fast electrons strongly influences the morphology of external surfaces. In this current paper, we have characterized the morphology of the external surfaces of the studied samples before and after the ion desorption (Fig. S3) by using the Atomic Force Microscopy (AFM) technique.

From Fig. S3, we can notice differences on the material surface as well as surface height indications. Differences in color indicate height; high regions are dark/light. Large grooves are produced on the surface independent of the amount of maghemite material; however there is no homogeneity in the surface, indicating that there may be regions with less damage upon impact.

#### Influence of the maghemite content in physical–chemical properties

Maghemite can restrict the conformational flexibility of the polymer, thus, the degradation of the polymer– $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  system is slower. We believe that the nanoscale structure of the polymer–maghemite composite plays an important role for the fragmentation of this material. Actually, the resultant chain conformation from the polymer strongly depends on the PMMA grafting points on the maghemite surface. From our IR result, it is clear that the incorporation of the maghemite significantly modifies the carbonyl vibration from  $1720 \text{ cm}^{-1}$  to  $1710 \text{ cm}^{-1}$  (Fig. 6) amplifying and decreasing the intensity in the peak. Furthermore our theoretical findings put in evidence that the most stable scenario for the hybrid system is PMMA– $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  2.5% nanocomposite.

Subramanian and coworkers [25] have predicted the preference conformations of PMMA using molecular simulation techniques. It is known the correlation between physical properties and the chemical constitution can help to elucidate the polymer chain flexibility. In this line, the study concluded that angle bending, van der Waals and electrostatic contributions were important in the stabilization of PMMA. As a result, these contributions can help improve the stabilization when the graft with maghemite nanocomposites occurs. An alternative is that in the fragmentation process by ionic

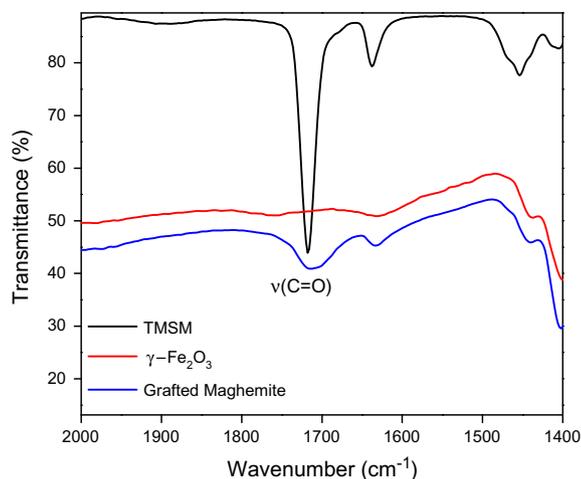


Fig. 6. IR spectrum carbonyl region.

desorption, the amount of Fe can modulate its ability to stabilize polymers due to its paramagnetic state. Because iron can receive electrons from decaying macrocrystals and that the mechanism stabilization would be similar to that, explains the thermal stability. Chandrasiri and coworkers [26] named this phenomenon as radical trapping.

Furthermore the experimental and theoretical data suggest the formation of brush-like structures. This conclusion agrees well with previous studies developed by Alexander [27,28]. In fact, properties and polymeric chain conformations are significantly influenced by spatial accommodation of the polymer in the hybrid materials. A polymer molecule within a brush structure is quite different from a regular structure, such as an entangled coil. In a brush-like structure, the movement of the polymeric chains can be reduced due to proximity with its neighboring chains, increasing significantly, thus, the probability of molecular interactions between chains. This scenario can affect intramolecular reactions, chain folding as well as producing extra stability for the ionic desorption. This effect is not so pronounced at the earlier stage, which is before the brush-like structure.

In this context, both processes (i) ion trapping or (ii) formation of “brush” structures could, in principle, take place to stabilize the polymer in the hybrid material. Furthermore, our findings suggest that although highly energetic electrons may excite both valence and inner-shell processes, the observed energy dependence for the larger fragments seems to favor the importance of inner-shell process excitations in the ionic desorption of PMMA.

To our knowledge, this is the first time that electron stimulated ionic desorption (ESID) results on PMMA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> induced by a pulsed electron beam at the energy of 1.2 keV using the time-of-flight technique for ion analysis was employed to study the impact of maghemite concentration on the degradation mechanism of hybrid materials.

## Conclusions

The electron stimulated ion desorption technique (ESID) coupled with time-of-flight mass spectrometer (TOF-MS) has been employed to PMMA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> hybrid materials in order to investigate the influence of the inorganic part on the fragmentation process of the hybrid materials.

Inner-shell ionization processes followed by Auger decay seem to play a major role in the ionic desorption of PMMA as induced by electron impact. The fragmentation patterns indicated that, after the first 60 s, there is a significant difference between the relative

amounts of fragment with the increased concentration of maghemite in each sample of the hybrid material, however in comparison with neat PMMA, some fragments shown variations during the ionic desorption over time.

Our theoretical calculations demonstrated that the kinetics effects can take place in the fragmentation process of PMMA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> in opposition to the thermodynamics effects.

The structure of the polymer-maghemite composite plays an important role for the fragmentation and electrostatic contributions or intermolecular interactions are important in the stabilization of PMMA after grafting with maghemite. In addition, Atomic Force Microscopy results show that there is no homogeneity in the surface, indicating modifications after electron impacts.

In this work we have studied PMMA- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> hybrids by combining spectroscopy technique and theoretical procedures. We expect that the results of this study will be useful for understanding the desorption process in hybrid materials based on polymers containing neat maghemite nanocrystals.

## Acknowledgments

We thank the Brazilian agencies FAPEMIG, CAPES, and CNPq for funding this work. We also thank the help provided by the staff of the Scanning Probe Microscopy Laboratory in Brazilian Nanotechnology National Laboratory of the National Center for Research in Energy and Materials (Campinas, Brazil) and staff of Photons and Electrons Impact Laboratory (LIFE) at Federal University of Rio de Janeiro for supporting of ESID studies. Finally, we acknowledge the fellowships and scholarships provided by CNPq and CAPES (N<sup>o</sup> 8884-11-0).

## Appendix A. Supplementary material

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2013.08.029>.

## References

- [1] S. Li, J. Qin, A. Fornara, M. Toprak, M. Muhammed, D.K. Kim, *Nanotechnology* 20 (2009) 185607.
- [2] J. Zheng, R. Zhu, Z. He, G. Cheng, H. Wang, K. Yao, *J. Appl. Poly. Sci.* 115 (2010) 1975.
- [3] K. Mase, E. Kobayashi, A. Nambu, T. Kakiuchi, O. Takahashi, K. Tabayashi, J. Ohshita, S. Hashimoto, M. Tanaka, S. Nagaoka, *Surf. Sci.* 607 (2013) 174.
- [4] D.P.P. Andrade, H.M. Boechat-Roberty, S. Pilling, E.F. da Silveira, M.L.M. Rocco, *Surf. Sci.* 603 (2009) 3301.
- [5] H. Kizaki, Y. Matsumoto, H. Ban, K. Morishita, S.I. Wada, K. Tanaka, *Surf. Sci.* 601 (2007) 3956.
- [6] M. Karas, F. Hillenkamp, *Anal. Chem.* 60 (1988) 2299.
- [7] K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida, *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* 2 (1988) 151.
- [8] J.B. Fenn, M. Mann, C.K. Meng, S.F. Wong, C.M. Whitehouse, *Science* 246 (1989) 64.
- [9] G. Cerveau, R.J. Corriu, J. Dabosi, C. Fischmeister-Lepetyre, R. Combarieu, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 13 (1999) 2183.
- [10] K.Q. Ngo, P. Philipp, Y. Jin, S.E. Morris, M. Shtein, J. Kieffer, T. Wirtz, *Surf. Interface Anal.* 43 (2011) 88.
- [11] J.R. Santa Rita, B.G.A.L. Borges, B. Beck, Y. Garcia-Basabe, L.S. Roman, M.L.M. Rocco, *J. Braz. Chem. Soc.* 24 (2013) 615.
- [12] T.E. Madey, *Vacuum* 37 (1987) 31.
- [13] C. Arantes, M.L.M. Rocco, A.G.B. da Cruz, A.M. Rocco, *Quim. Nova.* 31 (2008) 61.
- [14] M.L.M. Rocco, D.E. Weibel, L.S. Roman, L. Micaroni, *Surf. Sci.* 560 (2004) 45.
- [15] M.L.M. Rocco, D.E. Weibel, F.C. Pontes, R.R. Pinho, G.S. Faraudo, G.G.B. de Souza, *Polym. Degrad. Stab.* 80 (2003) 263.
- [16] M.L.M. Rocco, F.C. Pontes, G.S. Faraudo, G.G.B. de Souza, D.E. Weibel, R.R. Pinho, *Quim. Nova.* 27 (2004) 160.
- [17] E.J. Baerends, T. Ziegler, J. Autschbach, D. Bashford, A. Bérce, F.M. Bickelhaupt, C. Bo, P.M. Boerrigter, L. Cavallo, D.P. Chong, L. Deng, R.M. Dickson, D.E. Ellis, M. van Faassen, L. Fan, T.H. Fischer, C. Fonseca Guerra, A. Ghysels, A. Giammona, S.J.A. van Gisbergen, A.W. Götz, J.A. Groeneveld, O.V. Gritsenko, M. Grüning, S. Gusarov, F.E. Harris, P. van den Hoek, C.R. Jacob, H. Jacobsen, L. Jensen, J.W. Kaminski, G. van Kessel, F. Kootstra, A. Kovalenko, M.V. Kryukin, E. van Lenthe, D.A. McCormack, A. Michalak, M. Mitoraj, J. Neugebauer, V.P. Nicu, L.

- Noodleman, V.P. Osinga, S. Patchkovskii, P.H.T. Philipsen, D. Post, C.C. Pye, W. Ravenek, J.I. Rodríguez, P. Ros, P.R.T. Schipper, G. Schreckenbach, J.S. Seldenthuis, M. Seth, J.G. Snijders, M. Solà, M. Swart, D. Swerhone, G. te Velde, P. Vernooijs, L. Versluis, L. Visscher, O. Visser, F. Wang, T.A. Wesolowski, E.M. van Wezenbeek, G. Wiesenekker, S.K. Wolff, T.K. Woo, A.L. Yakovlev. ADF2012, SCM, Theoretical Chemistry, Vrije Universiteit, Amsterdam, The Netherlands.
- [18] C. Lee, W. Yang, R.G. Parr, *Phys. Rev. B* 37 (1988) 785.
- [19] T. Ninjbadgar, S. Yamamoto, T. Fukuda, *Solid State Sci.* 6 (2004) 879.
- [20] K. Fujii, D. Taga, Y. Nakashima, S. Waki, S.A. Sardar, Y. Yasui, S. Wada, T. Sekitani, K. Tanaka, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. A* 467 (2001) 1509.
- [21] K. Fujii, H. Tomimoto, K. Isshiki, M. Tooyama, T. Sekitani, K. Tanaka, *Jpn. J. Appl. Phys.* 38 (1999) 321.
- [22] O. Takahashi, K. Tabayashi, S. Wada, R. Sumii, K. Tanaka, M. Odelius, L.G.M. Pettersson, *J. Chem. Phys.* 124 (2006) 124901.
- [23] S. Mallakpour, M. Dinnari, *J. Reinf. Plast. Compos.* 32 (2013) 4.
- [24] J. van Tilborg, T.K. Allison, T.W. Wright, M.P. Hertlein, R.W. Falcone, Y. liu, H. Merdji, A. Belkacem, *J. Phys. B At. Mol. Opt. Phys.* 42 (2009) 081002.
- [25] V. Subramanian, P.S. Asirvatham, R. Balakrishnan, T. Ramasami, *Chem. Phys. Lett.* 342 (2001) 603.
- [26] J.A. Chandrasiri, D.E. Roberts, C.A. Wilkie, *Polym. Degrad. Stab.* 45 (1994) 97.
- [27] S. Alexander, *J. Phys.* 38 (1977) 977.
- [28] K. Chen, M.A. Susner, S. Vyazovkin, *Macromolecular* 26 (2005) 690.