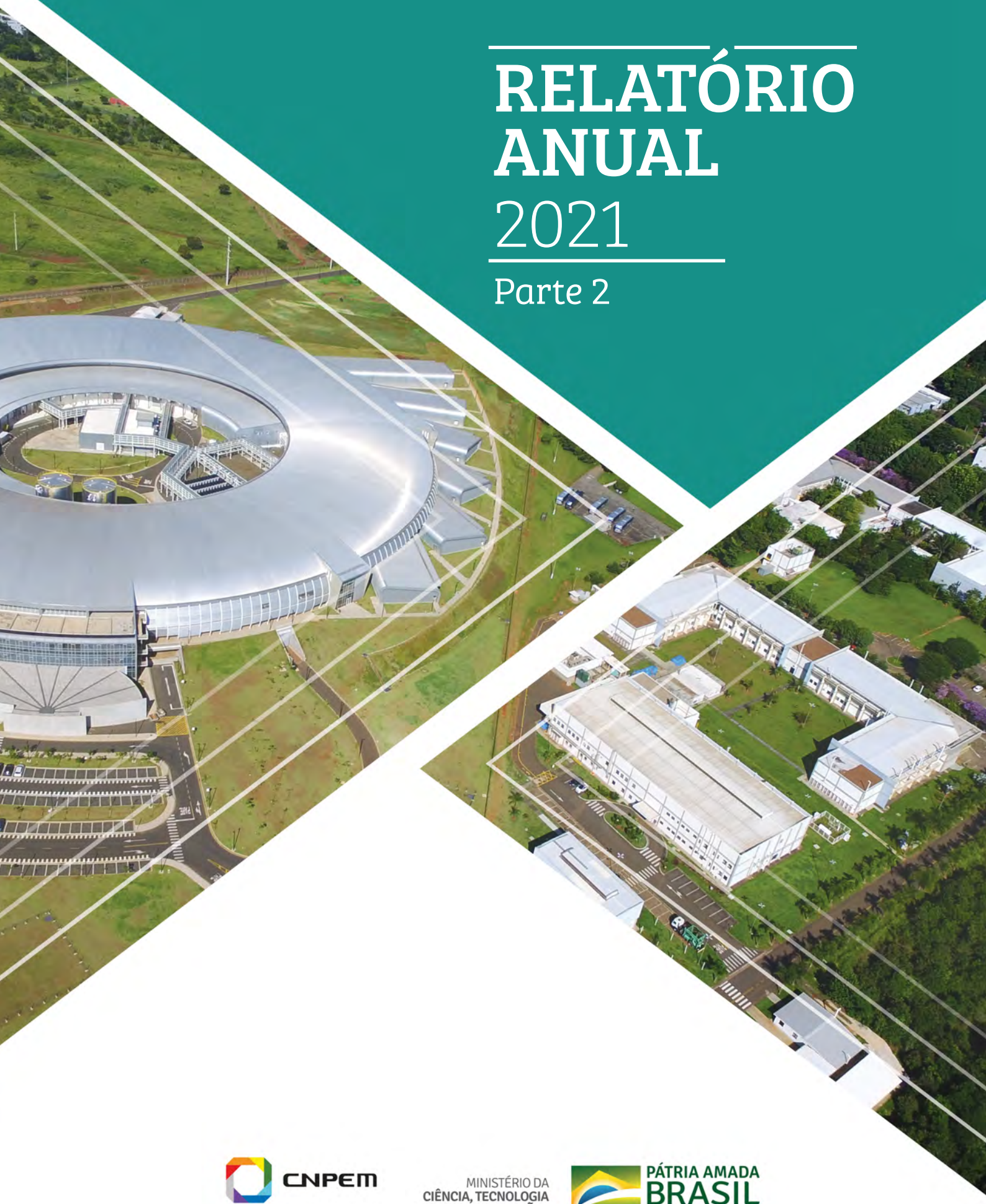
RELATÓRIO ANUAL 2021

Parte 2



CNPEM
ORGANIZAÇÃO SOCIAL DO MCTI

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÕES

PÁTRIA AMADA BRASIL
GOVERNO FEDERAL

Este relatório foi aprovado pelo Conselho de Administração
em Reunião Ordinária realizada em
23 de fevereiro de 2022

Sumário

1. Laboratório Nacional de Luz Síncrotron 1
   1.1. Projeto Sirius 1
   1.2. Pesquisa e Desenvolvimento in-house 52
   1.3. Treinamento Educação e Extensão 62
2. Laboratório Nacional de Biociências 64
   2.1. Instalações Abertas a Usuários Externos 64
   2.2. Pesquisa e Desenvolvimento in-house 66
   2.3. Apoio à Geração de Inovação 109
   2.4. Treinamento, educação e extensão 113
   2.5. Infraestrutura, Operação e Melhorias Técnicas 116
3. Laboratório Nacional de Biorrenováveis 124
   3.1. Instalações Abertas a Usuários Externos 124
   3.2. Pesquisa e Desenvolvimento *in-house* 125
   3.3. Apoio à geração de inovação 148
   3.4. Treinamento, Educação e Extensão 151
4. Laboratório Nacional de Nanotecnologia 160
   4.1. Instalações Abertas a Usuários Externos 160
   4.2. Pesquisa e Desenvolvimento in-house 164
   4.3. Apoio à geração de inovação 201
   4.4. Treinamento, Educação e Extensão 205
   4.5. Infraestrutura, Operação e Melhorias Técnicas 209
5. Engenharia e Tecnologia 222
   5.1. Pesquisa e Desenvolvimento *in house* 222
   5.2. Outros projetos e iniciativas da Engenharia e Tecnologia 294
   5.3. Apoio à geração de inovação 302
   5.4. Projetos de Laboratórios de Nível de Biossegurança 3 e Linhas Longas e Ambiente de Biocontenção (LLABC) 303

1. Laboratório Nacional de Luz Síncrotron

1.1. Projeto Sirius

No ano de 2021, o LNLS operou o Sirius, dividindo seus recursos humanos e tempo útil dos aceleradores entre o fornecimento de feixe para experimentos de comissionamento técnico e científico das linhas de luz, tempo de estudos de máquina, tempo para alinhamento dos aceleradores e instalações de componentes das linhas de luz, e tempo para terraplanagem e compactação do solo em torno do prédio do Sirius (Figura 1). As circunstâncias de operação do laboratório, comissionando simultaneamente os aceleradores e as linhas de luz são desafiadores e pouco usuais em síncrotrons de 3ª e 4ª geração, mas têm gerado interações ricas entre as equipes envolvidas no projeto Sirius. Após o período de alinhamento dos imãs nos primeiros dois meses do ano, que trouxe os aceleradores para condições mais próximas das especificações de projeto, a partir de março de 2021 o tempo de feixe fornecido para as linhas cresceu progressivamente, mantendo uma boa compatibilidade entre o tempo programado e o tempo entregue para os experimentos (Figura 1).

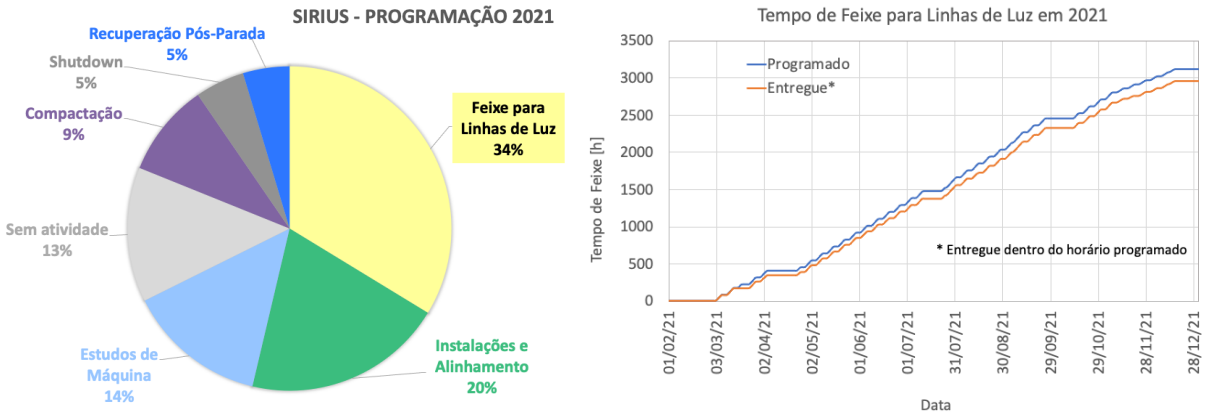


Figura 1: Distribuição de tempo do Sirius no ano de 2021 e relação entre tempo de feixe programado e entregue para experimentos.

A partir do mês de abril a disponibilidade de feixe nos horários programados para experimentos nas linhas foi superior a 92%, com um tempo médio entre falhas (MTBF) superior a 30 horas e um tempo médio para recuperação de falhas inferior a 4 horas. Para o atual estágio de operação, estes são níveis muito satisfatórios.

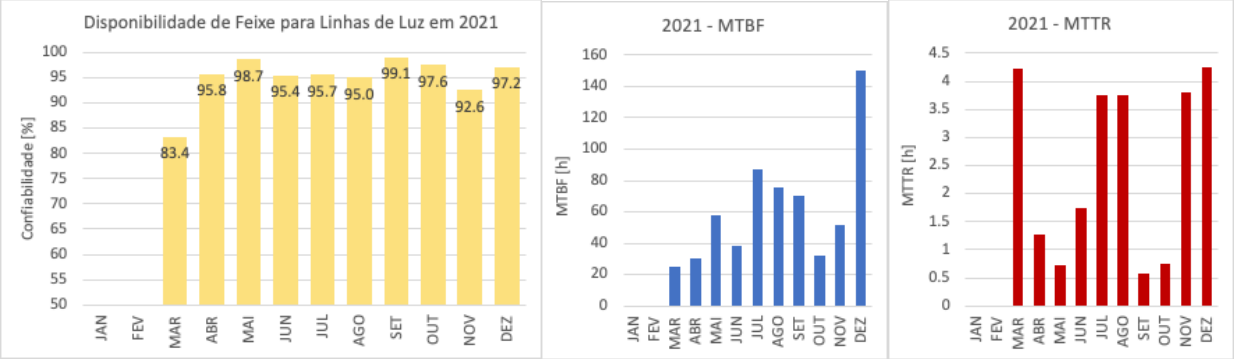


Figura 2 Disponibilidade de feixe para as linhas, tempo médio entre falhas (MTBF) e tempo médio para recuperação de falhas (MTTR) no ano de 2021.

Desde março de 2021, a corrente do anel entregue no início dos turnos de feixe para linhas de luz foi de 70 mA, com duas injeções por dia. A partir de 17 de novembro, a corrente entregue passou para 100 mA, após estudos de sintonização da cavidade de RF com a temperatura. Esta corrente é cerca de 30% da especificada em projeto, reduzindo o fluxo de fótons dos experimentos na mesma proporção. Não obstante, para fase atual do projeto, nem a corrente nem o tempo entre injeções tem sido fatores limitantes para as atividades de comissionamento das linhas. A injeção quase contínua do feixe de elétrons (injeção *top-up*), em desenvolvimento, deverá melhorar a qualidade de vários aspectos de operação das linhas de luz, relacionados principalmente à estabilidade térmica. O tempo de vida em 100 mA no modo de preenchimento uniforme, onde todos os 864 pacotes são igualmente preenchidos, é de aproximadamente 27 horas atualmente, limitado pelo espalhamento Touschek, que descreve a interação elétron-elétron dentro do pacote.

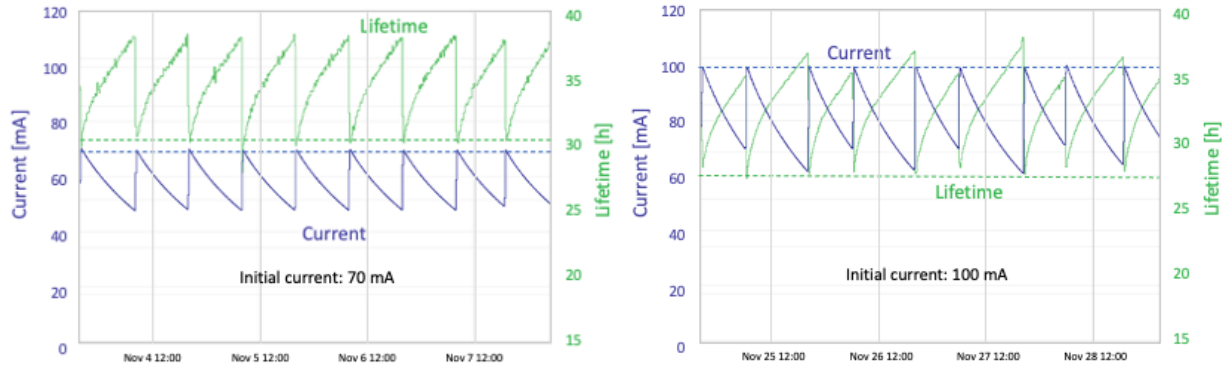


Figura 3 Corrente (azul) e tempo de vida (verde) no anel para turnos de usuários com 2 injeções por dia em modo de decaimento de corrente. À esquerda, corrente inicial de 70 mA a partir de 31 de março e à direita corrente inicial de 100 mA a partir de 17 de novem

Em 2021, mesmo com o Sirius ainda em fase de comissionamento, a linha MANACA recebeu diversas propostas de pesquisa em modo de acesso especial (*fast-track*), ainda que limitando o número de pesquisadores usuários no campus, em conformidade às restrições sanitárias da pandemia. No ano passado foram atendidas 33 propostas, 19 de usuários externos e 14 internos. A primeira de coleta remota de dados foi realizada com usuários do Chile, abrindo uma grande oportunidade para ampliar a base de usuários de cristalografia de proteínas e a produtividade da linha, sem a necessidade de trabalho presencial de usuários da técnica.

Estas coletas resultaram no depósito de mais 5 estruturas no banco internacional de dados de proteínas (PDB), elevando 12 o total de estruturas de proteínas descobertas no Sirius desde o início do comissionamento científico da MANACA.

Graças aos esforços em se colocar o CNPEM na frente de luta contra o COVID-19, o primeiro artigo produzido com dados do Sirius foi publicado no *Journal of Molecular Biology* (JMB 433, 2021, 167118), descrevendo o mecanismo de maturação de uma proteína do vírus SARS-CoV2, e suas interações com ligantes (Figura 4).

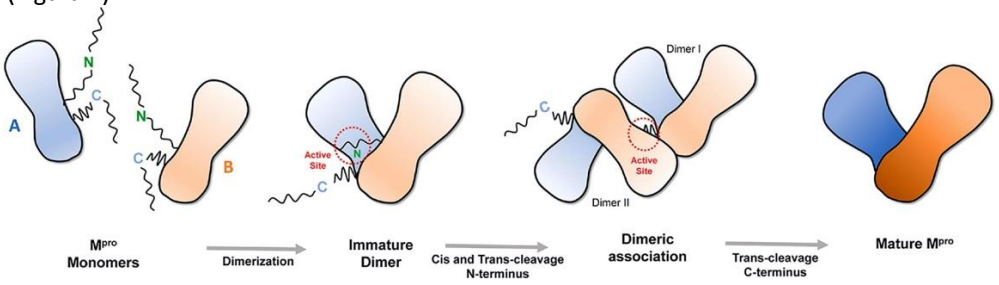


Figura 4 Resumo visual do artigo, disponível no site do periódico (https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167118).

Outras linhas de luz também começaram a receber propostas de usuários para experimentos de comissionamento. Apesar de essa ser uma fase ainda de testes, alguns dos experimentos de comissionamento já têm resultado em dados de alta qualidade e gerado publicações. A linha IMBUIA, por exemplo, começou a receber propostas de usuários em 2021, mesmo trabalhando provisoriamente com fontes de IR de laser e fonte térmica. Na configuração atual, em 2021 a linha IMBUIA atendeu 15 propostas, 11 na estação IMBUIA-micro e 4 na estação IMBUIA-nano, sendo 4 propostas externas. Foram geradas 04 publicações com dados de comissionamento que serão detalhadas na sessão de destaques científicos. A linha EMA, desde o anúncio do início de comissionamento científico das linhas da fase 1-A, atendeu 12 propostas em 2021, sendo 3 de usuários externos. Na linha CARNAÚBA as propostas de usuários externos têm sido analisadas uma a uma, de acordo com a complexidade e viabilidade dos experimentos para o estágio atual de comissionamento dos instrumentos. Não obstante, algumas propostas viabilizadas nestas interações com a comunidade têm resultado em dados extremamente competitivos que serão detalhados ao longo do relatório.

Comissionamento dos aceleradores

As atividades de estudos de máquina e comissionamento dos aceleradores têm se concentrado em diversos aspectos envolvendo a física de aceleradores (como caracterização da ótica e dinâmica do feixe de elétrons após o alinhamento dos berços dos ímãs) e na entrega de luz síncrotron em condições cada vez melhores para experimentos nas linhas de luz. Em particular, foi dada ênfase na correção da ótica da máquina e melhoria do modelo usado em simulações, assim como na implementação de algoritmos de caracterização e controle do feixe, visando tanto a melhoria de estabilidade do feixe, como a operação em mais alta corrente.

Um dos principais destaques para os resultados de comissionamento dos aceleradores foi a sintonização da cavidade de radiofrequência com a temperatura, que resultou em um novo ponto de operação do sistema de RF no qual é possível operar o Sirius com a corrente inicial de 100 mA de forma estável, a partir de 17 de novembro (Figura 5). Estas atividades foram realizadas com a participação do

grupo de RF da divisão de Engenharia e Tecnologia, com o intuito de garantir a operação da cavidade de forma correta nas novas condições.

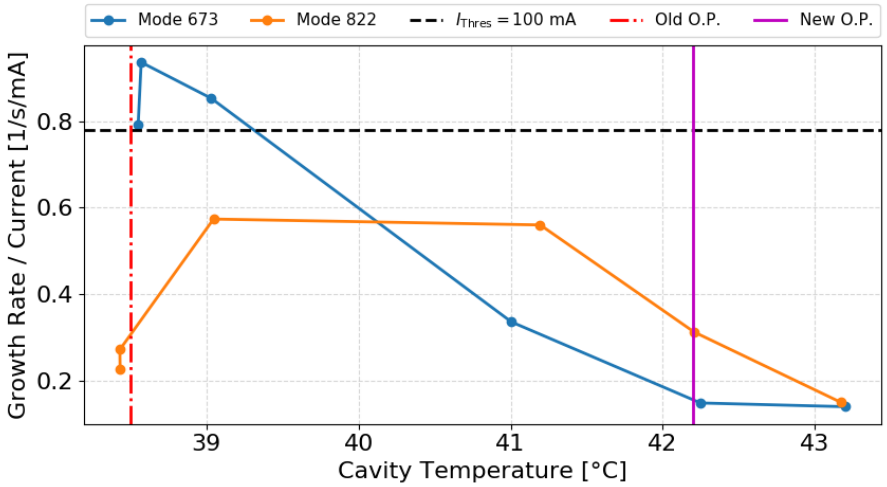


Figura 5 Novo ponto de operação da cavidade de RF (linha magenta em 42.2˚C) onde a taxa de crescimento dos modos instáveis é reduzida em relação ao ponto anterior (linha vermelha em 38.5˚C). O limiar para a corrente de 100 mA, dada pela taxa de amortecimento, é indicada pela linha tracejada preta.

Com o alinhamento dos aceleradores no início de 2021, iniciamos um novo comissionamento de todo complexo de aceleradores a partir de meados de fevereiro. Os efeitos do alinhamento puderam ser verificados já nas primeiras voltas do feixe no anel com injeção no-eixo: a distância de propagação do feixe sem correção de órbita passou de menos de uma volta para duas voltas. O efeito na órbita residual (indesejada) do feixe de elétrons após a correção também foi bastante significativo, com redução para cerca de 1/3 do valor rms que havia antes do alinhamento (*Figura 5*). Em particular, a órbita vertical nos BPMs, que antes atingia valores pico-a-pico de aproximadamente 150 µm, ficou praticamente zerada após o alinhamento. Podemos também perceber o efeito nas funções óticas medidas após ajustes utilizando o método LOCO, em que ótica linear da máquina é ajustada aos valores de referência com base nos valores medidos de matriz resposta de órbita. O valor rms do beta-beating (diferença relativa entre as funções bétatron medidas e as de referência) medido nos quadrupolos reduziu pela metade, enquanto os valores pico-a-pico, que antes chegavam a 40% de diferença, reduziram por um fator de 4. Já os resíduos das funções de dispersão horizontal e vertical, praticamente não foram alteradas pelo alinhamento.

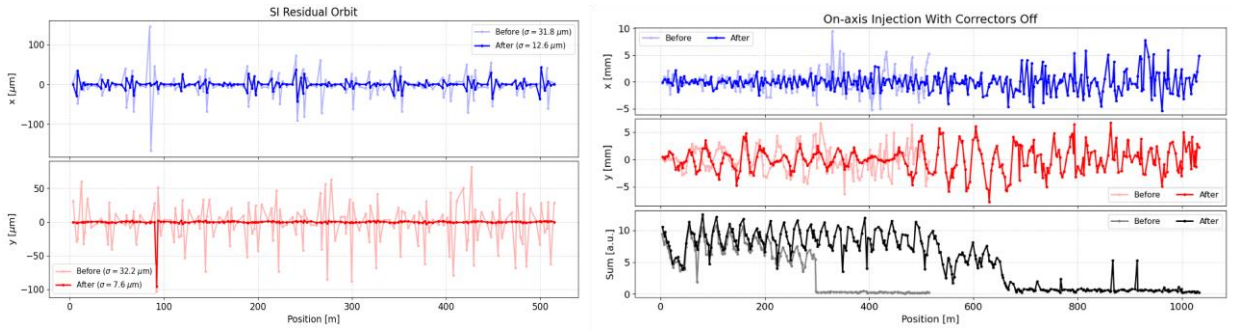


Figura 6 Esquerda: Correção de órbita antes (linha mais clara) e após (linha mais escura) alinhamento dos aceleradores. Os planos horizontal e vertical estão mostrados respectivamente acima e abaixo.Direita: Propagação do feixe injetado sem correção de órbita antes (linha mais clara) e após (linha mais escura) alinhamento. Plano horizontal acima, vertical no meio e intensidade abaixo.

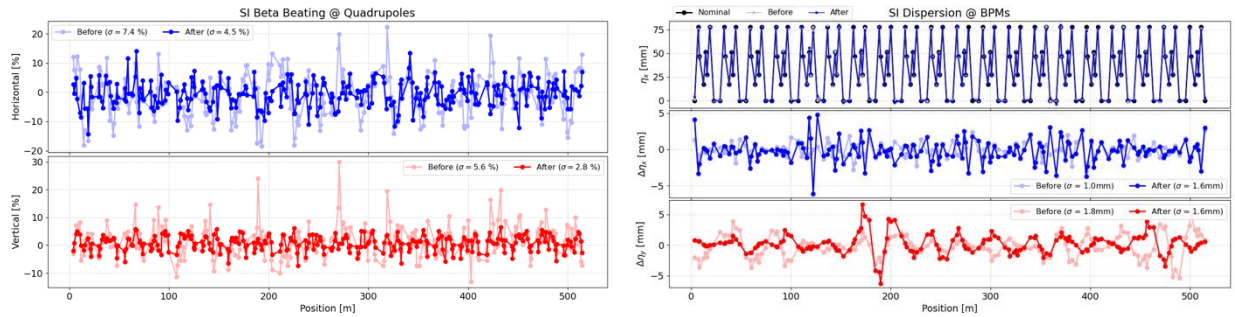


Figura 7Esquerda: Correção de órbita antes (linha mais clara) e após (linha mais escura) alinhamento dos aceleradores. Os planos horizontal e vertical estão mostrados respectivamente acima e abaixo. Direita: Funções-dispersão medidas e diferença para valores nominais antes (linha mais clara) e após alinhamento (linha mais escura). Dispersão horizontal medida acima, diferença para valor nominal ao centro e dispersão vertical medida abaixo.

A eficiência de injeção do booster para o anel de armazenamento (Figura 8), chegou a cerca de 80% (78%±11%).

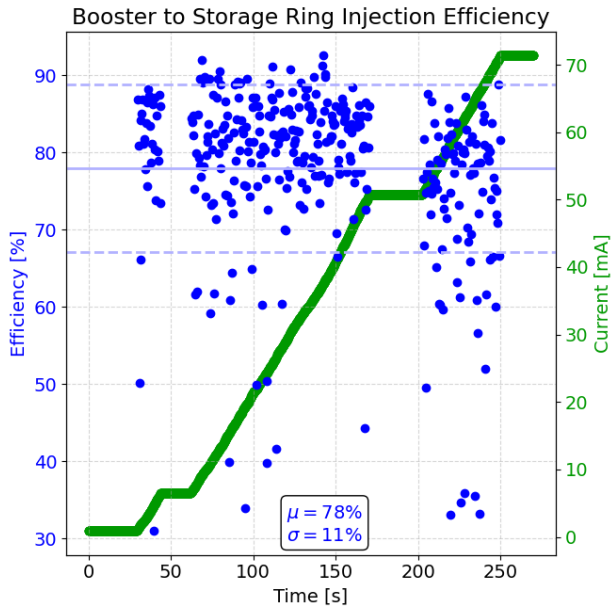


Figura 8 Aumento de eficiência alcançado na injeção Booster-Anel.

Atualmente, a instabilidade do feixe de elétrons é o principal fator limitante dos experimentos de comissionamento das linhas de luz, pelo menos no que tange às características do feixe fornecido pelo anel de armazenamento do Sirius. Estas instabilidades ocorrem em diferentes escalas temporais e afetam os experimentos de diferentes formas. Nas escalas de tempo de horas as principais instabilidades parecem vir de movimentações do prédio do Sirius. Elas afetam o feixe de elétrons de forma contínua, e resultam em derivas de posição do feixe de luz síncrotron para fora da condição de alinhamento com os componentes óticos das linhas. As causas e soluções para este problema estão sendo investigadas pelos grupos da Engenharia e Tecnologia do CNPEM. Já houve avanço parcial no entendimento da causa de uma variação com período de 2 a 3 horas, que foi correlacionada ao acionamento de um poço artesiano próximo ao prédio do Sirius, que causa variações no lençol freático sobre o qual o prédio está construído. Em escalas de tempo de segundos o sistema de correção de órbita lenta (SOFB) tem permitido melhorias significativas na estabilidade do feixe. Já em escalas de tempo mais curtas, as principais perturbações se dão na faixa de frequência de 60 Hz. Estas perturbações fazem com que o feixe de elétrons tenha um tamanho aparente maior para os experimentos, resultando em aumento de foco e perda de coerência quando os tempos de integração dos detectores é superior a dezenas de milissegundos. As flutuações verticais, por exemplo, ultrapassam bastante o critério de 10% do tamanho do feixe. Ressalta-se que o tamanho vertical do feixe é muito menor que o tamanho horizontal, portanto, espera-se maior dificuldade em atingir o critério de estabilidade de 10% do tamanho do feixe no plano vertical. Não obstante, estratégias de processamento de dados e de filtragem das flutuações estão sendo adotadas para circunvir este problema até que os problemas de instabilidade de órbita sejam sanados, seja por identificação das suas fontes (já em investigação) ou pelo sistema de correção rápida de órbita (FOFB), ou uma combinação de ambos. O sistema FOFB atuará até a taxa de 1kHz, e espera-se uma atenuação de um fator de aproximadamente 20 nas perturbações em 60 Hz quando o sistema estiver totalmente funcional.

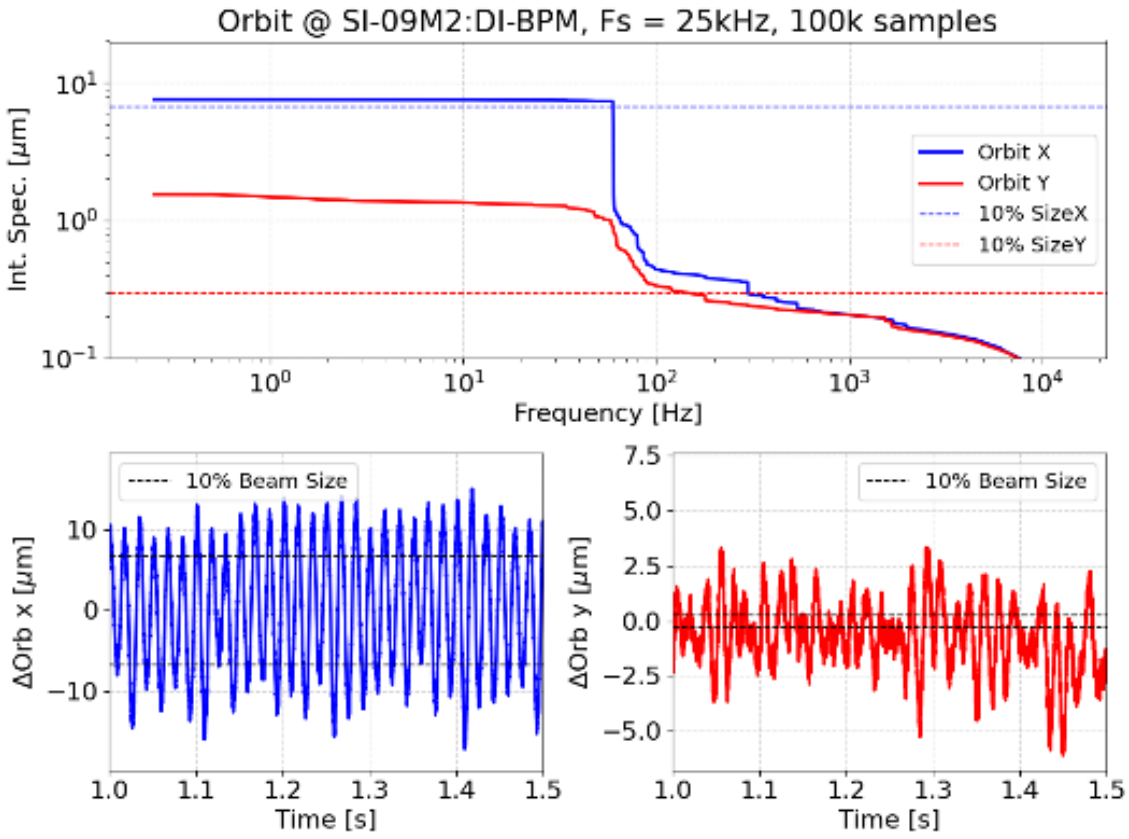


Figura 9 Estabilidade de órbita de curto prazo após implantação do sistema de correção lenta (SOFB). Acima: Espectro integrado em função da frequência mostrando perturbação da órbita em 60 Hz. Abaixo: perturbação das órbitas horizontal (esquerda) e vertical (direita) em função do tempo, medidas em um BPM do trecho reto de alto beta. As linhas tracejadas indicam 10% do tamanho do feixe neste BPM.

Outros parâmetros relevantes para caracterização da ótica foram medidos e ajustados, como o fator de acoplamento transversal das oscilações bétatron no anel de armazenamento. Este fator foi inicialmente medido, corrigido para valores próximos a zero, e depois ajustado ao valor desejado, de maneira controlada, usando quadrupolos *skew* acromáticos. Com o ajuste do fator de acoplamento controla-se a emitância vertical de equilíbrio, e, consequentemente, o tempo de vida e o tamanho vertical do feixe. Este último parâmetro está diretamente relacionado ao brilho da fonte de luz. O valor de acoplamento ajustado resulta de um compromisso entre o tempo de vida e o brilho desejados. O experimento de medida do fator de acoplamento é feito através da aproximação das raias de sintonia dos dois modos de oscilação transversais (Figura 10).

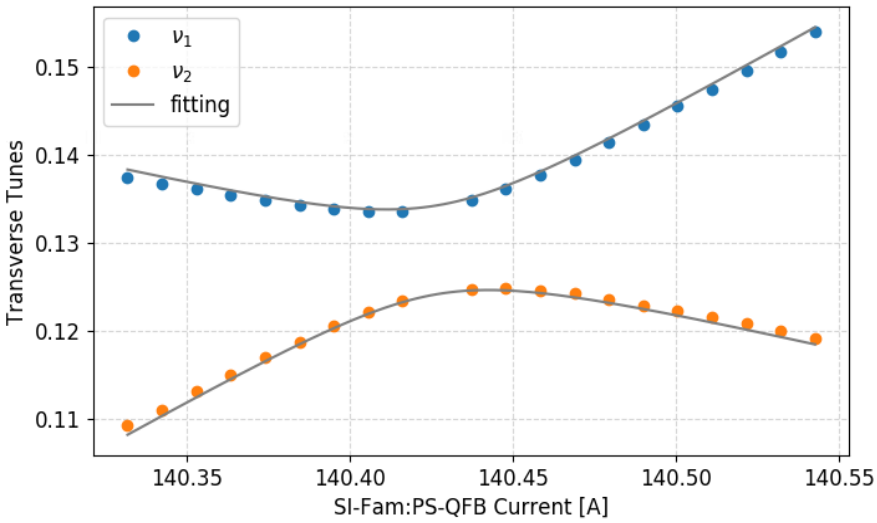


Figura 10 Medida de acoplamento do anel de armazenamento através da distância mínima entre as raias das sintonias dos dois modos transversais ν_1 e ν_2. A variação das sintonias é feita através do ajuste da força da família de quadrupolos QFB.

A abertura dinâmica da máquina é a região no espaço transversal x-y (ou horizontal-vertical) em que o movimento do elétron é estável. O tamanho suficientemente grande da abertura dinâmica é fundamental para que a injeção de elétrons no anel tenha alta eficiência. Este tamanho é determinado pela dinâmica tanto linear quanto não-linear da rede magnética. Assim, a medida da abertura dinâmica pode indicar se a ótica não-linear do anel de armazenamento está próxima da ótica de projeto. Em particular, como o feixe do *Booster* é injetado no plano horizontal do anel, pelo interior (lado negativo) do anel, a 8 mm do eixo, é importante que a abertura dinâmica no ponto de injeção seja maior que 8 mm no lado negativo, para que o feixe injetado possa ser capturado no processo de injeção. A Figura 11 mostra as medidas de abertura dinâmica no ponto de injeção. O valor medido de aproximadamente 8.6 mm no lado negativo é suficiente para obtermos eficiências de injeção médias relativamente altas no Sirius, mas este valor ainda é menor que o valor simulado em projeto, que é de aproximadamente 10 mm, indicando que ainda há espaço para a otimização da dinâmica não-linear. De fato, a otimização sistemática da configuração dos sextupolos, que domina a dinâmica não-linear, é uma tarefa que ainda não foi realizada.

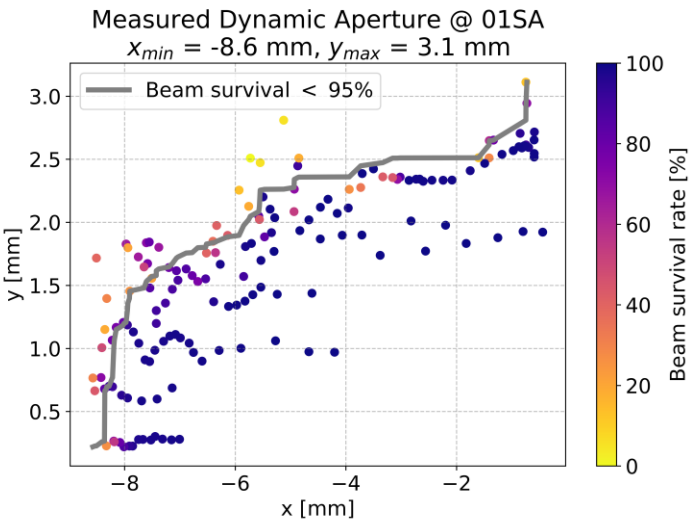


Figura 11 Medida de abertura dinâmica do anel de armazenamento, no ponto de injeção, para coordenadas horizontais negativas (lado de dentro do anel). As medidas baseiam-se na medida da taxa de sobrevivência do feixe em função da amplitude de oscilação do feixe excitado por um 'kick' muito rápido.

Com relação à injeção quase contínua no modo *top-up*, foram feitos os primeiros testes de controle automático da injeção no dia 24 de agosto, conforme mostra a *Figura 12*. Apesar dos testes mostrarem que o controle é efetivo, a operação neste modo em turnos de feixe para usuários ainda precisa de diversos desenvolvimentos adicionais, como o sistema de inter-travamento que detecta uma corrente mínima armazenada, o aumento da eficiência e repetibilidade da injeção, que dependem de ajustes no injetor e estabilização de temperatura dos ímãs pulsados. Ainda, para que a injeção seja transparente às linhas de luz, também é necessário mitigar perturbações relacionadas aos transientes na órbita causados pelos ímãs pulsados, tanto septa como kicker não-linear (NLK), assim como as perturbações de 2 Hz induzidas pela rampa em energia do Booster (*Figura 13*). Estas atividades também há participação de equipes da divisão de Engenharia e Tecnologia.

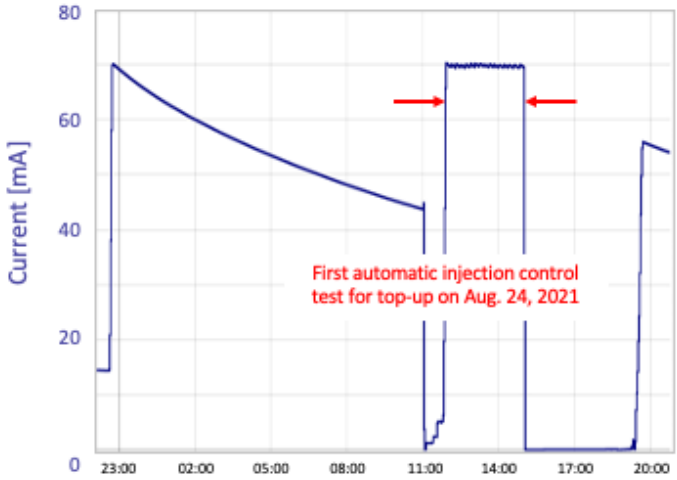


Figura 12 Primeiros testes de controle automático do processo de injeção no anel visando o modo de injeção top-up.

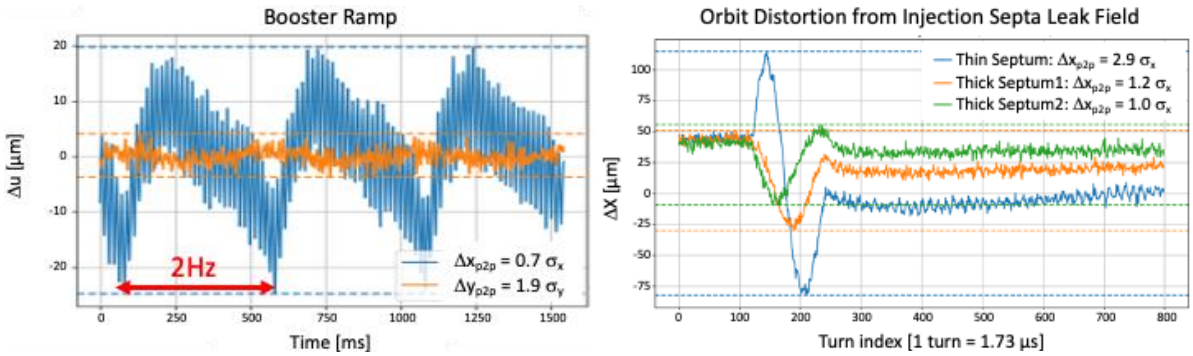


Figura 13 Perturbações na órbita do feixe estocado durante o processo de injeção. Esquerda: perturbações de 2 Hz causadas pela rampa em energia do Booster. Direita: perturbações causadas por transientes rápidos dos ímãs pulsados, na escala de tempo de μs a ms.

Uma série de outras atividades merecem destaque, como a implementação de uma medida mais rápida da assinatura de corretoras sobre a variação da órbita do feixe (matriz resposta de órbita). O método consiste em medir em paralelo a assinatura de várias corretoras excitadas com diferentes frequências, conforme esquematizado na *Figura 14*.

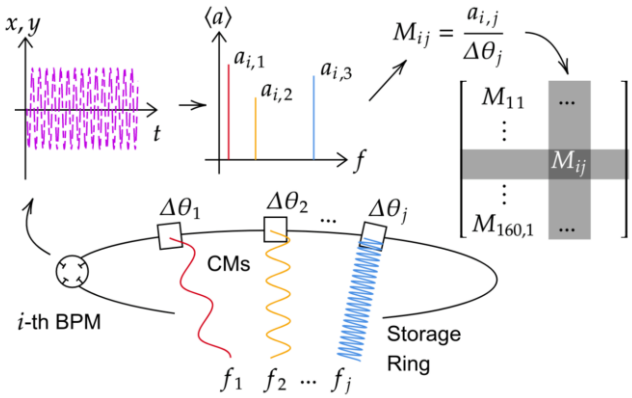


Figura 14 Esquema utilizado na medida de matriz resposta de órbita usando excitação AC paralela de diversas corretoras.

Outro destaque vai para o desenvolvimento de diversos aplicativos para o sistema de controle dos aceleradores, tanto para o controle e monitoramento dos equipamentos, como para operação, registro e análise de dados, caracterização e controle de parâmetros do feixe, e experimentos de estudos de máquina (*Figura 15*).

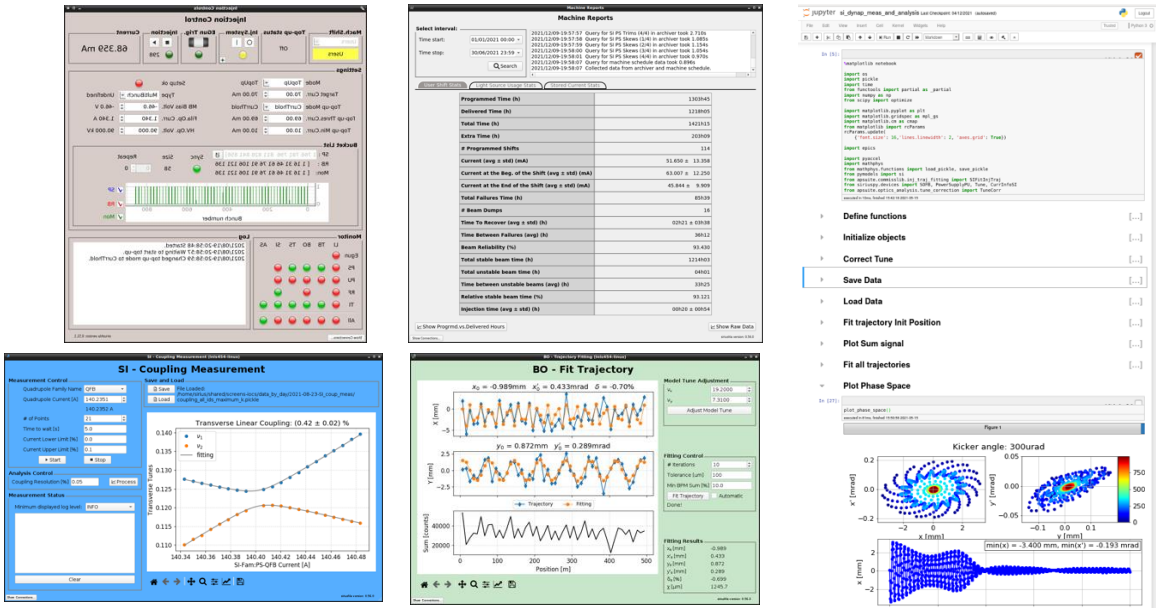


Figura 15 Exemplos de interfaces gráficas de aplicativos desenvolvidos para o sistema de controle dos aceleradores e experimentos de estudos de máquina em 2021.

Montagem e comissionamento das Linhas de Luz

Figura 16 – Vista panorâmica do hall experimental do Sirius exibindo desde a linha IPÊ até a CARNAÚBA (esq. para direita).

O ano 2021 foi marcado pelo início da construção e instalação das linhas de luz da fase I-B (*Figura 17*) do Sirius (IMBUIA, CEDRO, SAPÊ, QUATI, JATOBÁ, PAINEIRA, SABIÁ e SAPUCAIA). Entretanto, o ritmo de construção das linhas SAPÊ, SAPUCAIA, QUATI e JATOBÁ foi reduzido substancialmente por falta de recursos financeiros do projeto, mantendo apenas a construção das linhas IMBUIA, PAINEIRA, SABIÁ e CEDRO, que serão detalhadas à frente. Estas 4 linhas foram selecionadas pelo estágio de construção que se encontravam e pelo investimento que seria necessário para sua conclusão. Ainda estão sendo mantidas

atividades e investimentos menores nas demais linhas da fase I-B, embora em um ritmo mais lento e apenas em componentes que estão no caminho crítico dos seus projetos.

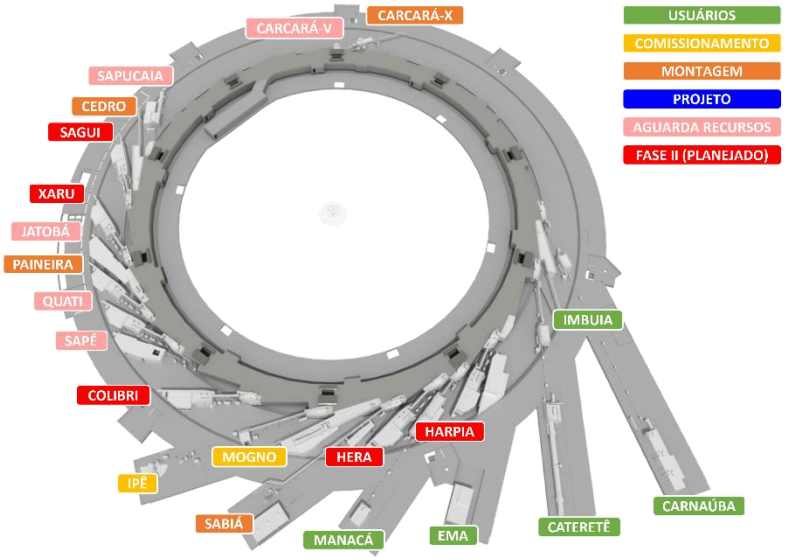


Figura 17 - Disposição das linhas das fases I-A, I-B e II e suas respectivas fases de implantação.

CARCARÁ

A linha de diagnóstico de feixe de elétrons (*Figura 18*), nomeada CARCARÁ, também está sendo montada. Esta linha possui um ramo principal de raios-X (CARCARÁ-X) e outro de luz visível (CARCARÁ-V) e, embora esta não seja uma linha para experimentos de usuários, ela permitirá que o grupo de física de aceleradores monitore características essenciais do feixe de elétrons de forma contínua e aprimore a operação do anel de armazenamento em direção a seu máximo desempenho.

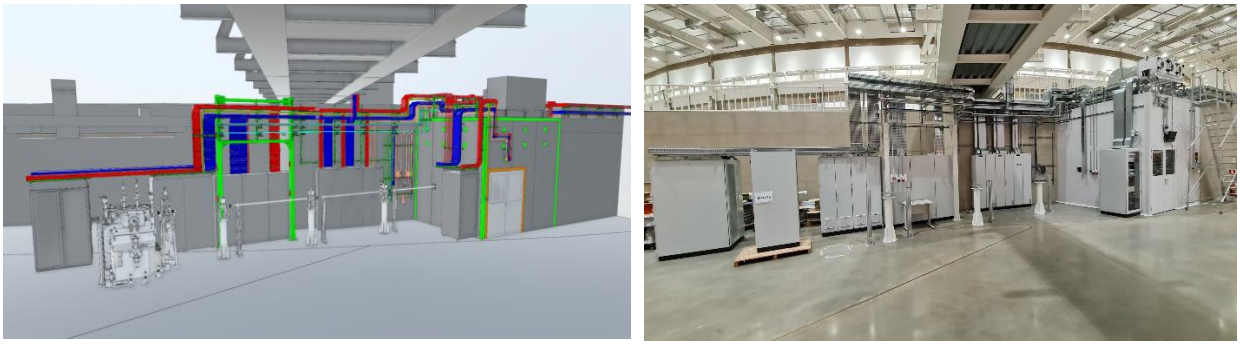


Figura 18 – (Esquerda) Projeto integrado de infraestrutura e componentes da CARCARÁ-X; (Direita) Infraestrutura concluída e Instalação de componentes em andamento.

PAINEIRA

Na linha PAINEIRA, dedicada à difração de pó, a instalação das cabanas de proteção radiológica, produzidas por uma nova empresa brasileira, encontram-se em fase final de instalação (*Figura 19*) e os sistemas de detecção em fase de finalização, com partes importadas já sendo embarcados do exterior e com previsão de instalação entre março e abril de 2022. Não obstante, a maior parte dos componentes da linha se encontram no laboratório e aguardam a sequência de instalações. O projeto da estação

experimental da linha passa pelas últimas revisões e a instalação física do *front-end* dentro da blindagem do anel está programada ainda para janeiro. O detector PiMega 450D da linha está montado e aguarda a realização de testes funcionais, o difratômetro legado do da linha XRD1 do UVX se encontra em manutenção na França e tem instalação prevista para março. Além disso, a maior parte dos componentes da linha se encontra no laboratório e aguarda a sequência de instalações.

Figura 19 – (Esquerda) superior: projeto integrado de infraestrutura e componentes da PAINEIRA, inferior: instalação da infraestrutura na etapa final de instalação. (Direita) Limpeza e integração do monocromador que será instalado na linha.

SABIÁ

A linha SABIÁ (dedicada ao dicroísmo circular magnético e imagem por foto-emissão de elétrons) também avançou significativamente (*Figura 20*). A instalação da cabana foi concluída e a infraestrutura de utilidades será finalizada em janeiro, abrindo espaço para o início da instalação dos componentes e estações. O *front-end*, que faz a ligação da linha com o anel de armazenamento, está parcialmente montado e será concluído em janeiro. O monocromador PGM da linha, fornecido por empresa dinamarquesa, tem sofrido com atrasos ocasionados pela cadeia de suprimentos global e tem chegada prevista ao Sirius até maio, prazo previsto para operacionalização dos sistemas de espelhos construídos internamente. A estação experimental PEEM já se encontra preparada para instalação e da bobina supercondutora passará por montagem e comissionamento *ex-situ* a partir de janeiro de 2022.

Figura 20 – (Esquerda) superior: estado da montagem do front-end no interior da blindagem; inferior: infraestrutura na etapa final de Instalação. (Direita) superior: câmara da bobina supercondutora; inferior: estação PEEM em condicionamento.

Para os experimentos de dicroísmo magnético circular e linear (XMCD e XMLD, respectivamente) na linha SABIÁ está sendo desenvolvido um sistema de vácuo que permitirá introduzir amostras no magneto sem quebra de vácuo, tornando muito mais ágil a troca de amostras. Mais ainda, como esse magneto deverá trabalhar com amostras preparadas i*n-situ* no LCIS, o sistema prevê a conectividade com um sistema portátil de vácuo para transporte de amostras do laboratório para a linha de luz.

IMBUIA

Na linha IMBUIA (micro e nano espectro-microscopia infravermelho), atualmente a infraestrutura está operacional (A/C, gases, iluminação, rede e alimentação) e os componentes ópticos e de vácuo instalados (*Figura 21*). As cabanas receberam os microscópios, que se encontram operando em modo *off-line*, com fontes auxiliares de radiação. A conclusão da instalação com a extração de luz síncrotron está prevista para início de fevereiro de 2022, após a instalação do espelho entregue recentemente.

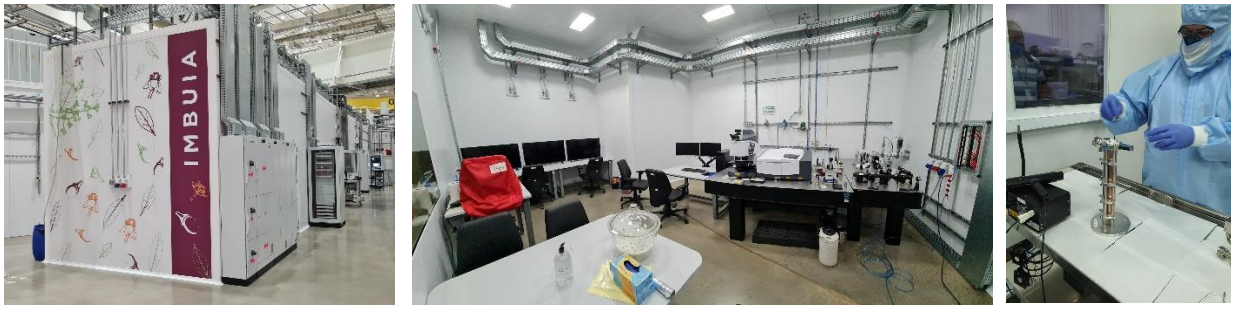


Figura 21 – Esquerda: infraestrutura concluída; meio: equipamentos das estações experimentais em posição; direita: preparação para instalação de espelho.

Enquanto a linha IMBUIA é preparada para instalação dos microscópios de infravermelho, estes sistemas experimentais têm sido comissionados em experimentos internos do CNPEM, utilizando fontes

de radiação convencionais. Ainda que estas fontes sejam mais limitadas que o feixe de luz síncrotron tais experimentos de comissionamento permitirão uma transição para operação para usuários mais rápida quando as instalações estiverem concluídas. A *Figura 22* exibe imagens *full-field* de micro-IR nas faixas espectrais de lipídeos, proteínas e DNA de hifas de fungos. Estes micro-organismos são centrais em pesquisa em andamento no tema de desenvolvimento compostos orgânicos voláteis em alternativa aos agrotóxicos. Os dados a seguir foram coletados em proposta interna realizada pela pesquisadora Juliana Velasco do LNBr. As imagens revelam uma distribuição bioquímica de diferentes componentes celulares e dá uma visão geral da composição destes fungos. Para uma análise espectral mais detalhada, foram obtidos espectros pontuais micrométricos das hifas submetidas a diferentes ambientes químicos (*Figura 22* dir.). Estas medidas foram decisivas na indicação de uma alteração no DNA, uma hipótese importante do trabalho. Tais resultados serão submetidos em breve para revista da área.

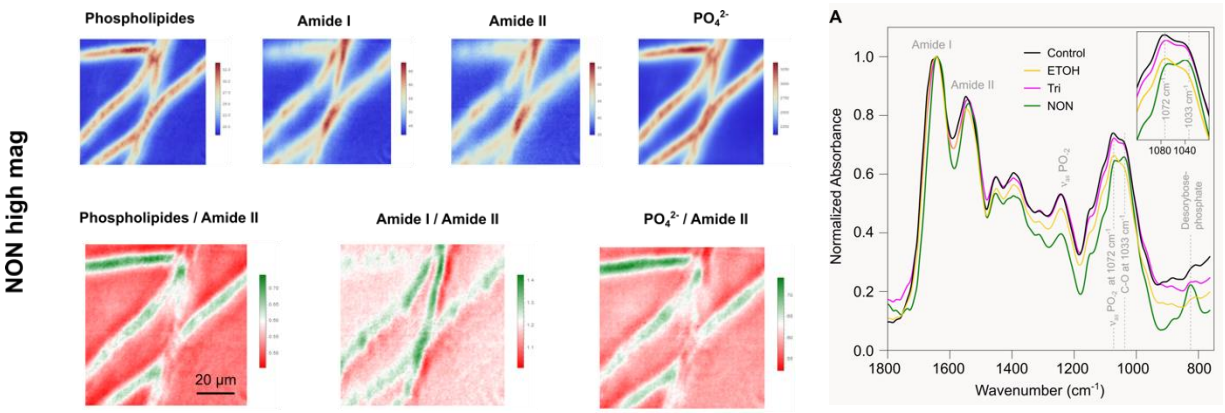


Figura 22 (esq.) Imagens espectrais de hifas de fungos obtidas por microscopia de IR em campo inteiro (full-field) no microscópio da linha a IMBUIA. (dir.) Espectros pontuais micrométricos das hifas submetidas a diferentes ambientes químicos

CEDRO

O layout óptico da linha CEDRO (dedicada ao dicroísmo circular para biologia estrutural) e o seu acoplamento ao espectrômetro de UV (OLIS), selecionado e customizado para a linha de luz, foi concluído e uma customização do espectrômetro DSM 20 foi solicitada à empresa OLIS em março de 2021. O projeto consiste na abertura de uma porta adicional lateral para a entrada da radiação sincrotron no monocromador (mantendo a lâmpada convencional como fonte alternativa). Esta linha emprega luz síncrotron oriunda de um dipolo de baixo campo do anel de armazenamento, de forma análoga à IMBUIA. Com isso, foi possível replicar a maior parte das soluções técnicas adotadas (*Figura 23*) para a infraestrutura e para a óptica da linha, propiciando que o tempo de construção seja significativamente reduzido. A interface com o anel de armazenamento está pronta para se acoplar ao espelho de extração no primeiro semestre de 2022, as obras de infraestrutura estão sendo iniciadas neste momento e estarão concluídas até março, dando espaço para a instalação dos demais elementos ópticos e estação experimental. Esta já foi recebida e testes de validação executados com sucesso pela equipe científica.

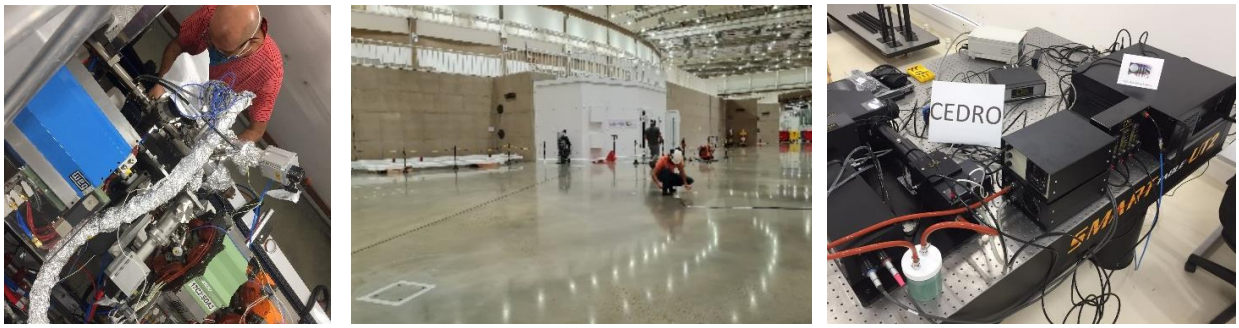


Figura 23 – CEDRO. Esquerda para direita: instalação da câmara de extração no anel de armazenamento, espectrômetro OLIS em testes operacionais e preparação de área no hall para receber a cabana.

Evoluções Parciais

As demais linhas que foram postergadas por limitações orçamentárias tiveram uma evolução mais lenta, cadenciada pelo investimento de recursos em alguns dos componentes mais relacionados ao caminho crítico dos seus projetos.

SAPUCAIA

Para a linha SAPUCAIA (*Figura 24*), dedicada à técnica de SAXS, a instalação da cabana ótica foi concluída em outubro e a cabana experimental encomendada recentemente. O túnel de espalhamento teve testes de fábrica realizados e aprovados em outubro na Espanha, a data de instalação prevista é imprecisa devido à conjuntura global de indisponibilidade nos fretes marítimos, espera-se o ter instalado no primeiro semestre de 2022 com a cabana experimental.

Figura 24 – SAPUCAIA. Esquerda para direita: cabana óptica instalada no hall experimental, túnel de espalhamento durante teste de aceitação em fábrica na Espanha e projeto integrado básico da linha para contratação do projeto executivo de utilidades.

QUATI

Para a linha QUATI (dedicada à espectroscopia de raios-X com resolução temporal) apresentada na *Figura 25*, foi possível seguir com a contratação da fabricação e instalação das cabanas de proteção radiológica, conceituação da estação experimental e das diferentes técnicas previstas, além de testes com as novas câmeras de ionização Ionitech na linha EMA e detector Vortex. No início de 2022 seguiremos com a contratação do projeto executivo de utilidades e daremos continuidade ao detalhamento dos componentes e estação, deixando em ponto de contração para quando houver novos recursos, mesma estratégia adotada para as linhas SAPUCAIA e SAPÉ. Diversos componentes da QUATI são oriundos da linha XDS do antigo anel UVX, parte desses componentes já se encontram disponíveis para recondicionamento e outros, como os sistemas de espelhos, aguardam ainda desmontagem.

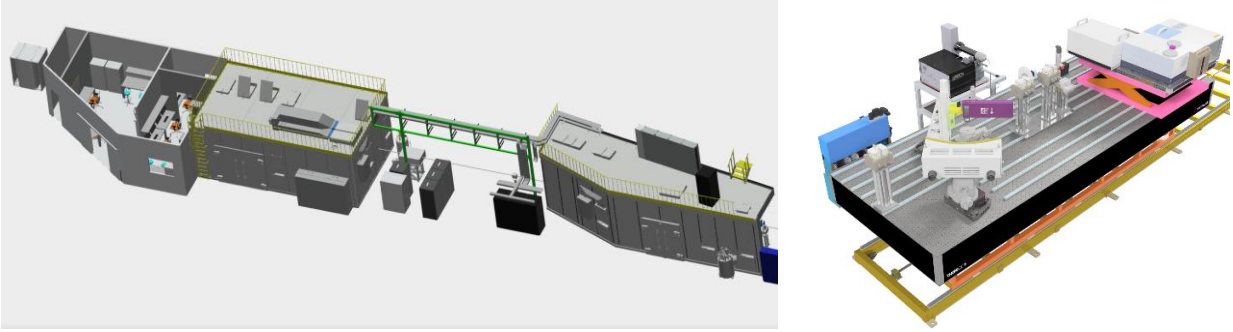


Figura 25 – QUATI. Esquerda para direita: projeto integrado básico para contratação do projeto executivo de utilidades e projeto conceitual da estação experimental.

SAPÉ

A linha SAPÉ (dedicada à espectroscopia de foto-emissão resolvida em ângulo) não requer cabanas de proteção radiológica metálicas nos moldes das anteriores, sendo a aplicação de áreas de exclusão e cabanas em isopainel medidas suficientes para assegurar uma operação segura. O projeto básico de infraestrutura avança para viabilizar a contratação do projeto executivo no primeiro trimestre de 2022. O projeto de componentes, embora pendente, possui a maior parte das soluções técnicas equivalentes aos de outras linhas em operação ou em fase avançada de projeto. As customizações necessárias ocorrerão predominantemente no *front-end*, região que une a linha ao anel, onde temos dois sistemas de espelhos localizados dentro do túnel do anel o que trará novos desafios para sua instalação e robustez dos sistemas de controle. No segundo semestre de 2021 a estação experimental ARPES foi trazida do anel UVX para o Sirius, começando a passar por uma série de adequações até sua instalação na SAPÉ.

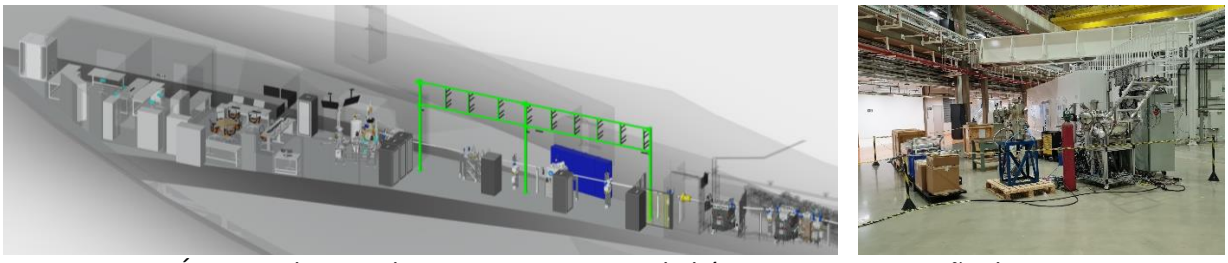


Figura 26 – SAPÉ. Esquerda para direita: projeto integrado básico para contratação do projeto executivo de utilidades e partes da estação experimental ARPES em instalação provisória no hall experimental do Sirius.

A Câmara do ARPES foi transportada e montada no LCIS e já está em bombeamento com pressão parcial de 1.62 x 10^{-7} mbar (*Figura 27*). Ao longo de 2021, foram realizadas algumas das manutenções previstas que envolviam instalação de peças de isolamento elétrico e térmico do manipulador, e atividades na lâmpada de Hélio: como realinhamento do capilar, testes de vácuo e algumas conexões elétricas com problema.

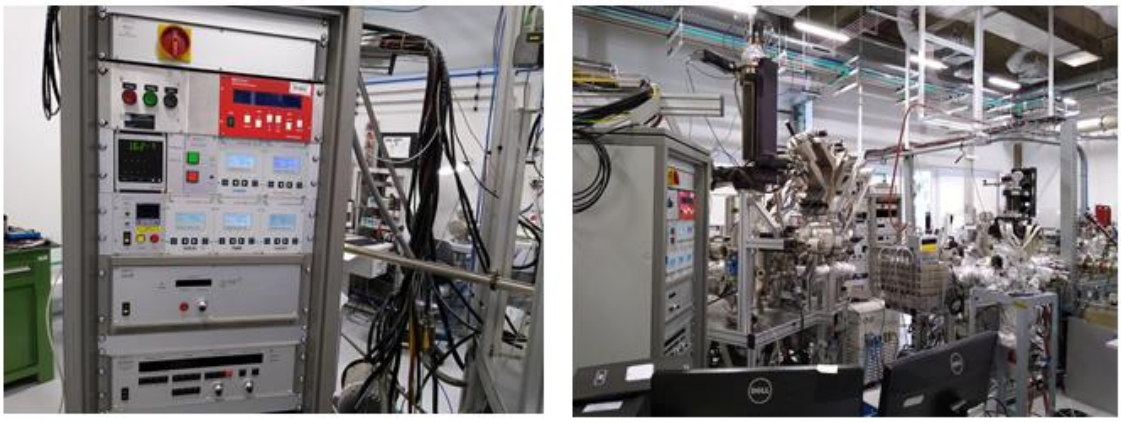


Figura 27 Figura à esquerda mostra "rack" do ARPES no LCIS, com sensor de vácuo indicando pressão parcial da câmara em bombeamento e já preparada para "baking". Figura à direita mostra o sistema aguardando instalação no túnel de vácuo do LCIS para posterior acoplamento ao berço da câmara do ARPES.Foi observado feixe UV de 21 eV (HeI) na tela de fósforo montada no manipulador do ARPES (*Figura 28*).

Figura 28 A foto acima mostra o ponto verde, que é o feixe UV HeI (21eV) chegando da lâmpada pelo capilar de Cobre à tela de Fósforo fixada ao manipulador Carving na câmara do ARPES.

A câmara de preparação da linha SAPÊ foi colocada em vácuo no SIRIUS utilizando alguns equipamentos reutilizados do UVX, como: bomba turbo, bomba mecânica, válvulas "*gate*", sensores de vácuo, entre outros. O espectrômetro de difração de elétrons de baixa energia foi instalado na câmara e já está em bombeamento (*Figura 29*). Equipamentos como as evaporadoras, fonte de íons e manipulador serão instaladas antes do fim desse ano. A foto da *Figura 29* mostra o manipulador, que já foi retirado da embalagem para transporte e está pronto para instalação na câmara.

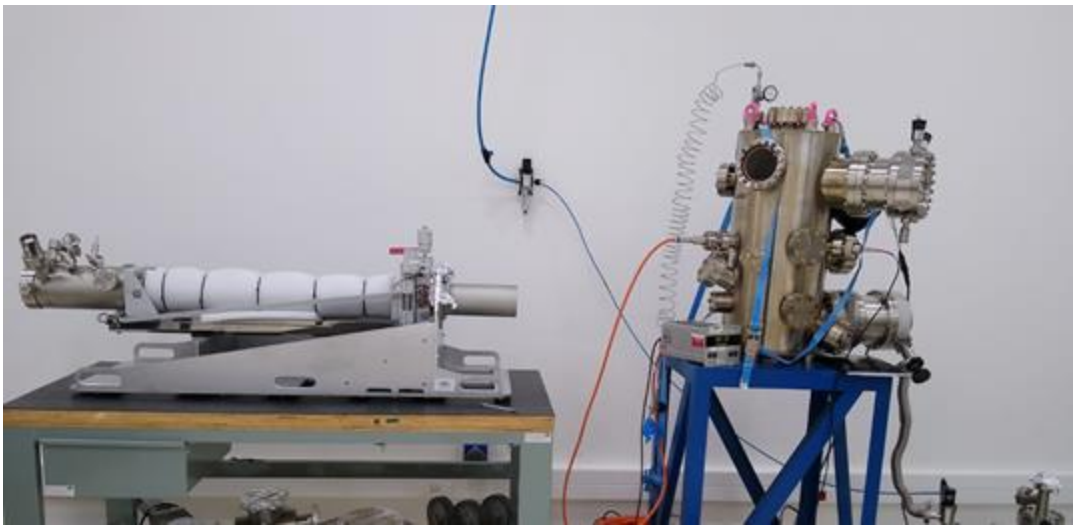


Figura 29 Câmara de preparação da linha SAPÊ bobeando com pressão parcial de 1.3 x 10-7 mbar. O espectrômetro LEED pode ser visto já instalado à câmara à direita e o manipulador à esquerda, já preparado para instalação na câmara.

Alguns procedimentos foram desenvolvidos como uma montagem de termopares para calibração dos estágios de aquecimento do manipulador da câmara de preparação, além de porta amostras para monocristais que estão sendo desenvolvidos e construídos, tanto para uso no sistema de aquecimento e resfriamento a N2L dessa câmara de preparação, quanto para resfriamento à HeL no criostato do Carving, na câmara do ARPES.

Evolução das Linhas da Fase I-A

Neste semestre prosseguimos também com a instalação e comissionamento das linhas de luz da fase 1-A do Sirius (MANACÁ, CATERETÊ, CARNAÚBA, MOGNO, IPÊ e EMA). Além da linha MANACÁ, que já se encontra em comissionamento científico, as linhas CATERETÊ e CARNAÚBA estão passando também do comissionamento técnico para o científico, com experimentos que serão detalhados neste relatório, e já receberam os primeiros usuários de comissionamento.

MANACÁ

Os desenvolvimentos na linha MANACÁ continuaram em paralelo com os experimentos de usuários. Durante o primeiro semestre de 2021 ocorreu a instalação e comissionamento do robô de entrega de amostras da linha, e os usuários já estão se beneficiando desta melhoria. Com isso, em cada sessão de coleta de dados, 48 amostras podem ser carregadas por vez no *dewar* de nitrogênio líquido, e toda a operação é controlada por meio da interface gráfica MXCube (*Figura 30*). As principais vantagens deste sistema são a rapidez na coleta de dados, visto que o usuário não precisa entrar e sair da cabana experimental a cada coleta, e é o primeiro passo para a implementação de coletas no modo totalmente remoto. Essa é uma opção que será muito explorada em medidas em várias linhas de luz do Sirius.

Figura 30 (esq.) Visão geral do sistema robótico (dir.) da linha MANACÁ (MX) Usuária utilizando o sistema na sua coleta de dados.

CATERETÊ

A linha CATERETÊ, com instrumentação dedicada a imagens por espalhamento coerente e com resolução temporal, teve todos os esforços concentrados neste semestre em obter as primeiras imagens tridimensionais com resolução de nanômetros. Os resultados nos primeiros meses de medidas em 2021, obtidos com tomografias de cubos micrométricos de zeólitas pelo modo de difração coerente com onda plana (pwCDI), foram muito promissores. Entretanto, a reconstrução computacional das imagens 3D a partir dos dados de difração obtidos na linha de luz evidenciaram diversos problemas ligados a fontes de ruído de diversas origens, desde o feixe de elétrons até os elementos óticos da linha.

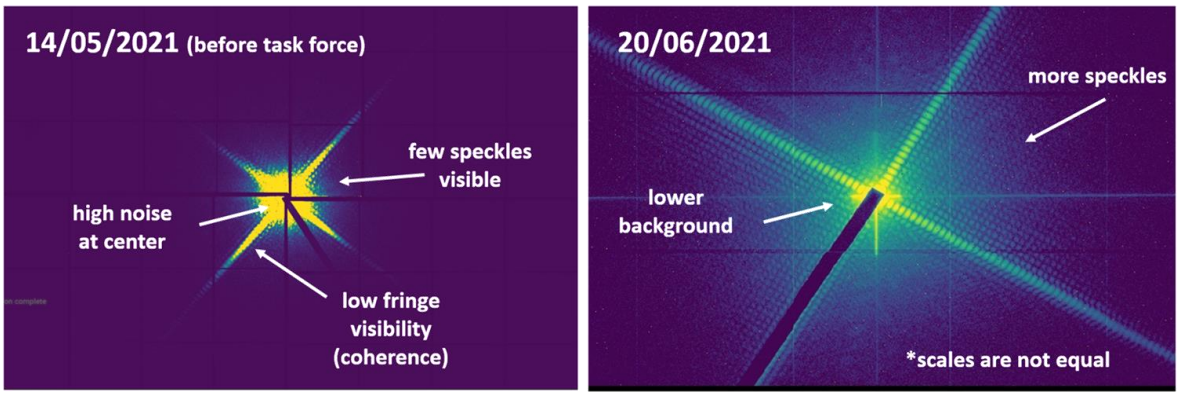


Figura 31 Melhorias obtidas nas medidas de difração coerente após a campanha de realinhamento ótico e redução de fontes de ruído na linha CATERETÊ

Com uma campanha detalhada de revisão de todos os subsistemas, que consumiu praticamente todo restante do semestre, parte dos problemas foram identificados e sanados (*Figura 31*). Entretanto, foi identificado uma origem de ruído relacionada a contaminação no cristal monocromador da linha que ainda não pôde ser resolvido. Pelo monitoramento feito ao longo do ano, é possível observar que o problema provavelmente não teve origem em nenhum evento singular, mas vem evoluindo lentamente até chegar no ponto crítico que atualmente dificulta muito o uso do monocromador da linha. Embora já

tenhamos cristais para reposição, optamos por fazer o *by-pass* do monocromador e continuar com as medidas sem interrupção, que levaria meses.

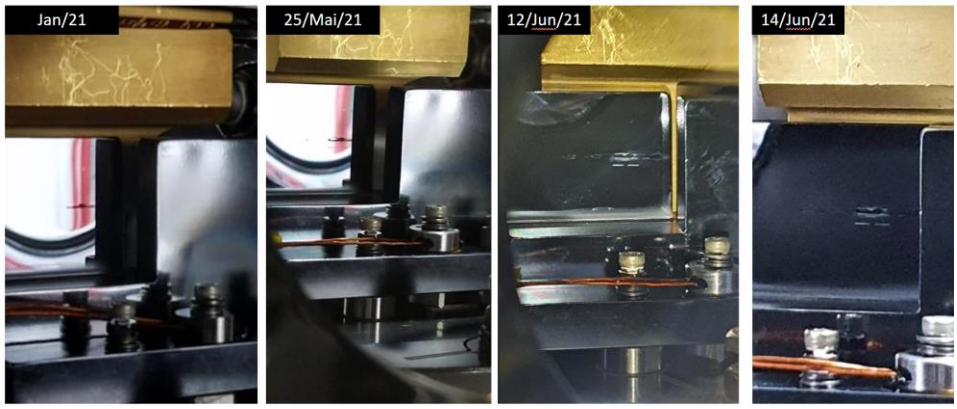


Figura 32 Contaminação do cristal monocromador da CATERETÊ, responsável por uma das maiores fontes de ruído nos experimentos realizados até agora.

Com o *by-pass* no monocromador, o que limita a resolução das imagens, ainda foi possível obter imagens de resolução nanométrica através de uma adaptação do método de medida de difração coerente, com uso de *pinhole*. O novo método, proposto por Giovanni Beraldi, do grupo de computação científica é uma nova versão que é mais robusta e menos sensível as flutuações do feixe de elétrons que ainda limitam os experimentos com coerência. Algumas das imagens bidimensionais (com fase e amplitude) do padrão Siemens Star é exemplificado na *Figura 33*. Estas medidas permitiram otimizar as condições de resolução da linha de luz e agora estão sendo estendidos para imagens 3D, em particular de células.

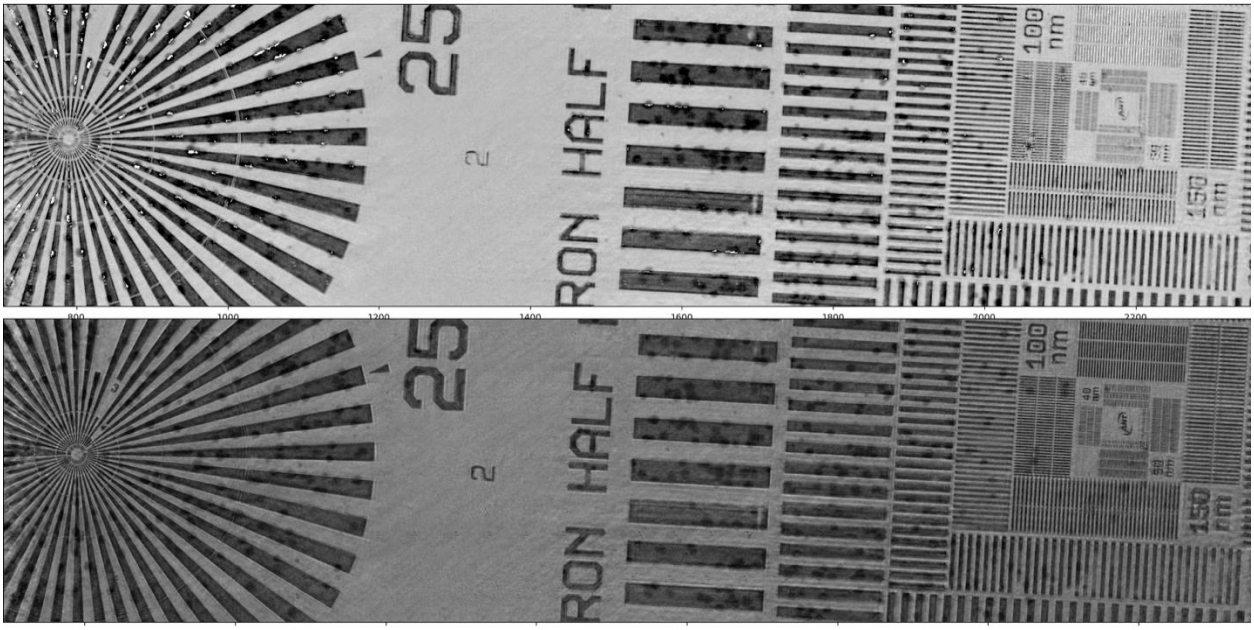


Figura 33 Fase e Amplitude de resolução nanométrica do padrão da Siemens Star obtido na linha CATERETÊ.

CARNAÚBA

As atividades de comissionamento da linha CARNAÚBA se concentraram na estação da nanosonda TARUMÃ, a primeira da linha a ser comissionada (Figura 34). A estação conta com uma grande variedade de detectores de raios-X integrados simultaneamente nos experimentos com imagem por varredura do feixe de raios-X na amostra.

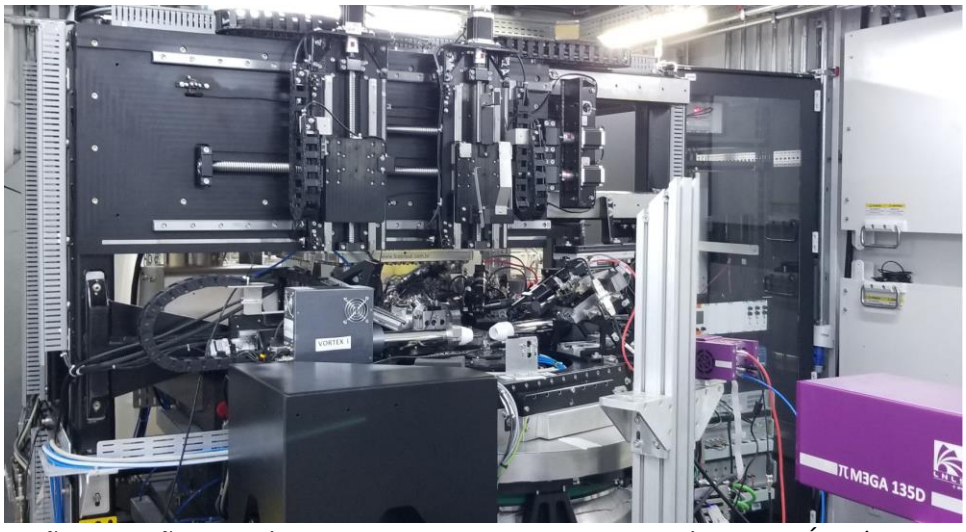


Figura 34 Estação Tarumã montada para os primeiros experimentos da CARNAÚBA (nanoprobe de raios-X).

Um exemplo deste tipo de imagem do padrão de calibração de estrela (Padrão ANT – *Applied NanoTools*, semelhante ao usado na linha CATERETÊ), obtida nos experimentos de comissionamento com resolução nanométrica, é apresentado na *Figura 35*. Enquanto a resolução da imagem por fluorescência é limitada pelo tamanho do feixe no foco (que neste caso era cerca de 120x250 nm2), na pticografia de raios X essa resolução pode ser ampliada explorando o efeito de coerência do feixe de luz síncrotron do Sirius. A imagem da esquerda mostra uma resolução da ordem de 20 nm obtida por reconstrução pticografica da fase da onda propagando até o detector 2D PiMega.

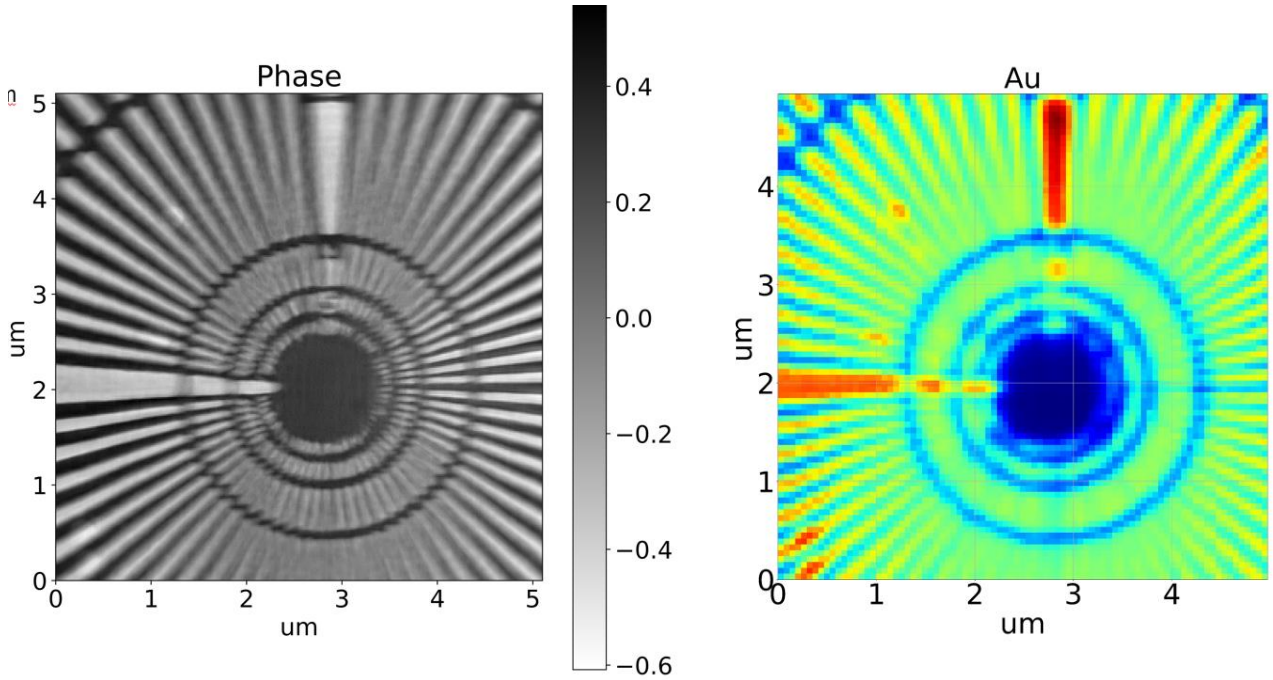


Figura 35 Imagem de varredura do padrão de estrela (padrão ANT) na linha CARNAÚBA, medindo simultaneamente fluorescência e pticografia. Imagem obtida no modo "pink beam" com feixe focalizado em 120 x 250 nm2 (VxH) a partir da fluorescencia do Au (direita) e por reconstrução pticografica (phase) com pixel de 18 nm e resolução estimada de 20 nm por FRC.

No estágio atual de comissionamento, embora o feixe ainda esteja ligeiramente maior do que o esperado nominalmente, já é possível se obter mapeamento químico de amostras complexas como a de raízes no solo (*Figura 36*). Isso demonstra que a linha está pronta para iniciar o comissionamento científico. Experimentos mais desafiadores permitirão identificar as necessidades de otimização da linha com amostras reais de usuários.

Nas condições atuais da linha, já é possível realizar experimentos de varredura 2D e 3D por contraste de atenuação e de fluorescência, bem como se escolher regiões de interesse nas amostras para medidas de espectroscopia de absorção de raios X.

Um exemplo de mapeamento 2D por fluorescência, observando-se a distribuição dos micronutrientes Zn e Se em uma castanha do Pará, e a especiação química do elemento Selênio, é mostrado na *Figura 37*. A resolução desse estudo foi sub-micrométrica, com o feixe focalizado em

120x500 nm^2 e o passo dado na varredura foi de 800 nm. Observa-se claramente a presença de selênio no estado de oxidação -2.

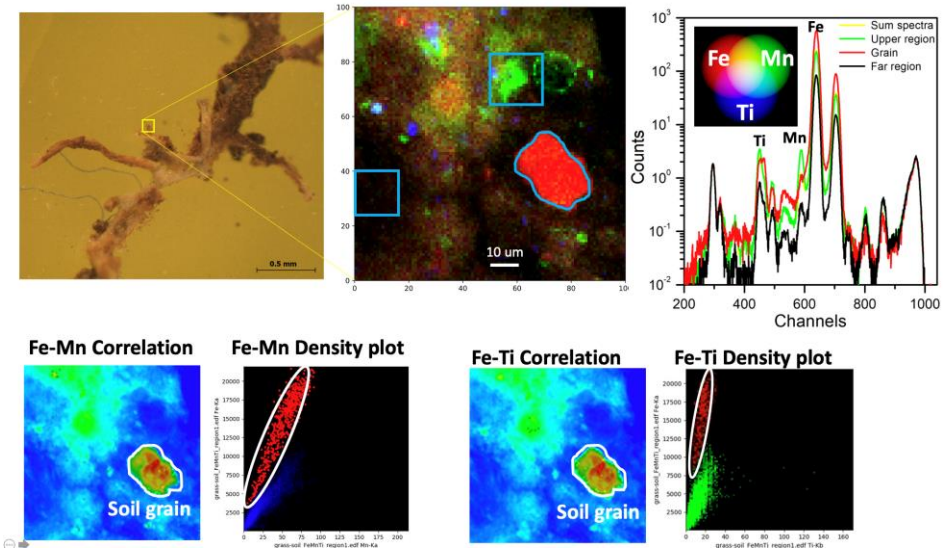


Figura 36 Imagem de fluorescência de uma amostra de raiz e solo obtida na linha CARNAÚBA, com correlações de posição entre diferentes elementos químicos.

O primeiro experimento de tomografia na linha Carnaúba foi realizado em uma amostra de diamante profundo (originário de uma profundeza estimada entre 400 e 600 km abaixo na crosta terrestre) contendo inclusões sólidas metálicas. A amostra de diamante foi previamente estudada na linha de luz Mogno para identificação de inclusões e distribuição espacial. Em seguida, foi buscada uma inclusão dentro do diamante com dimensões compatíveis com a medida na linha Carnaúba. Observamos na *Figura 38* uma projeção da imagem da linha Mogno e as respectivas imagens em transmissão e em fluorescência de uma inclusão sólida de aproximadamente 20 um. Esse nanocristal metálico é formado por átomos de Fe, Ni e recobertos por uma capa de Cu.

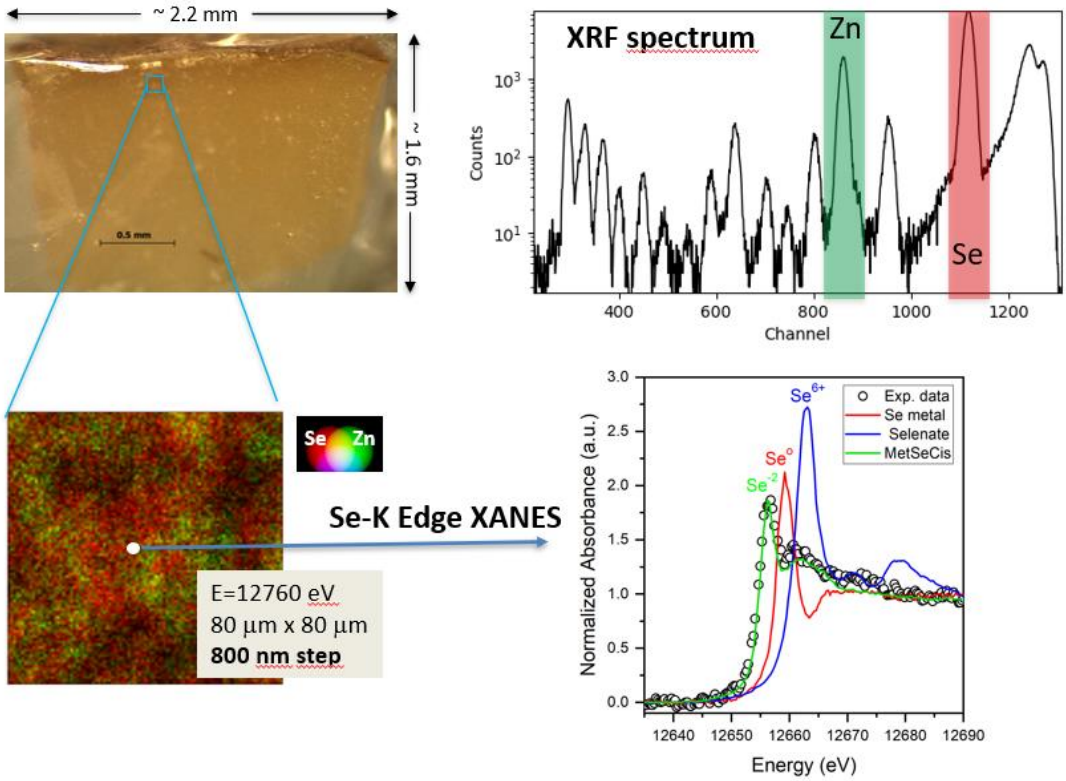


Figura 37 Imagem de fluorescência e especiação química de uma amostra de castanha do Pará obtida na linha CARNAÚBA. A imagem 2D de fluorescência foi feita observando-se os micronutrientes Zn e Se, suas distribuições e correlações. A especiação química foi feita na borda de absorção de raios x do elemento Se, indicando que sua forma química mais provável seja orgânico.

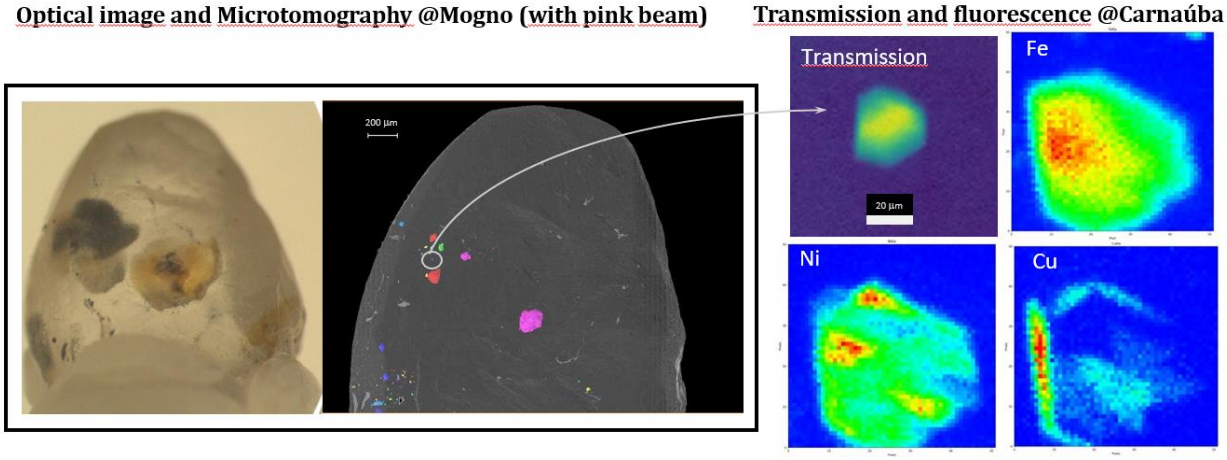


Figura 38. Combinando linhas de luz: Imagem óptica, tomografia na linha Mogno, e mapeamento 2D por transmissão e fluorescência na linha Carnaúba de um diamante oriundo das profundezas da crosta terrestre. A inclusão sólida metálica observada tem dimensões da ordem de 20 micrometros e vê-se claramente facetas cristalinas. O mapeamento químico indica que o microcristal é formado por átomos de Fe e Ni recobertos por uma camada de Cu. A imagem tomográfica (não mostrada) confirma esse fato.

EMA

A linha EMA (dedicada a experimentos em condições extremas), teve seus primeiros experimentos (difração em altas pressões) realizados no fim de 2020 com um *setup* experimental provisório. Na sequência, durante o primeiro semestre de 2021, foi iniciada a instalação do setup definitivo de altas pressões e temperaturas extremas (*Figura 39*), que ainda está pendente finalização por atraso de entrega de placas óticas de um fornecedor nacional. Isso deve ser concluído no primeiro semestre de 2022.

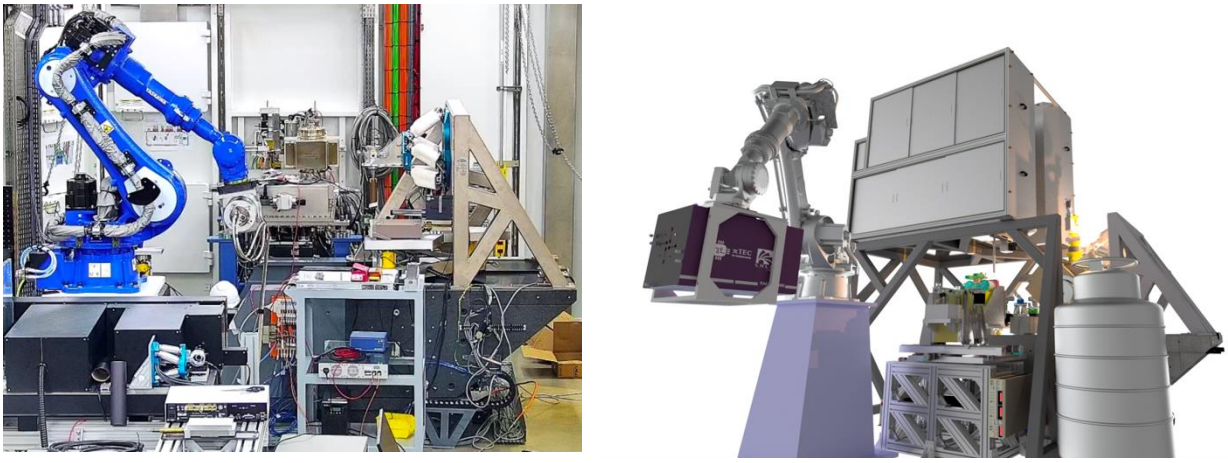


Figura 39 Imagens do estado atual e do projeto final do setup 1 da linha EMA (condições extremas)

O sistema de aquecimento por laser que será usado no setup experimental 1 da EMA (*Figura 40*) para se estudar amostras submetidas a condições extremas de temperaturas de milhares de graus e pressões de milhões de atmosferas, também foi comissionado neste semestre e preparado para operação após sua instalação. O painel direito da *Figura 40* mostra a temperatura atingida em uma folha de Pt (uma amostra de 5 micrometros de espessura, como no *inset* da figura). A temperatura máxima de 3200K obtida neste experimento coincide com a temperatura de fusão da Pt nesta pressão.

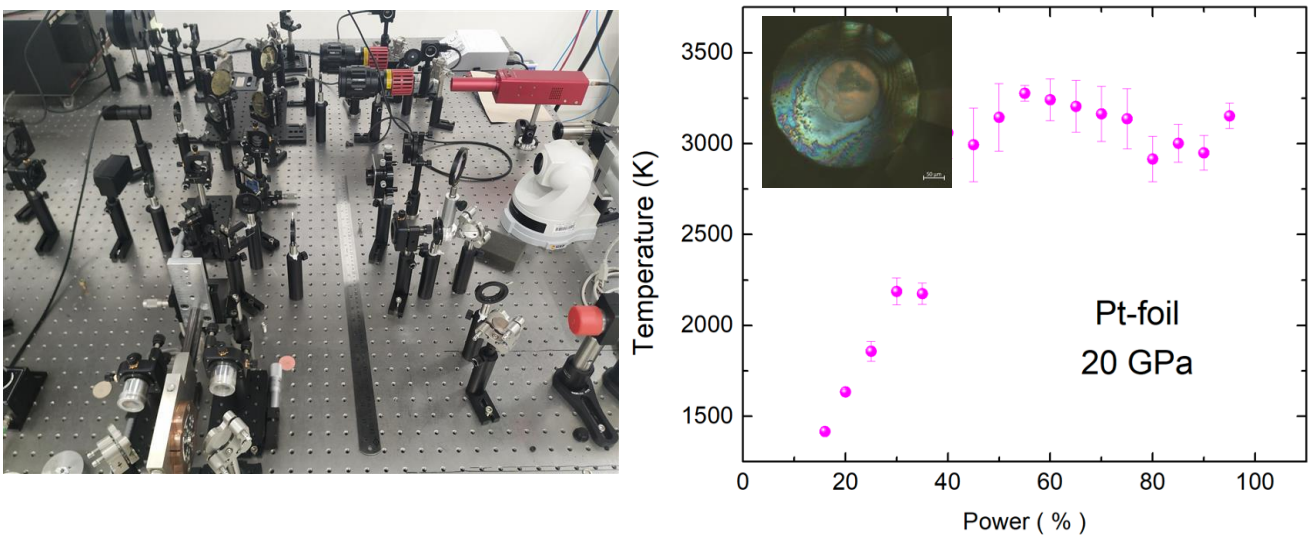


Figura 40 (esq.) Montagem do sistema de laser heating para testes em laboratório. (dir.) Temperatura atingida pelo setup em uma amostra de Pt em pressão de 20 GPa.

Com o avanço do comissionamento da linha EMA para alguns dos experimentos planejados, em combinação com as condições termodinâmicas possíveis graças a implementação e comissionamento do laboratório LCTE (Lab. Condições Termodinâmicas Extremas) foi possível realizar alguns experimentos de espectroscopia e difração de raios X em condições diferentes das ambientais.

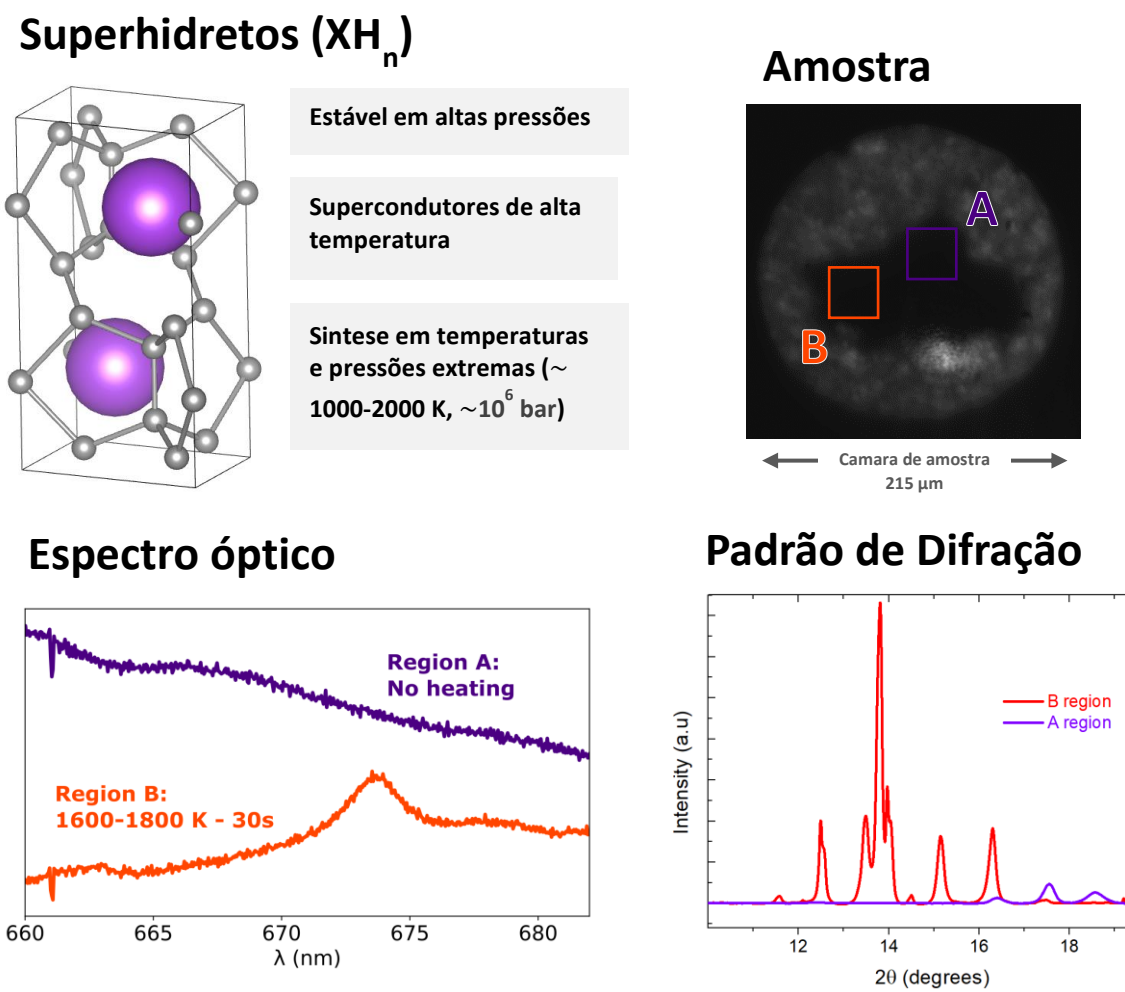


Figura 41 Experimentos nas misturas de NH3BH3 com Cério

A combinação de altas pressões com altas temperaturas disponíveis na linha EMA pode levar a formação de novos materiais. Após o comissionamento ao longo do último semestre do novo setup de aquecimento a laser em conjunto com células de diamante para atingir altas pressões, fizemos uma primeira tentativa de síntese de um superhidreto de cério, onde uma mistura de NH3BH3 com Cério foi colocado em uma célula de pressão a 10GPa, localmente aquecida até 1700K (*Figura 41*). Uma vez feita a síntese, fizemos medidas de XRD na região irradiada pelo laser e fora desta região que nos permitiram comprovar a formação de uma nova fase do composto. Um estudo mais detalhado está sendo desenvolvido a fim de identificar qual a fase foi criada.

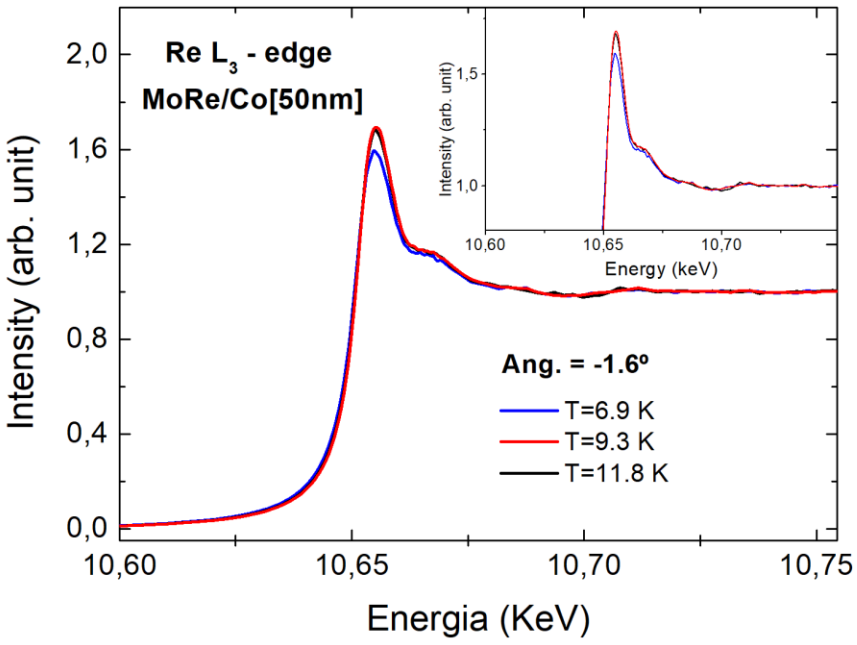


Figura 42 Espectroscopia de absorção do composto MoRe

Usando a seletividade ao elemento químico e ao orbital da técnica de espectroscopia de absorção nós investigamos o efeito do estado supercondutor densidade de estados do composto MoRe (*Figura 42*), o qual é supercondutor para temperaturas abaixo de 9K. Para isso, fizemos medidas em incidência rasante, que nos da seletividade a profundidade do filme, em um filme fino composto por uma camada de MoRe com espessura de 150nm e um outra camada de Co com 50nm. Desta forma, como a camada de Co é magnética poderíamos também investigar o efeito do magnetismo deste íon no estado supercondutor da camada de MoRe.

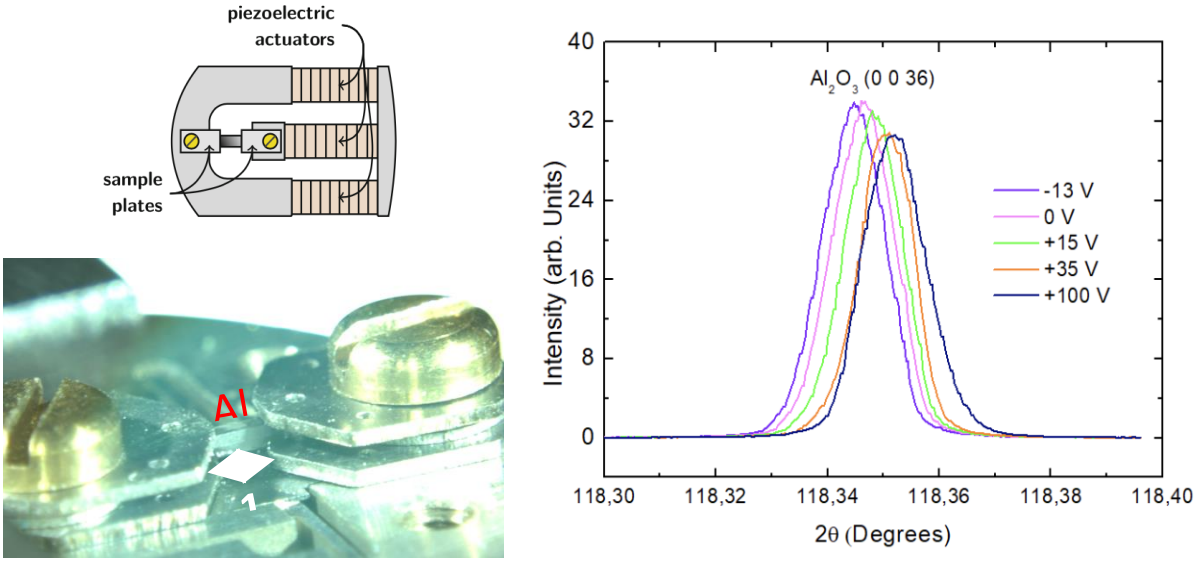


Figura 43 Dispositivo para pressão unuiaxial e experiment de difração in-situ

A aplicação da pressão uniaxial é uma importante ferramenta para mudar unidirecionalmente a simetria de materiais o que pode alterar significativamente suas propriedades. Com esse objetivo foi adaptada uma célula de pressão uniaxial da empresa Razorbil, para experimentos de difração de monocristal na linha EMA (*Figura 43*). Para testes usamos uma amostra de Alumina (Al2O3) e aplicamos pressão uniaxial ao longo do eixo 100 do material e acompanhamos as deformações na direção (0 0 36) perpendicular a direção da aplicação de força. Embora o módulo de bulk da Alumina seja bastante elevado (250GPa) conseguimos verificar deslocamentos significativos dos picos de Bragg, confirmando a efetividade da aplicação de pressão uniaxial (*Figura 43*).

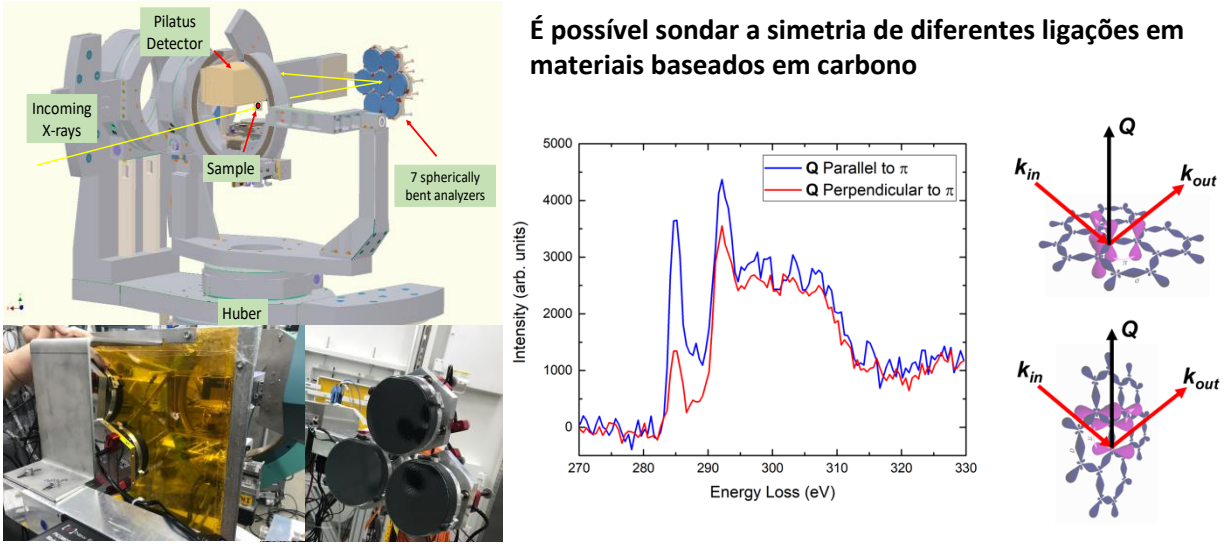


Figura 44 Implementação do sistema de de X-ray Raman (XRS) na linha EMA e as futuras possibilidades de medidas.

Também na linha EMA, é implementada a técnica de X-ray Raman (XRS), que nos permite estudar bordas de absorção de elementos leves, tais como Carbono e Oxigenio, usando altas energias (*Figura 44*). Desta forma, esta técnica pode ser bastante útil para estudo de materiais "leves" sob condições extremas de temperatura e pressão. Nesta técnica fazemos o uso da componente inelástica do raio X espalhado, onde o raio X espalhados são "filtrado" por um conjunto de cristais analisadores de silício e focalizados em um detector de área. Os analisadores foram produzidos em colaboração com o LNNano e um primeiro experimento teste foi realizado a fim de se testar a qualidade dos cristais. Como teste do sistema, foram feitas medidas em uma pastilha de carbono em duas orientações, paralelo e perpendicular ao plano de espalhamento, onde pudemos verificar a sensibilidade da técnica simetria dos orbitais atômicos.

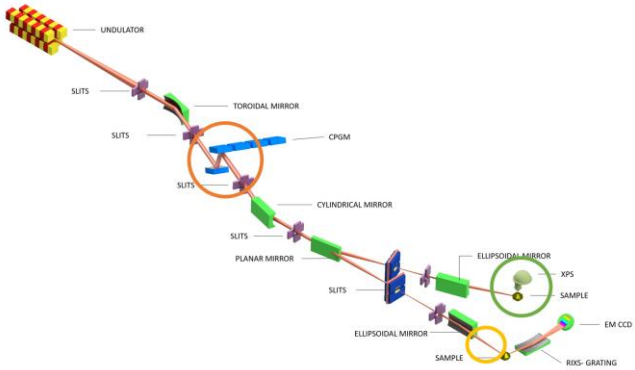
Durante o comissionamento da ótica da linha EMA também foram detectados problemas no monocromador DCM que já foram resolvidos (*Figura 45*) e a linha aguarda recuperação da pressão de vácuo para reiniciar o comissionamento com feixe.

Figura 45 Correções e melhorias sendo executadas no monocromador HD-DCM da linha EMA

IPÊ

A linha IPÊ (dedicada a espalhamento inelástico ressonante de raios-X e espectroscopia de fotoelétrons) desafiou as equipes técnicas ao longo do ano com inúmeras questões intrincadas de gerenciamento, montagem, instalação e integração de sistemas. O ponto mais preocupante ocorreu no meio do ano quando um vazamento foi detectado na conexão do canal interno de refrigeração do espelho do monocromador, às vésperas de iniciar o comissionamento com feixe. Esse espelho é um dos elementos ópticos mais caros, delicados e de difícil fabricação presentes nas linhas do Sirius. O problema foi rapidamente identificado pelas equipes internas com a ajuda do fabricante, o reparo sugerido foi a aplicação de um selante especial, que teve sucesso. Entretanto, todo processo de reparo acarretou cerca de 4 meses de atraso para a nova tentativa de iniciar o comissionamento, devido ao grande número de retrabalhos gerados. Nesse tempo a instalação da estação experimental XPS foi concluída e da RIXS avançou mais lentamente devido à interrupção de embarques ocasionada pela indisponibilidade da cota de importação, bem como a falhas no processo de contratação de peças fabricadas e pendências de projeto. Agora a estação passa pelas montagens e alinhamentos finais e deve estar disponível para comissionamento em fevereiro de 2022. A
Figura *46* apresenta elementos de todo esse processo e a Figura 47 a iluminação de pontos-chaves da linha até as estações de pesquisa.

Figura 46 – IPÊ. (1) Vazamento detectado em junho na junção Silício-Aço Inox do espelho presente no monocromador em junho; (2) detalhe da junção com aplicação de selante para UHV; (3) vista externa da linha após o término da instalação de componentes; (4) estação XPS plenamente instalada e operacional; (5) estação RIXS durante instalação dos últimos itens.



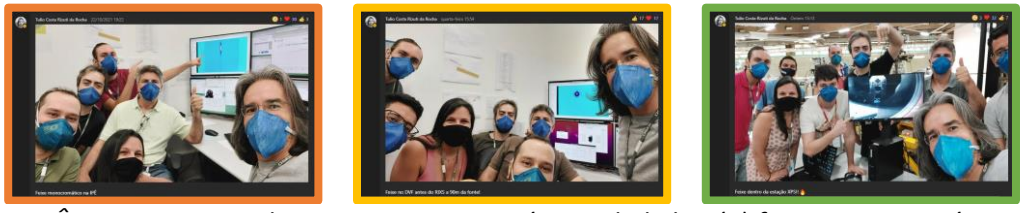


Figura 47 – IPÊ. Etapas iniciais do comissionamento técnico da linha: (1) feixe monocromático em 22/10, (2) feixe na entrada da estação RIXS em 27/10 e (3) feixe dentro da câmara da estação XPS em 28/10.

Há duas estações experimentais na linha IPÊ, uma dedicada a experimentos de espalhamento inelástico de raios-X (RIXS) e outra dedicada a Espectroscopia de foto emissão por raios-X. Não existem ainda fabricantes que comercializem espectrômetros de RIXS de alta resolução, portanto para trabalhar com esta técnica é necessário desenvolver seu próprio instrumento. Para construir e operar um espectrômetro RIXS é necessário conhecer muito bem a óptica de raios-X tanto para definir os elementos

ópticos (grade, detector e mecânica) quanto para determinar os parâmetros de operação do espectrômetro. Apesar de já estar em fase de instalação, há ainda diversos desafios em instrumentação científica que são essenciais para realizar os experimentos definidos no caso científico da linha IPÊ

O espectrômetro de RIXS é baseado em uma grade de difração cilíndrica, com dupla função de dispersar e focalizar a radiação espalhada pela amostra em um detector. Os parâmetros básicos para operação da grade de difração já foram definidos para uma energia de referência do design óptico. Porém, o espectrômetro pode ainda ser operado em diversas configurações (ângulos e distâncias relativas entre grade, amostra e detector) que permitem otimizar resolução, fluxo ou minimizar aberrações ópticas para cada energia. Para determinar os diferentes modos de operação (*Figura 48*) e auxiliar o alinhamento, realizamos cálculos analíticos de óptica paraxial e simulações com softwares especializados em óptica de raios-X, baseados em soluções numéricas (REFLEC) e traçado de raios (SHADOW). Este trabalho foi realizado como parte da tese de doutorado da aluna Marli dos Reis Cantarino co-orientada por Tulio Rocha no IF-USP e recentemente submetido para apresentação no conferência internacional de sincrotron (SRI).

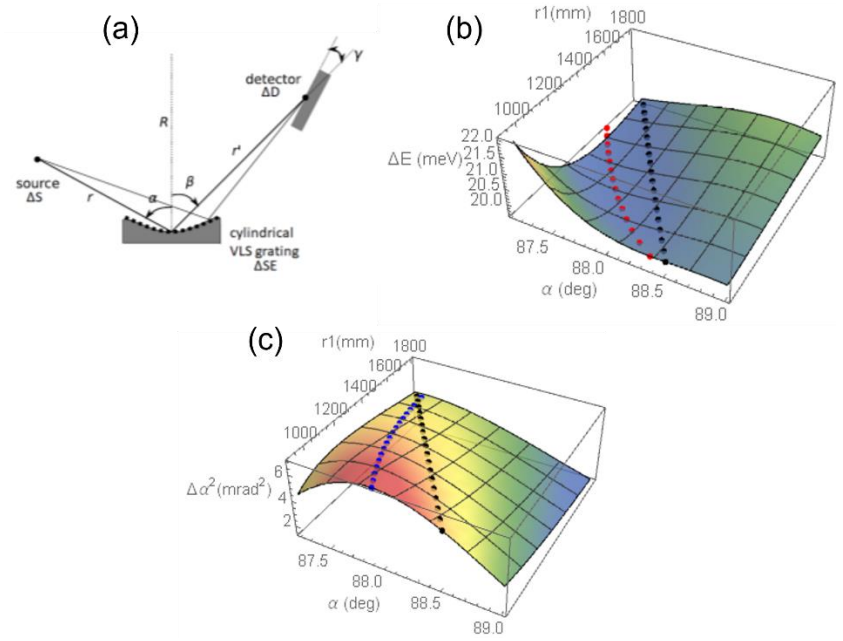


Figura 48 (a) parâmetros geométricos do espectrômetro RIXS: distância da grade (r), distância do detector (r´), ângulo de incidência da grade (alfa) e ângulo de difração (beta). (b) resolução em função do ângulo e distância da grade. (c) Aceitância em função do ângulo e distância da grade. Curvas em (b,c) denotam trajetórias de máxima resolução (vermelho), máxima aceitância (azul) e mínima aberração (preto).

A detecção dos fótons dispersados pela grade de difração ocorre em um detector de área, cuja resolução espacial determina a resolução final do espectrômetro. Para isso será utilizado um detector CCD especial com pixel de 16 μm e multiplicação de sinal (EM-CCD) que resulta em ruído menor que 1 elétron por pixel. Estas características permitem a detecção de imagens com eventos de fótons únicos por pixel, que podem ser processadas com algoritmos que determinam a posição do fóton com precisão sub-pixel (centroide), resultando em resolução espacial na imagem melhor que 5 um. Tipicamente centenas de imagens devem ser combinadas para formar um espectro. No entanto, para atingir alta resolução espectral é necessário processamento cuidadoso das imagens que envolve: centroide, correção de inclinação, correção de aberrações ópticas, alinhamento na direção dispersiva, soma de imagens,

integração na direção não-dispersiva e calibração em energia (*Figura 49*). Foram desenvolvidos códigos na linguagem python para realizar este processamento de imagens como parte do trabalho de tese de doutorado aluno Carlos William Galdino co-orientado pelo pesquisador Tulio Rocha no IFGW-UNICAMP. O código está publicado em um repositório aberto GitHub.

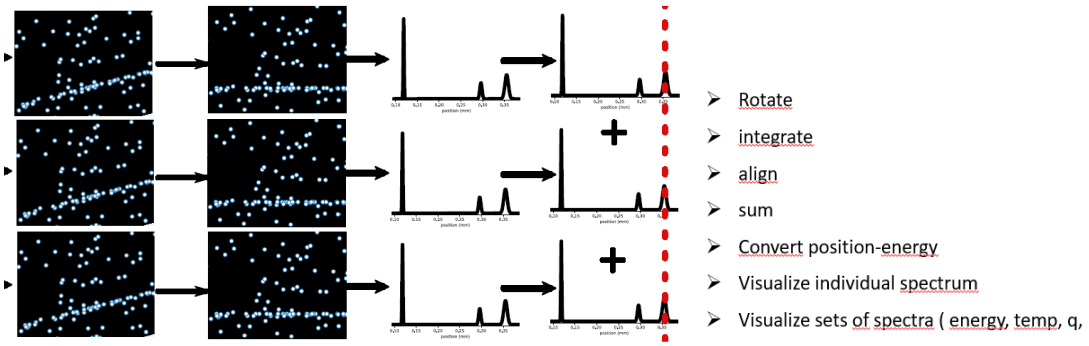


Figura 49 Exemplo de processamento de imagens de fótons únicos para gerar espectros integrados de RIXS. Cada uma das imagens é rotacionada para corrigir inclinação, integradas na horizontal, os espectros gerados são alinhados e finalmente somados para compor um espectro final.

A câmara experimental da estação RIXS conta com um manipulador de amostras de alta precisão que permite varreduras micrométricas (XYZ) e rotação (RZ) que opera em ultra-alto vácuo (UHV). Para realizar experimentos mais desafiadores, necessitamos desenvolver ambientes de amostra que permitam com rotação em Rx e Ry para mapear a transferência de momento em 3D e com controle de variáveis termodinâmicas das amostras (temperatura, strain, campos, lasers). Estes ambientes de amostra compreendem alguns dispositivos comerciais adaptados e partes completamente fabricados sob medida que serão inseridos no manipulador dentro da câmara em ultra-alto vácuo (*Figura 50*). Os ambientes sido projetados e montados pelo engenheiro Luiz Borges e estagiário Lucas Tuão sob orientação do pesquisador Thiago Mori.

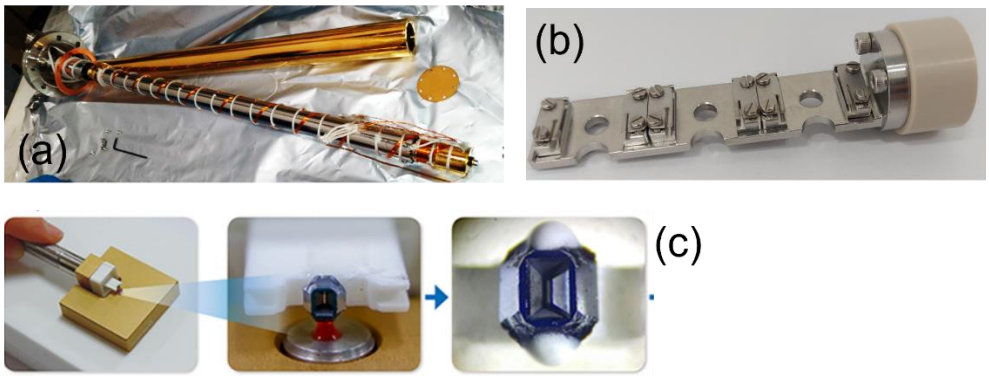


Figura 50 Exemplos de ambientes de amostra desenvolvidos para a estação RIXS (a) criostato comercial ColdEdge (<3K) adaptado para o manipulador Englund. (b) Receptáculo de amostras com isolamento elétrico para amostras policristalinas. (c) célula comercial selad

A estação XPS da antiga linha SXS do UVX foi trazida para o Sirius e passou por melhorias para ser instalada no braço A da linha IPE (*Figura 51*). Construímos uma nova base, adaptamos o sistema de proteção de equipamento (EPS) e fizemos uma atualização no software de controle do analisador de

elétrons (Prodigy) para permitir futura compatibilização com o sistema de controle do Sirius baseado em EPICS. A estação foi conectada a linha de luz e alinhada para receber o feixe de raios-X

Figura 51 Estação XPS instalada no braço A da linha IPE após melhorias e adaptações

Uma fonte de raios-X convencional foi utilizada para fazer o comissionamento técnico do analisador de elétrons SPECS da estação XPS. Para cada modo de operação do analisador (lente e energias de passagem) medimos espectros de uma amostra padrão de Ag para determinar a resolução e intensidade do sinal. Estes dados foram comparados com a performance medida na fábrica em 2008 para validar que após a mudança e melhorias da estação a performance do analisador foi preservada. O teste final foi detectar o sinal de uma amostra real de um futuro usuário do estação (Prof. José Maria Bueno UFSCAR) com menos de 1% de concentração (*Figura 52*).

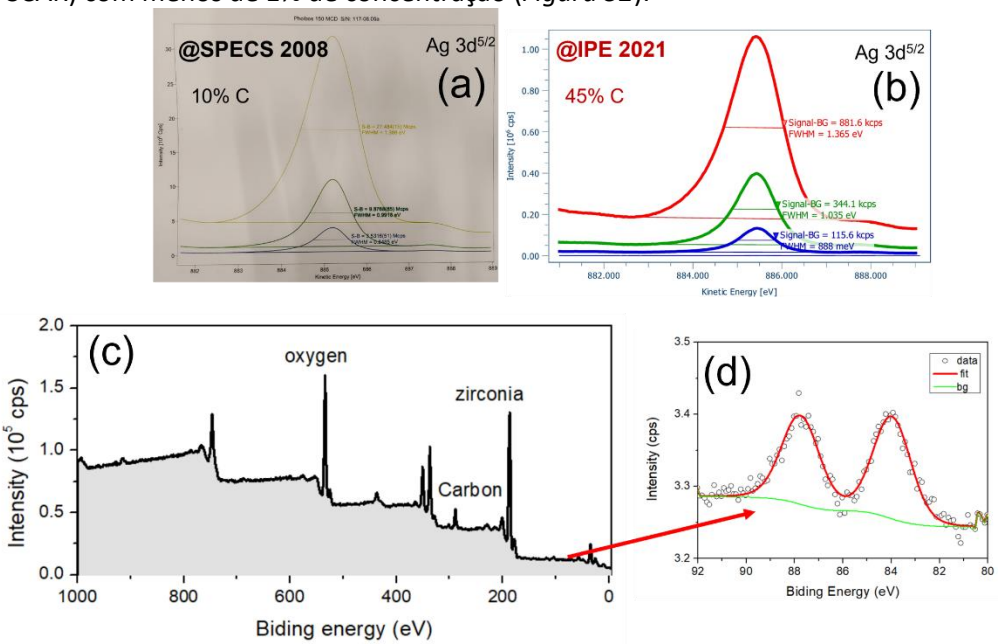


Figura 52 Exemplos de medidas de XPS realizados com a Estação XPS usando uma fonte convencional de raios-X para comissionamento técnico. (a) Espectros de referência de Ag 3d5/2 em comparação com medidas reais (b) mostrando que mantemos a resolução e intensidade.

MOGNO

A montagem da linha MOGNO (microtomografia em alta energia) seguiu com a conclusão da instalação da infraestrutura das cabanas da linha (Figura 54) e com a montagem do sistema ótico da primeira cabana a partir de agosto, agora concluídos. A montagem do sistema ótico de focalização tipo KB foi postergado por um atraso considerável desencadeado devido ao rompimento contratual do fornecedor alemão das multicamadas focalizantes da linha. O problema se originou com dificuldades técnicas e de limitações de recursos humanos da empresa, que se agravaram durante a pandemia. Uma empresa japonesa foi contratada para prosseguir com o trabalho e entregar os espelhos indispensáveis para finalização da linha. A mudança deu certo e os espelhos foram finalizados com sucesso e entregues no final de novembro, agora se encontram aguardando os processos de metrologia, montagem e instalação na nano estação que está prevista para o primeiro semestre de 2022.

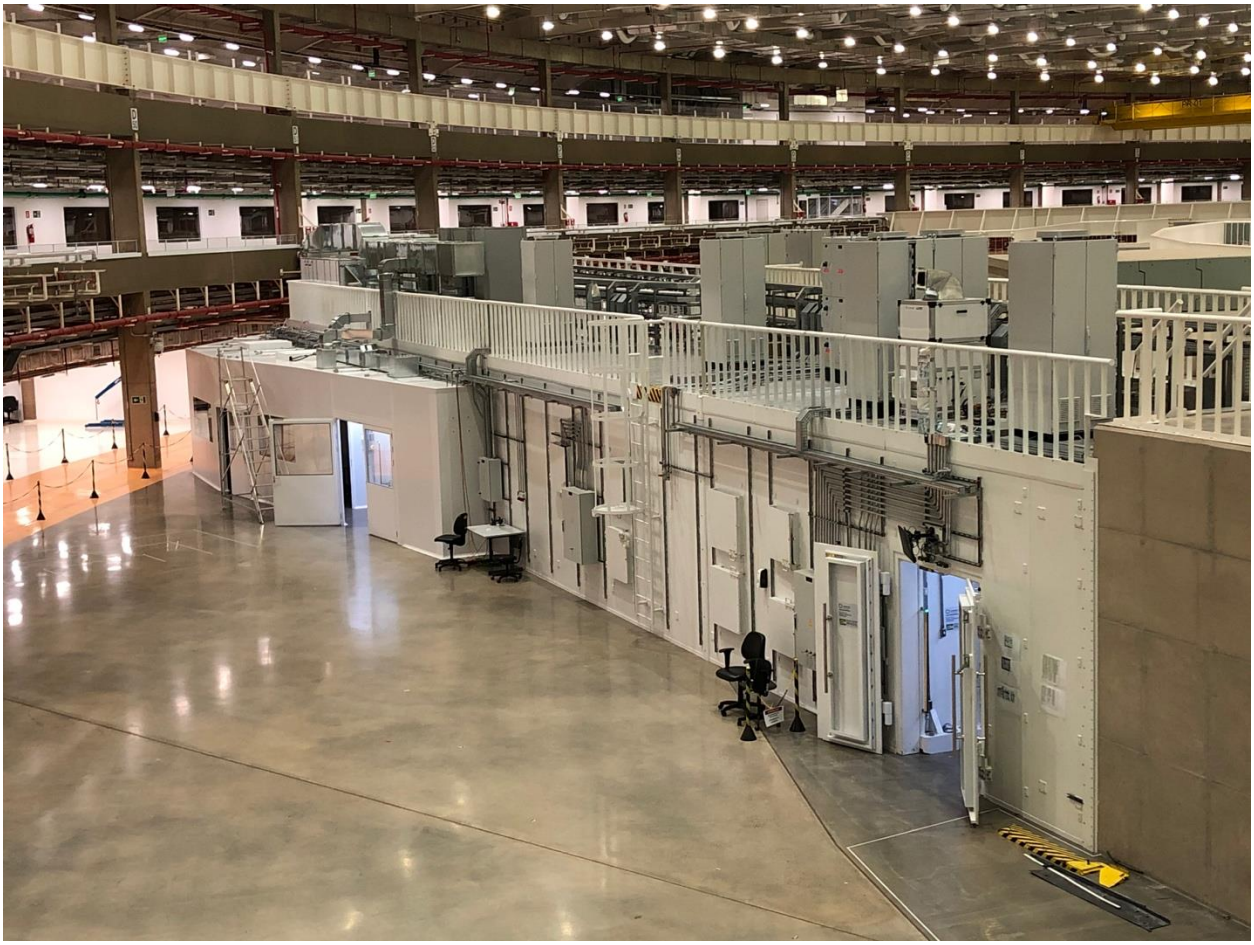


Figura 53 Vista geral das cabanas da linha MOGNO (μ-CT)

Nos últimos meses o projeto de todos os componentes e subsistemas de nano estação foram finalizados e aquisições/contratações encaminhadas. No início de 2022 espera-se receber as últimas peças que faltam para realizar a montagem completa da nano estação, essas as bases de granito vêm da China e sofreram com atrasos do fornecedor e congestionamento nas empresas de frete marítimo devido à pandemia. A nano estação deverá ser operacionalizada ao longo do primeiro semestre de 2022. Adicionalmente, a equipe de projeto já trabalha no desenvolvimento da segunda estação experimental,

chamada de micro estação, ela complementará a capacidade tomográfica da linha permitindo que estudos em diferentes escalas espaciais possam ser aplicadas.

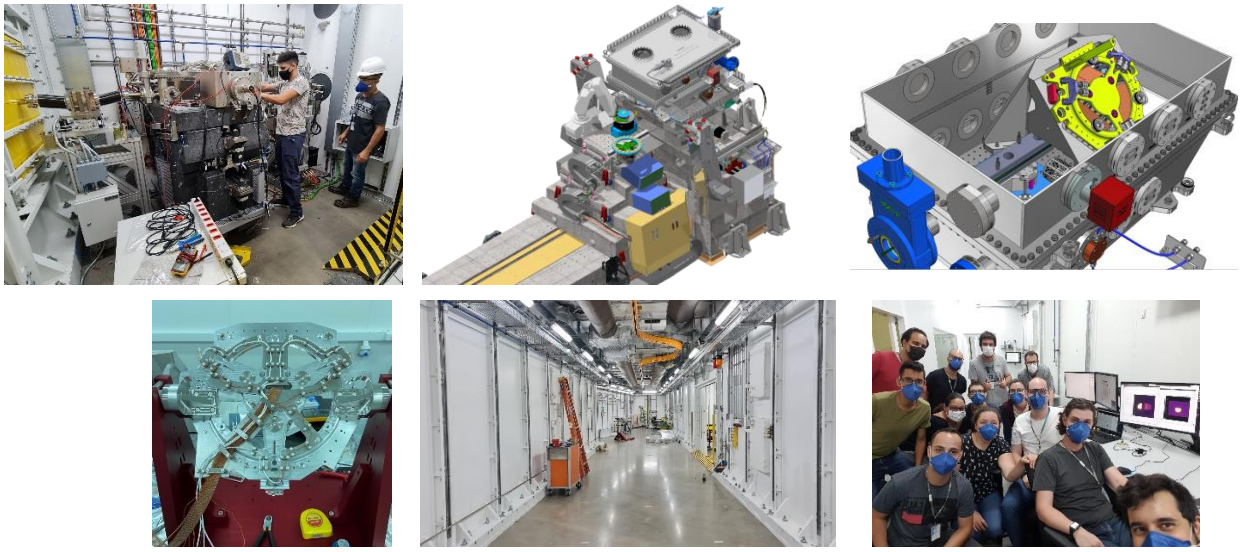


Figura 54 – MOGNO. Do canto superior esquerdo ao inferior direito: (1) técnicos durante etapa final de instalação dos componentes da cabana óptica; (2) visão geral do projeto da nano estação com espelhos KB e sistemas de posicionamento e troca de amostras; (3) vista interna da câmara dos espelhos KB; (4) mecanismo interno em processo de montagem; (5) interior da cabana experimental aguardando o ingresso da nano estação; (6) parte da equipe do projeto durante obtenção do primeiro feixe no ponto de entrada da nano estação.

Laboratórios de Apoio

Dando continuidade a instalação de infraestrutura de laboratórios para preparação de amostras de usuários, foram também iniciadas as instalações de mais 7 laboratórios nas áreas de extensão do prédio do Sirius, vide Tabela 1.

Tabela 1 Resumo do status da construção de laboratórios

LABORATÓRIO OU SALA	INTEGRATED DESIGN	CIVIL ADJUSTMENTS	MECH. UTILITIES	ELECT. UTILITIES	EXHAUST / HVAC	FURNITURE / SPECIAL EQUIPMEI	AVANÇO GERAL
LAM - LABORATÓRIO DE AMOSTRAS MICROSCÓPICAS	100%	100%	100%	100%	100%	90%	98%
LPA - LABORATORIO PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS	100%	100%	80%	80%	60%	70%	82%
LCA - LABORATÓRIO DE CIÊNCIAS AMBIENTAIS	100%	100%	80%	80%	60%	70%	82%
LCRIO - LAB. PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS CRIOGÊNICAS	100%	100%	80%	80%	60%	70%	82%
LCTE / HP1 - LAB. DE ALTAS PRESSÕES 1	100%	100%	80%	80%	60%	70%	82%
LCOC - LAB. CORTE E ORIENTAÇÃO DE CRISTAIS	100%	-	60%	-	-	60%	73%
LMS - LAB. MANIPULAÇÃO DE SÓLIDOS	100%	-	40%	40%	-	60%	60%

De forma geral, todas as áreas do projeto do Sirius (e inclusive de outros síncrotrons do mundo) sofreram com atrasos no fornecimento de componentes e com o aumento de custos de insumos (como o aço) gerados pela pandemia. Entretanto, levando-se em consideração estas dificuldades globais, foi possível manter o projeto Sirius em ritmo relativamente acelerado. Mais recentemente, o gargalo no recebimento de vários destes componentes não tem sido atrelado apenas aos atrasos de fornecedores, mas também à liberação das cotas nacionais de importação. Diversos componentes necessários para continuação das montagens passaram cerca de dois meses aguardando autorização para

coleta/embarque, desviando a conclusão desses laboratórios para o primeiro trimestre de 2022. A exceção foi o Laboratório de Amostras Microscópicas (LAM, Figura 55), que recebeu o microscópio Helios 5 PFIB (*Plasma Focused Ion Beam*) a tempo. Esse equipamento dará suporte a usuários e equipes técnicas para preparação de amostras em escala nanométrica.

Figura 55 – LAM. Vista interna da sala com tratamento acústico com o microscópio FIB em etapa final de instalação.

Laboratório de Condições Termodinâmicas Extremas (LCTE)

O LCTE foi inaugurado em outubro de 2021 junto com outras instalações do LNLS e encontra-se disponível para usuários internos e externos (*Figura 56*). Desde sua abertura este laboratório atendeu 14 propostas em 2021. Dessas, 1 é proveniente de usuários externos. Além disso, dentre as propostas estão os atendimentos vinculados à experimentos científicos nas linhas de luz e aquelas submetidas diretamente ao LCTE. As propostas atendidas englobam preparação e montagem de amostras para experimentos, desenvolvimento de protocolos para medidas em condições extremas e desenvolvimento de instrumentações para experimentos nas linhas de luz (*Figura 57*).

Figura 56 Instalações do LCTE em 2021.

Figura 57 Fotos de usuários e funcionários do LCTE durante a preparação de experimentos.

Em colaboração com outros membros da divisão de matéria condensada foram desenvolvidas várias Instrumentações para experimentos em condições extremas. Dentre elas podemos destacar:

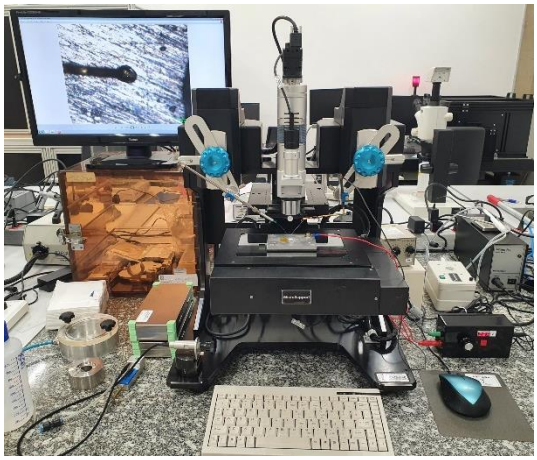
Membranas

Propósito: Aplicação de pressão controlada em células de bigorna de diamante.
Ganho: As membranas são vendidas por uma empresa estrangeira e em uma única configuração. Desenvolver esse sistema aqui é muito importante, pois uma vez dominado o processo podemos trabalhar no desenvolvimento desses sistemas em diferentes tamanhos e materiais, o que possibilita seu uso em células de pressão de outros tamanhos ou compatibilidade com experimentos com aplicação de campo magnético, por exemplo.

Figura 58 À esquerda temos duas representações esquemáticas do funcionamento de membranas para aplicação de pressão em DACs. Quando gás He é injetado na membrana ela expande empurrando o pistão da célula de pressão. A foto à direita mostra 4 membranas produzidas

Solda ponto

Propósito: Soldagem de fios em amostras metálicas volumétricas (cristais) para experimentos de transporte elétrico sob pressão uniaxial aplicada.
Ganho: As amostras estudadas em células de pressão uniaxial possuem tamanho de poucos milímetros. Portanto, sua manipulação e soldagem de contatos elétricos à mão torna-se dificultada. Ter um sistema de solda ponto com controle remoto e micrométrico é muito importante para facilitar a preparação de amostras para experimentos de transporte elétrico. Além disso, ter acoplado um sistema de ajuste da tensão aplicada (fonte) permite soldar fios de diferentes materiais em diferentes tipos de amostra.



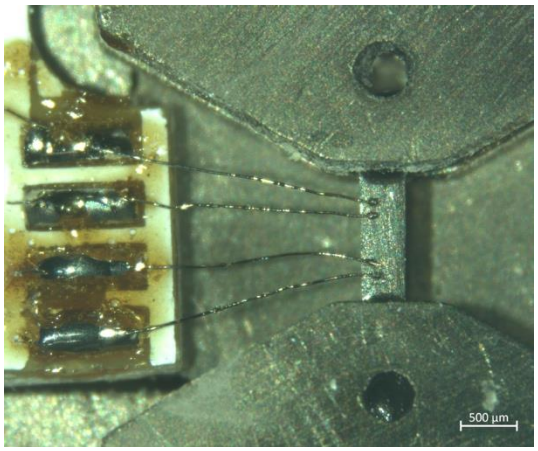


Figura 59 À esquerda está mostrado o sistema de solda ponto. Uma fonte de tensão é acoplada eletricamente a uma agulha metálica que pressiona o fio contra a amostra. Ao aplicar uma descarga elétrica através do circuito, o fio será soldado na amostra. O sistema de

Célula de pressão uniaxial

Propósito: Aplicar pressão uniaxial em amostras volumétricas e na forma de filmes.
Ganho: Células de pressão uniaxial são usadas para comprimir ou esticar amostras. Com essas células é possível realizar medidas de transporte elétrico e experimentos de difração e espectroscopias de raios X. Dessa forma, o usuário pode estudar o comportamento das estruturas eletrônicas e cristalinas do seu material sob pressão uniaxial.

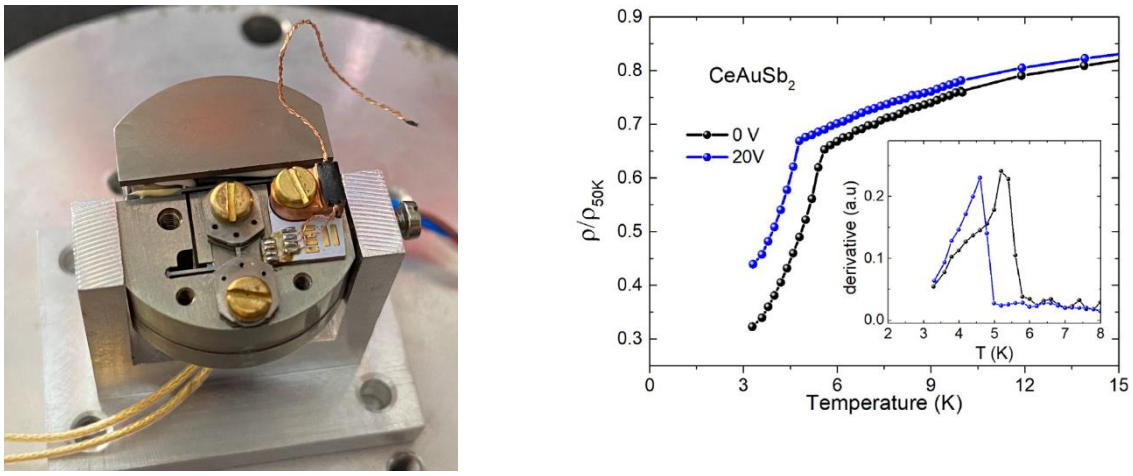


Figura 60 À esquerda está mostrada a foto de uma das células de pressão uniaxial adquiridas pelo grupo. Essa célula é comercial, da Razorbill Instruments. A amostra é montada entre dois eletrodos controlados por um sistema de piezos. Ao aplicar uma tensão os eletrodos se movem, puxando ou comprimindo a amostra. À direita está mostrado um gráfico da resistividade elétrica em função da temperatura de uma amostra de férmion pesado, em que fica evidente o deslocamento de sua transição magnética com a tensão uniaxial aplicada.

Criostatos

Propósito: Resfriamento de amostras para experimentos em temperaturas abaixo de 10 K.
Ganho: Criostatos comerciais, como os que dispomos no LCTE, em geral não são compatíveis com diferentes experimentos ou condições ao mesmo tempo. Para permitir experimentos de difração e espectroscopias na linha de luz EMA juntamente com as condições de campo magnético aplicado, alta pressão e baixa temperatura, adaptamos dois criostatos comerciais (Janis ST-100 e STVP-400). Essas adaptações incluem troca de janelas óticas para compatibilidade com os experimentos e inserção de sistema elétrico para medidas de transporte in-situ. Esse último é importante para aferir a transição elétrica da amostra e garantir que ela está no regime de temperaturas do fenômeno de interesse, por exemplo a supercondutividade. Utilizando L-He em ambos os sistemas é possível atingir temperaturas menores que 10 K em experimentos com feixe luz sincrotron.

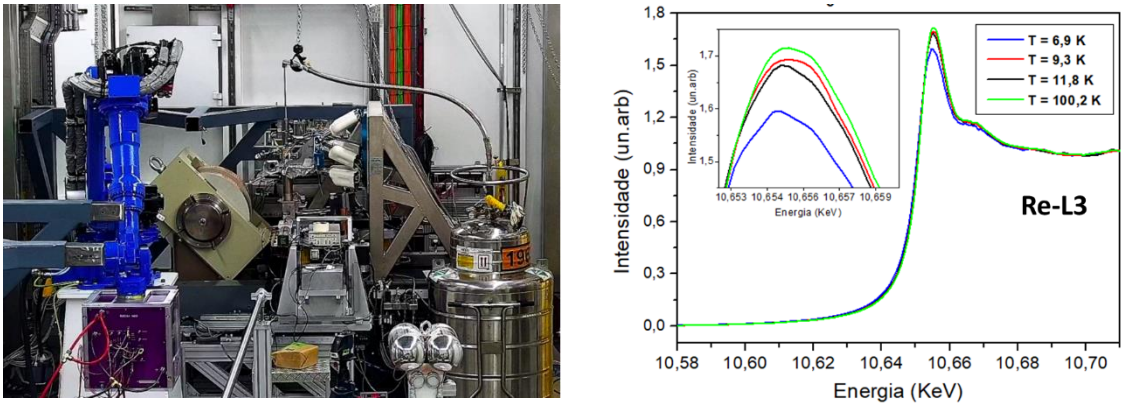


Figura 61 À esquerda é mostrada a montagem experimental para o primeiro experimento com temperaturas criogênicas na linha EMA. À direita está mostrado o resultado de um experimento de espectroscopia XANES realizado em um filme supercondutor de MoRe no setup mostr

Com esse criostato, é possível chegar a 2 K na amostra. Três das 4 janelas de quartzo foram trocadas por kapton para serem compatíveis com experimentos de espectroscopias e as aberturas do shield recobertas com MLI para melhorar a blindagem da radiação externa. Outra grande melhoria consistiu na inserção de um sensor extra no porta-amostra e fios para a medida de resistência elétrica da amostra. Dessa forma foi possível verificar a transição supercondutora de um filme de MoRe, que no criostato anterior não foi possível atingir. Esse criostato de vaporização está passando por alguns testes de comissionamento e será levado para operar na linha EMA nos próximos dias.

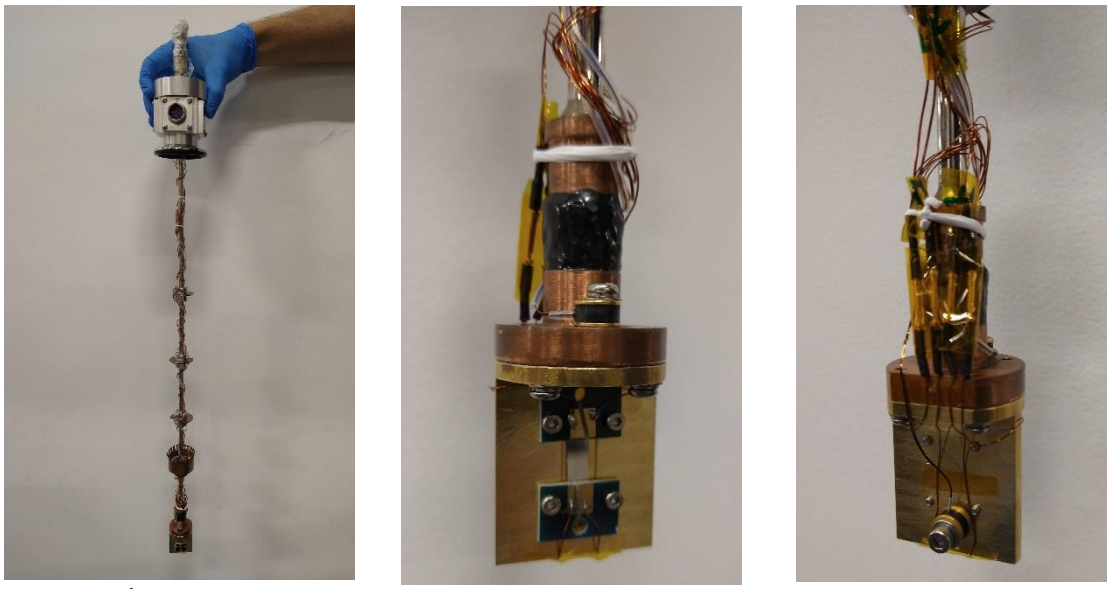


Figura 62 À esquerda o porta-amostra do criostato STVP-400 com conexões elétricas do topo até a amostra. Ao meio a amostra com contatos elétricos e à direita o verso do porta-amostra, evidenciando o sensor adicional e demais conexões elétricas.

Figura 63 Da esquerda para a direita: janela interna e externa revestidas com kapton e por último o lado com a janela original na qual é possível visualizar o MLI que reveste a abertura do shield.

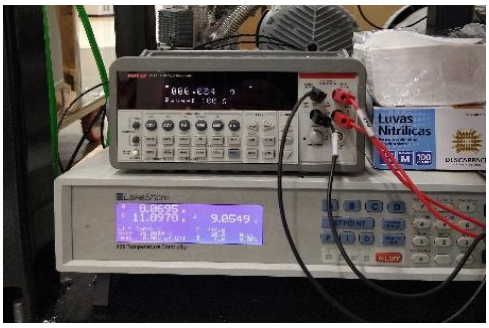
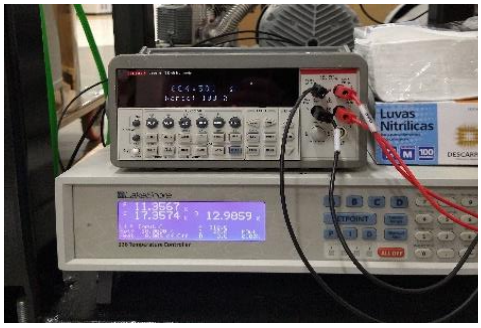



Figura 64 À esquerda a montagem experimental para o comissionamento do criostato STVP-400 após as modificações. À direita é mostrada a queda na resistência elétrica da amostra quando a temperatura cai para abaixo de Tc = 8.9 K.

Laboratório de Crescimento In-Situ (LCIS)

O LCIS foi mais um dos laboratórios inaugurados em 2021 que se encontra aberto para usuários. Além da instalação dos equipamentos, neste ano foram realizados reparos de vários dos instrumentos com o auxílio dos grupos de engenharia do LNLS e ENT, como o laser de alta potência e o microscópio de força atômica. Os demais equipamentos disponíveis neste laboratório como STM, BEM e PLD foram comissionados e calibrados para atendimento de usuários externos.

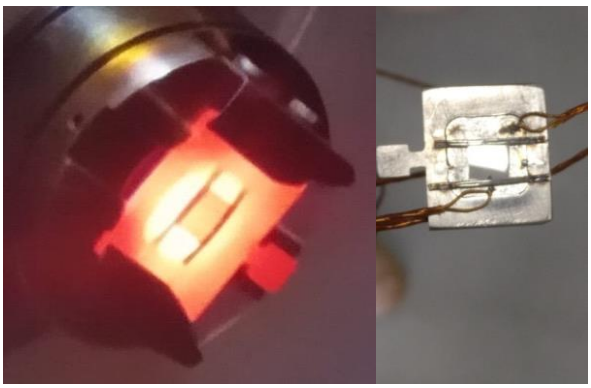


Figura 65 (esq.) Vista geral do laboratório LCIS. (dir) e crescimento de filmente de YBCO por PLD

Descomissionamento do UVX

Devido ao encerramento das atividades de operação do anel UVX do LNLS ao final de 2019, e dadas as incertezas trazidas pela pandemia ao longo de 2020, intensificamos apenas em maio de 2021 a desmontagem técnica das instalações científicas presentes no prédio do antigo anel. Empresas especializadas foram recrutadas para desmantelar essas instalações, segmentando os diversos componentes e subsistemas presentes no local para reaproveitamento em novas instalações do CNPEM, em outras instituições de ensino e pesquisa, para venda por meio de chamadas públicas ou mesmo sucateamento de alguns materiais e equipamentos. Chegamos ao final de 2021 com as antigas linhas de luz e laboratórios de apoio predominantemente desmontados (*Figura 66*) e itens de maior valor agregado realocados no Sirius, restando executar o processo de sucateamento de alguns itens, bem como realizar a triagem de definir a melhor forma de equipamentos, conexões e instrumentação para ultra-alto-vácuo, itens tipicamente com 15 ou 20 anos de uso. Mobilizações semelhantes envolvendo os antigos aceleradores também estão em curso com a participação da divisão de Engenharia e Tecnologia, com previsão de liberação completa do prédio até junho de 2022, um espaço técnico valioso para novas iniciativas no horizonte do CNPEM.

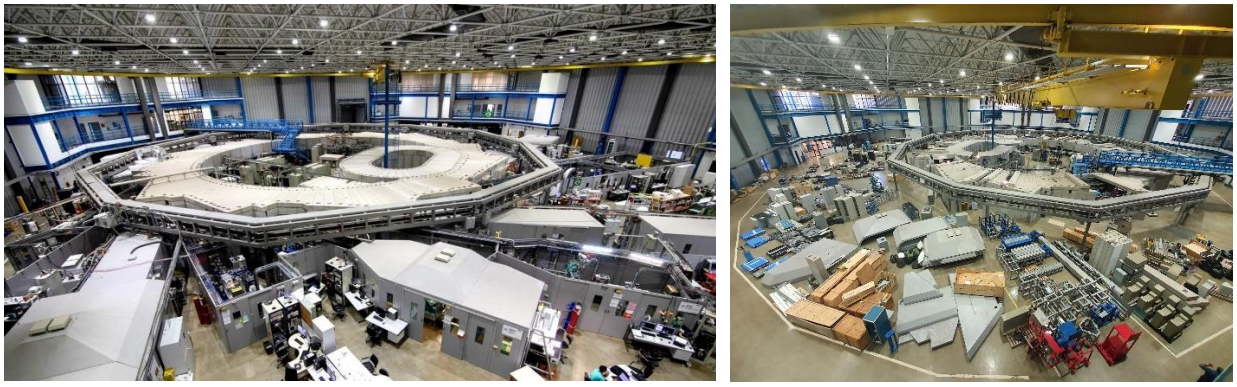


Figura 66 – Uma comparação entre o estado do hall experimental em 2019 antes do encerramento das atividades nas linhas de luz do anel UVX e novembro de 2021, quando as atividades de desmontagem entravam na fase final.

Subsistemas das linhas de luz

Ao longo do primeiro semestre de 2021, vários dos subsistemas foram comissionados nas linhas de luz. Um dos principais destaques foi o comissionamento do HD-DCM, cujos resultados estão sendo apresentados na conferência MEDSI 21. Embora o limitante de medida seja ainda a estabilidade do feixe de elétrons, os resultados obtidos até aqui (Figura 67) indicam uma alta reprodutibilidade e estabilidade em acordo com a especificação de projeto.

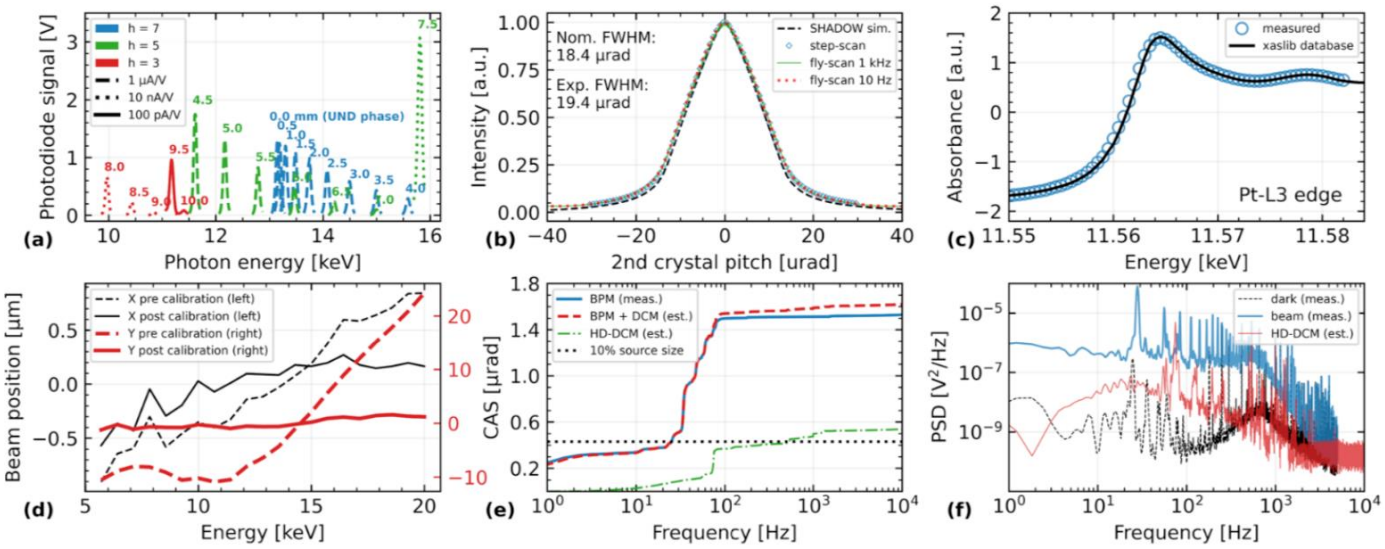


Figura 67 Resultados de comissionamento do HD-DCM (da publicação Geraldes, et. al que será apresentada na MEDSI 21).

Subsistemas de aquisição e processamento de dados

Um destaque para estes subsistemas das linhas de luz do Sirius foram as primeiras imagens dos detectores Mobipix com sensores de CdTe (Figura 68). Este é um sistema projetado para ser móvel, ou seja, um detector de imagem de raios-X compacto e independente de computadores externos para operá-lo e adquirir imagens. Ele possui tecnologia System-on-a-Chip com GPUs que possibilita o controle, aquisição de dados e processamento integrado de imagens. O Mobipix funciona como uma câmera de vídeo inteligente, permitindo a realização de experimentos de imagem e diagnósticos de feixe a uma taxa de quadros da ordem de kiloHertz. O detector é relativamente simples e permite incorporar outros tipos de sensores como os baseados em semicondutores mais pesados. Por exemplo, os sensores de silício normalmente empregados nos detectores de raios-X das linhas de luz de síncrotrons são capazes de detectar raios-X até cerca de 20 keV. Acima destas energias são necessários sensores em elementos químicos mais pesados, como os baseados em CdTe. Estes sensores permitem a imagem com raios-X de altas energias, com alta eficiência e serão empregados na linha MOGNO. A tecnologia do Mobipix está sendo licenciada para a empresa PiTec no presente momento.

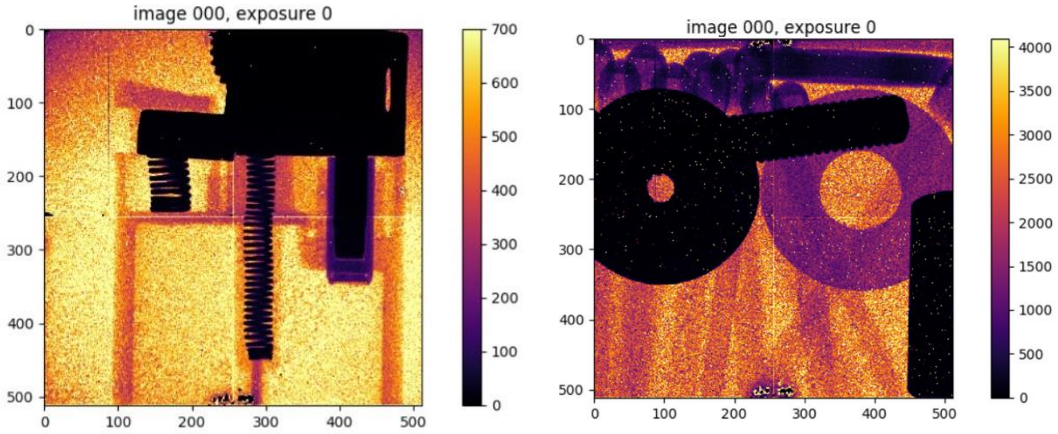


Figura 68 Imagens de raios-X de alta energia obtidas com o Mobipix de CdTe

No ano de 2021 foram entregues diversos detectores PIMEGA para as linhas de luz do Sirius dentro do contrato com a empresa PiTec. O detector da linha SAPUCAIA, PIMEGA-540D # 2, foi entregue e está sob testes de vácuo na sala limpa do laboratório de detectores do Sirius após reparo de diversos problemas detectados por nossos testes de aceitação, como módulos que não funcionaram, sensores que falharam e vazamento do sistema de refrigeração. Para a linha EMA, o detector PIMEGA-540D # 3 foi entregue e instalado no braço robótico da linha de luz Ema. No presente momento está em comissionamento e calibração. A *Figura 69* mostra os primeiros difratogramas de amostra padrão em pó feitas na linha de luz com este detector. Neste sistema foram detectados problemas de oxidação no sistema de refrigeração, que estão sendo solucionados pela empresa.

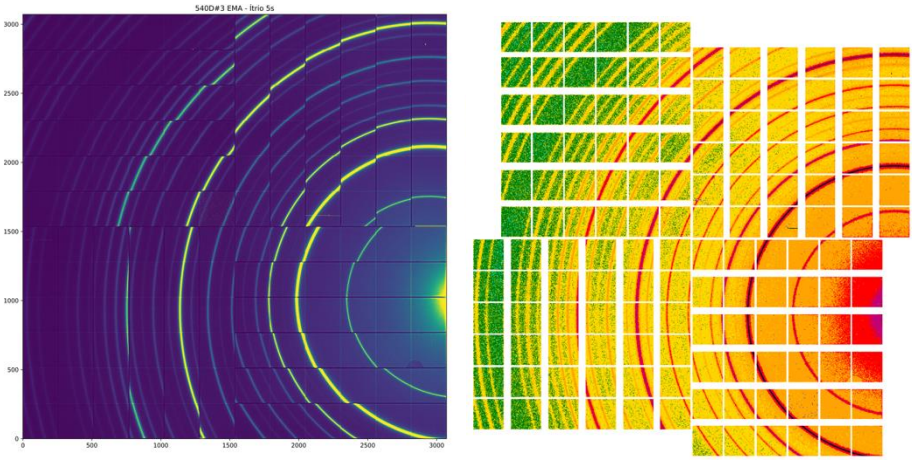


Figura 69 Difratograma obtido com o detector PIMEGA instalado na linha EMA. (Esq) a imagem "raw" e (dir) após as correções geométricas

O sistema da linha PAINEIRA: PIMEGA-450D teve o Hardware mecânico e eletrônico fabricado e o detector está em montagem no laboratório de detectores do Sirius. A entrega deste sistema foi adiada para 2022/02 devido aos lotes de baixo rendimento do fabricante dos sensores. Os próximos passos são montar cabeças de sensores Hexa e testes de software de backend. Um segundo sistema PIMEGA-450DS passou por um redesenho solicitado a PiTec para atender uma geometria diferente da prevista inicialmente e que é mais otimizada para os experimentos com a nova bobina supercondutora que será

instalada na linha. O Design Review foi concluído e a entrega foi adiada para abril de 2022 devido aos lotes de baixo rendimento do fabricante dos sensores. A modificação da geometria visa melhor corresponder aos requisitos de configuração experimental da linha de luz.

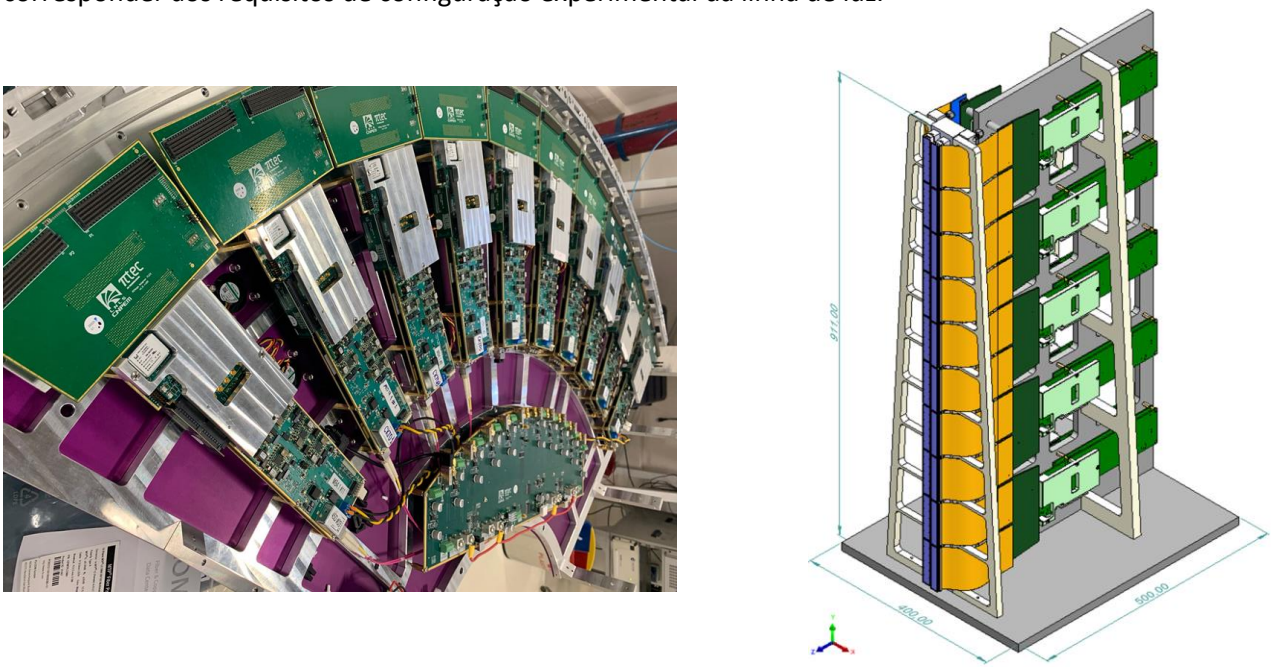


Figura 70 Sistemas PIMEGA-450D. (esq) Detector da linha PAINERIA em montasgem (dir.) reprojeto do sistema da linha EMA para melhor adaptar a geometria da linha.

Para a linha CARNAÚBA foram entregues os detectores PIMEGA-135D # 3 e PIMEGA-135D # 4, e no momento estão sob testes de aceitação na sala limpa do laboratório de detectores do Sirius. O detector novo da linha MANACÁ, PIMEGA-540D # 4, está sendo entregue ainda em dezembro de 2021. Após a fase de testes de montagem final ele passará pelos Testes de Aceitação no início de 2022.

Para o comissionamento de todos estes detectores de forma independente das linhas de luz, em 2021 foi desenvolvida também uma câmara de vácuo, com proteção radiológica suficiente para o comissionamento com raios-X (*Figura 71*).

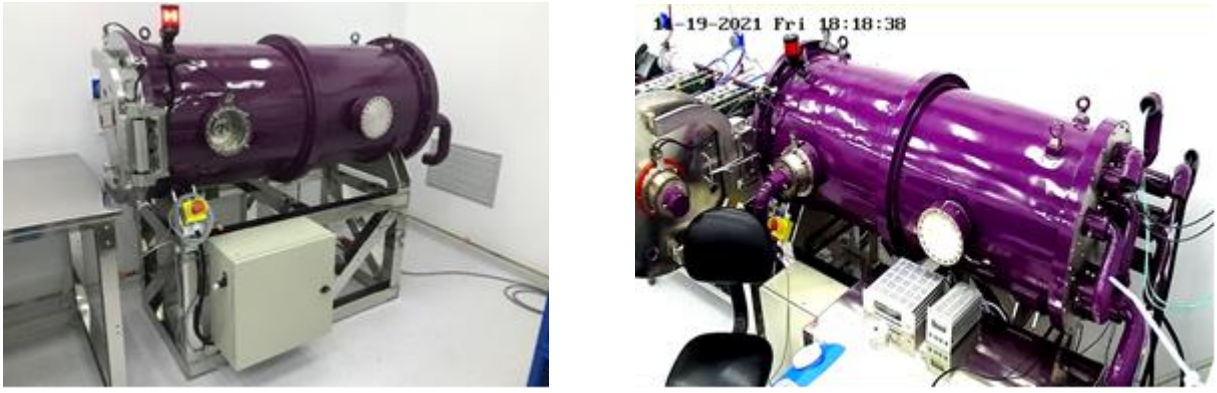


Figura 71 Câmara de Vácuo e RX montada (esquerda) no local de uso na sala limpa do grupo DET no SIRIUS após entregue, com a instalação da proteção, dos controles e intertravamento de segurança. Na direita a câmara sendo usada para calibrações de detectores.

O desenvolvimento de dispositivos de instrumentação eletrônica para atenderem diversas demandas das linhas de luz foi consolidado em 2021. Basicamente são 15 tipos de dispositivos diferentes, que totalizam mais de 350 unidades (boa parte ainda sendo instalados) nas linhas da Fase 1A e 1B. Um dos principais destaques foi o amplificador de corrente de um canal. Temos 75 unidades produzidas com 30 instaladas, com índice de falha próximo de zero. O desempenho deste dispositivo foi competitivo com soluções comerciais, como pode ser visto na Figura 72.

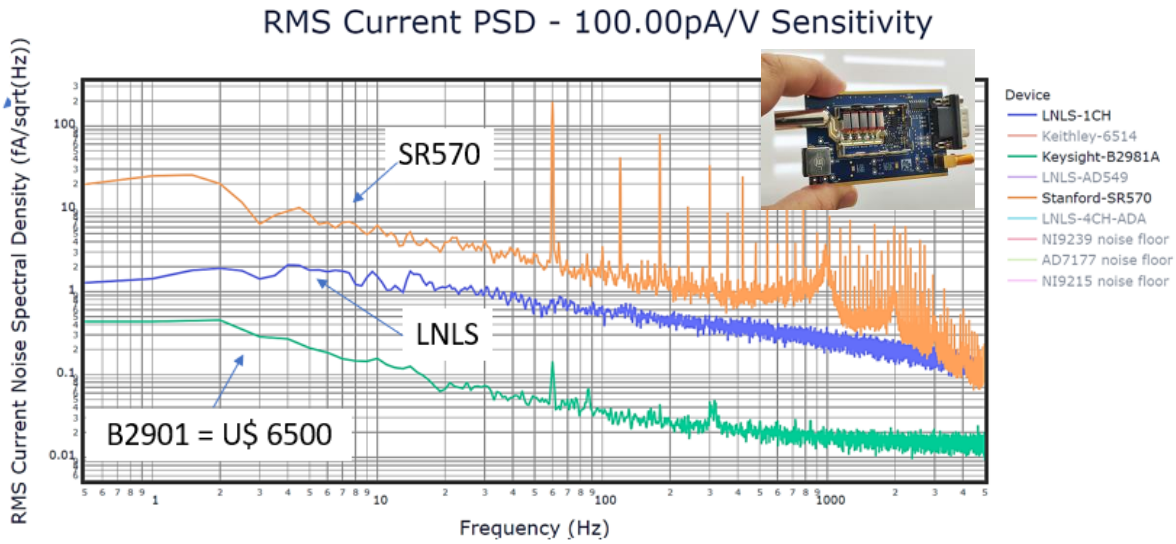


Figura 72 Comparação entre o espectro de ruído do amplificador de corrente desenvolvido no LNLS para as linhas de luz do Sirius e duas soluções comerciais.

Outro destaque é o picoamperímetro de 4 canais já com conversores AD embarcados e comunicação Ethernet que permite leituras de corrente em dispositivos como monitores de posição. Dois protótipos foram testados e o projeto da versão final está próximo de ser concluído.

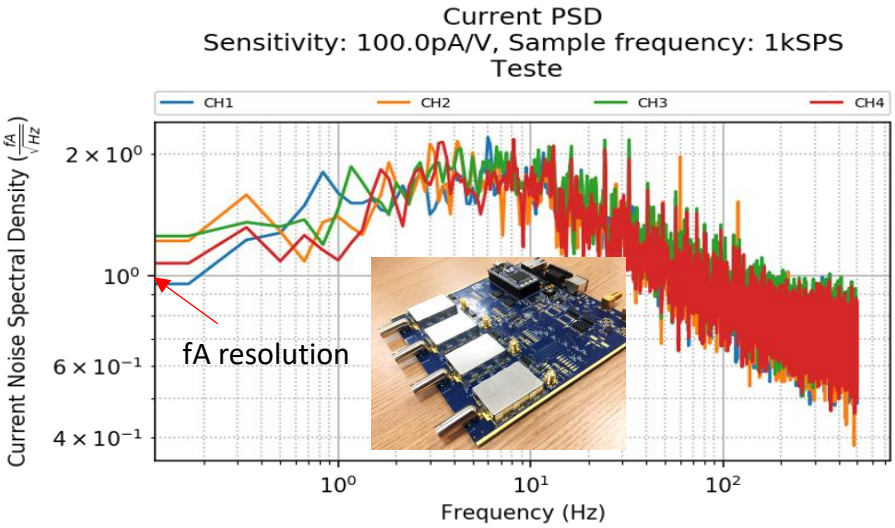


Figura 73 Espectro de ruído do sistema de leitura de baixas correntes em de quatro canais.

Considerando a sincronização de todos os sinais de aquisição e monitoramento de dados, o sistema TATU (*Time and Trigger UnIt*) foi desenvolvido no LNLS para cumprir esta função aproveitando um recurso de hardware já disponível em cada cabana de linha de luz, os controladores CompactRIO. O TATU usa tecnologia FPGA e a solução é flexível o suficiente para combinar sinais de entrada e saída a 30 KHz, muito superior à taxa de aquisição dos detectores de raio-X. Na Carnaúba, por exemplo, o Tatu tem sido usado para produzir 500 pulsos de µs para escanear 10.000 pontos em uma área de 80 µm x 80 µm, em 30 segundos.

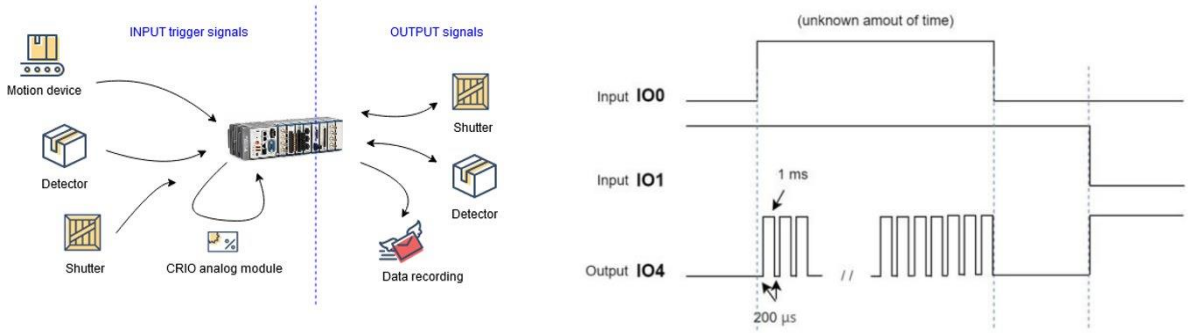


Figura 74 Sistema TATU embarcado nos controladores CRIO para sincronização de sinais de trigger e aquisição de dados.

À medida que os dados das linhas são gerados nos detectores, diversas operações matemáticas de pré-processamento de dados e realinhamento das imagens adquiridas são necessárias, por exemplo para correção de efeitos como instabilidades do feixe de raios-X. Em 2021 foram desenvolvidos vários destes algoritmos de pré-processamento e implementadas para uso nas linhas do Sirius. Dois destaques deste tipo de algoritmo são apresentados na Figura 75.

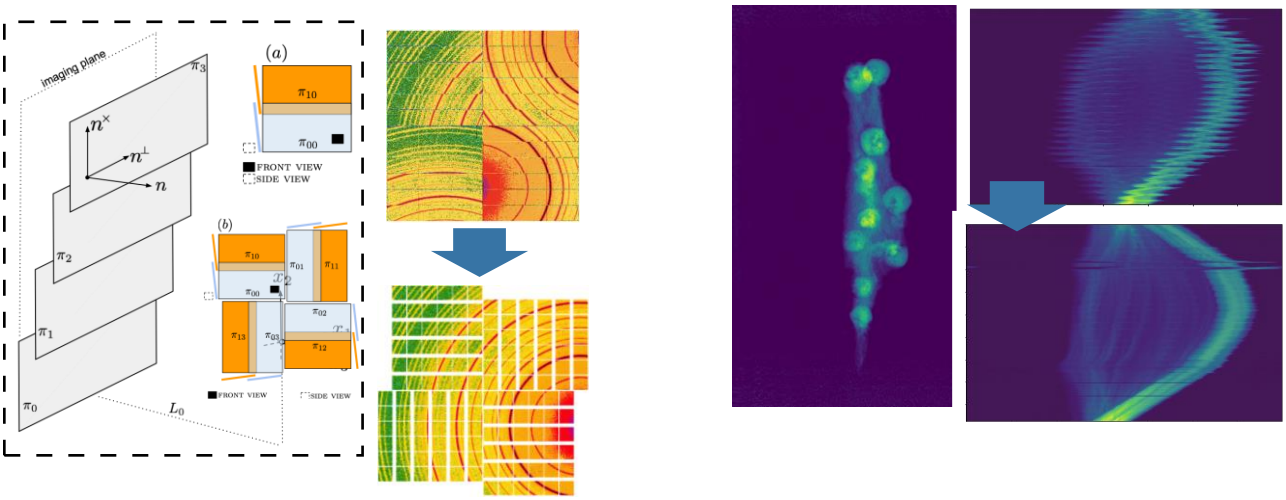


Figura 75 (esq.) Correções de alinhamento dos dados de detectores PIMEGA em experimentos de difração de pó. (dir.) Correções de sinogramas para compensação do movimento do feixe de elétrons durante a aquisição de imagens 3D na CATERETE.

Outro destaque dentro das atividades de computação científica foram as melhorias feitas na interface do sistema de renderização INDEX em colaboração com a empresa NVIDIA. Os resultados deste sistema estão presentes nas imagens 3D deste relatório.

Ao final da cadeia de aquisição e processamento de dados encontra-se o TEPUI (***T**hroughput **E**nhanced **P**rocessing **UnI**t*), a infraestrutura de computação de alto desempenho (HPC) do Sirius. Em 2021, além da continuidade dos trabalhos de implementação de servidores do TEPUI, foram dedicados muitos esforços em se criar e implementar uma política de uso dos recursos computacionais compartilhados, tanto de processamento quanto de armazenamento de dados (Figura 76). Estas políticas foram amplamente debatidas com os usuários do CNPEM de forma a encontrar soluções que permitissem um compartilhamento eficiente de recursos. A nota técnica referente a esta política foi distribuída para todos os usuários internos e externos.

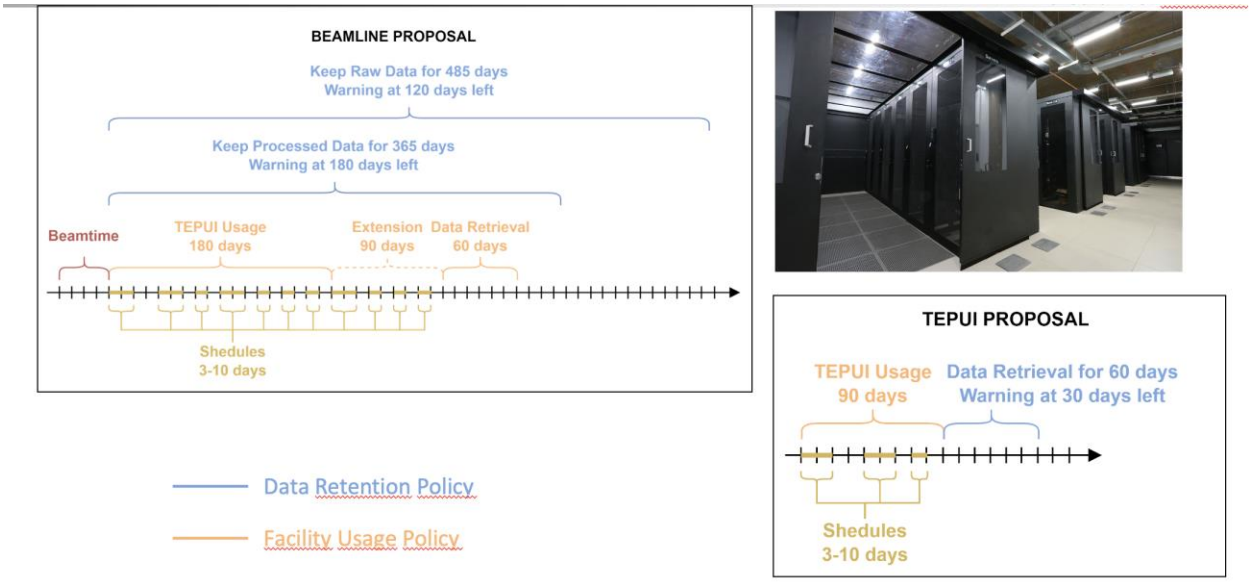


Figura 76 Representação gráfica das políticas de retenção de dados.

Na nova política são definidas cotas de armazenamento para linhas de luz e laboratórios de apoio, uma vez que a capacidade de armazenamento de dados é limitada. Ao fim do período de retenção o usuário fica responsável por recuperar seus dados e armazená-los na sua instituição de origem. Neste momento ainda não temos um sistema de arquivamento de dados ou política de backup em vigor. No que diz respeito ao uso do sistema de HPC, o tempo concedido por proposta depende se ela está ou não vinculada a tempo de linha de luz.

1.2. Pesquisa e Desenvolvimento in-house

Materiais Biológicos

As nanopartículas são consideradas uma das estratégias mais promissoras para aumentar significativamente a eficácia da entrega de drogas. No entanto, sua transposição às clínicas e hospitais tem sido parcialmente impedida devido as interações inespecíficas que ocorrem entre essas partículas sintetizadas e os componentes biológicos. Entre esse componentes, as proteínas desempenham um papel fundamental, uma vez que elas adsorvem espontaneamente nas nanopartículas e afetam sua estabilidade coloidal e capacidade de direcionamento. Dessa forma, o tamanho, densidade, composição e orientação da camada de proteína, chamada coroa de proteína, governam o destino das nanopartículas no corpo do paciente e dita sua interação com as células e órgãos alvo. Embora essa camada protéica (coroa de

proteínas) já tenha sido amplamente estudada, a robustez dos métodos de caracterização mais empregados bem como a visualização de suas frações não marcadas ainda precisa passar por desenvolvimento e validação. Neste trabalho publicado na revista *Nano Latters*[1], pesquisadores do LNLS utilizaram espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS) para monitorar a formação da corona e estimar os parâmetros de ligação entre as proteínas e as partículas. Complementarmente, a microscopia eletrônica de transmissão sob condições criogênicas associadas ao processamento de imagem de correlação cruzada e microscopia eletrônica de transmissão filtrada por energia realizada em colaboração com pesquisadores do LNNano permitiu determinar a morfologia e a espessura da coroa da proteínas juntamente com a visualização de suas frações não marcadas. A estratégia descrita acima demostra um enorme potencial para decifrar aspectos fundamentais da coroa de proteínas e pode contribuir para o desenvolvimento racional de nanopartículas para o uso médico.

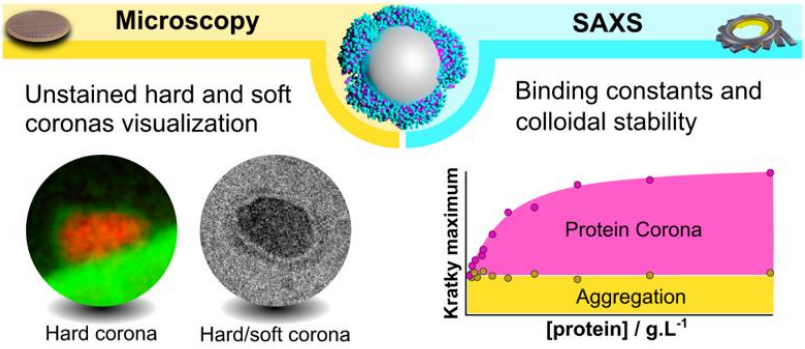


Figura 77 Esquema experimental que mostra os resultados de microscopia à esquerda onde uma camada de proteínas pode ser visualizada ao redor das nanopartículas (vermelho e cinza escuro) e à direita onde os dados de SAXS permitiram uma diferenciação entre a formaç

A maioria dos medicamentos baseados em nanopartículas são preparados e armazenados em suspensões aquosas onde estão propensos a hidrólise, dissolução, fusão de nanopartículas, liberação prematura de droga e desnaturação de biomoléculas conjugadas. A secagem após congelamento rápido, também conhecida como liofilização, é uma estratégia eficiente para evitar esses efeitos prejudiciais e manter as propriedades das nanoformulações. Este processo remove a água do sistema e produz sólidos que podem ser facilmente manuseados e transportados. No entanto, o processo de liofilização pode induzir efeitos indesejáveis devido a tensões distintas durante as etapas de congelamento e secagem. Neste trabalho[2], a albumina de soro bovino (BSA) foi descrita como um excelente protetor para nanopartículas de sílica (SNP) durante a liofilização e os complexos SNP-BSA resultaram em estruturas sólidas com excelente redispersibilidade ("solubilização") mesmo quando tempos de armazenamento mais longos são considerados. Os pesquisadores do CNPEM demonstraram experimentalmente que a agregação massiva do complexos SNP-BSA pode ser evitada quando uma camada de BSA é formada ao redor das SNP antes do processo de liofilização. Além disso, essa camada de BSA é capaz de evitar interações inespecíficas entre essas nanopartículas e os sistemas biológicos, como evidenciado pela ausência de citotoxicidade

1 Galdino, F.E. ; Picco, A.S. ; Capeletti, L.B. ; Bettini, J. ; Cardoso, M.B. . Inside the Protein Corona: From Binding Parameters to Unstained Hard and Soft Coronas Visualization. *Nano Letters*, v. 21, p. 8250, 2021

2 Picco, A.S. ; Mondo, G.B. ; Ferreira, L.F. ; de Souza, E.E. ; Peroni, L.A. ; Cardoso, M. B. Protein Corona Meets Freeze-Drying: Overcoming the Challenges of Colloidal Stability, Toxicity, and Opsonin Adsorption. *Nanoscale*, v. 13, p. 753, 2021.

residual, atividade hemolítica e adsorção de opsonina. Dessa forma, o recobrimento de nanopartículas com BSA pode e deve ser seriamente considerado pela indústria farmacêutica uma vez que gera nanoformulações sólidas e redispersáveis com biocompatibilidade avançada.

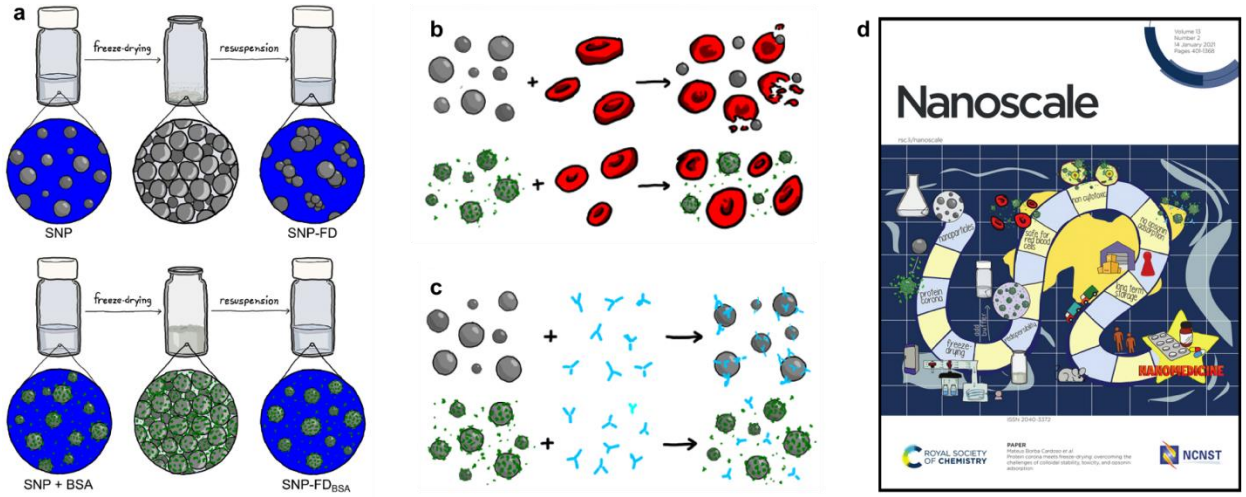


Figura 78 a) Esquema experimental que mostra o processo de secagem e ressuspensão das nanopartículas de sílica na ausência e na presença das proteínas. Ilustração esquemática da interação das nanopartículas recobertas e não recobertas com proteínas e b) glóbulos

Em paralelo aos mecanismos mais básicos de direcionamento de nanopartículas, os pesquisadores do LNLS também têm trabalho no desenvolvimento de sistemas biocompatíves de alta capacidade de incorporação de drogas. Em um outro trabalho foi investigada a influência estrutural sofrida por nanopartículas de cubossomos devido a presença de miltefosina (HePC). A miltefosina vem sendo amplamente utilizada no tratamento de alguns tipos de cânceres, como o de mama por exemplo. Além dessa aplicação como quimioterápico, a HePC também pode atuar contra outras doenças, como evidenciado recentemente conta a Leishmaniose. Uma das grandes limitações de se ministrar a HePC em humanos se dá através dos seus efeitos colaterais, pois os pacientes relatam dores abdominais severas quando estão sendo tratadas com HePC por via oral. Neste trabalho[3], os pesquisadores do LNLS colocaram a HePC dentro de nanopartículas, chamadas de cubossomos, com o intuito de gerar um sistema capaz de diminuir os efeitos colaterais causadas pelo fármaco. Para elucidar o efeito da HePC nas nanopartículas, os pesquisadores utilizaram a técnica de espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS). Com isso, esse estudo mostrou que a HePC se localiza nas paredes internas dos cubossomos, alterando pouco a sua morfologia original. Também foi possível quantificar um alto percentual de HePC encapsulada nas nanopartículas. Dessa forma, este trabalho abre novas portas para a utilização dos cubossomos como veículos carregadores de HePC com possibilidade de mitigação de efeitos secundários do fármaco.

3 MALHEIROS, BARBARA ; CASTRO, RAPHAEL DIAS DE ; LOTIERZO, MAYRA C. ; CASADEI, BRUNA R. ; MARIANI, Paolo ; Barbosa, Leandro R.S. . Influence of hexadecylphosphocholine (Miltefosine) in phytantriol-based cubosomes: a structural investigation. *Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects*, DOI: https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2021.127720

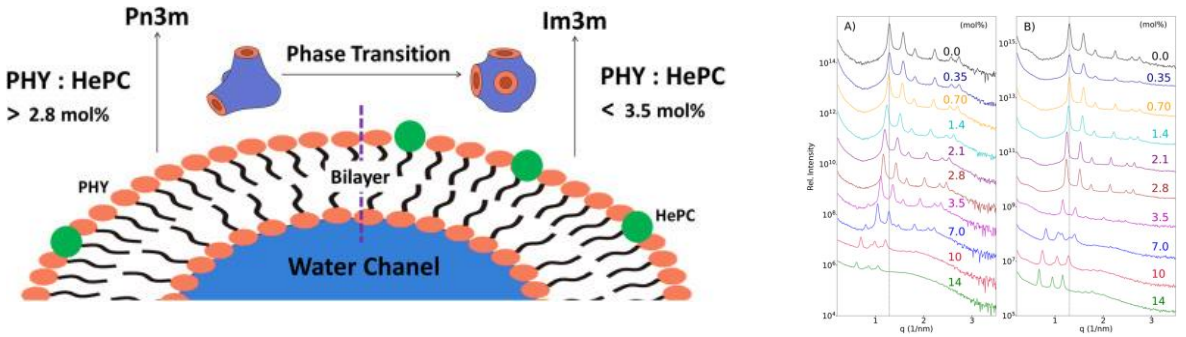


Figura 79Representação esquemática da interação da miltefosina (verde) com a membrana da bicamada de cubossomos de fitantriol (laranja). À direta temos as curvas de espalhamento de raios-X a baixos ângulos dos sistemas que estudamos.

A doença de Alzheimer (DA) é responsável por cerca de 70% das doenças neurodegenerativas e é uma causa de declínio cognitivo e morte para um terço dos idosos. Atualmente, a DA é subdiagnosticada e não pode ser evitada com eficácia. A agregação de proteínas do tipo amilóide (Aβ) tem sido associada ao desenvolvimento de DA, e foi estabelecido que, em condições patológicas, as proteínas Aβ sofrem alterações estruturais para formar estruturas secundárias de folhas-beta que são consideradas neurotóxicas. Numerosos estudos *in vitro* forneceram informações detalhadas sobre os polimorfos amilóides; no entanto, pouco se sabe sobre como os agregados enriquecidos em folhas de amilóide podem causar neurotoxicidade em ambientes relevantes. Na colaboração entre os laboratórios LNLS, Max IV, Soleil e a Universidade de Lund, pesquisadores utilizaram microscopia ótica de campo próximo de varredura do tipo espalhamento (s-SNOM) para estudar estruturas amilóides em nanoescala, em neurônios individuais. Especificamente, o estudo[4] mostrou que em sistemas bem validados, a s-SNOM pode detectar estruturas de folha-beta de amilóide com resolução espacial nanométrica em neurônios individuais. Este é um estudo de prova de conceito para demonstrar que s-SNOM pode ser usado para detectar estruturas de Aβ em superfícies de células em nanoescala. Além disso, este estudo teve como objetivo aumentar a consciência dos neurobiologistas sobre o potencial do s-SNOM e da espectroscopia de infravermelho como uma ferramenta para analisar estruturas de folha-beta de amilóide em nanoescala em neurônios, sem a necessidade de imunomarcação.

4 R. O. Freitas, A. Cernescu, A. Engdahl, A. Paulus, J. E. Levandoski, I. Martinsson, E. Hebisch, C. Sandt, G. K. Gouras, C. N. Prinz, T. Deierborg, F. Borondics, O. Klementieva, Cells **2021**, 10, 2559.

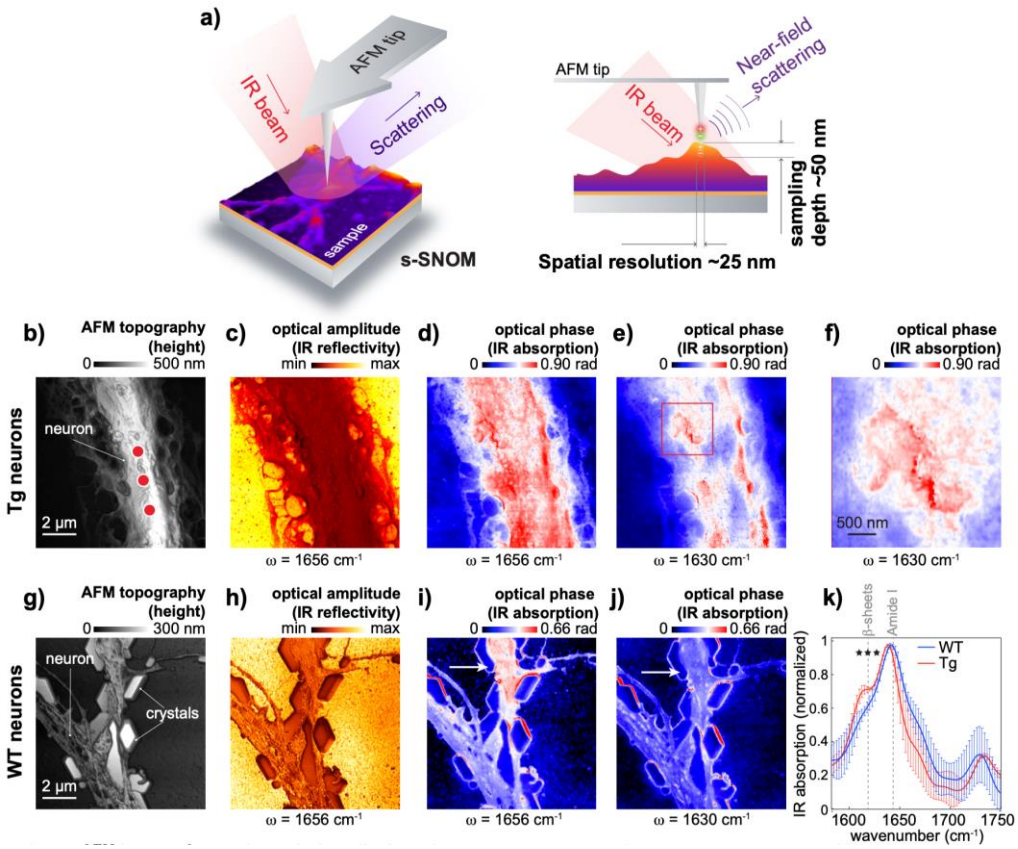


Figura 80 - Nanoimagem e nanoospectroscopia de microscopia ótica de campo próximo de varredura do tipo espalhamento (s-SNOM). (a) Diagrama esquemático do princípio de funcionamento, profundidade de penetração e resolução lateral nanométrica. (b – f) imagens s-SNOM de neurônios transgênicos APP/PS1 individuais cultivados no substrato de Au. (b) Topografia AFM de neurônios individuais com indicação de locais de aquisição de espectros pontuais.(c-f) imagens de refletividade e fase óptica (absorção de IR) correspondentes adquiridas em 1656 cm^{-1}, 1630 cm^{-1} e zoom digital da área indicada pelo quadrado vermelho (e) para destacar a resposta de amilóides na superfície neuronal. (g-j) Imagens s-SNOM de neurônios de tipo selvagem. (g) topografia AFM 10 × 10 μm^2 de neurônios individuais, seguido pela imagem de refletividade (h) correspondente e imagens de fase óptica (i,j) adquiridas em 1656 cm^{-1}, 1630 cm^{-1}. (k) Média e normalizada de medidas de nano-FTIR registradas a partir de neurônios transgênicos APP/PS1 (vermelho) e tipo selvagem (azul). As linhas tracejadas verticais indicam ombros espectrais em torno de 1656 cm^{-1}, 1630 cm^{-1} e 1740 cm^{-1}.

Materiais Funcionais

Os destaques em materiais funcionais, projetados para cumprir funções específicas, mostram como as vantagens de experimentos *in-situ*, ainda feitos no UVX, para o desenvolvimento de baterias e catalisadores mais eficientes.

Estrutura Atômica de Baterias de Li-O2 em condições de operação

Baterias Li-O2 ou Li-ar possuem uma capacidade de armazenamento quase 5 vezes maior do que baterias tradicionais de íons de lítio e uma densidade energética semelhante à da gasolina. Estes

dispositivos são compostos de um eletrodo de lítio metálico, um eletrólito e um eletrodo poroso que adsorve oxigênio. Durante a descarga, o lítio metálico (ânodo) é oxidado formando íons Li+ que por sua vez são conduzidos através do eletrólito até o cátodo onde a reação com o oxigênio ocorre. Durante a carga há liberação de oxigênio, revertendo o processo (Figura 81). No trabalho publicado na revista Applied Materials and Interfaces, os pesquisadores do *Avanced Energy Storage Division, Laboratory of Advanced Batteries* (LAB), Centro de Inovação em Novas Energias, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) em colaboração com o LNLS acompanharam as mudanças estruturais de bateriais de Li-ar usando difração de raios-X em condições operando.

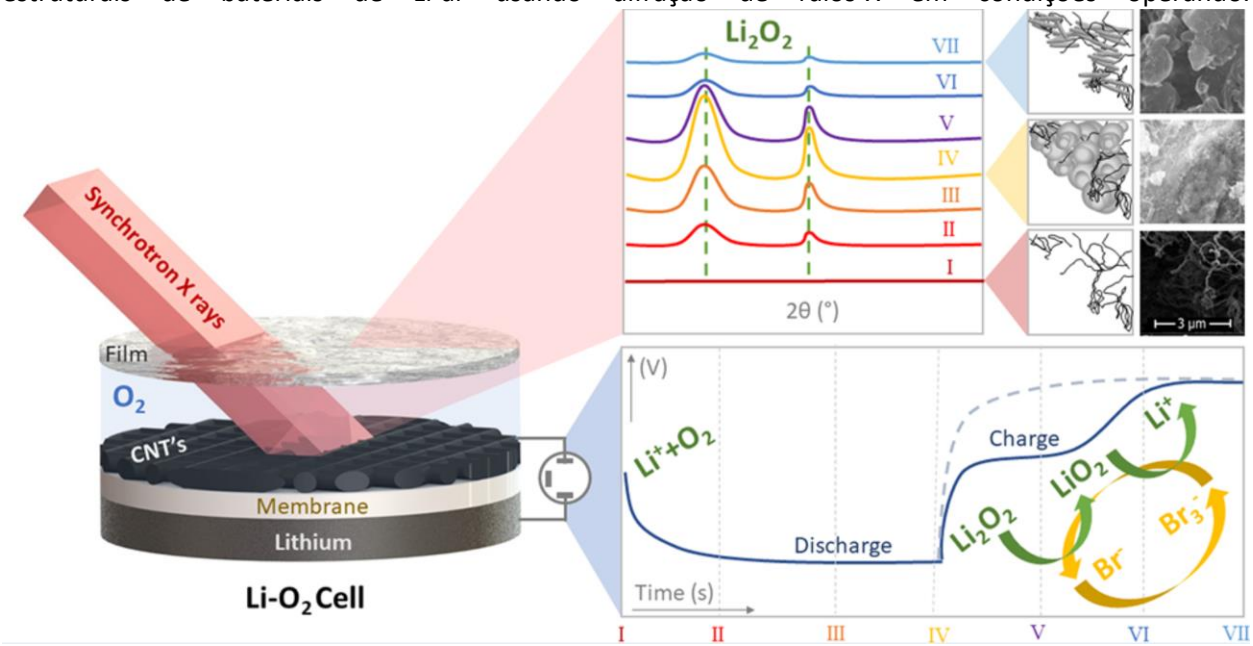


Figura 81 Mudanças estruturais observadas por experimentos in-situ nas baterias de Li-O

Acompanhando a síntese de Zeólitas

Zeólitas são aliminosilicatos com uma rede cristalina de nano, micro e mesoporos que varia dependendo da topologia. Zeólitas possuem várias aplicações na indústria, em particular na área de catálise, e podem ser usados como adsorventes em processos de purificação de água e em nanomedicina. A estrutura, tamanho e rede de poros das zeólitas têm relação direta com suas propriedades, definindo seu desempenho e eficiência nas diferentes aplicações. O controle dos parâmetros de síntese desses materiais possibilita ajuste de suas propriedades com eficiência.

Neste trabalho[5], os mecanismos de nucleação e crescimento da zeólita pura sílica HPM-1 foram desvendados. Cientistas do CNPEM e da UFRN usaram a linha de luz de SAXS do UVX e microscopia eletrônica para estudar a síntese da zeólita HPM-1. Os resultados revelam um mecanismo não clássico de formação de zeólitas, demonstrando a existência de espécies intermediárias com superfície porosa. Esses estudos permitem aprofundar o conhecimento das rotas de síntese para um melhor controle de suas propriedades catalíticas.

5 Vinaches, P.; Meneau, F.; Pergher, S. B. C. *Microporous Mesoporous Mater*. **2021**, 315, 110893.

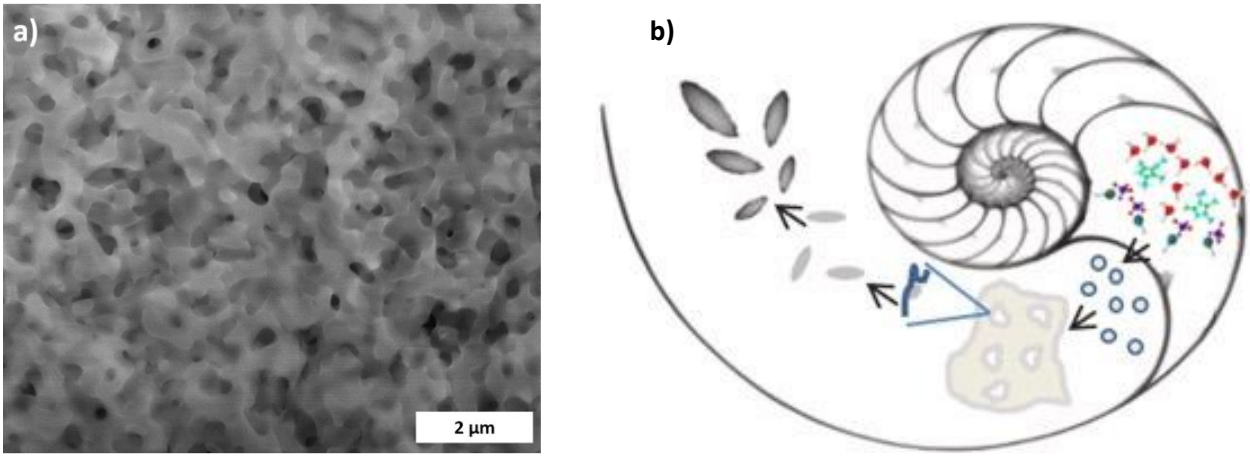


Figura 82 Imagem de microscopia eletrônica de varredura mostrando a superfície porosa da espécie intermediária durante a síntese da zeólita HPM-1. b) Esquema ilustrando o mecanismo de síntese de quatro etapas com base nas diferentes populações de nanopartículas.

Materiais Nanofotônicos

O estudo do confinamento de luz na nanoescala em cristais bidimensionais, ou simplesmente cristais 2D, tem ganhado muita força ultimamente. Isso porque esses cristais, que são atomicamente finos, podem ser integrados as circuitos eletrônicos e eletro-ópticos, permitindo uma diminuição dos componentes que compõe muito das tecnologias atuais. Entretanto, a atividade desses materiais pode ocorrer em um espectro de energia muito largo, exigindo assim, a utilização de fontes brilhantes de banda-larga. Recentemente, pesquisadores do LNLS e da Unicamp, reforçaram em um artigo[6] o papel da Nanospectroscopia em Infravermelho como uma técnica crucial para o estudo de confinamento de luz em materiais 2D. Nessa técnica, o feixe de luz sincrotron é combinado com métodos de interferometria e microscopia de força atômica. O resultado dessa combinação é uma técnica capaz de resolver campos eletromagnéticos confinados muito além do limite da difração. O estudo ainda indica que simulações numéricas podem ser utilizadas para garantir uma interpretação física dos fenômenos na nanoescala, permitindo um acesso completo às propriedades da luz em cristais 2D.

6 R. A. Mayer, F. H. Feres, R. O. Freitas, in 2021 Sbfot. Int. Opt. Photonics Conf. (Sbfot. IOPC), IEEE, 2021, pp. 1–6.

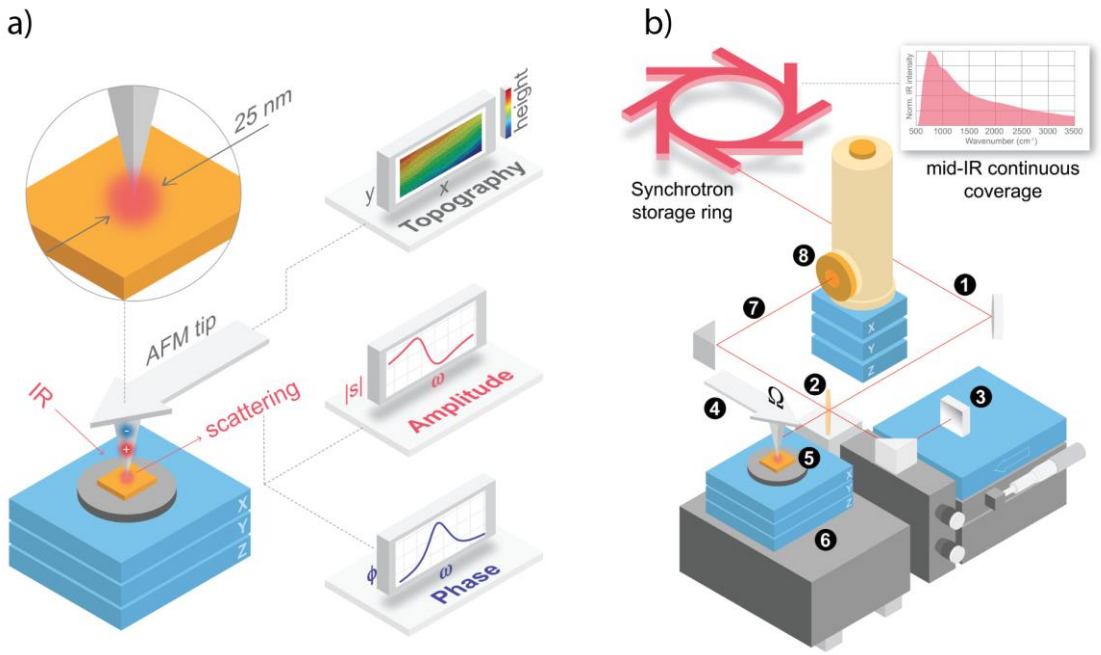


Figura 83 – (a) s-SNOM combina microscopia IR e AFM. A ponta atua como uma antena confinando os campos incidentes no ápice da ponta, criando uma nanossonda de ~25 nm. A topografia e a resposta dielétrica complexa locais são medidas simultaneamente nesta técnica. (b) Experiência de nanospectroscopia de infravermelho síncrotron (nano-FTIR). A radiação IR de banda larga do síncrotron (1) entra em um interferômetro de Michelson assimétrico cujo divisor de feixe (2) divide o feixe em dois braços: espelho de referência (3) e estágio de amostra de ponta (4,5,6), cujos feixes retroespalhados são recombinados após o divisor de feixe e entregue (7) ao detector de infravermelho (8).

Ainda no contexto de aplicações tecnológicas, o confinamento de luz em dispositivos nanométricos é um dos grandes desafios da fotônica e sua promessa de uma computação mais rápida e com menor consumo energético. No artigo[7], os pesquisadores do CNPEM e colaboradores do Brasil e exterior estudaram o confinamento de ondas longas de infravermelho (IR) em nanofitas de óxido de estanho (SnO_2). Foram combinados experimentos de Nanoespectroscopia de IR realizados nas fontes de luz síncrotron UVX, do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), e ALS, do *Lawrence Berkeley National Laboratory* (EUA), e no laser de elétrons livres do *Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf* (Alemanha). O conjunto de experimentos, além de teoria e simulações numéricas, confirmou que nanofitas de SnO_2 são uma excelente plataforma nanofotônica para o confinamento de ondas longas de IR. Através de imagens espectrais demonstrou-se que a luz pode ser confinada em uma escala nanométrica formando uma cavidade de Fabry-Perot, um mecanismo que produz ondas estacionárias dentro do cristal. Por isso, de acordo com os pesquisadores, essa descoberta expande as possibilidades do uso do SnO_2, que na forma de nanofitas (1D) é naturalmente otimizado para aplicações em ressonadores ópticos e, potencialmente, guia de ondas na faixa de IR longo.

7 Feres, F. H., Mayer, R. A., Wehmeier, L., Maia, F. C., Viana, E. R., Malachias, A., ... & Barcelos, I. D. (2021). Sub-diffractional cavity modes of terahertz hyperbolic phonon polaritons in tin oxide. *Nature communications*, *12*(1), 1-9.

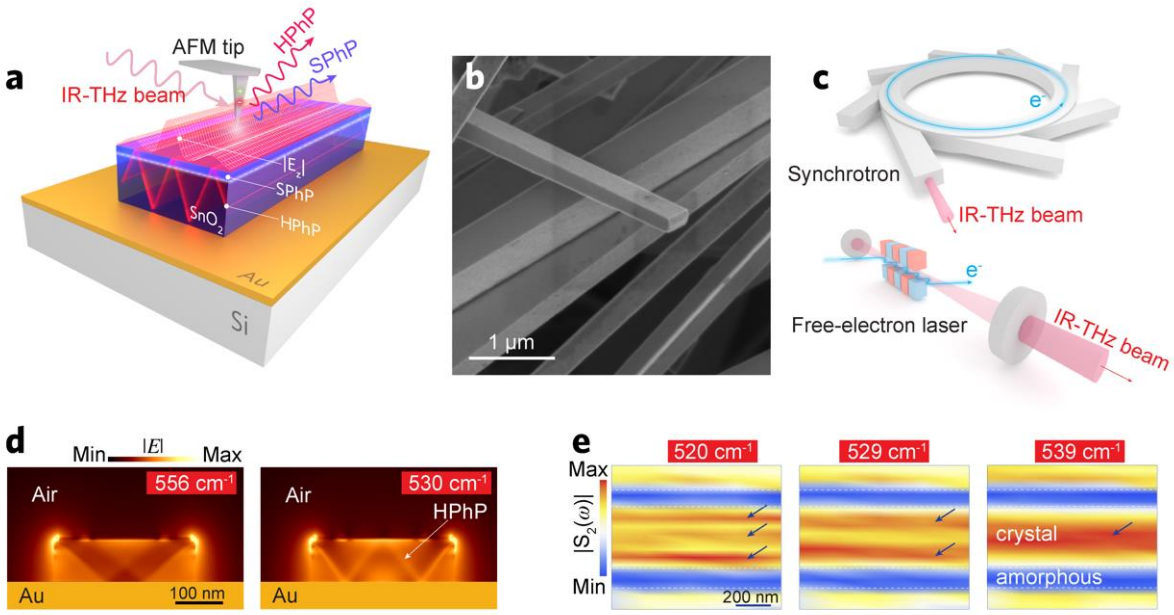


Figura 84 a) Esquema experimental que mostra o feixe de IR longo iluminando uma ponta metálica de microscopia de força atômica (nano-antena) para o experimento nanoespectroscopia. A radiação infravermelha é confinada no ápice da ponta numa região de 25 nm. b) Imagens de microscopia eletrônica de nanofitas de SnO2. c) Fontes de IR baseadas em aceleradores utilizadas nos experimentos. d) Vista da seção transversal do campo elétrico simulado de dentro da nanofita destacando a presença de ondas estacionárias. e) Visualização experimental dos modos de cavidade através de imagens hiperespectrais.

Ainda na mesma linha de pesquisa, os pesquisadores do LNLS, em colaboração com a Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), a Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e o *Advanced Light Source* (ALS), investigaram as propriedades nano-ópticas de nanofitas de tríoxido de molibdênio (MoO_3). De forma similar ao estudo do SnO_2, os pesquisadores demonstraram pela técnica de Nanospectroscopia em IR que o material também é capaz de confinar radiação no IR na nanoescala. Entretanto, neste caso, o MoO_3 não se limita apenas ao confinamento de ondas longas. Com atividade no IR médio, ele também funciona como uma plataforma nanofotonica que cobre uma ampla faixa espectral. Além do mais, por conta da anisotropia cristalina do MoO_3, tais ondas estacionárias são restritas a apenas algumas direções cristalográficas. Tal observação foi comprovada por cálculos analíticos e simulações numéricas. Os autores explicam que as nanofitas de MoO_3 podem ser aplicadas para aprimorar a interação da luz com a matéria em detectores de IR, células solares e técnicas de espectroscopia de superfície[8].

8 . D. Barcelos, T. A. Canassa, R. A. Mayer, F. H. Feres, E. G. de Oliveira, A.-M. B. Goncalves, H. A. Bechtel, R. O. Freitas, F. C. B. Maia, D. C. B. Alves, ACS Photonics **2021**, acsphotonics.1c00955.

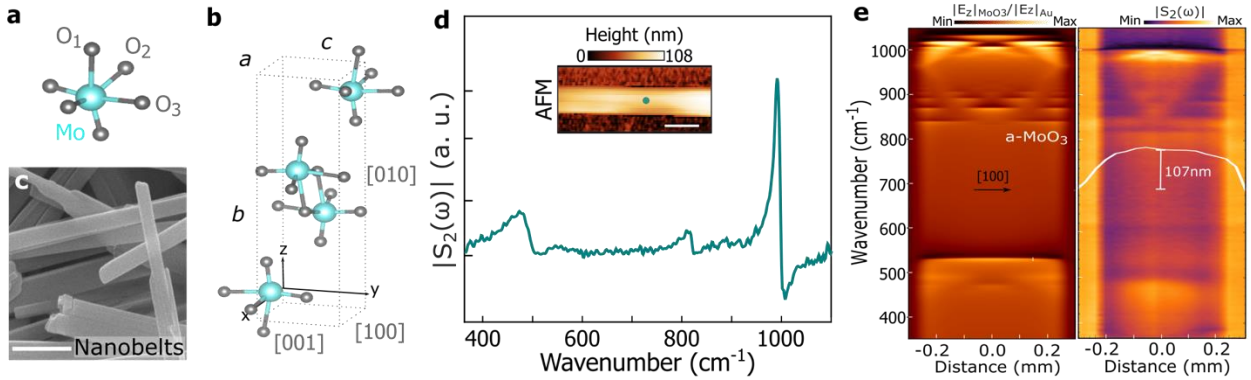


Figura 85 - a) Esquema dos três sítios de oxigênio de ligações assimétricas Mo-O ao longo dos diferentes eixos cristalinos marcados como O1, O2 e O3 de α-MoO_3. (b) A célula unitária de α-MoO3 é mostrada pelas linhas tracejadas com as constantes de rede: a = 0,396 nm, b = 1,385 nm e c = 0,369 nm. Esferas verdes / cinza representam átomos de molibdênio / oxigênio (c) Imagens de SEM de nanofitas de α-MoO_3 (barra de escala: 1 µm) no substrato. d) Espectros nano-FTIR normalizados do nanobelt de α-MoO_3 no topo do substrato de Au obtido na posição marcada pelo ponto verde na imagem topográfica AFM (detalhe). A barra de escala representa 1 µm. e) Simulação numérica (esquerda) e experimento (direita) de linescan de nano-FTIR da nanofita com w = 490 nm e t = 107 nm.

Ambientes de amostra in-situ, operando e in-vivo

O aumento de brilho das fontes de luz de última geração, permitindo altos fluxos de fótons em regiões confinadas de amostras, traz naturalmente a possibilidade única de realização de experimentos em condições *in-situ*, operando e *in-vivo*.

Desenvolvimento de um dispositivo microfluídico selado com adesivo para medições analíticas in situ usando luz síncrotron

Dispositivos microfluídicos operam com pequenas quantidades de amostras através de canais micrométricos. Como características principais, esses dispositivos apresentam tamanho reduzido, baixo peso e alto rendimento, ideais para uso em nanosondas. Essas características têm atraído muita atenção por parte da comunidade síncrotron interessada em instrumentação compatível para experimentos in-situ, operando e in-vivo.

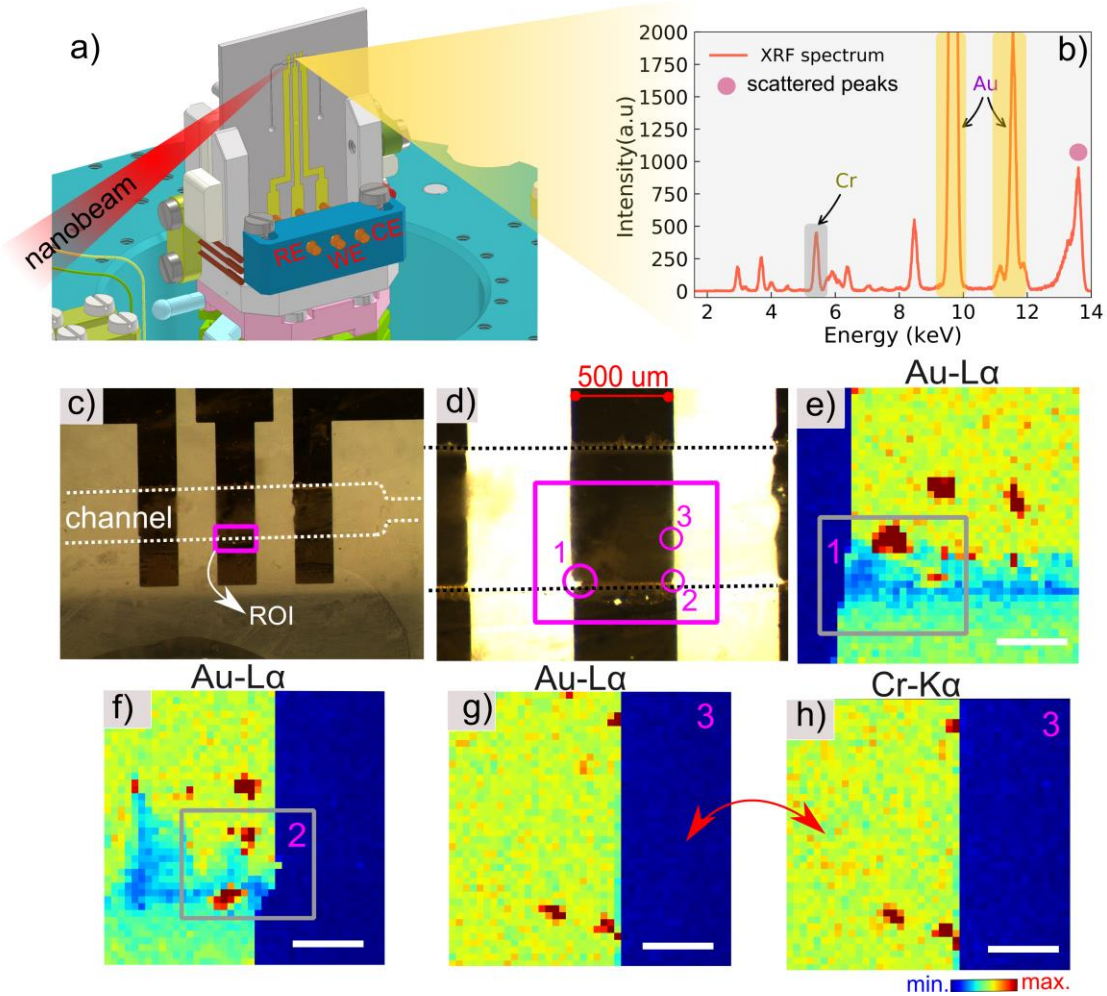


Figura 86 Experimentos de nanofluorescência no dispositivo microfluídico. (a) Representa um esquema 3D do porta-amostras microfluídico. (b) Espectro de fluorescência coletado no eletrodo central. (c-d) Micrografia óptica do canal e eletrodos destacando o ROI.

Neste trabalho, recentemente publicado na revista Scientific Reports, a equipe da linha Carnauba, em colaboração com o LNNano, apresentou a microfabricação e a caracterização de um dispositivo microfluídico multifuncional bem adequado para combinar técnicas analíticas de raios-X. O dispositivo consiste em microcanais em vidro, onde três eletrodos de ouro são depositados nos canais, para servir à eletroquímica in situ, à análise ou às medições elétricas padrão, selados por um filme de poliester. O dispositivo demonstrou excelente resistência química a produtos orgânicos solventes, boa resistência às pressões, e sua eficiência na presença de amostras biológicas (proteínas) é notável. Ele foi caracterizado com luz síncrotron através do mapeamento 2D por fluorescência de raios X, tanto de seus componentes básicos, como o eletrodo de Au e o filme de adesão de Cr, como através do resultado de uma reação eletroquímica envolvendo Ag e Cl e a nucleação de nanopartículas de Ag no eletrodo de Au.

1.3. Treinamento Educação e Extensão

No ano de 2021 os grupos envolvidos com o Sirius organizaram a Conferência Internacional de Aceleradores de Partículas, IPAC'21, de forma virtual (Figura 87). A conferência contou com aproximadamente 1750 participantes, de 270 diferentes instituições e 38 países. A participação de

estudantes chegou a 24% do total de inscritos. O programa da IPACC'21 contou com 10 palestras plenárias, 48 palestras convidadas, 50 palestras contribuídas, aproximadamente 1200 apresentações de pôsteres, e 30 expositores industriais, que apresentaram seus produtos em salas especiais. A plataforma virtual possibilitou também a criação espontânea de diversas salas de discussão de variados assuntos, desde tópicos técnicos até oferta de empregos na área de aceleradores. A publicação dos *proceedings* da conferência foi particularmente desafiadora pois não pôde ser feito da maneira tradicional, com um time de editores experientes provenientes de vários laboratórios de todo mundo, capaz de finalizar a edição dos artigos ao final da conferência. No caso da IPAC'21, devido às restrições de viagem durante a pandemia, foi montada uma equipe local de editores novatos que finalizou os trabalhos de edição em aproximadamente 4 meses.

Figura 87 Esquerda: página da edição virtual da IPAC'21, ipac21.org. Direita: proceedings da IPAC'21, com acesso no endereço jacow.org

2. Laboratório Nacional de Biociências

2.1. Instalações Abertas a Usuários Externos

Em 2021, o LNBio manteve suspensa suas instalações abertas à comunidade científica acadêmica e empresarial até o início do mês de novembro, em função das ações de enfrentamento da pandemia de Covid-19. Assim, os laboratórios de Espectrometria de Massas (MAS), Espectroscopia e Calorimetria (LEC), Cristalização de Proteínas (ROBOLAB) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN), atenderam um número reduzido de propostas de pesquisa externa, refletindo não apenas a suspensão das atividades de atendimento aos usuários por parte do CNPEM, desde o início de abril de 2020, como também a interrupção das atividades de pesquisa dos próprios usuários. Por outro lado, vale ressaltar que tais instalações não permaneceram inoperantes ao longo de 2021. Pelo contrário, diversas melhorias foram implementadas, além de desempenharem um papel central nas ações do laboratório dando suporte às pesquisas desenvolvidas no âmbito da força-tarefa contra a Covid-19.

Laboratório de Espectrometria de Massas – MAS

A instalação do Laboratório de Espectrometria de Massas (MAS) tem se dedicado ao atendimento de usuários internos e externos ao longo dos anos dando suporte aos projetos que utilizam proteômica baseada em espectrometria de massas. Esse suporte contempla todas as etapas do projeto, incluindo o delineamento experimental, preparo das amostras, injeção no espectrômetro de massas acoplado à cromatografia líquida e análise dos dados. As principais técnicas disponibilizadas nesta unidade incluem análises de massa intacta, de identificação e quantificação de proteínas em misturas simples e complexas, de parceiros de interação, de modificações pós-tradicionais, como também análises de complexos de proteínas visando mapeamento de interfaces de interação. Atualmente, o MAS opera com três espectrômetros de massas, incluindo um equipamento 'LTQ Orbitrap Velos ETD' (*Thermo Scientific*) e um 'UPLC-Q-TOF Premier' (*Waters*), ambos acoplados a cromatógrafos líquidos. Além desses equipamentos, por meio de uma nova parceria entre LNBio e a empresa Agilent, foi instalado um novo espectrômetro de massas 'Q-TOF', de alta resolução, acoplado a um sistema de cromatografia líquida de alto desempenho. Esse equipamento permitirá aos usuários do MAS realizar uma série de experimentos de proteômica baseada em espectrometria de massas com alta sensibilidade e acurácia de massas. Como melhorias realizadas no MAS em 2021, destacamos a adequação da sala de instrumentação para os novos equipamentos, com novos mobiliários, linhas de gases, rede elétrica e sistema de exaustão; além da aquisição de um computador Precision Torre T5820 (Dell), juntamente com novos programas para análise de dados de proteômica. Destaca-se também a realização de manutenção corretiva do cromatógrafo líquido NanoAcquity (*Waters*); e dos *nobreaks* ligados aos Q-tof e LTQ Orbitrap Velos com a troca das baterias e capacitores. Durante o período de 2021, foram desenvolvidas diversas técnicas de análises de proteômica baseada em espectrometria de massas, destacando-se o desenvolvimento de protocolos para o enriquecimento de proteínas acetiladas e ubiquitinadas utilizando imunoprecipitação, com otimização de métodos de aquisição e análise de dados; desenvolvimento de protocolos para análises de interação proteína-proteína, incluindo agentes de ligação cruzada cliváveis e *proximity labeling*; desenvolvimento de *script* para seleção de peptídeos proteotípicos e elaboração de tutorial do programa Skyline para uso em proteômica direcionada a alvos; desenvolvimento de métodos para enriquecimento de vesículas extracelulares (VEs) de amostras de pacientes (soro, plasma e saliva) e para extração de proteínas das VEs; e otimização de protocolos e métodos para análise de glicopeptídeos.

Laboratório de Cristalização de Proteínas – ROBOLAB

O ROBOLAB executa todas as etapas do processo de cristalização de proteínas, desde o preparo das matrizes de cristalização até à distribuição dessas condições em microplacas e registro periódico dos experimentos de cristalização. Para tanto, disponibiliza aos seus usuários uma plataforma totalmente automatizada para triagem das condições de cristalização e dois sistemas de visualização de experimentos que podem ser acessados remotamente pelo usuário para acompanhamento da formação de cristais nas placas de cristalização.

Em 2021, o ROBOLAB continuou atuando de forma coordenada à linha Manacá de difração de raios-X do SIRIUS, na obtenção de cristais que foram utilizados no estabelecimento dos melhores parâmetros de difração, coleta de dados e resolução da estrutura atômica de proteínas. Além disso, o ROBOLAB manteve papel importante na obtenção de cristais de proteínas do vírus SARS-COV-2 com ligantes, além de outros alvos relacionados com projetos institucionais (resultados detalhados na seção Força-tarefa Covid-19).

Atendendo a demanda de alguns usuários, como melhoria, deve-se citar a instalação de um sistema de visualização de gotas de cristalização, projetado e executado *in-house*. O sistema consiste em uma lupa Leica $MZ12_5$ acoplada a uma câmera fotográfica gerenciada pelo *software* uEye. Com este equipamento é possível gerar imagens e vídeos de experimentos de cristalização, além de registrar em tempo real a manipulação dos cristais, auxiliando e facilitando a prática de *soaking* de ligantes e congelamento dos mesmos. Também foi adquirido um sistema completo de *dewar* totalmente compatível com o método de coleta automatizada operante na linha Manacá do Sirius. Nele ficam armazenados os cristais de proteína em nitrogênio líquido, os quais são transportados até a linha de luz no dia da coleta de dados de difração.

Laboratório de Espectroscopia e Calorimetria – LEC

O LEC realiza estudos biofísicos e bioquímicos objetivando caracterizar estrutura, função, dinâmica e estabilidade de macromoléculas. Este laboratório desenvolve e aplica metodologias para medidas de interação entre proteínas e outras moléculas, como pequenos ligantes, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, com determinação de constantes de afinidade, estequiometria de ligação, cinética e parâmetros termodinâmicos, fundamentais para avaliação e desenvolvimento de novos fármacos. Além disso, o LEC possui instrumentação para mensuração do controle de qualidade de moléculas em solução, como a determinação de estado oligomérico, agregação e tamanho de proteínas e outras macromoléculas, as quais são essenciais para decisão sobre a aplicação das amostras em diferentes cenários.

Até o início do mês de novembro deste ano, o atendimento aos usuários externos foi suspenso no LEC em função das ações de enfrentamento da COVID-19. Ainda assim, diversas melhorias foram implementadas, incluindo a substituição do sistema de injeção de amostras e atualização do *software* de análise de dados do equipamento OMINISEC, usado na determinação do estado oligomérico e massa molecular de proteínas e outras macromoléculas. Além disso, com auxílio dos recursos provisionados à Plataforma de Virologia Estrutural, proveniente do Projeto de combate a Viroses Emergentes do MTCI, foi instalado no LEC um novo equipamento usado em experimentos de DSF (*differential scanning fluorecence*), o Thyco Nanotemper-6. Esse equipamento, além de permitir a aquisição de dados de maior precisão usando quantidades diminutas de proteína, tem a vantagem de as amostras de proteína não necessitarem de marcação ectópica com sondas fluorescentes, o que reduz significativamente o tempo e o custo da experimentação. Neste mesmo projeto também foi adquirido um equipamento de Dicroísmo Circular, para análise de estrutura secundária de biomoléculas, bem como sua estabilidade. Este novo equipamento possibilitará a análise de 6 amostras simultâneas, além de contar com leitor de fluorescência acoplado ao de absorção. Esses equipamentos aumentarão,

portanto, a capacidade do LEC em atender usuários nas medidas de estabilidade térmica de proteínas, de interação de proteínas com ligantes e fármacos, e na caracterização estrutural de biomoléculas. Outro equipamento de suporte que foi adquirido no LEC com recursos do projeto regular da Fapesp (proc. # 2019/14465-1), trata-se de uma centrifuga de placas, que irá auxiliar na montagem de placas que são analisadas no laboratório.

2.2. Pesquisa e Desenvolvimento in-house

O LNBio possui como estratégia atuar na interface entre os avanços do conhecimento científico e o amadurecimento de tecnologias que atendam demandas do sistema de saúde. Dessa forma, sua equipe científica reúne competências especializadas à realização de pesquisas em temas relevantes e estratégicos nas áreas de biociências e biomedicina. Durante este período de 2021, as linhas de pesquisa dos Programas Temáticos "Mecanismos Moleculares do Desenvolvimento de Doenças", "Métodos Avançados em Biociências" e "Biologia Computacional" foram contempladas, resultando em importantes avanços e resultados, os quais estão sumarizados nessa seção do relatório.

Além disso, a força-tarefa organizada em 2020 no LNBio continuou dedicando-se à busca por fármacos antivirais, ao desenvolvimento de meios de diagnóstico da COVID-19 e ao entendimento de mecanismos biológicos envolvidos na infecção pelo vírus SARS-CoV-2. O projeto "**Reposicionamento de fármacos e biologia estrutural do SARS-CoV-2**" financiado pelo MCTI por meio da FINEP trouxe ao LNBio recursos adicionais para que nossos profissionais continuassem com suas pesquisas. Os resultados sumarizados na seção "Especial Força-tarefa Covid-19" refletem o esforço e o empenho de nossos pesquisadores no aprofundamento do conhecimento da biologia da infecção pelo SARS-CoV-2, além de posicionar o LNBio como uma instituição de pesquisa ligada à área da saúde humana.

Programa de Mecanismos moleculares do desenvolvimento e de doenças

Este programa reúne estudos sobre o papel de macromoléculas na sinalização, regulação e ativação de processos metabólicos associados a várias doenças humanas como câncer, doenças metabólicas e cardiovasculares, transtornos do neurodesenvolvimento, e doenças infecciosas causadas por vírus, bactérias e outros parasitas. Seu principal objetivo é desenvolver competências multidisciplinares para o avanço da ciência básica dedicada à saúde humana.

Subprograma Câncer

O subprograma de pesquisa em câncer possui como foco principal identificar formas de suprimir o crescimento de células tumorais, além de compreender vias de transformação e manutenção do fenótipo tumoral. O entendimento dessas vias e a identificação de proteínas diretamente associadas ao processo de transformação maligna das células é a base para o desenvolvimento de novos fármacos capazes de interferir no processo tumoral. A seguir serão apresentados os principais projetos e resultados científicos obtidos no âmbito dessa temática em 2021. Destaca-se o desenvolvimento de novas ferramentas para entrega de imunomoduladores alvo-específicos, além da elucidação de mecanismos e proposição de alvos moleculares envolvidos em câncer oral e de mama.

No âmbito da linha de pesquisa **Desenvolvimento de estratégias alvo-dirigidas para imunoterapia de câncer,** o grupo de Imunologia do LNBio têm se dedicado ao desenvolvimento de estratégias com alvo na estimulação do sistema imunológico para eliminação de células tumorais. O

principal objetivo consiste em aumentar a atividade de células T efetoras, evitando mecanismos de imunossupressão, além de buscar inativar o efeito de células T regulatórias.

Uma das abordagens do grupo consiste em utilizar moléculas de RNA que apresentam alta afinidade e seletividade por alvos moleculares, de forma análoga a um anticorpo. Essa molécula, denominada aptâmero, pode ser modificada para carrear sequências inibitórias atuando como um vetor para modificação de células alvo. Os aptâmeros foram desenvolvidos para carrear moléculas de RNA de interferência diretamente a células T regulatórias, com alvo de inibir a função destas células que atuam como mediadores de mecanismos imunossupressores conferindo uma proteção das células cancerígenas no organismo. Observou-se em modelos experimentais que estes aptâmeros potencializaram a resposta antitumoral. O trabalho foi publicado em 2021 na revista *Molecular Therapy Nucleic-acids* [9]. Além dos aptâmeros, outro trabalho desenvolvido consiste na engenharia de nanopartículas imunomodulatórias. Estas partículas derivam de vesículas extracelulares e apresentam em sua superfície elementos imunomoduladores. Nos modelos experimentais, foi observado que estas partículas atuaram como coestimuladores do sistema imune, reduzindo a atividade de células T regulatórias e mediando a eliminação de células tumorais. Os resultados do trabalho foram publicados na revista *Scientific Reports*, em 2020[10] e utilizados para o desenvolvimento de uma nova plataforma imunomodulatória baseada em *virus-like particles* (VLPs), que são decoradas com ligantes para direcionamento para o sítio tumoral, e veiculação de imunomoduladores. Ensaios em modelos experimentais demonstram que estas partículas potencializaram a reposta imunológica antitumoral. Foi efetuado um pedido de depósito de patente desta nova tecnologia desenvolvida no CNPEM e o trabalho foi recém submetido para publicação. Este projeto contou com financiamento FAPESP 2019/04458-8.

No ano de 2021 também foi publicada uma revisão de imunoterapia, na revista *Frontiers in Immunotherapy* [11], que apresenta e discute diferentes estratégias baseadas na coestimulação de elementos TNFSF, como OX40L e 4-1BBL, utilizados no LNBio no desenvolvimento de nanopartículas e vacinas antitumorais.

Algumas das ferramentas desenvolvidas pela equipe também foram aplicadas em outros projetos, gerando resultados publicados em revistas científicas. Tem-se como exemplo dos trabalhos publicados, o estudo de vetores retrovirais para modificação de cardiomiócitos (Consonni et al, 2021)[12] e colaboração com outros grupos que utilizaram vetores de superexpressão, vetores de RNAi e estabelecimento de

9 Manrique-Rincon, A.J., Ruas, L.P., Fogagnolo, C.T., Brenneman, R.J., Berezhnoy, A., Castelucci, B., Consonni, S.R., Gilboa, E., and Bajgelman, M.C. (2021). Aptamer-mediated transcriptional gene silencing of Fox p 3 inhibits regulatory T cells and potentiates antitumor response. Mol Ther Nucleic Acids 25, 143-151. 10.1016/j.omtn.2021.05.005.

10 Semionatto, I.F., Palameta, S., Toscaro, J.M., Manrique-Rincón, A.J., Ruas, L.P., Paes Leme, A.F., and Bajgelman, M.C. (2020). Extracellular vesicles produced by immunomodulatory cells harboring OX40 ligand and 4-1BB ligand enhance antitumor immunity. Scientific Reports 10, 15160. 10.1038/s41598-020-72122-3.

11 Mascarelli, D.E., Rosa, R.S.M., Toscaro, J.M., Semionatto, I.F., Ruas, L.P., Fogagnolo, C.T., Lima, G.C., and Bajgelman, M.C. (2021). Boosting Antitumor Response by Costimulatory Strategies Driven to 4-1BB and OX40 T-cell Receptors. Front Cell Dev Biol 9, 692982. 10.3389/fcell.2021.692982.

12 Consonni, S.R., de Carvalho, A., Mauro, A.B., Franchini, K.G., and Bajgelman, M.C. (2021). Lentiviral transduction of neonatal rat ventricular myocytes preserves ultrastructural features of genetically modified cells. *Virology* 562, 190-196. 10.1016/j.virol.2021.07.015.

linhagens para estudos metabólicos desenvolvidos pelo grupo de Imunologia do LNBio (Carraro et al, 2021; Dias et al, 2020) [13,14.]

O câncer de cabeça e pescoço é o sétimo tipo de câncer mais frequente no mundo, com incidência anual superior a 830.000 casos e mortalidade anual maior que 430.000 casos. Apesar dos avanços nas modalidades terapêuticas nas últimas décadas, a taxa de sobrevida continua baixa, aproximadamente 50% após 5 anos do diagnóstico. Os pacientes apresentam alta taxa de metástase linfonodal, entre 50-75%, e a taxa recorrência do tumor varia entre 18 e 76%. Portanto, é urgente a necessidade de descobrir marcadores de diagnósticos e prognósticos, bem como, novos alvos terapêuticos para mudar esse cenário. Nesse contexto, os projetos de **"Proteômica aplicada ao câncer oral"** visam investigar os mecanismos moleculares de iniciação e progressão tumoral por meio da identificação de assinaturas moleculares de diagnóstico e prognóstico, e de alvos terapêuticos com potencial de aplicação clínica, utilizando como principal técnica a espectrometria de massas baseada em proteômica. No ano de 2021, podemos destacar cinco estudos inéditos que permitiram avançar no conhecimento sobre o câncer de boca. Por meio da combinação das análises de proteômica e peptidômica da saliva de pacientes com câncer de boca, foi identificada atividade proteolítica acentuada na saliva de pacientes com metástase linfonodal, resultando na identificação de peptídeos endógenos mais abundantes nessa condição clínica, que pode ser reflexo dos níveis reduzidos de inibidores de proteases na saliva desses pacientes (*Figura 88*) [15.]

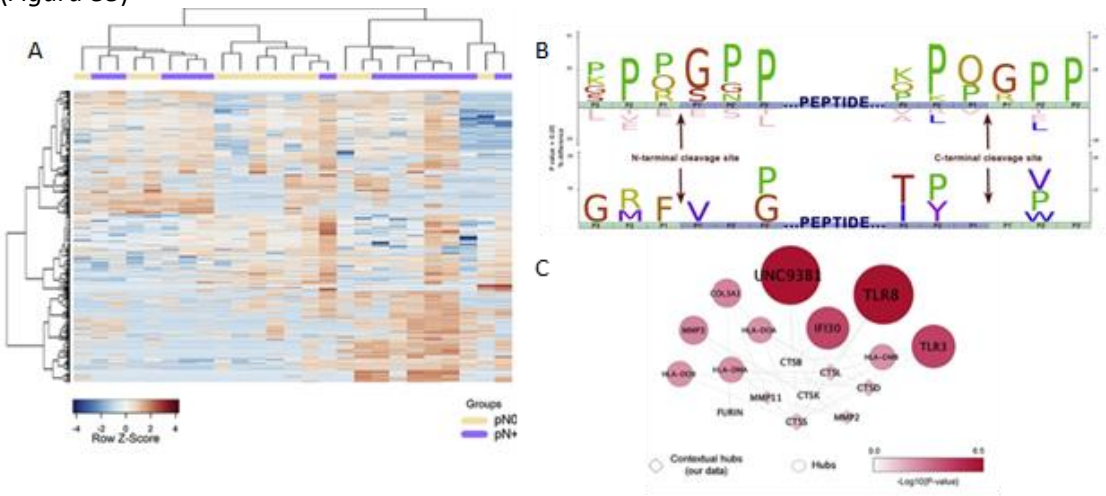


Figura 88 Composição diferencial de peptídeos endógenos na saliva de pacientes com diagnóstico de presença e ausência de metástase linfonodal: visualizada por meio de agrupamento hierárquico (A), de sítios de clivagens dos peptídeos (B) e do interactoma das proteases preditas (C)

13 Carraro, R.S., Nogueira, G.A., Sidarta-Oliveira, D., Gaspar, R.S., Dragano, N.R., Morari, J., Bobbo, V.C.D., Araujo, E.P., Mendes, N.F., Zanesco, A.M., Tobar, N., et al. (2021). Arcuate nucleus overexpression of NHLH2 reduces body mass and attenuates obesity-associated anxiety/depression-like behavior. *J Neurosci*. 10.1523/JNEUROSCI.0222-21.2021.

14 Dias, M.M., Adamoski, D., Dos Reis, L.M., Ascencao, C.F.R., de Oliveira, K.R.S., Mafra, A.C.P., da Silva Bastos, A.C., Quintero, M., de, G.C.C., Ferreira, I.M., Fidelis, C.H.V., et al. (2020). GLS2 is protumorigenic in breast cancers. Oncogene 39, 690-702. 10.1038/s41388-019-1007-z

15 Neves, L.X, Granato, D.C., Busso-Lopes, A.F., Kowalski, L.P., Lopes, M.A., Paes Leme, A.F. (2020) Peptidomics-Driven Strategy Reveals Peptides and Predicted Proteases Associated With Oral Cancer Prognosis. *Molecular & Cellular Proteomics* 20, Doi :https://doi.org/10.1074/mcp.RA120.002227

Um segundo estudo, também utilizando saliva de pacientes com ou sem lesão ativa de câncer de boca, demonstrou por meio da metaproteômica que a microbiota oral e suas proteínas têm valor diagnóstico e prognóstico em pacientes com câncer oral. Em outro estudo, estratégias multiômicas, incluindo-se miRNA, proteômica, metabolômica e lipidômica, indicaram proteínas presentes nas VEs, originadas de células de câncer de boca de tecido primário e de tecido metastático, associadas à metástase linfonodal e que podem ser candidatas a marcadores de prognóstico em câncer de boca (*Figura 89*)[16].

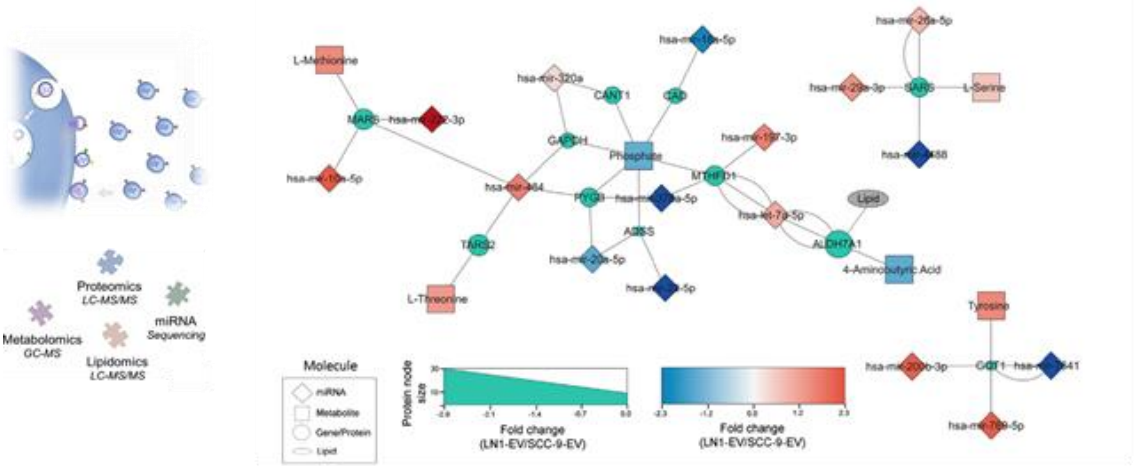


Figura 89 Integração de dados de multiômicas de miRNA, proteômica, metabolômica e lipidômica de vesículas extracelulares de células de câncer de boca revela alvos associadas à metástase linfondal.

Finalmente, para traduzir o conhecimento da pesquisa básica para a prática clínica, foi desenvolvido um protótipo de biossensor eletroquímico para análise da interação entre proteínas que tem a perspectiva de ser utilizado como teste rápido para diagnóstico e prognóstico de câncer de boca. Esse biossensor foi desenvolvido sendo utilizada como prova de conceito a interação entre duas proteínas conhecidas por interagirem entre si, o domínio citoplasmático da metaloproteinase de membrana (ADAM17) e tiorredoxina (*Figura 90*) [17] .

16 Busso-Lopes, A.F., Carnielli, C.M., Winck, F.V., Dryden, K., Fox, J.W., Paes Leme, A.F. A Reductionist Approach Using Primary and Metastatic Cell–Derived Extracellular Vesicles Reveals Hub Proteins Associated with Oral Cancer Prognosis. 2021. *Molecular & Cellular Proteomics* 20. DOI:https://doi.org/10.1016/j.mcpro.2021.100118

17 Trino, L.D., Albano, L.G.S., Granato, D.C., Santana, A.G., Camargo, D.H.S., Correa, C.C., Bufon, C.C.B., Paes Leme, A.F. 2021. ZIF-8 Metal–Organic Framework Electrochemical Biosensor for the Detection of Protein–Protein Interaction. Chem. Mater. 2021, 33, 4, 1293–1306

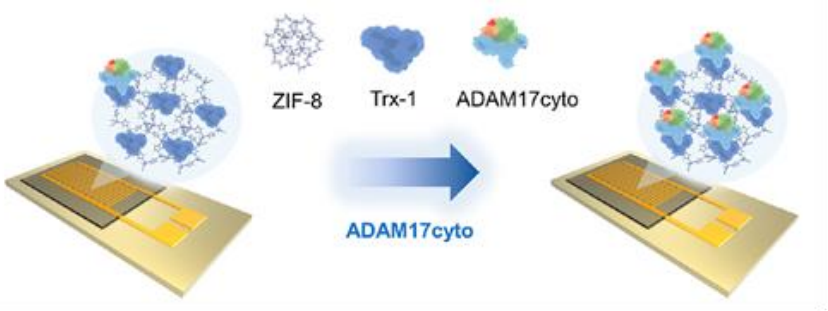


Figura 90 Biossensor desenvolvido para detecção de interação proteína-proteína

Em resumo, as estratégias integradas permitem uma melhor compreensão das características moleculares do câncer de boca, definindo a agressividade da doença e pode ajudar nas decisões sobre tratamentos (*Figura 91*) [18].

18 Oliveira Sá, J., Trino, L.D., Oliveira, A.K., et al. Proteomic approaches to assist in diagnosis and prognosis of oral cancer 2021. *Expert Review of Proteomics* 18, Issue 4 - https://doi.org/10.1080/14789450.2021.1924685

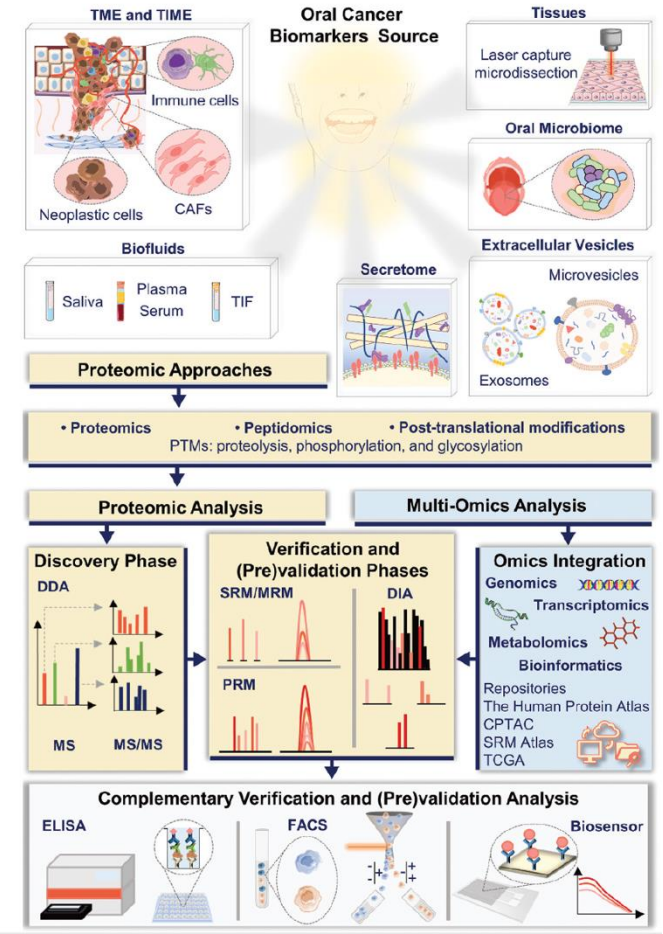


Figura 91 - Estratégias utilizadas na descoberta e verificação de potenciais marcadores e alvos terapêuticos em câncer oral

No âmbito da pesquisa **"Desenvolvimento de inibidores de Glutaminase como terapia de combate ao câncer"** a equipe publicou recentemente um trabalho na ACS *Pharmacology & Translational Science* onde apresenta uma nova molécula inibidora da enzima identificada após campanha de *High Throughput Screening* e otimização de hit com ensaios enzimáticos e em células. Em colaboração com o LNNano e a USP de São Carlos a estrutura do estado ativo da enzima glutaminase foi resolvida por Cryo-EM, a qual se organiza na forma polimérica. Esta estrutura, além de desvendar pela primeira vez o mecanismo de ativação induzido por fosfato da enzima, revela uma nova superfície da enzima que pode ser alvo do desenho de novos inibidores. A técnica de *Cryo-FIB-Electron Tomography* foi empregada (em colaboração com um grupo de pesquisa do European Molecular Biology (EMBL) de Heidelberg) para confirmar a organização polimérica da enzima *in situ* (especificamente, dentro de mitocôndrias). Esta é a primeira vez que a estrutura de uma enzima metabólica é resolvida *in situ*; de fato, poucas estruturas de grandes complexos macromoleculares já foram resolvidos *in situ* até então. No momento, os pesquisadores estão empenhados em compreender o papel destes polímeros para a proteção mitofágica de mitocôndrias em situações de estresse nutricional. Por fim, foram alcançados avanços consideráveis no estabelecimento de cultura 3D de linhagens de tumores de mama, glioblastoma e modelos de pele para o emprego das mesmas no estudo de terapias com nanopartículas ou pequenas moléculas. A

proposta é utilizar estes modelos emulando a complexidade do microambiente (e células imune associadas), com especial interesse no estabelecimento de organoides derivados de tumores de pacientes em parceria com hospitais públicos e privados. Parceria com o hospital AC Camargo foi iniciada e coleta de tumores de mama de pacientes recrutados no hospital já foram iniciadas. Os tumores serão expandidos em camundongos e usados para o estabelecimento de organoides. O objetivo principal deste projeto é estabelecer uma plataforma de testes terapêuticos personalizados em tumores de mama.

Receptores nucleares e ação em câncer fazem parte do tema de dois projetos em andamento no LNBio. No primeiro, foi verificado que a mutação do RAR que causa uma fusão com a proteína PML (PML-RAR) leva à disfunção do receptor que perde a habilidade de se ligar a DNA ou a moléculas correguladoras, transformando-o em um receptor inativo. Por meio de análises biofísicas, estruturais e de microscopia eletrônica, foi verificado que o PML-RAR forma agregados que perdem a habilidade de exercer sua função na célula, desregulando os efeitos do ácido retinóico, o que explica a resistência que pessoas que possuem esta mutação desenvolvem no tratamento da leucemia promielocítica aguda a quimioterápicos como o ácido retinóico.

Com relação segundo projeto, foi verificado por meio de biologia computacional, que mutações no receptor de estrógeno (ER) descritas em experimentos celulares como câncer ativadoras, provocam mudanças conformacionais no receptor tornando-o constitutivamente ativo. Além disso, estas mutações teriam o mesmo efeito que a basificação do pH intracelular, que altera a estrutura do receptor. Os resultados referentes aos modelos computacionais e dinâmicas moleculares foram confirmados por meio de ensaios biofísicos e celulares, que mostraram que estas mutações, ou o aumento do pH induzem o recrutamento de coativadores independentemente da presença do estrógeno. O manuscrito com os dados foi redigido e submetido à revista *Biochemistry*.

Subprograma Biologia Doenças Metabólicas e Cardiovasculares

O objetivo do projeto "Estudo do PPARγ e proteínas correguladoras para elucidação de vias de controle metabólico relacionadas ao diabetes e obesidade" é desvendar os mecanismos moleculares que modificações pós-traducionais (PTM) provocam no receptor PPARγ com relação ao seu modo de ação. Com isso, por meio de ensaios celulares e biofísicos foi demonstrado que a fosforilação do PPAR pela CDK5 (induzida em condições de obesidade), interfere no recrutamento de correguladores alterando a regulação do receptor. Estas modificações podem explicar a desregulação na expressão gênica controlada pelo PPAR, resultando na resistência à insulina.

Além deste estudo de mecanismo, foram desenvolvidos camundongos *knockin* com a mutação PPARγ ser273ala, que mimetiza o impedimento total da fosforilação do PPARγ. Os animais *knockin* tiveram desenvolvimento e comportamento aparente normal. Entretanto, apresentaram maior peso corporal e hiperglicemia logo após o desmame. Além disso, foi observada a redução na expressão do PPARγ, como a que ocorre em animais alimentados com dieta hiperlipídica. Os genes regulados pela fosforilação em tecido adiposo branco também tiveram sua expressão reduzida, sugerindo alteração no padrão de fosforilação nos animais obesos. Também foi observado que os animais obesos *knockin* possuem melhora na sensibilidade à insulina e redução de insulina circulante, porém apresentaram indução de esteatose hepática, mas o nível de triglicérides hepático e o tamanho deste órgão foi bastante reduzido. Aumento no tecido adiposo branco (WAT), redução no número de adipócitos e aumento nos seus tamanhos também foram características observadas. Estes resultados estão sendo compilados para publicação.

Dando continuidade aos estudos com este receptor, foram avaliados os efeitos de diferentes doses de um ligante não-agonista de PPARγ já descrito por nosso grupo, o AM-879, comparados com o modelo *knockin* (Figura 92). Este ligante também foi descrito com envolvimento na via do hormônio liberador de corticotropina (CRH). Resultados demonstraram que a dose menor do ligante promove mais

efeitos na via do CRH, principalmente devido a alterações na expressão gênica, porém ainda atua em genes alvo do PPARγ. Com a dose maior, há efeitos de melhora na sensibilidade à insulina, assim como redução de consumo de dieta e triglicérides hepático, além de aumentar a expressão de Ucp1, tanto no tecido adiposo branco, quanto marrom. Esses resultados indicam que pelo fato do AM-879 atuar em duas vias, a dose escolhida vai determinar em qual delas a atuação do ligante será predominante, porém esta molécula demonstrou potencial de ser um modulador eficaz da sensibilidade à insulina sem causar efeitos colaterais. Estes resultados também estão sendo compilados para publicação.

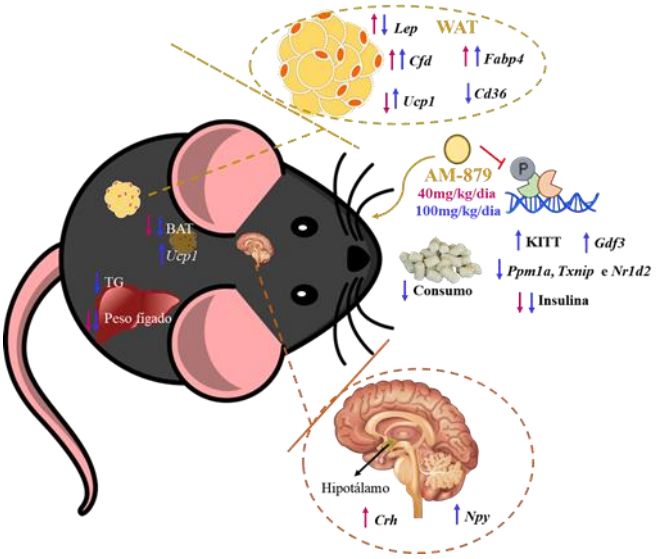


Figura 92 - Esquema do mecanismo de ação do ligante AM-879 nas doses de 40mg/kg/dia e 100mg/kg/dia, atuando tanto na via do PPARγ através do bloqueio da fosforilação na Ser273 e, também, na via do hormônio liberador de corticotropina (Crh).

Por fim, dando continuidade à elucidação de vias de controle metabólico relacionadas à obesidade, modelos de esferoides de tecido adiposo branco e marrom foram desenvolvidos, caracterizados e validados. Utilizando-se de estratégias de proteômica e estudos de expressão gênica, foi possível confirmar o desenvolvimento de tecido adiposo branco saudável e obeso e do tecido adiposo marrom. Modelos de testes para estes esferoides forma desenvolvidos, além de modelos de inflamação, resistência à insulina e de lipólise [19] .

O projeto "**Diagnóstico sensor de coagulação**" vem sendo desenvolvido em colaboração com o Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (IDPC) e com o Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano/CNPEM) e tem como objetivo o desenvolvimento de um teste rápido de coagulação que contenha um dispositivo sensor capaz de determinar o tempo de coagulação mediante a conversão de protrombina em trombina (*Figura 93*). Neste ano foram feitos avanços no desenho e parametrização do dispositivo, dentre eles medidas de impedância e capacitância das amostras de sangue nos eletrodos vazios e contendo a proteína incorporada para verificação do monitoramento do processo de coagulação sanguínea. No momento estão sendo finalizadas as parametrizações para a montagem do dispositivo e sua forma de leitura, além de adaptar as condições de incorporação da proteína tromboplastina fusionada a micelas lipídicas nos eletrodos. Após a finalização destas etapas, testes em larga escala serão iniciados com sangue de pacientes que possuam algum tipo de problema de coagulação sanguínea, dado que toda

19 Avelino, T.M., García-Arévalo, M., Torres, F.R., et al., Mass spectrometry-based proteomics of 3D cell culture: A useful tool to validate culture of spheroids and organoids, *SLAS Discovery* https://doi.org/10.1016/j.slasd.2021.10.013

a documentação necessária para a realização destes testes já foi aprovada pelo comitê de ética em pesquisa do IDPC.

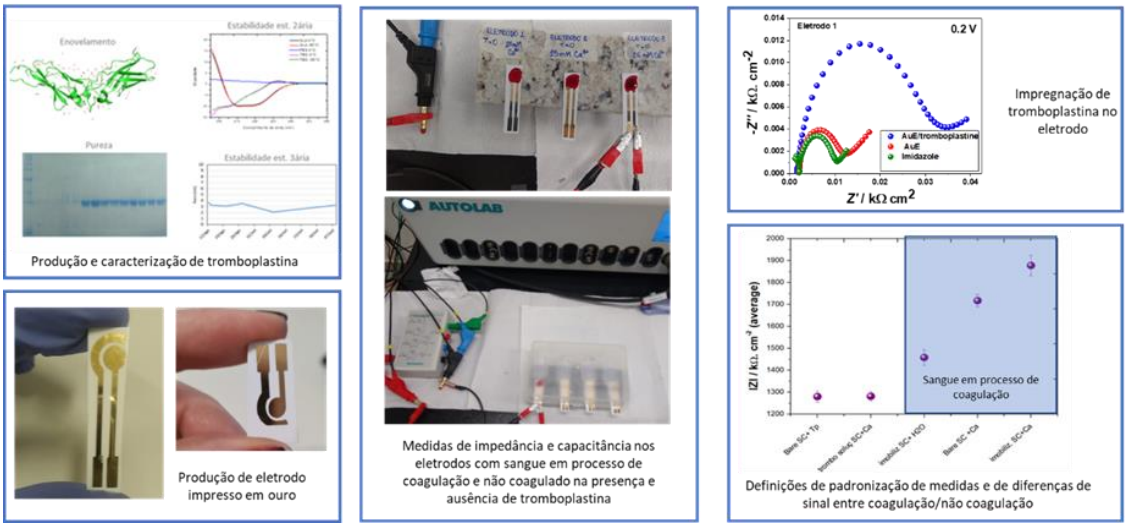


Figura 93 Avanços obtidos no desenvolvimento do teste de coagulação. Acima à esquerda temos a proteína sendo produzida de forma recombinante, abaixo, dois protótipos de dispositivos sensores recobertos em ouro que foram produzidos. Ao centro, o setup experimental para as medidas de impedância e capacitância que foram realizadas com sangue normal e em processo de coagulação e à direita e acima, a caracterização do sensor após incorporação da proteína tromboplastina e, abaixo, as diferenças nos valores de impedância obtidos em diferentes amostras de sangue em condições de coagulação e não coagulação.

Subprograma Doenças infecciosas e negligenciadas

O subprograma de pesquisa em doenças infecciosas e negligenciadas tem como principal meta o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos em infecções humanas causadas por arbovírus emergentes, bactérias e parasitas, além da identificação de proteínas alvos para o desenvolvimento de fármacos antivirais, antimicrobianos e antiparasitários. O subprograma agrupa vários projetos que visam a descoberta de novas moléculas bioativas contra doenças negligenciadas como doença de Chagas, bem como aquelas causadas por bactérias e outros microrganismos. O estabelecimento do grupo de pesquisa em virologia no LNBio foi essencial para a rápida resposta do CNPEM à pandemia da Covid-19.

Parasitas

Este ano foi concluído o trabalho em colaboração com pesquisadores da farmacêutica GlaxoSmithKline (GSK) e do Tres Cantos Open Lab Foundation (TCOF) ambos em Madrid, Espanha, que revelou o provável mecanismo de ação para moléculas selecionadas pela farmacêutica como potenciais novos candidatos a fármacos para o tratamento da doença de Chagas. Após uma triagem de aproximadamente 1,8 milhões de moléculas químicas em células de ratos infectadas pelo *Trypanosoma cruzi,* a empresa selecionou as 220 moléculas mais promissoras em controlar a infecção pelo *T. cruzi* sem afetar a viabilidade das células hospedeiras. Denominada como ChagasBox, ela faz parte de uma iniciativa da farmacêutica (do tipo inovação aberta) para o desenvolvimento de fármacos para as principais doenças negligenciadas. Dessa forma, amostras do Chagasbox seriam compartilhadas sem restrições de

propriedade intelectual com pesquisadores externos interessados em investigar o mecanismo de ação destas moléculas e avançar com desenvolvimento de novos fármacos para doença de Chagas.

Uma análise computacional do Chagasbox resultou na identificação de moléculas quimicamente similares a inibidores da Enzima Málica de *T. cruzi* (TcME), previamente reportados por pesquisadores do LNBio-CNPEM [20] (*Figura 94*). A farmacêutica então enviou as moléculas do Chagasbox ao CNPEM e os testes confirmaram a presença de potentes inibidores da TcME. Estudos subsequentes, envolvendo síntese de mais moléculas, ensaios enzimáticos, celulares, calorimetria e difração de raios-X, todos realizados no CNPEM, resultaram na identificação do sítio de ligação destes inibidores na estrutura cristalográfica da enzima alvo. Estes resultados foram publicados em julho deste ano no periódico *Infectious Diseases* da *American Chemistry Society* [21]. Esse projeto segue agora para fase de estudos pré-clínicos, visando a confirmação da eficácia em modelos animais da doença de Chagas, fases aguda e crônica.

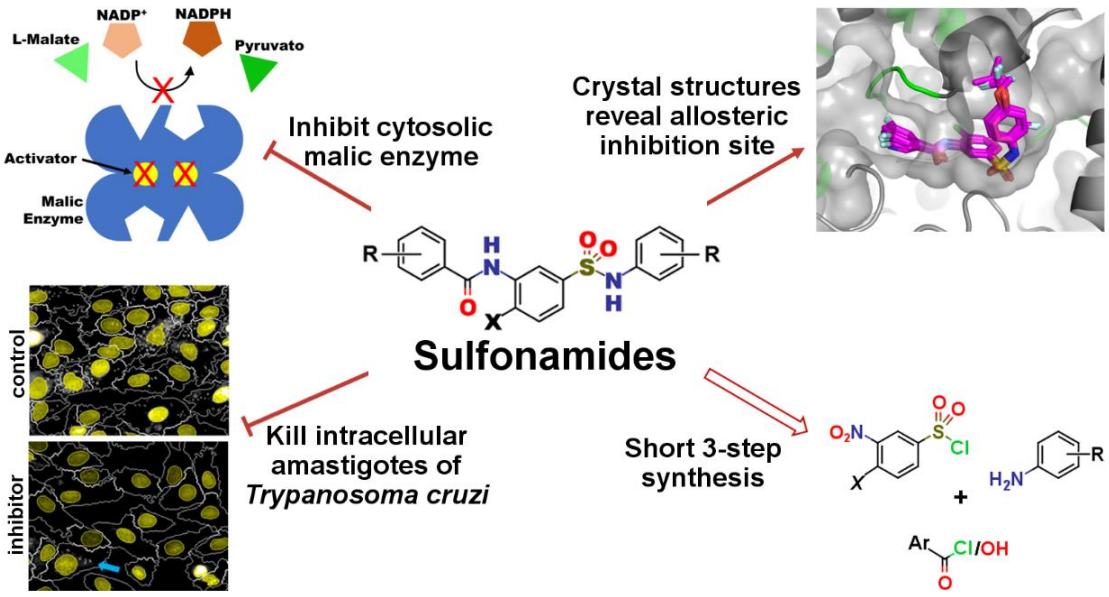


Figura 94 Resumo gráfico referente aos estudos para identificação do sítio de ligação de sulfonamidas na estrutura cristalográfica da Enzima Málica de T. cruzi.

Vírus

Neste ano, no âmbito do projeto **"Doenças Arbovirais Negligenciadas",** o Grupo de Virologia publicou os resultados sobre a elucidação da estrutura do vírus Mayaro na revista *Nature Communications*[22]. Pela primeira vez no Brasil e na América Latina, a estrutura completa de um vírus foi elucidada por uma equipe multidisciplinar de pesquisadores do CNPEM. Os primeiros resultados deste projeto já haviam sido divulgados em formato *preprint* em 2020. No entanto, para a publicação em 2021

20 Ranzani, A.T, et al; 2017. SLAS Discov. 22(9):1150-1161

21 Mercaldi, G.F., Eufrásio, A.G., Ranzani, A.T., do Nascimento Faria, J., Mota, S.G.R., Fagundes, M., Bruder, M., Cordeiro, A.T. 2021 Trypanosoma cruzi Malic Enzyme Is the Target for Sulfonamide Hits from the GSK Chagas Box. ACS Infect Dis. 2021;7(8):2455-2471. doi: 10.1021/acsinfecdis.1c00231.

22 Ribeiro-Filho, H. V., Coimbra, L. D., Cassago, A., Rocha, R. P., da Silva Guerra, J. V., de Felicio, R., ... & Marques, R. E. (2021). Cryo-EM structure of the mature and infective Mayaro virus at 4.4 Å resolution reveals features of arthritogenic alphaviruses. *Nature communications*, 12(1), 1-13.

foram realizados novos experimentos confirmatórios de espectrometria de massas, a pedido dos revisores.

O vírus, que foi primeiramente identificado em Trinidad e Tobago ainda na década de 1950, se espalhou pelas Américas. A doença infecciosa transmitida por mosquitos conhecida como Febre do Mayaro provoca dores nas articulações que podem perdurar por meses. Considerada como uma das doenças endêmicas negligenciadas no Brasil, possui dificuldades de diagnóstico e sintomas muito parecidos com os da Chikungunya que prejudicam muito o planejamento de estratégias de controle. Dados epidemiológicos mostram que o vírus vinha circulando há décadas pelas regiões Norte e Nordeste, mas o número de pacientes infectados tem aumentado no Centro-Oeste e Sudeste nos últimos anos. Entretanto, acredita-se que o número de casos ainda é subnotificado, dada a dificuldade de métodos de diagnóstico específicos e de resultados que podem ser associados à Chikungunya e a Dengue.

O trabalho, publicado na *Nature Communications*, descreve a partícula viral infecciosa, também conhecida como vírion, incluindo as proteínas estruturais que o compõem, denominadas E1, E2 e C. Contando com a dedicação de 20 pesquisadores e colaboradores ao longo de três anos e meio, a pesquisa empregou equipamentos sofisticados de Criomicroscopia Eletrônica e técnicas avançadas de virologia e espectrometria de massas, representando um avanço em nossas capacidades de combate e entendimento da Febre do Mayaro. Este estudo facilitará o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico, medicamentos e imunizantes contra a doença transmitida por mosquitos, que representa um risco de saúde às populações em países da América Latina.

O Mayaro vírus é uma partícula de 70 nm de diâmetro com complexos de proteínas E1 e E2, chamados de spikes, ancorados em uma membrana lipídica chamada envelope e apontados para o exterior da partícula. É importante entender como suas proteínas interagem e se organizam para entender como o Mayaro vírus se replica no interior de nossas células e para procurar eventuais vulnerabilidades a serem exploradas no desenvolvimento de tratamentos. Detalhes inéditos da estrutura molecular do vírus Mayaro foram revelados com resolução de 4.4 angstrom, aproximadamente 100 mil vezes menor que a espessura de um fio de cabelo (*Figura 95*). Dentre esses destalhes inéditos destacam-se as cadeias de açúcares ligadas na proteína E2 (*Figura 96*), voltados uns para os outros em uma configuração que se assemelha a um aperto de mãos e que, portanto, foi apelidada de “handshake” (aperto de mãos). Os pesquisadores acreditam que esses açúcares, além de serem reconhecidos pelo sistema imunológico, podem ajudar o vírus a se organizar e ficar mais estável. A função dessa parte específica do vírus está entre os temas que continuarão sendo estudados pelos pesquisadores.

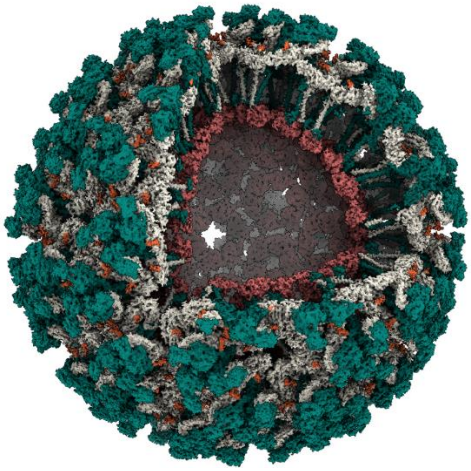


Figura 95 Imagem que representa a estrutura do vírus Mayaro revela a partícula viral – em parte aberta para possibilitar a visualização de todas as suas proteínas. Cada uma das proteínas que forma a partícula viral está representada por uma cor (verde, cinza e vermelho). Os açúcares que são ligados às proteínas estão em laranja.

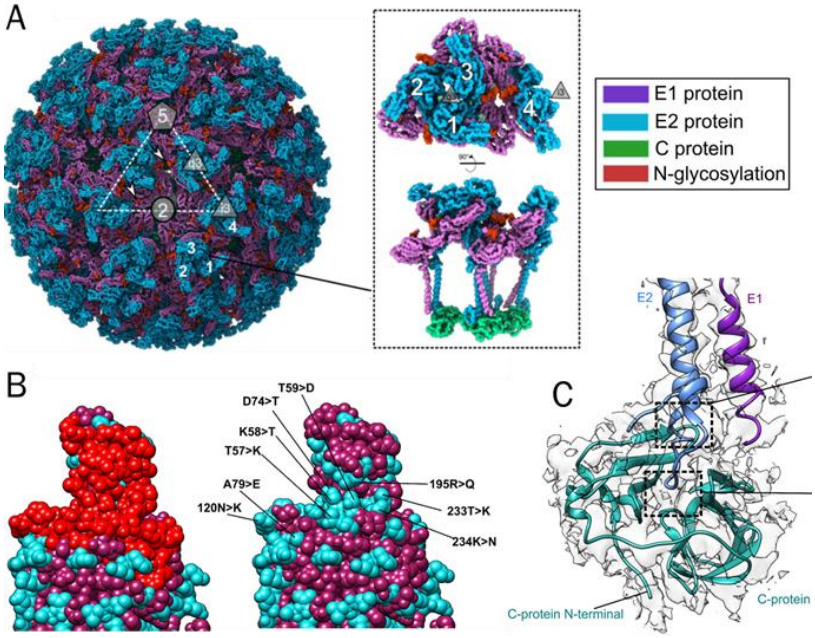


Figura 96 Elucidação da estrutura do MAYV e implicações diretas no desenvolvimento de metodologias de diagnóstico e estratégias de tratamento. A elucidação da estrutura do Mayaro em alta resolução (4.4Å) (A) permitiu a identificação de características virais nunca observadas em alfavirus, como glicosilações nos spikes virais na configuração de aperto de mãos (handshake, em vermelho). Alvos moleculares pertinentes ao desenvolvimento de métodos diagnósticos baseados em antígenos/ anticorpos, capazes de discernimento entre MAYV e CHIKV, foram identificados nas proteínas E1 e E2 (B), sendo os resíduos em ciano específicos para MAYV. Alvos pertinentes ao desenvolvimento de antivirais também foram identificados, incluindo o ancoramento da proteína E2 à proteína do Capsídeo, interação crítica à formação da partícula viral (C), destacada nos retângulos pontilhados. Adaptado de Ribeiro-Filho e Coimbra, et al. Nat Comms 2021.

O grupo de Virologia do LNBio também se empenhou no estudo do vírus da encefalite de St. Louis (SLEV). Considerada uma doença arboviral negligenciada, o vírus SLEV também é transmitido por mosquito e afeta populações em países em toda a extensão das Américas. A infecção pelo vírus, como indicado pelo seu nome, pode causar uma encefalite viral, que é uma forma grave e perigosa de doença. Em um recente artigo publicado na revista Virulance [23], os autores identificaram que nem toda resposta imunológica ao vírus é protetora, mesmo aquelas que estão tipicamente associadas à resposta antiviral durante uma infecção. Também foi observado que a resposta de Interferon do tipo II, envolvendo um mediador chamado IFNγ, não é protetora frente à infecção pelo SLEV e pode ser danosa ao hospedeiro. De forma contrária, a resposta de interferon do tipo I, envolvendo a ativação do receptor IFNAR por uma diversidade de mediadores desencadeados pela infecção viral, é essencial para o controle da replicação de SLEV no cérebro. Sem essa resposta protetora, o SLEV replica e induz uma resposta inflamatória excessiva que acelera o desenvolvimento de encefalite e a morte dos animais. O maior entendimento sobre a contribuição das respostas de interferon no desenvolvimento da Encefalite de St. Louis experimental em camundongos indica que mais estudos são necessários para entender como vírus e hospedeiros interagem e como essa interação pode tender ao desenvolvimento de doença.

Bactérias

O desenvolvimento de novos agentes biológicos, como os antimicrobianos, é uma necessidade constante da sociedade. A importância deste desenvolvimento fica ainda mais evidente diante do decréscimo observado no número total de novos agentes antimicrobianos aprovados pelo FDA, das altas taxas de resistência microbiana, da necessidade de agentes que atuem por mecanismos de ação diferentes aos dos fármacos em uso, e por outras diversas razões. Assim, o estudo para a obtenção de novos compostos que exibem atividade antimicrobiana torna-se fundamental no campo da saúde pública. O projeto intitulado "**Descoberta e desenvolvimento de novos compostos antimicrobianos contra bactérias Gram-negativas resistentes a carbapenêmicos e cefalosporinas**", apoiado pela FAPESP, tem como principal objetivo identificar novos compostos com atividade antimicrobiana sobre espécies de bactérias Gram-negativas multirresistentes a antibióticos. Para tanto, estão sendo realizadas triagens de bibliotecas de compostos através de ensaios fenotípicos de inibição de crescimento celular, e bioquímicos, baseados em alvos moleculares da bactéria. Como principais avanços realizados no período, destaca-se a identificação de três proteínas de membrana da bactéria *Xanthomonas citri*, usada como modelo de bacilo Gram-negativo multirresistente, como potenciais alvos de ação de uma quinazolina com propriedades antimicrobianas sintetizada no LNBio. O núcleo quinazolina é encontrado em vários dos fármacos comercializados atualmente. As quinazolinas e quinazolinonas correspondem a duas classes de moléculas orgânicas heterocíclicas aromáticas de intensa atividade biológica e, portanto, são de grande interesse para a química medicinal. O mecanismo de ação de alguns compostos derivados dessas moléculas já foi elucidado, porém, no que diz respeito às quinazolinas com atividade antimicrobiana, apenas dois alvos primários de ação dessa classe de moléculas têm sido reportados na literatura.

Um derivado de quinazolina com excelente atividade antimicrobiana, denominado QX1, foi identificado anteriormente pelo laboratório e demonstrou atividade bactericida contra várias espécies de *Xanthomonas*, incluindo *X. citri*, a semelhança de tetraciclina. O principal objetivo desta linha de pesquisa é determinar o mecanismo de ação do composto QX1 em *X. citri*, bactéria que está sendo usada como

23 Rocha, R.F., Del Sarto, J.L., Gomes, G.F., Gonçalves, M.P., Rachid, M.A., Smetana, J.H.C., Souza, D.G., Teixeira, M.M. & Marques, R.E. (2021) Type I interferons are essential while type II interferon is dispensable for protection against St. Louis encephalitis virus infection in the mouse brain. Virulence, 12 – 244-259.

organismo modelo. Também é de interesse realizar a síntese de uma molécula quimera, Bio-Linker-QX1, o composto QX1 biotinilado. Essa molécula será utilizada para a construção da matriz de afinidade com uma resina de estreptavidina e incubada com proteínas totais de *X. citri*, para identificação das proteínas que ficarão retidas apenas na matriz contendo a quimera. Técnicas de espectrometria de massas serão utilizadas para identificar essas proteínas e aumentar as chances de sucesso dessa técnica de "*fishing*", a fim de identificar proteínas da bactéria que possam se ligar ao composto QX1, constituindo seus potenciais alvos moleculares.

Na linha de pesquisa "**Estudos de aminoacil-tRNA sintetases de organismo infecciosos**", avanços foram feitos nos estudos relacionados a duas enzimas, prolil- e metioninil-tRNA sintetases (ProRS e MetRS, respectivamente). Os avanços com a ProRS envolveram a validação de 4 candidatos a *hits*, dos quais 3 se mostraram potentes inibidores da enzima de bactéria gram-negativa, selecionados a partir da triagem de uma pequena biblioteca de derivados de quinazolinonas (Figura 97A). Dentre os inibidores de ProRS foram encontradas moléculas capazes de matar bactérias gram-negativas em ensaios *in vitro*, demonstrando que essa enzima pode ser um alvo promissor para desenvolvimento de antibióticos. Os próximos passos do projeto devem abranger a seleção de inibidores seletivos da ProRS bacteriana que mantenham efeito fenotípico. No que diz respeito a MetRS, estudos estruturais e bioquímicos permitiram a elucidação das bases moleculares da seletividade e mecanismo de ação de antimicrobianos da classe diarildiamina (p. ex. REP3123 e REP8839) pelas distintas formas da enzima metionil-tRNA sintetase (MetRS1 e MetRS2). Estes estudos revelaram que as diarildiaminas ocupam não só o sítio de ligação da L-metionina como também bloqueiam a região envolvida no reconhecimento do braço aceptor do RNA transportador (tRNA) na MetRS (Figura 97B). Além disso, foi demonstrado que resíduos de aminoácidos polimórficos do sítio do braço aceptor do tRNA estão relacionados a baixa susceptibilidade da MetRS2 a inibidores derivados das diarildiaminas. Como as bactérias que produzem a MetRS2 se mostram resistentes a antibióticos com esqueleto básico de diarildiaminas, esforços têm sido dedicados na identificação de sondas químicas capazes de modular a MetRS2. Para isso, duas estratégias têm sido empregadas, sendo que a primeira envolve triagens automatizadas de pequenas moléculas usando uma MetRS2 de bactéria gram-negativa. Nesta frente, uma pequena triagem automatizada contra uma biblioteca de derivados de produtos naturais já foi executada e candidatos a *hits* foram selecionados. Novas triagens automatizadas com a mesma enzima estão previstas, desta vez usando biblioteca maior composta de algumas dezenas de milhares de moléculas sintéticas. Além das triagens automatizadas, também estão sendo viabilizados protocolos para a síntese de compostos que são potenciais inibidores da MetRS2. Etapas sintéticas também foram otimizadas, permitindo alcançar bons rendimentos nestes processos. Assim, esperamos com essas iniciativas identificar novas sondas químicas da ProRS e MetRS2 que serviram para avaliar o potencial destas enzimas como alvos para desenvolvimento de fármacos contra bactérias gram-negativas multirresistentes.

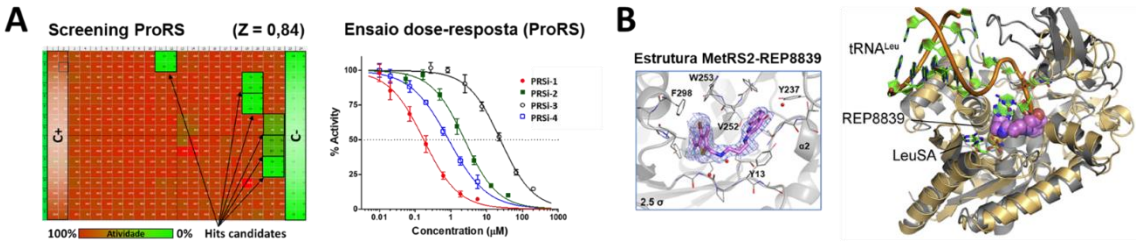


Figura 97 Avanços obtidos nos estudos de aminoacil-tRNA sintetases de bactérias gram-negativas. (A) Triagem com ProRS contra biblioteca de quinazolinonas levou a identificação de alguns candidatos a hits (esquerda), dos quais 4 foram confirmados. Três dos hits confirmados se mostraram inibidores potentes da ProRS em ensaios dose-reposta (direita). (B) Detalhe do sítio catalítico da MetRS2 formando um complexo com uma diarildiamina (REP8839) (esquerda) e ilustração da sobreposição entre a porção final do braço aceptor do RNA transportador com motivo quinolona do inibidor (direita).

O projeto "**ANTIBIO-BAC**", desenvolvido no contexto de um Projeto Temático 'São Paulo Excellence Chair (SPEC)' em parceria com pesquisadores da USP, Univali, UNICAMP, e do Instituto de Biologia Estrutural de Grenoble, França, tem como objetivo caracterizar complexos proteicos envolvidos na biossíntese da parede celular bacteriana e sistemas de secreção de toxinas, a fim de identificar novas moléculas antimicrobianas. Como avanço nessa linha investigativa no período, destaca-se o trabalho descrevendo a estrutura oligomérica da proteína MreC do patógeno *Pseudomonas aeruginosa*, resolvida através da utilização de técnicas como a crio-microscopia eletrônica (Figura 98) e a cristalografia de raios-X, publicado na revista *Nature Communications* [24].

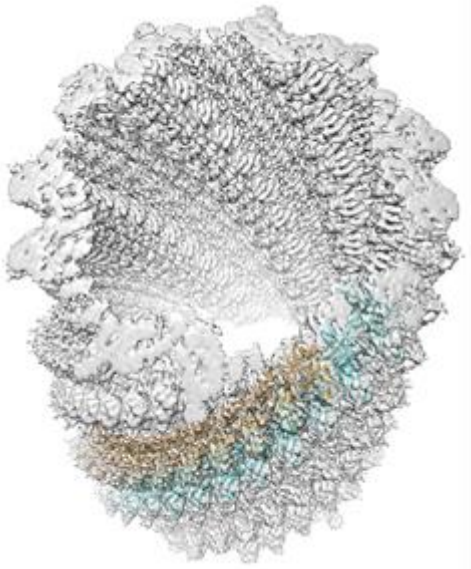


Figura 98 Mapa de crio-microscopia eletrônica do oligômero de MreC de Pseudomonas aeruginosa, que se associa em forma de seis conjuntos de fibras antiparalelas. Um conjunto está colorido em laranja e azul.

24 Martins, A., Contreras-Martel, C., Janet-Maitre, M., Miyachiro, M.M., Estrozi, L.F., Trindade, D.M., Malospirito, C.C., Rodrigues-Costa, F., Imbertm L., Job, V., Schoehn, G., Attrée, I., and Dessen, A. 2021. Self-association of MreC as a regulatory signal in bacterial cell wall elongation. Nature Comm. 12, 2987.

Destaca-se também a caracterização da proteína MagC, um membro do complexo Mag de *P. aeruginosa*, que se liga à parede celular bacteriana com o intuito de estabilizar o complexo em si [25]. Outros esforços do grupo nas áreas de química e microbiologia visam a caracterização de novos produtos naturais inibidores do crescimento de bactérias patogênicas.

Subprograma Neurobiologia Molecular

Atualmente, o subprograma de pesquisa em Neurobiologia Molecular conta com projetos que abordam aspectos de mecanismos celulares e moleculares envolvidos no estabelecimento de doenças de neurodesenvolvimento, com ênfase em Deficiência Intelectual (DI) e Esclerose Múltipla (EM).

A linha de pesquisa "**Investigação de mecanismos celulares e moleculares associados à deficiência da enzima conjugadora de ubiquitina UBE2A**" visa a melhor compreensão dos mecanismos moleculares associados à atividade da UBE2A e sua relação com pacientes que apresentam Deficiência Intelectual (DI). Estudos demonstraram que uma mutação missense nesta enzima afeta sua capacidade de formar o produto (proteínas ubiquitinadas) e que, o modelo animal portador da mutação em questão apresentou alterações de citoarquitetura cerebral, estrutura e função mitocondrial, comprometimento da função neuronal e déficit no processo de aprendizagem espacial.

Neste ano de 2021, foi realizado sequenciamento de RNA mensageiro de neurônios hipocampais primários de animais controles (WT) ou mutantes (UBE2A Q93E) após 14 dias de diferenciação em cultura. Pela abundância de genes identificados, há uma distinção entre os grupos experimentais WT e mutante (gráfico de PCA, Figura 99A). No total, foram identificados 15.790 genes diferencialmente expressos (DE), dos quais 2.375 são significativos (p-valor ajustado ou FDR < 0.05). A lista dos 50 genes mais DE é indicada no heatmap (Figura 99B). Dos DE, foram identificados 531 genes com expressão aumentada e 107 genes com expressão reduzida (*fold change* de 1.5 em cada direção) (Figura 99C).

25 Zouhir, S., Contreras-Martelm C., Trindade, D.M., Attrée, I., Dessen, A., and Macheboeuf, P. 2021. MagC is a NlpC/P60-like member of the a2-macroglobulin Mag complex from Pseudomonas aeruginosa. FEBS Lett. 595, 2034-2046.

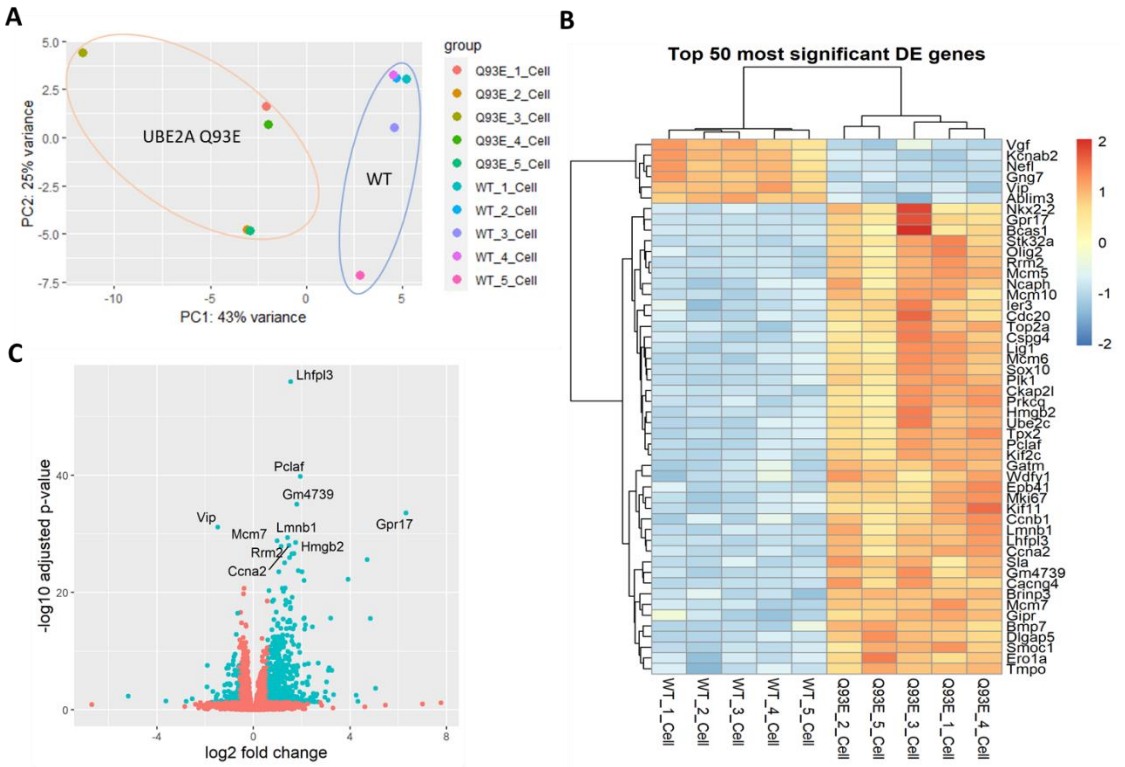
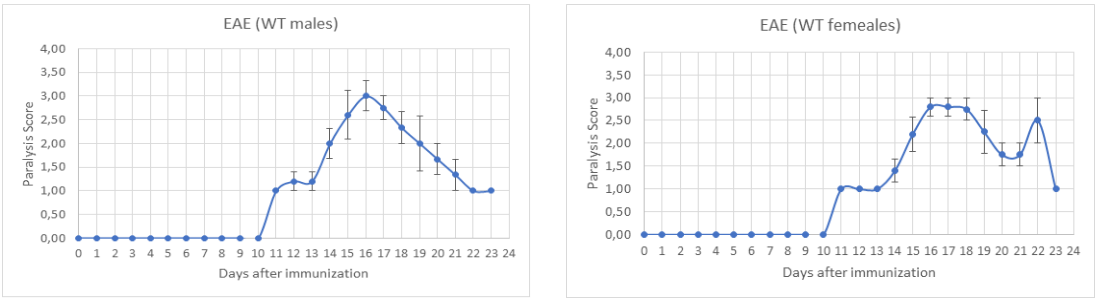


Figura 99 Análise de sequenciamento de RNA mensageiro de neurônios hipocampais primários de animais controles (WT) ou mutantes (UBE2A Q93E) após 14 dias de diferenciação em cultura. (A) Análise de Componente Principal (PCA) da expressão gênica entre as amostras de neurônios hipocampais controles (WT) e mutantes (UBE2A Q93E). (B) Gráfico de heatmap demonstrando os 50 genes mais diferencialmente expressos (DE), de acordo com o p-valor ajustado ou FDR < 0.05, entre as amostras de neurônios hipocampais WT e UBE2A Q93E. A escala de cores indica o z-score de cada gene (vermelho = expressão aumentada; azul = expressão reduzida entre as amostras). (C) Volcano plot dos resultados de expressão diferencial. Em azul estão representados os genes diferencialmente expressos (p-valor ajustado ou FDR < 0.05) com fold change > 1.5 em cada direção. Os genes identificados representam os genes com menor p-valor ajustado e mais significativos.

Inicialmente, o *software* Metacore foi utilizado para identificar genes alterados da via de ubiquitinação de proteínas. Foi encontrado aumento de 2,9x (Q93E/WT) de expressão de Ube2c, enzima E2 com atuação no processo de degradação de substratos mitóticos. Embora seja um dado preliminar, sem indicações do exato mecanismo, o aumento de expressão de outra enzima E2 pode significar uma forma de compensação da deficiência de função de UBE2A no contexto em que ambas compartilham a mesma função. Foi feita uma busca por genes alterados e potencialmente relevantes para as alterações de função sináptica observadas anteriormente. Nesta análise foi observada a redução de sinaptotagmina, uma proteína que regula o processo de fusão e exocitose de vesículas sinápticas. Se confirmado, este dado pode explicar o aumento de exocitose espontânea e reduzido número de vesículas sinápticas observados anteriormente.

Outras análises dos dados obtidos neste transcriptoma estão em andamento e serão complementares ao ensaio de proteoma global de ubiquitinação, também em andamento. Todos esses resultados trarão informações cruciais para a melhor compreensão dos mecanismos moleculares associados à atividade da UBE2A para a manutenção da homeostase celular e função sináptica.

Em 2021, no âmbito do projeto intitulado "**Estudos funcionais no modelo de camundongo *knockin* GALR2 W248L**" foram produzidos animais portadores da mutação GALR2 W248L em homozigose e não foi possível observar fenótipos espontâneos de paralisia, um dos sinais clínicos de Esclerose Múltipla (EM). Entretanto, ensaios em animais podem requerer algum estímulo para se observar o sinal clínico do paciente. De fato, em trabalhos anteriores com o modelo animal nocaute para GALR2, os sinais de doença foram demonstrados através do modelo de Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE), amplamente utilizado para investigar os aspectos inflamatórios da EM em roedores. Portanto, visando a aplicação do modelo de EAE em animais GALR2 W248L, no segundo semestre de 2021 este procedimento foi padronizado com sucesso em machos (Figura 100A) e fêmeas WT (Figura 100B). O ensaio consistiu na imunização dos camundongos com peptídeo de mielina, adjuvante de Freud e toxina pertussis, e acompanhamento diário do comportamento e peso para avaliação do grau de paralisia (*score*) de acordo com referências da área. A paralisia se iniciou da região posterior (cauda) e progrediu para os membros posteriores e anteriores, quando os animais foram eutanasiados para coleta de tecidos para histologia e microtomografia de raio-x futura no SIRIUS.



A B

Figura 100 Padronização do modelo de EAE em animais WT machos (n=5) e fêmeas (n=5), após imunização com peptídeo MOG35-55. Os gráficos indicam a média ± SE do grau de paralisia durante 23 dias de acompanhamento. Os animais controles (injeção de PBS) não apresentaram sinais de doença. Os dias de início, pico e reversão dos sinais clínicos está dentro da janela temporal prevista na literatura para este experimento. (A) machos e (B) fêmeas.

Programa de Métodos Avançados em Biociências

O Programa de Métodos Avançados em Biociências compreende a execução de projetos estratégicos e de fronteira, de caráter multidisciplinar, alinhados às prioridades do MCTI e com potencial impacto econômico e social. Muitas das pesquisas em biologia tornam-se restritas pela falta ou limitação de métodos adequados de investigação. O programa de P&D se beneficia do moderno parque de equipamentos e competências disponíveis no CNPEM e tem caráter abrangente, envolvendo o aprimoramento e desenvolvimento de métodos e técnicas experimentais e instrumentação científica que permite impactar os demais eixos de atuação do Centro. Destacam-se, neste eixo, os subprogramas de pesquisa e desenvolvimento voltados para a descoberta e desenvolvimento de fármacos e biofármacos, desenvolvimento de culturas 3D, além do subprograma de imagens biológicas. Todos focados no desenvolvimento e na implantação de novas e sofisticadas tecnologias.

Subprograma Imagens Biológicas

O objetivo principal deste subprograma é o desenvolvimento de métodos e instrumentação científica em luz síncrotron, em um caráter multidisciplinar. O subprograma visa o estabelecimento e integração de técnicas de captura e processamento de imagens de alta resolução de amostras biológicas obtidas através de microtomografia (µCT) e fluorescência (XRF) de raios-X. Também prevê a integração de instrumentação avançada em microscopias incluindo a implantação de técnicas avançadas de microscopia ótica de super-resolução.

Um dos projetos realizados nesse subprograma envolveu a tomografia síncrotron do coração de camundongo com detalhamento celular. Após a realização das primeiras imagens de material biológico de coração de camundongo na linha de micro e nano tomografia do Sirius (Mogno), verificou-se que as altas energias da linha também causaram ruídos no detector, em especial os chamados "*speckles*" dinâmicos, sendo necessário o desenvolvimento de filtros para correção de modo a melhorar o pós-processamento do dado 3D (Figura 101). O algoritmo foi otimizado para processamento paralelo em CPU, o que permitiu melhora significativa nos processos subsequentes de segmentação (isolamento de cada célula no tecido) para posterior quantificação (Figura 102). Ao final desse processo, iniciou-se o estudo do espaço entre as células, chamado interstício, do coração (Figura 103). Essa estrutura é o arcabouço de suporte das células no tecido, cuja conformação 3D determina a função desse órgão e, consequentemente, desarranjos estruturais podem levar a cardiomiopatias.

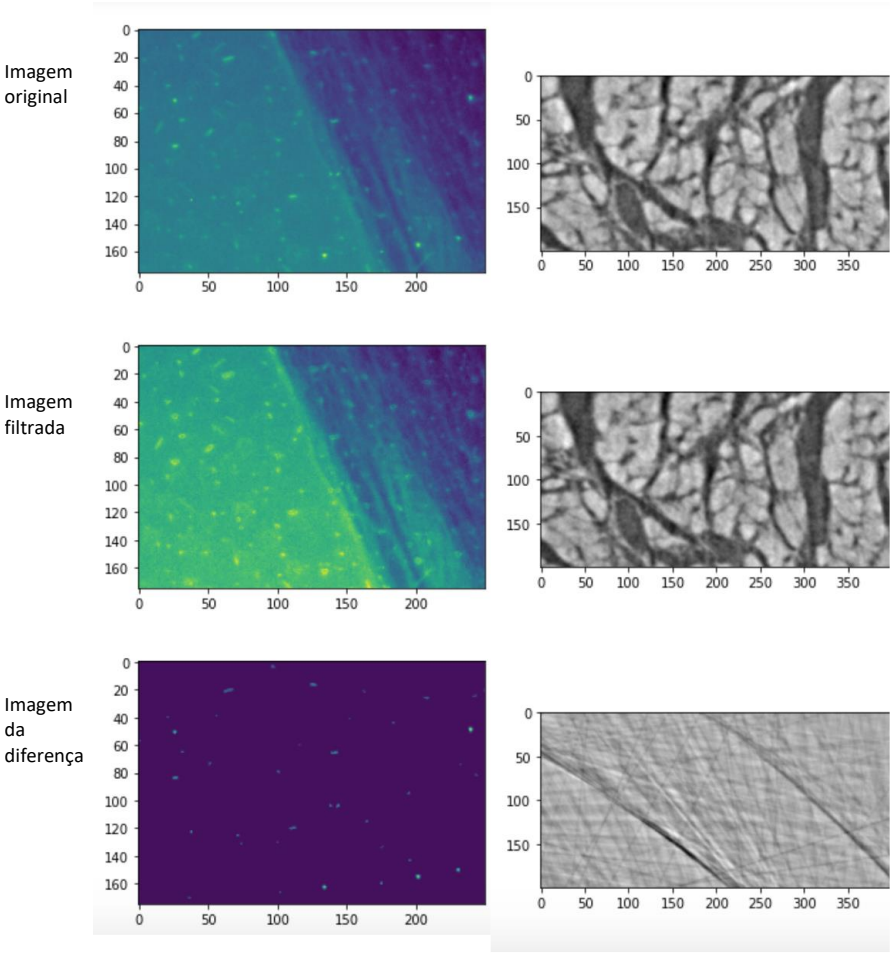
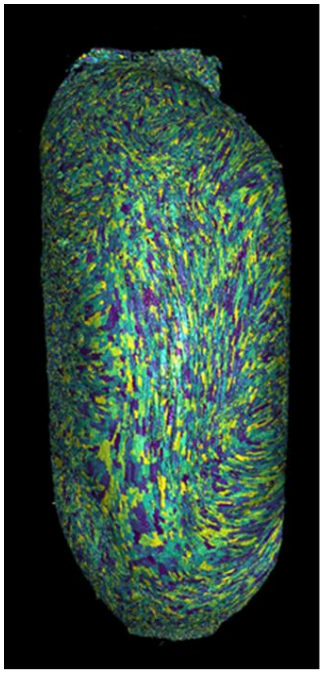
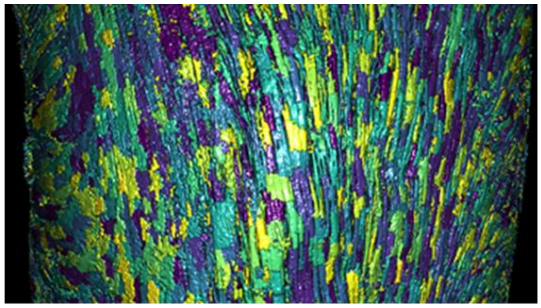


Figura 101 Efeito dos pixels com o ruído de "Speckle dinâmico" no detector. Na reconstrução da imagem 3D causa padrões similares a linhas que prejudicam a resolução, ainda que de maneira sutil. O efeito do filtro é remover estes artefatos sem causar perda na qualidade final.





B

A

Figura 102 Renderização 3D de uma das amostras de coração de camundongo mostrando cada uma das células individualizadas. (A) Visão geral da região ventricular; (B) Detalhe do nível celular. Diferentes cores representam células individualizadas.

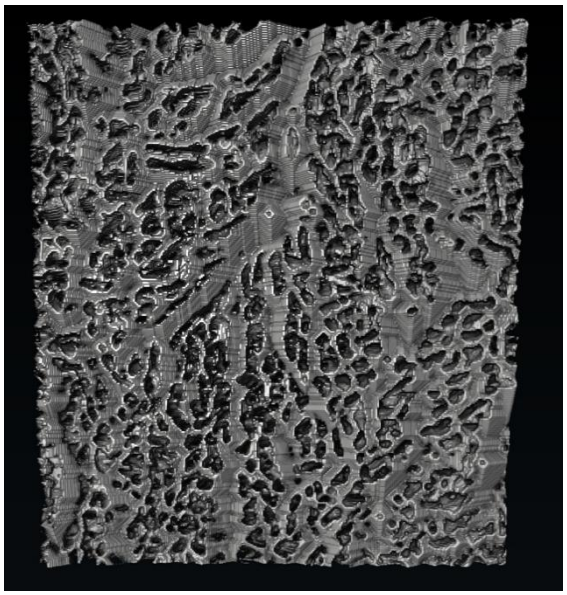


Figura 103 Representação 3D do espaço intersticial do músculo cardíaco de camundongos obtida por tomografia de raios-X.

Um avanço necessário e importante para imageamento de raios-X é a criação de um método de marcação para tipos celulares específicos dentro da amostra biológica. A ideia é a utilização de sondas químicas ou biológicas que liguem (reconheçam) proteínas que estejam presentes exclusivamente nas células de interesse para o estudo. Dessa forma, foram sintetizadas sondas derivadas de um beta-bloqueador (carazolol), da alta afinidade para o receptor β1ADR, que foram conjugadas com um elemento pesado bromo (Br). Podendo assim utilizar técnicas de imagens diferenciais de raios-X e

fluorescência de raios-X para identificação dos alvos. Com o início das atividades da linha de luz Carnaúba do Sirius, utilizou-se uma amostra de coração de camundongo que fora marcada com as referidas sondas. Foi desenvolvido um protocolo de preparo de amostras biológicas para a linha Carnaúba que permite pouca manipulação inicial da amostra e possibilita utilização de corte por pFIB (*Focused Ion Beam* de plasma) (Figura 104). Os resultados atestam que, após o corte e montagem, a amostra continua íntegra.

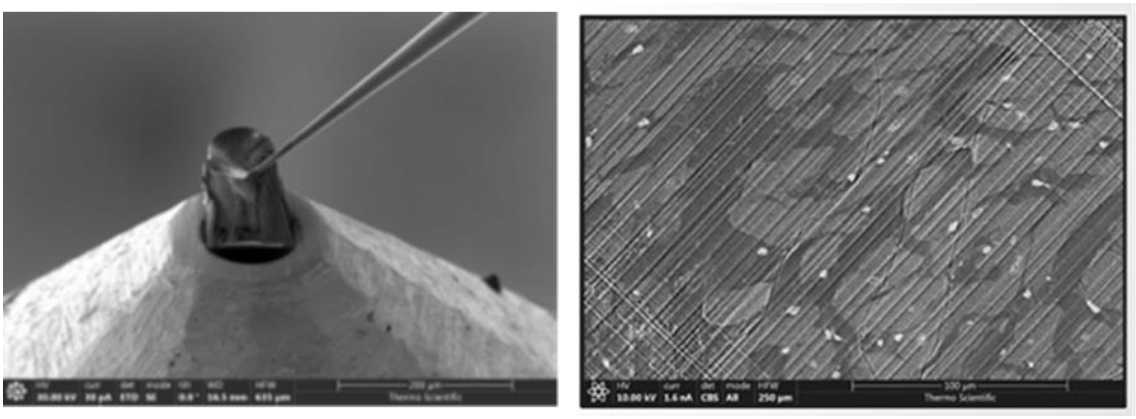


Figura 104 Micrografias eletrônicas do preparo de amostra biológica (tecido cardíaco) para medidas na linha carnaúba. Esquerda, pilar de cerca de 100µm de diâmetro montado no porta-amostra ("carpin"). Direita, detalhe de varredura do topo da amostra mostrando integridade do tecido.

A amostra foi levada para a nanoscopia na linha Carnaúba em um primeiro teste. Os resultados, embora preliminares e estatística baixa revelam que a amostra resistiu aos danos de radiação e indica presença elementos químicos esperados, incluindo Br que seria derivado da sonda (Figura 105).

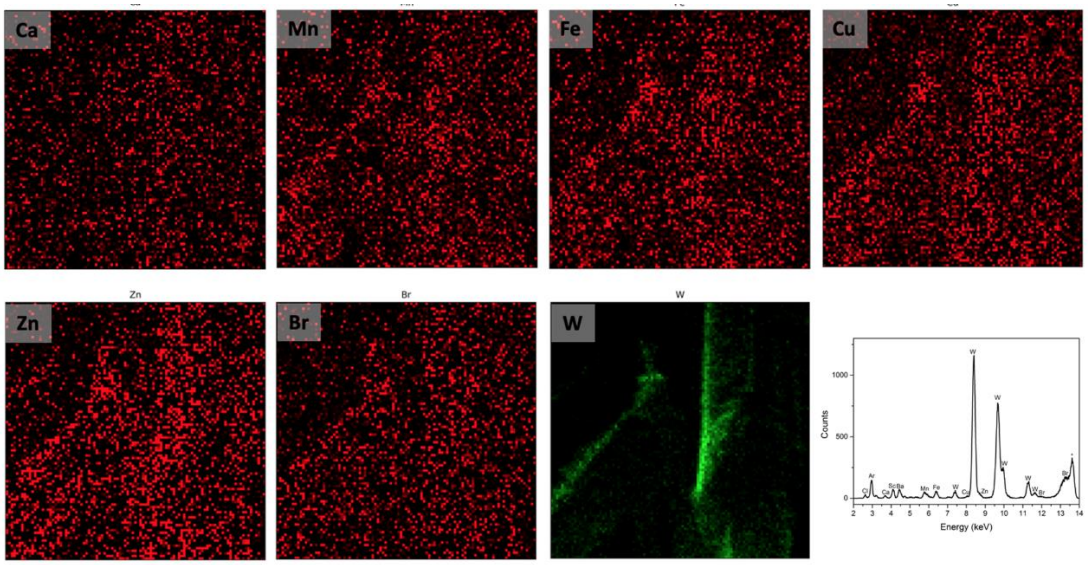


Figura 105 Resultados preliminares de medidas de fluorescência de raios-X na linha CARNAÚBA. Presença de elementos químicos endógenos e Br, que seria indicativo da localização da sonda molecular. Destaque para o elemento W que é contaminação da "colagem" da amostra no porta-amostra.

Na iniciativa de imageamento de amostras biológicas por luz síncrotron, em especial com raios-X é necessário considerar o dano radiológico devido à radiação ionizante. Em colaboração com grupo de proteção radiológica do Sirius (RADS) foi simulado por método de Monte Carlo as condições experimentais

da linha de tomografia Mogno para pequenos animais. Os resultados iniciais para corpo inteiro revelam um cenário comparável àqueles oriundos de equipamentos pré-clínicos de bancada (Figura 106). Isso possibilita o imageamento em estudos longitudinais dos animais. Iniciamos os primeiros experimentos com células vivas e os resultados devem ser obtidos no 1º semestre de 2022.

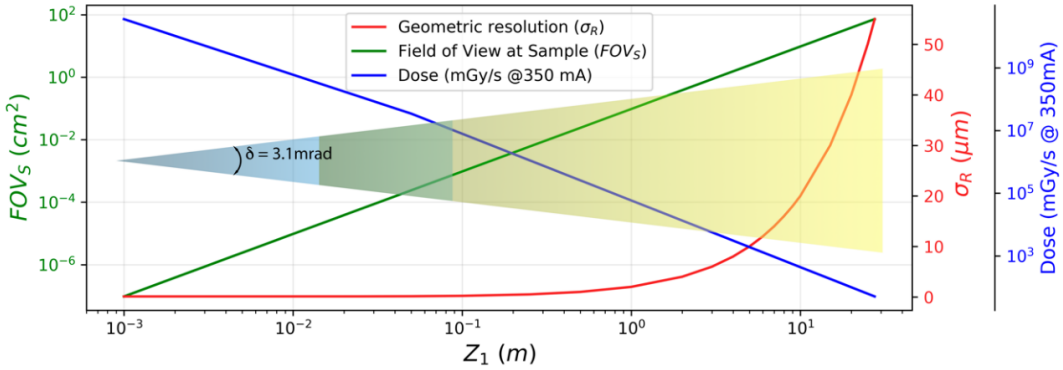


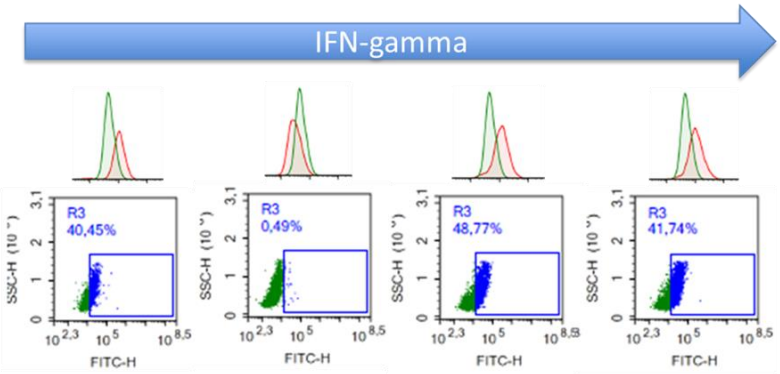
Figura 106 Estimativa preliminar da taxa de dose absorvida na linha MOGNO de acordo com a posição da amostra em relação ao foco. Triângulo azul ilustra o perfil do feixe ao longo dos 30m desde a fonte (esquerda) até o detector (direita).

Subprograma Biofármacos

Desde 2014 o CNPEM vem se capacitando a desenvolver uma linhagem celular produtora de anticorpo em escala de bancada e executar testes estruturais e funcionais que atestem viabilidade para progredir na cadeia de desenvolvimento. Neste sentido, escolheu-se produzir o nivolumab, um biofármaco de interesse do SUS, indicado para o tratamento de melanoma metastático e alguns tipos de câncer de pulmão. Sua patente expira em 2026, fornecendo tempo suficiente para que ocorra o desenvolvimento completo, incluindo testes clínicos, para que o produto biossimilar chegue ao mercado no momento da expiração de sua patente. Esta etapa do projeto encontra-se em andamento (financiado pelo Ministério da Saúde por meio do programa PRONON). Neste ano de 2021, a equipe destacou resultados animadores para este projeto de alta complexidade, destacando-se a construção e testes piloto do sistema de produção de anticorpos recombinantes na linhagem HEK293, o estabelecimento de clones produtores de anticorpo derivados da linhagem aderente CHO-K1, e por fim o desenvolvimento de ensaios de caracterização para avaliação de anticorpos produzidos pelos clones celulares.

Clones produtores de anticorpo derivados da linhagem aderente CHO-K1 foram identificados, sendo que dois deles se mostraram promissores. O clone *CHO-K1#33* apresentou estabilidade por 60 dias em cultura, e o clone celular *CHO-k1#93*, que apresentou estabilidade por mais de 100 dias em cultura, na ausência de antibiótico. Nos testes da preparação de anticorpo do clone #33, verificou-se seletividade pelo alvo molecular em ensaios celulares. Além disso, a preparação de anticorpo #33 também apresentou bons resultados em ensaios funcionais demonstrando potencial imunomodulatório (Figura 107). Adicionalmente a caracterização funcional, também foi efetuado ensaios de caracterização estrutural. A estrutura primária dos clones #33 e #93 foi sequenciada por espectrometria de massas, apresentando cerca de 90% de cobertura em comparação à sequência esperada para o anticorpo de referência Opidivo.

Foram observamos bons resultados no ensaio DLS, mostrando baixos níveis de agregados para ambos os clones. No perfil de estrutura secundária, observou-se melhor potencial do clone #93, com resultados comparáveis ao anticorpo referência, por dicroísmo circular. No momento, a equipe se prepara tecnicamente para prosseguir com ensaios de afinidade por termoforese, dando continuidade à caracterização funcional com este clone #93.



jurkat	*	*	*	*
MDA-231		*	*	*
opidivo			*	
LNBio				*

Figura 107 Ensaio de citometria de fluxo para avaliar efeito imunomodulatório de anticorpos anti-PD1. O efeito é indicado pela expressão da citocina Interferon gama (IFNg), produzida em células linfocitárias. Neste ensaio incubamos células tumorais MDA-MB-231, que expressam o ligante PDL1, com células linfocitárias JURKAT, que expressam o receptor PD1. A interação de PDL1 com PD1 faz com que ocorra redução nos níveis de IFNg produzidos pela célula JURKAT. Se um anticorpo anti-PD1 bloquear a interação PD1/PDL1, deve ocorrer o resgate na expressão de IFNg, o que observamos na presença do Opidivo (anticorpo referência) e também na presença do candidato biossimilar do LNBio (clone#33).

/

Subprograma Métodos aplicados à Descoberta e Desenvolvimento de Fármacos

A plataforma de descoberta de fármacos do LNBio-CNPEM visa entregar moléculas fármaco-candidatas (candidato) para avaliação pré-clínica e clínica no processo de desenvolvimento e reposicionamento de fármacos. Para entregar os fármacos-candidatos, a plataforma de descoberta de fármacos do LNBio-CNPEM opera um fluxo de trabalho modular, operando em estratégias fenotípicas e baseadas em alvo. A plataforma também traz diferenciais proporcionados pela infraestrutura e métodos disponíveis e desenvolvidos no CNPEM. Outro diferencial é o uso de compostos da biodiversidade brasileira, em abordagem de descoberta e desenvolvimento de fármacos a partir de produtos naturais. Neste caso, métodos e processos desenvolvidos e/ou implementados no CNPEM trazem, aliado à diversidade química única dos produtos naturais, grandes diferenciais competitivos à plataforma (Figura 108).

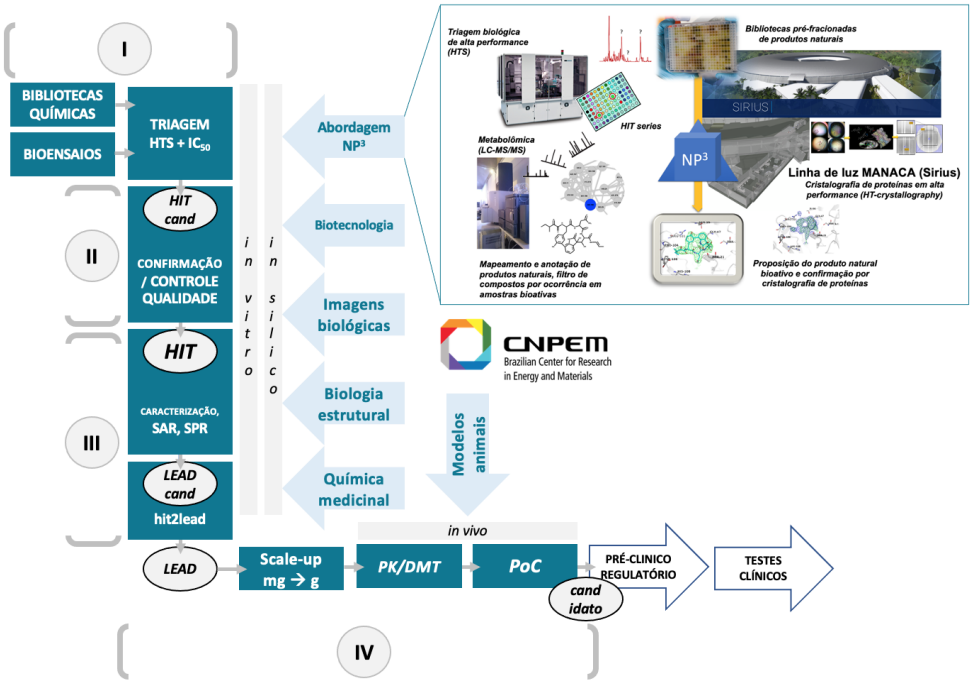


Figura 108 Fluxo de trabalho na plataforma de Drug Discovery do LNBio por módulo. Está evidenciado a descoberta de moléculas de partida (hits), sua caracterização e otimização em um candidato a molécula líder (lead) e sua validação em um fármaco-candidato (candidato), para a área terapêutica do projeto. SAR: structure-activity relationship; SPR: structure-property relationship; PK: pharmacokinetics; MTD: maximum tolerated dose; PoC: prova de conceito/eficácia in vivo. No inset é mostrada a abordagem LNBio-CNPEM para a descoberta de novas substâncias químicas bioativas partindo de bibliotecas de produtos naturais únicas, e usando alta tecnologia para desvendar os produtos naturais bioativos e seus sítios de ligação à proteína alvo. Estas são informações chave para o desenvolvimento de fármaco-candidatos atualmente.

Durante este ano de 2021, foram realizadas implementações de métodos analíticos ainda ausentes na plataforma, investimentos na infraestrutura para a produção e gestão de moléculas naturais e sintéticas e na estruturação de bases de armazenamento e mineração de dados. Destacam-se as implementações no contexto de ensaios ADME-Tox *in vitro*, como os ensaios de citotoxicidade e metabolismo descritos a seguir.

Nos **ensaios de citotoxicidade,** compostos selecionados por busca através de ensaios bioquímicos com proteínas alvo purificadas devem ser subsequentemente avaliados pela maneira como impactam o comportamento celular, tais como seu efeito direto na proliferação e toxicidade para diferentes tipos celulares. A técnica do *High Content Analysis* envolve microscopia de fluorescência automatizada acoplada a *software* para quantificação de parâmetros celulares. Por exemplo, podem ser analisados simultaneamente, e visualmente, dados de toxicidade tais como fragmentação nuclear, massa mitocondrial, alteração no tamanho celular e nuclear, aumento de porosidade de membrana e estresse oxidativo, oferecendo dados estatísticos robustos e completos sobre a ação do composto em análise.
Desta maneira, fatores como cardiotoxicidade, hepatotoxicidade, neurotoxicidade, entre outros, altamente relacionados a falhas em um processo de descoberta de novos fármacos, podem ser precocemente identificados em ensaios celulares. Estudos como estes podem diminuir a quantidade de compostos *hit* que são enviados a estudos pré-clínicos, diminuindo o uso de animais, e aumentando a taxa de sucesso na obtenção dos fármacos-candidatos.

Para tanto, dois protocolos estão sendo desenvolvidos para análise multiplex de citotoxicidade: Ensaio # 1 contempla marcações nucleares, mitocondriais, de porosidade de membrana e apoptose; Ensaio # 2 contempla marcações nucleares, de estresse oxidativo, de porosidade de membrana e apoptose.

A linhagem celular HaCat (queratinócitos humano imortalizados) está sendo empregada para padronizar os ensaios Multiplex de Citotoxicidade #1 e #2 (Figura 109). Além desta linhagem referência, foram também realizados investimentos na composição de um banco de células certificadas (vide Tabela 2) para ensaios de citotoxicidade em células representativas dos principais tecidos humanos. Este banco de células é também empregado na composição de modelos celulares preditivos de eficácia clínica empregados nos diversos projetos de Descoberta de Fármacos do LNBio, incluindo os envolvendo infeções virais.

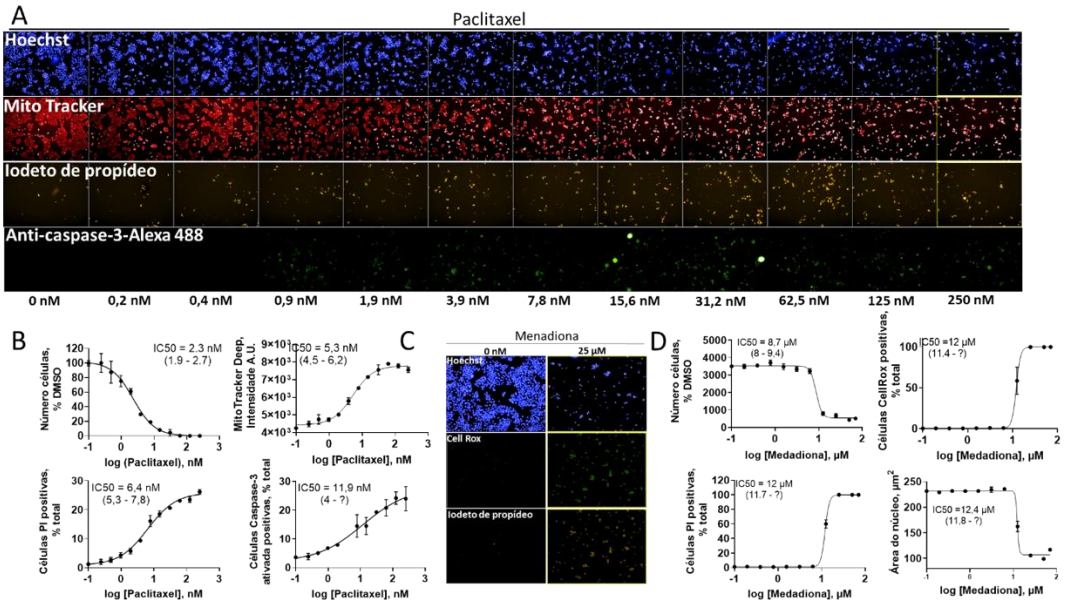


Figura 109 Ensaios multiplex de citotoxicidade em implementação na plataforma de descoberta de fármacos do LNBio/CNPEM. (A) Microscopia de fluorescência de células HaCat tratadas com paclitaxel nas concentrações indicadas. Núcleos celulares foram corados com Hoescht para contagem de núcleos, MitoTracker Deep Red foi usado para coloração de mitocôndrias e definição de massa mitocondrial, PI para identificação de células necróticas e anti-caspase 3-Alexa 488 para marcação de células apoptóticas. (B) ajuste sigmoidal da relação concentração-resposta de paclitaxel e os parâmetros celulares apresentados em (A). (C) Microscopia de fluorescência de células HaCat tratadas com menadiona. Imagens de apenas controle e concentração máxima são apresentadas. Núcleos celulares foram corados com Hoescht para contagem de núcleos, Cell Rox foi usado para identificar células em estresse oxidativo e PI para identificação de células (D) ajuste sigmoidal da relação concentração-resposta de menadiona e os parâmetros celulares apresentados em (C).

CÉLULA	TECIDO REPRESENTATIVO	TIPO
HaCat	pele	queratinócito
HCT-116	intestino	câncer colon, epitelial
Calu-3	pulmão	adenocarcinoma, epitelial
Caco-2	intestino	câncer colon, epitelial
H9C2	coração	miocárdio (rato), mioblasto
HK-2	rim	papiloma, cortex, tubo proximal
SH-SY5Y	neural	neuroblastoma, medula
Hep G2	fígado	carcinoma hepatocelular

Tabela 2 Painel de células representativas dos principais tecidos humanos em implementação no LNBio.

Ensaios ADME *in vitro*

O sucesso clínico de um candidato a fármaco depende também de diversas propriedades que devem ser determinadas em estágios iniciais da fase pré-clínica. Propriedades estas conhecidas pelo acrônimo ADME, onde A significa absorção, D distribuição, M metabolismo e E eliminação. Assim, estes parâmetros fornecem informações relevantes sobre o composto estudado e se este possui as propriedades de fármaco desejadas para um *lead*. Desta forma, antes da administração *in vivo*, estes ensaios *in vitro*, que são relativamente rápidos, podem servir como indicadores e pautar as tomadas de decisão, uma vez que os processos de ADME determinam a concentração e o tempo despendido das moléculas do fármaco no seu local de ação. Para avaliar esses diversos parâmetros de ADME, tanto em modelos *in vitro* quanto *in vivo*, é necessário desenvolver métodos analíticos e bioanalíticos capazes de identificar e quantificar a molécula e seus produtos de biotransformação em matrizes complexas.

Os principais ensaios previstos para implementação são ilustrados na Figura 110. No ano de 2021 deu-se enfoque na implementação de ensaios de metabolismo *in vitro* (Figura 110**E**).

Metabolismo *in vitro*: O metabolismo e a excreção do composto são fundamentais para a determinação da dose administrada tanto na fase pré-clínica quanto clínica, pois impacta diretamente no tempo de meia-vida. A identificação dos metabólitos também é importante pois auxilia na compreensão do mecanismo de ação do composto assim como de potenciais efeitos colaterais. O metabolismo geralmente ocorre no fígado pela família das enzimas CYP450. Esses ensaios de estabilidade metabólica, identificação e caracterização do perfil metabólico são realizados utilizando fontes de enzimas (microssomas) e são analisados em UPLC/HR-MS (Figura 110E). A produção *in-house* de microssomas hepáticos foi padronizada assim como o processo para avaliação da taxa de metabolismo e identificação de metabólitos (Figura 110**E**, gráfico com destaque em amarelo claro).

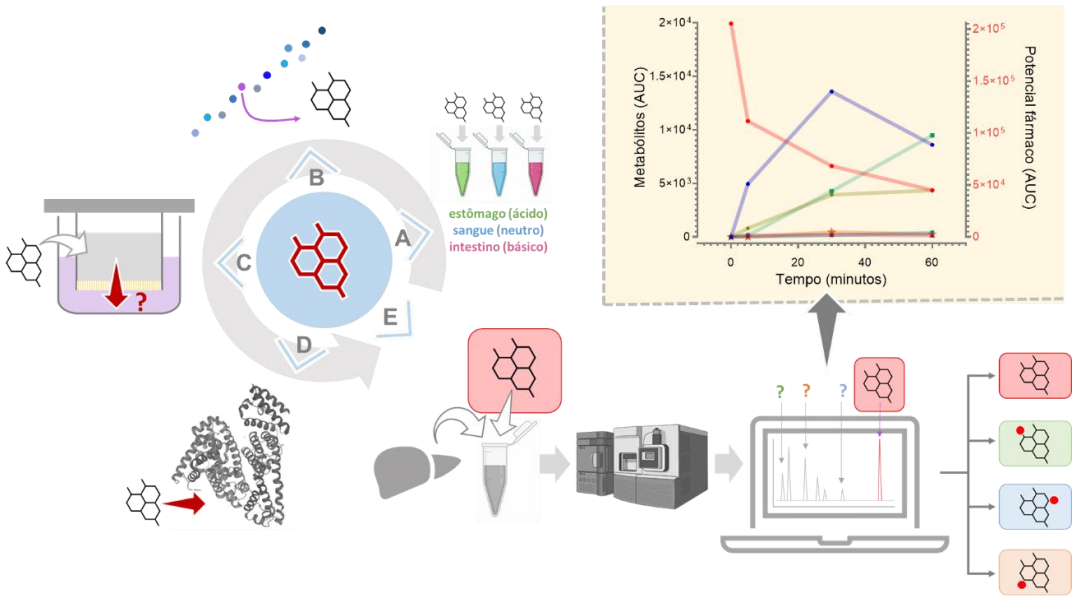


Figura 110 Ensaios in vitro para determinação de propriedades de ADME nas etapas da obtenção do lead. (A) Estimativa da estabilidade do composto em diversos pHs fisiológicos, (B) métodos cromatográficos para determinação da lipofilicidade (logP e logD), (C) avaliação da permeabilidade através de monocamada de células Caco-2, (D) determinação da fração livre através de ensaio de ligação à proteínas plasmáticas e (E) avaliação do metabolismo hepático utilizando-se microssomas com determinação da taxa de metabolismo e identificação dos metabólitos produzidos; em destaque na caixa amarela, uma molécula desenhada no LNBio sendo consumida pelas enzimas hepáticas (linha vermelha), originando seis metabólitos passíveis de identificação (linhas em outras cores). Métodos cromatográficos acoplados à sistemas de detecção são utilizados e otimizados para cada ensaio (A-E). A estrutura química apresentada é meramente ilustrativa.

Ferramentas de quimioinformática para a descoberta de produtos naturais bioativos

O projeto "NP³" visa o desenvolvimento de uma interface computacional capaz de integrar dados de *screening* de bibliotecas de produtos naturais, espectrometria de massas e cristalografia de proteínas para viabilizar a descoberta de fármacos a partir de produtos naturais da biodiversidade brasileira. Esse projeto, conta com o apoio do Instituto Serrapilheira desde 2018. Foram consolidados algoritmos para o tratamento de dados de espectrometria de massas, com aplicação direta na desreplicação e anotação de produtos naturais bioativos. O algoritmo, denominado "NP³ MS *workflow*", foi registrado no INPI (INPI BR 51 2021 000074-9) e disponibilizado para a comunidade científica[26] sob licença GNU - Figura 111.

26 https://github.com/danielatrivella/NP3_MS_Workflow

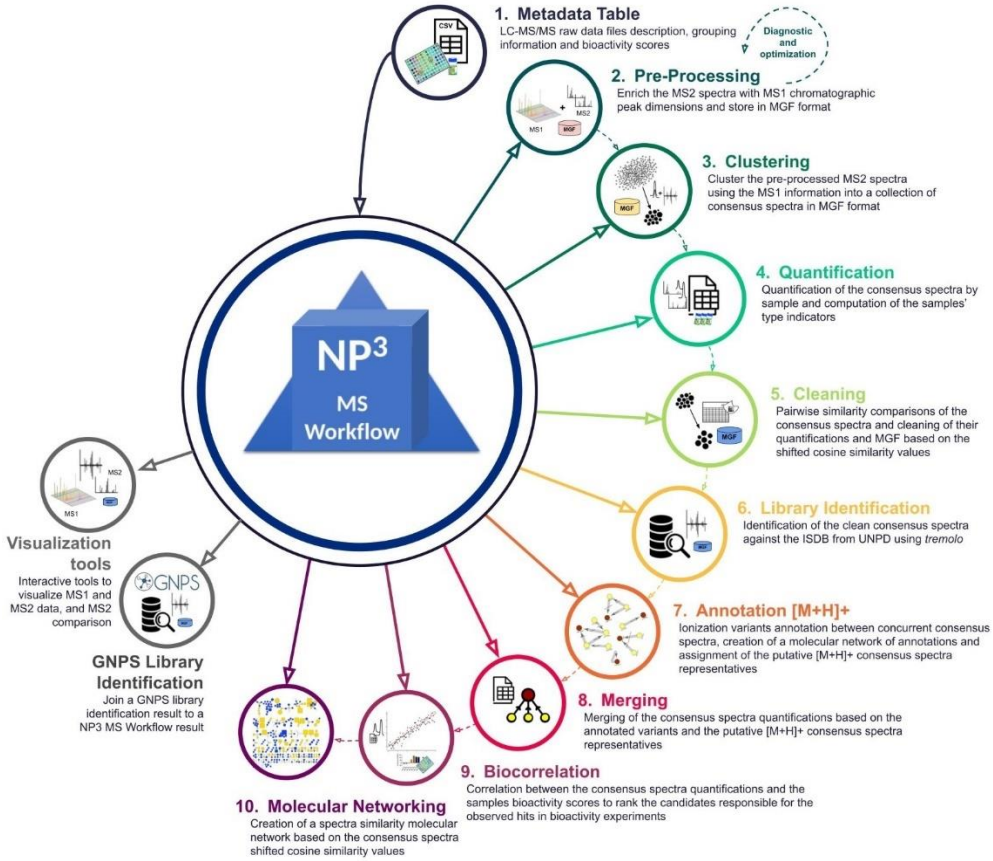


Figura 111 Representação esquemática do algoritmo NP3 MS workflow desenvolvido no CNPEM com o apoio do Instituto Serrapilheira.

Foi também publicado um primeiro artigo científico como estudo de caso de uso do algoritmo NP³ MS *workflow*27, onde é reportada a construção e análise de uma coleção de bactérias isoladas a altas profundidades oceânicas, uma coleção rara, que viabilizou a produção e acesso a novos produtos naturais para a descoberta de fármacos (Figura 112). Esta biblioteca piloto, denominada EPfB, foi integrada à biblioteca de produtos naturais do LNBio e o "NP³ MS workflow" vem sendo utilizado na rotina nos projetos do LNBio usando produtos naturais.

27 de Felício, R.; Ballone, P.; Bazzano, C.F.; Alves, L.F.G.; Sigrist, R.; Infante, G.P.; Niero, H.; Rodrigues-Costa, F.; Fernandes, A.Z.N.; Tonon, L.A.C.; et al. 2021. Chemical Elicitors Induce Rare Bioactive Secondary Metabolites in Deep-Sea Bacteria under Laboratory Conditions. Metabolites 11, 107. http://dx.doi.org/10.3390/metabo11020107.

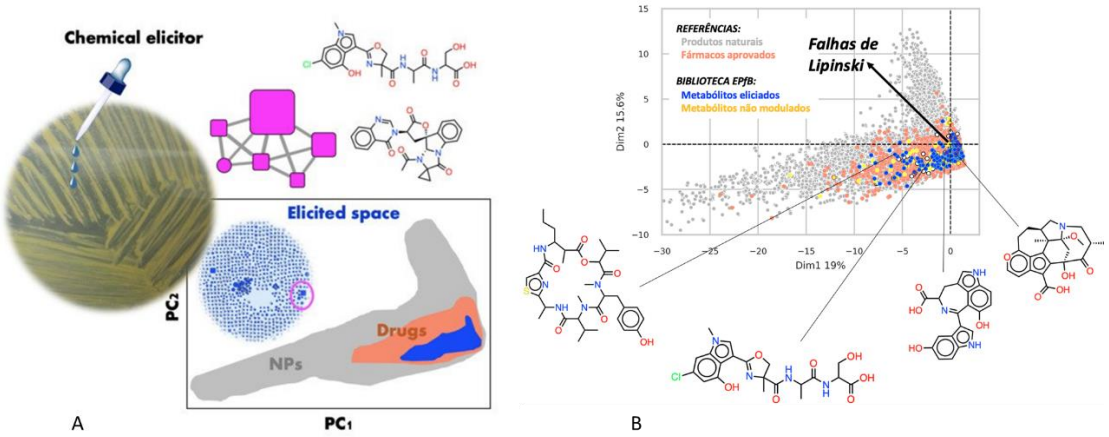


Figura 112 Construção e análise da biblioteca de produtos naturais bacterianos EPfB. (A) Representação esquemática da abordagem para eliciação química e (B) mapeamento do espaço química da biblioteca EPfB construída no LNBio-CNPEM a partir da coleção de bactérias de mar profundo da Universidade do Vale do Itajaí (Univali). As abordagens empregadas para a preparação e análise desta biblioteca foram publicadas em artigo científico na revista Metabolites no ano de 2021 [1]. Esta representa a primeira publicação empregando o algoritmo NP3 MS workflow desenvolvido no CNPEM.

Também em desenvolvimento na plataforma NP³ é o treinamento de modelo de rede neural profunda para a montagem automática de produtos naturais ligantes de proteínas, oriundos de dados de cristalografia de proteínas. Este módulo, denominado "NP³ ligands", já mostra mais de 60% de acurácia para identificação de ligantes e vem se tornando muito importante uma vez que a velocidade de coleta de dados na linha MANACÁ do SIRIUS já aumentou cerca de 10 vezes em relação à MX2-UVX e mais projetos de *drug discovery* estão partindo de moléculas naturais e usando os algoritmos NP³.

Ferramentas biotecnológicas para a descoberta de produtos naturais bioativos

Além da abordagem de eliciação química supracitada, novas abordagens experimentais voltadas aos produtos naturais bioativos também foram implementadas no LNBio no ano de 2021. Em colaboração com o LNBR, e por meio dos projetos NP³ (Serrapilheira) e plataforma metagenômica (FAPESP-FAPESC), já foi possível estabelecer as rotinas para clonagem e expressão de clusters gênicos biossintéticos bacterianos, viabilizando a produção de produtos naturais de interesse farmacêutico no CNPEM usando abordagem biotecnológica (Figura 113). Um manuscrito reportando a primeira clonagem de cluster gênico biossintético completo e funcional realizada no LNBio foi submetido para publicação e encontra-se em revisão por pares.

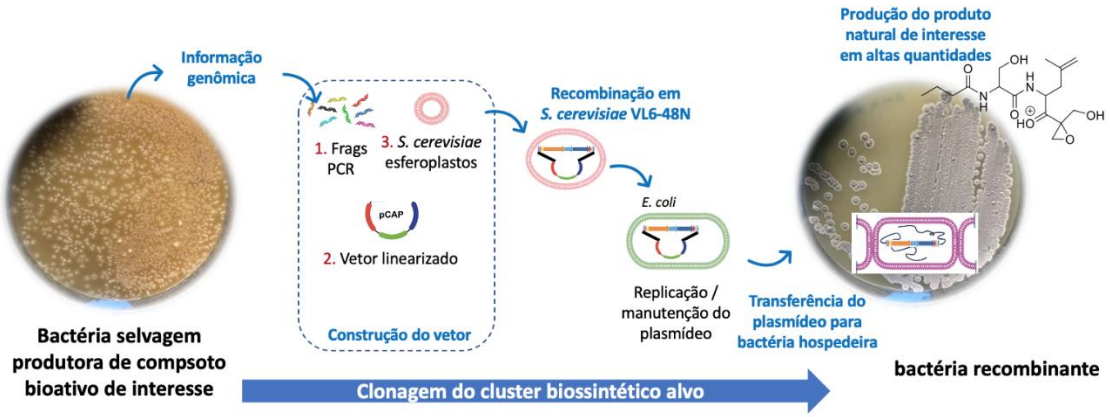


Figura 113 Representação esquemática da abordagem biotecnológica para clonagem de clusters gênicos biossintéticos implementada no LNBio para viabilizar a produção de produtos naturais de interesse farmacêutico.

Modelos Biológicos - Proteínas de membrana isoladas para estudos bioquímicos e estruturais

Em 2021, o LNBio, em colaboração com o LNNano, avançou na implementação de protocolos para a expressão, purificação, caracterização e realização de estudos estruturais com proteínas de membrana. Especial atenção é dada aos receptores acoplados à proteína G (GPCRs), que são alvos para aproximadamente 40% dos fármacos. Os desafios para extração, purificação e estabilização destas proteínas para estudos estruturais foram contornados com a utilização de abordagens na fronteira do conhecimento. Para a produção de GALR2, foram implementadas no LNBio as metodologias para cultivo de células de mamífero em suspensão. Para a extração foram utilizados polímeros de estireno anidrido maleico (SMA), que são capazes de extrair proteínas de membrana em partículas lipídicas circundadas por SMA (SMALPs). A metodologia de Native-PAGE foi implementada como última etapa da purificação de GALR2 resultou em amostras de melhor qualidade, reduziu o tempo de processamento da amostra de 2 semanas para 3 dias e aumentou os rendimentos em 5x aproximadamente em comparação com a purificação por técnicas cromatográficas convencionais. Uma coleta preliminar de dados de crio-EM foi realizada e está sob análise, a qual orientará a coleta de dados final, bem como a preparação de novas amostras de GALR2 para determinação da estrutura. A Figura 114 mostra as principais etapas de produção da proteína, controles de qualidade e as partículas em grades de crio-EM.

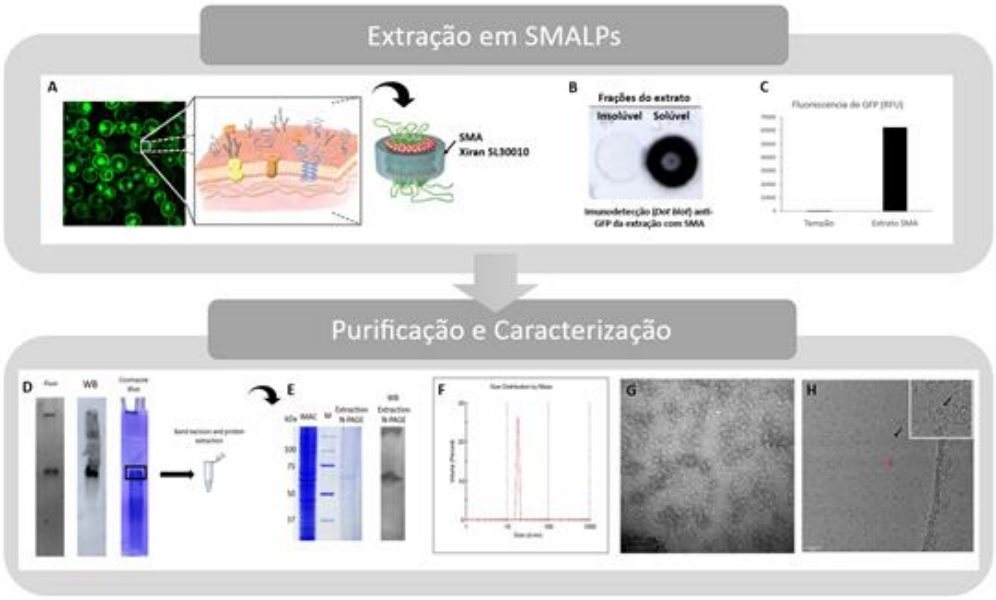


Figura 114 Expressão, purificação e caracterização de GALR2. (A) Extração de GALR2 em SMALPs. (B e C) Fração solúvel do extrato contendo o receptor. (D) Purificação por Native-PAGE e (E) SDS-PAGE de GALR2 purificado. (F e G) Controles de qualidade por DLS e NS-EM. (H) Imagens de crio-EM.

Subprograma Desenvolvimento de culturas 3D

A capacidade de construir biossistemas complexos, como tecidos e até mesmo órgãos completos, tem gradualmente se aproximado da realidade, conforme as tecnologias de microfabricação avançam. Modelos de estudos em culturas tridimensionais poderão ser utilizados na busca e no desenvolvimento de metodologias para testes ADMTox de fármacos, o que irá promover o desenvolvimento de tecnologias utilizando sistemas mais miméticos de um organismo humano, tanto para o desenvolvimento de novos fármacos, quanto para estudos iniciais de toxicidade, absorção e metabolização, reduzindo o número de animais de experimentação.

Neste contexto, a equipe de pesquisadores do LNBio vem se empenhando em desenvolver modelos de pele reconstituída, esferóides de tecido adiposo, esferóides de fígado e modelos de barreira intestinal e de epitélio pulmonar, utilizando células derivadas de linhagens imortalizadas e células primárias.

Nos modelos de tecido adiposo branco e marrom em esferoides, sendo o tecido adiposo branco diferenciado em tecido adiposo magro e obeso, as culturas 3D foram validadas através de comparações com tecido animal e bioensaios focando termogênese e lipólise foram padronizados. Por fim, o modelo de cultura de tecido adiposo foi transposto para células humanas e um modelo racional para o desenvolvimento e caracterização de culturas 3D, com controles de qualidade foi instituído no laboratório. Outro modelo desenvolvido foi o de cultura de pele reconstituída. Neste modelo a pele artificial contendo derme e epiderme foi montada e caracterizada para testes de produtos dermatológicos, além da caracterização de alvos importantes na composição, regeneração e manutenção da sua homeostase. Diversos ensaios para alvos de reepitelização foram definidos, com enfoque futuro em aprimorar o modelo através do uso de bioimpressão 3D visando o desenvolvimento de curativos dermatológicos. Também estão sendo desenvolvidos culturas 3d de fígado, epitélio pulmonar e barreira intestinal, focando o desenvolvimento de ensaios de toxicologia e outros métodos alternativos ao uso de animais, sendo que estas culturas estão caracterizadas e algumas delas sendo utilizadas em ensaios de

organs-on-chip. Novamente o enfoque futuro é aprimorar o modelo destes tecidos utilizando bioimpressão 3D.

Programa de Biologia Computacional

Dentre as principais linhas de pesquisa do programa de Biologia Computacional, destaca-se o desenvolvimento e aplicação de ferramentas baseadas em biologia computacional para resolver problemas biológicos (como análise de estruturas de moléculas, interações entre alvos biológicos e moléculas), bem como análises de dados gerados por estudos genômicos, transcriptômicos, proteômicos e metabolômicos. Além disso, o programa também prevê disponibilizar tais ferramentas para pesquisadores internos e para a comunidade cientifica e empresarial brasileira. No âmbito do Programa de Computação Científica, o LNBio tem realizado colaborações científicas com outros Laboratórios do CNPEM, e com outros grupos de pesquisa do Brasil e do exterior.

A linha de pesquisa **"Predição e análise estrutural de biomacromoléculas"** tem como principal objetivo a construção de modelos estruturais de alta qualidade de proteínas e seus complexos com outras macromoléculas e com pequenas moléculas. O programa de biologia computacional historicamente tem um especial interesse no entendimento da interação entre proteínas quinases e seus substratos, dado o papel chave que essas proteínas exercem na regulação dos mais diversos processos biológicos. Nesse sentido, em colaboração com a Dra. Deborah Schechtman da Universidade de São Paulo, nesse ano investigamos, do ponto de vista estrutural, a interação da proteína quinase TrkA e seu substrato PLCg1, culminando com a identificação de um peptídeo derivado dessa quinase com potencial ação analgésica (*Figura 115*). O artigo científico oriundo desse estudo está atualmente em fase de revisão final em periódico internacional.

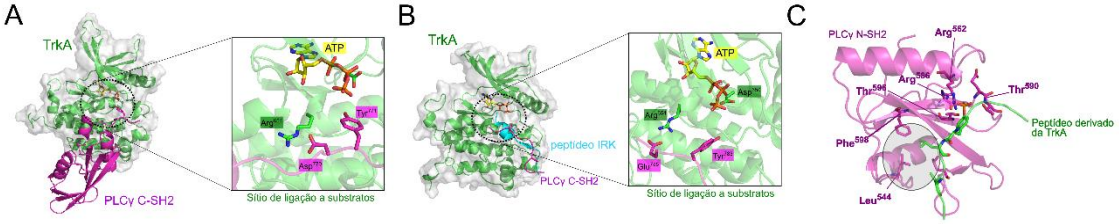


Figura 115 Modelos estruturais da interação da proteína quinase TrkA com seu substrato PLCg1. (A) e (B) Modelos estruturais obtidos por modelagem molecular computacional da interação entre TrkA (em verde) e os domínio C-SH2 (em A) e N-SH2 (em B), respectivamente, da proteína PLCg1 (em magenta). Essas interações acarretam fosforilação desses domínios. Em destaque são apresentados resíduos importantes para essa interação. Em B, está apresentado também a interação entre um peptídeo derivado da quinase IRK (em azul) e a TrkA (em verde). (C) Modelo estrutural da interação entre o domínio N-SH2 da proteína PLCg1 (em magenta) e um peptídeo derivado da TrkA com propriedades analgésicas (em verde). Os resíduos que participam da interação estão evidenciados.

A linha de pesquisa "**Desenvolvimento de algoritmos computacionais em biologia molecular"** tem como principal enfoque o desenvolvimento de programas e protocolos de análises para sistemas orgânicos e bio-orgânicos em nível atomístico. Nessa linha de pesquisa, a equipe implementou e distribuiu o parKVFinder (https://github.com/LBC-LNBio/parKVFinder)28, um *software* desenvolvido *in-*

28 Guerra, J.V.S.; Ribeiro-Filho, H.V.; Bortot, L.O., Honorato, R.V.; Pereira, J.G.C.; Lopes-de-Oliveira, P.S. 2020. ParKVFinder: A thread-level parallel approach in biomolecular cavity detection. SoftwareX, 12:100606, doi:10.1016/j.softx.2020.100606.

house para detecção e caracterização de cavidades em estruturas biomoleculares, como um serviço (*Software as a Service* - SaaS), denominado KVFinder-web. O KVFinder-web é composto por um serviço web RESTful (https://github.com/LBC-LNBio/KVFinder-web-service) e um cliente gráfico do PyMOL v2 (https://github.com/LBC-LNBio/PyMOL-KVFinder-web-Tools). Este serviço visa eliminar barreiras técnicas enfrentadas por usuários menos experientes do ponto de vista computacional, que comumente enfrentam dificuldades na instalação e configuração de programas *standalone*, e usuários afetados por recursos computacionais limitados. Atualmente, o serviço *web* público está disponível em http://parkvfinder.cnpem.br, juntamente com a documentação completa. Alternativamente, os usuários podem configurar localmente um serviço KVFinder-web em sua instituição de pesquisa ou ensino.

Ainda na linha de estudo e detecção de cavidades em biomoléculas, foi implementado um pacote Python, denominado pyKVFinder (https://github.com/LBC-LNBio/pyKVFinder), com rotinas aprimoradas e otimizadas do parKVFinder, o qual se aproveita da interoperabilidade do ecossistema Python. No contexto de ciência de dados, o pacote abstrai as cavidades detectadas e suas caracterizações em matrizes multidimensionais (ndarrays) em NumPy, possibilitando a integração com pacotes científicos, como SciPy e scikit-learn, e bibliotecas de terceiros, para cálculos matemáticos, análises estatísticas e visualização tridimensional. Concomitantemente, novas caracterizações moleculares (*Figura 116*) foram implementadas, como distribuição de resíduos de interface, profundidade e hidrofobicidade, contribuindo para o estudo acerca de sua função e interações do sítio de ligação; assim, auxiliando na descoberta e melhoramento de fármacos. A caracterização de hidropatia foi aplicada para comparar sítios de ligação em alfavírus relacionados [29]. Ainda, estas caracterizações também foram aplicadas para estudo e comparação em proteínas relacionadas com o domínio ADRP do SARS-CoV-2, que está em processo de revisão em periódico internacional.

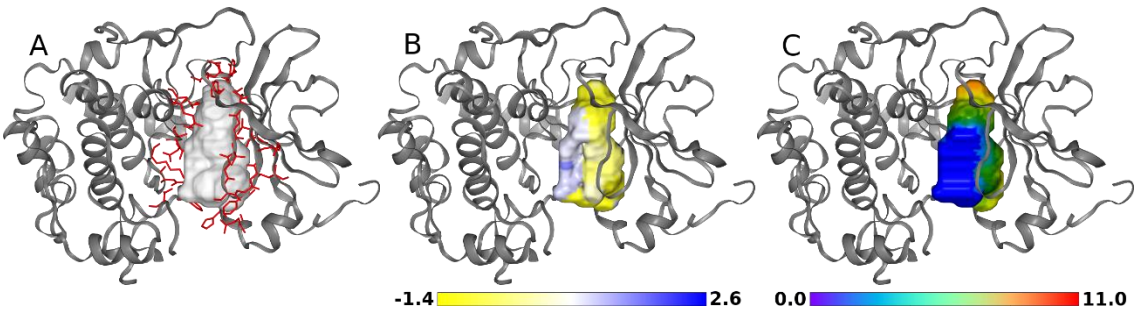


Figura 116 Detecção e caracterização molecular de uma proteína pelo pyKVFinder. (A) Resíduos de interface (vermelho) ao redor da cavidade (branco). (B) Escala de hidrofobicidade "Eisenberg & Weiss" dos resíduos de interface projetada na superfície da cavidade. (C) Profundidade dos pontos de cavidade. Estas visualizações foram produzidas usando a ferramenta NGLView pelo Jupyter Notebook.

Na linha de biologia integrativa, o projeto de pesquisa **"Utilização de métodos de aprendizado profundo para a detecção de novos alvos terapêuticos e biomarcadores"** conta com a parceria com os Drs. John Blangero e Marcio Almeida da University of Texas Rio Grande Valley para análise genética de populações afetadas por diabetes e síndrome metabólica. Em 2021 o modelo passou por modificações que resultaram em melhorias significativas em relação às diversas métricas calculadas. Na fase atual a

29 Ribeiro-Filho, H.V.; Coimbra, L.D.; Cassago, A. et al. 2021. Cryo-EM structure of the mature and infective Mayaro virus at 4.4 Å resolution reveals features of arthritogenic alphaviruses. Nature Communications, 12:3038. doi:10.1038/s41467-021-23400-9.

equipe está analisando os resultados e extraindo informações do modelo para relacionar esses dados numéricos ao significado biológico (*Figura 117*). Os objetivos são obter, além de um método de predição do risco genético de desenvolvimento de diabetes tipo 2, uma compreensão de possíveis alvos terapêuticos e suas vias metabólicas.

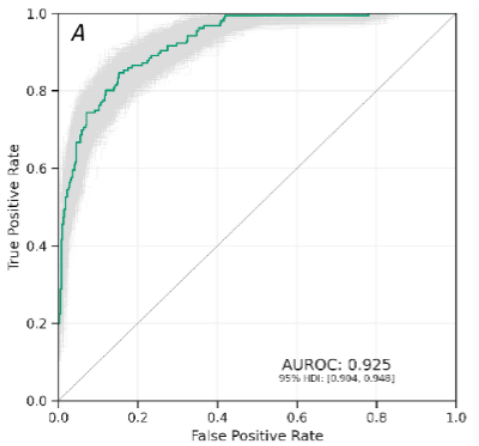


Figura 117 Resultado de teste do modelo e exemplos de predição do risco de desenvolvimento de diabetes tipo 2. Gráfico da curva ROC e valor da área sob a curva AUROC obtidos pelo modelo no conjunto de teste com 550 indivíduos.

Pode-se observar na Figura 118 uma visão geral do método de *Virtual Screening* criado pelo grupo de Biologia Computacional do LNBio. A grande inovação do processo é a utilização do método de fronteiras de Pareto, que permite a utilização de parâmetros múltiplos otimizados na seleção das melhores moléculas. Neste caso, os parâmetros utilizados foram a energia livre do complexo em x e a eficiência que nada mais é do que a energia livre dividida pelo número de átomos exceto hidrogênios. Esta seleção permitiu a escolha de uma maior diversidade funcional de compostos. Na primeira linha da figura resume o processo de *docking* molecular a partir da escolha de um alvo, realiza-se uma amostragem conformacional por dinâmica molecular e cada uma das conformações é varrida por uma biblioteca de compostos para a geração das melhores poses que são selecionadas pelas melhores fronteiras de Pareto. Em seguida as melhores poses/moléculas são submetidas a uma dinâmica molecular de refinamento que avaliará a estabilidade do complexo eliminando falsos-positivos do *docking*. Por fim, as moléculas verdadeiro-positivas são ordenadas por estimavas de energia livre e serão testadas em ensaios bioquímicos.

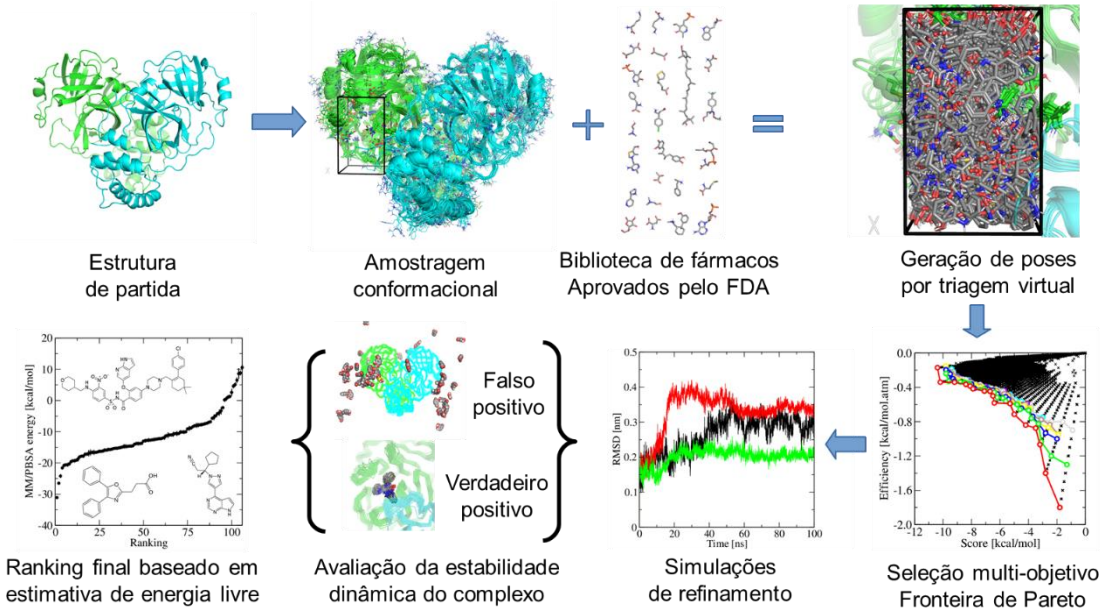


Figura 118 Visão geral do método de Virtual Screening.

Seção especial força tarefa Covid-19

Apesar da significativa melhora no cenário epidemiológico e o Brasil ser um dos países com maior taxa da população vacinada, a situação atual da pandemia ainda é preocupante e óbitos continuam sendo registrados. Diante disso, a força-tarefa Covid-19 organizada em 2020 no LNBio continuou se dedicando à busca por fármacos antivirais, ao desenvolvimento de meios de diagnóstico da Covid-19 e ao entendimento de mecanismos biológicos envolvidos na infecção pelo vírus SARS-CoV-2. O projeto "**Reposicionamento de fármacos e biologia estrutural do SARS-CoV-2**" financiado pelo MCTI por meio da FINEP trouxe ao LNBio recursos adicionais para que os profissionais continuassem com suas pesquisas. Os resultados abaixo refletem o esforço e o empenho de nossos pesquisadores no aprofundamento do conhecimento da biologia da infecção pelo SARS-CoV-2.

Reposicionamento e descoberta de fármacos - Desenvolvimento de ensaios baseado em alvos virais

A plataforma de descoberta de fármacos do LNBio-CNPEM vem sendo empregada no desenvolvimento de projetos de descoberta e desenvolvimento de fármacos em conjunto com a Indústria nacional (vide Eixo 3) e com a Academia. Em decorrência da pandemia Covid-19 a plataforma vem sendo também amplamente empregada para a busca de antivirais no combate ao vírus SARS-CoV-2.

Em 2021, o LNBio avançou na implementação das metodologias para expressão de proteínas em células de mamíferos aplicada a projetos de P&D *in-house* (Expressão de proteínas de membrana – GALR2). Esta mesma tecnologia foi utilizada para produção de proteínas humanas e de SARS-CoV-2, no intuito de triar fármacos que atuem no processo da infecção viral. Para tanto, as proteínas ACE2 humana e a porção RBD da Proteína S de SARS-CoV-2 foram produzidas e purificadas na forma solúvel, e a funcionalidade do complexo foi confirmada por microscopia confocal e ensaios de interação proteína-proteína, como mostrado na *Figura 119*. A equipe segue com as otimizações necessárias para transposição do ensaio para formato HTS (*high throughput screening* ou triagens de alto desempenho).

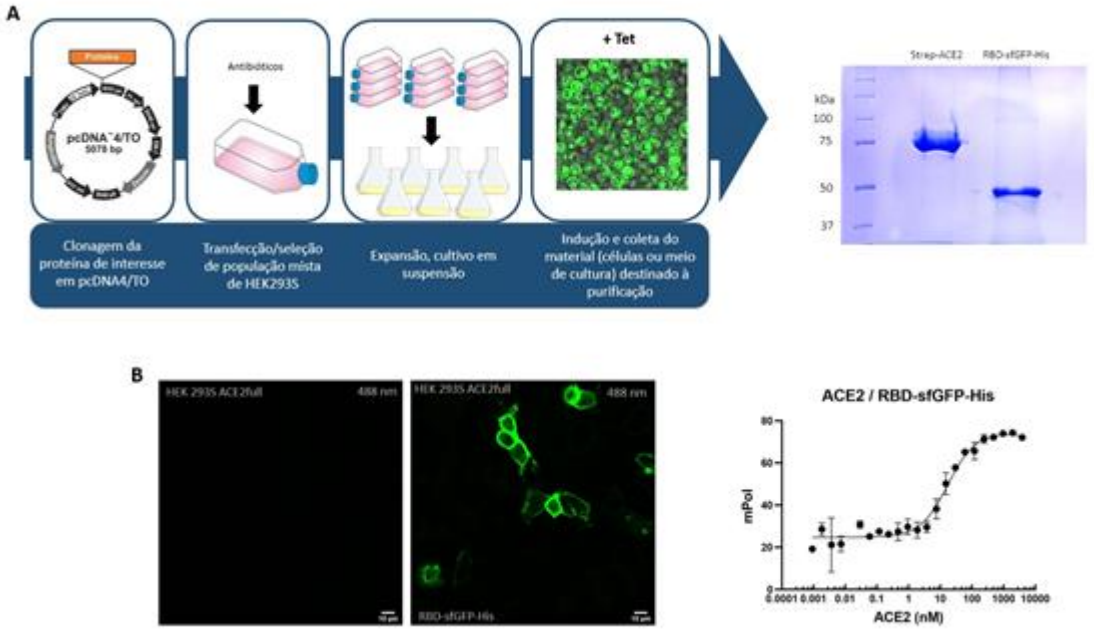
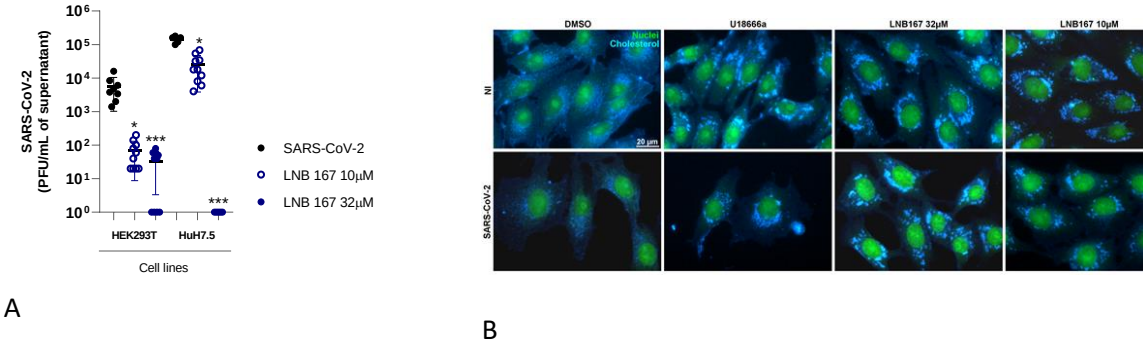


Figura 119 Proteínas ACE2 humana e RBD da Proteína S de SARS-CoV-2. (A) Fluxograma da produção das proteínas em células de mamíferos e purificação. (B) Ensaios funcionais de ligação ACE2-RBD por microscopia confocal (esquerda) e polarização (direita).

Ainda sobre este projeto, no tocante aos experimentos com SARS-CoV-2 infectivo em ambiente de biossegurança nível 3 (NB3), foram finalizadas as campanhas de triagem da biblioteca de compostos da *Medicines for Malaria Venture* (MMV). A triagem original de 400 compostos levou à identificação de um composto com ação anti-SARS-CoV-2 em múltiplos tipos celulares. Em continuidade à parceria com a MMV, solicitou-se uma nova série de compostos químicos derivados do composto hit original. Essa nova série química de 40 compostos foi triada, resultando na identificação e validação de um novo composto em culturas de células. Este novo composto tem maior potência em células Calu-3, derivadas de epitélio alveolar humano e consideradas o melhor modelo em cultura de células para avaliação de compostos contra SARS-CoV-2. Esses resultados estão em processo de submissão em revistas científicas internacionais com revisão pelos pares.

Os estudos com o composto LNB167, um composto esteroidal desenvolvido por pesquisadores do LNBio/ CNPEM, indicaram sua capacidade em reduzir a replicação de SARS-CoV-2 em cultura de células humanas. Experimentos mecanísticos e de virologia básica indicaram que as propriedades anti-SARS-CoV-2 de LNB167 estão associadas à capacidade do composto em modular o colesterol e lipídeos de membrana em células hospedeiras, especialmente em fases iniciais do ciclo de replicação viral (*Figura 120*). Experimentos visando a caracterização dos efeitos do composto sobre a biologia de SARS-CoV-2 também foram realizados e mostraram que o tratamento com LNB167 induz mutações em proteínas estruturais transmembranares. Por fim, manuscritos derivados de ambos os trabalhos se encontram em fase de submissão à periódicos acadêmicos internacionais.



A B

Figura 120 Figura 33. Atividade anti-SARS-CoV-2 do composto esteroidal LNB167 desenvolvido no LNBio. Culturas de células humanas HEK293T ou HuH7.5 foram infectadas com SARS-CoV-2 em ambiente de biossegurança nível 3 (NB3) e tratadas ou não com o composto esteroidal LNB167 nas concentrações de 10 ou 32 μM. (A) A mensuração da carga viral no sobrenadante de cultura indica que a replicação do SARS-CoV-2 foi reduzida pelo tratamento com LNB167 em uma maneira dose-dependente, impedindo a replicação do vírus em até 10000 vezes em relação ao controle. (B) Estudos em cultura de células Vero CCL81 sobre o mecanismo de ação do composto LNB167 indicam que o mesmo altera lipídeos de membrana e colesterol, componentes celulares necessários à replicação do SARS-CoV-2. Na figura, observa-se que o tratamento com LNB167 resulta na formação de pontos de colesterol na célula, de maneira similar ao composto controle U18666A. Esses pontos não estão presentes no controle (DMSO) e são observados em células tratadas com LNB167 na presença ou ausência de infecção.

Biologia Estrutural do SARS-CoV-2

No âmbito do projeto de reposicionamento de fármacos para a COVID-19, financiado pela FINEP, deu-se continuidade ao trabalho de produção das proteases 3CL e PL-Pro, assim como da proteína nucleocapsídeo (N) do vírus SARS-Cov-2, as quais foram utilizadas em estudos estruturais e ensaios bioquímicos para triagens de fármacos. Destaca-se no período a resolução das estruturas cristalográficas da protease PL-Pro e do domínio C-terminal da proteína N do vírus SARS-Cov-2 na presença de ligantes (*Figura 121*). Além disso, confirmou-se, por técnicas de RMN, a interação da proteína N com um fármaco identificado nos ensaios bioquímicos em larga escala.

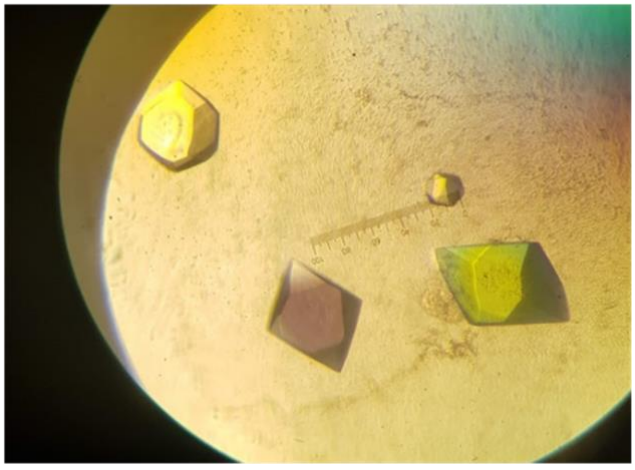


Figura 121. Cristais da protease PL-Pro do vírus SARS-CoV-2.

Investigações imunológicas do SARS-CoV-2

Desde o início da pandemia, a compreensão imunológica contra o SARS-CoV-2 tem sido investigada em diferentes perspectivas. Durante esse período, a equipe de Imunologia Molecular e Engenharia de Anticorpos do LNBio teve participação expressiva na força tarefa Covid-19 do CNPEM, desenvolvendo VLPs de SARS-CoV-2, imunoensaios para detecção de anticorpos antivirais, estudos de correlação de resposta humoral e celular na infecção por SARS-CoV-2 e imunidade protetora. Os esforços dessa iniciativa originaram o estabelecimento de uma plataforma denominada PIMEA (Plataforma de Imunologia e Engenharia de Anticorpos), que tem como objetivo a obtenção de anticorpos para novos alvos virais e desenvolvimento de imunoensaios que podem ser aplicados para pesquisa e diagnóstico.

As VLPs ou *vírus-like particles*, são partículas defectivas que apresentam o envelope do vírus SARS-CoV-2 e carecem de genoma. Dessa forma, as partículas têm alto nível de segurança e podem ser consideradas como risco biológico I, não patogênico e não infeccioso, podendo ser manipuladas em laboratórios de baixo nível de contenção biológica, em experimentos para o estudo de biologia estrutural e desenvolvimento de imunoensaios, dentre outros. No laboratório do LNBio, foi desenvolvido um sistema de produção baseado na transfecção de plasmídeos codificantes de 4 proteínas estruturais virais (N,E,M e S), em cultura de células humanas HEK293. Essas proteínas, expressas, originam a montagem da partícula, que é coletada e purificada. Ensaios administrando VLPs para animais foram efetuados e verificou-se que estas partículas induziram resposta de anticorpos contra proteínas virais de SARS-CoV-2. Também foi observado, em ensaios de microscopia eletrônica no Laboratório Nacional de Nanotecnologia do CNPEM (LNNano), que estas partículas apresentavam morfologia similar a do coronavírus MHV3, risco I, utilizado como controle em nossos experimentos (*Figura 122*). Neste momento protocolos para enriquecimento e purificação das partículas estão sendo aprimorados, viabilizando posteriores estudos de biologia estrutural.

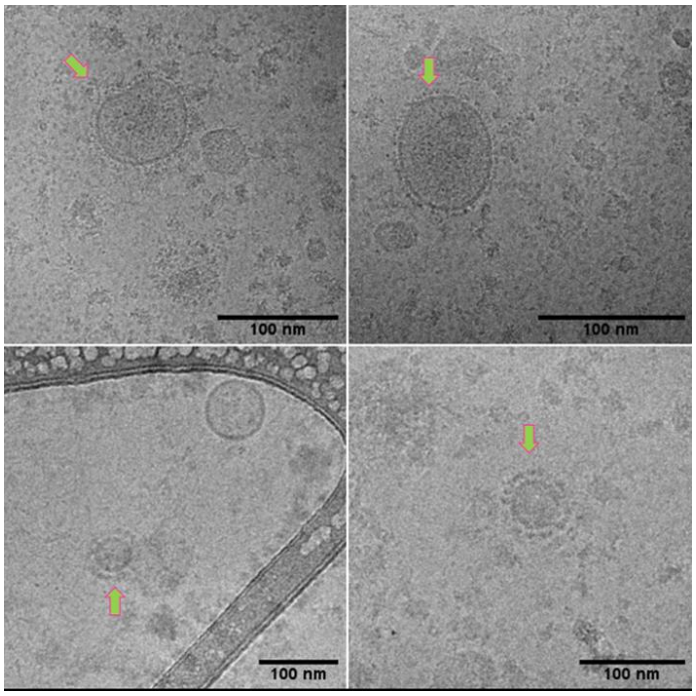


Figura 122. Ensaio de microscopia eletrônica para visualização de VLPs. As VLPs produzidas foram analisadas por criomicroscopia eletrônica. Os painéis mostram partículas indicadas nas setas amarelas, com a morfologia característica de coronavírus.

Em uma segunda frente de pesquisa, foi desenvolvido um ensaio para avaliar interação do sítio de ligação viral do *spike* (RBD) com o receptor ACE2. A interação da proteína de envelope *spike* viral com o receptor celular ACE2 é uma via muito importante para infecção viral. Com o objetivo de viabilizar estudos em menor risco de contenção biológica, idealizou-se uma estratégia de gerar uma proteína quimérica contendo o domínio de ligação do *spike* (RBD) fusionado à uma proteína repórter (GFP). Dessa forma, a proteína RBD-GFP pode se ligar a proteína *spike* solúvel, ou mesmo ser expressa na superfície de uma célula, podendo ser detectada em diferentes ensaios analíticos. A proteína foi produzida, sendo o objetivo principal a utilização dessa estratégia para avaliar candidatos inibidores da interação do RBD viral com seu alvo celular, ou mesmo utilização do ensaio para avaliar soroneutralização e neutralização por anticorpos monoclonais. Atualmente ensaios analíticos estão sendo desenvolvidos para utilização da proteína recombinante.

A equipe também teve resultados promissores na transferência de tecnologia para detecção de anticorpos antivirais. Antígenos de SARS-CoV-2, para proteínas N e 3CL, foram gerados, e posteriormente imunoensaios para detecção de anticorpos virais foram desenvolvidos, otimizados e a tecnologia foi transferida e implementada no Instituto Dante Pazzanese de São Paulo. A interação com o time do Dante também resultou num estudo com amostras clínicas para entendimento da imunidade humoral em indivíduos convalescentes, publicado na revista *Frontiers in Immunology* [30]. A tecnologia de imunoensaios também foi transferida para representantes da Biotec Amazônia, bem como treinamento de um pesquisador que veio ao CNPEM. Em adição aos ensaios desenvolvidos com antígenos gerados no CNPEM, também obtivemos a proteína do *Spike Viral,* cedida pela prof. Dra. Leda Castilho da

30 Peroni, LA, Toscaro, JM, Canateli, C, Tonoli, CCC, de Olivera, RR, Benedetti, CE, Coimbra, LD, Pereira, AB, Marques, RE, Proenca-Modena, JL, Lima, GC, et al. (2021). Serological Testing for COVID-19, Immunological Surveillance, and Exploration of Protective Antibodies. Front Immunol 12, 635701. 10.3389/fimmu.2021.635701.

UFRJ, que possibilitou a geração de um imunoensaio de baixo custo, para detecção de anticorpos antivirais, divulgado no repositório medRxiv [31] para disponibilização imediata à comunidade científica. Com a expertise adquirida neste último ano, em conjunto com Plataforma de Nanobiologia e Dispositivos Diagnósticos do LNBio, está sendo desenvolvido um ensaio para detecção de antígeno viral do SARS-CoV-2 em saliva, que poderá originar um teste rápido.

A equipe de Imunologia e Engenharia de Anticorpos do LNBio foi responsável pela investigação de aspectos da imunidade humoral e celular em indivíduos convalescentes e/ou vacinados para SARS-CoV-2. Neste contexto, iniciou-se um trabalho de coleção e caracterização de amostras de soro e células isoladas de voluntários do CNPEM. Foram observadas a existência de particularidades na resposta celular e correlações com níveis de soroconversão e soroneutralização. Esses dados estão atualmente sendo compilados para gerar um trabalho que deverá ser publicado em breve. E dando continuidade à colaboração com o Instituto Dante Pazzanese, a equipe de pesquisadores do LNBio teve acesso a milhares de amostras sorológicas e dezenas de amostras celulares de indivíduos vacinados. As amostras foram catalogadas, armazenadas e analisadas num ensaio de soroneutralização em alta demanda, montado no LNBio e efetuado no laboratório NB3 da UNICAMP. Atualmente, a resposta celular destas amostras por meio de ensaio de ELISA e ensaios de citometria, em modelos in vitro com células primárias e estímulos antigênicos estão sendo avaliadas, bem como a associação de resposta humoral e celular em indivíduos vacinados com vacina de vírus inativado. Os dados estão sendo analisados e serão compilados para publicação futura.

Produção de sondas in-house na busca de novos alvos terapêuticos

As proteases são enzimas que realizam funções importantes em diferentes organismos, mediando a hidrólise de diferentes substratos celulares. Desta forma, a compreensão de sua atividade em situações específicas, como na infecção causada pelo SARS-CoV-2, é importante na busca de novos alvos terapêuticos. Para tal, a utilização de substratos fluorogênicos permite a análise cinética das proteases, sendo extremamente úteis na triagem de potenciais inibidores e na determinação da especificidade ao substrato pelas proteases. Os substratos comerciais, normalmente, utilizam uma amino-trifluorometilcouramina (AFC) ou amino-4-methylcoumarin (AMC) para a marcação de peptídeos fluorogênicos. O comprimento de excitação destas sondas apresenta a desvantagem de interferir nos experimentos de triagem de diferentes compostos, tanto naturais quanto sintéticos, gerando resultados falso-positivos ou falso-negativos, devido à proximidade dos sinais. Desta forma, o laboratório de Biologia Sintética e Engenharia Genética do LNBio propôs uma nova abordagem de síntese de substratos fluorescentes, especificamente, alvos da protease $3CL^{pro}$ do SARS-CoV-2. O objetivo foi desenhar sondas utilizando o fluoróforo rhodamina 110 (Rh110), o qual possui excitação em 500nm, deixando o experimento de triagem mais confiável e amplo para o *screening* de diversos compostos. Outra vantagem, é que não há necessidade da presença de um bloqueador do sinal de fluorescência (quencher), pois a rhodamina ligada ao aminoácido adjacente tem o sinal bloqueado e a emissão se dá somente quando ocorre a ação no substrato pela enzima. Os resultados de UPLC/MS demonstraram o sucesso das sínteses *Figura 123*). Também, após a síntese, os substratos foram submetidos aos testes de concentração contra a enzima $3CL^{pro}$ e os resultados foram comparados com um substrato comercial. Ambos os substratos sintetizados no laboratório apresentaram respostas de incremento de fluorescência de forma mais eficiente e intensa do que o substrato comercial, indicando que não houve inibição da reação pelo

31 Peroni, LA, Toscaro, J, Canateli, C, Lima, G, Pagliarone, A, Cardoso, E, Viana, R, Borges, JB, Lin-Wang, HT, Abboud, CS, Gun, C., et al. (2021). Development of low-cost serological immunoassay to detect antiviral antibodies to Sars-Cov-2 Spike protein. medRxiv, 2021.2006.2007.21258114. 10.1101/2021.06.07.21258114

substrato e, também, uma clara distinção entre o sinal positivo e negativo, dentro do protocolo testado. Os resultados apresentados demonstraram a eficiência na estratégia da síntese proposta, chegando-se a substratos que produzem resposta em comprimentos de onda adequados, com baixo *background* (alta relação sinal-ruído) e com perfil de resposta compatível àquele obtido com a sonda comercial.

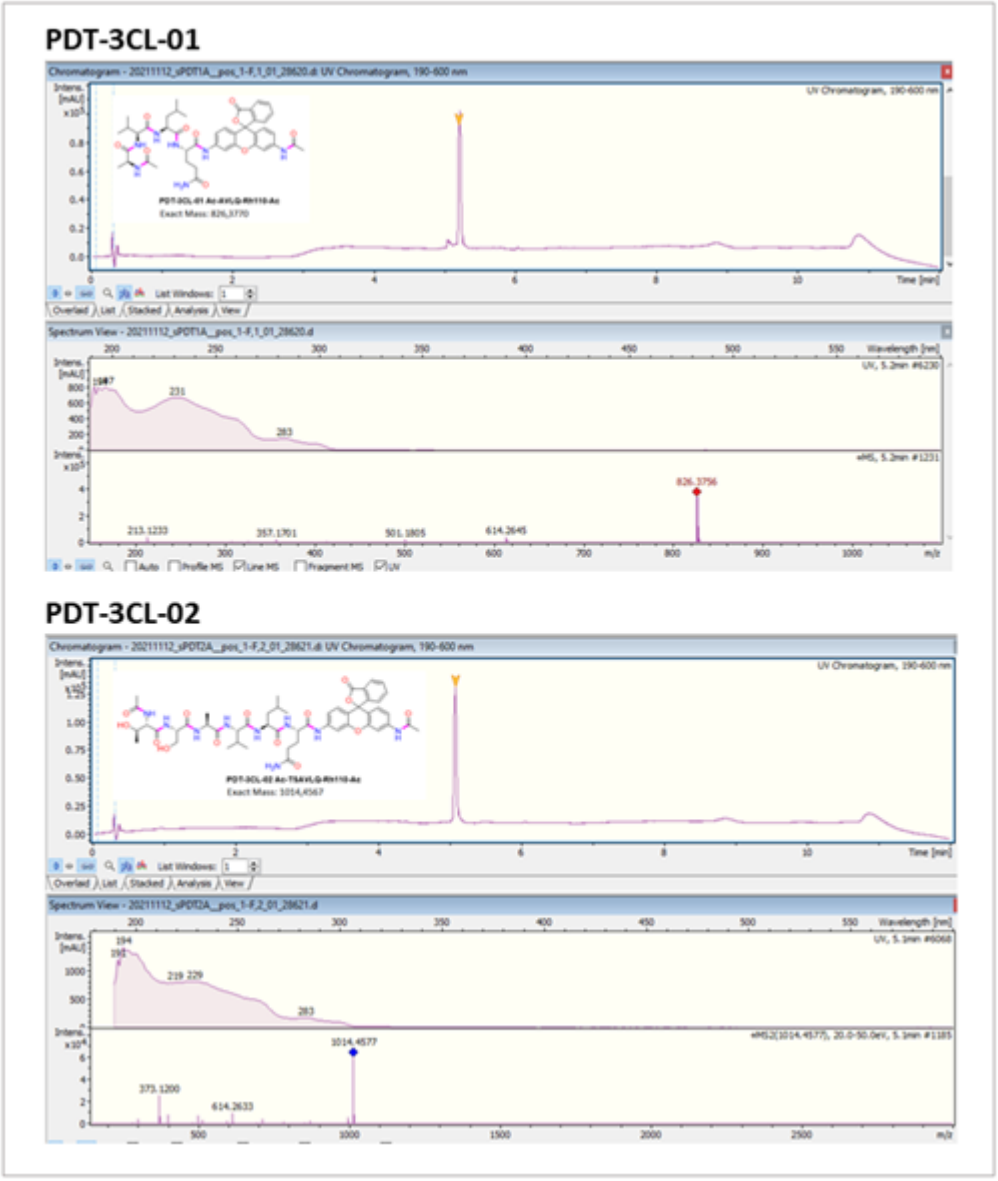


Figura 123 Perfil UPLC/MS das duas sondas sintetizadas.

Desvendando a estrutura do SARS-CoV-2 por Biologia Computacional

A equipe de Biologia Computacional e Inteligência Artificial do LNBio avançou no entendimento da organização estrutural da nucleoproteína do SARS-CoV-2 (Proteína N) cujas funções são essenciais ao ciclo de vida do vírus e envolvem empacotamento do genoma viral, replicação e montagem da ribonucleoproteína em partículas virais. A determinação estrutural dessa proteína por abordagens tradicionais é desafiadora devido a sua flexibilidade e capacidade de formar estruturas complexas. Para relevar a organização estrutural da Proteína N, foram combinadas técnicas de biofísica e microscopia

eletrônica de transmissão com técnicas computacionais de modelagem molecular e simulações de modelos *coarse-grained*. A partir da combinação dessas técnicas foi possível construir um modelo estrutural do dímero da Proteína N na presença de RNA e relevar a dinâmica da Proteína N na ausência de RNA (*Figura 124Figura 124*). Além disso, por meio das simulações conseguiu-se identificar, nas imagens de microscopia eletrônica, uma possível organização octamérica da Proteína N. O conteúdo completo desse trabalho está disponível através do repositório *Biorxv 32* e atualmente está em fase de revisão em periódico internacional.

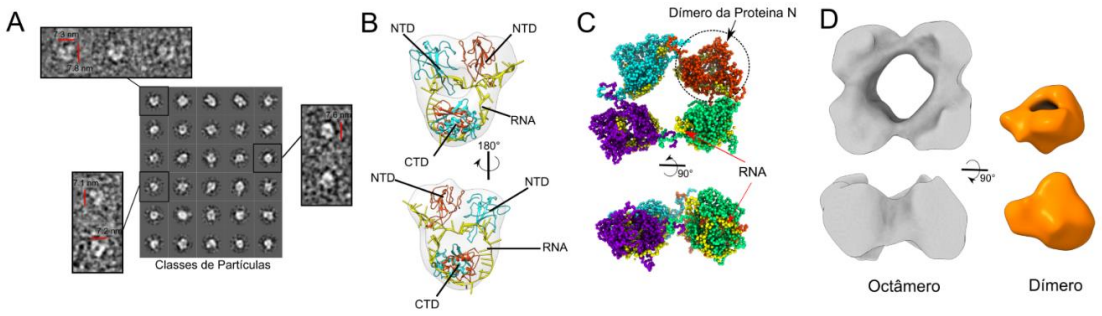


Figura 124. Organização estrutural em diferentes estados oligoméricos da Proteína N de SARS-CoV-2. (A) Classes de partículas de Proteína N em estado dimérico em presença de ácidos nucléicos obtidas por processamento de imagens de microscopia eletrônica por contraste negativo. Os quadros de inserção correspondem as imagens originais das partículas. (B) Mapa de densidade obtido a partir de reconstrução 3D das partículas em (A). No mapa estão ajustados os domínios estruturados da Proteína N em estado dimérico e em presença de uma molécula de RNA. (C) Representação do estado octamérico da Proteína N obtido por dinâmica utilizando modelo coarse-grained. (D) Mapas de densidade do octâmero da Proteína N obtido a partir de reconstrução 3D de partículas selecionadas baseando-se no modelo coarse-grained apresentado em (C). O mapa de densidade do dímero está também apresentado para fins de comparação de tamanho.

Aplicação da Biologia Computacional no reposicionamento de fármacos em Covid-19

A linha de pesquisa "Predição e análise estrutural de biomacromoléculas" tem como objetivo principal a construção de modelos estruturais de alta qualidade de proteínas e seus complexos com outras macromoléculas e com pequenas moléculas. Através dessa linha de pesquisa, a participação do grupo na força-tarefa de enfrentamento à Covid-19, financiada pela Finep/MCTI, foi intensificada durante o primeiro semestre de 2021. Análises computacionais de reposicionamento de fármacos contra quatro alvos moleculares do SARS-CoV-2 foram concluídas, incluindo cinco novos alvos a essa análise (*Figura 125*). Como resultado dessas análises computacionais, foi obtido uma lista de fármacos de prateleira que tem alto potencial de interação com alvos moleculares envolvidos na fisiopatologia da COVID-19. O trabalho conjunto do grupo de Biologia Computacional com outros grupos envolvidos na força-tarefa permitiu a validação do método computacional de triagem virtual desenvolvido pela equipe. Demonstrou-se uma taxa de acerto de 9,4% de predições computacionais em relação à interação com alvos moleculares do SARS-CoV-2. Isso representa um ganho de eficiência em relação a métodos tradicionais

32 Ribeiro Filho, HV, Jara, GE, Batista, FAH, Schleder, GR, Tonoli, CC, Soprano, AS, Guimarães, SL, Borges, AC, Cassago, A, Bajgelman, MC, Marques, RE, Trivella, DBB, Franchini, KG, Figueira, ACM, Benedetti, CE, & Lopes de Oliveira, PS (2021). Structural dynamics of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein induced by RNA binding. *BioRxiv*.

de *High Throughput Screening* da ordem de 100 vezes. No total, foram analisadas mais de 5,3 milhões de possibilidades de interação molecular entre fármacos de prateleira com os alvos macromoleculares investigados, gerando mais de 24 µs de trajetórias de simulação de dinâmica molecular. O acordo com a Oracle Brasil, que concedeu acesso à sua infraestrutura computacional *Oracle Cloud Infrastructure*, foi essencial para a análise desse grande volume de dados em um curto intervalo de tempo. Atualmente a taxa de acerto das predições desenvolvida pela equipe, fica em torno de 25%, valor que é relativamente superior a outros encontrados na literatura. Além disso, é importante destacar que foi possível implementar um protocolo de triagem virtual que está fortemente acoplado com as *facilities* experimentais existentes no LNBio.

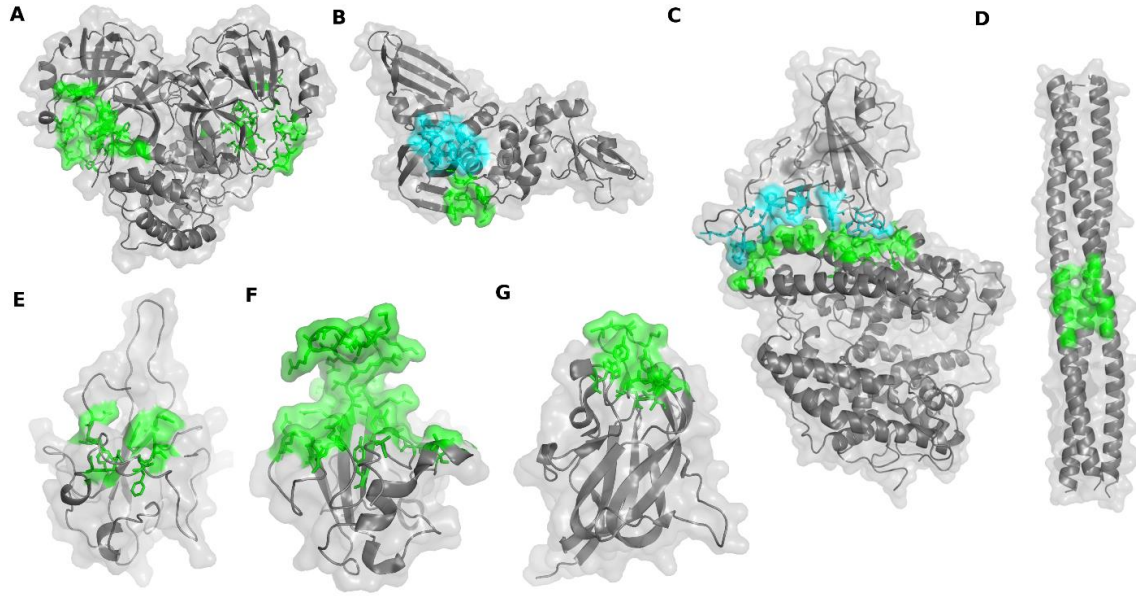


Figura 125 Alvos moleculares que foram submetidos à análise computacional de reposicionamento de fármacos. (A) Sítio ativo da 3C-Like Protease, (B-verde) Sítio ativo da Papain-Like Protease viral, (B-azul) Sítio de ancoragem do peptídeo da Papain-Like Protease viral, (C-verde) Domínio peptidase da Angiotensin-Converting Enzyme 2 humana, (C-azul) Domínio de ligação ao receptor (RBD) da glicoproteína do Spike viral, (D) Domínio HR1 da glicoproteína do Spike viral, (E) Sítio do AMP do domínio N-terminal da proteína do Nucleocapsídeo viral, (F) Sítio do ssRNA do domínio N-terminal da proteína do Nucleocapsídeo viral e (G) Sítio de reconhecimento do peptídeo da Neuropilina-1 humana.

2.3. Apoio à Geração de Inovação

Além da pesquisa *in-house*, o LNBio também apoia os esforços de inovação do setor industrial através de parcerias em projetos de colaboração com empresas para desenvolvimento de novas tecnologias, desde estágios iniciais até potencial aplicação industrial. Em 2021, o laboratório continuou atuando ativamente em projetos e iniciativas voltadas para o avanço do conhecimento sobre a ação do vírus SARS-CoV 2 e suas formas de combate, incluindo também o desenvolvimento de novos métodos para diagnóstico. Dentre os compromissos com o desenvolvimento tecnológico e a inovação no país, foram iniciadas quatro novas parcerias, sendo duas delas com *startups*.

Além das parcerias com empresas destacadas a seguir, foram também depositados 2 pedidos de patentes, um junto ao INPI (Instituto Nacional de Propriedade Industrial) e outro junto ao escritório

americano de patentes USPTO (United States Patent and Trademark Office) além de um registro de *software*. Ainda, foram estendidas duas tecnologias para fases nacionais.

Em parceria com a UNICAMP, foi registrado o *software* (BR 51 2021 000074 9) intitulado "NP3 Mass Spectrometry workflow" junto ao INPI. O *software* tem função de aprimorar o processamento e análise de dados metabolômicos. Em conjunto com o LNNano, o LNBio desenvolveu a tecnologia intitulada "Biossensor sem marcação baseado em estrutura de imidazolato zeolítico, processo de fabricação do mesmo e processo de detecção de interações", protegida junto ao INPI com o número de depósito BR 10 2021 002128 4. Adicionalmente, como resultado da linha de ações voltadas a compreensão e tratamento de doenças negligenciadas, foi depositado o pedido provisório junto ao escritório de patentes americano (USPTO) de título "*Trypanosoma cruzi Malic Enzyme is the target for sulfonamide hits from Chagas Box*", que recebeu número US63/183,812, e trata de novo ativo farmacêutico para o tratamento da doença causada pelo protozoário.

Desenvolvimento e caracterização de culturas 3D bioimpressas

Em 2021 foi iniciado o projeto "Desenvolvimento e Caracterização de Culturas 3D Bioimpressas para Comercialização", parceria do Laboratório de Culturas 3D, Biobanco e Diagnóstico do LNBio com a startup brasileira 3DBS. A primeira fase do projeto trata de uma transferência de *know-how* do LNBio para a 3DBS, visando a produção de esferóides de fígado e modelos de barreira intestinal, e da 3DBS para o LNBio, para a produção de um modelo de pele por bioimpressão. Em uma fase posterior, os modelos gerados serão melhorados em desenvolvimento conjunto, sendo que os esferóides de fígado e barreira intestinal deverão ser biofabricados por bioimpressão e o modelo de pele deverá ser validado para que seja reconhecido no Brasil como um modelo regulamentado. O acordo de cooperação técnica foi firmado em julho deste ano e foram iniciadas as atividades de transferência de conhecimento das tecnologias já produzidas pelos grupos participantes.

Desenvolvimento de fármacos anticâncer a partir da biodiversidade brasileira

Com o objetivo de identificar ativos inexplorados da flora brasileira, que possuam ação anticâncer, um projeto foi iniciado em 2018 no CNPEM/LNBio, em parceria com o Aché Laboratórios e a empresa Phytobios, com cofinanciamento da EMBRAPII. O projeto caminha para a conclusão da etapa de identificação e expansão de *hits* e novos sítios de ação, obtendo-se um conjunto de moléculas desenhadas com esta ação terapêutica, em adição à utilização delas no contexto da refratariedade de tumores às terapias atuais, ou mesmo em sinergismo às terapias vigentes.

O projeto começou com a triagem da biblioteca de produtos naturais da biodiversidade brasileira, construída pelo CNPEM e a Phytobios, testando-se as mostras químicas da biodiversidade quanto a atividade inibitória da proteína alvo do projeto, que é validada para o tratamento de diversos tipos de câncer. As amostras que se mostraram capazes de inibir o alvo foram analisadas usando uma metodologia integrada proprietária do CNPEM, que envolve a cristalografia de proteínas, e tem foco na captura dos produtos naturais bioativos a partir das amostras da biodiversidade. Essas etapas revelam características importantes da estrutura dos produtos bioativos e quatro sítios de modulação da proteína alvo foram identificados nos produtos naturais da biodiversidade brasileira, cujas plantas produtoras foram selecionadas para os estudos subsequentes. Prosseguiu-se então para o isolamento bioguiado dos produtos naturais e sua avaliação em ensaios biológicos mais complexos. Encontraram-se oito classes de produtos naturais com ação no alvo e em células tumorais.

Em 2021, foram iniciados os ciclos de expansão das séries químicas e a otimização das moléculas de partida, com base em dados de cristalografia de proteínas obtidos nas linhas do antigo acelerador UVX e na linha Manacá do Sirius. A expertise e infraestrutura do Ache também foram importantes nesta etapa, permitindo o planejamento e síntese conjunto das moléculas com o CNPEM, também amparados pela

avaliação e seleção *in silico*. Quatro séries químicas já foram expandidas no projeto, otimizando a potência ao alvo e ação em células tumorais em mais de dez vezes. As moléculas selecionadas poderão ser levadas às próximas etapas de pesquisa e desenvolvimento, rumo à otimização de potência, seletividade e demais propriedades biofarmacêuticas, no caminho para a seleção de um candidato à fármaco com ação anticâncer oriundo da biodiversidade brasileira.

Desenvolvimento de dermocosmético a partir de produtos naturais

Este projeto, cofinanciado pela EMBRAPII, realizado pelo LNBio em parceria com o Ache e a Phytobios, visa o desenvolvimento de um dermocosmético para tratamento e regeneração de pele com efeitos antienvelhecimento a partir de extratos vegetais oriundos da flora brasileira. Iniciado em 2018, com conclusão em 2022, o projeto avançou em 2021 para os estudos de reprodutibilidade dos extratos, após a determinação de possíveis marcadores dos três extratos selecionados (codificados através das siglas PB024, PB092, PB369), realizando coletas diferentes e avaliando suas atividades e composição em lotes diferentes. Os estudos de atividade e espectrometria de massas permitiram avaliar o quanto estes extratos podem ser estáveis e reprodutíveis, e ainda forneceu informações sobre modos de extração que podem escalonáveis para a produção industrial. Adicionalmente, iniciou-se estudos mais aprofundados sobre as características químicas do extrato PB092, o qual teve seu ativo quantificado por cromatografia liquida, bem como as análises do extrato PB369, para a identificação de seus marcadores e a determinação da melhor forma de produção.

Estudos fenotípicos em modelo de pele reconstituída foram finalizados, após o tratamento com o extrato PB092, e estão sendo realizados com o PB369, ambos selecionados nas atividades de *screening* realizadas no início do projeto. Nesses estudos fenotípicos avalia-se as capacidades dos extratos de aumentar a produção de colágeno, a formação de barreira de pele e a hidratação, além de prevenir envelhecimento, remodelar a pele e induzir cicatrização, sem causar nenhum tipo de toxicidade ou redução de viabilidade celular. Por fim, estamos trabalhando o extrato PB024, também selecionado no *screening* inicial, para a identificação de seus marcadores, avaliação de reprodutibilidade e determinação de sua melhor forma de produção, visando também o processo produtivo e os estudos fenotípicos, os quais deverão ser realizados na próxima etapa do projeto.

Desenvolvimento de novo método alternativo ao uso de animais para avaliação de toxicologia sistêmica em cosméticos, dermocosméticos e suplementos orais.

O projeto “O Desenvolvimento de um Novo Método Alternativo ao Uso de Animais para Avaliação de Toxicologia Sistêmica de Cosméticos, Dermocosméticos e Suplementos Orais” iniciado em 2019 com a empresa Natura. e contando com cofinanciamento da Embrapii, tem por objetivo desenvolver uma metodologia alternativa ao uso de animais para ensaios de toxicologia, utilizando a tecnologia de sistemas microfisiológicos humanos, através do cultivo simultâneo de 3 modelos de culturas tridimensionais (pele, fígado e barreira intestinal) em um Chip, e avaliando a toxicidade de tratamentos tópicos. A meta é que a metodologia desenvolvida possa ser incorporada no processo de controle de qualidade de produtos na empresa.

Em 2021, o projeto obteve avanços no seu desenvolvimento, alcançando resultados promissores e caminhando para uma conclusão bem-sucedida em 2022. Durante este ano otimizou-se a produção e biofabricação de modelos de esferóides de fígado e barreira intestinal, caracterizando-os quanto à sua morfologia, função e viabilidade. Estes modelos foram incorporados em sistemas microfluídicos, também conhecidos como sistema de Organ-on-Chip, em conjunto com o modelo de pele fornecido pela Natura, e os testes iniciais de viabilidade foram realizados. Com relação aos tratamentos, foram testados compostos relacionados a 3 desfechos toxicológicos: toxicidade sistêmica, disruptor endócrino e

carcinogênese, além de seus veículos. Como o modelo a ser desenvolvido neste projeto é de avaliação de toxicidade de um tratamento tópico por um produto, a entrada do composto no sistema é iniciada no modelo de pele. Por isso, avaliou-se a viabilidade celular de células de pele e culturas 3D evitando que os tratamentos causassem morte celular, porém, permitindo que a dose utilizada causasse algum tipo de resposta toxicológica. Além disso, avaliou-se a permeação dos compostos em pele por métodos *in sílico*, e a viabilidade e toxicidade dos compostos nos modelos 3D de fígado e intestino.

Com isso, foi possível a determinação das doses dos compostos a serem utilizadas nos tratamentos. Em paralelo, foram selecionados 48 genes marcadores de cada um dos desfechos escolhidos para a definição dos painéis gênicos, que serão utilizados para avaliar a expressão genica destes marcadores nos tecidos tratados em *Chip*. Após todas essas análises e determinação de doses, os modelos de cultura 3D foram novamente biofabricados, inseridos nos *chips* e seus tratamentos estão em andamento. Ao final do processo, todas as culturas serão avaliadas em termos de toxicidade e viabilidade celular e os seus RNAs mensageiros serão extraídos para análises de expressão gênica nos painéis montados.

Cristalização de Proteínas no Espaço

Um acordo de cooperação em pesquisa, desenvolvimento científico e tecnológico foi firmado entre o CNPEM e as empresas AIRVANTIS INC e CIMED INDÚSTRIA DE MEDICAMENTOS LTDA, em setembro de 2021. O objetivo desse acordo é realizar experimentos de cristalização de proteínas na Estação Espacial Internacional. O acordo prevê, portanto, a produção e o envio, por parte do CNPEM, de amostras de proteínas de interesse para serem cristalizadas em condições de microgravidade na Estação Espacial Internacional. Os cristais de proteína que eventualmente se formarem nas condições especiais de microgravidade serão enviados de volta ao CNPEM para serem analisados na linha de luz Manacá de difração de raios X, do Sirius. Neste acordo o CNPEM terá a possibilidade de enviar até seis amostras de proteínas em estudo no LNBio à Estação Espacial Internacional por um período de até dois anos. Essa parceria poderá viabilizar futuros experimentos de cristalização de proteína no espaço envolvidos em projetos importantes do LNBio. Ao todo serão 6 amostras divididas em 2 voos, 3 amostras em 2021 partindo do Cabo Canaveral (Falcon 9 - SpaceX) e 3 amostras em 2022 partindo do Cazaquistão (Soyuz). Essas amostras ficarão em torno de 4 meses no espaço e depois voltam para o CNPEM.

Desenvolvimento de novo teste de diagnóstico para SARS-CoV-2

No segundo semestre de 2021 foi oficializada a parceria do Laboratório de Culturas 3D, Biobanco e Diagnóstico do LNBio com a empresa Advagen. O objetivo deste primeiro projeto é o desenvolvimento de um teste *point-of-care* para diagnóstico de antígenos de SARS-CoV-2 em saliva, utilizando-se um método menos invasivo de coleta de amostras e buscando um diagnóstico de alta sensibilidade e especificidade, que pode ser realizado em poucos minutos sem a necessidade de uma instrumentação específica. Nesta parceria, o LNBio irá desenhar o método de detecção, produzir os anticorpos e antígenos e desenvolver testes de prova de conceito. Do outro lado, a Advagen irá produzir os dispositivos cassetes com a imobilização das biomoléculas produzidas no LNBio e fazer a marcação dos anticorpos com nano partículas, desenvolvendo o protótipo do dispositivo. Por fim, caberá ao LNBio fazer as medidas com material biológico humano.

Apesar desta parceria ter sido firmada no segundo semestre de 2021, o projeto encontra-se em estágio avançado. Toda a documentação relativa à coleta de amostras e testes de material humano já foi submetida ao sistema CEP-CONEP, pelo LNBio, para avaliação dos aspectos éticos da pesquisa. Inicialmente produzimos os antígenos de SARS-Cov-2 para a imunização de camundongos e, com isso, anticorpos mono e policlonais anti-antígenos de SARS-Cov-2 foram produzidos e purificados em parceria

com o Laboratório de Anticorpos Monoclonais do LNBio. Além disso, estes anticorpos foram caracterizados biofisicamente, sendo que a marcação de um dos anticorpos com partículas de ouro também já foi realizada. Após a produção dos anticorpos, eles foram testados para verificação da capacidade de reconhecimento de antígeno viral puro e presente em saliva.

Os próximos passos do projeto envolverá a coleta de saliva humana e a testagem nos dispositivos montados. Além disso, a especificidade e sensibilidade serão avaliadas com intuito de atender as validações exigidas para o registro do teste junto aos órgãos competentes.

Avaliação de luz no espectro de UVC distante como agente virucida de SARS-CoV-2

A pandemia da Covid-19 trouxe vários desafios e necessidades de tecnologias que permitam a retomada às atividades de modo seguro. Dentre essas, encontram-se alternativas eficazes descontaminação de superfícies e objetos. A aplicação de radiação ultravioleta (UV) para inativar vírus está bem estabelecida, mas as lâmpadas germicidas tradicionais apresentam riscos à saúde humana. Uma janela de comprimento de onda no espectro UV-C distante tem mostrado grande poder antiviral e antimicrobiano sem causar danos, sendo avaliada para construção de equipamentos. Com a ideia de avançar na disponibilização dessa tecnologia, o CNPEM/LNBIO firmou colaboração em 2020 com a Vale e o Instituto Tecnológico Vale (ITV), com cofinanciamento Embrapii, para a avaliação do uso da radiação UVC-distante para inativação do vírus SARS-CoV-2. Este projeto representa uma oportunidade para a construção de equipamentos dedicados à descontaminação do ar e de superfícies em ambientes com a presença de seres humanos sem a necessidade de equipamentos de proteção pessoal adicionais.

Os resultados obtidos até o momento indicam que o espectro em estudo é eficaz em inativar o vírus, com o benefício de não gerar lesões com potencial mutagênico. Contudo, a eficácia de inativação depende também do meio líquido onde o vírus se encontra. Dessa forma, pretende-se avançar em 2022 no estudo do efeito da luz em solução que simula fluidos respiratórios para se obter a dose adequada para eliminação do vírus. Serão ampliados, também, os estudos dos efeitos em células de pele para modelos de camundongos e para o estudo de mecanismos moleculares ainda não avaliados na literatura.

Desenvolvimento de Novas Terapias para doenças multifatoriais

Em 2021 foi assinado o acordo de cooperação entre a *startup* Nintx e o CNPEM para utilizar produtos da biodiversidade brasileira como plataforma para desenvolvimento de novas terapias para doenças multifatoriais (terapias *multi-target*). Nesta parceria, Nintx e CNPEM irão colaborar inicialmente em quatro projetos, selecionados como os mais promissores para a abordagem *multi-target*. Por parte do CNPEM a biblioteca de produtos naturais proveniente de bioprospecção, construída em parceria com a Phytobios, será empregada em sinergismo a tecnologias avançadas desenvolvidas no centro. Estas últimas incluem um pipeline único com técnicas analíticas e de *screening* avançadas, cristalografia de proteínas com o SIRIUS e algoritmos computacionais customizados para descoberta de fármacos a partir de produtos naturais. Por parte da Nintx, o *know-how* em pesquisa e desenvolvimento de fármacos, aliado a experiência e tecnologias proprietárias no campo do microbioma humano complementará a Plataforma de Descoberta do CNPEM com vistas a novos desenvolvimentos na área farmacêutica.

2.4. Treinamento, educação e extensão

Seminários e Palestras

Os pesquisadores do LNBio participaram ativamente de eventos científicos a despeito das restrições imposta pela pandemia de Covid-19. Destacamos aqui a participação da Dra. Daniela Trivella

na IUPAC | CCCE 2021 Conference, em agosto 2021 e do Dr. Rafael Elias na mesa redonda "*Young Inspiring Research*", do XXXII Congresso Brasileiro de Virologia, em outubro 2021, ambos online.

Outras ações importantes de divulgação estão listadas abaixo:

Adriana Franco Paes Leme	Congress of Brazilian Society for Cell Biology, Janeiro, 2021. Encontro Science, Analítica, agosto, 2021. Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, ICESP, setembro, 2021. VIII SEMIC, São Leopoldo Mandic, outubro, 2021. Sociedade Brasileira de Proteômica (BrProt), novembro, 2021. X Annual Meeting of the Graduate Program in Immunology, novembro, 2021.
Ângela Saito	Seminário para a equipe do Hemocentro/UNICAMP, setembro 2021 Seminário para o *Journal Club* do Fertility Medical Group, setembro 2021
Artur T. Cordeiro	Seminários para o programa de pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNICAMP , Abril 2021
Daniela Barretto Barbosa Trivella	Escola Sirius para Professores do Ensino Médio (ESPEM), julho 2021 Unicamp Ciências Farmacêuticas, junho 2021 Seminários Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas UFRGS, junho 2021 IUPAC | CCCE 2021 Conference, agosto 2021 Simpósio PPG Farmacologia FMRP USP, novembro 2021 II Bionatural Meeting, novembro 2021
Murilo de Carvalho	ESPEM-CNPEM, julho 2021 International Pan American Light Sources for Agriculture (PALSA) and AgroEnviro Workshop, Abril 2021 13th SBBN (Sociedade Brasileira de Biociências Nucleares) Congress, outubro 2021
Rafael Elias Marques	XXXII Congresso Brasileiro de Virologia na mesa redonda "Young Inspiring Research", outubro 2021 Palestra de abertura ministrada na SIPAT 2021 do CNPEM sobre a biologia do SARS-CoV-2 e as pesquisas realizadas no CNPEM sobre a Pandemia de COVID-19 28° Congresso da Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise, julho 2021 Palestra ministrada no Centro de Pesquisas Boldrini, maio 2021 Seminário do INFAR – UNIFESP, maio 2021

Sandra Martha Gomes Dias	"Escola SIRIUS para Professores do Ensino Médio (ESPEM)" , julho 2021 Seminário para curso de pós-graduação em Biotecnociências da UFABC, agosto de 2021 Seminários Gerais do Programa de Oncobiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, maio 2021 Palestra no departamento de Biofísica, Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP/EPM, maio 2021

Ações de Capacitação

Durante este ano de 2021, devido à pandemia e às medidas de isolamento social, foram poucas as participações dos pesquisadores em cursos e treinamentos. Destacamos neste período algumas atividades dos pesquisadores Rafael Elias e Ângela Saito:

- Aula/ Palestra ministrada na ESPEM - Escola Sirius para Professores do Ensino Médio. Aplicações da luz sincrotron no estudo de arboviroses emergentes (Rafael Elias);
- Disciplina NI208 – Tópicos Especiais em Imunologia ministrada junto ao Programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da UNICAMP (Rafael Elias);
- Palestra no Curso Pandemia COVID-19 organizado pela Sociedade Brasileira de Imunologia, intitulado: Descoberta de compostos antivirais contra SARS-CoV-2 (Rafael Elias);
- Aulas sobre Edição Genômica, do Curso de Pós-Graduação em Reprodução Humana Assistida, módulo clínico-laboratorial da Associação Instituto *Sapientiae*, em março e novembro de 2021 (Ângela Saito)

2.4.3. Eventos Científicos

O tradicional *Workshop* de Proteômica do LNBio realizou sua décima edição de forma *online*, nos dias 3, 4 e 5 de novembro de 2021. Os participantes tiveram a oportunidade de apresentar e-posters durante o evento. Dentre os temas dessa edição, foram abordados proteômica quantitativa baseada em descoberta e em alvos, proteômica estrutural, modificações pós-traducionais, análise de interação proteína-proteína e proteômica de *single-cells*.

2.5. Infraestrutura, Operação e Melhorias Técnicas

Além das instalações abertas à comunidade científica acadêmica e empresarial (MAS, RMN, LEC e ROBOLAB), o LNBio mantém outros laboratórios dedicados aos projetos científicos e tecnológicos (internos e/ou em parcerias com empresas) associados aos Programas Temáticos do LNBio/CNPEM. A seguir, destacam-se as melhorias realizadas nessas instalações, bem como as novas técnicas e metodologias disponibilizadas aos usuários em cada instalação.

Laboratório de Química Analítica - LQA

O Laboratório de Química Analítica (LQA) está em fase de estruturação e já conta com o apoio de cientistas envolvidos na implementação e execução de várias metodologias que permitem avaliar a pureza de compostos candidatos a fármacos assim como as suas propriedades de absorção, distribuição, metabolismo e eliminação (ADME) *in vitro* e *in vivo*. Entre os investimentos feitos no LQA em 2021, destaca-se a aquisição de um equipamento de cromatografia líquida (ArcHPLC) equipado com sistema de bombeamento quaternário, amostrador automático e forno para colunas. Este equipamento é acoplado aos detectores de arranjo de diodos, fluorescência e de espalhamento de luz e será utilizado para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos capazes de separar e quantificar compostos a partir de matrizes diversas.

Laboratório de Culturas 3D e Biobanco

Neste ano, iniciamos a constituição do laboratório de culturas 3D e Biobanco, que inclui as unidades de células IPSC, culturas 3D e biobanco. Como melhorias realizadas na unidade de culturas 3D, destacam-se a aquisição e instalação de uma estufa de CO_2 para incubação de células e culturas 3D (pHcbi), a aquisição de um contador automático de células, o Countess 3FL (Figura 126), um equipamento de q-PCR para análise de expressão gênica CFX -96 (*Figura 126*), um minifluorimetro utilizado para quantificação de DNA e proteínas (Qubit 4), um banho térmico seco (Thermo GP 10) e uma bioimpressora (Genesis, 3DBS) para impressão de tecidos e culturas tridimensionais. Com relação a unidade de IPSC, foi adquirido um novo fluxo laminar e, na unidade do biobanco, um freezer -80°C foi alocado.

Figura 126. Equipamentos adquiridos e Instalados no LC3DBD. Acima, da esquerda para a direita temos: estufa de CO2 (pHcbi) para crescimento de céulas, tecidos e cultura 3D, q-PCR para quantificação de expressão gênica (BioRad), computador (Dell), banho seco (Thermo), Fluxo laminar (Pachane), e abaixo, da esquerda para a direita temos: contador de células automatizado (Invitrogen), Qubit (Invitrogen), dewar (Volta) e Bioimpressora (3DBS).

Além do estabelecimento dos procedimentos de segurança e de qualidade na experimentação científica e dos procedimentos de operação padrão em todos os laboratórios, foram otimizados novos protocolos de culturas 3D, incluindo produção de pele, esferoides de fígado, esferóides de tecido adiposo branco e marrom, além de produção de barreira intestinal. Foram otimizados protocolos de produção de organoides cerebrais humanos a partir de células IPSC e foram retomados testes em sistemas microfisiológicos para ensaios toxicológicos usando-se esferóides e o treinamento para o suo da bioimpressora foi realizado. A constituição do biobanco foi aprovada juntamente com toda sua documentação pela CONEP, e já iniciamos algumas coletas e organização de amostras.

Laboratório de Purificação de proteínas – LPP

Como principais melhorias realizadas no LPP em 2021, destaca-se a instalação de um segundo sistema de cromatografia liquida AKTA Pure (*Figura 127*), adquirido com financiamento da Plataforma de Virologia Estrutural, sendo que o primeiro foi adquirido em 2020 com recursos da FINEP. O sistema AKTA-Pure instalado está equipado com bomba de injeção de amostra e sensor de ar que permite a injeção de grandes volumes de amostra de maneira prática, rápida e segura. O equipamento dispõe ainda de uma válvula de coluna que permite o usuário operar o sistema com o fluxo de líquidos nos dois sentidos, sem a necessidade de inverter a coluna manualmente.

Figura 127. Sistemas de purificação AKTA-Pure (GE-Healthcare) usados na purificação de proteínas. O sistema AKTA-Pure permite a injeção de grandes volumes de amostra de maneira rápida e segura.

Laboratório de Biologia Molecular e Cultura de Células – LBMCC

Entre os investimentos feitos no LBMCC em 2021, destaca-se a aquisição e instalação de um microfluidizador e disruptor de células LM20 (Microfluidics), usado para o rompimento da parede celular de bactérias e outros microrganismos na preparação de proteínas (). Em adição a isto, foi realizado compra de novo sensor de oxigênio e manutenção da estufa de hipóxia da sala de cultura de célula, trazendo para sala capacidade de cultivo de células de mamíferos em baixa pressão de oxigênio.

A B

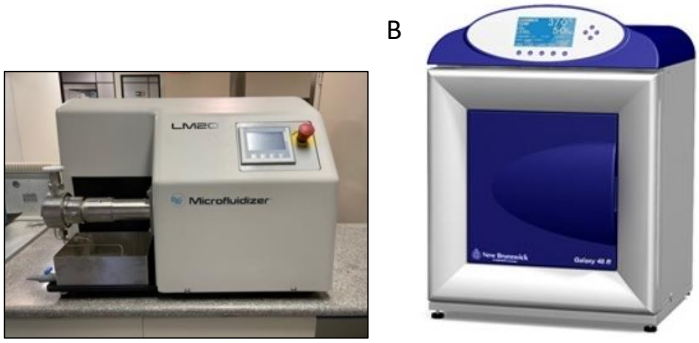


Figura 128(A) Microfluidizador de alta pressão "LM20" (Microfluidics) usado na ruptura de células e tecidos para o preparo de proteínas. (B) New Brunswick™ Galaxy® 48 S CO2 Incubator.

Laboratório de Bioensaios – LBE

Em 2021, foram realizadas manutenções corretivas no pipetador automático JANUS-MDT, usado na maioria dos ensaios de HTS e HTC sendo realizados no LNBio para a identificação de novos fármacos contra a COVID-19 e outras doenças sendo estudadas no laboratório. Tal manutenção, que incluiu a troca de amortecedores, correias e rolamentos (*Figura 129*), visou corrigir falhas detectadas nos procedimentos de transferências de compostos durante os ensaios.

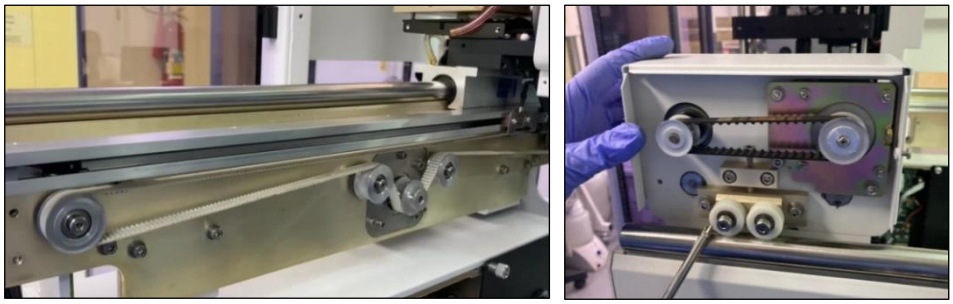


Figura 129 - Manutenção do pipetador JANUS-MDT: substituição de rolamentos e correias originais, com mais de 10 anos de uso.

Laboratório de Gestão de Compostos – LGC

O Laboratório de Gestão de Compostos (LGC) foi recentemente criado para gerenciar as bibliotecas de compostos químicos e de produtos naturais do LNBio. Em 2021, o LGC recebeu a certificação NB2 (nível de biossegurança 2) que permitiu a realização de procedimentos como a formatação de amostras de soro humano provenientes do Biobanco do LNBio, as quais estão sendo analisadas no âmbito da força-tarefa da COVID-19.

Laboratório de Imagens Biológicas – LIB

Desde 2020, durante a fase de comissionamento do LIB, observou-se oscilações e instabilidades na temperatura e umidade relativa do ar na sala que abriga os microscópios de fluorescência confocal e super-resolução. A fim de resolver o problema e evitar manutenções recorrentes em componentes elétricos e aumentar a vida útil dos equipamentos, em 2021 foram realizadas várias melhorias na sala incluindo isolamento térmico e instalação de resistências elétricas para aumentar a carga térmica interna. Adicionalmente, instalou-se um sistema de monitoramento em tempo real da temperatura e umidade relativa (*Full Gauge*), que ajusta automaticamente os valores de carga térmica e condicionadores de ar. Os primeiros resultados comprovam que as ações foram efetivas. Tais adequações reduziram de forma significativa a amplitude térmica da sala (± 1°C), permitindo assim o uso contínuo dos equipamentos sem necessidade de alinhamentos mecânicos constantes dos componentes ópticos. Embora eventuais flutuações térmicas ainda sejam observadas, elas são temporalmente restritas (*Figura 130*) e não chegam a afetar a estabilidade dos equipamentos.

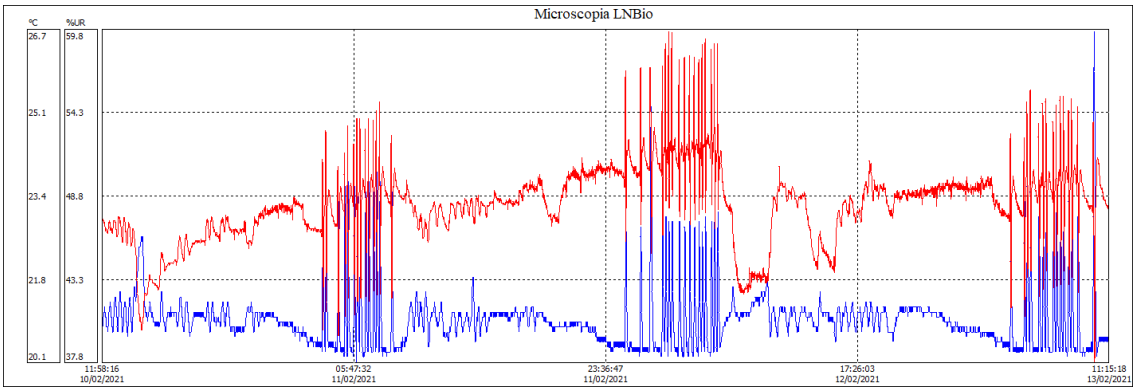


Figura 130. Variação de temperatura e umidade relativa na sala de microscopia do LIB. Observa-se a estabilidade média dentro dos limites ideais de ± 1C, com pontos temporalmente restritos de maior flutuação.

Laboratório de Anticorpos Monoclonais – LAM

No período de 2020/2021, o Laboratório de Anticorpos Monoclonais finalizou uma reforma para adequação da sala às necessidades do projeto. A sala é atualmente usada para a obtenção de clones produtores de anticorpos recombinantes e para ensaios funcionais. Na reforma, a parte elétrica foi refeita, bancadas, portas e divisórias foram reajustadas, armários foram trocados e o ar-condicionado foi substituído. Além das adequações feitas na sala, equipamentos novos foram instalados, incluindo freezer -80°C, incubadora de CO_2, cabine de segurança biológica II, refrigerador, microscópio invertido com câmera, tanque criogênico, bomba de vácuo, mini centrífuga, agitador orbital para incubadora, agitador magnético, banho seco, banho seco com agitação e banho-maria. O laboratório aloca ainda o equipamento ClonePix, importante para a seleção de clones produtores de anticorpos que aguarda visita técnica internacional para instalação e início das operações (*Figura 131*).

Figura 131. Sala principal do LAM mostrando sua nova configuração e equipamentos instalados como freezer -80oC, incubadora de CO2, cabine de segurança biológica II, mini centrífuga, agitadores, banhos e o ClonePix.

Laboratório NB2 de manipulação de patógenos – LMP

Entre as melhorias realizadas no LMP em 2021, destaca-se a instalação de vários equipamentos incluindo microscópio ótico convencional e microscópio ótico invertido, utilizados na visualização de células isoladas, cortes histológicos e contagem de células, cabine de segurança biológica nível II, usada na manipulação de patógenos, e lavadora de placas de 96 e 384 poços, usada nas análises de plasma humano (*Figura 132*). Tais equipamentos foram necessários para suprir a demanda por experimentações envolvendo organismos de classe de risco biológico II.

Figura 132.Equipamentos instalação no LMP incluindo microscópio óptico convencional, microscópio óptico invertido, fluxo laminar usado na manipulação de patógenos de nível de biossegurança 2 e lavadora de placas.

Laboratório de Operações – OPR

Entre os investimentos feitos no OPR, destaca-se a aquisição de uma impressora 3D, computador dedicado e software para o desenvolvimento de projetos e impressão de peças e acessórios de equipamentos diversos (*Figura 133*). Além disso, uma nova lavadora de vidrarias, e duas cabines de segurança biológica de uso geral foram adquiridas com recursos da FAPESP.

Figura 133. Aquisições no Laboratório de Operações - OPR. Impressora 3D e componentes impressos por ela, incluindo hastes magnéticas para manuseio de cristais de proteína, modelo tridimensional do vírus Mayaro, suportes para filtros do equipamento Janus-MDT, suportes para cubetas de quartzo e suporte para lâminas de microscópio.

Laboratório de Computação Científica - LCC

No primeiro semestre de 2021, foram investidos recursos na atualização de estações de trabalho de uso geral dos pesquisadores, especialistas e bolsistas. Com recursos da FINEP, foram adquiridas oito estações de trabalho de alto desempenho dotadas das modernas GPUs Nvidia RTX3060 e monitores 4K de 27'. Com intuito de incentivar o desenvolvimento na área de resolução de estruturas por crio-microscopia eletrônica, foi adquirida uma estação de trabalho dedicada à biologia estrutural com 32 núcleos e 64 threads, com 256GB de memória RAM (DDR4), disco SSD de 2TB e 4 HDs de 12TB. Além disso, visando o armazenamento de dados de modo seguro, foram adquiridos com recursos da FAPESP um servidor NAS (*Storage Sinology*) de 40TB de espaço útil, além de dois HDs de 8TB sobressalentes ao sistema NAS.

Laboratório de Organismos Modelo – LOM

Entre as melhorias realizadas no LOM em 2021, destaca-se a substituição de luminárias convencionais por lâmpadas LED nas áreas de produção, manutenção e experimentação animal. A mudança proporciona maior bem-estar e redução do estresse animal, uma vez que a substituição de lâmpadas LED é feita com frequência bem menor comparada às lâmpadas convencionais. Destaca-se ainda a instalação de um microscópio invertido Nikon-Ts2 com contraste de fase, usado para acompanhamento e aquisição de imagens de células em cultura primária e de tecidos extraídos de animais (*Figura 134*).

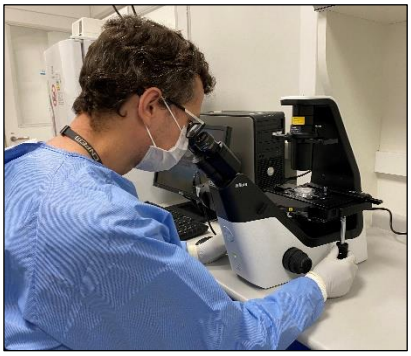


Figura 134. Microscópio ótico invertido Nikon-Ts2 com contraste de fase, usado na aquisição de imagens de células, culturas primárias e tecidos obtidos de animais de experimentação.

3. Laboratório Nacional de Biorrenováveis

3.1. Instalações Abertas a Usuários Externos

O LNBR disponibilizou este ano cinco instalações abertas a usuários externos visando atender as principais demandas nas áreas correlatas ao desenvolvimento de biorrenováveis. Restrições devido à pandemia limitaram o número de usuários atendidos no período e houve uma acomodação no modo de operação permitindo o atendimento mediante o envio de amostras. As instalações abertas do LNBR são fundamentais para os projetos de pesquisa e desenvolvimento dos Programas Temáticos do LNBR de forma integrada com outros Laboratórios Nacionais do CNPEM, além da destinação ao apoio à inovação, treinamento e capacitação. A seguir estão os principais destaques de propostas atendidas mediante o envio de amostras.

Instalação de Caracterização de Macromoléculas (MAC)

Instalação dedicada à caracterização bioquímica e biofísica de macromoléculas como proteínas e enzimas, e nanopolímeros, como a nanocelulose e derivados de lignina. Com o uso das técnicas desta instalação é possível avaliar e selecionar proteínas potenciais com características compatíveis (como pH e temperatura) para aplicação em bioprocessos. Além de toda a infraestrutura para caracterização bioquímica e biofísica de macromoléculas, que é de suma relevância para aplicações industriais, esta instalação conta com equipamentos instrumentais para enzimologia fina que envolve estudos de especificidade e mecanismos de ação. Uma das propostas atendidas pela instalação MAC no ano de 2021 foi da UNICAMP de Limeira e teve como objetivo o desenvolvimento de novos nanomateriais para serem usados no tratamento de efluentes contendo fármacos, corantes, surfactantes, entre outros. Através de análises de tamanho e carga das partículas em suspensão realizadas no equipamento DLS (Espalhamento Dinâmico de Luz) foi possível compreender a estabilidade das suspensões e os tipos de interações entre o material adsorvente e o poluente. Dessa forma, as análises feitas no MAC contribuíram para o desenvolvimento de novos materiais filtrantes para a remoção de compostos tóxicos presentes nas águas que os tratamentos convencionais não removem e que trazem muitos malefícios à saúde humana e ao meio ambiente.

Instalação de Sequenciamento de Alta Performance (NGS)

A instalação NGS é uma unidade dedicada ao sequenciamento em larga escala de ácidos nucleicos (DNA/RNA), possibilitando a realização de estudos para avaliação da expressão gênica de diversos sistemas biológicos, sequenciamento de genomas, metagenomas, metatranscriptomas e marcadores moleculares (16S rDNA e ITS). Atualmente é composta por dois sequenciadores que utilizam tecnologia de segunda geração para o sequenciamento em larga escala de ácidos nucleicos. Dispõe de uma equipe altamente qualificada para acompanhamento e assessoramento dos usuários nas atividades laboratoriais, monitorando todas as etapas do processo que vão desde o *design* experimental, preparação das amostras até o sequenciamento. Destaca-se este ano proposta enviada por pesquisadores da USP, que visa o estudo

de uma bactéria (*Chromobacterium violaceum*) de vida livre encontrada no solo e na água, causadora de sérias infecções em mamíferos. O trabalho investiga os mecanismos de regulação de genes em resposta a estresse ocasionado pela limitação dos metais ferro e zinco. O conhecimento adquirido a partir do sequenciamento do RNA por meio de plataformas de segunda geração, permitirá identificar mecanismos regulatórios genéticos importantes para adaptação da bactéria em condições infectantes *in vivo* ou em condições relevantes do hospedeiro. O esclarecimento destas redes de expressões genicas contribuirá para os esclarecimentos de fatores determinantes de virulência da bactéria. Esta instalação foi também empregada na campanha COVID-19 do CNPEM contribuindo com o sequenciamento gênico e estudos de transcriptômica para compreensão da resposta celular ao vírus SARS-COV-2.

Metabolômica (MET)

A instalação Metabolômica permite a identificação e quantificação de metabólitos em amostras biológicas complexas por meio da espectrometria de massas acoplada à cromatografia líquida e gasosa. A metabolômica representa a composição química de uma célula e permite uma visão geral das funções celulares, já que reflete diretamente seu estado fisiológico, permitindo a caracterização e diferenciação dos organismos. A instalação atende usuários com trabalhos relacionados a bioenergia e química verde. Neste ano a instalação destaca a proposta do CENA/USP relacionada ao estudo de disponibilidade de enxofre no metabolismo de plantas de soja. Atualmente há carência de estudos sobre os efeitos deste micronutriente no metabolismo destas plantas. Com isso, o estudo propõe avaliar a disponibilidade de enxofre em plantas de soja, visando compreender como nódulos radiculares e plantas de soja (raiz e folha) interagem metabolicamente entre si para adaptarem suas características fisiológicas e sustentarem seu crescimento. A instalação está sendo crucial para a identificação dos metabólitos relacionados ao ciclo de carbono em diferentes quantidades de enxofre disponível.

3.2. Pesquisa e Desenvolvimento *in-house*

O desenvolvimento sustentável baseado em recursos de origem biológica cria desafios e oportunidades de P&D. O Brasil pode assumir papel de protagonista nesse novo modelo global da indústria de transformação, se agregar valor à biomassa e à biodiversidade por meio de tecnologias habilitadoras como a biotecnologia. A transição para uma economia de baixo carbono com uso responsável de recursos naturais levam a pressões para mudar os modelos de produção e consumo de produtos industriais incluindo a implantação de uma economia circular, que promova reuso de matéria-prima e o aproveitamento de resíduos. O crescimento da população e a tendência de urbanização geram uma demanda crescente por energia e por produtos industrializados, sendo que atualmente as rotas principais de transformação industrial usam derivados do petróleo como matéria-prima. Há necessidade por soluções alternativas, renováveis e sustentáveis, por moléculas réplicas das derivadas de petróleo. Além disso, a expectativa de aumento do consumo de produtos industriais como plásticos, por exemplo, demanda alternativas apropriadas para lidar com os resíduos desses materiais. A biotecnologia pode criar oportunidades para novos modelos de produção industrial de base biológica, com menores impactos

ambientais, uso racional de recursos naturais e que estimule a economia circular e promova a tecnologias de baixo carbono.

Os esforços do CNPEM no emprego da biotecnologia para o avanço do desenvolvimento econômico sustentável são visualizados em suas linhas de pesquisa e projetos científicos associados. Os Programas Biotecnologia Industrial e Sustentabilidade, estão diretamente associados a esses esforços. A integração dos Laboratórios Nacionais do CNPEM é uma rota recorrente e orgânica para atingir maior profundidade e impacto científico em temas de grande relevância para a biotecnologia.

A atuação neste ano se concentra nos seguintes temas-chave: materiais renováveis (químicos renováveis e biomateriais), energias renováveis (biocombustíveis líquidos), agroambiental (biotecnologia para agricultura) e sustentabilidade de biorrenováveis. Estes temas se complementam e compartilham as principais competências adquiridas e desenvolvidas ao longo da existência deste Laboratório nas áreas de Biologia Sintética, Biologia Molecular Estrutural, Bioprocessos, incluindo escalonamento e Avaliações de Tecnologias e de Ecossistemas.

A seguir são descritas as linhas de pesquisa e seus projetos associados com os principais resultados deste ano. Os artigos correspondentes aos trabalhos de pesquisa e desenvolvimento *in-house* são apresentados nos anexos deste Relatório, ou apontados em notas de rodapé ao longo do texto.

Programa de Biotecnologia Industrial

A biotecnologia tem um papel relevante na produção e consumo industrial criando novos modelos a partir de matéria-prima renovável e sustentável que minimizem o impacto no meio ambiente e otimizem a utilização de recursos naturais. O CNPEM atua na lacuna existente no Brasil desde a descoberta e desenho racional de sistemas biológicos de alto desempenho até o desenvolvimento de P&D em escala semi-industrial.

O Programa de Biotecnologia Industrial tem como foco o desenvolvimento e customização de biocatalisadores e micro-organismos de alto desempenho industrial com potencial impacto em vários setores estratégicos para o Brasil como: energia/transporte (biocombustíveis), indústria/materiais (químico de renováveis e biomateriais) e agricultura (bioinsumos). No subprograma químicos renováveis e biomateriais houve desenvolvimento de enzimas e microrganismos para produção de hidrocarbonetos renováveis, que podem ser intermediários químicos ou possibilitar o desenvolvimento de rotas biológicas para combustíveis sustentáveis de aviação. Além disso, o CNPEM investiga a lignina macromolecular e solúvel visando o aproveitamento integral da biomassa renovável na busca de alternativas sustentáveis para os produtos petroquímicos. O tema agroambiental envolve a biotecnologia para a agricultura que visa fornecer base para a engenharia racional do microbioma do solo, a fim de promover uma maior disponibilidade de nutrientes, redução das emissões de gases de efeito estufa e da poluição ambiental. Além disso, também atua na prospecção de biomoléculas e desenvolve plataformas microbianas como alternativas biológicas e de baixo carbono para uma agricultura mais sustentável. Outra importante atuação é na elucidação dos mecanismos biológicos e físicos associados ao estoque de carbono no solo e a redução dos impactos ambientais, em particular gases de efeito estufa. No tema biocombustíveis, a ênfase está no desenvolvimento de coquetéis enzimáticos e de rotas de produção de etanol celulósico.

Para endereçar esses temas, o CNPEM utiliza as competências de Biologia Sintética e Molecular como a engenharia genética, desenho e engenharia de proteínas, integração de abordagens ômicas, e prospecção e descoberta por métodos avançados de sequenciamento (como "*single-cell sequencing*" e sequenciamento de 3ª geração "*long-read sequencing*"), além do estado da arte em Biologia Estrutural com síncrotron de 4ª geração e experimentos resolvidos no tempo na escala de micro e milissegundos. Conjuntamente, esta abordagem interdisciplinar gera conhecimentos mecanísticos e metabólicos que são instrumentais para guiar o desenvolvimento de macromoléculas e sistemas biológicos complexos de alto desempenho e customizados para a realidade brasileira.

Subprograma Químicos Renováveis e Biomateriais

O subprograma Químicos Renováveis e Biomateriais, possui duas linhas de pesquisa: Plataforma Biológicas e Derivados de Lignina, ambos atuam em questões fundamentais associadas à biotransformação de matérias-primas renováveis, tipicamente resíduos agroindustriais, em moléculas de alto valor agregado com aplicações nos setores alimentício, agrícola, bebidas, químico, farmacêutico, cosmético, têxtil, automobilístico e outros. Enquanto a linha de pesquisa Plataforma Biológicas engloba o desenvolvimento de enzimas e micro-organismos para converter açucares e lipídios presentes na biomassa em moléculas de maior valor agregado e a prospecção de biomoléculas e micro-organismos que possam ser utilizadas como alternativas biológicas para uma agricultura de baixo carbono, a linha de Derivados de Lignina busca a conversão de aromáticos em intermediários químicos de origem renovável.

Plataformas Biológicas

A linha de pesquisa Plataformas Biológicas é estruturante, abrangente e visa: (i) elucidar os mecanismos fundamentais de sistemas biológicos complexos formados por micro-organismos e enzimas para atuar na desconstrução, modificação e biossíntese da biomassa e (ii) entender microbiomas em níveis molecular e populacional. Para tanto, o CNPEM busca elucidar rotas metabólicas, descobrir novos biocatalisadores e desenvolver ferramentas de manipulação genética de microrganismos como fungos filamentosos, leveduras e bactérias. A seguir a descrição dos esforços de 2021 nos seguintes temas: enzimas para aplicações industriais, plataformas microbianas para aplicações industriais e agrícolas e rotas bioquímicas para hidrocarbonetos renováveis.

Enzimas para aplicações industriais

As enzimas estão presentes no processamento ou na formulação de uma vasta gama de produtos como por exemplo biocombustíveis, ração animal, alimentos, bebidas, cosméticos e detergentes. As enzimas são geralmente proteínas com propriedades catalisadoras capazes de acelerar, em ordens de grandeza, certas reações bioquímicas de maneira seletiva e altamente especializada. Os coquetéis enzimáticos, representam formulações complexas e com multi-componentes biocatalíticos, que são fundamentais para quebrar a lignocelulose em açúcares avançados e lignina, onde aqueles serão fermentados por micro-organismos engenheirados. Um notável esforço no desenvolvimento de linhagens industriais de micro-organismos envolve modificações das vias metabólicas, que são essencialmente um

conjunto de enzimas atuando em série, bioquimicamente correlacionadas, para gerar moléculas altamente puras e complexas. O CNPEM vem se consolidando com abordagens avançadas para a descoberta, compreensão e redesenho de enzimas. A descoberta é baseada em análises ômicas incluindo genômica, transcriptômica, proteômica e metabólica, que permitem uma compreensão aprofundada das propriedades funcionais e estruturais, incluindo itinerários conformacionais das reações catalíticas e determinantes estruturais para o modo de clivagem e a especificidade do substrato. O redesenho de biocatalisadores depende em grande parte da elucidação mecanística com estratégias racionais e orientadas pelas informações da estrutura tridimensional em alta resolução das enzimas, visando criar funções enzimáticas que não estão presentes na natureza, identificando assim, novas classes de enzimas de relevância industrial. As enzimas, em formas de cristais ou mesmo monodispersas em solução, são analisadas em aceleradores de luz síncrotron como o Sirius, ou em microscópios eletrônicos de última geração. Desta forma, é possível correlacionar a estrutura tridimensional das enzimas e as suas funções. O CNPEM é hoje referência nacional no desenho racional de enzimas e seus mecanismos de ação para a desconstrução vegetal.

Um dos grandes desafios para utilização dos componentes da parede celular vegetal é a despolimerização da biomassa, processo ainda não totalmente consolidado e nem economicamente viável para diversas aplicações industriais. O projeto temático FAPESP[33] "**Novas estratégias para a despolimerização de polissacarídeos da parede celular vegetal**" destaca-se na área de descoberta e desenvolvimento de enzimas e tem direcionado esforços na elucidação de novas enzimas ativas sobre carboidratos (CAZymes) com potencial de aplicação em processos industriais de relevância nacional, como nas áreas de bioenergia, produção de alimentos e setores correlatos. Trabalhos relacionados a este projeto foram destaques deste ano, incluindo dois publicados na revista *Nature Communications*. Um dos trabalhos[34], com colaboração da USP e UNICAMP e envolveu todos os laboratórios nacionais do CNPEM, desvendou toda a maquinaria molecular usada pelas bactérias *Xanthomonas* para a despolimerização da xiloglicana. A bactéria *Xanthomonas*, responsável pelo cancro cítrico, sempre foi conhecida como inimiga da citricultura e este estudo demonstrou que os mesmos processos biológicos usados pela bactéria para enfraquecer alguns dos mais importantes sistemas de defesa das plantas, a parede celular vegetal, se demonstram valiosos para a produção de biorrenováveis (*Figura 135*). Dentre os polissacarídeos da hemicelulose, a xiloglicana é uma fração significativa na maioria das plantas terrestres, com grande potencial biotecnológico. As bactérias *Xanthomonas* possuem dezenas de enzimas que degradam diferentes polissacarídeos, e este trabalho descreve a descoberta de uma família de enzimas, a carboidrato esterase (CE20 - acrônimo para *Carbohydrate Esterase family 20*), que é um dos elos da maquinária de despolimerização e captação da xiloglicana. Normalmente os açucares são fontes de carbono para os micro-organismos, porém neste caso a bactéria além disso, utilizou os açucares da despolimerização da xiloglicana como indutores de expressão de proteínas que auxiliam o microrganismo a romper a parede celular e modular os mecanismos de defesa natural da planta. O conhecimento gerado neste estudo, portanto, fornece uma nova classe de enzimas que auxilia na redução da complexidade

33 Temático FAPESP:2015/26982-0. Explorando novas estratégias para a despolimerização de polissacarídeos da parede celular vegetal: da estrutura, função e desenho racional de hidrolases glicosídicas às implicações biológicas e potenciais aplicações biotecnológicas.

34 *Xyloglucan processing machinery in Xanthomonas pathogens and its role in the transcriptional activation of virulence factors*. *Nature Communications.*

molecular das hemiceluloses facilitando a ação outras enzimas-chave na despolimerização, além de contribuir no melhor entendimento dos mecanismos moleculares associados a doença cancro cítrico, que pode ser explorado para o desenvolvimento de novas estratégias de combate a essa doença de importância agrícola no Brasil.

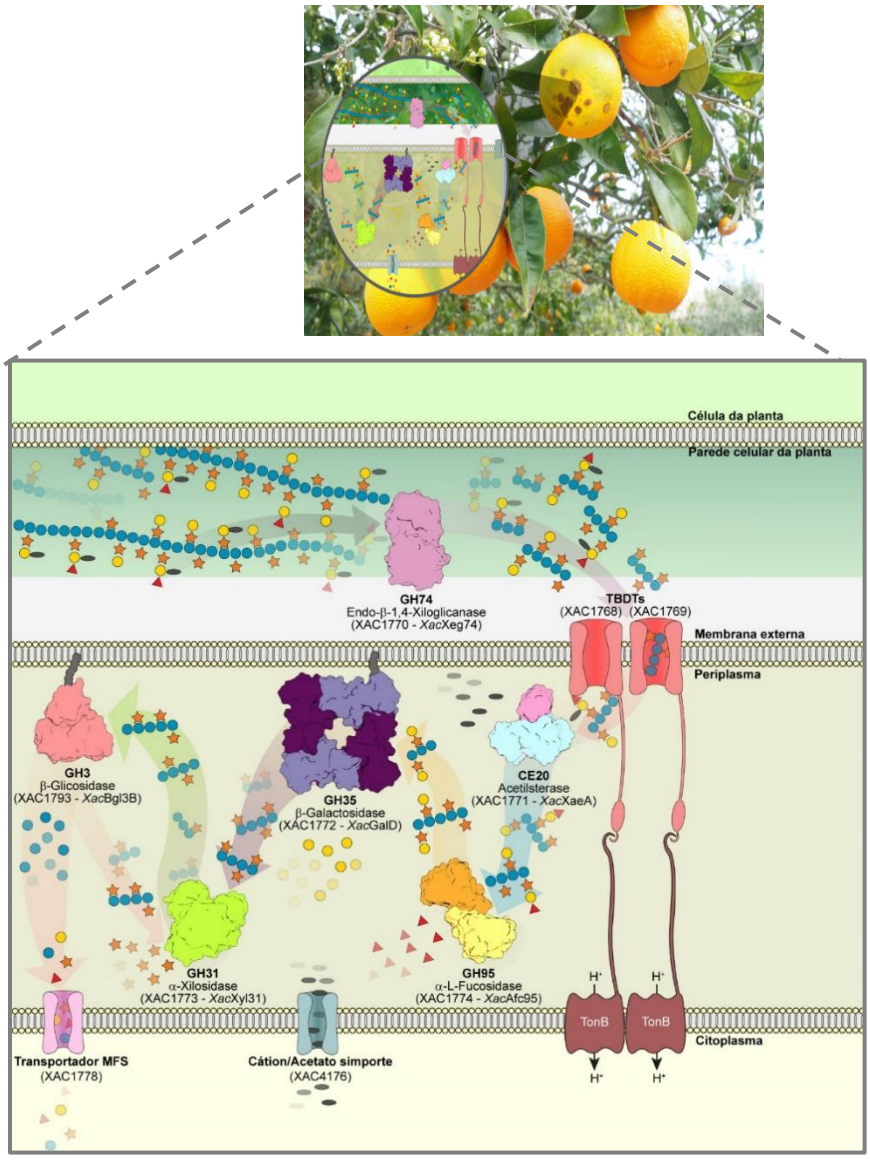


Figura 135. Despolimerização da xiloglicana pelas enzimas das bactérias Xanthomonas. As reações catalisadas por xiloglicanase, acetilesterase, α-fucosidase, β-galactosidase, α-xilosidase e β-glicosidase geram monossacarídeos. Estes, são importados para o citoplasma e podem ser usados como fonte de energia ou para desencadear uma cascata que leva ao enfraquecimento dos mecanismos de defesa da planta.

O segundo trabalho em destaque busca entender como as enzimas convertem um substrato em moléculas de valor agregado. Esta outra publicação na revista *Nature Communications*[35] utilizou uma abordagem multidisciplinar para mostrar que uma enzima (hidrolase glicosídica) que participa da despolimerização da hemicelulose é capaz de atuar por meio de dois itinerários catalíticos distintos para conversão do substrato em produto (*Figura 136*). Para que as enzimas convertam um substrato em produto, uma série de alterações conformacionais ocorrem e a esse processo dá-se o nome de itinerário catalítico. A descoberta da atuação por meio de dois itinerários catalíticos distintos quebra o paradigma de que somente uma rota para a conversão do substrato poderia ser adotada. Como as hidrolases glicosídicas são enzimas responsáveis por uma das principais bioreações da natureza e da indústria, a hidrólise de carboidratos, essa descoberta abre novos horizontes sobre o funcionamento molecular dessas enzimas e traz impactos imediatos sobre o desenvolvimento de novos biocatalisadores e inibidores.

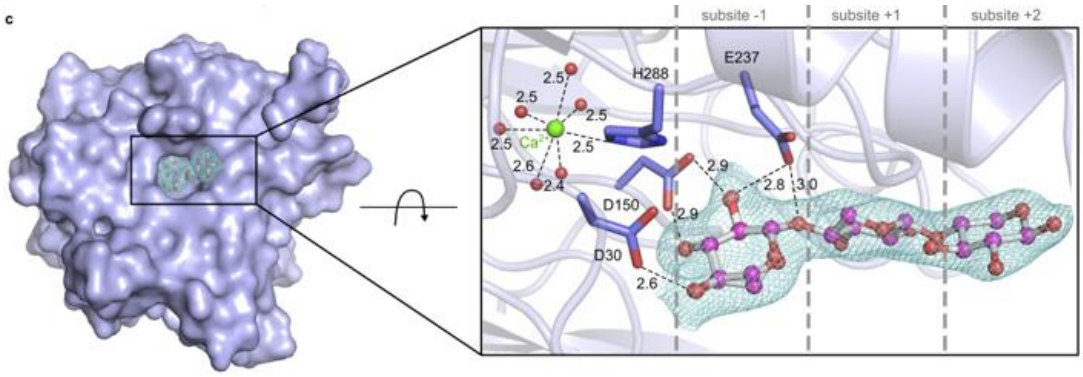


Figura 136. Estrutura cristalográfica revela enzima momentos antes de sua atuação no substrato; detalhe na enzima (em roxo) se refere ao sítio ativo, exatamente onde o substrato se liga.

Além disso, um resultado promissor foi a elucidação das bases moleculares para o funcionamento e seletividade de um conjunto de enzimas chamadas de manosidases provenientes de bactérias probióticas (Bifidobactérias). Essa informação era uma grande lacuna no conhecimento acerca das estratégias de sobrevivência das Bifidobactérias no lúmen instetinal, um nicho altamente competitivo e escasso nutricionalmente. Para isso, essas bactérias desenvolveram sistemas multi-enzimáticos para utilização de carboidratos complexos e recalcitrances, como N-glicanos. Essas enzimas são de alto peso molecular e oligomerizam, sendo bastante desafiadoras para se obter suas estruturas tridimensionais. Portanto, em uma colaboração entre o LNBR e o LNNANO, o estado-da-arte em criomicroscopia eletrônica foi empregada para obter dados estruturais de todas as enzimas manosidades dessa bactéria em resolução melhores que 3.0 Å (*Figura 137*), o que revelou o papel de sítios remotos polimórficos e mutações pontuais no sítio ativo para conferir estéreo-seletividade e preferência ao substrato. Essas informações combinadas com o estudo bioquímico de outros componentes dessa maquinária molecular permite completar todo o complexo quebra-cabeça molecular para o processamento de N-glicanos de Bifidobactérias, postulando um primeiro modelo de utilização desses carboidratos nessas bactérias

35 Morais, M. A., Coines, J., Domingues, M. N., Pirolla, R. A., Tonoli, C. C., Santos, C. R., ... & Murakami, M. T. (2021). Two distinct catalytic pathways for GH43 xylanolytic enzymes unveiled by X-ray and QM/MM simulations. *Nature communications*, *12*(1), 1-13.

probióticas e que se expande para todo o filo das Actinobactérias. Essa descoberta explica uma das estratégias moleculares de como essas bactérias sobrevivem nesse nicho, que pode ser explorado na modulação da microbiota intestinal de animais e humanos.

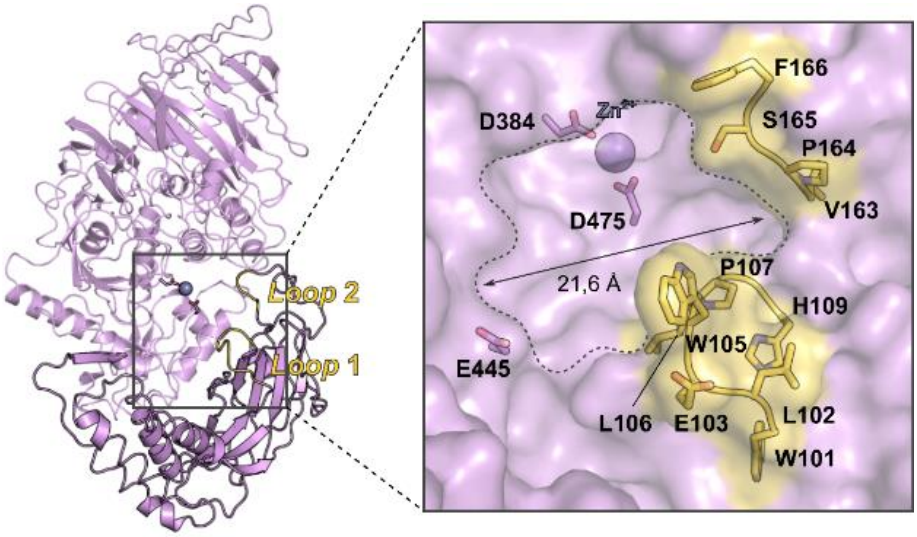


Figura 137. Sítio ativo de enzima atuante sobre os resíduos de manose em N-glicosilações. Em amarelo é destacado os elementos estruturais elucidados pela estrutura a alta resolução resolvida por criomicroscopia eletrônica no super microscópio Titan Kryos do LNNANO.

A prospecção de enzimas em manguezais é outra forma de explorar a biodiversidade e encontrar soluções para a produção de Biorrenováveis. Neste sentido destaca-se o trabalho "***Microbial enrichment and meta-omics analysis identify CAZymes from mangrove sediments with unique properties***", publicado neste ano, que utilizou um processo de enriquecimento microbiano combinado com abordagens ômicas integrativas para identificar enzimas promissoras para a desconstrução de biomassas vegetais. Uma comunidade microbiana lignocelulolítica obtida por enriquecimentos a partir de amostras de um bioma de mangue, foi submetida a pressão seletiva com o objetivo de proporcionar a degradação de bagaço de cana-de-açúcar. Análises metagenômicas e metaproteômicas realizadas após a degradação indicaram a presença de uma vasta gama de classes de enzimas de interesse para a desconstrução de biomassa, que poderão ser acessadas e exploradas para distintos processos biotecnológicos.

No trabalho "***Paradigm shift in xylose isomerase usage: a novel scenario with distinct applications***" foi realizada uma análise abrangente sobre os aspectos biológicos, bioquímicos, estruturais e termodinâmicos das xiloses isomerases, uma classe de enzimas extensivamente usadas na indústria do xarope. Esse estudo destaca o potencial da reação de isomerização intra- ou extracelular da D-xilose na biotecnologia para a produção de uma gama de outros bioprodutos que podem ser utilizados em cosméticos, na indústria farmacêutica e de alimentação, também para a produção de bioplásticos e biocombustíveis. Além disso, se discute o uso destas enzimas em sinergia com o desenvolvimento de estratégias de engenharia de bioprocessos e de biologia sintética, ampliando o portfólio de biorrenováveis possíveis de serem obtidos a partir da xilose. A Figura 138 mostra exemplos dessas novas aplicações de xilose isomerases.

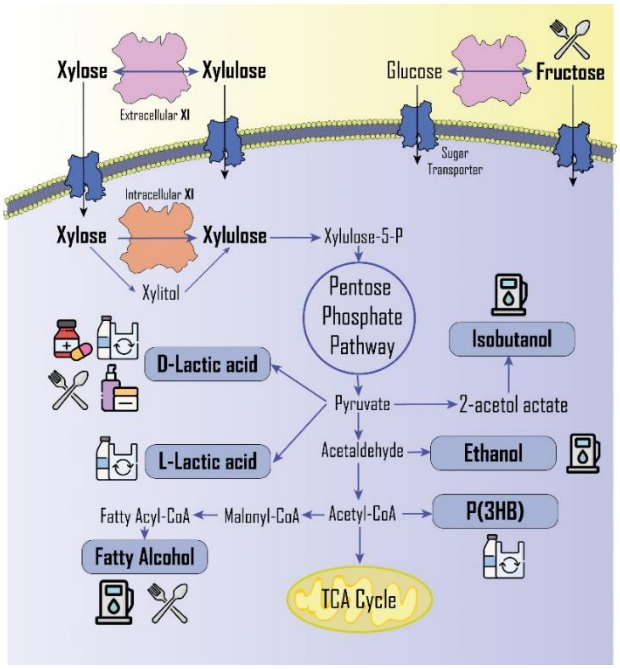


Figura 138. Possíveis aplicações de xilose isomerases.

Finalizando os destaques relacionados as enzimas industriais, o pesquisador Mario Murakami foi selecionado como um dos finalistas do **Prêmio *Science Breakthrough of the Year***[36], promovido pela *Falling Walls Foundation* (FWF), instituto alemão de promoção da ciência com sede em Berlin. Murakami concorreu na categoria *Life Sciences* (Ciências da Vida) e a pesquisa apresentada ao *Falling Walls* demonstra como o CNPEM tem empregado a elucidação molecular associada à engenharia metabólica e biologia sintética para o desenho racional de sistemas biológicos (enzimas e microrganismos) para resolver grandes desafios da biotecnologia moderna. Quebras de paradigma na biocatálise e no desenvolvimento de biofábricas celulares, também integram o projeto submetido ao Prêmio.

Plataformas microbianas para aplicações industriais

Assim como as enzimas, os micro-organismos são essenciais na biotecnologia Industrial. O metabolismo microbiano pode ser redesenhado, criando plataformas eficientes para converter biomassa em moléculas de alto valor agregado, substituindo os derivados petroquímicos. A descoberta e elucidação de novas vias metabólicas e a engenharia biológica são essenciais para aumentar a tolerância microbiana às condições extremas encontradas em processos industriais. O CNPEM emprega abordagens interdisciplinares para projetar plataformas microbianas incluindo modelos metabólicos em escala de genoma e ferramentas de biologia sintética, como engenharia genética e evolutiva, biologia de sistemas e ômicas integradas.

O desenvolvimento de chassis microbianos eficientes para a produção de bioquímicos e biocombustíveis que tolerem os estresses do processo industrial é a base da construção de biorrefinarias.

36 Fonte: http://www.cnip.org.br/banco_img/Mulungu/erythrinavelutinawilld3.html

O processo industrial de despolimerização da biomassa libera uma fração de açúcares, como a xilose, que não são convertidos naturalmente, além de produzir um conjunto de moléculas inibidoras tóxicas que afetam a cinética microbiana. O projeto financiado pelo CNPq[37] "**Engenharia racional de transportadores de xilose para aumento da eficiência de conversão de açúcares complexos da biomassa**", buscou melhorar a conversão metabólica da xilose. Para tanto, desenvolveu bibliotecas sintéticas de transportadores de membrana utilizando abordagens de evolução dirigida em conjunto com biosensores específicos de xilose. O projeto conta com uma parceria com a University of Liverpool e permitiu a construção de transportadores de açúcares com maior afinidade a xilose, aumentando a velocidade de assimilação desse açúcar.

Visando explorar a integridade da parede celular frente a inibidores e estresses bióticos e abióticos, com ênfase em compostos fenólicos, o projeto financiado pela FAPESP[38] "***Abordagens sistêmicas integradas para o desenvolvimento de leveduras como plataformas microbianas em biorrefinarias***" integra abordagens biofísicas, bioquímicas e multiômicas. Alterações estruturais e químicas na arquitetura da parede celular na levedura foram identificadas utilizando microscopia de força atômica e FTIR em parceria com LNNano e a equipe do Sirius. A análise da expressão gênica da cepa estudada frente a exposição a compostos fenólicos revelou complexas modificações fenotípicas que explicam as respostas celulares do microrganismo para a adaptação a essa condição de estresse industrial. Outra vertente complementar a este projeto FAPESP e à temática de assimilação de xilose, é o desenvolvimento racional de plataformas microbianas para a conversão da totalidade dos açúcares da biomassa. O estudo publicado[39] neste ano, identifica metabolismos envolvidos com a homeostase de metais e a sua relação direta com a fermentação de xilose, aumentando em até dez vezes as taxas de consumo de xilose. Isso permitirá a construção de cepas mais eficientes na conversão de resíduos agroindustriais em bioprodutos.

Desenvolvimento de rotas bioquímicas para hidrocarbonetos renováveis

Há uma linha de pesquisa dedicada a plataformas biológicas para a produção de hidrocarbonetos renováveis, dada a grande relevância deles na produção de petroquímicos. Hidrocarbonetos renováveis são cadeias médias e longas de alcenos e alcanos, oriundos de diferentes tipos de biomassas (lignocelulósica e óleos vegetais). Estes compostos possuem características físicas e químicas muito semelhantes às do petróleo, o que permite serem utilizados na produção de biocombustíveis (diesel verde e bioquerosene de aviação), plásticos, lubrificantes sustentáveis, dentre outros biomateriais e, portanto, são denominados compostos *drop-in*. Uma das tecnologias utilizadas para a produção de hidrocarbonetos renováveis é a conversão química, a qual utiliza altas temperaturas e pressões, metais pesados e grande quantidade de hidrogênio, o que representam grandes entraves tecnológicos e ambientais. Uma alternativa promissora para esse problema é o uso de rotas bioquímicas baseadas em micro-organismos engenheirados com enzimas altamente eficientes e específicas que são capazes de remover o oxigênio de

37 CNPq 430291/2018-3. Engenharia racional de transportadores de xilose para aumento da eficiência de conversão de açúcares complexos da biomassa.

38 FAPESP: 2020/07918-7. Abordagens sistêmicas integradas para o desenvolvimento de leveduras como plataformas microbianas em biorrefinarias.

39 Exploring metal ion metabolisms to improve xylose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*.

cadeias longas de ácidos graxos. A rota bioquímica, ao contrário a rota química, possibilita que a produção dos hidrocarbonetos renováveis seja realizada de forma mais limpa, sustentável e específica.

Essa pesquisa conta com o apoio da FAPESP[40] **"Novos mecanismos de P450: uma estratégia enzimática para a produção de hidrocarbonetos renováveis"** e foco atual vem sendo na descoberta, caracterização e aplicação de novas enzimas que removem o oxigênio de cadeias de ácidos graxos produzindo alcenos terminais, isto é, moléculas *drop-in*. Desta maneira, várias descarboxilases pertencentes à superfamília do citocromo P450 previamente selecionadas por ferramentas de bioinformática, foram produzidas heterologamente com capacidade de se ligarem a ácidos graxos. Uma delas, a descarboxilase de Rothia sp, foi capaz de promover a descarboxilação de diferentes tamanhos de cadeia de ácidos graxos, o que é muito atrativo desde a indústria de químicos renováveis até biocombustíveis. Com intuito de revelar as bases moleculares de sua reação catalítica descarboxilase, sua estrutura foi determinada por cristalografia de raios X no Sirius. A análise estrutural indicou resíduos críticos para essa atividade presentes no sítio ativo e bolsão hidrofóbico e mutantes desses resíduos de aminoácidos estão sendo avaliados para a postular um modelo catalítico dessa enzima com grande potencial biotecnológico. Atualmente todo o conhecimento acerca da atividade de descarboxilação por proteínas P450 para formação de alcenos a partir de ácidos graxos é baseado em apenas uma estrutura tridimensional disponível no *Protein Data Ban*k (PDB). Sendo assim, a estrutura molecular elucidada pelo CNPEM impactará significativamente a literatura, além de representar um novo modelo para estudo da biocatálise de conversão de ácidos graxos para compostos *drop-in*.

Biotecnologia para Agricultura

A microbiota do solo tem grande relevância para a agricultura. O solo é a base para a produção global de alimentos, biomassa e biocombustíveis e representa o principal reservatório de carbono da biosfera terrestre. Os solos tropicais têm características peculiares como a alta de infiltração de água, os baixos estoques de carbono e nitrogênio e a baixa disponibilidade de nutrientes, as quais às condições climáticas locais, fazem do Brasil um país singular quanto as vias e mecanismos que regulam as emissões de gases do efeito estufa, a estocagem de carbono, o desenvolvimento de pragas e doenças e a adsorção/disponibilidade de nutrientes no solo. Ademais, as emissões de solos, associadas à aplicação de fertilizantes e resíduos orgânicos, são centrais para o programa RenovaBio[41], uma vez que representam a principal fonte de emissão de gases dos biocombustíveis à base de biomassa no Brasil. Outro ponto crucial é que os insumos renováveis podem substituir os fertilizantes e defensivos sintéticos e aqueles oriundos de reservas minerais finitas. Insumos petroquímicos possuem impactos ambientais negativos e há anos desfavorecem a balança comercial brasileira, todas questões estratégicas para o Brasil.

A abordagem no CNPEM se baseia na busca de como o microbioma do solo pode promover uma maior disponibilidade de nutrientes para as culturas agrícolas e reduzir as emissões de gases de efeito estufa e a poluição ambiental pelo uso dos agroquímicos. Além disso, visa prospectar biomoléculas e micro-organismos para o desenvolvimento de alternativas biológicas para uma agricultura mais sustentável. A seguir os destaques das pesquisas relacionadas à Biotecnologia para Agricultura em 2021.

40 FAPESP: 2019/08855-1. Novos mecanismos de P450: uma estratégia enzimática para a produção de hidrocarbonetos renováveis.

41 Política Nacional de Biocombustíveis, instituída pela Lei nº 13.576/2017.

O CNPEM tem foco em microrganismos que podem aumentar a sanidade e produtividade vegetal através da produção de compostos orgânicos voláteis (COVs), que são pequenas moléculas sinalizadoras encontradas na forma gasosa em temperatura ambiente. Nessa temática, destacam-se alguns resultados do projeto "**Identificação e uso de voláteis bacterianos contra patógenos da cana-de-açúcar**", financiado pela FAPESP[42], que se encerrou em 2021. Em 2020, identificou-se moléculas bioativas responsáveis pela inibição do crescimento do *Thielaviopsis ethacetica*, fungo causador da doença podridão do abacaxi na cana-de-açúcar. Em 2021, verificou-se que o fitopatógeno, em contato com estas moléculas, **hipo**-expressa diversos genes relacionados ao metabolismo central e a obtenção de energia, o que pode justificar seu menor crescimento nesta condição. Também foi observado que o fungo **hiper**-expressa um conjunto de genes que formam um complexo de reparo de DNA dupla fita conhecido como MRN, o que levantou a hipótese de que estas moléculas gasosas poderiam causar danos no DNA do fitopatógeno. Para comprovar esta hipótese, em colaboração com pesquisadores do Sirius, realizou-se análises de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) (Figura 139), e de fato foi verificado que o DNA do fungo estava danificado caracterizado pelo deslocamento do pico de 1080 para 1040 cm^{-1}.

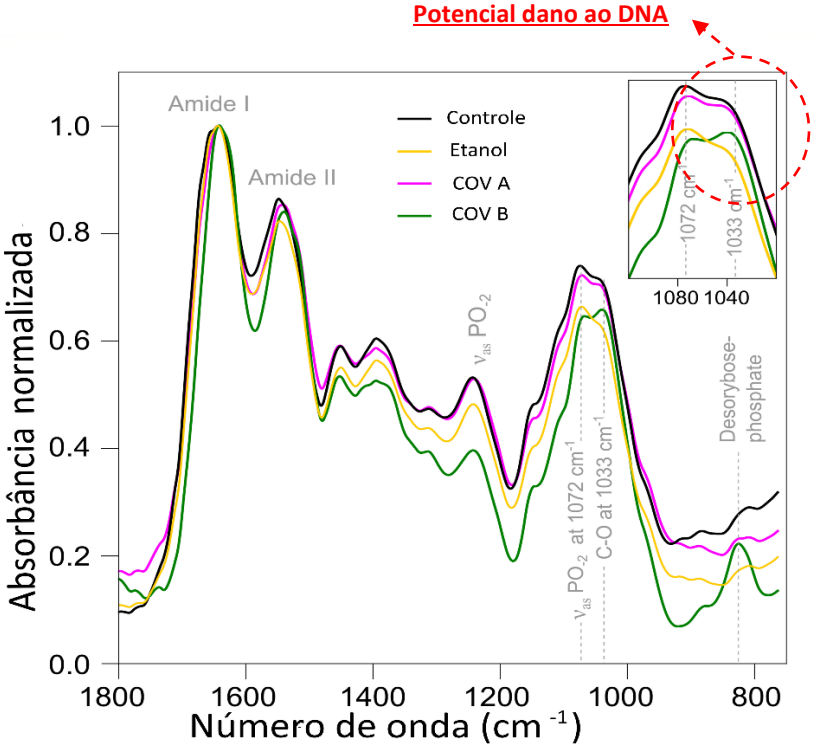


Figura 139. FTIR, gráfico com absorbância em diferentes faixas. Visualização de potencial dano ao DNA. Em geral, os espectros da faixa 1280–1000 cm^{-1} correspondem à estrutura do DNA. A região amplificada (1100 a 1000 cm^{-1}) mostra uma alteração no perfil de bandas na amostra tratada com o COV B que, segundo a literatura, é um indicativo de dano ao DNA, o que corrobora os dados de expressão gênica.

Para melhor entender o papel do COVs no fungo foram realizadas análises de microscopia eletrônica com e sem o contato com os COVs, que indicaram um severo dano celular causado pelos COVs.

42 FAPESP: 2017/24395-5. Identificação e uso de voláteis bacterianos contra patógenos da cana-de-açúcar.

Nas amostras sem COVs (*Figura 140*A), é possível visualizar o conteúdo celular organizado, organelas nítidas e em maior número (como por exemplo, as mitocôndrias), material de reserva visível, membrana plasmática aderida à parede celular, e núcleo integro, não granular. Já nas amostras tratadas (*Figura 140*B), há poucas organelas presentes, desorganização celular, membranas não estão aderidas a parede celular, e núcleo com conteúdo condensado, características que culminam com a morte celular. A descoberta deste COV cria uma alternativa biológica eficaz para o controle desta praga de importância econômica para o setor canavieiro. Estes e outros resultados deste projeto foram apresentados no *workshop* EsalqShow[43] e teve a cadeia produtiva da cana-de-açúcar como temática central, visando estimular inovações e o empreendedorismo neste setor.

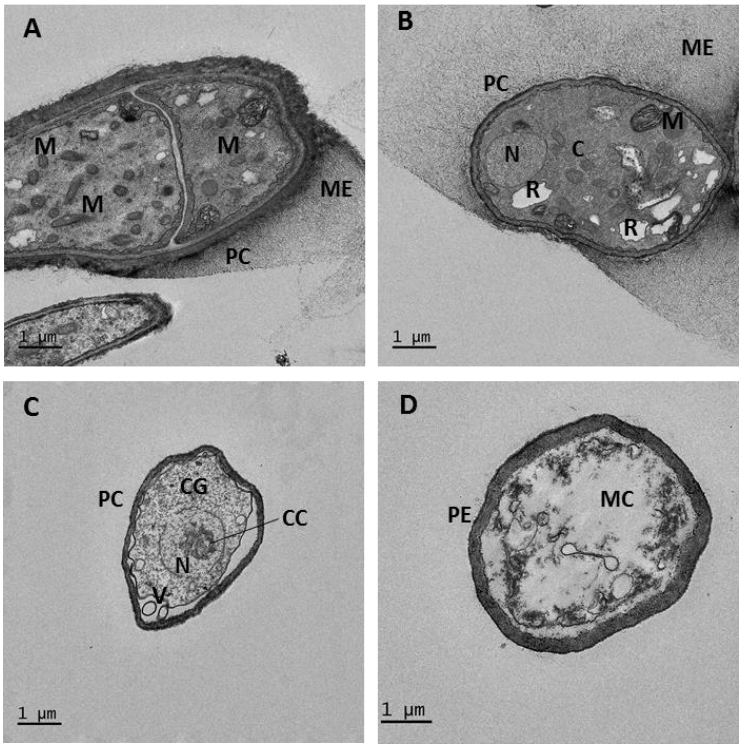


*Figura 140. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de cortes do micélio do fitopatógeno, sem (**A** e **B**) e com os COVs (**C** e **D**). C = citoplasma, CG = citoplasma granular, M = mitocôndria, MC = morte celular, ME = mucilagem externa, MP = membrana plasmática, MV = membrana plasmática não aderida à parede, N = núcleo, R = conteúdo de reserva, PC = parede celular, PE = parede celular mais espessa, V = vacúolo*.

Outra linha de destaque foi a elucidação dos mecanismos que regulam as emissões de gases de efeito estufa dos solos. O óxido nitroso (N_2O), um dos principais gases causadores do efeito estufa, é emitido majoritariamente pela aplicação de fertilizantes sintéticos e orgânicos em solos sob cultivo agrícola. As emissões de N_2O do solo e suas relações com a comunidade microbiana do solo são estudadas no projeto "**Adubação nitrogenada e práticas alternativas de manejo do solo na cana energia e seus efeitos nas emissões de gases do efeito estufa".** Neste projeto, foram finalizadas as atividades do Projeto

43 Na Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (Esalq/USP).

BEPE-FAPESP[44] em parceria com o Instituto Francês de Pesquisa em Agricultura e Ambiente (INRAE). Por meio de análises de qPCR[45], o projeto avaliou o efeito dos tratamentos nos genes funcionais responsáveis pelas emissões de N_2O em solo tropical e qual o papel de resíduos orgânicos, tais como a vinhaça e o biochar[46] nestas emissões. A aplicação do biochar se mostrou uma alternativa viável para mitigar as emissões de N_2O do solo, enquanto a adição de vinhaça no solo acentuou estas emissões. Diferentemente do reportado na literatura para solos em condições de clima temperado, no qual as reduções das emissões de N_2O ocorrem por meio da rota da desnitrificação, os resultados indicaram que o biochar reduziu a atividades de nitrificadores (bactérias e arquéias oxidadoras de amônio). Estes resultados demostram que a nitrificação é a rota predominante de produção de N_2O e que o biochar pode ser considerado como uma estratégia (natural e renovável) de mitigação das emissões. Vale ressaltar que novos estudos serão realizados para corroborar estas evidências.

Por fim há dois trabalhos relacionados ao ciclo do nitrogênio. O primeiro, com o título **"*Implications of regional N_2O-N emission factors on sugarcane ethanol emissions and granted decarbonization certificates*"** foi publicado em revista de ampla circulação e repercutiu na mídia[47], ao revelar que a emissão de N_2O em solos tropicais é menor que o valor preconizado pelo Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC). Realizado em colaboração com pesquisadores do Instituto Agronômico de Campinas (IAC), o trabalho obteve, de forma inédita, fatores regionais de emissão de N_2O resultantes da aplicação de fertilizantes nitrogenados em áreas de cana-de-açúcar. O uso destes fatores regionais (baseado em medições feita no Brasil) reduziu em 17% as emissões totais de GEE do etanol de cana-de-açúcar em comparação àqueles estimados utilizando o fator padrão do IPCC (*Figura 141*). O estudo demonstrou ainda que a adoção de práticas inovadoras, como a aplicação de inibidores de nitrificação, pode reduzir ainda mais as emissões dos solos tropicais e assegurar uma maior obtenção de certificados de descarbonização (CBIOs) previstos no programa RenovaBio[48], melhorando a sustentabilidade do etanol brasileiro. Já o segundo projeto "***How do nitrogen fertilization and cover crop influence soil C-N stocks and subsequent yields of sugarcane?",*** verificou que a aplicação de fertilizantes nitrogenados sintéticos não afeta a estocagem de carbono e nitrogênio do solo, mas a inclusão de uma planta fixadora de nitrogênio atmosférico, aumenta os estoques de nitrogênio do solo e o potencial produtivo de plantas de cana-de-açúcar (aumento entre 9 e 15%).

44 FAPESP 2019/21817-1: Microbiota associada a emissão de N_2O em solo sob plantio de cana energia.
45 Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real.
46 Biomassa de origem vegetal processada por meio de pirólise.
47 Etanol brasileiro polui menos do que se pensava, diz estudo - Valor
48 Política Nacional de Biocombustíveis, instituída pela Lei nº 13.576/2017.

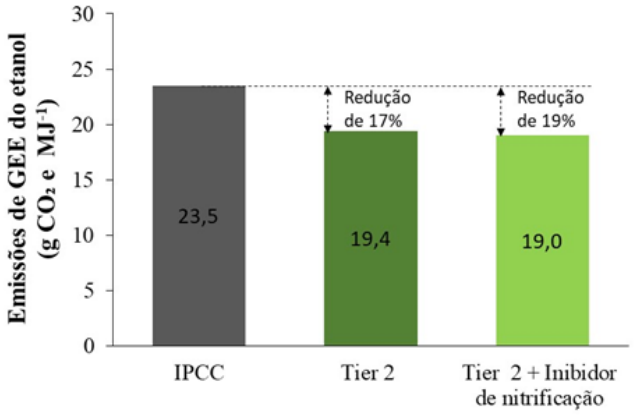


Figura 141. Emissões de GEE do etanol de cana-de-açúcar considerando o uso de fatores de emissões de N_2O recomendados pelo IPCC e novo fator com dados medidos em solo brasileiros (Tier 2 e Tier 2 + inibidores de nitrificação).

Derivados de Lignina

Esta linha de pesquisa visa a valorização da lignina, que é um dos três principais componentes macromoleculares da biomassa lignocelulósica e, nesse contexto, a principal fonte renovável de compostos aromáticos. Entretanto, nas biorrefinarias a lignina possui baixo valor agregado sendo queimada para a geração energia. Produtos como fragrâncias, solventes e plásticos podem ser produzidos a partir de químicos obtidos de lignina, permitindo substituir por equivalentes renováveis, os produtos químicos hoje derivados do petróleo, além de criar oportunidades para obtenção de novas moléculas com vantagens funcionais em relação aos petroquímicos atuais. Apesar das particularidades de cada bioquímico derivado da lignina, existem desafios comuns como a compreensão dos mecanismos de despolimerização da lignina macromolecular e a conversão da diversidade de fragmentos de lignina despolimerizada em um único composto alvo. O CNPEM emprega ferramentas de biologia sintética, química, modelagem computacional, radiação síncrotron e instrumentação de larga escala na planta piloto para o desenvolvimento de bioquímicos derivados de lignina.

O foco atual visa a obtenção de ácidos orgânicos de alto valor agregado a partir da lignina. O primeiro passo é despolimerizar a lignina gerando compostos aromáticos monoméricos (bio-óleos), aptos a sofrerem bioconversão para moléculas de maior valor agregado. Em seguida, é necessário criar plataformas biológicas capazes de realizar essa bioconversão para a obtenção dos compostos de interesse, que também envolve o desenvolvimento de bioprocessos e estratégias de recuperação, separação e purificação dos produtos. Em 2021, destacam-se os esforços na despolimerização de lignina e na obtenção de microrganismo capaz de realizar a bioconversão dos bio-óleos gerados, com três avanços relevantes: (i) despolimerização hidrotérmica de lignina, (ii) consolidação de métodos analíticos para lignina despolimerizada, e (iii) modelagens computacionais para fragmentos de lignina despolimerizada.

Na despolimerização de lignina, destacam-se resultados do projeto "**Modificação biológica de fragmentos de lignina na obtenção de compostos fenólicos**", financiado pela FAPESP49 e CAPES50. Este projeto visa aproveitar ligninas obtidas a partir do bagaço de cana-de-açúcar na produção de diferentes monômeros fenólicos e outros químicos de alto valor agregado, com abordagens experimentais para a despolimerização hidrotérmica de lignina (*Figura 142*). Como a lignina é uma macromolécula complexa, formada pela polimerização de fenilpropanoides (monolignois) é necessário primeiro realizar sua despolimerização, quebrando as principais ligações que formam a lignina macromolecular para obter alto rendimento de compostos aromáticos monoméricos.

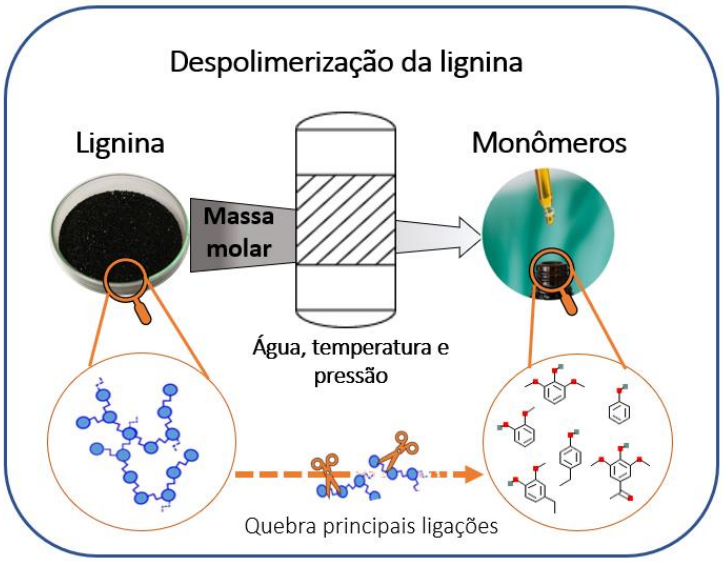


Figura 142. Ilustração da despolimerização hidrotérmica da lignina em monômeros aromáticos (bio-óleo).

Este ano foram realizados experimentos de despolimerização de lignina em condições otimizadas com o intuito de obter, na fase aquosa, o máximo rendimento em monômeros e oligômeros aromáticos derivados da lignina. Tipicamente a despolimerização pirolítica não é solvente em água, portanto a necessidade da despolimerização hidrotérmica para o aproveitamento biológico do bio-óleo que precisa ser feito em meio aquoso. O fluxograma da *Figura 143*mostra as etapas de despolimerização hidrotérmica (fases aquosas, sólidas e orgânicas). As frações bio-óleos (ricas em fragmentos de lignina) obtidas foram empregadas para o desenvolvimento de metodologias analíticas, balanços de massas e estudos de extrações líquido-líquido como estratégia de recuperação dos fragmentos derivados de lignina.

49 FAPESP 2019/22213-2: Modificação biológica de fragmentos de lignina na obtenção de compostos fenólicos.
50 Bolsa PCI CAPES/CNPEM.

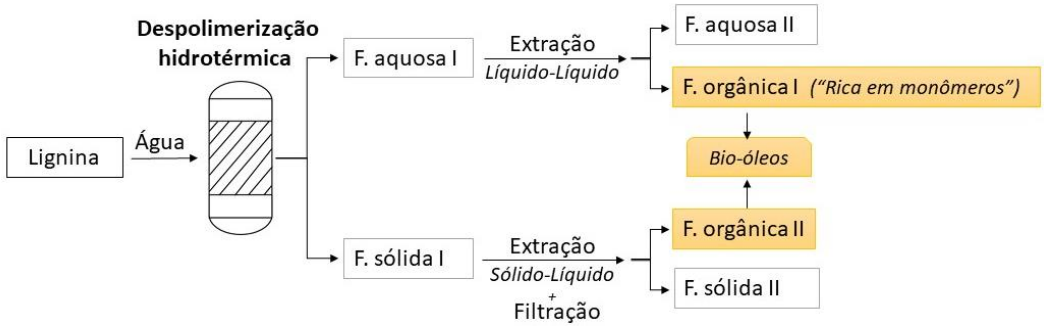


Figura 143. Fluxograma das principais etapas de despolimerização hidrotérmica da lignina.

Os bio-óleos são as fontes de carbono para o crescimento dos micro-organismos e o fluxograma da *Figura 144* mostra o funcionamento do funil biológico, que começa com a alimentação do bio-oleo extraído das frações orgânicas I e II da *Figura 143*. Uma nova fração aquosa III contendo diferentes monômeros aromáticos é usada para a conversão biológica produzindo uma fração orgânica III (rica em ácidos carboxílicos) e um fração sólida III (rica em resíduos microbianos). Os ácidos carboxílicos são o produto químico renovável de interesse e os resíduos microbianos serão fruto de nova linha de pesquisa para agregação de valor.

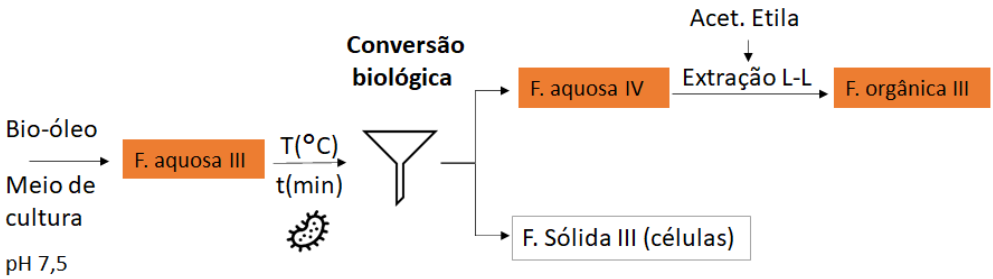


Figura 144. Fluxograma do tratamento biológico do bio-óleo.

O projeto "**Desenvolvimento e validação de método de cromatografia por permeação em gel (GPC) para determinação da distribuição de massa molar de frações contendo fragmentos de lignina**" viabiliza o monitoramento das reações de despolimerização e do consumo biológico dos fragmentos de lignina. Até então o CNPEM não possuía metodologia para quantificar a eficiência de despolimerização da lignina. A *Figura 145* mostra como a GPC identifica os diferentes tipos de fragmentos de lignina, o que também possibilitará a quantificação temporal da eficiência de despolimerização.

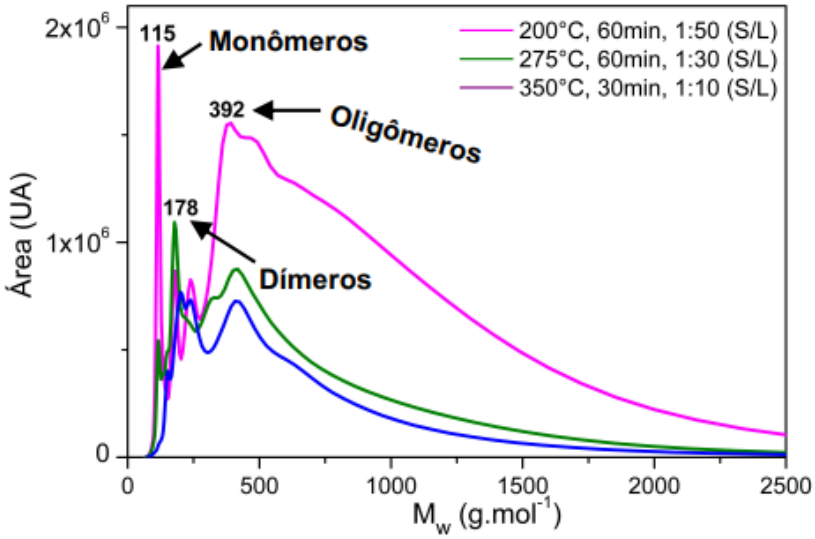


Figura 145. Distribuição de massa molar de lignina de bagaço de cana despolimerizada pelo processo hidrotérmico sob diferentes condições de temperatura, tempo e relação sólido-líquido.

Os bio-óleos de lignina possuem uma grande diversidade de compostos que necessitam ser identificados. Essa diversidade vem sendo estudada a partir de uma biblioteca de compostos dedicada à fragmentos de lignina. Para esse estudo o CNPEM utiliza modelagens computacionais de fragmentos de lignina despolimerizada. Este ano uma primeira versão da biblioteca foi construída com mais de 300 compostos cujas propriedades foram obtidas de dados públicos, com destaque para a biblioteca NIST/EPA/NIH (para padrão de fragmentação em espectrometria de massas) e a base PubChem (para propriedades gerais dos compostos). As informações das bibliotecas públicas foram complementadas por cálculos de DFT (*Density Functional Theory*) realizados pela equipe do CNPEM. Testes demonstraram a viabilidade da abordagem de DFT para complementação das informações obtidas de bibliotecas públicas.

A bioconversão dos vários compostos aromáticos derivados da lignina em moléculas únicas de interesse industrial tem sido a estratégia utilizada pelo CNPEM para superar o desafio da heterogeneidade química desse abundante resíduo agroindustrial e assim viabilizar seu uso como matéria prima na indústria de transformação. No estudo **"Investigação das rotas metabólicas utilizadas por *Xanthomonas axonopodis pv. citri* para a utilização de compostos aromáticos derivados da lignina**, apoiado pela FAPESP[51], demonstrou-se, nesse ano, que a bactéria *Xanthomonas axonopodis pv. citri* (*Xac*) é capaz de metabolizar diversos compostos derivados de lignina, incluindo amostras complexas como o bio-óleo de melhor rendimento em monômeros resultante da despolimerização hidrotérmica e de uma lignina alcalina comercial. A *Figura 146* mostra as curvas de crescimento da *Xac* em vários meios (painéis: a, b e c). O consumo dos compostos modelo foi validado por análises de HPLC como mostrado no painel (d) usando o álcool coniferílico como exemplo. Outros picos identificados no cromatograma representam metabólitos intermediários da bioconversão desse álcool.

51 FAPESP: 2019/06921-7. Investigação das rotas metabólicas utilizadas por *Xanthomonas axonopodis pv. citri* para a utilização de compostos aromáticos derivados da lignina. 2019/08590-8: bolsa de doutorado.

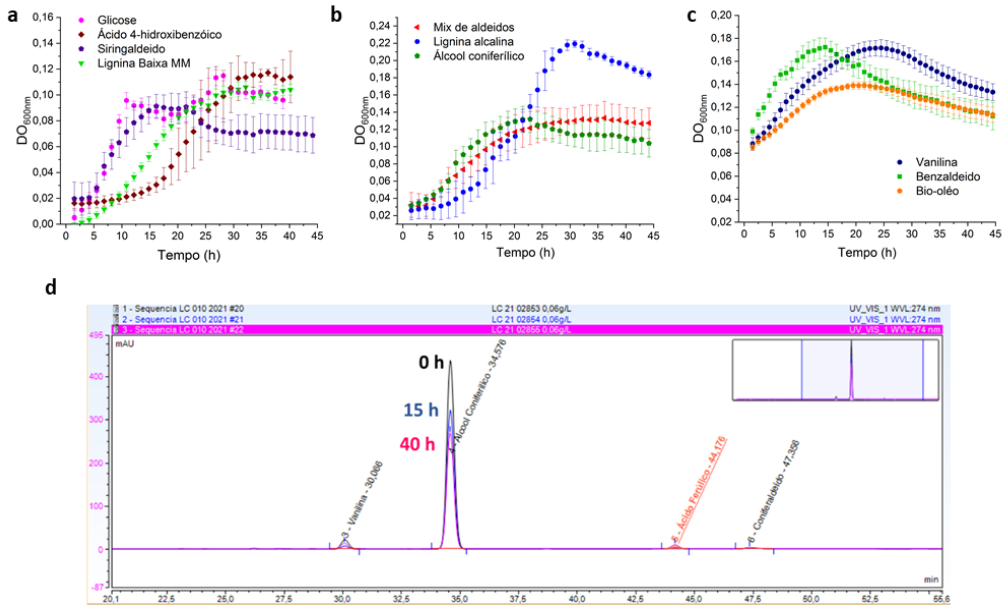


Figura 146. Bioconversão de derivados de lignina por Xac. Curvas de crescimento de Xac (a, b e c). Todas as condições, com exceção do ácido 4-hidroxibenzoico e lignina de baixa massa molar, contém glicose como fonte adicional de carbono. Consumo de álcool coniferílico pela Xac (d) com picos de metabólitos intermediários da bioconversão.

Para se desvendar quais genes a *Xac* utiliza para o metabolismo de álcoois, aldeídos e ácidos aromáticos derivados de lignina, além de misturas complexas de compostos resultantes da sua despolimerização, foram realizadas análises na instalação de Sequenciamento de Alta Performance (NGS) do CNPEM. As etapas de crescimento bacteriano, extração e quantificação de RNA, depleção do rRNA, montagem da biblioteca de cDNAs e sequenciamento genético foram concluídas, com análise dos dados em andamento. Assim, espera-se elucidar novas rotas metabólicas de bioconversão de aromáticos para chassis microbianos capazes de transformar amostras complexas de fragmentos de lignina em produtos de relevância industrial.

Na temática da lignina destaca-se ainda o resultado de uma colaboração com a Universidade Federal de Pernambuco que teve como objetivo a valorização das biomassas abundantes no norte-nordeste brasileiro. O trabalho "***Characterization of a lignin from Crataeva tapia leaves and potential applications in medicinal and cosmetic formulations***" realizou o isolamento e caracterização de uma lignina extraída das folhas de *Crataeva tapia*. Os resultados dos ensaios *in vitro*, mostraram que a lignina obtida é um potencial agente antioxidante. A macromolécula não apresentou toxicidade frente a células animais, além disso, foi capaz de promover proliferação e ativação celular. Em ensaios de fotoproteção *in vitro*, a lignina apresentou resultados bastantes promissores. Estes resultados reforçam o uso farmacológico das folhas de *Crataeva tapia* e sugerem a necessidade de novos estudos *in vivo* para determinar os potenciais aplicações medicinais e cosméticas desta biomassa.

Outro importante componente da biomassa é a celulose, o biopolímero mais abundante do planeta. São várias as soluções para seu aproveitamento na forma macromolecular em produtos de alto valor agregado. As fibras de celulose podem ser parcialmente desconstruídas em blocos conhecidos como celulose fibrilada, de dimensões variáveis e controláveis que se estendem até à nanoescala. Esses blocos

são utilizados para o desenvolvimento de uma nova geração de materiais tecnológicos e avançados de base renovável. O destaque deste ano neste tema é a publicação na revista *Nature* "***Developing fibrillated cellulose as a sustainable technological material*"**. Liderado por grupo da *University of Maryland* (EUA) e coautoria de pesquisadores do Japão, Europa e América do Norte, o trabalho aponta caminhos para o futuro das pesquisas para desenvolvimento da celulose fibrilada como plataforma de novos biomateriais sustentáveis. Foram exploradas aplicações em compósitos, fibras, películas, membranas e géis e destacados os desafios para ganhos de escala na produção desses materiais.

Subprograma Biocombustíveis

Os biocombustíveis têm papel central na substituição de combustíveis fósseis nas matrizes energéticas de transporte e, consequentemente, na mitigação da emissão dos gases de efeito estufa. O Brasil é reconhecido mundialmente pela sua matriz energética renovável e pelo pioneirismo no desenvolvimento de bioetanol. Com o desenvolvimento dos setores de etanol e biodiesel, os combustíveis líquidos no Brasil experimentaram mudanças significativas ao longo das últimas décadas. Dentre as opções tecnológicas para aumento da produção de biocombustíveis que vêm sendo desenvolvidas no Brasil, destaca-se o etanol celulósico ou de segunda geração, que apresenta vantagem de poder ser produzido a partir de resíduos agroindustriais com baixos impactos ambientais. Outras opções tecnológicas para o país baseiam-se no desenvolvimento de rotas de produção de biocombustíveis para transporte aéreo, marítimo e rodoviário para veículos pesados. Tendo em vista a ausência de oferta desses biocombustíveis em escala comercial no curto prazo, deve existir uma confluência de fatores para superar os desafios da oferta no país, visto que a utilização de combustíveis sustentáveis é imprescindível para assegurar a operação dos serviços de transporte em um cenário de limitações de emissões de gases de efeito estufa.

O CNPEM tem apoiado o desenvolvimento de tecnologias para a produção de etanol celulósico, em especial por meio da construção de um coquetel enzimático competitivo e do desenvolvimento de cepas microbianas capazes de metabolizar de forma integral os açúcares fermentescíveis provenientes da biomassa. Outras opções tecnológicas apoiadas para o país baseiam-se no desenvolvimento de rotas de produção de biocombustíveis para transporte aéreo, marítimo e rodoviário para veículos pesados.

Etanol

O bioetanol a partir do caldo da cana-de-açúcar é um biocombustível avançado devido ao seu baixo índice de emissões de gases de efeito estufa, quando comparado à gasolina, além de apresentar custo competitivo e de possuir mercado consolidado no Brasil. Visando a maior disponibilidade de combustíveis e ao aproveitamento de biomassa o etanol celulósico despontou como nova tecnologia. Considerando o aproveitamento de palha e bagaço de cana-de-açúcar para geração do etanol celulósico, é possível aumentar em até 50% a produção de etanol no País, com redução de até 30% nos impactos ambientais. Entretanto, o etanol celulósico requer o desenvolvimento de novas tecnologias e o CNPEM tem atuado no desenvolvimento de tecnologias nacionais para coquetéis enzimáticos, leveduras e de rotas de produção de etanol celulósico, pois estas tecnologias são controladas por oligopólio estrangeiro.

A obtenção de coquetéis enzimáticos específicos para a sacarificação da biomassa a um baixo custo e em grandes quantidades é um dos desafios a serem superados para viabilizar a produção do etanol celulósico no país. A eficiência da sacarificação enzimática depende de múltiplos fatores relacionados à natureza e composição da biomassa, ao tipo de pré-tratamento e as propriedades funcionais das enzimas. Assim, a obtenção de uma sacarificação eficiente requer o desenvolvimento de coquetéis enzimáticos customizados com enzimas específicas para cada biomassa e tipo de pré-tratamento. Para tanto, o CNPEM tem dedicado esforços extensivos para desenvolver uma plataforma fúngica para a produção de enzimas para reduzir o custo da produção de etanol celulósico com tecnologia brasileira validada em condições de operação industrial. O projeto "**Desenvolvimento de novas plataformas enzimáticas visando a produção de biocombustíveis**" emprega uma abordagem interdisciplinar, que engloba desde a biologia molecular até a avaliação técnico-econômica. Em 2021, foram realizados vários cultivos em biorreatores de bancada com o objetivo de otimizar parâmetros para o crescimento e produção enzimática pela plataforma fúngica desenvolvida pelo CNPEM. Os resultados possibilitaram identificar as condições ideais de inóculo, pH, temperatura e alimentação para o escalonamento da tecnologia em escala piloto. Paralelamente, foi iniciada a avaliação técnico-econômica do processo de produção enzimática com as informações dos testes em bancada. Além disso, neste período duas novas modificações genéticas do fungo foram realizadas na tentativa de aumentar a sua capacidade de produção de celulases e melhorar a eficiência de sacarificação da biomassa.

Para aumentar a eficiência dos processos biotecnológicos usados na produção do etanol celulósico é preciso conhecer a estrutura da biomassa. Nessa temática, o CNPEM colabora com o **INCT Bioetanol**[52] e ao longo de 2021 seguiu aprofundando o conhecimento sobre os componentes inorgânicos da biomassa. Destaca-se a publicação de revisão vinculada ao estudo "Imageamento multimodal dos componentes inorgânicos intrínsecos e extrínsecos do bagaço e da palha de cana-de-açúcar". Essa apresentação estruturada do papel dos inorgânicos permitirá melhorias nos desenhos racionais de novos processos de bioenergia e biorrefino que utilizem a biomassa de cana-de-açúcar, servindo de base também para entendimento de outros resíduos agrícolas e gramíneas energéticas.

Outra atuação na produção de etanol está relacionada aos microrganismos e enzimas responsáveis pela fermentação dos açúcares. Além da tradicional levedura modelo industrial *S. cerevisiae*, o estudo com leveduras não-convencionais fornece uma base ampla para o redesenho de vias metabólicas. Nesse contexto, a levedura *Spathaspora passalidarum* é uma potencial plataforma para aplicações industriais na obtenção de biocombustíveis e bioquímicos devido sua capacidade natural de fermentar xilose. Neste ano foi finalizado o trabalho "**Estudo fisiológico de *Spathaspora passalidarum* na cofermentação de hexoses e pentoses em etanol de segunda geração**". Além da capacidade natural de produzir etanol a partir de pentoses, a levedura *S. passalidarum* também pode ser utilizada como plataforma biológica para obter outros compostos químicos a partir da biomassa vegetal. O trabalho publicado neste ano discute sobre o potencial desta levedura não-convencional em biorrefinarias. Parâmetros fermentativos e cinéticos em hidrolisados industriais são comparados com a levedura tradicional *S. cerevisiae*, mostrando o potencial da *S. passalidarum* na produção de etanol e outros bioquímicos.

52 O INCT é co-financiado por CNPq, CAPES e FAPESP.

No que diz respeito a enzimas para produção de etanol, destaca-se também a parceria com a UFMG na publicação "***Simultaneous saccharification isomerization and Co-fermentation – SSICF: A new process concept for second-generation ethanol biorefineries combining immobilized recombinant enzymes and non-GMO Saccharomyces***" que propõe um novo conceito de sacarificação, isomerização e co-fermentação simultânea (SSCIF) do bagaço de cana-de-açúcar. Estratégias integradas de bioprocessos podem facilitar a produção de etanol a partir dos açúcares glicose e xilose, presentes em materiais lignocelulósicos. O processo discutido no trabalho envolve um sistema multi-enzimático imobilizado em nanopartículas de ferro, além do uso de levedura sem modificações genéticas, permitindo o reuso de enzimas recombinantes por magnetismo (*Figura 147*). O processo tem patente requerida[53].

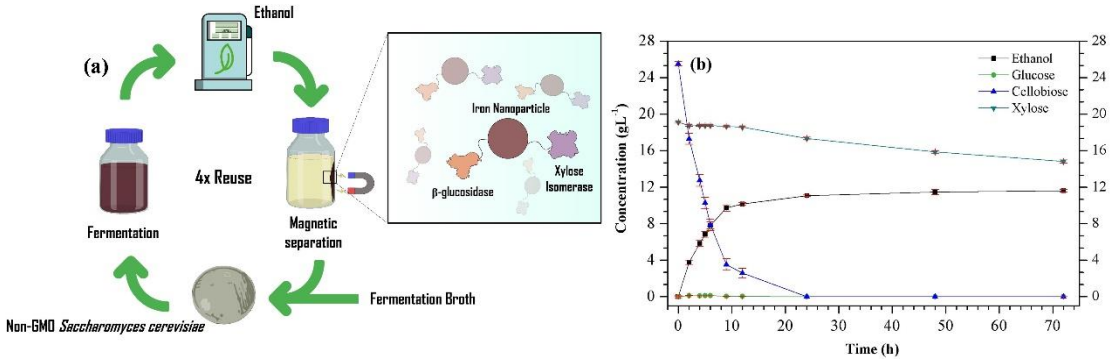


Figura 147. (a) Novo conceito de SSICF permitiu o reciclo das enzimas imobilizadas utilizando um magneto. (b) resultado do perfil de produção de etanol por meio da SSCIF utilizando enzimas imobilizadas em nanopartículas de ferro.

Vale observar que muitos resultados reportados no item Biotecnologia Industrial, incluindo o desenvolvimento de enzimas e microrganismos, podem também ser direcionados à produção de biocombustíveis.

Programa de Sustentabilidade

O Programa de Sustentabilidade visa assegurar o uso da biotecnologia e dos processos industriais no âmbito do desenvolvimento sustentável. O CNPEM possui ferramentas para avaliar quantitativamente os impactos na sustentabilidade (econômica, ambiental e social) das tecnologias em desenvolvimento, bem como dos impactos globais em ecossistemas. Há alinhamento com os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) estabelecidos pela Organização das Nações Unidas ao desenvolver tecnologias para produção sustentável de biorrenováveis de forma a manter positivo o balanço entre os serviços e desserviços ecossistêmicos gerados por estas cadeias produtivas.

Subprograma Sustentabilidade de Biorrenováveis

A transição para uma economia de base biológica requer a garantia de que os biorrenováveis produzidos minimizarão os impactos sobre o meio ambiente, otimizarão o uso dos recursos naturais e

53 Patente: INPI – BR 1020200111221

promoverão benefícios socioeconômicos. Em relação a sustentabilidade de biorrenováveis o CNPEM direciona suas linhas de ação em dois níveis. No nível de biorrefinarias e rotas de produção de biorrenováveis o CNPEM realiza avaliação tecnológica de modelagem e simulação de processos industriais utilizando técnicas avançadas de modelagem e simulação para antecipar os impactos ambientais e econômicos da produção visando orientar os desenvolvimentos tecnológicos e apoiar os processos de tomada de decisão em vários níveis. Em um nível mais amplo desenvolve uma plataforma para quantificação e avaliação dos serviços e desserviços dos ecossistemas, em escala regional e nacional, para assegurar a produção sustentável de biorrenováveis. Um exemplo de serviços ecossistêmicos é a mitigação da mudança climática e de desserviços a emissão de gases de efeito estufa.

Avaliação Tecnológica

Considerando que os biorrenováveis podem ser produzidos utilizando uma grande variedade de matérias-primas com múltiplas combinações de caminhos de conversão industrial, é importante compreender completamente seus impactos antes de escalonar novas tecnologias em biorrefinarias. A necessidade de antecipar as consequências adversas antes da implementação real em larga escala é fundamental para promover a competitividade econômica, melhorar os benefícios ambientais e socioeconômicos a curto e longo prazo. O CNPEM emprega sua própria plataforma avaliação, denominada Biorrefinaria Virtual, para avaliar as tecnologias envolvidas na produção de biorrenováveis. Esta plataforma combina modelos matemáticos e ferramentas de simulação para avaliações customizadas, que consideram toda a cadeia de produção e integram modelos de produção agrícola a diversas configurações industriais. A plataforma se baseia no conceito de *Process Design* para avaliar uma nova tecnologia, cujos indicadores são dados pela avaliação técnico-econômica e pela Avaliação do Ciclo de Vida (ACV). Também apoia ciclos contínuos de desenvolvimento tecnológico, auxiliando os processos de tomada de decisão na escala da biorrefinaria.

Este ano, destacam-se resultados do estudo "**Avaliação de alternativas de integração energética e hídrica de biorrefinarias de cana-de-açúcar**", cujo objetivo é identificar oportunidades de integração e otimizar o uso de calor e água em biorrefinarias de cana de primeira e de segunda geração. Para biorrefinarias de primeira geração, os resultados mostraram que a integração hídrica é capaz de diminuir a captação de água do processo em até 25%. Combinada à integração energética, essa redução foi superior a 50%, demonstrando a importância de considerar os usos de vapor e água de forma conjunta.

Também neste ano foram publicados dois capítulos – **modelagem matemática e simulação e avaliação econômica de bioprocessos** – como parte de um livro[54] dedicado a Biotecnologia Industrial (2ª edição). Este livro, referência teórica para profissionais, estudantes e pesquisadores da área, oferece conhecimentos relevantes e atualizados sobre engenharia bioquímica dentro do escopo da biotecnologia industrial.

Outra iniciativa em andamento envolve a integração da indústria sucroenergética com a pecuária. A expansão da produção de biocombustíveis com base em culturas de alimentos e seus impactos no uso da terra originaram o debate "alimentos versus biocombustíveis". Ao mesmo tempo, a pecuária é a atividade humana com maior território ocupado no planeta, com pastagens e áreas agrícolas dedicadas à

54 Biotecnologia Industrial Vol. 2: Engenharia Bioquímica. Blucher, 2021.

produção de alimentos para gado. A pecuária nacional apresenta baixa produtividade média devido ao manejo extensivo, ao baixo uso de insumos e à baixa tecnificação. Neste contexto, a integração da produção de etanol com a pecuária pode melhorar o uso de terra, pois sistemas mais intensivos podem manter ou mesmo aumentar a produção de alimentos enquanto reduzem o uso da terra. É possível, portanto, expandir a área destinada à produção de biocombustíveis sem deslocar o cultivo de alimentos ou a pecuária, que, por sua vez, poderiam avançar em áreas de vegetação natural. O projeto temático FAPESP[55] **"Avaliação da Integração Cana-pecuária: Modelagem e Otimização"** é realizado em colaboração com 16 instituições parceiras[56] – integrando universidades nacionais e internacionais, instituições de ciência e tecnologia e empresas. Esse estudo visa explorar as sinergias entre as cadeias produtivas sucroenergética e agropecuária, avaliando seus aspectos logísticos e de sustentabilidade. Diante da nova realidade imposta pela pandemia, foram privilegiadas neste ano principalmente atividades de planejamento experimental e integração entre os múltiplos grupos de pesquisa envolvidos no projeto bem como o estudo de metodologias e tecnologias disponíveis para construção dos metamodelos representativos das diversas etapas que compõem os cenários de integração cana-de-açúcar/pecuária. Também foi realizada a estruturação da metodologia a ser empregada na otimização das cadeias produtivas e da logística representativa dos cenários de integração propostos, considerando como critérios diversos indicadores de sustentabilidade econômica e ambiental. No final do segundo semestre as atividades experimentais foram retomadas nos diversos laboratórios e os diversos grupos envolvidos neste projeto temático.

Avaliação de Ecossistemas

Os agroecossistemas são essenciais para produzir alimentos e fibras e, se bem administrados, podem também fornecer outros serviços e bens importantes. O CNPEM avalia cadeias de produção biorrenováveis que podem impulsionar a provisão de serviços ecossistêmicos a partir de agroecossistemas, tais como mitigação da mudança climática, reciclagem e manutenção da qualidade da água. Estes também podem promover a redução de desserviços comuns, tais como desmatamento, perda de nutrientes, emissão de gases de efeito estufa, entre outros. O CNPEM vem desenvolvendo e adaptando ferramentas e modelos para quantificar e avaliar sinergias e *trade-offs* entre benefícios e impactos negativos nos ecossistemas relacionados com as cadeias de produção biorrenováveis. O objetivo é desenvolver uma plataforma de avaliação de sustentabilidade georreferenciada que possa ser customizada e aplicada na avaliação do desempenho ambiental e econômico para diversos bioprodutos e aplicável em diferentes escalas geográficas. Esta plataforma permitirá a quantificação e avaliação confiável dos serviços e desserviços dos ecossistemas, essenciais para assegurar a produção sustentável de biorrenováveis.

55 Temático FAPESP: 2017/11523-5. Avaliação da Integração Cana-pecuária: Modelagem e Otimização.
56 Participam também as seguintes instituições brasileiras: EMBRAPA (CNPMA, CNPTIA, CNPSE, CNPGC e CPAP), Unicamp (NIPE, FEQ, FCA, IE e FEAGRI) e USP (EESC e CEPEA). Instituições internacionais: Michigan State University, Texas A&M University e University of Edinburgh.

Como resultado do estudo "**Valorização de serviços ecossistêmicos através do aprimoramento de cadeias produtivas de biorrenováveis**", foi publicado um trabalho[57] que mapeou as possíveis áreas com soluções ganha-ganha do ponto de vista dos serviços ecossistêmicos da produção de biorrenováveis no Brasil. Foram identificadas áreas para expansão considerando a preservação da vegetação nativa, da biodiversidade e da produção de alimentos. O estudo mostrou que temos cerca de 20 milhões de hectares para produzir cana-de-açúcar ou outras biomassas, intensificando as vantagens ambientais advindas não só da substituição de fósseis, mas também da utilização racional dos recursos naturais. Com este trabalho o Zoneamento Agroecológico da Cana-de-Açúcar foi atualizado com dados e mapas mais recentes, trazendo a disponibilidade de áreas para expansão para a realidade de 2019. Este trabalho também está servindo de mapa base para outros trabalhos do CNPEM.

Outro destaque está relacionado ao estudo "**Avaliação do uso de recursos naturais integrada a iniciativas de descarbonização**" que mapeou[58] os potenciais de recolhimento da palha de cana-de-açúcar no Centro-Sul do Brasil para aproveitamento energético, ao mesmo tempo em que uma quantidade mínima foi mantida no solo para sua conservação e benefício na produtividade dos canaviais. O mapeamento mostrou que, sem aumentar nenhum hectare de cana-de-açúcar, 62% da palha pode ser estrategicamente recolhida, o que potencialmente poderia gerar mais de 100 TWh de eletricidade, o suficiente para suprir mais de 80% da demanda residencial no país. Além disso, essa eletricidade mitigaria anualmente cerca de 13% das emissões de gases de efeito estufa do setor energético brasileiro.

3.3. Apoio à geração de inovação

O CNPEM tem como uma de suas atribuições a realização de projetos de P&D que visam solucionar os problemas e desafios científicos e tecnológicos do desenvolvimento econômico sustentável, por meio do emprego da biotecnologia. Os projetos desenvolvidos pelo CNPEM em colaboração com empresas vão desde tecnologias em estágios iniciais e em escala piloto até ambientes operacionais semi-industriais.

Além das parcerias com resultados importantes relatados a seguir, também foram depositados em 2021 um pedido de patente e uma extensão de pedido de patente para o PCT[59]. As proteções ocorreram em áreas relacionadas a bioprocessos, combustíveis e química renovável. O pedido de título "Uso de monooxigenases líticas de polissacarídeos, composição enzimática contendo as e método de degradação de polímeros plásticos" foi estendido para fase internacional via PCT recebeu número PCT/BR2021/050203.

Projetos desenvolvidos em parceria com empresas

57 Hernandes, T. A. D., Duft, D. G., dos Santos Luciano, A. C., Leal, M. R. L. V., & Cavalett, O. (2021). Identifying suitable areas for expanding sugarcane ethanol production in Brazil under conservation of environmentally relevant habitats. *Journal of Cleaner Production*, 292, 125318.

58 de Souza, N. R. D., Duft, D. G., Bruno, K. M. B., de Souza Henzler, D., Junqueira, T. L., Cavalett, O., & Hernandes, T. A. D. (2021). Unraveling the potential of sugarcane electricity for climate change mitigation in Brazil. *Resources, Conservation and Recycling,* 175, 105878.

59 *Tratado de Cooperação de Patentes, do inglês, Patent Cooperation Treaty - PCT.*

Etanol 2G - Desenvolvimento das etapas críticas do processo de produção de etanol de segunda geração.

O projeto é realizado pelo CNPEM/LNBR em cooperação com a Petrobras e cofinanciado pela EMBRAPII. Com o objetivo de desenvolver uma rota de produção de etanol celulósico para biomassas do setor sucroenergético, o projeto envolve estudos em escalas laboratorial e piloto, integrando os resultados em modelos de cenários industriais para avaliações técnico-econômicas e ambientais. Ao longo de 2021, último ano do projeto, foram concluídos o escalonamento da etapa de hidrólise enzimática em reator de 300 litros, e os ensaios de cofermentação de glicose e xilose em escalas laboratorial e piloto. Os resultados experimentais foram integrados em modelos de cenários industriais, para avaliação de condições ótimas de processo em diferentes configurações industriais e de sensibilidades de custos e preços exógenos ao processo, sejam eles insumos (como enzimas) ou produtos (como eletricidade e etanol). Os avanços do projeto foram reconhecidos pela sua indicação como um dos finalistas ao Prêmio ANP de Inovação Tecnológica na categoria Redução de Impactos Ambientais e Energias Renováveis.

Estratégias enzimáticas para combustíveis avançados.

O desenvolvimento de alternativas de energia limpa e renovável para a matriz energética tem sido pautado como agenda prioritária para a sustentabilidade global. O projeto realizado em parceria entre o CNPEM/LNBR e a Sinochem Petróleo Brasil, cofinanciado pela EMBRAPII, contribui com essa agenda por meio do desenvolvimento de estratégias enzimáticas para a produção de biocombustíveis avançados, com atividades que se dividem em duas frentes principais.

A primeira envolve o desenvolvimento de uma plataforma microbiana capaz de secretar altos teores de um coquetel enzimático otimizado para a sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar. Em 2021, foram utilizadas técnicas de biologia sintética para construção de uma nova cepa engenheirada, contendo gene codificante da enzima selecionada. Ensaios de otimização para o cultivo e produção do coquetel enzimático da cepa melhorada foram realizados em escala laboratorial e piloto. Este novo coquetel demostrou aumentada atividade hidrolítica em bagaço de cana em comparação com a cepa não otimizada.

A segunda frente do projeto visa desenvolver uma rota bioquímica para produção de hidrocarbonetos renováveis. Nesta frente, em 2021, realizaram-se estudos estruturais e bioquímicos para compreensão da reação e das características únicas de enzimas envolvidas na descarboxilação de ácidos graxos, para produção de alcenos terminais (olefinas). Iniciou-se, também, a busca de anterioridade e trabalhos para depósito da patente do projeto. Importante destacar que, que alcanos e alcenos de cadeia média e longa tem grande valor comercial por possuírem propriedades físico-químicas similares aos combustíveis fósseis convencionais. Adicionalmente, os alcenos terminais são bases químicas importantes para produção de polímeros, fertilizantes e surfactantes, apresentando alto valor comercial.

Desenvolvimento de processo de produção de ácido cítrico

O projeto realizado pelo CNPEM/LNBR em cooperação com a Tate & Lyle e cofinanciado pela EMBRAPII tem como objetivo avaliar os pontos críticos na produção do ácido cítrico e desenvolver um protocolo otimizado para o processo industrial, buscando contornar possíveis gargalos. Em 2021, realizou-se a avaliação dos dados do processo produtivo da empresa e, com isso, fez-se uma identificação

preliminar das variáveis que mais impactam na produtividade do ácido cítrico. A partir desta análise, experimentos em escala de bancada foram propostos e executados para estabelecer quais seriam as faixas de operação dessas variáveis e seus efeitos.

Desenvolvimento de um biorreagente seletivo para flotação reversa de minério de ferro

Reagentes químicos sintéticos são muito usados no beneficiamento do minério de ferro, para modificar a superfície e facilitar a separação de contaminantes por flotação. O projeto de pesquisa realizado pelo CNPEM/LNBR em cooperação com a Vale S/A e o Instituto Tecnológico da Vale (ITV), cofinanciado pela EMBRAPII, busca desenvolver um reagente coletor para a flotação reversa de minério de ferro que seja de origem biológica, apresente alta seletividade para o quartzo e tenha baixo impacto no meio ambiente. Em 2021, foram realizadas diversas análises químicas visando obter informações sobre as características desejáveis que uma molécula coletora deve apresentar. A partir destes dados, novas moléculas de reagentes coletores específicos para o quartzo foram propostas, visando à produção por rota biológica, e estas moléculas estão sendo avaliadas em ensaios de microflotação para verificar suas efetividades no processo.

Desenvolvimento de enzima para nova rota biotecnológica de produção de bioplásticos.

O projeto realizado pelo CNPEM/LNBR, em cooperação com a Braskem S/A cofinanciado pela EMBRAPII, tem como objetivo o desenvolvimento de enzimas para produção de bioplásticos a partir de açúcares derivados de biomassa. Em 2021, a equipe do LNBR executou atividades de prospecção de novas enzimas por meio de análises de Bioinformática, bem como a interpretação de dados de caracterização funcional das candidatas fornecidas pela Braskem. Análises estruturais e simulações computacionais foram realizadas com a finalidade de direcionar esforços para a engenharia racional dos alvos iniciais, visando a otimização das atividades enzimáticas.

Serviços tecnológicos especializados

Recuperação de resíduos urbanos

A Companhia Brasileira do Alumínio (CBA) firmou colaboração, em 2020 e 2021, com o CNPEM/LNBR para realização de serviço tecnológico especializado visando o escalonamento do processo de recuperação da fração alumínio em resíduos urbanos. As atividades envolveram experimentos em escala piloto para validação do protocolo desenvolvido pela própria empresa. Por meio da utilização de diferentes métodos e arranjos experimentais, foi possível compreender melhor as condições industriais de produção, replicando-se com sucesso os resultados encontrados em escala de bancada. Segundo Roberto Seno Junior, Gerente de Tecnologia da CBA “O processo de desenvolvimento de novos produtos e soluções exige uma conexão forte com o mercado para responder rápido às demandas e absorver este aprendizado”.

3.4. Treinamento, Educação e Extensão

A atuação do LNBR em treinamento, educação e extensão envolve a participação em eventos com palestras orais e pôsteres onde se realizam divulgação cientifica e importantes interações com o meio científico e industrial. Outras atividades envolvem eventos promovidos pelo Laboratório, direcionados para a capacitação de pessoas e divulgação cientifica. Por fim, há a atuação na orientação de bolsistas e estagiários internos, assim como a participação em bancas em universidades. Destaca-se este ano os eventos *online* promovidos, com expressivo número de participantes de todas as regiões do país e no exterior.

A seguir os principais destaques deste ano em treinamento, educação e extensão.

Seminários e Palestras

Neste ano, mesmo no cenário de pandemia, colaboradores, pesquisadores e pesquisadores voluntários (majoritariamente bolsistas) realizaram 55 apresentações orais em reuniões e eventos nacionais e internacionais.

1. BioDesign of synthetic yeast platforms for bio-based polymers production, III GBMeeting: Encontro da Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular do Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, Brasil, janeiro de 2021 (online).
2. Redesigning a new transport system in Saccharomyces cerevisiae to improve biomass conversion in biorenewable compounds, III GBMeeting: Encontro da Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular do Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, Brasil, janeiro de 2021 (online).
3. Design of microbial cell factories for renewable fuels and fine-chemicals, Seminário sobre desenvolvimento de carreira em biotecnologia, UFSCar, São Carlos, Brasil, janeiro de 2021 (online).
4. Bacterial volatile organic compounds as a strategy for biocontrol of sugarcane phytopathogens., III GBMeeting: Encontro da Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular do Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, Brasil, janeiro de 2021 (online).
5. Exploring bacterial volatile organic compounds to increase the growth of crops, III GBMeeting: Encontro da Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular do Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, Brasil, janeiro de 2021 (online).
6. Pegada Hídrica: Definição, Metodologia e Aplicação, disciplina de pós-graduação do programa de Planejamento de Sistemas Energéticos da FEM, UNICAMP, Campinas, Brasil, janeiro de 2021 (online).
7. Unveiling distinctive mechanisms of recognition and cleavage of plant polysaccharides, Biochemistry and Molecular Biology Seminar Series, USP, São Paulo, Brasil, abril de 2018 (online).
8. Evaluation of the impacts of maintaining sugarcane straw on water availability in a brazilian hydrographic basin, 29th European Biomass Conference & Exhibition, EUBCE, abril de 2021 (online).
9. Influence of yield gap and straw recovery rates on Ecosystem Services associated with sugarcane electricity, 29th European Biomass Conference & Exhibition, EUBCE, abril de 2021 (online).
10. Breakout session on sample preparation and data analysis for Tomography at MOGNO beamline (Sirius), 2nd International Pan American Light Sources for Agriculture (PALSA 2021), CNPEM, Campinas, Brasil, abril de 2021 (online).
11. Protein crystallography and biochemicals processes in plants, 2nd International Pan American Light Sources for Agriculture (PALSA 2021), CNPEM, Campinas, Brasil, abril de 2021 (online).

12. Matéria orgânica do solo: conceitos, funções e fatores que determinam sua dinâmica, Palestra ministrada aos alunos do Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas, ESALQ-USP, Piracicaba, Brasil, abril de 2021 (online).
13. Aproveitamento da palha de cana-de-açúcar: Resultados do Projeto SUCRE, Disciplina de pós-graduação do programa de Planejamento de Sistemas Energéticos da FEM, UNICAMP, Campinas, Brasil, abril de 2021 (online).
14. Protein crystallography and biochemicals processes in plants, 2nd International Pan American Light Sources for Agriculture (PALSA 2021), CNPEM, Campinas, Brasil, abril de 2021 (online).
15. Multi-scale observations of mineral impurities in sugarcane bagasse and straw, BBEST 2020-21 / BIOFUTURE SUMMIT II, FAPESP (BIOEN) / MRE (Plataforma Biofuturo), São Paulo, Brasil, maio de 2021 (online).
16. Técnicas de pré-tratamento para bagaço de cana: estudo de casos e aplicações, Ciclo de Palestras em Biocombustíveis, Universidade Federal de Uberlândia, Diamantina, Brasil, maio de 2021 (online).
17. Understanding the pros and cons of crop residues removal for bioenergy production on soil greenhouse gas emissions, BBEST 2020-21 / BIOFUTURE SUMMIT II, FAPESP (BIOEN) / MRE (Plataforma Biofuturo), São Paulo, Brasil, maio de 2021 (online).
18. Enzymatic Strategies for Biorenewables, Seminários da Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UNICAMP, Campinas, Brasil, maio de 2021 (online).
19. Comparison of Biofuel Life Cycle Analysis Tools: Biochemical 2G ethanol production and distribution, BBEST 2020-21 / BIOFUTURE SUMMIT II, FAPESP (BIOEN) / MRE (Plataforma Biofuturo), São Paulo, Brasil, maio de 2021 (online).
20. Design and assessment of optimal logistic chains, BBEST 2020-21 / BIOFUTURE SUMMIT II, FAPESP (BIOEN) / MRE (Plataforma Biofuturo), São Paulo, Brasil, maio de 2021 (online).
21. Biotechnology to address scientific and technological challenges of sustainable economic development, Swedish Week, Sweden, maio de 2021 (online).
22. Technology Push Policies, BBEST 2020-21 / BIOFUTURE SUMMIT II, FAPESP (BIOEN) / MRE (Plataforma Biofuturo), São Paulo, Brasil, maio de 2021 (online).
23. Integrated multi-omics of the capybara gut microbiome reveal unprecedented enzymatic strategies for plant polysaccharides breakdown, III IBSB – Enzymes for Biorenewables, CNPEM, Campinas, Brasil, junho de 2021 (online).
24. Potencial biotecnológico de moléculas sinalizadoras para controle de doenças de culturas agrícolas, Esalq SHOW – 4ª edição, ESALQ-USP, Piracicaba, Brasil, junho de 2021 (online).
25. Decarboxylation mechanisms to produce drop-in chemicals from fatty acids by P450 peroxygenases, III IBSB – Enzymes for Biorenewables, CNPEM, Campinas, Brasil, junho de 2021 (online).
26. Combining experimental and in silico approaches to reveal the molecular mechanisms of xylanolytic glycoside hydrolases, 3rd Industrial Biotechnology and Synthetic Biology Workshop (III IBSB), CNPEM, online, Brasil, junho de 2021 (online).
27. Physics and the Future of (bio)-Manufacturing, Reunião da Sociedade Brasileira de Física, Painel Física na Indústria, Brasil, Junho 2021 (online)
28. Reflexões sobre o mapeamento da Bioeconomia, Panorama da Produção Científica em Bioeconomia no Brasil e no Mundo, CGEE, Brasilia, junho 2021 (online)

29. Engenharia Bioquímica: utilizando catalisadores biológicos em uma biorrefinaria, IX Encontro de Engenharia Química, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Brasil, junho de 2021 (online).
30. Genome-scale metabolic models for industrial strains design, Coffee Science - Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos e Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Rio de Janeiro, Brasil, julho de 2021 (online).
31. A biotecnologia industrial e o desenvolvimento sustentável, Colóquio Científico do CBPF, Rio de Janeiro, Brasil, julho de 2021 (online)
32. A biotecnologia industrial e o desenvolvimento sustentável, Escola Sirius para Professores de Ensino Médio, CNPEM, Campinas, Brasil, julho de 2021 (online)
33. Biologia sintética aplicada a leveduras visando a produção de compostos renováveis, InovaBiotec II, Lajeado, Brasil, julho de 2021 (online).
34. Da dorna a Prateleira: As diversas formas de se purificar bioprodutos industriais, Escola Sirius para Professores do Ensino Médio (ESPEM), CNPEM, Campinas, Brasil, julho de 2021 (online).
35. Tour Virtual: Planta Piloto de Desenvolvimento de Processos, Escola Sirius para Professores do Ensino Médio (ESPEM), CNPEM, Campinas, Brasil, julho de 2021 (online).
36. Como uma enzima é? A junção entre biologia, química e física nos permite descobrir., Escola Sirius para Professores do Ensino Médio (ESPEM), CNPEM, Campinas, Brasil, julho de 2021 (online).
37. Luz síncrotron: Uma ferramenta da física aplicada a agricultura sustentável, Escola Sirius para Professores do Ensino Médio (ESPEM), CNPEM, Campinas, Brasil, julho de 2021 (online).
38. Structural basis of N-glycan demannosylation by the probiotic Bifidobacterium longum, 28th Congress of the Brazilian Society of Microscopy and Microanalysis, Brazilian Society of Microscopy and Microanalysis, São Paulo, Brasil, julho de 2021 (online).
39. Planta Piloto do Laboratório Nacional de Biorrenováveis: Estrutura e Possibilidades, Disciplina ACH5507 Engenharia Bioquímica II, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brasil, julho de 2021 (online).
40. Biorefining sugarcane lignocellulose into sustainable fuels, chemicals and materials, Sustainable Materials Research Summit, Consórcio de Universidades, Kunming, China, agosto de 2021 (online).
41. Energy-cane as a strategy to mitigate soil greenhouse gas emissions, EuroSoil 2021, European Confederation of Soil Science Societies, Geneva, Suiça, agosto de 2021 (online).
42. Biorrefinarias virtuais, Palestra para alunos de graduação da disciplina Bioprocessos Aplicados a Industria de Bioenergia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR, Toledo, Brasil, agosto de 2021 (online).
43. Bioinformatics @ CNPEM, Ciclo de Palestras 2a Liga Brasileira de Bioinformática, AB3C, ISCB Regional Student Group Brazil, online, Brasil, setembro de 2021 (online).
44. Exploring metal ion metabolism to improve xylose fermentation in Saccharomyces cerevisiae, GENÉTICA 2021 - 66th Brazilian Congress of Genetics, Sociedade Brasileira de Genética, Brasil, setembro de 2021 (online).
45. Biomédico na Biotecnologia Industrial, 2ª Jornada da Biomedicina, UNIFESP, São Paulo, Brasil, setembro de 2021 (online).
46. Industrial Biotechnology and sustainable development – IPR issues, XIII ENAPID - Encontro Acadêmico de Propriedade Intelectual e Inovação, Brasil, Setembro de 2021 (online)

47. Engenharia genética de levedura para produção de biorrenováveis, XI Semana Acadêmica de Biotecnologia, PUCPR, online, Brasil, outubro de 2021 (online)

48. Evaluation of steam demand, water use and integration opportunities in Brazilian Sugarcane Biorefineries, 16th Conference on Sustainable Development of Energy, Water and Environment Systems, SDEWES Centre, Dubrovnik, Croácia, outubro de 2021 (online).

49. Industrial Biotechnology and Sustainable Development, 10° Workshop da Divisão de Catálise, Biocatálise e Processos Químicos (DICAP) do INT, Rio de Janeiro, Brasil, outubro de 2021 (online)

50. A biotecnologia industrial e o desenvolvimento sustentável, 13ª Semana Acadêmica de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Santa Catarina (XIII SAEMAT), Santa Catarina, Brasil, outubro de 2021 (online)

51. Estabelecendo um Guia para Remoção de Palha no Centro-Sul do Brasil, Aproveitamento da palha de para a geração de energia elétrica, STAB, Piracicaba, Brasil, novembro de 2021 (online).

52. Synthetic biology of yeasts for production of renewable bio-based compounds, II Semana de Bioquímica Aplicada, UFV, Viçosa, Brasil, novembro de 2021 (online).

53. Current status of 2G ethanol in Brazil and worldwide, Workshop CNPEM-USP-KU Leuven (EPNOE): Challenges and opportunities to promote Circular Bioeconomy, CNPEM-USP-KU Leuven (EPNOE), novembro de 2021 (online).

54. Bioeconomy Strategy and Perspective in Brazil Workshop CNPEM-USP-KU Leuven (EPNOE), novembro de 2021 (online)

55. Microbial biotechnology to boost biomass conversion into value-added products, Energy and Bioproducts Research Institute's Seminar Series, Aston University, Birmingham, Reino Unido, dezembro de 2021 (online).

Ações de Capacitação

Neste ano foram oferecidos dois cursos na modalidade *online*. A seguir maiores detalhes dos cursos realizados.

I Curso de Biologia Sintética de Microrganismos Aplicada a Biotecnologia Industrial

Agosto foi marcado pela 1ª edição do **Curso de Biologia Sintética de Microrganismos Aplicada a Biotecnologia Industrial** [60]. A biologia sintética tem sido amplamente empregada no redesenho de organismos e criação de novos modelos biológicos com aplicação industrial diversa. O curso introduziu aos participantes o estado-da-arte em Biologia Sintética, destacando ferramentas e abordagens para a construção de plataformas microbianas a serem aplicadas em diversos processos biotecnológicos. O evento, conduzido totalmente online, contemplou os seguintes tópicos: Biologia sintética na construção de microrganismos, Modelos metabólicos e possibilidades de aplicação, Engenharia metabólica e evolução adaptativa, Ferramentas para otimização e escalonamento de processos e cases industriais de sucesso utilizando biologia sintética.

60 https://pages.cnpem.br/cursobiologiasintetica .

Figura 148. Divulgação do I Curso de Biologia Sintética de Microrganismos Aplicada a Biotecnologia Industrial.

Curso de Introdução à Microbiômicas: de multi-ômicas à descoberta de enzimas

O curso "**Introdução à Microbiômicas: de multi-ômicas à descoberta de enzimas**" [61], realizado nos dias 18 e 19 de novembro, introduziu aos participantes o estado-da-arte em análises ômicas, destacando ferramentas e estratégias computacionais dedicadas ao estudo de comunidades microbianas com enfoque na descoberta de novas enzimas com possíveis aplicações biotecnológicas. Ferramentas ômicas têm sido amplamente empregadas em diversas áreas da biologia moderna, dentre as quais destacam-se o estudo da diversidade e potencial genético de microrganismos e comunidades microbianas amplamente distribuídas em todos os habitats do nosso planeta. As comunidades microbianas, sobretudo aquelas não cultiváveis, guardam potencialidades enzimáticas e metabólicas que mais recentemente vem sendo desvendadas e exploradas por meio da genômica, metagenômica e metatranscriptômica. Para garantir a imersão do público nos tópicos sugeridos, o curso teve como diferencial a execução de tarefas simultaneamente com o palestrante durante o curso, no formato *hands-on*.

61 https://pages.cnpem.br/microbiomicas .

Figura 149. Curso de Introdução à Microbiômicas: de multi-ômicas à descoberta de enzimas.

Eventos Científicos

Neste ano o LNBR promoveu evento científico internacional, totalmente *online*. A seguir são apresentados maiores detalhes. Também é destacada a participação em evento co-organizado pelo European Polysaccharide Network of Excellence (EPNOE)-Katholieke Universiteit Leuven (KU Leuven, Bélgica), USP e CNPEM.

III Industrial Biotechnology and Synthetic Biology (IBSB): Enzymes for Biorenewables

Entre os dias 7 e 8 de junho de 2021, realizou-se a terceira edição do IBSB[62] (***Industrial Biotechnology and Synthetic Biology***), série que teve início em março de 2018 e que, na última edição, foi dedicado ao tema "*Enzymes for Biorenewables*". Nesta edição foram discutidas as pesquisas mais recentes sobre prospecção e design de enzimas, enzimas ativas sobre carboidratos e mecanismos de enzimas redox, bem como o desenvolvimento de plataformas microbianas para a produção de enzimas industriais. O evento promoveu um espaço acolhedor para discussões e *networking* entre os participantes, que incluiu estudantes de graduação e pós-graduação, profissionais, professores e pesquisadores trabalhando na área de Biotecnologia. O III IBSB promoveu um fórum para discutir questões-chave no estado da arte para o desenvolvimento de enzimas industriais, divulgando as pesquisas desenvolvidas no Brasil e incentivando um ambiente colaborativo. O evento foi realizado em modo online.

62 https://pages.cnpem.br/IndustrialBiotech/.

Figura 150. Divulgação do Industrial Biotechnology and Synthetic Biology: Enzymes for Biorenewables (III IBSB).

Workshop CNPEM-USP-KU Leuven (EPNOE) "Challenges and opportunities to promote Circular Bioeconomy"

O evento foi organizado pelo European Polysaccharide Network of Excellence (EPNOE)-Katholieke Universiteit Leuven (KU Leuven, Bélgica), pelo Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais/Laboratório Nacional de Biorrenováveis (CNPEM/LNBR), e pelo Centro de Ciência e Tecnologia de Biorecursos (CiTecBio/USP-IQSC). Aconteceu de forma online nos dias 23 e 24 de novembro de 2021[63]. Neste *workshop*, estratégias de pesquisa e inovação para promover a bioeconomia circular tanto na Europa como no Brasil foram discutidas, incluindo oportunidades de parceria e financiamento bilateral. O evento contou com apresentações de representantes de cada instituição sobre o estado-da-arte em biologia sintética e sustentabilidade.

Figura 151. Divulgação do Workshop "Challenges and opportunities to promote Circular Bioeconomy"

63 https://www.epnoe.eu/wp-content/uploads/2021/11/EPNOE_CNPEM_USP_KULeuven-workshop_v01agenda.pdf

Orientação e Supervisão

O LNBR/CNPEM apresenta contínuo esforço na formação de pesquisadores e jovens cientistas. O apoio à formação de alunos de pós-graduação ocorre por meio do credenciamento de pesquisadores do LNBR/CNPEM como orientadores em Programas de Pós-graduação regulares de instituições de ensino e pesquisa. Os colaboradores também participaram de 42 bancas de avaliação de trabalhos acadêmicos, incluindo qualificações e defesas de mestrado e doutorado. A seguir, alguns destaques dessas ações este ano:

1. Conclusão de estágio de pesquisa no exterior (BEPE/FAPESP) “Microbiota associada a emissão de N_2O em solo sob plantio de cana energia” da pós-doc Mara Regina Moitinho, no Agroécologie INRA (França), (janeiro de 2020 a janeiro de 2021).
2. Conclusão estágio de pesquisa no exterior (Print/CAPES) "Estudo de novas enzimas para rápida liquefação na sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com alto teor de sólidos" da doutoranda Liliane Pires Andrade, na Universidade de York (Inglaterra), (março 2020 a fevereiro 2021).
3. Conclusão do projeto de pesquisa de pós-doutorado “Resolução das estruturas tridimensionais de luciferases de besouros e enzimas relacionadas por cristalografia de raios X: relação entre estrutura, espectros de bioluminescência e atividade oxigenásica” do doutor Atilio Tomazini Junior.
4. Conclusão do projeto de pesquisa de pós-doutorado “Estudos de obtenção e utilização de C5 aplicados a engenharia evolutiva a partir da ação de xilose isomerase e a bioprospecção de micro-organismos extremofilos” da doutora Amanda Silva De Sousa.
5. Defesa de tese de doutorado "Identificação e caracterização de um novo loci de utilização de carboidrato (PUL): estrutura, função e potenciais aplicações" no Instituto de Biologia, UNICAMP, da aluna Marcele Pandelo Martins.
6. Defesa de tese de doutorado "Abordagem cinética e multiômica de Spathaspora passalidarum no processo Mellet-Boinot" na Bioenergia, UNICAMP, do aluno Thiago Neitzel.
7. Defesa de tese de doutorado " *How do management strategies affect soil carbon and sugarcane yields in brazilian conditions?*" na Bioenergia, UNICAMP, da aluna Sarah Tenelli.
8. Defesa de tese de doutorado " Avaliação e Otimização da Sustentabilidade Econômica e Ambiental da Cadeia Produtiva da Cana-de-açúcar" na Bioenergia, UNICAMP, da aluna Jessica Marcon Bressanin.
9. Defesa de tese de doutorado "Modelagem matemática para descrever o processo de produção de etanol 2G utilizando leveduras não Saccharomyces e geneticamente modificadas " na Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, do aluno Fernan David Martinez Jimenez.
10. Defesa de dissertação de mestrado "Identificação e caracterização de voláteis como indutores de crescimento em culturas agrícolas" no Departamento de Genética e Biologia Molecular, UNICAMP, da aluna Natalia Oliveira de Araujo (fevereiro de 2020).
11. Defesa de dissertação de mestrado "Cadeia de transporte de elétrons e fosforilação oxidativa" no Departamento de Genética e Biologia Molecular, UNICAMP, da Anna Julyana Viana Chianca Brilhante (2021).
1. Seleção e participação no IIASA’s 2021 Young Scientists Summer Program - YSSP 2021. Projeto: “Valorization of ecosystem services through location optimization of integrated

value chains for biofuel and livestock production in Brazil”. 01 de junho a 31 de agosto de 2021. online. Narie Rinke Dias de Souza.

12. Prêmio de melhor trabalho na 'GBMeeting 2021 conference'. Encontro da Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular realizada em Campinas, Brasil. Mirta Natália Coutouné.

13. Prêmio de melhor trabalho oral na área de genética de Microrganismos "*Exploring bacterial volatile organic compounds to increase the growth of agricultural crops*" na 'GBMeeting 2021 conference'. Encontro da Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular realizada em Campinas, Brasil. Natalia Oliveira de Araujo.

14. Prêmio de melhor trabalho na área de divulgação científica na 'GBMeeting 2021 conference'. Encontro da Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular realizada em Campinas, Brasil. Gisele Cristina de Lima.

15. Prêmio Milton Krieger de melhor trabalho na área de Genética De Microrganismos da Sociedade Brasileira de Genética (SBG). Gisele C L Palermo.

16. Prêmio de melhor poster "Biochemical characterization and structure elucidation of a new cytochrome P450 decarboxylase", Annual SBBq Meeting, outubro - Leticia Rade.

17. Prêmio de melhor poster "Mechanism elucidation of a non-conventional peroxygenase applied on production of drop-in biofuels", Annual SBBq Meeting, outubro - Mayara Chagas.

4. Laboratório Nacional de Nanotecnologia

4.1. Instalações Abertas a Usuários Externos

Técnicas de Caracterização

As atividades associadas às técnicas de caracterização são divididas em 4 diferentes subáreas: Microscopia de Força Atômica, Microscopia Eletrônica de Varredura e de Duplo feixe, Microscopia Eletrônica de Transmissão e Criomicroscopia Eletrônica.

Microscopia de Força Atômica

Atualmente as instalações abertas de Microscopia Força Atômica operam com quatro microscópios, equipados com grande variedade de técnicas relacionadas às áreas de física, química e biologia. Devido à pandemia de COVID-19, no início do ano os projetos externos foram executados pela equipe da instalação e acompanhados de maneira *online* pelos usuários. Com a gradual flexibilização da quarentena, o acompanhamento dos usuários passou a ser de maneira parcial e finalmente presencial. No segundo semestre, com a volta presencial dos pesquisadores e alunos aos laboratórios das universidades e centros de pesquisas, confirmou-se um evidente aumento nos agendamentos das instalações.

Buscando incrementar a diversificação dos recursos instrumentais oferecidos, continuamos o trabalho de atualizações e desenvolvimento interno da instrumentação, além de estudos de limites e aplicações de novas técnicas de microscopia de varredura por sonda, em particular AFM.

Destacamos a aquisição de mais dois lasers para serem utilizados no AFM acoplado com nano-espectroscopia e imageamento de infravermelho, utilizando a técnica de expansão térmica (AFM-IR). A faixa espectral será assim expandida em mais de 5 vezes, cobrindo a maior parte das aplicações desejadas.

A partir do segundo semestre foi disponibilizado aos usuários do AFM modelo Multimode 8-HR – BRUKER o módulo de força pulsada (*peakforce*) com alta resolução e velocidade. Com este módulo, imagens de superfícies planas podem ser adquiridas com alta resolução em velocidades até 6 vezes maiores que as técnicas convencionais.

Com a disponibilização da plataforma do Bio-AFM aos usuários, ocorreu uma crescente demanda de projetos que requerem sondas de AFM funcionalizadas com os mais diversos materiais (como proteínas, lignina, látex e outros), para uso em experimentos de espectroscopia de força. Assim, foi desenvolvido e construído um aparato para realizar esta funcionalização. Medidas como essas, de alta sensibilidade, levaram a realização de um estudo de estabilidade do sistema de detecção da deflexão da sonda do AFM.

Em relação às atividades de ensino, este laboratório se destaca tanto na divulgação como no treinamento básico de novos usuários, bem como no treinamento avançado de técnicos de outros laboratórios de microscopia de varredura por sonda, que necessitam de treinamento para aumentar seu nível de aprimoramento.

Microscopia Eletrônica de Transmissão

No segundo semestre de 2021 foi retomada a execução de propostas externas através do envio de amostras, discussão, planejamento e realização dos experimentos por um especialista do LNNano com o usuário. Além disso foram atendidas durante todo o ano um número expressivo de propostas na modalidade *fast track*. Neste período, discutimos também com o comitê externo a realização de um *workshop* para direcionar o futuro da microscopia eletrônica, bem como a implementação de novas modalidades de proposta, inclusive para discutir as chamadas temáticas.

Criomicroscopia eletrônica

Ao longo do ano, a instalação aberta de criomicroscopia eletrônica atendeu aos usuários externos remotamente, recebendo as amostras dos projetos e realizando as análises. Reuniões com os usuários foram conduzidas virtualmente para sanar dúvidas internas durante o preparo e análise das amostras, e para auxiliar os usuários quanto ao entendimento das análises realizadas. Propostas de pesquisas relacionadas ao estudo de Covid-19 foram atendidas pela instalação e visavam principalmente o estudo fundamental de Covid-19 e o desenvolvimento de vacinas.

Síntese

A área de síntese disponibiliza atualmente três equipamentos para usuários externos e internos. No próximo ano (2022), espera-se que o microscópio confocal Raman seja disponibilizado para utilização, com a finalização do processo de comissionamento. Outra novidade foi a chegada de um novo equipamento de Espectroscopia de Fluorescência Horiba Fluoromax 4 Plus, que foi instalado no final de julho de 2021. O equipamento vem sendo utilizado diariamente para pesquisa *in-house* no laboratório de Síntese de Materiais 2D e Nanopartículas (Divisão de Síntese do LNNano). O corpo técnico foi devidamente treinado em técnicas *in-situ* e também nos diferentes acessórios bem como a sala de apoio foi preparada para acomodar e atender o público com toda segurança necessária. Outras melhorias foram realizadas e disponibilizadas para o usuário, tal como apresentada a seguir.

Em relação ao Microtomógrafo (MicroCT) de Raios X, o corpo técnico responsável está realizando melhorias e manutenções preventivas na máquina. A FAPESP aprovou a compra de uma nova fonte de alimentação que irá garantir o funcionamento constante da máquina. Uma novidade nessa instalação consistiu na disponibilização ao usuário, no momento da submissão da proposta, a possibilidade de utilizar os laboratórios químicos como apoio para preparação das amostras e tratamentos específicos. Ainda foram ampliados os tipos de análise realizados por essa instalação, oferecendo ao usuário a possibilidade de realizar as caracterizações de seus materiais sob compressão utilizando um equipamento de tração (estudo de propriedades mecânicas), com o objetivo de oferecer maior versatilidade. A Microtomografia de Raios-X (MicroCT) recebeu inúmeras propostas de usuários externos no ano de 2021, nas mais diversas áreas de atuação, como biológicas, odontológicas, biomédicas, geológicas, compósitos inorgânicos e orgânicos. A partir deste ano, a instalação também conta com a incorporação de ensaios *ex situ* aos experimentos de MicroCT, ou seja, os usuários poderão submeter propostas e analisar a amostra após a compressão mecânica do material. Além disso, um projeto financiado pela FAPESP foi aprovado para a compra de uma nova fonte de raios-X para o equipamento.

O trabalho intitulado "*Influence of void content and morphology on the creep behavior on glass/epoxy composites*"[64], pode ser considerado um destaque neste período. Neste trabalho da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, de Foz do Iguaçu - PR, os resultados de microtomografia contribuíram na aquisição de imagens tridimensionais, as quais possibilitaram a visualização morfológica do material, assim como vazios e/ou defeitos no interior dos compósitos. Esses resultados contribuíram para o melhor entendimento das propriedades dinâmico mecânicas e térmicas dos compósitos, que foram correlacionados com eventos morfológicos.

O espectrômetro de fotoelétrons excitados por raios X (XPS) equipamento de alta demanda e responsável por alto número de publicações, teve sua agenda interrompida a partir de julho de 2019 para manutenção. Após longo período fora de operação o equipamento foi reaberto esse ano para a comunidade cientifica. Por um período de 60 dias o equipamento ficou em comissionamento atendendo apenas a usuários internos ao CNPEM. Recentemente foi aberta no portal do usuário para recebimento de proposta

O difratômetro de raios X modelo Focus D8 Advances Bruker ECO foi diagnosticado com um problema na parte ótica responsável pelo controle de todos os acessórios da máquina, que passou por manutenção e está em teste para certificar que o problema foi resolvido. Em breve este equipamento será aberto para usuários externos.

Nano e Microfabricação

Assim como em 2020, o ano de 2021 continuou sob forte influência da pandemia de COVID-19. As atividades relacionadas à instalação aberta a usuários externos foram reiniciadas, mas sem a presença física dos usuários. O atendimento ocorreu através do envio de amostras ao CNPEM para serem processadas pela equipe da Divisão de Nano e Microfabricação e devolvidas aos usuários para seu posterior uso ou caracterização. Devido às características desta instalação, este tipo de operação causa certa dificuldade de realização e dúvidas frequentes quanto às reais necessidades do usuário que seriam facilmente sanadas em situações de atendimento presencial. Independentemente destas limitações, todas as propostas externas aprovadas e agendadas na instalação foram executadas. Algumas poucas propostas externas não foram realizadas devido à dificuldade dos proponentes em acessar seus próprios laboratórios nas universidades de origem por conta das restrições impostas pela pandemia de Covid-19. Muitas das propostas realizadas estão relacionadas a projetos que envolvem pesquisa dedicadas ao combate à pandemia. Projetos multidisciplinares, em especial nas áreas de sensores e microfluídica, são alguns de maior número e destaque. Os usuários atendidos são oriundos de diversas universidades como USP, UNICAMP, UNESP, IF-São Paulo, UTFPR, e Universidade Presbiteriana Mackenzie, e de outras instituições de pesquisa como CTI Renato Archer e EMBRAPA.

Dentre os artigos publicados em 2021 fruto do atendimento a usuários, destacamos dois trabalhos do grupo da USP/São Carlos. Um dos artigos apresenta um estudo para a aplicação de genosensores em

64 Alves, Fillip Cortat et al. Influence of void content and morphology on the creep behavior on glass/epoxy composites. Composites Communications, v. 25. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/208508>.

câncer de próstata[65]. O segundo[66], mostra um estudo de biossensores para aplicações em SARS-CoV-2. Este último foi capa do periódico *Materials Chemistry Frontiers*. Ambos foram destacados em reportagens pela Agência FAPESP[67] e tiveram repercussão internacional.

No que se refere à infraestrutura aberta, estamos implementando uma nova área dedicada à nanofabricação, conforme detalhamento na seção 4.5. Esta infraestrutura oferecerá novas alternativas aos desafios científicos e tecnológicos dos usuários, agora através de processos de fabricação com controle de tamanho nanométrico.

Nanotoxicologia e Nanobiotecnologia

A instalação de Nanotoxicologia e Nanossegurança (Nanotox) finalizou a etapa de comissionamento em dezembro de 2021. Esta instalação está disponível para apoiar pesquisas e estudos que visam entender os impactos de diferentes tipos de materiais nanoestruturados, derivados funcionalizados e subprodutos (resíduos) sobre organismos vivos e meio ambiente na direção de inovação responsável e *safe-by-design*. Durante este primeiro de ano de atividades foi realizado o comissionamento dos seguintes equipamentos e bioensaios para usuários externos: espalhamento de luz dinâmico multi-ângulo (MALDS); sedimentação centrífuga diferencial (DCS); microscopia hiperspectral de campo escuro (CytoViva), Sala de Cultura de Células e Zebrafish (ZFET). Além disto, um novo modelo biológico (Daphnia) foi estabelecido nesta instalação para atendimento de usuários. Foram atendidos nesta instalação usuários externos da UFC, UFPI, InCor/USP, UFABC, Unicamp e Instituto Butantan. Pesquisadores do Instituto Federal do Piauí (IFPI) e Universidade Federal do Piauí (UFPI) utilizaram as facilidades desta instalação para avaliação da ecotoxicidade de nanopartículas de carbono (*carbon quantum dots*) que foram sintetizadas a partir de biomassa de babaçu (*Orbignya speciosa*). Foi verificado uma alta biocompatibilidade e ausência de efeitos tóxicos destas nanopartículas sobre o organismo aquático *Daphnia magna* (Figura 152). Este trabalho foi publicado no periódico *Carbon Trends*[68].

65 RAYMUNDO-PEREIRA, Paulo A.; PIAZZETTA, Maria Helena de Oliveira; CARVALHO, André L.; et al. Influence of the molecular orientation and ionization of self- assembled monolayers in biosensors: application to genosensors of prostate cancer antigen 3. Journal of Physical Chemistry C, Washington, DC, v. 125, n. Ja 2021, p. 498-506, 2021. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1021/acs.jpcc.0c09055 > DOI: 10.1021/acs.jpcc.0c09055.

66 SOARES, JULIANA COATRINI; SOARES, ANDREY COATRINI ; RODRIGUES, VALQUIRIA CRUZ ; OITICICA, PEDRO RAMON ALMEIDA ; RAYMUNDO-PEREIRA, PAULO AUGUSTO ; BOTT-NETO, JOSÉ LUIZ ; BUSCAGLIA, LORENZO A. ; DE CASTRO, LUCAS DANIEL CHIBA ; RIBAS, LUCAS C. ; SCABINI, LEONARDO ; BRAZACA, LAÍS C. ; CORREA, DANIEL S. ; MATTOSO, LUIZ HENRIQUE C. ; DE OLIVEIRA, MARIA CRISTINA FERREIRA ; DE CARVALHO, ANDRÉ CARLOS PONCE LEON FERREIRA ; CARRILHO, EMANUEL ; BRUNO, ODEMIR M. ; MELENDEZ, MATIAS ELISEO ; OLIVEIRA, OSVALDO N. . Detection of a SARS-CoV-2 sequence with genosensors using data analysis based on information visualization and machine learning techniques. Materials Chemistry Frontiers, v. 5, p. 5658-5670, 2021. https://doi.org/10.1039/D1QM00665G

67 AGÊNCIA FAPESP. Study could help develop biosensors for non-invasive diagnosis of diseases. Publicado em 22 de março. https://agencia.fapesp.br/study-could-help-develop-biosensors-for-non-invasive-diagnosis-of-diseases/35459/

68 Costa, R.S. et al (2021). Carbon-dots from Babassu coconut (Orbignya speciosa) biomass: Synthesis, characterization, and toxicity to Daphnia magna. Carbon Trends (Accepted)

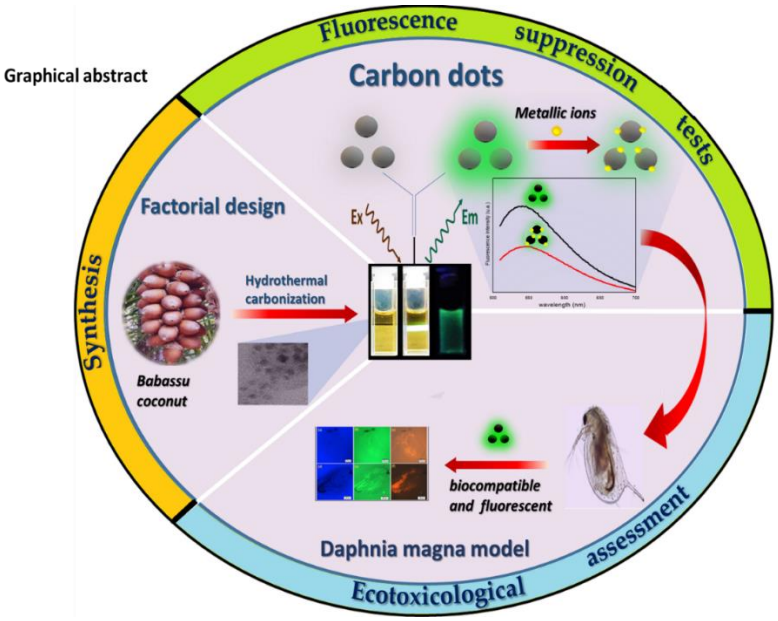


Figura 152. Síntese de nanopartículas de carbono fluorescentes utilizando biomassa de Babaçu via carbonização hidrotermal e avaliação da ecotoxicidade sobre o organismo aquático bioindicador Daphnia magna

4.2. Pesquisa e Desenvolvimento in-house

Na pesquisa e desenvolvimento *in-house*, destacam-se as seguintes pesquisas em andamento:

Criomicroscopia

O projeto **"Desenvolvimento de metodologias para processamento de dados de criomicroscopia eletrônica de partículas isoladas"** busca o desenvolvimento de novos métodos de processamento que explorem a informação presente em grandes conjuntos de dados de criomicroscopia e sejam capazes de elucidar questões relacionadas à heterogeneidade estrutural dos mesmos. No último período, foi dado prosseguimento ao projeto de desenvolvimento de métodos e aplicações da métrica de "resolução local cruzada". Em pesquisa iniciada em 2019-2020, foi desenvolvido um novo algoritmo para avaliar a resolução local cruzada, que permite a comparação de estruturas de macromoléculas . A teoria clássica de informação de Claude Shannon não é adequada para quantificar formas de informações desconhecidas na origem, tal como encontrado em um ambiente de sinal-ruído alto. Isso é um aspecto crítico para a microscopia, em particular a criomicroscopia, mas também para todos os modos de coleta de novos dados como a coleta de radiografias de pacientes clínico por Raios-X. Essa nova métrica de informação vem sendo testada em diferentes tipos de dados. Em particular, destaca-se as análises realizadas em estruturas da proteína S ("spike") de SARS-CoV-2. Anteriormente, estruturas foram analisadas para a visualização de glicosilações na proteína, comparando-se duas estruturas depositadas no PDB. Ao longo do último ano, foram comparadas centenas de estruturas de proteína S, já depositadas no Electron Microscopy Data Bank (EMDB), buscando identificar diferenças e similaridades entre as mesmas. De fato, o que se observou é que a comparação direta entre estruturas depositadas não foi possível devido a inconsistência de calibração entre as coletas de dados e processamentos realizados em diferentes laboratórios, que faz com que as proteínas depositadas tenham tamanhos ligeiramente diferentes (até 4%). Essa variabilidade dimensional impossibilita a comparação direta, sendo necessária a realização de um ajuste entre todas as

estruturas antes da aplicação da metodologia desenvolvida. As estruturas 3D necessitam ser classificadas em grupos, dependendo do seu tamanho, e então ajustadas para que possam ser comparadas. Sendo assim, foram desenvolvidos e implementados métodos para a classificação das estruturas em função do seu tamanho, utilizando-se Análise de Componentes Principais (PCA). A *Figura 153* mostra imagens de projeção de médias de estruturas 3D, de diferentes tamanhos, com linhas indicativas para facilitar a comparação. O estudo das variações entre estruturas de proteínas S no EMDB envolveu cerca de 300 estruturas diferentes. No momento, estão sendo realizadas análises de variabilidade conformacional entre as estruturas.

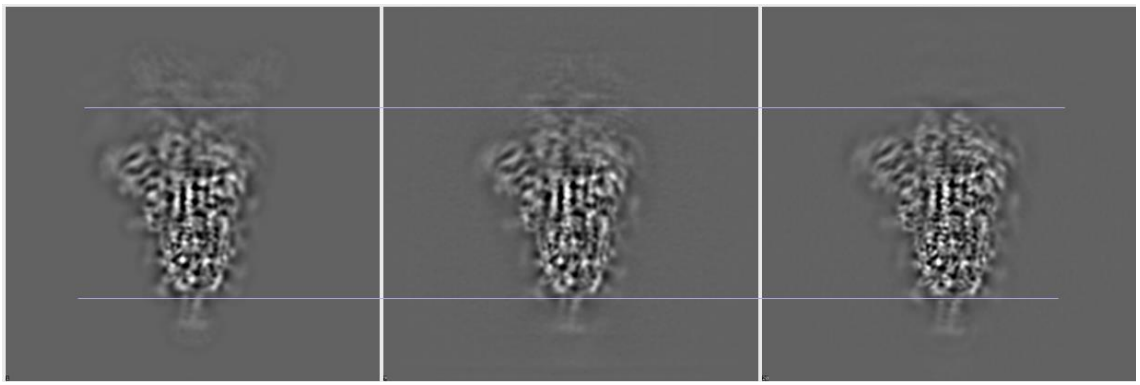


Figura 153. Variações de tamanho do complexo "spike" do vírus SARS-CoV-2 que foram depositados no EMDB. Estas variações, de até 4%, foram detectadas com nossas novas metodologias, baseado em ~200 estruturas do trímero "spike", variações que refletem inconsistências de calibração dos dados depositados. O estudo destas variações foi aumentado para incluir um total de ~300 estruturas depositadas.

O projeto **"Desenvolvimento de metodologias orientadas para otimização e integração de instrumentação"** visa propor novas metodologias nas áreas de normalização de dados de câmeras, correção da função de transferência de contraste (CTF), integração de teorias de análise espectral de imagens (P-spectrum e S-spectrum) em microscopia e alinhamento de filmes de dados obtidos por detectores diretos. Em anos anteriores já haviam sido obtidos resultados preliminares, utilizando-se nova metodologia de análise espectral, desenvolvida especificamente para coletas de filmes (*movie-mode*), com a qual foi detectada uma instabilidade no ajuste de astigmatismo do Titan Krios G3i (Thermo Fisher Scientific), posteriormente corrigida, liberando a instrumentação para coleta de dados em alta resolução. Com essa nova metodologia de análise, foram processados os primeiros resultados da câmera K3 do Gatan, coletados em janeiro de 2021. Os erros detectados ainda não foram corrigidos pois será necessária a troca da câmera K3 da Gatan.

Como é possível observar na *Figura 154*, a nova câmera "K3" do Gatan gera imagem retangulares de 4092x5760 pixels. Em consequência os espectros dos *movies* são retangulares (lado esquerdo) com uma resolução anisotrópica no espaço recíproco. Image Science em Berlin alterou o código dos programas para gerar espetros quadrados (lado direito) resolvendo este novo problema, de maneira que os programas clássicos de "CTF" *fitting* podem ser usados normalmente. Já na Figura 155, o espectro (lado esquerdo; primeiro vetor próprio) foi calculado com a nova opção para *movies* retangulares e corresponde à área inteira do sensor. O espectro do lado direito foi calculado com só o centro do sensor (4000x4000 pixels). As linhas verticais nesses espectros são o resultado de erros de estabilidade do sensor K3. Os erros estão

até mais pronunciados nas áreas laterais do sensor, um porque o espectro na esquerda demostra até mais erros do que o do lado direito.

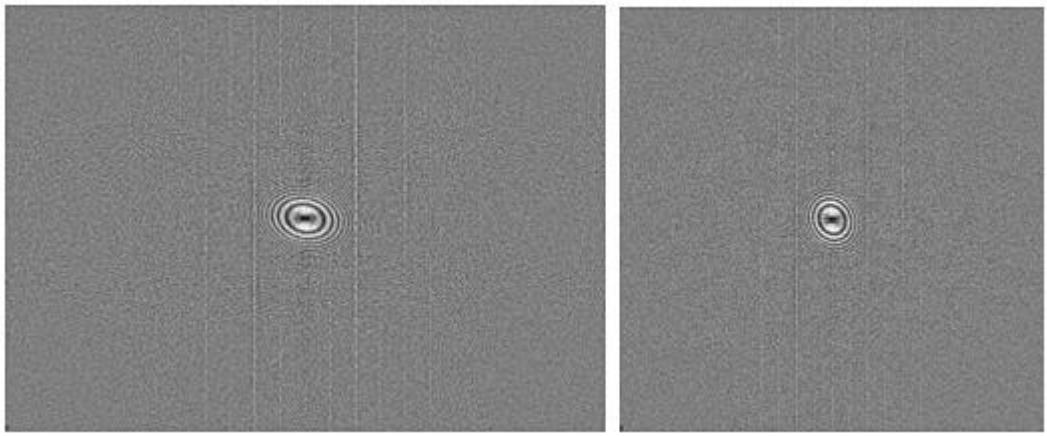


Figura 154. Imagens retangulares de 4092x5760 pixels da nova câmera "K3" do Gatan.

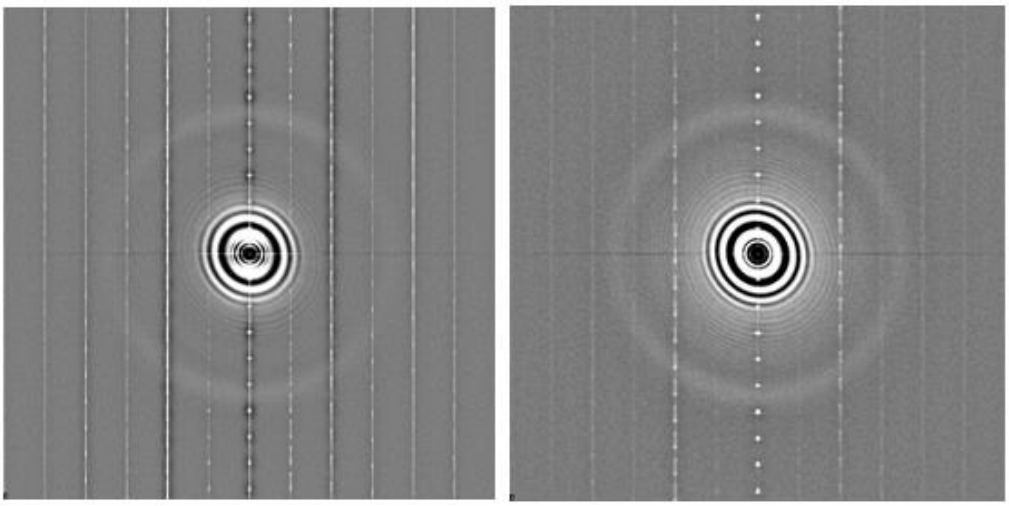


Figura 155. O espectro (lado esquerdo; primeiro vetor próprio) foi calculado com a nova opção para movies retangulares e corresponde a área inteira do sensor. O espectro do lado direito foi calculado com só o centro do sensor (4000x4000 pixels).

A técnica de criomicroscopia eletrônica permite a obtenção de estruturas de alta resolução de complexos macromoleculares, tendo ampla utilização no entendimento de processos biológicos. Este projeto visa a obtenção de informação estrutural de complexos macromoleculares, por criomicroscopia eletrônica de partículas isoladas. Em 2020 foram coletados os primeiros conjuntos de dados no Titan Krios, sendo obtida a estrutura do vírus Mayaro (EMD-22961, PDB-7ko8), em colaboração com o LNBio. Os resultados

preliminares deste estudo apresentados no Relatório Anual de 2020 foram publicados no primeiro semestre deste ano no periódico *Nature Communications*[69].

Nesse mesmo período, tivemos também a publicação do estudo do hexâmetro de septinas humanas, realizada em colaboração com o IFSC/USP São Carlos. Septinas são proteínas do esqueleto celular, envolvidas em uma série de processos intracelulares, incluindo divisão celular, tráfego de vesículas, entre outros. Septinas se polimerizam na forma de heterocomplexos, ou seja, complexos formados por diferentes septinas. Esses complexos, por sua vez, formam filamentos que se organizam em estruturas maiores. Em 2019 foi finalizado um estudo sobre a organização estrutural de septinas, possibilitando visualizar corretamente a localização das subunidades de um complexo hexamérico. Os dados de microscopia eletrônica foram essenciais para a elucidação da ordem correta do complexo, mostrando que o modelo existente na literatura estava incorreto[70]. Dando continuidade a esse estudo, o complexo SEPT2G/6/7 foi purificado, tendo seus dados coletados e processados por criomicroscopia eletrônica. Os resultados deste estudo foram publicados nesse ano no *Journal of Molecular Biology*[71].

A *Figura 156* mostra os resultados obtidos, com resolução média de 3.25 Å. Um importante aspecto deste estudo foi o entendimento da flexibilidade existente nessa proteína, que é fundamental para a sua função estrutural. Os resultados obtidos foram depositados nos repositórios EMDB e PDB (EMD-23698, PDB-7M6J).

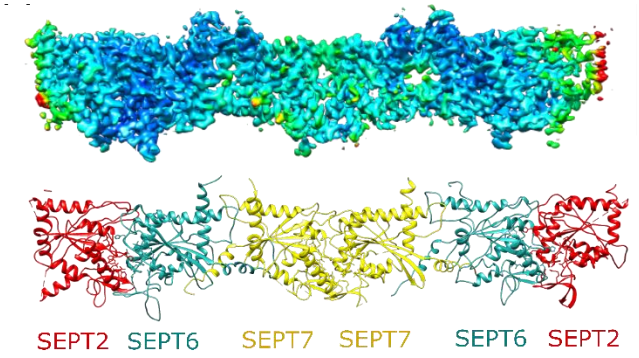


Figura 156 Mapa tridimensional e modelo estrutural, obtidos por criomicroscopia eletrônica, do complexo humano SEPT2G-SEPT6-SEPT7

69 Ribeiro-Filho, H.V., Coimbra, L.D., Cassago, A., Rocha, R.P.F., Guerra, J.V.S., Felicio, R., Carnieli, C.M., Leme, L., Padilha, A.C., Leme, A.F.P., Trivella, D.B.B., Portugal, R.V., Lopes-de-Oliveira, P.S., Marques, R.E., Cryo-EM structure of the mature and infective Mayaro virus at 4.4 Å resolution reveals features of arthritogenic alphaviruses. Nat Commun 12, 3038 (2021). 10.1038/s41467-021-23400-9

70 Mendonça, D. C., Macedo, J. N., Guimarães, S. L., Silva, F. L. B., Cassago, A., Garratt, R. C., Portugal, R. V., Araújo, A. P. U., A revised order of subunits in mammalian septin complexes, Cytoskeleton, 76 (9-10), 457-466 (2019). DOI:10.1002/cm.21569.

71 Mendonça, D.C., Guimarães, S.L., Pereira, H.D.M., Pinto, A.A., de Farias, M.A., Godoy, A.S., Araujo, A.P.U., van Heel, M., Portugal, R.V., Garratt, R.C., An atomic model for the human septin hexamer by cryo-EM. J Mol Biol (2021) 10.1016/j.jmb.2021.167096.

Em outras atividades desse projeto, ao longo do ano, foram coletas e análise de dados de octamêros de septinas humana e de *Ciona intestinalis*. Estudar septinas de *Ciona intestinalis* é interessante por ser um organismo utilizado como modelo em diversos estudos evolutivos, devido à sua classificação num grupo basal dentro dos Cordados. As análises indicaram a presença de misturas de octâmeros e hexâmeros, com dominância desse último. Sendo assim, alterações nos protocolos de expressão e purificação estão sendo introduzidas pelo grupo do IFSC/USP para melhorar a pureza das amostras de octâmeros. Até o momento, não existe nenhuma informação estrutural disponível para um octâmero completo de septinas, de nenhum organismo.

Destaca-se também o projeto de desenvolvimento de plataformas de estudos para a criação de partículas pseudovirais (virus-like particles - VLP), que são partículas que se assemelham a vírus, mas não são infecciosas, por não conterem o genoma do vírus selvagem. No âmbito do desenvolvimento de vacinas, os projetos executados apresentaram níveis de amadurecimento distintos. Alguns estudos preliminares estavam relacionados à visualização da morfologia do vírus SARS-CoV-2 e outros, mais avançados, visavam viabilizar análise junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Sendo assim, foram apoiados projetos que visavam a obtenção de vacinas nacionais, as quais serão de suma importância para a saúde pública do país.

A utilização dos microscópios Talos Arctica e Titan Krios, para aplicações em biologia estrutural vem se consolidando. Anteriormente, já haviam sido reportadas estruturas de macromoléculas obtidas por contrastação negativa com dados coletados no LNNano, além da estrutura do vírus Mayaro, obtida por criomicroscopia em 2020, tendo sida publicada em 2021 no periódico *Nature Communications*[72] (EMD-22961, PDB-7ko8).

Microscopia Eletrônica de Transmissão

Dentre os trabalhos em desenvolvimento em microscopia eletrônica de transmissão (MET), o destaque é uso da técnica ePDF, ou seja, como utilizar a técnica PDF (*pair distribution function*) a partir de dados de difração de elétrons obtidas em um microscópio eletrônico de transmissão convencional, ampliando assim a difusão desta técnica de caracterização estrutural. Estamos explorando as vantagens de se utilizar o ePDF em materiais nanométricos e em materiais amorfos, incluindo líquidos amorfos congelados. Este trabalho é resultado de uma interação intensa entre pesquisadores de diferentes divisões do LNNano, inclusive participação dos grupos de teoria. Como descrito na *Figura 157* . Etapas para obtenção do padra PDF a partir de dados de difração de elétrons o processo de obtenção do padrão de PDF demanda várias etapas de coleta de dados e processamento de imagens e dados. Assim estamos nos dedicando ao aprimoramento dos *softwares* existentes, para facilitar e padronizar operações importantes, tais como subtração da linha base e minimização de distorções provocados pelos detectores e lentes no processo de geração do padrão de difração de elétrons. Outro tema relevante é compreender a contribuição

72 Ribeiro-Filho, H.V., Coimbra, L.D., Cassago, A., Rocha, R.P.F., Guerra, J.V.S., Felicio, R., Carnieli, C.M., Leme, L., Padilha, A.C., Leme, A.F.P., Trivella, D.B.B., Portugal, R.V., Lopes-de-Oliveira, P.S., Marques, R.E., Cryo-EM structure of the mature and infective Mayaro virus at 4.4 Å resolution reveals features of arthritogenic alphaviruses. Nat Commun 12, 3038 (2021). 10.1038/s41467-021-23400-9

instrumental do MET no padrão final PDF. Os avanços obtidos na técnica ePDF deste ano foram publicados em um artigo de revisão, na revista *Matter*[73].

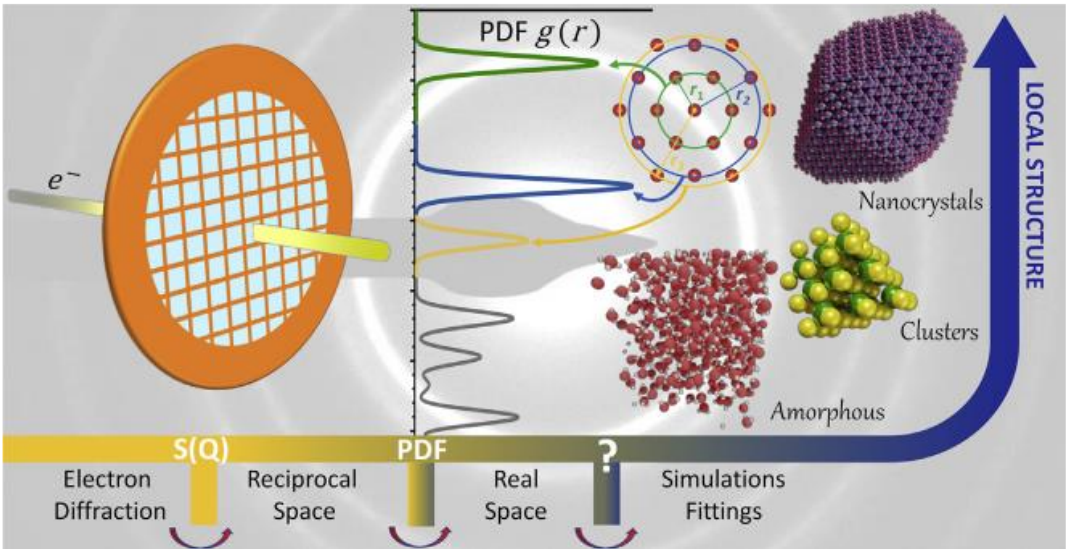


Figura 157. Etapas para obtenção do padra PDF a partir de dados de difração de elétrons

Microscopia Eletrônica de Varredura e de Duplo feixe

A proposta de pesquisa submetida pelo LNNano em colaboração com a Universidade Presbiteriana Mackenzie se destacou entre as propostas executadas em microscopia eletrônica de varredura no ano de 2021. Neste trabalho os autores desenvolveram dispositivos OECTs (*Organic Electrochemical Transistors*) com performance excepcional utilizando uma técnica de *rolling-origami*. As imagens foram adquiridas no microscópio eletrônico de varredura Thermo Fisher Quanta 650 FEG sendo uma delas (*Figura 158*), depois de devida edição artística, capa da edição 29 (volume 33) da *Advanced Materials*[74].

73 SOUZA JUNIOR, JOÃO BATISTA; SCHLEDER, GABRIEL RAVANHANI ; BETTINI, JEFFERSON ; NOGUEIRA, IÇAMIRA COSTA ; FAZZIO, ADALBERTO ; LEITE, EDSON ROBERTO . Pair Distribution Function Obtained from Electron Diffraction: An Advanced Real-Space Structural Characterization Tool. *Matter*, v. 4, p. 441-460, 2021.

74 Letícia M. M. Ferro, Leandro Merces, Davi H. S. Camargo, Carlos C. Bof Bufon. Ultrahigh-Gain Organic Electrochemical Transistor Chemosensors Based on Self-Curled Nanomembranes. *Advanced Materials* 2021, 33 (29) , 2101518. https://doi.org/10.1002/adma.202101518

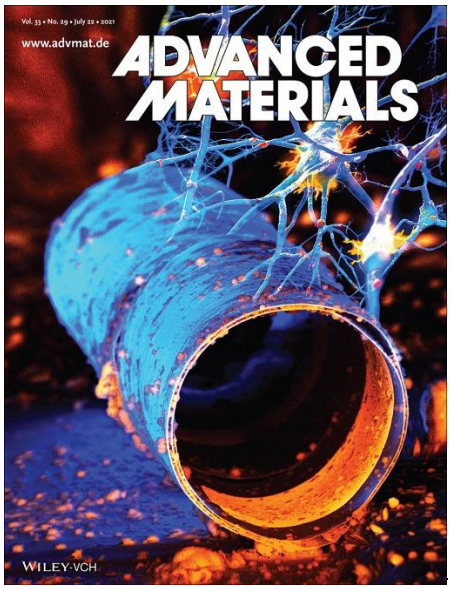


Figura 158. Imagem da capa da edição 29 (volume 33) da revista AVANCED MATERIALS de julho de 2021

Com relação à microscopia de duplo feixe (FIB), gostaríamos de destacar um trabalho executado em parceria entre pesquisadores do LNNano e do LNLS que necessitou do preparo de ponteiras especiais de AFM para deposição de filmes magnéticos, exigindo o desenvolvimento de metodologias especiais para nanofabricação. Neste trabalho uma ponteira convencional de AFM foi submetida a processos de *milling* por FIB (*Focused Ion Beam*) em um microscópio eletrônico de duplo feixe Thermo Fisher Helios NanoLab 660 (Figura 159). A utilização de *softwares* específicos para nanofabricação, aliada a ferramentas de nano manipulação disponíveis no equipamento, permitiu a produção de ponteiras que atendessem às necessidades de morfologia necessárias ao trabalho em desenvolvimento.

Os resultados obtidos nesse projeto se mostraram extremamente promissores no desenvolvimento de ponteiras de MFM (*Magnetic Force Microscopy*) com características superiores aos modelos comerciais e encontram-se em processo de avaliação para solicitação de patente de proteção tecnológica.

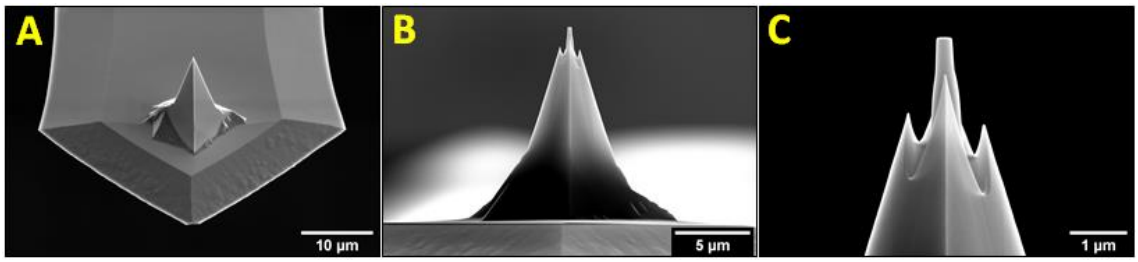


Figura 159. Ponteira de AFM (A) antes e (B) após o processo de nano fabricação da ponta de 250 nm. A extremidade da ponteira produzida por FIB pode ser vista em (C)

Por fim, ainda foram publicados artigos nos periódicos Nano Letters[75], Carbon[76], ACS Sustainable Chemistry & Engineering[77], Nanomedicine[78], Journal Of Physical ChemistryC[79].

Nanomateriais Renováveis

Comportamento coloidal de suspensões complexas de nanocelulose

Esta linha de pesquisa tem como objetivo estudar o comportamento coloidal de suspensões de nanocelulose para obter materiais avançados. Os trabalhos englobam desde a produção até a aplicação de nanocelulose em diferentes sistemas.

No projeto sobre recalcitrância de biomassa, em colaboração com LNBR, avançamos no estudo da interação entre celulose e lignina através de medidas de indentação por AFM e dinâmica molecular. O uso de *machine learning* para o tratamento estatístico das milhares de curvas de força versus distância permitiu, pela primeira vez, obter evidência experimental sobre a energia de interação entre os biopolímeros em função das faces cristalinas da celulose. A metodologia desenvolvida abre um novo caminho para o estudo da recalcitrância da biomassa, pois permite obter experimentalmente informações sobre interações intermoleculares em escala nanométrica.

Em estudos anteriores, verificamos que a extração de nanofibrilas de celulose de bagaço de cana de açúcar é favorecida quando uma etapa de oxidação é realizada antes da desfibrilação mecânica (Figura 160). As forças de coesão da celulose foram determinadas em função do grau de oxidação das fibras em um estudo teórico-experimental, publicado no *Journal of Physical Chemistry*[80]. Quanto maior a

75 Galdino, FE (Galdino, Flavia E.); Picco, AS (Picco, Agustin S.); Capeletti, LB (Capeletti, Larissa B.); Bettini, J (Bettini, Jefferson); Cardoso, MB (Cardoso, Mateus B.). Inside the Protein Corona: From Binding Parameters to Unstained Hard and Soft Coronas Visualization. NANO LETTERS, Volume: 21, Issue: 19, Pages: 8250-8257. DOI: 10.1021/acs.nanolett.1c02416

76 da Costa, JPD (de Campos da Costa, Joao Paulo); Teodoro, V (Teodoro, Vinicius); Assis, M (Assis, Marcelo); Bettini, J (Bettini, Jefferson); Andres, J (Andres, Juan); do Carmo, JPP (Pereira do Carmo, Joao Paulo); Longo, E (Longo, Elson). A scalable electron beam irradiation platform applied for allotropic carbon transformation. CARBON, Volume: 174, Pages: 567-580. DOI: 10.1016/j.carbon.2020.11.054

77 Sorribes, I (Sorribes, Ivan); Ventura-Espinosa, D (Ventura-Espinosa, David); Assis, M (Assis, Marcelo); Martin, S (Martin, Santiago); Concepcion, P (Concepcion, Patricia); Bettini, J (Bettini, Jefferson); Longo, E (Longo, Elson); Mata, JA (Mata, Jose A.); Andres, J (Andres, Juan). Unraveling a Biomass-Derived Multiphase Catalyst for the Dehydrogenative Coupling of Silanes with Alcohols under Aerobic Conditions. ACS SUSTAINABLE CHEMISTRY & ENGINEERING, Volume: 9, Issue: 7, Pages: 2912-2928. DOI: 10.1021/acssuschemeng.0c08953

78 Schneid, AC (Schneid, Andressa C.); Ribeiro, IRS (Ribeiro, Iris R. S.); Galdino, FE (Galdino, Flavia E.); Bettini, J (Bettini, Jefferson); Cardoso, MB (Cardoso, Mateus B.). NANOMEDICINE, Volume: 16, Issue: 2, Pages: 85-96. DOI: 10.2217/nnm-2020-0257

79 Vale, BRC (Vale, Brener R. C.); Socie, E (Socie, Etienne); Cunha, LRC (Cunha, Leticia R. C.); Fonseca, AFV (Fonseca, Andre F., V); Vaz, R (Vaz, Roberto); Bettini, J (Bettini, Jefferson); Moser, JE (Moser, Jacques-E); Schiavon, MA (Schiavon, Marco A.). Revealing Exciton and Metal-Ligand Conduction Band Charge Transfer Absorption Spectra in Cu-Zn-In-S Nanocrystals. JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY C, Volume: 124m Issue: 50, Pages: 27858-27866. DOI: 10.1021/acs.jpcc.0c09681

80 SILVESTRE, GUSTAVO H. ; PINTO, LIDIANE O. ; BERNARDES, JULIANA S. ; MIWA, ROBERTO H. ; FAZZIO, ADALBERTO. Disassembly of TEMPO-Oxidized Cellulose Fibers: Intersheet and Interchain Interactions in the Isolation of Nanofibers and Unitary Chains. JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY B, v. 125, p. 3717-3724, 2021.

quantidade de grupos carboxilatos, menos efetivas são as interações não covalentes, sendo as inter-cadeias mais afetadas do que as inter-folhas. O resultado é que a desagregação das fibras oxidadas ocorre preferencialmente no sentido de formação de nanofibras e cadeias de celulose destacadas, ao invés de folhas, como visualizado por microscopia de força atômica (AFM), Figura 160, direita.

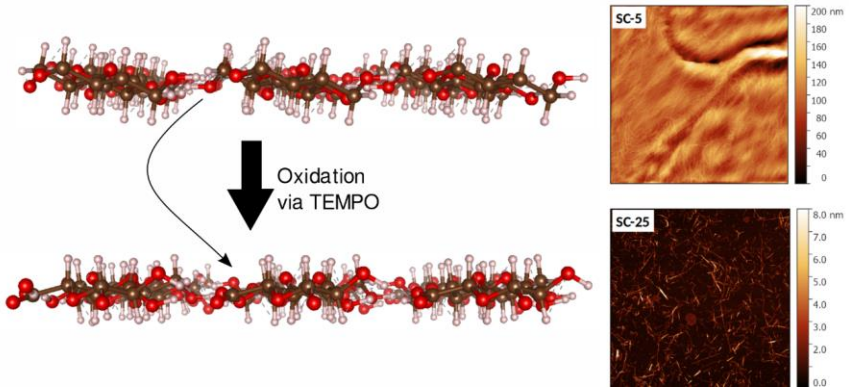


Figura 160. Reação de oxidação da celulose (esquerda); imagens de topografia adquiridas por AFM de nanofibras de celulose oxidadas (direita)

A baixa estabilidade mecânica em água de materiais produzidos a partir de nanofibras de celulose é um dos principais desafios a serem vencidos para a substituição de derivados de petróleo por esses nanomateriais renováveis. Em um trabalho publicado na *Carbohydrate Polymers*[81], a complexação eletrostática entre nanofibras catiônicas e aniônicas foi utilizada com estratégia para melhorar a resiliência de espumas em meio aquoso. Resultados de SAXS e Cryo-TEM mostraram que as dispersões contendo as nanofibras de cargas opostas apresentam regiões com agregados de nanofibras e regiões contendo uma rede interconectada. O balanço entre essas duas estruturas governa a estabilidade coloidal e a reologia das suspensões, bem como a estabilidade em água das espumas.

Na mesma linha de complexação eletrostática, foram desenvolvidos adesivos com alta estabilidade em meio aquoso, duas formulações já estão patenteadas (INPI BR10202002595[82] e INPI BR1320210213301[83]). Essas colas são bioinspiradas em mexilhões (*sandcastle worm*) que excretam uma mistura de proteínas para aderir areia. As formulações adesivas, produzidas no laboratório, são obtidas através da mistura controlada de biopolímeros com cargas opostas e são capazes de aderir diferentes substratos.

81 MARIANO, MARCOS ; SOUZA, SIVONEY F. ; BORGES, ANTÔNIO C. ; DO NASCIMENTO, DIEGO M. ; BERNARDES, JULIANA S. . Tailoring strength of nanocellulose foams by electrostatic complexation. CARBOHYDRATE POLYMERS, v. 256, p. 117547, 2021.
82 Bernades, Juliana S.; Polezi, G. ; Polezi, G. ; Nascimento, D. M. . Coacervado Adesivo A Base De Nanocelulose E Lignossulfonato E Processo De Produção Do Mesmo. 2020, Brasil.
Patente: Privilégio De Inovação. Número Do Registro: Br10202002595, Título: "Coacervado Adesivo A Base De Nanocelulose E Lignossulfonato E Processo De Produção Do Mesmo" , Instituição De Registro: Inpi - Instituto Nacional Da Propriedade Industrial. Depósito: 18/12/2020
83 Bernardes, Juliana S.; Da Silva, Daiane B.; Gouveia, Rubia F.; Do Nascimento, Diego M.; Claro, Pedro I. C. Adesivo A Base De Látex, Nanocelulose Cationizada E Lignina Não-Funcionalizada, Processo De Produção Do Mesmo E Seus Usos Patente: Privilégio De Inovação. Número Do Registro: Br 13 2021 021330 1, Instituição De Registro: Inpi - Instituto Nacional Da Propriedade Industrial. Depósito: 25/10/2021.

A estabilidade elétrica de dispositivos preparados com nanocelulose em ambiente úmido é uma barreira a ser vencida para avançar no uso dessa nanopartícula em eletrônica flexível. Em um trabalho patenteado (INPI BR10202100807[84]) e publicado na ACS Applied Bio Materials[85], a interação da celulose com água foi substancialmente reduzida por meio de modificação química de hidrofobização com HMDS (hexadimetilsilasano), levando assim a uma estabilidade das propriedades elétricas dos dispositivos, mesmo em altas umidades.

Nanociências e Materiais Avançados

Inibição do SARS-CoV-2 induzida por nanofibras de celulose oxidada

Superfícies desempenham um papel importante na disseminação de vírus, a estratégia de desenvolver materiais que possuam a capacidade de inativar o vírus, sem a necessidade de uma etapa de limpeza é bastante promissora para evitar a sua propagação. Em um recente trabalho de simulação computacional foi verificado que o poder infectante do SARS-CoV-2 pode ser reduzido através da interação eletrostática de parte do vírus com moléculas/partículas carregadas negativamente. O objetivo desse projeto é avaliar se nanofibras de celulose (CNFs) com grupos carboxilatos na superfície (-COO-) são capazes de interagir e inativar o SARS-CoV-2. Essas nanopartículas oxidadas podem ser utilizadas, por exemplo, para desenvolver *coatings* para diferentes substratos, como tecidos para máscaras. A interação eletrostática será avaliada através de medidas de potencial zeta e Cryo-TEM, e inicialmente serão ficados sistemas simples, ou seja, CNF e arginina. Posteriormente, sistemas mais complexos que envolvem parte do vírus (*spike*) ou o vírus inteiro serão estudados. As CNFs já foram preparadas utilizando duas condições de oxidação que levaram a duas quantidades de grupos carboxilatos na superfície das nanofibras (0.4 e 1.4 mmol/g). Análises da interação entre as CNFs oxidadas e arginina por medidas de potencial zeta e transmitância revelam que ocorre a interação entre as espécies. Imagens de cryo-TEM desses sistemas serão obtidas para verificar a agregação das fibras na presença de arginina.

Desenvolvimento de bionanocompósitos reforçados com nanoestruturas de celulose funcionalizada

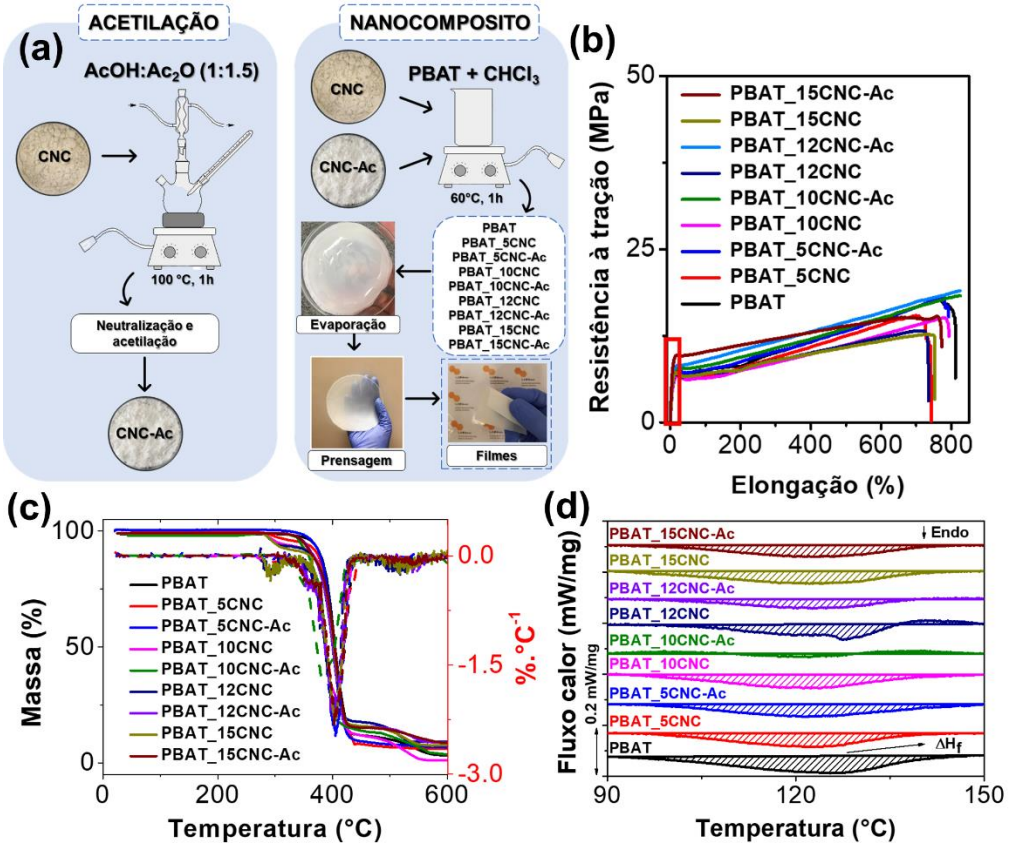
O interesse por polímeros biodegradáveis tem aumentado exponencialmente devido às preocupações ambientais globais sobre o descarte inadequado de materiais plásticos convencionais, como o polietileno (PE) e polipropileno (PP). Diante dessa questão, o poli (adipato-co-tereftalato de butileno) (PBAT) é um bom candidato para aplicação em filmes, uma vez que apresenta processabilidade, propriedades termo-mecânicas desejáveis e promissoras e menor solubilidade em água, quando comparado com outros biopolímeros. No entanto, o PBAT exibe propriedades mecânicas inferiores em comparação aos polímeros convencionais. Para superar essa questão, os nanocristais de celulose acetilados (CNCs-Ac) foram sistematicamente investigados através da incorporação de diferentes proporções dessa nanoestrutura em filmes baseados em PBAT produzidos através da técnica de *solvent casting* seguido da prensagem à quente, como ilustrado na Figura 161a. Este processo, combinado com a inserção de um reforço hidrofóbico, garantiu um aumento na resistência mecânica ao escoamento dos filmes de 30%, módulo de

84 Bernardes, J. S.; Corrêa, Cátia C. ; Bufon, Carlos C. B. ; Fingolo, A. C. ; Morais, V. B. ; Santhiago, Murilo ; Morais, V. B. . Nanopapel De Celulose Modificada, Sistema Tinta-Nanopapel De Celulose Modificada, Dispositivos Baseados Nos Mesmos E Seus Processos De Fabricação. 2021, Brasil.
Patente: Privilégio De Inovação. Número Do Registro: Br10202100807, Título: "Nanopapel De Celulose Modificada, Sistema Tinta-Nanopapel De Celulose Modificada, Dispositivos Baseados Nos Mesmos E Seus Processos De Fabricação" , Instituição De Registro: Inpi - Instituto Nacional Da Propriedade Industrial. Depósito: 27/04/2021

85 Fingolo, Ana C. ; De Morais, Vitória B. ; Costa, Saionara V. ; Corrêa, Cátia C. ; Lodi, Beatriz ; Santhiago, Murilo ; Bernardes, Juliana S. ; Bufon, Carlos C. B. . Enhanced Hydrophobicity In Nanocellulose-Based Materials: Toward Green Wearable Devices. *Acs Applied Bio Materials*, 2021, 4, 9, 6682–6689.

Young de 90% e flexibilidade em mais de 650%, quando comparado aos filmes de PBAT puro, como demonstrado na Figura 161b. Os CNCs-Ac garantiram a estabilidade térmica dos nanocompósitos de PBAT acima de 350 °C devido ao grupo funcional acetil compatível a matrizes de PBAT (Figura 161c). Este comportamento foi relacionado à dispersão e distribuição homogênea dos CNCs-Ac sem aglomerações por toda a matriz de PBAT, produzindo maior compatibilidade de interface entre a carga acetilada e a matriz. Neste caso, a etapa de prensagem a quente garantiu menores valores de índice de cristalinidade da matriz polimérica (Figura 161d), permitindo uma melhoria na resistência ao escoamento e ao módulo de Young com alongamento semelhante na ruptura do PBAT puro. Com isso, este trabalho proporcionou uma nova rota para a preparação de bionanocompósitos baseados em PBAT e nanocelulose, apresentando maior potencial para embalagens biodegradáveis, que podem ser uma alternativa aos polímeros convencionais. Esse trabalho foi submetido para a revista *Industrial Crops and Products* e está em fase final de revisão.

Figura 161. Bionanocompósitos de PBAT reforçados com CNC-Ac. (a) Procedimento esquemático para acetilar os CNCs (esquerda) e para produzir os bionanocompósitos de PBAT. (b) Propriedades mecânicas das formulações dos nanocompósitos de PBAT. Propriedades térmicas das formulações dos nanocompósitos de PBAT: (c) termogravimétria (TGA) e termogravimétria diferencial (DTG); (d) e curvas de calorimetria exploratória diferencia (DSC) com área destacada relacionada à entalpia de fusão (ΔHf).



Espumas de nanocelulose e látex: uma estratégia para remediação ambiental

A escassez de água doce adequada ao consumo vem se intensificando em diferentes regiões do planeta em decorrência de descartes irregulares de esgoto, de poluição por derramamentos/vazamentos de produtos químicos orgânicos e inorgânicos (metais pesados, corantes, entre outros), seja por resultado de acidentes, por desastres naturais ou por más práticas laboratoriais/industriais. Tal contaminação ocorre em águas marítimas e estuários, prejudicando a pesca, o lazer e outras atividades ligadas aos mares e litorais. Em geral, a grande maioria dos contaminantes é sempre prejudicial a todos os seres vivos que compõem um determinado ecossistema, sejam eles humanos ou não. Um método promissor para a remoção de poluentes em meios aquáticos é o processo de adsorção e/ou absorção, utilizando um material absorvente para a captura desses contaminantes. O processo tem se mostrado eficiente para diversas aplicações e possui a vantagem de ter um custo mais baixo comparado com os demais processos. Neste cenário, a biomassa é uma opção como matéria-prima para biopolímeros biodegradáveis, renováveis, e aplicáveis no desenvolvimento de novos materiais absorventes/adsorventes. Dentre esses materiais, destaca-se a nanocelulose, principalmente, pela sua abundância na natureza e suas excelentes propriedades de reforço, além de ser um material renovável e biodegradável. Sendo o Brasil o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, há um enorme potencial associado ao reaproveitamento desses resíduos na produção de materiais com maior valor agregado. No entanto, a nanocelulose possui baixa resiliência estrutural em meios aquosos, por ser uma estrutura extremamente hidrofílica, causando a sua desestruturação mecânica em água. Para contornar esses desafios, o látex de borracha natural é usado para atuar como um ligante ou agente reticulante para as nanoestruturas de celulose, mantendo uma estrutura 3D resiliente, estável e robusta em meios aquosos.

A Figura 162 ilustra a adsorção de íons Cu II na espuma, que foi analisada por microtomografia de raios-X, de forma a identificar as possíveis mudanças morfológicas, bem como as diferenças de atenuação de raios-X, após a adsorção dos íons cobre. Esse ensaio foi realizado com as amostras após imersão em solução de $CuCl_2$ e posteriormente seca por 2 dias (Figura 162d), bem como nas espumas secas (Figura 162 e Figura 162 f) antes da imersão. A reconstrução das imagens das espumas antes e após o teste de adsorção mostram claramente regiões com maior atenuação de raios-X (regiões em azul - Figura 162d), o que indica a retenção de espécimes com maior densidade eletrônica, permitindo inferir que se trata da adsorção do cobre II pela espuma. Isso fica mais evidente quando comparamos essa reconstrução com aquela feita para a espuma antes do ensaio (Figura 162f). Nesta última é possível verificar apenas o sinal atenuado para valores menores, comumente correlacionados a materiais compostos por carbono, como a celulose nanofibrilada. Esses dados confirmam a efetividade da espuma contendo nanocelulose e látex em manter sua estrutura porosa quando submetida a ambientes aquosos e alta capacidade de adsorção de metais pesados, como verificado para o cobre II. A eficiência de adsorção também foi confirmada por dados experimentais de espectrometria de emissão óptica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES). Tais confirmações estão diretamente correlacionadas a adição do látex e a oxidação da celulose, respectivamente.

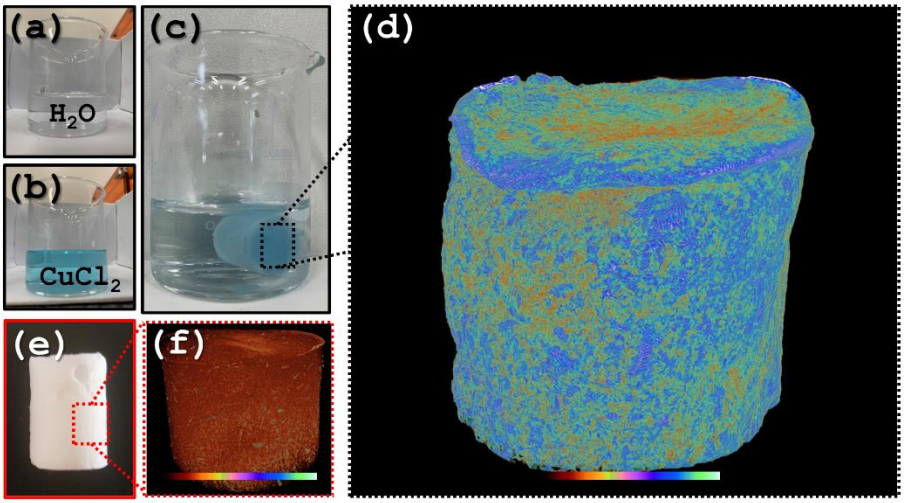


Figura 162 Espumas de nanocelulose e látex de borracha natural usadas na remediação de meios contaminados com CuCl2. (a-b) Fotografias de ambientes com água e solução de CuCl2 (c) Espumas após imersão em solução de CuCl2. (d) Microtomografia de raios-X de uma espu

Essa tecnologia desenvolvida pelo CNPEM foi protegida em dois pedidos de patentes de invenção e o licenciamento está atualmente sendo discutido com uma empresa do setor produtivo, com atuação em soluções verdes para remediação de problemas ambientais.

Atualmente, essa mesma tecnologia está sendo adaptada através da incorporação de nanopartículas com atividades virucidas, pois esse material é promissor para a remediação de meios contaminados por SARS-CoV 2.

Além disso, as espumas também estão sendo avaliadas quanto a sua capacidade de reuso para a absorção de óleo, visando a remediação ambiental de meios aquosos contaminados por poluentes hidrofóbicos. Neste trabalho, o monitoramento experimental está sendo correlacionado com alterações morfológicas e morfométricas (como tamanho de poros, porosidade, espessura de paredes, etc) com dados avançados de tomografia de raios-X. Como perspectivas, novas microtomografias serão obtidas na linha MOGNO do Sirius, com maiores resoluções espaciais e temporais (cerca de 16s cada reconstrução 3D). Isso permitirá o acompanhamento in situ da dinâmica de absorção de óleos e alterações morfológicas causadas por esses eventos, em uma escala curta de tempo. Para a análise dos dados que devem chegar na ordem de terabytes, o software Annotat3D desenvolvido pelo Grupo de Computação Científica do Sirius (GCC) será utilizado para o treino de uma rede neural, que será usada na segmentação automática e quantificação de dados extraídos das espumas. Além disso, será preciso desenvolver algoritmos baseados em GPU para a análise quantitativa dos dados, em vez de usar softwares comerciais, aproveitando assim do potencial da *workstation* recentemente adquirida pelo grupo de síntese do LNNano. Esse projeto de pesquisa faz parte de uma colaboração interna entre o LNNano e Sirius e foi recentemente aprovado pela FAPESP.

Nanomateriais para Energia

Produção de Hidrogênio "verde": Fotossíntese Artificial

O ano 2021 foi oficialmente finalizada a implementação do laboratório dedicado ao estudo, desenvolvimento de nanomateriais e tecnologias para produção e armazenamento de energia limpa. O laboratório tem infraestrutura competitiva e já nesse ano com os resultados obtidos o LNNano-CNPEM já

figura no cenário nacional e internacional. No total foram publicados 4 artigos científicos em revistas internacionais indexadas, incluindo a participação em tópico especial na área de energia renovável a convite de pesquisadores internacionais. O avanço na fabricação e caracterização de materiais nanométricos de óxidos foi um passo importante para incluir o CNPEM nesse cenário competitivo. Concomitantemente foi priorizado o desenvolvimento de metodologias e técnicas de fabricação que permitam a produção desses materiais já em escala industrial. Neste sentido, podemos destacar a fabricação de materiais em escala nanométrica aptos a absorverem a luz do sol e na presença de água promoverem sua quebra formando gás O_2 e H_2. A produção de hidrogênio por essa rota classificado como verde, pois não envolve em nenhuma etapa a liberação ou formação de CO_2. Ainda nesse mesmo ano protótipos foram projetados e estão em fase final de fabricação, o que permitirá o LNNano-CNPEM quantificar o quanto é gerado de H_2 por cm^2 de material. Poucos laboratórios têm realizado esse tipo de experimento. A Figura 163 destaca um processo químico simples que permitir a produção de uma variedade grande de óxidos simples e complexos com propriedades fotocatalisadoras, ou seja, nanomateriais que absorvem luz do sol e promovem a geração de H_2 verde.

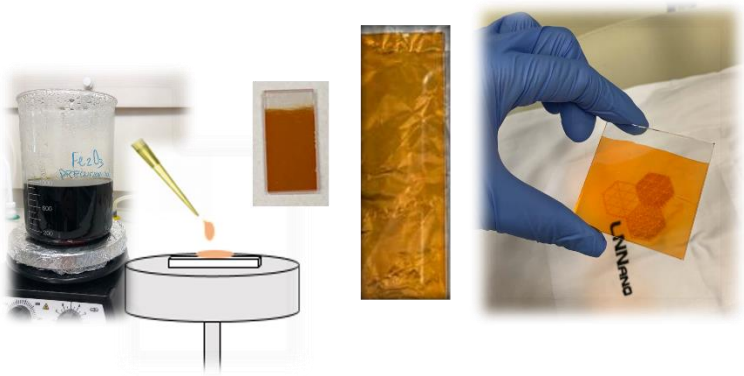


Figura 163 Representação do processo de fabricação de nanomateriais em diferentes escalas para fabricação de H2 verde

Os artigos publicados nesse ano na *Applied Physics Letters*[86] [87] e na *Chemistry of Materials*[88], envolvendo os pesquisadores e equipe técnica do LNNano, bem como colaboradores internacionais, destacam esse desenvolvimento bem como o estudo e compreensão de fenômenos físicos e químicos que nos permitiram avançar na criação dos métodos simples e versáteis como o ilustrado acima.

Desenvolvimento de uma célula eletroquímica para medidas Raman in situ de materiais para energia

Neste projeto foram prototipadas por impressão 3D duas versões distintas de célula eletroquímica (Figura 164) que contemplam um *design* modular no qual podem ser instalados diferentes tipos de eletrodos de trabalho, referência e contra, e que possuem também conexões que permitem o fluxo de eletrólito. A primeira versão, em que podem ser instalados eletrodos comerciais, já foi completamente comissionada.

86 Lima, F. C.; Schleder, G.; Souza Junior, J.; Souza, Flavio L.; Destro, F.; Miwa, R. H.; Leite, E. R.; Fazzio, A. Unveiling the Dopant Segregation Effect at Hematite Interfaces. Applied Physics Letters, V. 118, P. 201602, 2021.

87 Rodriguez-Gutierrez, Ingrid; Souza Junior, Joao B.; Leite, Edson R.; Vayssieres, Lionel; Souza, Flavio L. An Intensity Modulated Photocurrent Spectroscopy Study of the Role of Titanium in Thick Hematite Photoanodes. Applied Physics Letters, V. 119, P. 071602, 2021.

88 Nakajima, K.; Souza, Flavio L.; Freitas, Andre L. M.; Thron, A.; Castro, R. H. R. Improving Thermodynamic Stability of nano-LiMn 2 O 4 for Li-Ion Battery Cathode. Chemistry of Materials, v. 33, p. 3915-3925, 2021.

Foram realizados ensaios que atestam o potencial deste tipo de dispositivo em experimentos que correlacionam alterações em propriedades estruturais e químicas de materiais com experimentos eletroquímicos. Foi estudada, por exemplo, a estabilidade eletroquímica e fotoquímica de *flakes* de MoS_2 (Figura 164) que é tido como um material com potenciais aplicações em geração e armazenamento de energia. Esta versão está prevista a ser disponibilizada para os usuários externos assim que o espectrômetro Raman for aberto aos usuários externos.

A segunda versão do dispositivo, que contempla uma arquitetura que permitirá a instalação de eletrodos integrados, microfabricados e diferentes tipos de substratos, e um sistema de iluminação para a realização de ensaios de fotoeletroquímica se encontra em fase de comissionamento. Estão sendo testados e realizados ajustes na configuração do dispositivo para otimizar a sua vedação e o estabelecimento dos contatos elétricos entre os eletrodos e o potenciostato que controla os experimentos.

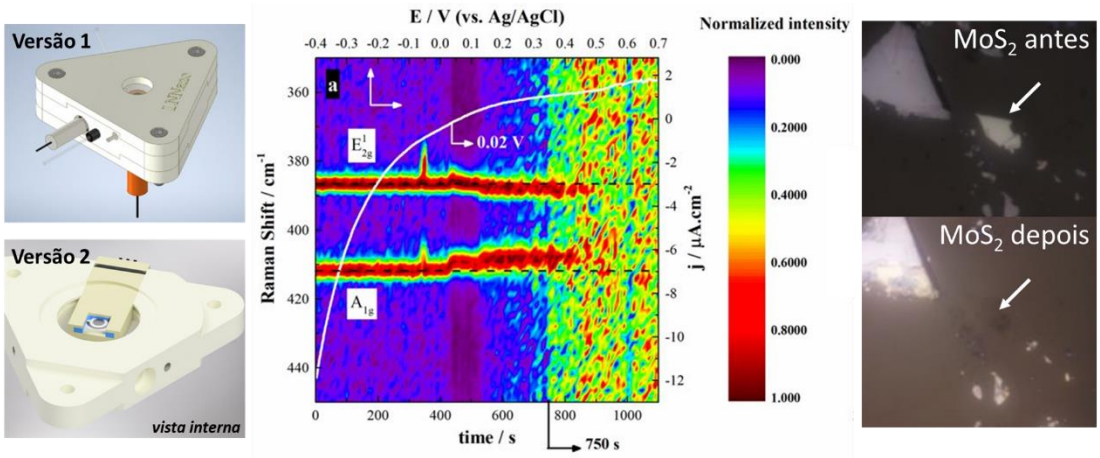


Figura 164 Configuração das duas versões da célula eletroquímica para medidas Raman in situ prototipadas por impressão 3D e ensaio de estabilidade eletroquímica de um flake de MoS2

Eletrólitos sólidos cerâmicos para dispositivos de armazenamento de energia

O principal objetivo o desenvolvimento de materiais cerâmicos do tipo LLZO (Li7La3Zr2O12) para utilizá-los como eletrólitos em baterias no estado sólido de íons lítio. Duas rotas de síntese têm sido exploradas neste projeto: a rota clássica de síntese no estado sólido, e a produção de filmes finos a partir de decomposição de precursores metalorgânicos. O enfoque dos estudos com estas rotas está em estabelecer as correlações entre os processos de síntese e processamento, as propriedades críticas e a eficiência destes materiais na sua aplicação fim. Para materiais do tipo LLZO é desejado que se obtenha a fase cristalina cúbica uma vez que esta é a que apresenta melhor mobilidade iônica para os íons Li+, no entanto ela é mais instável do que a fase tetragonal. No primeiro semestre, foram realizados os primeiros estudos da síntese de materiais cerâmicos do tipo LLZO a partir da rota no estado sólido. Empregou-se, como ponto de partida, composições e parâmetros escolhidos a partir de uma extensa revisão bibliográfica. Após uma série de ajustes nos parâmetros e método de síntese de materiais cerâmicos do tipo LLZO dopados com Al e Ta foram alcançados ótimos resultados com relação a obtenção da fase cristalina desejada com baixíssimo grau de impurezas. A revisão bibliográfica realizada evidenciou a ausência de estudos de ecotoxicologia destes materiais o que abriu uma janela de oportunidade com sinergia com os trabalhos voltados a caracterização da toxicidade e do ciclo de vida de nanomateriais da Divisão de Nanobiotecnologia e Nanotoxicologia do LNNano Figura 165). Nessa direção, no segundo

semestre, os materiais do tipo LLZO dopados com Al e Ta começaram a ser caracterizados visando estudos futuros da sua toxicidade frente a embriões de *Danio rerio* (peixe-zebra) que é um modelo relevante tanto para ensaios ecotoxicológicos como de saúde humana.

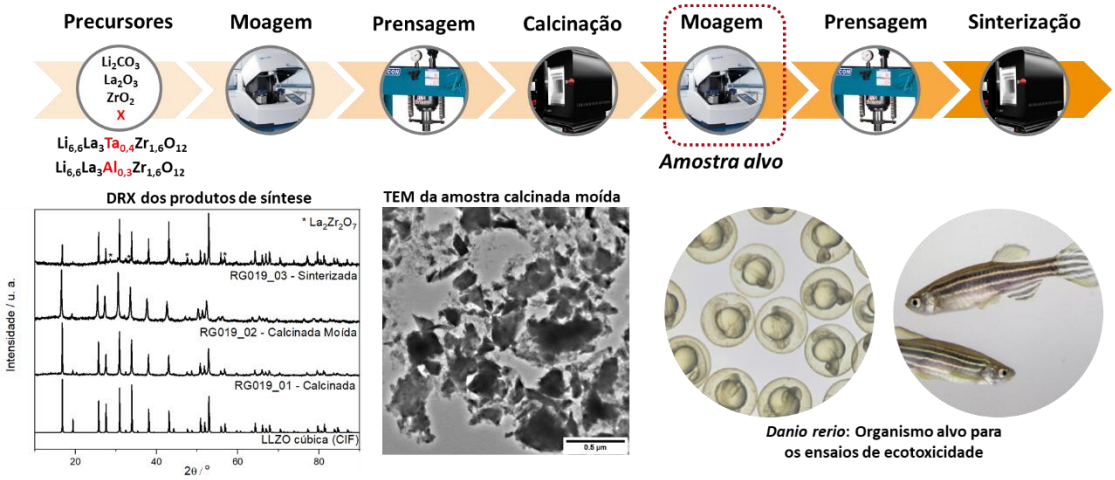


Figura 165 Rota de preparação de LLZO via síntese no estado sólido e seleção de amostra alvo para ensaios de ecotoxicidade

Uma rota, sem precedentes na literatura, de decomposição de precursores metalorgânicos, tem sido desenvolvida para a preparação de filmes finos de LLZO. Essa é uma estratégia para aumentar a eficiência das baterias de íons Li de estado sólido com vistas à redução da resistividade iônica total por redução da espessura do eletrólito. Essa rota consiste na deposição por *dip coating* de soluções contendo metalorgânicos dos metais precursores (Li, Zr, La e dopante Nb) sobre substratos seguida pela decomposição térmica em óxidos para a formação da LLZO (Figura 166). Os estudos têm evidenciado que é possível obter filmes finos de LLZO sem impurezas. Variações desta rota, como por exemplo a realização de múltiplos ciclos de deposição e decomposição ou o controle da estequiometria da solução dos precursores, serão empregadas para controle de espessura, da composição e das interfaces dos filmes finos.

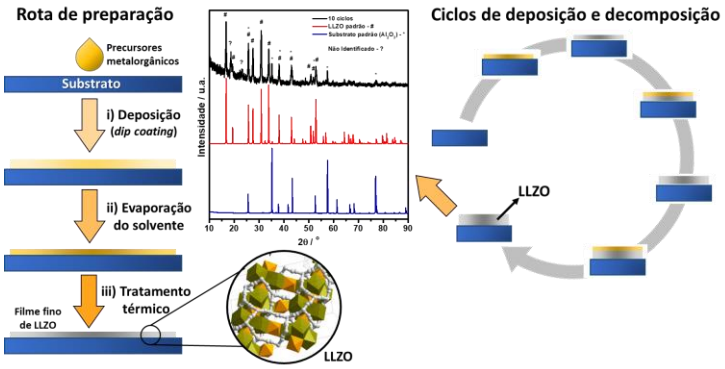


Figura 166 Rotas de obtenção de filmes finos de LLZO a partir a deposição e decomposição de precursores metalorgânicos

Síntese e Caracterização Estrutural Avançada De Nanopartículas de Semicondutores

O objetivo deste projeto é desenvolver métodos avançados de caracterização estrutural por Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) para estudar os defeitos estruturais de nanomateriais semicondutores e otimizar suas propriedades óticas e eletrônicas. No início de 2021 foi publicado na revista *Matter da Cell Press* um *review* que demonstra a importância da técnica de Função de Distribuição de Pares Atômicos por Difração de Elétrons (ePDF) para determinação estrutural de nanomateriais e materiais amorfos[89]. No primeiro semestre de 2021 foram sintetizadas nanopartículas monodispersas esféricas de óxidos de ferro (Fe_3O_4 – magnetita) entre 2 e 13 nm e coletados os dados de difração de elétrons de para estudar como os parâmetros instrumentais afetam os dados de ePDF. Dados quantitativos de estruturas cristalográficas foram obtidos e refinados utilizando o *software* PDFGui obtendo o grupo espacial de simetria, os parâmetros de rede da célula unitária, posições atômicas, os parâmetros de deslocamento atômico (ADP - *atomic displacement parameter*), e tamanho de cristalito. O manuscrito com a compilação destes resultados está em fase final de redação para submissão. A síntese dos nanomateriais semicondutores com dimensões abaixo do confinamento quântico dos portadores de carga também foi realizada, especialmente os calcogenetos metálicos de CdSe (< 5.4 nm), e os resultados de ePDF estão em fase final de aquisição e tratamento de dados. Com estes resultados, a otimização dos parâmetros estruturais de nanomateriais semicondutores e sua correlação com suas propriedades óticas e eletrônicas estão sendo avaliadas durante o segundo semestre visando o início da aplicação em dispositivos optoeletrônicos planejado para 2022. Em outubro de 2021 foi aprovado um Projeto Regular FAPESP sobre o "Controle Estrutural de Nanopartículas Semicondutoras: Superfície, Defeitos e Propriedades"[90]. Outras publicações em colaboração relacionadas a análise estrutural por TEM, ePDF ou materiais semicondutores foram publicadas ou encontram-se em análise[91 92 93].

89 Souza Junior, J. B. S., Schleder, G. R., Bettini, J., Nogueira, I. C., Fazzio, A., & Leite, E. R. Pair Distribution Function Obtained from Electron Diffraction: An Advanced Real-Space Structural Characterization Tool. Matter, v. 4, n. 2, p. 441-460, 2021. https://doi.org/10.1016/j.matt.2020.10.025.

90 Regular FAPESP: 2021/03321-9. Controle Estrutural de Nanopartículas Semicondutoras: Superfície, Defeitos e Propriedades

91 de Lima, F. C., Schleder, G. R., Souza Junior, J. B., Souza, F. L., Destro, F. B., Miwa, R. H., ... & Fazzio, A. Unveiling the dopant segregation effect at hematite interfaces. Applied Physics Letters, v. 118, n. 20, p. 201602, 2021.

92 Rodriguez-Gutierrez, I., Souza Junior, J. B., Leite, E. R., Vayssieres, L. Souza, F. l. An intensity modulated photocurrent spectroscopy study of the role of titanium in thick hematite photoanodes, Applied Physics Letters, v. 119, n. 7, p. 071602, 2021.

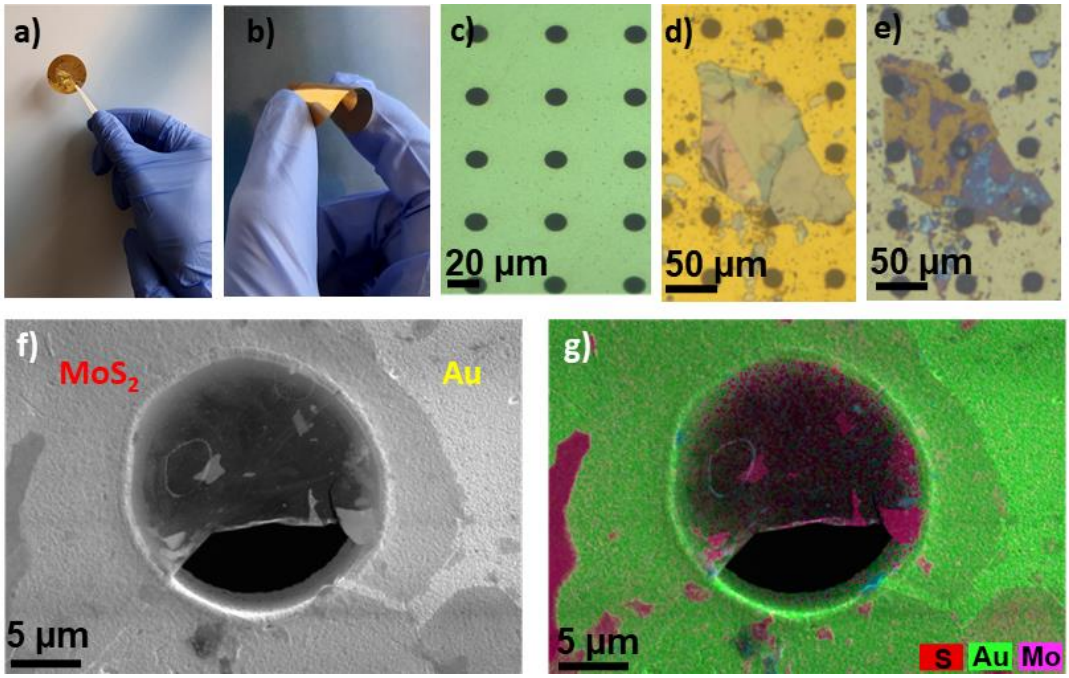
93 Souza Junior, J. B., Souza, F. l., Vayssieres, L., Varghese, O. K. On the relevance of understanding and controlling the locations of dopants in hematite photoanodes for low-cost water splitting, Applied Physics Letters, just accepted.

Esfoliação e caracterização eletroquímica de materiais 2D

Os materiais lamelares têm sido um dos grandes alvos de estudo visando a produção e armazenamento de energia. Esses materiais possuem ligações mais fracas ocorrendo entre suas camadas possibilitando a esfoliação e obtenção de monocamadas. Dentre os inúmeros materiais bidimensionais podemos destacar os dicalcogenetos de metais de transição (TMDs), de maneira especial o dissulfeto de molibdênio (MoS_2), material abundante na crosta terrestre, de baixo custo e utilizado em diversos estudos na área de energia. Nesse trabalho buscamos compreender o papel dos defeitos localizados no plano basal do MoS_2, região de maior área no material, visando a produção de hidrogênio. Para isso, um dos desafios iniciais consiste no preparo de monocamadas de MoS_2 com alta razão de aspecto para extrairmos informações inequívocas a respeito da atividade eletrocatalítica do plano basal. Desenvolvemos e aprimoramos durante este ano uma nova rota eletroquímica visando obter monocamadas com alta razão de aspecto. Este projeto tem financiamento do programa Serrapilheira intitulado “Compreendendo defeitos químicos no plano basal de materiais 2D em direção a reação de evolução de hidrogênio” (Serra-1912-31228).

Inicialmente, cristais multicamadas são transferidos para substratos de ouro microfabricados. Aproveitamos a alta energia de ligação entre o MoS_2 e as superfícies de ouro para minimizar a lixiviação do material 2D durante o processo eletroquímico. O processo de desbaste eletroquímico de cristais de MoS_2 multicamada até o nível de monocamada é simples, rápido e possibilita o preparo de monocamadas com alta razão de aspecto. Os cristais de MoS_2 foram caracterizados por espectroscopia Raman, microscopia de força atômica e experimentos de fotoluminescência, confirmando assim a natureza de monocamada do material 2D investigado. A hifenização da técnica eletroquímica com microscopia óptica nos permitiu a observação em tempo real do processo de desbaste. Além disso, um tratamento de imagem alternativo foi usado para calcular a taxa e a área de desbaste, que atingiu valores de 90 - 100% em condições otimizadas. Por fim, com o objetivo de ampliar as possibilidades do método e possibilitar ensaios de caracterização por microscopia eletrônica de transmissão, demonstramos pela primeira vez o processo de desbaste eletroquímico em lâminas de ouro flexíveis contendo microfuros. A Figura 167 (a-c) mostra imagens das lâminas de ouro flexíveis contendo microfuros. Cristais de MoS_2 podem ser desbastados eletroquimicamente nos substratos fabricados, assim como ilustrado na Figura 167 (d-e). A Figura 167 (f-g) mostra imagens de microscopia eletrônica de varredura e um mapa de EDS, respectivamente, que confirmam a presença do material 2D sobre a região do microfuro.

Figura 167. a-c) Fotos das lâminas de ouro flexíveis contendo microfuros de 20 m de diâmetro. d-e) Foto do cristal de MoS2 multicamada sobre os microfuros antes e após o desbaste eletroquímico, respectivamente. f) Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura do cristal de MoS2 após o tratamento eletrquímico. G) Mapa de distribuição dos elementos químicos



Assim, demonstramos pela primeira vez o processo de desbaste eletroquímico em lâminas de ouro flexíveis contendo microfuros que possibilitaram a preparação de camadas de MoS_2 suspensas que irão auxiliar em futuras caracterizações. O método proposto abre a possibilidade de estudar propriedades ópticas, mecânicas e eletroquímicas em monocamadas de MoS_2 suspensas.

Uma das formas de alterar as propriedades eletrocatalíticas do MoS_2 é através da geração de defeitos químicos no material. O tratamento térmico, por exemplo, pode contribuir para a remoção de átomos de enxofre do material e potencializar sua performance visando a produção de hidrogênio (H_2). No entanto, a remoção de enxofre ocorre em temperaturas próximas a 1000°C onde grande parte dos substratos condutores utilizados em dispositivos não resiste ao tratamento. Dessa forma, propomos uma metodologia alternativa que consiste em transferir cristais de MoS_2 para substratos de papel. O papel possui muitas propriedades interessantes como baixo custo, alta disponibilidade e biodegradabilidade. Além disso, mediante a realização de processo de pirólise em atmosfera inerte, pode se tornar um material altamente condutor elétrico. Aproveitando sua estrutura altamente porosa, o papel também é promissor para utilização como substrato para incorporação de partículas de materiais para diferentes aplicações. Dissulfeto de molibdênio (MoS_2), por exemplo, pode ser incorporado no desenvolvimento de catalisadores para reação de evolução de hidrogênio94. Contudo, já foi demonstrado que a atividade catalítica desse material se relaciona a presença de sítios de borda, sendo que o plano basal ou terraço, é inerte para tal processo. Desde 2013[95], métodos para realizar “engenharia de defeitos” têm sido

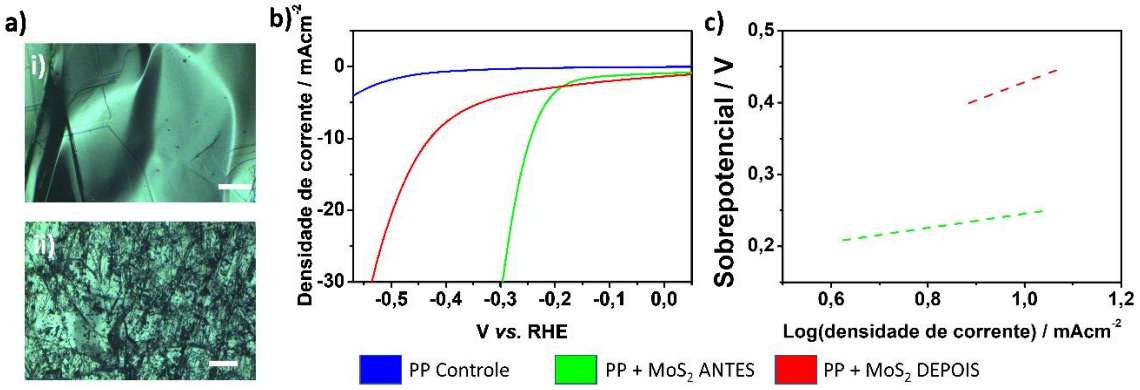
94 Hinnemann, B.; Moses, P. G.; Bonde, J.; Jørgensen, K. P.; Nielsen, J. H.; Horch, S.; Chorkendorff, I.; Nørskov, J. K. Biomimetic Hydrogen Evolution: MoS2 Nanoparticles as Catalyst for Hydrogen Evolution. J. Am. Chem. Soc. 2005, 127 (15), 5308–5309

95 Xie, J.; Zhang, H.; Li, S.; Wang, R.; Sun, X.; Zhou, M.; Zhou, J.; Lou, X. W.; Xie, Y. Defect-Rich MoS2 Ultrathin Nanosheets with Additional Active Edge Sites for Enhanced Electrocatalytic Hydrogen Evolution. Adv. Mater. 2013, 25 (40), 5807–5813

propostos para introduzir sítios de borda no plano basal, visando aumentar a eficiência de MoS_2 como catalisador. Um dos métodos destacados é a criação de vacâncias de enxofre mediante a volatilização desse elemento em processos realizados a altas temperaturas[96]. Através da combinação de MoS_2 em papel fica evidente que processo de pirólise possui dupla função: (i) gerar defeitos químicos no MoS_2 e tornar o substrato de papel condutor.

A Figura 168 apresenta uma imagem de microscopia ótica, demonstrando a texturização de um cristal de MoS_2 ocasionada pelo processo de pirólise realizado. Curvas de polarização obtidas a partir de papel pirolisado (PP - controle) e papel pirolisado modificado com MoS_2 (PP + MoS_2) antes e depois da realização do processo de pirólise podem ser vistas na Figura 168b. A partir da análise das curvas obtidas é possível perceber que ocorreu grande melhoria na resposta eletrocatalítica dos dispositivos modificados indicada pelos menores sobrepotenciais necessários para promover uma densidade de corrente de 10 mAcm-2. Além disso, para o dispositivo modificado antes da pirólise, onde espera-se a formação de defeitos, foi observado valor de sobrepotencial ainda menor, indicativo de aumento de desempenho. Notadamente, enquanto o dispositivo fabricado a partir de papel pirolisado não alcançou valor de 10 mA cm^{-2} nem mesmo acima de 550 mV, o dispositivo fabricado a partir de papel e MoS_2 modificado depois da pirólise apresentou 430 mV, enquanto o dispositivo modificado antes da pirólise alcançou tal valor em 245 mV, demonstrando clara melhoria de desempenho. Curvas de Tafel ilustradas na Figura 168c demonstram uma melhoria na resposta do eletrocatalisador após o tratamento térmico realizado. Mais especificamente, o dispositivo modificado após a pirólise apresentou um valor de 267 $mVdec^{-1}$ enquanto o dispositivo modificado antes apresentou um valor de 98 mV dec^{-1}. Esse menor valor indica que com uma menor variação de sobrepotencial ocorre um maior aumento de corrente, novamente demonstrando a eficiência do tratamento térmico na ativação do MoS_2.

Figura 168. a) Imagens de microscopia ótica: i) Cristal controle; ii) Cristal Pirolisado. Barra de escala equivale a 50 m. b) Curvas de polarização obtidas em meio a solução 0,5 M de H2SO4 a uma velocidade de varredura de 5 mVs-1. c) Curvas de Tafel obtidas para dispositivos PP + MoS2 Antes e PP + MoS2 Depois



96 Kiriya, D.; Lobaccaro, P.; Nyein, H. Y. Y.; Taheri, P.; Hettick, M.; Shiraki, H.; Sutter-Fella, C. M.; Zhao, P.; Gao, W.; Maboudian, R.; Ager, J. W.; Javey, A. General Thermal Texturization Process of MoS2 for Efficient Electrocatalytic Hydrogen Evolution Reaction. Nano Lett. 2016, 16 (7), 4047–4053

Aplicação de polidopamina no desenvolvimento de dispositivos eletroquímicos flexíveis

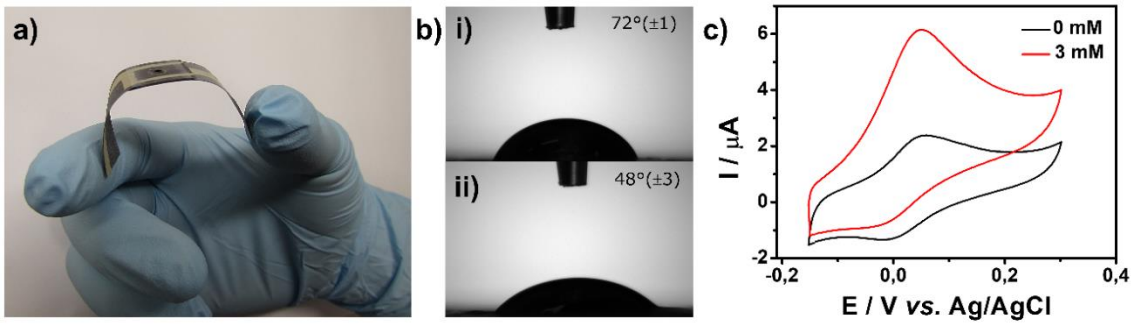
Revestimento químico inspirado em mexilhões, comumente chamado de polidopamina (PDA), foi inicialmente proposto em 2007, visando mimetizar propriedades adesivas de proteínas secretadas por estes animais. A grande vantagem apresentada pela PDA é o fato de poder ser formada em praticamente qualquer tipo de superfície através de um processo simples e de única etapa de imersão ou deposição de solução contendo seu precursor, a dopamina, e agentes oxidantes. Essas características fazem com que a funcionalização com PDA ganhe destaque frente a métodos amplamente utilizados em pesquisa como *self-assembled-monolayers, layer-by-layer assembly* e deposição de Langmuir-Blodgett[97]. PDA formada em diferentes superfícies fornece grupos químicos ricos em oxigênio e nitrogênio, que colaboram para o aumento de molhabilidade e biocompatibilidade dessas superfícies. Além disso, sua formação é acompanhada da introdução de grupos quinona que podem apresentar atividade eletrocatalítica. Dessa forma, filmes de PDA podem ser promissores com relação à fabricação de dispositivos flexíveis e miniaturizados, combinando hidrofilicidade e propriedades eletrocatalíticas em superfícies de carbono.

Embora PDA possua aplicações em áreas como baterias, ciências biomédicas e tratamento de água[98], pouca atenção tem sido dada à sua preparação em superfícies para fabricação de dispositivos eletroquímicos flexíveis. Nesse contexto, PDA poderia ser explorada para trazer novas funcionalidades e expandir o campo de aplicação para tais dispositivos. Neste primeiro trabalho, é apresentada a fabricação de um dispositivo eletroquímico flexível feito à base de papel sulfite e lápis comercial seguido por sua funcionalização com PDA. Inicialmente, eletrodos de trabalho foram preparados a partir do método de transferência direta, denominado de *pencil-drawing* e, em seguida, filmes de PDA foram formados sobre o eletrodo de trabalho utilizando a rota química de polimerização. Uma foto do dispositivo flexível fabricado pode ser vista na Figura 169a. Após o processo de funcionalização, foi observada a introdução de grupos ricos em oxigênio e nitrogênio que ajudam a aumentar a hidrofilicidade da superfície (diminuição do ângulo de contato em 33%) (Figura 169b). Além disso, os nanofilmes de PDA, com espessura em torno de 6 nm, não bloquearam a transferência heterogênea de elétrons. De fato, foi observada uma das maiores constantes heterogêneas de transferência de elétrons para eletrodos baseados em papel, 2,5 x 10-3 cm s^{-1}. Em adição, grupos carbonílicos, fornecem atividade redox ao nanofilme, possibilitando aplicações na área de eletrocatálise. Dessa forma, como prova de conceito, a eletro-oxidação da espécie relevante biologicamente nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) revelou características notáveis como menor potencial de detecção e correntes de pico mais que 30 vezes maior se comparado a dispositivos não funcionalizados. A Figura 169c apresenta voltamogramas obtidos para dispositivos funcionalizados na ausência e presença de 3 mM de NADH, onde é possível verificar um grande aumento na corrente de pico anódica, revelando a atividade eletrocatalítica dos grupos quinona da PDA.

97 Lee, H.; Dellatore, S. M.; Miller, W. M.; Messersmith, P. B. Mussel-Inspired Surface Chemistry for Multifunctional Coatings. Science (80-.). 2007, 318 (5849), 426–430

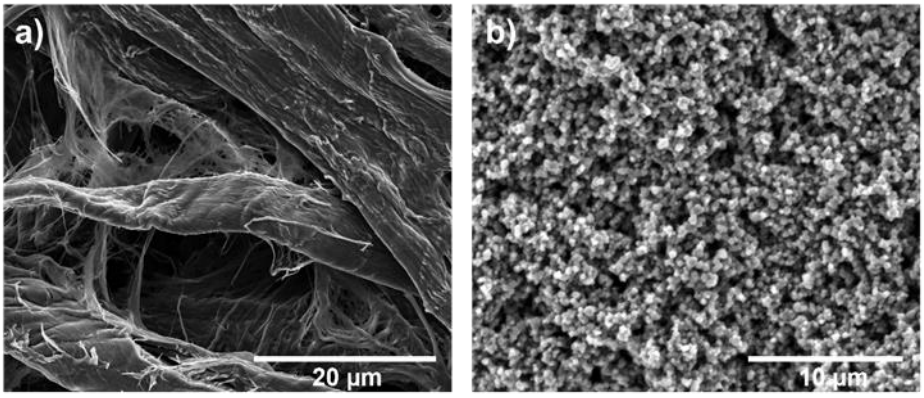
98 Hasimoto, L. H.; Corrêa, C. C.; Costa, C. A. R.; Santhiago, M. Polydopamine Nanofilms for High-Performance Paper-Based Electrochemical Devices. Biopolymers 2021, No. August

Figura 169. a) Dispositivo eletroquímico flexível desenvolvido. b) ângulo de contato i) sem PDA; ii) com PDA; c) Voltamogramas para eletrodos funcionalizados na ausência e presença de 3 mM de NADH



Nesta mesma linha de dispositivos flexíveis à base de papel com PDA, também está sendo estudado a elaboração de dispositivos com papel pirolisado e funcionalizados com PDA. O papel possui uma estrutura fibrosa que possibilita tanto a filtração como o transporte de amostras por capilaridade, Figura 170a e, além disso, ao passar por processos térmicos (pirólise), passa a ser um material condutor, logo o tornando um excelente candidato para detecções eletroquímicas. Contudo, o papel pirolisado, apesar de condutor, apresenta comportamento hidrofóbico. Neste sentido, a incorporação de PDA favorece o retorno da hidrofilicidade, devido aos grupos funcionais polares presentes em sua estrutura molecular. A dopamina (DA) passa pelo processo de oxidação em meio alcalino para a formação de PDA sobre o papel pirolisado. Assim como visto na imagem ilustrada na Figura 170b, os agregados nanoparticulados de PDA decoram as fibras pirolisadas. A deposição de PDA adiciona uma série de grupos funcionais que possibilitará a interação com outras moléculas (compostos orgânicos, biomoléculas). Neste trabalho também está sendo estudada a possibilidade da formação de filmes suspensos, ou seja, um extenso filme suspenso de PDA sobre as fibras do papel pirolisado que poderá trazer o maior controle de porosidade na incorporação de líquidos. Essa alteração na superfície pode favorecer o aumento de sensibilidade devido a penetração do líquido por capilaridade nas regiões mais internas do papel. Dessa forma, o trabalho está em estágio de análise, com a verificação do ganho de área com a PDA, sensibilidade e condutividade, além de possíveis mudanças na rota de formação de PDA para o melhoramento das propriedades citadas.

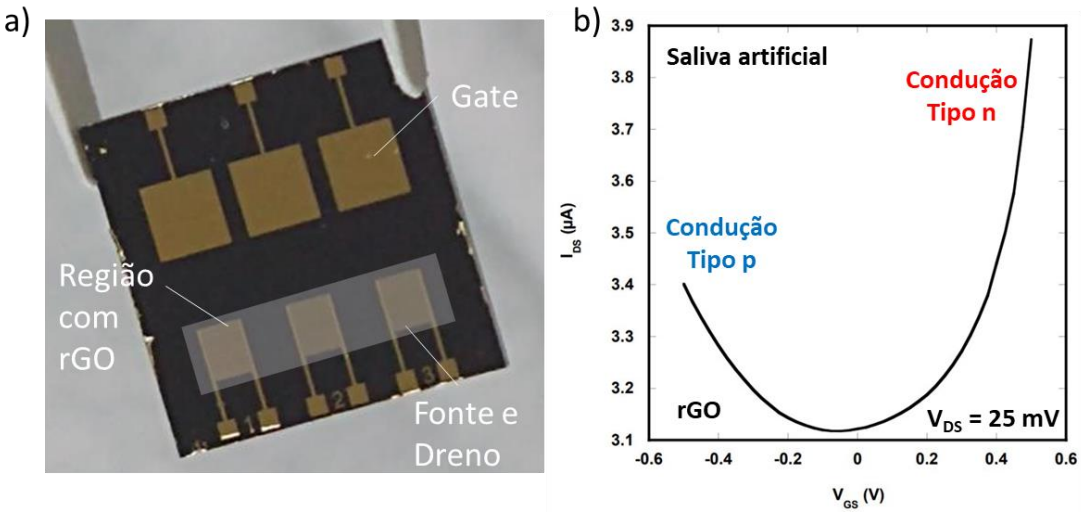
Figura 170. Imagens feitas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). a) Fibras do papel. b) Material nanoparticulado de PDA sobre as fibras de papel pirolisado



Dispositivos elétricos baseados em Materiais 2D para sensores e biossensores

Neste projeto são fabricado dispositivos do tipo transistores eletrolíticos sobre substratos de SiO_2 visando aplicações em sensores químicos e biossensores. Transistores são dispositivos eletrônicos muito versáteis e sua inerente capacidade de amplificar sinais elétricos faz com que possam ser utilizados como um poderoso transdutor em aplicações sensoriais. Nestes dispositivos, utilizamos como material ativo no canal filmes ultrafinos automontados de óxido de grafeno reduzido (rGO). A Figura 171a ilustra um "chip" contendo 3 dispositivos fabricados no LNNano. É possível visualizar os eletrodos de fonte, dreno, e porta coplanar de cada transistor. Na Figura 171b, ilustra-se sua curva característica de operação, denominada de curva de transferência, onde se destaca a condução de corrente elétrica por portadores do tipo p (buracos) e do tipo n (elétrons). Atualmente, temos trabalhado na caracterização da estabilidade elétrica destes dispositivos visando sua aplicação como transdutores em sensores e biossensores. Essas atividades estão em linha com a proposta de pesquisa na modalidade "Jovem Pesquisador" submetida à FAPESP em Junho/2020 e que se encontra em análise. O enfoque do projeto é a funcionalização de materiais 2D com receptores moleculares e biorreceptores como camada ativa em transistores eletrolíticos para o (bio)sensoriamento de espécies química e bioquímicas em solução.

Figura 171. a) Dispositivo contendo 3 estruturas do tipo transistores eletrolíticos onde são indicados os terminais de gate, fonte e dreno, e o local onde é depositado o filme de rGO. b) Curva de transferência (operação) de um transistor eletrolítico de rGO em saliva artificial ilustrando a condução de corrente com um comportamento ambipolar (portadores do tipo p e n)



No que se refere ainda ao desenvolvimento de sensores e biossensores utilizando materiais a base de carbono (ex. grafeno e seus derivados), publicamos neste ano de 2021 um capítulo de livro[99].

Desenvolvimento de Transistores de Filmes Ultrafinos para Sinapse Artificial

Utilizando a mesma arquitetura de transistores e materiais como o próprio rGO e semicondutores orgânicos moleculares, temos conduzidos experimentos acerca da sua resposta neuromórfica, i.e., sua resposta temporal a partir de estímulos elétricos pulsados que imitam a sinapse neural. A Figura 172a ilustra as conexões elétricas de um transistor eletrolítico operando sob estímulo pulsado no terminal de *gate*, e a Figura 172a) Um chip contendo transistores de rGO operando em solução, conectados a instrumentação de caracterização elétrica por meio de uma estação de pontas (probe station). b) Resposta do dispositivo (corrente de fonte-dreno) a pulsos de tensão (V) aplicadosb o perfil do estímulo e a resposta elétrica do dispositivo (corrente no canal). O entendimento da dinâmica de polarização elétrica nestes dispositivos (por íons e elétrons/buracos) permitirá ajustar propriedades de interface e operacionalidade dos transistores visando aplicações sensoriais, como o monitoramento de neurotransmissores e outras pequenas moléculas de interesse biológico.

99 de Barros, Anerise ; Braunger, Maria Luisa ; de Oliveira, Rafael Furlan ; Ferreira, Marystela . Functionalized Advanced Carbon-Based Nanomaterials for Sensing. Reference Module in Biomedical Sciences. -ed.: Elsevier, 2021, v. -, p. 0-0. doi.org/10.1016/B978-0-12-822548-6.00014-5

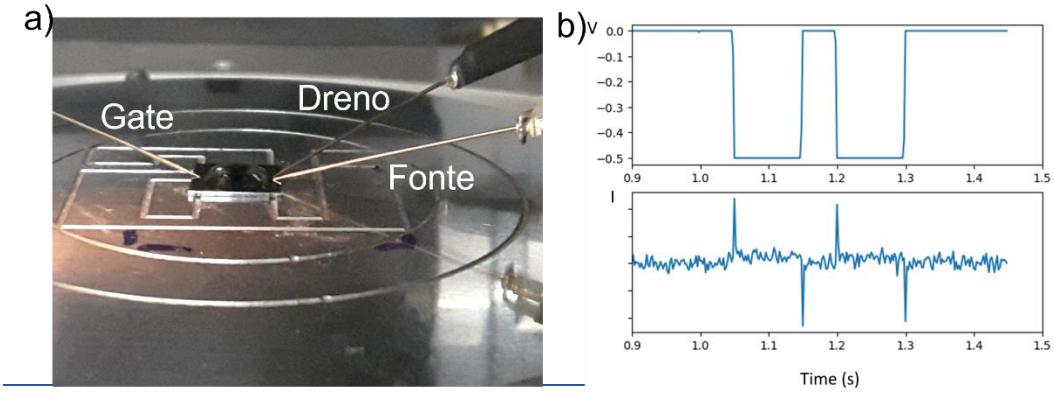


Figura 172 a) Um chip contendo transistores de rGO operando em solução, conectados a instrumentação de caracterização elétrica por meio de uma estação de pontas (probe station). b) Resposta do dispositivo (corrente de fonte-dreno) a pulsos de tensão (V) aplicados

Dopagem de Filmes Metálicos com Conjuntos Moleculares: Análise do Transporte Eletrônico e Magnetoeletrônico

Recentemente o LNNano adquiriu um PPMS (*Physical Parameter Measurement System*), um instrumento no estado da arte para a caracterização elétrica do transporte eletrônico e magnetoeletrônico em baixas temperaturas (até 1,8K) e altos campos magnéticos (até 14T). A aquisição deste equipamento tem permitido estudar neste projeto o efeito de dopagem por *spin* em filmes metálicos diamagnéticos utilizando conjuntos moleculares semicondutores com alto grau de controle de espessura (na faixa de poucos nanômetros, 10 nm). A Figura 173a ilustra o dispositivo em estudo, denominadas de junções sanduíches Au/conjunto molecular/Au, onde tais conjuntos correspondem a camadas termicamente depositadas de ftalocianinas metálicas. Figura 173b ilustra a curva de resistividade em função da temperatura onde observa-se claramente o aparecimento do Efeito Kondo em amostras dopadas com moléculas, a dizer, amostras dopadas com moléculas de ftalocianina de cobre e ftalocianina de cobre fluoradas. Nota-se que a estrutura molecular do dopante e suas propriedades físico-químicas afetam significativamente o ponto de mínimo nestas curvas, quando a resistividade das trilhas de Au passa a aumentar com a diminuição da temperatura. Atualmente estamos buscando entender como estas características governam o Efeito Kondo através de novos experimentos e suporte da teoria e simulações computacionais. O objetivo é desenvolver novos dispositivos quânticos como válvulas de *spin.*

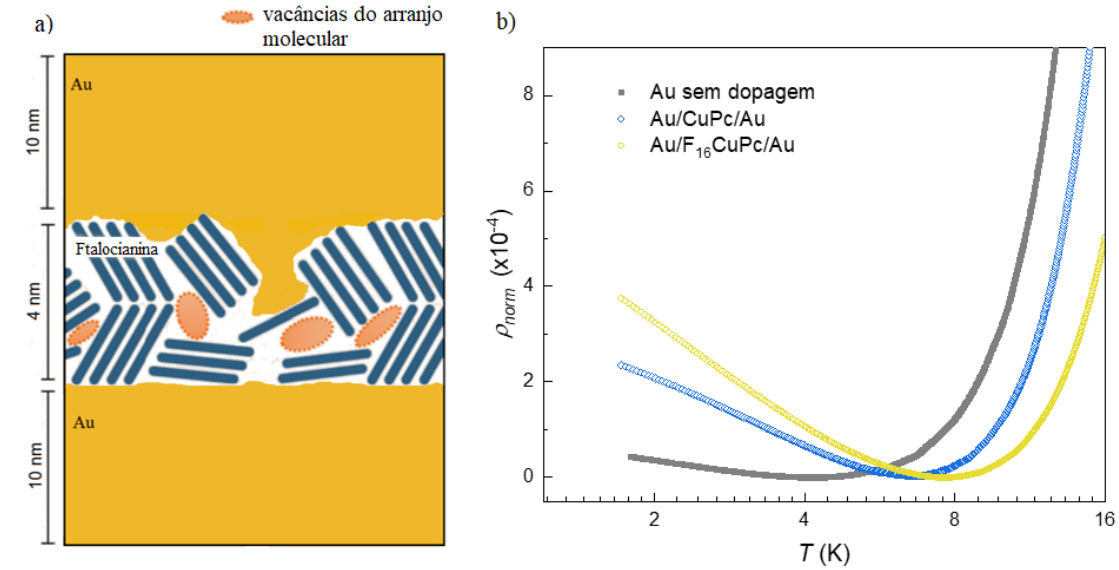


Figura 173 a) Representação esquemática da seção transversal das amostras dopadas, em que a organização molecular do filme de ftalocianina é retratada em azul e as regiões em amarelo representam os filmes de ouro e sua interface com as Pcs após a deposição b) Gráfico da resistividade normalizada em função da temperatura, em que as amostras de Au dopadas com CuPc e com F16CuPc apresentam aumento da resistividade com a diminuição da temperatura, comportamento que indica o surgimento do efeito Kondo induzido pela dopagem com as moléculas orgânicas

Desenvolvimento de Plataformas Tridimensionais como Dispositivos de Biossensoriamento Eletroquímico

A pandemia do novo coronavírus escancarou a necessidade da sociedade e sistemas de saúde por novos biossensores, capazes de monitorar a transmissão da doença e a condição clínica dos infectados. Visando o desenvolvimento de novas soluções tecnológicas para essa finalidade temos desenvolvidos novos dispositivos tridimensionais que atuem como transdutores eletroquímicos para o biossensoriamento de antígenos do vírus SARS-CoV-2. A Figura 174a ilustra um conjunto de 24 dispositivos fabricados sobre substratos de vidro por métodos de microfabricação e litografia óptica, tecnologias dominadas pela indústria e, portanto, compatível com o escalonamento para a produção em massa. Nesses dispositivos, anticorpos específicos por identificar e interagir com uma parte do vírus (antígeno) são imobilizados de maneira orientada sobre a superfície de eletrodos metálicos atuando como biorreceptores. Medidas de espectroscopia de impedância elétrica (Figura 174b) de cada dispositivo individual são usadas na detecção da amostra de interesse. Uma vez consolidada a arquitetura do dispositivo, o método de detecção será posto à prova em amostras de pacientes infectados pelo vírus.

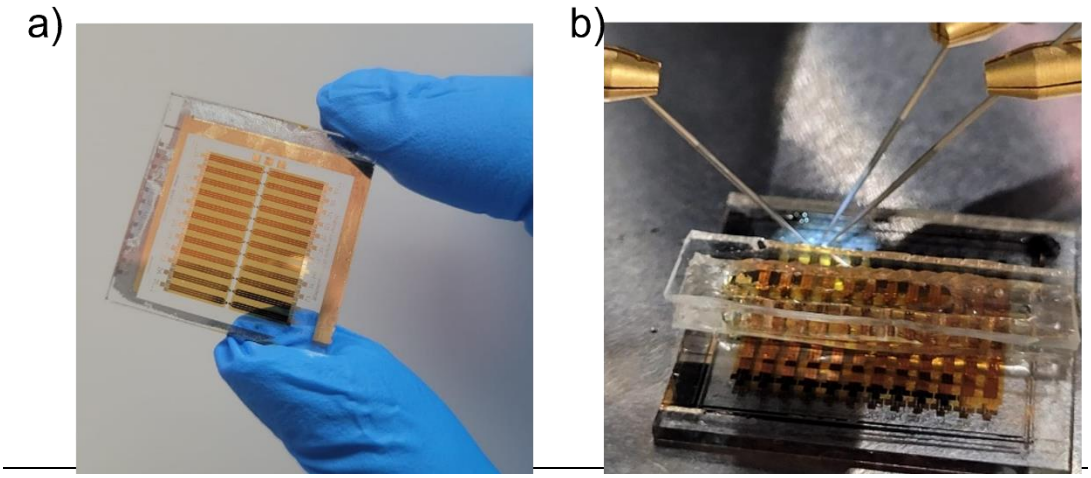


Figura 174 a) Chip contendo x dispositivos microfabricação e pronto para uso. b) Estação de medida utilizada para a caracterização

Crescimento de Filmes Epitaxiais de Arseneno e Caracterização de suas Propriedades Topológicas

Em 2005 foi proposto um modelo teórico no qual os estados de bordas do grafeno apresentariam o efeito chamado spin-Hall quântico (QSH) no qual o acoplamento spin órbita (SOC) induz o alinhamento dos spins em relação a direção do momentum do elétron produzindo uma corrente de spins polarizados sem a necessidade da aplicação de um campo magnético externo. Entretanto, o SOC no grafeno é muito fraco e, portanto, a observação experimental do efeito QSH torna-se muito difícil. Desde então a procura por materiais bidimensionais que sejam capazes de realizar efeitos como o QSH em temperatura ambiente tem sido um crescente campo de investigação devido ao seu profundo impacto na spintrônica e na computação quântica.

Estudos recentes mostram que o arseneno, monocamada de arsênio (As) com estrutura hexagonal quando submetido a tensões em sua rede cristalina pode ser um forte candidato à nova geração de materiais QSH. Essas tensões podem ser induzidas extrinsecamente por meio de células de pressão ou intrinsecamente por meio da epitaxia entre o substrato e o material depositado. Deste modo, o sistema de Epitaxia por Feixe Molecular (MBE) do LNNano (único do país a possuir um sistema difração de elétrons de baixa energia integrado), Figura 175a, vem sendo utilizado para investigar o crescimento de estruturas bidimensionais a partir dos compostos III-V. As amostras produzidas mostram um empilhamento com altura máxima de três camadas atomicamente planas de arseneno, conforme indicado por imagens de microscopia eletrônica de transmissão (Figura 175b). As próximas etapas do projeto incluem estabelecer as condições de crescimento para filmes monocamadas de arseneno e caracterizar as propriedades de transporte eletrônico no material.

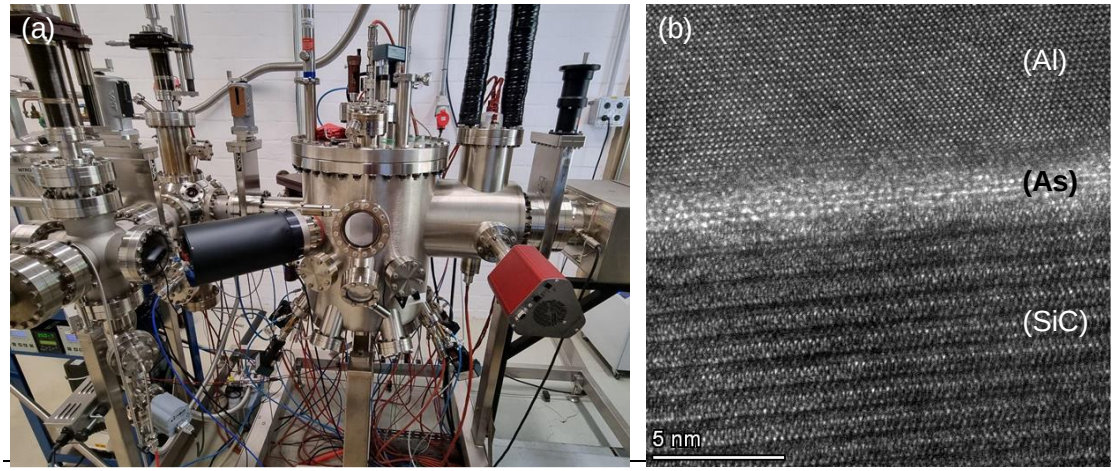


Figura 175 (a) Sistema de Epitaxia por Feixe Molecular (MBE) do LNNano, dedicado ao crescimento de compostos III-V. (b) seção transversal de uma amostra na qual é possível observar entre o substrato de carbeto de silício (SiC) e a camada protetora de alumínio (Al)

Nanotoxicologia e Nanobiotecnologia

Construção de uma plataforma integrada de pesquisa para nanociência ambiental, nanotoxicologia e nanossegurança

O crescimento da nanotecnologia em diferentes setores industriais está cada vez mais evidente, apresentando grande potencial para inovação e geração de novas tecnologias. Assim, é essencial avançarmos nos estudos dos impactos destes novos materiais em nanoescala sobre sistemas biológicos e meio ambiente dentro de uma perspectiva ampla de proteção da saúde humana, animal e ambiental associado com conceitos importantes de economia circular, inovação responsável e sustentabilidade. Nesse sentido, avançamos no entendimento do efeito combinado (co-exposição) de nanomateriais com poluentes ambientais (pesticidas e metais pesados) sobre organismos bioindicadores de qualidade de águas e ecotoxicidade aquática.

Palaemon pandalirformis é uma espécie de camarão amplamente distribuída na região costeira brasileira e com importante papel econômico. Além disso, este organismo é considerado um indicador de poluição ambiental em estuários; entretanto, suas respostas fisiológicas aos poluentes ambientais, incluindo pesticidas e nanomateriais, não são bem conhecidas, especialmente os efeitos da co-exposição. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos ecotoxicológicos da co-exposição entre nanotubos de carbono oxidados e o pesticida Carbofuran no metabolismo de rotina de P. pandalirformis. Nossos resultados mostraram que os camarões expostos aos nanotubos oxidados (10 µg L-1) aumentaram a taxa metabólica (consumo O_2) em 292% e a excreção de amônia em 275%; aqueles expostos ao Carbofuran (10 µg L-1) aumentaram sua taxa metabólica em 162% e a excreção de amônia em 425%; e com a co-exposição (nanotubos + pesticida) também houve aumento da taxa metabólica em 317% e excreção de amônia em 433% quando comparado ao controle Figura 176). Esses resultados fornecem informações importantes para um melhor entendimento das respostas fisiológicas de camarões após a exposição combinada a nanomateriais e pesticidas em ambientes aquáticos. Este trabalho foi realizado em parceria com o

Instituto de Pesca de São Paulo em Cananéia e Instituto de Química da UNICAMP, e foi publicado no periódico Chemosphere (Elsevier)[100].

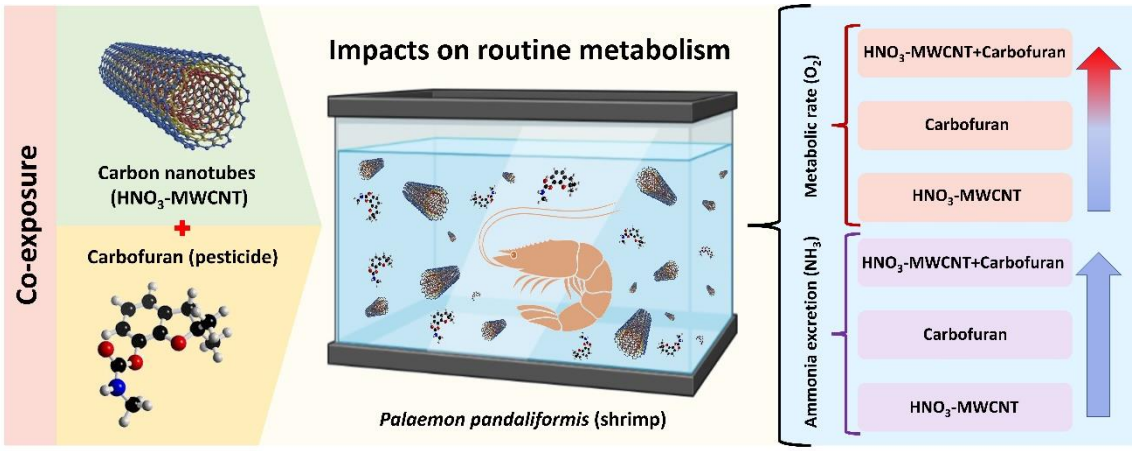


Figura 176 Estudo do efeito combinado de nanotubos de carbono oxidados e pesticida Carbofuran sobre o metabolismo (consumo de oxigênio e excreção de amônia) de Palaemon pandaliformis (camarão)

Em outro estudo, investigamos a toxicidade combinada de partículas fluorescentes de sílica (SiNPs) com cádmio (Cd2+) após co-exposiçao ao microcrustáceo aquático Ceriodaphnia dubia. O Cd2+ e matéria orgânica natural (NOM) foram escolhidos como poluente modelo (metal pesado) e compostos orgânicos ambientais onipresentes, respectivamente. A toxicidade aguda (imobilidade) foi utilizada para comparar os efeitos das misturas na presença e ausência de NOM a 10 mg L-1. Ensaios de alimentação de C. dubia com Pseudokirchneriella subcapitata (algas verdes) e biodistribuição das partículas SiNP (microscopia de fluorescência) em C. dubia também foram empregados para monitorar essas nanobioeco-interações e efeitos da co-exposição. A presença de NOM aumentou drasticamente a estabilidade coloidal das SiNP em água reconstituída. De acordo com os valores de imobilidade mediana aguda (24 h-IC50 e 48 h-IC50), nenhum efeito significativo foi observado na toxicidade do Cd2+ puro tanto com NOM (10 mg L-1) quanto com concentrações variadas de SiNPs (0,1, 1.0 e 10 mg L-1). Da mesma forma, ocorreu para SiNPs (1.0 mg L-1) juntamente com Cd2+ e NOM (10 mg L-1). Foi observada dependência de SiNPs na dose para bioacumulação, aumentando-a proporcionalmente. Apesar da ausência de efeitos interativos observados nos resultados de imobilidade (toxicidade aguda), supomos que as alterações no comportamento alimentar e o aumento da bioacumulação de SiNPs indicam risco em potencial para C. dubia da exposição combinada a SiNPs, Cd2 + e NOM. A co-exposição a SiNP, NOM e Cd2+ resultou em uma resposta de alimentação ao estresse estimulante na concentração mais baixa de Cd2+ e declínio na dose mais alta deste metal, devido a um comprometimento funcional do trato digestivo (Figura 177). Nossos resultados até o momento indicam que os efeitos dessa mistura (SiNP + Cd2+ + NOM) na presença de algas pode afetar processos vitais e causar impactos de longo prazo na sobrevivência de C. dubia. Este trabalho foi desenvolvido em colaboração com o Grupo de Nanociência Ambiental da University of Birmingham - UoB (Reino Unido), e com apoio do acordo de cooperação FAPESP-UoB.

100 Alves, K.V.B., Martinez, D.S.T., Alves, O.L., Barbieri, E. Co-exposure of carbon nanotubes with carbofuran pesticide affects metabolic rate in Palaemon pandaliformis (shrimp). Chemosphere. 2021 Sep 24; 288(Pt 1): 132359. doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.132359.

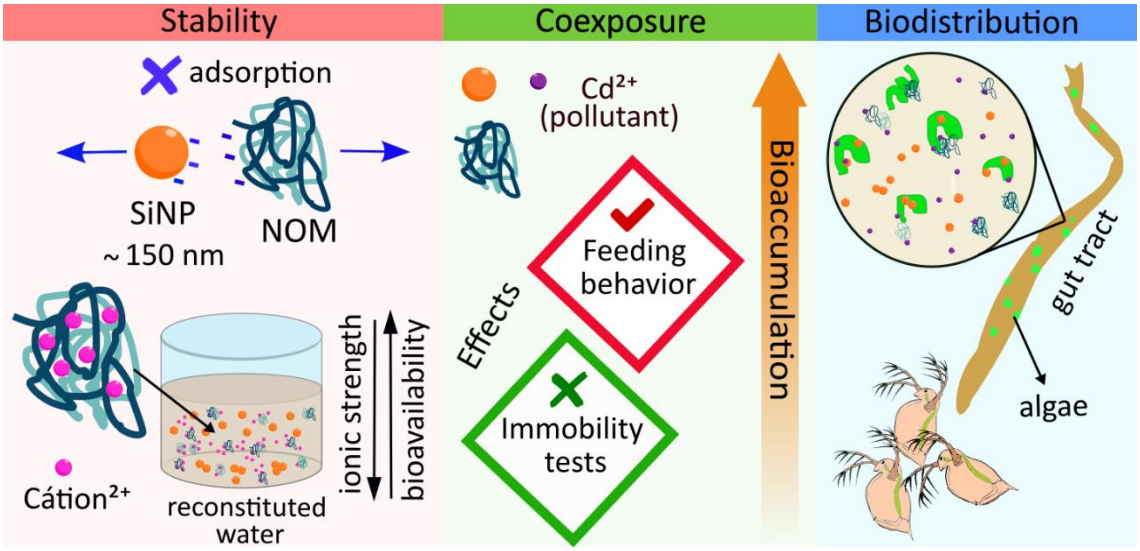


Figura 177 Estudo do efeito combinado de nanopartículas de sílica fluorescentes com o metal pesado Cádmio sobre o microcrustáceo aquático C. dubia na presença e ausência de matéria orgânica natural (NOM) e alimentação com algas

Sensores eletroquímicos para diagnósticos

O projeto "Sensores para diagnósticos" objetiva o desenvolvimento de sensores elétricos e eletroquímicos, microfluídicos ou em batelada, com compatibilidade de produção em larga-escala para diagnósticos *point-of-care* (POC) em meios biológicos complexos. Desde o início de 2021, esforços vêm sendo direcionados para diagnóstico da COVID-19 a partir da detecção de anticorpos. Esses projetos na divisão de Nanotoxicologia e Nanobiotecnologia (NBT-LNNano) se encontram vinculados ao Programa Estratégico Emergencial de Prevenção e Combate a Surtos, Endemias, Epidemias e Pandemias da CAPES (projeto temático CAPES-EPIDEMIAS).

Especificamente, eletrodos consistindo em papel grafítico poroso, condutor e hidrofóbico preparado por meio da pirólise de papel celulósico vêm sendo usados em combinação com a adição do polissorbato 20 (Tween® 20, T20) a fim de produzir uma nanocamada hidrofílica (< 2 nm). Tal nanocamada pode ser gerada de modo in-situ (simultaneamente com a adição da amostra) e evita a biopassivação além de permitir a penetração gradual da amostra através dos poros do papel. Esses dois fenômenos cooperativos, como ilustra a

, elevam a corrente e a sensibilidade, que aumentam ainda mais com o tempo de exposição (até 4h). Logo, esse método representa uma quebra de paradigmas para testes eletroquímicos em fluidos biológicos complexos, imediatas ou que envolvam monitoramento a longo prazo, por garantir análises quantitativas ultrassensíveis sem a necessidade de modificação química covalente da superfície do eletrodo de trabalho com camadas anti-biopassivação como aborda a literatura. Além de afetarem o custo, a complexidade e a capacidade de escalonamento do método, essas camadas levam a uma deterioração da sensibilidade e da reprodutibilidade das medidas.

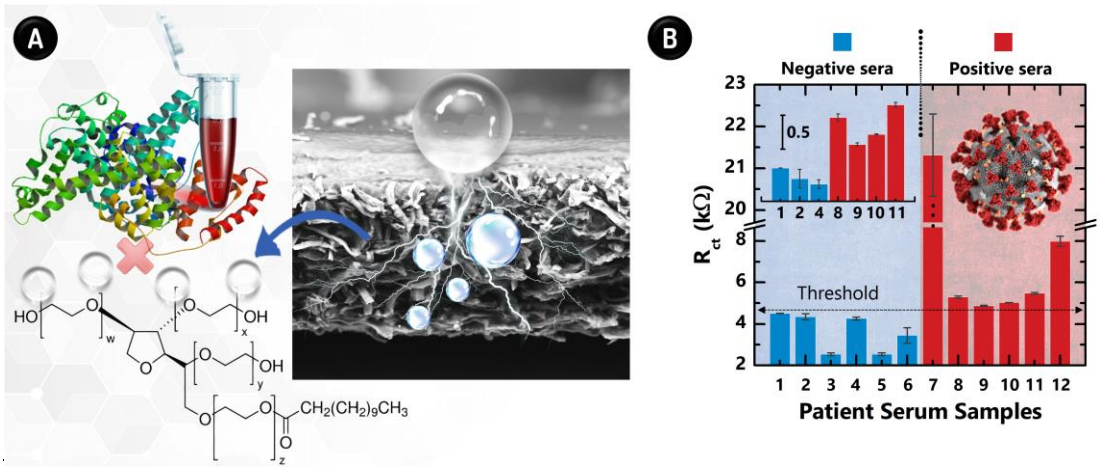


Figura 178 . Sensor baseado em papel pirolisado e nanocamada de T20 para análises eletroquímicas diretas sensíveis em meios biológicos complexos. (A) Efeitos cooperativos da nanocamada (< 2 nm), quais sejam, evitar a contaminação do eletrodo por proteínas e permitir a penetração da amostra nos poros do eletrodo 3D (60 µm de espessura). Esses fenômenos garantem respostas eletroquímicas altas em plasma humano e demais amostras biológicas complexas. (B) Dados de resistência à transferência de carga (Rct) obtidos pelo método usando nanopartículas de ouro, a proteína Spike como receptor e a técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica a amostras de soro de indivíduos saudáveis e de pacientes da COVID-19. Esse gráfico demonstra o potencial do método para triagem da COVID-19

Em 2021, foram realizadas etapas de caracterização as quais abrangeram técnicas espectroscópicas e microscópicas (de transmissão e varreduras eletrônica e por sonda), dentre outras, para análises da topografia do eletrodo, da sua composição química, do fenômeno de capilaridade das amostras através dos poros do papel e da espessura e propriedade anti-biopassivação da nanocamada de T20. Além de ensaios eletroquímicos na presença de BSA e plasma humano não diluído, o método foi aplicado com sucesso para o diagnóstico da COVID-19 a partir de amostras de soro. Análises a dezenas de amostras demonstraram que o método desenvolvido é capaz de classificar com sucesso amostras de indivíduos saudáveis e com a COVID-19. Um artigo contemplando todos esses resultados encontra-se em fase de revisão em um periódico. Ademais, um pedido de patente[101] foi depositado junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

A proteína Spike, responsável por mediar a entrada do vírus SARS-CoV-2 nas células humanas, tem sido largamente utilizada em biossensores impedimétricos para reconhecimento de anticorpos da COVID-19. Porém, o seu uso implica em limitações para produção em massa de testes rápidos e o seu uso de rotina considerando-se etapas como armazenamento e transporte. Essas limitações incluem uma síntese complexa, de baixo rendimento e de alto custo e as possibilidades de desnaturação, que resultam em uma baixa estabilidade. Como solução, um projeto da divisão NBT-LNNano vem substituindo a proteína Spike por um peptídeo como receptor. Selecionado via bioinformática a partir de estudos sobre a composição de subprodutos da subunidade S1 da Spike após interação com anticorpos produzidos em peixes, esse peptídeo se encontra presente na subunidade de ligação (S1) da proteína Spike como mostra a Figura 179.

101 LIMA, RENATO S; Santhiago, Murilo. todo para análises eletroquímicas sensíveis em fluidos biológicos complexos. 2021, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020210161078, título: "todo para análises eletroquímicas sensíveis em fluidos biológicos complexos", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 14/08/2021

Esse peptídeo possui vantagens competitivas em relação à Spike no que concerne à construção de testes rápidos mais acessíveis e aplicáveis no mundo real, são elas: estabilidades de armazenamento e estocagem (não há o problema de desnaturação como ocorre com as proteínas) e maior simplicidade e menor custo de síntese. De fato, esse peptídeo pode ser sintetizado de forma simples e barata e apresenta alta estabilidade térmica. Adicionalmente, o peptídeo tem demonstrado capacidade de interação seletiva com anticorpos produzidos em amostras de soro de pacientes com o SARS-CoV-2 conforme experimentos de caracterização de superfície, ensaios eletroquímicos e estudos teóricos de docagem molecular. Esse sistema, notoriamente, também gerou testes com maior sensitividade em relação às análises com a Spike como receptor. Esse resultado é crucial uma vez que diminui os riscos de falsos negativos.

O sistema com o peptídeo consiste em um biossensor usando eletrodo de carbono vítreo e nanopartículas de ouro (AuNPs, 34 nm) modificadas via adsorção eletrostática direta com o peptídeo para reconhecimento do Ab do vírus SARS-CoV-2 em amostras de soro de pacientes com COVID-19 através de medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica. Essa rotina adotada envolve uma arquitetura modular, permitindo fácil adaptação para detecção de demais analitos. Mediante tratamento dos dados por um método de *machine learning* (ML), o método possibilitou a triagem de amostras de soro de indivíduos sadios não vacinados e vacinados e de pacientes da COVID-19. Objetivamos, assim, a construção de uma plataforma portátil capaz de diagnosticar a COVID-19 e com viabilidade de translação do laboratório para análises clínicas de rotina. Um artigo contemplando esses resultados encontra-se em fase final de digitação e será submetido para publicação.

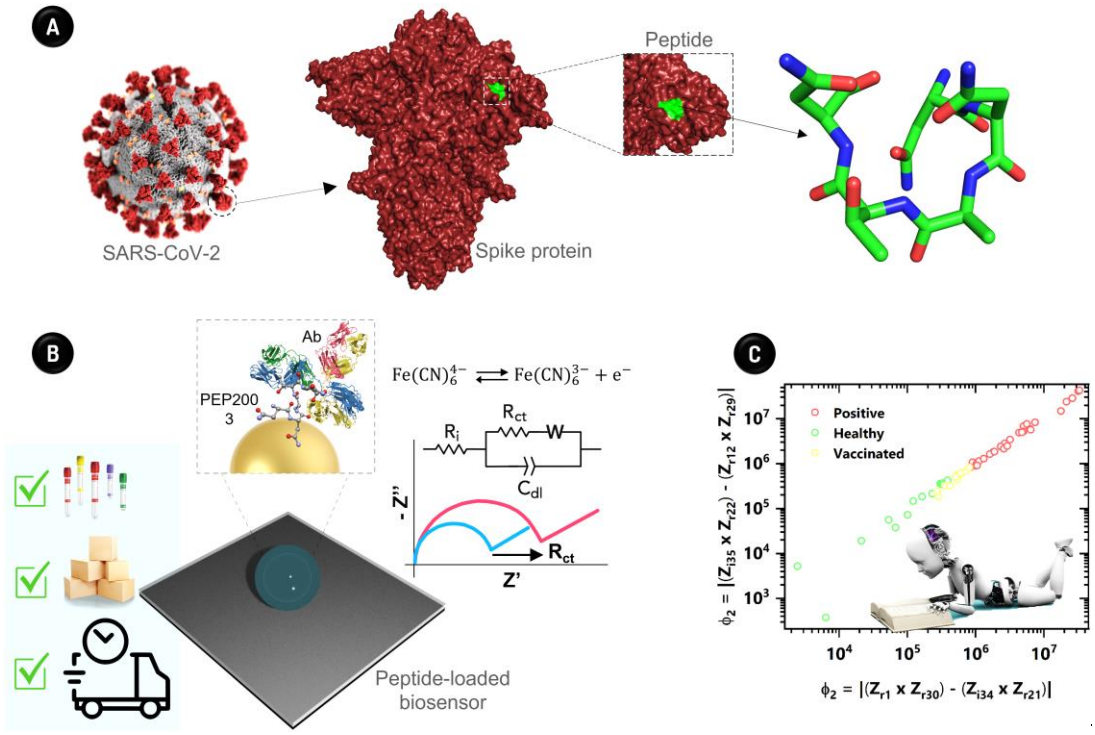


Figura 179 Biossensor contendo peptídeo como receptor para detecção de Ab da COVID-19. (A) Modelos estruturais da proteína Spike e do peptídeo. (B) Representações esquemáticas das vantagens de uso do peptídeo, do biossensor e do diagrama de Nyquist obtido na presença de um complexo de ferro como sonda redox. (C) Triagem de amostras de soro de indivíduos sadios não vacinados e vacinados e de pacientes da COVID-19. Esses resultados foram obtidos após processamento de dados do diagrama de Nyquist por ML

Sensores para nanomateriais

O projeto “Sensores para nanomateriais” da divisão NBT-LNNano visa o uso de sensores como soluções de baixo custo e rápidas para o monitoramento de nanomateriais sintéticos e coloidais, quando biotransformações como a formação de protein corona e agregação passam a exercer um papel fundamental sobre as propriedades físico-químicas e as interações dos nanomateriais. Um outro alvo de investigação é a determinação do grau de toxicidade desses nanomateriais, o qual depende fortemente dessas biotransformações.

Um sensor microfluídico eletroquímico baseado em PDMS e eletrodos interdigitados de ouro vem sendo usado para o monitoramento in-situ e em tempo real de nanopartículas de sílica (SiO_2NPs). Ao longo da sua síntese (24 h), a partir do uso de ML, o sensor é capaz de fornecer multideterminações do diâmetro hidrodinâmico e da concentração das SiO_2NPs a partir de medidas únicas de impedância como exibe a Figura 180. Um artigo com esses resultados encontra-se em fase final de digitação para submissão em um periódico.

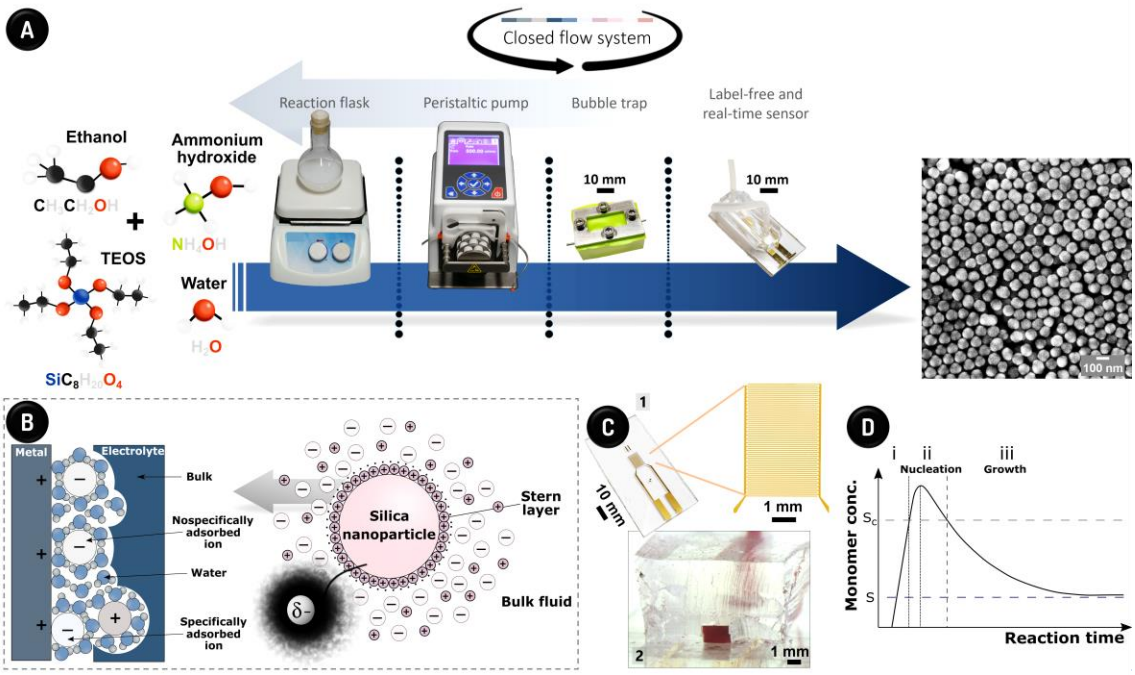


Figura 180 Sensor microfluídico baseado em capacitores de dupla-camada elétrica para o monitoramento em tempo real de propriedades como concentração e diâmetro hidrodinâmico de nanopartículas de sílica ao longo da sua síntese. (A) Meio reacional, plataforma e nanopartículas. (B) Carregamento da interface do eletrodo. (C) Eletrodos e canal de PDMS. (D) Etapas da síntese

Sensores eletroquímicos para o meio ambiente

De maneira similar ao projeto anterior, o projeto “Sensores para o meio ambiente” da divisão NBT-LNNano visa o desenvolvimento de sensores eletroquímicos, microfluídicos, em batelada ou vestíveis, que permitam análises in-situ de baixo custo, rápidas e sensíveis voltadas ao monitoramento ambiental usando uma instrumentação portátil e dispositivos apresentando viabilidade de produção em larga escala.

Usando o eletrodo de papel pirolisado e isopropanol para permeação das amostras pelos poros do papel, determinações eletroquímicas ultrassensíveis foram obtidas para determinação de traços de fosfato em água mediante a sua complexação com sal de molibdato. O complexo formado (≈250 nm), denominado ânion de Keggin, é eletroativo, sofrendo reduções em +0,38 V (vs. Ag/AgCl) e +0,21 V que correspondem às reações de transferência de carga de Mo^{+6} para Mo^{+4} e Mo^{+4} para Mo^{+2}, respectivamente. A análise de fosfato é relevante, pois essa espécie gera a eutrofização em meios aquáticos quando em concentrações excessivas. A sensibilidade ($-1{,}9 \times 10^{-6}$ mA cm^{-2} ppb^{-1}) e o limite de detecção (1,1 ppb) foram melhorados, respectivamente, por fatores de 33 e 99 sobre os dados obtidos sem a adição de isopropanol, listando entre os melhores valores quando comparados com os resultados relatados na literatura para fosfato. Uma imagem ilustrativa desse trabalho segue apresentada na Figura 181. Um artigo com esses resultados foi publicado no periódico ACS Sensors[102].

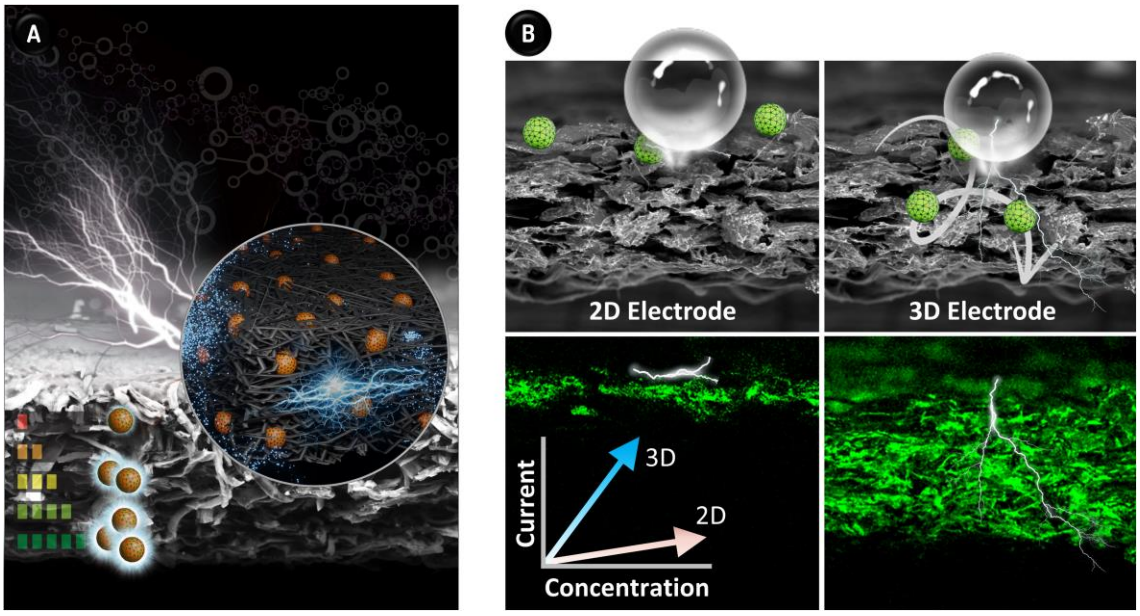


Figura 181 Sensor baseado em papel pirolisado e isopropanol para determinações eletroquímicas ultrassensíveis sem a necessidade de modificação química do eletrodo. (A) Seção transversal do eletrodo e ilustração do complexo formado ao longo dessa região do papel. (B) Eletrodos 2D e 3D (com permeação da amostra pelos poros do papel) sem e com adição prévia de isopropanol

Em um outro projeto, desenvolvemos um método eletroquímico para análise rápida, simples e ultrassensível de compostos químicos voláteis. Como ilustra a Figura 182, usamos malhas com micro-furos concomitantemente como membrana para a extração por difusão em fase gasosa do analito da amostra e eletrodo para a determinação eletroquímica desse alvo com o eletrólito receptor em repouso. Usamos dois tipos de malhas com benefícios complementares, (i) uma malha de Ni fabricada por métodos robustos, escalonáveis e bem estabelecidos para a fabricação de geometrias específicas e (ii) uma malha

102 SHIMIZU, FLAVIO M. ; PASQUALETI, ANIELLI M. ; NICOLICHE, CAROLINE Y. N. ; GOBBI, ANGELO L. ; Santhiago, Murilo ; LIMA, RENATO S. . Alcohol-Triggered Capillarity through Porous Pyrolyzed Paper-Based Electrodes Enables Ultrasensitive Electrochemical Detection of Phosphate. ACS Sensors, v. 6, p. 3125-3132, 2021.

de aço inoxidável, que é disponível comercialmente a baixo custo. Esse método produziu uma espécie de difusão reversa do analito dissolvido no eletrólito (receptor), ou seja, do eletrodo para o seio da solução, o que permitiu análises altamente sensíveis. Utilizando malhas de Ni revestidas com nanopartículas de $Ni(OH)_2$, esse sistema foi aplicado para determinação de etanol em amostras reais relacionadas à produção do biocombustível etanol. Uma equação simples obtida por ML foi capaz de fornecer análises acuradas.

Testes preliminares também demonstraram o revestimento bem-sucedido das malhas com filme de ouro como um material de eletrodo alternativo e o monitoramento de HCl utilizando malhas de aço revestidos com ouro. Essas estratégias ampliam a aplicabilidade da plataforma que pode fornecer soluções úteis de detecção de espécies voláteis para o mundo real. Um artigo sobre esse trabalho foi publicado no periódico ACS Appl. Mater. Interfaces[103]. Ademais, um pedido de patente foi depositado junto ao INPI[104].

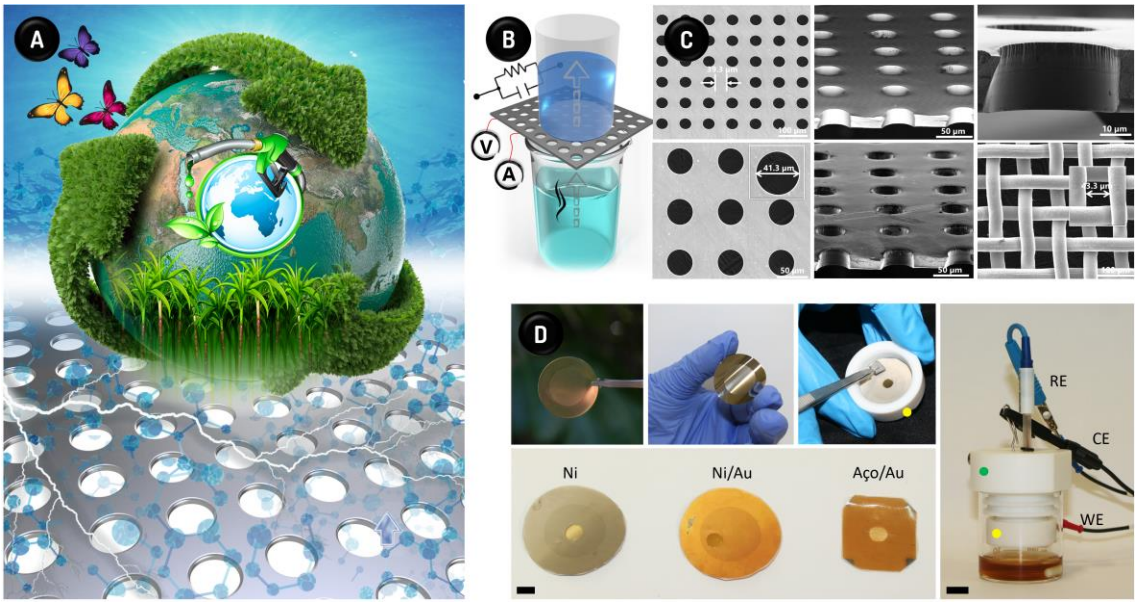


Figura 182 Novo método para análise de espécies voláteis. (A) Ilustração genérica do trabalho. (B) Representação esquemática da plataforma. (C) Imagens de microscopia eletrônica das malhas metálicas de Ni e aço. (D) Fotos dessas malhas, as quais foram usadas como membrana para a extração por difusão em fase gasosa do analito da amostra doadora e eletrodo para sua determinação eletroquímica. RE, CE e WE são os eletrodos de referência, auxiliar e de trabalho, respectivamente. As barras de escala correspondem a 5 (à esquerda) e 10 mm (à direita)

A indústria de óleo e gás envolve a geração de uma grande quantidade de água produzida (PW), que incorpora produtos químicos ecologicamente nocivos, como compostos de petróleo que também

103 GIORDANO, GABRIELA F. ; FREITAS, VITORIA M. S. ; SCHLEDER, GABRIEL R. ; Santhiago, Murilo ; GOBBI, ANGELO L. ; LIMA, RENATO S. . Bifunctional Metal Meshes Acting as a Semipermeable Membrane and Electrode for Sensitive Electrochemical Determination of Volatile Compounds. ACS Applied Materials & Interfaces, v. 13, p. 35914-35923, 2021.

104 LIMA, RENATO S; GIORDANO, GABRIELA F ; FREITAS, V. M. S. ; GOBBI, ANGELO L. . Método e sistema de detecção eletroquímica de compostos voláteis compreendendo eletrodo-membrana semipermeável. 2021, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020210163950, título: "Método e sistema de detecção eletroquímica de compostos voláteis compreendendo eletrodo-membrana semipermeável" , Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 18/08/2021

implicam em efeitos deletérios à sua taxa de recuperação e segurança de trabalho. Como limitação, o monitoramento de óleo em amostras de PW (OiW) em poços *on-shore* e *off-shore* é desafiador uma vez que os métodos atualmente disponíveis geralmente envolvem o uso de equipamentos de bancada e rotinas experimentais laboriosas. Usando o método baseado em microemulsificação (MEC), que foi introduzido por nosso grupo em 2014[105], desenvolvemos uma estratégia econômica, de fácil uso, rápida, escalonável e aplicável em campo para a determinação de OiW. De acordo com a Figura 183, a análise é baseada na medida do volume mínimo de anfifílico necessário para estabilizar termodinamicamente dispersões turvas (emulsões ou sistemas de Winsor), formando microemulsões transparentes. Aplicando a amostra como fases óleo-água, Tween-80 como fase anfifílica e um turbidímetro portátil, os ensaios são realizados em 5 min com um limite de detecção em torno de 6 ppm, o qual é inferior à média máxima mensal de OiW que é limitada oficialmente no Brasil (29 ppm).

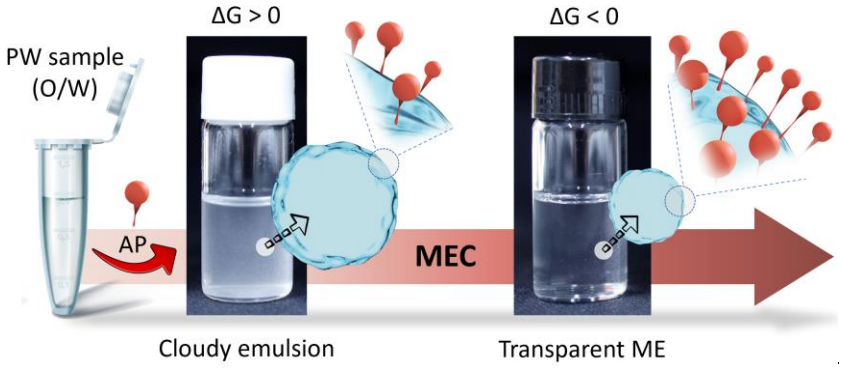


Figura 183 Princípio e operação do MEC para determinação de óleo em uma amostra de PW. Esse método se assemelha a uma titulação, embora o ponto de viragem não seja consequência de reações químicas, mas da estabilização termodinâmica de dispersões. Uma outra diferença é que a mudança abrupta de cor como acontece em titulações é substituída, nesse caso, por uma variação de turbidez

Além de apresentar elevada robustez frente a mudanças de salinidade, vale ressaltar que o método possibilitou a determinação do OiW em amostras reais com acurácias entre 95,7% e 105,6%. Nossos resultados são um passo relevante para a quantificação de OiW em campo. A indústria de petróleo e gás pode se beneficiar desse método para traduzir soluções úteis para o mundo real, minimizando, logo, possíveis efeitos adversos ecológicos e operacionais associados a OiW. Um artigo com esses resultados foi publicado no periódico Fuel[106].

Em um outro projeto da divisão NBT-LNNano, sensores eletroquímicos vestíveis em folhas em combinação com o uso de ML vêm sendo desenvolvidos para o monitoramento *in-situ*, em tempo real e a longo prazo de parâmetros fisiológicos de plantas de soja. Sensores vestíveis impedimétricos são uma estratégia promissora para determinar a perda de água (LW) das folhas uma vez que podem possibilitar a

105 Renato S. Lima.; Shiroma, Leandro Yoshio ; TEIXEIRA, ÁLVARO VIANNA NOVAES DE CARVALHO ; TOLEDO, JOSÉ ROBERTO DE ; DO COUTO, BRUNO CHARLES ; CARVALHO, ROGERIO MESQUITA DE; Carrilho, Emanuel ; Kubota, Lauro T. ; GOBBI, A. L. . Microemulsification: a novel approach for analytical determinations. Analytical Chemistry (Washington), v. 86, p. 9082-9090, 2014.

106 DE OLIVEIRA, RICARDO A.G. ; CARVALHO, ROGERIO M. ; GOBBI, ANGELO L. ; LIMA, RENATO S. . Microemulsification-based method enables field-deployable quantification of oil in produced water. FUEL, v. 308, p. 121960, 2022.

quantificação *in-situ* e não destrutiva da água celular a partir de uma única medida. Uma vez que LW é um marcador crucial da saúde das plantas, o seu monitoramento pode fornecer informações essenciais em áreas como agricultura de precisão, estudos de toxicidade e desenvolvimento de insumos agrícolas. Os desafios ante a esse monitoramento são a adesão na folha, a compatibilidade, a viabilidade de escalonamento e a reprodutibilidade dos eletrodos, especialmente quando submetidos a monitoramentos de longo prazo. Neste projeto, desenvolvemos um conjunto de inovações em sensoriamento (medidas de bioimpedância) e soluções tecnológicas e de processamento de dados objetivando superar esses obstáculos.

Eletrodos adequados para produção em massa consistindo em filmes *stand-alone* de Ni obtidos por métodos de microfabricação bem estabelecidos e papel pirolisado ecologicamente amigável permitiram a determinação reprodutível de LW de folhas de soja com sensibilidades ótimas de 27,0 (Ni) e 17,5 mΩ %–1 (papel). Além disso, os eletrodos de Ni apresentaram alta adesão na folha e compatibilidade de longo prazo. Suas respostas de impedância permaneceram inalteradas sob a ação do vento em velocidades de até 2,0 ms–1, enquanto experimentos de fluorescência de nanossonda de raios-X fornecidas pelo Sirius (linha Carnaúba) nos permitiram confirmar a compatibilidade do Ni através do monitorando dos micronutrientes presentes no interior da folha em uma área na região de fixação do eletrodo externo. Ambos os eletrodos foram transferidos diretamente sobre as folhas utilizando um adesivo comum como mostra a Figura 184.

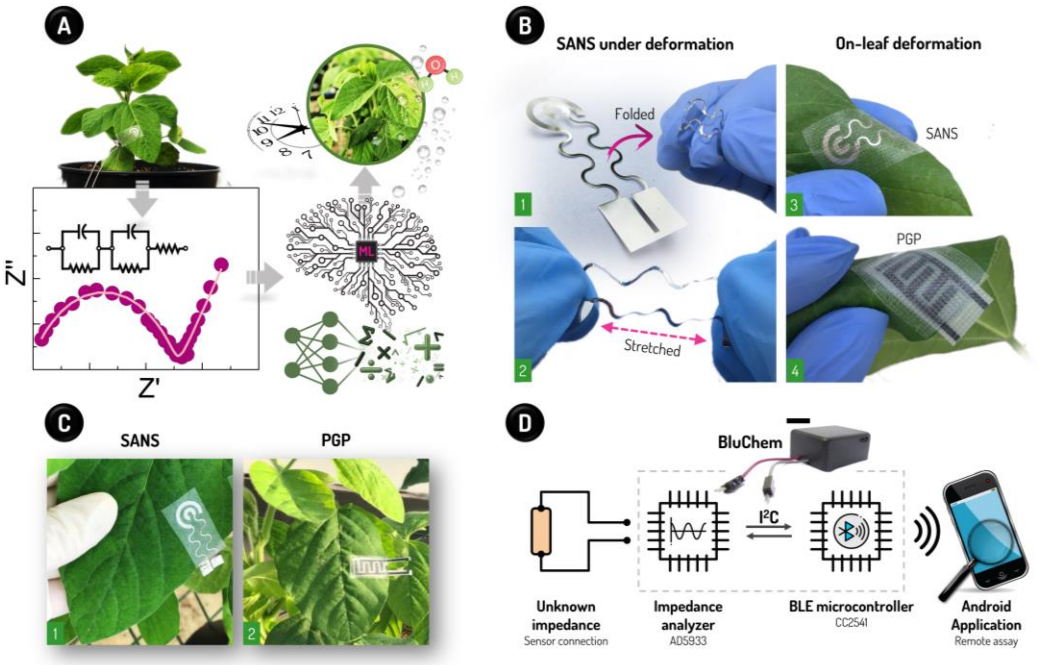


Figura 184 Sensores vestíveis para o monitoramento de folhas de soja. (A) Ilustração genérica do trabalho. (B) Eletrodos de Ni (SANS) e papel pirolisado (PGP) sob estados de deformação conforme indicados. (C) Sensores fixados sobre folhas de soja com o auxílio de um adesivo comum. Após a fixação, os pads dos eletrodos foram cortados para permitir o contato elétrico dos eletrodos com o equipamento (potenciostato) para as medidas de impedância. (D) Diagrama de blocos indicando componentes do potenciostato portátil (BluChem) conectado à internet das coisas (IoT). A inserção mostra uma foto desse potenciostato. A barra de escala expressa 20 mm

Usamos um potenciostato portátil e de baixa demanda de energia elétrica com conexão sem fio a um smartphone para determinar de maneira remota ao longo de 24 h o LW de plantas colocadas no interior de uma câmara com controles de temperatura, iluminação e umidade. Notoriamente, um modelo de ML foi capaz de converter os dados do sensor usando eletrodos de Ni em uma equação matemática simples capaz de gerar determinações dos valores de LW em duas temperaturas (30 e 20 °C) com erros de raízes médias quadráticas baixos (0,1% a 0,3%). Esses dados sugerem uma ampla aplicabilidade da plataforma ao permitir a determinação direta do grau de hidratação de folhas em temperaturas variáveis. Nosso método é promissor para o desenvolvimento de tecnologias capazes de fornecer análises em tempo real e remotas da saúde de plantas, com implicações em áreas como agricultura de precisão e nanotoxicologia. Um artigo contemplando esses resultados encontra-se em fase de revisão em um periódico. Essa submissão está vinculada a um convite que o pesquisador da Divisão de Nanotoxicologia e Nanobiotecnologia recebeu da revista para publicação de artigo em um volume especial dedicado a trabalhos de jovens pesquisadores (ACS Applied Materials & Interfaces's Forum "Early Career Forum").

4.3. Apoio à geração de inovação

O LNNano é um laboratório referência nacional em nanociência e em sua aplicação para geração de tecnologias voltadas ao desenvolvimento sustentável. Em 2021, o Laboratório estabeleceu uma parceria estratégica com grandes empresas do setor de papel e celulose com o objetivo de validar materiais nanoestruturados de origem renovável que pode ser amplamente incorporado em outras matrizes, de modo a melhorar suas propriedades físico-químicas. Os resultados desse projeto têm potencial de gerar impacto positivo significativo para o setor, uma vez que habilitarão o uso seguro da tecnologia.

Paralelamente aos projetos e parcerias com empresas realizados no ano, que serão detalhados abaixo, foram depositados um número recorde de pedidos de proteção de propriedade intelectual junto ao INPI (Instituto Nacional de Propriedade Industrial), resultantes das atividades de pesquisa e desenvolvimento do LNNano. Adicionalmente, houve o depósito de um pedido definitivo via Tratado de Cooperação de Patentes (do inglês *Patent Cooperation Treaty* - PCT).
Detalhando as proteções de propriedade intelectual de 2021, começamos pelo desenvolvimento interno em conjunto com o LNBio, que gerou a tecnologia intitulada “Biossensor sem marcação baseado em estrutura de imidazolato zeolítico, processo de fabricação do mesmo e processo de detecção de interações”, depositada no INPI sob o número de depósito BR 10 2021 002128 4

O pedido intitulado “Processo e sistema de detecção de padrão molecular de amostra biofluídica” é resultante de uma pesquisa interna que utilizou inteligência artificial e um sensor eletroquímico multidimensional não seletivo para detecção e quantificação de biomarcadores, e foi depositado junto ao INPI com número BR 10 2021 005098 5.

As pesquisas internas na área sensoriamento produziram outras duas tecnologias: a tecnologia intitulada “Método de detecção eletroquímica em meios fluídicos, eletrodo e kit para análises eletroquímicas”, que permite a análise de amostras biológicas complexas utilizando eletrodo de papel, e depositada no INPI sob o número BR 10 2021 016107 8; a tecnologia de detecção eletroquímica de gases inorgânicos e compostos orgânicos voláteis, intitulada “Método e sistema de detecção eletroquímica de compostos orgânicos voláteis e gases inorgânicos compreendendo eletrodo-membrana semipermeável e processo de fabricação do mesmo”, e depositada no INPI sob o número BR 10 2021 016395 0.

A tecnologia intitulada “Nanopapel de celulose modificada, sistema tinta-nanopapel de celulose modificada, dispositivos baseados nos mesmos e seus processos de fabricação”, também desenvolvida

internamente no LNNano, destaca o uso de nanocelulose para a produção de dispositivos elétricos e eletrônicos flexíveis, e foi protegida no INPI sob o número BR 10 2021 008072 8. Ainda na área de eletrônica, a tecnologia protegida "Células eletroquímicas baseada em nanomembranas e processo de fabricação das mesmas" contempla uma célula eletroquímica de nanomembranas autoenrolada com microambientes de difusão, e foi depositada no INPI sob o número BR 10 2021 011740 0. Na área de descontaminação, foi protegida a tecnologia "Espuma porosa para retenção de compostos orgânicos e inorgânicos, processo de produção da mesma e seus usos", com deposito no INPI sob número BR 10 2021 021329 9. Essa espuma apresenta alta capacidade de adsorção de compostos orgânicos (como corantes e detergentes) e compostos inorgânicos de metais pesados e é produzida com componentes renováveis.

Utilizando materiais renováveis, foi desenvolvido um "Adesivo a base de látex, nanocelulose cationizada e lignina não-funcionalizada, processo de produção do mesmo e seus usos", depositado no INPI sob o número BR 13 2021 021330 1. Por fim, em parceria com a empresa Robert Bosch, foram depositados dois pedidos de patente relacionados ao desenvolvimento de componente automotivo que visa o aumento da performance da combustão. Nos próximos parágrafos, serão descritos os projetos realizados em colaboração com empresas no ano de 2021.

Biossensor nanoestruturado para determinação da glicemia por método transdérmico não-invasivo

Este projeto está sendo desenvolvido em parceria com a startup Se7e Digital, dentro do âmbito do SibratecNano – Rede de Nanodispositivos e Nanosensores e foi iniciado no primeiro semestre de 2020. A parceria tem como objetivo desenvolver uma solução nacional e de baixo custo para a quantificação de glicose e determinação da glicemia sem a necessidade de perfurar a pele, como ocorre nos exames convencionais de coleta de sangue ou utilizando-se o dispositivo dextro. Neste sentido, a equipe do LNNano vem trabalhando no desenvolvimento de um sensor vestível, capaz de realizar esta leitura a partir do fluido intersticial da pele. Em 2021, as atividades foram concentradas no desenvolvimento de eletrônica portátil, por meio da engenharia do *front end* (interface do usuário) e do firmware que controla cada uma das funções do dispositivo, como os sinais para a promoção da coleta de fluido intersticial da pele, detecção de glicose, comunicação Bluetooth e NFC com dispositivo móvel, e gerenciamento de memória e bateria da aplicação.

Dispositivos de Corte e Erosão com Revestimento Nanoestruturado (Plenus Coating)

Com o objetivo de desenvolver um método de aplicação de revestimento de instrumentos cirúrgicos, uma demanda importante da área saúde, o LNNano em colaboração com a NChemi, uma startup do setor de nanomateriais para a proteção mecânica de instrumentos odontológicos e médicos, iniciou este projeto, que vem desenvolvendo uma técnica e um equipamento automatizado para a deposição de uma suspensão de nanopartículas por spray, buscando-se a customização do processo e a qualidade do revestimento produzido. Em 2021, foram preparadas e caracterizadas diversas amostras-modelo constituídas de aço polido, utilizando-se um aerógrafo manual para verificação da potencialidade da técnica para a deposição do filme de nanopartículas. O equipamento automatizado para deposição dos filmes tem sido desenvolvido em etapas ao longo deste ano, culminando na construção do primeiro protótipo. Atualmente, o sistema de movimentação do módulo spray do equipamento, nos eixos X, Y e Z, está em desenvolvimento, bem como a câmara de deposição de filmes com sistema de aquecimento integrado.

Desenvolvimento de coating para redução do efeito de "Light-struck" em embalagens de vidro

Neste ano, o LNNano iniciou uma colaboração com a AMBEV com o objetivo de desenvolver camadas protetivas para embalagens. Até o presente momento, foi possível obter uma camada transparente e com a menor coloração possível, e eficiente para bloquear a entrada de luz do sol e evitar o seu contato com líquidos presentes no interior das embalagens de vidro. Além de uma metodologia para produção em larga escala dessas camadas protetivas, o processo de aplicação dessa tecnologia foi desenvolvido na primeira etapa do projeto. O próximo passo será estudar aderência, resistência química (processos de lavagem) e iniciar os testes de aplicação no produto fornecido pela empresa.

Desenvolvimento de nova metodologia para avaliação da toxicidade e segurança de microfibrilas de celulose

Como parte dos esforços das duas grandes empresas do setor de papel e celulose, a Klabin S.A. e a Suzano S.A, com apoio da Associação Brasileira Técnica de Papel e Celulose (ABTCP), estabeleceram cooperação com o CNPEM com cofinanciamento Embrapii para a validação da segurança no uso de microfibilas de celulose, cujos resultados representarão um grande avanço na regulamentação e comercialização de nanocelulose no país. O projeto foi firmado no primeiro semestre de 2021 e, até o momento, a equipe do LNNano já realizou experimentos para caracterização dos materiais selecionados conforme previsto no cronograma.

Desenvolvimento de métodos de preparo de amostra e sensores na área de petróleo e gás considerando a utilização e concepção de plataformas microfluídicas

Projeto realizado pelo CNPEM/LNNano em parceria com a Petrobras, está em andamento desde 2019 e tem como objetivo utilizar plataformas microfluídicas para a identificação de insumos químicos utilizados pela indústria do petróleo. Na primeira etapa do projeto, foram avaliados dispositivos microfluídicos baseados no sistema de língua eletrônica, e concluiu-se que, apesar de eles permitirem a discriminação de faixas estreitas de concentração de diferentes insumos, as medidas não possuem boa reprodutibilidade. Observou-se, também, que esses dispositivos não seriam capazes de determinar os grupos químicos do princípio ativo dos insumos, uma vez que eles usam métodos não seletivos. Portanto, o escopo do projeto foi alterado para o desenvolvimento de um método eletroquímico seletivo, utilizando eletrodos de carbono baseados em papel pirolisado. Ensaios já realizados mostraram que o método possui alta sensibilidade, e possibilitaram a obtenção de limites de detecção da ordem de parte por bilhão do teor de fósforo. Importantes informações já foram extraídas, tais como a identificação da presença de grupos fosfatos com concentrações da ordem de centenas a milhares de partes por milhão. Como próximos passos, será avaliada a resposta de padrões fosfonatos para comparação com os resultados atuais, possibilitando melhor entendimento dos mecanismos de detecção.

Além do uso de insumos, a indústria de petróleo e gás gera grande quantidade de água produzida (PW – *produced water*), que é composta da água de formação e água injetada junto com produtos químicos no reservatório para aumentar a taxa de recuperação de petróleo. Como existem normas que limitam os valores de óleo em água produzida (OiW – *oil in water*), a determinação de OiW em PW em poços *onshore* e offshore é fundamental devido aos danos ao meio ambiente e aos animais marinhos. Para isso, utiliza-se o método baseado em microemulsificação (MEC), que foi desenvolvido pelo grupo de microfluídica do LNNano em 2014. Trata-se de uma estratégia econômica,

rápida, escalonável de fácil uso, que também fornece a determinação em campo de OiW. O MEC pode ser aplicado tanto para quantificação a olho nu, quanto com o auxílio de um turbidímetro portátil e os ensaios são realizados em menos de 5 minutos com um limite de detecção de aproximadamente 6 ppm. Além de apresentar elevada robustez frente às mudanças de salinidade, o método permite a determinação de OiW em amostras reais com acurácias entre 95,7% e 105,6%. Os resultados obtidos até o momento representam um avanço importante para a quantificação em campo de OiW, e para a indústria de petróleo e gás, que pode se beneficiar deste método para desenvolver soluções que facilitem a tomada de decisão e minimizem o impacto ambiental.

Destilação de volumes reduzidos de petróleo

Este projeto foi realizado pelo CNPEM/LNNano em parceria com a Petrobras de 2018 e concluído em 2021, tendo o objetivo desenvolver um destilador miniaturizado para a destilação de pequenos volumes de petróleo bruto. A destilação é um processo crítico para a caracterização do óleo bruto, permitindo identificar e quantificar as frações de petróleo por suas faixas de temperatura de ebulição, através da curva de pontos de ebulição verdadeiros (PEV). Na indústria, a curva PEV é elaborada seguindo a norma ASTM D 2892, que necessita de 1 a 30 litros de óleo. Contudo, há casos em que a quantidade amostrada é reduzida, como na prospecção de novos poços, o que dificulta a caracterização por destilação. Neste projeto, foram concebidos dois sistemas capazes de realizar a destilação de 2mL de petróleo bruto. O primeiro foi construído em vidro, com coluna de fracionamento com recheio de corda de aço-inox, acoplado a técnica de *machine learning*, e apresentou resultados de exatidão entre 96% e 103% para a quantificação dos derivados nafta, querosene e diesel presentes nas amostras de óleo. Contudo, a fragilidade do vidro e as características do processo produtivo dificultam a produção em larga escala e a precisão inter-dispositivos desse sistema.

O segundo sistema foi concebido inteiramente em aço-inox, através de usinagem mecânica, que tem a vantagem de ter os componentes construídos em peças independentes e rosqueáveis entre si, o que facilitou a montagem, limpeza e troca. Com este dispositivo, observou-se a redução do tempo de operação e foi possível calcular as concentrações dos derivados. Houve boa correlação com o método da ASTM D 2892 e exatidão de 94% a 108%. Por fim, foram feitos estudos para a incorporação de uma coluna de pratos perfurados ao sistema de aço-inox, com malhas hidrofóbicas de níquel obtidas por fotolitografia e eletrodeposição. Observou-se uma melhor separação dos derivados do petróleo em comparação com os outros recheios estudados. Como vantagens, essas colunas envolvem uma fabricação escalonável e robusta, além de permitirem a fácil modulação da eficiência de separação mediante alterações simples como no número de malhas e/ou nas dimensões dos micro furos. Esses resultados demonstraram que as plataformas desenvolvidas são promissoras para avaliação de petróleo quando os volumes de amostra são reduzidos.

Desenvolvimento de sistemas microfluídicos para a extração de espécies presentes no petróleo e separação de fases em emulsões

Este projeto foi iniciado em 2018, pelo CNPEM/LNNano em parceria com a Petrobras, e continuará em andamento em 2022. O objetivo deste projeto é desenvolver sistemas de extração microfluídicos de alta eficiência, ultrarrápidos, com baixo consumo de amostras e com fabricação reprodutível e escalonável. Esses sistemas visam à extração e à análise da água de formação, encontrada em forma de emulsão

água/óleo no petróleo, e presente em toda cadeia extrativa e produtiva. Essa água apresenta características inorgânicas importantes para indústria petrolífera, pois sua composição salina pode produzir incrustações em várias etapas do processo, impactando a rentabilidade. Portanto, métodos de extração e análise são fundamentais para a tomada rápida de decisão. Ao longo do projeto, vêm sendo exploradas duas vertentes na confecção dos dispositivos microfuídicos: a primeira baseou-se no método de polimerização e remoção de scaffold (PSR - *polymerization and scaffold removal*) utilizando-se uma resina epóxi de bisfenol (BPA); a segunda envolveu o uso de impressora 3D com a técnica de estereolitografia (SLA), utilizando-se uma resina polimérica a base de poli metacrilato de metila (PMMA). Neste último caso, novos formatos estão sendo estudados, buscando-se obter um dispositivo com a máxima eficiência de extração possível. Até o momento, desenvolveu-se um dispositivo que possibilitou extrações ultrarrápidas com eficiência próxima a 82 % em relação ao valor obtido pelo método de referência, que é o misturador mecânico.

Adicionalmente, este projeto também se dedica à exploração do uso de sensores multidimensionais para a análise dos íons metálicos presentes nas amostras de água, obtidas após o processo de extração descrito acima. Estes sistemas são compostos de sondas de sensoriamento não seletivas, que interagem diferencialmente com uma mesma amostra, e que produzem padrões de resposta únicos para cada uma delas (impressões digitais). Já foi possível desenvolver um sensor multidimensional eletroquímico com uma única sonda comum e com detecção capacitiva universal em chips microfluídicos, também conhecido como língua eletrônica. Os íons estudados inicialmente foram Ca2+, Ba2+ e Cl- em diferentes níveis de concentração. Os dados obtidos foram tratados por técnicas de *machine learning* (ML) para avaliar o potencial efetivo da plataforma para fins de classificação e multideterminação dos íons. Os resultados obtidos até o presente momento juntamente com as técnicas de *machine learning* e revelaram a capacidade de classificar e determinar a concentração dos íons estudados em misturas preparadas em laboratório, com acurácias próximas a 100 % para as amostras de validação e teste.

Avaliação de estabilidade e desempenho de produtos químicos por sistemas micro/mesofluídicos

Este projeto foi contratado no segundo semestre de 2021, realizado em colaboração com a Petrobras, tendo como objetivo o desenvolvimento de dispositivos micro/mesofluídicos capazes de simular diversas condições de escoamento em dutos de petróleo, visando estudos *in-situ* relativos à formação e inibição de incrustações, e à avaliação da eficiência de diferentes desemulsificantes na quebra de emulsões do tipo água/óleo. O escopo do projeto também inclui o estudo do efeito de alguns parâmetros como o tipo de material e a porosidade do canal sobre a cinética de incrustação.

4.4. **Treinamento, Educação e Extensão**

Seminários e Palestras

O LNNano ofereceu, ao longo de 2021, seminários abertos à comunidade do CNPEM, em formato híbrido (online e presencial), que são apresentados pelos seus próprios pesquisadores, como também por convidados externos com grande relevância científica:

1. Seminário "Supercondutividade e DFT: aspectos básicos e perspectivas novas", no dia 02 de fevereiro de 2021 (79 participantes). Palestrante: Klaus Capelle.

2. Seminário "Defect Engineering of Solution-processed 2D Materials for Improved Electronic Devices", no dia 09 de fevereiro de 2021 (59 participantes). Palestrante: Rafael Furlan de Oliveira.

3. Seminário "A Física e suas relações com o Patrimônio Cultural", no dia 18 de fevereiro de 2021 (53 participantes). Palestrante: Márcia de Almeida Rizzutto.

4. Seminário "Conformational analysis of tannic acid: environment effects in electronic and reactivity properties", no dia 23 de fevereiro de 2021 (46 participantes). Palestrante: Romana Petry.

5. Seminário “ePDF - Um modelo de projeto em equipe”, no dia 02 de março de 2021 (65 participantes). Palestrante: Edson Leite.

6. Seminário “Simulações Atomísticas de Nanoestruturas e Colaborações Teoria/Experimento”, no dia 30 de março de 2021 (72 participantes). Palestrante: Rodrigo Capaz.

7. Seminário “Design de Ligas de Alta Entropia para Armazenagem de Hidrogênio”, no dia 20 de Julho de 2021 (42 participantes). Palestrante: Guilherme Zepon.

8. Seminário “Investigação experimental em filmes epitaxiais de isolantes topológicos tridimensional (Bi2Te3) e cristalino (Pb1-xSnxTe)”, no dia 08 de julho de 2021 (52 participantes). Palestrante: Eduardo Abramof.

9. Seminário “A tecnologia da microeletrônica e o desenvolvimento de nanodispositivos”, no dia 21 de Outubro de 2021 (69 participantes). Palestrante: Roberto R. Panepucci.

10. Seminário "Doping and Stability: open issues in halide perovskites", no dia 28 de outubro de 2021 (52 participantes). Palestrante: Gustavo M. Dalpian.

11. Seminário “Application of FTIR to (photo)(electro)chemistry. Everybody has, just a few take advantage”, no dia 18 de novembro 2021 (58 participantes). Palestrante: Dr. Pablo Sebastián Fernández.

12. Seminário: “SUPERCAPACITORS”, no dia 25 de novembro de 2021 (82 participantes). Palestrante: Hudson Zanin.

13. Seminário “Desafios para a conversão de CO2 e CH4 em sistemas Fotoeletrocatalíticos”, no dia 02 de dezembro de 2021. Palestrante: Cauê Ribeiro de Oliveira.

14. Seminário "Usando a óptica não linear para estudar moléculas em superfícies", no dia 09 de dezembro de 2021. Palestrante: Paulo B. Miranda.

Alguns seminários/palestras externos que os pesquisadores do LNNano participaram em 2021 são destacados a seguir:

1. Palestra “Flexible cellulose-based electric and electrochemical devices”, para alunos de Graduação da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), no dia 23 de março de 2021.

2. Colóquios e Seminários do PPG-NMA - UFABC. Título da palestra: “A versatilidade de aplicações da (nano)celulose: uma plataforma para produção de novos compósitos”, no dia 01 de julho de 2021.

3. Fronteiras da microscopia eletrônica aplicada à Biologia Estrutural (Palestra). Curso de Microscopia Eletrônica Aplicada à Sistemas Biológicos: Princípios e Preparação de Amostras, na Universidade Federal do Ceará (On-Line), no dia 09 de agosto de 2021.

4. Palestra “Comportamento coloidal de suspensões complexas de nanocelulose”, no Webinar da ABTCP - Associação Brasileira Técnica de Celulose e Papel, no dia 14 de setembro de 2021.

5. Palestra “Aplicações de criomicroscopia eletrônica, de materiais moles a proteínas" (online). No âmbito dos Seminários do INCT-FCx, oferecido pelo IF-USP, no dia 15 de outubro de 2021.

6. Open core-facilities at LNNano/CNPEM towards BRICS cooperation on Materials Science and Nanotechnology (seminário). 3º Encontro do Grupo de Trabalho dos BRICS/MCTI, 26 a 28 de outubro de 2021, Manaus, AM.

7. Colóquio da IBM “Descoberta de novos materiais para um futuro sustentável”. Título da palestra: “Nanoestruturas da natureza usadas como plataformas para a produção de novos materiais sustentáveis”, no dia 25 de novembro de 2021.

8. Nano & Environmental Heatlh: from single- to mixture toxicity assessment of graphene-based materials (seminário). Universidad Nacional de Trujillo (UNITRU), III Simposio Internacional de Nanociencia y Nanotecnología, 12 de novembro de 2021, Trujillo, Peru.

Ações de Capacitação

O LNNano atuou intensamente na capacitação de profissionais e pesquisadores de diversas Instituições Científicas, Tecnológicas e de Inovação. Destacamos algumas inciativas, listadas a seguir:

1. O LNNano realizou em 2021 a primeira edição do “**Curso teórico e demonstrativo de técnicas avançadas de caracterização de nanomateriais”**, entre maio e agosto. O evento, totalmente online, contou com especialistas e pesquisadores do Laboratório para ministrar aulas teóricas, demonstrações experimentais e tratamento de dados, das seguintes técnicas de caracterização de nanomateriais:

- Criomicroscopia Eletrônica (cryo-TEM)
- Espectroscopia de Fotoelétrons excitados por raios X (XPS)
- Microscopia de Força Atômica (AFM)
- Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)
- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)
- Microtomografia de raios X

2. O LNNano pariticipou do comitê organizador da Escola Sirius para Professores de Ensino Médio (ESPEM), realizado de maneira remota nesse ano no período de 26-30 de julho de 2021. O evento contou com aulas expositivas e visitais virtuais realizadas por pesquisadores do CNPEM. Houve apresentações de pesquisas conduzidas no laboratório, assim como visita virtual ao vivo pelos laboratórios de micro/nanofabricação e microscopia mostrando alguns de nossos equipamentos e infraestruturas avançadas.

3. V Curso de Introdução – Nanotecnologia & Nanotoxicologia. “Fundamentos de Nanotoxicologia: Ambiente, Saúde e Segurança” (palestra), 19 e 20 de agosto de 2021, Campinas, SP.

4. “Nanomateriais, Nanotoxicologia e Nanossegurança” (mini-curso). Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), IV SIMDAQBI, 23 de agosto de 2021, Curitiba, PR.

5. LNNano Instalações Abertas (palestra) e Nanotoxicologia (mini-curso). Universidade Federal do Piauí (UFPI), V Workshop PPG-Ciência de Materiais, 29 de setembro de 2021, Teresina, PI.

6. Curso Teórico e Demonstrativo de Técnicas Avançadas de Caracterização de Nanomateriais, oferecido pelo CNPEM/UFABC, nos dias 19, 21, 26 e 28 de julho de 2021.

7. Curso “*Principles of Cryo-EM*”. Oferecido pela Asociación de Universidades Grupo Montevideo. 2ª Escuela Virtual AUGM de Tecnicas Biofisicas Aplicadas al Estudio Funcional y Estructural de Proteinas (On-Line), no dia 14 de setembro de 2021.

8. Curso de “CryoEM aplicado a macromoléculas: aspectos teóricos gerais e aplicações”. Oferecido pela USP/UnB/Sociedade Brasileira de Cristalografia, nos dias 24 de setembro e 22 de outubro de 2021

9. Apresentação oral: Pós-graduação em Biotecnociência da UFABC. Título da apresentação: “Biossensores eletroquímicos: conceito, configurações e aplicações no diagnóstico da COVID-19”. Data: 19 de julho 2021.

10. Apresentação oral: V Curso de Introdução – Nanotecnologia & Nanotoxicologia do LNNano-CNPEM. Título da apresentação: “Nanomateriais em biossensores para diagnóstico da Covid-19”. Data: 20 de agosto de 2021.

11. Apresentação oral: terceira edição da Escola Sirius para Professores do Ensino Médio (ESPEM 2021) do CNPEM. Título da apresentação: “Sensores Eletroquímicos: conceito, montagem e aplicações no diagnóstico da COVID-19”. Data: 26 a 30 de julho de 2021.

Os Pesquisadores do LNNano também lecionaram disciplinas em Programas de Pós-Graduação, como no Instituto de Química (IQ) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) e no Programa de Pós-Graduação em Nanociências e Materiais Avançados (PPG-NMA) da Universidade Federal do ABC (UFABC).

Eventos Científicos

Destacamos algumas participações do LNNano em eventos de relevância científica e tecnológica:

1. *Electronic and Optical Properties of Twisted Multilayer Graphene Near the Magic Angle*, 2DMAT2021, Paris, França, 23-26 agosto 2021 (participação remota devido à pandemia de COVID-19).

2. *Latin America - Europe Symposium on Research Infrastructures, organizado pela Instruct-ERIC*, em que foi apresentada a palestra “Models for Integration”, no dia 16 de junho 2021;

3. Encontro da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais (SBPMat), ocorrido no dia 31 de agosto de 2021;

4. Participação em iniciativa na área de inovação com foco em conhecimentos na área de nanocelulose e nanotecnologia, em empresa produtora e exportadora de papéis para embalagens do Brasil, em abril de 2021.

Orientação e Supervisão

Os pesquisadores do LNNano atuam amplamente na orientação de estudantes de iniciação científica e desenvolvimento industrial, de dissertações de mestrado e teses de doutorado. Além das orientações, nossos pesquisadores participam frequentemente de bancas de qualificação e defesa de mestrado e doutorado.

4.5. Infraestrutura, Operação e Melhorias Técnicas

Microscopia de Força Atômica

Atualização dos Lasers do AFM-IR

O laboratório dispõe de um AFM acoplado com nano-espectroscopia e imageamento de infravermelho, utilizando a técnica de termo expansão (AFM-IR). O modelo é o nanoIR2-s (Figura 185), do fabricante Anasys (atualmente BRUKER), que foi adquirido pelo projeto SisNano em setembro de 2016.

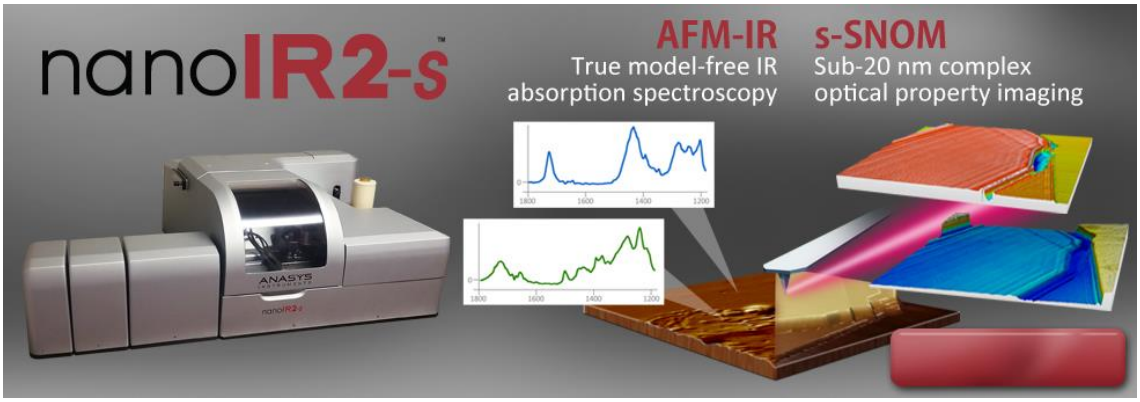


Figura 185 AFM-IR e SNOM modelo NanoIR2-s – ANASYS / BRUKER

O sistema está disponibilizado para usuários externos deste julho de 2017. Mais de 60 propostas de pesquisas foram realizadas, com vários artigos publicados por usuários, inclusive uma capa de revista.

Para a realização das técnicas de AFM-IR, o instrumento atualmente está equipado com um laser de cascata quântica, que opera na faixa de 1540 cm-1 a 1860 cm-1. Para a técnica de s-snom (o instrumento combina métodos ópticos com a microscopia de força atômica) é utilizado um laser de CO2, que opera em número de onda fixo de 1000cm-1.

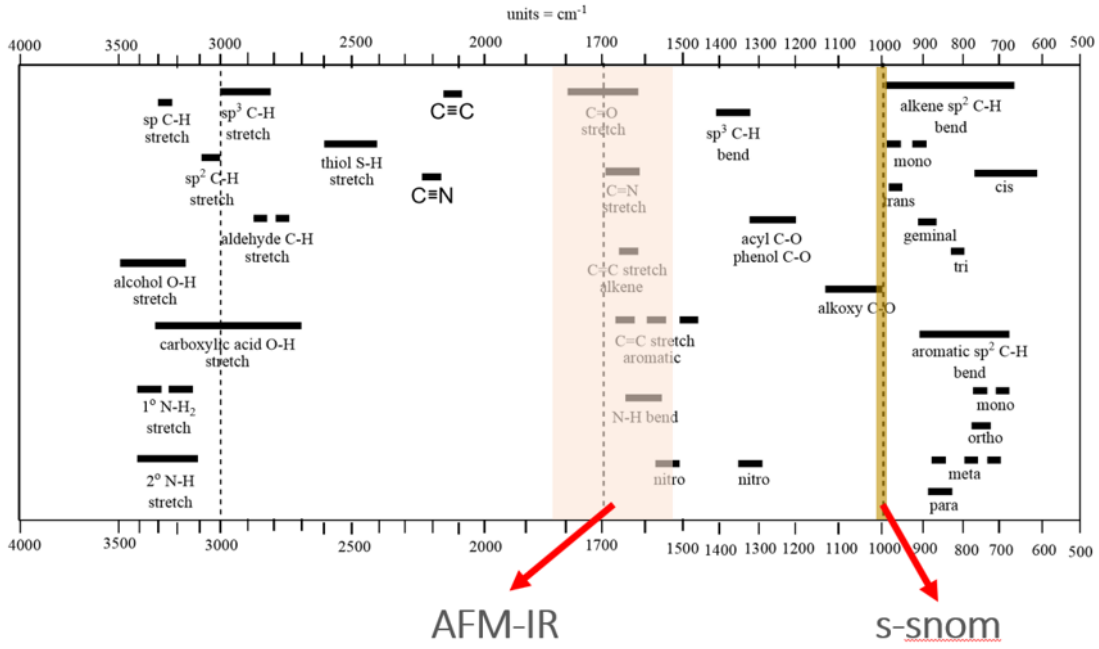


Figura 186 Técnica de AFM-IR e Tecnica de s-snom

Como é possível observar, a faixa da Figura 186 é estreita, o que limita bastante os resultados desse instrumento. Nesta atualização estamos realizando a expansão desta faixa (Figura 187

), com a aquisição de 2 lasers abrangendo uma maior região de interesse:

Laser 1 - LS-QCL-CWP-PS (em amarelo) - AFM-IR - faixa espectral de 950 cm-1 a 1900 cm-1 e s-snom: 950 cm-1 a 1150 cm-1 e 1700 cm-1 a 1850 cm-1

Laser 2 - Laser FASTspectra-OPO (em verde) - AFM-IR - faixa espectral de 2700 cm-1 a 3600 cm-1

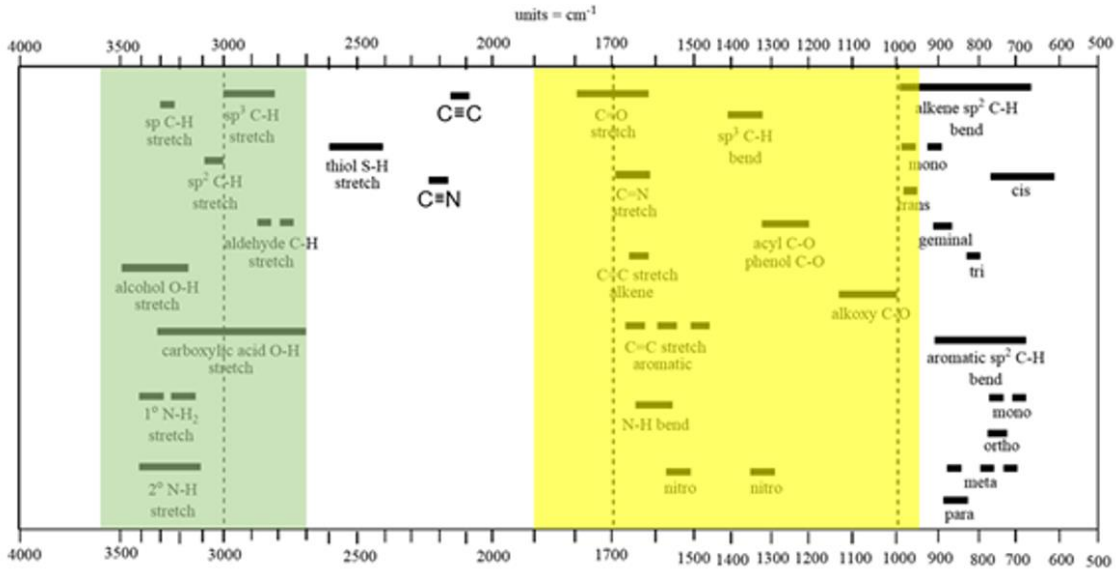


Figura 187 Laser 1 - LS-QCL-CWP-PS (em amarelo) e Laser 2 - Laser FASTspectra-OPO (em verde)

Estes 2 lasers foram entregues no LNNano no quarto trimestre de 2021, com previsão de instalação/treinamento no início de 2022. O comissionamento deste sistema deverá ocorrer no primeiro semestre de 2022. No segundo semestre deverá ser disponibilizado para realização de propostas de pesquisas externas.

Implementação do Módulo de Alta Resolução e Velocidade

Buscando melhorar o desempenho do AFM modelo Multimode 8-HR – BRUKER(Figura 188), a partir do segundo semestre foi disponibilizado para os usuários o módulo de força pulsada (Peakforce) com alta resolução e velocidade. Com este módulo, um modulador extra é inserido no eixo z, possibilitando atingir uma maior frequência na pulsação da força, o que permite adquirir imagens de amostras de baixa rugosidade com alta resolução, em velocidades até 6 vezes maiores que as técnicas convencionais.

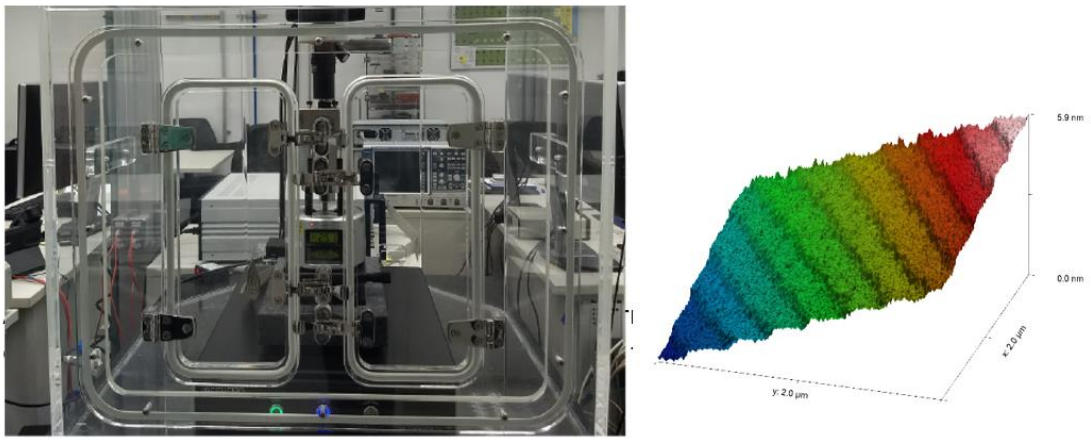


Figura 188 Multimode 8-HR – BRUKER

Construção de um Dispositivo para Funcionalização de Sondas de AFM

Sondas comerciais para AFM estão disponíveis com uma grande variedade de modelos com diferentes constantes elásticas, frequências de ressonância, afiações das extremidades, materiais e outros. Contudo, algumas análises requerem sondas modificadas específicas para uso em experimentos de espectroscopia de força, funcionalizadas com os diversos materiais em estudo (como proteínas, lignina, látex e outros).

A imersão total da sonda na dispersão do material a ser depositado provoca o recobrimento total da haste da sonda. Com isso, o local onde é refletido o laser do sistema de detecção da deflexão da haste também contém material aderido, que pode alterar a eficácia da detecção. Assim, foi aqui desenvolvido e construído um aparato para mergulhar somente a extremidade da sonda na dispersão do material a ser depositado. Desta forma, o recobrimento é realizado somente na extremidade da sonda, mantendo intacto o local da haste onde o laser de controle é incidido.

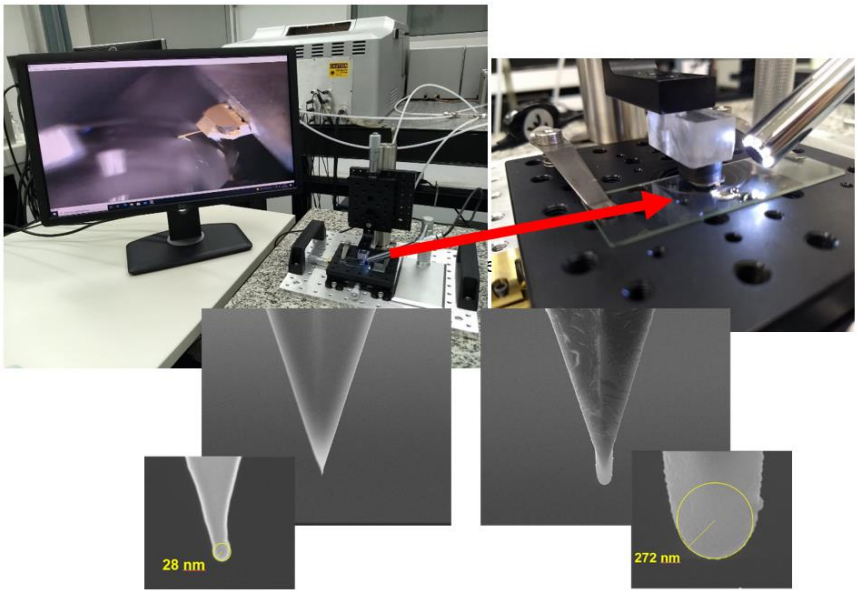


Figura 189 Sonda de AFM com recobrimento de Au

As imagens de MEV (Figura 189) da esquerda mostram uma sonda de AFM com recobrimento de Au sem funcionalização e as imagens da direita esta sonda após o processo de funcionalização com lignina.

Testes de Estabilidade

Com o aumento da demanda de projetos que requerem uma grande quantidade de dados para um estudo estatístico das propriedades estudadas, ocorreu um aumento no tempo das aquisições de dados, principalmente na plataforma do Bio-AFM (Figura 190). Em razão disso, nós investigamos sistematicamente a estabilidade do sistema, testando diferentes procedimentos para minimizar suas flutuações.

Figura 190 Bio-AFM modelo Nanowizard 4 JPK/BRUKER

Foi observado que a principal causa destas flutuações são decorrentes das mudanças térmicas. Elas modificam o sistema de detecção de deflexão da haste da sonda, afetando a sensibilidade e calibração de

força, críticas para imagens e medições espectroscópicas de AFM. Os testes mostraram a importância do aquecimento correto antes da aquisição dos dados, bem como as variações observadas ao longo do tempo com os diferentes procedimentos. As variações podem chegar a 80% após a incorreta ativação. Seguindo os procedimentos elaborados, as variações permanecem em uma faixa de 5%. Estes procedimentos foram descritos e publicados no memorando técnico intitulado “AFM thermal stability tests: effects in the cantilever deflection detection system modifying sensitivity and force calibration”, disponíveis na biblioteca CNPEM.

Microscopia Eletrônica de Varredura e de Duplo feixe

Instalação e comissionamento de um novo microscópio eletrônico de duplo feixe (FIB)

O LNNano adquiriu em 2021 um novo microscópio eletrônico de duplo feixe modelo Thermo Fisher Scientific SCIOS 2 (Figura 191), que será disponibilizado como instalação aberta para utilização pela comunidade científica a partir de 2022. Trata-se de um equipamento de alta resolução que combina um microscópio eletrônico de varredura com canhão FEG (Field Emission Gun) e um canhão de íons de Gálio (FIB – Focused Ion Beam). Este instrumento possui dez detectores para aquisição de imagens por elétrons secundários, retroespalhados e transmitidos, sendo três destes detectores instalados dentro da coluna de elétrons do microscópio, o que permite realizar análises com resolução de até 0,7 nm.

Além disso, este instrumento permite o preparo de secções transversais e amostras ultrafinas para microscopia eletrônica de transmissão, possuindo para isso dispositivos de deposição de Platina e Tungstênio, além de um sistema de nano manipulação de alta precisão. Diferente de outro microscópio de duplo feixe já em operação no LNNano (Thermo Fisher Helios Nanolab 660), este novo sistema é capaz de operar com a amostra em ambiente de baixo vácuo, o que juntamente com outros recursos permite o preparo e análise de amostras não-condutivas e magnéticas, aumentando a diversidade de materiais com os quais o LNNano pode trabalhar. Também possui softwares de programação e controle para o preparo de amostras ultrafinas e mapeamento de grandes áreas, o que possibilita automatizar determinadas tarefas demoradas e repetitivas.

Sua operação será focada no preparo de amostras ultrafinas, sendo um aliado de fundamental importância aos microscópios eletrônicos de transmissão de altíssima resolução do LNNano. Isso permitirá que o microscópio de duplo feixe já em operação seja utilizado para realizar análises de varredura de alta resolução e aquisição de dados para reconstrução 3D.

Figura 191 Microscópio eletrônico de duplo feixe Thermo Fisher Scientific Scios 2 instalado no LNNano

Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Em MET, as atualizações de infraestrutura foram mais no sentido de novos porta amostras e de atualização de software, como descrito abaixo

Atualização do servidor do Titan Cubed Themis

Neste processo o sistema foi atualizado para o software Velox, possibilitando a aquisição de imagens em modo TEM com as seguintes velocidades, 30 f/s para imagens 4kx4k, 120 f/s para imagens 2kx2k e 480 f/s para imagens de 1kx1k, o que possibilita a realização de estudo in-situ na escala de microssegundos.

Comissionamento do porta-amostra Wildfire para Biasing

Este comissionamento possibilita o estudo in-situ no microscópio Titan Cubed Themis do efeito de campos elétricos de até 300 kV/cm em amostras manométricas na escala de microssegundos. Ainda no tópico novos equipamentos, neste segundo semestre implementamos a compra de mais acessórios para a MET, como descrito abaixo.

Implementação da técnica 4D-STEM

Compra de um detector pixelado de alta área por pixel e mais softwares de controles para instalação no Titan Themis 300. Esta atualização permitirá a realização da técnica 4D-STEM no Titan Themis 300. Esta técnica é a mais avançado na caraterização estrutural via imagem por microscopia eletrônica de transmissão e vai permitir a implantação da técnica avançadas de difração de elétrons.

Implementação da técnica de microdifração

O Talos F200C receberá uma atualização que permitirá fazer microdifração 3D, tornado o MET uma plataforma de determinação de estruturas cristalinas de micro e nanocristais, incluindo pequenos cristais moleculares, cristais orgânicos de pequenas moléculas e cristais inorgânicos. Esta técnica vai complementar a área de crio-microscopia eletrônica, ampliando o potencial de determinação de estruturas de proteínas e cristais orgânicos e inorgânicos.

Criomicroscopia Eletrônica

O preparo de amostras para criomicroscopia eletrônica demanda o uso de proteína purificada, que tipicamente necessita o uso de um sistema de cromatografia líquida rápida de proteínas (FPLC – Fast Protein Liquid Chromatography). Em diversos casos é necessário que o preparo das grades de microscopia seja realizado imediatamente após a purificação da proteína, para que se mantenha a qualidade da mesma. Como a maior parte dos grupos de usuários não possui infraestrutura para preparo das grades em seus laboratórios, o LNNano adquiriu um FPLC (Akta Pure - Cytiva) para disponibilizar aos seus usuários de criomicroscopia. Dessa maneira, as etapas finais de purificação podem ser realizadas no laboratório de preparo de amostras do LNNano, imediatamente antes do preparo das grades de criomicroscopia, melhorando a qualidade das amostras.

As instalações de computação científica (HPC) do LNNano tiveram uma atualização de sua infraestrutura por meio da instalação e ativação de um novo Datacenter. O antigo datacenter era composto por dois racks e ar-condicionados do tipo split, que não são recomendados para Datacenters. Este sistema foi substituído por racks enclausurados com dois ar-condicionados de precisão, instalados diretamente nos racks, com possibilidade de instalação de uma terceira unidade. Isso permite um melhor controle da temperatura e umidade, bem como uma redução no consumo de energia, pois a sala não precisa ser resfriada, apenas os racks. Além disso, o novo sistema possui uma unidade de combate a incêndio integrada e dois nobreaks de 20 kVA, com possibilidade de instalação de uma terceira unidade. Todo o sistema possui a capacidade de monitoramento remoto via web, onde a temperatura, umidade, carga elétrica, funcionamento dos ar-condicionados e nobreaks podem ser acompanhados. Neste sistema de monitoramento podem ser configurados alarmes para eventuais riscos na operação, tais como temperatura e carga. No total, o novo sistema possui quatro racks, sendo um ocupado pelos sistemas de monitoramento e nobreaks e três para receber equipamentos. Cada um dos três racks disponíveis possui a capacidade de carga de 15 kVA. Atualmente estamos utilizando um rack completo e um quarto de um segundo rack. Desta maneira, temos uma capacidade de expansão que deverá atender ao LNNano nos próximos anos. A Figura 192 mostra o novo sistema de racks enclausurados.

Figura 192 Sistema de racks enclausurados para equipamentos de HPC do LNNano

Síntese

Durante todo ano de 2021 os laboratórios da Divisão de Síntese foram reorganizados de forma temática para que juntos com os equipamentos de espalhamento e espectroscopia fossem disponibilizados a comunidade cientifica interna e externa e ao setor produtivo. Além dos laboratórios de apoio aos equipamentos abertos a comunidade, três novos laboratórios temáticos foram finalizados sendo dois dedicados inteiramente a fabricação de nanomateriais (Figura 193) para aplicação em diferentes tecnologias de produção e armazenamento de energia limpa. Um terceiro laboratório dedicado ao processamento de polímeros, celulose em escala piloto para principalmente desenvolvimento de produtos e tecnologias. Essa instalação tem grande interface com o setor produtivo tanto para desenvolvimento de projetos em conjunto, como prestação de serviço ou consultorias.

Figura 193 Fotos do laboratório de fotossíntese artificial com a infraestrutura de caracterização de materiais e dispositivos

Nano e Microfabricação

Com recursos do SisNANO, o LNNano adquiriu um sistema de deposição de metais customizado (Sputtering + e-Beam), Angstrom Engineering/MBraun, modelo Evovac 046, para substituir um sputtering Balzers com cerca de 30 anos de uso, Figura 194. O sistema possui quatro canhões de evaporação (três DC e um RF) e um e-Beam com seis cadinhos, podendo depositar até dez materiais diferentes (metais e dielétricos), de forma sequencial. No 1º semestre de 2021 o sistema foi instalado pelo fabricante e foi realizado treinamento da equipe interna. Após o comissionamento, o equipamento foi caracterizado e em seguida, foi aberto para atender aos usuários internos e externos. Possui um sistema de movimento planetário, com quatro porta amostras com 200mm de diâmetro, o que permite depositar uma grande quantidade de amostras ao mesmo tempo. O softwarw AERES controla todo o processo de deposição.

Figura 194 Sistema de Metalização MBraun (Sputtering + e-Beam)

Com recursos provenientes de projetos com a Petrobras, foram adquiridos, instalados e comissionados, um Plasma de Oxigênio (Plasma Cleaner CYKY) e um Cromatógrafo a Gás com Espectrometro de Massas acoplado (Thermo Trace 1300 +ISQ 7000). Ambos estão disponíveis para atender aos projetos industriais e aos usuários internos e externos. O plasma de oxigênio,Figura 195a, é largamente utilizado em processos de limpeza antes da etapa de metalização e é essencial para a etapa de selagem de dispositivos microfluídicos baseados em PDMS. O Cromatógrafo a Gás com espectrômetro de Massas, Figura 195b, é uma poderosa técnica analítica capaz de separar e identificar espécies voláteis e semivoláteis.

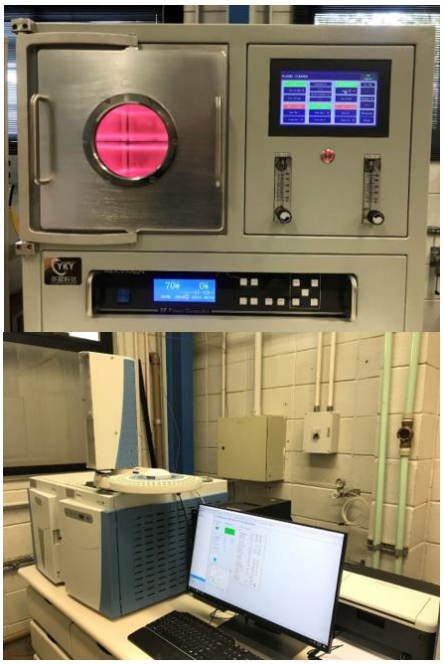


Figura 195 a) Plasma cleaner utilizado para processos de limpeza pré-metalização e para selagem de dispositivos microfluídicos baseados em polímeros. b) Cromatógrafo a gás com espectrômetro de massas acoplado fabricado pela Thermo. Na parte superior da foto, pode-se observar o detalho do sistema de amostragem automática

Também com recurso do SisNano, o LNNano adquiriu uma nova impressora 3D da Formlabs. O modelo Form2, Figura 196, utiliza a tecnologia SLA (Stereolithography Apparatus), baseado em resinas poliméricas foto curáveis para imprimir peças e partes com elevado grau de definição. O equipamento substitui o modelo anterior que deixou de operar após 5 anos. Aberto a usuários interno e externos, este equipamento tem sido usado em vários projetos para fabricar peças e partes para montagem dos setups nas linhas de luz do Sirius, bem como na fabricação de dispositivos microfluídicos para o LNBio e LNNano.

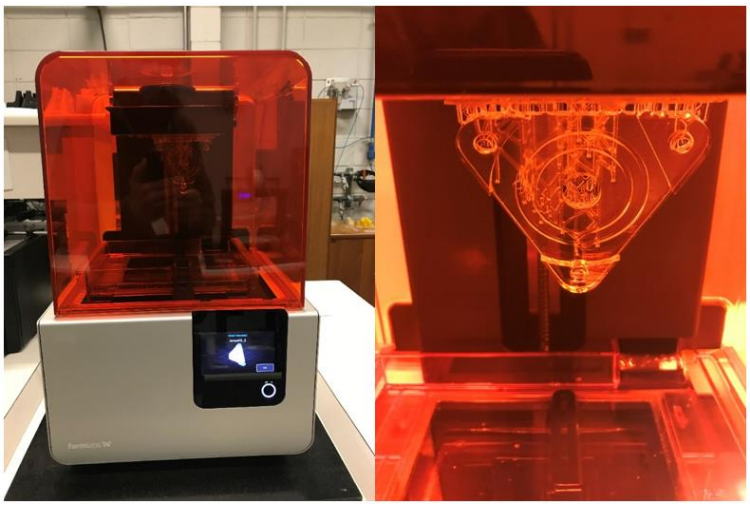


Figura 196 Impressora 3D SLA Form2. Neste sistema, um feixe de laser escreve camadas com até 25 micra de espessura em uma resina polimérica sensível a luz UV. No detalhe a direita, pode-se observar uma peça recém-fabricada na impressora

Visando expandir as competências da Divisão de Nano e Microfabricação do LNNano e complementar as técnicas existentes no laboratório, o laboratório adquiriu com recursos do SisNano um sistema de micromachining a laser. Esse sistema atenderá as crescentes demandas de seus usuários por soluções de problemas com intricada complexidade na fabricação de microestruturas e dispositivos para aplicações nas áreas de sensoriamento, energia, entre outros. O laser promove a remoção controlada (ablação), com precisão micrométrica, de camadas nanométricas de materiais de variada natureza (metálica e não-metálica) depositadas sobre a superfície de interesse para a fabricação de microestruturas com configuração e geometria variável, definidas sob demanda por software dedicado. Este sistema é útil para a microfabricação de estruturas sem necessidade de técnicas de litografia ou corrosão por via úmida e, portanto, complementar a estas, podendo atender ainda demandas de prototipagem de microdispositivos flexíveis e/ou de materiais orgânicos ou (bio)degradáveis. Devido as restrições de importação que o CNPEM sofreu em meados deste ano, o sistema de micromachining a laser foi entregue em Outubro/2021 e, até a data deste relatório, está em fase de instalação.

Por fim, destacam-se as novas instalações para a Nanofabricação do LNNano (Figura 197), um conjunto de salas-limpas equipadas com instrumentação no estado da arte para a fabricação de nanoestruturas e nanodispositivos. Entre os instrumentos já instalados e em processo de comissionamento, destacam-se o e-line plus da Raith para litografia por feixe de elétrons e o ion milling da AJA International Inc. para processos de corrosão controlada via íons argônio. Essa nova infraestrutura de Nanofabricação é uma parceria entre o LNNano e a FAPESP (através de um projeto multiusuário), e integrará o Sistema Nacional de Laboratórios em Nanotecnologias (SisNANO), que são laboratórios direcionados à pesquisa, ao desenvolvimento e à inovação (PD&I) em nanociência e nanotecnologia, apoiados pelo Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações (MCTI). Trata-se de uma infraestrutura multiusuário dedicada a nanofabricação visando novos desenvolvimentos para as áreas da saúde, meio ambiente, agricultura, energia, entre outras. Essa nova infraestrutura foi projetada de modo a criar um ecossistema integrado com outras facilidades já existentes no LNNano e que são referência no país, como o parque de microscopia eletrônica e os laboratórios de microfabricação. A infraestrutura de nanofabricação abrirá inúmeras oportunidades a pesquisadores de todo o país de projetar e executar experimentos desafiadores, tanto para fins de ciência fundamental, como para o entendimento de fenômenos físicos e químicos complexos em nanomateriais, quanto para o desenvolvimento de novas aplicações em diversas áreas do conhecimento. Por atuar na forma de infraestrutura aberta, usuários da academia e do setor produtivo poderão submeter propostas para o uso das facilidades, onde receberão ainda apoio técnico e científico para a execução dos projetos.

Figura 197 a) Equipamento para litografia por feixe de elétrons (e-line plus, Raith) e b) Ion milling para processos de corrosão (AJA International Inc.)

Nanotoxicologia e Nanobiotecnologia

O peixe *Danio rerio (Zebrafi*sh) tem se destacado como um modelo animal estratégico para pesquisa em ciências da vida e do ambiente. Entre as inúmeras vantagens do *Zebrafish* como modelo de estudo, destacam-se o seu tamanho reduzido e baixos custos de manutenção, resistência e transparência de seu embrião permitindo aceder a nível celular e em tempo real qualquer processo de desenvolvimento durante as diversas fases da embriogênese. Além disso, seu curto período reprodutivo, alta fecundidade, conservação genômica com outros vertebrados e disponibilidade de ferramentas para produção de animais transgênicos tornaram este modelo cada vez mais importante para estudos *in vivo.* Foram realizadas adaptações e melhorias para automação da Rack de Zebrafish instalada na Sala de Bioensaios (Figura 198) da Instalação de Nanotoxicologia e Nanossegurança para manutenção e cultivo destes organismos com alta qualidade para a pesquisa visando o atendimento de usuários internos e externos.

Figura 198 A. Rack automatizada para manutenção dos peixes (Zebrafish); B- sistema de purificação de água por osmose reversa; C- painel de controle de parâmetros físico-químicos da rack; D- painel de controle do sistema de fotoperíodo da sala do biotério

5. Engenharia e Tecnologia

5.1. Pesquisa e Desenvolvimento *in house*

Projeto Sirius

Sistemas de Vácuo

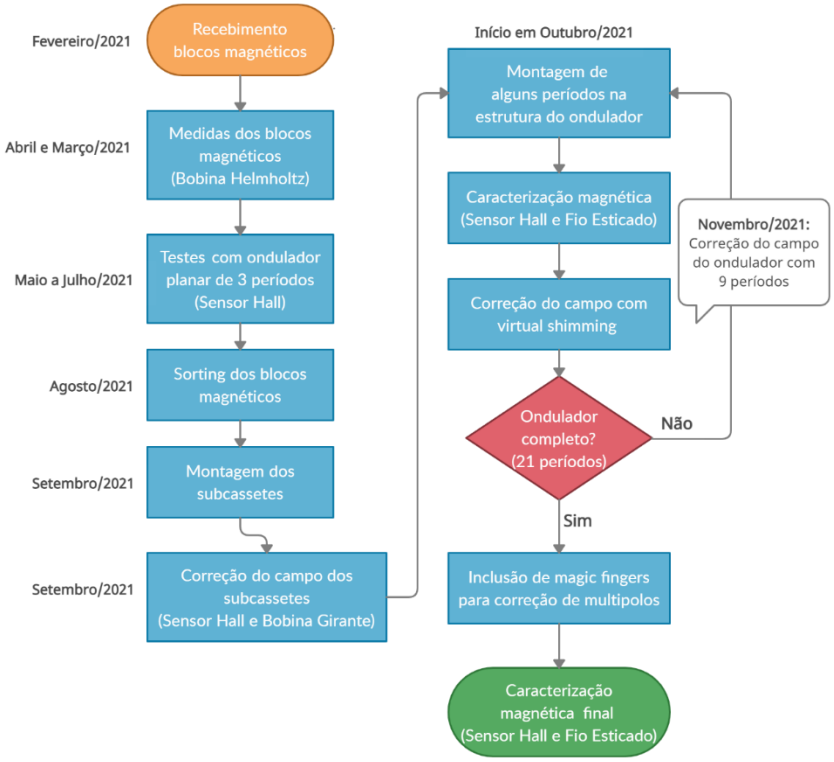
Durante o ano de 2021, os sistemas de vácuo do Sirius continuaram em condicionamento e as pressões de vácuo de todos os aceleradores continuaram diminuindo gradativamente. Na condição dinâmica, com feixe de elétrons na máquina, os valores das pressões especificados em projetos devem ser atingidos com as seguintes doses de corrente de feixe de elétrons integrada: 1 A·h para o booster e linhas de transporte; e aproximadamente 100 A·h para o anel de armazenamento de elétrons. No caso do booster, a dose integrada ainda não foi atingida no ano de 2021 e, por isso, sua pressão de vácuo ainda não atingiu os valores desejados. No caso do anel, a dose integrada especificada em projeto já foi atingida e em dezembro ultrapassou a marca de 300 A·h. As pressões de vácuo do anel, especificadas em projeto, foram atingidas antes do previsto. Foram obtidos valores com uma dose integrada de aproximadamente 70 A·h, ou seja, com 70% da dose especificada em projeto, indicando que a evolução das pressões no anel está melhor do que o esperado.

Além disso, deu-se continuidade ao processo de desenvolvimento das câmaras de vácuo para os dispositivos de inserção do tipo onduladores Delta. Mesmo com o alto grau de complexidade de fabricação dessas câmaras, foram obtidos bons resultados e fabricadas duas câmaras para os onduladores Delta 52 – essas câmaras deverão ser instaladas no Sirius no início de 2022. Além disso, a deposição NEG das câmaras para os onduladores Delta 22 foi desenvolvida para as câmaras finais de 2,6 m de comprimento e foi concluída a fabricação de um protótipo de câmara completa de 1,3 m. Os próximos tópicos apresentam mais detalhes sobre a evolução dos sistemas de vácuo dos aceleradores e do desenvolvimento das câmaras de vácuo para os onduladores Delta.

Montagem e caracterização magnética dos onduladores

No último trimestre de 2021, foi iniciada a montagem do conjunto magnético do ondulador Delta da linha Sabiá. Ao longo do ano, o projeto magnético do ondulador foi refinado, as bancadas de caracterização magnética foram preparadas para as medidas do novo dispositivo, e foi desenvolvido um conjunto de ferramentas computacionais para auxiliar no refinamento das características do campo magnético de forma que o dispositivo atinja as apertadas especificações de projeto. O cronograma simplificado da montagem e caracterização magnética deste ondulador é mostrado na Figura 199.

Figura 199. Cronograma da montagem e caracterização magnética do ondulador Delta da linha Sabiá

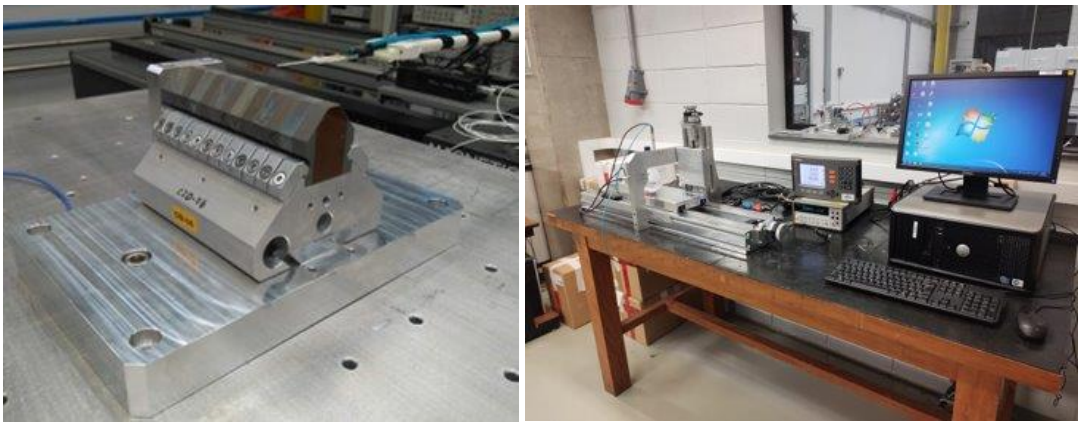


Para a elaboração do projeto magnético e para auxiliar no processo de montagem, foram desenvolvidas várias ferramentas de simulação dos dispositivos de inserção que permitem, por exemplo, calcular o campo magnético, as integrais de campo e o erro de fase, além da trajetória tridimensional do feixe no dispositivo. Incluem também algoritmos de *sorting* (ordenamento) e *shimming* (calçamento) – ferramentas importantes para a montagem e otimização do campo do ondulador. Dentro do escopo do projeto magnético foram realizadas simulações de mapas de campo e de perturbações na órbita para as várias fases do ondulador, bem como, simulações das forças magnéticas envolvidas na movimentação dos cassetes. Além disso, foram realizados estudos de correção multipolar.

O ondulador Delta da linha Sabiá é composto por quatro cassetes – nome dado aos arranjos de blocos de imã permanente –, que geram um campo magnético com formato aproximadamente senoidal com 21 períodos de oscilação. Por questões construtivas, cada cassete é composto por um conjunto de subcassetes, que acomodam doze blocos perfazendo três períodos magnéticos, exceto por dois subcassetes de terminação que ajustam o campo nas bordas do ondulador. Para selecionar os blocos para cada subcassete, um lote de blocos magnéticos, normais e de terminação, foi caracterizado no laboratório de Ímãs. As informações de cada bloco são utilizadas no algoritmo de *sorting* dos blocos magnéticos utilizado na montagem dos cassetes. O procedimento que permite a seleção e o ordenamento dos blocos é necessário para otimizar o perfil e as integrais de campo, de forma a minimizar a necessidade de *shimming* nas etapas seguintes. O processo de *shimming* é demorado e trabalhoso, pois requer retirar os subcassetes do ondulador para o calçamento dos blocos, a remontagem e a aferição na bancada de

medidas – processo que pode exigir várias interações para garantir que o desempenho do dispositivo esteja dentro do especificado. Um protótipo de ondulador planar com três períodos magnéticos composto por blocos do ondulador Delta foi construído e utilizado para a validação dos algoritmos e verificação da amplitude do campo magnético gerado. Para auxiliar na montagem do ondulador, foi desenvolvida uma mesa de montagem e aferição dos subcassetes (Figura 200). O projeto magnético das corretoras e quadrupolos *skew de feedforward*, que devem ser instaladas com o dispositivo para otimizar a sua operação com o feixe de elétrons, estão em fase final de refinamento.

Figura 200. Mapeamento do campo de um subcassete do ondulador (esq); parte da infraestrutura desenvolvida para a montagem do Delta (dir)

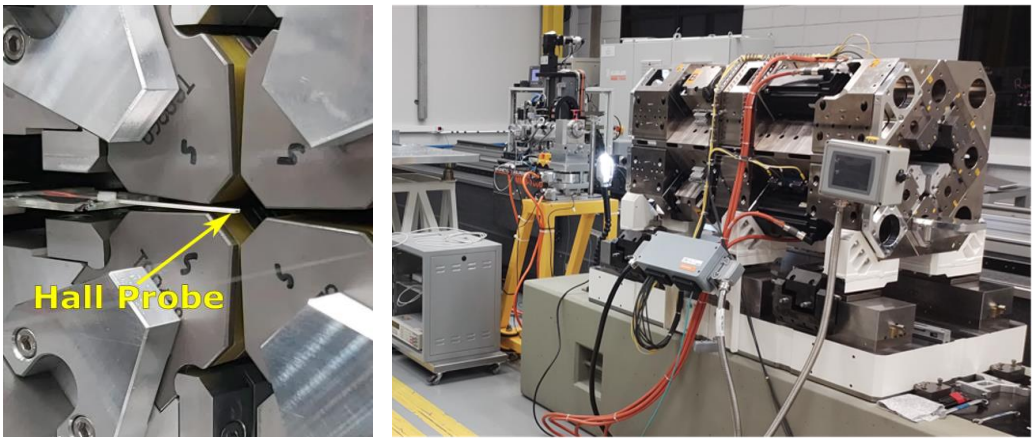


Para que as caracterizações do campo magnético possam ser realizadas de forma adequada e para que seja possível determinar se as especificações são atingidas, várias atividades foram realizadas visando melhorar as bancadas de medida. Foram feitos melhoramentos no ímã de calibração de 2 Tesla e na câmara de zero-gauss utilizados na calibração dos sensores Hall. Uma etapa importante das atividades, foi a preparação das bancadas para as medidas, comparando os resultados das medidas de dispositivos-padrão de calibração entre elas. Esses preparativos incluíram também estudos comparando as simulações magnéticas dos blocos com medidas realizadas na bancada Hall e na bancada de bobina girante. Foram realizados, ainda, melhoramentos na bancada de caracterização com bobina de Helmholtz para a medida dos blocos de NdFeB utilizados no ondulador. O conjunto de blocos recebidos do fabricante são sempre medidos no laboratório de ímãs para aferição de suas características magnéticas. Estas informações são importantes, pois as características magnéticas dos blocos são determinantes para a escolha daqueles que comporão cada subcassete do ondulador.

Em paralelo, também foram efetuadas melhorias na infraestrutura e instrumentação das próprias bancadas de medidas magnéticas. Um novo sensor Hall, adequado para o mapeamento do campo do Delta, foi adquirido e caracterizado na bancada Hall de mapeamento de campo magnético (Figura 201). A abertura entre os blocos magnéticos de alguns onduladores do tipo Delta será menor do que 7 mm, o que exigiu a aquisição de um sensor com dimensões compatíveis. A bancada de fio esticado, utilizada para as medidas das integrais de campo, foi otimizada para atingir a resolução necessária para caracterizar os onduladores dentro das especificações e tolerâncias exigidas. O processo para melhorar a resolução das

medidas da bancada e reduzir o nível de ruído das medidas está em andamento e os resultados alcançados até o momento mostram erros abaixo de 10 G.cm. A bancada foi adequada para permitir medidas do ondulador com o sensor Hall e o fio esticado, o que se mostrou muito importante para a validação das medidas.

Figura 201. Novo sensor Hall em utilização (esq); estrutura do ondulador posicionada para medidas nas bancadas Hall e de fio esticado



A montagem do ondulador teve início no último trimestre de 2021 com a montagem dos primeiros conjuntos de subcassetes, observados na Figura 202. Os procedimentos de otimização de campo e de medida foram utilizados para corrigir as integrais de campo. Um exemplo de aplicação do procedimento é mostrado na Figura 203, que apresenta uma significativa redução das integrais após as correções aplicadas. Medidas conjuntas realizadas nas bancadas Hall e de fio esticado permitiram uma aferição das medidas com as simulações magnéticas utilizando dois métodos diferentes, o que se mostrou muito adequado para confirmar as medidas. O processo de montagem e otimização do campo com os procedimentos de *shimming* está em andamento. Com meio ondulador montado, o processo foi interrompido para adequação do mecanismo de movimentação dos polos. A expectativa é de que a montagem e os primeiros ajustes do campo sejam retomados no início de 2022.

Figura 202. Nove períodos montados no ondulador (esq); montagem completa (dir)

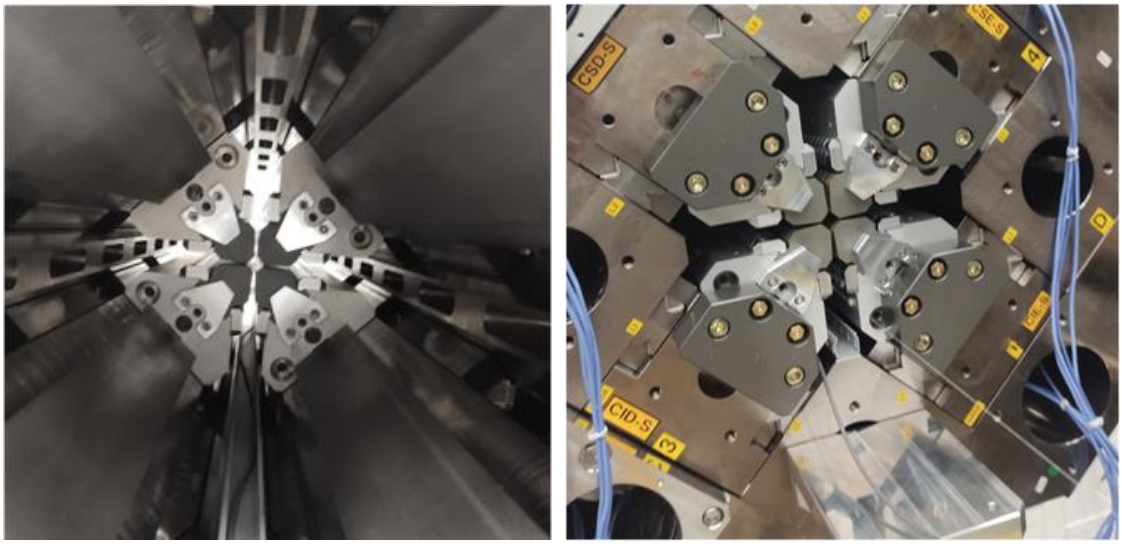
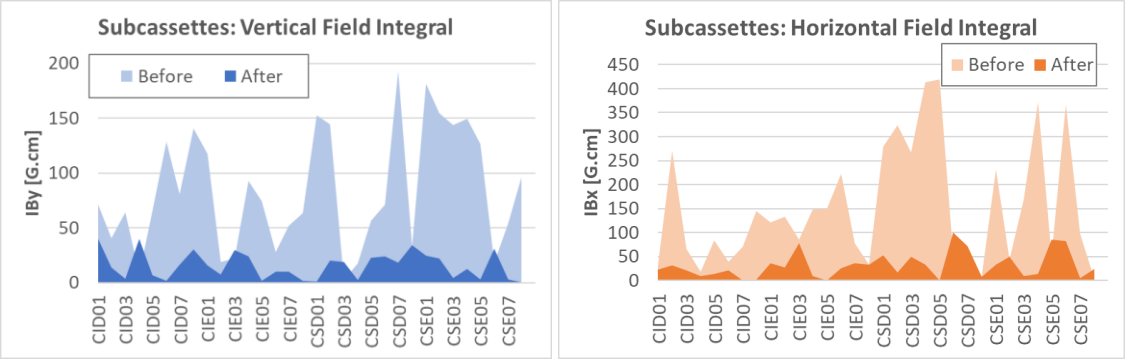


Figura 203. Medida e correção das integrais de campo dos subcassetes do ondulador Delta da linha Sabiá



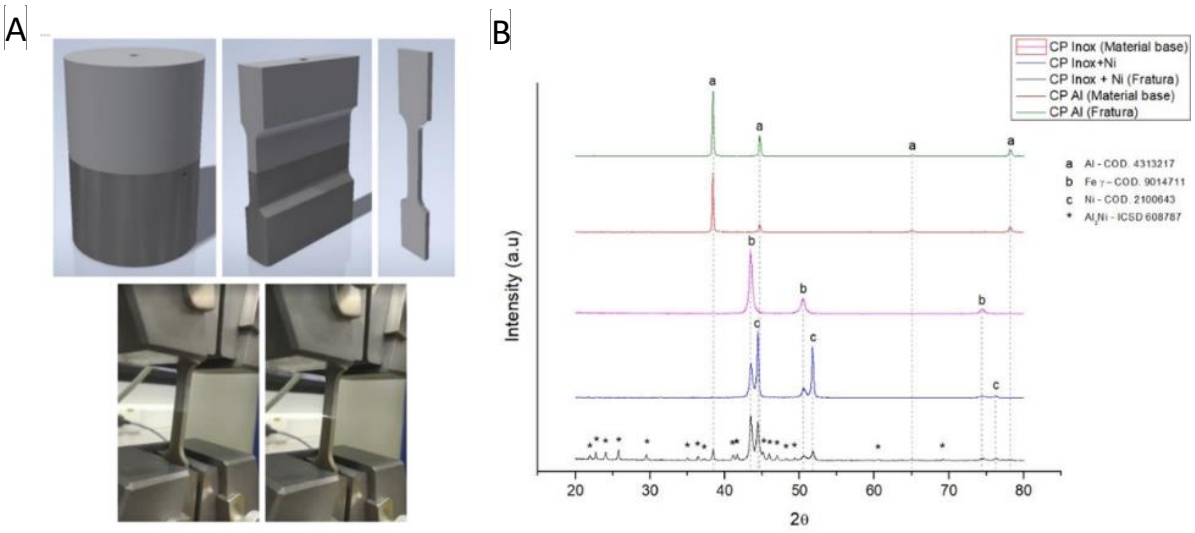
Câmaras de vácuo para os onduladores Delta 52

Ao longo de 2021, foram realizadas diversas atividades visando a conclusão do projeto e fabricação da câmara de vácuo do Ondulador Delta 52, e das câmaras de vácuo necessárias para a montagem do trecho reto.

O conceito do flange da câmara do ondulador foi revisado e a espessura de alumínio submetida ao aperto foi reduzida para 1 mm. Este conceito de flange se deu a partir de processos de soldagem por difusão e FSW (*friction stir welding*), extensamente estudados pelo grupo de materiais, assim como a geometria das mesmas para que a vedação não fosse afetada por perda de adesão da união dos materiais brasados.

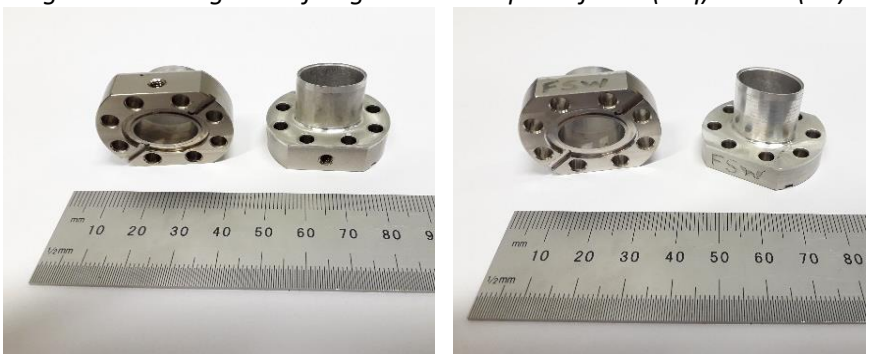
Os processos de soldagem por difusão e FSW foram testados por meio da fabricação e caracterização de diversos protótipos ao longo do ano[107]. Foram realizados ensaios de tração para diferentes condições de soldagem por difusão e feita análise de difração de raios-X (DRX) para identificação de intermetálicos formados durante esta soldagem, conforme ilustra a Figura 204. Os flanges obtidos por FSW ficaram prontos no final deste ano e serão caracterizados ao longo de 2022.

Figura 204. Caracterização da soldagem por difusão: amostras e ensaios de tração (A); e análise de DRX (B)



Os flanges também foram submetidos a testes de ciclagem térmica e testes de estanqueidade. Todas as peças submetidas às ciclagens térmicas foram aprovadas no teste de estanqueidade. A Figura 205 ilustra os flanges soldados por Difusão e FSW.

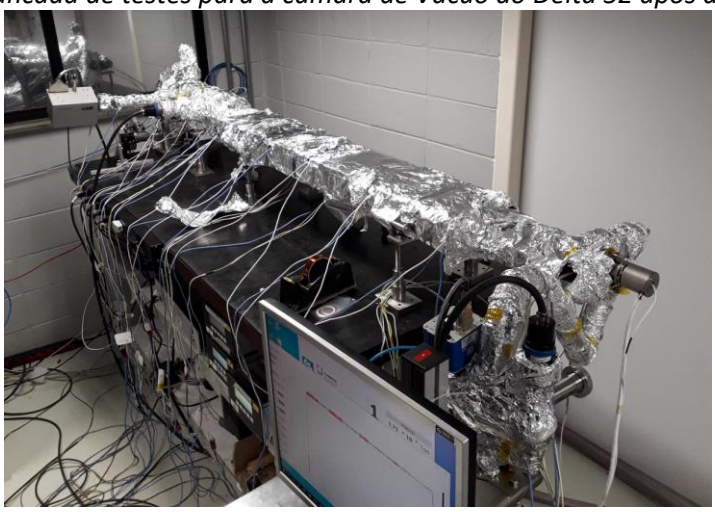
Figura 205. Imagem de flanges soldadas por Difusão (esq) e FSW (dir)



107 Diferentes geometrias foram testadas e chegou-se à geometria mais adequada para uso na câmara de vácuo do ondulador delta DU525. Essas câmaras são fabricadas a partir de um perfil em liga de alumínio AA 6063 extrudado, desenvolvido em parceria com a empresa Hydro Extrusion Solutions, devido à sua geometria específica e necessidade de canais de refrigeração que seriam difíceis de desenvolver através de métodos anteriormente utilizados.

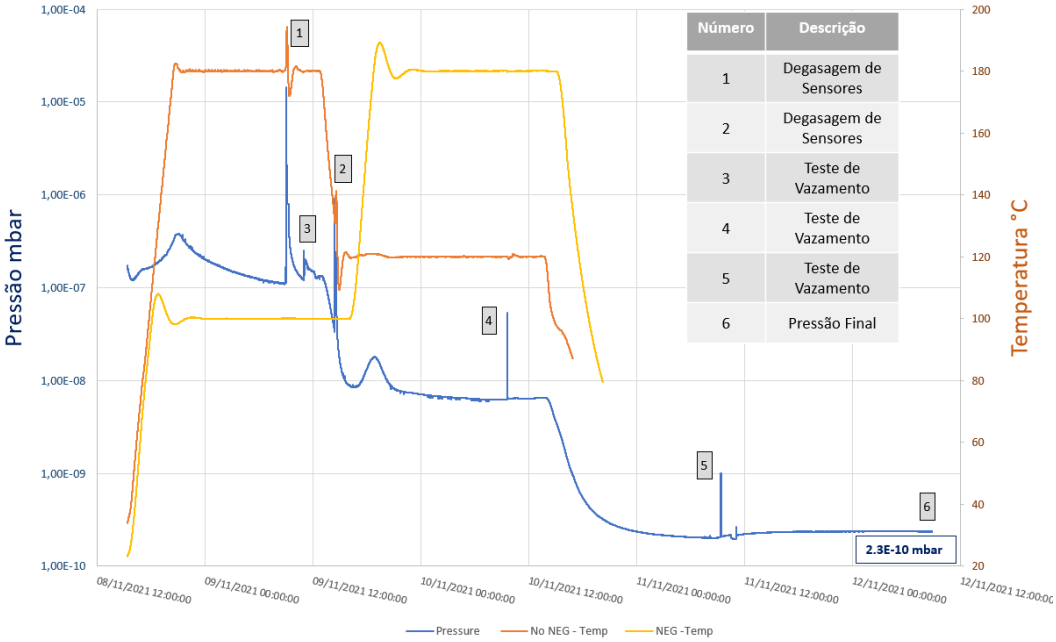
A primeira câmara fabricada para o Delta 52 foi soldada aos flanges do tipo “solda por difusão” e submetida ao processo de deposição NEG. Para avaliar a qualidade do filme NEG depositado, foi realizada a ativação do filme em uma bancada de experimentos (Figura 206). A pressão final de 1,05.10-10 mbar foi registrada após a primeira ativação do filme NEG, indicando um desempenho de vácuo de acordo com o esperado em projeto.

Figura 206. Bancada de testes para a câmara de Vácuo do Delta 52 após deposição NEG



A Figura 207 ilustra as curvas de Temperatura e Pressão para a segunda ativação realizada no filme NEG. A pressão final atingida foi de 2,3.10-10 mbar.

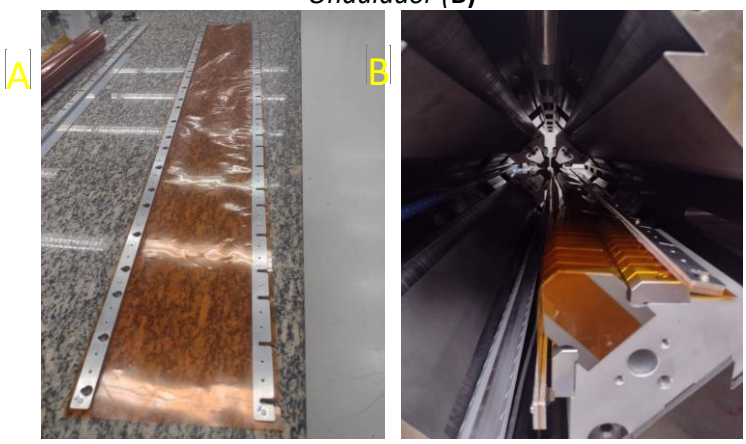
Figura 207. Curvas de Temperatura e Pressão durante ativação do filme NEG



A câmara número 2 para o Delta 52 teve sua usinagem finalizada. No final do mês de novembro de 2021, decidiu-se utilizar o modelo de flange “soldada por difusão” para a construção da câmara, pois o processo por FSW continua em desenvolvimento com promissores resultados preliminares. A segunda câmara ficou pronta para instalação no início do mês de dezembro.

Foi desenvolvido um processo para o envelopamento dos cassetes do ondulador utilizando filme Kapton de 0,076 mm de espessura. O objetivo de tal envelopamento é reduzir o atrito entre os pólos do ondulador e a câmara de vácuo, evitando que ocorram danos à câmara. O Kapton é preso por um par de chapas em cada extremidade, que serão parafusadas em determinados subcassetes do ondulador. O procedimento é realizado em cada cassete separadamente e o Kapton pode ser removido e inspecionado em manutenções preventivas, por exemplo. A Figura 208 ilustra o envelopamento dos cassetes utilizando Kapton.

*Figura 208. Chapas que prendem o Kapton e são travadas no Ondulador (A), e teste de montagem no Ondulador (***B)**



Em dezembro foram iniciados o teste de montagem da câmara de vácuo no Ondulador Delta 52 e avaliação de integridade do filme Kapton durante a movimentação dos cassetes. Foram escolhidos 3 modos de movimentação do ondulador para a realização de experimentos. Além disso, foi finalizado o projeto das câmaras de vácuo do trecho reto no qual o ondulador será instalado. As câmaras foram usinadas, brasadas, passaram por etapas de dimensional e finalmente pela deposição do filme NEG. As câmaras estão armazenadas em vácuo e prontas para a instalação no trecho reto. Foram usinados e soldados mais 18 corpos de BPM. Desta forma, já estão disponíveis conjuntos de BPM completos para a instalação dos primeiros onduladores Delta 52 e Delta 22 para as linhas Sabiá e Carnaúba. A Figura 209 ilustra as transições que serão montadas no trecho reto do Setor 10 (Sabiá) do Sirius.

Figura 209. Transições a serem montados no trecho reto após brasagem (A), e após Deposição de filme NEG (B)

Avaliação da resistência mecânica dos ímãs dos Onduladores Delta 52

Para avaliar a resistência mecânica dos ímãs de NdFeB que serão usados na construção do ondulador Delta 52, foram realizados ensaios de flexão em quatro pontos e ensaios de tração em amostras deste material. Os corpos de prova e resultados podem ser vistos nas Figura 210 e Figura 211, respectivamente.

Figura 210. Ensaio de Flexão em 4 pontas do NdFeB

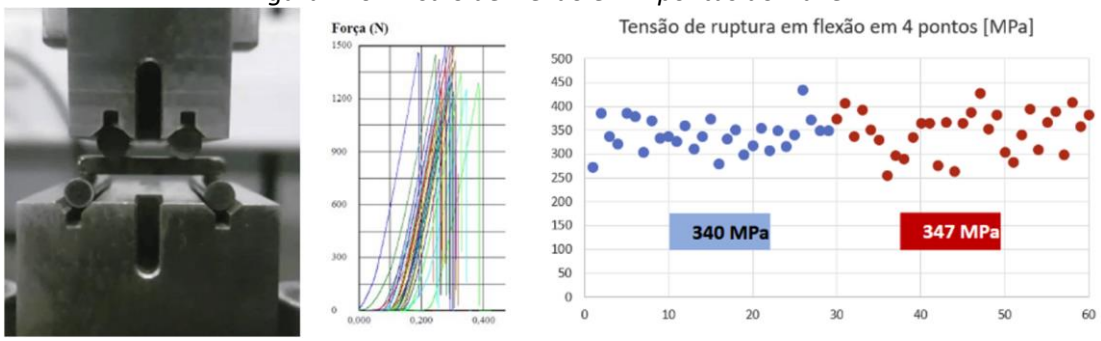
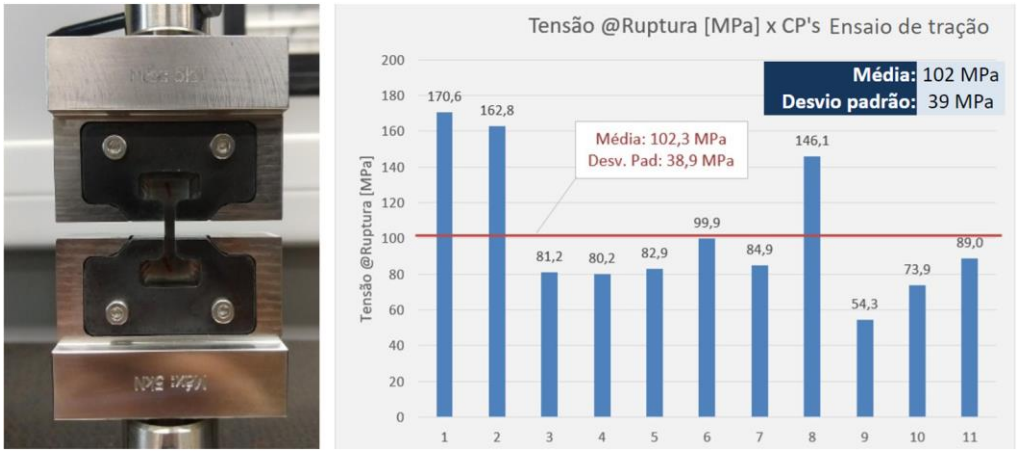


Figura 211. Ensaio de tração do NdFeB

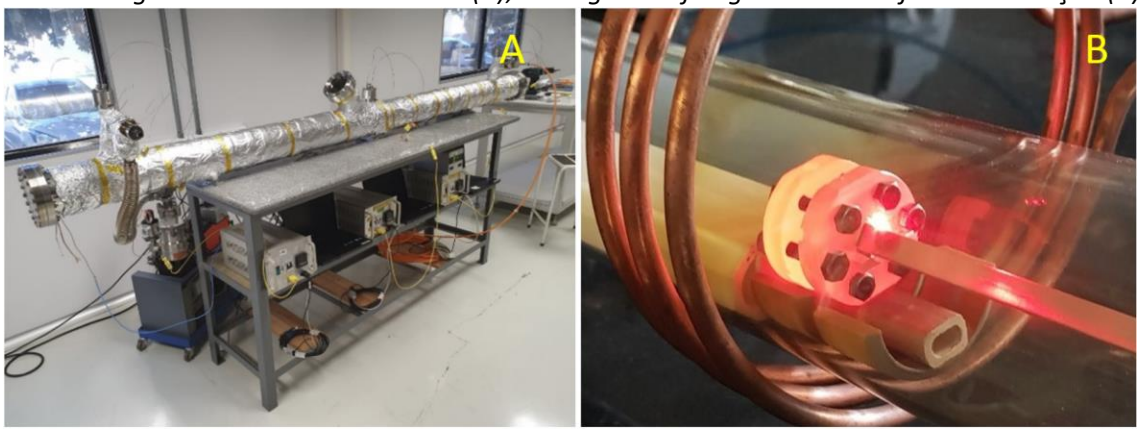


Câmaras de vácuo para os onduladores Delta 22

Para as câmaras de vácuo do Ondulador Delta 22, foi definido como método de fixação das abas dissipadoras laterais o processo de solda branda com a liga SN100CV. Esta liga já foi utilizada com sucesso nas câmaras de vácuo do anel do Sirius, ao passo que a geometria requerida pelo projeto limitou os avanços com o método de fabricação por FSW.

Um forno tubular a vácuo de três metros de comprimento foi construído neste ano (Figura 212A), e utilizado para efetuar a solda entre as chapas de refrigeração e os tubos de perfil quadrado das câmaras de vácuo. Estes tubos de perfil quadrado são previamente brasados em flanges de inox em um forno de indução, também adaptado à geometria das câmaras deste ondulador (Figura 212B). A Figura 212 abaixo mostra os fornos utilizados na fabricação das câmaras do Ondulador Delta 22.

Figura 212. Forno Tubular 3m (A); brasagem de flange de inox em forno de indução (B)



Ao longo do ano foram realizados diversos testes de solda a fim de comissionar o novo forno tubular, parametrizar o processo e definir a metodologia final de fabricação. No final de 2021 foi obtido o primeiro protótipo completo da câmara de vácuo do Ondulador Delta 22, com 1300 mm de comprimento (Figura 213). Para a caracterização deste processo, foram realizadas metalografias (Figura 214), além de ensaios de tração, micro-dureza, ciclagem térmica e estanqueidade.

Figura 213. Primeiro protótipo de câmara de 1300 mm do ondulador Delta 22. Visão geral (A) e detalhe das soldas (B)

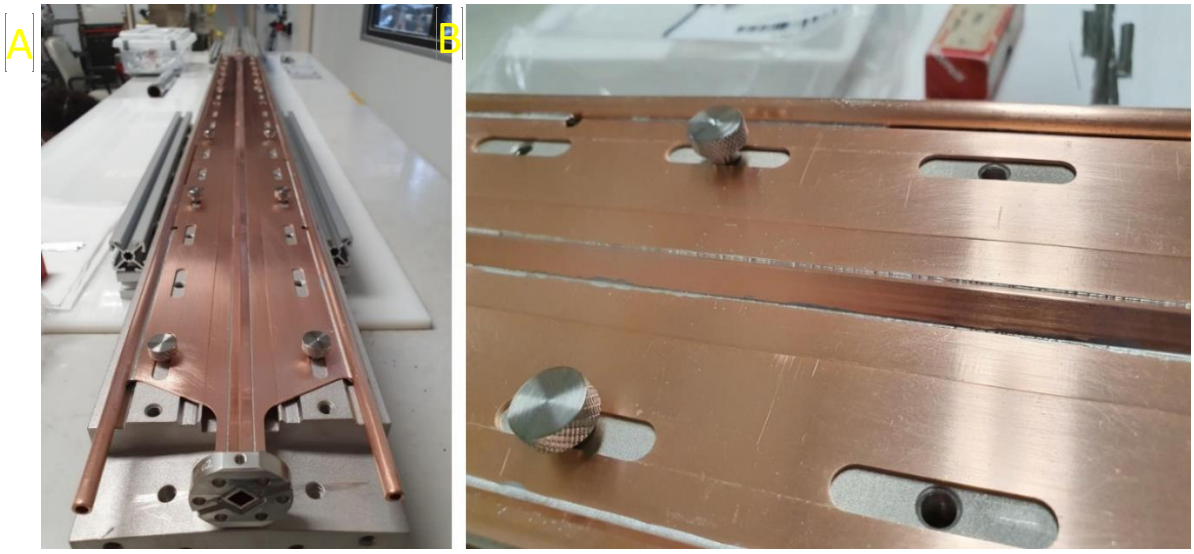
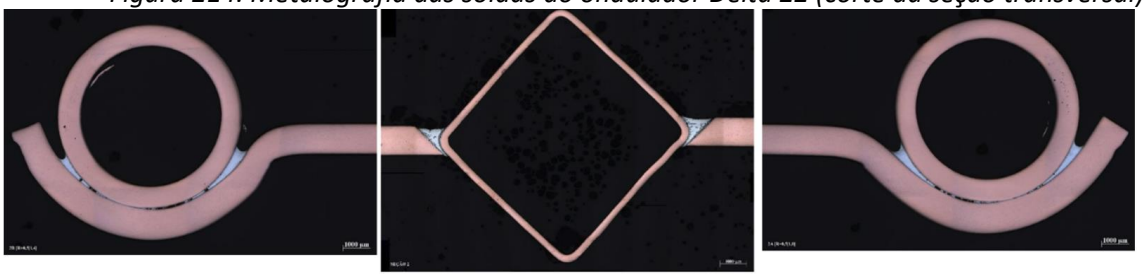
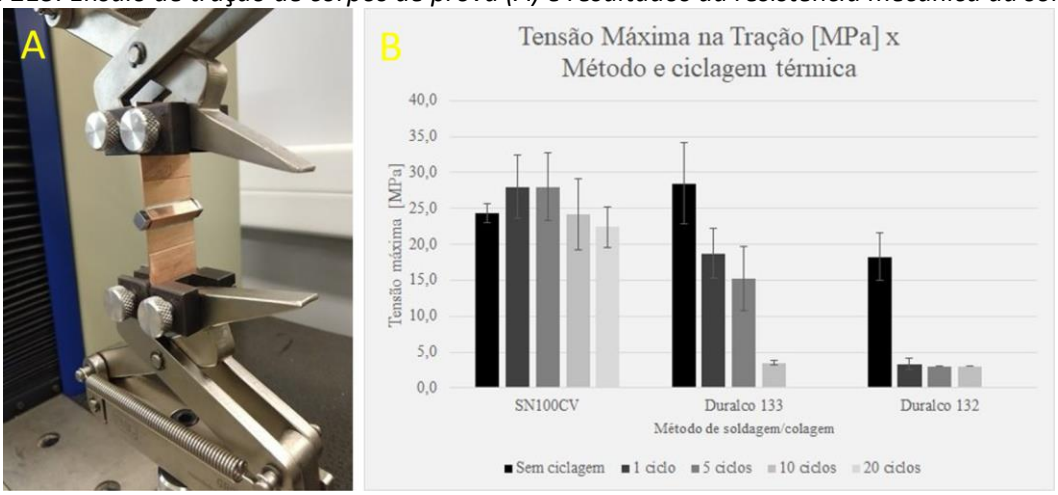


Figura 214. Metalografia das soldas do ondulador Delta 22 (corte da seção transversal)



Além da solda branda, também foi testado outro método de união das abas dissipadoras através de duas colas epóxi condutivas: Cotronics 132 e 133. Estas colas substituiriam o processo de união de solda branda e seriam uma segunda alternativa de fabricação. Diversos corpos de prova foram fabricados e um estudo de caracterização da resistência mecânica foi feito para avaliar ambos os métodos de manufatura. Os corpos de prova foram submetidos a testes de ciclagem térmica e testes de tração (Figura 215).

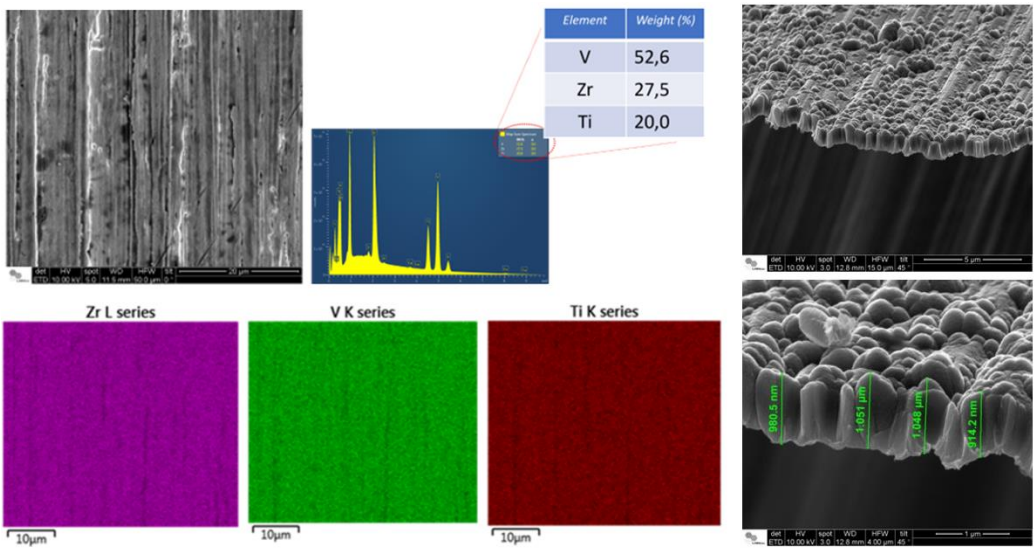
Figura 215. Ensaio de tração de corpos de prova (A) e resultados da resistência mecânica da solda (B)



Os resultados demonstraram uma queda significativa na resistência mecânica das colas após os processos de ciclagens térmicas que simularam as ativações de NEG, sendo então descartadas para a produção das câmaras do ondulador Delta 22. Embora não sejam apropriadas para esta aplicação, o composto fica caracterizado como uma possível alternativa para aplicações que não envolvam ciclagens térmicas.

O processo de deposição NEG foi executado em câmaras protótipos de 2600 mm usando dispositivos especiais para garantir as tolerâncias dimensionais e o alinhamento durante o processo de deposição do filme. Várias deposições foram feitas com essa montagem e o processo se mostrou repetitivo. Desta forma, uma parametrização preliminar do processo foi estabelecida. A validação das deposições foi feita pela caracterização do filme depositado em amostras, onde foram avaliadas a morfologia, espessura e composição química através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de raios-X por energia dispersiva (EDS) tanto para o Delta 22 como para o Delta 52 (Figura 216).

Figura 216. Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de raios-X por energia dispersiva (EDS) do filme NEG depositado



No final deste ano, foram iniciadas inspeções dimensionais e o desenvolvimento de novos gabaritos de transporte e de testes passa-não-passa para a validação das câmaras fabricadas. Para 2022, prevê-se finalizar a caracterização dimensional das câmaras do Delta 22, realizar deposição NEG em protótipos funcionais e fabricar a câmara final a ser instalada com o ondulador que será usado pela linha Carnaúba, assim como os componentes do trecho reto.

Automação para onduladores Delta

As principais atividades de automação desenvolvidas estão relacionadas ao primeiro ondulador Delta a ser instalado no Sirius, para a linha Sabiá. A especificação funcional do dispositivo, projeto elétrico e montagem do painel de controle foram finalizados em 2021. A adequação de um painel protótipo para uso dedicado a testes está em andamento e os programas do CLP, da IHM (Interface Homem-Máquina) local e o IOC EPICS para controle remoto, a partir da sala de controle do acelerador, estão em desenvolvimento. Este projeto é fruto de uma colaboração com a empresa Rockwell Automation.

Também foram realizados testes para validação da movimentação e otimização da sintonia do controlador com os onduladores de período 22 mm e 52,5 mm e o software para a operação da mesa de montagem de sub-cassetes foi modificado conforme novas especificações de requisitos. A Figura 217 e a Figura 218 apresentam, respectivamente, a montagem final da automação e o rack de controle do ondulador para a Linha Sabiá. A Figura 219 apresenta as telas da interface de controle do ondulador (IHM) em fase final de desenvolvimento.

Figura 217. Protótipo do Delta com montagem da automação final

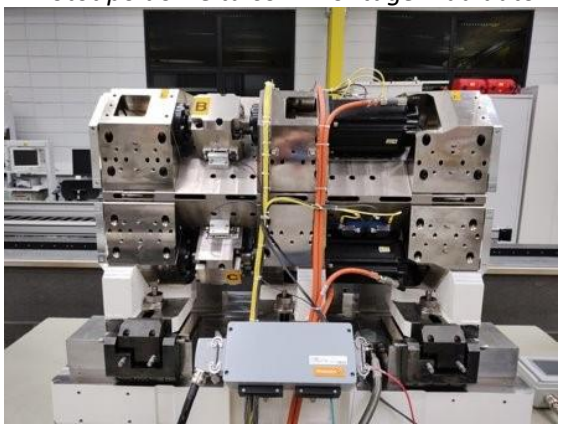


Figura 218. Rack de controle do ondulador para a Linha Sabiá

Figura 219. Exemplos de telas de IHM em fase final de desenvolvimento

O projeto de *hardware, software* e *firmware* para o sistema de *feed-forward* do ondulador Delta basea-se em um "sniffer" para os *encoders* de posição absoluta deste dispositivo. O hardware é baseado na *BeagleBone-Artificial-Intelligence* e conta com quatro núcleos de tempo real junto com dois cores que rodam linux embarcado. O objetivo é obter a posição instantânea de cada cassete, com menor latência e jitter possíveis, para que sejam corrigidas as integrais de campo do ondulador e para que distúrbios na órbita sejam minimizados. Ainda com ajustes, otimizações e estudos a serem realizados prevê-se uma taxa de atualização das fontes de corrente, baseada numa tabela estática, de pelo menos 1 kHz. Este projeto avançou no último ano e já permite testes no acelerador. Os tempos de resposta esperado foram

atingidos e a comunicação com as fontes foi parcialmente testada. A Figura 220 mostra a posição absoluta de um dos cassetes durante uma varredura onde era realizada a validação do sistema e a Figura 221 mostra o hardware desenvolvido do Sirius para a correção *feed-forward*.

Figura 220. Posição absoluta de um dos cassetes durante validação do hardware e firmware.

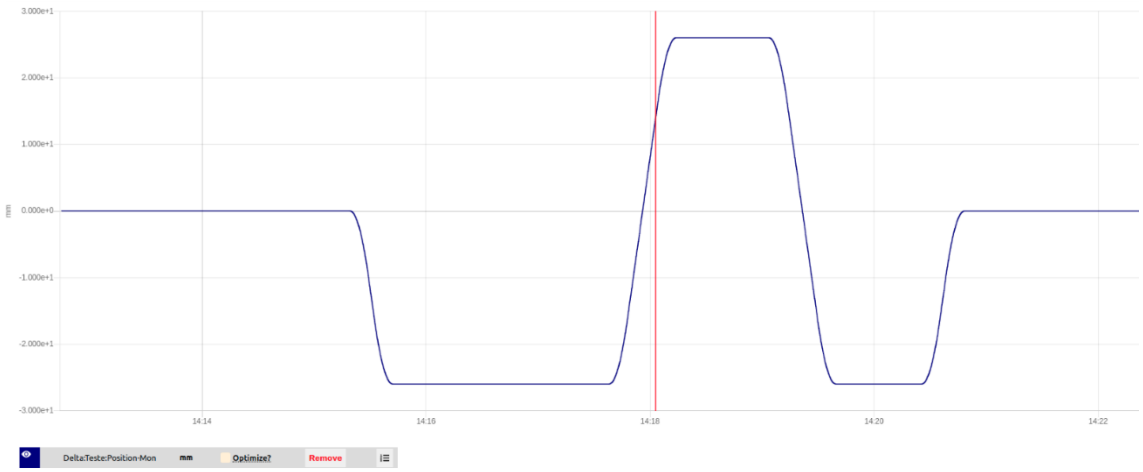
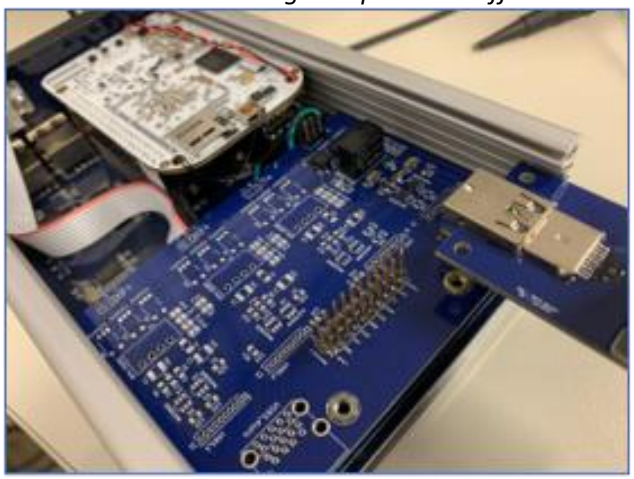


Figura 221. Hardware desenvolvido e integrado para o "sniffer" do sistema feed-forward.



Front-end máquina

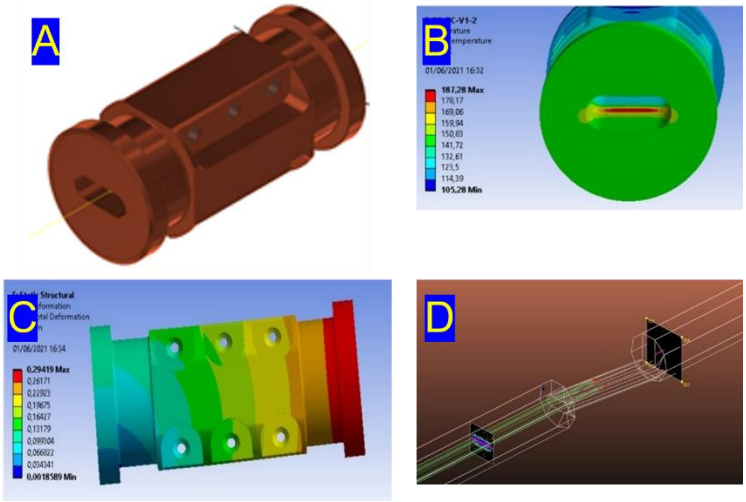
Visando a proteção do anel de armazenamento contra acidentes de vácuo nas linhas de luz e o comissionamento destas últimas, estão sendo projetados e fabricados os chamados *front-ends* máquina compostos, inicialmente, por *photon shutters*, válvulas e *bellows*. Os *photon shutters* são componentes de segurança, que quando estão fechados são responsáveis por bloquear o feixe de luz síncrotron, em caso de acidente de vácuo no front-end linha, permitindo que as válvulas fechem em segurança e

protejam, assim, o anel de armazenamento. Quando abertos, os *photon shutters* atuam como máscaras fixas, limitando o tamanho do feixe de luz que vai para as linhas.

Além disso, foi concluído o projeto dos *photon shutters*, que serão instalados no *front-end* de linhas de luz de ID (dispositivos de Inserção). Atualmente, os componentes estão em processo de compras ou fabricação, visando a instalação de um primeiro conjunto no primeiro trimestre de 2022.

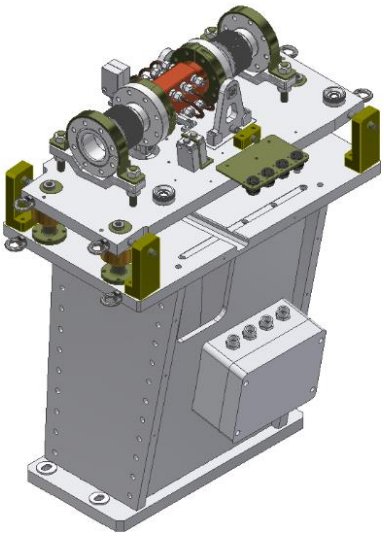
O *photon shutter* para os *front-ends* de linhas de luz do dipolo central (BC) está em fase de desenvolvimento. Esse componente precisará absorver uma potência de feixe de aproximadamente 1,5 kW e foi utilizado como base o projeto de uma máscara de cobre que está em operação no anel de armazenamento do Sirius. O design mecânico foi modificado com intuito de atender a demanda térmica. Simulações termo-estruturais (Ansys) e análise de fótons refletidos (Synrad+) foram conduzidos e são apresentados na Figura 222.

Figura 222. PSBC: a) Desenho Mecânico; b) Análise Térmica; c) Análise Estrutural; d) Synrad+



A Figura 223 apresenta o projeto em desenvolvimento do conjunto completo com os suportes, *bellows* e cilindros de acionamento. Atualmente, está sendo realizada a cotação e especificação técnica dos componentes.

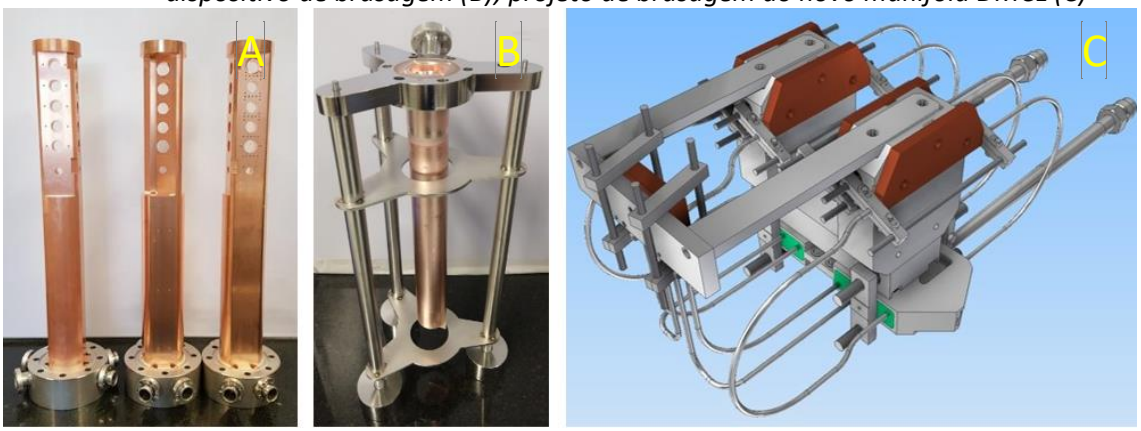
Figura 223. Projeto Mecânico do Photon Shutter de BC com suportes e bellows



Componentes para as linhas

Em 2021, foram brasados mais oito dispositivos visualizadores de feixe (DVFs) para as novas linhas de luz do Sirius (Figura *224*A); foi desenvolvido o processo de brasagem entre glidcop e aço inoxidável, e produzidas duas unidades de espelhos para as linhas Cedro e Imbuia (Figura *224*B); foram projetados, ainda, novos dispositivos e iniciadas as brasagens para o novo manifold DMCL das linhas Quatis e Sapucaia (Figura *224*C); e realizados os testes de solda por FSW dos *front-ends* para a soldagem dos componentes.

Figura 224. dispositivos visualizador de feixe (DVFs) (A); espelho para as linhas Cedro e Imbuia em seu dispositivo de brasagem (B); projeto de brasagem do novo manifold DMCL (C)



Além disso, foi desenvolvido o processo de limpeza de tranças de cobre para utilização nas câmaras de espelhos (pré e pós deposição de ouro), e iniciado um estudo para avaliar a corrosão a longo prazo da liga SN100CV em soldas que apresentam interface com água, para possíveis aplicações futuras.

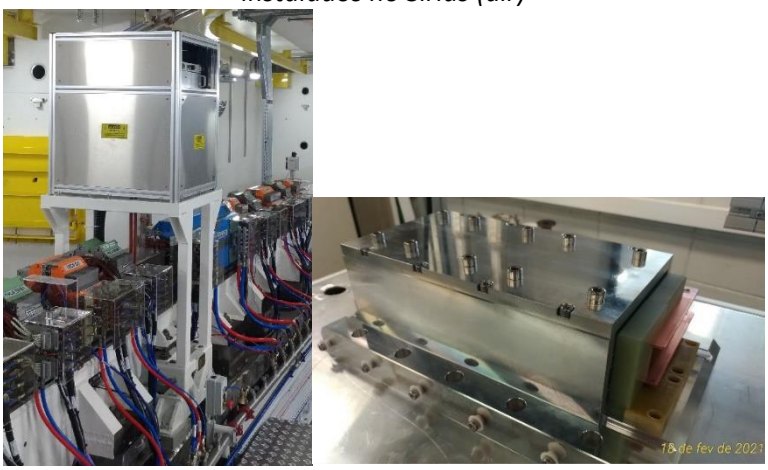
Sistemas de injeção e sistemas pulsados do Sirius

Ao longo de 2021, destacam-se duas importantes atividades no âmbito do sistema de injeção e sistemas pulsados do Sirius. No início do ano, foi instalado o Pinger vertical, um magneto pulsado utilizado para estudar a dinâmica não-linear do feixe de elétrons no Sirius. Também foi instalada uma bancada de testes do canhão de elétrons, que deverá ser de grande valia para testes de sistemas reservas e para estudos com um canhão de elétrons.

Pinger vertical

Pingers são magnetos pulsados utilizados para estudos da dinâmica do feixe de elétrons no regime não-linear. No Sirius, o *kicker on-axis* de injeção é utilizado como *pinger* horizontal. O *pinger* vertical é um *kicker* de 30 cm de comprimento que produz um campo dipolar horizontal produzindo uma distorção vertical na trajetória dos elétrons. O pulso de 1,5 µs é menor do que o período de revolução dos elétrons, de forma que estes veem a perturbação apenas uma vez. O *pinger* é composto pelo magneto e pela fonte de alta tensão pulsada, e foram montados, caracterizados em bancada e instalados no anel de armazenamento em abril de 2021 – conforme pode ser observado na Figura 225.

Figura 225. Pinger vertical posicionado na bancada de caracterização (esq); conjunto pinger e pulsador instalados no Sirius (dir)

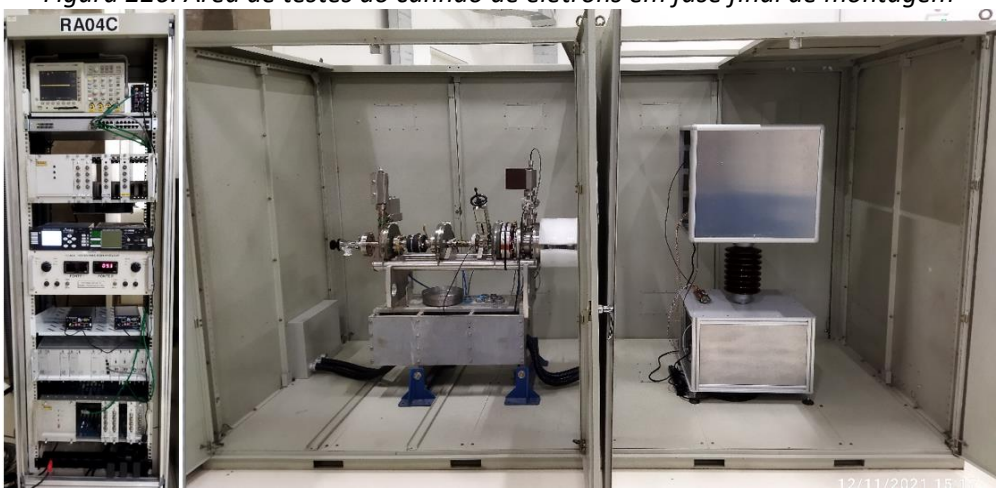


Bancada de testes do canhão de elétrons

Uma bancada de testes de canhão de elétrons foi projetada e encontra-se em fase final de montagem. A bancada será utilizada para testes de eletrônicas auxiliares reservas do canhão de elétrons do linac do Sirius e para estudos com o canhão. Não havendo um canhão reserva para o Sirius, foi utilizado na bancada aquele que estava em operação no UVX, construído no LNLS no final dos anos 1980. A bancada foi instalada dentro de um dos antigos armários de moduladores do linac do UVX, ao qual foram adicionados pontos de blindagem especificados pela Proteção Radiológica. A bancada foi posicionada dentro no hall de klystrons do linac do Sirius (
Figura *226*). O canhão foi adaptado para operar com as eletrônicas e fontes do canhão do Sirius. O projeto prevê a operação remota de forma a possibilitar a utilização da bancada para estudos com o feixe do

canhão. A expectativa é de que os estudos permitam aumentar a confiabilidade e a estabilidade do canhão do Sirius, com impacto positivo sobre a operação.

Figura 226. Área de testes do canhão de elétrons em fase final de montagem



Cavidades Supercondutoras

Ao longo do ano de 2021 continuaram os preparativos para a instalação das cavidades supercondutoras do anel de armazenamento. Uma das cavidades deverá chegar ao CNPEM no início de 2022 e será armazenada no hall experimental do Sirius, até sua instalação no anel. A segunda cavidade está em processo de montagem na Alemanha, e o teste de aceitação na fábrica está previsto para ser realizado no primeiro semestre de 2022. A valve box e as linhas de transferência multicanal, que são os componentes responsáveis pelo controle e alimentação de hélio líquido para os criomódulos[108], estão prontas e armazenadas na fábrica (Figura 227).

Figura 227 Valve box e os racks de controle dos criomódulos do Sirius (esq); primeiro criomódulo sendo embalado para envio para o CNPEM (dir)

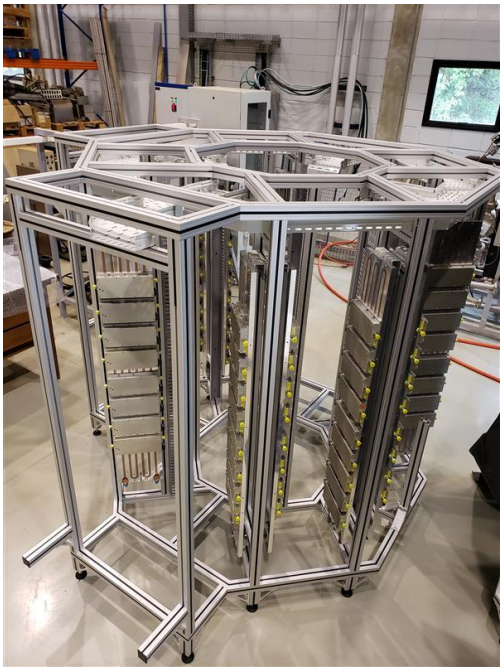
108 Criomódulo é a estrutura criogênica que acomoda a cavidade.

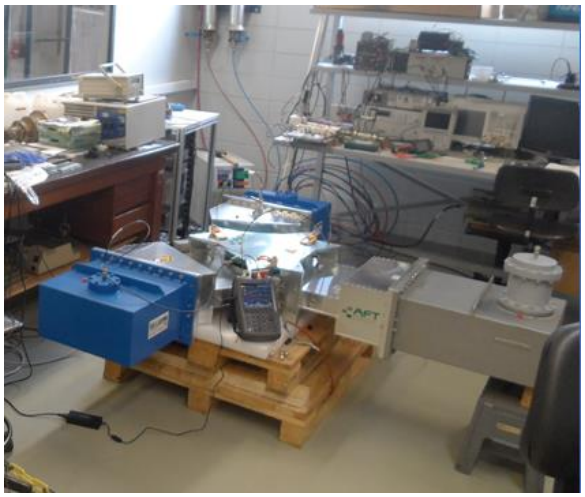
A aquisição da planta criogênica foi contratada no primeiro semestre deste ano, havendo uma previsão de que a instalação e o comissionamento da planta sejam realizados nos primeiros meses de 2023. Após o comissionamento da planta, está prevista a instalação das cavidades gerando uma parada longa na operação do Sirius. A previsão inicial da Research Instruments, fabricante das cavidades, é de uma parada de 4 meses para a instalação e comissionamento dos dois criomódulos. Por ocasião da instalação das cavidades, duas plantas de RF deverão estar prontas para instalação, assim como toda a infraestrutura necessária para recebê-las.

A planta de RF é composta pela cavidade aceleradora e pelo sistema de RF responsável por fornecer energia para gerar o campo elétrico acelerador e manter o feixe de elétrons armazenado. O sistema de RF compreende um conjunto de amplificadores de alta potência, um sistema de controle que mantém a estabilidade do campo elétrico no interior da cavidade, linhas de transmissão e sistemas de proteção. Uma planta de RF está em operação no Sirius, disponibilizando até 120 kW de potência em 500 MHz para uma cavidade aceleradora de cobre de 7 células. Esta planta deverá sofrer algumas modificações para as instalações das cavidades supercondutoras. A potência de RF da planta é obtida pela combinação de torres amplificadoras de 60 kW, e duas delas são utilizadas para alimentar a cavidade atual. Para facilitar a instalação e movimentação dessas torres, foram introduzidas algumas modificações no projeto das torres já construídas. O projeto foi finalizado e duas novas torres começaram a ser montadas na área de testes do laboratório de RF, com previsão do término de montagem para o início de 2022 (Figura *228*).

Essas modificações incluem pequenas mudanças na estrutura mecânica, no sistema de intertravamento e nas eletrônicas de aquisição de medidas de corrente e potências de RF, corrigindo problemas encontrados nas duas primeiras torres. Além disso foi iniciada a montagem do segundo sistema de LLRF, o sistema de controle que controla a amplitude e a fase do campo elétrico no interior da cavidade de RF e a sintonia da cavidade. Os sistemas de guias de onda e os circuladores de alta potência para a instalação desse conjunto de duas torres amplificadoras por planta estão armazenados na sala de RF do Sirius.

Figura 228. Montagem das novas torres na área de RF (esq); testes do circulador no laboratório de RF (dir)





Novos amplificadores

Uma outra frente de trabalho foi o desenvolvimento de um novo módulo amplificador e de divisores e combinadores de RF para as quatro últimas torres do sistema de RF do anel. A motivação para esses desenvolvimentos é a obsolescência do transistor utilizado nos módulos já em operação, que foram selecionados em 2012 nos primórdios do projeto. Em 2020, com o Sirius já em comissionamento, um novo transistor foi lançado com características muito mais interessantes para a aplicação em amplificadores de potência na faixa de UHF: maior potência de saída, maior ganho e maior eficiência. Assim, foi iniciado o desenvolvimento de um novo módulo a ser utilizado nas quatro últimas torres amplificadoras. Utilizando protótipos montados no próprio laboratório, o módulo foi otimizado para operação em 800 W, atingindo 880 W em 1dB de compressão. A comparação das características dos dois módulos pode ser observada na Tabela 3.

Tabela 3. Comparação entre módulos amplificadores

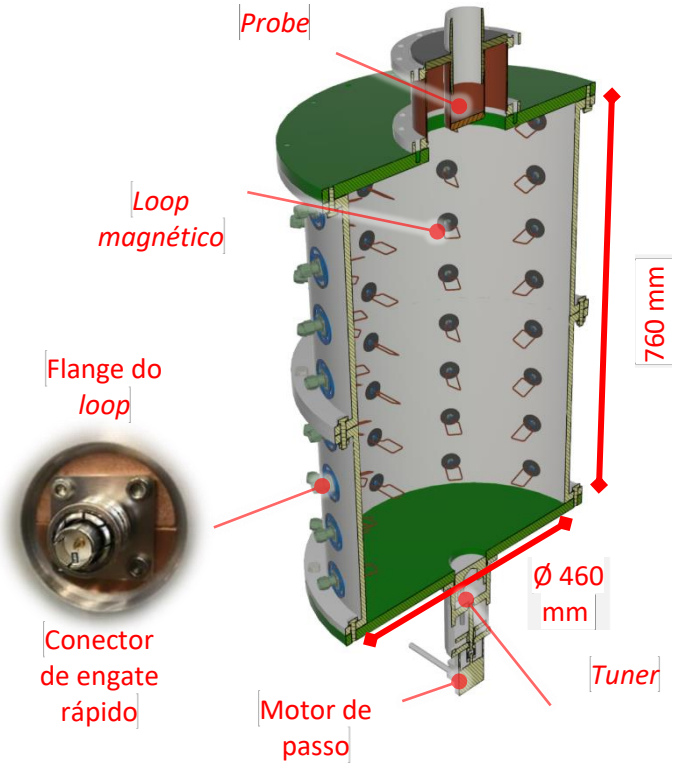
Modelo	Torres 1 a 4	Torres 5 a 8
P_n - Potência @0,5dB compr. (W)	530	830
Transistor	BLF578	BLF978p
Ganho @ P_n (dB)	17	22,4
Eficiência @ P_n (%)	60	68

O protótipo permitiu validar as simulações eletromagnéticas e térmicas realizadas e levou a modificações destinadas à redução da temperatura dos componentes críticos nessas condições de operação (Figura 229). As simulações e caracterizações em bancada também desencadearam mudanças no projeto da blindagem e na refrigeração dos módulos. Essa nova blindagem está em fase final de projeto mecânico. Diferentemente das torres anteriores, não serão utilizadas as barras dissipadoras nas quais são fixados os módulos para serem refrigerados. No novo conceito, a própria blindagem será refrigerada, otimizando a refrigeração do transistor e da carga resistiva do circulador.

Figura 229. Protótipo do novo módulo amplificador (dir); Nova versão (esq)

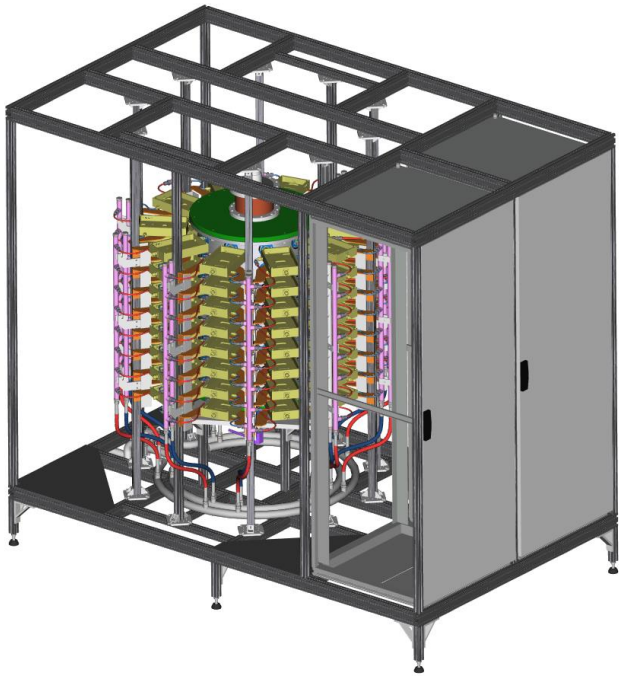
A maior potência dos novos módulos levou à necessidade de mudar o conceito da combinação dos módulos utilizado nas quatro primeiras torres e na torre do *booster*. O objetivo é evitar a utilização de cabos na saída dos módulos, pois a maior potência requer a utilização de cabos bem menos flexíveis. Uma solução utilizada em vários amplificadores desenvolvidos em outros laboratórios e por empresas que atuam na área é a utilização de uma cavidade ressonante para combinar a potência dos módulos ou de conjuntos de módulos. Buscando uma solução semelhante, foram realizados estudos de uma cavidade combinadora para as novas torres (Figura 230). A cavidade foi desenhada para combinar 80 módulos amplificadores, o número necessário para entregar até 64 kW de potência na saída da torre. O projeto de RF foi otimizado, incluindo antenas e êmbolo de sintonização. Antenas para o acoplamento do módulo à cavidade combinadora foram simuladas e prototipadas. Um projeto mecânico preliminar foi realizado e um projeto executivo da cavidade está em andamento para que um protótipo possa ser produzido. Também estão sendo desenvolvidos divisores de potência para os estágios de alimentação dos módulos. Dado o ganho do módulo, é necessária uma potência máxima da ordem de 5 W na entrada para se atingir os 800 W na saída. Um divisor de potência 1:8 foi projetado e validado em bancada.

Figura 230. Corte da cavidade combinadora (CaCo) para as novas torres amplificadoras.



Um projeto mecânico da nova torre, utilizando os novos conceitos, está em andamento. Um desenho preliminar é mostrado na *Figura 231*, que apresenta um estudo do posicionamento da cavidade combinadora e dos módulos, dos sistemas de refrigeração, e do posicionamento das fontes de alimentação e dos painéis elétrico e de intertravamento. O desenho dos novos módulos prevê a utilização de conectores de engate rápido para a RF e para a hidráulica, de modo a facilitar a instalação dos módulos no combinador. O mesmo conceito de combinação de conversores AC/DC será utilizado, uma vez que garante modularidade e redundância na alimentação dos módulos. Uma parceria está sendo firmada com uma empresa visando agilizar o desenvolvimento e a produção dessas torres para que possam estar disponíveis quando ocorrer a instalação das cavidades.

Figura 231. Estudos preliminares dos novos amplificadores de 60kW, mostrando a cavidade combinadora, os módulos e o sistema de refrigeração



Cavidade harmônica

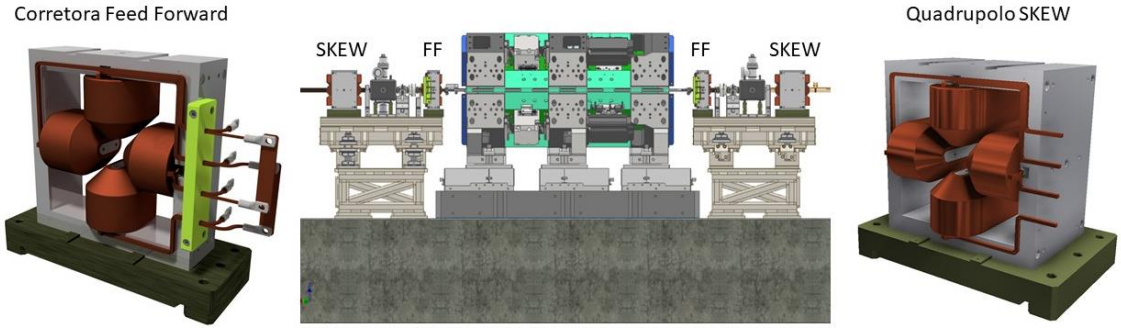
Foram realizados estudos para definir as características de uma cavidade harmônica que possa ser utilizada no Sirius. Para a tensão de aceleração de projeto do sistema de RF principal, 3 MV, a cavidade harmônica deve ser capaz de fornecer uma tensão integrada da ordem de 1 MV. Tipicamente, as cavidades harmônicas supercondutoras existentes operando em 1,5 GHz operam com tensões da ordem de 500 kV, de forma que duas cavidades seriam necessárias. Foram realizados estudos de um modelo utilizado no SLS e no Elettra, composta por duas cavidades passivas com modos de ordem superior amortecidos acomodadas em um mesmo criomódulo. Uma solução semelhante supriria perfeitamente as necessidades do Sirius.

Corretoras Pré e Pós onduladores

Em 201, foi realizado o projeto de desenvolvimento de corretoras do tipo *Feed Forward*. Essa corretora será instalada nos trechos retos sobre a câmara de transição nos berços pré e pós ondulador, tendo como objetivo corrigir órbita vertical e horizontal do feixe. Essas corretoras ainda não foram fabricadas e o projeto inicial pode ainda ser modificado.

O projeto do Quadrupolo Skew, ainda em fase de desenvolvimento, corrige erros de acoplamento gerados no feixe pelo ondulador, esse eletroímã será instalado nas posições mostradas na Figura 232.

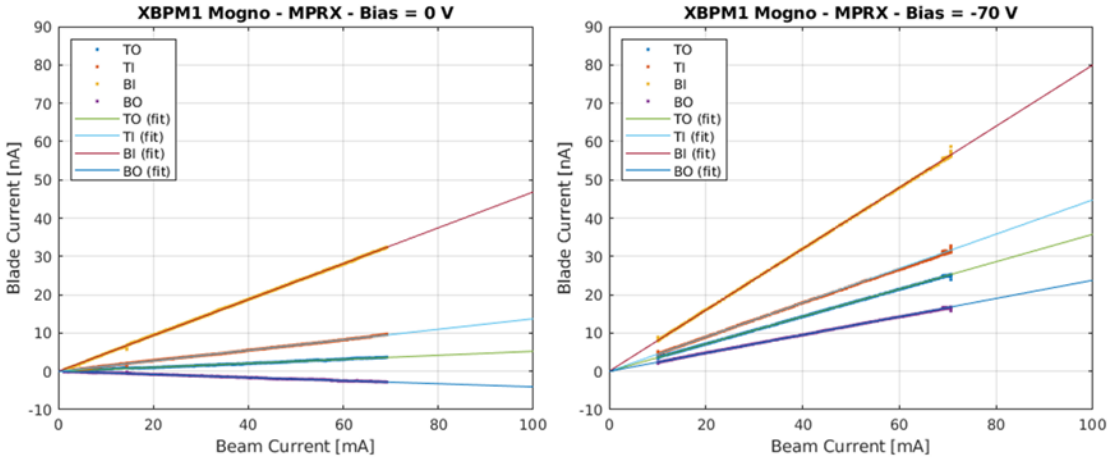
Figura 232 – Corretoras Feed Forward e quadrupolo SKEW instaladas nos berços pré e pós ondulador.



Diagnóstico de Feixe

Na área de diagnóstico e instrumentação de feixe foram realizados melhoramentos, instalações e testes com o sistema de monitores de posição de feixe de raios-X, chamados XBPMs. Cada sensor XBPM possui quatro lâminas dispostas ao redor do feixe, tal que cada uma forneça uma corrente elétrica para seu respectivo canal eletrônico proporcional à quantidade de fótons incidentes extraindo elétrons das lâminas. A intensidade do feixe de fótons, por sua vez, é proporcional à corrente do feixe de elétrons armazenado no anel. A partir dessa premissa, foi investigado um comportamento anormal no primeiro XBPM da linha Mogno. Para uma antena, havia leitura de corrente negativa, a qual diminuía cada vez mais com o aumento da intensidade do feixe. Reuniões com experts de outros aceleradores indicaram comportamentos semelhantes em equipamentos semelhantes de outras máquinas. Com a suspeita de que os elétrons arrancados de uma lâmina estavam sendo direcionados para outra, testou-se a implementação da tensão de bias. Aplicando um potencial elétrico negativo em todas as lâminas, essas passam a repelir qualquer elétron que se aproxime, sem afetar em nada o comportamento dos fótons incidentes. Conforme *Figura 233*, pode-se observar a eficácia da tensão de bias, que mitigou o comportamento indesejado da lâmina BO, tornando a leitura de corrente positiva.

Figura 233. Leituras de corrente em cada uma das 4 lâminas do XBPM1 da linha Mogno, em função da corrente do feixe armazenado no anel: sem bias (esq) e com bias de -70 V (dir)



Até então, a transmissão dos sinais provenientes dos XBPMs já instalados para as eletrônicas de aquisição era realizada por longos cabos triaxiais comerciais instalados de maneira provisória. Em 2021, concluiu-se a especificação de cabos que atendessem a uma banda passante de transmissão mais adequada, os quais foram fabricados e instalados nas linhas Mogno e Manacá, assim como mostrado pela *Figura 234*.

Figura 234. Instalação de cabos definitivos de XBPM

Além de sensores XBPM, o sistema de correção de órbita rápido (FOFB para *fast orbit feedback system*) teve importantes avanços no último período de 2021. Tal sistema visa corrigir perturbações de órbita no feixe de origens externas, até frequências da ordem de 1 kHz, como: vibrações mecânicas, harmônicos de 60 Hz provenientes da rede elétrica, distorções de órbita devidas às variações de parâmetros de dispositivos de inserção etc. Como estas perturbações podem provocar oscilações na posição do feixe até maiores que o tamanho transversal do próprio feixe de elétrons, a mitigação dessas oscilações contribuirá diretamente para qualidade do feixe entregue para as estações experimentais. Como a imagem formada da amostra de um experimento da linha geralmente representa a soma das imagens recebidas ao longo de diversas voltas do feixe durante o tempo de exposição, um feixe de elétrons oscilante deteriora a qualidade da imagem da amostra.

Para implementação do sistema FOFB no Sirius, os racks de BPM são interligados por fibra ótica, os cálculos de correção são calculados internamente às FPGAs e, diretamente dos racks, saem os sinais de correção para as corretoras rápidas – eletroímãs próprios para a frequência de atuação do sistema. Ao longo de 2021, diversos componentes de hardware, lógica programável e software do FOFB foram desenvolvidos, validados e instalados. Dentre os marcos mais relevantes estão:

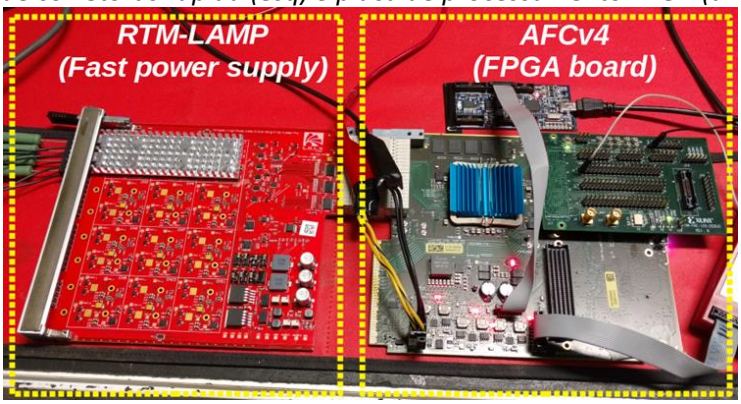
- A implementação completa em FPGA da rede determinística em fibra ótica utilizando módulos, em colaboração com o Diamond Light Source, atingindo latência de 10 microssegundos, contando com instalação final de toda a infraestrutura de fibras óticas;
- Validação de protótipo completo da fonte de corretora rápida (RTM-LAMP) em formato MicroTCA.4 em maio de 2021 e envio para produção final de 24 unidades em novembro de 2021 após correções no projeto. Todas as especificações foram atingidas, tais como banda passante de

10 kHz para pequenos sinais, latência inferior a 5 us. Os resultados foram publicados nos anais da conferência IPAC 2021[109];

- Aquisição das 24 placas FPGA (AFCv4) necessárias para implementação dos controladores da correção de órbita rápida, após trabalho conjunto com o fabricante para implementar customizações no hardware da placa.

A **F***igura 235* mostra algumas das placas eletrônicas pertencentes ao sistema FOFB: à esquerda, fonte de corretoras rápidas de órbita, RTM-LAMP; a direita, placa FPGA versão AFCv4, onde se implementa o controlador da correção de órbita rápida.

F*igura 235. Fonte de corretoras rápida (esq) e placa de processamento FPGA (dir) do sistema FOFB*



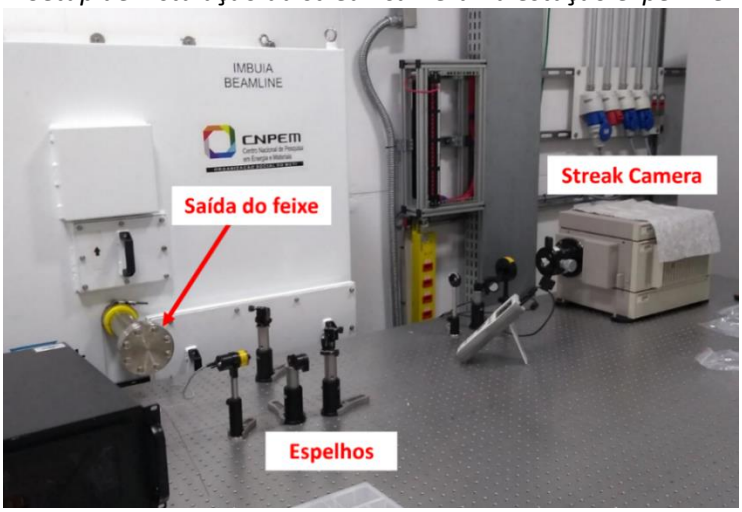
Em 2021, foi finalizada a especificação, compra, fabricação e instalação de todas as 240 unidades de cabos que conectam as fontes aos eletroímãs, totalizando aproximadamente 6 quilômetros de cabos tipo PP de duas vias, correspondentes à todas 8 corretoras rápidas por setor do anel, bem como 4 cabos extras para futuros upgrades. A *Figura 236* mostra alguns estágios da fabricação e instalação de cabos para conexão entre fontes e corretoras do sistema FOFB.

Figura 236. Fabricação e instalação de cabos para conexão entre fontes e corretoras do sistema FOFB

109 A. F. Giachero, G. B. M. Bruno, L. M. Russo, and D. O. Tavares, “Fast Orbit Corrector Power Supply in MTCA.4 Form Factor for Sirius Light Source”, in Proc. 12th Int. Particle Accelerator Conf. (IPAC'21), Campinas, Brazil, May 2021, pp. 4307-4310. doi:10.18429/JACoW-IPAC2021-THPAB257

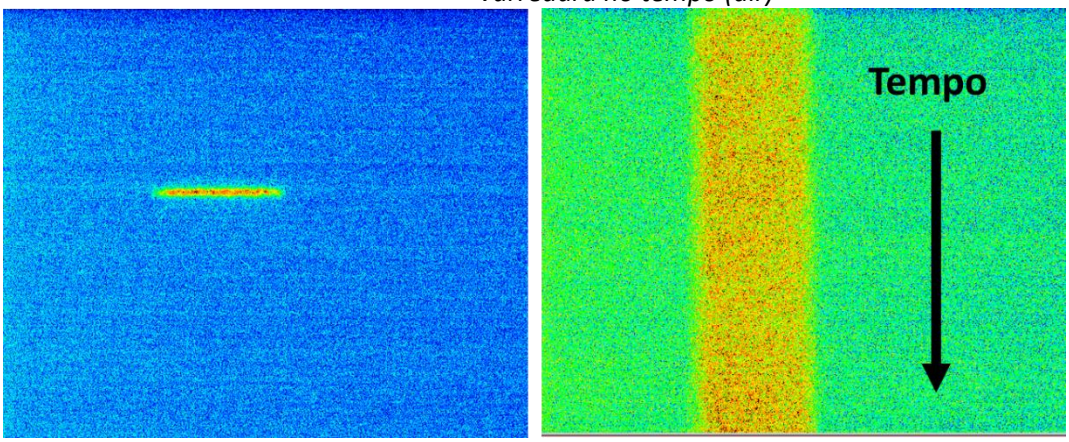
Um dos importantes equipamentos de diagnóstico que ainda não havia sido instalado no acelerador é a *streak camera*. Tal equipamento é capaz de medir o tamanho longitudinal (ou comprimento, ou tamanho temporal) dos pacotes de elétrons através da luz visível extraída dos pulsos de luz síncrotron da linha. A *streak camera* que será utilizada no Sirius foi reaproveitada do antigo acelerador do LNLS, o UVX. Dentre as adequações e recalibração, foi realizada a troca da frequência de operação para compatibilização com a frequência de RF do Sirius, 500 MHz. Após o recebimento do equipamento no Brasil, foram realizados testes de validação do dispositivo, os quais identificaram problemas em seu funcionamento – o tubo de vácuo interno ao equipamento estava danificado. O dispositivo foi enviado novamente ao Japão para reparo e, após sua chegada neste ano, foi instalado na Linha de Luz IMBUIA, com expectativa de feixe até o início de 2022. A *Figura 237* mostra o setup de instalação da *streak camera* na linha IMBUIA.

Figura 237. Setup de instalação da streak camera na estação experimenta Imbuia



A verificação do correto funcionamento do dispositivo foi feita com luz ambiente, conforme mostrado na *Figura 228*. No futuro, com a finalização da instalação da Linha de Luz CARCARA-V, a *streak camera* será movida e instalada nessa Linha, a qual será dedicada à instrumentação de feixe de luz visível.

Figura 238. Imagem da luz através da fenda de entrada da streak camera no modo estático (esq) e varredura no tempo (dir)

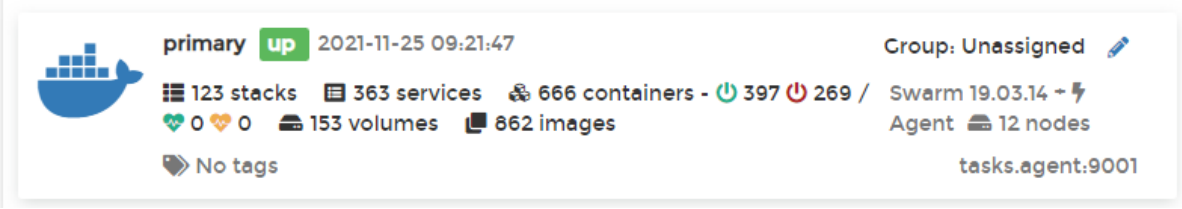


Sistema de Controle

Na área de softwares, em 2021 foi dada continuidade a implementação de novas funcionalidades e correção de bugs em diversos sistemas usados na sala de controle para a operação da máquina. Foram desenvolvidas ferramentas para agilizar e padronizar interações com o EPICS Archiver, Zabbix e outros sistemas utilizados internamente pelos times de suporte. Projetos importantes foram iniciados, como o do sistema de arquivamento dos dados da correção de órbita rápida e o software para operação das cavidades de RF supercondutoras. A implementação da redundância da rede do sistema de controle está em fase final de implementação.

Os servidores usados no sistema de controle do Sirius foram reconfigurados para melhor operação em cluster e agora atendem um maior número de casos de uso. Foram feitas melhorias em diversos containers, oferecendo um controle mais granular das aplicações aos operadores e melhor divisão da carga de trabalho entre os servidores. A *Figura 239* mostra uma visão geral do cluster do sistema de controle do Sirius, com centenas de containers ativos no final de 2021.

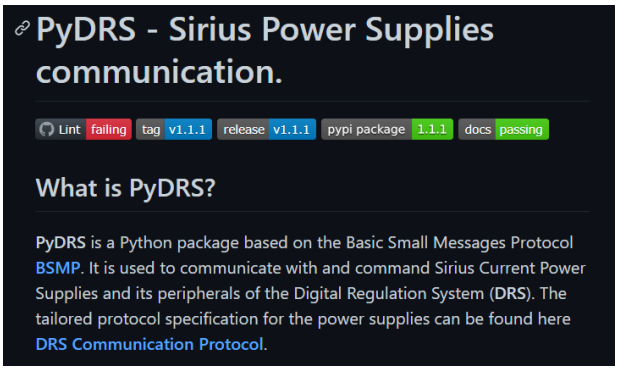
Figura 239. Visão geral do cluster do sistema de controle (25/11/2021)



Foi disponibilizada à comunidade da Engenharia e tecnologia do CNPEM e ao LNLS um sistema de leitura das variáveis do Sistema de controle EPICS do Sirius via aplicativo de mensagens instantâneas, projeto denominado EPICSTel. Os usuários podem consultar valores instantâneos de variáveis, cadastrar janelas de avisos bem como solicitar gráficos de um determinado espaço de tempo.

Em 20201, também ocorreu a atuação em conjunto com membros do grupo de Eletrônica do Sirius no projeto de reestruturação da biblioteca pyDRS para comunicações com as quase 800 fontes de corrente do Sirius desenvolvidas internamente utilizando o protocolo BSMP. Tal atividade está em andamento. A *Figura 240* mostra a biblioteca pyDRS assim como em novembro deste ano.

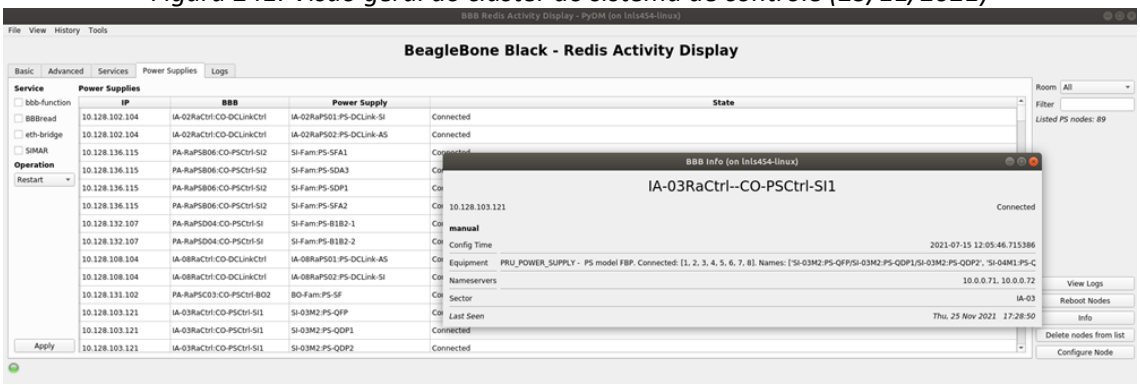
Figura 240. Visão geral do cluster do sistema de controle (25/11/2021)



Atualizações na versão do sistema de arquivamento "EPICS Archiver" foram sincronizadas com a última release estável publicada pelos desenvolvedores. Containers Docker foram reestruturados aumentando a confiabilidade e permitindo a deploy do sistema em modo cluster, onde diversas instâncias do "EPICS Archiver" dividem a carga de trabalho. Também foram realizadas melhorias no sistema de notificação de eventos de PVs EPICS por e-mail, tornando-o mais extensível e simplificando a implementação de novas regras para notificação. Além disso, foram feitas melhorias no *front-end* do sistema, que agora armazena históricos de eventos.

O sistema de controle do Sirius é composto por centenas de nós computacionais, baseados no sistema embarcado BeagleBone Black (BBB). Como ferramenta para monitoramento desses dispositivos, o projeto BBBread foi aprimorado. As principais funcionalidades são coleta de dados, atuações remotas e disponibilização visual dessas informações para ampliar a confiabilidade do sistema bem como agilizar na identificação de problemas. A *Figura 241* mostra a interface para gerenciamento de BBBs do Sistema de Controle do Sirius.

Figura 241. Visão geral do cluster do sistema de controle (25/11/2021)



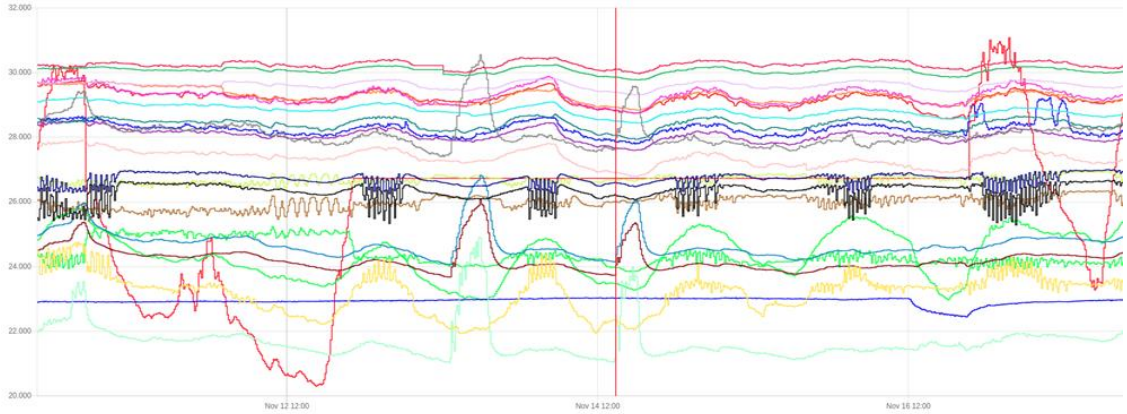
Atualmente, está em desenvolvimento o projeto de redundância de Hardware da rede de comunicação do sistema de controle, para ampliar a confiabilidade e facilitar futuras manutenções. Consiste em melhorar a segurança do sistema e reduzir o tempo de recuperação, tendo uma segunda unidade "SERIALxxCON" operando sempre em paralelo com a principal, monitorando-a e pronta para assumir sua função em caso de falha em poucos segundos. Além disso, a unidade secundária pode atuar como espiã

da rede serial para eventuais dificuldades de comunicação com equipamentos, por exemplo. Em bancada, o funcionamento foi validado e espera-se ter unidades operacionais nos sistemas mais críticos do Sirius para o próximo ano.

Outra facilidade implementada visando a versatilidade, unificação e agilidade de manutenção é o serviço inicial que roda na inicialização de todas as unidades BeagleBone Blacks do Sistema de Controle, independentemente de sua operação e/ou finalidade. Com apenas uma única imagem padrão, o sistema reconhece os equipamentos conectados, local de instalação e é capaz de configurar seu próprio IP (pré-definido) e *hostname*, além de lançar os serviços essenciais para cada aplicação.

Ainda relacionado ao sistema de monitoração do Sirius, o projeto SIMAR (Sistema de Monitoração e Atuação em Racks), iniciado no primeiro semestre do ano, se concretizou e teve as primeiras unidades instaladas na área de Engenharia do Sirius. O sistema de monitoramento multipropósito foi instalado em uma sala da engenharia do Sirius completa, monitorando variáveis ambientais de vários subsistemas presentes na área. Esse sistema tem o objetivo de monitorar, atuar e/ou controlar periféricos em ambientes pré-definidos. De fácil expansão, já começou a ser ampliado para demais locais do Sirius como Sala de Conectividade, Sala de RF, Sala de Fontes e outros locais pontuais do prédio. Prevê-se a monitoração e/ou atuação em todos os racks para o próximo ano. *Figura 242* mostra várias leituras de temperatura em locais diferentes do prédio, na região de engenharia. A *Figura 243* mostra a interface gráfica para o projeto SIMAR.

Figura 242. Variáveis de processo EPICS com leituras de temperaturas via Projeto SIMAR em diversas áreas de engenharia e prédio do Sirius



Como um importante módulo adicional para o sistema SIMAR, foi desenvolvido um novo módulo que será de grande importância para racks refrigerados a água, um sistema de detecção de vazamentos. De baixo custo quando comparado com soluções comerciais, se baseia no princípio de impedância de um sensor capacitivo de placas paralelas. Com alguns cabeça-de-série já fabricados, estuda-se a mecânica final para futura instalação em racks da Sala de Fontes do Sirius. A *Figura 243* detalhes desta eletrônica e seu receptáculo.

Figura 243. Eletrônica de detecção de vazamento do projeto SIMAR e seu receptáculo

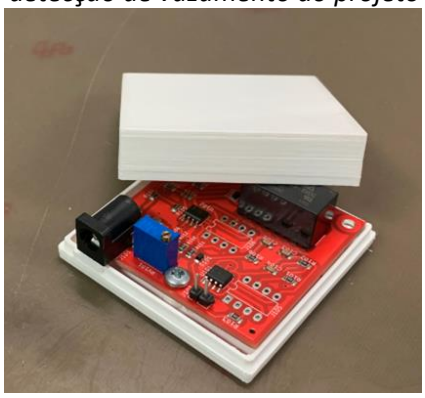
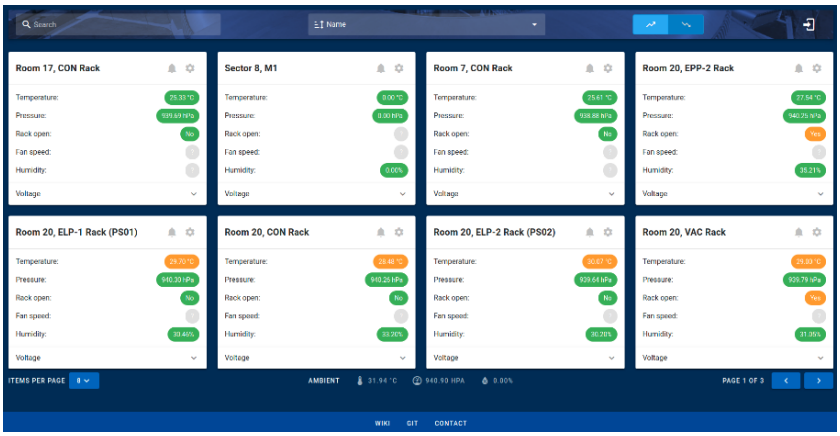


Figura 244. Interface gráfica desenvolvida para o projeto SIMAR



Fontes de Corrente

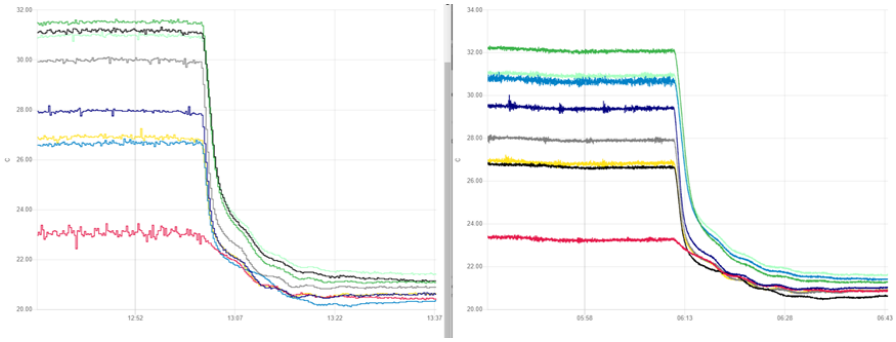
A regulação da corrente nos eletroímãs fornecida pelas fontes de corrente do Sirius, o monitoramento de suas variáveis de operação, tais como correntes, tensões e temperaturas, e o acionamento de proteções (interlocks) são realizados pelo Sistema de Regulações Digital (DRS), constituídas por um conjunto de eletrônicas desenvolvidas *in-house*. Ao longo de 2021, diversas melhorias e instalações foram feitas a fim de prover novas funcionalidades, aumentar a capacidade de diagnósticos e corrigir falhas de operação. Em fontes de alta potência, foram habilitadas 14 Interfaces Homem-Máquina (IHM), permitindo operação e monitoramento local das fontes e 24 placas de memória externa (BID), que contém parâmetros de inicialização, proteção e controle, automatizando a inicialização das eletrônicas do DRS durante eventuais trocas de placas defeituosas ou testes. A *Figura 245* mostra uma Interface Homem-Máquina.

Figura 245. Interfaces Homem-Máquina habilitadas em 14 fontes do Sirius em 2021

Problemas de operação das placas de interlock (IIB) dos módulos de potência, componente constituinte do DRS, foram analisados e solucionados. Um problema de hardware consistia no acoplamento de ruídos de chaveamento no cabo de gravação JTAG e uma falha de implementação em um driver de interface I2C no firmware faziam esta placa entrar em um estado indefinido. Além disso, a comunicação via barramento CAN desta com a placa de controle (UDC) frequentemente se perdia, afetando a operação e monitoramento das fontes.

O problema de hardware foi solucionado adicionando uma placa ao frontal dos módulos de potência que curto circuita certos pinos do cabo JTAG, diminuindo o acoplamento de ruído devido à campos elétricos. O problema de firmware foi solucionado com uma nova versão após entender a origem deste – investigação iniciada em 2020. Em outros versionamentos do firmware também foi melhorada a taxa de comunicação dos dados, garantindo uma leitura de 10 Hz para todas as variáveis lidas pela placa. A *Figura 246* demonstra a melhora obtida na resolução das leituras internas das fontes após a atualização do *firmware* que possibilitou taxas de aquisição de dados de 10 Hz.

Figura 246. Taxa de comunicação das leituras da IIB antes (esquerda) e depois (direita) da atualização do firmware das eletrônicas IIB.



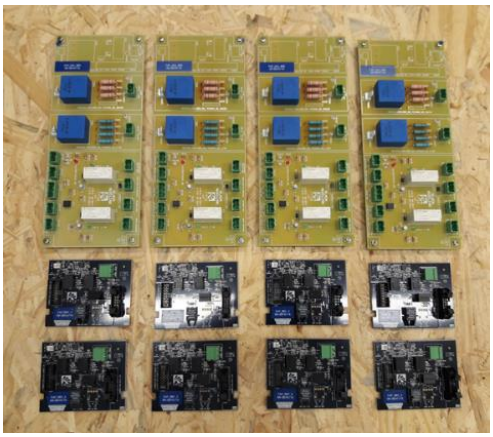
No último período as fontes comerciais de modelo TopCon (fabricante Regatron), que alimentam as fontes de alta potência do Anel, passaram por uma reforma devido às explosões em alguns capacitores, consequência de sobre temperatura de operação nos mesmos. A solução encontrada foi a adição de mais um capacitor em paralelo em todas as fontes, porém, apesar das fontes estarem funcionando initerruptamente e o problema não ter voltado a ocorrer, os capacitores ainda estavam operando em uma temperatura elevada, próximo a 80 °C, o que pode comprometer seu tempo de vida.

Para mitigar esse problema, foi feito um estudo de algumas soluções, e a que se mostrou mais viável foi a substituição das tampas superiores das fontes modelo TopCon, que, originalmente, não apresenta abertura para ventilação, por um outro modelo que conte com furos logo acima dos capacitores que sobreaquecem. Foi feito um protótipo desta nova tampa e instalado em duas das fontes. O resultado obtido foi o de diminuição da temperatura nesses capacitores em até 20 °C, validando assim a solução. As tampas definitivas serão instaladas nas fontes desse modelo no próximo período. A *Figura 247* exemplifica a modificação na tampa superior da fonte.

Figura 247. Modificação realizada em fontes comerciais para redução de temperatura.

Neste ano, também ocorreu a reforma dos módulos de potência das fontes do Sirius. Em todos os módulos foi feita a substituição de um resistor que faz parte de um circuito de leitura de tensão isolada. O resistor foi trocado por outro de modelo cuja resistência varia menos em função da temperatura, garantindo, assim, uma leitura mais precisa dessas grandezas. Outra adição foi a instalação de ferrites nos *flat-cables* internos aos módulos, o que garantiu uma menor interferência devido a ruídos de chaveamento. A *Figura 248* mostra as placas auxiliares dos módulos de alta potência do Sirius onde tais modificações foram realizadas.

Figura 248. Placas auxiliares dos módulos de alta potência do Sirius.

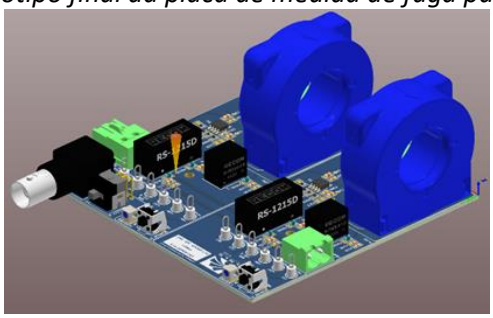


Nas fontes de alta potência do anel também foram feitas modificações nas placas de *driver* para permitir uma leitura mais precisa da temperatura das chaves via barramento I2C. Ainda, nas fontes dos dipolos e quadrupolos focalizadores do Booster foram adicionadas proteções de policarbonato sobre os bancos de capacitores, impedindo o acúmulo de sujeira e protegendo no caso de uma eventual explosão de componente. Também foram adicionados voltímetros analógicos que medem a tensão nesses bancos de capacitores, permitindo visualizar se os capacitores estão carregados ou não, aumentando assim a segurança pessoal. A Figura 249 exemplifica um dos voltímetros já instalado numa das fontes do booster.

Figura 249. Voltímetro instalado em fonte do booster

No âmbito de novos desenvolvimentos, foi iniciada a especificação e o desenvolvimento de uma nova eletrônica para leitura da corrente de fuga para o terra das fontes (placa LDC), que fornecerá uma medida mais confiável do que as soluções já instaladas, proporcionando diagnósticos mais precisos e proteções de equipamento e pessoal mais efetivos. Uma prova de conceito do circuito foi testada em campo e um protótipo do design final fabricado. Também foram realizadas caracterizações da corrente de fuga real das fontes de corrente, que permitiram a escolha adequada do transdutor da placa LDC, bem como fornecer insumos para futuros estudos das origens das fugas. O protótipo final da placa LCD é mostrado pela *Figura 250*.

Figura 250. Protótipo final da placa de medida de fuga para o terra (LDC).



Por fim, estudos de métodos para automação de medida de *ripple* de todas as fontes do Sirius foram realizados, incluindo o desenvolvimento de um design conceitual de um amplificador multicanal de baixo ruído e custo, que permitiria a execução de campanhas de medições manuais em campo em tempo hábil.

Automação e Sistemas de Intertravamento

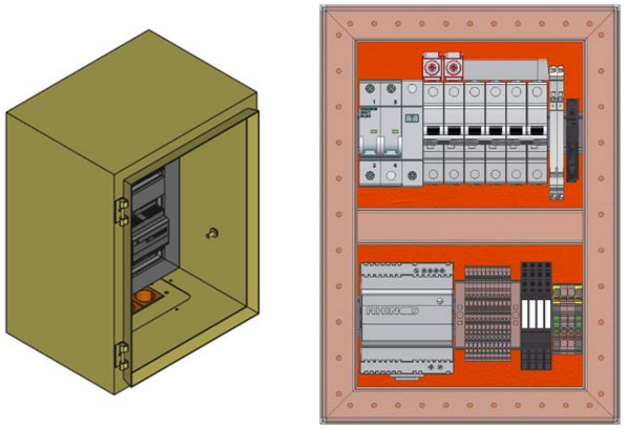
Em 2021, o projeto de automação da operação do forno utilizado para tratamento térmico de materiais que são utilizados em projetos para o Sirius foi iniciado. O Forno, apresentado na *Figura 251* possui diâmetro de 1 metro e é construído em aço inoxidável AISI 304, com paredes duplas formando uma camisa refrigerada com circulação de água, contendo conexões flangeadas, portas deslocáveis e removíveis.

Figura 251. Forno F-1000. Primeiro forno a ter o processo automatizado

O sistema de automação é formado por um controlador Honeywell UDC 3500, responsável pelo controle automático da temperatura, leitura de rotâmetros e sensores de vácuo Edward Vacuum que monitoram a pressão no interior do forno e controle de uma fonte de tensão Sorensen. A primeira versão do projeto

do painel e do esquemático elétricos foi concluída e a *Figura 252* mostra as visões de perspectiva e visão frontal do projeto 3D do painel elétrico.

Figura 252. Modelo 3D do painel elétrico (esq) e visão frontal do painel (dir)



A pressão de vácuo e o fluxo de água do forno devem se manter dentro de intervalos pré-determinados e o sistema é responsável por esta verificação, bem como pelo monitoramento e controle remoto das variáveis de processo, realizada pelo sistema de controle EPICS, padrão para controle de equipamentos no CNPEM e Sirius.

Na área de sistemas de intertravamento, após a montagem do painel principal de controle deste sistema, foi realizada a fixação do painel na sala de controle do Sirius e interligação Ethernet com o sistema de *interlock* para o início da operação do sistema de forma centralizada. A **Figura 253** mostra imagens do painel de controle do sistema de intertravamento.

Figura 253. Imagens do projeto 3D (esquerda) e fotos da montagem final do painel de controle do sistema de interlock

Um importante passo na operação do Sirius para aumento da estabilidade é a operação em modo *top-up*. Para tanto, um sistema de automação que acessa as leituras da corrente armazenada no anel via sistema de *interlock* tem que ser implementado. Um protótipo foi instalado e testado com sucesso numa das salas

de rack do Sirius. A *Figura 254* mostra a instalação provisória deste sistema de automação e a *Figura 255* mostra o projeto 3D final para a instalação junto ao rack dos DCCTs, equipamentos que monitoram a corrente dos aceleradores. Quando finalizado, tal sistema também será responsável pela contagem do tempo necessário após o desligamento dos aceleradores para liberação das portas que dão acesso ao túnel do Sirius.

Figura 254. Protótipo do sistema de leitura de corrente dos DCCT's do anel

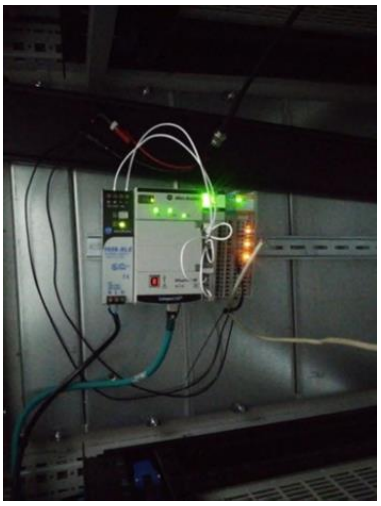
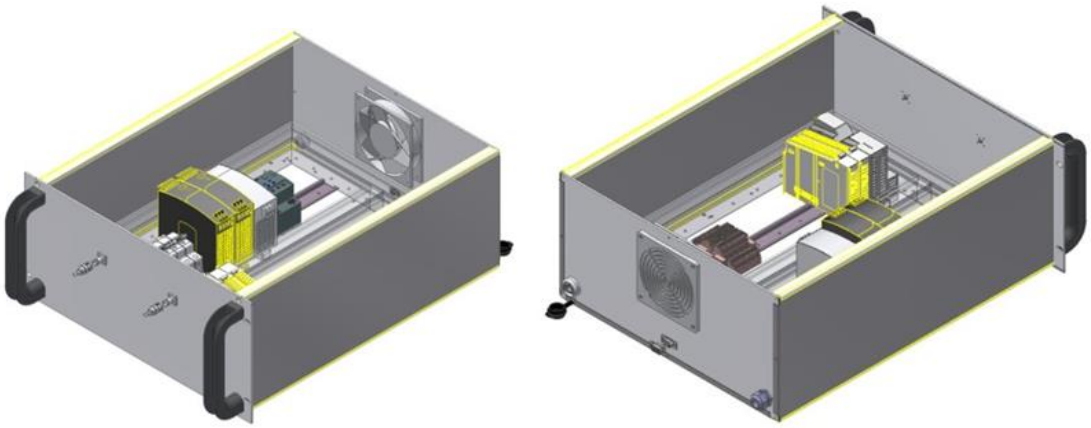
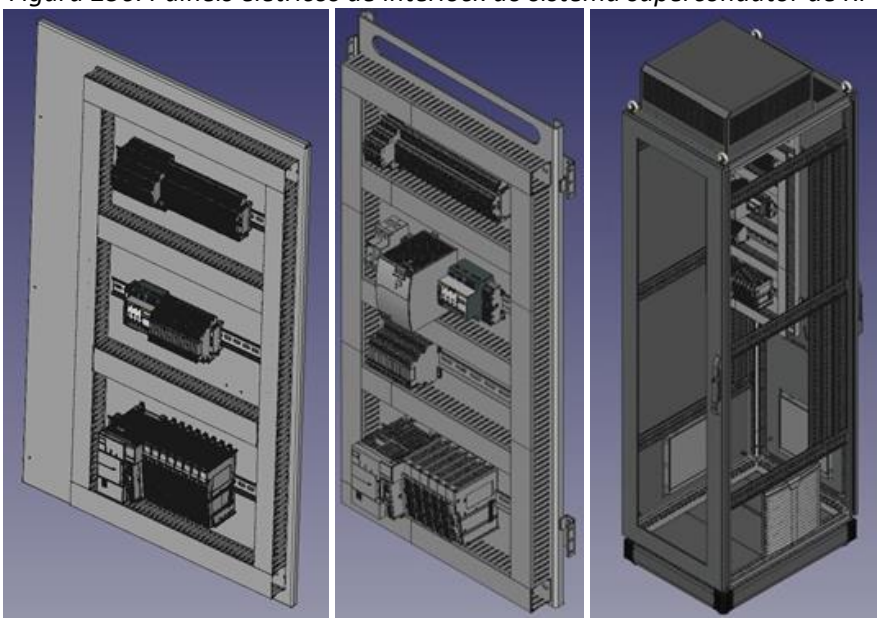


Figura 255. Projeto 3D final do sistema de leitura de corrente



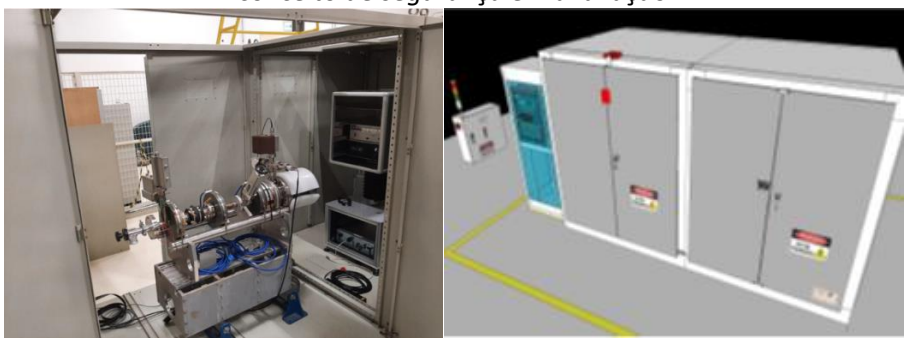
Ainda na área de automação, projetos dos painéis de *interlock* para os sistemas supercondutores de RF foram finalizados e entregues à empresa responsável pela montagem. O projeto se encontra em revisão dos documentos fornecidos por este fornecedor de serviços. A *Figura 256* mostra o modelo 3D final dos painéis elétricos de *interlock* do sistema supercondutor de RF.

Figura 256. Painéis elétricos de interlock do sistema supercondutor de RF



Outro projeto relevante que necessita de automação e que está em andamento é a Bancada de Teste do Canhão de Elétrons. Esse equipamento abrigará um canhão similar ao utilizado no Sirius, onde o projeto tem como intuito aprimorar os conhecimentos sobre operação deste sistema. Para operação adequada e segura do equipamento, que conta com uma fonte de alta tensão e possíveis emissões de radiação de baixa intensidade, se faz necessária a apreciação de risco e validação do projeto. Para isso, foi elaborado um contrato junto a uma empresa especializada na aplicação da NR12 (Norma Regulamentadora para Segurança do Trabalho em Máquinas e Equipamentos), que já realizou uma visita técnica e tem ainda uma a fazer. A primeira visita teve foco no levantamento de riscos para concepção de um relatório e de um primeiro conceito de segurança, que já foi avaliado pela equipe envolvida no projeto. O próximo passo é a preparação de um projeto elétrico que levara em consideração os riscos apresentados e discutidos em reuniões e nos relatórios. Após isso, se seguirá a adequação do projeto para recebermos a segunda visita técnica, que será responsável pela análise e validação da segurança de operação do equipamento. A *Figura 257* mostra a visão geral do canhão de elétrons na galeria de Klystrons (esquerda) e o projeto 3D (direita) com o conceito de segurança apresentado pela empresa contratada.

Figura 257. Visão geral do canhão de elétrons na galeria de Klystrons (esq) e o projeto 3D (dir) com o conceito de segurança em avaliação

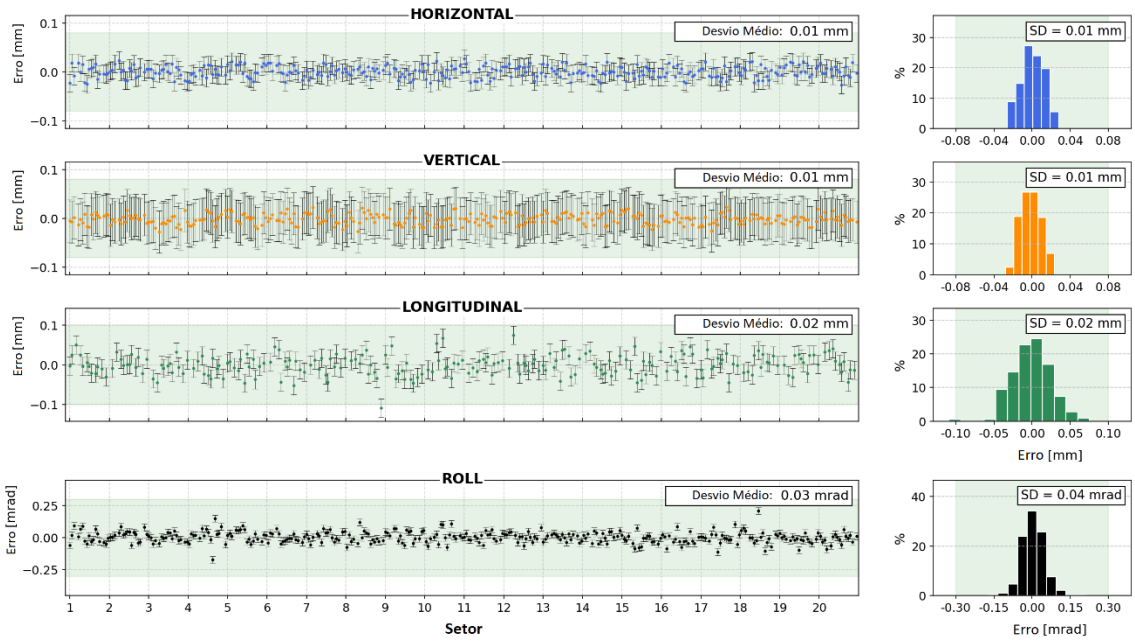


Metrologia (MET)

Alinhamento dos aceleradores

Em janeiro de 2021, foi realizada a primeira rodada de alinhamento dos aceleradores do Sirius. Após extenso planejamento, uma equipe de 24 colaboradores trabalhou diretamente na operação que envolveu o refinamento do posicionamento de todos os componentes das linhas de transporte, booster, anel de armazenamento e front ends das seis primeiras linhas de luz. O resultado para o anel de armazenamento pode ser visto na Figura 258 (zonas de tolerância expressas em verde translúcido).

Figura 258 Distribuição de erros de alinhamento e incerteza de medição para os graus de liberdade principais de cada ímã de referência dos berços do anel do Sirius



Ao longo do ano, durante as paradas de instalação, foram realizadas atividades de acompanhamento de montagens de suportações para os novos onduladores a serem instalados no Sirius, bem como marcações de pontos para novos *front ends*. Além disso, foram posicionadas estações de bombeamento para o *front end* máquina das linhas CEDRO e IMBUIA. Por fim, o grupo acompanhou a substituição de blindagem eletromagnética no *septum* de injeção no booster.

Monitoramento da estabilidade

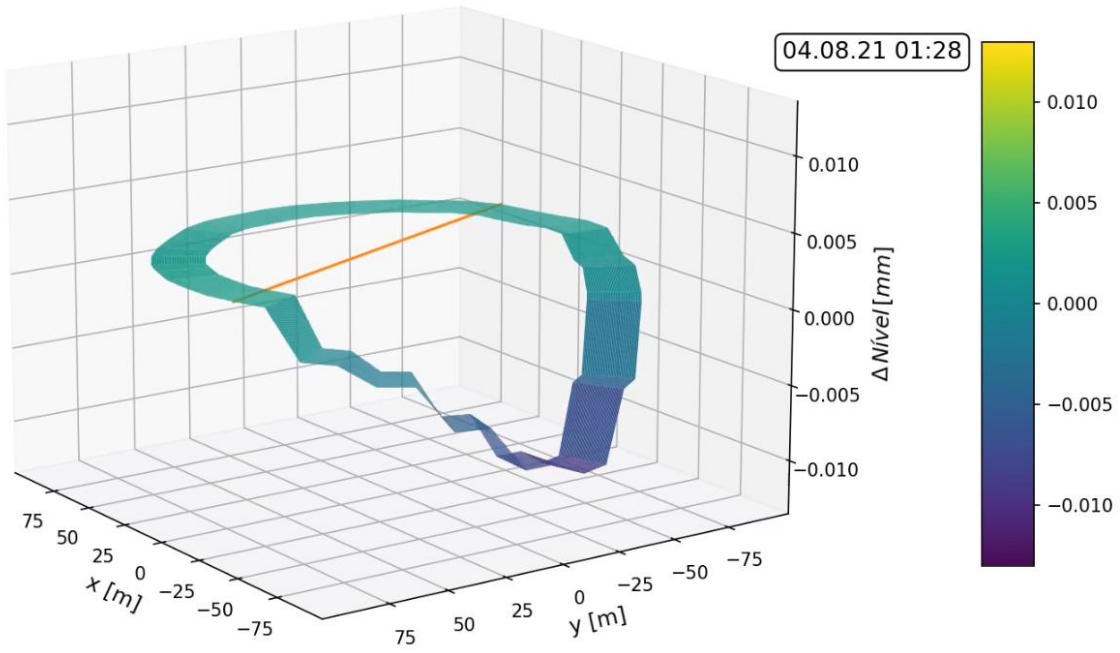
Durante o primeiro semestre de 2021, deu-se continuidade às atividades de implementação de software e testes da estação sismográfica do Sirius. Além disso, a rede de sensores de temperatura e deformação estrutural encontra-se coletando dados e armazenando-os nos servidores do CNPEM. Discussões e preparação de infraestrutura para as estações meteorológicas estão em andamento e espera-se o início de operação para o segundo semestre de 2021. A rede de sensores HLS (do Inglês, Hydrostatic Leveling System) foi validada nos últimos meses e vem sendo utilizada com sucesso no monitoramento de estabilidade da estrutura do Sirius desde então.

O grupo vem trabalhando em diversas frentes de monitoramento ao longo do ano. Além do uso dos sistemas de monitoramento em tempo real mencionados, medições periódicas vêm sendo realizadas, com o objetivo de se conhecer o comportamento a longo prazo da estrutura. Por exemplo, o raio da blindagem do Sirius vem sendo acompanhado, com o intuito de se conhecer a estabilidade da estrutura. Nas linhas de luz, um exemplo que pode ser dado é o monitoramento de posição de um robô manipulador utilizado para posicionar amostras na linha MANACÁ. Após a identificação de um problema ao executar uma rotina de coleta de porta amostra, o Grupo de Metrologia foi acionado e passou a investigar as deformações no sistema, e foi concluído que o problema estava na própria geometria de alguns tipos de porta amostra.

Do ponto de vista de efeitos de vibração sobre o Sirius, em 2021 foram realizados dois grandes estudos experimentais: avaliação do impacto de compactação em obras de terraplenagem no terreno vizinho ao Sirius sobre as linhas de luz e aceleradores, e avaliação do impacto de tráfego de veículos na via próxima ao Sirius sobre o piso especial. Com o estudo do efeito do tráfego de veículos, está sendo possível identificar os tipos de veículos que causam instabilidades detectáveis, bem como sua velocidade. Já o estudo dos efeitos de compactação de solo foram fundamentais para permitir que a obra de terraplenagem para futura instalação do NB3/NB4 ao lado do Sirius fosse liberada. A obra está sendo realizada com acompanhamento do grupo, com instrumentação monitorando a todo instante os níveis de vibração nos componentes críticos.

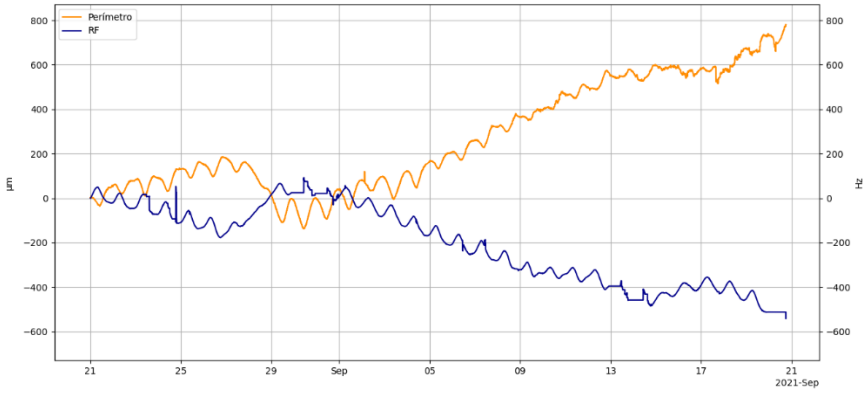
Com a ajuda da rede de HLS e dos sensores de temperatura embutidos no concreto e instalados em larga escala no Sirius, foi possível identificar duas causas de instabilidades importantes sobre o Sirius: na direção vertical, foi descoberto um efeito de subsidência de solo causada por extração de água subterrânea. Já na direção horizontal, pequenas variações térmicas ao longo da blindagem causam variações periódicas de perímetro, que por sua vez afetam o controle de radiofrequência do anel de armazenamento. A Figura 259 mostra a perturbação vertical causada pelo poço.

Figura 259 Instabilidade vertical causada por extração de água subterrânea



Atualmente encontra-se em fase de testes um sistema de automação de poço semiartesiano, com vistas a se controlar a pressão da coluna d'água (já instrumentada) e, com isso, eliminar o deslocamento relativo atualmente existente entre feixe de luz e amostra, nas linhas de luz longas. A *Figura 260* mostra as variações de frequência do sistema de RF do anel de armazenamento, bem como dados de variações de perímetro modelados com dados medidos de temperatura do concreto e dados teóricos de maré terrestre. Nota-se uma correlação de aproximadamente 0,98 entre as duas curvas. Com o conhecimento mais aprofundado do problema, algumas soluções possíveis serão testadas, como a mudança dos sensores usados para retroalimentar o sistema de ar-condicionado.

Figura 260. Variação de RF medida pelo sistema de controle do anel de armazenamento versus modelagem da variação de perímetro causada por expansão térmica do concreto

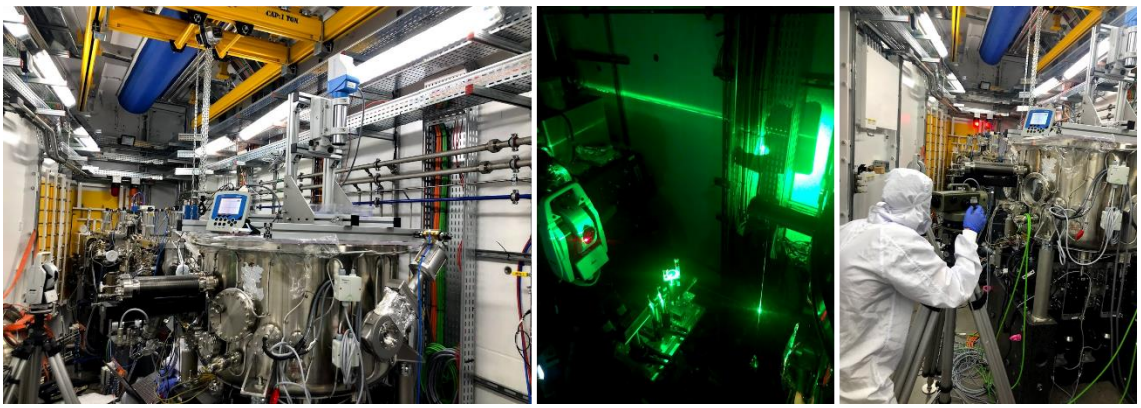


Também foram realizados mapeamentos de variação de perímetro com sistemas de medição a laser, de modo a validar o entendimento do comportamento horizontal do sistema.

Alinhamento das linhas de luz

Após o alinhamento fino dos aceleradores, algumas linhas de luz passaram por refinamento de posicionamento de seus componentes. Além disso, o alinhamento da linha IPE seguiu de forma intensa ao longo do ano (seguiu-se com a fiducialização de componentes e posicionamentos, como por exemplo sistemas de espelho e PGM, câmara de amostras, RIXS etc.). A Figura 261 mostra o PGM da linha IPE em processo de alinhamento. Parte da linha EMA também foi alinhada ao longo de 2021 (como foi o caso do difratômetro e do DCM). Novas linhas de luz também tiveram atividades de instalação com apoio na área de alinhamento, como é o caso das linhas SABIA, PAINEIRA IMBUIA, CEDRO e CARCARA, para citar alguns exemplos. Nesses casos, foram realizadas marcações de pontos para infraestrutura de cabanas e pipelines, bem como medições do tipo *as-built* de pisos e paredes. Em alguns casos, como na IMBUIA, foram realizadas fiducializações de sistemas de espelho, bem como sua instalação e posicionamento. Em outros casos, como nas linhas CARCARÁ e PAINEIRA, diversos componentes foram fiducializados ao longo do ano.

Figura 261 Fotografias de etapas do procedimento de alinhamento do PGM da linha IPÊ (nivelamento do espelho, à esquerda, alinhamento das grades ao centro e à direita)



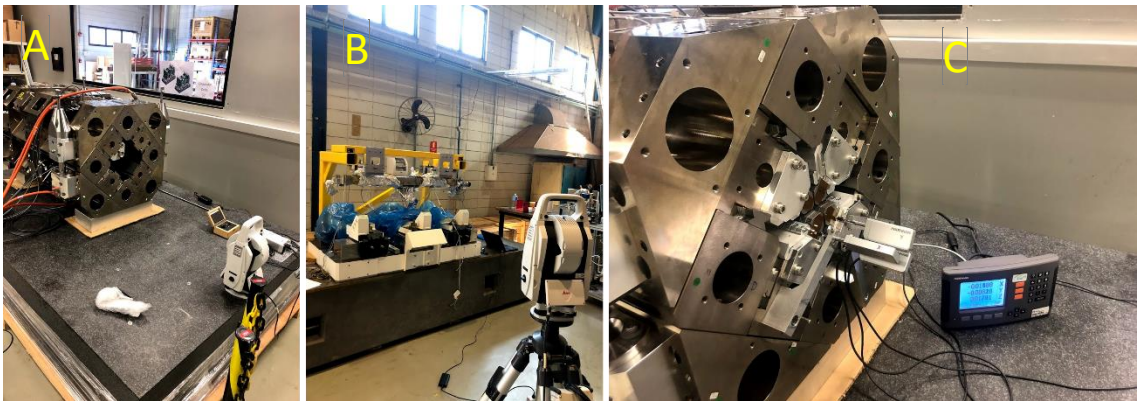
Em 2021 também foram realizadas medições de rotina e pequenas intervenções de alinhamento em componentes de linhas de luz instaladas em 2020, como foi o caso das linhas MANACÁ, CATERETÊ e CARNAÚBA. Para a linha MOGNO, o grupo vem trabalhando na expansão da rede de pontos de referência, bem como no apoio à colagem do espelho M1 e sua fiducialização.

Outro avanço importante em termos de apoio ao LNLS no que tange as linhas de luz foi o estabelecimento de procedimento de caracterização de geometria de sensores dos detetores Pimega, juntamente ao Grupo de Detetores (DET). O grupo tem executado medições angulares sem contato (por meio de uma estação total de precisão) dos sensores que compõe os detetores, e essa informação vem sendo utilizada pelo grupo DET como entrada para algoritmos de correção de dados capturados em experimentos.

Metrologia para projeto dos onduladores e infraestrutura dos grupos

Ao longo do primeiro semestre de 2021, o grupo esteve envolvido com o projeto dos onduladores do Sirius. Nesse esforço, diversas atividades de inspeção dimensional e caracterização geométrica de componentes foram realizadas. Pode-se citar, especialmente, avaliações de conformidade realizadas em cassetes e subcassetes, bem como nos blocos magnéticos que comporão os onduladores e nos diferentes gabaritos e câmaras de vácuo desenvolvidas no âmbito do projeto. Ainda, o grupo apoiou a revisão de aspectos de engenharia dimensional do projeto e o planejamento de procedimentos de testes de sistemas de movimentação e fiducialização dos onduladores. Foram realizados testes de abertura e fechamento, com medição em tempo real dos desvios residuais e de repetibilidade por meio de apalpadores micrométricos. Também foram realizadas medições de retitude de movimentação dos cassetes montados no ondulador, além de testes dinâmicos de atuação nos motores do ondulador (*Figura 262*). Foi realizado também um ensaio do procedimento de posicionamento da câmara de vácuo do ondulador, e um ensaio do procedimento de fiducialização.

Figura 262. Etapas de testes de caracterização geométrica e dimensional (A), ensaio de alinhamento da câmara de vácuo (B) e teste de repetibilidade dos atuadores dos cassetes (C) no ondulador da linha Sabiá



No contexto de metrologia para infraestrutura dos grupos, o Grupo de Metrologia tem apoiado os demais grupos da Engenharia e Tecnologia do CNPEM na manutenção de qualidade e confiabilidade metrológica. Foram feitos levantamentos do parque de instrumentos dos grupos, e iniciou-se um processo de envio de itens para calibração externa em laboratórios acreditados pelo INMETRO. Nesse processo, instrumentos do próprio grupo e da Ferramentaria (FER) foram enviados. Também, o grupo realizou verificações internas (intermediárias) em instrumentos do Grupo de Vácuo (VAC), Materiais (MAT) e Instalações, Montagens e Metrologia do LNLS (IMM). O grupo tem atuado também, juntamente com o Grupo de Controle e Instrumentação (COI) do LNLS na caracterização de cinemática de componentes de linhas de luz. Por fim, foi desenvolvido um estudo de layout de uma nova sala de metrologia, para futuras instalações do grupo.

Injetores e Sistemas Pulsados

As manutenções e melhoramentos realizados na fonte de luz ao longo de 2021 tiveram como objetivo melhorar a confiabilidade do processo de injeção. Isso envolveu melhorias no linac e o início de estudos e testes visando reduzir o campo de fuga dos septa, que estão acima das especificações de projeto.

Acelerador linear (linac)

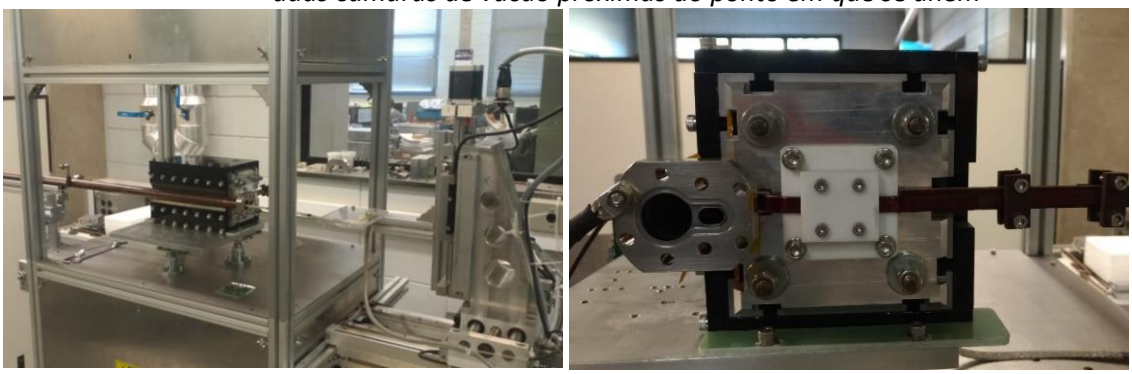
Com o início da operação do Sirius, o linac passou a ser operado de forma rotineira, necessitando de manutenções preventivas e corretivas. Visando agilizar as intervenções foi necessário revisar e atualizar a documentação dos dispositivos pulsados e do canhão de elétrons, visto existirem muitas discrepâncias entre a documentação recebida e a realidade dos equipamentos. Foi também necessário atualizar o parque de peças reservas desses equipamentos. O objetivo foi identificar e buscar soluções para possíveis fragilidades na operação do linac. Foram realizadas modificações no canhão e nos moduladores para disponibilizar mais informações sobre o estado desses equipamentos aos sistemas de controle. Foram realizadas melhorias no sistema de intertravamento do canhão e dos moduladores, e foi implementado um procedimento para rampa automática de aquecimento do cátodo do canhão. Um bastidor de controle reserva para os moduladores está em processo de construção e teve a sua documentação técnica completamente revista.

Melhoramentos nos septa do sistema de injeção

Estão em andamento estudos para reduzir o campo de fuga dos septa de injeção do Sirius. Um septum é um dipolo magnético especial utilizado no sistema de injeção do feixe em aceleradores circulares instalado na região em que a câmara de vácuo da linha de transporte que traz o feixe é conectada à câmara do anel ou booster, permitindo a injeção do feixe nesta máquina. A principal característica do septum é que ele gera um campo intenso na região da câmara da linha de transporte, mas o campo na câmara de vácuo do anel, por onde circula o feixe já armazenado, é fraco. O campo precisa ser suficientemente fraco de modo a não causar perturbações na órbita do feixe armazenado. A amplitude permitida para este campo é definida pela dinâmica de feixe e é um componente essencial da especificação do septum. No ponto de injeção, em que é posicionado o septum fino, a distância entre as duas câmaras é de apenas poucos milímetros. Como os septa instalados no Sirius são pulsados, a perturbação não consegue ser corrigida pela correção de órbita, e a perturbação produzida no feixe é inaceitável para a operação *top-up* do Sirius, em que o anel é continuamente reabastecido com elétrons de modo a manter a corrente armazenada constante. Isto porque a perturbação de órbita interfere negativamente nas medidas realizadas nas estações experimentais. Este será o modo de operação normal do Sirius nos turnos para usuários. Os septa do Sirius estão com um campo de fuga acima das especificações de projeto e necessitam de correção

Para estudar formas de corrigir o problema, um protótipo do septum de injeção no booster foi instalado na bancada de medidas magnéticas pulsadas, buscando simular as condições da instalação no túnel do Sirius (*Figura 263*). O objetivo é identificar as origens da fuga de campo, e testar possíveis soluções para melhorar a blindagem do campo. Os estudos estão em andamento. Mudanças já realizadas na blindagem, baseadas em medidas realizadas na bancada de testes, reduziram o campo de fuga por um fator 2, o que é ainda insuficiente para atingir as especificações.

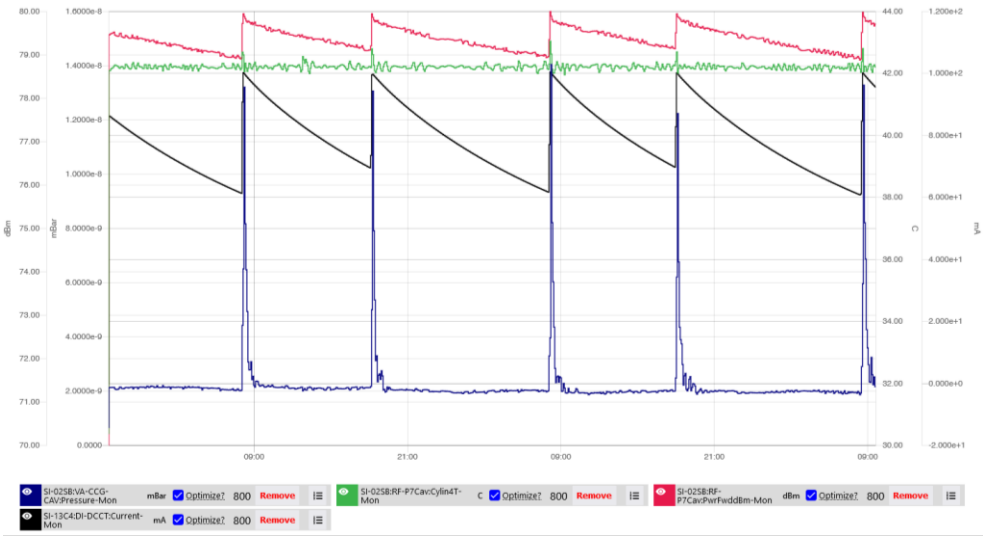
Figura 263. Septum fino de injeção no booster instalado na bancada de testes. À direita, detalhe das duas câmaras de vácuo próximas do ponto em que se unem



Radiofrequência

Ao longo de 2021, foram dedicados vários períodos de estudos de máquina visando aumentar a corrente armazenada no anel. O sistema de controle de temperatura da cavidade aceleradora foi projetado para permitir a operação da cavidade em temperaturas no intervalo de 25°C a 50°C. Um dos desafios para permitir o aumento da corrente armazenada foi encontrar uma temperatura de operação da cavidade para a qual o efeito dos demais modos ressonantes não levasse a instabilidades no feixe. Os modos de ordem superior, como são chamados, são outros modos ressonantes da cavidade aceleradora que, embora não excitados diretamente pelo sistema de RF, são excitados e realimentados pelo próprio feixe de elétrons. Nas cavidades supercondutoras definitivas do Sirius esses modos de ordem superior são fortemente amortecidos, mas este não é o caso da atual cavidade. Ao variar a temperatura de operação da cavidade e sintonizá-la por meio dos êmbolos de sintonização, é possível modificar as frequências de ressonâncias dos demais modos e, eventualmente, encontrar uma temperatura em que seus efeitos sobre o feixe sejam minimizados. Um ponto de operação foi encontrado em 41,8°C, o que exigiu um rápido condicionamento da cavidade para operar nessa temperatura. Após a solução de um problema com a refrigeração do acoplador de potência a corrente armazenada foi elevada para 100 mA, com a utilização do sistema de realimentação pacote-a-pacote (BBB, *bunch-by-bunch feedback*). A operação com correntes mais elevadas tornou necessária a instalação de sensores adicionais na cavidade para monitorar possíveis efeitos dos modos excitados pelo feixe na janela de quartzo e no acoplador de potência. Nessa condição a planta opera com uma potência de saída da ordem de 100 kW.

Figura 264. Operação do Sirius com corrente inicial de 100 mA: (preto) corrente armazenada; (vermelho) potência na entrada da cavidade, em torno de 100 kW; (verde) temperatura da cavidade; (azul) pressão na cavidade

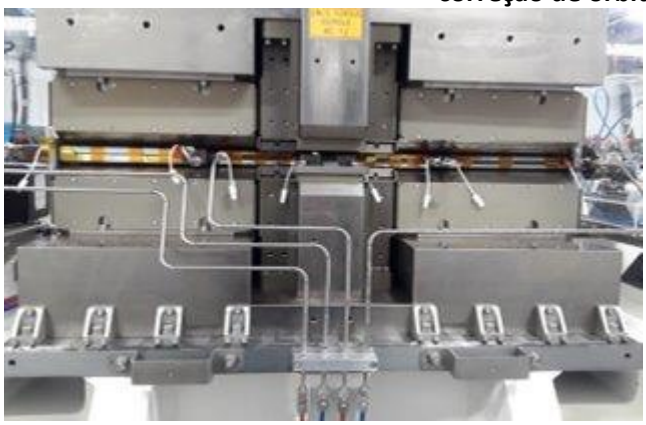


Também foram realizados vários melhoramentos nos sistemas de RF do anel, booster e linac. Em especial, foi feita uma análise dos programas e uma revisão da documentação dos sistemas de LLRF, uma vez que foram adquiridos de outros laboratórios. O sistema do linac faz parte da entrega realizada pelo SINAP (China) em 2018; o sistema utilizado no booster e anel de armazenamento foi desenvolvido pelo ALBA (Espanha). Em ambos os casos o *firmware* dos sistemas foi passado ao CNPEM, abrindo a possibilidade de que melhoramentos e alterações possam ser realizados no laboratório. Problemas observados pela Operação do Sirius, como um problema intermitente que podia aparecer no carregamento de configurações do LLRF pelo sistema de controle de alto nível, e com a perda das fases relativas entre os sistemas de LLRF quando da sua reinicialização, foram solucionados. Foram realizados estudos de estabilidade da rampa do booster e de análise da composição harmônica do sinal de RF que é enviado para as cavidades. Esses estudos foram decorrentes do acompanhamento dos estudos de máquina realizados pela Física de aceleradores e da operação diária da fonte de luz. No que tange à manutenção dos sistemas de RF foi realizado um esforço para atualização do parque de reservas de componentes de RF do linac.

Rede Magnética do Sirius

Em 2021, foram realizados vários melhoramentos nas instalações da rede magnética do Sirius. Uma mudança na refrigeração dos dipolos BC começou a ser implementada visando aumentar a confiabilidade do circuito de refrigeração utilizando tubulações rígidas. Um programa de substituição sistemática de componentes hidráulicos que apresentaram vazamentos nos *manifolds* de refrigeração dos ímãs está em andamento. Foram feitos preparativos para a instalação das corretoras do sistema de correção de órbita rápida. Os imãs foram montados, testados e desmagnetizados e aguardam programação para instalação (**Figura 265**). No início do ano foram refeitas as medidas das curvas de excitação dos ímãs do booster em decorrência dos estudos realizados pela Física de Aceleradores.

Figura 265. Melhoramentos na refrigeração dos dipolos BC (esq); corretoras para o sistema de correção de órbita rápido (dir)



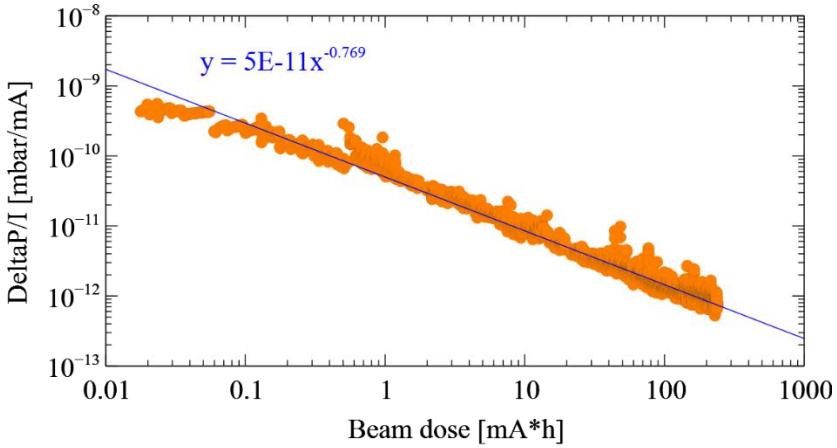
Vácuo

Anel

Atualmente, a pressão média de vácuo, condição estática (sem feixe), no anel de armazenamento de elétrons está em 8x10-11 mbar. As pressões de vácuo dinâmicas, com feixe, dependem diretamente do estágio de condicionamento do sistema, ou seja, quanto maior a dose integrada menor serão as pressões de vácuo na máquina, caso o sistema de vácuo esteja funcionando adequadamente. Isso é valido para qualquer parte dos aceleradores do Sirius.

O sistema de vácuo do anel foi projetado para atingir os níveis de vácuo desejados quando se atingir a dose integrada de 100 A·h. A *Figura 266* mostra a evolução da média das pressões lidas no anel normalizadas pela corrente em função da dose integrada. Conforme estimado no documento anterior, a pressão média normalizada pela corrente de 2,8x10-12 mbar/mA, valor nominal especificado em projeto (1x10-9 mbar@350 mA), foi atingida com uma dose integrada de 70 A·h no primeiro semestre de 2021. Portanto, pode-se dizer que o condicionamento das câmaras se comportou muito bem. Adicionalmente, pode-se dizer que o condicionamento de vácuo das câmaras do anel transcorreu de forma mais rápida e eficiente do que era esperado, já que as pressões especificadas em projeto foram atingidas com uma dose integrada inferior à 100 A·h.

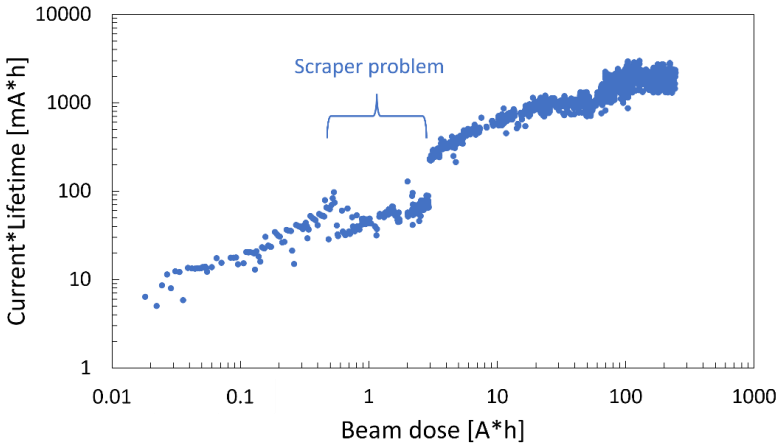
Figura 266. Média de pressão normalizada pela corrente em função da dose integrada



Uma outra forma de avaliar o condicionamento de vácuo é verificar a evolução do tempo de vida do feixe de elétrons, que depende de diferentes contribuições. Uma delas está relacionada com a interação dos elétrons com as moléculas dos gases residuais nas câmaras de vácuo.

A *Figura 267* mostra a evolução do tempo de vida do feixe de elétrons normalizado pela corrente do feixe em função da dose integrada. Esse gráfico mostra o comportamento do tempo de vida desde o início da operação do Sirius. O aumento gradativo do tempo de vida está relacionado com o condicionamento de vácuo da máquina. A queda do tempo de vida observada no período aproximado de 0,5 a 3 A·h está relacionada com um problema ocorrido no *scraper* vertical da máquina, no qual uma mola de contato elétrico entre um dos pistões do *scraper* e a câmara de vácuo se soltou e entrou na frente do feixe obstruindo-o parcialmente. Após o problema ter sido resolvido, percebe-se que o tempo de vida voltou a aumentar com a mesma inclinação de antes, evidenciando a continua evolução do condicionamento do sistema de vácuo.

Figura 267. Evolução do tempo de vida do feixe de elétrons normalizado pela corrente em função da dose integrada



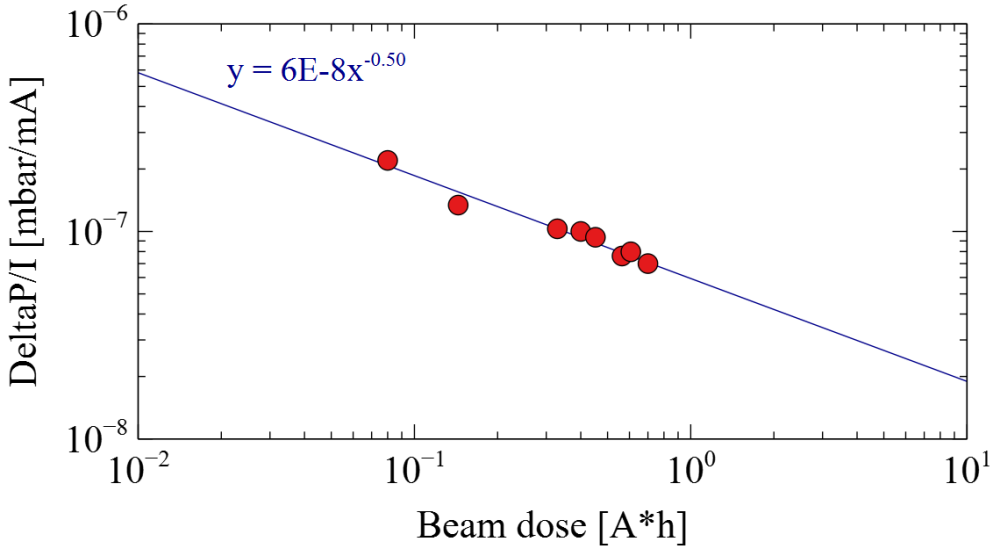
Por volta de 30 A·h, percebe-se uma tendência de saturação no aumento do tempo de vida e isso mostra que o tempo de vida passa a não depender mais majoritariamente de vácuo, mas sim do espalhamento Touschek (interação elétron-elétron). Em aproximadamente 60 A·h, houve uma mudança no valor do acoplamento betatron, um dos muitos parâmetros de ajuste da máquina, que aumenta o limiar de

contribuição do espalhamento Touschek. Desta forma, o tempo de vida volta a aumentar levemente, evidenciando a dependência majoritária da pressão de vácuo, mas com aproximadamente 100 A·h há uma nova tendência de saturação mostrando que a contribuição de vácuo deixa de ser dominante.
O comportamento atual do tempo de vida corrobora que as pressões de vácuo já atingiram os valores especificados em projeto e que o tempo de vida não é mais dominado por vácuo.

Booster

O sistema de vácuo do booster está plenamente operacional e a pressão média no booster, condição estática (sem feixe), está em 7,3x10-10 mbar. Porém, em condição dinâmica (com feixe), apesar das pressões de vácuo do booster permitirem um funcionamento adequado do Sirius, elas ainda não atingiram os valores especificados em projeto. As pressões no booster vem caindo de forma lenta e gradativa, como já era esperado, pois a dose integrada no booster aumenta de forma muito mais lenta quando comparado com o anel. No booster são injetadas correntes de feixe muito mais baixas que no anel e essas correntes permanecem estocadas por períodos muito curtos.
O sistema de vácuo do booster ainda está em condicionamento, sendo que a dose integrada de 1 A·h, especificada em projeto para se atingir as pressões de vácuo desejadas, ainda não foi atingida. A **Figura 268** mostra a evolução da pressão média normalizada pela corrente em função da dose integrada no booster. Para atingir os valores especificados em projeto, as pressões dinâmicas no booster ainda precisam melhorar um fator 3. A especificação de projeto do booster prevê uma pressão média normalizada pela corrente menor ou igual a 2,5.10-8 mbar/mA. Atualmente, a dose integrada no booster está em aproximadamente 0,7 A·h, ou seja, 70% da dose integrada especificada em projeto. Por isso, pode-se dizer que o condicionamento de vácuo do booster está transcorrendo de forma mais lenta do que esperado e previsto em projeto. Com a tendência de queda das pressões dinâmicas mostrada na **Figura 268**, é de se esperar que as pressões de vácuo no booster não atinjam os valores especificados em projeto quando a dose integrada de 1 A·h for atingida. Porém, é importante salientar que esse condicionamento mais do vácuo do booster não tem impactado a operação do Sirius.

Figura 268. Evolução da pressão média normalizada pela corrente em função da dose integrada no booster

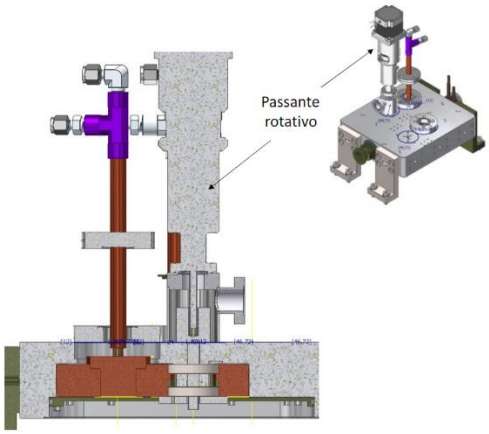


Scrapers

Scrapers são componentes especiais desenvolvidos para aceleradores de partículas cuja função principal é delimitar a abertura horizontal e vertical do feixe de elétrons em valores requisitados para a adequada operação do acelerador. No caso do Sirius, por exemplo, planeja-se a instalação de câmaras de ondulador que possuem uma seção transversal de dimensões reduzidas como, por exemplo, a câmara do ondulador Delta 22 com seção quadrada de 6,4 mm interno de lado. Neste caso, as peças internas do scraper serão posicionadas de forma a bloquear os elétrons cuja órbita extrapole as posições desejadas, e assim tendo a função de proteger as câmaras de pequena seção transversal.

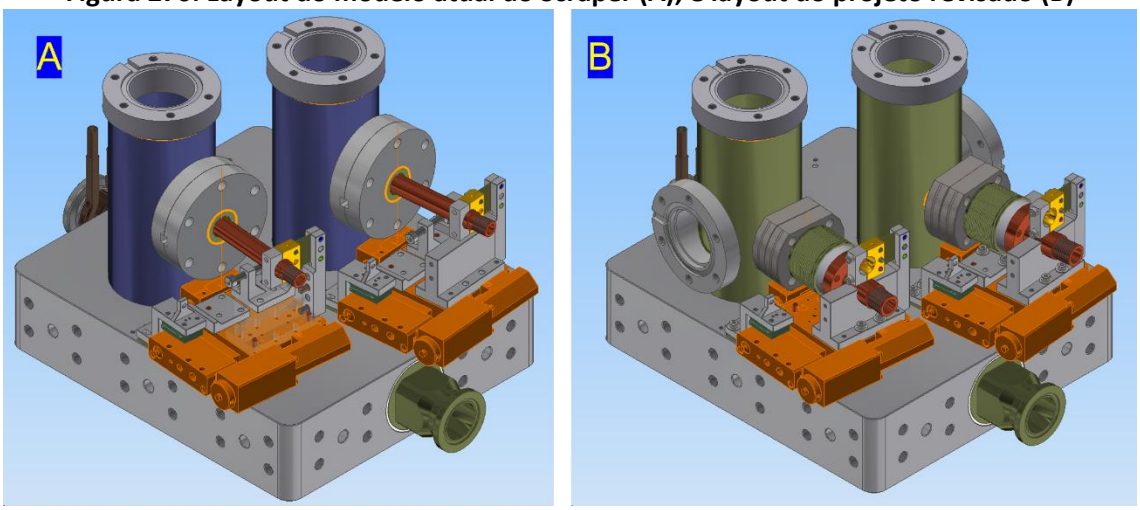
A fim de garantir um adequado funcionamento dos Scrapers, foram analisadas diversas melhorias que englobam o sistema de movimentação, as hastes de refrigeração e a mola interna de contato elétrico. Inicialmente, foi considerada a alteração do sistema de movimentação para um modelo com passante rotativo e haste de refrigeração até a base dos pistões, ilustrado pela *Figura 269*. Foi também realizado um estudo com sistema de movimentação com passante linear.

Figura 269. Lay out da primeira proposta de melhoria



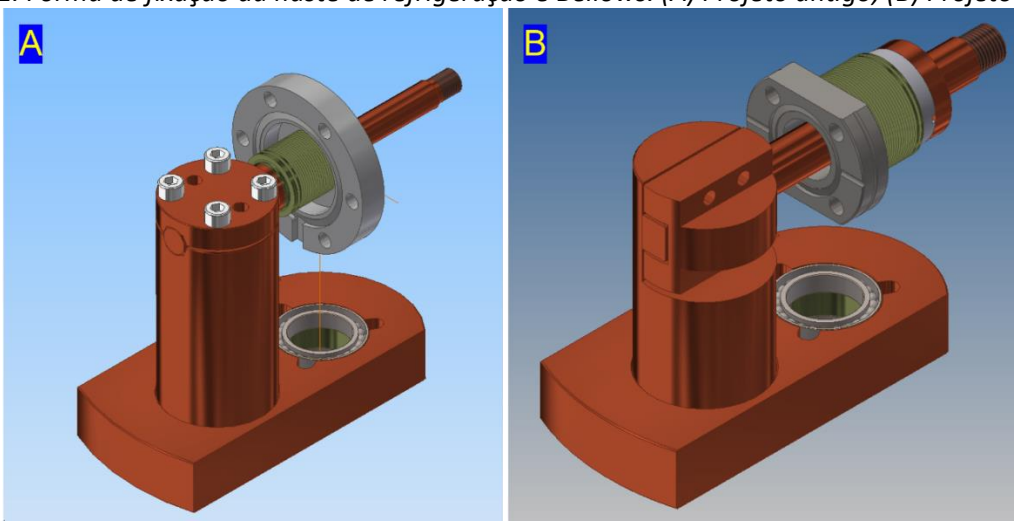
Entretanto, o método de movimentação proposto implicou em mudanças relativamente complexas, que poderiam induzir dúvidas quanto a confiabilidade e precisão de movimento. Dessa forma, foi realizado um novo estudo que utiliza o sistema de movimentação já validado nos Scrapers (vide **Figura 270**), mas que contempla melhorias na troca térmica da haste com o pistão, no contato elétrico entre pistão e carcaça, e no sistema de bombeamento de vácuo.

Figura 270. Layout do modelo atual do Scraper (A), e layout do projeto revisado (B)



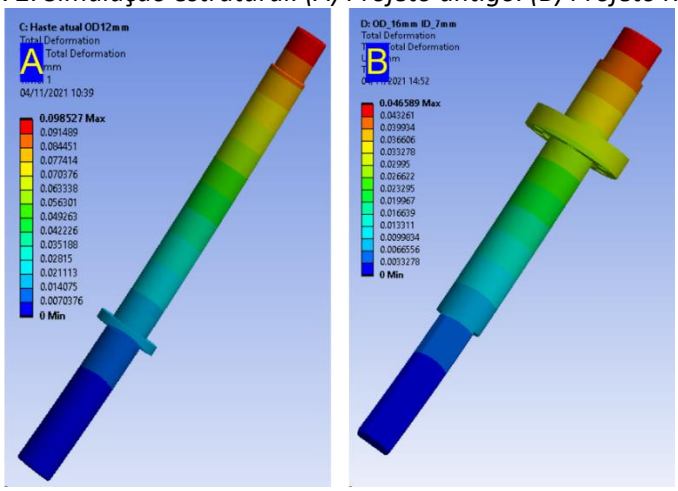
Foi revisada a haste de refrigeração, com a troca do material de Cu ETP para CuCrZr, e aumento do diâmetro externo com consequente aumento na espessura da parede e maior rigidez à deformação. Além disso, a nova haste será apoiada no cilindro vertical pela lateral, promovendo maior troca térmica e garantindo um melhor alinhamento do *bellows*. Para comportar o maior diâmetro da haste, o *bellows* foi colocado do lado de fora do vácuo e seu diâmetro interno também foi aumentado em relação ao projeto original do Scraper. A *Figura 271* ilustra o conceito antigo e o novo de fixação da haste e posicionamento do *bellows*.

Figura 271. Forma de fixação da haste de refrigeração e Bellows. (A) Projeto antigo; (B) Projeto Revisado



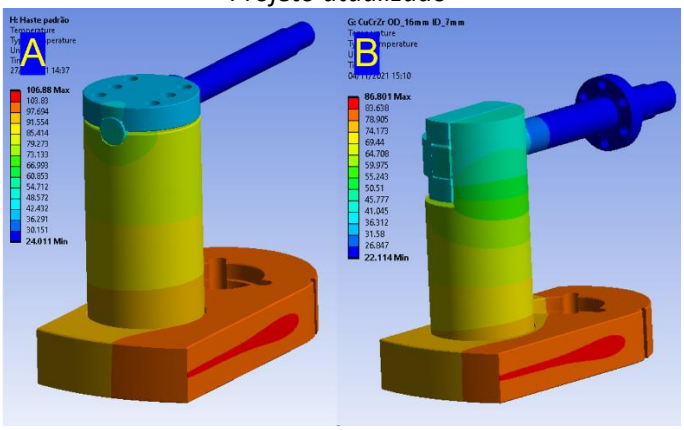
A alteração da haste levou em consideração simulações estruturais e simulações térmicas. Nas simulações mecânicas foi possível notar uma redução da deformação de 98 µm para 46 µm ao aumentar o diâmetro externo de 12 mm para 16 mm, conforme mostra a *Figura 272*.

Figura 272. Simulação estrutural. (A) Projeto antigo. (B) Projeto Revisado



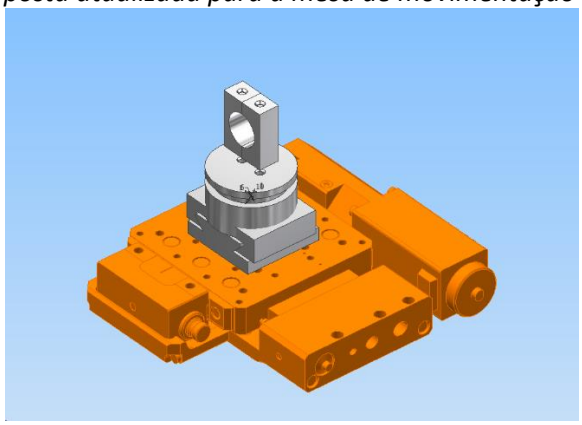
Esse ganho também se reflete na troca térmica, onde pode se notar uma redução de aproximadamente 18%, com o pistão antigo atingindo uma temperatura de 106°C e o pistão proposto chegando na temperatura máxima de 86°C para uma potência de 125 W (vide *Figura 273*).

Figura 273. Distribuição de temperatura nas hastes, cilindro vertical e pistão. (A) Versão antiga. (B) Projeto atualizado



Sobre o sistema de movimentação, merece destaque a alteração do sistema de fixação da haste com a mesa. O projeto original do Scraper considerou o uso de "weak links", que proporcionou dificuldades operacionais. Dessa forma, foi proposto um novo método que utiliza um rolamento para proporcionar a rotação, e uma mesa auxiliar para comportar a translação, conforme ilustrado na *Figura 274*.

Figura 274. Proposta atualizada para a mesa de movimentação e mesa auxiliar



Além da troca da haste e do sistema de fixação, foi proposto também a troca dos rolamentos de fabricação totalmente cerâmica para rolamentos híbridos metal-cerâmico a fim de evitar que o rolamento se deteriore com a dilatação térmica decorrente dos processos de baking. Outra melhoria proposta se refere ao contato elétrico do pistão de cobre com a câmara através do uso de molas confinadas por uma haste soldada a tampões. Após testes contínuos de movimentação, não houve alteração no perfil da mola e ela se manteve confinada no slot de montagem. A *Figura 275* ilustra as molas montadas no sistema com as hastes soldadas.

Figura 275. Mola confinada por haste soldada a tampões

Com relação ao bombeamento de vácuo do Scraper, foi proposta a substituição das 2 bombas iônicas de 10 L/s por uma bomba modelo NexTorr D300 que consiste em uma bomba iônica combinada a um cartucho de NEG (non-evaporable getter) com capacidade de 300 L/s. Esta configuração proporcionará um aumento na velocidade de bombeamento e resultará em pressão final de vácuo mais baixa. Com a aplicação das melhorias propostas descritas, espera-se que os Scrapers possuam desempenho mais confiável para a operação no Sirius.

Descomissionamento do UVX

Ao longo do ano de 2021, foi dada continuidade ao descomissionamento do UVX através da identificação e realocação de componentes de vácuo disponibilizados nas linhas de luz, Anel de Armazenamento e Booster. Dentre os itens selecionados e removidos das linhas de luz, destacam-se os seguintes: 12 bombas de vácuo de palhetas rotativas, 12 válvulas em ângulo, 8 passantes lineares, desmontagem de 3 Gamma Shutters para experimentos futuros do grupo de Supercondutividade e câmara de vácuo para experimentos. Serão selecionados também tubos de diferentes diâmetros para o aproveitamento futuro em experimentos e montagens.

No Booster do UVX, foram removidas correntes de vedação dos flanges e sensores catodo frio e válvulas em ângulo. No anel principal do UVX, foram removidos sensores de catodo quente, válvulas em ângulo, válvulas setor, além de outros componentes. Todos os itens estão armazenados no Grupo de Vácuo e comporão o estoque do grupo para atender as demandas de vácuo do CNPEM.

Projetos mecânicos

Proteções radiológicas

A blindagem do anel de armazenamento do Sirius possui diversas aberturas ao longo de sua extensão que possibilitam a entrada e saída de utilidades elétricas, eletrônicas e hidráulicas. Com a evolução do comissionamento da máquina, novos cenários com produção de radiação começaram a ser analisados mediante contribuições provenientes de: espalhamento do gas-bremsstrahlung dos trechos retos; perdas de elétrons as quais foram concentradas em um espalhador ideal; e, radiação síncrotron de um BC no qual todo o espectro foi concentrado em um espalhador ideal. Assim, novas proteções radiológicas necessitaram ser criadas a fim de prover segurança à operação do equipamento.

Figura 276. Proteções com blocos de concreto para aberturas no teto da blindagem.

Figura 277. Proteções com chapas de aço para aberturas próximas ao piso.

Ondulador Delta DU525 – Linha Sabiá

Suporte fundido para BPMs reservas e complementares

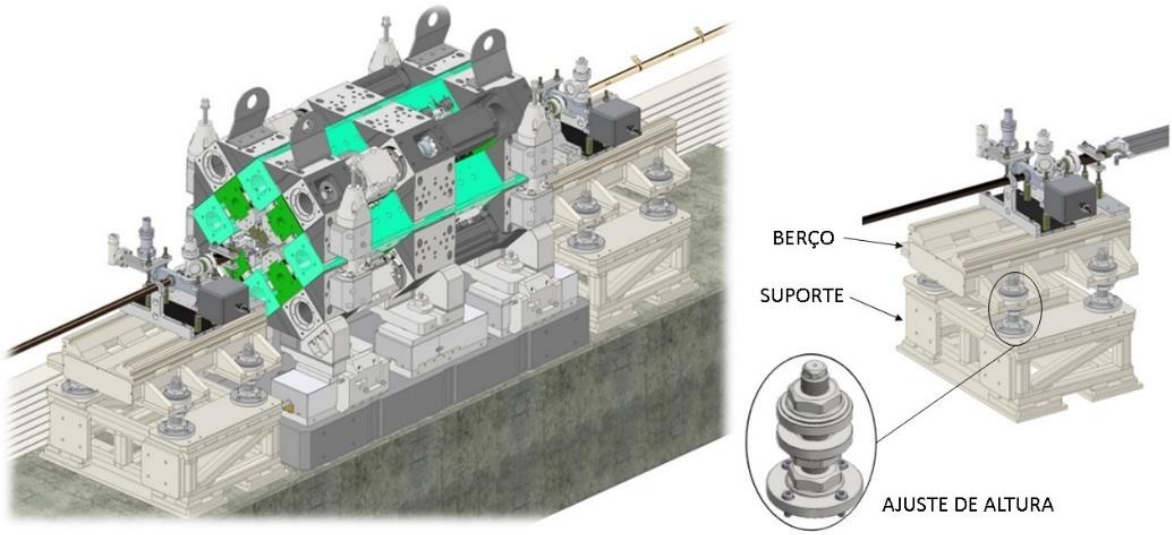
O monitor de posição da órbita (Beam Position Monitor - BPM) é um sensor que fica posicionado ao longo do anel de armazenamento de elétrons, e é um dos componentes cruciais para o Sirius. Sua função é monitorar constantemente a posição do feixe elétrons em movimento dentro das câmaras de vácuo para que possam ser efetuadas correções em sua órbita. Um dos pontos importantes do projeto é a escolha do material do suporte com coeficiente de expansão térmico semelhante à dos ímãs e como este material não é padrão da indústria, tornou-se necessário estabelecer um processo de desenvolvimento e compra através de peças fundidas (*Figura 278*).

Figura 278. Lote de peças fundidas em aço inoxidável 305 para suporte de BPM.

Berço e suporte estrutural pré e pós Onduladores Delta

Onduladores Delta como o DU525, previstos para serem instalados em alguns trechos retos do Sirius, necessitarão de estruturas metálicas que suportarão e posicionarão estações de bombeamento, BPM, corretora, câmara de vácuo e transição. À esquerda da *Figura 279* é possível observar o ondulador montado para visualização das posições do berço e suporte. À direita é possível observar o berço e o suporte, com o mecanismo de ajuste de altura em destaque.

Figura 279. Berço e suporte estrutural com ajustes para pré e pós ondulador

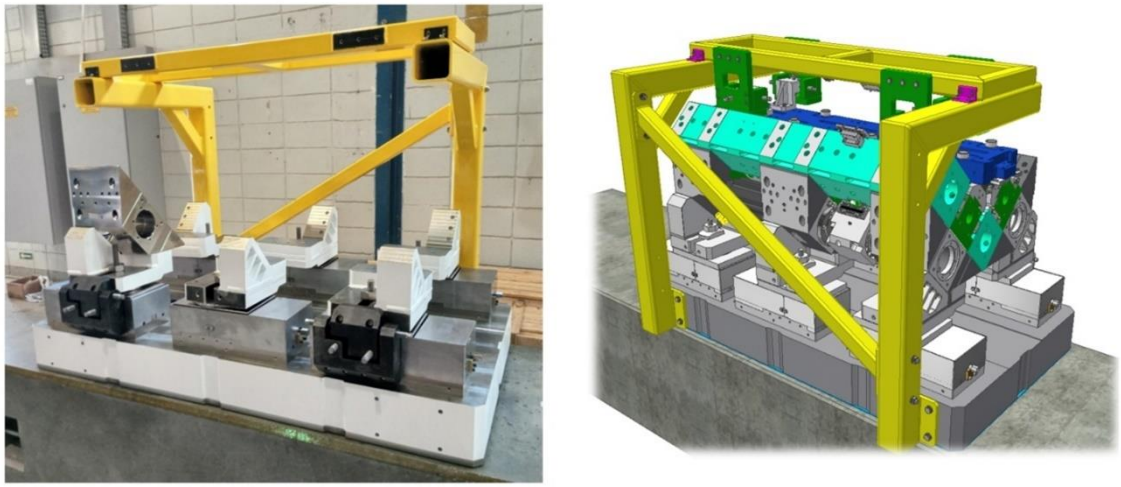


Suportes e dispositivos para montagem, baking e alinhamento do ondulador Delta e câmara

O projeto de suportação dos onduladores Delta previu uma base metálica grauteada e fixada na face superior da base de concreto de modo a oferecer maior rigidez ao conjunto. Niveladores, pés de apoio e dispositivos de ajuste permitirão o seu posicionamento no anel de armazenamento. Uma estrutura

metálica (em amarelo na *Figura 280*) fixada na base metálica (em cinza) também foi projetada para sustentar e alinhar a câmara de vácuo em sua montagem e na execução do processo de baking.

Figura 280. Mockup para testes com o ondulador e câmara de vácuo

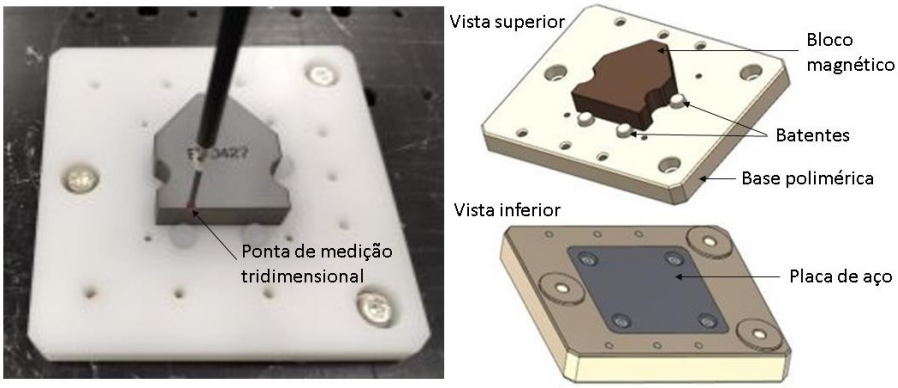


Dispositivo de fixação dos blocos magnéticos para medição na máquina tridimensional

Blocos magnéticos com perfis especiais, adquiridos para utilização no ondulador Delta DU525, necessitam de caracterização dimensional através de medições realizadas por máquina de medição tridimensional, já que o campo magnético resultante depende da correta geometria dos blocos. Visando a uma maior produtividade, repetibilidade e otimização do processo de medição, optou-se pelo desenvolvimento de uma base especial que permitisse a troca de peças em um tempo inferior a 2 minutos.

Basicamente, a placa é confeccionada em um material polimérico que não agride as faces dos blocos magnéticos. Ela possui 3 pinos que são utilizados como batentes, para garantir que o posicionamento das peças possua uma repetibilidade dentro dos padrões de medições da máquina tridimensional. Por último, foi acrescentado uma placa de aço na face inferior da placa polimérica de modo a permitir que o bloco fosse fixo por meio da ação de forças magnéticas, sem a necessidade de qualquer tipo de grampo ou parafuso.

Figura 281. Dispositivo de fixação dos blocos magnéticos para medição na máquina tridimensional



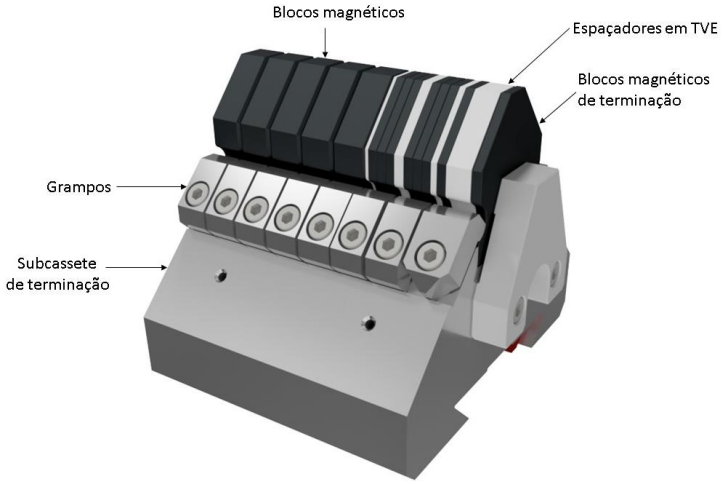
Projeto mecânico dos subcassetes de terminação

Os subcassetes de terminação (*Figura 282*) são responsáveis pela acomodação dos blocos magnéticos de terminação que fogem ao padrão de espessura e arranjo em relação aos outros blocos utilizados no Ondulador (blocos dos cassetes intermediários).

Como o próprio nome diz, as terminações são montadas no início e fim de cada cassete, com uma ordem específica de blocos de 3,25 mm de espessura e seus respectivos espaçadores em material TVE (laminado de fibra de vidro impregnada com resina epóxi).

As principais diferenças entre este projeto e os subcassetes intermediários são os grampos exclusivos para a fixação destes blocos mais finos com seus espaçadores e, também, o comprimento total do subcassete.

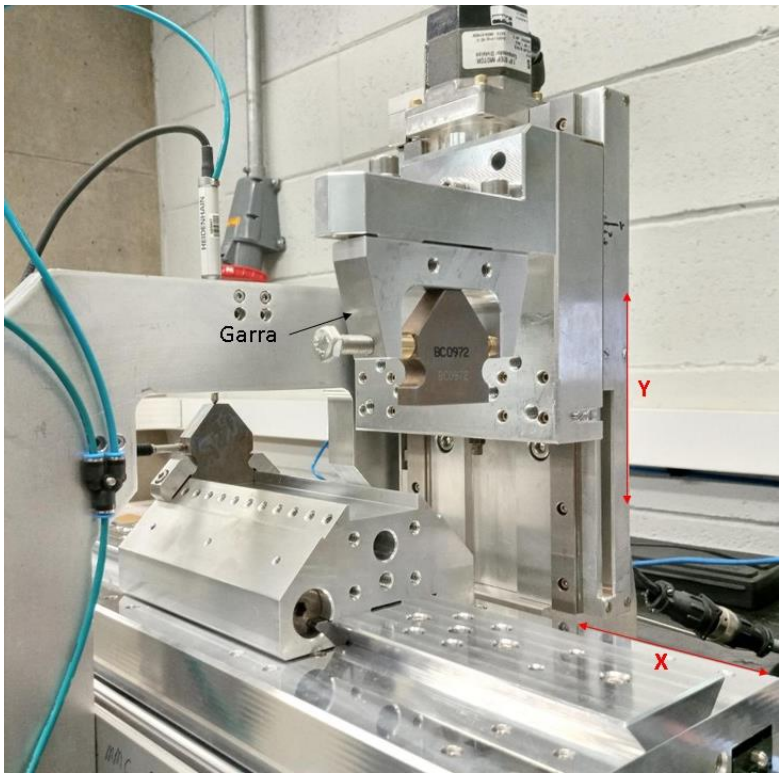
Figura 282. Subcassete de terminação



Mesa e garras para montagem dos blocos magnéticos nos subcassetes

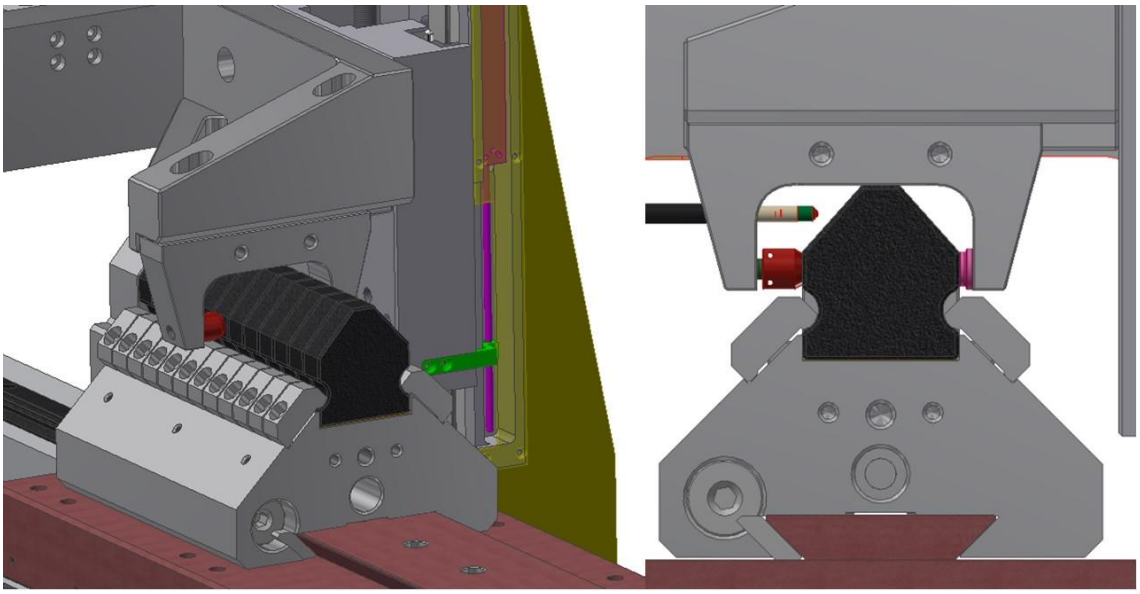
A mesa de montagem de subcassetes é um acessório utilizado para montagem dos blocos magnéticos nos subcassetes do ondulador *Figura 283*). Devido às forças magnéticas envolvidas e à necessidade de precisão no posicionamento dos blocos, sua utilização durante o processo de montagem é imprescindível. O acessório desenvolvido é composto por dois sistemas de movimentação nos eixos X e Y, que definem o posicionamento dos blocos. Os blocos são fixados e montados individualmente através de um sistema de garra. Para aferição de posicionamento longitudinal e transversal entre os blocos, são utilizados apalpadores pneumáticos. Também é possível medir o campo magnético de cada bloco através de um sensor Hall, que é instalado próximo aos apalpadores e possui uma distância vertical pré-estabelecida da face superior dos blocos, de forma a permitir que o sensor possa medir todos os blocos com a mesa em movimento.

Figura 283. Mesa de montagem dos blocos magnéticos nos subcassetes



A garra é um componente acoplado à mesa de montagem, sendo este intercambiável e desenvolvido especialmente para cada geometria de bloco magnético. O sistema desenvolvido para realizar o posicionamento dos blocos magnéticos é feito de maneira a que a lateral do bloco fique encostado inicialmente em um batente fixo (em rosa na *Figura 284*) e o batente móvel (em vermelho) é deslocado até que este encoste na face da lateral oposta, por meio de um parafuso estojo (acoplado ao batente por meio de um sistema de articulação côncavo/convexo para evitar deformação nas superfícies dos blocos).

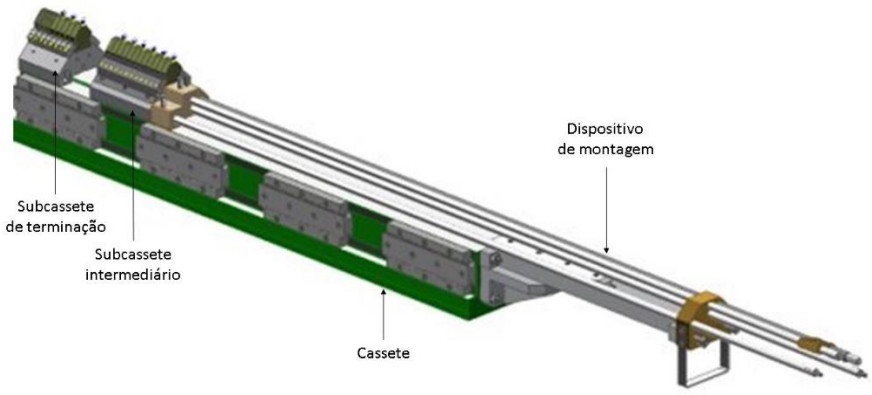
Figura 284. Garra para montagem de blocos magnéticos do ondulador DU525



Dispositivo de montagem dos subcassetes nos cassetes

Os blocos magnéticos do Ondulador Delta são montados em subconjuntos denominados subcassetes. Eles são montados nos 4 cassetes do Ondulador já "fechado" de forma ordenada no sentido longitudinal da peça, através do sistema rabo de andorinha. Necessitou-se deste modo, desenvolver uma ferramenta para possibilitar o manuseio destes subcassetes, deslizando-os sob os cassetes até a posição final por auxílio de hastes e fusos, sob interação de forças magnéticas e no espaço restrito da parte interna do Ondulador. O dispositivo de montagem desenvolvido é mostrado na *Figura 285*.

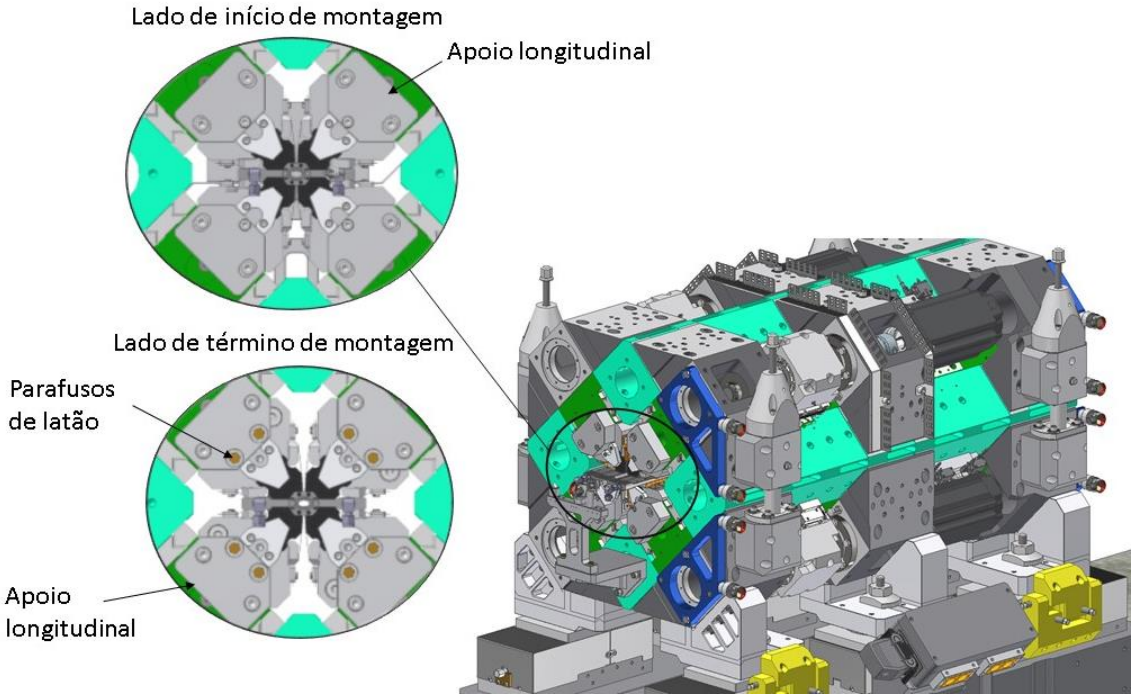
Figura 285. Dispositivo de montagem dos subcassetes no ondulador Delta DU525



Apoio longitudinal para subcassetes

A montagem dos subcassetes do ondulador é feita em etapas. Durante a montagem dos subcassetes nos cassetes do ondulador, com utilização do dispositivo de montagem de subcassetes, foi verificada a necessidade de um apoio que sirva de referência para montagem e posicionamento dos subcassetes. Um primeiro conjunto de apoios foi projetado para ser aparafusado nos cassetes no lado de início da montagem e um segundo conjunto para ser instalado nos cassetes na face oposta do ondulador, estes por sua vez contando com parafusos em latão que ficarão em contato com a face do último subcassete a ser instalado, embora os subcassetes apresentem fixação aos cassetes individualmente e ainda sejam intertravados, estes conjunto de apoio proposto reduz ainda mais a possibilidade de que os conjuntos de subcassetes possam apresentar qualquer movimentação longitudinal.

Figura 286. Apoios longitudinais para montagem de subcassetes no ondulador DU525

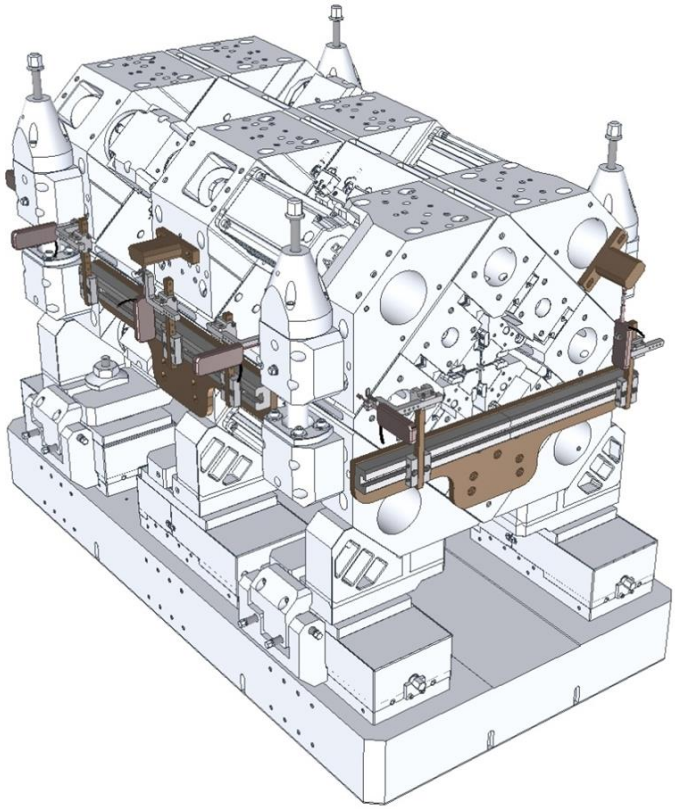


Dispositivo com apalpadores para verificação de erros na montagem do ondulador

A fim de validar o posicionamento dos subconjuntos do ondulador Delta na abertura e fechamento do conjunto, foi desenvolvido um dispositivo para acomodar apalpadores Heidenhain (*Figura 287*). O dispositivo é composto por uma barra estrategicamente posicionada no ondulador com alojamentos e grampos para fixação dos apalpadores. O setup consiste em 6 apalpadores:

- Face frontal: 2 sensores (Tz / Ty + nível)
- Face traseira: 1 sensor (Ty + nível)
- Face lateral: 3 sensores (Ty + nível / Tx + Ry / Tx + Ry)

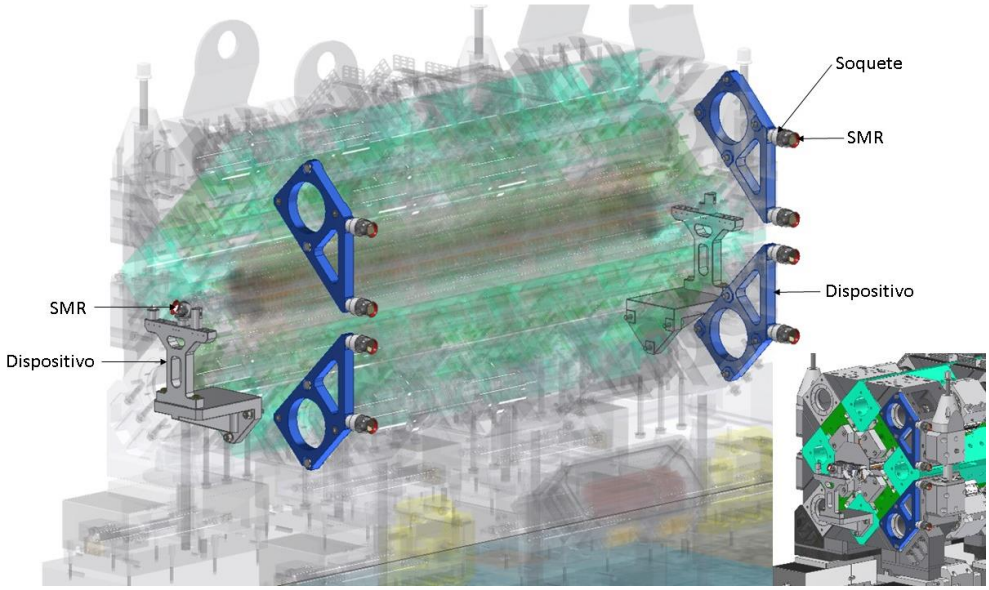
Figura 287. Dispositivo com apalpadores Heidenhain posicionado no ondulador



Soquetes e dispositivos para fiducialização

O processo de montagem do ondulador é realizado sem que este esteja acoplado ao anel. Durante a instalação (que será realizada durante paradas programadas de operação do Sirius), um alinhamento perfeito dos campos magnéticos do ondulador deve ser obtido para o funcionamento adequado sem interferência no feixe. Para isto, realiza-se o processo de fiducialização, que é a parametrização das coordenadas externas do ondulador em relação ao seu centro, para que durante a instalação, um perfeito alinhamento do ondulador em relação ao feixe seja alcançado, utilizando-se pontos externos como referência para alinhamento. Assim, foram desenvolvidos soquetes e dispositivos para acoplamento de esferas de posição (SMR) utilizadas para fiducialização do ondulador por meio de medições em 3 dimensões por laser tracks, sendo estes instalados ao longo de diferentes posições ao longo do exterior do DU525 (*Figura 288*).

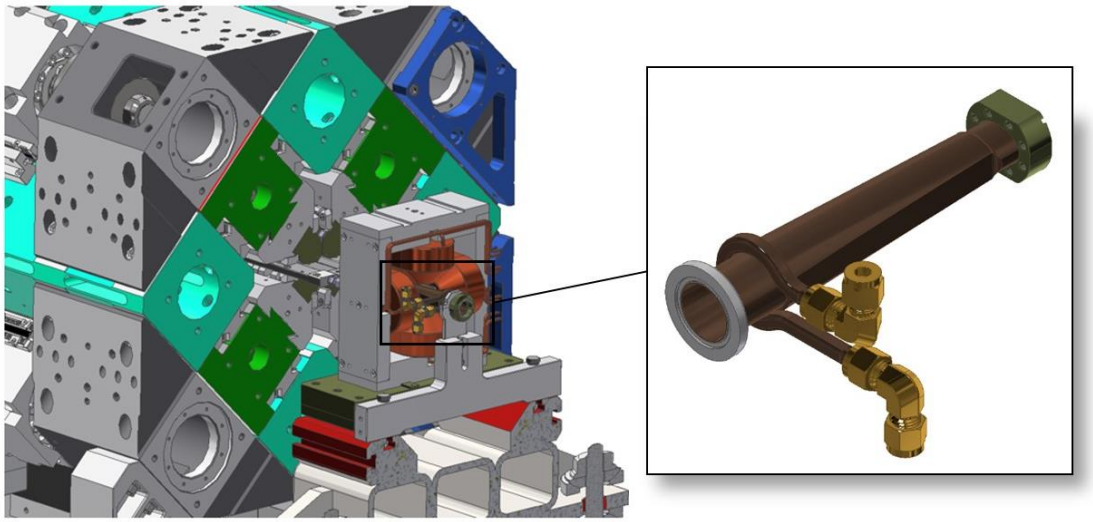
Figura 288. Dispositivos e soquetes para fiducialização por laser track



Câmara de transição e suporte

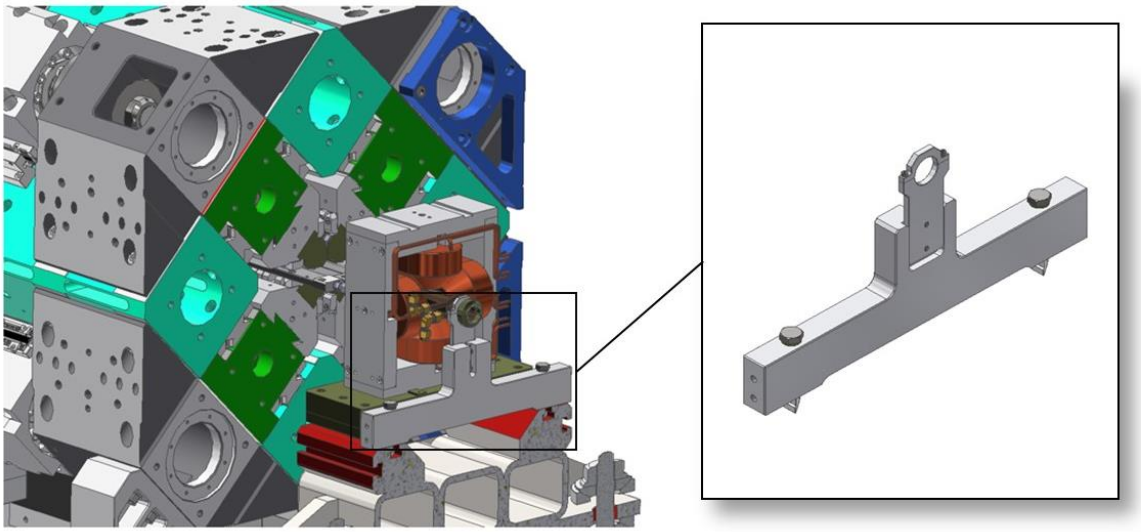
As câmaras de transição são acopladas à câmara de vácuo do ondulador, posicionadas nas regiões de entrada e saída do feixe. Estas são feitas em cobre, sendo essenciais para realizar a transição geométrica dos perfis internos das câmaras do trecho reto (perfil circular), para a geometria das câmaras de vácuo do ondulador (elíptico), de forma que essa transição seja o mais suave possível, evitando que o feixe de elétrons perca energia devido ao aumento da impedância gerada pela sensibilidade do feixe à geometria da câmara. De modo geral, as câmaras posicionadas na entrada do ondulador também servem como absorvedores de potência para regiões críticas da câmara, sofrendo elevado aquecimento, tornando-se imprescindível promover o resfriamento do componente por meio tubos de refrigeração acoplados à superfície externa da câmara. Os flanges da câmara são fabricados em aço inoxidável, sendo unidos ao corpo da câmara (*Figura 289*) por processos de brasagem.

Figura 289. Câmara de transição projetada para ondulador delta DU525



Um suporte para a câmara de transição do ondulador Delta DU525 (*Figura 290*) foi projetado de maneira a permitir a eventuais movimentações da câmara no sentido longitudinal (sentido do feixe) devido à dilatação da mesma durante o processo de "baking", deste modo, atuando apenas como sustentação vertical da câmara de transição.

Figura 290. Suporte para câmara de transição do ondulador Delta DU525

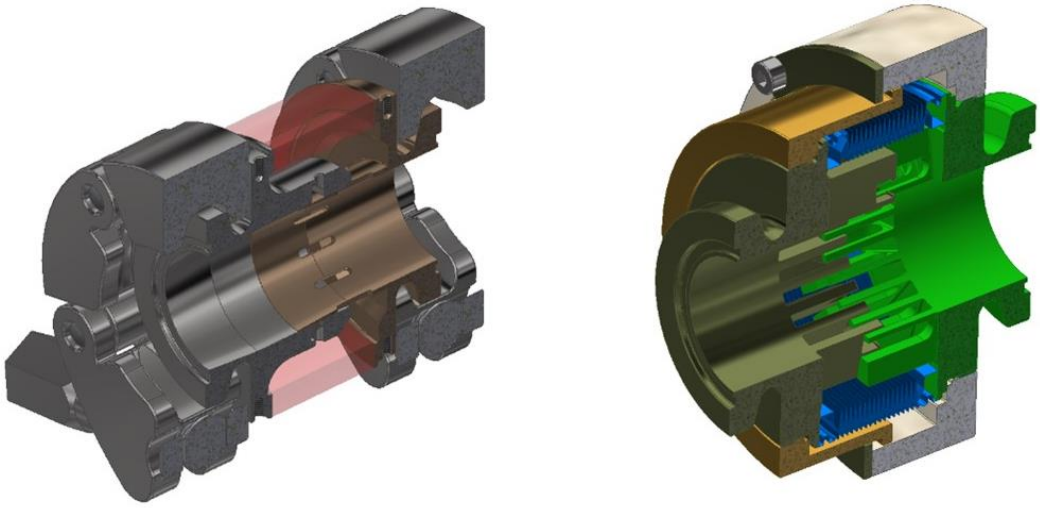


Bellows BW e comb-type

Durante o processo de baking das câmaras de vácuo por onde o feixe de elétrons percorre, devido a dilatações térmicas, há a necessidade de conectores entre elas capazes de absorver a alteração em seu comprimento, sem que a vedação para vácuo seja comprometida e limitando ao máximo os deslocamentos radiais, a fim de garantir o bom alinhamento de todo o sistema. Para que isso seja possível, utilizam-se componentes chamados “bellows”, que são dispositivos flexíveis que promovem a conexão

entre as câmaras. Uma vista em corte do modelo BW, convencionalmente utilizado no Sirius, é mostrada à esquerda da **Figura 291**. Este componente, porém, em alguns trechos do anel, apresentou limitações na absorção dessas variações (movimentações) por não permitir nenhum tipo de desalinhamento radial, o que motivou o desenvolvimento de um novo componente mais flexível. Neste novo modelo (comb-type) mostrado à direita da **Figura 291**, o perfil interno sugerido permite mais graus de liberdade, facilitando a acomodação dessas variações. Sua movimentação é limitada por uma capa externa que limita tanto o seu deslocamento longitudinal, quanto radial. Um dos desafios desse projeto é conciliar o processo de fabricação com os pré-requisitos do projeto do acelerador, uma vez que essa geometria interna interfere diretamente na impedância do feixe.

Figura 291. Modelos de bellows utilizados nas câmaras de vácuo



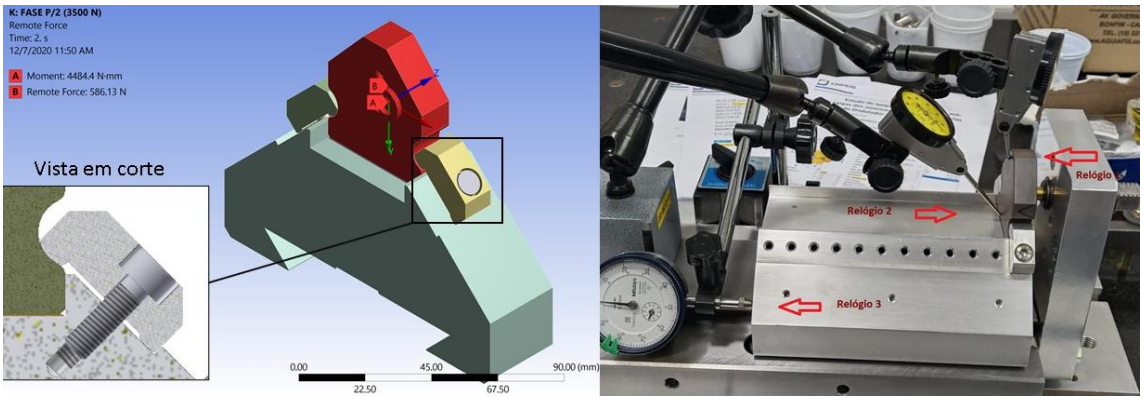
Teste dos grampos de aperto dos blocos magnéticos

Após o estudo de vários modelos de blocos magnéticos para utilização no ondulador DU525, chegou-se à geometria mostrada em vermelho à esquerda na *Figura 292*. Nesta geometria, os blocos são fixados por suas laterais pela aplicação de forças compressivas exercidas por grampos em alumínio aparafusados ao subcassete, permitindo um shimming (alteração na altura dos blocos) de até ± 0.25 mm. Foi também verificada a necessidade de utilização de parafusos não magnéticos para que a fixação dos grampos ao subcassete fosse realizada, alterando-se o material, antes de inox, para liga de alumínio 7075-T6.

Os blocos não devem se mover durante movimentação dos cassetes necessária para configuração de diferentes modos de operação do ondulador, portanto, a fim de avaliar e validar o sistema de fixação e a deformação dos blocos magnéticos do ondulador delta DU525, uma série de simulações computacionais considerando a ação de forças magnéticas foram realizadas para que, tanto a geometria proposta quanto o torque nos parafusos fossem avaliados. Por meio dessas análises, foi possível otimizar a geometria dos grampos de fixação dos blocos magnéticos, bem como definir torque de aperto necessário aos parafusos

para garantir a rigidez do sistema, sem que este seja submetido a altos níveis de deformação e tensão. A partir dos resultados dessas análises, os componentes foram validados por meio de testes de bancada.

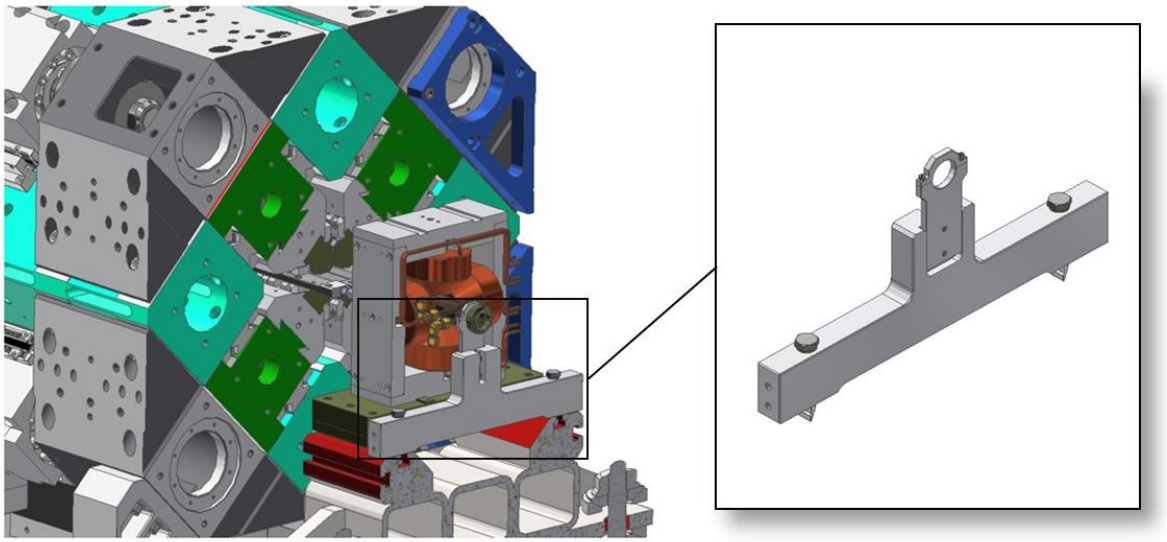
Figura 292. Configuração de simulações do projeto de grampos e análises dimensionais realizadas em protótipo



Projeto do dispositivo de abertura e fechamento do ondulador

Durante a instalação do ondulador Delta DU525 no anel do Sirius, é necessário realizar a abertura do ondulador para que a câmara de vácuo possa ser instalada. Para isso, forças magnéticas de grande magnitude da interação entre blocos magnéticos devem ser vencidas para que a parte superior do ondulador possa ser removida com movimentação vertical plana (a parte superior não deve se inclinar). Deste modo foram projetados dispositivos para abertura do ondulador a serem instalados simetricamente nas laterais externas do DU525 (*Figura 293*). Esses dispositivos são acionados de maneira sincronizada por meio de apertos em seus parafusos superiores, evitando qualquer inclinação da parte superior. O mesmo procedimento é realizado no ato de fechamento após instalação da câmara de vácuo.

Figura 293. Dispositivo de abertura e fechamento para ondulador Delta DU 525

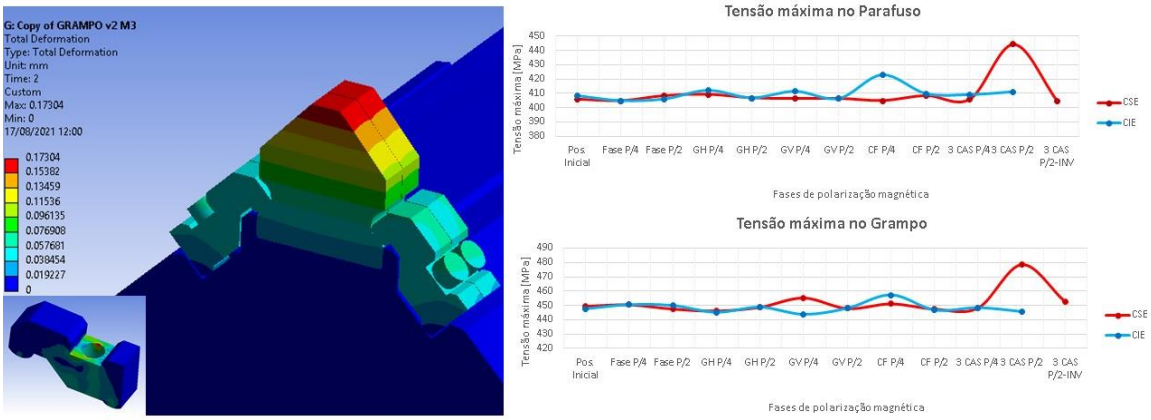


Ondulador Delta DU220 – Linha Carnaúba

Grampos e parafusos DU220

Para o desenvolvimento do ondulador Delta DU220 de período magnético de 22 mm, diversas configurações de grampos para fixação dos blocos magnéticos ao subcassete foram estudadas. No caso deste ondulador, os blocos magnéticos têm espessura de 5,25 mm, sendo o período composto de uma por uma sequência de 4 blocos magnéticos com espaçamento de 0,05 mm entre blocos, o que dificulta sua fixação visto que os parafusos do grampo devem ter dimensões bastante reduzidas. Inicialmente foi testada uma geometria semelhante à geometria de grampo utilizada no ondulador Delta DU525 (*Figura 294*), porém nesta geometria o parafuso deveria ser de especificação de rosca M2,5, o que se mostrou inviável por meio das análises de tensão devido à altas tensões obtidas no grampo mesmo alterando o material do grampo de liga de alumínio 7075 para liga de titânio. Deste modo uma nova geometria foi analisada para utilização de parafusos com bitola M3 e grampo em liga de alumínio.

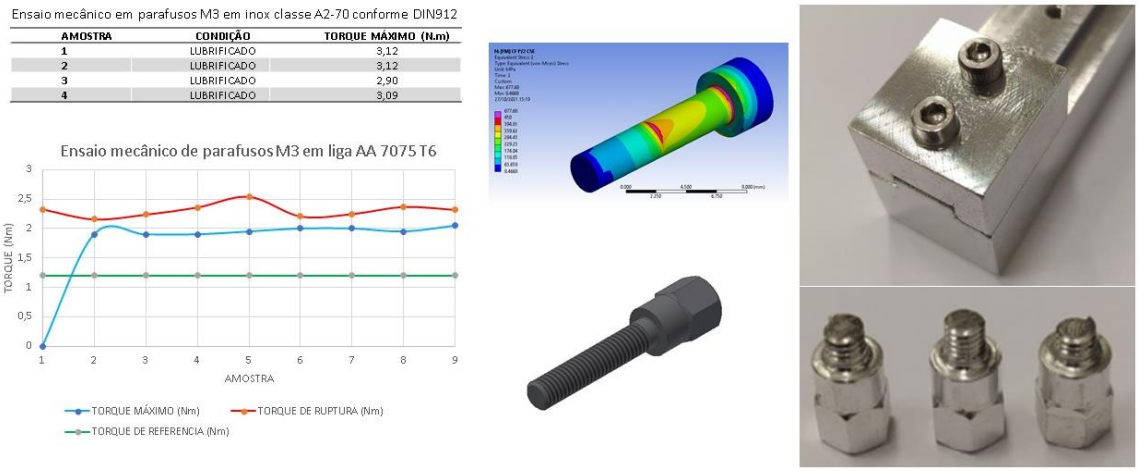
Figura 294. Análises de tensões e deformações em grampos e parafusos do ondulador Delta DU220



Ensaios mecânicos de torção de parafusos para grampo de subcassete

A partir dos resultados obtidos pela análise de grampos para o ondulador Delta DU220, uma análise mais aprofundada foi realizada para seleção dos parafusos a serem utilizados para fixação dos blocos magnéticos do ondulador (*Figura 295*). Inicialmente avaliou-se o comportamento mecânico de parafusos M3 em liga de aço inoxidável austenítico classe A2-70 conforme DIN912. Os parafusos resistiram ao torque especificado em projeto, apresentando falha no encaixe da cabeça allen. Visto que esses parafusos podem apresentar pequena quantidade de magnetização proveniente de fase ferrítica residual, foram também usinados parafusos M3 em liga de alumínio 7075-T6, sendo usinados pela ferramentaria internamente com cabeça sextavada de modo a facilitar fabricação. Estes foram testados e resistiram às solicitações previstas devido ao torque de projeto, se mostrando uma alternativa viável para utilização no ondulador Delta DU220 sem apresentar qualquer característica magnética.

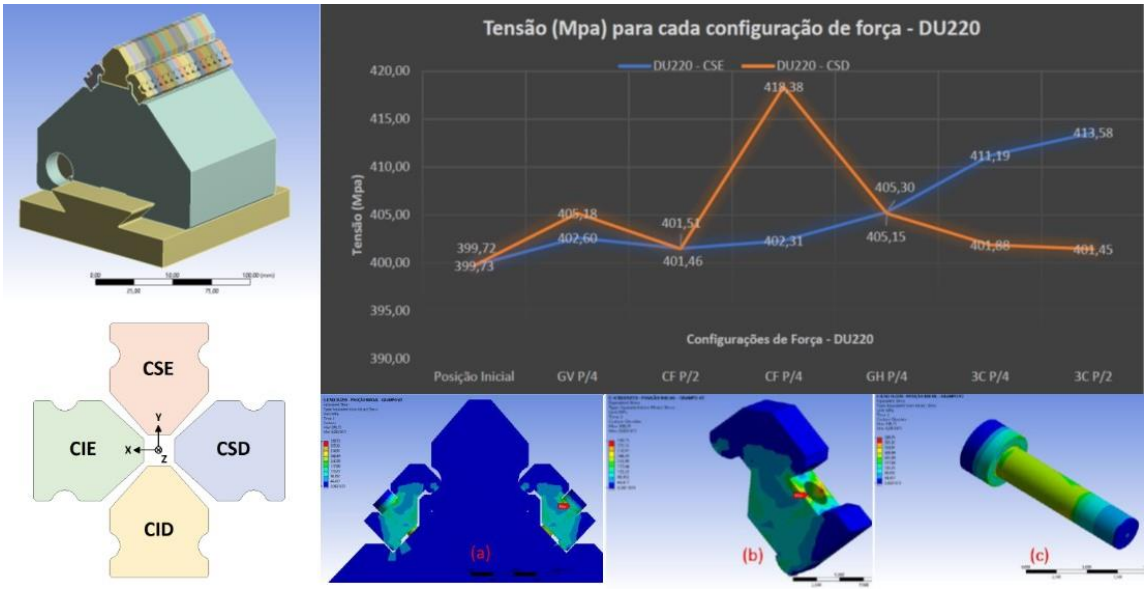
Figura 295. Análises realizadas para seleção de parafusos para fixação de grampos do ondulador Delta DU220



Subcassetes Intermediários

Para validação da geometria dos subcassetes intermediários proposta para ondulador DU220, análises para avaliação do comportamento de todo o conjunto montado, considerando a atuação das forças magnéticas, geometria de grampos e parafusos e torque de aperto foram realizadas. As forças magnéticas calculadas e fornecidas pelo grupo de ímãs foram aplicadas para cada configuração de operação do ondulador, gerando diferentes distribuições de tensões máximas para cada condição analisada.

Figura 296. Análise de tensões e deformações em subcassete intermediário do ondulador Delta DU220

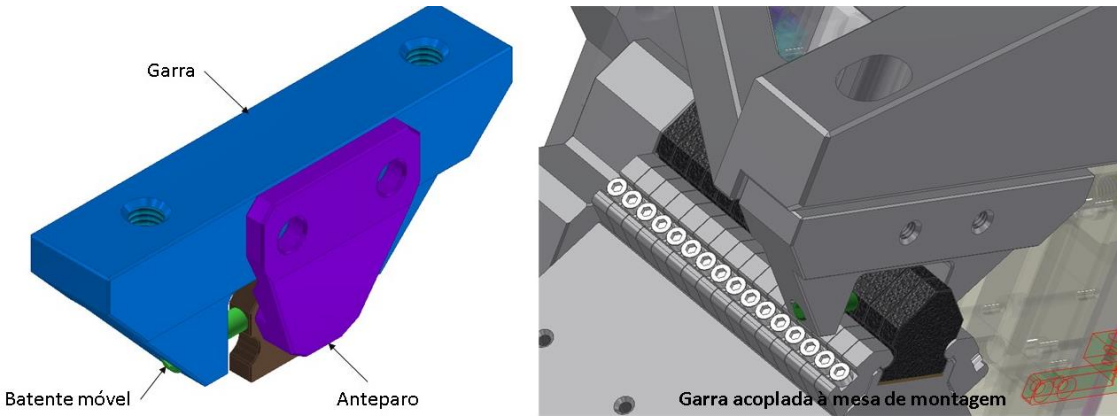


Garra para montagem dos blocos magnéticos em subcassetes do Delta DU220

Assim como para a montagem dos blocos magnéticos do ondulador DU525, uma garra foi desenvolvida para montagem dos blocos do ondulador DU220 na mesa de montagem (*Figura 296*). O dispositivo conta, além dos batentes de posicionamento lateral, com um anteparo para garantir o alinhamento durante

montagem dos blocos em sequência. Após completa montagem do conjunto, o alinhamento e magnetização dos blocos são verificados e, no caso de necessidade de ajuste, o anteparo é removido para que a garra possa realizar o alinhamento sem que o anteparo colida com os blocos magnéticos já montados.

Figura 297. Garra para blocos magnéticos do Delta DU220 na mesa de montagem.

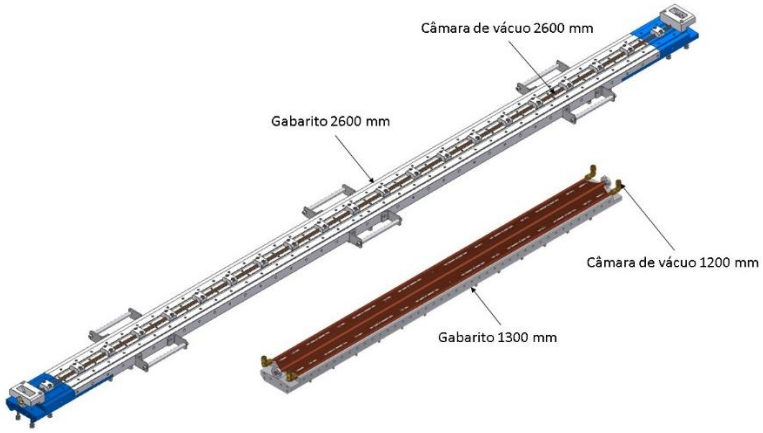


Gabarito da câmara de vácuo do ondulador Delta DU220

Para o desenvolvimento das câmaras de vácuo do ondulador Delta DU220, foi desenvolvido um gabarito com o intuito de manter a rigidez e integridade estrutural da câmara ao longo de todo o seu processo produtivo. Inicialmente, as câmaras foram desenvolvidas com comprimento de 2600 mm, a fim de validar o processo de deposição de filme NEG, bem como a brasagem dos flanges. O processo de usinagem dessas peças foi bastante desafiador para que os objetivos propostos fossem alcançados, dado o comprimento do gabarito e a dificuldade de se encontrar parceiros com maquinário capaz de atender às necessidades do projeto. O desenvolvimento dessa etapa inicial foi muito bem-sucedido, proporcionando adequada deposição de filme NEG em todo o interior da câmara, processo este que nunca foi executado em câmaras tão longas, além de garantir que a câmara sofresse deformações dentro dos limites estabelecidos por projeto.

Para o ondulador que deve ser instalado no setor 6 (linha Carnaúba), está sendo desenvolvido um novo gabarito para uma câmara de 1300 mm, dado o comprimento deste equipamento (1200 mm). O novo gabarito tem o mesmo objetivo do anterior, porém nesta etapa, novos sistemas de fixação da câmara estão sendo desenvolvidos a fim facilitar sua instalação no anel.

Figura 298. Modelos de gabaritos para fabricação e instalação de câmaras de vácuo do ondulador DU220



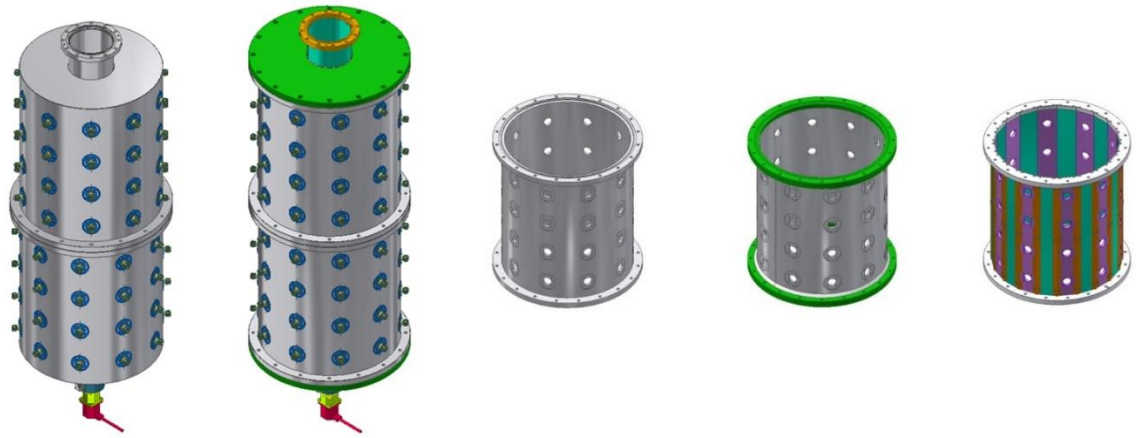
Cavidade combinadora (CACO)

Estudos de viabilidade para fabricação e custo

Atualmente são utilizadas torres (1970x1970x2106 mm) contendo 16 módulos amplificadores; a cavidade combinadora visa a suprir novas demandas necessárias e otimizar a amplificação das frequências com dimensões inferiores. O modelo foi baseado em outros desenvolvimentos de cavidades combinadoras feitas por outros laboratórios (ESRF, SPRING-8, CERN e NSLS-II).

Foram realizados vários estudos para avaliar a viabilidade da fabricação devido à necessidade de garantir uma uniformidade entre as distâncias dos plugs radiais ao centro da Cavidade para alcançar da amplificação desejada. Entre eles, a fabricação através de um “blank” maciço e usinado, chapa única calandrada e diversas chapas unidas. Abaixo alguns dos modelos projetados podem ser visualizados na *Figura 299*.

Figura 299. CACO: estudos de viabilidade para fabricação

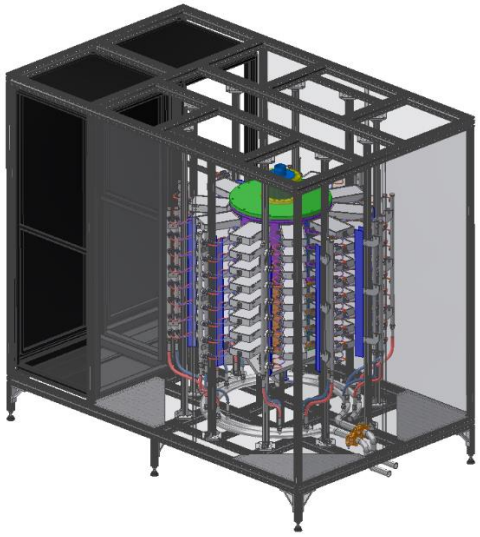


Chassi para cavidade combinadora

um chassi metálico foi projetado de maneira a promover a sustentação mecânica e proteção de todos os componentes da cavidade combinadora e seus subsistemas embarcados (eletrônicos, controles,

refrigeração etc.), tendo em vista a facilidade do acesso dos componentes internos para que a montagem e processos de manutenção fossem facilmente realizáveis (*Figura 300*).

Figura 300. Chassi desenvolvido para sustentação de cavidade combinadora



Micromolde para produção de esferoides

Micromolde em resina maleável utilizados para produção de esferoides que serão aplicados em projetos do LNBio. Ele deve suportar o processo de esterilização por autoclave e o design deve permitir que a deposição de agarose possa ser desenformada para que caiba em placas de 24 e 12 poços. Realizamos a engenharia reversa e o micromolde foi impresso no LNNano.

Figura 301. Modelo 3D para impressão.

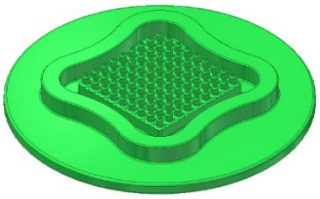
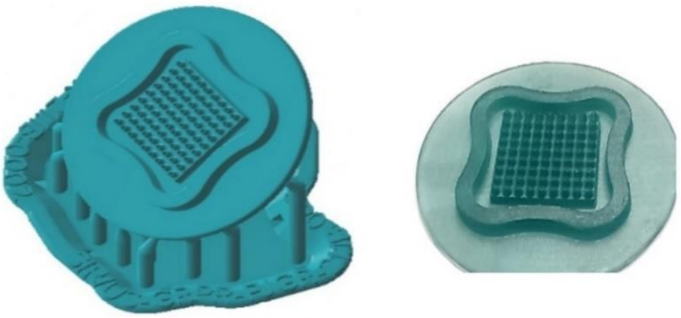


Figura 302. Micromolde impresso em resina.

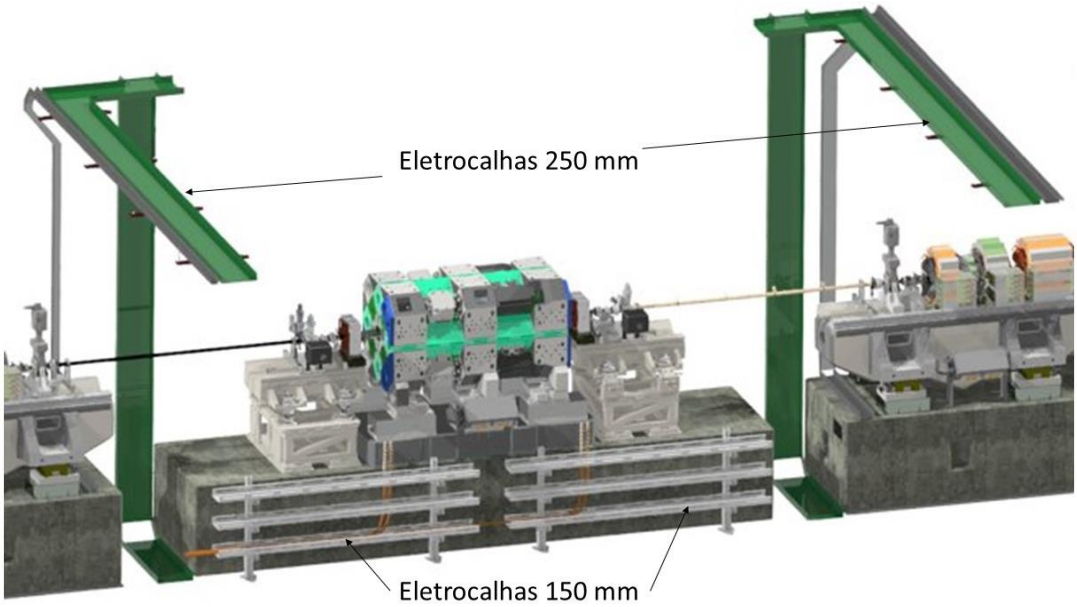


Infraestruturas

Estudo de eletrocalhas para passagem de cabos de alimentação do Ondulador – Delta Sabiá

Para instalação do ondulador Delta Sabiá, que será realizada no setor 10 do túnel do Sirius, eletrocalhas para condução de fios, cabos e mangueiras foram projetadas. As eletrocalhas superiores (de 250 mm de largura) serão instaladas paralelamente em posições próximas a eletrocalhas já existentes no túnel do Sirius, tendo base em perfil estrutural padrão e serão fixadas ao teto por meio barras roscadas, como mostrado na região superior da *Figura 303*. Um conjunto de 6 eletrocalhas serão instaladas em frente ao bloco de concreto, tendo dimensões de 150x50x1800 mm. Estas serão fixadas por meio de pilastras de fornecimento interno (região inferior da *Figura 303*).

Figura 303. Eletrocalhas para ondulador Delta Sabiá a serem instaladas no túnel do Sirius



5.2. Outros projetos e iniciativas da Engenharia e Tecnologia

Supercondutividade

A supercondutividade, capacidade de alguns materiais de perderem a resistência à corrente elétrica abaixo de uma temperatura crítica (Tc) e um campo crítico (Bc), é aplicada em diversas áreas da ciência e tecnologia. No contexto das fontes de luz síncrotron, a utilização de fios supercondutores nos enrolamentos das bobinas dos ímãs garante a produção de campos magnéticos mais altos e radiação síncrotron de maior energia do que os fios comuns. Dessa forma, é de interesse do CNPEM formar uma equipe, dentro da Engenharia e Tecnologia, que domine e explore as tecnologias da supercondutividade aplicadas a aceleradores e outras áreas.

No final de 2020, foi estabelecido um acordo de colaboração entre CNPEM e CERN (European Organization for Nuclear Research). Por ser um centro de excelência em pesquisa científica com vasta experiência, o

acordo tem foco na pesquisa, desenvolvimento e compartilhamento de recursos na área da supercondutividade.

Durante o ano de 2021, o CNPEM, em parceria com o CERN, se concentrou no aprendizado e desenvolvimento de dois projetos conceituais de ímãs supercondutores para o Sirius. O primeiro projeto visa a substituição de um ou mais dipolos centrais dos arcos do Sirius por um dipolo supercondutor com campo magnético de pico igual a 6.4 T, denominado Superbend. O segundo projeto visa a instalação de um ímã supercondutor com campo de pico superior a 6 T (idealmente 7 T), denominado *Wavelength Shifter* (WLS), em um dos trechos retos do Sirius.

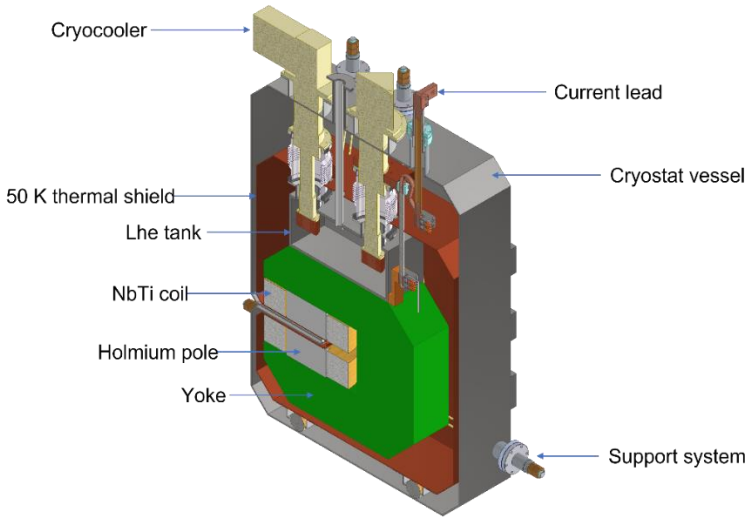
Dipole Supercondutor (Superbend)

O Superbend foi proposto para substituir um dos dipolos BC, atingindo um campo magnético de pico superior a 6 T sem alterar as características óticas do feixe de elétrons. Dessa forma, uma equipe multidisciplinar da Divisão de Engenharia e Tecnologia do CNPEM foi reunida para que, ao longo do desenvolvimento do projeto, estudos, levantamentos bibliográficos, discussões e simulações computacionais fossem realizados para propor os conceitos do criostato, bobinas, núcleo magnético, *current leads*, entre outros, e avaliar se as propriedades dos modelos satisfaziam as características desejadas para o dipolo supercondutor.

As dimensões do Superbend deveriam satisfazer o espaço limitado ocupado pelo dipolo BC que seria substituído. Portanto, os materiais, dimensões e disposição dos componentes foram avaliadas com cuidado através de simulações magnéticas, térmicas e estruturais. No Sirius, as câmaras de vácuo do anel de armazenamento são revestidas com filme NEG, cuja ativação é feita a 200°C. Dessa forma, foi discutida a disposição dos componentes do dispositivo a fim de criar um modelo de um magneto em formato de "C" para que a câmara de vácuo pudesse ser quente e externa ao criostato.

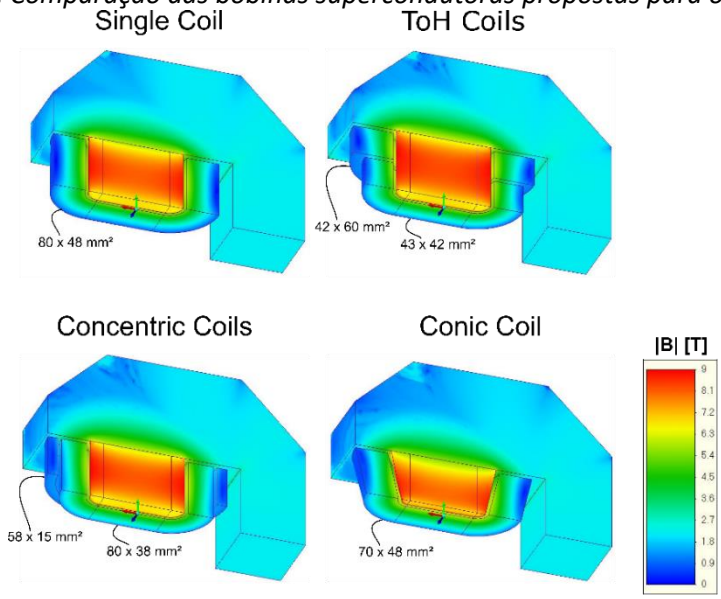
A Figura 304 ilustra o desenho 3D final da proposta para o Superbend, onde pode ser observada a disposição dos componentes. O criostato (câmara de vácuo), o escudo térmico e o yoke seguem o formato de "C". Tiras de Kevlar são fixadas no yoke para sustentá-lo. O tanque de Hélio líquido é um paralelepípedo sustentado pelo yoke e possui um tubo de realimentação conectado à área superior externa. Dois cryocoolers são utilizados no dispositivo, em que o primeiro estágio mantém a temperatura do escudo térmico em 50 K e o segundo estágio fica inserido no tanque de Hélio com recondensadores para manter o volume de Hélio constante e a temperatura em 4,2 K. A bobina supercondutora é feita de NbTi e as current leads possuem três partes, a resistiva, a HTS (High *Temperature Superconductor*) e a conexão com NbTi.

Figura 304. Desenho preliminar da disposição dos componentes do Superbend



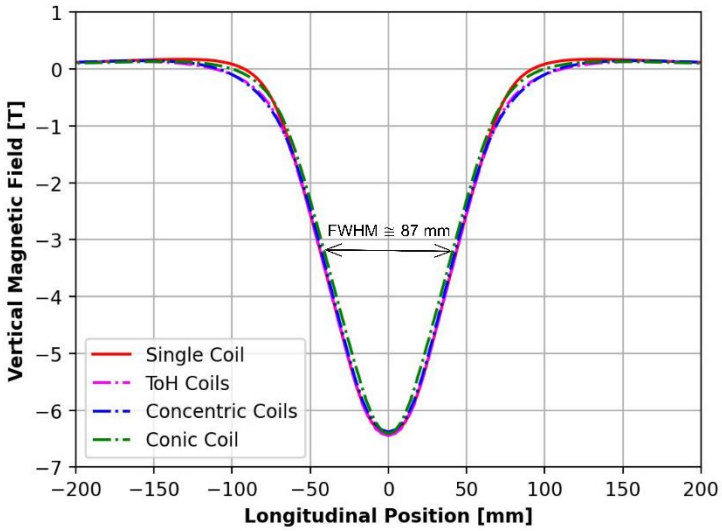
Os resultados das simulações eletromagnéticas, ilustrados na Figura 305, avaliaram e compararam qual dos quatro modelos de bobinas supercondutoras de NbTi melhor se adequava às premissas do projeto: campo de pico maior que 6 T, campo integrado e gradiente de campo integrado iguais aos do dipolo BC, e topologia do yoke em formato de "C".

Figura 305. Comparação das bobinas supercondutoras propostas para o Superbend



A Figura 306 ilustra os perfis de campo magnético longitudinais, na direção do feixe de elétrons, dos diferentes modelos de bobinas supercondutoras analisadas. Como os perfis se apresentam muito parecidos, decidiu-se escolher o modelo de bobina "*Single coil*", por representar o projeto geral mais simples.

Figura 306 - Comparação dos perfis de campo longitudinais das bobinas supercondutoras propostas para o Superbend



Para garantir a integridade do dispositivo supercondutor, foram realizadas simulações mecânicas paramétricas variando a espessura dos componentes, permitindo a determinação da espessura ideal das paredes do vazo externo do criostato e do pescoço do yoke a fim de manter as deformações e tensões inferiores aos limites estabelecidos em projeto. A Figura 307 ilustra o resultado da simulação estrutural do vaso externo do criostato, cuja espessura das paredes foi definida em 12 mm e barras de reforço de 20 mm de espessura foram inseridas em posições estratégicas. A Figura 308 ilustra o resultado da simulação estrutural que buscou otimizar o desenho do yoke para melhor se adequar ao projeto eletromagnético, com espessura do pescoço definida em 180 mm, de forma a não aumentar demais o peso do yoke e interferir no projeto criogênico.

Figura 307. Resultado da simulação estrutural (deformação total, esquerda, e tensões eq. von-Mises, direita) do vazo externo do criostato

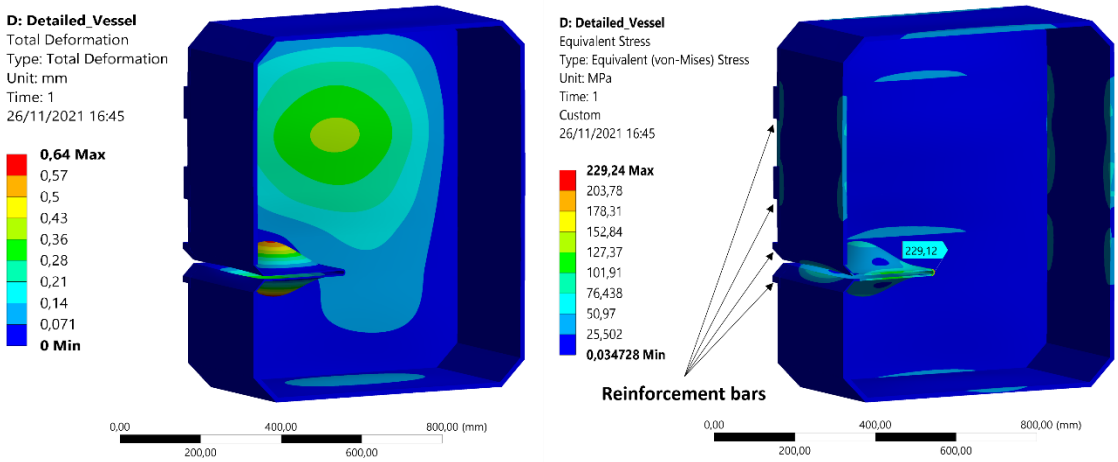
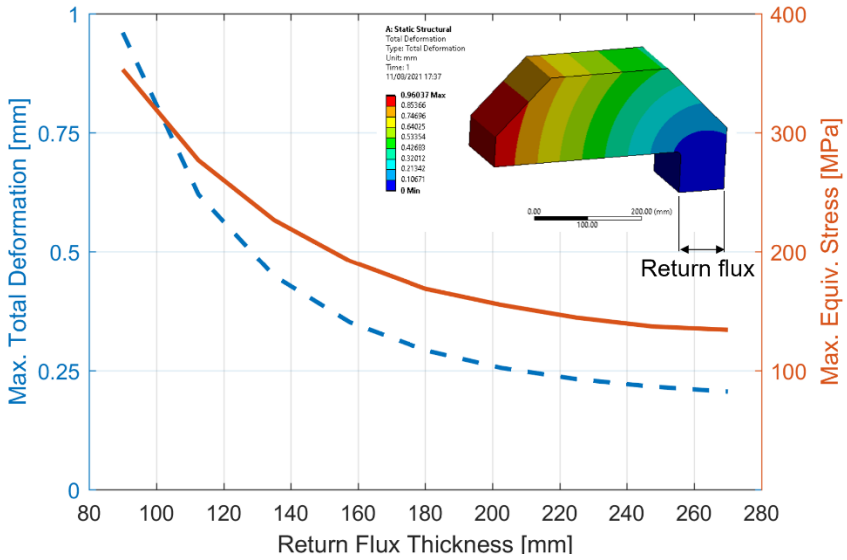
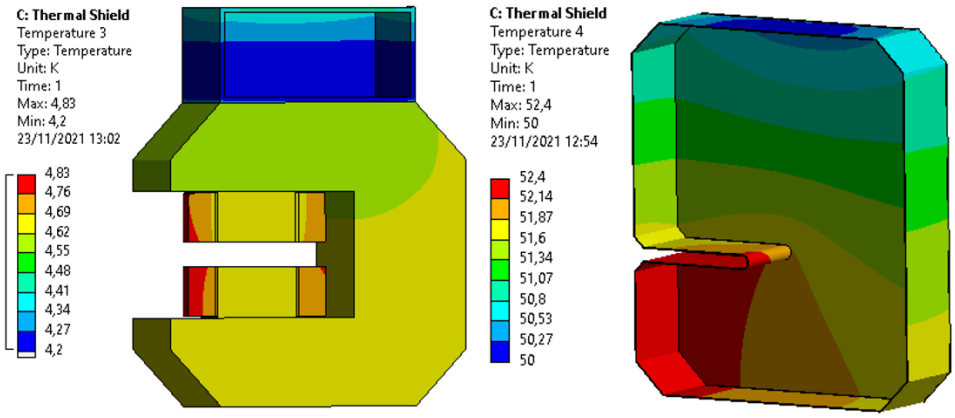


Figura 308. Resultados da simulação estrutural para a otimização da espessura do pescoço do yoke



A Figura 309 ilustra os resultados das simulações térmicas para avaliar a distribuição de temperatura no yoke com as bobinas supercondutoras e a distribuição de temperatura no escudo térmico ancorado a 50 K no primeiro estágio dos cryocoolers. A refrigeração ocorre via contato da face superior do yoke com o reservatório de Hélio líquido mantido a 4,2 K. Dessa forma, na simulação térmica do yoke e bobinas supercondutoras, a temperatura máxima se deu na parte inferior, que está mais afastada da refrigeração. No entanto, essa temperatura é inferior à temperatura crítica do NbTi, mantendo-se dentro das especificações do projeto para a bobina. Na simulação do escudo térmico, a temperatura máxima de 52,4 K também foi observada na região mais distante da ancoragem feita no primeiro estágio dos cryocoolers.

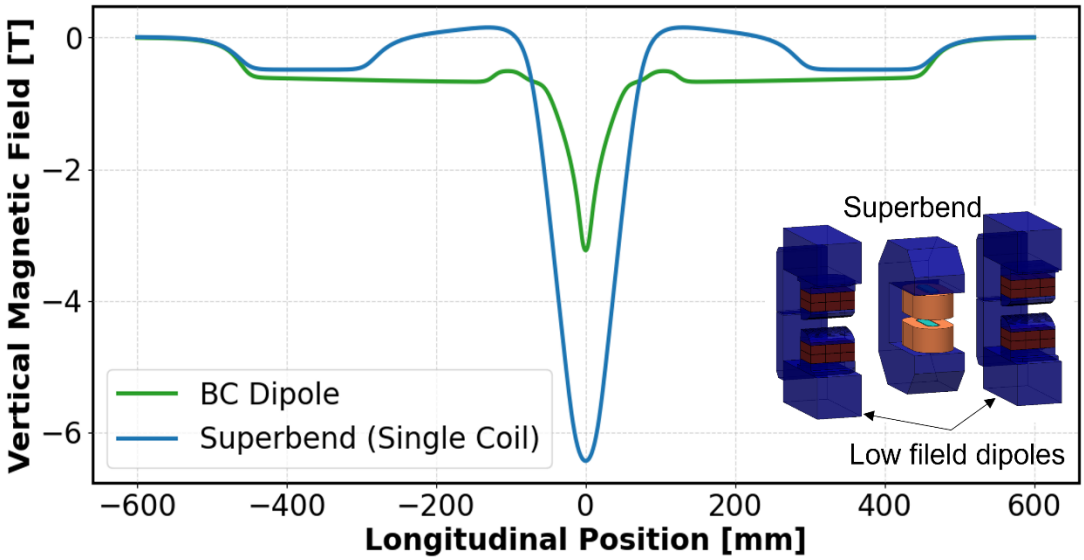
Figura 309. Distribuição de temperatura simulada no yoke, bobinas supercondutoras (esq) e escudo térmico (dir)



Apesar de o desenvolvimento do projeto do Superbend ter resultado em grande aquisição de conhecimento na área de supercondutividade e proporcionado avanço nos estudos dos modelos, algumas premissas de projeto não foram satisfeitas, principalmente aquelas que permitem a substituição direta

de um dos dipolos BC pelo Superbend, como a obtenção de um perfil de campo condizente com a rede magnética do Sirius. A Figura 310 ilustra a comparação do perfil de campo longitudinal dos dipolos BC e do Superbend com seus dipolos auxiliares. O uso de dipolos auxiliares permitiu casar o campo integrado do Superbend com o do dipolo BC, porém o gradiente de campo ficou bastante diferente. Portanto, é necessário realizar estudos mais aprofundados para otimizar o projeto eletromagnético, mecânico, criogênico e de proteção contra "quench" do Superbend.

Figura 310. Comparação entre os perfis de campo longitudinais de um dipolo BC e do Superbend com dipolos laterais auxiliares

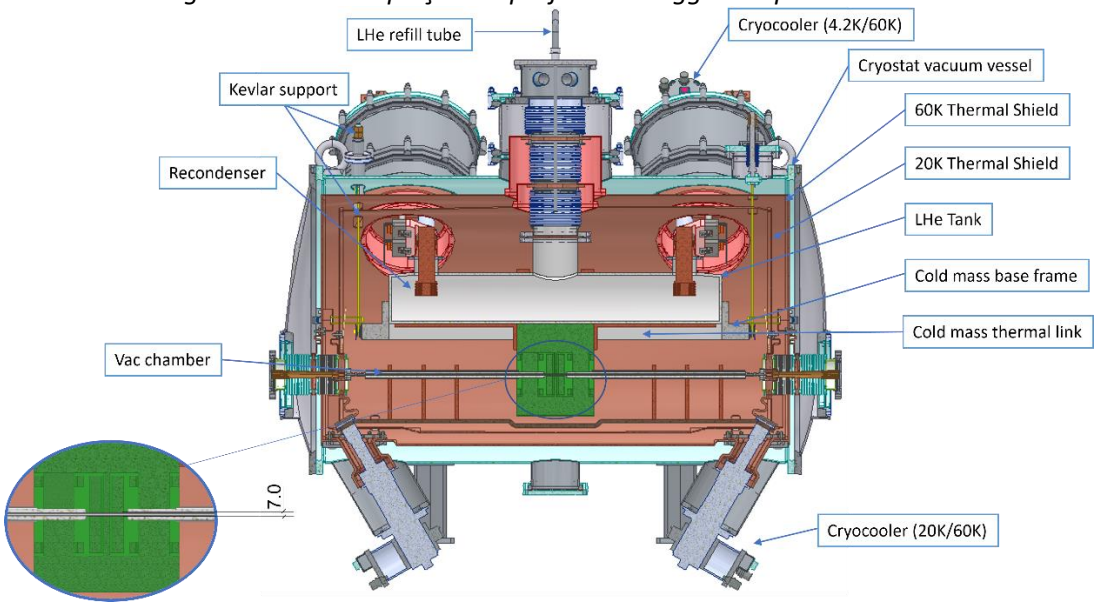


Wavelength Shifter Supercondutor (WLS)

O *Wavelength Shifter* (WLS), um ímã supercondutor com uma bobina central e duas bobinas laterais, foi proposto para reutilizar a maior parte dos componentes e equipamentos de alto custo do *Wiggler Supercondutor* (Wiggler SC), ímã supercondutor que foi removido da antiga fonte de luz síncroton do CNPEM, UVX. A equipe se dedicou à readequação dos componentes a fim de projetar o WLS para operar em um dos trechos retos do Sirius e foram estabelecidos os seguintes requisitos: campo magnético acima de 6 T, idealmente 7 T; perfil de campo estreito na região do polo central (FWHM ≈ 30 mm); e campo integrado nulo. É importante que o pico central seja estreito para não aumentar a emitância do acelerador e impactar negativamente as características do feixe.

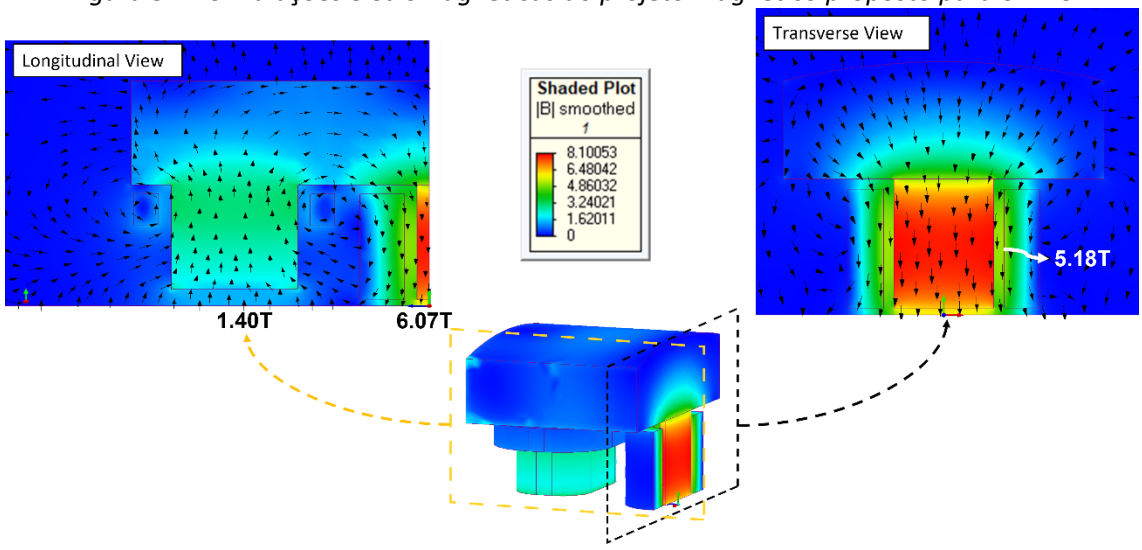
A Figura 311 ilustra um corte do desenho 3D do WLS, no qual pode ser observada a disposição dos componentes do dispositivo, criostato, escudos térmicos, yoke, tiras de kevlar, reservatório de Hélio líquido, bobinas supercondutoras, tubo de realimentação, cryocoolers e câmara de vácuo. Na transformação de Wiggler SC para WLS, todos os componentes que operam em temperaturas próximas a 4,2 K foram alterados, yoke, bobina supercondutoras, reservatório de Hélio líquido e conexões térmicas. Além disso, como o gap magnético do WLS é cerca de 2,5 vezes menor que o do Wiggler, um novo projeto para a câmara de vácuo do feixe de elétrons também foi necessário, cuja câmara é fabricada a partir de um perfil de alumínio extrudado com geometria especial que já foi utilizado nas câmaras de vácuo dos onduladores planares.

Figura 311. Readequação do projeto do Wiggler SC para um WLS



O projeto eletromagnético foi otimizado para buscar atingir um campo de pico no polo central acima de 6 T. A Figura 312 ilustra o resultado da simulação eletromagnética do projeto magnético que apresentou o melhor desempenho. Esse projeto é baseado em um polo central estreito (apenas 10 mm de espessura) feito de Hólmio, material que exerce a função de concentrador de fluxo magnético, e seu resultado forneceu um campo magnético pouco maior que 6 T (6,01 T) no gap e pouco maior que 5 T (5,09 T) na bobina supercondutora.

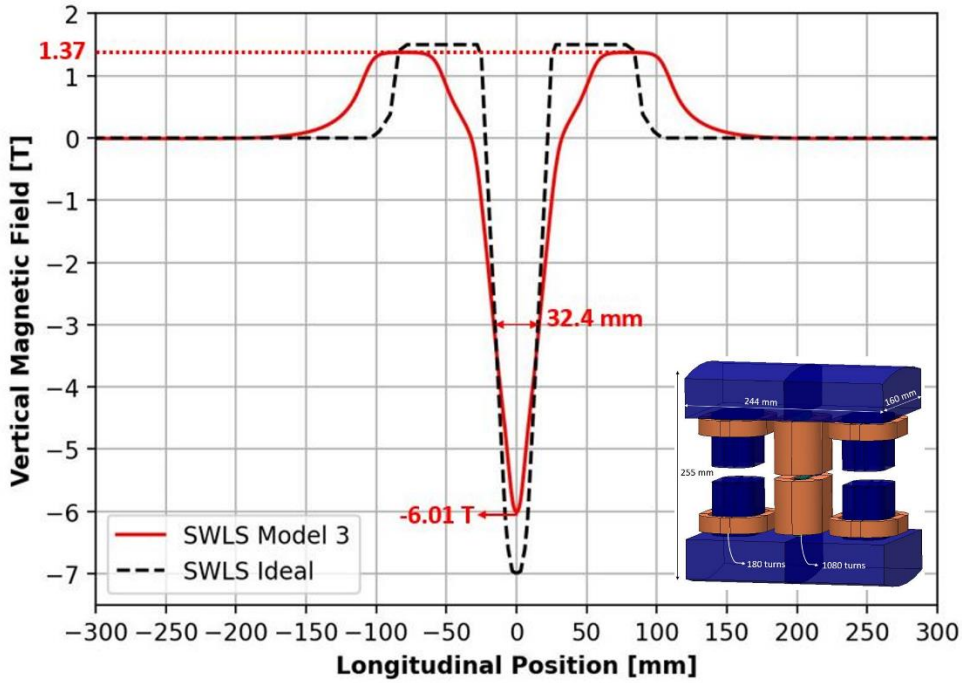
Figura 312. Simulações eletromagnéticas do projeto magnético proposto para o WLS



A Figura 313 mostra a comparação entre o perfil de campo teórico e ideal para o projeto eletromagnético, validado pelo Grupo de Física de Aceleradores (FAC), e o perfil de campo longitudinal obtido com o projeto magnético mostrado na Figura 312. Apesar de o campo de pico de 7 T ainda não ter sido atingido, o perfil

de campo apresentou uma FWHM muito parecida com o perfil de campo ideal, caracterizando esse projeto magnético como aceitável para o Sirius por estar dentro da especificação definida pela FAC.

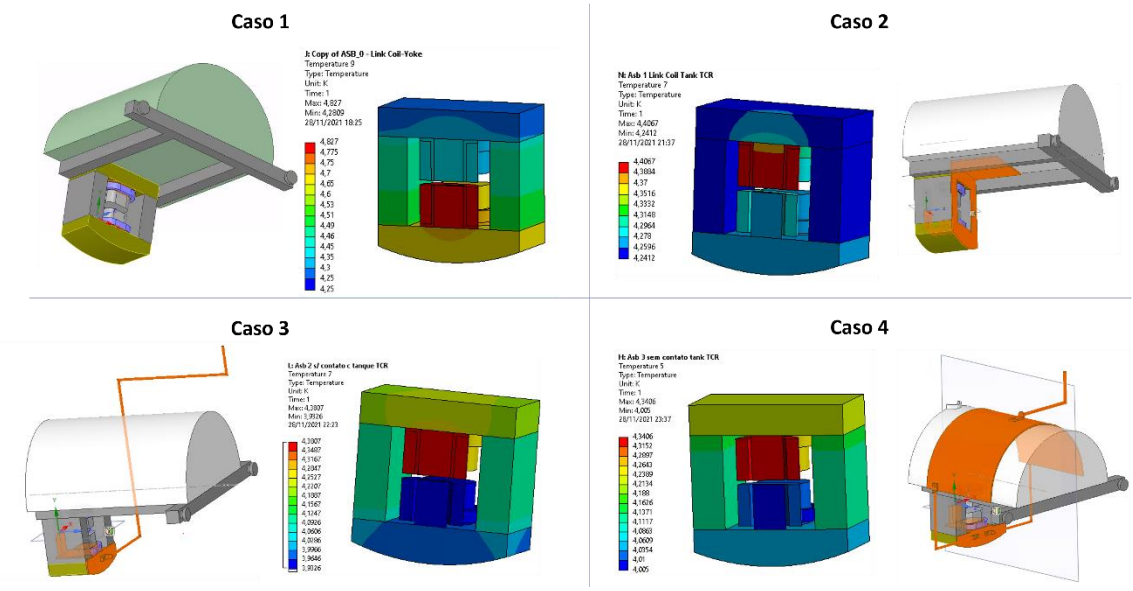
Figura 313. Comparação do perfil de campo simulado para o melhor modelo eletromagnético do WLS com o perfil de campo ideal definido pelo grupo FAC para o Sirius



O projeto criogênico do WLS foi feito partindo do projeto e conceito usado no Wiggler SC. Para a validação dos modelos de simulação térmica, primeiro o modelo original do Wiggler SC foi simulado e comparado com os resultados de projeto do fabricante. Os resultados obtidos ficaram muito próximos dos resultados especificados pelo fabricante e, portanto, os modelos simulados foram validados.

Com a validação do modelo, foram feitas simulações térmicas com as modificações na “massa fria” para readequar o modelo ao WLS. A Figura 314 ilustra o resultado das simulações térmicas da “massa fria” do WLS em 4 casos diferentes. O Caso 1 (temperatura máxima de 4,83 K) é o caso básico onde o yoke está em contato com o tanque de Hélio, sem links térmicos de cobre. No Caso 2 (temperatura máxima de 4,41 K), a parte inferior das bobinas recebe um link térmico de cobre que está em contato direto com a parte inferior do reservatório de Hélio, já a parte superior das bobinas considera apenas um link térmico entre a bobina e o yoke. No Caso 3 (temperatura máxima de 4,38 K), a parte inferior das bobinas recebe um link térmico de cobre, com adição de um link térmico longo que está em contato com o segundo estágio do cryocooler. Por fim, o Caso 4 (temperatura máxima de 4,34 K) é similar ao Caso 3 com a adição de uma chapa de cobre, ligada ao segundo estágio do cryocooler, que envolve parte do tanque de Hélio. Cada caso apresenta vantagens e desvantagens do ponto de vista térmico e de praticidade. No entanto, como o projeto criogênico precisa ser capaz de manter as bobinas supercondutoras o mais próximo possível da temperatura de 4,2 K, apenas os Casos 2, 3 e 4 satisfazem as especificações.

Figura 314. Comparação das simulações térmicas para a "massa fria" do WLS com diferentes casos de link térmico



A detecção e proteção de "quench" do WLS aproveitarão o mesmo conceito usado no Wiggler SC, que se baseia no uso de resistores em série com as bobinas supercondutores. Com esse conceito, quando um "quench" ocorre, uma chave é aberta e a corrente que circula pelas bobinas é forçada a passar pelos resistores, dissipando assim toda a energia fora do criostato. Vários estudos foram realizados para permitir um tempo de detecção da ordem de 100 ms a uma temperatura máxima nas bobinas supercondutoras de 100 K. As fontes de corrente para o WLS serão reaproveitadas do Wiggler SC.

Vários estudos ainda estão em andamento para otimizar o projeto do WLS de forma a atingir o campo de pico desejado de 7 T. No entanto, pode-se considerar que o projeto conceitual apresentado, que permite atingir um campo de pico maior que 6 T, já pode ser considerado razoavelmente bom para servir de base para testes e protótipos preliminares.

5.3.Apoio à geração de inovação

Projetos desenvolvidos em parceria com empresas

Aprofundamento da Parceria com startup Pitec para Sistema de Radiofrequência do Sirius

Para que o Sirius possa chegar à sua corrente de projeto, é necessária a instalação de um sistema de radiofrequência composto por duas cavidades de radiofrequência supercondutoras e por um conjunto de oito torres de amplificadores de alta potência que irão fornecer a energia necessária para manter o feixe de elétrons de alta corrente. Em paralelo, está em desenvolvimento um novo conceito para as quatro torres de amplificadores restantes, necessário em função do lançamento de uma nova linha de transistores e da obsolescência dos utilizado nos primeiros amplificadores. Para dar continuidade aos novos projetos e para a produção dos quatro amplificadores dentro de um prazo compatível com a necessidade de instalações das cavidades supercondutoras no primeiro semestre de 2023, o CNPEM

precisou buscar fornecedores qualificados e consultou a Pitec, empresa que já atua na fabricação dos detectores do Sirius.

Essa nova colaboração será parte do novo acordo guarda-chuva assinado entre o CNPEM e a Pitec, e tem como objetivo agilizar o processo de validação dos módulos amplificadores desenvolvidos no CNPEM, finalizar o projeto, construir protótipos e validar o conceito dos novos combinadores, desenvolver a estrutura elétrica e mecânica dos novos amplificadores, e ter quatro exemplares montados e testados em um ano. Deste modo, será possível que o projeto Sirius tenha todo o sistema de RF instalado em 2023. A parceria permitirá, ainda, a transferência para o setor industrial do *know-how* de ponta desenvolvido e aprimorado no CNPEM, afirmando o papel estratégico da instituição no apoio esforços de inovação das empresas brasileiras e a ampliação da geração de benefícios para a sociedade.

Parceria com a empresa CBMM para desenvolvimento de tecnologias em supercondutividade

Em 2021, foi assinado um convênio entre o CNPEM e a CBMM, líder mundial na produção e comercialização de produtos de nióbio, para cooperação em pesquisa, desenvolvimento tecnológico e científico na área de materiais supercondutores com aplicação de nióbio. Essa colaboração visa inserir dispositivos supercondutores no Sirius e alavancar o desenvolvimento de novas tecnologias nesta área ainda não dominada no País. Assim, espera-se que esse acordo permita o projeto, desenvolvimento e aplicações da supercondutividade como elemento-chave do desempenho de equipamentos nas mais variadas áreas – incluindo médica, energia, física de partículas, elétrica e eletrônica, defesa –, gerando componentes de alto valor agregado e novos produtos de interesse da sociedade.

A colaboração entre o CNPEM e a CBMM, ao conectar duas instituições com grande conhecimento em suas áreas de atuação, tem o potencial de acelerar o processo de desenvolvimento e geração de inovações tecnológicas e elevar o patamar de desenvolvimento científico e tecnológico. Dada a alta complexidade da supercondutividade, o projeto demanda recursos humanos muito especializados, além do fornecimento de materiais certificados em elevados padrões tecnológicos. A colaboração representa uma importante oportunidade para colocar o Brasil como um produtor de materiais e equipamentos supercondutores, com níveis competitivos globalmente quanto à qualidade e desempenho.

5.4. Projetos de Laboratórios de Nível de Biossegurança 3 e Linhas Longas e Ambiente de Biocontenção (LLABC)

NB3

Em 2021, foram concluídos os projetos básicos de Retrofit do edifício LNBio e sua expansão para abrigar o laboratório de alta contenção com nível de biossegurança 3 (NB3) do CNPEM. Foi contratada consultoria especializada para análise e validação dos projetos, que passam agora à etapa de projetos executivos e orçamentação para validação de viabilidade financeira.

Em paralelo, o projeto do Executivo das instalações do Laboratório está em fase de contratação e o prazo previsto para sua conclusão é de 2 meses. Assim que os pacotes de Retrofit e Expansão, bem como o de Instalações Laboratoriais estiverem concluídos, a contratação de sua execução deverá ocorrer no primeiro semestre de 2022.

Linhas Longas e Ambiente de Biocontenção (LLABC)

Dentro do projeto de Linhas Longas e Ambiente de Biocontenção (LLABC), foram obtidas todas as licenças necessárias junto à Secretaria do Verde e meio Ambiente da Prefeitura Municipal de Campinas para os levantamentos topográficos do terreno. Os trabalhos de terraplenagem estão em curso e possibilitarão às instalações do Sirius receberem novas instalações futuramente. Os serviços e compactação da terraplenagem estão em fase de conclusão, e o demais serviços de infraestruturas, tais como drenagem, tem sua conclusão prevista para fevereiro de 2022.

@cnpem

cnpem.br