

INSTITUTO DE FÍSICA E QUÍMICA DE SÃO CARLOS — USP

DEPARTAMENTO DE FÍSICA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS

AGUA LIGADA E PROPRIEDADES ELÉTRICAS
DA LISOZIMA

SÉRGIO CELASCHI

(Dissertação apresentada ao Depto. de
Física e Ciência dos Materiais, para
obtenção do título de Mestre em FÍSICA
APLICADA)

Orientador:

Sérgio Mascarenhas de Oliveira

SÃO CARLOS

Junho, 1977

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA E QUÍMICA SÃO CARLOS

04

ÁGUA LIGADA E PROPRIEDADES
ELÉTRICAS DA LISOZIMA



Sergio Celaschi

Trabalho apresentado ao Instituto de Física e Química de São Carlos, para obtenção do título de Mestre em Física Aplicada.

Orientador:

Prof.Dr.Sergio Mascarenhas

Banca Examinadora:

Prof.Dr.Sergio Mascarenhas (orientador) - IFQSC/USP

Prof.Dr.Guilherme F.L.Ferreira - IFQSC/USP

Prof.Dr.Donald Channin - RCA-LAB.,

Princeton - USA

DEPARTAMENTO DE FÍSICA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS

São Carlos, junho de 1977

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro da FAPESP,
CNPq-NSF, BNDE e BID.

Devagar ele começa a aprender... a princípio pouco a pouco e depois a passos largos. Logo seus pensamentos entram em choque. O que aprende nunca é o que ele imaginava, de modo que começa a ter medo e sente este crescer impiedosamente. Seu propósito torna-se um campo de batalha.

E assim ele depara com o primeiro de seus inimigos naturais: o medo ! Um inimigo terrível, traiçoeiro e difícil de vencer.

Aos poucos a batalha se estrutura, mas no entanto o medo é vencido de repente.

Aqui o homem já conhece seus desejos e sabe como satisfazê-los. Uma clareza incrível cerca tudo.

E assim ele encontra seu segundo inimigo: a clareza! Uma clareza tão difícil de se obter. Ela elimina o medo mas também cega. Obriga o homem a nunca duvidar de si, ele é corajoso porque é claro e não para diante de nada. Mas é tudo um engano, é como algo incompleto..... e virá o momento em que ele sente que sua clareza era apenas um ponto diante de sua vista. Naquele instante, ele terá vencido seu segundo inimigo e saberá que o poder que vem buscando há tanto tempo é seu, por fim. Seu desejo é ordem. Vê tudo que está em volta. Mas também encontra seu terceiro inimigo: o poder!

Com paciência ele controlará seu poder e assim terá vencido seu terceiro inimigo. O homem então estará no fim de sua jornada do saber e, quase sem perceber, encontrará seu último inimigo: a velhice! Este é o mais cruel, o único que ele não conseguirá derrotar completamente, mas apenas afasta ... e virá um desejo irresistível de descansar.

Mas se o homem sacode sua fadida e vive seu destino, então poderá ser chamado um homem de conhecimento. Nem que seja no breve momento em que ele consegue lutar com o seu último inimigo invencível. Esse momento de clareza, poder e conhecimento é pleno.

À

MAMÃE,

com muito amor

INDICE

Agradecimentos.....	I
Resumo.....	II
Abstract.....	III
CAPÍTULO I	
Introdução sobre bioeletretos.....	1
Modelos sobre a estrutura da água.....	4
A água estruturada em macromoléculas.....	6
Propriedades dielétricas de proteínas.....	9
CAPÍTULO II	
Propriedades dielétricas da Lisozima e sua hidratação....	12
A Lisozima e suas propriedades estruturais.....	15
CAPÍTULO III	
Preparo e hidratação das amostras e os sistemas de medida	17
✓ A técnica de Corrente Termo-Estimulada.....	21
✓ A técnica de Pressão Termo-Estimulada.....	28
A técnica de Análise Termo-Gravimétrica.....	33
CAPÍTULO IV	
Resultados experimentais.....	36
CAPÍTULO V	
Conclusões e modelos.....	44
CONCLUSÕES FINAIS.....	57
CONTRIBUIÇÕES.....	58
SUGESTÕES.....	59
BIBLIOGRAFIA.....	60

I

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

Aos Profs. Robert L. Zimmerman, Laercio G. de Freitas, Almir Massambani, Sylvio G. Rosa Jr., Roberto Lobo e Dietrich Schiel pela dedicação e participação tão necessárias para a minha formação.

Ao Prof. S. Mascarenhas pela escolha e estímulo quanto ao trabalho apresentado.

Aos Profs. B. Gross, Guilherme F. L. Ferreira e J. A. Fornés pela participação decisiva.

Ao Sanches pelo apoio tão necessário na parte experimental e ao Valdeci pelo processamento de dados.

Aos companheiros de turma Mergulhão, Lençóis, Drugo, Liderio e Zilio com quem convivi.

ã Loreni e ao Paulo pela datilografia e impressão.

Ao pessoal da oficina mecânica pela manufatura de peças e equipamentos.

II RESUMO

Utilizando-se quatro diferentes técnicas de medi-
das analisou-se as propriedades dielétricas e estruturais da liso-
zima com grau de hidratação inferior a 40mg H₂O/g prot. De um mo-
do geral todos os efeitos observados foram relacionados com a pre-
sença de moléculas de H₂O ligadas aos sítios hidrofílicos existen-
tes na superfície da macromolécula proteica.

Das curvas de Descarga Isotérmica observa-se a e-
xistência de dois diferentes sítios de ligação ambos caracteriza-
dos por frequência, medida de temperatura ambiente, no intervalo
de 10⁻²Hz, indicando que as moléculas se encontram fortemente li-
gadas.

O processo de despolarização pode ser, em princí-
pio, devido a dois efeitos: a rotação e a desorção das moléculas
de H₂O. Os dados experimentais indicam os efeitos da desorção co-
mo os principais.

As energias de ativação do processo de desorção ,
encontradas para os dois diferentes sítios 0.34 e 0.55eV, sugerem
que as moléculas de H₂O se ligam por uma ou duas pontes de hidro-
gênio a superfície da lisozima.

III
ABSTRACT

Using four different techniques we have analysed the dielectric and structural properties of lysozyme with hydration below 40mg H₂O/g prot. All the observed effects were related to the presence of bound-water molecules at the hydrophilic sites on the surface of the macromolecule. From the spectra of Isothermic Discharge we observe the existence of two different bounding sites, both with characteristic frequency, measured at room temperatures, in the range of 10⁻²Hz, indicating that the molecules are strongly bounded.

The despolarization process might be due to two effects: rotation and sorption of the H₂O molecules. The experimental data show that the main effects are those of sorption.

The sorption activation energies, 0.34 and 0.55eV, suggest that the H₂O molecules are bounded by one or two hydrogen bonds to the surface of lysozyme.

A água é um dos mais abundantes compostos sobre a superfície da terra e o principal constituinte de todos organismos vivos.

Os oceanos contêm 1.4×10^{24} g de H_2O e outras 0.8×10^{24} g existem nas rochas da crosta terrestre na forma de água de cristalização.

O corpo humano possui cerca de 65% de água em peso. Alguns tecidos tais como o cérebro e os pulmões são compostos de aproximadamente 80% de água.

Desde Thales de Mileto (624-546AC) que considerou a água como o elemento universal, tem-se reconhecido a importância da água em nosso meio ambiente externo e interno e se tem estudado essa substância extensivamente.

CAPÍTULO I

a) Introdução sobre bioeletretos

A palavra "eletreto" foi criada em 1885 por Oliver Heaviside, físico inglês, para definir uma polarização dielétrica "permanente", o analogo elétrico do magneto.

O primeiro trabalho experimental sobre eletretos data de 1919 e é devido a Eguchi, um físico japonês. Esse fenômeno foi descoberto quando investigava-se a condutividade elétrica de óleos e ceras em solidificação. Eguchi fundiu, a 120°C, partes iguais de cera de carnauba e uma resina. Através de eletrodos de metal foi aplicado a esta mistura um campo de 10KV/cm durante a fusão e todo o processo de resfriamento. Após a mistura ter alcançado a temperatura ambiente e se encontrar solidificada, o campo elétrico foi removido e como resultado o sistema exibiu uma polarização elétrica interna. Estava descoberto o primeiro eletreto.

Eguchi concluiu que esta nova propriedade era um fenômeno volumétrico, pois ao quebrar a mistura solidificada, dois novos eletretos se formavam.

Os vários tipos de eletretos conhecidos hoje são definidos a partir do método físico pelo qual foram criados. O eletreto original de Eguchi é agora chamado um termoeletreto. Os eletretos produzidos por incidência de luz são chamados fotoeletretos e assim temos os radioeletretos, os magnetoletretos, os eletretos naturais e outros.

Após os trabalhos pioneiros de Eguchi, carga e armazenamento de polarização via estado de eletreto tem sido identificado em uma grande variedade de materiais, tais como os cristais iônicos (1), sólidos moleculares (2), polímeros (3,4), gelo (5), cristais líquidos (6) e cerâmicas (7). O grau de polarização desses materiais e sua razão de decaimento (tempo de relaxação), dependem da natureza do dielétrico e das suas condições experimentais.

Um dielétrico torna-se um eletreto quando sua razão de decaimento faz-se tão pequena que uma fração significativa do cam

po induzido fica preservada depois do campo de polarização ter sido removido.

O efeito de eletreto tem percorrido um longo caminho desde os trabalhos pioneiros de O.Heaviside (8) e as descobertas experimentais de Eguchi (9), B.Gross (10) e outros (11).

O completo entendimento do fenômeno envolveu bases fenomenológicas e microscópicas. Podemos hoje dizer que o estado de eletreto não é uma anomalia dos dielétricos como se chegou a pensar, mas sim uma propriedade geral de isolantes a qual pode estar presente em maior ou menor grau dependendo de sua origem molecular e parâmetros experimentais, em particular a temperatura.

Recentemente atenções tem sido voltadas para as possibilidades de armazenamento de polarização elétrica em materiais de interesse biológico, os bioeletretos. A presença de tal fenômeno tem sido estudada intensamente em ossos (12) e outros materiais estruturais.

Após uma vasta série de investigações dos efeitos de eletreto em material biológico, conclue-se que este estado é uma propriedade geral dos biopolímeros, tendo sido encontrado em polipeptídeos fibrilares (colageno) e globulares (hemoglobina e tripsina), polinucleotídeos (DNA e RNA) polisacarídeos (celulose e quitina de várias origens biológicas) e em vários polipeptídeos artificiais.

O termo "bioeletreto" foi proposto por S.Mascarenhas (13) em vista desse comportamento geral dos biopolímeros como eletretos.

Aplicações do conceito de bioeletreto tem ocorrido no campo das superfícies antitrombogênicas por Murphy e Col (14) e S.Mascarenhas e col (15). A maioria dos materiais tanto naturais como sintéticos que apresentam boa compatibilidade sanguínea, também apresentam, eletronegatividade em suas superfícies. Uma técnica para aumentar a eletronegatividade dos polímeros é o efeito de eletreto. Os experimentos "in vivo" e "in vitro" mostraram contínuo aumento da compatibilidade sanguínea como resultado da carga nega-

tiva induzida, via estado de eletreto, nesses materiais.

Outras aplicações do conceito de eletreto no campo da permeabilidade de membranas, tem sido estudadas de um ponto de vista experimental e teórico por diversos pesquisadores (16, 17). A idéia básica é que a indução do estado de eletreto em membranas biológicas pode apresentar diferenças marcantes nas propriedades de transporte, uma vez que a maioria das moléculas difundidas possuem carga elétrica.

As aplicações acima selecionadas servem para demonstrar a potencialidade dos bioeletretos e sua importância para uma melhor compreensão de muitos processos biológicos a partir de uma base física da matéria. Investigando a carga e armazenamento de polarização em macromoléculas biológicas, nós esperamos obter a tão necessária base microscópica que permitirá um melhor entendimento de toda física envolvida nesses processos.

Correlacionando os estados de eletretos das moléculas com suas funções biológicas, aproximamos mais e mais a física da biologia.

b) Modelos sobre a estrutura da água

A estrutura da água tem sido o assunto de um grande número de artigos e livros (18,19). Essa molécula forma um líquido de "estrutura aberta" (20), muito diferente dos líquidos "ideais" tais como o Argônio ou o Mercúrio. O número de vizinhos mais próximos a cada molécula, 5, é muito menor do que no gelo em estrutura FCC, 12 moléculas.

Tem existido muitos pontos de vista diferentes e conflitantes sobre as possíveis estruturas formadas por essas moléculas. Os mais importantes podem ser classificados em cinco categorias: Teorias de Agrupamento, Teoria de Dois Estados, Teorias Intersticiais, Teorias de Meios Contínuos e a Teoria devida a Berendsen.

De acordo com as teorias de agrupamento (21), supõe-se que a água forme aglomerados de pontes de hidrogênio, existindo moléculas não ligadas como espécies distintas. Teorias estatísticas baseadas nesses agrupamentos (22), as quais admitem 5 tipos distintos de moléculas dependendo do número de pontes de hidrogênio existentes, tem tido certo sucesso. Interpretações dos dados de infravermelho (23) tendem a suportar essa teoria. Recentemente, porém, tais interpretações tem sido mostradas serem incorretas (24).

No modelo de dois estados (25) a estrutura de água fica baseada na existência de anéis hexagonais distorcidos, similares aos encontrados no gelo. Na água esses anéis são assumidos em uma distribuição de equilíbrio entre essas duas estruturas.

A "Compacta Aberta" ótima para a formação de pontes de hidrogênio entre os anéis e a "Compacta Fechada" na qual as moléculas formam aproximadamente uma estrutura cúbica de face centrada (FCC). Esse modelo concorda com estimativas de espectroscopia Raman e dados de propriedades dielétricas da água.

Na teoria intersticial (26,27) a estrutura da água líquida é vista como um colapso parcial da estrutura do gelo, ficando as partes colapsadas preenchidas por moléculas de água intersticiais. Esse modelo é fortemente suportado pelos dados obtidos por

Danford e Levy (27) em experimentos com raios-X.

Por outro lado, as teorias contínuas (28,29) não supoõe qualquer tipo particular de ordem; nelas a água se estrutura por intermédio de pontes de hidrogênio distorcendo fortemente suas distâncias intermoleculares e ângulos em relação a molécula livre.

Outro importante modelo com base nos experimentos de difração de raios-x, espalhamento de neutrons e propriedades dielétricas foi proposto por Berendsen (30) em 1967. Em resumo o modelo assume que o gelo ao se derreter varia sua estrutura de modo que alguns dos sítios intersticiais existentes ficam ocupados. Essas moléculas não permanecem livre para rodar pois são ligadas por pontes de hidrogênio distorcidos a rede vizinha. Portanto onde existe uma molécula intersticial, a rede, com estrutura semelhante ao gelo, se torna apreciavelmente distorcida. O conceito de ligações nos interstícios torna possível uma série de explicações sobre as propriedades dielétricas da água e do gelo.

c) A água estruturada em macromoléculas

Desde que a água fica estabilizada em cadeias nas vizinhanças de certas moléculas biológicas tais como o colágeno, o DNA, a queratina, e certos agregados de lipídeos (20), essas cadeias de água podem ligar, através de pontes de hidrogênio, várias macromoléculas contribuindo assim para estabilizar os mais diversos arranjos formados.

Isso, naturalmente, ocorre em adição as interações diretas entre as cadeias laterais, mas ainda assim a função da água como estabilizadora pode ser da maior importância para o crescimento desses agregados.

Podemos então concluir que certas macromoléculas, tais como o colágeno, podem estabilizar a estrutura da água nas suas vizinhanças, a qual por sua vez, estabiliza os arranjos formados por essas moléculas.

A seletividade iônica pode ser outro aspecto muito importante das variações estruturais na água. Quando no estado líquido, a água apresenta ordenação em distâncias menores do que 10Å , as variações estruturais que acompanham a hidratação iônica são importantes somente nas primeiras camadas de moléculas de água em torno dos íons. Se essa ordem se estender a distâncias maiores, as dimensões do íon hidratado podem ser muito mais críticas por suas energias livres e mobilidade.

Nas funções de membrana, em conexão com a seletividade iônica, o estado de eletreto pode ser induzido pelos potenciais transmembrana, nas moléculas polares de água ligada existente nos poros, partes hidrofílicas das camadas lipídicas, e na superfície das proteínas existentes (nas membranas), alterando dessa forma a estrutura e o campo elétrico da membrana, com isso ficam alteradas as seletividades para Na^+ e K^+ . Tais influências podem ser críticas para as funções nervosas.

I.M.Klotz e col. (31) em seus trabalhos sobre transporte de elétrons em proteínas, sugeriram que a estrutura da água pode estar envolvida na transferência de elétrons, íons e hidrogênio, nos caminhos do metabolismo e fotossíntese.

O Estado de Eletreto da Água Estru-
turada em Biomateriais

Em condições fisiológicas, moléculas de água raramente se ionizam formando H^+ e OH^- , elas existem como moléculas polares e assim sendo, suas propriedades elétricas podem ser explicadas, em primeira ordem, através de um momento de dipolo elétrico permanente originado de uma carga positiva e uma negativa fixas e separadas por uma certa distância.

Essa molécula também possui um momento de dipolo induzido proporcional à magnitude do campo elétrico local (32).

Seu momento de dipolo elétrico permanente ($1,84 \times 10^{-18}$ stat.coul/cm = 1,84 Debye) foi determinado por medidas de constante dielétrica através de variações na temperatura do vapor (32) e confirmado por vários outros métodos (33,34,35). A origem desse momento dipolar vem da não linearidade da molécula, o valor do ângulo H-O-H ($104,474^\circ$) para a molécula livre, é conhecido da análise dos dados de espectroscopia no infravermelho (18).

Como já ficou enfatizado anteriormente, essa molécula polar pode se unir as mais diversas moléculas biológicas por intermédio de pontes de hidrogênio. A energia dessa ligação provém de uma combinação de forças covalentes e forças de Van der Waals ou interação dipolo-dipolo. Segundo Frank (36), a covalência dessa ligação causa uma separação de cargas adicional na molécula de água provocando um aumento em seu momento dipolar e possibilitando a formação de outras pontes. Assim esse processo tem como resultado um efeito cooperativo em concordância com as teorias de agrupamento.

Por causa da alta natureza direcional, as características covalentes são funções sensíveis do ângulo de ligação. O máximo de covalência, no caso de ligação entre moléculas de água, ocorre para o valor de 180° .

Desvios apreciáveis do ângulo crítico resultam em uma perda na covalência. A ausência dessa característica é utilizada

para explicar o rompimento das pontes de hidrogênio.

Um dos objetivos deste trabalho é mostrar que a água quando ligada de um modo estruturado na macromolécula de lisozima, pode possuir níveis de energia para a rotação dipolar. Então a água ligada pode também apresentar o estado de eletreto, como foi mostrado para o caso do colágeno, gelatina, hemoglobina e outras moléculas (13).

Através do estudo das relaxações tanto nos graus de rotação, quanto nos de vibração das moléculas ligadas junto aos sítios primários de hidratação na matriz protéica, são obtidas informações sobre a natureza desses locais, sobre os processos de interação e sobre a estrutura de ligação das primeiras moléculas de água na superfície da macromolécula.

Naturalmente será preciso limitar nossas investigações a baixas hidratações, onde a resistividade das amostras ainda é suficientemente elevada de modo a permitir a aplicação do campo de polarização, necessário a indução do estado de eletreto no sistema. Para hidratações maiores existem vários outros métodos sensíveis tais como: Relaxação dielétrica (37), velocidade de sedimentação (38), coeficiente de difusão (39), viscosidade intrínseca, NMR (40), espalhamento de raios-X (41), coeficiente de atrito (42), difusão de O^{18} (43) e espectroscopia no infravermelho.

d) Propriedades dielétricas de proteínas

As primeiras medidas das propriedades elétricas de proteínas em solução foram feitas por Oncley em 1942 (44). Ele observou uma dispersão perto de 2MHz a qual foi atribuída a rotação da molécula de proteína. Dez anos depois, também trabalhando com soluções, Buchaman, Haggis, Hasted e Robinson (45) concluíram seus estudos sobre as propriedades dielétricas da albumina, uma proteína do ovo, na região de microondas. Esses revelaram duas relaxações dielétricas em diferentes regiões de frequência: A região β (10^5 a 10^7 Hz) correspondente a rotação das moléculas da proteína em solução e a região γ (2×10^9 Hz a 2×10^{11} Hz) correspondente a relaxação da água. Posteriormente Schwan (46) (1957) e Grant (47) (1962) observaram uma dispersão extra a qual ficou relacionada a região δ (10^7 Hz a 10^9 Hz) situada entre as regiões β e γ . Foi sugerido por Schwan e Grant que a rotação da água estruturada era a responsável pela nova relaxação encontrada. Schwan, entretanto, frisou que os radicais polares da cadeia polipeptídica poderiam também apresentar relaxações nesta região de frequência.

Em artigo posterior, Pennock e Schwan (48) concluíram que a dispersão dielétrica da hemoglobina em solução ($7,5-26,6g/100cm^3$) entre 1 e $1,2 \times 10^3$ MHz poderia ser separada em três regiões distintas. Abaixo de 30MHz a dispersão notada foi atribuída a natureza dipolar da molécula de hemoglobina. Entre 10 e 100MHz a dispersão encontrada foi atribuída a relaxação dos radicais polares da cadeia. Acima de 100MHz, a dispersão ficou associada a relaxação de camada de água ligada. A quantidade de água estruturada mais compatível com os dados experimentais para a hemoglobina é de (200 ± 50) mg de H_2O/g de proteína. Convém frisar que esses estudos não atingiram a região γ onde encontra-se a relaxação da água propriamente dita.

Trabalhando com diversas proteínas cristalizadas Rosen (49) apresentou em 1962 um estudo sobre a contribuição da água absorvida para as propriedades dielétricas das proteínas em "esta-

em peso), a probabilidade de ligação água água e proteína - proteína

desprezada, uma estrutura de equilíbrio entre 5 estados foi proposta. Um estado livre, e quatro estados ligados, classificados pelo número de pontes de hidrogênio pelas quais a molécula de água se encontra presa a matriz proteica.

Nenhum dos parâmetros dos processos de ativação foram calculados nos trabalhos em "Estado Sólido".

CAPÍTULO II

a) Propriedades dielétricas da Lisozima e sua hidratação

Como já foi visto na secção anterior, devemos a Pennock e Schwan (48) os primeiros resultados sobre a relaxação da camada de água estruturada existente na superfície das proteínas. Das três relaxações encontradas, a situada acima de 100MHz foi identificada com a dispersão da água ligada a macromolécula. A melhor concordância com os dados experimentais foi conseguida assumindo-se para a água ligada uma constante dielétrica estática no intervalo de 80 a 100, uma frequência própria de rotação entre 0,5 e 1GHz e um valor de 200 ± 50 mg de H_2O/g de proteína para a complementação da primeira monocamada.

Com base nesses valores e dos dados da variação da frequência de rotação dipolar com a temperatura, Pennock e Schwan obtiveram uma entalpia de ativação em torno de 0,3eV/partícula e concluíram que a água ligada se encontrava estruturalmente entre a água propriamente dita e o gelo.

Infelizmente devido a alta constante dielétrica do solvente e a baixa concentração de soluto (hemoglobina), os efeitos da camada de água ligada observados não passaram de 1% dos valores previstos pela equação de uma mistura de água e proteína desidratada. Com isso para a determinação dos parâmetros característicos da relaxação tornou-se necessário medidas de alta precisão, além do que no modelo utilizado foram assumidos muitos parâmetros tais como: A forma da molécula, a quantidade de água ligada, as constantes dielétricas estáticas da molécula proteica e da água ligada e a frequência característica da dispersão.

Com o propósito de contornar os problemas inerentes as medidas em solução Harvey e Hoekstra (49) resolveram estudar as propriedades dielétricas da água ligada a superfície das macromoléculas em pó de proteína cristalizada. A proteína escolhida para esses estudos foi a Lisozima. Apesar de haverem sido encontradas in -

fluências da água na constante dielétrica das proteínas, no "estado sólido", em regiões de baixa frequência, nenhuma das pesquisas realizadas cobriram o intervalo de frequências (10^7 e 10^9 Hz) onde foi observada pela primeira vez por Schwan, a dispersão da água ligada, assim sendo nenhum dos parâmetros característicos deste processo foram calculados.

Harvey e Hoekstra utilizando as técnicas de Medidas de Ondas Estacionárias (S.W.M) (49) e Reflectometria no Domínio do Tempo (T.D.R.) (49') em guias de ondas e linhas coaxiais no intervalo de frequências entre 10^7 e $2,5 \times 10^{10}$ Hz, observaram duas dispersões distintas as quais foram relacionadas a duas camadas de água adsorvida. A primeira monocamada ficou caracterizada por um tempo de relaxação da ordem de 10^{-9} seg., uma entalpia de ativação negativa e uma entropia de ativação também negativa. Essas características, pouco comuns, foram explicadas assumindo-se que no processo de ativação, pontes de hidrogênio são refeitas e assim sendo uma quantidade de calor flui do sistema ($H < 0$). Com a formação destas novas pontes devemos esperar um aumento da estrutura local, ou seja, uma redução da entropia ($S < 0$). Em resumo, com o aumento da temperatura, temos o rompimento de pontes de hidrogênio entre a molécula da água e a matriz proteica, seguindo com a formação de melhores pontes entre as moléculas de água reorientadas e suas vizinhas.

Tem-se como suporte a esse modelo, as variações de H e S com o conteúdo de água. Em amostras cuja primeira monocamada está completa, H é aproximadamente zero indicando que a molécula de água está bem ligada as vizinhas.

A entropia de ativação também diminui quanto mais água é agregada a macromolécula mostrando novamente que um menor número de pontes de hidrogênio estão sendo refeitas e com isso uma menor variação da estrutura local tem lugar.

A dispersão associada a segunda monocamada ficou caracterizada por uma distribuição de tempos de relaxação em torno do valor 2×10^{-11} seg.

Os dados sobre os trabalhos realizados em solução, citados na vasta literatura, somados aos estudos em algumas proteínas em "Estado Sólido", mostram que as primeiras "camadas" de água que envolvem a superfície proteica apresentam uma dispersão, medida a temperatura ambiente, no intervalo de 10^8 e 10^9 Hz, ou seja, apenas duas ordens de grandeza inferiores a da frequência de relaxação da água propriamente dita. Essa pequena diferença quando comparada com a frequência de rotação do próton no gelo 10^4 Hz, sugere que as moléculas nas "camadas" se encontram quase tão livres quanto no estado líquido.

Nosso trabalho não tem por objetivo o estudo das propriedades físicas das moléculas que pertencem às "camadas". Nosso interesse está no estudo das moléculas ligadas aos sítios hidrofílicos, ou seja, os resultados desse trabalho dizem respeito apenas às moléculas que se encontram realmente ligadas a sua superfície proteica.

b) A Lisozima e suas propriedades estruturais

A proteína escolhida para os estudos das propriedades da água estruturada, tanto neste trabalho, quanto no apresentado por Harvey e Kockstra, foi a Lisozima (Sigma Chemical Co.)

Em 1922 Alexander Fleming juntou algumas gotas de mucosa nasal a uma placa contendo uma determinada cultura bacteriana para ver o que poderia acontecer. Para sua grande surpresa, após alguns dias, ele notou que algo na mucosa tinha matado as bactérias. Essa substância foi a enzima Lisozima.

Ela tem sido encontrada em várias outras secreções do corpo e em grande quantidade na parte clara do ovo. Quando retirada da clara do ovo, essa enzima apresenta uma estrutura globular com peso molecular de 14.600 proveniente de uma única cadeia polipeptídica contendo 129 aminoácidos e quatro pontes dissulfídicas para a estabilização.

Sua atividade enzimática é útil no ataque a muitas bactérias através do rompimento da estrutura mucopolissacarídica da parede da célula.

A unidade básica de um polisacarídeo é um anel hexagonal de açúcar, o qual pode ser polimerizado de duas maneiras distintas (50). A Lisozima corta a cadeia polisacarídica em sítios específicos, reduzindo desta forma o polímero a um conjunto de dímeros.

Ela foi a segunda proteína e a primeira enzima que teve sua estrutura molecular detalhadamente resolvida por análise de difração de raios-X por Phillips, North, Blake e cols. (51)(52)(53). Observando essa estrutura de forma globular, notamos a existência de uma fenda (semelhante a falta de um gomo), onde essa enzima possui seu centro ativo.

A Lisozima obedece ao modelo da "gota de óleo". Semelhante as globulinas ela segue o princípio dos grupos hidrofóbicos internos e hidrofílicos externos. Todos seus grupos polares carregados se encontram na superfície com uma ou duas exceções. A gran-

de maioria de seus grupos não polares e hidrofóbicos estão voltados para o interior.

As principais razões que nos levaram a escolha dessa proteína para os estudos da água estruturada foram sua alta resistência a tratamento térmico e a seguidos ciclos de adsorção-desorção das moléculas de água induzidas por esse tratamento (54). Quando cristalizada, a Lisozima suporta temperaturas até 120°C sem perda apreciável de sua atividade enzimática.

A fácil determinação de sua atividade enzimática e de um modo geral a vasta literatura existente contribuíram também para a escolha.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
Chicken	lys	val	phe	gly	arg	cys	glu	leu	ala	ala	ala	met	lys	arg	his	gly	leu	asp	asn	tyr	arg	gly	tyr	ser	leu	gly	asn
Human	lys	val	phe	glu	arg	cys	glu	leu	ala	arg	thr	leu	lys	arg	leu	gly	met	asp	gly	tyr	arg	gly	ala	ser	leu	ala	asn
α-Lact.	glu	gln	leu	thr	lys	cys	glu	val	phe	arg	glu	leu	lys	asp	leu	lys	gly	tyr	gly	val	ser	leu	pro	glu	
						177																					
	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52		
-Chicken	trp	val	cys	ala	ala	lys	phe	glu	asn	phe	asn	thr	gln	ala	thr	asn	arg	asn	thr	asp	gly	ser	thr	asp	
Human	trp	met	cys	leu	ala	lys	trp	glu	ser	gly	tyr	asn	thr	arg	ala	thr	asn	tyr	asn	ala	gly	asn	ser	thr	asp	
α-Lact.	trp	val	cys	thr	thr	phe	his	thr	ser	gly	tyr	asn	thr	gln	ala	ilu	val	gln	asn	asn	gln	ser	thr	asn	
			115																								
	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79
Chicken	tyr	gly	ilu	leu	gln	ilu	asn	ser	arg	trp	trp	cys	asn	asp	gly	arg	thr	pro	gly	ser	arg	asn	leu	cys	asn	ilu	pro
Human	tyr	gly	ilu	phe	gln	ilu	asn	ser	arg	tyr	trp	cys	asn	asp	gly	lys	thr	pro	gly	ala	val	asn	ala	cys	his	leu	ser
α-Lact.	tyr	gly	leu	phe	gln	ilu	asn	asn	lys	ilu	trp	cys	lys	asn	asn	gln	asn	pro	his	ser	ser	asn	ilu	cys	asn	ilu	ser
												80												84			
	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106
Chicken	cys	ser	ala	leu	leu	ser	ser	asp	ilu	thr	ala	ser	val	asn	cys	ala	lys	lys	ilu	val	ser	asp	gly	asp	gly	met	asn
Human	cys	ser	ala	leu	leu	gln	asn	asn	ilu	ala	ala	asn	val	ala	cys	ala	lys	arg	val	arg	asn	pro	gln	gly	ilu	arg
α-Lact.	cys	asp	lys	phe	leu	asn	asn	asn	leu	thr	asn	asn	ilu	met	cys	val	lys	lys	ilu	leu	asp	lys	val	gly	ilu	asn
	64														76												
	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129				
Chicken	ala	trp	val	ala	trp	arg	asn	arg	cys	lys	gly	thr	asp	val	gln	ala	trp	ilu	arg	gly	cys	arg	leu			
Human	ala	trp	val	ala	trp	arg	asn	arg	asn	val	arg	gln	tyr	val	gln	gly	cys	gly	val			
α-Lact.	tyr	trp	leu	ala	his	lys	ala	leu	cys	ser	glu	lys	leu	asp	gln	trp	trp	leu	cys	glu	lys	leu			
									81																		

Fig 2 As seqüências de amino ácidos da Lisozima da clara de ovo e humana, quando comparados com a Lactalbumina bovina sugerem um processo de evolução segundo primas.

CAPÍTULO III
PARTE EXPERIMENTAL

- a) Preparo e hidratação das amostras e os sistemas de medida

A lisozima três vezes recristalizada, dializada e liofilizada que utilizamos foi produzida pela sigma Co.

As amostras foram preparadas inicialmente compactando-se o pó manualmente. Posteriormente foram feitas pastilhas de aproximadamente 0,1cm de espessura por 1,3cm de diâmetro comprimindo-se o pó em prensa hidráulica. Com este novo procedimento obtivemos uma maior polarização volumétrica e uma melhor reprodutibilidade nas medidas. As melhores pastilhas foram obtidas utilizando-se uma densidade de $0,9\text{g/cm}^3$. Para se obter melhor resultados foi necessário desidratar o pó antes e durante a prensagem.

O estado "seco" das pastilhas foi obtido extrapolando-se para o tempo zero as curvas de variação de massa produzida pela adsorção de água com o tempo de hidratação. As amostras antes de serem postas na balança foram deixadas para desidratar em vácuo e a temperatura de 70°C por várias horas.

O estado "úmido" foi obtido deixando-se a pastilha hidratar no prato da balança. Uma correção posterior dessa medida foi feita devido a necessidade de se deixar a pastilha a temperatura de 20°C no sistema de medida, em vácuo, durante vários minutos (até o resfriamento) isso tudo para a aplicação do campo de polarização. Essa correção foi realizada pesando-se a amostra após o tempo necessário para a aplicação do campo de polarização.

Com o objetivo de estudar os possíveis efeitos dos eletrodos nos espectros de C.T.E. foram realizadas medidas com eletrodos de Latão, Ouro, Índio e Prata. Para evitar problemas de condução pela superfície das amostras, foi utilizado durante a des polarização um "anel de guarda" mantido a potencial sempre igual ao potencial do eletrodo superior de medida.

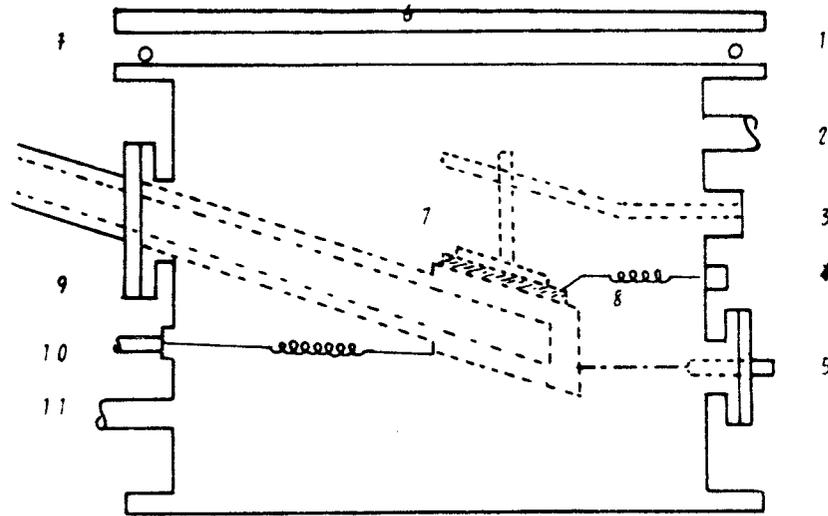
Dos estudos sobre a condutividade elétrica das amostras como função do grau de hidratação e temperatura, foi possível se determinar o valor da resistência do eletrômetro de modo a garantir que praticamente toda a carga de polarização fosse dissipada através da resistência de medida e não através da própria amostra. Desses estudos concluímos que a resistividade elétrica da lisozima com grau de hidratação inferior a $40\text{mgH}_2\text{O/g}$ de proteína, se situa no intervalo entre 5×10^{15} e $5 \times 10^{16} \Omega \text{cm}$.

O SISTEMA DE MEDIDA

Quanto ao sistema de medida, este é bastante simples, a amostra é encerrada em um recipiente onde se faz vácuo por meio de uma bomba mecânica primária (10^{-3} mm de Hg). A pressão de H_2O desse recipiente foi monitorada por um manômetro modelo 610-C da Varian, previamente calibrado.

O campo de polarização foi aplicado através de eletrodos paralelos em contacto superficial com a amostra. Utilizamos uma fonte de tensão H.P. modelo 65160A-Power DC. para esse fim.

Varia-se a temperatura das amostras com nitrogênio líquido (-196°C), sendo o aquecimento posterior feito por resistência elétrica com voltagem aplicada variável de modo a se obter uma boa linearidade do aumento da temperatura com o tempo.



- 1 ORINGS
- 2 CONEXÃO COM MANÔMETRO
- 3 ENTRADA P/ ELETRÔMETRO E FONTE DE TENSÃO
- 4 TERMO-PAR DA AMOSTRA (ENTRADA)
- 5 TERRA DO SISTEMA
- 6 TAMPA
- 7 ELETRODO SUPERIOR
- 8 TERMO-PAR DA AMOSTRA
- 9 TUBO P/ VARIAÇÃO DA TEMPERATURA
- 10 TERMO-PAR DO SUPORTE (ENTRADA)
- 11 CONEXÃO COM A BOMBA DE VÁCUO

Fig 4 Diagrama do sistema de medida e das ligações elétricas.

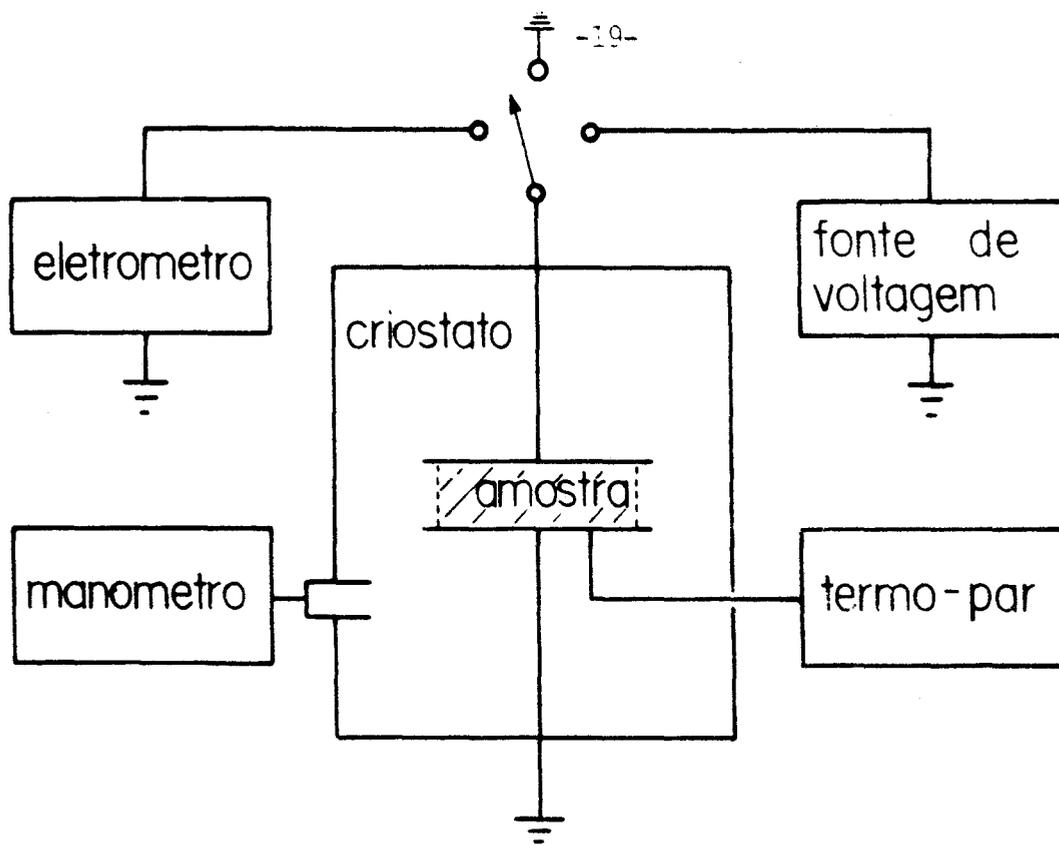


Fig 5 Diagrama em blocos das ligações elétricas.

As medidas de corrente foram feitas por intermédio de um eletrômetro KEITHLEY-610C sendo a corrente lida assinalada contra o tempo em um registrador X-Y Hewlett Packard Mod 7004B.

Todas as temperaturas foram medidas por meio de termopares de cobre-Constantan e registradas de 2,5 em 2,5^oK nos próprios espectros de C.T.E. e P.T.E.

b) A técnica de corrente termo-estimulada
(C.T.E.)

Este método aproveita o fato de que o tempo τ , característico da relaxação dipolar, depende fortemente da temperatura. A baixa temperatura (-60°C para dipolos da água ligada), τ é muito elevado de modo que um tempo extremamente longo (da ordem de vários dias) seria necessário para se levar o dielétrico do estado polarizado ao despolarizado e vice-versa. Por outro lado em uma temperatura mais elevada (30°C), esse mesmo tempo reduz-se de várias ordens de grandeza. Em vista disso, se aplicarmos um campo elétrico, em alta temperatura, por um tempo suficientemente longo, de modo a se obter uma componente de polarização na direção do campo, e em seguida baixarmos a temperatura, reduziremos de tal modo o tempo de rotação dos dipolos que ao retirarmos o campo, somente uma fração desprezível da polarização armazenada será perdida.

O dielétrico ao passar por esse processo torna-se um termoeletreto.

Procedendo-se então a um reaquecimento acelera-se a despolarização. A corrente, no circuito externo de medida, aumenta com o tempo, passa por um valor máximo, e em seguida rapidamente se anula. A corrente observada nessa fase chama-se corrente termo-estimulada.

Resumindo-se o método consiste em:

a) aplicação de um campo elétrico contínuo E_p a um material isolante que contenha um ou mais tipos de dipolos elétricos, a uma temperatura T_p e durante um tempo t_p ;

b) rápido abaixamento da temperatura após o tempo t_p , com o campo elétrico ainda aplicado;

c) atingida a temperatura final T_F o campo E_p é retirado, a amostra é aquecida e a corrente de despolarização é medida.

As escolhas de T_p , T_F e t_p dependem das características do dipolo e do sítio onde o mesmo se encontra. Sua orientação depende não só da intensidade do campo E_p como também do tempo durante o qual esse campo atua.

TEORIA DE CORRENTE TERMO-ESTIMULADA

Se uma amostra estiver no instante t com uma polarização P , decorrido um intervalo infinitesimal de tempo dt , essa polarização sofrerá uma perda dP , tal que:

$$dP = -P\omega dt \quad (1)$$

onde $\omega \triangleq \tau^{-1}$ é a frequência com que os dipolos perdem sua orientação.

Supondo válida a lei de ativação de Arrhenius temos:

$$\omega = \omega_0 \exp\{-\Delta F/kT\} \quad (2)$$

com

$$\Delta F = \Delta H - T\Delta S \quad (3)$$

onde

ΔF = energia livre do processo de ativação

ΔH = entalpia de ativação

ΔS = entropia de ativação

T = temperatura absoluta

k = constante de Boltzmann

$\omega_0^{-1} = \tau_0$ = tempo característico do processo

Aumentando-se a temperatura linearmente com o tempo temos:

$$T(t) = T_0 + bt \quad (4)$$

logo

$$dt = \frac{1}{b} dT \quad (5)$$

Substituindo (5) e (2) em (1) ficamos com:

$$\frac{dP}{P} = - \frac{\omega_0}{b} e^{-\Delta F/kT} dT \quad (6)$$

Integrando membro a membro

$$\int_{P_0}^P \frac{dP'}{P'} = - \frac{\omega_0}{b} \int_{T_0}^T e^{-\Delta F/kT'} dt' \quad (7)$$

ou

$$P(T) = P_0 \exp\left\{-\frac{\omega_0}{b} \int_{T_0}^T e^{-\Delta F/kT'} dT'\right\} \quad (8)$$

onde P_0 é a polarização inicial da amostra e T_0 sua temperatura inicial.

Para obtermos a densidade de corrente J precisamos tomar a derivada de P no tempo

$$J = - \frac{\partial P}{\partial t} = - \frac{\partial P}{\partial T} \frac{\partial T}{\partial t} = -b \frac{\partial P}{\partial T} \quad (9)$$

$$J(T) = P_0 \omega_0 e^{-\Delta F/kT} \exp\left\{-\frac{\omega_0}{b} \int_{T_0}^T e^{-\Delta F/kT'} dT'\right\} \quad (10)$$

ou

$$J(T) = P(T) \omega(T) \quad (11)$$

As expressões (10) e (11) nos dão a densidade de corrente como função da temperatura. A grandeza medida nas experiências é a corrente elétrica $I(T)$ que está relacionada com $J(T)$ através da relação $I(T) = J(T) \times S$ onde S é a área dos eletrodos. Substituindo essa relação em (10) e (11) vem finalmente

$$I(T) = Q_0 \omega_0 e^{-\Delta F/kT} \exp\left\{-\frac{\omega_0}{b} \int_{T_0}^T e^{-\Delta F/kT'} dT'\right\} \quad (12)$$

ou

$$I(T) = \omega(T) Q(T) \quad (13)$$

onde

$$Q_0 \triangleq P_0 S \quad (14)$$

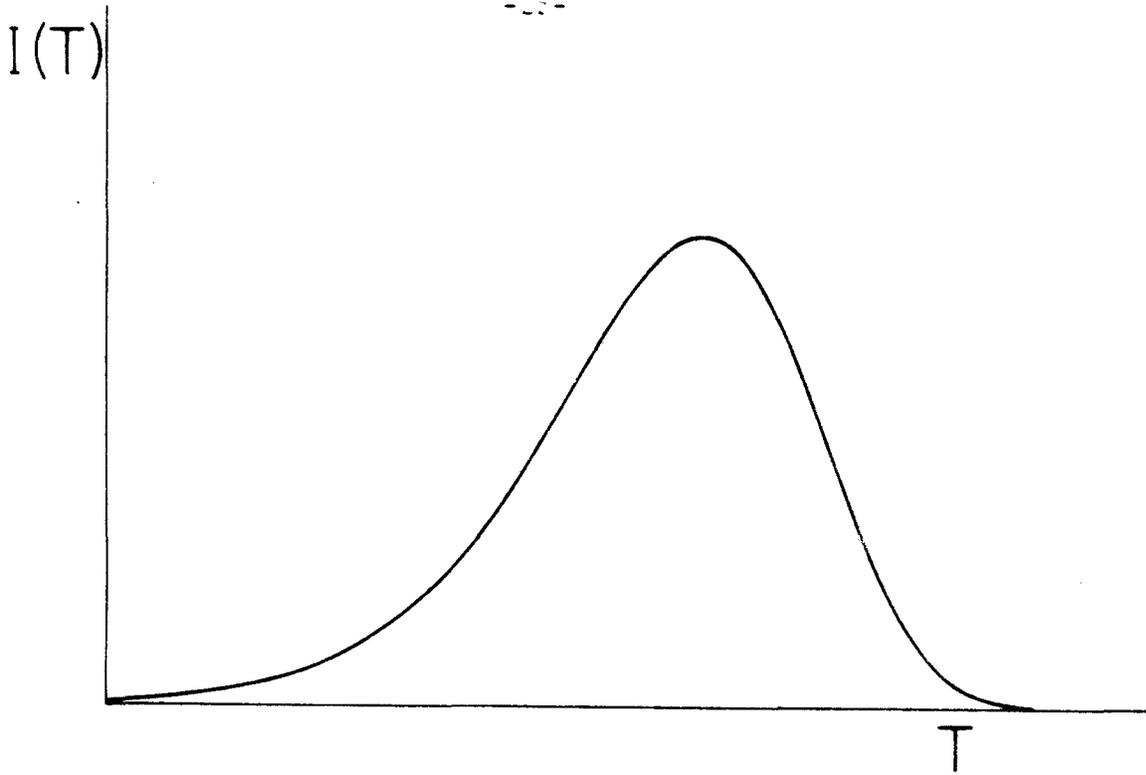


Fig 6 Função Corrente Termo-Estimulada (C.T.E).

Para a determinação dos parâmetros característicos do processo existem três diferentes métodos:

1) Pela corrente inicial: Para temperaturas próximas da temperatura inicial, o valor da integral da $\exp\{-\Delta F/kT\}$ pode ser desprezado frente ao termo $\Delta F/kT$ e disso resulta

$$I(t) \approx Q_0 \omega_0 e^{-\Delta F/kT} \quad (15)$$

Ou seja lançando-se $\ln I(T)$ contra $1/T$ determinamos ΔH e o fator pré exponencial $Q_0 \omega_0 e^{\Delta S/k}$. //

Essa expressão é válida somente até 15% da subida inicial.

2) Pela posição do máximo: No ponto onde a corrente é máxima temos $dI/dT=0$

$$\frac{dI}{dT} = \left(\frac{\Delta F}{kT^2} - \frac{\omega_0}{b} e^{-\Delta F/kT} \right) \times \exp\left\{ -\frac{\Delta F}{kT} - \frac{\omega_0}{b} \int_{T_0}^T e^{-\Delta F/kT'} dT' \right\} \quad (16)$$

Mas

$$\frac{dI}{dT} = 0 \text{ em } T=T_M \text{ ou seja}$$

$$\Delta F e^{\Delta F/kT_M} = \frac{\omega_0}{b} kT_M^2 \quad (17)$$

3) utilizando toda a curva de C.T.E.: Como na des-
polarização $I(T) = -dQ/dt$ (18)
vem

$$Q(t) - Q_\infty = - \int_\infty^t I(t') dt' \quad (19)$$

No final do processo toda a carga foi perdida, logo $Q_\infty = 0$ e

$$Q(t) = \int_t^\infty I(t') dt' \quad (20)$$

Com a substituição da expressão (20) na (13) ficamos com

$$\tau(T) = \frac{\int_t^\infty I(t') dt'}{I(T)} \quad (21)$$

Portanto se lançarmos o logaritmo natural de $\int_t^\infty I(t') dt' / I(T)$ contra o inverso da temperatura, determinaremos a inclinação dessa reta a entalpia da ativação do processo.

Através da extrapolação para temperaturas infinitas, obtém-se o fator pre exponencial.

A polarização inicial P_0 ou a carga armazenada Q_0 são determinadas integrando-se totalmente a curva de C.T.E. no tempo.

$$Q_0 = \int_0^\infty I(t') dt' \quad (22)$$

Utilizando-se a estatística clássica de Langevin

(55) para cálculo do valor médio do coseno do ângulo entre o campo elétrico aplicado E e o momento dipolar P das moléculas de água no caso de $pE \ll kT^*$ tem-se que

$$P_o = N_p \langle \cos \theta \rangle = \frac{Np^2 E}{3kT_p} \quad (23)$$

onde:

N = número de dipolos por unidade de volume

p = momento de dipolo elétrico

E = campo elétrico local

k = constante de Boltzmann

T_p = temperatura absoluta da polarização

* A temperatura ambiente

$pE \approx 2 \times 10^{-5} \text{ eV}$

$kT \approx 2 \times 10^{-2} \text{ eV}$

A TÉCNICA DE PRESSÃO TERMO-ESTIMULADA
(P.T.E.)

Durante o tratamento térmico indispensável a técnica de corrente termo-estimulada, tem-se com o aumento da temperatura, o rompimento das pontes de hidrogênio que estruturam as moléculas da água na superfície da macromolécula proteica. A temperatura inicial desse processo depende da pressão de vapor de H_2O do gás que se encontra em contacto com a amostra. Para pressões da ordem de 10^{-3} mm hg, temos uma temperatura inicial por volta de $273^{\circ}K$.

A passagem de moléculas do estado ligado ao estado livre durante a despolarização altera de modo sensível os espectros de C.T.E., uma vez que é possível essas moléculas romperem os laços de hidrogênio ainda orientadas. Isso traz como resultado uma despolarização devido a "perda" de dipolos orientados e não mais a rotação deles.

Com o intuito de seguir esse processo de desorção e calcular os parâmetros associados a esse fenômeno, registramos curvas da variação da pressão de H_2O do sistema de medida, estando a bomba de vácuo desacoplada, contra o momento linear da temperatura. Inicialmente esses experimentos foram realizados simultaneamente com a despolarização.

Como para as baixas densidades de vapor de H_2O estudadas é válida a aproximação de gás ideal na equação de Van der Waals, temos nessa aproximação a pressão proporcional ao número de moléculas desorvidas.

Assumindo-se que todas as moléculas de H_2O se ligam em sítios idênticos, ou seja, que elas possuem uma mesma energia de ligação e uma mesma probabilidade de transição do estado ligado ao estado livre.

Podemos afirmar com base nessas hipóteses que: se a amostra no instante de tempo t e temperatura T , possuir $N_D(T)$

moléculas no estado ligado, decorrido um intervalo infinitesimal de tempo dt e correspondente acréscimo de temperatura dT , teremos uma variação de $N_D(T)$ dada por

$$dN_D(T) = -W_{D \rightarrow 0}(T)N_D(T)dt \quad T = T_i + \Delta T \quad (24)$$

ou efetuando a troca de variáveis de acordo com a expressão (5)

$$dN_D = -\frac{1}{b} W_{D \rightarrow 0}(T)N_D(T)dT \quad T = T_i + \Delta T \quad (25)$$

onde $W_{D \rightarrow 0}(T)$ é a probabilidade de transição. Supondo novamente válida a lei de ativação de Arrhenius temos:

$$W_{D \rightarrow 0}(T) = W_{D0} \exp\{-\Delta E_D/kT\} \quad (26)$$

com

$$\Delta E_D = \Delta H_D - T\Delta S_D \quad (27)$$

onde

ΔE_D = energia livre de ligação da água

ΔS_D = entropia de ativação da disorção

ΔH_D = entalpia de ativação de disorção

W_{D0} = probabilidade por unidade de tempo característica da transição

Como no início do processo todas as moléculas se encontram no estado ligado temos para

$$T = T_i \quad N_D(T_i) = N_i \quad (28)$$

Da existência de apenas dois estados vem a lei de conservação

$$N_D(T) + N_O(T) = N_i \quad (29)$$

onde $N_o(T)$ é o número de moléculas no estado livre no instante em que a amostra se encontra a temperatura T.

Resolvendo a equação (25) com a condição (28) vem como solução

$$N_D(T) = N_i \exp\left\{-\frac{W_{D0}}{b} \int_{T_i}^T e^{-\Delta E_d/kT'} dT'\right\} \quad (30)$$

Como a pressão $p(T)$ é proporcional ao número de moléculas de vapor de H_2O , ou seja, o número de moléculas no estado livre, teremos desprezando a reabsorção, que

$$p(T) = \frac{kT''}{V} N_o(T) \quad (31)$$

onde

V = volume do recipiente

T'' = temperatura das paredes

Substituindo a expressão (31) na expressão (29) e utilizando $N_D(T)$ da expressão (30) vem finalmente

$$p(T) = p_F \left[1 - \exp\left\{-\frac{W_{D0}}{b} \int_{T_i}^T e^{-\Delta E_D/kT'} dT'\right\}\right] \quad (32)$$

onde $p_F = N_i kT''/V$ é a pressão do sistema após a passagem de todas as moléculas para o estado livre.

A função $p(T)$ expressa na equação (32) será daqui em diante referida por Função Pressão Termo-Estimulada. Suas características são mostradas na figura 7.

DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DO PROCESSO DE DESORÇÃO

Derivando a pressão com relação a temperatura, temos da expressão (32)

$$\frac{dp(T)}{dT} = \frac{W_{D0}}{b} e^{-\Delta E_D/kT} [p_F - p(T)] \quad (33)$$

$$W_{D0} e^{-\Delta E_D/kT} = \frac{b}{p_F - p(T)} \frac{dp(T)}{dT} \quad (34)$$

ou

$$\ln(W_{D0} e^{\Delta S_D/k}) - \frac{\Delta H_D}{kT} = \ln\left[\frac{b}{p_F - p(T)} \times \frac{dp(T)}{dT}\right] \quad (35)$$

Portanto se lançarmos o logarítmo natural de $[b/p_F - p(T)] \times dp(T)/dT$ contra o inverso da temperatura determinaremos pela inclinação da reta a entalpia de ativação do processo.

O fator pré exponencial fica determinado por extrapolação para temperaturas infinitas.

Para o cálculo quantitativo dos parâmetros associados a ligação da água junto a matriz proteica, foi necessário construir um novo sistema de medida.

Nos primeiros espectros de pressão termo-estimulada (P.T.E.) realizados simultaneamente aos experimentos de C.T.E., notamos que o valor da pressão final de saturação do sistema era inferior ao valor previsto pela equação do gás, na qual a massa da água envolvida no processo foi determinada pesando-se a amostra no início e final de cada medida. Essa incoerência apareceu devido a adsorção das moléculas de água nas paredes do recipiente de medida. Uma fração das moléculas que deixavam a pastilha estavam sendo re-adsorvidas nas paredes de aço inoxidável do sistema e desse modo não contribuíam para o aumento da pressão interna.

Para solucionar esse problema da adsorção nas paredes, utilizamos um novo sistema de vidro com suas paredes mantidas

a uma temperatura de aproximadamente 200°C durante o decorrer de todas as medidas.

Como os espectros de P.T.E. não apresentaram alterações sensíveis quanto ao estado de polarização ou despolarização das amostras não houve necessidade de continuar a realizar as medidas de P.T.E. e C.T.E. simultaneamente. Não poderíamos esperar alterações dos espectros de P.T.E. com o estado de polarização das amostras pois a fração média de moléculas de água orientadas pelo campo de polarização (calculada com base na estatística clássica de Langevin) não passou de 10^{-7} .

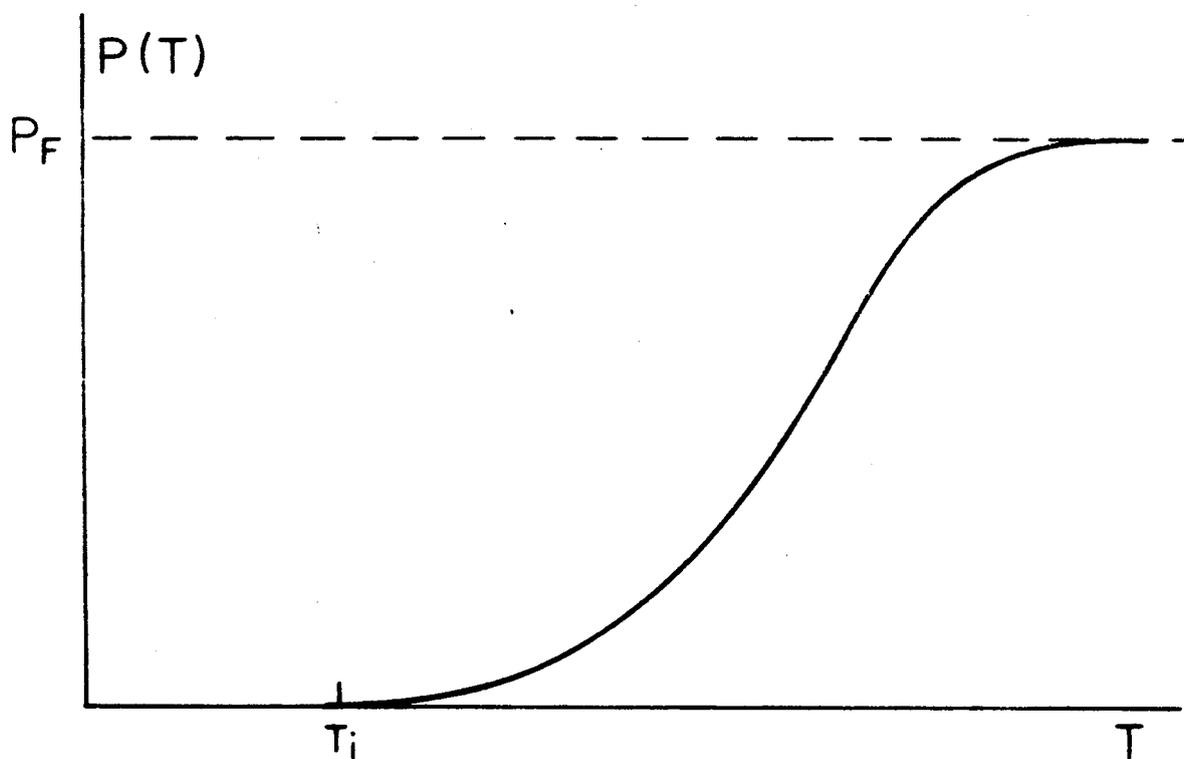


Fig 7 Função Pressão Termo-Estimulada (P.T.E).

A TÉCNICA DE ANÁLISE TERMO-GRAVIMÉTRICA
(A.T.G.)

Essa técnica foi de grande auxílio nesse trabalho. Através dela foi possível comparar os resultados obtidos pelos estudos sobre o aumento de pressão no sistema de medida, causado pela passagem das moléculas de água ligada ao estado gasoso.

Esse método consiste da medida contínua do peso das amostras simultaneamente ao aumento da temperatura. Isso é conseguido com a utilização de uma micro balança situada no interior de um forno cuja temperatura pode ser programável em função do tempo.

Quando ocorre uma variação de peso na amostra devida, por exemplo ao aumento da temperatura (também chamada variação termogravimétrica), o braço da balança que suporta a amostra perde sua posição de equilíbrio horizontal tornando-se inclinado. Essa inclinação é medida por um foto-elemento CdS e amplificada eletricamente. Através de um sistema de controle (circuito TG) é então gerada uma corrente elétrica necessária a criação do campo magnético. A ação desse campo em um magneto fornece a força necessária para compensar a variação termogravimétrica. Com isso o braço da balança retorna a posição original.

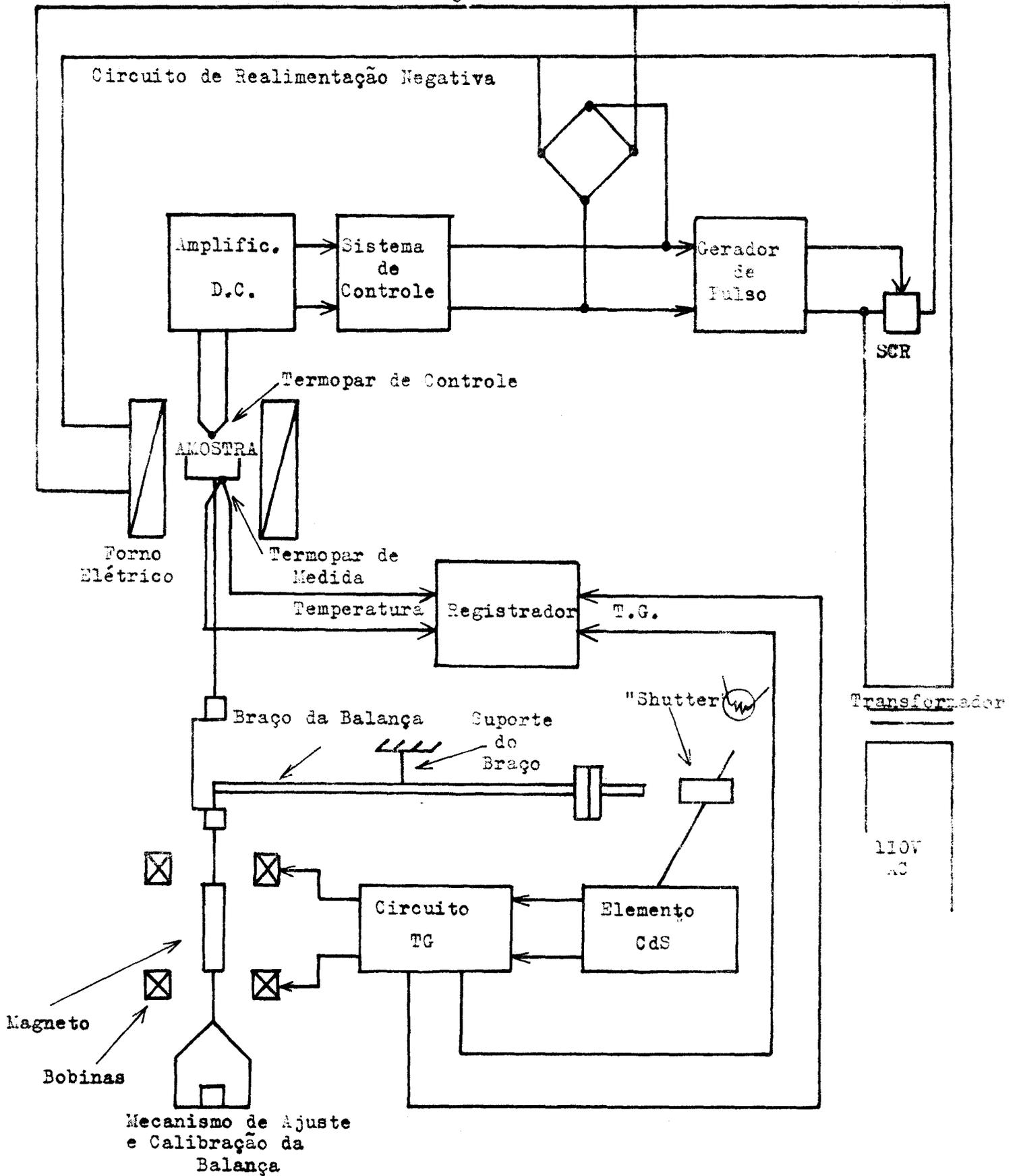
A intensidade da força magnética restauradora é então assinalada em uma das penas do registrador.

A temperatura do forno é controlada eletronicamente por um sistema PID-SCR.

O instrumento utilizado, de marca Rigaku, para essa técnica, permite realizar simultânea uma análise Termo Diferencial (TDA).

Com ele uma pequena variação de apenas 10 μ g em 500mg de amostra pode ser detectada.

Para a determinação dos parâmetros associados a desorção da água estruturada foi utilizado o mesmo modelo discu-



Aparatus da Análise Termogravimétrica

tido em detalhes na secção anterior.

Utilizando um aquecimento linear com o tempo vem

$$N_D(T) = N_{av} [m(T) - m_F] \quad (36)$$

onde

N_{av} = número de Avogrado

$m(T)$ = massa da amostra a temperatura T

m_F = massa final da amostra

Da substituição da equação (36) na (24) vem, de acordo com (5)

$$W_{D \rightarrow 0}(T) = \frac{b}{m_F - m(T)} \frac{dm(T)}{dT} \quad (37)$$

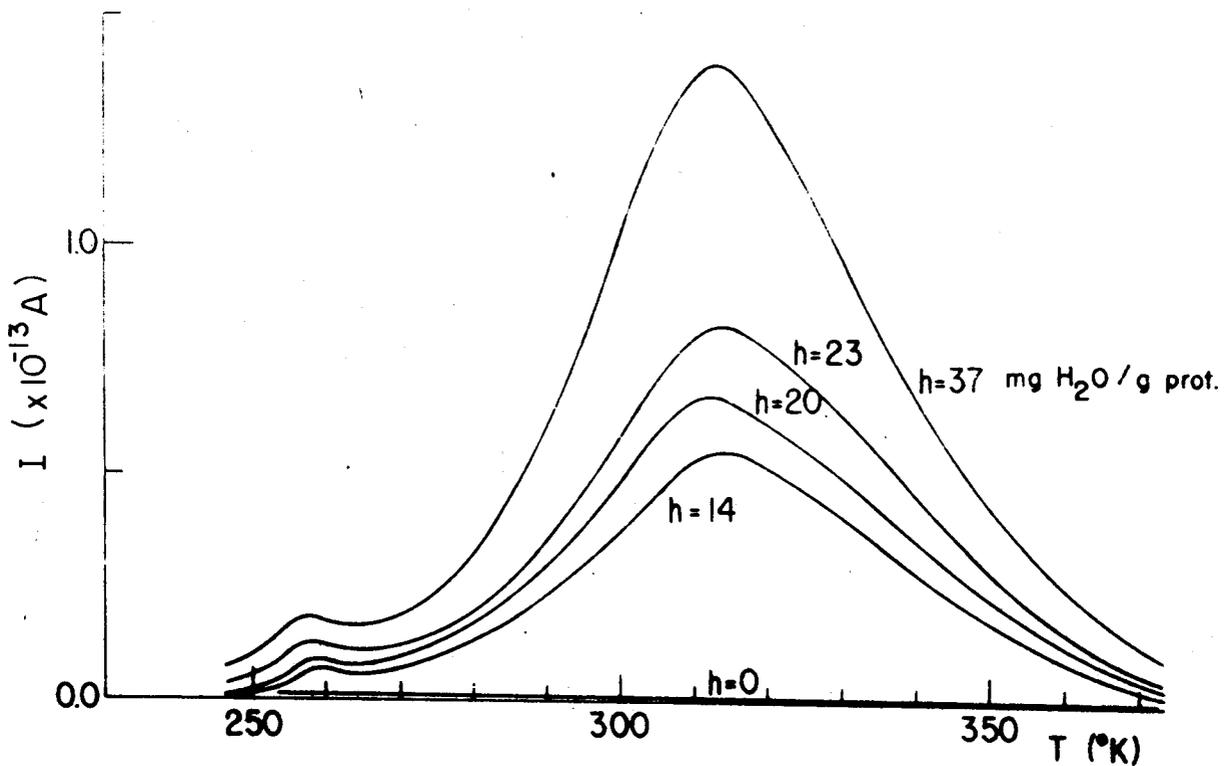
Da expressão (37) pode-se então determinar a frequência característica do processo bem como seus potenciais termodinâmicos.

CAPÍTULO I
RESULTADOS EXPERIMENTAIS

Os espectros de C.T.E. da lisozima como função de sua hidratação são mostrados na Fig.9. No eixo vertical temos a sinalada a corrente de despolarização contra a temperatura do suporte metálico em contato térmico com a pastilha.

Estes espectros são o resultado da aplicação de uma d.d.p. de 600Volts através de uma amostra com 1,3mm de espessura por 6 minutos.

A temperatura de polarização utilizada foi de 293°K e após se abaixar a temperatura da amostra até cerca de 83°K, utilizou-se uma taxa de aquecimento linear de 0,11°K/seg. As correntes de despolarização foram registradas pelo eletrômetro em escala correspondente a uma resistência de medida de $10^{11}\Omega$.



•Fig 9 Curvas experimentais de C.T.E para várias hidratações. Polarizou-se o dielétrico com um campo de 4.6 V/cm por 6 min. em temperatura de 300 °K.

O gráfico de C.T.E. da amostra desidratada leva-nos a concluir que todos os efeitos na ordem de grandeza observada, estão de algum modo relacionados com a presença de H_2O na matriz proteica.

Os picos caracterizados por uma temperatura de corrente máxima em torno de $312^{\circ}K$ apresentam um comportamento quase simétrico em relação a temperatura do máximo. A área sob a curva, em uma determinada hidratação, para temperaturas acima de $T_{m\acute{a}x}$ é superior a área sob a mesma curva calculada em temperaturas inferiores a $T_{m\acute{a}x}$.

Essa característica não pode ser interpretada por uma cinética monomolecular com uma única energia de ativação e constante de tempo, pois nesse caso teríamos o tempo de subida do pico superior a seu tempo de descida e com isso a área relativa a subida seria maior que a de descida.

O pequeno pico encontrado na região de baixa temperatura (aproximadamente $260^{\circ}K$) foi associado a presença de moléculas de H_2O não estruturadas na superfície dos eletrodos.

Com o abaixamento da temperatura, uma fração das moléculas de H_2O (do vapor) que não se conseguiu retirar com a bomba de vácuo são aprisionadas na superfície que se encontra a baixa temperatura ($-190^{\circ}C$). Esse fenômeno é encontrado na literatura como o efeito do "Dedo frio" e termodinamicamente é explicado pela minimização da energia livre do gás.

Como o campo de polarização permanece aplicado durante todo o abaixamento da temperatura, as moléculas de H_2O aprisionadas na superfície dos eletrodos ficam orientadas gerando assim um pico na despolarização. Como se trata de água não estruturada e estando a pressão de H_2O do recipiente de medida inferior a 10^{-2} Torr, esse pico permanece em região de temperatura abaixo de $273^{\circ}K$.

O espectro da pressão no sistema de medida mostrado na figura 10 vem confirmar essas hipóteses. Nele se encontra assinalada a pressão do sistema de medida contra a temperatura do suporte metálico da amostra.

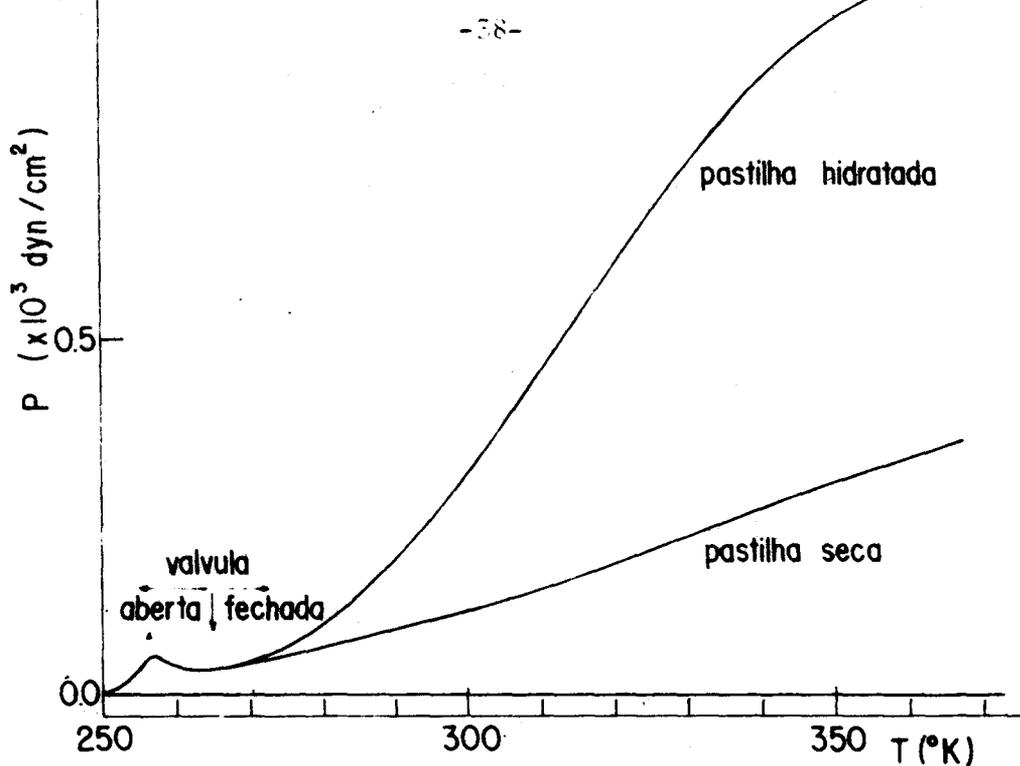


Fig 10 Aumento da pressão do sistema de medida com a temperatura da amostra.

Em temperaturas inferiores a 265°K foi necessário deixar aberta a válvula de acoplamento entre o sistema e a bomba para que fosse possível se retirar a água aprisionada nas paredes externas do tubo utilizado para o resfriamento das amostras. Notamos neste espectro que esse pico não é função da hidratação da pastilha como era de se esperar. Fazendo-se a diferença das curvas para a pastilha hidratada e seca temos os espectros de P.T.E. da lisozima hidratada mostrados na figura 11.

Como podemos notar, o aumento da pressão de H_2O do criostato acontece na mesma região de temperatura onde encontramos os picos de C.T.E. indicando que a relaxação elétrica está intimamente associada com a desorção da fração das moléculas orientadas pelo campo de polarização.

Na figura 12 encontram-se graficados os dois processos. $N_D(T)$ indica o número de moléculas da amostra sendo N_i o valor de N_D no início do processo de desorção.

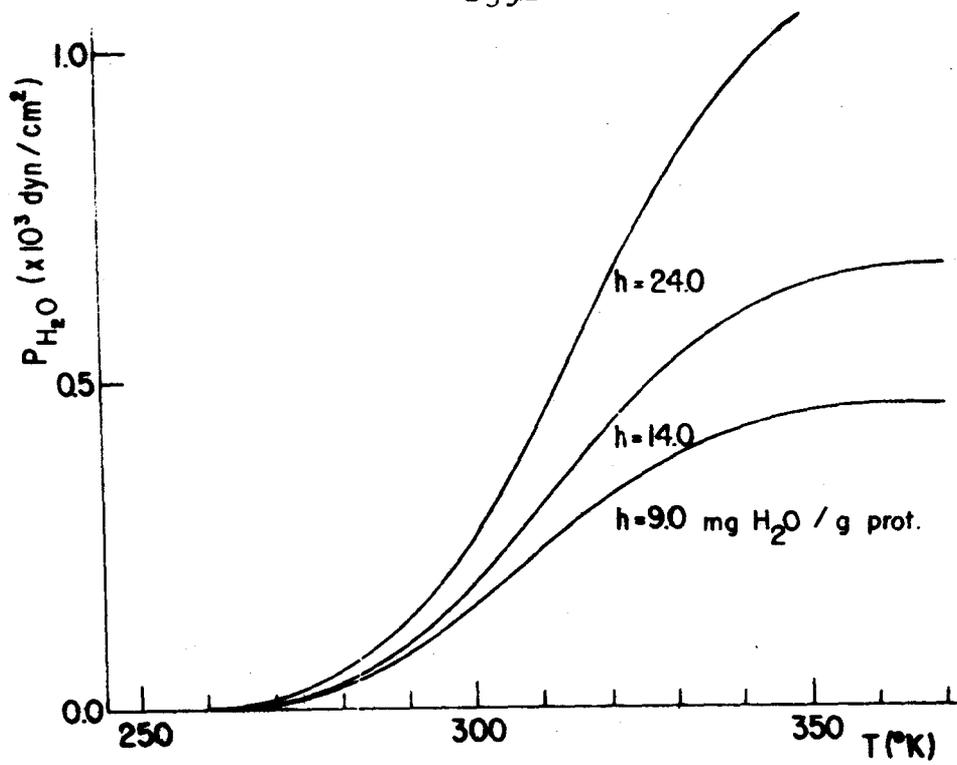


Fig 11 Curvas experimentais de P.T.E para várias hidratações. Utilizou-se uma taxa de aquecimento linear de $0.10 \text{ }^{\circ}\text{K}/\text{seg.}$

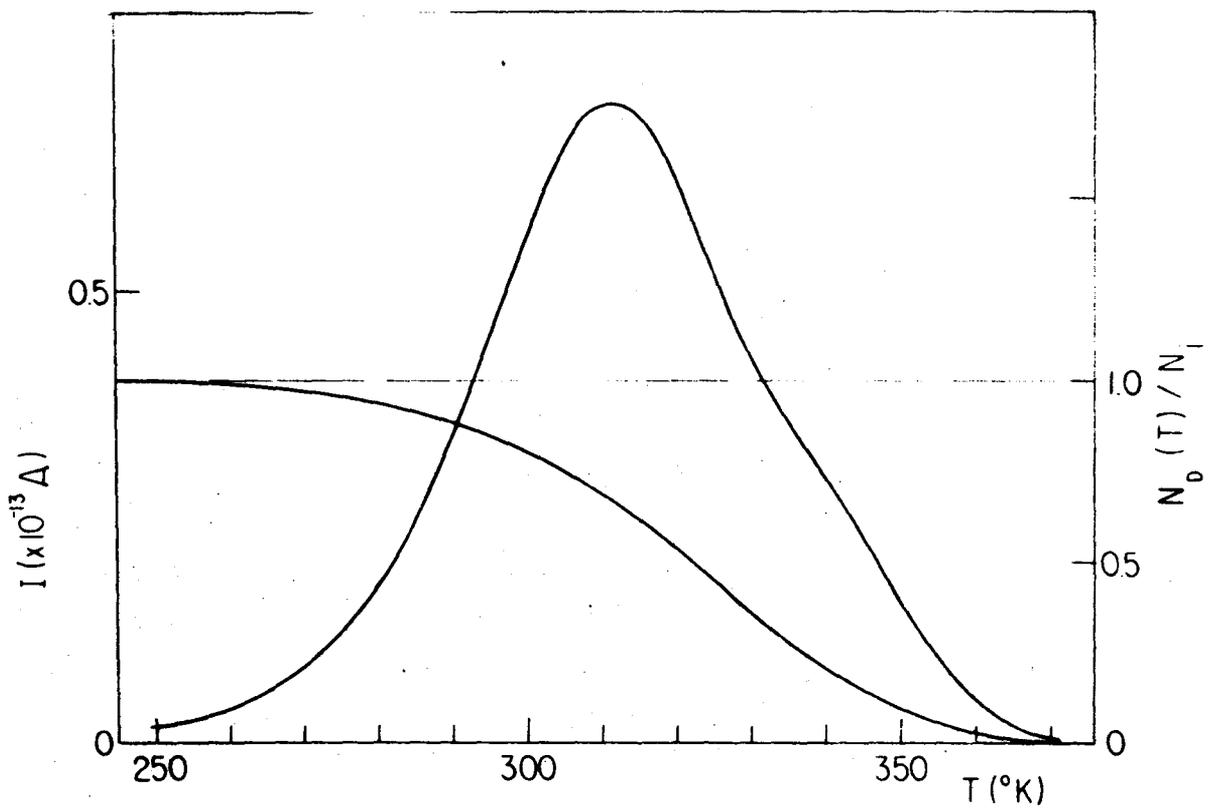


Fig 12 Superposição do processo elétrico com o processo de desorção

Integrando-se as curvas de C.T.E. no tempo, calcula-se a carga total armazenada. Na figura 13 mostramos essa carga total em várias hidratações. O comportamento linear encontrado indica que em primeira aproximação podemos desprezar as interações dipolo-dipolo entre moléculas de H_2O no intervalo de hidratações analisado.

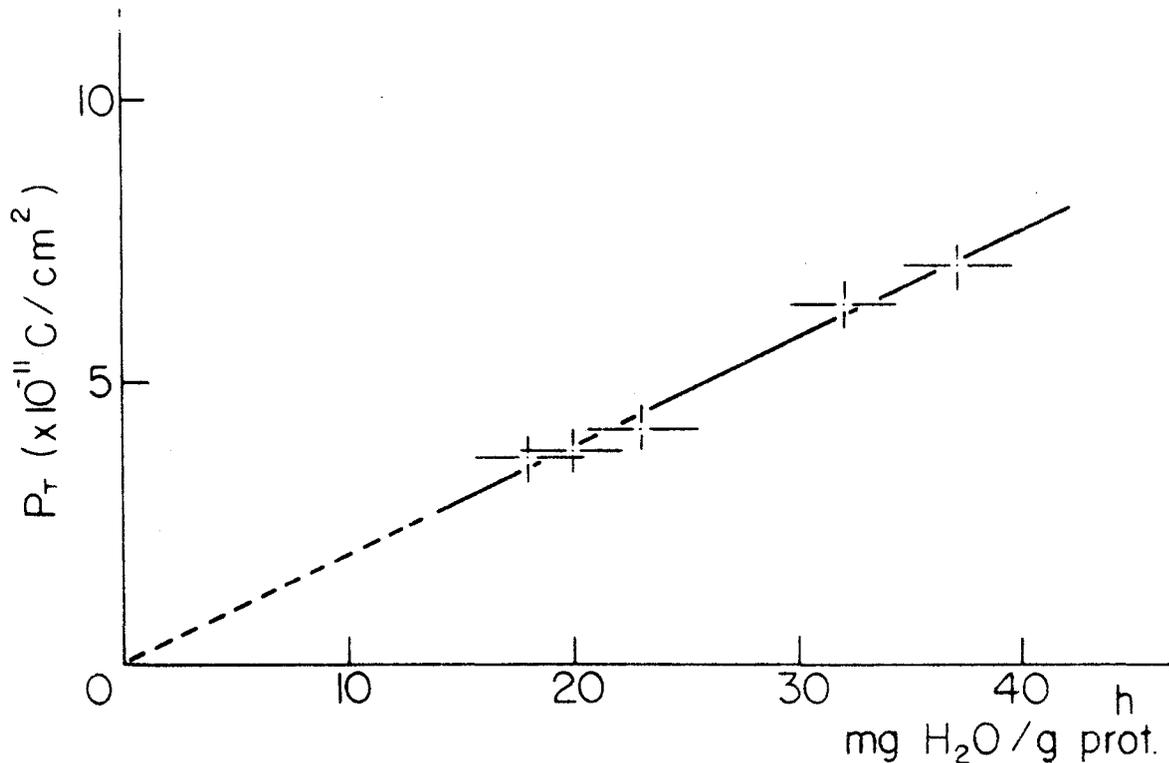


Fig 13 Carga total armazenada como função da hidratação. Obtida da integral das curvas da fig 9.

Mantida uma hidratação constante de 10mg de H_2O/g de prot., curvas com diferentes campos de polarização, figura 14, também trouxeram como resultado uma dependência linear da carga total armazenada com o campo aplicado. Esses resultados encontram-se na figura 15.

A proporcionalidade da polarização total P_T com o campo aplicado E e a hidratação h indicam que o processo segue a estatística clássica assumida

$$P_T \propto hE \quad \text{para } pE \ll kT$$

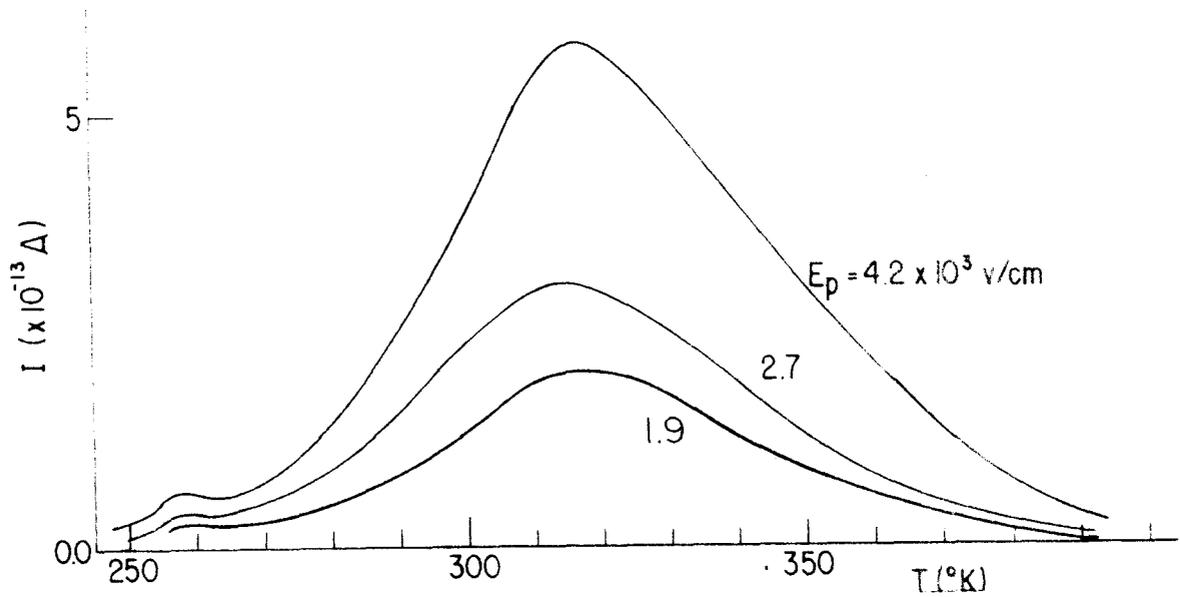


Fig 14 Curvas experimentais de C.T.E para diferentes campos de polarização e mesma hidratação.

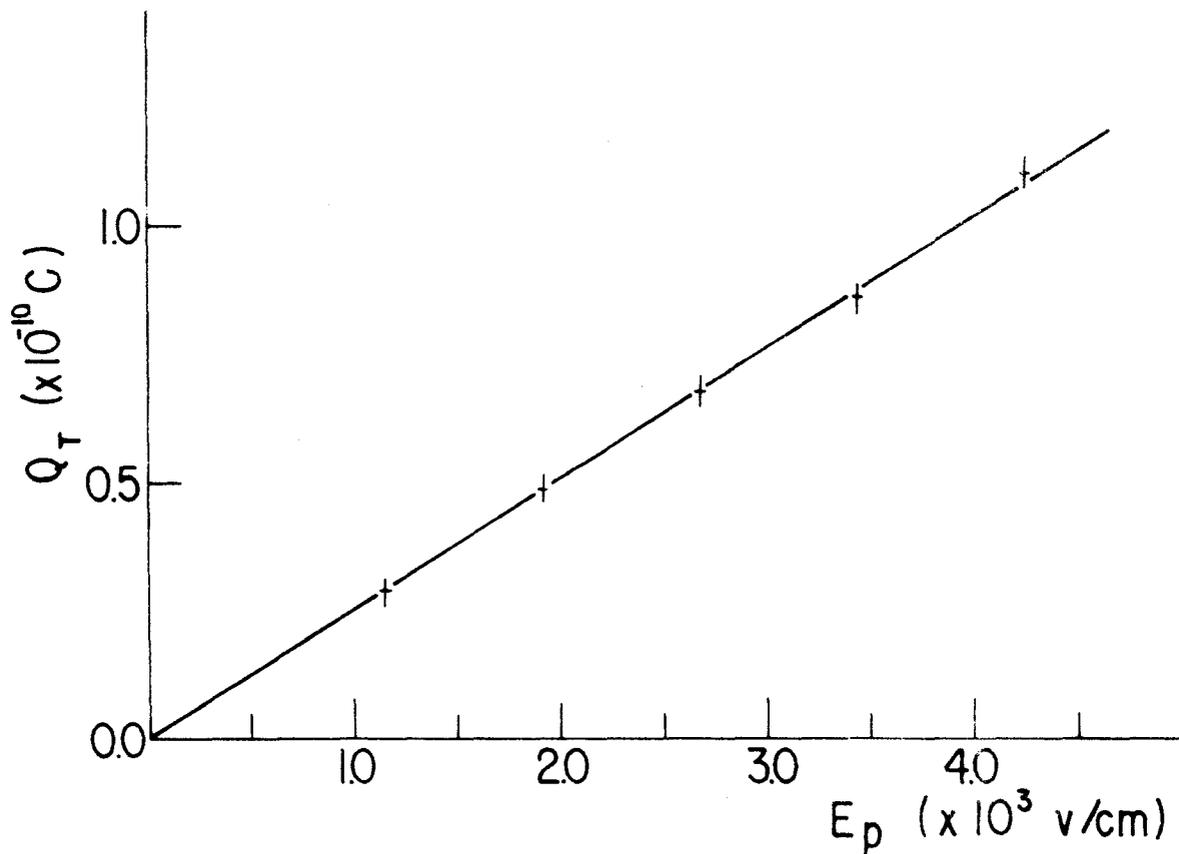


Fig 15 Carga total armazenada como função do campo de polarização. Dados obtidos das curvas da fig 14.

Ainda com o intuito de se obter maiores informações sobre o armazenamento de energia elétrica na matriz hidratada, foram realizados experimentos de carga e descarga isotérmica em temperaturas em torno de 300°K . Na figura 16 mostramos o espectro de descarga obtido a temperatura de 298°K para um tempo de carga de aproximadamente 20 minutos.

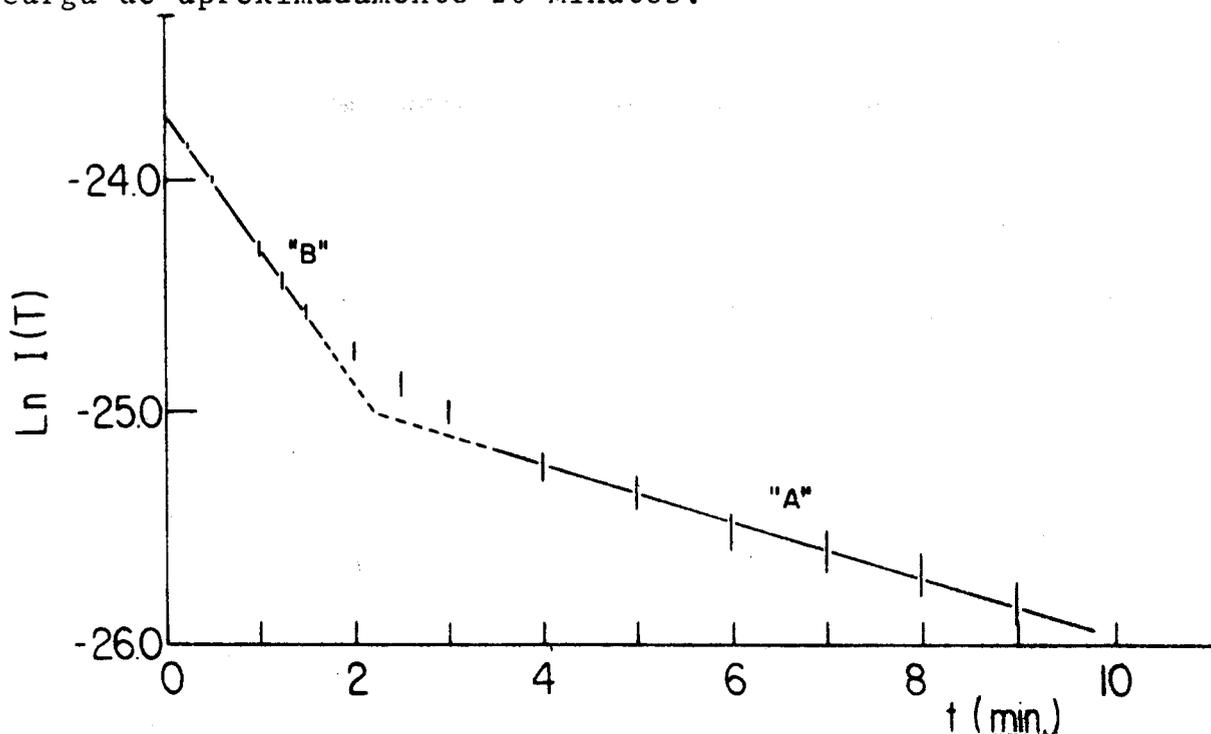


Fig 16 Espectro de descarga isotérmica. O campo de polarização foi aplicado a temperatura de 300°K .

De um modo geral os espectros apresentam duas regiões caracterizadas por diferentes tempos de relaxação. Nestes experimentos temos novamente implícito o fenômeno de desorção, ou seja durante o processo de carga e descarga a pressão de H_2O do sistema de medida foi reduzida (pela utilização da bomba de vácuo) para evitar problemas com a corrente de condução pela superfície. Portanto durante todo o processo de carga e descarga houve variação do número de moléculas de H_2O da amostra.

Com base nestes resultados conclue-se que na super-

fície da lisozima existem dois sítios de ligação primária com diferentes propriedades físicas e portanto uma parte da polarização total é armazenada nos sítios rotulados por "A" ficando o restante armazenado nos sítios "B".

A ordem de grandeza dos tempos de relaxação encontrados nas curvas de descarga isotérmica (10^2 seg) indica que as moléculas de água se encontram fortemente ligadas aos respectivos sítios de adsorção.

Ainda para confirmar os resultados obtidos com a nova técnica de P.T.E. foram realizadas medidas no sistema termogravimétrico (A.T.G.) com novas taxas de aquecimento, porém sempre lineares. Na figura 17 mostramos uma de uma série de curvas obtidas. A taxa de aquecimento utilizada foi de $0,034^\circ\text{K}/\text{seg}$.

Estes experimentos foram realizados em pressão atmosférica. Os parâmetros de ativação determinados pela utilização do modelo encontram-se na tabela 1.

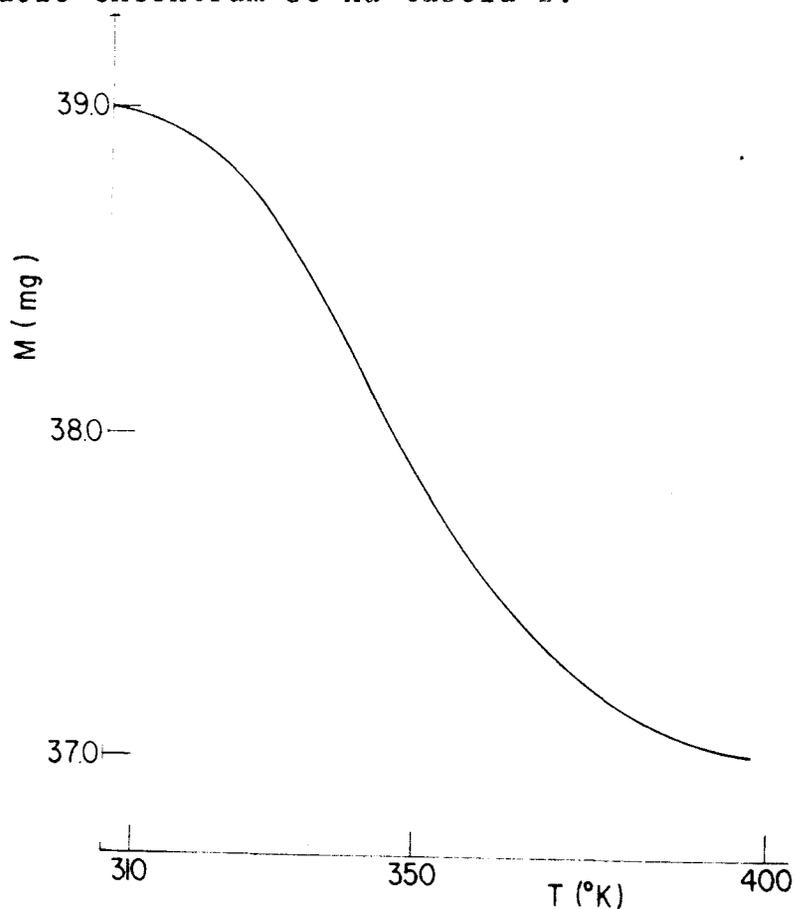


Fig 17 Curva experimental de Análise Termo-Gravimétrica.

CAPÍTULO V

CONCLUSÕES E MODELOS

O modelo de P.T.E. discutido em detalhes no Capítulo III, foi aplicado a todas as curvas de P.T.E. da figura 11.

Na figura 18 graficamos esta função cujos parâmetros foram determinados pelo método de mínimos quadrados. A curva experimental utilizada para o ajuste está indicada nesta figura por pontos.

A Tabela I contém os resultados gerais da aplicação do modelo tanto das curvas de P.T.E. quanto das curvas de A.T.G.

Dessa tabela obtivemos uma frequência característica média $\langle \omega_{D \rightarrow 0} \rangle = 2.1 \times 10^{+3} \text{seg}^{-1}$ e uma entalpia de desorção média $\langle \Delta H_D \rangle = 0.37 \text{eV}$. De acordo com dados teóricos e experimentais obtidos de estudos do gelo (58) encontramos para as ligações de hidrogênio na água uma energia de ligação de 0,25eV. Com base nestes dados concluímos que, em média, as moléculas de H_2O se ligam a matriz de lisozima por 1.5 pontes de hidrogênio.

Como podemos notar, o ajuste das curvas não é perfeito. Na figura 19 lançamos em gráfico a derivada de uma das curvas de P.T.E. com relação a temperatura contra o aumento linear da própria temperatura, isto para uma melhor compreensão do processo. Essa curva apresenta um comportamento assimétrico em desacordo com o modelo proposto.

Segundo o modelo de P.T.E. deveríamos encontrar um tempo de subida do pico maior do que seu tempo de descida.

Essa discordância vem da hipótese de que todos os sítios de ligação são idênticos. Como se nota nos espectros de carga-descarga isotérmica, existem sítios "A" e "B" com propriedades elétricas distintas portanto é de se esperar que estas diferenças provenham da estrutura dos sítios.

Comparando as técnicas de medidas utilizadas, podemos dizer que com o aumento linear da temperatura temos nos espectros de C.T.E. uma corrente produzida pela relaxação das moléculas

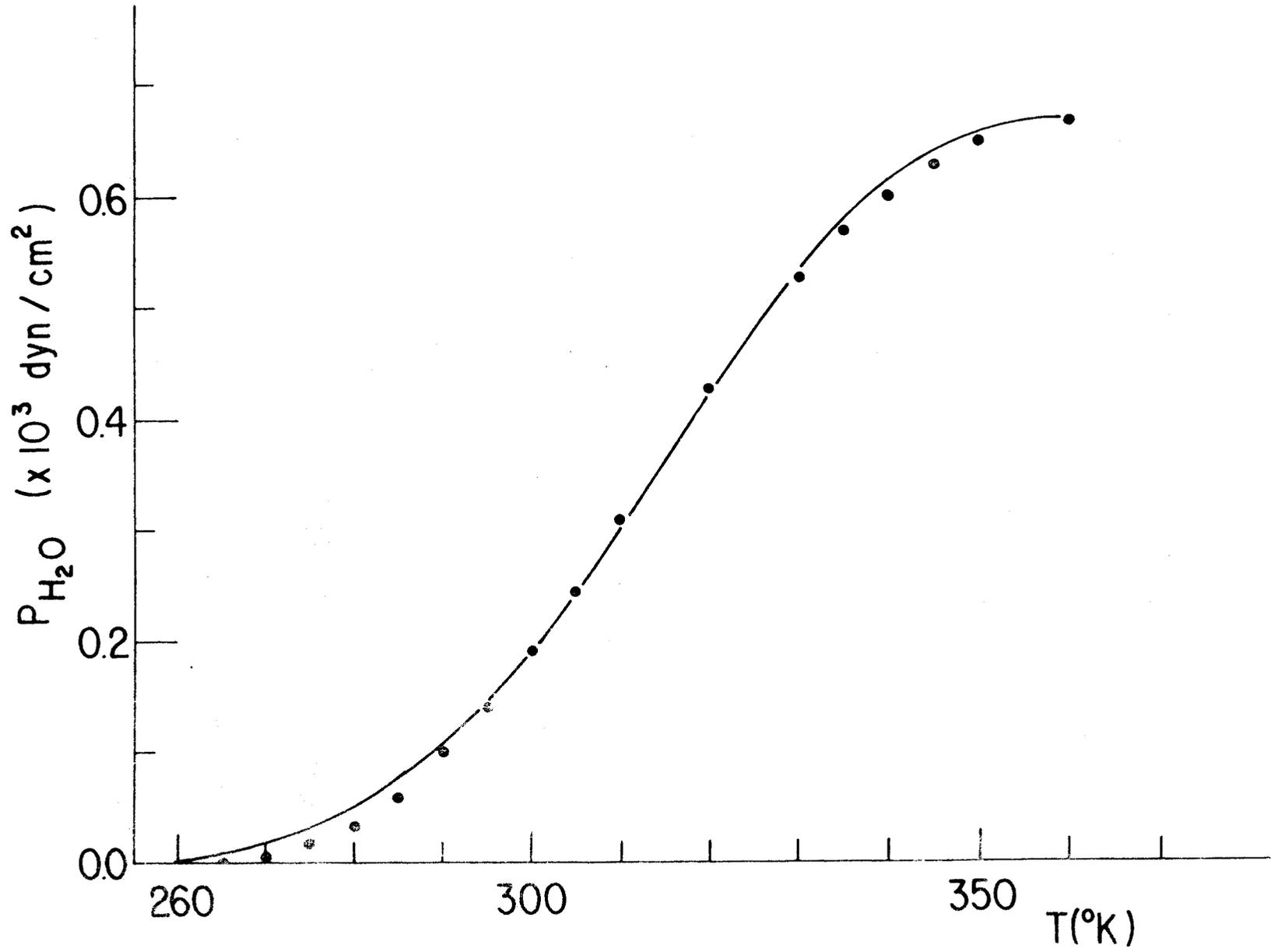


Fig 18 Aplicação do modelo de P.T.E a uma das curvas da fig 11.

TABELA 1 Os valores médios para a entalpia e frequência característica do processo de desorção são respectivamente $(0.37 \pm 0.02)\text{eV}$ e $(2.1 \pm 0.3) \times 10^3 \text{seg}^{-1}$

TECNICA	HIDRATAÇÃO mgH ₂ O/g Pt.	AQUECIMENTO °K/seg	ENERGIA eV	w _{0D} 10 ³ seg	COEF. de CORRELAÇÃO
P.T.E	9.0	0.101	0.37	3.3	0.98
P.T.E	14.0	0.103	0.35	1.7	0.98
P.T.E	22.0	0.100	0.36	1.4	0.98
P.T.E	24.0	0.100	0.38	3.5	0.98
A.T.G	60.0	0.035	0.38	3.3	0.96
A.T.G	80.0	0.034	0.34	1.4	0.96

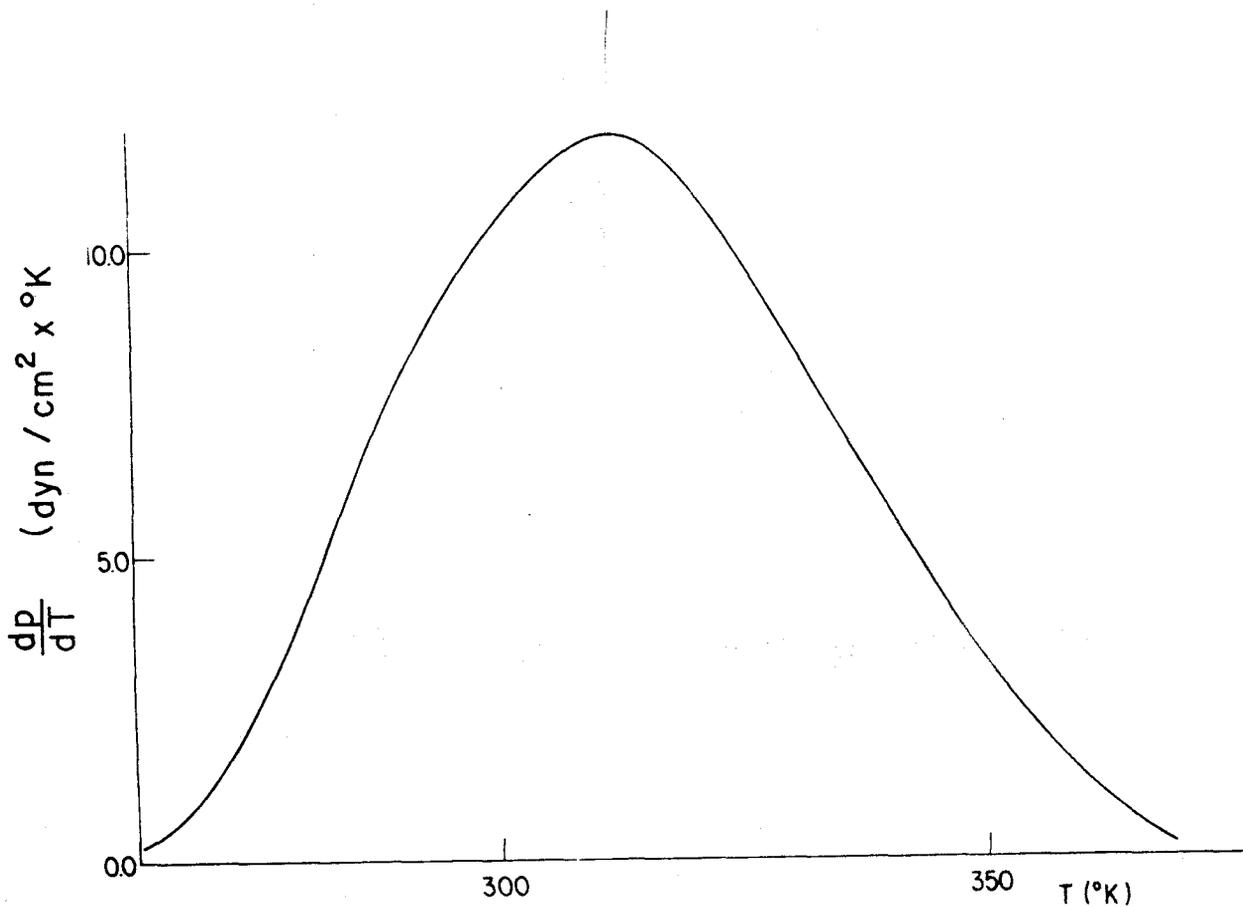


Fig 19 Derivada da curva de P.T.E em relação a temperatura. A assimetria observada não é explicada por uma cinética mono molecular de primeira ordem com uma única energia de ativação e constante de tempo.

de H_2O que foram em parte orientadas pelo campo de polarização e nos espectros de P.T.E. o efeito acumulativo do fluxo de desorção dessas moléculas para o volume do sistema de medida. O "Equivalente Elétrico" do processo de desorção será então a carga de um capacitor de volume equivalente ao volume do sistema de medidas produzida pela corrente de desorção.

Com o objetivo de comparar os processos de descarga elétrica e de "carga produzida pela desorção", lançamos em gráfico as $\int_{T_0}^T I(T')dT'$ contra T para várias hidratações em escalas normalizadas, superpostas aos espectros de P.T.E. ("carga de desorção").

Os espectros se sobrepõe como se pode notar na figura 20 indicando que: Em nossos experimentos, a desorção dos dipolos de H_2O orientados é o principal processo da despolarização elétrica.

De posse desses resultados, o próximo passo foi ajustar as curvas elétricas pela superposição de duas funções C.T. E associadas a perda de dipolos orientados de cada sítio de ligação.

Com isso temos que:

$$J_{C.T.E.} = J_A + J_B \text{ onde}$$

$$J_A = - \frac{dP_A}{dt} \quad \text{e} \quad J_B = - \frac{dP_B}{dt}$$

$$\frac{dP_A}{dt} = -P_A \omega_{A \rightarrow 0}(T)$$

$$\frac{dP_B}{dt} = -P_B \omega_{B \rightarrow 0}(T)$$

$$\omega_{A \rightarrow 0}(T) = \omega_{A0} \exp\{-\Delta H_A/kT\}$$

$$\omega_{B \rightarrow 0}(T) = \omega_{B0} \exp\{-\Delta H_B/kT\}$$

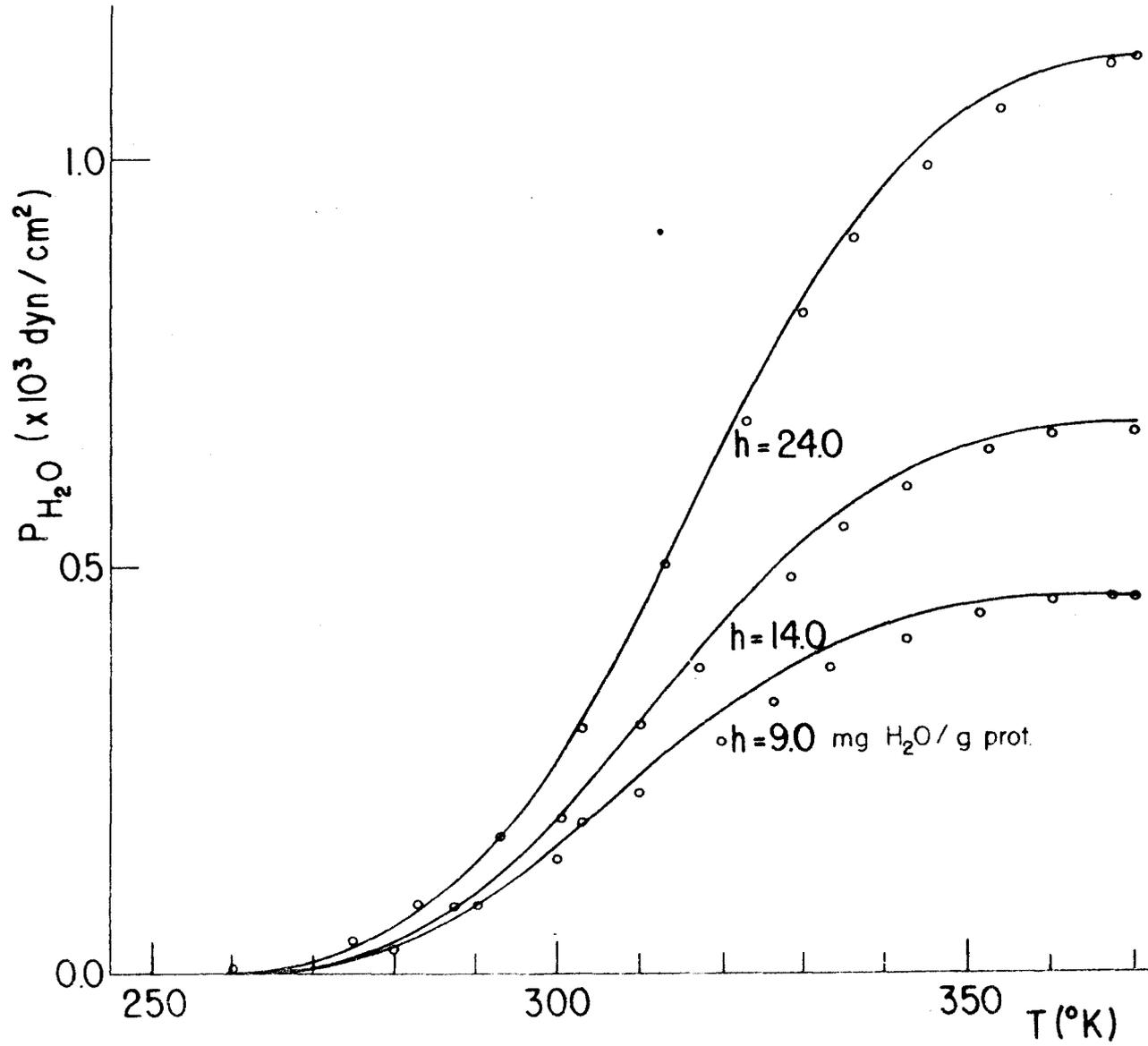


Fig 20 Curvas de P.T.E superpostas as cargas parciais obtidas da curvas de C.T.E

$\omega_{A \rightarrow 0}(T)$ e $\omega_{B \rightarrow 0}(T)$ são respectivamente as "velocidades de saída" (frequências de desorção) das moléculas de H_2O dos sítios A e B.

ΔH_A e ΔH_B são respectivamente suas entalpias de desorção.

Para a obtenção dos parâmetros P_{0A} , P_{0B} , ω_{A0} , ω_{B0} , ΔH_A e ΔH_B a partir dos espectros de C.T.E., utilizou-se um programa numérico para a superposição das funções $J_A(T)$ e $J_B(T)$.

Em resumo o programa consiste da minimização da soma dos erros quadráticos definidos em cada temperatura como o quadrado da diferença entre o ponto experimental e o teórico calculado pela superposição das duas funções com parâmetros próximos dos ideais. Através de método iterativo, novos parâmetros são gerados até que a soma acima definida seja minimizada.

Os resultados da aplicação deste programa numérico as curvas de C.T.E encontram-se na tabela 2. Obtivemos entalpias de $(0.34 \pm 0.02)eV$ e $(0.55 \pm 0.04)eV$, constantes de tempo características de $(0.2 \pm 0.1) \times 10^{-2} \text{seg}$ e $(0.4 \pm 0.3) \times 10^{-6} \text{seg}$ respectivamente para os sítios A e B. O ajuste das curvas nas hidratações estudadas se encontra na figura 21. Nela as linhas contínuas estão representando os espectros experimentais enquanto que as funções teóricas estão assinaladas por pontos.

As frequências de desorção obtidas pelo modelo, são compatíveis com as obtidas das curvas de descarga isotérmicas.

Utilizando-se a estatística de Langevin na aproximação $pE \ll kT$, obtemos um número de dipolos por unidade de volume também em concordância com o número de moléculas de água determinado pelo processo de pesagem das amostras em micro balança.

Dos dados das polarizações parciais e da característica linear da carga com a hidratação conclue-se que os sítios de menor energia, rotulados por "A" são duas vezes mais numerosos do que os rotulados por "B". Vem daí se obter do ajuste parcial das curvas de P.T.E. uma entalpia de desorção de $0.37eV$, ou seja, mais próxima da entalpia de desorção dos sítios duas vezes mais numerosos.

h mg H ₂ O/g Pt.	ΔH_A eV	τ_{0A} 10 ⁻² seg	P_{0A} 10 ⁻¹⁰ C/cm ²
18	0.32	0.6	2.5
20	0.34	0.2	2.5
23	0.34	0.1	2.8
32	0.38	0.04	4.3
37	0.34	0.2	4.9

h mg H ₂ O/g Pt.	ΔH_B eV	τ_{0B} 10 ⁻⁶ seg	P_{0B} 10 ⁻¹⁰ C/cm ²
18	0.51	1.0	1.2
20	0.52	0.5	1.3
23	0.58	0.01	1.4
32	0.53	0.6	2.1
37	0.62	0.01	2.2

TABELA 2 Resultados gerais da aplicação do modelo onde $P_T = P_A + P_B$ às curvas de C.T.E. Os valores das entalpias $\Delta H_A = (0.34 \pm 0.02)$ eV $\Delta H_B = (0.55 \pm 0.04)$ eV sugerem que as moléculas de H₂O se ligam a matriz proteica por uma ou duas pontes de hidrogenio.

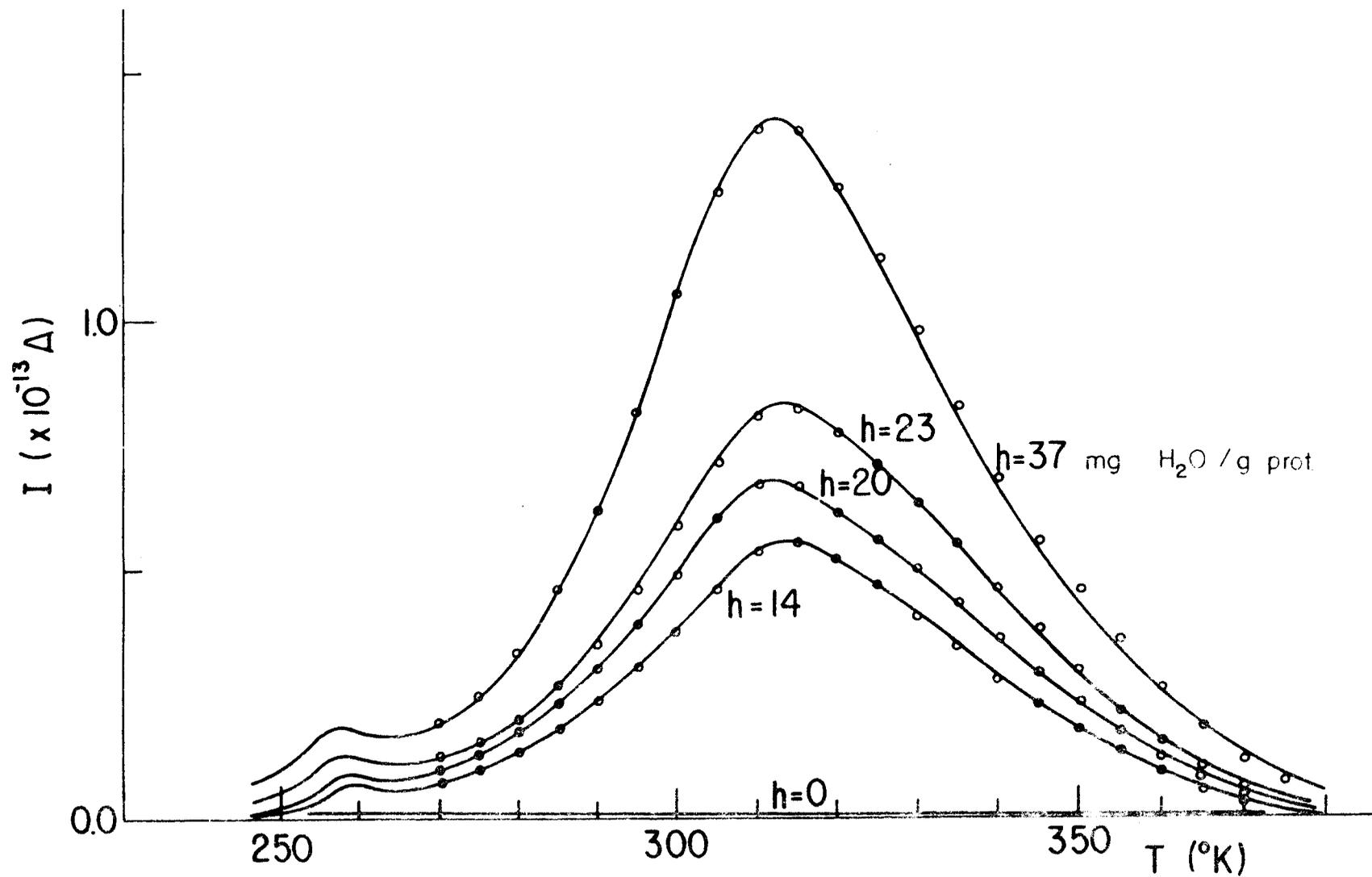


Fig 21 Ajuste das curvas de C.T.E pelo modelo de superposição.
Os pontos indicam as funções teóricas.

Das energias obtidas conclue-se que as moléculas de H_2O se ligam a matriz proteica por uma ou duas pontes de hidrogênio.

Precisamos ainda explicar porque não são observados os efeitos da rotação encontrados no gelo e atribuídos a defeitos na estrutura gerados pelo "salto do proton".

Sugerimos tentativamente o seguinte modelo: Nas hidratações estudadas existem cerca de 10^{19} moléculas de H_2O na amostra. Como as pastilhas foram feitas com aproximadamente 150mg de lisozima, necessitaríamos 10^{21} moléculas para preencher completamente as superfícies das moléculas de proteína com uma monocamada de água, ou seja, apenas 10^2 moléculas a mais. Portanto mesmo nas baixas hidratações estudadas ainda existe uma grande probabilidade de formação de agrupamentos de moléculas de H_2O nas superfícies. Esses aglomerados se estruturam semelhantemente ao gelo e portanto a princípio deveriam apresentar uma relaxação dielétrica causada pelo salto do proton do hidrogênio.

Evidentemente essa relaxação ocorre em região de temperatura abaixo de $273^{\circ}K$, logo se ela existisse seria detectada uma vez que resfriamos as amostras até cerca de $100^{\circ}K$.

Atribuimos a ausência desta relaxação ao método de pesquisa utilizado. O campo de polarização é aplicado a temperatura de $300^{\circ}K$ e em baixo vácuo. Como a energia de ligação entre as moléculas de H_2O é menor do que a energia de desorção dos sítios primários, devemos esperar, nesta temperatura, que os aglomerados sejam desfeitos.

importante O processo de polarização das amostras pode ser explicado pela rotação das moléculas nos sítios de desorção porém com uma frequência mais baixa do que a frequência de desorção.*

Sugerimos tentativamente o modelo discutido abaixo para a determinação da frequência de rotação a partir do valor inicial da corrente de carga dos espectros isotérmicos.

Sejam n_2 e n_1 respectivamente os números de moléculas orientadas em sentido do campo de polarização e em sentido con-

* por frequência subentende-se probabilidade de transição por unidade de tempo ($\omega_D \rightarrow 0 \gg \omega_R$)

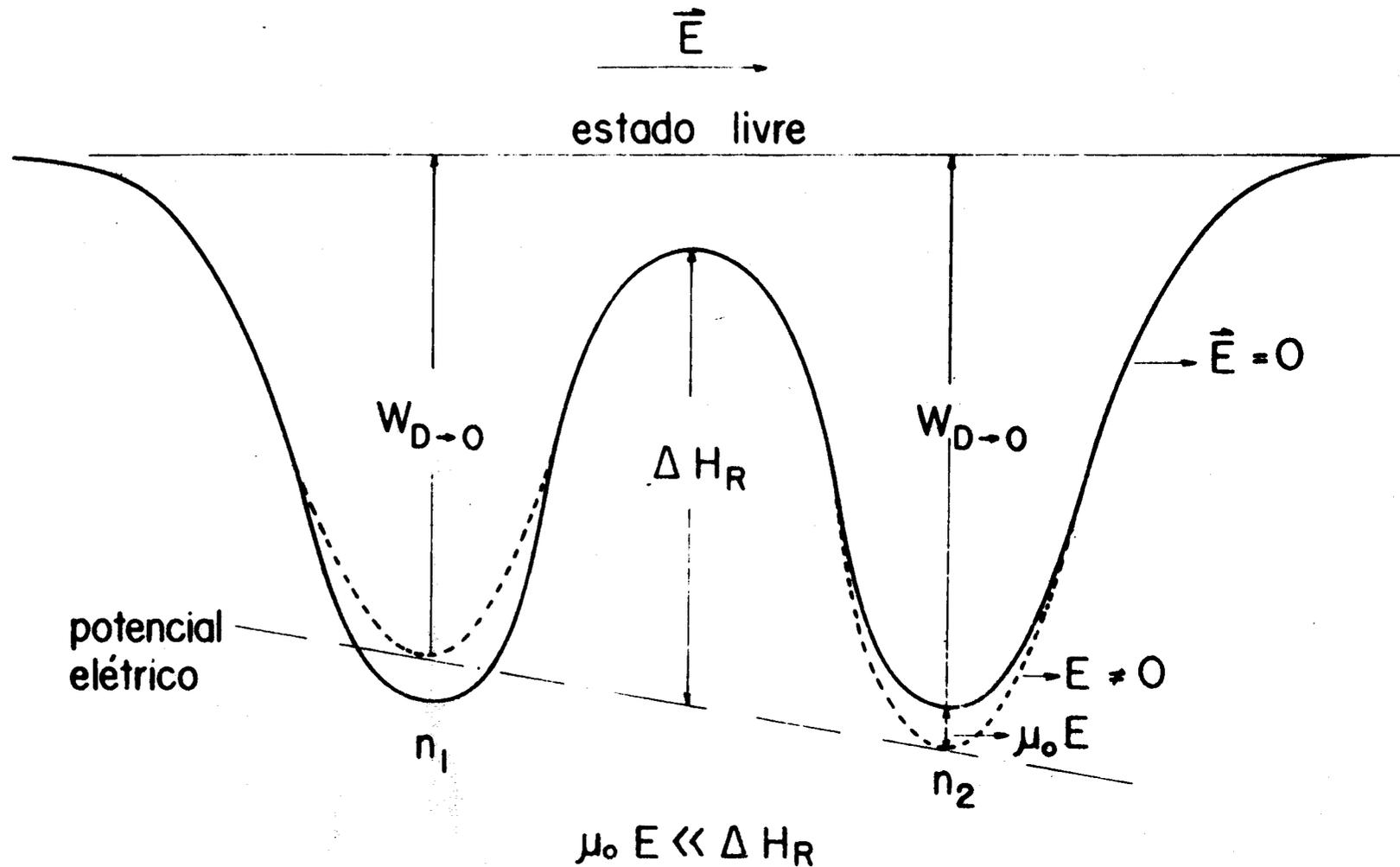


Fig 22 Diagrama de energia do modelo utilizado para a determinação da Frequência de rotação das moléculas de H_2O . A frequência de saída esta indicada por $W_{D \rightarrow 0}$ e a de rotação por W_R (ΔH_R é a energia livre de rotações)

trário, quando o dielétrico se encontra a temperatura T.

Portanto a polarização será:

$$P = \mu_0 (n_2 - n_1)$$

Supondo uma entalpia [★] de rotação ΔH_R e uma frequência característica ω_{OR} temos:

$$-\frac{dn_1}{dt} = \omega_{D \rightarrow 0} n_1 + n_1 \omega_{OR} e^{-\frac{\Delta H_R - \mu_0 E}{kT}} - n_2 \omega_{OR} e^{-\frac{\Delta H_R + \mu_0 E}{kT}}$$

$$\frac{dn_2}{dt} = -\omega_{D \rightarrow 0} n_2 + n_1 \omega_{OR} e^{-\frac{\Delta H_R - \mu_0 E}{kT}} - n_2 \omega_{OR} e^{-\frac{\Delta H_R + \mu_0 E}{kT}}$$

Como $\mu_0 E \ll kT$ temos em primeira aproximação:

$$-\frac{dn_1}{dt} = \omega_{D \rightarrow 0} n_1 + n_1 \omega_{OR} \left(1 + \frac{\mu_0 E}{kT}\right) e^{-\Delta H_R / kT} - n_2 \omega_{OR} \left(1 - \frac{\mu_0 E}{kT}\right) e^{-\Delta H_R / kT}$$

$$\frac{dn_2}{dt} = -\omega_{D \rightarrow 0} n_2 + n_1 \omega_{OR} \left(1 + \frac{\mu_0 E}{kT}\right) e^{-\Delta H_R / kT} - n_2 \omega_{OR} \left(1 - \frac{\mu_0 E}{kT}\right) e^{-\Delta H_R / kT}$$

Com isso temos que:

$$\frac{dP}{dt} = -\omega_{D \rightarrow 0} P - 2\omega_R P + \alpha e^{-\omega_{D \rightarrow 0} t}$$

onde

$$n_1 + n_2 = N_0 e^{-\omega_{D \rightarrow 0} t}$$

$$\omega_R = \omega_{OR} e^{-\Delta H_R / kT}$$

$$\star \Delta G(T, P) = \Delta (H - TS)$$

- Gibbs

$$\alpha = 2\omega_R \mu_o N_o \frac{u_o E}{kT}$$

Seja $\omega_T \triangleq \omega_{D \rightarrow 0} + 2\omega_R$ logo

$$\frac{dP}{dt} + \omega_T P = \alpha e^{-\omega_{D \rightarrow 0} t}$$

cuja solução isotérmica será:

$$P(t) e^{\int_0^t \omega_T dt'} = \alpha \int_0^t e^{-\omega_{D \rightarrow 0} t'} e^{\int_0^{t'} \omega_T dt''} dt' + C$$

como condição inicial temos

$$P(t=0) = 0 \rightarrow C = 0$$

Com isso obtemos como solução:

$$P(t) = \frac{\alpha}{2\omega_R} [e^{-\omega_{D \rightarrow 0} t} - e^{-\omega_R t}]$$

No processo de carga temos que

$$J(t) = \frac{dP}{dt}$$

$$J(t) = \frac{\alpha}{2\omega_R} [\omega_T e^{-\omega_T t} - \omega_{D \rightarrow 0} e^{-\omega_{D \rightarrow 0} t}]$$

Portanto $J(t=0) = \alpha$ ou

$$I(t=0) = S \alpha$$

$$I(t=0) = \frac{2\omega_R \mu_o^2 N_o^2 S E}{kT}$$

onde

ω_R = frequência de rotação

μ_0 = momento de dipolo elétrico

N_0 = número de dipolos por unidade de volume

S = área dos eletrodos

k = constante de Boltzmann

T = temperatura absoluta

Logo do valor inicial da corrente no processo de carga isotérmica podemos determinar a frequência de rotação dos dipolos.

Dos espectros de carga isotérmica realizados a temperatura de 298^oK, obtemos uma corrente inicial de 0.8×10^{-11} . Substituindo esses valores na equação acima e considerando para o momento de dipolo elétrico da água o valor de 8.2×10^{-30} C×m obtivemos uma frequência de desorção da ordem das frequências de desorção obtidas dos espectros de carga e descarga isotérmica para a mesma temperatura. As frequências de desorção para os sítios "A" e "B" são respectivamente $7 \times 10^{-3} \text{seg}^{-1}$ e $2 \times 10^{-3} \text{seg}^{-1}$.

Convém frisar que os dados utilizados para o cálculo de ω_R são qualitativos. A hidratação nestes espectros não foi obtida pelo processo de pesagem e a extrapolação da corrente para o tempo zero contém erros causados pelo método experimental utilizado.

CONCLUSÕES FINAIS

1) A água ligada é a responsável pela polarização elétrica obtida no comportamento de eletreto da lisozima, como pode ser visto da linearidade da carga total armazenada contra a hidratação das amostras figura 13.

2) As medidas de P.T.E. juntamente com as integrais parciais das curvas de C.T.E. indicam que o processo de des polarização está associado ao processo de desorção das moléculas de água ligada causado pelo tratamento térmico.

3) Das curvas de carga e descarga isotérmica observa-se a existência de dois sítios de ligação primária. Os valores das frequências obtidos nos experimentos a temperatura ambiente para os sítios "A" e "B" são respectivamente $2 \times 10^{-3} \text{seg}^{-1}$ e $7 \times 10^{-3} \text{seg}^{-1}$.

4) Aplicando às curvas de C.T.E. da lisozima hidratada o modelo no qual a polarização total é considerada como sendo a soma das polarizações dos dois diferentes sítios conclui-se que as frequências dos sítios "A" e "B" se encontram nos respectivos intervalos de frequência

$$10^{-3} \text{seg}^{-1} < \omega_A(298^{\circ}\text{K}) < 4 \times 10^{-3} \text{seg}^{-1}$$

$$0.3 \times 10^{-3} \text{seg}^{-1} < \omega_B(298^{\circ}\text{K}) < 8 \times 10^{-3} \text{seg}^{-1}$$

5) O processo de despolarização elétrica pode ser, em princípio, devido a dois efeitos: rotação e desorção. Os dados experimentais indicam os efeitos da desorção como os mais importantes.

CONTRIBUIÇÕES DA PRESENTE DISSERTAÇÃO

- 1) Uma técnica de medida mais sensível para a investigação das propriedades elétricas e estruturais da água ligada em hidratações abaixo de $40\text{mgH}_2\text{O/g}$ de prot.
- 2) Introdução da nova técnica de Pressão Termo Estimulada (P.T. E.)
- 3) Determinação quantitativa dos parâmetros associados aos processos de ativação da água ligada junto aos sítios primários de adsorção.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- 1) Estudo detalhado dos processos de carga e descarga isotérmica para a obtenção de maiores informações sobre os processos de rotação das moléculas de H₂O.
- 2) Construção de um novo sistema para evitar gradientes de temperatura através da espessura das amostras.
- 3) Ampliar os estudos para um maior grau de hidratação.
- 4) Generalizar os resultados com a investigação de outras proteínas.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Gross,B., Charge Storage in Solids Dielectrics. Elsevier , Amsterdam.
 - (2) Campos,M., S.Mascarenhas and G.F.L.Ferreira, Phys.Rev.Lett., 27, 1432 (1971).
 - (3) Takamatso,T. and E.Fukada, J.Polymers, 1, 101 (1970).
 - (4) Gross,B., Phys.Rev., 107, 368 (1957).
 - (5) Mascarenhas,S., in Physics of Ice, Ed.N.Riehl and all., Plenum Press, 483 (1969).
 - (6) Bini,S. and Capelleti,R., Electrets Ed.M.Perlman Electrochem. Soc.Inc.,N.Y.,66 (1973).
 - (7) Fridkin,V. and Zheludev,I., Photoelectrets and the Eletro - photo Grafic Process Consult.Bureau, N.Y. (1961).
 - (8) Heaviside,O., Electrical Papers, MacMillan London,1,488(1892).
 - (9) Eguchi,M., Phil.Mag., 49, 178 (1925).
 - (10) Gross,B., Charge Storage and Transport in Dielectrics, M.M. Perlman Electrochem., Soc., (1973).
 - (11) Sawyer,P.N., Am.J.Physiol., 175, 103 (1953).
 - (12) Mascarenhas,S., in Electrets, Ed.M.Perlman, Electroch.Soc. N.Y., 650 (1973).
 - (13) Mascarenhas,S., The Electret Effect in Bone and Biopolymers and the Bound-Water Problem. Annals of the New York Academy of Sciences, vo.238, (1974).
 - (14) Murphy,P. Charge Storage and Transport in Dielectrics, M.M. Perlman Electrochem.,Soc., 627 (1973).
 - (15) Mascarenhas,S. in ref.(14), 657.
 - (16) Linder,C. and I.Miller, J.Phys.Chem., 76 (1972), 3434.
 - (17) Wobschall,O.J., Theor.Biol.,21(1968),439.
-

- (18) Eisenberg and Kauzmann, The Structure and Properties of Water, 1969, Oxford.
- (19) Horne, R.A., Water and Aqueous Solutions, 1972, John Wiley.
- (20) Berendsen, H.C., Biology of the Mouth, P. Person, Ed. Am. Assoc. Adv. Science, n° 89, 145 (1968).
- (21) Frank, H.S. and W.Y. Wen, Discussions Faraday Soc., 24, 133 (1957).
- (22) Némethy, G. and H.A. Scheraga, J. Chem. Phys., 36, 3382 (1962).
- (23) Buijs, K. and G.R. Choppin, J. Chem. Phys., 39, 2035 (1963).
- (24) Falk, M. and T.A. Ford, Can. J. Chem., 44, 1699 (1966).
- (25) Davis, C.M. and T.A. Litovitz, J. of Chem. Phys., 42, 2563 (1965).
- (26) Samoilov, O. Ya. 1961. Die Struktur van wässigen Elektrolyt-lösungen. Tebnex Leipzig.
- (27) Danford, M.D. and H.A. Levy., J. Chem. Phys., 84, 3965 (1962).
- (28) Pople, J.A., Proc. Roy. Soc. Sci A, 205, 163 (1951).
- (29) Sparnaay, M.J., J. Colloid Interf., Sci., 22, 23 (1966).
- (30) Berendsen, H.C., Theoretical and Experimental Biophysics, B. Cole Ed., 76 (1967).
- (31) Klotz, I.M., et al. J. Am. Chem. Soc., 80, 2132 (1958).
- (32) Hasted, J.B. Aqueous Dielectrics, Halsted Press a Division of John Wiley, N.Y. (1973).
- (33) McClellan, A.L., Dipole Moments, Freeman, S. Francisco (1963).
- (34) Slinger, R. and O. Steiger, Helv. Phys. Acta, 1, 369 (1928).
- (35) Moclwyn-Hughes, E.A., Phys. Chem. (1964).
- (36) Frank, H., Proc. Roy. Soc. (London) A247, 481 (1958).
- (37) Buchanan, T.J., G.H. Haggis, J.B., Hasted, Proc. Roy. Soc. (London), Ser A, 213, 379 (1952).
- (38) Cox, D.J., and V.N. Schumaker, J. Amer. Chem. Soc., 83, 2433 (1961).

- (39) Tanford, C., Phys. Chem. of Macromolecules, Wiley, N.Y., (1961).
- (40) Kuntz, I.D. and T.S. Brassfeld, Science, 163, 1329 (1969).
- (41) Ritland, H.N., and W.W. Beeman, J. Chem. Phys., 18, 1237 (1950).
- (42) Anderegg, J.W. and O. Kaesburg, J. Amer. Chem. Soc., 77, 2977, (1955).
- (43) Wang, J.H., J. Amer. Chem. Soc., 76, 4755, (1954).
- (44) Oncley, J.L., Chem. Rev., 30, 433 (1942).
- (45) Buchaman, T.J., G.H. Haggis, J.B. Hasted and B.G. Robinson, Proc. Roy. Soc. (London), Ser A, 213, 379 (1952).
- (46) Schwan, H.P., Advan. Biol. Med. Phys., 5, 191 (1957).
- (47) Grant, E.H., Ann. N.Y. Acad. Sci., 125, 478 (1965).
- (48) Pennock, B.E. and H.P. Schwan, J. Phys. Chem., 73, 2600 (1969).
- (49) Rosen, D. Trans. Faraday Soc., 59, 2178 (1963).
- (49') Harvey, S.C., and P. Hoekstra, J. Phys. Chem., vol. 76, n° 21 (1972).
- (50) Lim, J.J. and M.H. Shamos, Biophys. J., 11, 648 (1971).
- (50') The Structure and Action of Proteins, R.E. Dickerson and I. Geis, Harper e Row Publishers, N.Y.
- (51) Johnson, L.N., and D.C. Phillips Nature 206, 759 (1965).
- (52) Phillips, D.C. Sci. American (November, 1966) p. 78.
- (53) Blake, C.C.F., G.A. Mair, A.C.T. North, D.C. Phillips and V.R. Sauma, Proc. Roy. Soc. (London) B167, 365 (1967).
- (54) Brey, W.S., M.A. Heeb and T.M. Ward, J. Colloid Interface Science vol. 39, 13 (1969).
- (55) Kittel, C. Introduction to Solid State Physics, J. Wiley, N.Y.
- (56) Thermally Stimulated Discharge of Polymer Electrets Ph.D. Thesis, Central Lab. Leiden, The Netherlands.
- (57) Gross, B., Phys. Rev., 107: 368 (1957).

(58) Hobbs, P.V., Ice Physics Clarendon Press, Oxford, 131 (1974).