UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA E QUÍMICA DE SÃO CARLOS

DESENVOLVIMENTO DA TÉCNICA
DE MEDIDA DE ISOTERMA DE
SORÇÃO DE H_2O , ÁGUA ESTRU-
TURADA À INSULINA.

Roberto Cleto Pires

Dissertação apresentada ao
Instituto de Física e Química
de São Carlos, para obtenção
do título de MESTRE EM FÍSICA
APLICADA.

Orientador:

Prof. Dr. Sergio Mascarenhas
Oliveira

Departamento de Física e Ciências dos Materiais,

São Carlos, 1983

BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE FÍSICA E QUÍMICA DE SÃO CARLOS - USP
FÍSICA

MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE _____
ROBERTO CLETO PIRES

APRESENTADA AO INSTITUTO DE FÍSICA E QUÍMICA DE SÃO CARLOS, DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, EM 10 DE março DE 1983.

COMISSÃO JULGADORA:

Dr. Sergio Mascarenhas - Orientador

Dr. Marcio Fantozzi Giorgetti

Dr. Rosemary Sanches

Este trabalho foi realizado com o auxílio do CNPq, FINEP,
CNEN, FAPESP.

BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE FÍSICA E QUÍMICA DE SÃO CARLOS - USP
FÍSICA

• A MEUS PAIS E IRMÃOS

AGRADECIMENTOS

Agradeço

Ao Prof. Dr. SERGIO MASCARENHAS OLIVEIRA pela orientação, amizade, apoio e estímulo necessários à realização deste trabalho;

Ao Prof.Dr. MARCIUS FANTOZZI GIORGETTI pelo estímulo e facilidades proporcionadas para que este trabalho pudesse ser concluído;

A Profa.Dra. ROSEMARY SANCHES pela discussão em torno do trabalho, amizade e apoio.

A todo pessoal do grupo de biofísica pela amizade e pelo apoio;

Ao SANCHES e ISABEL pelo apoio na parte experimental e pela amizade;

Ao Prof.Dr. RAUL GRIGERA pela oportunidade de discussões e sugestões dadas.

A Profa. RUTH DE GOUVÊA DUARTE pela amizade e estímulo.

Aos colegas e funcionários do Instituto de Física e Química de São Carlos e do departamento de Hidráulica e Saneamento pela amizade, estímulo e espírito de luta;

Aos meus familiares pelo apoio dado.

ÍNDICE

-	Índice de figuras	i
-	Lista de tabelas	ii
-	Resumo e abstract	iii
I	- INTRODUÇÃO	1
II	- A INSULINA	7
III	- MODELO DE SORÇÃO	15
	3.1 - ISOTERMA DE LANGMUIR	15
	3.2 - ISOTERMA DE BRUNAUER E EMMETT E TELLER	19
	3.3 - ISOTERMA DE GUGGENHEIM	28
IV	- PRESSÃO TERMOESTIMULADA	34
V	- SISTEMA DE MEDIDA	39
	5.1 - ISOTERMA DE SORÇÃO	39
	5.1.1 - TEORIA DA MICROBALANÇA A QUARTZO	39
	5.1.2 - A MICROBALANÇA A QUARTZO: OPERAÇÃO E CONSTRUÇÃO	45
	5.1.2.1 - OPERAÇÃO	45
	5.1.2.1 - CONSTRUÇÃO	46
	5.1.2.2.1 - CONTROLE DE TEMPERATURA	46
	5.1.2.2.2 - CONTROLE DE PRESSÃO DE VAPOR D'ÁGUA	47
	5.1.2.2.3 - CRISTAL E CÂMARA DO CRISTAL	48
	5.1.1.2.4 - OSCILADOR	52
	5.1.2.2.5 - FREQUENCÍMETRO	53
	5.2 - PRESSÃO TERMOESTIMULADA	54
VI	- RESULTADOS EXPERIMENTAIS.....	59
	6.1 - ISOTERMA DE SORÇÃO	59
	6.2 - PRESSÃO TERMOESTIMULADA	64
VII	- CONCLUSÕES	66
	7.1 - INSTRUMENTAÇÃO	66
	7.1.1 - OSCILADOR	66
	7.1.2 - CÂMARA DE HIDRATAÇÃO	67
	7.2 - ISOTERMA DE SORÇÃO DE ÁGUA DA INSULINA	67
	7.3 - PRESSÃO TERMOESTIMULADA	68

-	CONTRIBUIÇÕES DA PRESENTE DISSERTAÇÃO	70
-	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	71
-	ANEXO	72
-	BIBLIOGRAFIA	78

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura primária da insulina	9
Figura 2 - Estrutura da proinsulina	10
Figura 3 - Biossíntese da insulina	11
Figura 4 - Posição atômica da cadeia A da insulina	12
Figura 5 - Posição Atômica da cadeia B da insulina	12
Figura 6 - Posição Atômica do hexâmero de insulina	13
Figura 7 - Posição Atômica do dímero de insulina	14
Figura 8 - Isotermas de Langmuir	18
Figura 9 - Isotermas de BET	26
Figura 10 - Isoterma de BET (mudança de comportamento)	27
Figura 11 - Isoterma de Guggenheim	33
Figura 12 - PET da lizosôma	38
Figura 13 - Cristal de quartzo ângulo de corte	41
Figura 14 - Ressonador composto	42
Figura 15 - Diagrama de bloco isoterma de sorção	46
Figura 16 - Equipamento de isoterma de sorção	47
Figura 17 - Câmara de controle de umidade	49
Figura 18 - Interior da câmara	50
Figura 19 - Cristal de quartzo	51
Figura 20 - Cristal montado	51
Figura 21 - Protetor do cristal	52
Figura 22 - Circuito Oscilador	53
Figura 23 - Diagrama do equipamento de PTE	55
Figura 24 - Dedo frio (PTE)	56
Figura 25 - Vista geral do equipamento de PTE	57
Figura 26 - Isoterma do DNA	61
Figura 27 - Isoterma da insulina	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Umidade relativa para várias substâncias	48
Tabela 2 - Sorção de água pela insulina	62
Tabela 3 - Energia de dessorção de água para a insulina ...	65

RESUMO

No presente trabalho, descreve-se o projeto e construção de uma balança a quartzo usada para estudos de isothermas de sorção de água em materiais biológicos.

Estudou-se pela técnicas de isothermas de sorção e pressão termoestimuladas a água ligada a insulina.

A capacidade de monocamada é de 46 moles de água por mol de monomero de insulina.

Os experimentos de pressão termoestimulada indicam que em média, as moléculas de água estão ligadas por 1,3 pontes de hidrogênio.

ABSTRACT

This work describe the design and construction of a quartz micro-balance which is used for the study of isotherms of water sorption, in biological materials.

Using the techniques of sorption isotherms and thermo-stimulated pressure the bound water in insulin was studied.

The monolayer capacity is 46 mols of water per mol of monomer of insulin.

The termo-estimated pressure experiments indicate that in average the water molecules are bond through 1,3 hydrogen bonds.

I. INTRODUÇÃO

O Laboratório de Biofísica do Instituto de Física e Química de São Carlos tem como uma de suas linhas básicas de pesquisa a BIOFISICA DA ÁGUA.

A importância da água em biofísica tem sido ressaltada recentemente por vários autores (MASCARENHAS 1980 (1), CLEMENTI 1980 (2), FRANKS 1975 (3)). Como resultado do trabalho do Laboratório de Biofísica de São Carlos organizou-se inclusive no VII INTERNATIONAL BIOPHYSICS CONGRESS AND III PAN-AMERICAN BIOCHEMISTRY CONGRESS, Mexico City, aug 23-9, 1981 simpósio sobre biofísica da água.

Sabe-se que a retirada da água de todo o organismo vivo resulta na dormência do mesmo ou sua morte; isto mostra a importância da água para a vida.

A quantidade de água nos seres vivos pode variar desde 97 por cento de água em alguns invertebrados marinhos a 50 por cento em algumas bactérias.

O ser humano adulto contém de 65 a 70 por cento de água. Os tecidos nervosos são constituídos por 84 por cento de água enquanto os adiposos têm somente 30 por cento. Um adulto consome cerca de 900 litros de água por ano. Apesar destes números, o conhecimento do papel da água na vida, a nível molecular, é muito pequeno.

Até recentemente muitos biologistas tinham a água como um meio de suspensão para as moléculas ativas ou um mero preenchedor de espaço nos organismos vivos. Sendo a água aparentemente i-

nerte, é difícil imaginar que ela tenha papéis importantes no processo da vida, além de ser um mero meio de transporte de moléculas ativas.

A nível molecular, a água interage entre si, formando água líquida ou vários tipos de gelos; é possível também ocorrer sua interação com outras moléculas. Estas podem ser desde pequenos ions, (Na^+ , K^+ , Cl^- , e outros), até macromoléculas (1).

As macromoléculas que são essencialmente de três tipos ou seja, proteínas, polinucleotídeos e polissacarídeos, interagem com a água basicamente de dois modos:

- 1) Interação hidrofílica - através de pontes de hidrogênio ou solvatação das cargas da macromoléculas.
- 2) Interação hidrofóbica - a água, sendo repelida pela molécula, é obrigada a se auto-organizar formando - por exemplo dodecaedros pentagonais e estruturas altamente organizadas.

No caso de proteínas globulares (conformação esferoidal), pode-se explicar tal forma como devida à interação com a água. Para que a proteína seja solúvel, os aminoácidos hidrofílicos devem ficar na parte externa para solvatação e os aminoácidos hidrofóbicos preferem o interior da molécula.

A interação da água determina sua ligação com moléculas biológicas importantes. Ao se pensar nessas moléculas, a estrutura seca não é suficiente para explicar sua ação biológica; a existência de moléculas de água ligada deve ser levada em conta, isto porque a água interage com os resíduos hidrofílicos e polares mu-

dando sua conformação.

Temos o DNA como exemplo: Durante a determinação da sua estrutura através de raio-X foram obtidos diagramas diferentes em função da hidratação.

Existem várias técnicas para o estudo da água estruturada em macromoléculas biológicas.

Uma das técnicas mais poderosas para o estudo da água ligada é a cristalografia de raio-X ou neutrons (4).

Como o número de elétrons na água é pequeno, esta espalha pouco os raios-X; por outro lado, os neutrons são bem espalhados pelos hidrogênios da água, permitindo desta forma serem localizados mais precisamente.

Técnicas de refinamento de estruturas, em certos casos, permitem aos cristalógrafos verem água em mapas de densidade eletrônica, mesmo nos de proteínas.

Com NMR estuda-se como os spins magnéticos de prótons da água tem seu tempo de relaxação alterado pelas ligações com os diversos sítios, em função da hidratação e temperatura (5).

A água ligada pode ser estudada também por espectroscopia infravermelha (6).

Nessa técnica estuda-se as vibrações das ligações O-H da água na região infravermelha, através da mudança da frequência de absorção.

Outras técnicas foram introduzidas por nosso laboratório -

rio para o estudo da água ligada. Uma delas é a técnica de corrente termoestimulada (CTE) do BIOELETRETO (1) na qual:

- 1) O material em estudo é montado entre dois eletrodos.
- 2) Através da aplicação de um campo elétrico, a uma dada temperatura, os dipolos são orientados (a água tem um dipolo de 1,84 Debye).
- 3) Abaixa-se a temperatura com o campo ligado e, assim os dipolos, inclusive os da água ligada, ficam "congelados" na posição de orientação.
- 4) Monitora-se a corrente elétrica, que passa a ser produzida devido à desorientação dos dipolos, quando o material é aquecido linearmente com o tempo.
- 5) Da curva corrente contra temperatura, podem ser calculados vários parâmetros sobre a água ligada.

Uma outra técnica introduzida pelo nosso laboratório - foi a de pressão termoestimulada (PTE) que será discutida no capítulo IV da presente dissertação.

O resultado das técnicas descritas anteriormente têm uma grande dependência do conteúdo de água na amostra.

No sentido de complementar os estudos de CTE, PTE resolveu-se introduzir a técnica de isotermas de sorção da água em nossos laboratórios. A mesma é utilizada comumente no estudo da água ligada.

Desta maneira poder-se-á dar apoio à grupos que trabalham em nossos laboratórios com outras técnicas tais como: cristalografia, NMR, corrente termoestimulada, pressão termoestimulada e propriedades elétricas de macromoléculas.

A introdução da técnica de isoterma de sorção deu-se com a construção de uma microbalança a cristal de quartzo, que será discutida detalhadamente no capítulo V.

Foram realizados testes preliminares da microbalança utilizando-se DNA cuja isoterma de sorção de água é conhecida da literatura (7).

Realizou-se também estudos sobre a água ligada à molécula de insulina utilizando-se a microbalança e a técnica de pressão termoestimulada.

A escolha da insulina para este trabalho deve-se ao fato de ser conhecida a posição cristalográfica das moléculas de água e sobretudo pela grande importância biológica desta macromolécula.

O presente trabalho é uma continuação de trabalhos anteriores do grupo do professor S.MASCARENHAS com S.CELASCHI (8), S.QUESADO (9) E J. N.ONUCHIC (10).

Nova contribuição além da parte de instrumentação, vem atacar o problema central de interesse do grupo que é a biofísica da água, tanto em seus aspectos experimentais (CTE, PTE e agora a microbalança de quartzo) como teóricos (modelo de interação de água com métodos quânticos e estocásticos, Monte Carlo).

Novas contribuições estão sendo dadas, em nosso laboratório, com a técnica de NMR pulsado (11). Com esta técnica é possível distinguir água ligada, na molécula de insulina, da água livre.

II. A INSULINA

Inicialmente será feito um histórico sobre a insulina (12, 13, 14), passando posteriormente a sua estrutura.

Em 1889 Von Mering e Minkowski, comprovaram que, com a extirpação do pâncreas de um animal, surge rapidamente um estado denominado diabete pancreática, que se caracteriza por um alto teor de açúcar no sangue, hiperglicemia, e a perda do açúcar pela urina, glicosurina.

O aumento do açúcar no sangue e a perda do açúcar pela urina são proporcionais à quantidade de hidratos de carbono da dieta. O animal sem o pâncreas excreta uma quantidade considerável de açúcar; mesmo sob dieta inteiramente proteica a reserva de açúcar do corpo, isto é, o glicogênio hepático, é perdido rapidamente.

Nesta situação o açúcar é formado a partir das proteínas dos tecidos e o animal perde peso. Também são utilizados os depósitos de gorduras e o aumento da desintegração delas, traz como consequência, o aumento dos corpos cetônicos no sangue e na urina.

Os compostos cetônicos possuem propriedades tóxicas e a eles se atribui em grande parte o início da coma diabética.

Os sinais e sintomas observados em animais cujos pâncreas foram retirados são encontrados na diabete humana, a qual, na maioria dos casos, é consequência de afecções das ilhotas de Langerhans do pâncreas.

Essas formações são as únicas responsáveis pelo fornecimento de insulina ao corpo. Num corte do pâncreas elas se apresentam como pequenos grupos de células espalhadas aqui e ali, entre os alvéolos pancreáticos.

A conclusão é que o pâncreas elabora substância que mantém baixo o açúcar no corpo e normal o metabolismo dos hidratos de carbono.

A terapia de diabete começou em 1922 quando Banting e Best obtiveram êxito no isolamento de substância que age diretamente no metabolismo dos hidratos de carbono ou seja a insulina.

A insulina injetada subcutânea ou endovenosamente, elimina todos os sinais da diabete nos animais dos experimentos ou em pacientes humanos.

A deficiência de insulina provoca a diabete e a sua hiperprodução é responsável por um quadro clínico denominado hiperinsulismo, cuja principal característica é um baixo teor de açúcar no sangue (hipoglicemia).

Os sinais da hipoglicemia são: hiperexcitabilidade neuromuscular e fome. A excitabilidade aumenta, conduzindo a contrações involuntárias dos músculos e posteriormente a convulsões generalizadas.

A glicose é o melhor antídoto para o excesso de insulina.

Em 1953 Frederick Sanger e colaboradores determinaram a

sequência de aminoácido das cadeias polipeptídicas da insulina , primeira proteína para a qual se determinou a estrutura covalente completa.

Esta determinação foi o resultado de cerca de dez anos de estudo cuidadoso e metuculoso.

A sequência de aminoácidos da insulina pode ser vista na figura 1 bem como as posições das ligações cruzadas -S-S- ligando as cadeias A e B.

FIGURA 1 - Estrutura primária da insulina bovina (de Sanger F. e colaboradores, Biochem, J., 49, 481 (1951); 53, 366 (1953); 60, 541 (1955)).

A insulina é sintetizada primeiramente em uma forma inativa de cadeia única, denominada proinsulina. Ela contém as cadeias A e B da insulina.

A cadeia A constitui a extremidade carboxilica da proinsulina e a B a extremidade aminica. Entre as cadeias A e B há uma terceira, C, conectora.

As cadeias A e B são separadas da C por dois pares de aminoácidos básicos, figura 2

FIGURA 2 - Estrutura da proinsulina bovina. A remoção dos aminoácidos indicados produz a insulina e a cadeia C (mais escuro). (LEHNINGER; A. L - BIOCHEMISTRY)

A figura 3 mostra os estágios e as relações temporais na biossíntese, secreção e liberação da insulina a partir das células β do tecido insular.

A proinsulina é clivada, formando insulina e peptídeo C, que são armazenados nas vesículas de Golgi, onde a insulina e o peptídeo cristalizam-se com Zn^{++} .

Um aumento de glicemia, desencadeia um processo, onde o conteúdo das vesículas é liberado por exocitose, através da membrana plasmática para o sangue circundante.

FIGURA 3 - Representação esquemática da biossíntese da insulina e sua liberação das células β das ilhotas de Langerhans, mostrando relações de tempo. Os grânulos maduros não são liberados enquanto a glucose sanguínea não estiver significativamente elevada.

A sequência de aminoácidos da insulina tem pequenas variações para espécies diferentes de animais.

A insulina, em solução se agrega em polímeros de diferentes tamanhos dependendo do pH, temperatura, concentração, força iônica e composição iônica.

Em pH neutro ou moderadamente alcalino na presença de zinco⁺⁺ ou cátion divalente, há predoninância da forma hexâmera (15). As cadeias A e B podem ser vistas nas figuras 4 e 5 respectivamente, e a forma hexâmera é mostrada na figura 6.

FIGURA 4 - Cadeia A da molécula de insulina (15)

FIGURA 5 - Cadeia B da molécula de insulina (15)

FIGURA 6 - Posição atômica na insulina hexâmera projetada ao longo do eixo de terceira ordem (15).

Outra forma comumente encontrada em solução é em dímeros, (figura 7) a proporção de dímeros aumenta com o abaixamento do pH, concentração e força iônica.

Sakabe (16) e colaboradores, através de técnicas cristalográficas, obtiveram a estrutura da insulina 2 zinco em cristais romboédricos com uma resolução de 1,2 Å.

FIGURA 7 - Dímero de insulina projetada ao longo do eixo de terceira ordem (15).

O cristal contém trinta por cento de moléculas de água que são empacotadas não só no canal formado ao longo do eixo de terceira ordem, mas também ao redor do hexâmero.

Neste cristal há cerca de 280 moléculas de água, isto é, aproximadamente 47 moléculas de água por monômero (16).

III. MODELO DE SORÇÃO

Uma maneira de se obter informações da interação entre macromoléculas biológicas é através da medida de sorção de vapor de água.

Sorção pode ser definida como sendo o processo em que moléculas no estado de vapor ligam-se a sítios nos sólidos (17).

Tanto o termo adsorção como absorção são utilizados para designar o processo de sorção.

Segue-se um desenvolvimento histórico sobre isotermas de sorção, começando por Langmuir 1916 (18), depois uma extensão da teoria de Langmuir devido a Brunauer, Emmett e Teller 1938 (19) e finalmente pelo tratamento feito por Guggenheim (20).

3.1 - ISOTERMA DE LANGMUIR

Langmuir desenvolveu uma teoria quantitativa de sorção baseada em considerações da cinética molecular. Assumiu que os átomos ou moléculas dos gases ligam-se a pontos discretos ou centros ativos na superfície dos sólidos, para formar um filme monomolecular.

A cada centro pode-se ligar somente um átomo ou molécula e as forças envolvidas nesse processo são de curto alcance e, portanto, independentes dos centros adjacentes estarem ou não ocupados.

Seja N_t o número de centros ativos por unidade de área,

estando ocupados n desses centros.

A taxa r_1 de evaporação ou desorção de átomos já ligados será proporcional a n . Então:

$$r_1 = \alpha n \quad (\text{III-1})$$

A taxa r_2 de sorção de novos átomos será proporcional ao número de sítios livres ($N_t - n$) e da pressão P , pois a taxa m com que as moléculas do gás entram em contacto com a superfície é dada por $m = \sqrt{M/(2\pi RT)} P$ (21) onde m é a massa do gás que colide com a superfície por unidade de área por unidade de tempo; M é a massa molecular; T a temperatura absoluta; R a constante de Boltzmann e P a pressão.

$$r_2 = \beta (N_t - n) P \quad (\text{III-2})$$

Quando o gás está em equilíbrio com a superfície estas duas taxas, r_1 e r_2 , devem ser iguais, portanto:

$$\frac{n}{N_t} = \frac{\beta P}{\alpha + \beta P} \quad (\text{III-3})$$

A relação n/N_t pode ser substituído por h/h_m porque a quantidade h expressa em gramas de um gás sorvido é proporcional ao número de moléculas n por unidade de área. O fator h_m é a quantidade sorvida quando todos os N_t sítios estão ocupados e, portanto, representa a capacidade de monocamada.

$$h = \frac{h_m \beta P}{\alpha + \beta P} \quad (\text{III-4})$$

Substituindo β/α por b obtendo:

$$h = \frac{h_m b P}{1 + bP} \quad (\text{III-5})$$

A isoterma de Langmuir (eq. III-4 ou III-5), comumente designada de tipo I, também pode ser deduzida a partir de considerações termodinâmicas ou estatísticas.

A equação III-5 pode ser rescrita na forma linearizada.

$$\frac{P}{h} = \frac{1}{h_m b} + \frac{1}{h_m} P \quad (\text{III-6})$$

A forma da isoterma de sorção de Langmuir pode ser vista na figura 8a. Na figura 8b observa-se o gráfico dessa isoterma na forma linearizada. Com frequência é conveniente expressar-se a pressão em termos da pressão relativa de vapor P/P_0 onde P_0 é a pressão de saturação do material sorvido.

A forma linearizada (III-6) é útil em dois aspectos:

- 1) Através do gráfico $(P/h) \times P$ ou $(X/h) \times X$ onde $X = P/P_0$ de resultados experimentais é possível saber se o processo em questão está de acordo ou não com as considerações de Langmuir.
- 2) Facilmente podem ser calculados os valores das constantes h_m através do coeficiente angular, e b do intercepto extrapolado do eixo p/h .

FIGURA 8 - Em 8.a temos a isoterma de Langmuir (Tipo I) para um valor de $b = 10$ e na figura 8.b a isoterma é graficada na forma linearizada. - (eq. III.6).

No entanto, as isotermas experimentais de sorção comumente apresentam duas regiões: à baixas pressões a isoterma é côncava e à altas pressões convexa em relação ao eixo das pressões.

Refinamentos introduzidos na teoria exposta tais como interação entre sitios (22), causam uma mudança na forma da isoterma, mas esta nova isoterma não apresenta as características ditas acima, que são encontradas normalmente em resultados experimentais de sorção de água em biomateriais.

Na prática normalmente o que ocorre é não termos a formação somente de monocamada em processos de sorção, frequentemente temos a formação de multicamadas.

A formação de monocamada geralmente ocorre a valores baixos de pressão, correspondendo no caso de materiais biológicos a pressões parciais de vapor d'água da ordem de 0,15 ou menos (22).

A teoria de Langmuir para monocamada pode ser generalizada para multicamada, este tratamento foi feito por Brunauer, Emmett e Teller (19), esta isoterma é designada frequentemente - por isoterma B.E.T.

3.2 - ISOTERMA DE B.E.T

Sejam $S_0, S_1, S_2, \dots, S_i, \dots$ as áreas que são cobertas pelas $0, 1, 2, \dots, i, \dots$ camadas de moléculas sorvidas.

Então no equilíbrio tem-se que S_0 deve permanecer constante, a taxa de condensação é igual a de evaporação na primeira camada.

$$a_1 P S_0 = b_1 S_1 \exp(-E_1/RT) \quad (\text{III-7})$$

onde P é a pressão, E_1 é o calor de adsorção na primeira camada e a_1 e b_1 são constantes; a_1 , b_1 e E_1 são independentes do número de moléculas sorvidas na primeira camada.

A expressão III-7 é essencialmente a equação de Langmuir.

No equilíbrio S_1 também deve permanecer constante, através de considerações anglogas à primeira camada será obtido:

$$a_2 P S_1 = b_2 S_2 \exp(-E_2/RT) \quad (\text{III-8})$$

Essa argumentação pode ser estendida para $S_2, S_3, \dots, S_i, \dots$, dessa forma:

$$\begin{aligned} a_3 P S_2 &= b_3 S_3 \exp(-E_3/RT) \\ &\cdot \quad \cdot \\ &\cdot \quad \cdot \end{aligned} \quad (\text{III-9})$$

$$a_i P S_{i-1} = b_i S_i \exp(-E_i/RT)$$

A superfície total é dada por:

$$A = \sum_{i=0}^{i=\infty} S_i \quad (\text{III-10})$$

e o volume total sorvido é:

$$V = V_0 \sum_{i=0}^{i=\infty} i S_i \quad (\text{III-11})$$

onde V_0 é o volume do gás sorvido por unidade de área da superfície quando esta é completamente coberta com uma camada monomolecular. Dessa forma

$$\frac{V}{A V_0} = \frac{V}{V_m} = \frac{\sum_{i=0}^{i=\infty} i S_i}{\sum_{i=0}^{i=\infty} S_i} \quad (\text{III-12})$$

onde o V_m é o volume do gás sorvido quando a superfície inteira é coberta com uma monocamada. Podemos substituir V/V_m por h/h_m já definido anteriormente.

Podemos calcular os somatórios da equação III-12 através das seguintes suposições:

$$E_2 = E_3 = \dots = E_i = E_\ell \quad (\text{III-13})$$

onde E_ℓ é o calor de liquefação e

$$\frac{b_2}{a_2} = \frac{b_3}{a_3} = \dots = \frac{b_i}{a_i} = g \quad (\text{III-14})$$

onde g é uma constante apropriada.

Isto é equivalente a assumir que as propriedades de evaporação-condensação da segunda camada em diante são as mesmas do estado líquido.

Esta suposição é razoável uma vez que a partir da segunda camada as moléculas sorvidas só estão em contato com elas próprias.

Podemos expressar $S_2, S_3, \dots, S_i, \dots$ em termos de S_0

$$S_1 = Y S_0 \text{ onde } Y = (a_1/b_1) P \exp(E_1/RT) \quad (\text{III-15})$$

$$S_2 = X S_1 \text{ onde } X = (1/g) P \exp(E_\ell/RT) \quad (\text{III-16})$$

$$S_3 = X S_2 = X^2 S_1 \quad (\text{III-17})$$

$$S_i = X S_{i-1} = X^{i-1} S_1 = Y X^{i-1} S_0 = c X^i S_0 \quad (\text{III-18})$$

onde

$$c = Y/X = (a_1 g/b_1) \exp(E_1 - E_\ell)/RT) \quad (\text{III-19})$$

substituindo na equação III-12 será obtido:

$$\frac{V}{V_m} = \frac{c S_0 \sum_{i=1}^{i=\infty} X^i}{S_0 (1 + c \sum_{i=1}^{i=\infty} X^i)} \quad (\text{III-20})$$

onde as somas são dadas por:

$$\sum_{i=1}^{i=\infty} X^i = \left(\sum_{i=1}^{i=\infty} X^i \right) - 1 = \frac{X}{1-X} \quad (\text{III-21})$$

$$\sum_{i=1}^{i=\infty} i X^i = X \frac{d}{dX} \sum_{i=1}^{i=\infty} X^i = \frac{X}{(1-X)^2} \quad (\text{III-22})$$

Substituindo (III-21) e (III-22) em (III-20) será obtido :

$$\frac{V}{V_m} = \frac{cX}{(1-X)(1-X+cX)} = \frac{cX}{(1-X)(1+(c-1)X)} \quad (\text{III-23})$$

Quando $P=P_0$, pressão de saturação do gás, um número infinito de camadas é sorvido sendo assim $V = \infty$ portanto X deve ser igual a unidade na equação III-23. Da equação III-16 segue-se que:

$$(P_0/g) \exp(E_g/RT) = 1 \quad (\text{III-24})$$

e

$$X = \frac{P}{P_0} \quad (\text{III-25})$$

Substituindo em III-23, a equação da isoterma de B.E.T. é obtida.

$$V = \frac{V_m c (P/P_0)}{(1-P/P_0)(1+(c-1)(P/P_0))} \quad (\text{III-26})$$

A equação III-26 pode ser reescrita na forma linearizada.

$$\frac{P}{V(P_0-P)} = \frac{1}{V_m c} + \frac{c-1}{V_m c} \frac{P}{P_0} \quad (\text{III-27})$$

Através de um gráfico $P/(V(P_0-P))$ contra P/P_0 as seguintes informações podem ser obtidas:

- 1) Se o processo em questão obedece às condições do desenvolvimento da teoria, uma linha reta será obtida.
- 2) O valor numérico das constantes V_m e c pode ser obtido através do intercepto, $1/V_m c$, e do coeficiente angular $(c-1)/V_m c$.

As equações III-19 e III-14 fornecem o valor da constante c .

$$c = \frac{a_1 b_2}{b_1 a_2} \exp ((E_1 - E_\ell)/RT) \quad (\text{III-28})$$

Devido a natureza de a_1 , a_2 , b_1 e b_2 temos que $(a_1 b_2)/(b_1 a_2)$ não deve diferir muito da unidade sendo assim c pode ser escrita como sendo:

$$c = \exp ((E_1 - E_\ell)/RT) \quad (\text{III-29})$$

Em um processo de sorção nem sempre é formado um número infinito de camadas, pode haver casos em que somente há n camadas.

Tomando-se as somas das séries da equação III-20 até o n -ésimo termo e não mais até o infinito, obtemos a equação III-30, em lugar de III-26

$$V = \frac{V_m cX}{1 - X} \frac{1 - (n+1)X^n + nX^{n+1}}{1 + (c-1)X - cX^{n+1}} \quad (\text{III-30})$$

A equação III-30 tem dois casos limites importantes:

- 1) Se $n = 1$ a equação III-30 se reduz a

$$V = \frac{V_m c (P/P_0)}{1 + c (P/P_0)} \quad (\text{III-31})$$

Comparando III-31 com a equação de Langmuir III-5 tiramos o valor do parâmetro b com o valor de c/P_0 .

2) Temos o outro caso extremo, isto é, $n = \infty$, e a equação assume a forma da equação III-26, isoterma de sorção de B.E.T.

Na figura 9 podemos observar a equação III-30 para vários valores de n . Na figura 10a e 10b podemos observar a equação III-26 para dois valores de c tais que haja uma mudança no comportamento da curva. Na figura 10 a temos que $E_1 > E_\ell$ isto implica em $c > 1$, e no caso b temos $E_1 < E_\ell$ levando a um valor de c menor que a unidade. Essas isotermas são designadas por tipo II e III respectivamente.

FIGURA 9 - Pode-se observar a mudança de comportamento da isoterma de BET para vários números de camadas.

FIGURA 10 - Pode ser observado nessa figura a mudança do comportamento da isoterma de B.E.T. quando $c < 1$ (FIG 10a) e $c > 1$ (FIG 10b).

3.3 - ISOTERMA DE GUGGENHEIM

Será utilizado agora um formalismo baseado em mecânica estatística da sorção em multicamadas, feito por Guggenheim, que será adotado com ligeiras modificações.

Será desenvolvido primeiramente o modelo de Langmuir.

Considerando-se a existência de N_t sítios localizados, idênticos e independentes; a grande função de partição do sistema será:

$$F = (1 + \lambda q)^{N_t} \quad (\text{III-32})$$

onde q é a função de partição de uma única molécula e λ é a atividade absoluta, relacionada com o potencial químico através de expressão $\lambda = \exp(\mu/RT)$.

Cada termo $1 + \lambda q$ é proporcional à probabilidade de que o sítio considerado esteja ocupado ou não.

De acordo com as propriedades de grande função de partição o número total de moléculas sorvidas será:

$$n = \lambda \frac{\partial \ln F}{\partial \lambda} \quad (\text{III-33})$$

Através da substituição de III-32 em III-34 será obtido o número de moléculas sorvidas

$$n = \frac{N_t \lambda q}{1 + \lambda q} \quad (\text{III-34})$$

Como as moléculas sorvidas estão em equilíbrio com o gás, λ será proporcional à pressão do gás P , e q é independente de P , sendo assim q pode ser escrito como sendo

$$\lambda q = b P/P_0 = b X \quad (\text{III-35})$$

Substituindo III-35 em III-34 a isoterma de Langmuir será obtida

$$n = N_t \frac{b P/P_0}{1 + b P/P_0} \quad (\text{III-36})$$

Será feito agora um desenvolvimento análogo para multicamada.

Seja a grande função de partição

$$F = (1 + \lambda q_1 + \lambda^2 q_1 q_2 + \lambda^3 q_1 q_2 q_3 + \dots)^{N_t} \quad (\text{III-37})$$

onde λ é a atividade absoluta do gás e q_i é a função de partição para uma única molécula sorvida na i -ésima camada.

Cada uma das N_t somas correspondem a um sitio, e cada termo é proporcional à probabilidade de que o sitio considerado esteja ocupado por 0, 1, 2, ... moléculas.

Supondo que

$$q_2 = q_3 = q_4 = \dots = q_i = \dots q \quad (\text{III-38})$$

Isto é, que a energia livre de todas as moléculas, exceto a primeira que ocupa cada sitio (molécula da primeira camada), são iguais e escrevendo a função de partição para as moléculas da primeira camada como

$$q_1 = cq \quad (\text{III-39})$$

a grande função de partição será

$$F = (1 + \lambda c q + \lambda^2 c q^2 + \lambda^3 c q^3 + \dots)^{N_t} \quad (\text{III-40})$$

como $\lambda c q + \lambda^2 c q^2 + \lambda^3 c q^3 \dots$ estão em uma progressão geométrica, podemos escrever a grande função de partição como sendo

$$F = \left(1 + \frac{\lambda c q}{1 - \lambda q}\right)^{N_t} = \left(\frac{1 + (c-1) \lambda q}{1 - \lambda q}\right)^{N_t} \quad (\text{III-41})$$

Utilizando a relação III-33 será encontrada o número de sitios ocupados

$$n = \lambda \frac{\partial \ln F}{\partial \lambda} = \frac{N_t c \lambda q}{(1 + (c-1) \lambda q) (1 - \lambda q)} \quad (\text{III-42})$$

Como as moléculas sorvidas estão em equilíbrio com o seu vapor, λ é igual a atividade absoluta do gás e proporcional à pressão sendo q independente de P pode-se escrever

$$\lambda q = \frac{P}{P^\dagger} \quad \text{(III-43)}$$

O novo parâmetro P^* é mais facilmente entendido através das relações

$$c = \exp (- \Delta\mu_m / RT) P / P_0 \quad \text{(III-44)}$$

$$P^* = P_0 \exp (\Delta\mu_M / RT) = (1/b) P_0 \quad \text{(III-45)}$$

$$P/P_0 = X \quad \text{(III-46)}$$

onde P_0 é a pressão de saturação do vapor; $\Delta\mu_m$ diferença entre o potencial químico das moléculas ligadas aos sítios primários e o líquido; $\Delta\mu_M$ é a diferença entre o potencial químico das moléculas ligadas a partir da segunda camada e o líquido; T temperatura absoluta, e R constante de Boltzmann.

A equação III-42 pode ser reescrita utilizando-se essas relações.

$$\frac{h}{h_m} = \frac{c b X}{(1 - b X) (1 + (c-1) b X)} \quad \text{(III-47)}$$

O parâmetro b fornece uma indicação sobre o quanto se afastam do estado líquido as moléculas da segunda camada em diante.

Enquanto na isoterma de B.E.T. só havia a saturação isto é, $h = \infty$, quando $X = 1$; nessa nova isoterma o mesmo não ocorre. Se $b < 1$ temos a não ocorrência da saturação e se $b > 1$ temos a saturação ocorre antes da pressão de saturação.

A influência do parâmetro b pode ser observado na figura 11.

FIGURA 11 - Isoterma de Guggenheim, para vários valores do parâmetro b , normalmente $b < 1$.

IV PRESSÃO TERMOESTIMULADA

Durante o tratamento térmico, para medidas de despolarização termoeestimulada, observa-se um aumento da pressão parcial de vapor d'água no recipiente de medida.

Este aumento de pressão ocorre devido ao rompimento das ligações de hidrogênio entre moléculas de água e os sitios de hidratação da macromolécula biológica, ocasionando a dessorção.

Monitorando-se o aumento da pressão de vapor d'água, em um volume fixo, em função da temperatura da amostra, podem ser medidos alguns parâmetros relativos a essa dessorção.

Será feito um desenvolvimento segundo o trabalho realizado por CELASCHI (23).

Assume-se que todas as moléculas de água ligam-se em sitios idênticos, isto é, que estas possuem uma mesma energia de ligação e uma mesma probabilidade de transição do estado ligado ao estado livre.

Com base nestas hipóteses, se a amostra no instante de tempo t e temperatura T , possuir $N(T)$ moléculas no estado ligado, após um intervalo de tempo infinitesimal dt teremos uma variação de $N(T)$ dada por:

$$dN(T) = - W(T) N(T) dt \quad (IV-1)$$

onde $W(T)$ é a probabilidade de transição do estado ligado ao livre.

Impondo-se um aumento da temperatura linear com o tempo isto é

$$T(t) = T_0 + bt \quad (\text{IV-2})$$

o diferencial dt pode ser escrito em função do diferencial dT como sendo:

$$dt = \frac{1}{b} dT \quad (\text{IV-3})$$

Através da substituição de IV-3 em IV-1 a equação IV-4 é obtida:

$$dN(T) = \frac{1}{b} W(T) N(T) dT \quad (\text{IV-4})$$

Conhecendo-se a função $W(T)$ a equação IV-4 pode ser integrada, obtendo-se desta forma a função que fornece o número de moléculas no estado ligado em função da temperatura.

Supondo válida a lei de atividade de Arrhenius.

$$W = W_0 \exp \left(- \frac{\Delta E}{KT} \right) \quad (\text{IV-5})$$

com

$$\Delta E = \Delta H - T \Delta S \quad (\text{IV-6})$$

onde

ΔE - energia livre de ligação da água

ΔS - entropia de ativação da dessorção

ΔH - entropia de ativação da dessorção

W_o - probabilidade por unidade de tempo, característica do processo

K - constante de Boltzmann

T - temperatura absoluta.

e utilizando a seguinte condição de contorno.

$$T = T_i \quad (IV-7)$$

$$N(T_i) = N_i \quad (IV-8)$$

na integração da equação IV-4, a expressão IV-9 que fornece o número de moléculas ligadas, é obtida

$$N(T) = N_i \exp \left(- \frac{W_o}{b} \int_{T_i}^T \exp \left(\frac{\Delta E}{KT'} \right) dT' \right) \quad (IV-9)$$

No processo em questão há somente dois estados, portanto, da conservação vem

$$N(T) + n(T) = N_i \quad (IV-10)$$

onde $N(T)$ é o número de moléculas ligadas, $n(T)$ número de moléculas no estado livre quando a temperatura da amostra é T , N_i número total de moléculas de água.

A baixa densidade de vapor d'água é válida a aproximação

de gás ideal na equação de Van der Waals, portanto o número de moléculas de água dessorvidas é proporcional à pressão.

A equação para gás ideal fornece

$$P(T) = \frac{K T'' n(T)}{V} \quad (IV-11)$$

onde

V - volume do recipiente

T''- Temperatura do gás

Através da substituição da expressão IV-11 em IV-10 e utilizando N(T) da expressão IV-9 a expressão final IV-12 é obtida

$$P(T) = P_f \left(1 - \exp\left(-\frac{W_0}{b} \int_{T_i}^T \exp(\Delta E / KT') dT'\right) \right) \quad (IV-12)$$

onde $P_f = (N_i K T'')/V$ é a pressão do sistema após a passagem de todas as moléculas para o estado livre, onde T'' é a temperatura do gás.

Através do ajuste da equação IV-12, as curvas experimentais de P(T) x T, os valores de W_0 e ΔE podem ser obtidos.

Na figura 12 pode ser vista uma curva onde está superposta a curva de pressão termoestimulada às cargas parciais obtidas das curvas de despolarização termo estimulada obtidas por CELASCHI para a lisozima.

FIGURA 12 - Curvas de PTE superpostas às cargas parciais obtidas das curvas de CTE para lizosima (23).

V SISTEMA DE MEDIDA

Neste capítulo é apresentada a teoria e construção da microbalança a quartzo e o procedimento experimental para a obtenção de isothermas de sorção de vapor de água em biomateriais.

Descreve-se também o equipamento e o modo de operação para as medidas de pressão termestimuladas.

5.1 ISOTHERMAS DE SORÇÃO

5.1.1 - TEORIA DA MICROBALANÇA A QUARTZO

A técnica de microbalança a cristal de quartzo é comumente utilizado, entre outras aplicações, para a monitoração de espessuras de filmes depositados por evaporação (24 e 25).

As medidas são efetuadas através da monitoração das mudanças na frequência de ressonância do cristal de quartzo quando é depositado um filme em sua superfície.

No caso específico deste trabalho é de interesse o estudo da variação de massa de uma amostra biológica em função da umidade relativa do ar que a circunda; para tanto um filme do material biológico em estudo é depositado sobre a superfície do cristal.

A frequência fundamental de ressonância de uma lâmina de cristal de quartzo é dada por:

$$f_q = \frac{V_q}{2 l_q} = \frac{N}{l_q} \quad (V-1)$$

onde

V_q - velocidade da onda elástica no cristal de quartzo

l_q - espessura da lâmina de quartzo

N - 1670 KHz mm para cortes do quartzo AT (26) (fig 13)

Considerando uma onda acústica de frequência f , gerada piezoeletricamente, que se propaga da face em $x = 0$ para a face em que o filme está depositado (fig. 14). Na interface, quartzo-filme, isto é $x = l_q$, a onda é parcialmente transmitida, e parcialmente refletida.

Os coeficientes de transmissão, t , e reflexão, r , são dados por (27):

$$t(q \rightarrow f) = \frac{2 Z_q}{(Z_q + Z_f)} \quad (V-2a)$$

$$r(q \rightarrow f) = - r(f \rightarrow q) = r = \frac{Z_q - Z_f}{Z_q + Z_f} \quad (V-2b)$$

onde

$$Z_q = \rho_q V_q \quad (V-2c)$$

$$Z_f = \rho_f V_f \quad (V-2d)$$

(a)

(b)

FIGURA 13 - 13a Sistema da coordenadas cartesianas utilizadas com quartzo 13b agulos de orientaões de corte para que os coeficientes de variação da frequência com a temperatura sejam minimizados (AT, BT).

FIGURA 14 - Ressonador composto consistindo de um transdutor de quartzo e o filme depositado, mostrando as interferências. Na realidade a direção é perpendicular às faces.

ρ_q - massa específica do quartzo

ρ_f - massa específica do filme

V_q - velocidade da onda elástica no cristal

V_f - velocidade da onda elástica no filme

Z_q e Z_f são as impedâncias acústicas por unidade de área da secção transversal.

Assumindo que a onda é totalmente refletida em $x = 0$ e $x = l_q + l_f$, e que as perdas no filme e no quartzo são pequenas, a frequência f em que o sistema, cristal-filme, é ressonante, satisfaz a equação V-3 (28).

$$\begin{aligned}
 & 2r (\cos(2 \pi f / f_f) - \cos(2 \pi f / f_q)) + \\
 & + (1 + r^2) (1 - (\cos(2 \pi f / f_q)) (\cos(2 \pi f / f_f))) + \\
 & + (1 + r^2) (\sin(2 \pi f / f_q)) (\sin(2 \pi f / f_f))
 \end{aligned} \tag{V-3}$$

onde

$$f_q = \frac{V_q}{2 l_q} \quad (V-4a)$$

$$f_f = \frac{V_f}{2 l_f} \quad (V-4b)$$

Definindo

$$D = \frac{\rho_f l_f}{\rho_q l_q} \quad (V-5)$$

A equação pode ser reescrita utilizando-se das definições de r (equ V-2b), z_q e z_f (equ V-2c e V-2d) e das relações V-4a e V-4b, e de $m_f = \rho_f l_f S$

$$D = \frac{(1 - r)}{(1 + r)} \frac{f_q}{f_f} \quad (V-6a)$$

$$D = \frac{2 f_q}{\rho_q V_q S} m_f \quad (V-6b)$$

onde

m_f - massa do filme depositado

S - superfície do cristal

Utilizando as identidades trigonométricas

$$\sin(2\pi f / f_q) = \sin(2\pi(f - f_q) / f_q) \quad (V-7a)$$

$$\cos (2 \pi f / f_q) = \cos (2 \pi (f - f_q) / f_q) \quad (V-7b)$$

e o fato que $2 \pi f / f_q \ll 1$ e $2 \pi ((f - f_q) / f_q) \ll 1$, as funções trigonométricas da equação V-3, que é uma função implícita da nova frequência de ressonância, podem ser aproximados pelos primeiros termos da expansão em série de Taylor. Sendo assim uma relação explícita da frequência de ressonância do sistema composto é obtida.

$$(f - f_q) + 2D F (f - f_q) + D f = 0 \quad (V-8)$$

$$f = \frac{f_q}{(1 + D)} \quad (V-9)$$

Portanto o período é fornecido pela relação

$$T = T_q (1 + D) \quad (V-10a)$$

$$\Delta T = T - T_q = D T_q \quad (V-10b)$$

Reescrevendo ΔT (eq v-10b) utilizando a relação V-6b en contra-se a expressão V-11 que mostra a proporcionalidade entre a variação do período com a massa do filme depositado sobre o cristal.

$$T = \frac{2}{\rho_q V_q S} m_f \quad (V-11)$$

5.1.2 - A microbalança a quartzo: operação e

construção

5.1.2.1 - Operação

A utilização da microbalança no levantamento de isotermas de sorção de água em macromoléculas biológicas é feita da seguinte maneira:

- 1) Mede-se a frequência de ressonância do cristal antes de ser depositado o filme do material biológico do qual se quer a isoterma de sorção;
- 2) Deposita-se um filme do material em estudo sobre o cristal, esta deposição normalmente é feita preparando-se uma solução da macromolécula em um solvente volátil onde o cristal é banhado, formando-se assim, após a evaporação do solvente, um filme sobre o cristal;
- 3) O cristal assim preparado é colocado em um recipiente com temperatura e pressão de vapor d'água controlados.
- 4) Observa-se a variação do período de oscilação do cristal de quartzo em função da umidade relativa.
- 5) Através desta medida, calcula-se o conteúdo de água na amostra.

5.1.2.2 - Construção

Um diagrama em bloco de equipamento pode ser visto na figura 15, a seguir será feita uma descrição de cada componente.

FIGURA 15 - Diagrama em bloco do equipamento para estudo de isotermas de sorção.

5.1.2.2.1 - Controle de temperatura

o controle de temperatura foi feito através da imersão da câmara contendo o cristal em um banho isotérmico produzido pela FANEN UNITEMP, sendo que este dispunha de uma unidade de refrigeração, permitindo, desta forma, o controle de temperaturas meno

- res que do meio ambiente (Figura 16).

FIGURA 16 - Conjunto montado vendo-se da esquerda para a direita, milivoltímetro ligado a um termopar, frequencímetro e controlador de temperatura.

Existiam termopares que permitiam a medida da temperatura do banho isotérmico e interior da câmara em uma região próxima do cristal.

5.1.2.2.2 - Controle da pressão de vapor d'água

A umidade relativa do meio foi controlada através de soluções saturadas com precipitado (29) que eram colocadas no interior da câmara.

Os valores das pressões parciais de vapor de água em função da temperatura para várias substâncias podem ser vistos na tabela que se segue:

Valores de umidade para várias soluções saturadas

Temp. (C)	10,0	20,0	25,0	30,0	40,0	50,0
K ₂ SO ₄	98.3	97.9	97.6	97.4	97.0	96.6
KCl	86.8	85.1	84.2	83.5	82.1	80.7
NaCl	75.8	75.6	75.4	75.2	75.0	74.9
NaNO ₂	67.4	65.4	64.3	63.2	61.2	59.2
NaBr	62.5	59.3	57.8	56.2	53.0	49.6
Na ₂ Cr ₂ O ₇	57.5	54.7	53.4	52.0	49.2	46.3
K ₂ CO ₃	44.5	44.1	44.0	43.8	43.4	42.8
MgCl ₂	33.8	33.1	32.8	32.4	31.6	30.6
CH ₃ COOK	24.5	23.2	22.4	21.6	19.7	19.5
LiCl	12.7	11.1	11.1	11.1	11.1	11.0
NaOH	----	7.0	6.9	6.8	6.5	5.8
LiBr	7.8	7.2	6.7	6.3	5.2	5.0

TABELA I

5.1.2.2.3 - Cristal e câmara do cristal

A câmara do cristal foi construída utilizando-se um recipiente de vidro com tampa de material plástico (Figura 17), permitindo que ela fosse usada de forma que todos os componentes da câmara pudessem ser fixados.

Nesta câmara foi necessária a colocação de dois agitadores, acoplados ao mesmo eixo (Figura 18). Um dos agitadores era responsável pela agitação da solução evitando, desta forma, a es-

tratificação da mesma, acelerando assim o equilíbrio da solução com o meio, o outro era utilizado na movimentação do ar no interior da câmara evitando gradientes de concentração de moléculas da água; desta forma o processo de equilíbrio era acelerado.

FIGURA 17 - Câmara onde se faz o controle da umidade e temperatura.

O eixo dos agitadores é movido por um motor externo com aproximadamente trinta rotações por minuto.

O cristal utilizado é uma unidade normalmente comercializada para equipamentos de telecomunicações. Para sua utilização

é necessária a remoção de capa metálica protetora (Figura 19).

FIGURA 18 - Interior da câmara podendo ser visto da esquerda para a direita agitador da solução , agitador do ar e protetor do cristal.

Estes cristais já têm depositados em suas faces eletrodos de prata ligados a contactos da base.

O cristal é fixado pelos contactos da base em um suporte que fornece o contacto elétrico a um conector tipo BNC, o qual faz a conexão entre o cristal e o circuito oscilador figura 20.

FIGURA 19 - Vista do cristal sem capa protetora metálica, esta é soldada com estanho e unidade montante.

FIGURA 20 - Elemento sensível, cristal, conectado ao suporte.

O cristal utilizado nos experimentos era de 6 MHz, para esta frequência de oscilação sua espessura é de aproximadamente três décimos de milímetro apresentado, desta forma, pouca resistência mecânica. Devido a este fato foi previsto no projeto um protetor. Figura 21

FIGURA 21 - Vista geral do interior da câmara podendo ser observado o cristal sem o protetor que está à direita.

5.1.2.2.4 - OSCILADOR

O circuito oscilador utilizado na microbalança a quartzo está esquematizado na figura 22.

Os componentes utilizados são de custo praticamente desprezíveis.

FIGURA 22 - Circuito oscilador, CI - 7400 alimentação 5 Volts.

É utilizado um circuito integrado 7400 da família TTL que contém quatro portas lógicas. São utilizadas duas destas portas ligadas como inversoras.

A alimentação é feita por uma fonte estabilizada de cinco volts.

O circuito fornece um sinal com amplitude suficiente para excitar um frequencímetro com baixa sensibilidade.

5.1.2.2.5 - FREQUENCÍMETRO

A medida da frequência de oscilação do cristal de quartzo foi feita através de um frequencímetro comercial marca FLUKE modelo 1953A com uma resolução de uma parte em 10^6 ,

A utilização deste frequencímetro e do banho termostático

- co foi devido à sua existência no laboratório.

Todo o equipamento utilizado pode ser adquirido ou construído com materiais facilmente encontrados no mercado.

5.2 PRESSÃO TERMOESTIMULADA

Um diagrama de blocos do aparelho de medida de pressão termoestimulada pode ser visto na figura 23.

O aparelho utilizado foi desenvolvido inicialmente por CELASCHI (23), e posteriormente modificada por ONUCHIC, PIRES e VERA (30).

As medidas foram feitas em um recipiente de vidro com um volume de 5 litros, cujas paredes são aquecidas através de uma resistência elétrica até cerca de 450 °K. Este aquecimento é necessário para evitar que moléculas de água desorvidas da amostra sejam sorvidas na superfície do recipiente, mascarando resultados que, devido a quantidade de água sorvida poderiam falsamente parecerem menores.

A amostra foi colocada em uma cavidade feita no dedo frio, que pode ser visto em detalhe na figura 24.

A temperatura deste dedo foi medida através de um termopar cobre-constantan. O equipamento possui outro termopar para medida de temperatura do gás (vapor d'água).

FIGURA 23 - Diagrama do equipamento de PTE (2a a 2e válvulas, B.D. Bomba de vácuo).

Através de um registrador gráfico de dois canais fêz-se o registro da temperatura da amostra (temperatura no suporte) e da pressão do recipiente contra o tempo.

A pressão foi medida através de um medidor diferencial marca MKS Baratron Pressure Meter Type 77, com saída para registrador linearmente proporcional à ela. Este medidor, por ser diferencial, requer um recipiente no qual a pressão seja mantida constante. A referência foi construída por um cilindro metálico com uma capacidade de aproximadamente 25 litros.

A utilização de um recipiente com tal volume deve-se ao

fato de ser minimizada a variação da pressão devido a algum vazamento eventual.

FIGURA 24 - Vista do dedo frio, onde se vê o termopar da amostra, e o do gás, na parte inferior pode-se ver a cavidade onde era colocada a amostra.

O aquecimento da amostra foi feito por uma resistência elétrica com potência controlada para se obter uma variação linear da temperatura da amostra contra o tempo.

Uma vista geral da montagem pode ser vista na figura 25.

As medidas de pressão termoestimulada foram realizadas adotando-se o seguinte procedimento (figura 23):

FIGURA 25 - Vista geral do equipamento de PTE.

- 1) Com as válvulas 2b, 2d e 2e fechadas, a válvula 2a é utilizada para introduzir ar no sistema, é feito vácuo no recipiente de referência. O vácuo na referência normalmente não é desfeito, pois sendo seu volume da ordem de cinco vezes e do recipiente de medida necessitar-se-ia de uma bomba de vácuo de grande capacidade para que o vácuo pudesse ser refeito em pouco tempo.
- 2) Coloca-se a amostra na cavidade do dedo frio e introduz-se todo o conjunto no recipiente de medida.
- 3) Fecha-se as válvulas 2c, para manter o vácuo da referência, abrindo-se as válvulas 2d, desta maneira abaixa-se a pressão no recipiente de medida até por

volta de 10 mtorr. Durante esta fase deve-se fazer um controle da temperatura da amostra, mantendo inicialmente em torno de 270 °K e posteriormente abaixando-a gradativamente.

- 4) Uma vez que a pressão do recipiente de medida esteja próxima do valor da referência, todas as válvulas do sistema devem ser abertas para a equalização da pressão entre o recipiente de medida e a referência, exceto naturalmente a válvula 2e.
- 5) Uma vez estabelecido o equilíbrio são fechadas as válvulas 2c, 2d e 2a e inicia-se o aquecimento da amostra, registrando-se a temperatura e a pressão em função do tempo.

VI - RESULTADOS EXPERIMENTAIS

Este capítulo está dividido em duas partes. Primeiramente serão apresentados os resultados referentes à isoterma de sorção e posteriormente os obtidos através da técnica de pressão termestimulada.

6.1 - ISOTERMAS DE SORÇÃO

Inicialmente foi realizado um teste para verificar o funcionamento da microbalança a cristal de quartzo.

Optou-se nesta fase pela utilização do DNA por ser um material disponível em nosso laboratório e sua isoterma de sorção de água ser conhecida da literatura (7).

Foi levantada também a quantidade de água sorvida no cristal de quartzo limpo, em função da umidade relativa do meio. Posteriormente estes valores foram comparados com a quantidade de água sorvida pelos filmes de materiais biológicos. A quantidade de água sorvida na superfície do cristal é desprezível em relação à dos materiais biológicos estudados, sendo menor que 0,1 por cento.

O filme de DNA depositado na superfície do cristal foi preparado dissolvendo-se 3 mg de DNA de timo de bezerro em 3 ml de água destilada e deionizada.

Adotou-se o procedimento descrito no capítulo V, para a determinação da massa do DNA seco colocou-se sílica gel na câma

- ra do cristal.

Com a sílica gel consegue-se umidades relativas menores que 0,01 por cento.

A curva de hidratação foi obtida utilizando-se algumas das substâncias da tabela I.

O resultado da isoterma de sorção a 25°C pode ser observada na figura 26 onde é feita uma comparação entre os dados desse trabalho e a curva ajustada a pontos experimentais obtidos por Falk e colaboradores.

Uma vez confirmado o funcionamento do equipamento passou-se ao estudo da insulina.

A insulina utilizada tanto nas isotermas como na pressão termoeestimulada é de pâncreas bovino processada pela SIGMA.

Na deposição do filme de insulina no cristal de quartzo utilizou-se uma solução com concentração de 1,5 mg de insulina em 1,0 ml de tampão fosfato 0,02 M pH 8.

Adotando-se o procedimento já descrito foram obtidas várias curvas totais ou parciais de sorção de água, havendo uma boa concordância entre elas.

FIGURA 26 - Resultados obtidos neste trabalho com o DNA comparado com a curva dada por Falk (7).

Os dados de uma medida típica a 25 °C podem ser observados na Tabela II.

Período de oscilação do cristal $1,667131 \times 10^{-7} \text{ s}$.

Período de oscilação com a insulina seca $1,667698 \times 10^{-7} \text{ s}$.

Sorção de água pela insulina a 25 C

P/Po	Período (S)	gramas de água por 100 gramas de insulina sêca
0,069	$1,667742 \times 10^{-7}$	7,75
0,111	$1,667757 \times 10^{-7}$	10,49
0,165	$1,667780 \times 10^{-7}$	14,52
0,224	$1,667819 \times 10^{-7}$	21,19
0,328	$1,667810 \times 10^{-7}$	19,71
0,440	$1,667834 \times 10^{-7}$	24,02
0,578	$1,667934 \times 10^{-7}$	41,72
0,643	$1,668160 \times 10^{-7}$	81,57
0,754	$1,668407 \times 10^{-7}$	125,10

Tabela II

Utilizando um programa que pode ser visto no apêndice
fêz-se um ajuste dos pontos experimentais.

$$h = \frac{h_m c b X}{(1 - b X) (1 + (c - 1) b X)} \quad (\text{III-47})$$

Os valores das constantes obtidas são dados a seguir:

$$h_m = 13,82 \text{ g H}_2\text{O} / 100 \text{ g de insulina sêca} =$$

$$= 46 \text{ moles de H}_2\text{O} / \text{mol de monômero}$$

$$b = 1,17$$

$$c = 16,70$$

A curva ajustada e os pontos podem ser vistos na figura
27.

FIGURA 27 - Isotermas da isulina.

Foi realizado um estudo da sorção de água no tampão, utilizada na preparação do filme, concluindo-se que a influência do mesmo é menor que 12 por cento de erro.

6.2 - PRESSÃO TERMOESTIMULADA

A insulina utilizada nesta etapa do trabalho era proveniente do mesmo frasco da empregada nas medidas de sorção.

Foram realizadas medidas tanto em forma de pó quanto pastilhadas com as seguintes características:

diâmetro 13,0 mm

espessura 0,5 mm

massa específica 0,9 g/cm³

As amostras utilizadas tinham uma massa da ordem de 60 mg e uma hidratação de cerca de 5 por cento.

A taxa de aquecimento para as medidas foi de 0,167 °K /seg.

Na tabela III são dados os valores da energia de ligação da água à insulina obtidos pelo ajuste das curvas de PTE através de um programa desenvolvido por CELASCHI.

VALORES DA ENERGIA DE DESSORÇÃO
DE ÁGUA PARA A INSULINA

MEDIDA	ENERGIA (eV)
Primeira medida pastilha 1	0,32
Segunda medida pastilha 1	0,32
Primeira medida pastilha 2	0,30
Segunda medida pastilha 2	0,30
Primeira medida em pó	0,35
Primeira medida pastilha 3	0,34
Segunda medida pastilha 3	0,30

Tabela III

O valor médio da energia de ligação é $(0,32 \pm 0,02)$ eV

VII CONCLUSÕES

Este capítulo está dividido em três partes a saber:

7.1 - Instrumentação

7.2 - Isoterma de sorção de água da insulina.

7.3 - Pressão termoestimulada da insulina.

7.1 - Instrumentação

Um dos objetivos desta dissertação é dar contribuição na área de instrumentação, portanto pode-se adiantar as conclusões relativas também a tais aspectos.

7.1.1 - Oscilador

As duas conclusões relativas neste aspecto são:

O oscilador, dentro da grande precisão necessárias, mostrou-se estável (uma parte em 10^6).

A reprodutividade foi satisfatória apresentando um desvio de $\pm 5\text{HZ}$.

7.2.2 - Câmara de hidratação

Feito um projeto desta importante parte do equipamento, construiu-se um protótipo que mostrou-se plenamente satisfatório. No entanto, o sistema poderia ser aprimorado através de um eventual dispositivo de controle contínuo da pressão parcial de vapor de água.

Conclui-se que houve um desempenho muito bom do SISTEMA, dada a concordância dos dados da literatura para o DNA.

A principal conclusão é que tem-se condições de construir no Brasil uma microbalança a quartzo, com sensibilidade de 7×10^{-7} g, para estudo de sorção de água, a partir do projeto deste trabalho.

Construída esta balança sua aplicação irá além do presente uso, podendo ser utilizada na química, na farmacologia, bioquímica e outros campos. Dada a urgente necessidade de substituição de equipamentos estrangeiros por instrumentos e equipamentos brasileiros, esta balança a quartzo, se coloca em uso em laboratório de pesquisa e de tecnologia, poderá dar uma contribuição a nível da problemática da instrumentação.

7.2 - Isotermas de sorção de água da insulina

Através da tecnologia de pesagem (em nossa balança a quartzo) encontrou-se para a insulina 46 moles de água por mol de monômero para a capacidade de monocamada, vale dizer h_m no modelo de Guggenheim (equação III.47). Este vapor é semelhante ao encontrado por SAKABE e colaboradores em 1980, através da técnica de espalhamento de raios X (16). Sendo assim, estes dados estão plenamente satisfatórios.

Nesta mesma equação (III.47), b assume valor 1,17, que, sendo maior que 1, mostra haver saturação antes que a umidade relativa seja de cem por cento.

Estas conclusões reforçam pois os resultados de raios-X o que a nosso ver é um dos resultados mais relevantes da presente dissertação.

7.3 - PRESSÃO TERMOESTIMULADA

A pressão termoestimulada (tabela III) apresentou como resultado da energia de ativação o valor médio de $0,32 \text{ eV} \pm 0,02$. Para os dados teóricos e experimentais, obtidos de estudo de gelo, são encontrados para as ligações de hidrogênio na água, energias de $0,25 \text{ eV}$. Através desses dados é possível estimar-se que, em média, as moléculas de água se ligam à insulina por 1,3 pontes de hidrogênio.

Esta conclusão poderá vir a ter eventuais repercussões na interpretação dos dados estruturais obtidos por raios-X.

Entretanto na presente fase de tais estudos torna-se difícil uma utilização deste resultado para obtenção de conclusões comparativas com os dados estruturais. Além de tudo, trata-se certamente de um valor médio.

As conclusões gerais são pois que:

- 1) - O instrumental relativo à microbalança a quartzo apresenta bom desempenho e concordaram com os valores experimentais usando-se as curvas do DNA como curvas de referência.

- 2) - Os resultados referentes à insulina concordam com os resultados de raios-X e estes dão apoios experimental, o que é importante em virtude das conhecidas dificuldades com o método em face do baixo poder de espalhamento da água.
- 3) - Ainda com a insulina os resultados de PTE indicam uma energia de ligação de 0,32 eV, o que leva à conclusão de que em média a água realiza 1,3 pontes de hidrogênio. Entretanto não temos meios de analisar tais resultados com os dados estruturais.
- 4) - A presente balança poderá vir a ser utilizada no país em química, farmacologia, bioquímica e outros campos.

CONTRIBUIÇÕES DA PRESENTE DISSERTAÇÃO

- 1) - Projeto, construção e desenvolvimento de uma microbalança a cristal de quartzo para o estudo de isothermas de sorção de água em materiais biológicos.
- 2) - Controle do desempenho da microbalança, construída em nossos laboratórios, através da isoterma de hidratação do DNA; com desempenho satisfatório.
- 3) - Estudo da hidratação da insulina através da microbalança construída em nossos laboratórios, com resultado ajustado ao modelo de Guggenheim, obtendo-se para a capacidade da monocamada 46 moles de água por mol de monômero de insulina.
- 4) - Estudo da desidratação da insulina através da técnica de PTE, encontrando uma energia de ligação de 0,32 eV, isto é, em média as moléculas de água ligam-se à PTE de insulina através de 1,3 pontes de hidrogênio.
- 5) - Implantação de um programa computacional para análise de resultados de isothermas de sorção.
- 6) - Intercâmbio com o grupo de biofísica de La Plata (Argentina).

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- 1) - Desenvolvimento de um sistema de controle de unida de relativa, com a capacidade de variação contínua da pressão parcial de vapor d'água, permitindo desta forma maior facilidade para a obtenção de curvas de sorção e dessorção.
- 2) - Desenvolvimento de um sistema gravimétrico para o estudo de isothermas de sorção, o qual possa ser utilizado com amostras na forma de cristais ou pó.
- 3) - Complementação do estudo da interação da água com a insulina:
 - 3.1) Isothermas na forma cristalina da insulina determinando-se se a mesma está na forma de dímeros ou hexâmeras;
 - 3.2) Estudos de correntes termoestimuladas da insulina como função da hidratação;
 - 3.3) Propriedades dielétricas através de decaimento isotérmico de polarização da insulina em função da hidratação.

ANEXO

Ajuste da função

$$Y_i = \frac{A B c X_i}{(1 - b X_i) (1 + (c - 1) B X_i)}$$

esta função pode ser reescrita convenientemente na
forma

$$\frac{X_i}{Y_i} = Z = a_1 + a_2 X_i + a_3 X_i^2$$

onde

$$a_1 = \frac{1}{A B c}$$

$$a_2 = \frac{B (c - 2)}{A B c}$$

$$a_3 = \frac{B (c - 1)}{A B c}$$

Da literatura os valores a_1 , a_2 e a_3 que minimizam

$$\sum_{i=1}^{i=n} \left(\frac{X_i}{Y_i} - a_2 X_i - a_3 X_i^2 - a_1 \right)^2$$

são dados pela solução do sistema linear

$$n a_1 + (\sum X_i) a_2 + (\sum X_i^2) a_3 = \sum Z_i ;$$

$$(\sum X_i) a_1 + (\sum X_i^2) a_2 + (\sum X_i^3) a_3 = \sum Z_i X_i$$

$$(\sum X_i^2) a_1 + (\sum X_i^3) a_2 + (\sum X_i^4) a_3 = \sum Z_i X_i^2$$

Os valores de A B e C em função de a_1 , a_2 e a_3 são dados por:

$$B c = 2 ((a_2 / 2 a_1)^2 - a_3 / a_1)^{1/2}$$

$$A = (a_2^2 - 4 a_1 a_3)^{-1/2}$$

$$B = (1/2) (B c - a_2 / a_1)$$

$$C = (B c) / B$$

Foi desenvolvido um programa em FORTRAN para fazer este ajuste.

O número de pontos e os pontos, X_i e Y_i , que são respectivamente pressão parcial de vapor d'água e massa relativa de água sorvida, para maior flexibilidade são introduzidas através do terminal.

O programa define a nova variável $Z_i = X_i/Y_i$ e monta a matriz dos coeficientes do sistema linear.

A solução do sistema linear é realizada através de uma sub-rotina de eliminação por Gauss.

Como saída, o programa nos fornece os valores de A, B e c e uma tabela contendo os valores de X_i , Y_i e $f(X_i) Y_i$.

Na verificação do programa procedeu-se da seguinte maneira; atribuiu-se valores às constantes A, B e c dentro dos limites encontrados na literatura; calculou-se os valores da função nas unidades dadas pela tabela 1 a 25 °C com J casas decimais. Rodou-se então o programa sendo encontrado erros inferiores a 0,08 por cento nas constantes A, B e c.

A listagem do programa e um exemplo de saída são mostrados a seguir.

```
DIMENSION X(30),Y(30),Z(30),S(4),SD(30),A(3)
REAL MTC(3,4)
TYPE 1
1 FORMAT (/,1X,'NUMERO DE PUNTOS=?')
ACCEPT *,N
TYPE 2
2 FORMAT (//,1X,'X(I),Y(I)')
DO 3 I=1,N
ACCEPT *,X(I),Y(I)
3 CONTINUE
DO 10 I=1,4
10 S(I)=0
DO 20 I=1,3
20 SD(I)=0
DO 30 I=1,N
Z(I)=X(I)/Y(I)
30 CONTINUE
DO 40 NI=1,N
DO 60 IS=1,4
60 S(IS)=S(IS)+X(NI)**IS
SD(1)=SD(1)+Z(NI)
DO 70 ISD=2,3
70 SD(ISD)=SD(ISD)+Z(NI)*(X(NI)**(ISD-1))
40 CONTINUE
MTC(1,1)=N
DO 80 I=1,3
DO 80 J=1,3
MTC(I,4)=SD(I)
K=I+J
80 IF(K.NE.2) MTC(I,J)=S(K-2)
CALL GAUSS(MTC,A,3,4)
BC=2*SQRT((A(2)/(2*A(1)))*2-A(3)/A(1))
R=1/(SQRT(A(2)*A(2)-4*A(1)*A(3)))
B=(BC-A(2)/A(1))/2
C=BC/B
SQD=0
TYPE 100
100 FORMAT(//,10X,'VALORES DAS CONSTANTES')
TYPE 110,R
110 FORMAT(//,1X,'A=',F9.4)
TYPE 120,B
120 FORMAT(1X,'B=',F9.4)
TYPE 130,C
130 FORMAT(1X,'C=',F9.4)
TYPE 140
140 FORMAT(//,3X,'X(I)',4X,'Y(I)',4X,'F(X(I))',9X,'F(X(I))
* Y(I)',/)
DO 150 I=1,N
F=(R*BC*X(I))/((1-B*X(I))*(1+(BC-B)*X(I)))
D=F-Y(I)
TYPE 160,,X(I),Y(I),F,D
160 FORMAT(1X,F6.3,F9.3,F9.3,E23.7)
150 CONTINUE
STOP
END
SUBROUTINE GAUSS(A,X,N,NP1)
DIMENSION A(N,NP1),X(N)
NM1=N-1
DO 600 K=1,NM1
KP1=K+1
L=K
```

```
      DO 400 I=KP1,N
400  IF (ABS(A(I,K)).GT.ABS(A(L,K)))L=I
      IF (L.EQ,K) GO TO 500
      DO 410 J=K,NP1
      TEMP=A(K,J)
      A(K,J)=A(L,J)
410  A(L,J)=TEMP
500  DO 600 I=KP1,N
      FACTOR=A(I,K)/A(K,K)
      DO 600 J=KP1,NP1
600  A(I,J)=A(I,J)-FACTOR*A(K,J)
      X(N)=A(N,NP1)/A(N,N)
      I=NM1
710  IP1=I+1
      SUM=0.0
      DO 700 J=IP1,N
700  SUM=SUM+A(I,J)*X(J)
      X(I)=(A(I,NP1)-SUM)/A(I,I)
      I=I-1
      IF (I.GE.1) GO TO 710
      RETURN
      END
```

run Pires1

NUMERO DE PONTOS=?
11

X(I),Y(I)
.069,4.247
.111,5.844
.224,8.971
.328,11.453
.44,14.365
.534,17.375
.578,19.082
.643,22.125
.754,29.706
.842,40.009
.976,81.113

VALORES DAS CONSTANTES

A= 9.9999
B= 0.9000
C= 9.9985

X(I)	Y(I)	F(X(I))	F(X(I))-Y(I)
0.069	4.247	4.247	-0.7724762E-04
0.111	5.844	5.844	-0.2365112E-03
0.224	8.971	8.971	0.4367828E-03
0.328	11.453	11.453	0.3595352E-03
0.440	14.365	14.365	-0.1792908E-03
0.534	17.375	17.375	-0.2136230E-03
0.578	19.082	19.082	-0.3890991E-03
0.643	22.125	22.125	-0.9918213E-04
0.754	29.706	29.706	0.4711151E-03
0.842	40.009	40.009	0.1525879E-04
0.976	81.113	81.114	0.6713867E-03

BIBLIOGRAFIA

- 1 - MASCARENHAS, S. - Bioelectrets electrets in biomaterials and biopolimers. In: SESSLER, G.M, ed - Electrets. Berlim, Springer Verlag, 1980 (topics in Applied Physics, vol 33).
- 2 - CLEMENTI, E. - Computational aspects for large chemical systems. Berlim, Springer Verlag 1980. (Lectures Notes in Chemistry V. 19).
- 3 - FRANKS, F. - Water: a comprehensive treatise. Plenum Press, 1975, V. 1-5.
- 4 - FINNEY, J.L. - The organization and function of water in protein crystal. In: Water: a comprehensive treatise, New York Plenum, 1979, V.6.
- 5 - ORIGERA, J. R. - Nuclear magnetic resonance spin-spin relaxation time in hydrated protein powders. A two dynamic exchange model. J. Phys. Chem., 83(16): 2145-2147, 1979.
- 6 - RUEGG, M and HANI, H. - Infrared spectroscopy of the water vapor sorption process of caseins. Bioch. Biophy Acta, 400:17-23, 1975.
- 7 - FALK, M.; MARTMAN, Jr. K. A.; LORD, R. C. Hydration of deoxyribonucleic acid. I a gravimetric study. J. Amer. Chem. Soc. 84 : 3843-46, 1962.

- 8 - CELASCHI, S. and MASCARENHAS, S. - Thermal-Stimulated pressure and current studies of bond water in lysosyme. Biophys. J., 20:273-277, 1977
- 9 - QUEZADO, S. and MASCARENHAS, S. - On the problem of ferroelectricity and non linearity of DNA and RNA. In: Polymer Conference of the Institute of Physics and Chemical Research of Japan, 14 Oct. 1978.
- 10- ONUCHIC, J. N. - Investigações em biofísica da água, caso ácido violúrico. São Carlos, IFQSC, 1982. Tese (Mestre).
- 11- SANCHES, R.; DONOSO, J.P.; MASCARENHAS, S.; PANEPUCCI, H. C. Proton NMR spin-spin relaxation in hydrated insulin powder. In: Congresso Brasileiro de Biofísica, 7. Rio de Janeiro 15 a 17 de dezembro de 1982.
- 12- HOSSAY, B et al - Fisiologia humana. EL ATENED, 1957.
- 13- BEST, C. H. and TAYLOR, N. B. - Elementos de fisiologia humana. Editora Renascença, 1950.
- 14- Handbook of Physiology Section 7. Endocrinology, American Physiological Society, V. 1).
- 15- BLUNDELL, T.; DODSON, G.; HODGKEIN, D., MERCOLA, D. Insulin The struture in the crystal and its reflection in Chemistry and biology. Advances in Protein Chemistry 26:279-402, 1972.

- 16 - SAKABE, K.; SAKABE, N.; SASAKI, K. - Water in rhombohedral 2 zinc insulin crystals at 4°. In: Pullman, B., ed and Yagi, K. Water and metal cations in biology systems. TOKYO. JAPAN SCIENTIFIC, 1980.
- 17 - McLAREN, A.D. and ROWEN, W. J. *Plym. Sci.*, 7:289, (1951).
- 18 - LANGMUIR, I. - The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum, *J. Am. Chem. Soc.* 40:1361-1403, 1918.
- 19 - BRUNAUER, S.; EMMETT, P. H. and TELLER, E. - Adsorption of gases in multimolecular layers *J. Am. Chem. Soc.* 60:309-319. 1938.
- 20 - GUGGENHEIN, E. A. - Applications of statistical mechanics. Oxford 1966. Claredon Press.
- 21 - LANGMUIR, I. *Phys. Rev.* 2 331 1913.
- 22 - PETHIG, R. - Dielectric and electronic properties of biological materials, John Wiley.
- 23 - CELASCHI, S. - Água ligada e propriedades elétricas de lisozima. São Carlos, IFQSC, 1977. Tese (Mestre).
- 24 - ASHWORTH, H. A. and SHACKLETTE, L. W. - Mass/thickness detector employing inexpensive integrated circuits. *Rev. Sci. Instrum.*, 49 (12): 1653-57, Dec 1978.

- 25 - BALASUBRAMANIAN, G. and RIESZ, R. P. - Digital thickness monitor using only one crystal oscillator. Rev. Sci. Instrum. 52(5): 746-749, May 1981.

- 26 - BOTTOM, V. E. - The theory and design of quartz crystal units, McMurry Press 1968.

- 27 - MILLER, J. G. and BOLEF, D. I. - Acoustic wave analysis of the operation of quartz-crystal film-thickness monitors. J. Appl. Phys. 39 (12): 5815-16, Nov. 1968.

- 28 - MILLER, J. G. and BOLEF, D. I. - Sensitivity enhancement by the use of acoustic resonators in cw ultrasonic spectroscopy. J. Appl. Phys. 39 (12): 4589-93, Sep. 1963.

- 29 - ARAI, C.; HOSAKA, S; MURASE, K.; SAND, Y. - Measurements of the relative humidity of saturated aqueous salt solutions . J. Chem. Eng. Japan, 9 (4): 328-29, 1976.

- 30 - ONUCHIC, J. M. ; PIRES, R. C. e VERA, S. S. - Sistema de medida de pressão termo-estimulada. In: Simpósio sobre instrumentação, 2, 1980. Anais.