

Este exemplar corresponde à redação final da
tese defendida pela aluna Lucila Chebel Labaki
e aprovada pela comissão julgadora.

12/ julho/ 1990

ESTUDO DA CRISTALINIDADE E MECANISMOS DE SORÇÃO DE ÁGUA

EM BIOPOLÍMEROS

Torriani

LUCILA CHEBEL LABAKI

ORIENTADORA: PROF.DRA. IRIS C.L. TORRIANI

Tese apresentada no Instituto de Física
"Gleb Wataghin" - UNICAMP, como parte dos
requisitos necessários à obtenção do
título de Doutor em Ciências.

CAMPINAS

1990

À minha mãe, que tem capacidade de
estudar árabe aos 78 anos.

A meu pai, in memoriam.

Ao Adolpho, com muito amor.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Iris Torriani, pela orientação e apoio na realização desse trabalho

Ao Dr. Nathan Sabino e ao Julio Kondo, do IAC, pelas amostras de celulose

Ao Dr. Raul Grigera, do IFLYSIB, de La Plata, pelas amostras de colágeno

Ao Parente e à Vera, do IPEN, pelo auxílio precioso na computação, e pela amizade

Ao CPqD - Telebrás, pelo uso do microdensitômetro

À Ana Carolina, pelos diagramas de fibras

À Beth, do DHS-FEL, pelo empenho demonstrado nos desenhos

Ao Silvano, que também colaborou nos desenhos

À Rosa, pela datilografia perfeita e pela boa vontade

À Marly, do DHS-FEL, por todo o auxílio prestado

Ao Luis Fernando, aluno da Engenharia Civil, pelas fotografias

Aos colegas do Departamento de Hidráulica da Engenharia Civil, pelo apoio e amizade

A todo o pessoal do Laboratório de Cristalografia, pela convivência e pelo apoio demonstrado durante a realização desse trabalho

A todos os amigos, com quem partilhei tantos momentos bons e horas difíceis

À CAPES e FAPESP, pelo apoio financeiro

Muito obrigada

ÍNDICE

Resumo	1
Abstract	iii
1. Introdução	1
2. Os biopolímeros em estudo: celulose e colágeno	4
2.1. Celulose	4
2.1.1. Pequeno Histórico	4
2.1.2. Estrutura Química de Molécula de Celulose	6
2.1.3. Estrutura Cristalina	9
2.1.4. Conformação da Cadeia Celulósica	12
2.1.5. Formas Polimórficas	14
2.1.6. Morfologia da Celulose Nativa	17
2.2. Colágeno	23
2.2.1. O Colágeno e sua Estrutura Molecular e Fibrilar	23
2.2.2. A Molécula de Tropocolágeno: Uma Hélice Tripla	24
2.2.3. Hidratação do Colágeno a Nível Molecular	29
2.2.4. Associação das Moléculas de Tropocolágeno em Fibrilas	32
3. A Difração de Raios X e o Estudo de Biopolímeros	37
3.1. Cristalinidade e Tamanho de Cristalito em Fibras de Celulose	42
3.1.1. O Significado da Cristalinidade	42
3.1.2. O Conceito de Índice de Cristalinidade	44

3.1.3.	Métodos de Medida de Cristalinidade por Difração de Raios X	48
3.1.4.	Determinação do Tamanho de Cristalito	57
3.2.	Orientação Cristalina	58
3.2.1.	Orientação Preferencial em Polímeros	58
3.2.2.	Orientação em Fibras de Celulose	60
3.2.3.	A Orientação Cristalina e a Estrutura Espiral em Fibras de Algodão	65
3.3.	Estudo do Colágeno Através da Difração de Raios X	69
3.3.1.	Difração de Raios X por uma Estrutura Helicoidal	69
3.3.2.	O Padrão de Difração de Raios X pelo Colágeno	71
4.	Modelos de Hidratação em Biopolímeros	76
4.1.	Os Biopolímeros e a Água	76
4.2.	Isotermas de Sorção de Água	77
4.3.	Hidratação e Cristalinidade em Celulose	83
4.4.	O Papel da Água na Estrutura do Colágeno Nativo	88
5.	Experimental: Celulose	93
5.1.	Seleção das Amostras	93
5.2.	Difração de Raios X	95
5.3.	Medidas de Orientação	101
5.4.	Isotermas de Sorção de Água	104
5.5.	Resultados	106
5.5.1.	Medidas de Cristalinidade e Tamanho de Cristalito	106

5.5.2.	Medidas de Orientação	110
5.5.3.	Isotermas de Sorção de Água	117
5.5.4.	Hidratação e Cristalinidade	124
5.6.	Discussão	132
6.	Experimental: Colágeno	136
6.1.	Amostras Seleccionadas	136
6.2.	Difração de Raios X	136
6.3.	Isotermas de Sorção de Água	136
6.4.	Resultados	140
6.4.1.	Ciclos Consecutivos de Secagem e Rehi- dratação	141
6.4.2.	Comparação entre Secagem Total e Parcial	146
6.4.3.	Ciclos de Secagem e Hidratação Realizados numa Única Etapa	148
6.4.4.	Isotermas de Sorção de Água	148
6.5.	Discussão	153
7.	Conclusões	157
8.	Referências	159

RESUMO

Uma investigação da cristalinidade e mecanismos de sorção de água em bpolímeros estruturais: colágeno e celulose, foi realizada por métodos de difração de raios X e levantamento de isothermas de sorção de água.

Foi desenvolvido um método computacional para medida do índice de cristalinidade e tamanho de cristalito em polímeros. Esse método foi aplicado para fibras de celulose nativa.

Medidas de orientação média dos cristalitos e do ângulo espiral, característico do algodão nativo, foram realizadas, verificando-se uma correlação entre os valores obtidos. Foi observado que a resistência intrínseca das fibras cresce com a orientação, quando é controlada a maturidade da fibra.

O índice de cristalinidade decresce e o tamanho de cristalito cresce com o maior grau de hidratação a que é submetida a amostra. A fração de água fortemente ligada à celulose, obtida pelo ajuste das isothermas experimentais à equação de Guggenheim, relaciona-se diretamente com o tamanho de cristalito, e a acessibilidade às moléculas de água aumenta com a crescente fração de substância amorfa.

Amostras de pó de colágeno nativo foram submetidas a repetidos ciclos de hidratação e secagem gradual.

Os efeitos de histerese, conhecidos em isothermas de sorção de água dessa proteína, foram observados pela variação, com

a umidade relativa, da intensidade integrada das reflexões de raios X a alto ângulo, que constituem as principais características do padrão de difração.

Uma perda gradual de estrutura foi observada em cada processo de secagem e reidratação. Pelos dados de difração foi observado também um aumento das regiões amorfas das fibrilas.

A secagem parcial da amostra, até um teor de umidade não inferior a 0,13 g H₂O per g proteína, não produz a curva de histerese nos gráficos dos parâmetros estudados.

Ciclos de secagem-hidratação numa única etapa parecem não afetar irreversivelmente a ordem, pois as amostras recuperam sua estrutura original. A diferença entre esse resultado e os do processo de hidratação gradual pode ser atribuída à cinética da hidratação de biopolímeros.

ABSTRACT

X-ray diffraction and water sorption isotherms were used in this study of crystallinity and sorption mechanisms in the structural biopolymers: collagen and cellulose.

A computational method was developed in order to determine the crystallinity index and crystallite size in polymers. This method was employed in native cellulose fibers (cotton).

Measurements of the mean crystallite orientation and spiral angle, characteristic of native cotton, were carried out and correlations between the obtained values were verified. It has been observed that the tensile strenght of the fibers increases with increasing orientation, if the maturity of the fiber is controlled.

The Crystallinity index is reduced and crystallite size increases with hydration. The fraction of water strongly bound to cellulose, which was obtained by fitting the measured sorption isoherms to Guggenheim's equation, is directly related to the crystallite size; accessibility to water molecules increases with the fraction of amorphous substance.

Powdered native collagen samples were submitted to repeated cycles of gradual drying and hydration.

Hysteresis effects, known to exist in water sorption isotherms of this fibrous protein were observed in the plots of

relative humidity versus integrated intensity of the wide angle X-ray reflections which constitute the main features of the diffraction pattern.

A gradual reduction of structured material was observed after each drying and rehydration process. An increase in the amorphous regions of the fibrils could also be inferred from the diffraction data.

Partially drying the samples down to a moisture content not smaller than 0.13 g H₂O per g protein did not produce a hysteresis loop in the plots of the parameters studied.

One step drying-rehydration cycles did not seem to affect irreversibly the order of the samples which seemed to recover their original structure. The difference between this result and those of the gradual hydration process may be attributed to the kinetic properties of biopolymers hydration.

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o estudo da estrutura e função das macromoléculas biológicas tem representado uma das áreas mais frutíferas da Física, Química e Biologia. O grande interesse nesse campo de estudo são as contribuições importantes que podem advir, não só para a ciência básica, como também para aplicações tecnológicas e a medicina.

Nesse trabalho, nosso interesse foi voltado para o estudo das macromoléculas estruturais: a celulose e o colágeno. Estas macromoléculas fibrosas são largamente encontradas respectivamente no reino vegetal e animal, e são responsáveis pela formação de tecidos estruturais nos seres vivos.

A difração de raios X tem sido, na maioria dos estudos realizados nessa área, a técnica física que permitiu elucidar as características estruturais das macromoléculas biológicas. Foi, por isso, a técnica básica usada nesse trabalho.

A água tem um importante papel na estrutura e conformação dos biopolímeros. Sabe-se que o estado conformacional de um biopolímero depende não só do teor de água presente na substância, como também do procedimento experimental seguido para levá-lo às condições de umidade em que será estudado. Muitas informações tem sido obtidas sobre os mecanismos de sorção de água em biopolímeros através das isotermas de sorção; essa foi uma técnica auxiliar adotada para este estudo.

Foram realizados, por difração de raios X a alto ângulo, e medidas de sorção de água, estudos sobre cristalinidade em

fibras de algodão nativo (celulose I), seu grau de orientação cristalina, e mecanismos de hidratação em celulose.

Para o colágeno, foram estudadas basicamente as mudanças estruturais em colágeno nativo, em função da umidade, e a reversibilidade ou não das transformações estruturais nesses processos.

O capítulo dois, em sua primeira parte, é dedicado à descrição da celulose, com um pequeno histórico do conhecimento desse material, uma descrição da estrutura química e cristalina, conformação da cadeia da celulose I (celulose nativa), alguma informação sobre as formas polimórficas da celulose e a morfologia da celulose nativa. Na segunda parte vem a descrição do colágeno, uma proteína cujas moléculas são constituídas por três cadeias polipeptídicas helicoidais, que se enrolam formando uma superhélice. A hidratação do colágeno a nível molecular é considerada em seguida, formando um quadro do papel da água na estrutura do colágeno. Finalmente, são consideradas as possibilidades de associação das moléculas em fibrilas.

A seguir, no capítulo 3, trata-se da difração de raios X, como uma técnica bastante utilizada para o estudo de biopolímeros. Por se tratar de um trabalho interdisciplinar, foi apresentada inicialmente uma pequena introdução sobre os princípios básicos da difração de raios X, voltada principalmente para o estudo de biopolímeros. Uma parte desse capítulo é dedicada ao conceito de cristalinidade em fibras: seu significado, métodos de medida de cristalinidade e tamanho de cristalito por difração de raios X. Outro segmento importante no estudo de fibras

celulósicas é o da orientação cristalina. Para a celulose deve-se levar em conta não só a orientação cristalina como a estrutura em espiral das fibras. Encerrando esse capítulo, trata-se da difração de raios X por uma estrutura helicoidal e do padrão de difração pelo colágeno.

Os modelos de hidratação em biopolímeros vêm em seguida, no capítulo 4. Trata-se da interação da água com os biopolímeros, do estudo através de isotermas de sorção de água e das interpretações mais correntes sobre essas curvas. A hidratação e cristalinidade em celulose vêm a seguir, e finalmente o papel da água na manutenção da estrutura do colágeno nativo.

O capítulo 5 é dedicado a todo o trabalho experimental realizado com fibras de algodão nativo (celulose I): critérios para seleção das amostras, difração de raios X, medidas de orientação, isotermas de sorção de água. Finalmente, os principais resultados obtidos através de cada uma dessas técnicas, e a discussão desses resultados.

A parte experimental realizada com o colágeno nativo é tratada no capítulo 6, onde são relatados os diversos tipos de experiências, cujo objetivo foi verificar a reversibilidade das transformações estruturais sofridas pelo colágeno quando se faz variar repetidamente o grau de hidratação da amostra. A discussão dos principais resultados vem a seguir.

Finalmente, é apresentado um apanhado geral das conclusões deste trabalho e algumas propostas de problemas ainda em aberto dentro deste tema, tão amplo e diverso.

2. OS BIOPOLÍMEROS EM ESTUDO: CELULOSE E COLÁGENO

2.1. Celulose

2.1.1. Pequeno Histórico

A celulose, o polissacarídeo que forma a estrutura permanente da parede celular das plantas, é provavelmente o polímero natural mais abundante e amplamente utilizado no mundo. Sendo o principal constituinte das paredes celulares das plantas superiores, foi assim denominada, por essa razão, em 1838, por A. Payen. Este, já nessa época, indicava ser a celulose um carboidrato constituído de resíduos de glicose. (Nissan e colaboradores, 1966). Em 1858, Nägeli postulou que as fibras de celulose seriam formadas por partículas cristalinas submicroscópicas e anisotrópicas, as quais denominou micelas (Howsman e Sissan, 1954). Já nessa época se desenvolvia a química dos derivados da celulose, que são ponto de partida para muitas indústrias têxteis e de papel.

Em 1913, Nishikawa e Ono confirmaram a estrutura cristalina da celulose, quando, aplicando a técnica de Laue, mostraram que o diagrama de difração de raios-X consistia de anéis de difração bem definidos. Esse resultado demonstrava a existência de domínios onde as moléculas são ordenadas em três dimensões, num arranjo que se aproxima do estado cristalino. Mais tarde verificou-se que somente uma parte das fibras de celulose natural pertence às regiões ordenadas. Surgiu então o conceito de regiões "cristalinas" separadas por material mais ou menos desordenado (Mark, 1954). Em 1920, Herzog e Jancke demonstraram, por técnicas

de difração de raios-X, que a celulose, qualquer que seja a planta de origem, exhibe sempre o mesmo padrão de difração.

Ainda nos anos 20, Staudinger estabelecia o conceito de macromoléculas, enquanto um botânico, Sponsler, e seus colaboradores desenvolviam a idéia de ter a molécula de celulose dimensões muito maiores do que a da cela unitária (Marchessault e Sarko, 1967).

Com o desenvolvimento da química dos carboidratos e polissacarídeos, nos anos 30, reconhecia-se que a celulose é constituída por feixes de macromoléculas lineares formadas por unidades glicósicas policondensadas ligadas nas posições 1,4 por átomos de oxigênio. Por essa época Mark e colaboradores postulavam uma cela unitária monoclinica para a celulose, com as dimensões: $a = 8,35\text{\AA}$, $b = 10,3\text{\AA}$ (periodicidade ao longo da fibra), $c = 7,9\text{\AA}$, $\beta = 84^\circ$. (Howsman e Sissan, 1954).

O termo celulose tem sido usado, convencionalmente, para designar o agregado estrutural das paredes celulares, o qual em geral se encontra acompanhado de outros polissacarídeos, conhecidos como hemiceluloses. Uma definição alternativa considera a celulose como aquela porção da parede celular derivada exclusivamente da glicose, isto é, consistindo de macromoléculas com pelo menos centenas até milhares de unidades anidroglicósicas. Considera-se celulose nativa aquela obtida de uma fonte natural, e que tenha sofrido um mínimo possível de modificações.

A celulose é largamente encontrada na natureza, seja em plantas que contém celulose muito pura, como algodão, rami, juta, linho, sisal, como em fibras de madeira. De todos esses tipos, a

fibra de algodão é a que contém a menor porcentagem de material não celulósico, de 4 a 12% (Ward, 1954).

Para uma caracterização adequada dessa complexa estrutura, é necessário considerar:

- a) a estrutura química da molécula de celulose, isto é, o arranjo dos átomos dentro da cadeia polissacarídica;
- b) a estrutura cristalina, isto é, o arranjo das moléculas nas regiões ordenadas da fibra e
- c) a associação das moléculas numa superestrutura fibrilar, onde as regiões cristalinas se encontram separadas por material mais ou menos desordenado.

2.1.2. Estrutura Química da Molécula de Celulose

A celulose é um polissacarídeo, pertencendo, portanto, ao grupo dos compostos orgânicos conhecidos como carboidratos. A molécula de celulose é um polímero constituído por resíduos de β -D-glicose, com encadeamento 1-4 (Walton e Blackwell, 1973). Nessa sucessão de resíduos de glicose, os anéis são ligados nos grupos terminais OH, sendo que em cada ponto da combinação é removida uma molécula de água. Desse modo, a unidade da cadeia é a chamada unidade anidroglicósica (fig. 2.1.1).

Na figura 2.1.2 está representada a cadeia celulósica, onde o carbono da posição 1 de um anel está ligado ao carbono 4 do seguinte. Observa-se que os sucessivos anéis de glicose não se encontram em posições geometricamente equivalentes, e sim com uma

rotação de 180° em relação ao eixo de cadeia. A unidade repetidora estrutural, portanto, consiste de duas unidades anidroglicósicas.

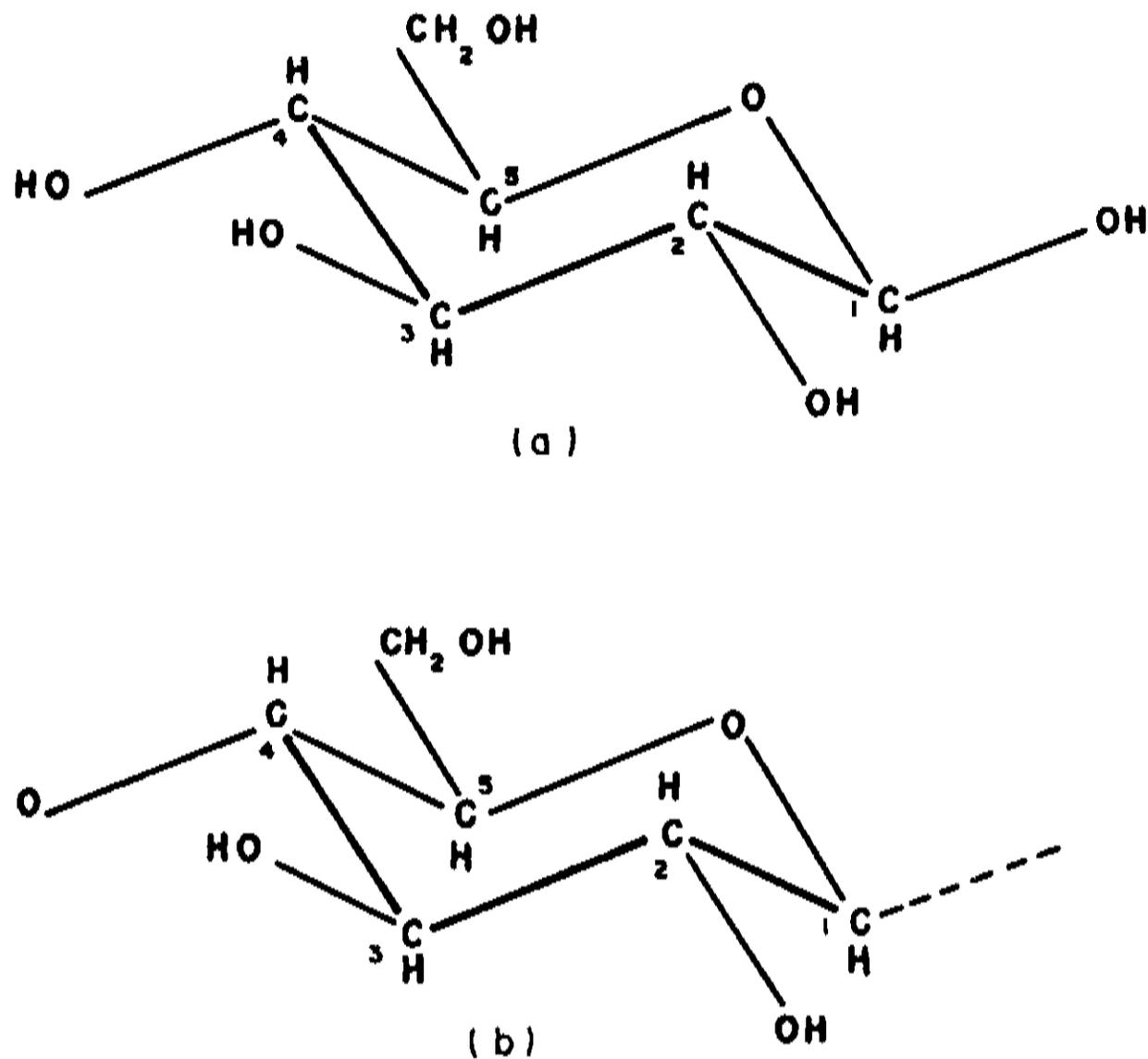


Fig. 2.1.1 - Estrutura: a) do anel de glicose; b) da unidade anidroglicósica

A conformação dos anéis de glicose é em forma de sela, a qual se ajusta bem à periodicidade de 10,3 Å característica da cadeia celulósica (Nissan e colaboradores, 1966).

Numa estrutura com um grande número de átomos de oxigênio e hidrogênio, se estes se encontrarem próximos um do outro (a distância de 3 Å ou menos), eles interagem formando pontes de hidrogênio intra e intermoleculares.

Liang e Marchessault, 1959, verificaram, através de

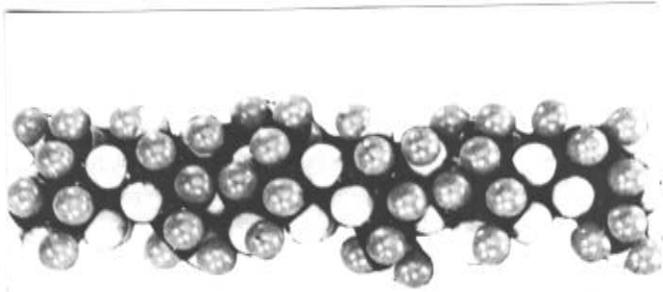
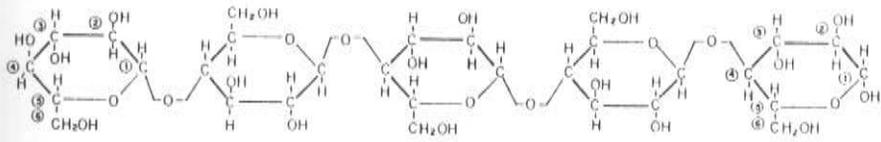


Fig. 2.1.2 - A cadeia celulósica e um modelo da molécula de celulose (Battista, 1975)

espectroscopia do infravermelho, a existência de uma ponte de hidrogênio intramolecular entre a hidroxila do carbono 3 e o oxigênio do anel da unidade anidroglicósica contígua (fig. 2.1.3). As hidroxilas são também responsáveis por pontes de hidrogênio intermoleculares.

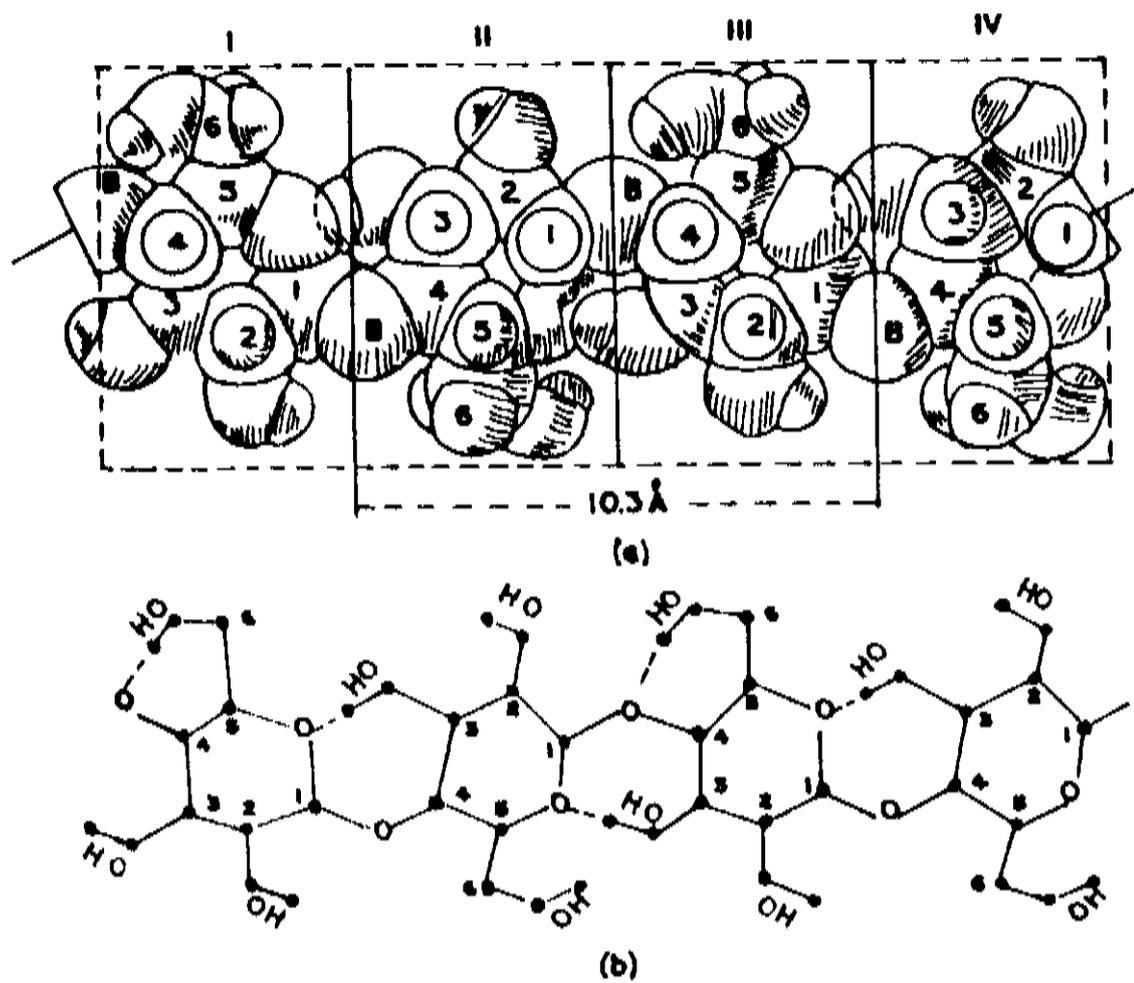


Fig. 2.1.3 - a) Modelo atômico da celulose; b) Pontes de hidrogênio intramoleculares (Nissan e colaboradores, 1966)

2.1.3. Estrutura Cristalina

O primeiro modelo detalhado de uma estrutura cristalina para a celulose nativa (celulose I) foi proposto por Meyer e Misch, em 1937 (citado em Howsmon e Sisson, 1954). Esse modelo postula uma cela unitária monoclinica, com as seguintes dimensões: $a = 8,35 \text{ \AA}$, $b = 10,3 \text{ \AA}$, $c = 7,9 \text{ \AA}$, $\beta = 84^\circ$. (Fig. 2.1.4) Para os

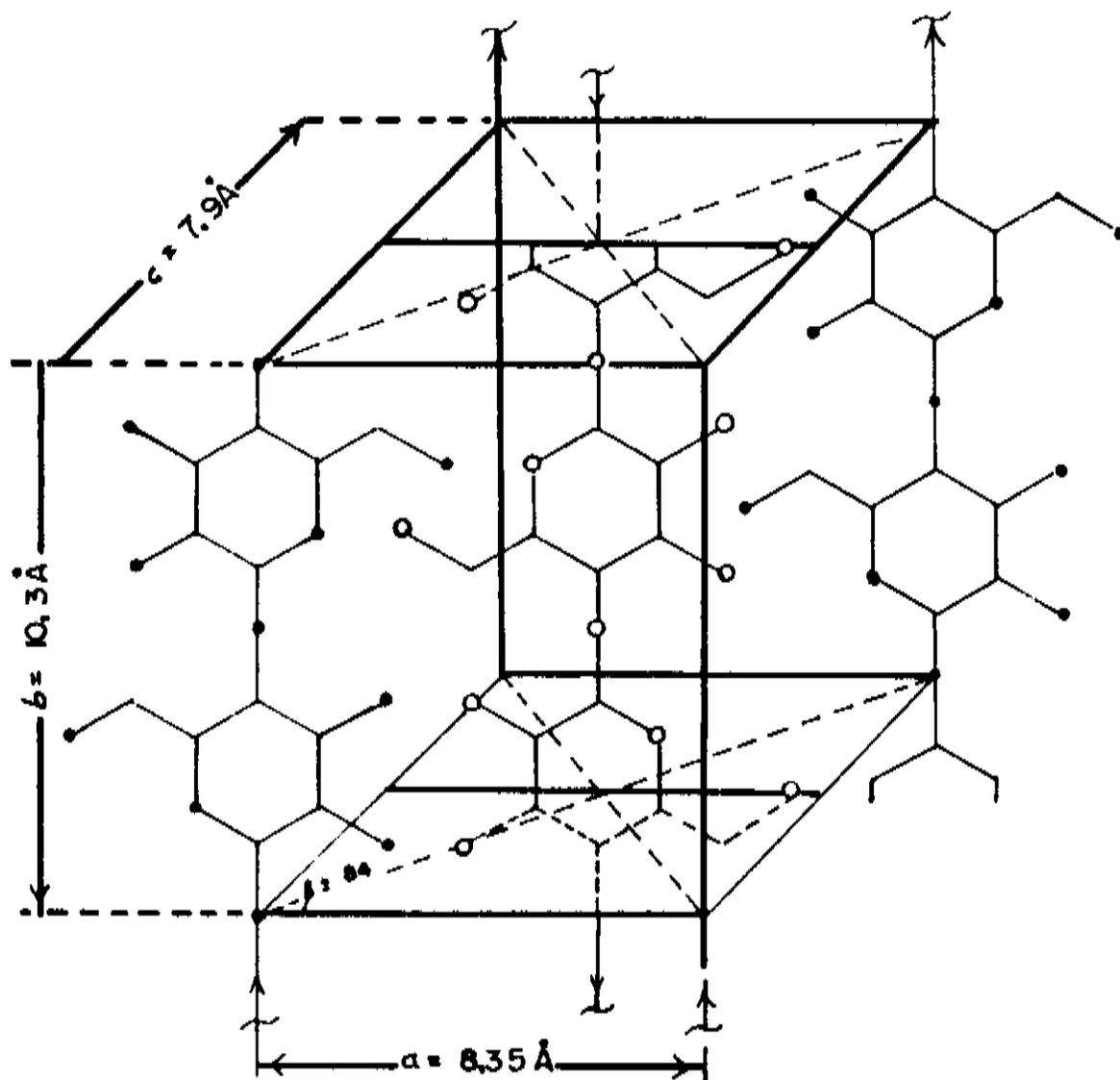


Fig. 2.1.4 - Cella unitária da celulose nativa (Howsmon e Sisson, 1954)

polissacarídeos geralmente o eixo molecular de simetria (o eixo ao longo da cadeia) coincide com aquele eixo da cela unitária cuja orientação é a mesma da fibra; é o chamado eixo da fibra. Tradicionalmente para a celulose o eixo da fibra é tomado como eixo b (Marchessault e Sarko, 1967).

Cada cela contém quatro unidades anidroglicósicas, cujos planos coincidem com o plano ab, sendo o eixo da cadeia paralelo ao eixo b da cela unitária. Esta cela unitária pertence ao grupo espacial $P2_1$, com o eixo binário de rotação paralelo ao eixo da fibra (Walton e Blackwell, 1973). Chegou-se a essa constatação

devido à ausência sistemática de interferências ($0 \ k \ 0$) de ordem ímpar (Legrand, 1952), sendo a interpretação usual desse grupo espacial como um eixo binário de rotação (com deslocamento de $\frac{b}{2}$, isto é, meia altura da cela unitária, acompanhado de uma rotação de 180°), que se desenvolve paralelamente ao eixo b da cela unitária monoclinica (Jones, 1971).

Desse modo, a cela unitária é constituída por duas cadeias, cada uma contendo um eixo binário de rotação na direção do eixo b (fig. 2.1.4). A cadeia que atravessa a face ac (cadeia central) é deslocada, ao longo do eixo b, em relação à cadeia do canto da cela, de modo que uma unidade anidroglicósica ocorre aproximadamente no centro da cela.

Segundo o modelo de Meyer e Misch, as cadeias celulósicas assumem orientações alternadas (indicadas pelas flechas na fig. 2.1.4), mas ainda não se tem indicações precisas a esse respeito. O argumento usado para esse modelo tem bases estatísticas, mas não tem aceitação definitiva, pois não considera, do ponto de vista energético, o empacotamento mais favorável das cadeias (Marchessault e Sarko, 1967). Mas a estrutura proposta satisfaz as exigências do grupo espacial $P2_1$, independentemente das cadeias serem paralelas, antiparalelas, ou terem uma orientação aleatória.

Uma solução possível foi proposta por Jones, 1960, que, partindo de um modelo estatístico, sugeriu uma estrutura com uma distribuição aleatória da polaridade das cadeias, tendo as cadeias adjacentes um deslocamento característico ao longo do eixo b quando forem de orientação paralela, e um deslocamento mútuo

diferente quando antiparalelas.

A cela unitária proposta por Meyer e Misch tem sido geralmente adotada para a celulose nativa. Wellard, em 1954, estudou as variações nas dimensões da cela unitária para vários tipos de celulose nativa, de acordo com a origem (linho, algodão, rami, celulose bacteriana e outros). Foram observadas pequenas diferenças nos parâmetros de rede obtidos. Com base no trabalho de Wellard e também nos de outros autores, adota-se atualmente os seguintes valores para os parâmetros de rede da celulose I:

$$a = 8,17\text{\AA} ; b = 10,34\text{\AA} ; c = 7,85\text{\AA} ; \beta = 83,6^\circ$$

Os valores de a e c , bem como do ângulo β apresentam pequenas variações, dependendo da origem da celulose nativa; os valores adotados são provavelmente uma média, ou um valor ideal, do qual os valores obtidos por vários autores se aproximam mais ou menos, dependendo da fonte ou do tratamento sofrido pela amostra. Também devido ao fato de não ser possível a obtenção de um cristal de celulose, torna-se impossível a definição exata da cela unitária. Obtém-se então aproximações que dependem de distorções da rede em agregados policristalinos.

2.1.4. Conformação da Cadeia Celulósica

O modelo proposto por Meyer e Misch supõe uma conformação da cadeia que pode ser chamada de "reta" (fig. 2.1.5). Esse modelo resulta numa distância pequena entre os átomos O_2-C_6 .

(Átomos marcados com " ' ", pertencem ao anel adjacente àquele dos não marcados, na mesma cadeia). Hermans e colaboradores, com base na construção de modelos por considerações estereoquímicas propõem uma configuração "dobrada", obtida de uma rotação em torno das ligações glicosídicas. (Marchessault e Sarko, 1967).

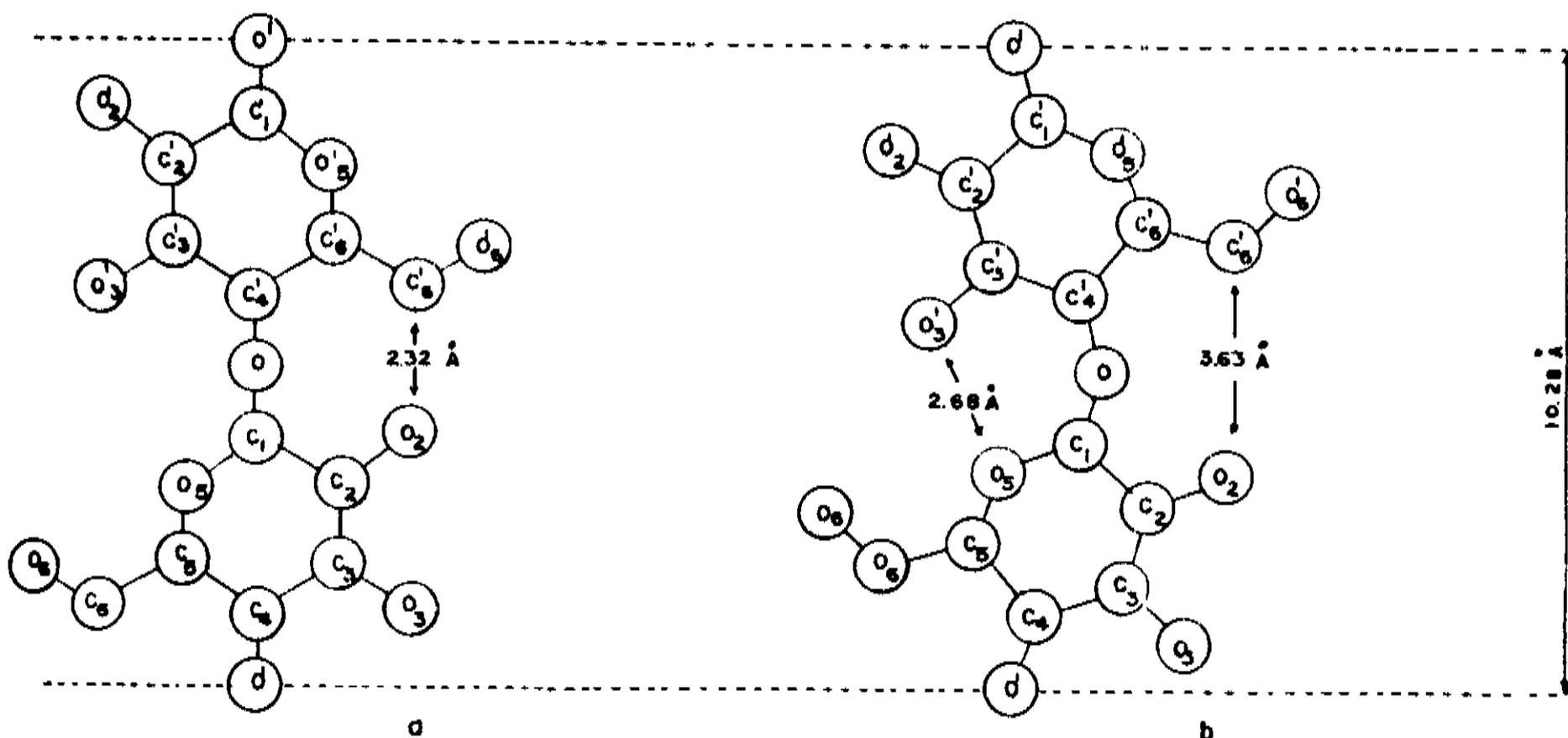


Fig. 2.1.5 - Configurações da cadeia celulósica: a) "reta";
b) "dobrada" (Marchessault e Sarko, 1967)

Esse arranjo fornece uma distância mais aceitável entre os átomos O₂-C₆, (3,63Å), além de permitir uma ponte de hidrogênio intramolecular O₅-HO₃, com uma distância de 2,68Å.

Quanto a pontes de hidrogênio intermoleculares, Jones, 1958, com base em dados de infravermelho, raios-X e critérios estequiométricos, propõe uma estrutura que envolve duas pontes de

hidrogênio intramoleculares ($O_3 \dots O_5$, e $O_2 \dots O_6$,) nos dois lados de cada cadeia, com pontes intermoleculares indo de O_6 a O_3'' (da cadeia adjacente), unindo assim as cadeias em camadas (002) (fig. 2.1.6a). Uma outra possibilidade seria a formação de camadas (002) como na fig. 2.1.6b, com O_6 ligado tanto a O_2'' como O_3'' das cadeias adjacentes.

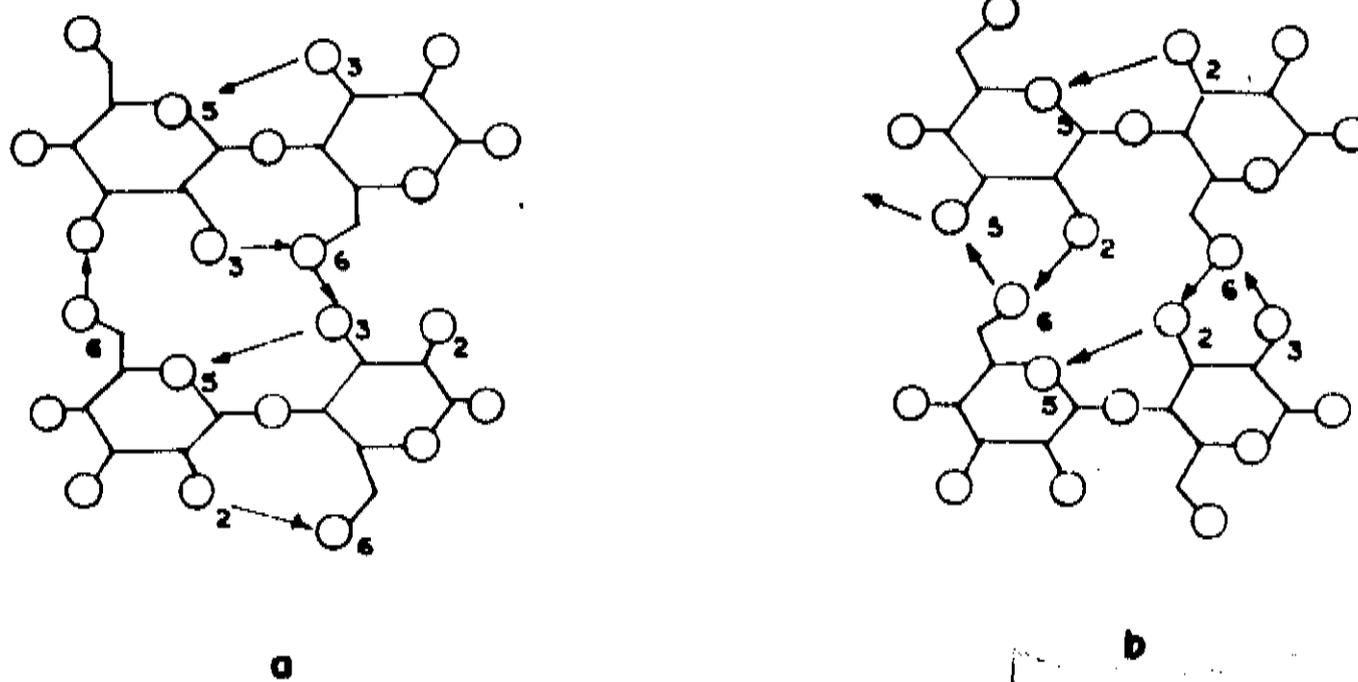


Fig. 2.1.6 - Sistema de pontes de hidrogênio planares (plano 002) proposto para celulose I; b) segundo sistema proposto (Jones, 1958)

2.1.5. Formas Polimórficas

A celulose nativa, obtida de plantas como algodão, rami, juta, etc. é conhecida como celulose I. Existem pelo menos cinco formas polimórficas da celulose reconhecidas pelos distintos

diagramas de difração de raios X (Jones, 1971, Ellefsen e Tønnesen, 1971). Todas as formas têm em comum o parâmetro b (eixo da fibra), de 10,3Å.

Através do tratamento da celulose nativa (algodão e polpas de madeira) com soluções suficientemente concentradas de hidróxido de sódio, obtém-se a forma alotrópica celulose II, também chamada de hidrato de celulose, celulose regenerada ou mercerizada. Esse processo, conhecido como mercerização, foi criado por Mercer, em 1845. As fibras assim obtidas são mais resistentes que as de algodão nativo, além de terem maior capacidade de tingimento. A forma polimórfica de celulose II é estável, sendo irreversível o processo de transição da celulose I para II. Considera-se, portanto, a celulose II uma estrutura energeticamente mais estável que a celulose nativa (Walton e Blackwell, 1973).

A figura 2.1.7 mostra a projeção no plano a-c das celas unitárias da celulose I (nativa) e da celulose II (mercerizada).

A forma conhecida como celulose III é obtida a partir das duas primeiras, quando tratadas com amônia líquida, monometilamina ou monoetilamina anídrica, removendo-se subsequentemente a amônia ou amina.

Através do aquecimento das formas I ou II em água, sob pressão, ou em glicerol, obtém-se a forma conhecida como celulose IV, ou celulose de alta temperatura. Há ainda uma forma, chamada celulose X, cuja cela unitária é muito semelhante à da celulose IV, mas que apresenta diferenças significativas nas intensidades obtidas por difração de raios X. A celulose X é obtida pelo

tratamento de algodão ou polpa de madeira com ácido fosfórico ou

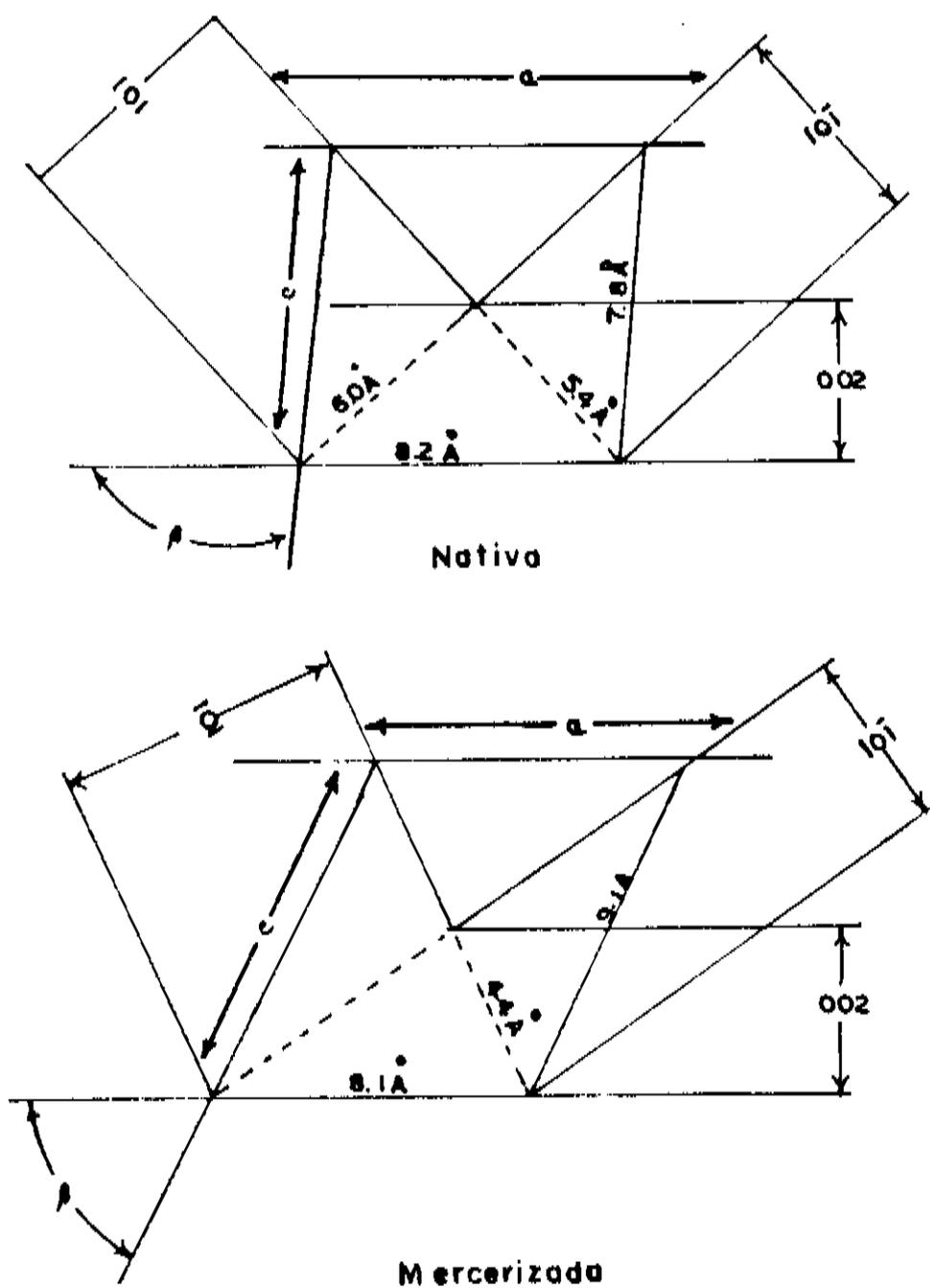


Fig. 2.1.7 - Projeção no plano a-c das celas unitárias da
a) celulose I (nativa); b) celulose II
(mercerizada) (Nissan e colaboradores, 1966)

hidroclórico concentrado.

Na Tabela abaixo são indicados os parâmetros da cela

unitária para as formas polimórficas da celulose (Walton e Blackwell, 1973)

Forma	a	b	c	β
	(Å)	(Å)	(Å)	
Celulose I (nativa)	8,17	10,34	7,85	83,6°
Celulose II (regenerada)	7,92	10,34	9,08	62,7°
Celulose III (amônia)	7,74	10,3	9,9	58°
Celulose IV (alta temperatura)	8,11	10,3	7,9	90°
Celulose X	8,1	10,3	8,0	90°

2.1.6 Morfologia da Celulose Nativa

A celulose nativa, quando examinada ao microscópio eletrônico, apresenta microfibrilas longas, cuja seção transversal varia de 100 a 250Å, dependendo de sua origem. Essas microfibrilas, com cadeias paralelas ao eixo fibrilar, foram consideradas durante muito tempo como a unidade básica supermolecular da celulose (Sarko e Marchessault, 1969). Atualmente, se reconhece a presença de fibrilas regulares com largura de 35-40Å, em todas as celulosas. Essas unidades foram chamadas de "fibrilas elementares" por Frey-Wissling e Muhlethaler, 1963. Segundo esses autores, essas unidades contém aproximadamente 36 cadeias moleculares (fig. 2.1.8). São rígidas, de comprimento indefinido e supõe-se que tenham um alto grau de cristalinidade. Essas fibrilas elementares seriam a unidade estrutural fundamental produzida na biossíntese da celulose.

O fato da unidade estrutural da celulose nativa ser a fibrila elementar, de 35Å, foi evidenciado por microscopia

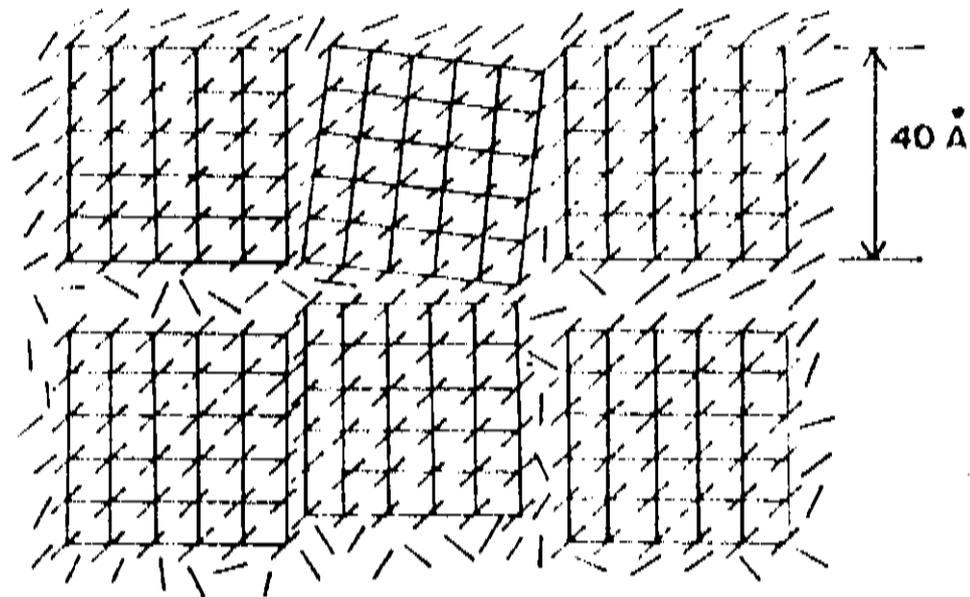


Fig. 2.1.8 - Seção transversal das "fibrilas elementares", cada uma com aproximadamente 40 cadeias moleculares (Sarko e Marchessault, 1969)

eletrônica. Mas medidas por difração de raios X indicam em geral larguras de cristalito maiores, entre 50 e 100Å (Nieduszynski e Preston, 1970). Isso sugeriria a união das fibrilas elementares em microfibrilas maiores, com a formação de agregados (Walton e Blackwell, 1973).

O termo microfibrila se aplicaria então para descrever os agregados naturais, de aproximadamente 250Å de espessura, que

formam as camadas das paredes celulares; haveria também unidades menores, termodinamicamente mais estáveis, com aproximadamente 100Å de espessura, compostas de duas ou três fibrilas elementares (Nissan e colaboradores, 1966).

Existem alguns modelos propostos para o arranjo das moléculas de celulose nas fibrilas elementares. Um desses modelos é o da cadeia dobrada (Manley, 1964), que poderia dar uma explicação para o empacotamento antiparalelo das moléculas de celulose, segundo a cela unitária proposta por Meyer e Misch. O fenômeno da cadeia dobrada é um mecanismo universal entre os polímeros sintéticos, quando estes são cristalizados a partir de solução. Como a celulose, bem como outros polímeros naturais, são inerentemente insolúveis no meio em que são biossintetizadas (Sarko e Marchessault, 1969), suas moléculas devem ser sintetizadas e cristalizadas simultaneamente e parece razoável supor-se que nesse caso irá prevalecer a conformação da cadeia estendida. Segundo Mühlethaler, 1969, há evidências de uma conformação dobrada para os derivados da celulose, mas não para a celulose nativa.

Statton (1967) propôs um arranjo estrutural para os polímeros: nesses compostos, onde se pode obter um estado cristalino quase perfeito, as desordens podem ser causadas por deslocação. Esses defeitos aparecem nas extremidades das moléculas. Baseado nesse ponto de vista, Mühlethaler, 1969, propôs um modelo como o da figura 2.1.9. Segundo esse esquema, as moléculas estão deslocadas ao longo do eixo da fibrila, havendo então uma distribuição aleatória de suas extremidades. Assim,

mesmo havendo ordem elevada, como essas deslocções são encontradas ao longo de toda a fibrila elementar, torna-se difícil uma separação entre áreas cristalinas e paracristalinas.

Quanto ao mecanismo da formação fibrilar, este ainda não

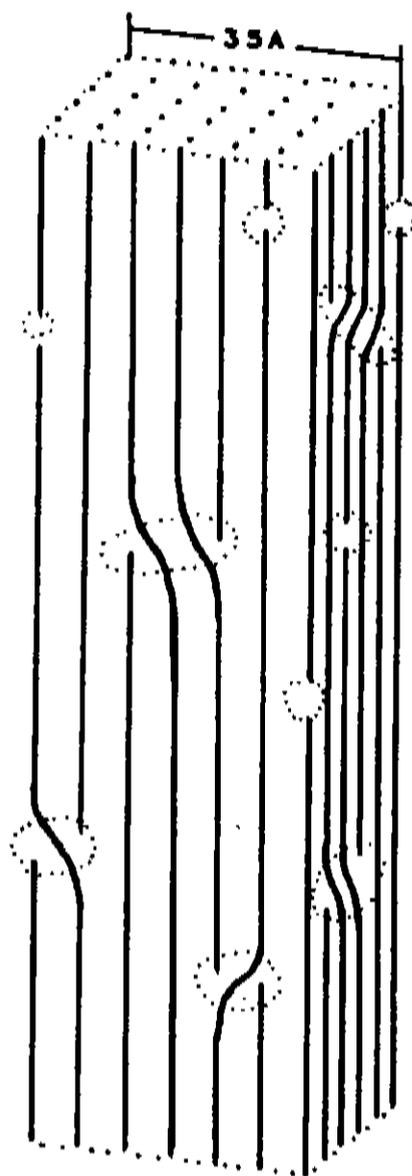


Fig. 2.1.9 - Modelo estrutural da fibrila elementar da celulose (Mühlethaler, 1969)

é bem conhecido. Há indicações de que, no primeiro estágio, são sintetizadas longas cadeias de moléculas, que se associam longitudinalmente por meio de forças de van der Waals. Essas moléculas então se associam, cristalizando-se parcialmente, de modo a minimizar a energia livre, com a consequente formação das microfibrilas (Mühlethaler, 1969).

A parede da célula da planta é composta de duas camadas: a parede primária e a secundária (fig. 2.1.10). Na parede primária, as microfibrilas formam uma estrutura entrelaçada, tendo sido observadas deposições em multicamadas (Nissan e colaboradores, 1966). No caso do algodão, ainda antes de ser completada a deposição da parede primária, quando a fibra de algodão atingiu 90% de seu comprimento total, tem início a deposição da parede secundária, a qual é formada por anéis concêntricos de celulose. Nessa parede, há uma orientação helicoidal das microfibrilas. O ângulo da hélice permanece quase constante ao longo da fibra (Morton e Hearle, 1975). A primeira camada da parede secundária difere bastante das subsequentes, tanto na estrutura como no ângulo de orientação microfibrilar. Essa orientação, nas paredes secundárias, inverte seu sentido em vários pontos da fibra, passando de hélice S para Z e vice-versa. Esses pontos de reversão são locais de baixa resistência e alto grau de cristalinidade. O ângulo de hélice é sempre o mesmo, segundo Morosoff e Ingram (1970), independentemente da variedade genética, e tem seu valor entre 20-23°.

Quanto ao grau de polimerização, é difícil a obtenção de dados precisos, devido à incerteza introduzida pela dissolução da celulose em um solvente adequado e demais procedimentos analíticos, que podem envolver certa degradação. Considera-se atualmente que um grau de polimerização de 5000 representa um valor médio para a celulose nativa, mas já foram registrados valores bem maiores, chegando até 10.000 para a celulose de madeira. O grau de polimerização cresce da parede primária para a

secundária.

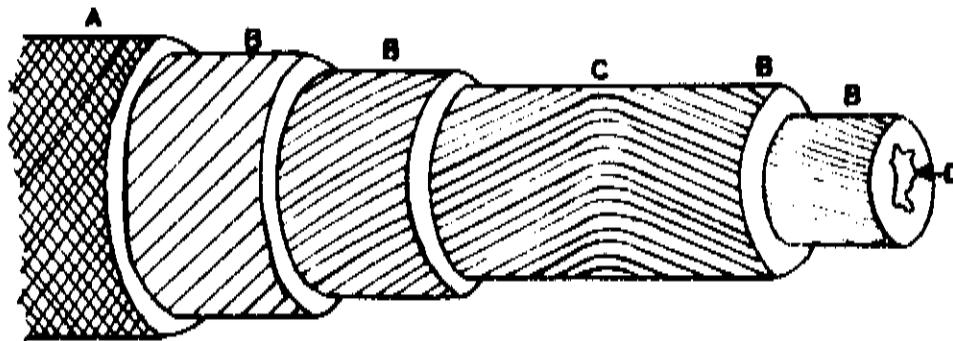


Fig. 2.1.10 - Modelo da parede celular da fibra de algodão: a) parede primária; b) paredes secundárias; c) inversões; d) lumen (Nissan e colaboradores, 1966)

2.2. Colágeno

2.2.1. O Colágeno e sua Estrutura Molecular e Fibrilar

O colágeno (termo derivado de palavras gregas, significa produtor de cola), em suas várias modificações, é a proteína mais abundante do reino animal, o principal constituinte de uma enorme gama de espécies vertebradas e invertebradas. Ocorre em tecidos tão diversos como ossos, pele, tendões, córnea, vasos sanguíneos e tecidos membranosos. Trata-se de uma proteína cujo papel, em tecidos maduros, é essencialmente estrutural (Traub e Piez, 1971). Caracteriza-se por formar fibras insolúveis, com grande resistência à tração.

Do ponto de vista citológico, a principal característica do colágeno é o fato de ser um componente extracelular do organismo (Durand e Favard, 1972). Em todos os tecidos conjuntivos onde se encontre o colágeno, as células desses tecidos se encontram dispersas, distantes umas das outras, e imersas num material intersticial compacto abundante, chamado matriz, que contém o colágeno.

A matriz é formada principalmente por numerosos feixes de filamentos, observáveis através de microscópio ótico. Esses filamentos constituem as fibras de colágeno, isto é, agregados fibrilares ordenados, com diâmetro que varia de algumas dezenas a centenas de microns (Bear, 1952). Os componentes menores constituem as fibras primitivas (diâmetro de 2 a 10 μ), as quais, através de meios químicos ou mecânicos podem ser subdivididas em fibrilas, que requerem o microscópio eletrônico para sua adequada

resolução.

As fibrilas constituem a unidade característica do colágeno pois, apesar de haver ainda possibilidades de clivagem "horizontal", é nas fibrilas que se encontra o que se poderia chamar de colágeno "puro", enquanto as unidades maiores já contêm certos componentes celulares e polissacarídeos.

As fibrilas são extremamente longas e seu diâmetro pode variar desde 1000-3000Å em tendões maduros até 160Å em tecido especializado, como o da córnea. Quando observada ao microscópio eletrônico, uma fibrila aparece como um conjunto regularmente espaçado de bandas e interbandas perpendiculares ao seu eixo (fig. 2.2.1). Essas bandas e interbandas, que motivam o aspecto estriado das fibrilas, repetem-se segundo um período de aproximadamente 650-700Å (Durand e Favard, 1972).

Essa periodicidade, observada também através da difração de raios-X a baixo ângulo (Bear, 1952) é devida a uma associação muito peculiar de unidades monoméricas quatro vezes maiores - as macromoléculas de tropocolágeno, com aproximadamente 3000Å de comprimento e 15Å de diâmetro.

2.2.2. A Molécula de Tropocolágeno: uma hélice tripla

A molécula de tropocolágeno, unidade estrutural básica do colágeno, é constituída de três cadeias polipeptídicas longas, helicoidais, que se estendem paralelamente ao longo de toda sua extensão. São as assim denominadas cadeias α (Traub e Piez, 1971).

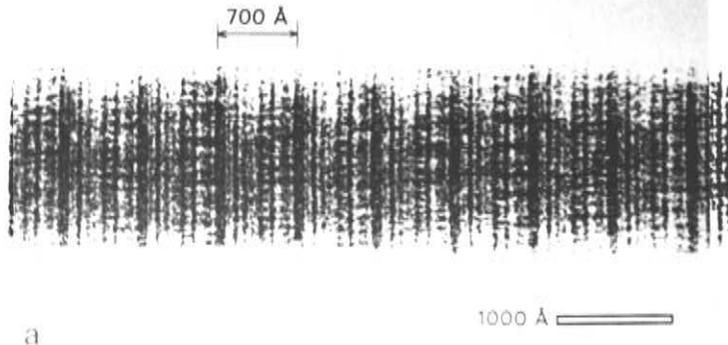


Fig. 2.2.1 - Fibra de colágeno nativo, que mostra a alternância de bandas e interbandas (Durand e Favard, 1972)

Cada uma das cadeias α contém aproximadamente 1050 resíduos de aminoácidos. Com seus 3000Å de comprimento, são as mais longa entre as cadeias polipeptídicas conhecidas no reino animal (Stryer, 1982).

A composição das cadeias α depende do tipo de colágeno. O colágeno chamado de tipo I, o mais frequentemente encontrado, é formado por duas cadeias idênticas, denominadas $\alpha_1(I)$ e uma cadeia diferente das duas primeiras por sua sequência de aminoácidos, denominada α_2 . Nos outros tipos de colágeno, as cadeias são idênticas.

As três cadeias α , helicoidais, de enrolamento sinistro,

associam-se numa superhélice de enrolamento dextro, formando a molécula, em forma de bastão, muito longa e com cerca de 15Å de diâmetro (fig. 2.2.2).

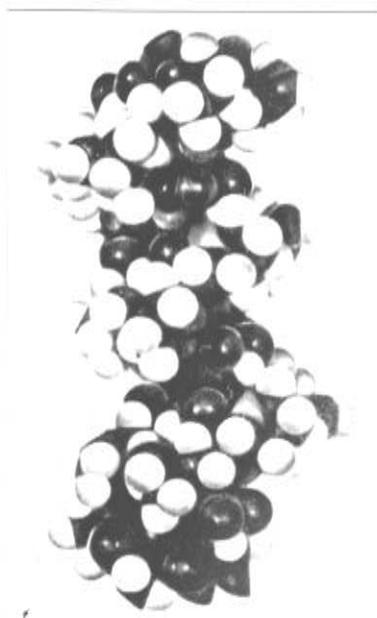
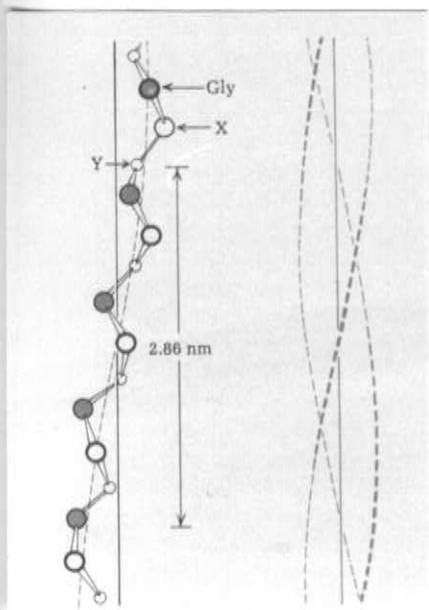


Fig. 2.2.2 - a) cadeia polipeptídica α ; b) hélice tripla; c) modelo da molécula de colágeno (Lehninger, 1975, Vainshtein, 1966)

Muitas das propriedades físicas ou biológicas de colágeno se devem às propriedades químicas dos aminoácidos que compõem as cadeias α . De cada três aminoácidos consecutivos, um é sempre a glicina, o mais simples de todos os aminoácidos. Os outros dois tipos mais frequentes são a prolina e a hidroxiprolina

que, juntos, formam 25% do total (fig. 2.2.3).

Nesse arranjo, consistindo de três hélices não coaxiais, cada uma com aproximadamente três resíduos por passo, um deles é sempre a glicina, por ser este o único aminoácido suficientemente pequeno para se encaixar no núcleo central da molécula (Ramachandran, 1967). Assim, em cada volta, haveria um átomo de

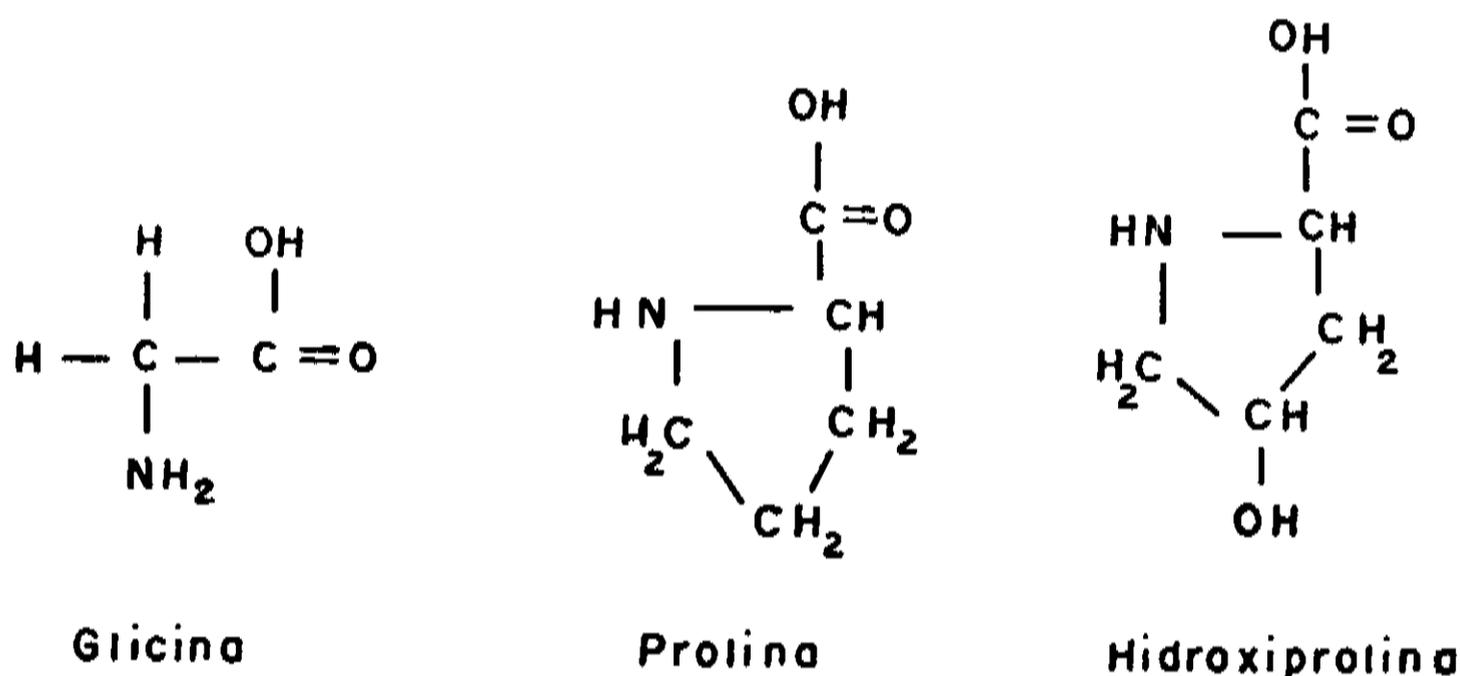


Fig. 2.2.3 - Aminoácidos mais comuns nas cadeias α

carbono ligado à glicina, internamente, e os outros dois teriam ligados a eles a prolina ou hidroxiprolina, formando cadeias laterais.

Foi a partir dessas considerações estereoquímicas, isto é, do postulado de que cada terceiro resíduo deve ser a glicina e de que a prolina e a hidroxiprolina devem se ajustar naturalmente a essa estrutura, que Ramachandran e Kartha, em 1955 (citado em Ramachandran, 1962), propuseram a estrutura em hélice tripla. A

resíduos por volta igual a 3,27 (isto é, $360/110$). Deve-se notar que não é um número inteiro.

A hélice "maior" é, portanto, de enrolamento dextro, com uma rotação de 30° no sentido anti-horário para cada três resíduos; o sentido dessa rotação é oposto ao das três hélices "menores", de enrolamento sinistro, com uma rotação de -110° no sentido horário. (Aqui foi usada a nomenclatura estabelecida por Crick, em 1953, para hélice "maior" e "menor").

2.2.3. Hidratação do Colágeno a Nível Molecular

Na hélice tripla, a altura h , correspondendo à distância entre dois átomos de carbono α é de aproximadamente 3,0Å, contra um máximo possível de 3,6Å na ligação peptídica. Isso significa que as três cadeias não se encontram completamente estendidas, o que limita a possibilidade de formação de pontes de hidrogênio entre átomos da mesma cadeia. Essa limitação vem do fato de que o empacotamento dos átomos não deve violar as distâncias limites para os menores contatos interatômicos.

Já na primeira proposta de uma estrutura de hélice tripla para o colágeno, feita por Ramachandran e Kartha, em 1955, se sugeria a existência de duas pontes de hidrogênio para cada três resíduos de aminoácidos, sendo ambas de um nitrogênio amínico para um oxigênio carbonílico de uma cadeia vizinha. Mais ou menos na mesma época, Rich e Crick, em 1961, propuseram a existência de apenas uma ponte de hidrogênio para cada três resíduos, baseados em certas restrições estereoquímicas para contactos a curta

distância.

Por meio de métodos computacionais, Ramachandran e Chandrasekharan, 1968, sugerem uma modificação da estrutura de duas pontes de hidrogênio para cada três resíduos de aminoácidos. Uma dessas ligações seria uma molécula de água formando uma ponte de hidrogênio entre dois oxigênios carbonílicos de duas diferentes cadeias peptídicas na hélice tripla. A segunda ligação seria uma ponte de hidrogênio, também através de uma molécula de água, entre um grupo N-H e um oxigênio carbonílico, de duas cadeias diferentes. Por esse modelo, haveria duas moléculas de água para cada três resíduos de aminoácidos, uma das quais agindo como receptor de uma ligação NH ... O.

Na figura 2.2.5 observa-se uma vista lateral de duas das três cadeias, chamadas A e B, para um comprimento de aproximadamente 10Å, isto é, uma altura de três unidades peptídicas.

Desse modo, a estrutura descrita acima, que seria aquela energeticamente mais favorável, é estabilizada por uma série de ligações secundárias intercadeias, ocorrendo regularmente, a intervalos aproximados de 3Å ao longo da hélice tripla. Em particular, há as seguintes ligações entre as cadeias A e B (os índices indicam a posição dos átomos na cadeia):

	cadeia A		cadeia B
- a nível de 1A:	(CO) ₁	HO ₂ ^W H ... (OC) ₀
- a nível de 4A:	(CO) ₁	...	HO ₁ ^W ... (HN) ₁
- a nível de 7A:	(NH) ₃	(OC) ₂

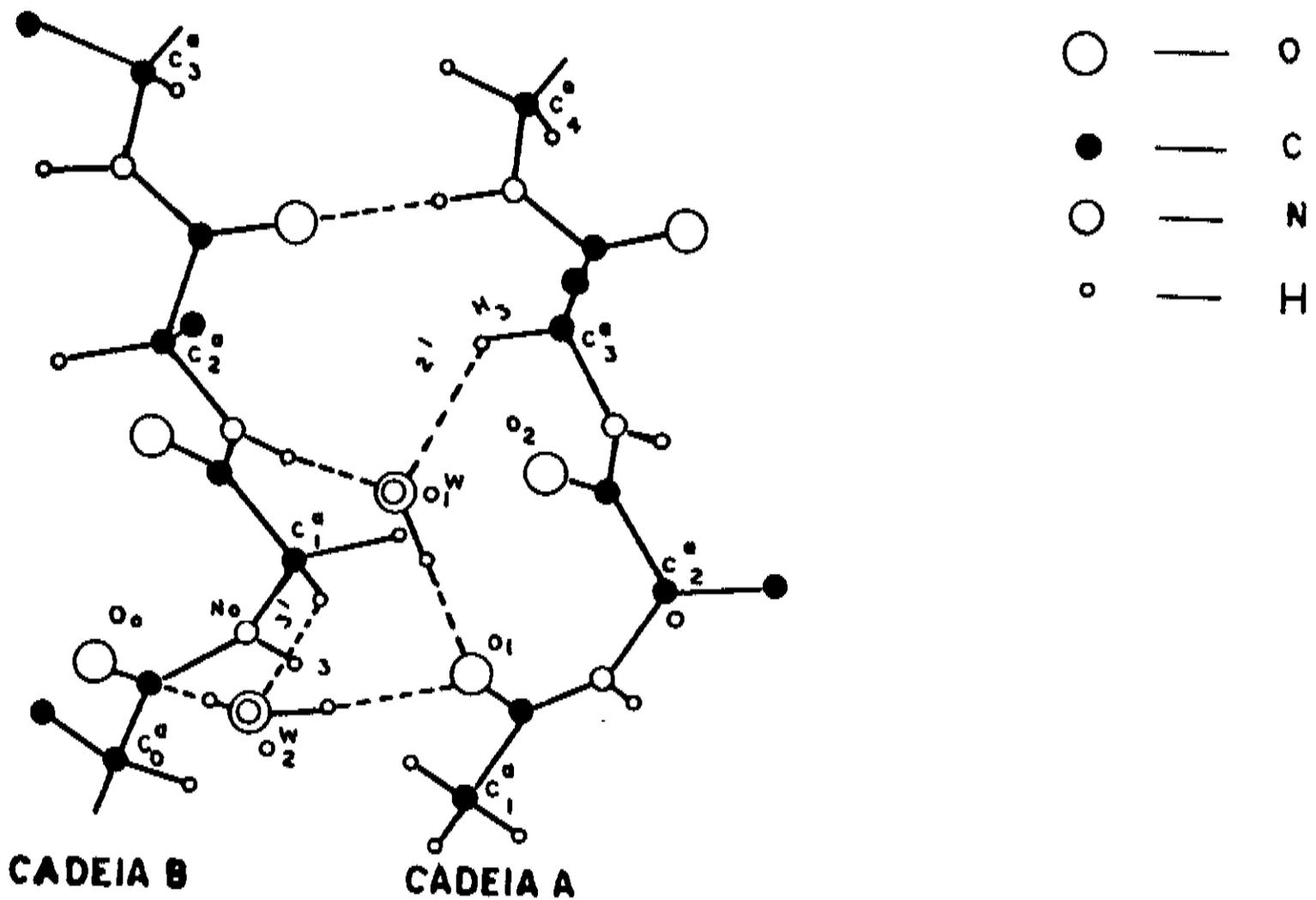


Fig. 2.2.5 - Vista lateral das cadeias A e B, num comprimento de 10Å (Ramachandran e Chandrasekhasan, 1968)

Esta última, a mais estável, ocorre mais profundamente dentro da cadeia tripla.

Assim, as cadeias vizinhas na hélice tripla se mantêm juntas através das ligações de valência secundária que ocorrem regularmente a intervalos de aproximadamente 3Å ao longo do comprimento da molécula. Moléculas de água adicionais são ligadas à periferia da molécula e contribuem para estabilizar a estrutura do colágeno.

2.2.4. Associação das Moléculas de Tropocolágeno em Fibrilas

A disposição espacial das moléculas de tropocolágeno para formar as fibrilas é que explica a periodicidade de aproximadamente 670Å observada nas fibras de colágeno, não só pela microscopia eletrônica como também pela difração de raios X a baixo ângulo (Tomlin e Worthington, 1956). Essa periodicidade pode variar de 600 a 700Å, dependendo do tipo de colágeno e da espécie animal.

Um registro axial preciso da associação das moléculas em fibrilas foi estabelecido por Hodge e Petruska, em 1963 (citado em Eyre, 1980).

Axialmente, as moléculas se dispõem em filas paralelas, com o extremo de cada molécula defasado em 0,1,2,3 ou 4D do extremo das moléculas das filas vizinhas, sendo $D = 1/4.4$ do comprimento da molécula, isto é, D tem uma dimensão aproximada de 670Å, o que corresponde a 234 ± 1 resíduos de aminoácidos, para o colágeno de tipo I (fig. 2.2.6).

Essa distribuição é tal que se produzem "buracos", de comprimento 0,6D entre os extremos de duas moléculas consecutivas. Por isso, as fibrilas apresentam regiões com geometria lateral distinta: regiões de comprimento 0,6D, onde se localizam os buracos, e regiões com 0,4D, onde há superposição molecular e portanto os segmentos moleculares se encontram num arranjo mais uniforme.

A sequência de aminoácidos apresenta uma periodicidade de 670Å na ocorrência de aminoácidos carregados e não carregados,

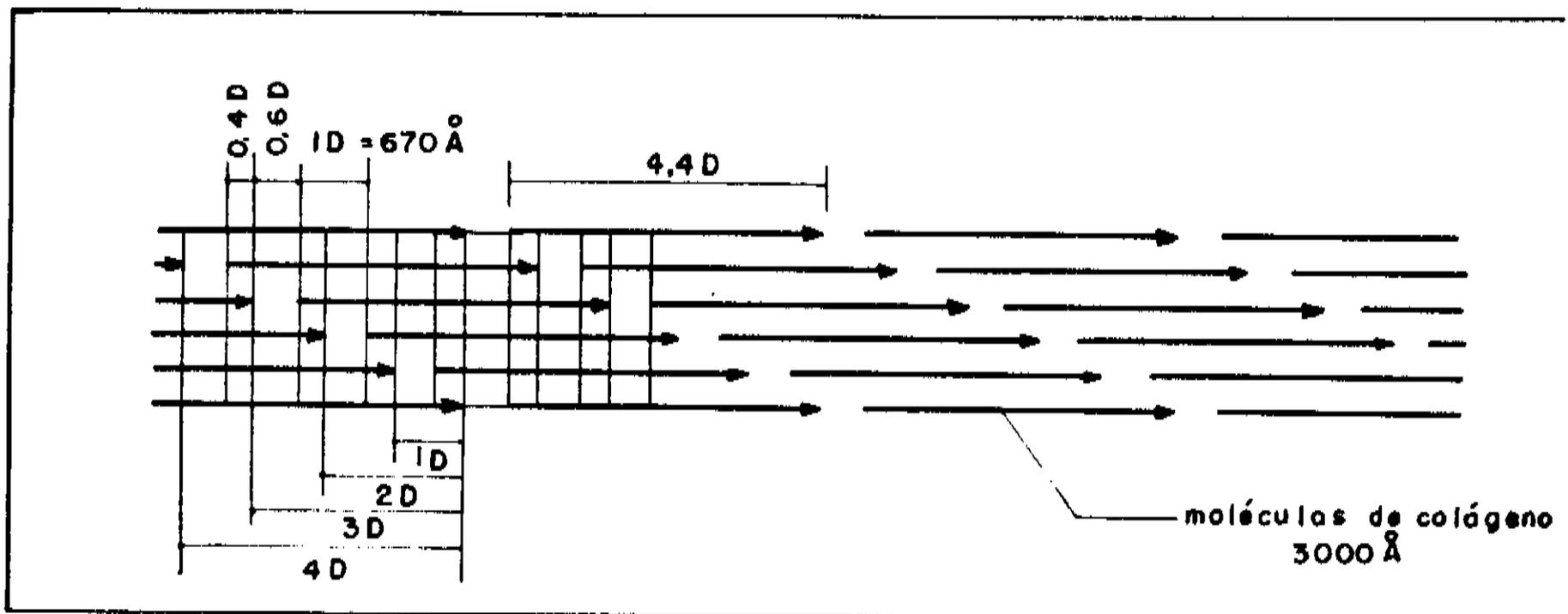


Fig. 2.2.6 - Associação das moléculas em fibrilas (Eyre, 1980)

e os dois tipos de resíduos se agrupam de maneira bastante regular (Miller, 1980). É nessa periodicidade, portanto, que se origina a disposição das moléculas de colágeno na formação das protofibrilas, sendo a defasagem periódica determinada pelas interações iônicas entre as cadeias laterais dos aminoácidos de duas moléculas adjacentes.

Em resumo, a estrutura do colágeno desde a sequência primária até a fibrila é a seguinte (fig. 2.2.7) (Eyre, 1980).

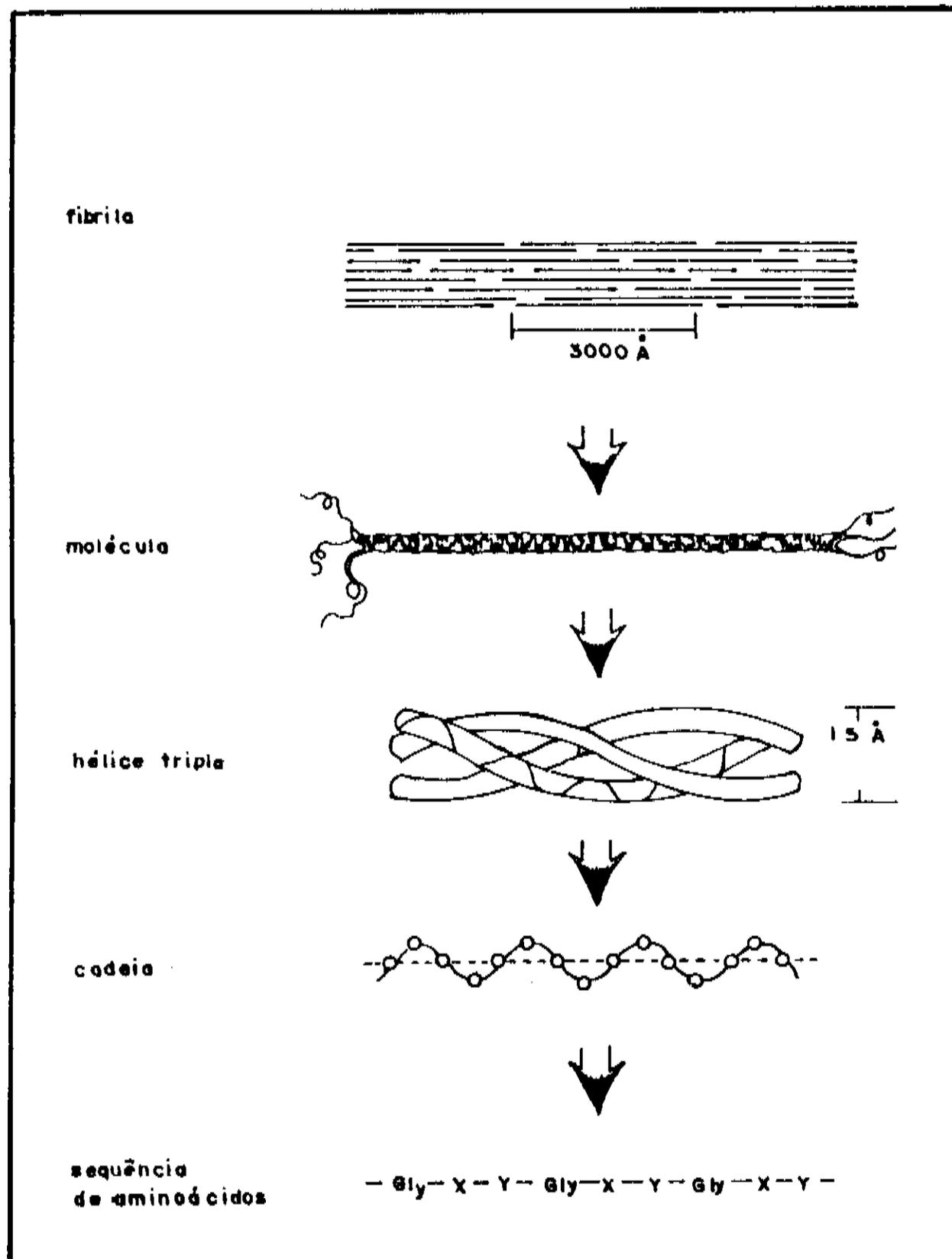


Fig. 2.2.7 - Estrutura do colágeno, desde a sequência primária até a fibrila (Eyre, 1980)

A subestrutura lateral das fibrilas, e o empacotamento destas nas fibras de colágeno não está completamente elucidada. Um

nível intermediário de organização seria o empacotamento das moléculas em subunidades, as microfibrilas.

Miller e Wray (1971) propõem um modelo, baseado em resultados de difração de raios X a médio ângulo, em que as moléculas de tropocolágeno seriam empacotadas em feixes de cinco moléculas, que teriam o status de microfibrila devido à sua integridade física (fig. 2.2.8).



Fig. 2.2.8 - Microfibrilas, formadas por feixes de cinco moléculas (Woodhead-Galloway, 1977)

Woodhead-Galloway (1977) propõe um modelo de cristal molecular tridimensional para a fibrila, explorando a razão de 5/4 das moléculas nas regiões de superposição e buracos da fibrila.

Numa reinterpretação dos dados obtidos por difração de raios X, Hulmes e Miller (1979) propõem um novo modelo para as regiões cristalinas da fibrila, que seria um empacotamento

molecular quase-hexagonal, sem subunidades microfibrilares, o que daria então à fibrila um caráter de cristal molecular.

Utilizando radiação sincrotrônica, Svendsen e Koch (1982), obtêm evidências de que as fibrilas apresentam regiões de agregação lateral, com um empacotamento bem ordenado das moléculas de colágeno.

3. A DIFRAÇÃO DE RAIOS X E O ESTUDO DE BIOPOLÍMEROS

Para o conhecimento da estrutura de cadeias poliméricas, a difração de raios X é uma ferramenta de grande utilidade. Como o comprimento de onda dos raios X é da mesma ordem de grandeza das distâncias interatômicas, uma distribuição regular de átomos desempenha o papel de uma rede de difração de raios X. O padrão de difração depende do arranjo dos átomos na estrutura molecular, e é, portanto, uma importante fonte de informação sobre a estrutura fina do polímero.

Uma rede tridimensional é descrita em termos de uma unidade repetidora básica, a cela unitária, determinada pelas constantes a , b e c (translações axiais) e pelos ângulos entre os eixos cristalinos, α , β e γ . Conjuntos de planos igualmente espaçados na rede são expressos pelos índices de Miller, hkl , onde h , k e l definem o número de intersecções de um conjunto particular de planos, respectivamente, com os eixos a , b e c de uma cela unitária (Alexander, 1969; Walton e Blackwell, 1973).

Quando um feixe de raios X incide sobre um cristal, obtém-se reflexões intensas (interferência construtiva), quando o feixe atinge um conjunto de planos inclinados de um ângulo θ em relação ao feixe incidente, que obedeça a equação de Bragg:

$$n\lambda = 2d \sin\theta$$

onde n é um inteiro, λ o comprimento de onda da radiação e d a distância entre os sucessivos planos atômicos (fig. 3.1).

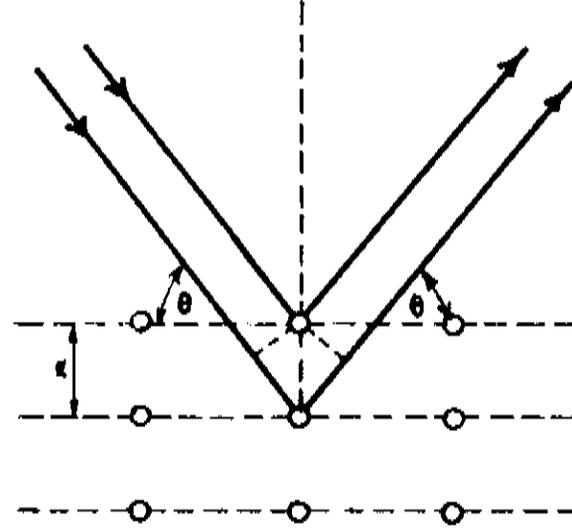


Fig. 3.1 - A reflexão de raios X por uma família de planos atômicos (Perepechko, 1981)

A geometria da difração de raios X pode ser mais facilmente visualizada quando se introduz o conceito de rede recíproca. Um conjunto de planos com espaçamento d no espaço real é equivalente a um ponto P no espaço recíproco, a uma distância igual a $1/d$ de uma origem escolhida O , de modo que OP é perpendicular ao conjunto de planos. As dimensões da rede no espaço recíproco, a^* , b^* e c^* e os ângulos entre os eixos estão relacionados com as dimensões e ângulos da cela unitária no espaço real.

Um conjunto de planos $(kh\ell)$ no espaço real se torna um ponto no espaço recíproco, e a reflexão somente ocorre quando esse ponto se situa numa esfera de raio $1/\lambda$, com um diâmetro na direção do feixe incidente e que intercepta a rede recíproca na origem. Essa esfera é chamada esfera de reflexão. O vetor da rede

recíproca ρ_{hkl} que liga o ponto correspondente aos planos (hkl) à origem é sempre perpendicular aos planos (hkl) na cela direta e seu módulo é dado por

$$|\rho_{hkl}| = \frac{1}{d_{hkl}}$$

As condições geométricas para a difração por um conjunto de planos $(h'k'l')$ são visualizadas através da figura 3.2. O centro do cristal e a origem da rede recíproca estão no ponto O . O vetor unitário s_0 designa a direção do feixe incidente de raios X.

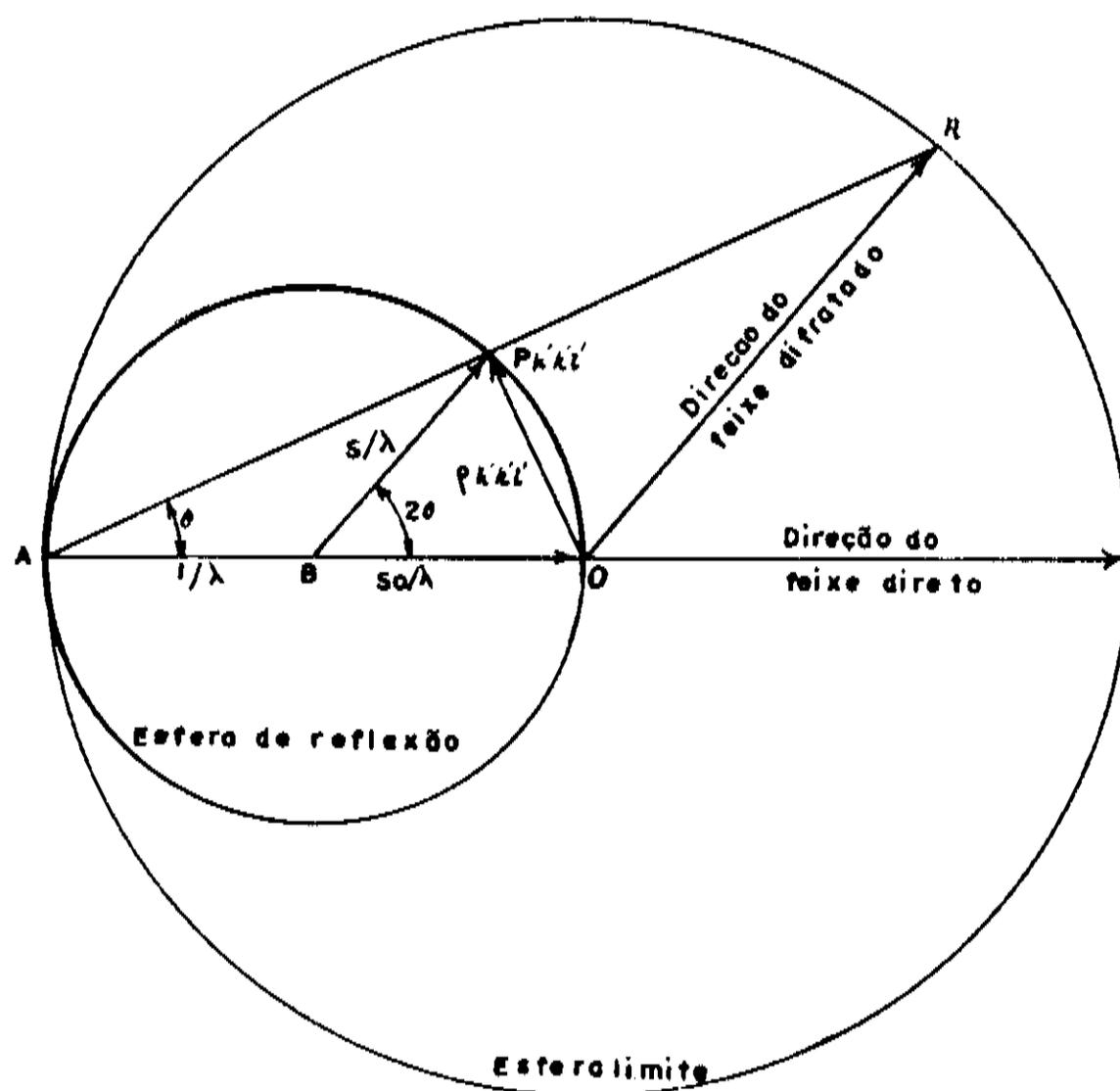


Fig. 3.2 - Condições geométricas para difração de planos $(h'k'l')$ definidas através do conceito de rede recíproca (Alexander, 1969)

O cristal e sua rede recíproca estão inclinados de modo que o ponto $P_{h'k'l'}$ intercepta a esfera de reflexão como mostra a figura.

A difração pelos planos $(h'k'l')$ ocorre nessas condições, e um raio difratado é emitido na direção s . O padrão de difração, registrado em filme fotográfico consiste de um número de pontos, cada um dos quais é resultado da reflexão de um conjunto de planos $(hk\ell)$.

As macromoléculas biológicas, em geral, não formam cristais suficientemente grandes, de modo a serem estudadas por métodos adequados para monocristais.

As estruturas fibrosas são parcialmente cristalinas, consistindo de cristalitos em forma de bastões ou faixas, num arranjo em que seus eixos longitudinais se orientam paralelamente ao comprimento da fibra; os cristalitos se encontram circundados por regiões menos cristalinas do mesmo material, ou eventualmente de um material diferente.

A orientação dos cristalitos paralela ao eixo da fibra não é perfeita, de modo que, ao invés de pontos, obtém-se arcos de difração. A figura 3.3 mostra a geometria de difração utilizada para fibras (Alexander, 1969). Geralmente, a fibra é montada com seu eixo perpendicular ao feixe incidente de raios X, sendo designada meridiano a direção no filme paralela ao eixo da fibra, e equador a direção normal a esta.

Desse modo, reflexões meridionais correspondem a espaçamentos ao longo do eixo da fibra, enquanto as equatoriais

são devidas a distâncias interplanares perpendiculares ao eixo (Crick e Kendrew, 1967).

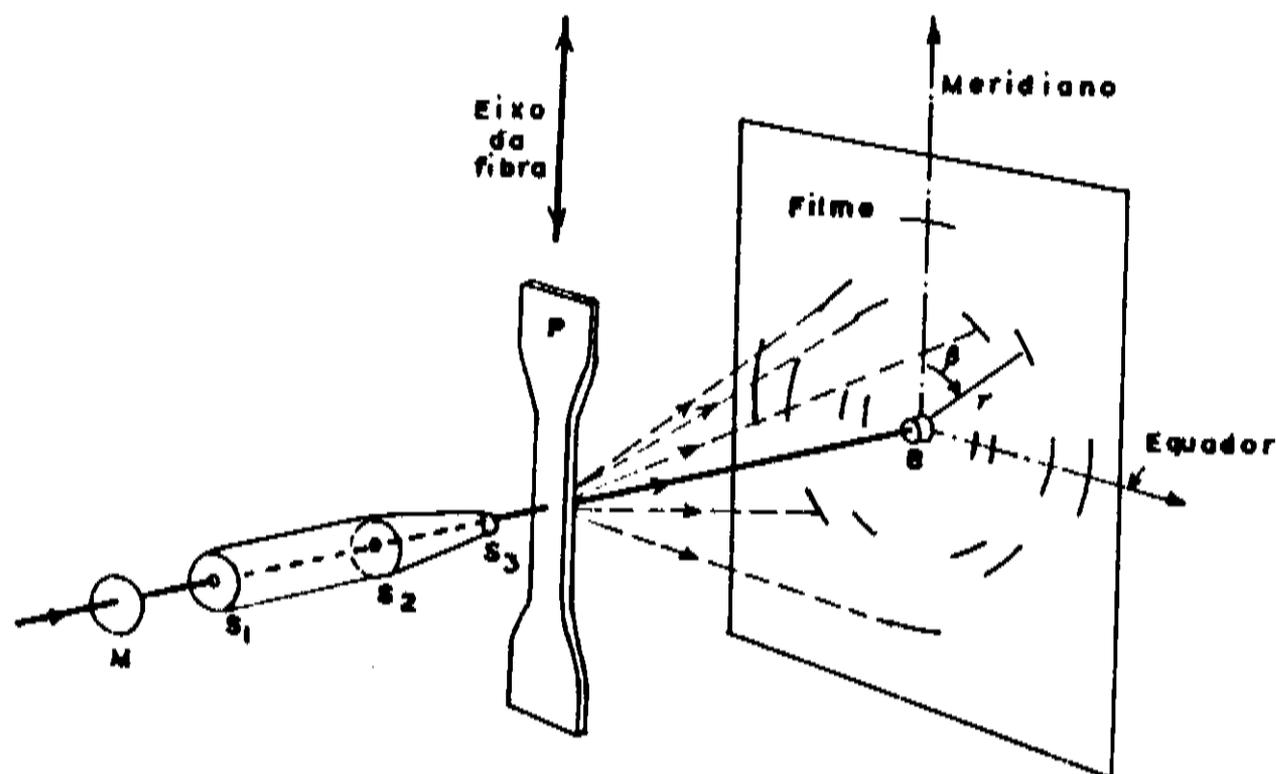


Fig. 3.3 - Geometria de difração para amostras com orientação axial (fibras) (Alexander, 1969)

Pela lei de Bragg, observa-se que, quanto maior o espaçamento d correspondente a determinado conjunto de planos, menor o ângulo θ . A chamada difração de raios X a alto ângulo dá informação sobre espaçamentos interatômicos, pois as reflexões são devidas ao espalhamento por celas unitárias sucessivas. Quando se quer informação sobre distâncias mais longas, (100Å ou mais) relacionadas com o tamanho e empacotamento dos próprios

cristalitos, utiliza-se a difração de raios X a baixo ângulo.

3.1. Cristalinidade e Tamanho de Cristalito em Fibras de Celulose

3.1.1. O Significado da Cristalinidade

Muitas das propriedades dos polímeros são intermediárias entre aquelas esperadas para um material totalmente cristalino e aquelas de material amorfo. Os diagramas de difração de raios X apresentam reflexões discretas, porém mais largas do que as de um cristal perfeito, sobre um espalhamento difuso que se estende por uma grande extensão do difratograma.

O arranjo das cadeias moleculares num sistema sólido consistindo de moléculas de celulose pode acontecer de inúmeras maneiras, das quais pode-se distinguir dois casos limites (Clark e Terford, 1955). O primeiro seria uma agregação completamente isotrópica e amorfa de cadeias orientadas e encurvadas aleatoriamente, enquanto o segundo seria um estado de perfeita ordem tridimensional, em que as cadeias se colocam paralelamente umas às outras, formando uma rede espacial regular.

As fibras de celulose, na realidade, encontram-se num estado intermediário entre esses dois casos extremos. Algumas regiões apresentam um arranjo ordenado das cadeias moleculares, que resulta em espaçamentos interatômicos que se repetem, tridimensionalmente, e que difratam raios X coerentemente. Essas são as regiões cristalinas da celulose. Entre essas regiões encontram-se outras, desordenadas, em que as cadeias podem ser deformadas e assumir formas mais ou menos encurvadas, e que seriam

as regiões chamadas de amorfas (fig. 3.1.1). Uma molécula individual pode pertencer em certos trechos a regiões cristalinas e em outros a regiões amorfas.

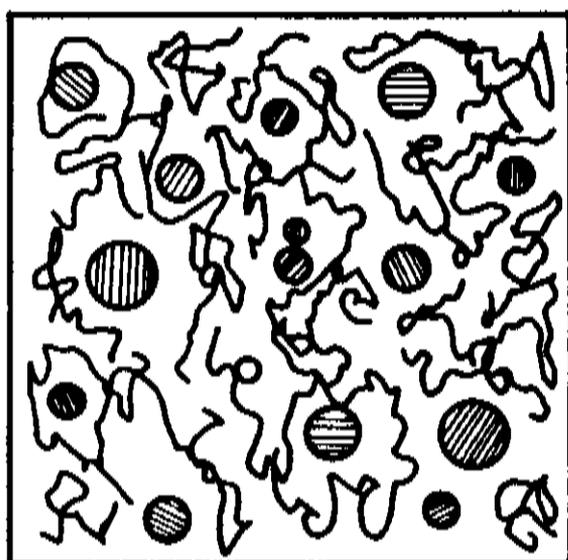


Fig. 3.1.1 - Regiões cristalinas e amorfas em celulose (Nissan e colaboradores, 1966)

Essa subdivisão entre regiões (ou fases) cristalinas e amorfas, porém, é apenas esquemática. É de se esperar que não existam limites definidos entre duas regiões, e sim transições contínuas entre elas. Mesmo nas regiões chamadas de amorfas pode haver desde cadeias quase paralelas, num arranjo mais ou menos desordenados, até moléculas numa distribuição totalmente aleatória.

Hosemann, 1962, examinou a estrutura das fibras, correlacionando-se com modelos idealizados de substâncias e suas possíveis distorções. Essas foram classificadas em distorções de

primeira ordem, aquelas em que as posições médias dos pontos representativos da rede cristalina correspondem às do cristal ideal, e distorções de segunda ordem, em que nem mesmo as médias estatísticas das posições dos pontos representativos formam uma rede ideal. Esse tipo de rede, em que há distorções de segunda ordem, é chamado de rede paracristalina.

Assim, numa rede afetada apenas por distorções de primeira ordem existe uma periodicidade que é preservada, havendo apenas deslocamentos dos elementos estruturais (átomos, unidades monoméricas) das posições de equilíbrio prescritas para os pontos da rede ideal (Alexander, 1969). Já numa rede paracristalina a ordem de longo alcance é perdida e cada ponto da rede ocupa uma posição que se relaciona mais a seus vizinhos mais próximos do que aos pontos da rede ideal. Na fig. 3.1.2 vê-se uma representação esquemática das distorções de primeira e segunda ordem.

Desse modo, observa-se que a divisão de um polímero em fases "cristalina" e "amorfa" está longe de corresponder à realidade. Apesar disso, essa idealização possibilita a caracterização de polímeros, principalmente no que se refere a certas propriedades físicas e mecânicas.

3.1.2. O Conceito de Índice de Cristalinidade

Esse conceito se aplica na suposição de um sistema de duas fases, cristalina e amorfa. Supõe-se também que as propriedades de cada fase são independentes da presença e quantidade da outra (Miller, 1966). As propriedades extensivas do

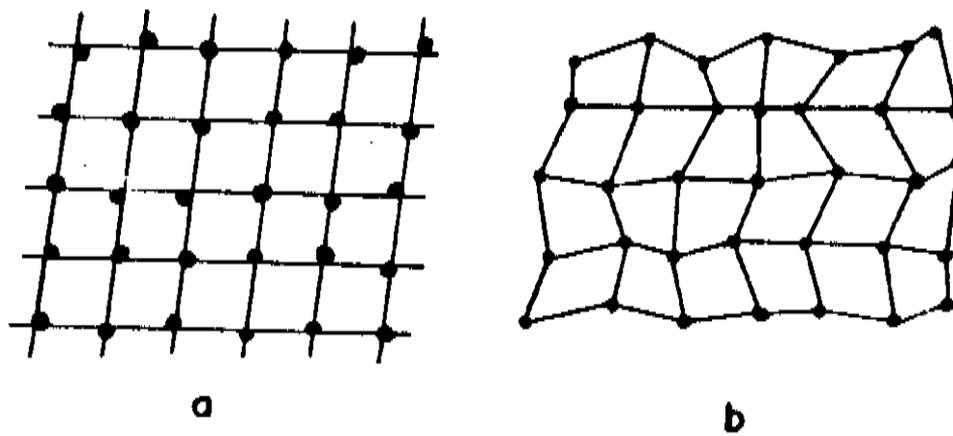


Fig. 3.1.2 - Distorções numa rede bidimensional: a) de primeira ordem; b) de segunda ordem (Vainshtein, 1966)

sistema são aditivas, isto é, a soma das propriedades extensivas das duas fases.

Seja um polímero de massa m , em que a massa da fase cristalina seja m_{cr} e a da fase amorfa m_{am} . Então $m = m_{cr} + m_{am}$. Sendo ρ a densidade e V o volume do sistema, tem-se que

$$\rho V = \rho_{cr} V_{cr} + \rho_{am} V_{am}$$

ou

$$\rho = \frac{V_{cr}}{V} \rho_{cr} + \frac{V_{am}}{V} \rho_{am}$$

Para que se possa avaliar o volume das regiões cristalinas no volume total do polímero, introduz-se o conceito de

índice de cristalinidade (Perepechko, 1981).

A quantidade $\frac{V_{cr}}{V} = K$ representa a fração relativa do volume da fase cristalina no polímero. K é chamado índice de cristalinidade, ou simplesmente cristalinidade do polímero, e pode assumir valores que variam de 1 (polímero completamente cristalino) a 0 (completamente amorfo). A quantidade $\frac{V_{am}}{V} = 1-K$ indica o volume relativo ocupado pela fase amorfa.

Tem-se então que:

$$\rho = K\rho_{cr} + (1-K)\rho_{am}$$

Assim, determinando-se as densidades das fases cristalina (ρ_{cr}) e amorfa (ρ_{am}), e sabendo-se a densidade ρ do polímero, pode-se determinar a cristalinidade K.

Para outras propriedades físicas pode-se utilizar de expressões semelhantes. Seja, por exemplo, P o valor de uma certa propriedade do polímero, e P_{cr} o valor da mesma propriedade para a fase cristalina. Então

$$K = \frac{P_{cr}}{P}$$

Um diagrama de difração de raios X, levando-se em conta a aditividade das propriedades das fases cristalina e amorfa, seria uma superposição de difração pelas regiões cristalinas e espalhamento pelas amorfas (Miller, 1966). Assim, P_{cr} seria a intensidade difratada coerentemente e P a intensidade total, isto é, P_{cr} mais a intensidade espalhada pelas regiões não cristalinas.

O índice de cristalinidade do polímero, por difração de raios X, seria então

$$K_x = \frac{\text{intensidade integrada sob os picos}}{\text{intensidade integrada total}}$$

Existem vários métodos para a determinação do índice de cristalinidade de polímeros dependendo da propriedade física P utilizada para a medida de $K = P_{cr}/P$. Podem ser utilizadas medidas de densidade, métodos termofísicos, a espectroscopia do infravermelho ou a ressonância magnética nuclear (NMR), além da difração de raios X. Os valores obtidos por diferentes métodos para um mesmo polímero nem sempre coincidem, o que se deve ao fato de que esses métodos se relacionam com diferentes quantidades, ligadas apenas indiretamente à cristalinidade K (Perepechko, 1981). Assim, tornou-se prática usual diferenciar o índice de cristalinidade obtido por difração de raios X daquele obtido por outros métodos.

Medidas de cristalinidade de polímeros por difração de raios X devem ser cuidadosamente interpretadas, para que se tenha claro seu significado (Statton, 1967). Em primeiro lugar, nem sempre o difratograma pode ser resolvido facilmente nas contribuições cristalina e amorfa, pois muitas vezes o espalhamento difuso se justapõe aos picos cristalinos. Além disso, mesmo quando a separação é facilmente obtida, há ainda diferentes interpretações estruturais: o espalhamento difuso pode não ser devido somente a um arranjo puramente aleatório das moléculas, mas sim a defeitos no estado cristalino, a deslocamentos

ou às regiões onde as moléculas têm seus extremos.

Assim, é necessário ter em mente que, mesmo sendo possível a obtenção de bons resultados através da difração de raios X, as dificuldades maiores aparecem na interpretação dessas medidas. Se as medidas são feitas de maneira consistente, podem levar a resultados que permitam uma boa comparação entre amostras com diferentes propriedades físicas. Esses resultados podem ser de grande utilidade, desde que se considere que são obtidos a partir de modelos aproximados e não um quadro real do estado sólido dos polímeros.

3.1.3. Métodos de Medida de Cristalinidade por Difração de Raios X

Os métodos de medida de cristalinidade por difração de raios X baseiam-se no fato de que a intensidade espalhada de raios X sobre todos os ângulos por determinado conjunto de átomos independente de seu estado de ordem ou desordem (Alexander, 1969). Esse fato pode ser expresso através da lei da conservação de intensidades de Vainshtein (Vainshtein, 1966), segundo a qual o espalhamento total, no espaço recíproco, de regiões equivalentes de determinado material, será idêntico, independentemente do grau de ordem da rede, seja de ordem perfeita (cristalina), imperfeita (para cristalina) ou desordem completa (amorfa).

Para um sistema de orientação aleatória, a lei de Vainshtein pode ser escrita como (Johnson, 1981):

$$\int_0^{\infty} I(s) dv_s = 4\pi \int_0^{\infty} I(s) s^2 ds = 4\pi \int_0^{\infty} \overline{f^2} s^2 ds$$

onde dv_s é o elemento de volume no espaço recíproco; $I(s)$ é a intensidade do espalhamento coerente na extremidade do vetor da rede recíproca $s = 2 \sin \theta / \lambda$. A integração é feita sobre todo o espaço recíproco.

Para um sistema com simetria cilíndrica:

$$\int_0^{\infty} I(s) dV = 2\pi \int_0^{\infty} I(s) s ds = 2\pi \int_0^{\infty} \overline{f^2} s ds$$

onde

$$\overline{f^2} = \frac{\sum N_i f_i^2}{\sum N_i}$$

isto é, a média quadrática do fator de espalhamento atômico para a molécula em questão; f_i é o fator de espalhamento atômico de um átomo de tipo i e N_i o número de átomos de tipo i .

A fig. 3.1.3 ilustra a lei de conservação da intensidade: a curva $4\pi s^2 I(s)$ oscila em torno da curva $\sum_i 4\pi s^2 f_i^2$. As áreas sob as duas curvas são idênticas.

Os métodos para medidas de cristalinidade de polímeros por difração de raios X podem ser divididos em duas categorias: os relativos e os absolutos. Para se ter uma boa visualização desses métodos para o caso particular da celulose I (algodão nativo),

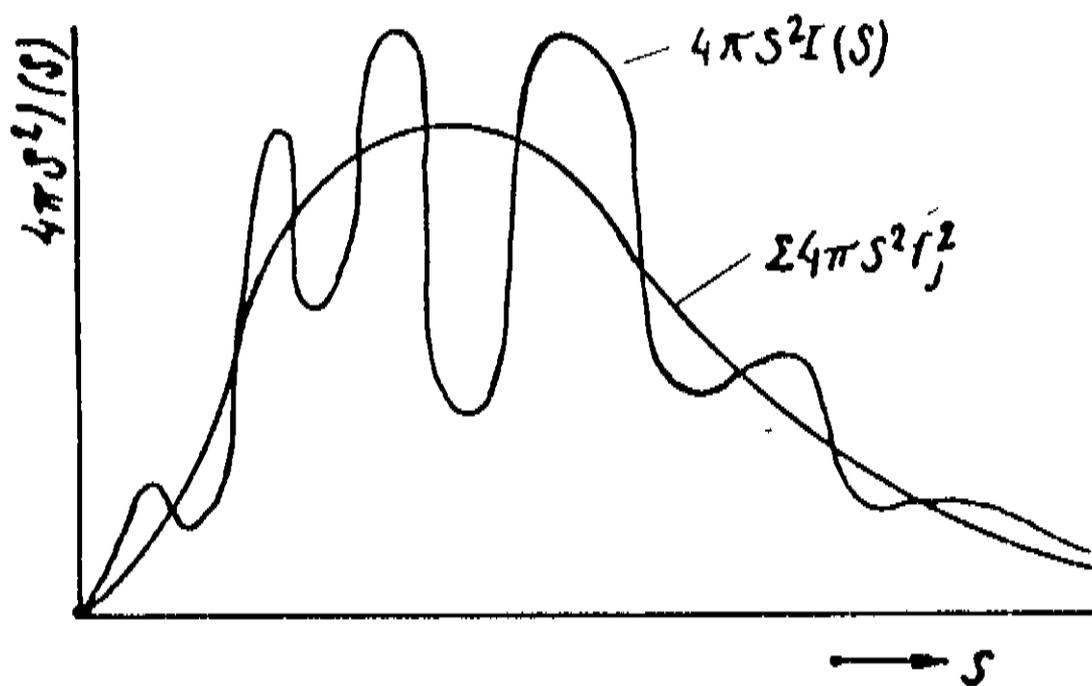


Fig. 3.1.3 - Lei da conservação da intensidade. As áreas sob as duas curvas são idênticas (Vainshtein, 1966)

observa-se na fig. 3.1.4 um diagrama típico de difração de raios X desse material. O pico mais intenso é devido à reflexão (002), e há uma superposição das reflexões (101) e (10 $\bar{1}$).

a) Métodos Relativos

Nesses métodos, também chamados de externos, a intensidade em cada ponto do diagrama de difração de certa amostra é comparada com aquela de outra amostra. A comparação pode ser em

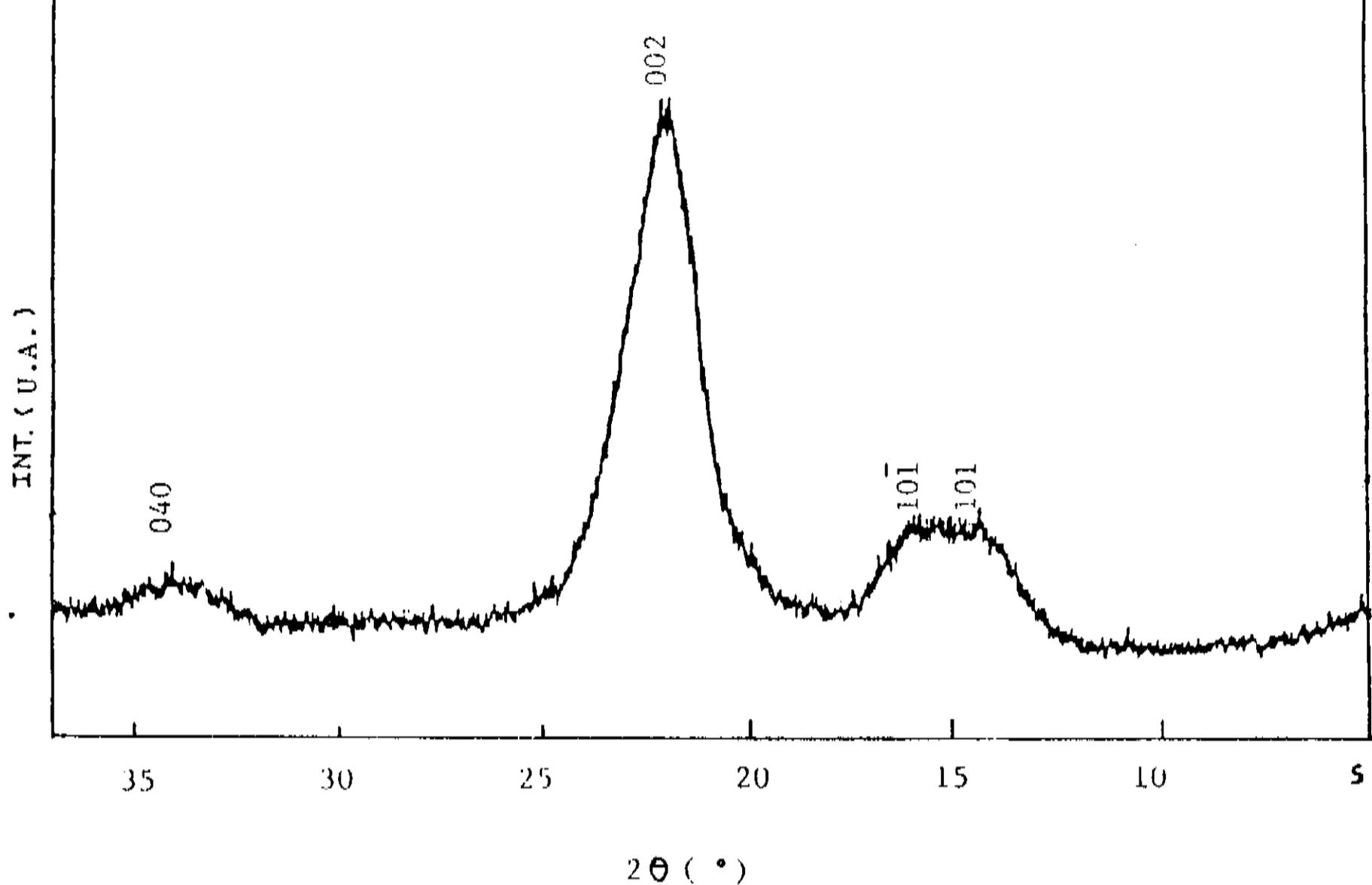


Fig. 3.1.4 - Diagrama típico de difração de raios X por celulose I

alguns pontos ou em certo intervalo angular.

Hermans e Weidinger, 1949, estabeleceram um método que compara duas amostras de cristalinidades bem distintas. Traçada uma linha de demarcação entre o espalhamento cristalino e o amorfo, escolhe-se intensidades adequadas que sejam proporcionais às frações cristalina e amorfa (I_c e I_a , respectivamente). Postula-se que a fração cristalina (x_c) é proporcional a I_c , e a amorfa ($x_a = 1 - x_c$) é proporcional a I_a , e obtém-se então duas equações para as frações cristalinas das duas amostras, x_{c1} e x_{c2} .

$$\frac{x_{c1}}{x_{c2}} = \frac{I_{c1}}{I_{c2}}$$

$$\frac{1-x_{c1}}{1-x_{c2}} = \frac{I_{a1}}{I_{a2}}$$

Pode-se construir então um nomograma de regressão a partir desses resultados, o qual é utilizado para se determinar a fração cristalina de outras amostras.

Um método relativo que aplica a lei de Vainshtein é o de Wakelin e colaboradores, 1959, o assim chamado método do índice de cristalinidade por correlação (ICC). Por esse método, são utilizadas duas amostras padrão, uma com um máximo de cristalinidade, considerada como 100% (I_c) e outra com um mínimo (padrão amorfo), considerada como 0% (I_a). Para as amostras cuja cristalinidade se quer determinar é medida a intensidade (I_k). Determina-se então para cada ângulo (2θ) as diferenças $I_k - I_a$ e $I_c - I_a$. O índice de correlação será a inclinação da reta obtida quando se faz a correlação entre ($I_k - I_a$) e ($I_c - I_a$). A equação dessa reta será

$$(I_k - I_a) = C_c (I_c - I_a) + B$$

C_c é então o índice de cristalinidade por correlação, e B o ponto de intersecção da ordenada. Teoricamente B deve ser zero, e portanto um dos critérios de aceitabilidade dos dados experimentais é que B seja pequeno.

b) Métodos Absolutos

Os métodos absolutos, também chamados de internos, baseiam-se no fato de que, em princípio, toda a informação necessária para a determinação da cristalinidade por difração de raios X está contida em cada diagrama de difração, pois a radiação total espalhada por certa massa de material independe do estado físico do material.

Entre os métodos absolutos, o método clássico de Hermans e Weindinger, 1961, dá uma medida da cristalinidade absoluta, como a relação entre a intensidade integrada sob os picos e a intensidade integrada sob o traço completo, ou seja:

$$\chi_{cr} = \frac{\int_0^{\infty} I_{cr}(2\theta) d(2\theta)}{\int_0^{\infty} I_{tot}(2\theta) d(2\theta)}$$

Para a aplicação desse método é necessário uma separação arbitrária do espalhamento sob os picos, devido às regiões cristalinas, do espalhamento de fundo correspondente às regiões desordenadas (fig. 3.1.5). Para isso são empregados vários métodos (Miller, 1966) mas nenhum deles leva em conta a possível superposição de picos.

Segal e colaboradores, 1959, desenvolveram um método empírico para a determinação da cristalinidade de celulose nativa por difratometria de raios X, no qual, através das medidas das intensidades I_{002} da reflexão (002) e da amorfa I_{am} , medida em

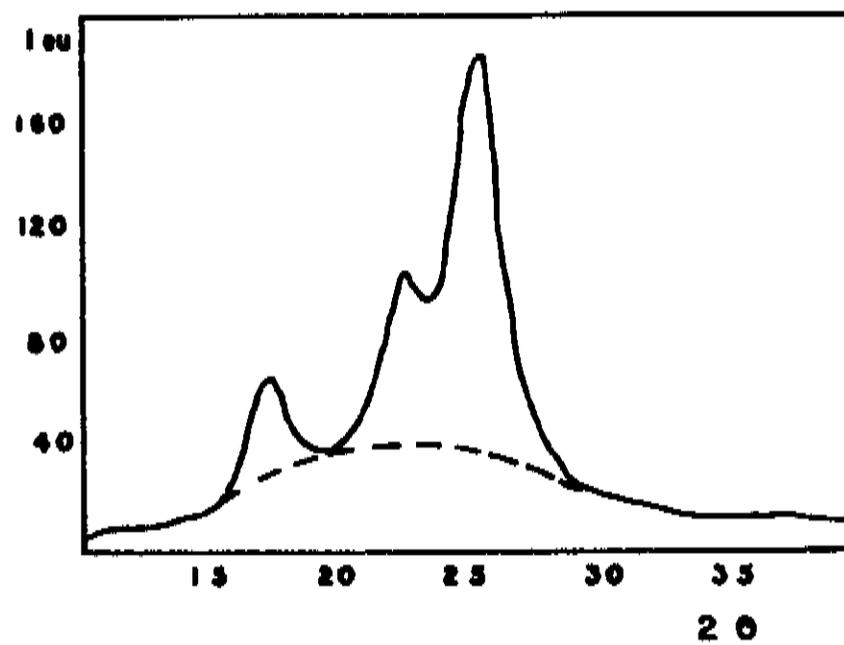


Fig. 3.1.5 - Separação arbitrária do espalhamento sob os picos cristalinos para um polímero (Johnson, 1981)

$2\theta = 18^\circ$, foi definido um índice de cristalinidade K dado por

$$K = \frac{I_{002} - I_{am}}{I_{002}} \times 100$$

É um método que possibilita medidas de rotina quando o objetivo é apenas uma comparação da cristalinidade de várias amostras.

Uma extensão bastante elaborada do método absoluto foi feita por Ruland, 1961, na qual foi introduzida uma função "desordem", que leva em conta a perda de intensidade nos picos cristalinos devido a distorções paracristalinas. A essência desse método consiste em se achar um parâmetro de desordem apropriado,

D, de modo que o índice de cristalinidade obtido, K, seja independente do intervalo angular:

$$K = \frac{\int_{S_0}^{S_1} S^2 I_{cr}(S) dS}{\int_{S_0}^{S_1} S^2 I(S) dS} C$$

onde C é o fator de correção, dado por

$$C = \frac{\int_{S_0}^{S_1} S^2 \overline{f^2} dS}{\int_{S_0}^{S_1} S^2 \overline{f^2} D dS}$$

Aqui I_{cr} é a intensidade cristalina, de onde é subtraída a intensidade do espalhamento de fundo. D é a função desordem, representada por $D = \exp(-ks^2)$, onde k incorpora distorções de rede de primeira e segunda ordem. Como k deve ser constante, o fator de correção C deve ser calculado para diferentes intervalos de S, variando-se o limite superior S_1 e o parâmetro k, até que se obtenha valores apropriados que satisfaçam essa condição.

Johnson e Hindeleh (Johnson, 1981; Hindeleh e Johnson, 1971) empregam o chamado método de resolução de múltiplos, em que os picos são resolvidos em perfis de melhor ajuste, e em que se considera o espalhamento remanescente como de fundo. Considera-se o perfil de cada pico sob a forma

$$fG + (1-f)C$$

onde G é a função de Gauss

$$G = A \exp\left\{-\ln 2 \left[\frac{2(X-P)}{W}\right]^2\right\}$$

e C a função de Cauchy:

$$C = A / (1 + [2(X-P)/W]^2)$$

A, W e P são respectivamente a altura do pico, a largura a meia altura e a posição angular. O parâmetro f define o perfil, sendo igual a 0 para uma função de Cauchy, igual a 1 para uma gaussiana, e assumindo valores entre 0 e 1 para uma combinação das duas funções.

Para o espalhamento de fundo, supõe-se que se ajuste a um polinômio de 3^o grau

$$a + bx + cx^2 + dx^3$$

A grande vantagem desse método sobre os anteriores é que não envolve uma separação arbitrária entre os picos e a área devida ao espalhamento pelas regiões desordenadas.

3.1.4. Determinação do Tamanho de Cristalito

A investigação de polímeros cristalinos por difração de raios X mostra que os picos de difração são mais largos, ou mais difusos, que os de substâncias de baixo peso molecular. Esse alargamento é associado com o pequeno tamanho dos cristalitos. Supondo-se cristalitos pequenos, relativamente perfeitos, empacotados formando um conjunto, ou na matriz amorfa, o tamanho médio é encontrado pela fórmula de Scherrer (Alexander, 1969):

$$L_{hkl} = \frac{k\lambda}{\beta_0 \cos\theta_{hkl}}$$

onde L_{hkl} é a dimensão média dos cristalitos perpendicularmente aos planos (hkl) , β_0 a largura do perfil da reflexão a meia altura, em radianos, θ_{hkl} é o ângulo de Bragg para a reflexão, λ o comprimento de onda da radiação e k uma constante, chamada parâmetro de Scherrer. Em geral, assume-se, um valor 0,9 para k .

Deve-se notar que a largura de linha da curva de difração está associada não somente com o pequeno tamanho de cristalito, mas também com defeitos e distorções da rede, e com o alargamento instrumental. Este pode ser corrigido tomando-se a largura de linha de uma substância de referência, a um ângulo de Bragg próximo a θ_{hkl} . Tendo-se a largura de linha experimental β_{exp} , então determina-se o valor de β_0 , dependendo da suposição que se faz para o perfil de linha:

$\beta_o = (\beta_{exp}^2 - \beta_{ref}^2)^{1/2}$ para uma função gaussiana,

$\beta_o = \beta_{exp} - \beta_{ref}$ para uma função de Cauchy,

•

$$\beta_o = f(\beta_{exp}^2 - \beta_{ref}^2)^{1/2} + (1-f)(\beta_{exp} - \beta_{ref})$$

onde f é o parâmetro que define o perfil do pico, para uma combinação Cauchy-Gauss.

O cálculo de L_{hkl} pela fórmula de Scherrer dá um valor aproximado, pois não leva em conta as distorções e deslocamentos que aparecem nos cristais e que tornam difícil a definição dos cristalitos regulares. Mas a determinação desses parâmetros é de grande utilidade para a comparação de amostras de materiais semelhantes (Walton e Blackwell, 1973).

3.2. ORIENTAÇÃO CRISTALINA

3.2.1. Orientação Preferencial em Polímeros

É característico dos polímeros fibrosos apresentarem orientação preferencial na estrutura molecular. Essa orientação desempenha importante papel durante o crescimento e no posterior desempenho da molécula em seu meio ambiente (Alexander, 1969). Em geral, o termo orientação refere-se ao alinhamento de moléculas individuais uma em relação à outra e em relação às superfícies da

amostra, mas, devido à coexistência de fases ordenadas e desordenadas na estrutura da fibra, usa-se esse termo com referência às regiões cristalinas, para as quais é possível uma avaliação quantitativa (Howsmon e Sisson, 1954).

Os materiais que apresentam textura de fibra (textura usada neste caso como orientação preferencial) têm uma simetria de rotação em torno do eixo da fibra, no sentido de que todas as orientações em torno desse eixo são igualmente prováveis. Na fig. 3.2.1 vê-se a geometria de difração de um diagrama de fibra. (Azaroff, 1969)

Conhecendo-se a distância filme-amostra D , o ângulo de difração de cada anel pode ser determinado medindo-se seu raio R no filme, pois

$$\operatorname{tg} 2\theta = \frac{R}{D}$$

O feixe difratado forma um ângulo δ com o plano vertical que contém o feixe direto e o eixo da fibra (fig. 3.2.2). O eixo NS passa pela origem da rede recíproca O e é paralelo ao eixo da fibra. O círculo horizontal de colatitude ρ mostra a localização dos pontos da rede recíproca em torno do eixo NS . Esse é o ângulo formado pelo eixo da fibra e as normais aos planos de reflexão. O valor de ρ pode ser determinado, considerando-se o triângulo esférico ONP da fig. 3.2.2, pela relação

$$\cos \rho = \cos \theta \cos \delta \quad ,$$

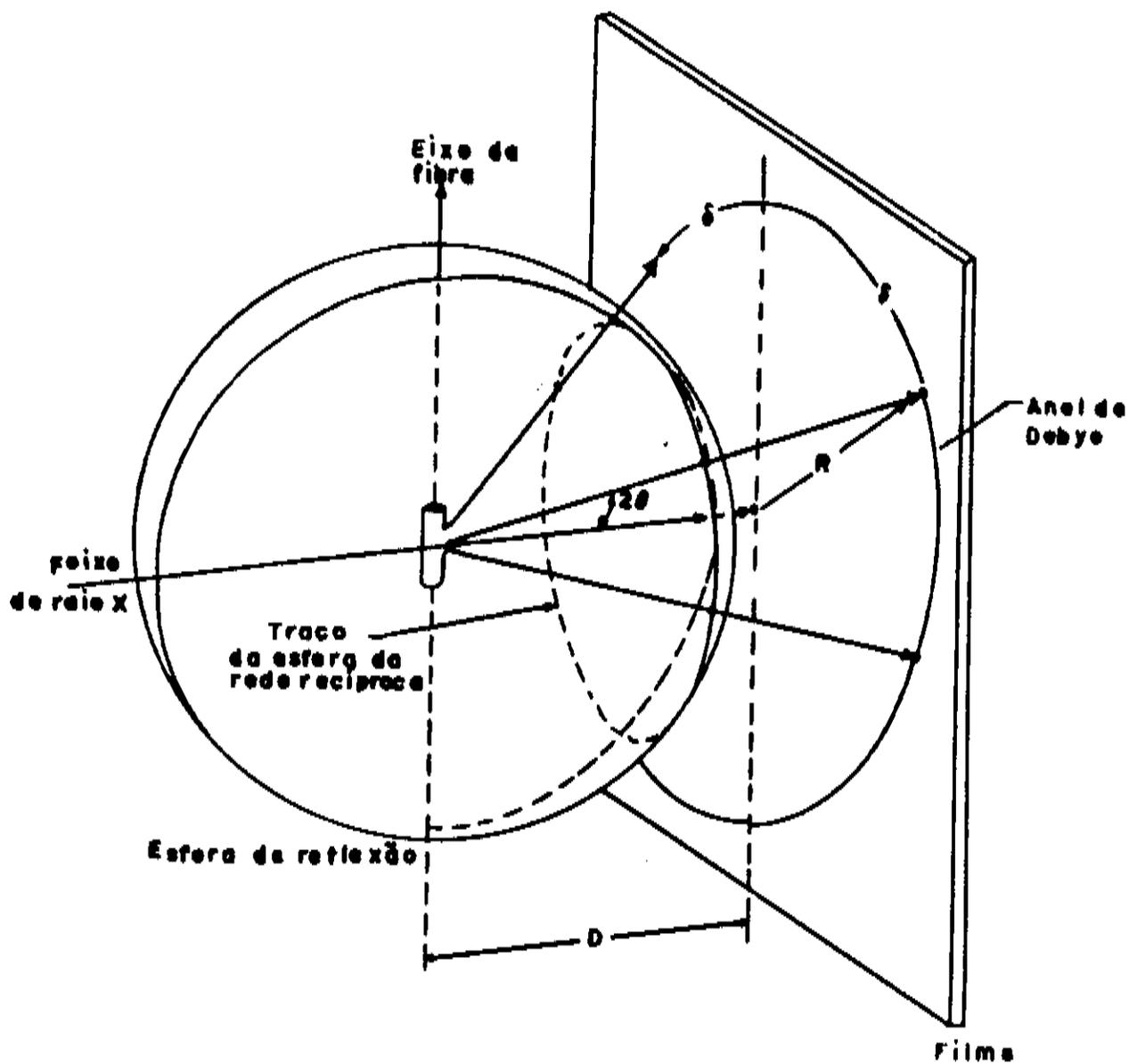


Fig. 3.2.1 - Geometria de difração de um diagrama de fibras (Azaroff, 1969)

conhecida como relação de Polanyi.

Assim, medindo-se o ângulo δ no filme (fig. 3.2.1) e sabendo-se o valor de θ , determina-se o ângulo ρ correspondente a determinada direção.

3.2.2. Orientação em Fibras de Celulose

Quando se trata de fibras naturais, a inclinação dos planos se desvia de seu valor ideal ρ . Em geral, o desvio é

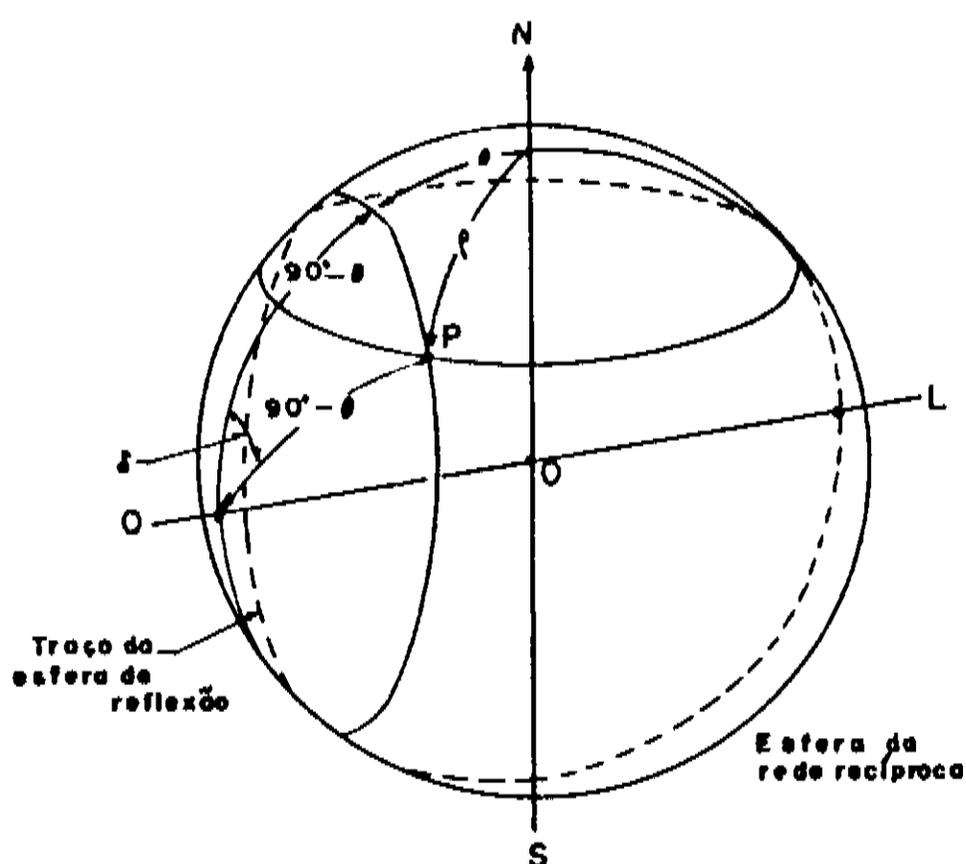


Fig. 3.2.2 - Condições para a difração através da rede recíproca (Azaroff, 1969)

simétrico em relação ao valor ideal, e os círculos de latitude então se alargam em bandas, que interceptam a esfera de Ewald em segmentos de arcos. No filme aparecem arcos, cuja intensidade é maior no centro, indicando que um maior número de planos tende a ter a inclinação ideal ρ .

No caso de fibras de celulose, refere-se a orientação como ao arranjo ou alinhamento das regiões cristalinas em relação ao eixo da fibra. Há vários tipos de orientação que podem ser identificados através de diagramas de difração de raios X, mas no presente trabalho vamos nos limitar à orientação uniaxial. Nesse

caso, a única limitação imposta é a de que o eixo b dos cristalitos tenha uma orientação preferencial paralela ao eixo da fibra. Com o eixo a ou c paralelo ao feixe incidente, aparecem as reflexões (101), (10 $\bar{1}$) e (002) com máximos de intensidade no equador, e suas intensidades relativas permanecem constantes com a rotação da amostra ao longo do eixo b ou eixo da fibra (fig. 3.2.3).

A maioria dos métodos utilizados para medidas de orientação de cristalitos em celulose por meio dos diagramas de

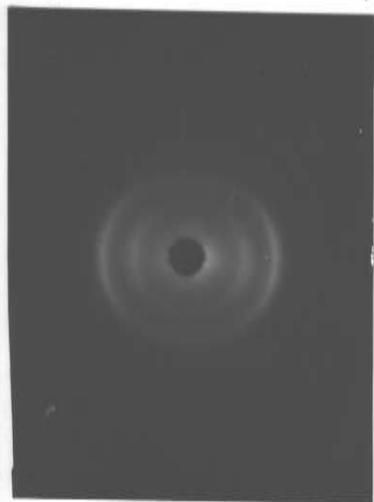


Fig. 3.2.3 - Diagrama de fibra da celulose de algodão

difração de raios X baseiam-se nos conceitos de Polanyi, segundo os quais as intensidades dos arcos de difração a determinado

Ângulo são proporcionais ao número de cristalitos inclinados do mesmo ângulo em relação ao eixo da fibra (Alexander, 1969). Na figura 3.2.3 a interferência mais intensa é a devida aos planos (002). Como esses planos são paralelos ao eixo longo dos cristalitos, um plano formando um ângulo θ com o feixe de raios X, que satisfaça a equação de Bragg ($n\lambda = 2d \sin\theta$) difrata raios X ao longo do arco de difração (002), a ângulos retos com o eixo longo do cristalito (Sisson e Clark, 1933). Assim, uma análise da distribuição de intensidades ao longo do arco (002) dará uma medida da distribuição de cristalitos em relação ao eixo da fibra.

Sisson e Clark, 1933, desenvolveram um método fotográfico quantitativo para uma estimativa da orientação de cristalitos: medidas de intensidade são feitas em 360° ao longo de um arco de difração, em geral o (002), e a orientação é expressa através de curvas de distribuição, em porcentagem, nas quais a intensidade relativa é dada como função do ângulo formado com o eixo da fibra (fig. 3.2.4). Segal e colaboradores, 1950, transformaram o método fotográfico de Sisson e Clark numa técnica difratométrica para avaliar o grau de orientação em fibras de algodão.

Um índice bastante usado para definir o grau de orientação é a largura azimutal a meia-intensidade, isto é, o ângulo entre a posição de máxima intensidade no arco (002) e a posição correspondente a metade dessa intensidade máxima. É também bastante utilizada como índice a largura azimutal a 40% da intensidade máxima (fig. 3.2.4). Outros autores preferem utilizar os inversos dessas larguras, pois são parâmetros que crescem com o

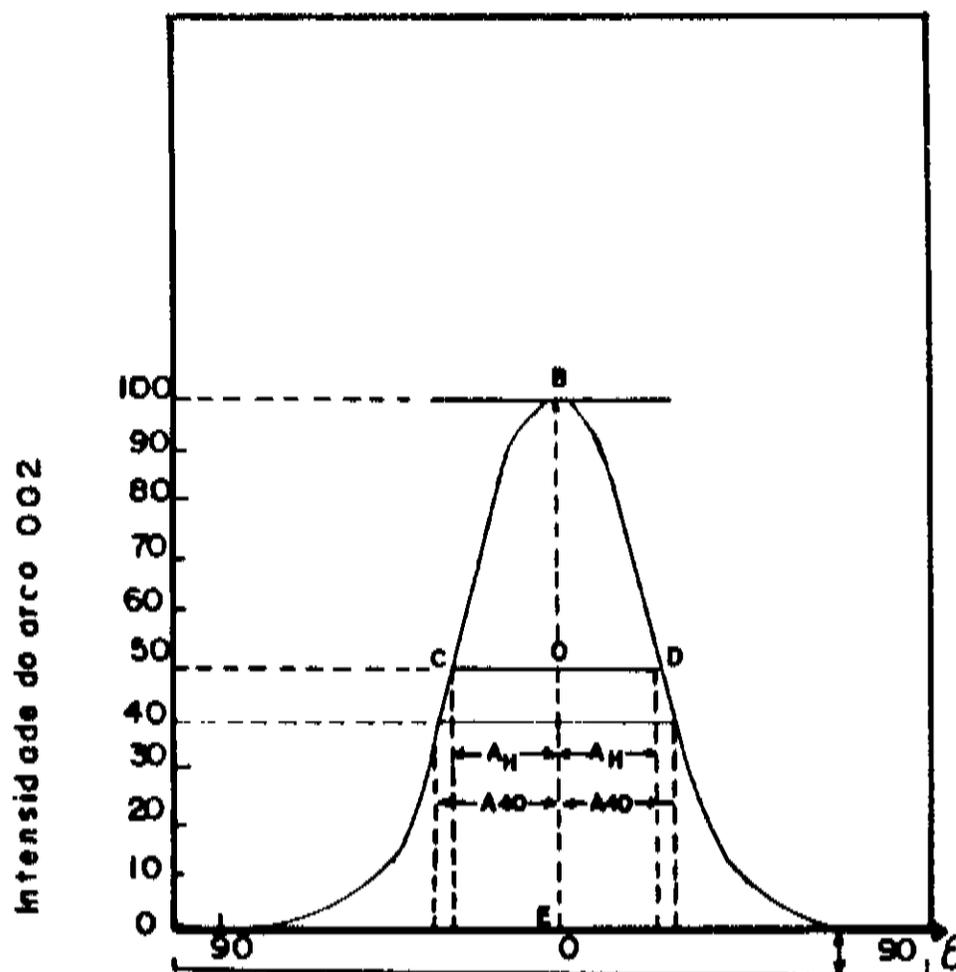


Fig. 3.2.4 - Distribuição de intensidades ao longo do arco (002)

crescente paralelismo do alinhamento (Alexander, 1969).

Hermans e colaboradores, 1946, desenvolveram um método para uma avaliação quantitativa do grau de orientação em fibras de celulose a partir do diagrama de difração de raios X. Eles definem um fator de orientação dado por

$$f_x = 1 - \frac{3}{2} \overline{\sin^2 \beta}$$

onde β é o ângulo entre o eixo cristalográfico b de cada cristalito e o eixo da fibra. A barra significa uma média ponderada sobre todos os cristalitos da fibra:

$$\overline{\sin^2 \beta} = \frac{\int_0^{\pi/2} I(\beta) \sin^2 \beta \cos \beta \, d\beta}{\int_0^{\pi/2} I(\beta) \cos \beta \, d\beta}$$

onde $I(\beta)$ é a intensidade ao longo do arco (002), a determinado ângulo azimutal β .

3.2.3. A Orientação Cristalina e a Estrutura Espiral em Fibras de Algodão

O fator de orientação de Hermans foi definido para fibras de celulose regenerada (celulose II), apesar de ser também aplicado no caso de fibras de celulose nativa.

Entretanto, a medida da orientação em muitas fibras de celulose nativa se complica devido à morfologia dessas fibras. Como as fibras são constituídas por camadas cilíndricas concêntricas, compostas pelas fibrilas, as quais se desenvolvem em espiral ao longo do eixo da fibra, as medidas de orientação devem levar em conta não só a orientação dos cristalitos dentro da fibrila como também a orientação destas em relação ao eixo da fibra (Howsmon e Sisson, 1954).

Já em 1935, Sisson dava uma indicação de que a forma dos arcos de difração para a celulose nativa poderia ser explicada considerando-se a distribuição total como função tanto do ângulo espiral (ϕ), como da distribuição em torno desse ângulo.

DeLuca e Orr, 1961, utilizaram a mesma curva de

distribuição de intensidades do arco (002) para determinar o ângulo espiral e a orientação dos cristallitos em relação a esse ângulo espiral. Um tipo de distribuição que se ajustou aos resultados experimentais desses autores foi obtido ao se considerar o perfil de intensidades do arco (002) como a soma de duas distribuições gaussianas iguais separadas por duas vezes o ângulo espiral ϕ (Fig. 3.2.5). Na abscissa figura a posição

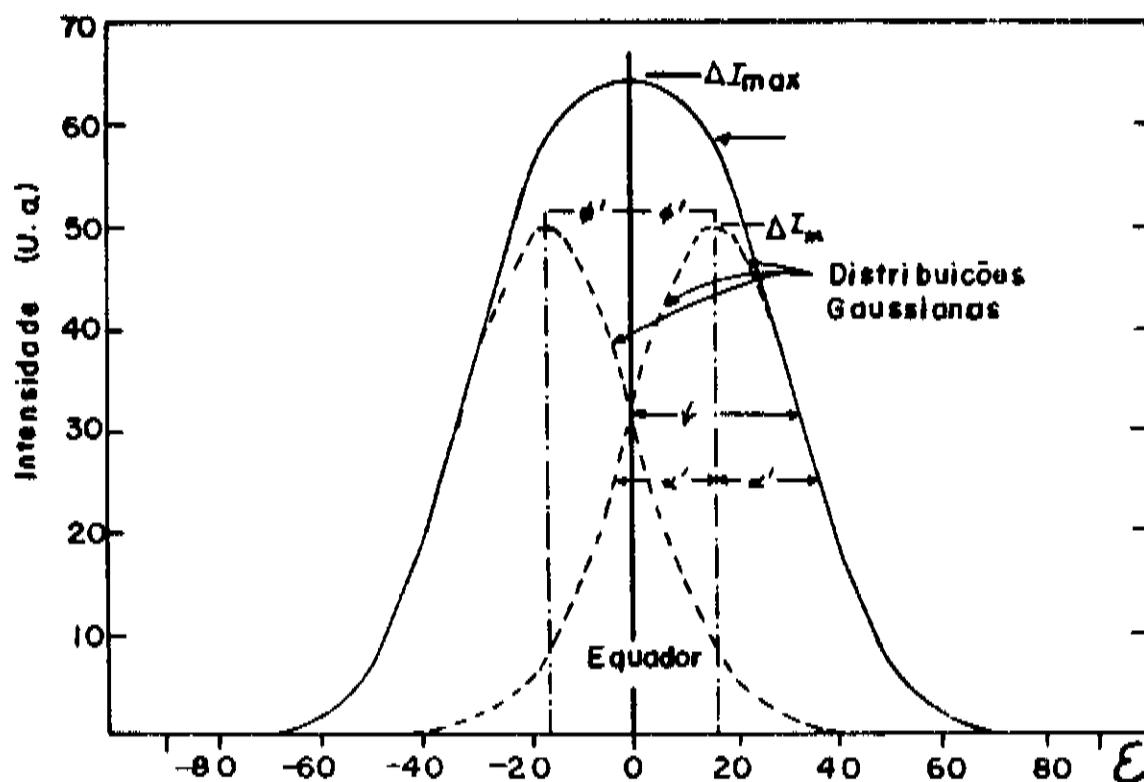


Fig. 3.2.5 - Resolução do perfil azimutal do arco (002) em duas distribuições gaussianas

angular ϵ , a partir do equador, e na ordenada a intensidade (ΔI_ϵ) do arco de difração. Supõe-se $\Delta I_\epsilon = I_\epsilon - I_{min}$, onde $I_{min} = I_{90^\circ}$ e

então $\Delta I_{00^\circ} = 0$. As duas distribuições gaussianas têm centros em $\epsilon = +\phi$ e $\epsilon = -\phi$, e são então expressas por

$$\Delta I_{1\epsilon} = \Delta I_m \exp\left\{-H^2(\epsilon-\phi)^2\right\}$$

$$\Delta I_{2\epsilon} = \Delta I_m \exp\left\{-H^2(\epsilon+\phi)^2\right\}$$

onde $H^2 = \ln 2/\alpha^2$, ϕ é o ângulo espiral, ΔI_m a intensidade máxima da distribuição gaussiana para $\epsilon = \phi$, e α o ângulo de meio-máximo da intensidade.

A soma das duas gaussianas (ou a curva de distribuição de intensidades do arco (002)) é então

$$\Delta I_\epsilon = \Delta I_m \left[\exp\left\{-H^2(\epsilon-\phi)^2\right\} + \exp\left\{-H^2(\epsilon+\phi)^2\right\} \right]$$

Para se eliminar ΔI_m , considera-se o ponto do arco (002) em que $\epsilon = 0$:

$$\Delta I_{0^\circ} = \Delta I_{\max} = 2\Delta I_m \exp\left\{-H^2\phi^2\right\}$$

e chega-se então à equação

$$\frac{\Delta I_\epsilon}{\Delta I_{\max}} \exp\left\{H^2\epsilon^2\right\} = \cosh\left[2H^2\epsilon\phi\right]$$

onde há duas incógnitas, ϕ e H . Tomando-se dois pontos no arco (002), por exemplo a 50% ΔI_{\max} e a 40% ΔI_{\max} tem-se duas equações:

$$0,5 \exp\{H^2 \psi^2\} = \cosh\{2H^2 \psi \phi\}$$

$$0,4 \exp\{H^2 \gamma^2\} = \cosh\{2H^2 \gamma \phi\}$$

onde ψ e γ são os ângulos a 50% ΔI_{\max} e 40% ΔI_{\max} , respectivamente.

Essas duas equações são resolvidas simultaneamente, atribuindo-se diferentes valores para H^2 até que se obtenha valores idênticos para ϕ nas duas equações. Do valor de H^2 para o qual isso acontece, obtém-se α .

Através desse método, DeLuca e Orr introduziram dois novos parâmetros que dão uma medida da orientação em fibras de algodão, mas levando em conta a estrutura espiral das fibras: o ângulo espiral ϕ e o parâmetro α , cujo significado seria a orientação média dos cristalitos em relação ao ângulo espiral.

Com a intenção de correlacionar os parâmetros ϕ e α com o fator de orientação de Hermans, Shenouda e Visuranathan, 1971, mediram esses parâmetros para várias amostras de algodão egípcio nativo e tratado quimicamente, e concluíram que o ângulo espiral ϕ é provavelmente uma estimativa direta da inclinação dos cristalitos em relação ao eixo da fibra, ao passo que o ângulo médio de orientação β , obtido pelo método de Hermans, seria uma resultante da inclinação da cadeia celulósica em relação ao cristalito e da inclinação do cristalito em relação ao eixo da fibra.

3.3. Estudo do Colágeno através da Difração de Raios X

3.3.1. Difração de Raios X por uma Estrutura Helicoidal

Numa estrutura helicoidal (Ramachandran, 1967), as sucessivas unidades contendo átomos equivalentes podem ser geradas através de uma operação de rotação e uma de translação: uma unidade é girada de um ângulo t em torno do eixo da hélice e transladada de uma distância h ao longo desse mesmo eixo. A fração $t/360^\circ$ pode ser chamada de rotação unitária, para a qual se usa o mesmo símbolo (t), e o deslocamento vertical de altura unitária (h). O inverso da rotação unitária dá o número de unidades em cada volta: $n = 1/t$. Esse número, n , não é necessariamente um inteiro, como no caso de estruturas cristalinas (onde n só pode assumir os valores 1, 2, 3, 4 e 6). No caso do colágeno, não há condições de simetria que permitam nem mesmo uma razão de números inteiros pequenos para n , pois os grupos laterais sucessivos são diferentes e sua sequência não mostra nenhuma regularidade a nível molecular de alguns Angstroms. Os critérios para determinar a regularidade da cadeia helicoidal são aqueles definidos estereoquimicamente, e que não fazem nenhuma restrição para o valor de n .

Assim, a simetria de uma estrutura helicoidal pode ser definida por dois parâmetros, h e t . A unidade repetidora consiste de um número de átomos ($j = 1$ a N), cujas coordenadas polares cilíndricas são dadas por r_j, ϕ_j, z_j , sendo o eixo z o eixo da hélice. Tomando-se o índice k para denotar os átomos correspondentes nas sucessivas unidades, então as coordenadas polares de um átomo em qualquer unidade são dadas em termos

daquelas da primeira unidade pelas relações:

$$r_{jk} = r_{j1} ; \phi_{jk} = \phi_{j1} + (k-1)t ; z_{jk} = z_{j1} + (k-1)h$$

O padrão de difração dessa estrutura consiste de uma série de reflexões alinhadas perpendiculares ao eixo da hélice. Em termos de espaço recíproco, com coordenadas polares cilíndricas R, ψ, Z , pode-se demonstrar, usando-se uma extensão da teoria de Cochran e colaboradores (1952), que, para as linhas horizontais (paralelas ao equador) que aparecem no padrão de difração, o espaçamento recíproco Z é dado por:

$$Z = \eta(1/h) = nZ_0 \quad .$$

onde

$$\eta = qt + m$$

sendo q o número inteiro correspondente à linha horizontal, e m também um inteiro.

A intensidade na linha q é dada em termos das funções de Bessel de ordem q , $J_q(2\pi Rr_j)$:

$$I = |2\pi J_q(2\pi Rr_j)|^2 \quad .$$

Das funções de Bessel de várias ordens, somente a função de ordem 0, $J_0(\alpha)$ é diferente de zero para $\alpha = 0$. Todas as outras

$J_q(\alpha)$ são iguais a zero para $\alpha = 0$, ou $R = 0$. Portanto, somente as linhas com $q = 0$, isto é, $\eta = 0, 1, 2$, etc., ou $Z = Z_0, 2Z_0$, etc., aparecem no meridiano. Isso significa que somente as linhas correspondentes às várias ordens da altura unitária, isto é, com espaçamentos $h, h/2$, etc., aparecem no meridiano. Desse modo, os espaçamentos correspondentes às reflexões meridionais dão diretamente o valor de Z_0 , e portanto de altura unitária h .

As linhas correspondentes aos índices de Bessel pequenos, $q = 1, 2$ ou 3 apresentam intensidades próximas ao meridiano, e somente essas ocorrerão na parte central do padrão de difração. Assim, através da razão entre os espaçamentos das linhas não meridionais mais proeminentes e o espaçamento da primeira reflexão meridional obtém-se η , e portanto a rotação unitária t , através da equação $\eta = qt + m$.

3.3.2. O Padrão de Difração de Raios X pelo Colágeno

A determinação dos elementos da hélice para o colágeno mostra que, numa boa aproximação, os sucessivos elementos estruturais, que consistem de três resíduos de aminoácidos, estão relacionados por uma translação de aproximadamente $2,9\text{Å}$ paralela ao eixo da hélice, que corresponde à altura unitária h , e uma rotação de 110° em torno desse eixo, correspondente a uma rotação unitária $t = 110/360 = 0,306$ (Traub e Piez, 1972).

Um padrão de difração de raios X por fibras de colágeno, registrado em filme fotográfico, com a fibra perpendicular ao feixe de raios X é apresentada na fig. 3.3.1.

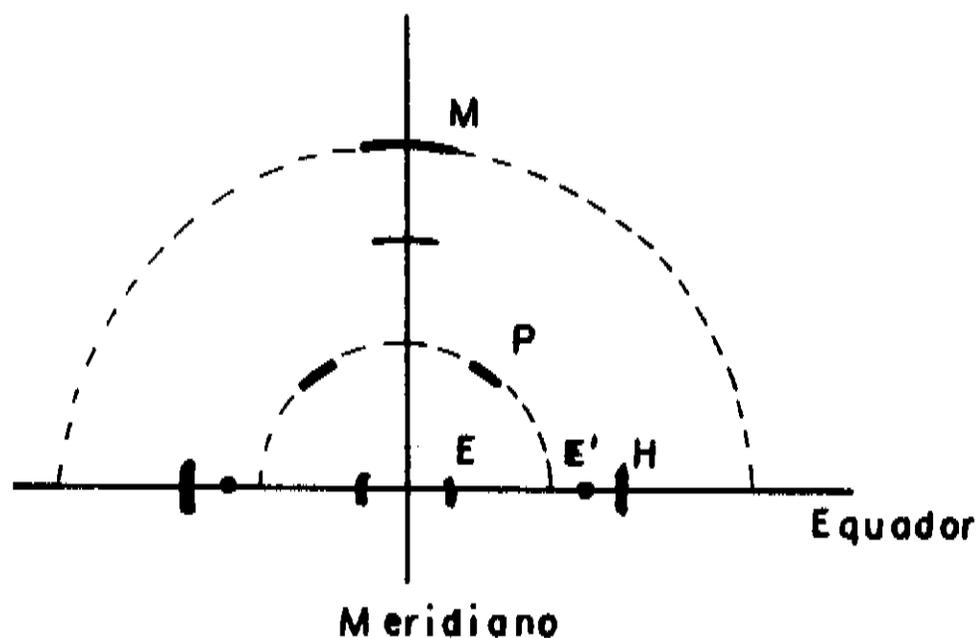


Fig. 3.3.1 - Padrão de difração de raios X por fibras de colágeno com a fibra perpendicular ao feixe de raios X

Consiste de uma série de manchas em linhas horizontais e verticais (Bear, 1952). As linhas horizontais atravessam o meridiano central a intervalos regulares e são indexadas de acordo com sua distância ao equador. A separação entre essas linhas permite a determinação do período axial da estrutura fibrilar. Esse tipo de investigação é feito através da difração de raios X a baixo ângulo.

A difração de raios X a alto ângulo permite a investigação de espaçamentos a nível molecular: grupos de átomos, resíduos de aminoácidos, etc., isto é, dimensões menores de 20 Å. Os padrões de difração são difusos, demonstrando orientação incompleta, consequência do fato de que os elementos intrafibrilares não são tão bem orientados como as fibrilas.

Na figura 3.3.1, a intensa reflexão meridional, M, corresponde ao espaçamento de 2,9 Å - a altura unitária h.

A mancha equatorial, E, também bastante intensa, ocorre a um espaçamento que varia de 10,6 Å na fibra seca a 14,6 Å quando é molhada (Ramachandran, 1967). Ainda no equador, vê-se outra mancha, E', menos intensa, e cujo espaçamento corresponde a metade do de E. Essas duas manchas são devidas à rede constituída pelas fibrilas, isto é, ao seu empacotamento lateral. A ocorrência de somente duas reflexões nítidas no equador indica que há considerável desordem no empacotamento lateral das fibrilas. O espaçamento de 10 a 15 Å fornece uma medida da distância entre planos que passam pelos centros das moléculas de tropocolágeno.

Observa-se também um meio-halo excessivamente difuso, H, que se estende acima e abaixo do equador, a um raio correspondente a um espaçamento de ~ 4,5 Å, que praticamente dilui a mancha equatorial E'. Ramachandran (1967) explica esse meio-halo difuso da seguinte maneira: se há um forte máximo num padrão de difração de raios X, isso corresponde a uma grande concentração de vetores interatômicos com esse espaçamento e direção. A ocorrência desse meio-halo com $d \sim 4,5$ Å no equador significa então que há conjuntos de átomos na estrutura separados por essa distância numa direção aproximadamente perpendicular ao eixo da hélice. De fato, no modelo de colágeno constituído de unidades peptídicas planares, essas unidades peptídicas no mesmo nível nas três cadeias são aproximadamente paralelas, de modo que os vetores entre átomos correspondentes em duas unidades vizinhas são equivalentes e aproximadamente horizontais. Essas distâncias podem ser calculadas

pelas coordenadas da estrutura e demonstram estar distribuídas em torno de um valor médio de 4,41 Å.

Ainda segundo Ramachandran, o fato de que no padrão de difração as linhas horizontais aparecem alargadas significa que os parâmetros da hélice, isto é, a altura unitária h e a rotação unitária t , podem apresentar leves flutuações. Pequenas flutuações em t (ou no número de resíduos por volta) afetam levemente as linhas com índices de Bessel q pequenos, mas levam a um alargamento maior com o crescente valor dos índices de Bessel. Provavelmente é essa a razão pela qual essas linhas são difusas e se confundem umas com as outras.

A mancha P, com espaçamento correspondente a 8,7 Å se deve ao passo da hélice maior, igual a 3 vezes a altura unitária h .

A figura 3.3.2 mostra um diagrama típico de colágeno, obtido por difratometria de raios X. Observa-se que aí estão claramente presentes a reflexão equatorial E, a banda difusa centrada em aproximadamente 4,5 Å e, sobrepondo-se a essa, a reflexão meridional de 2,9 Å.

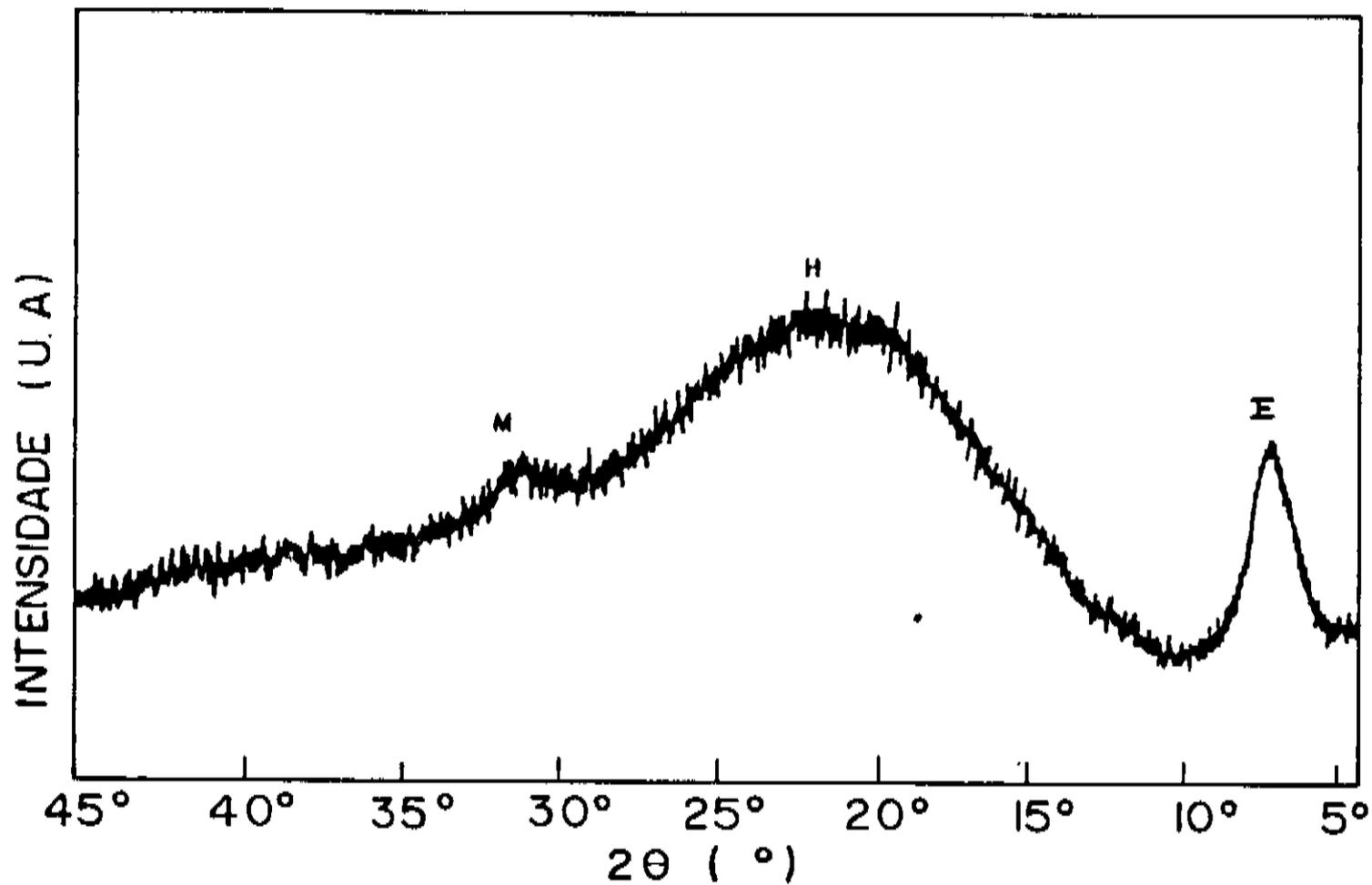


Fig. 3.3.2 - Diagrama típico de colágeno, obtido por difratometria de raios X

4. MODELOS DE HIDRATAÇÃO EM BIOPOLÍMEROS

4.1. OS BIOPOLÍMEROS E A ÁGUA

A interação entre os biopolímeros e a água é um dos fenômenos mais importantes entre os que regem os processos biológicos. Essa interação é necessariamente dependente da natureza química e física desses polímeros (Lüscher-Mattli e Rüegg, 1982; Nomura e colaboradores, 1977). É um fenômeno que já vem sendo estudado há mais de um século, porém muitos aspectos da interação estrutural dos biopolímeros no estado nativo com a água permanecem desconhecidos. Em particular no caso dos biopolímeros que têm sua função fora da célula, nos tecidos conectivos dos animais ou no espaço intercelular das plantas, a natureza e o grau de hidratação são de grande importância (Bettelheim e colaboradores, 1970). As dificuldades para esse estudo vêm ligadas em grande parte à complexa composição química dessas moléculas e à igualmente complexa hierarquia de organização estrutural.

Uma questão que se coloca é a natureza da água associada às macromoléculas. Grande parte da informação a respeito dos parâmetros termodinâmicos da hidratação de biopolímeros tem sido obtida através de estudos de pressão de vapor (como por exemplo o clássico trabalho de Bull, 1944).

A hidratação, ou sorção, tem sido definida como o processo pelo qual moléculas de vapor de água são ligadas a determinados sítios em sólidos (McLaren e Rowen, 1951). Tradicionalmente se utiliza o termo adsorção para descrever o processo pelo qual as moléculas de água se ligam a sítios numa

superfície interna ou externa. Para o caso de biopolímeros o termo absorção parece ser mais adequado, pois trata-se de um processo bem mais complexo do que a simples adsorção de moléculas numa superfície (Kuntz e Kauzmann, 1974).

À medida em que o polímero absorve vapor de água, ele vai sofrendo modificações de constituição, dimensões e outras propriedades. A composição química e a estrutura submicroscópica de um dado material determinam não somente a quantidade de vapor absorvida por ele em determinadas condições, como também até que ponto e de que maneira a água absorvida afeta o comportamento químico e mecânico do sistema.

4.2. Isotermas de Sorção de Água

Os dados experimentais sobre sorção-dessorção de vapor são usualmente expressos através das chamadas isotermas de sorção de água, que são descritas como a relação entre o teor de água absorvida por uma substância e a pressão de vapor relativa da atmosfera à qual está exposta, a temperatura constante, no estado de equilíbrio termodinâmico entre a água e o material (Neuber, 1981). Aqui a pressão de vapor relativa é definida como p/p_0 , onde p é a pressão de vapor na atmosfera e p_0 a pressão de vapor de saturação, a dada temperatura. A umidade relativa, em porcentagem, é $100 p/p_0$.

As isotermas de sorção de água não dão informação direta sobre as interações específicas biopolímero-água. Existem contudo, modelos teóricos (Morton e Hearle, 1975) de modo que a aplicação

das equações de sorção, derivadas desses modelos, permite uma estimativa de alguns parâmetros de hidratação específicos.

As isotermas de sorção de água por biopolímeros em geral são curvas sigmóides, como a que se vê na figura 4.2.1 (Berg e Bruin, 1981). A região I representa a fração de água fortemente ligada, com uma entalpia de vaporização consideravelmente maior que a da água livre. Em geral se considera que essas primeiras moléculas de água são sorvidas em grupos polares ativos (Pauling, 1945). Nessa região as moléculas do biopolímero agem como absorventes físicos rígidos que absorvem água em sítios de sorção ativos (absorção localizada).

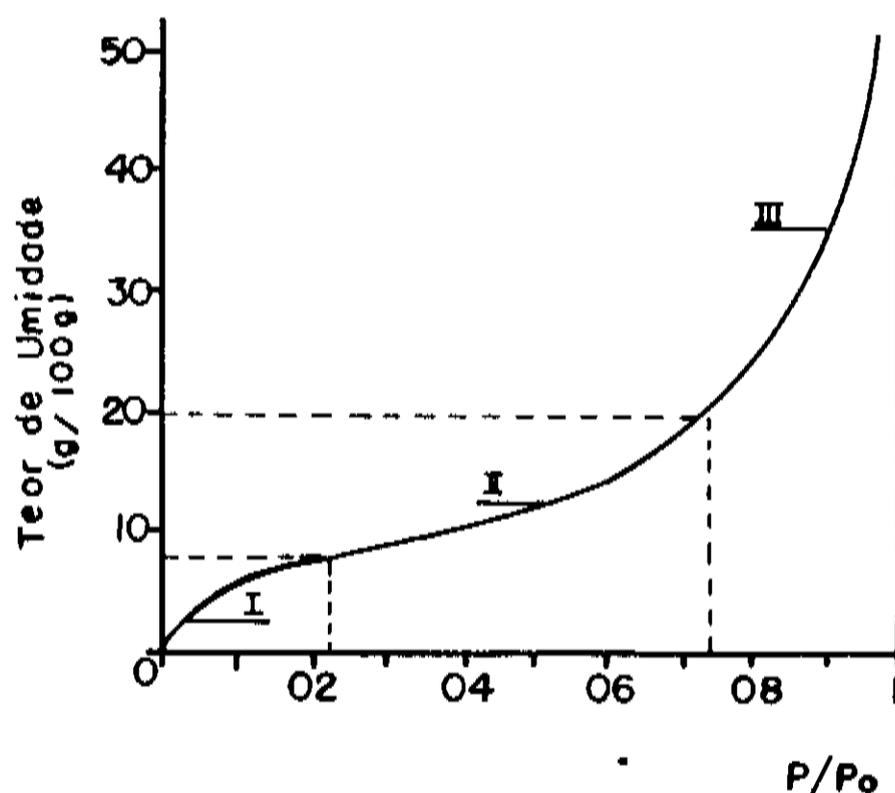


Fig. 4.2.1 - Isoterma de sorção de água, típica de biopolímeros (Berg e Bruin, 1981)

A região II representa uma fração de água ligada menos fortemente que a primeira. As moléculas de água são absorvidas junto às primeiras moléculas ou penetram em sítios novos criados pela estrutura já inchada. Essa região pode ser considerada como uma transição contínua do primeiro para o terceiro tipo de água.

A terceira região representa a água que ocupa mecanicamente os espaços vazios do sistema, e cujas propriedades são semelhantes às da água livre (bulk). Aqui nenhum calor de ligação em excesso é detectado.

Nas isotermas de sorção de água por biopolímeros é característico o efeito da histerese entre a dessorção e a absorção: a curva obtida na resorção (quando a amostra seca é novamente umedecida) situa-se abaixo da curva de dessorção. Esse fato sugere que não existe no sistema biopolímero-água um verdadeiro equilíbrio termodinâmico, apesar de ser um processo reproduzível, devido à irreversibilidade do processo de sorção (Kapsalis, 1981).

Uma explicação para o efeito da histerese nas isotermas de sorção de celulose foi dada por Hermans, e baseia-se em efeitos moleculares (Morton e Hearle, 1975). Quando uma fibra de celulose completamente seca é colocada em atmosferas de crescente umidade relativa, moléculas de água são absorvidas com o conseqüente inchamento da estrutura molecular da fibra. Com isso há um processo de quebra das ligações secundárias entre as moléculas da estrutura, aumentando então o número de hidroxilas capazes de agir como sítios ativos de sorção. Na dessorção, ao contrário, a estrutura tende a se contrair, mas esse processo é retardado pela

persistência de água ligada nos sítios novos formados na absorção. Assim, para um mesmo grau de umidade relativa, o número de moléculas de água absorvidas é maior na dessorção do que no processo de absorção.

Segundo Kapsalis, 1981, numa revisão das teorias correntes sobre o efeito da histerese em sorção de vapor, esse efeito, no caso de proteínas, seria atribuído a deformações das cadeias polipeptídicas na molécula, uma vez que a água vai ocupar posições favoráveis à formação de pontes de hidrogênio, o que seria causa de tensões moleculares.

Existem várias interpretações para os resultados de medidas de absorção-dessorção, com propostas de modelos teóricos (Kuntz e Kauzman, 1974), geralmente partindo de uma teoria de superfície ou de solução.

Nos modelos de superfície, considera-se o absorvente (polímero) como tendo um número fixo de sítios de ligação, onde se fixam as moléculas de água, primeiramente em uma monocamada (hidratação primária) e depois em multicamadas. Os vários modelos diferem bastante quanto à proposta sobre o tipo de interação entre as moléculas de água e as do polímero, bem como nas multicamadas.

Um dos modelos mais simples é o de Langmuir, 1918 (citado em Guggenheim, 1966), que supõe um número fixo de sítios de ligação, localizados, com uma única energia de absorção. Considera uma monocamada apenas, sem interação entre as moléculas adjacentes absorvidas. A isoterma de Langmuir é expressa pela equação

$$\frac{\omega}{\omega_m} = \frac{cp/p_0}{1+cp/p_0}$$

onde ω é o teor de água presente na molécula em equilíbrio com uma atmosfera a pressão de vapor p/p_0 ; ω_m é o teor de água absorvida na monocamada (hidratação primária), ambos expressos nas unidades adequadas, e c uma constante. Essa equação ajusta bem a curva experimental somente para pressões de vapor muito baixas. Para pressões mais altas, tende à saturação.

Brunauer, Emmett e Teller (1938) estenderam o modelo de Langmuir postulando, além de uma monocamada com sítios de ligação independentes, camadas adicionais de absorção (multicamadas), cuja energia de ligação é menor do que na primeira. Sua análise é baseada no equilíbrio entre a taxa de evaporação e a de condensação. A equação, conhecida como BET, pode ser escrita da seguinte forma:

$$\frac{\omega}{\omega_m} = \frac{cp/p_0}{(1-p/p_0)[1-(c-1)p/p_0]}$$

Essa equação se ajusta bem ao tipo sigmóide das curvas de sorção, mas apresenta discrepâncias para pressões de vapor acima de 50%.

Guggenheim, 1966, através de tratamento mecânico-estatístico, propôs uma equação para as isotermas de sorção, a qual, além de ser derivada em sólida base teórica, permite uma interpretação clara do significado dos parâmetros do ponto de vista termodinâmico. O modelo de Guggenheim supõe uma

superfície com um número fixo de sítios primários de absorção, idênticos e independentes, sendo que em cada um dos sítios podem se acomodar várias moléculas. A equação para esse modelo é a seguinte, sendo usada a mesma notação que para as anteriores:

$$\frac{\omega}{\omega_m} = \frac{cp/p^*}{(1-p/p^*)[1+(c-1)p/p^*]}$$

onde c e p^* são parâmetros relacionados com as propriedades termodinâmicas do material:

$$c = \exp(-\Delta\mu_m/RT)p^*/p_0$$

e

$$p^* = p_0 \exp(\Delta\mu_M/RT) \quad ;$$

sendo $\Delta\mu_m$ a diferença entre o potencial químico das moléculas ligadas aos sítios primários e o do líquido, e $\Delta\mu_M$ a diferença entre o potencial químico das moléculas ligadas aos sítios secundários (multicamadas) e o do líquido. R é a constante de gás ideal e T a temperatura absoluta. Os parâmetros c e p^* são característicos da superfície, do gás absorvido e da temperatura, e independentes da pressão p .

A equação de Guggenheim permite a separação da água absorvida em componentes: a água absorvida na primeira monocamada e a absorvida nas camadas posteriores, cuja soma resulta na

absorção em multicamadas.

Essa equação, através dos três parâmetros ω_m , c e p^* dá uma descrição completa da absorção. Observa-se que, fazendo-se $p^* = p_0$, obtém-se a equação de BET.

Uma visão alternativa às teorias de absorção em superfície considera uma mistura de moléculas de tipos diferentes, numa solução sólida, sem limitações sobre a posição das moléculas. Hailwood e Horrobin, 1946 (citado em Morton e Hearle, 1975) propõem um modelo teórico que consiste numa combinação da ligação das primeiras moléculas de água em determinados sítios (formando hidratos) com a formação de uma solução sólida ideal para a absorção da água remanescente. Formalmente, chega-se a uma equação semelhante à de Guggenheim, com três parâmetros ajustáveis: ω_m , correspondente ao número de sítios de hidratação específicos, e duas constantes, proporcionais, respectivamente, à atividade dos sítios de hidratação específicos e da solução sólida. Também como a equação de Guggenheim, ela pode ser separada nas componentes, correspondentes à água em hidratos e à água em solução.

4.3. Hidratação e Cristalinidade em Celulose

As fibras de celulose são bastante higroscópicas. Como todas as fibras naturais de origem animal e vegetal, há em suas moléculas grupos que atraem a água; isso provavelmente vem do fato de que as moléculas são formadas em presença de água. As moléculas de celulose contêm três grupos hidroxila para cada resíduo de

glicose, os quais podem formar pontes de hidrogênio com moléculas de água.

Em geral, as teorias existentes sobre absorção de água pela celulose consideram que o fenômeno relaciona-se diretamente com a estrutura de ordem-desordem das fibras, e que há dois tipos de água absorvida (McLaren e Rowen, 1951, Howsmon, 1954): 1) água ligada às moléculas de celulose, com uma energia de ligação maior do que a encontrada entre moléculas de água e 2) água condensada dentro da estrutura, sem efeitos de calor acima dos normalmente encontrados na condensação.

As fibras de celulose são macromoléculas, cujo empacotamento varia de ponto para ponto dentro da fibra. Nas regiões mais ordenadas, as moléculas são mantidas num arranjo regular através de pontes de hidrogênio entre grupos hidroxílicos. Assim, para que as moléculas de água penetrem nas regiões cristalinas, é necessário que os grupos ativos sejam liberados, pela quebra dessas ligações. À medida que a ordem diminui, o número de grupos hidroxílicos envolvidos, através de uma ponte de hidrogênio, com uma molécula adjacente vai decrescendo, de modo que nas regiões desordenadas encontra-se um grande número de hidroxilas livres, que atuam como centros de sorção, capazes de absorver água com uma energia de ligação maior do que na água livre.

O padrão de difração de raios X da celulose nativa não mostra alterações nas posições das reflexões principais com um maior ou menor teor de água na fibra (Morton e Hearle, 1975), o que foi confirmado nesse trabalho. Essa é uma indicação de que a

água não é absorvida nas regiões cristalinas. A umidade deve ser acessível então às regiões não cristalinas e às superfícies das regiões cristalinas. Assim, a capacidade de absorção de água pode fornecer uma estimativa da razão efetiva regiões cristalinas/não cristalinas em fibras de celulose.

A hidratação em celulose nativa, bem como sua influência sobre a cristalinidade, tem sido estudada, por diversas técnicas, há várias décadas. Já em 1924, Urquhart e Williams levantam isotermas de sorção para o algodão, e Urquhart, 1929, (ambos citados em McLaren e Rowen, 1951) propõe uma teoria para a histerese observada, baseada em efeitos moleculares.

Herman e Weidinger, 1948, numa revisão sobre os estudos de cristalinidade em fibras de celulose por difração de raios X, observam que a quantidade de substância amorfa em fibras de celulose é aproximadamente proporcional à sua capacidade de absorção de umidade. Segundo Hovsman, 1954, o "grau de cristalinidade" de uma fibra não descreve adequadamente seu estado físico. Fatores como o tamanho do cristal e a natureza das regiões intermediárias, nem cristalinas nem totalmente amorfas, afetam a absorção de água, sem afetar apreciavelmente a cristalinidade determinada por métodos físicos.

Segundo Valentine, 1958, em comentários sobre vários resultados publicados sobre o assunto, há considerável evidência de que uma fração apreciável da sorção total está associada às superfícies dos cristalitos. Aparentemente somente aqueles grupos hidroxila não participantes de ligações hidrogênio de uma maneira

cristalina regular ficam disponíveis como sítios de absorção de moléculas de água.

Morrison e Dzieciuch, 1959, em estudos sobre as propriedades termodinâmicas do sistema celulose-vapor de água, concluem ser a histerese na dessorção-absorção de vapor de água ligada à entropia, pois a dessorção apresenta uma entropia positiva maior, sendo portanto um processo mais desordenado que a absorção.

Comparando a cristalinidade de fibras de algodão maduro molhadas e secas, por difração de raios X, Heyn, 1965, observa que esta diminui com um maior grau de umidade. Segundo esse autor, além da cristalinidade original da fibra molhada, tem lugar uma cristalização maior da celulose durante a secagem, como resultado da formação de pontes de hidrogênio entre grupos hidroxila, intra e intermoleculares, anteriormente ligados à água.

Ray, 1969, em medidas de cristalinidade em fibras de celulose nativa pelo método de Hermans e Weidinger, 1949, observa que a cristalinidade diminui com o aumento da umidade. O mesmo autor, em 1971, utiliza o método da intensidade integrada e confirma os resultados obtidos anteriormente. Considera esses resultados consistentes também com a diminuição da densidade das fibras umedecidas.

Creely e Tripp, 1971, aplicando a técnica de Segal e outros, 1959, para a determinação do efeito da umidade sobre a cristalinidade da celulose, observam que esta cresce com o crescente grau de umidade. O mesmo resultado é obtido por Seitsonen e Mikkonen, 1972.

Froix e Nelson, 1975, estudam a interação da água com a celulose através dos tempos de relaxação em ressonância magnética nuclear, e observam que há uma forte interação entre um teor crítico de água e as regiões amorfas das moléculas de celulose.

Em estudos sobre a água ligada em vários tipos de celulose nativa por varredura calorimétrica diferencial (DSC), Nakamura e colaboradores, 1981, observam que o teor de água ligada decresce com o maior grau de cristalinidade da amostra, medido pelo método da intensidade integrada. Separam a água absorvida em celulose em três tipos: a) água livre, cuja temperatura de transição, entalpia e picos nas curvas de DSC são iguais à da água pura; b) água ligada, aquela restrita por grupos hidroxila das moléculas de celulose, cuja temperatura de transição é mais baixa do que a da água pura; e c) a água ligada não "congelada", cuja transição não é detectada na transição de primeira ordem. Os mesmos autores, em 1983, estudam o efeito da água ligada sobre as propriedades mecânicas (resistência à tração, alongação e elasticidade) de fibras de algodão. Observam, por difração de raios X, que a largura a meia altura da reflexão (002) aumenta com um maior teor de água, tornando-se constante para umidades relativas entre 20% e 50%. Segundo esses autores, os resultados obtidos por DSC mostram que um teor de água de 20% concorda bem com a quantidade de água ligada. Essa diminuição da largura a meia altura pode ser atribuída ou a um aumento no tamanho dos cristalitos ou à relaxação da tensão interna.

4.4. O Papel da Água na Estrutura do Colágeno Nativo

A água desempenha um papel de suma importância na estrutura e estabilização do colágeno. Há muitas evidências, de estudos feitos por várias técnicas, sobre o envolvimento da água com a estrutura dessa proteína.

É fato conhecido que o diagrama de difração de raios X pelo colágeno, tanto a baixo como a alto ângulo, difere bastante com a maior ou menor quantidade de água presente na proteína (Traub e Piez, 1971). Os diagramas mostram desorientação quando a amostra é completamente seca, e o grau de orientação aumenta consideravelmente à medida em que ela vai sendo umedecida.

Já em 1933, Kuntzel e Pranke (citado em Bear, 1952) verificam que a proeminente reflexão equatorial se desloca para ângulos menores com o umedecimento da amostra; o espaçamento correspondente varia de 10,4Å em material bem seco até um limite de 15 a 16Å no colágeno umedecido. Bull, em 1944, registra as isotermas de sorção de água pelo colágeno e outras proteínas, interpretando seus resultados através da equação de BET. Além das variações no espaçamento equatorial, Bear, 1952, observa que as reflexões no meridiano não são deslocadas apreciavelmente pela hidratação; também o meio-halo difuso não se desloca, mas se torna consideravelmente menos proeminente. Rougvie and Bear, 1953, comparam resultados obtidos por difração de raios X a alto e baixo ângulo de fibras de colágeno, relacionando as alterações no macroperíodo observado no meridiano com as variações no espaçamento equatorial, devidas à variação no grau de hidratação.

Ambos os tipos de diagramas mostram desorientação quando a fibra é seca, mas essa alteração é reversível com a rehidratação.

Com esses resultados já se pode verificar que se trata de uma estrutura composta de finos elementos paralelos, a qual, em processos de hidratação e secagem, se mantém aproximadamente constante, longitudinalmente, mas cuja separação transversal à direção axial comum aumenta com a hidratação.

Esipova e colaboradoras, 1958, apresentam estudos detalhados sobre o papel da água na estrutura do colágeno por difração de raios X a alto ângulo e medidas de sorção. Verificam que as moléculas de água são absorvidas primeiramente nas regiões amorfas das fibras. As regiões ordenadas no colágeno absorvem relativamente pouca água, e isso nas proximidades da cadeia principal, a uma distância não maior do que 3Å.

Em 1968, Ramachandran e Chandrasekharan propõem um modelo de estrutura para o colágeno com duas pontes de hidrogênio intercadeias para cada três resíduos de aminoácidos, a intervalos de aproximadamente 3Å ao longo do comprimento da molécula.

Em estudos por difração de raios X a alto ângulo de fibras e pó de colágeno curtido, Heidemann e Keller, 1970, observam variações na posição e na intensidade devida às cadeias laterais concluindo sobre a grande influência da água na cristalinidade.

Lüscher e colaboradores, 1973, determinam o teor de água estrutural em colágeno por difração de raios X a alto ângulo e isotermais de sorção de água. Observam que no decorrer de um ciclo sorção/dessorção há histerese no grau de ordem helicoidal,

verificada através da intensidade da reflexão meridional. A ligação de água na hélice se processaria em duas etapas distintas.

Em experiências com medidas mecânicas, usando pêndulo de torsão invertido, e técnicas criogênicas de raios X, Nomura e colaboradores, 1977, identificam quatro regimes de hidratação do tecido colagenoso: 1) água estrutural, incorporada à hélice tripla; 2) água ligada, associada a cadeias laterais polares; 3) uma região de transição e 4) água livre, que constituiria, junto com mucopolissacarídeos, a matriz interfibrilar.

Grigera e Mascarenhas, 1978, baseados em resultados publicados sobre colágeno e lisosima, obtidos através de NMR, relaxação dielétrica e ETSC, propõem a existência de três tipos de água ligada a essas proteínas, com diferentes tempos de relaxação: a) água fortemente ligada; b) moléculas de água ligadas a grupos polares e ligações peptídicas e c) água presente como moléculas praticamente livres, provavelmente em multicamadas ao longo da proteína.

Ainda em 1968, Pineri e colaboradores estudam a influência da hidratação em colágeno através da medida do calor envolvido na fixação da água, dependendo do grau de hidratação. Observam cinco regimes de absorção de água e propõem um modelo que leva em conta as energias correspondentes aos diferentes regimes de fixação.

Dados sobre ressonância magnética nuclear e relaxação dielétrica em colágeno hidratado são interpretados, em termos do modelo de hidratação de Ramachandran, por Grigera e Berendsen, 1979. Todos os dados são compatíveis com esse modelo, indicando

dois sítios de ligação específicos para três aminoácidos na hélice tripla. Dados de sorção são interpretados de acordo com a teoria de multicamadas de Guggenheim, e utilizados para o cálculo da fração de água ligada nos sítios primários.

Luscher-Mattli e Rüegg, 1982, propõem um modelo de hidratação segundo o qual a conformação em solução de biopolímeros nativos é estável a partir de um grau crítico de hidratação, que corresponde à fração de água fortemente ligada, correspondendo a cerca de 20% da esfera de hidratação primária.

Em estudos por difração de raios X a alto ângulo em diferentes tipos de colágeno, Lees e colaboradores, 1984, correlacionando o espaçamento equatorial com o teor de água, observam que todos os tipos de colágeno têm essencialmente o mesmo espaçamento quando secos, mas que este difere com um crescente teor de água. Concluem que o empacotamento equatorial das fibrilas de colágeno pode variar de retangular a quase hexagonal, dependendo da estrutura transversal e do teor de água. Cusack e Lees, 1984, através do espalhamento Brillouin determinam a velocidade acústica longitudinal ao longo do eixo de fibras de colágeno para diferentes umidades relativas. A partir dos resultados, identificam os mesmos cinco regimes de Pineri e colaboradores. Bigi e colaboradores, 1987, através de difração de raios X a alto e baixo ângulo, análise termogravimétrica e dilatométrica, estudam as modificações no empacotamento molecular do colágeno, após a remoção da água ligada e estrutural, aquecendo-se as amostras, em ar, a diferentes temperaturas, até 200°C. Concluem que as modificações observadas com a remoção de

boa parte da água estrutural são reversíveis, enquanto a retirada da última porção de água provavelmente corresponde ao início da depolimerização.

5. EXPERIMENTAL: CELULOSE

5.1. Seleção das Amostras

O estudo das características estruturais de fibras de celulose nativa foi realizado em colaboração com o Instituto Agrônomo de Campinas. O objetivo inicial desse estudo era o de investigar as relações entre as propriedades mecânicas e a estrutura molecular e morfologia do algodão ali produzido. Medidas preliminares por difração de raios X haviam demonstrado que pequenas diferenças observadas na cristalinidade, tamanho de cristalito, posição dos picos, não apresentavam correlação com testes de resistência da fibra. Esta depende diretamente da maturidade e da textura cristalina. Ao examinar amostras de diferentes variedades de algodão, não se tendo um controle da maturidade e outras variáveis como finura, uniformidade, comprimento das fibras, verificou-se ser impossível correlacionar dados sobre a estrutura com as propriedades mecânicas.

Tornou-se claro então que os dados de raios X só podem ser interpretados quando se controlam as outras variáveis, entre as quais a maturidade aparece como a mais importante. A maturidade da fibra de algodão pode ser definida como o grau de espessamento da parede secundária da fibra (Thibodeaux e Evans, 1986). Mas a espessura da parede não é um indicador suficiente, devendo ser considerada em relação ao diâmetro ou à finura da fibra. A maturidade é dada em geral em porcentagem.

A partir desse critério, foram selecionadas amostras de três variedades de algodão: IAC 17, IAC 19, IAC 20, com

maturidades em torno de 40% (maturidade muito baixa), 50% (baixa) e 60% (média). A tabela 5.1 indica as propriedades mecânicas das amostras selecionadas.

TABELA 5.1

LOCALIDADE	ARARAS			ITUVERAVA			PINDORAMA		
Variedade	IAC17	IAC19	IAC20	IAC17	IAC19	IAC20	IAC17	IAC19	IAC20
Maturidade(%)	36,92	41,82	38,10	50,63	52,75	51,72	57,35	58,08	61,10
Comprimento 2,5% (mm)	26,48	27,48	27,18	25,73	26,37	26,25	27,27	28,25	28,13
Finura (índice micronaire)	3,42	3,58	3,37	4,33	4,57	4,55	4,67	4,50	4,67
Resistência intrínseca (G/TEX)	16,40	17,40	16,63	20,32	22,78	22,47	20,38	21,58	22,05
Uniformidade de comprimen- to (%)	42,72	42,25	43,22	46,93	48,78	48,67	44,42	44,08	44,68

Os valores apresentados para as propriedades mecânicas são os medidos na Seção de Tecnologia de Fibras do IAC, de acordo com o método padrão para cada caso. O índice micronaire corresponde ao complexo finura-maturidade da fibra. A unidade de

resistência intrínseca é g/tex, o que significa grama-força/tex, onde tex é a massa em gramas de um comprimento de 1000m. Tanto o comprimento quanto a maturidade são medidos por métodos óticos.

Como se vê na Tabela 5.1, as amostras com maturidade em torno de 40% correspondem à localidade de Araras, as de 50% a Ituverava e de 60% a Pindorama. A referência a elas nesse trabalho será através de uma letra, A, I ou P, correspondendo à localidade, e um número, 17, 19 ou 20, correspondendo à variedade.

5.2. Difração de Raios X

Para a obtenção dos diagramas de difração de raios X, foi preparado um porta-amostras especial, em que as fibras se mantêm paralelas e planas, sem serem submetidas a esticamento, e sem suporte posterior, eliminando assim qualquer influência estranha à amostra no diagrama de difração. As fibras foram colocadas em posição vertical, perpendicularmente ao feixe incidente de raios X.

Os difratogramas foram obtidos num difratômetro Philips PW 1140, usando-se radiação de $\text{Cu}(K_{\alpha})$; monocromador de feixe difratado, que emprega um cristal curvo de LiF; fendas de divergência de 1° . As medidas foram feitas através de varredura horizontal contínua, a velocidade de $0,5^{\circ}(2\theta)/\text{min}$, no intervalo angular de 5° a $40^{\circ}(2\theta)$, com uma potência de 25mA x 46 kV.

Difratogramas foram obtidos para todas as amostras, a umidade ambiente. Com o intuito de se estudar o papel da água nas fibras de celulose, foram realizadas medidas para algumas amostras

(P20 e A20, as de maior e menor maturidade), fazendo-se variar o grau de umidade. Esse controle de umidade foi realizado deixando-se as amostras em dessecadoras sobre soluções saturadas de sais, a uma pressão de vapor conhecida, por períodos que variaram em torno de dez dias. As amostras foram inicialmente umidecidas a uma pressão de vapor relativa de 0,90, sendo em seguida submetidas a dessorção gradual, até a secagem sobre P_2O_5 , à temperatura ambiente (22°). A partir daí, foram novamente umidecidas até o valor inicial de p/p_0 .

Para a interpretação dos difratogramas, as intensidades foram corrigidas pelo fator de polarização (Alexander, 1969):

$$I_{\text{corr}}^P = I_{\text{exp}} \frac{2}{(1 + \cos^2 2\theta)}$$

e para o fator geométrico de Lorentz,

$$I_{\text{corr}}^L = I_{\text{exp}} \frac{\sin 2\theta}{2}$$

O fator de polarização, na forma como está colocado, é comum para todos os métodos de difração de raios X, exceto no caso de monocromatização do feixe primário, em cujo caso a expressão contém um termo adicional. Além disso, o monocromador de feixe difratado elimina o espalhamento incoerente (Klug e Alexander, 1974). A correção por absorção da amostra é desprezível para o intervalo angular de 2θ coberto pela varredura (Hindeleh e colaboradores, 1980). As intensidades obtidas nos difratogramas

(I_{exp}) foram então corrigidas pelo fator de polarização e de Lorentz:

$$I_{corr}^{LP} = I_{exp} \frac{\text{sen } 2\theta}{(1 + \cos^2 2\theta)}$$

Na fig. 5.1 vê-se um difratograma com as correções mencionadas.

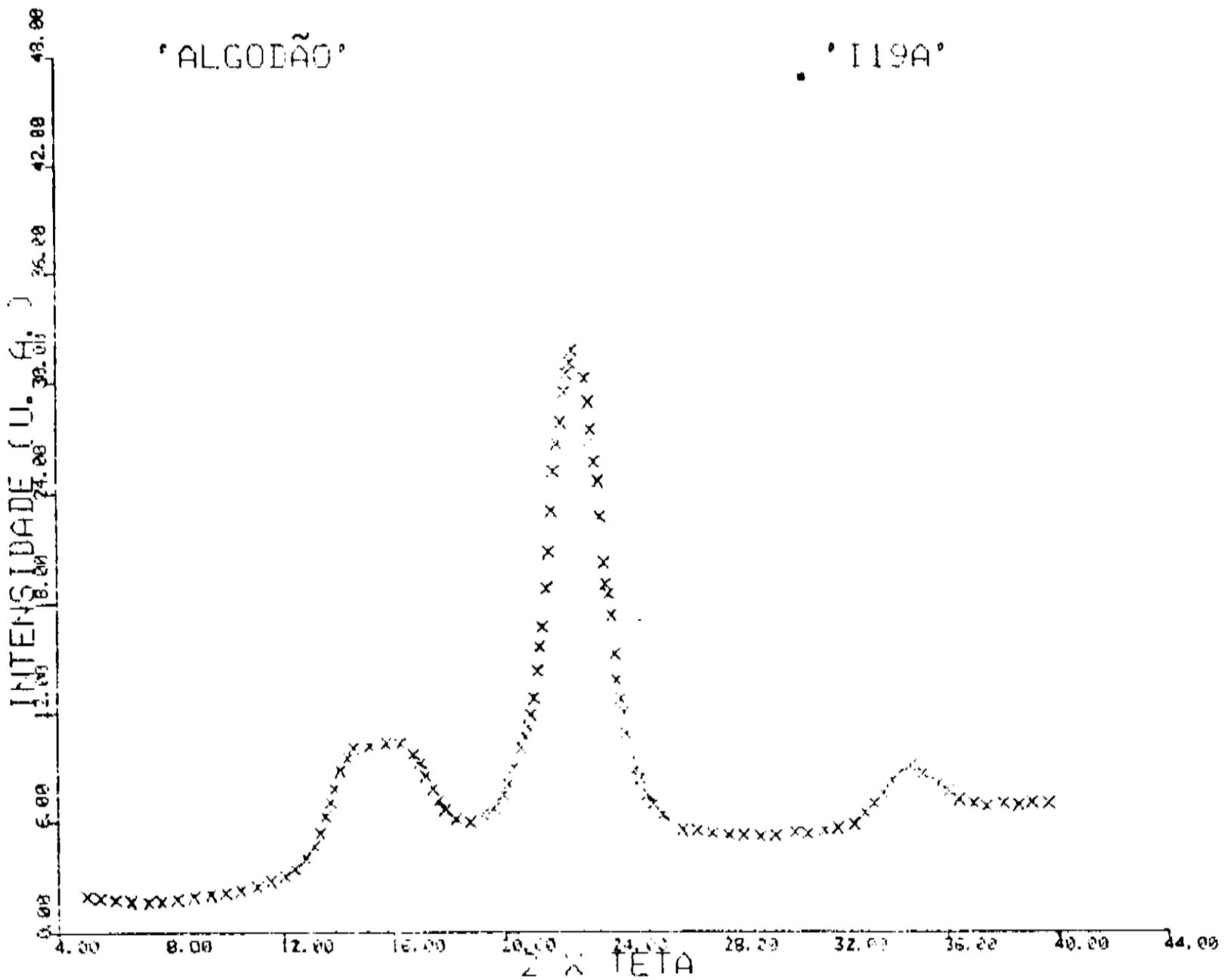


Fig. 5.1 - Difratograma obtido de amostra de algodão, nativo, com os resultados experimentais corrigidos (cf. texto)

A partir dos dados experimentais corrigidos, procedeu-se ao ajuste para a separação dos picos superpostos, e determinação da largura do pico de difração, com o objetivo de se calcular o índice de cristalinidade e o tamanho médio dos cristalitos das fibras de algodão nativo.

Para se proceder a esses cálculos foi adotada a aproximação de Gauss para o perfil dos picos de difração, por ser esta aproximação bastante adequada para polímeros, que apresentam perfis de difração em geral largos (Alexander, 1969, Buchanan and Miller, 1966). Para a radiação de fundo foi atribuída uma variação linear com o ângulo 2θ . Esta é uma suposição válida para um intervalo angular não muito grande (Langsford, J.I. and Wilson, A.J.C., 1963); além disso, considerou-se que se aplicava bem aos dados experimentais.

O ajuste foi feito utilizando-se um programa computacional baseado no método dos mínimos quadrados (Bevington, 1969). A intensidade para cada pico é dada por:

$$I_p(x) = H_p \exp \left\{ -\ln 2 \left[\frac{x - P_p}{L_p} \right]^2 \right\}$$

onde x é o ângulo 2θ , H_p é a intensidade máxima, P_p a posição de máximo e L_p a largura a meia altura. O ajuste considera as gaussianas acima da reta-base dada por

$$I(x) = a + bx$$

Para esse cálculo, são introduzidos os parâmetros $a, b, H_p^i, L_p^i, P_p^i$, $i = 1, N$, onde N é o número de picos. O programa fornece os parâmetros ajustados e as áreas integradas de cada reflexão.

Para a celulose, foram ajustadas cinco gaussianas, correspondendo às reflexões equatoriais (101), (10 $\bar{1}$), (002), e às não equatoriais (021) e (040). A figura 5.2 mostra o resultado de um ajuste, onde as cruces indicam os pontos experimentais, e a linha contínua indica a curva ajustada, soma das gaussianas e a reta base.

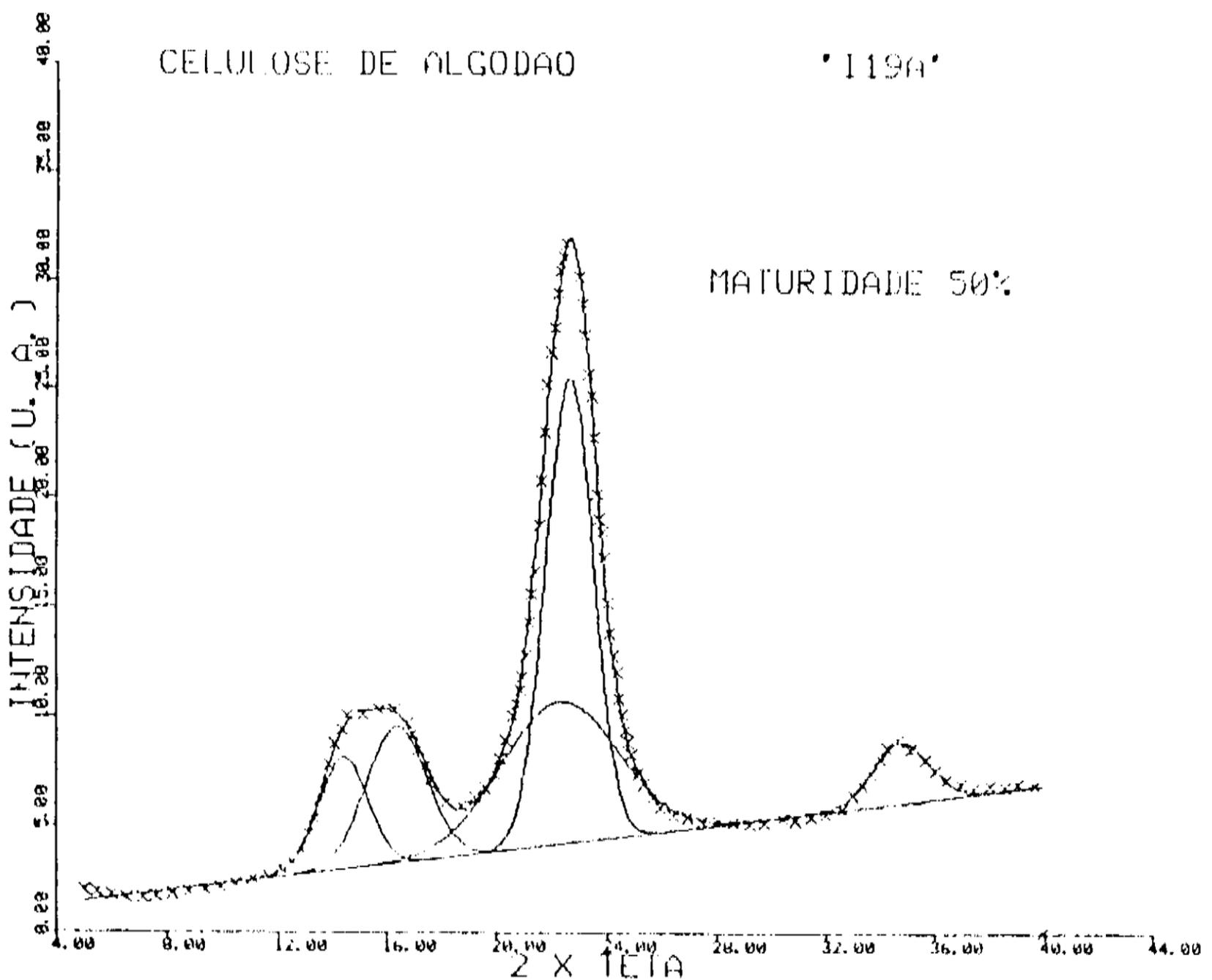


Fig. 5.2 - A mesma curva experimental da fig. 5.1, ajustada em

A partir dos parâmetros ajustados, foram calculados:

a) O índice de cristalinidade:

$$I_{cr} = \frac{\sum_{i=1}^4 A_i}{\sum_{i=1} A_i + A_r}$$

onde os A_i são as áreas integradas das primeiras quatro reflexões e A_r a área sob a reta base, no intervalo angular de 10° a 30° (2θ), que mostra ser um intervalo adequado, pois compreende as quatro reflexões mais intensas. Como a reflexão (040) não se encontra nesse intervalo angular, sua área integrada não foi considerada no cálculo do I_{cr} .

b) Os espaçamentos correspondentes às reflexões (hkl):

$$d_{hkl} = \frac{\lambda}{2 \sin \theta_{hkl}}$$

onde $\lambda = 1,542\text{\AA}$, comprimento de onda da radiação $\text{Cu}(K_\alpha)$, e θ_{hkl} é o ângulo de Bragg correspondente a cada espaçamento.

c) O tamanho médio dos cristalitos, na direção perpendicular ao plano (hkl):

$$L_{hkl} = \frac{k\lambda}{\beta \cos \theta_{hkl}}$$

onde k é o parâmetro de Scherrer, para o qual se adotou o valor 0.89, adequado para a celulose (Nieduszynski e Preston, 1970) e β_0

a largura diferencial da linha de difração, em radianos. A correção para o alargamento instrumental foi feita utilizando-se calcita (CaCO_3) como padrão de referência:

$$\beta_o = \sqrt{\beta^2 - \beta_{\text{ref}}^2}$$

com β a largura ajustada e β_{ref} a largura da linha de referência no ângulo mais próximo ao correspondente à reflexão (hkl) .

5.3. Medidas de Orientação

Para as medidas de grau de orientação cristalina das fibras, foram obtidos diagramas de difração de raios X por registro fotográfico. Foi utilizada uma câmara plana de transmissão, radiação $\text{CuK}\alpha$, filtrada (Ni), com a geometria indicada na fig. 5.3.

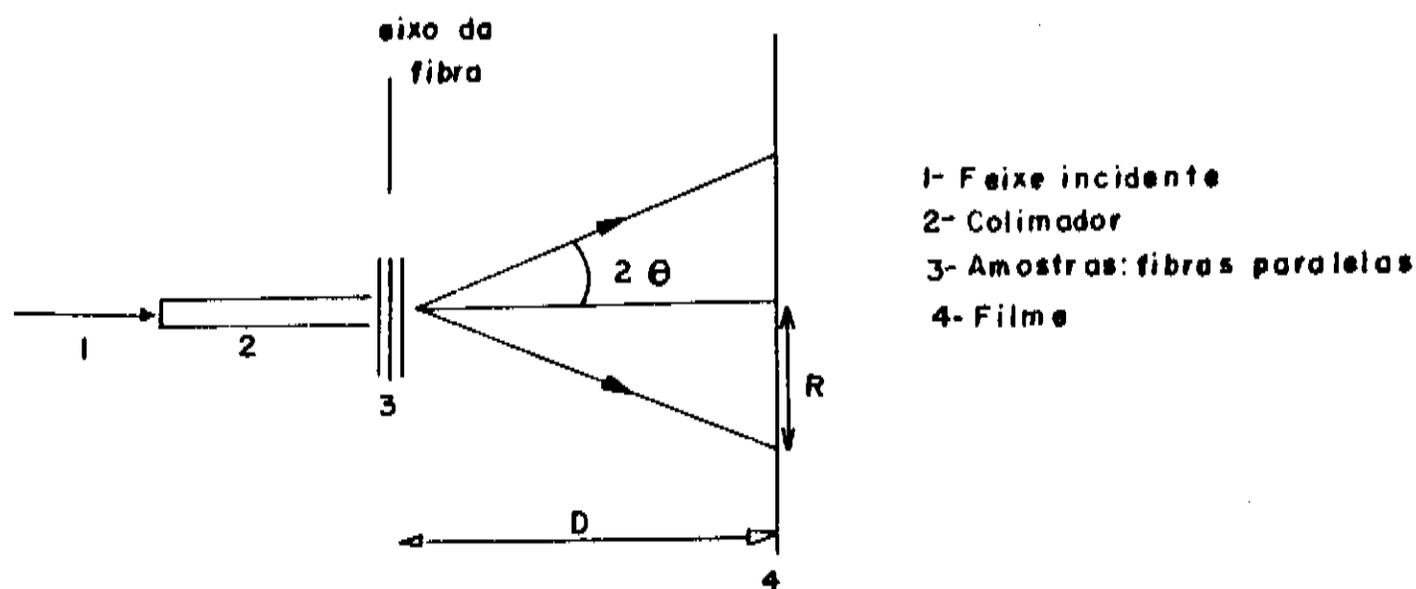


Fig. 5.3 - Geometria adotada para obtenção dos diagramas de fibras

Tempo de exposição: 4 horas

Distância filme-amostra: 3 cm.

A figura 5.4 mostra dois exemplos dos diagramas de fibras obtidos.

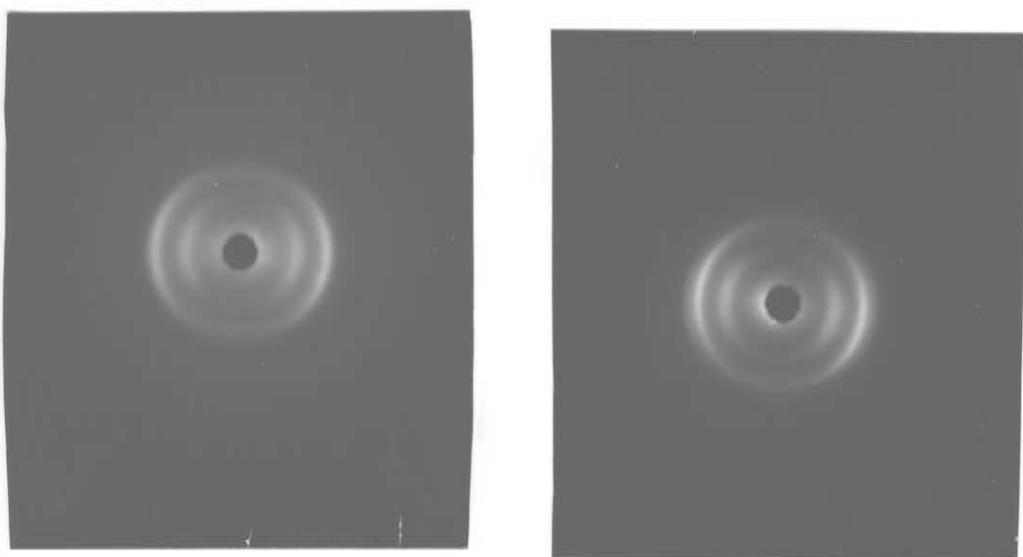


Fig. 5.4 - Diagramas de fibras das amostras A20 e P20

A partir dos filmes obtidos, passou-se à determinação da curva de distribuição de intensidades ao longo do círculo onde estão localizados os máximos de interferência devidos à reflexão (002). Essa é a reflexão escolhida usualmente para a celulose, por ser a mais intensa. Leituras no microdensitômetro foram realizadas, com varreduras radiais, isto é, seguindo o ângulo

azimutal β , de 0 a 90° , em intervalos de 5° . As varreduras compreenderam o primeiro e o terceiro quadrante, e tomou-se a média dos dois máximos de intensidades, para cada ângulo β . As intensidades $I(\beta)$, ao longo do arco (002), a determinado ângulo β , foram expressas em porcentagem do máximo ($\beta = 0^\circ$), depois de subtraído um background linear igual à intensidade a 90° .

Com o traçado das curvas de distribuição, procedeu-se às medidas dos seguintes parâmetros, que servem como estimativa do grau de orientação cristalina das fibras de celulose:

- a) $\psi_{50\%}$: ângulo azimutal para o qual a intensidade é metade do máximo.
- b) O fator de orientação de Hermans:

$$f_x = 1 - \frac{3}{2} \overline{\text{sen}^2 \beta}$$

onde

$$\overline{\text{sen}^2 \beta} = \frac{\sum I(\beta_1) \text{sen}^2 \beta_1 \cos \beta_1}{\sum_1 I(\beta_1) \cos \beta_1}$$

- c) O ângulo de Hermans, $\bar{\beta}$, obtido a partir do fator de orientação
- d) O ângulo espiral ϕ_{esp} e o ângulo α , que dá uma orientação média dos cristalitos em relação ao ângulo espiral. Para esses cálculos foi utilizado o método de DeLuca e Orr, 1961.

5.4. Isotermas de Sorção de Água

As isotermas de sorção de vapor de água para a celulose foram levantadas pelo método gravimétrico. As amostras foram inicialmente deixadas em atmosfera com umidade relativa de 90%, diminuindo gradualmente até a amostra seca. A umidade relativa foi controlada deixando-se as amostras sobre soluções saturadas de sais, com pressão de vapor definida. Para cada valor de umidade relativa, as amostras foram deixadas em equilíbrio por período de uma semana a dez dias, e em seguida pesadas numa balança de precisão. De três a quatro medidas foram realizadas, em dias consecutivos, para cada ponto da curva, e tirada uma média. Para a secagem completa, as amostras foram deixadas sobre P_2O_5 , a temperatura ambiente ($22^{\circ}C$).

O teor de água nas amostras foi calculado pela equação:

$$\omega = \frac{m - m_0}{m_0} \cdot 100$$

onde m é a massa da amostra, a certo grau de umidade relativa, e m_0 a massa da amostra seca. Os valores de ω são obtidos em gramas de água/100 gramas de polímero seco (g/100 g).

As isotermas de dessorção foram levantadas para todas as amostras de celulose, sendo que para três delas, A20, I20 e P20, que são amostras de uma mesma variedade e com os diferentes graus de maturidade, foi realizado o processo completo dessorção-absorção.

A partir dos resultados obtidos, foi feito um ajuste, por mínimos quadrados, dos resultados experimentais, à equação de Guggenheim. A partir desse ajuste, foram calculados:

a) ω_m : massa de água absorvida na primeira monocamada, quando completamente ocupada, que dá uma indicação do número de sítios primários de hidratação.

b) p^*/p_o , parâmetro que está relacionado com a diferença entre o potencial químico padrão da água nas multicamadas e o da água líquida ($\Delta\mu_M$), pela relação:

$$\frac{p^*}{p_o} = \exp(\Delta\mu_M/RT)$$

c) A constante c , relacionada à diferença entre o potencial químico padrão da água na monocamada e o da água líquida, $\Delta\mu_m$:

$$c = \exp(-\Delta\mu_m/RT)p^*/p_o$$

d) As grandezas $\Delta\mu_m$ e $\Delta\mu_M$.

e) A acessibilidade: se m for o número de sítios quimicamente receptivos por unidade polimérica, chama-se acessibilidade φ a fração deles fisicamente acessível (Dent, 1977). A acessibilidade está relacionada com ω_m pela expressão:

$$\omega_m = 100 m\varphi \frac{M}{M_o}$$

onde M é o peso molecular da água e M_0 o peso molecular da unidade polimérica. Para a celulose, $M_0 = 324$, o peso molecular de dois resíduos de glicose. Tradicionalmente se considera que apenas um grupo hidroxila por resíduo de glicose é efetivo na absorção (Morton e Hearle, 1975), de modo que $m = 2$. Como $M = 18$, obtém-se a relação entre φ e ω_m :

$$\varphi = 0.09 \omega_m$$

ou, em porcentagem:

$$\varphi \cdot 100 = 9 \omega_m$$

Essa expressão fornece portanto uma relação entre a acessibilidade e a fração de sítios primários de hidratação.

5.5. RESULTADOS

5.5.1. Medidas de Cristalinidade e Tamanho de Cristalito

O programa de ajuste das curvas experimentais obtidas por difratometria de raios X forneceu muito bons resultados. A curva ajustada coincide perfeitamente com aquela obtida experimentalmente, com uma separação nítida dos picos, acima da reta base. A figura 5.4 mostra o ajuste obtido para as amostras A20 e I20.

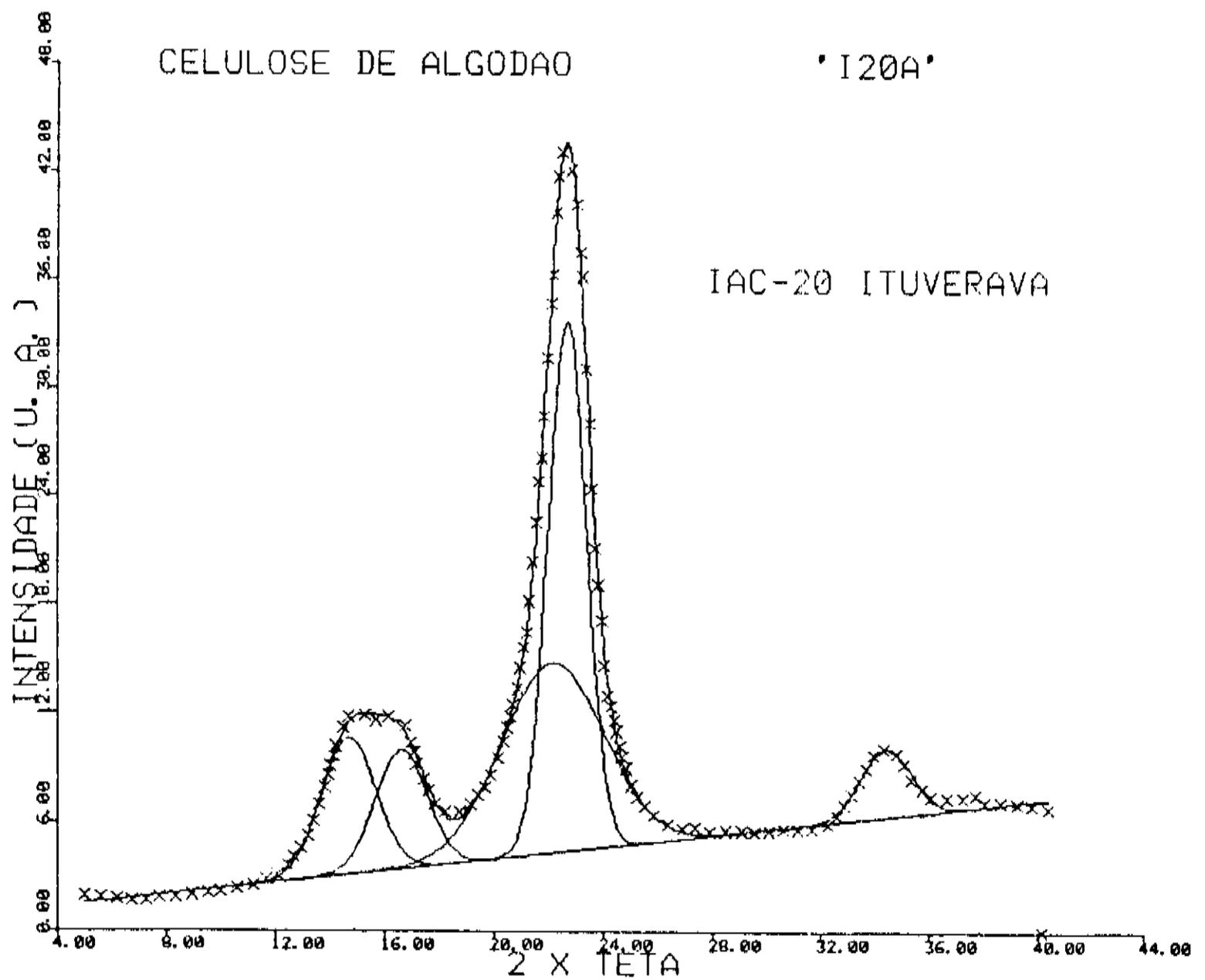
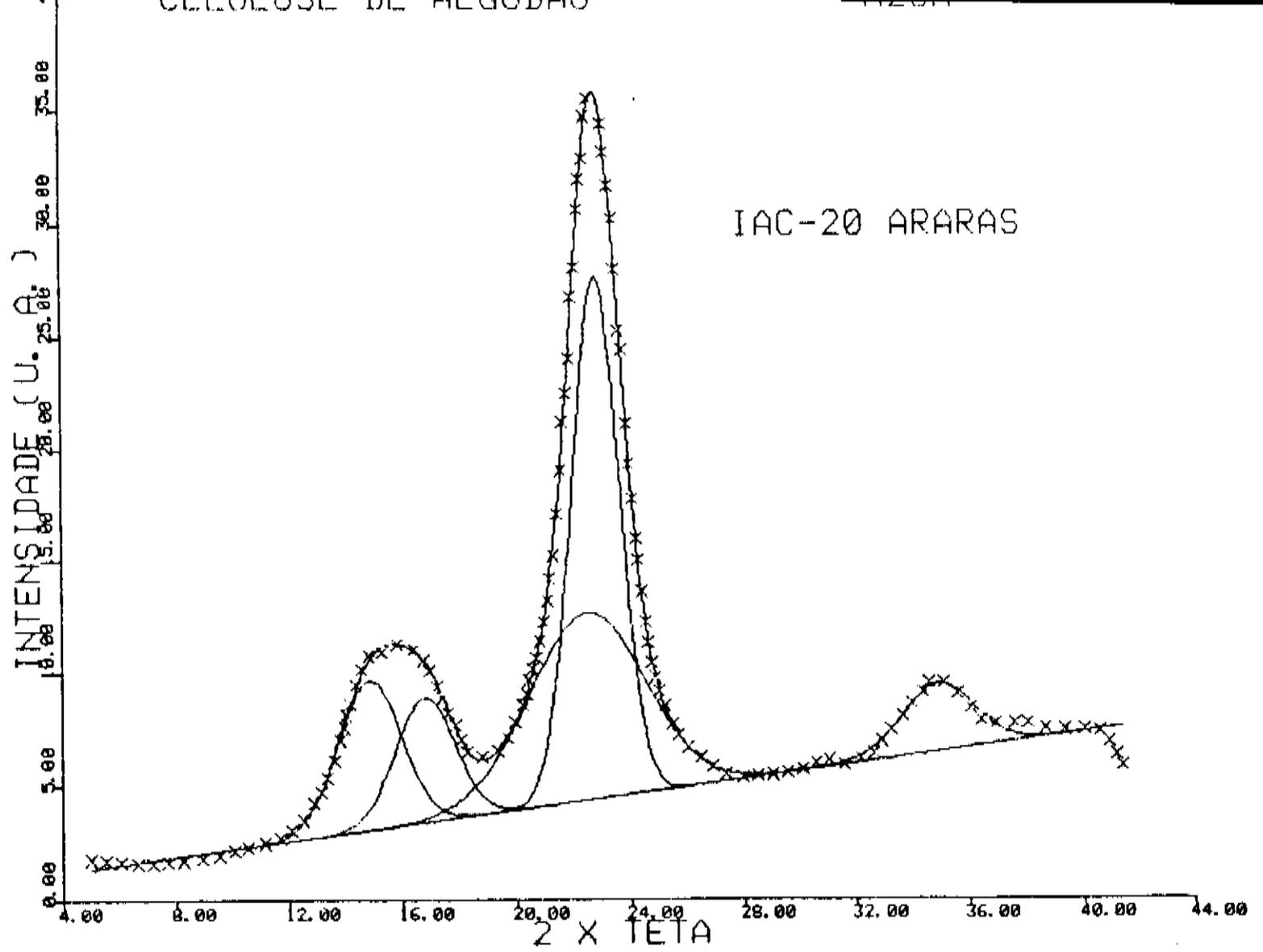


Fig. 5.4 - Ajuste dos difratogramas para as amostras A20 e I20. Pontos experimentais indicados com cruzeiros; curva ajustada com o traço continuo

Na tabela 5.2 aparecem alguns dos parâmetros calculados para as várias amostras: os espaçamentos correspondentes às reflexões equatoriais d_{101} , $d_{10\bar{1}}$ e d_{002} , o tamanho de cristalito na direção perpendicular ao eixo da fibra, L_{002} , o índice de cristalinidade, em porcentagem, e a fração amorfa, calculada como $A_m = 100 - I_{cr}$.

TABELA 5.2

Amostra	d_{101} (Å)	$d_{10\bar{1}}$ (Å)	d_{002} (Å)	L_{002} (Å)	I_{cr} (%)	A_m (%)
A ₁₇	5.95	5.26	3.89	47.71	59.00	41.00
A ₁₉	6.05	5.35	3.91	46.80	59.63	40.37
A ₂₀	5.96	5.27	3.90	41.15	61.04	38.96
I ₁₇	5.97	5.26	3.90	47.38	62.86	37.14
I ₁₉	6.14	5.41	3.93	40.18	59.21	40.79
I ₂₀	6.03	5.34	3.92	48.96	62.80	37.20
P ₁₇	5.80	5.15	3.85	40.56	61.95	38.05
P ₁₉	5.88	5.22	3.90	39.63	62.47	37.53
P ₂₀	5.96	5.27	3.93	46.48	60.97	39.03

Para a reflexão não equatorial (021) obteve-se um espaçamento médio de 4,0Å, um pouco abaixo do que seria de se esperar calculando-se seu valor pelos parâmetros da cela unitária monoclinica aceitos para a celulose I (4,3Å). Mas esses parâmetros são tomados como uma média para os vários tipos de celulose nativa, dependendo de sua origem vegetal. Essa discrepância pode ser explicada também como devida a alguma distorção na rede. O

espaçamento correspondente à reflexão (040) ficou em torno de 2,6Å.

Os valores médios obtidos para o tamanho dos cristalitos, nas direções perpendiculares aos planos (101) e $(10\bar{1})$ foram: $L_{101} = 31.5\text{Å}$ e $L_{10\bar{1}} = 34.6\text{Å}$. Nas direções perpendiculares aos planos (021) e (040), foram obtidos os valores: $L_{021} = 17.6\text{Å}$ e $L_{040} = 35.9\text{Å}$.

Como a maturidade da fibra foi considerada o parâmetro a ser controlado para o estudo da correlação entre a cristalinidade e as propriedades mecânicas, procurou-se verificar até que ponto esse parâmetro influi sobre a cristalinidade. A figura 5.5 mostra

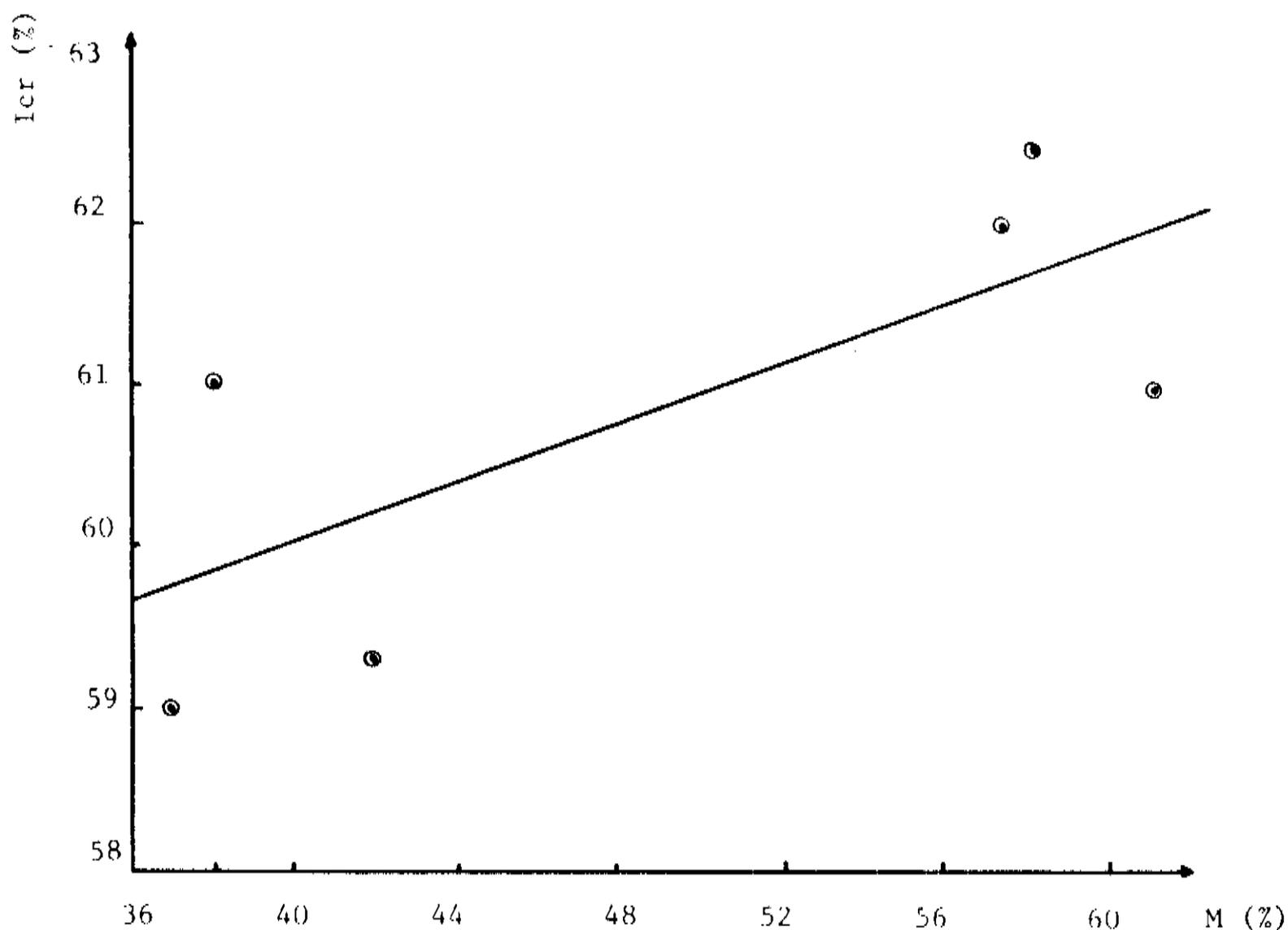


Fig. 5.5 - Índice de cristalinidade em função da maturidade da fibra

o gráfico dessa dependência, para as amostras de maturidade mais baixa e mais alta. Observa-se um crescimento da cristalinidade com a maturidade, com uma correlação de 0,74.

Não há na literatura muitos estudos sobre a variação da cristalinidade em diferentes espécies de algodão nativo e sua correlação com as propriedades mecânicas. Hindeleh, 1980, relata resultados obtidos de oito variedades diferentes de algodão, nos quais encontra correlações muito boas entre a cristalinidade e propriedades mecânicas, como finura, tenacidade, comprimento da fibra. Esses resultados, porém, são contestados por Iyer e colaboradores, 1981, os quais não encontraram quase nenhuma correlação entre cristalinidade e as outras propriedades, inclusive maturidade; mas as amostras observadas por eles têm uma variação muito pequena nessa propriedade (60-70%).

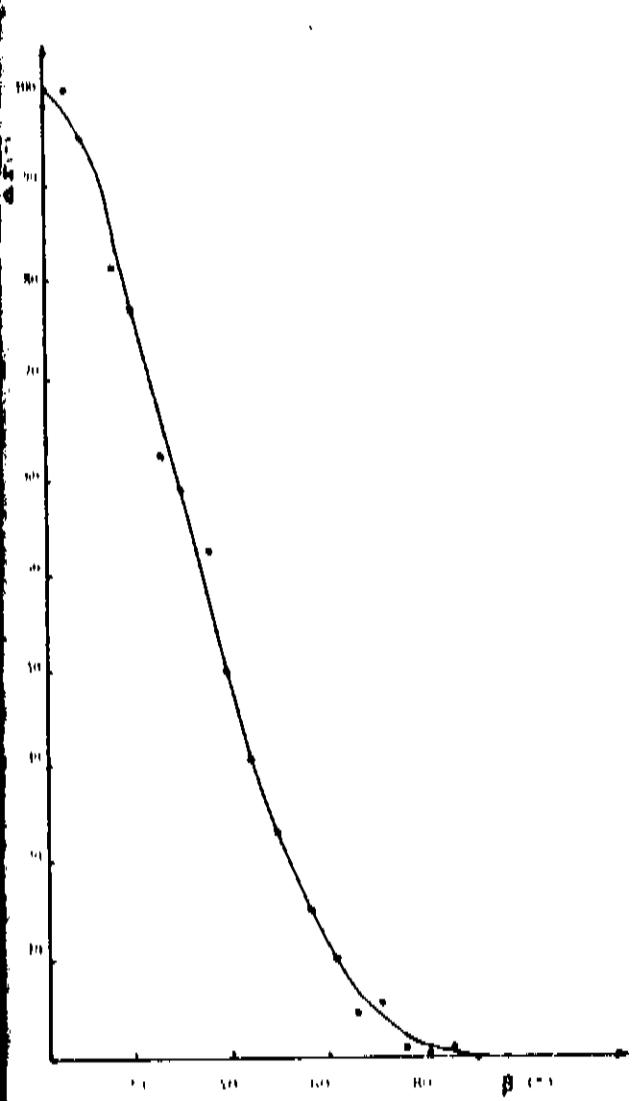
Nesse trabalho, consideramos que, para o intervalo observado (maturidade entre 36% e 61%), pode-se dizer que há um crescimento da cristalinidade com a maturidade.

Quanto às propriedades mecânicas (finura, comprimento, uniformidade de comprimento, resistência intrínseca) não foi encontrada qualquer correlação com a cristalinidade.

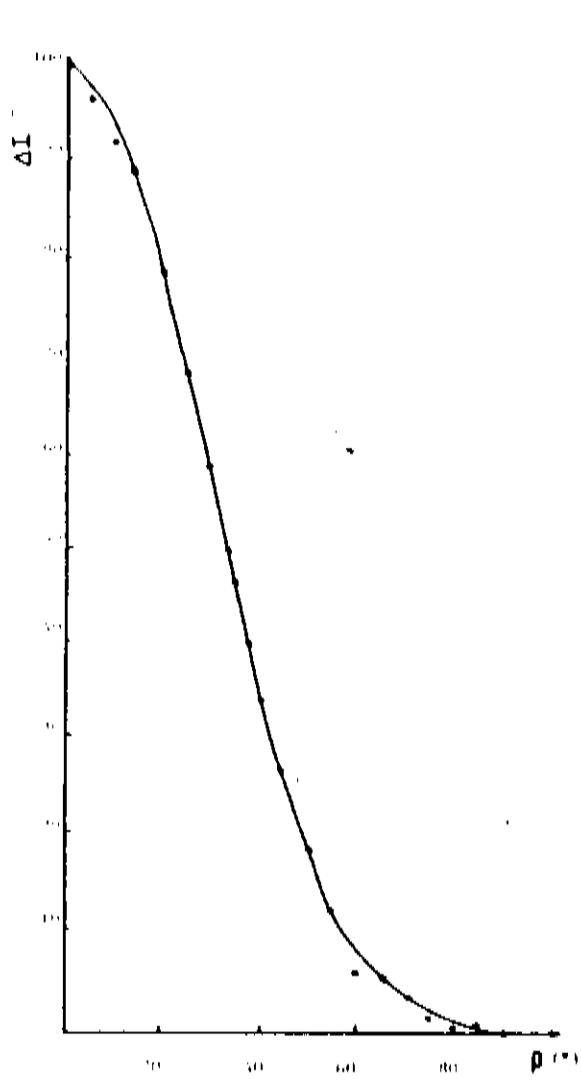
5.5.2. Medidas de Orientação

A partir dos diagramas de fibras obtidos, e das leituras no microdensitômetro, foram traçadas as curvas de distribuição de intensidade, vistas na fig. 5.6.

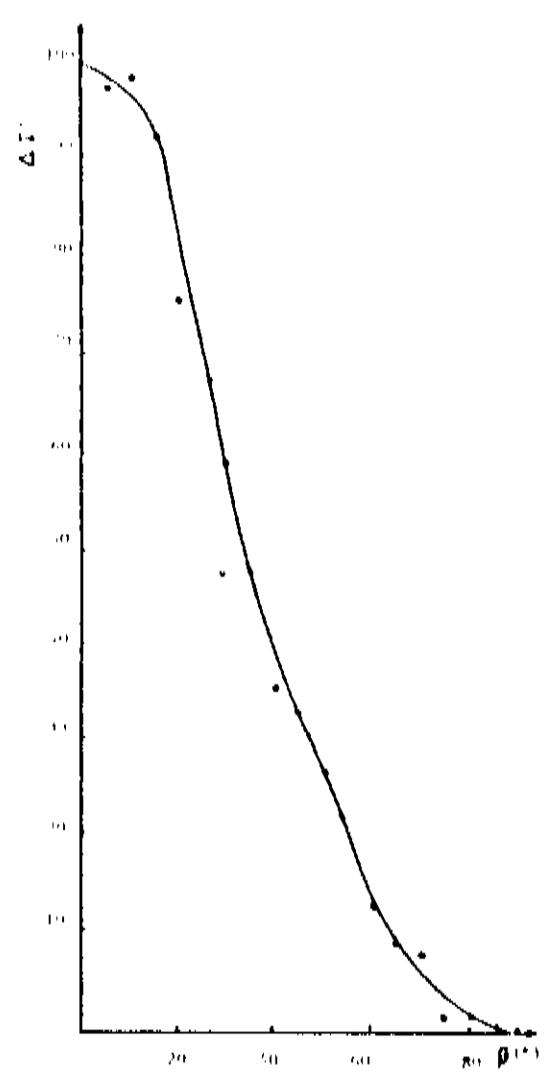
A partir dessas curvas, foram calculados os parâmetros



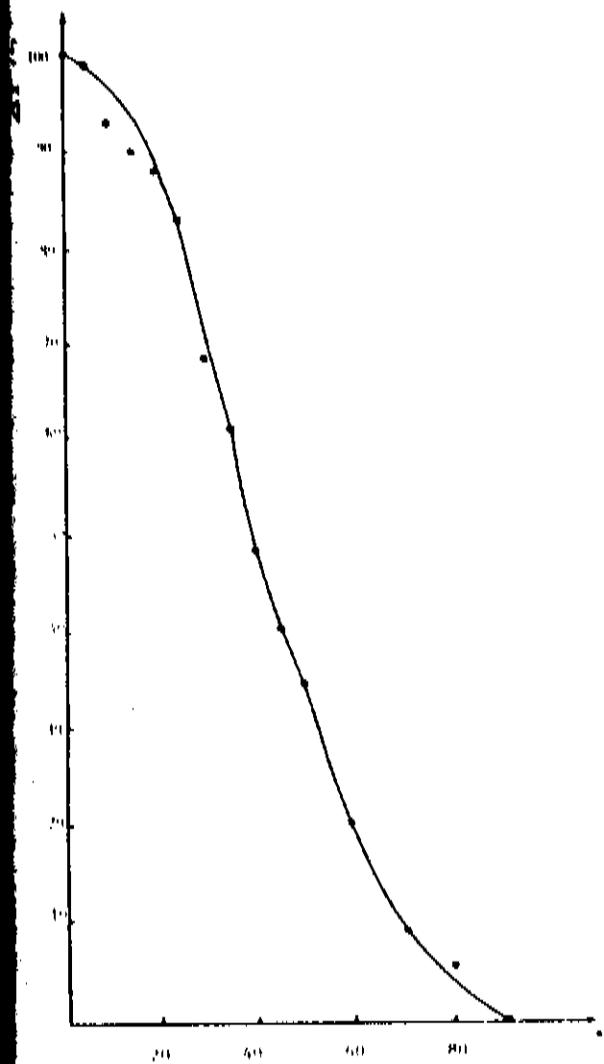
A17



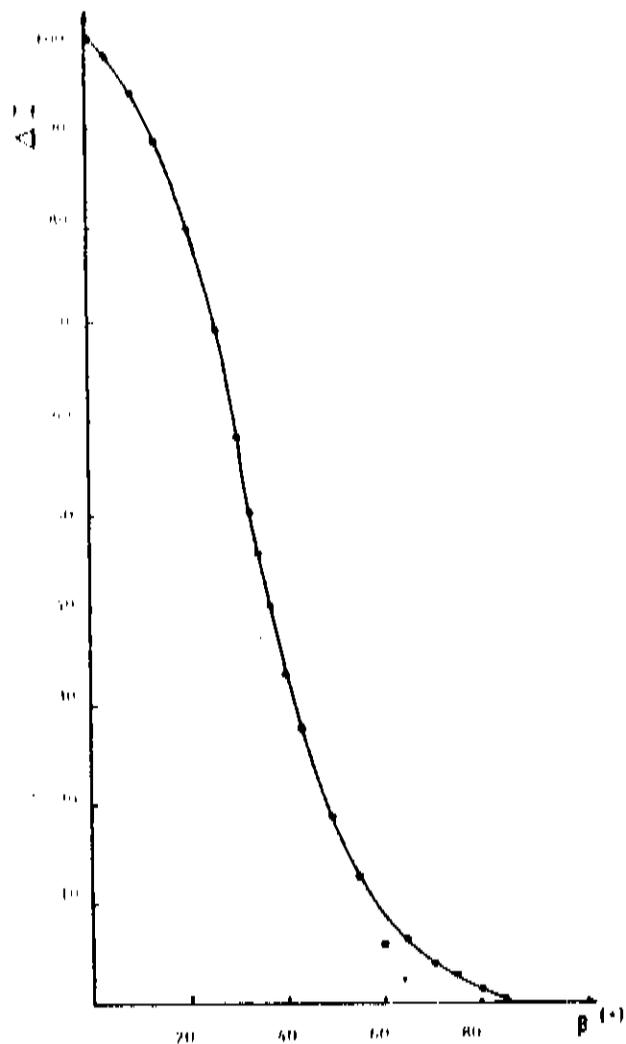
A19



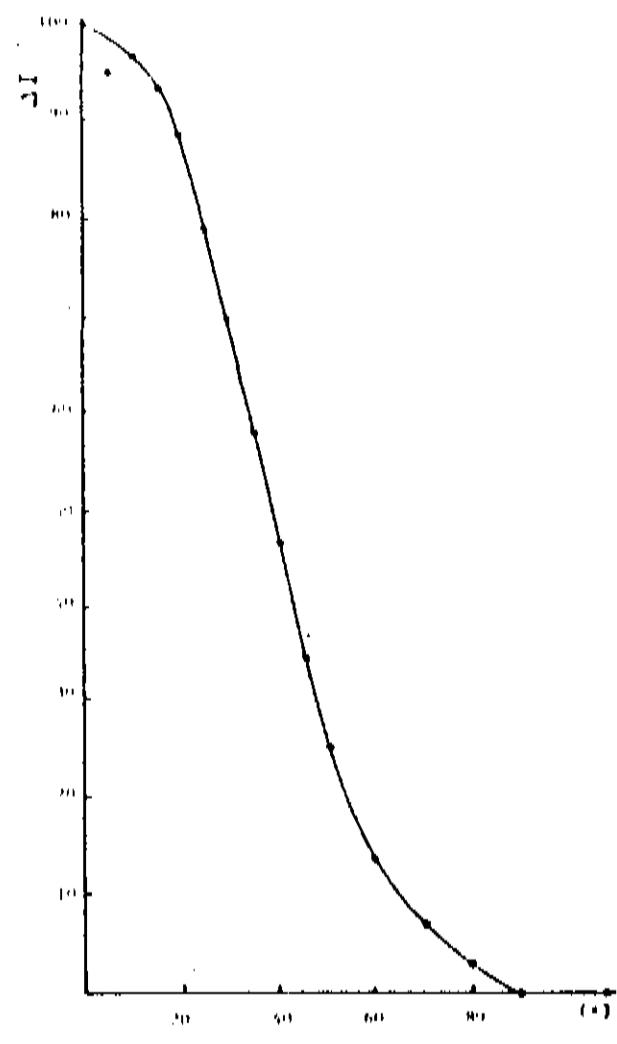
A20



I17

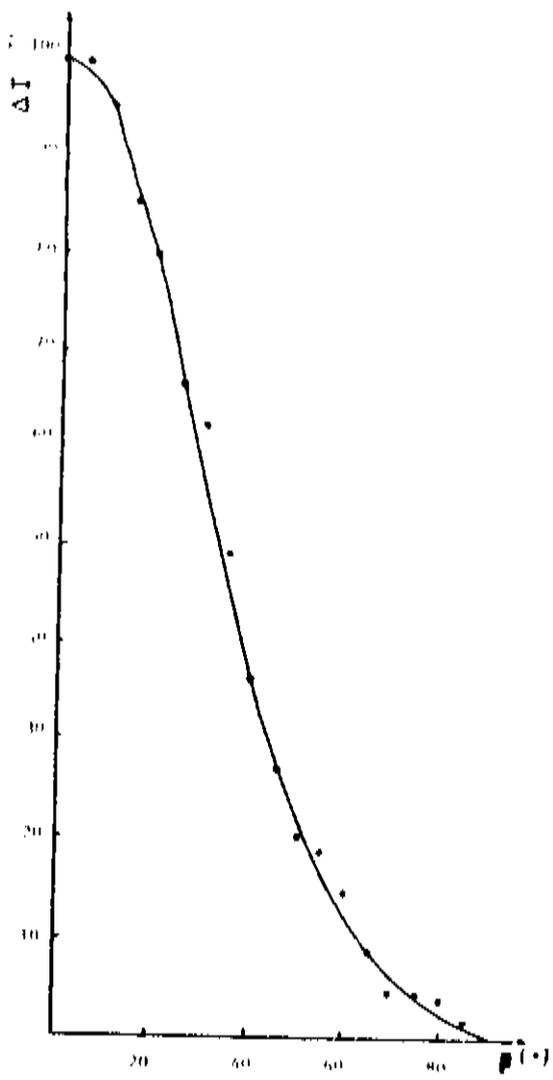


I19

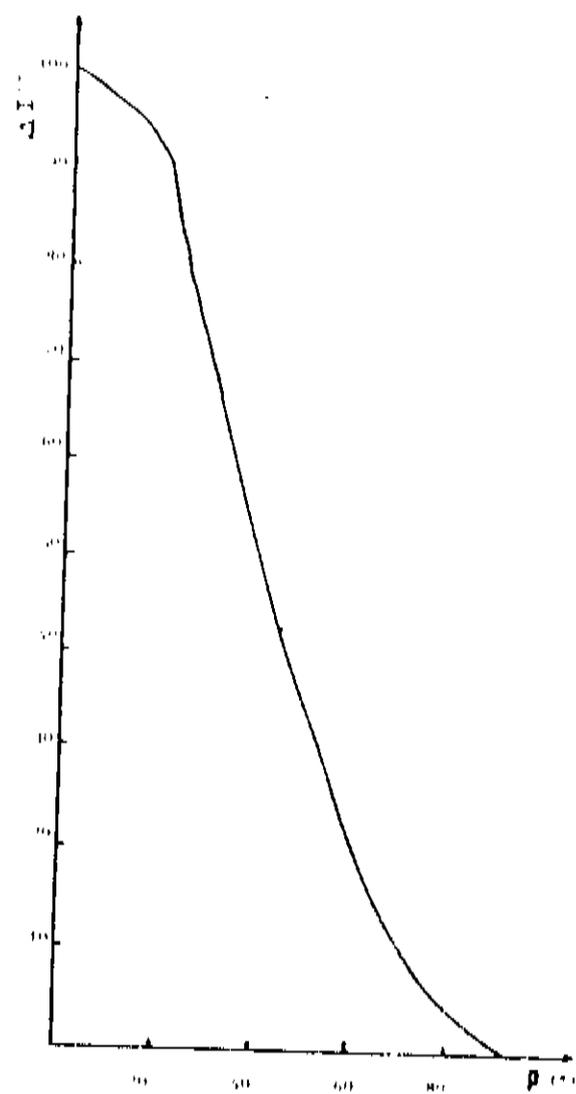


I20

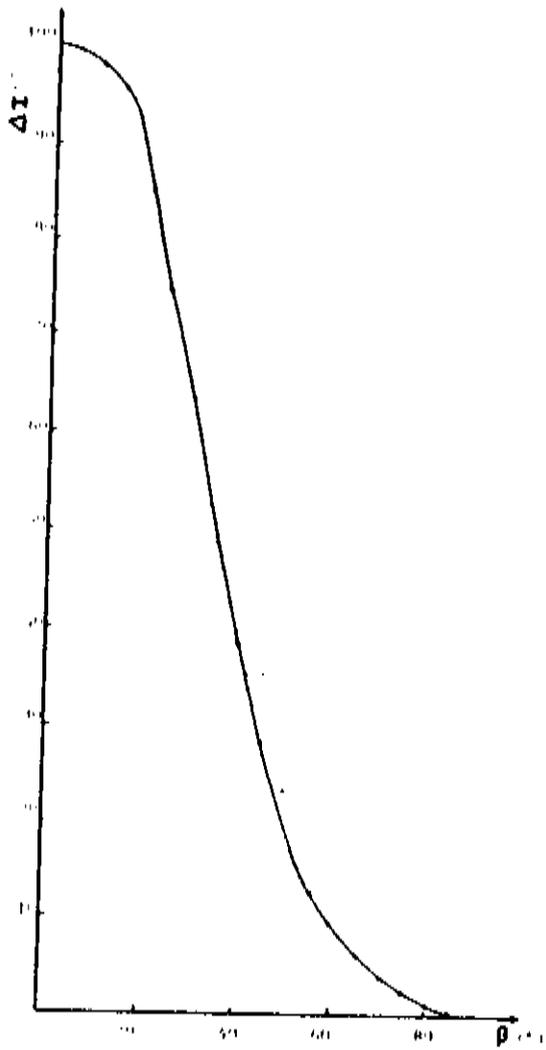
Fig. 5.6 - Curvas de distribuição ao longo do arco (002)



P17



P19



P20

Fig. 5.6 - Continuação

Indicadores do grau de orientação dos cristalitos e do ângulo espiral, os quais aparecem na tabela 5.3. Observa-se que não há uma grande variação entre os valores para o fator de orientação das amostras (entre 0,73 e 0,79). Na literatura, o fator de orientação para a celulose encontra-se entre 0,65 e 0,82 (Tripp e Conrad, 1972). As fibras analisadas, portanto, apresentam um bom grau de orientação cristalina. Para o ângulo espiral, seu valor ficou entre 15 e 19°.

É interessante observar as relações existentes entre os diversos parâmetros estudados. Tanto o fator de orientação f_x , quanto o ângulo médio de orientação $\bar{\beta}$ e o ângulo a 50% são parâmetros utilizados para o grau de orientação. A figura 5.7 mostra a variação de f_x em função de $\psi_{50\%}$.

Observa-se uma boa correlação entre os dois parâmetros, o que mostra que o ângulo a 50% de intensidade dá uma boa informação a respeito da orientação.

Na fig. 5.8 vê-se o gráfico do ângulo espiral em função de $\psi_{50\%}$. Shenouda e Viswanathan, 1971, haviam obtido uma equação por regressão linear para esses dois parâmetros, estudando várias amostras de algodão egípcio. Para as amostras das variedades em estudo nesse trabalho, também foi obtida uma equação semelhante:

$$\phi_{\text{esp}} = 0.57 \psi - 3.40$$

Desse modo, pode-se ter facilmente uma estimativa do ângulo espiral, através da determinação de $\psi_{50\%}$, que é muito menos

TABELA 5,3

ORIENTAÇÃO CRISTALINA E ÂNGULO ESPIRAL EM CELULOSE DE ALGODÃO NATIVO

AMOSTRA	F_x	β (°)	ψ (°) 50%	ϕ esp. (°)	α (°)
A17	0,779	22,54	34,5	16,00	25,53
A19	0,793	21,78	33,0	14,93	25,32
A20	0,773	22,95	34,0	15,59	25,57
I17	0,746	24,27	40,0	19,03	28,16
I19	0,792	21,84	33,0	15,83	22,74
I20	0,766	23,27	38,5	18,70	25,52
F17	0,775	22,80	33,5	15,37	25,25
F19	0,734	24,91	41,0	19,69	28,23
F20	0,785	22,26	34,5	16,00	25,53

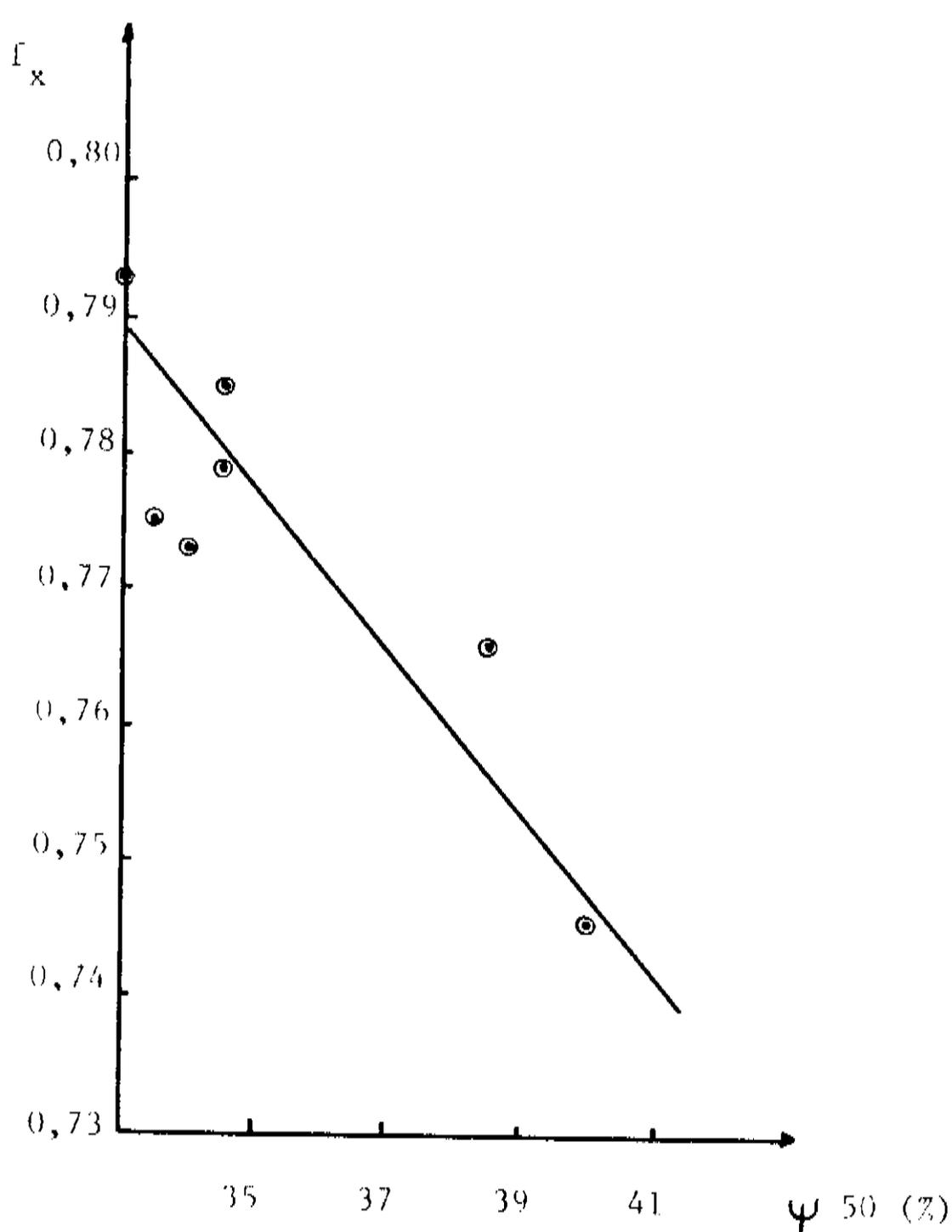


Fig. 5.7 - Fator de orientação em função do ângulo a 50% de intensidade

trabalhosa.

Também entre o ângulo espiral ϕ_{esp} e o ângulo de orientação dos cristalitos em relação a esse ângulo, α , se obteve uma boa correlação, como se pode ver pela figura 5.9.

Deve-se observar que, como é improvável que as fibrilas tenham o mesmo ângulo espiral em toda a espessura da parede celular (Tripp e Conrad, 1972), os valores obtidos para ϕ_{esp} e α

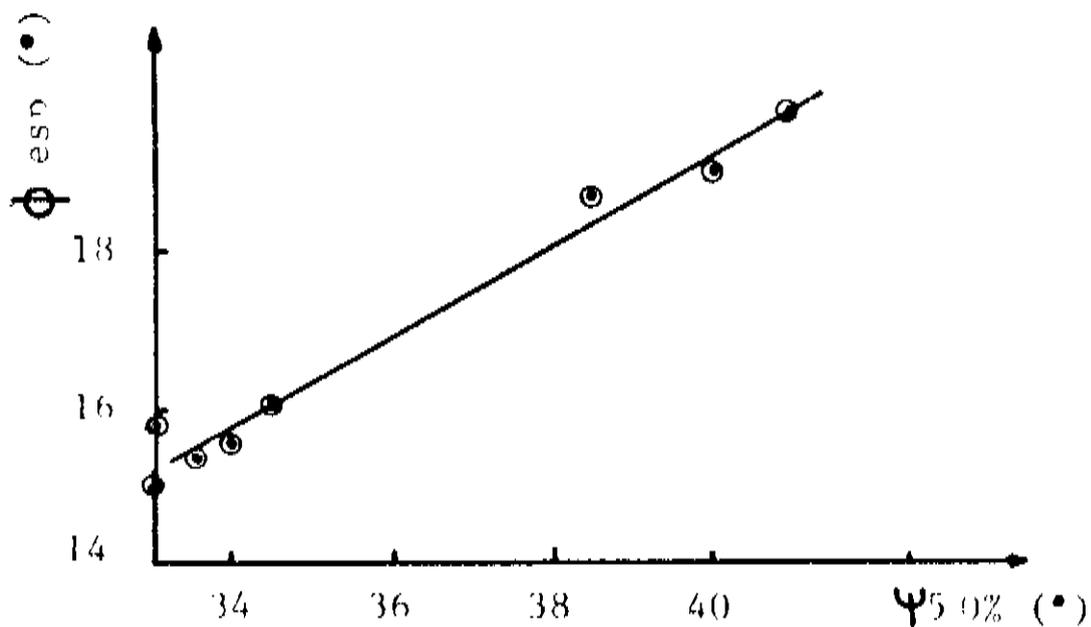


Fig. 5.8 - Ângulo espiral em função do ângulo a 50% de intensidade

são aproximados, ou um valor médio para a amostra.

É fato conhecido que a resistência de uma fibra está diretamente ligada à orientação dos cristalitos (Howsmon e Sisson, 1954). Foi interessante nesse trabalho comparar a resistência intrínseca das fibras com seu grau de orientação cristalina, para amostras de maturidades próximas. O resultado é visto na fig. 5.10, para maturidades em torno de 40% e 50%. Para os dois casos, observou-se que a resistência intrínseca realmente cresce com a orientação. O índice de correlação calculado foi de 0.87 e 0.89,

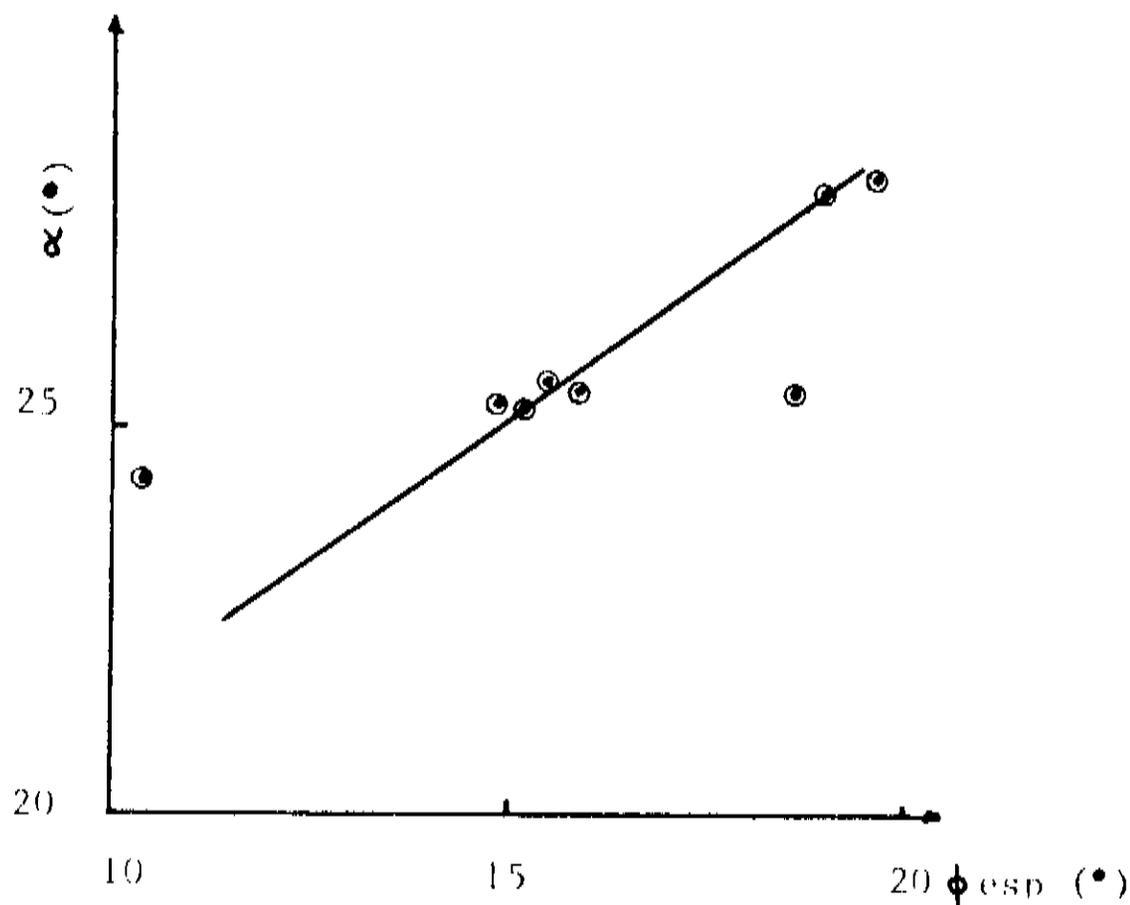


Fig. 5.9 - Ângulo espiral em função do ângulo α

respectivamente.

5.5.3. Isotermas de Sorção de Água

As isotermas experimentais obtidas para as amostras A20, I20 e P20, para as quais foi realizado o ciclo completo dessorção-absorção, são vistas na figura 5.11. Estão indicadas as curvas experimentais, e a separação entre monocamadas e multicamadas, obtida pelo ajuste pela equação de Guggenheim. Nota-se claramente o efeito da histerese, e que esse efeito é mais pronunciado na absorção da primeira monocamada, isto é, da água

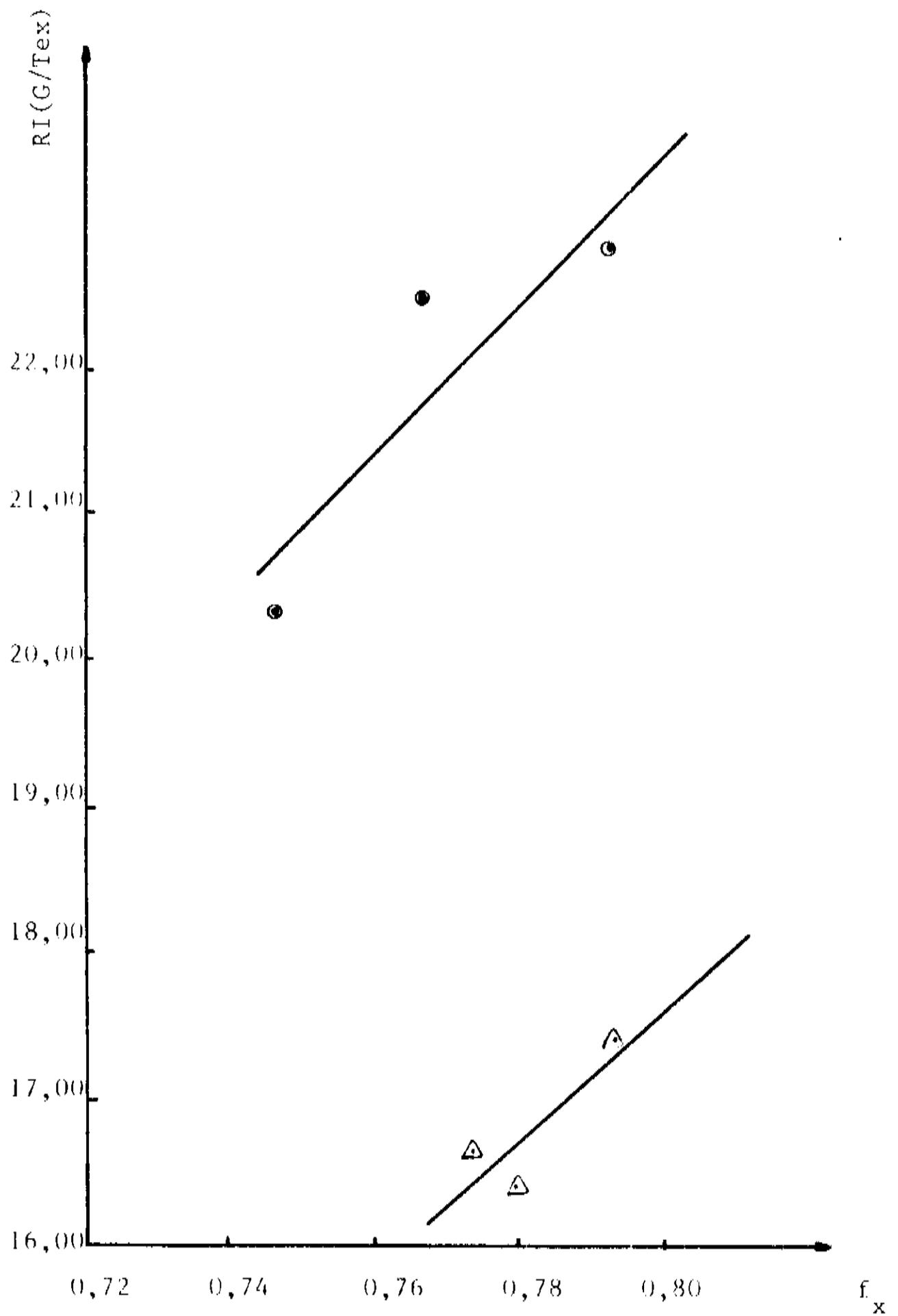
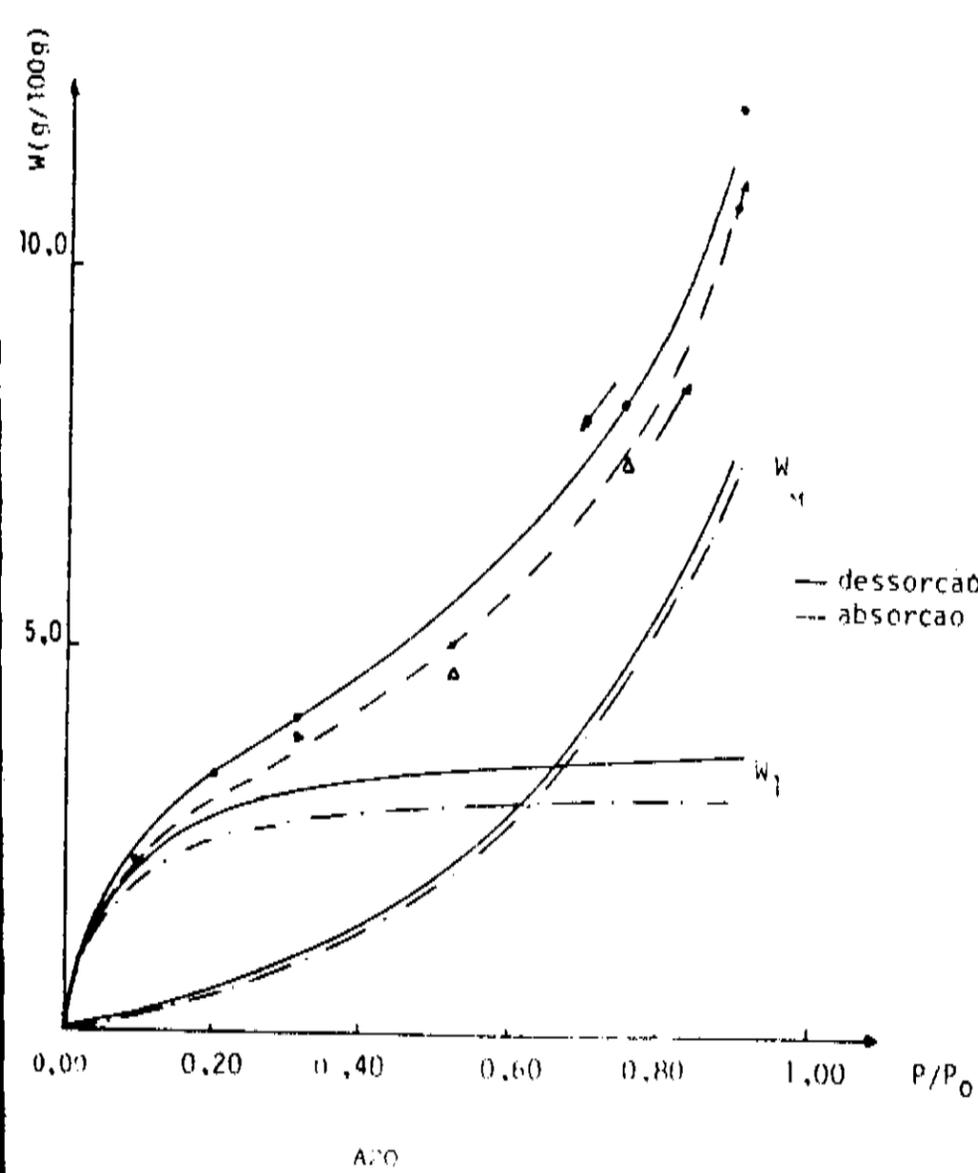
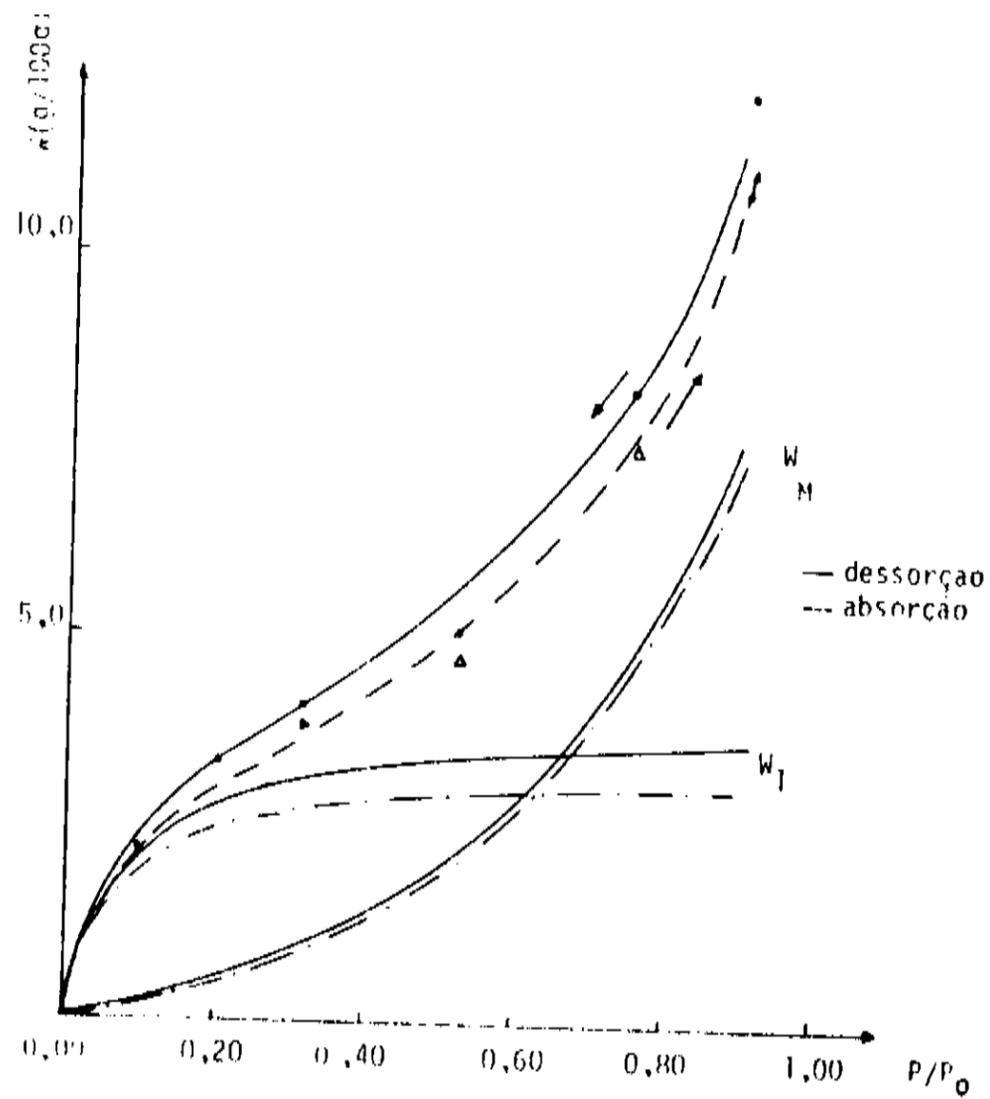


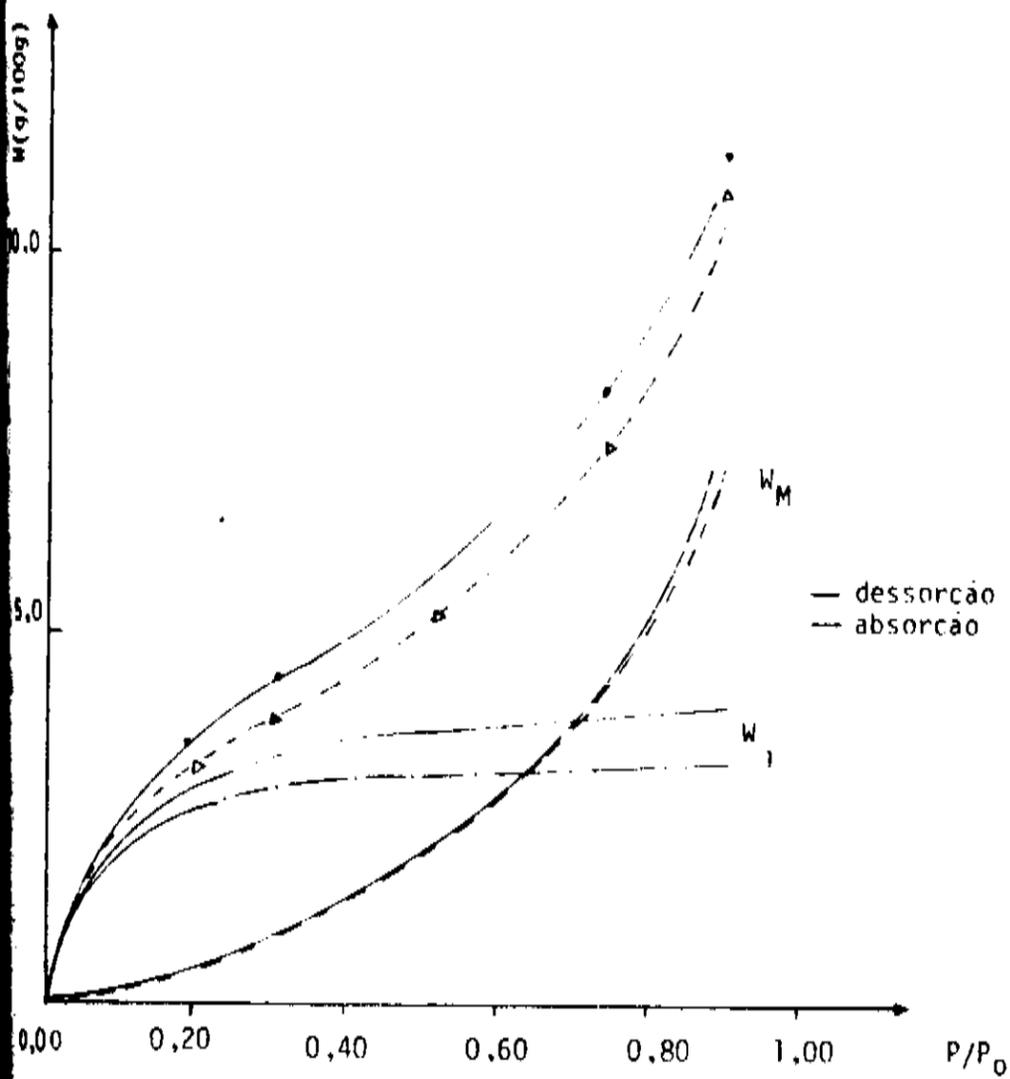
Fig. 5.10 - Resistência intrínseca em função do fator de orientação: triângulos - maturidade ~ 40%
 círculos - maturidade ~ 50%



A20



I 20



P 20

Fig. 5.11 - Isotermas de dessorção-absorção para as amostras A20, I20 e P20

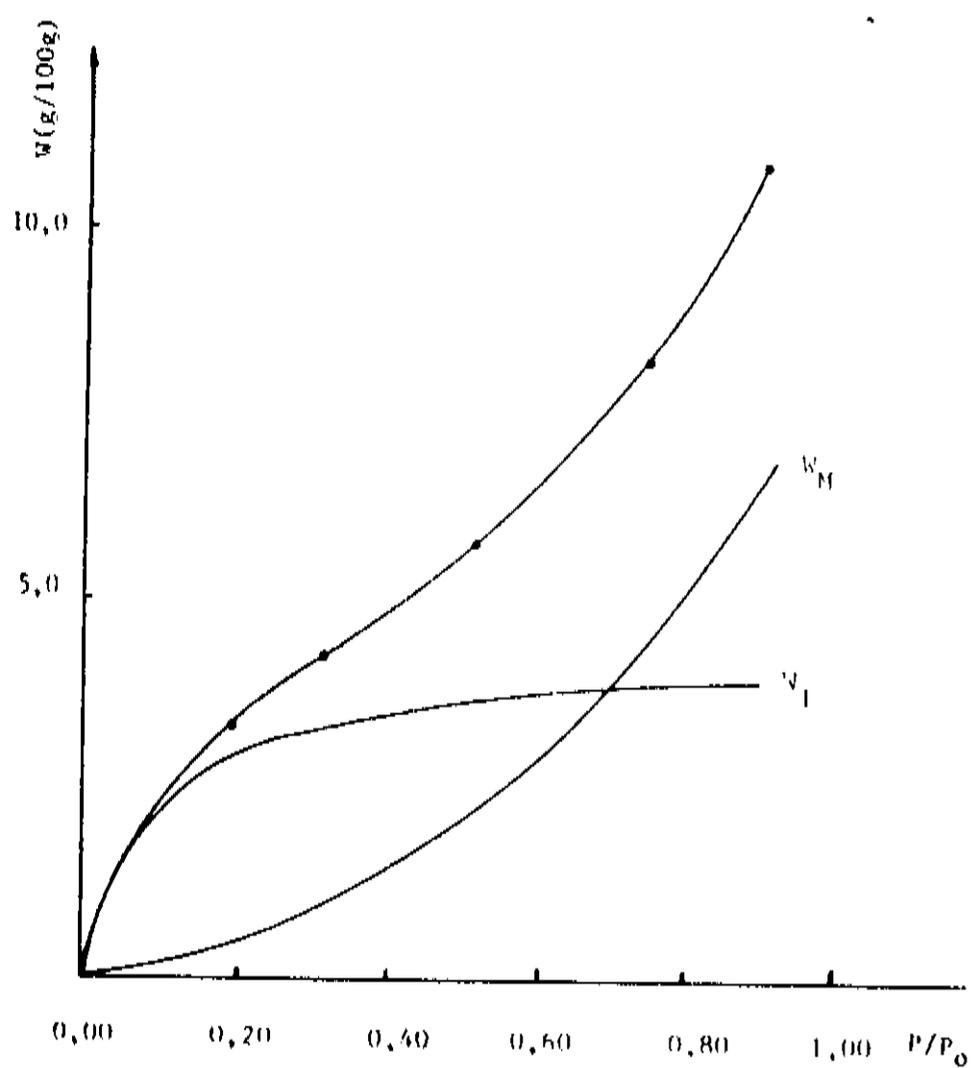
TABELA 5,4

Parâmetros Termodinâmicos | Dessorção - absorção
 Celulose de Algodão Nativo | IAC20

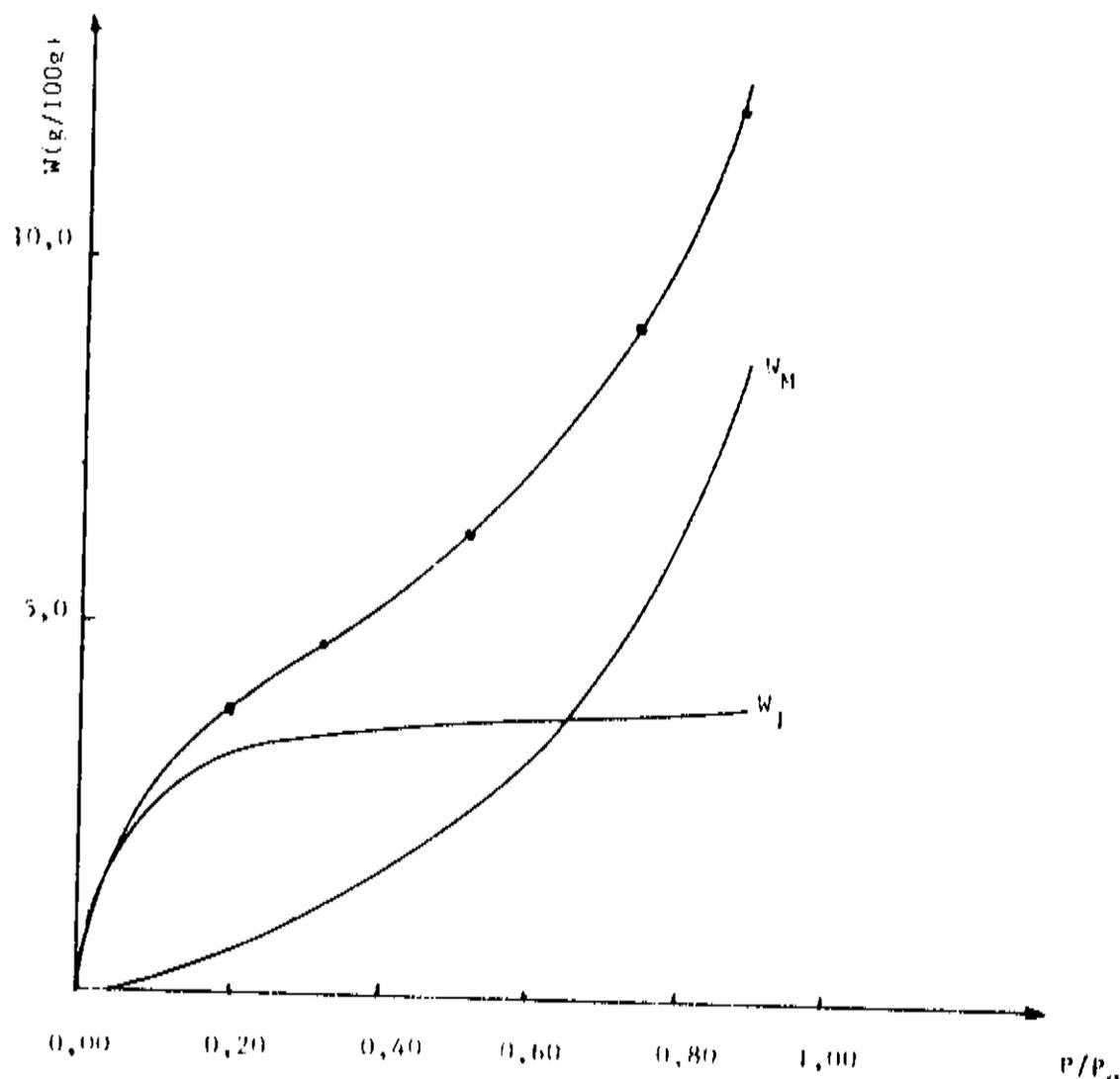
AMOSTRA	A20		I20		P20	
	dessorção	absorção	dessorção	absorção	dessorção	absorção
$W_m(g/100g)$	3,71	3,25	3,89	3,54	4,02	3,26
p^*/P_0	1,31	1,27	1,29	1,27	1,41	1,30
C	18,90	18,08	18,16	14,96	15,83	22,86
$\Delta \mu_m(\text{cal/mol})$	-1,55	-1,54	-1,54	-1,44	-1,41	-1,67
$\Delta \mu_m(\text{cal/mol})$	0,16	0,14	0,15	0,14	0,20	0,15

fortemente ligada às moléculas de celulose. Os parâmetros obtidos para essas isotermas, tanto para a dessorção como para a absorção, são apresentados na tabela 5.4.

A figura 5.12 mostra as isotermas obtidas para as amostras restantes, para as quais é realizado o ciclo de dessorção. Também aparecem as curvas devidas à absorção em monocamadas e multicamadas. A tabela 5.5 apresenta os parâmetros ajustados para essas isotermas.

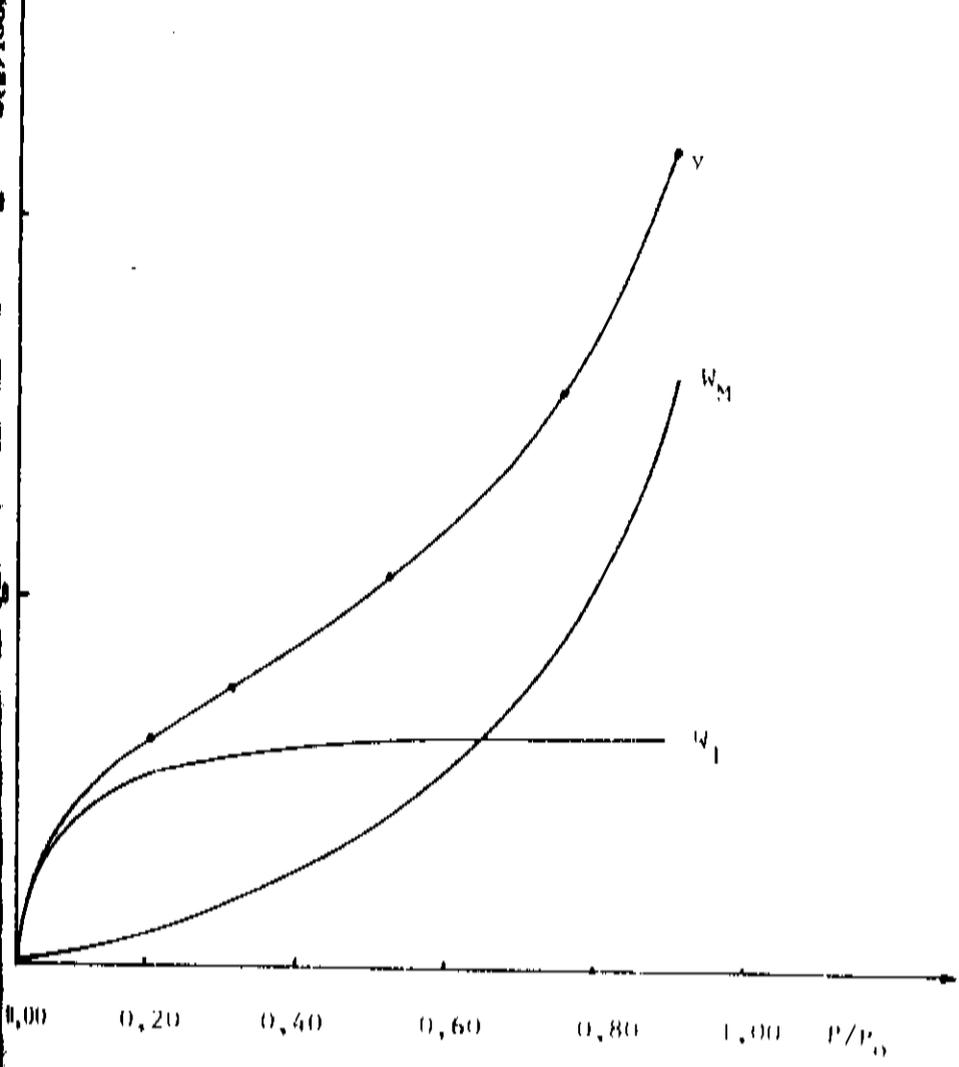


A 17

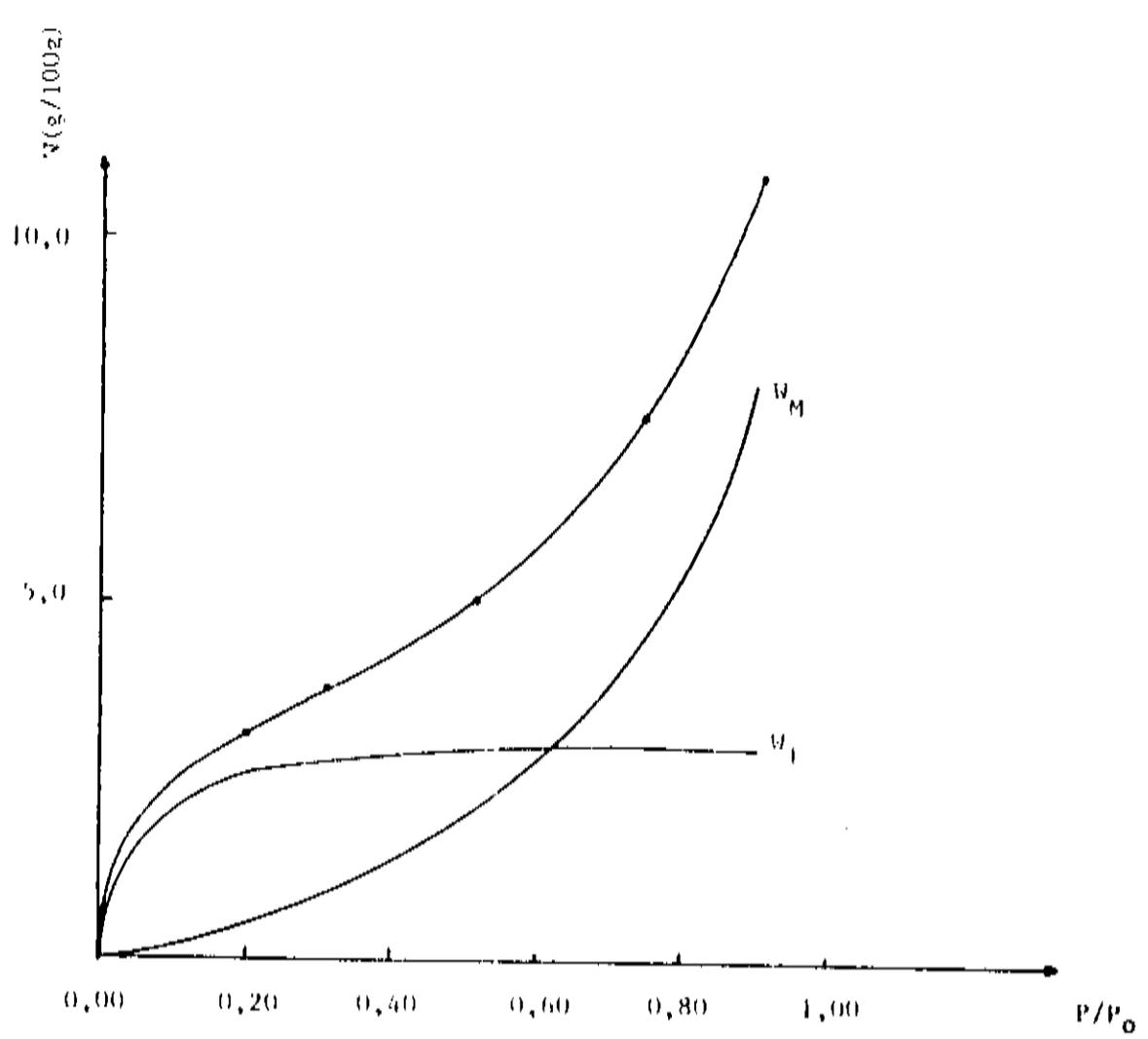


A 19

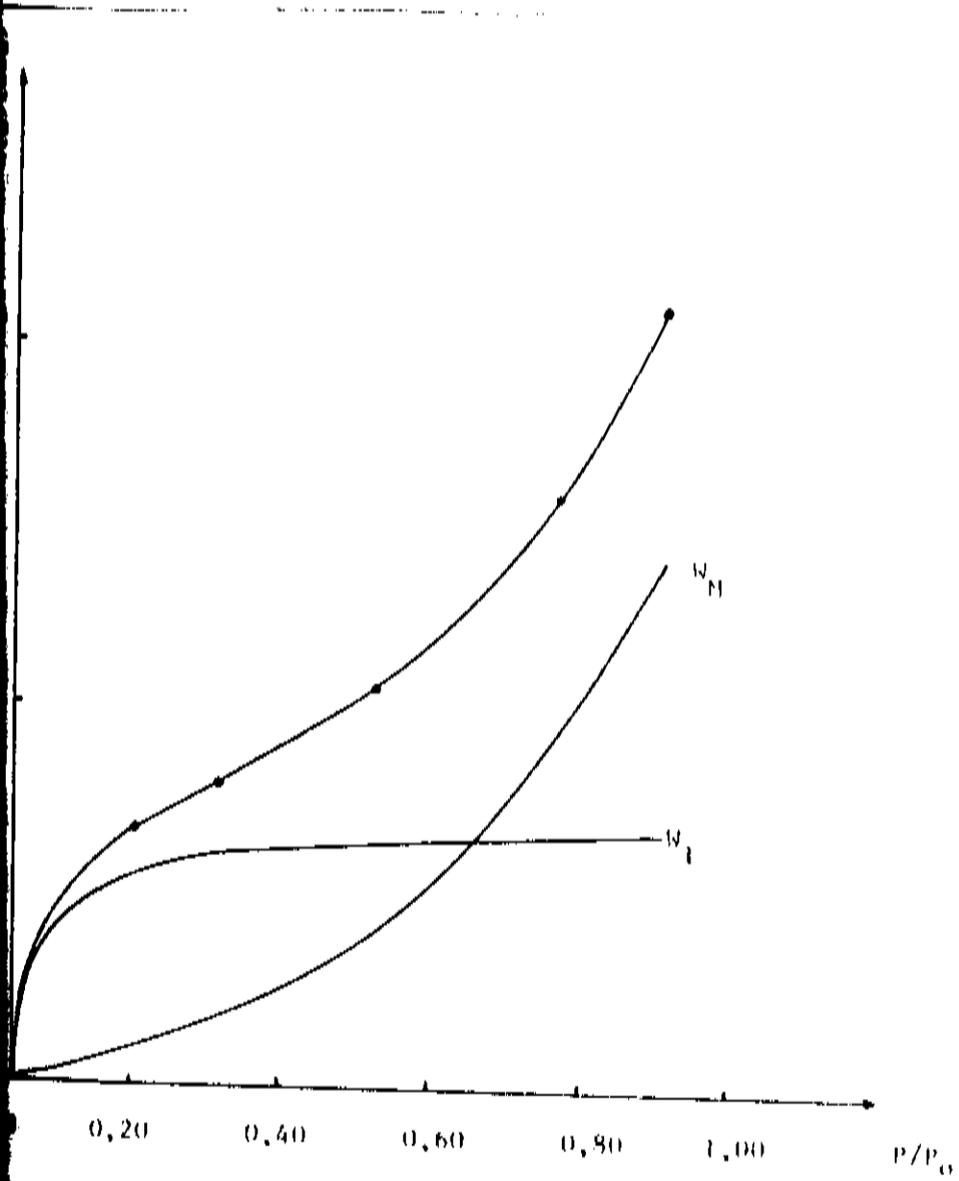
Fig. 5.12 - Isotermas de dessorção para as demais amostras



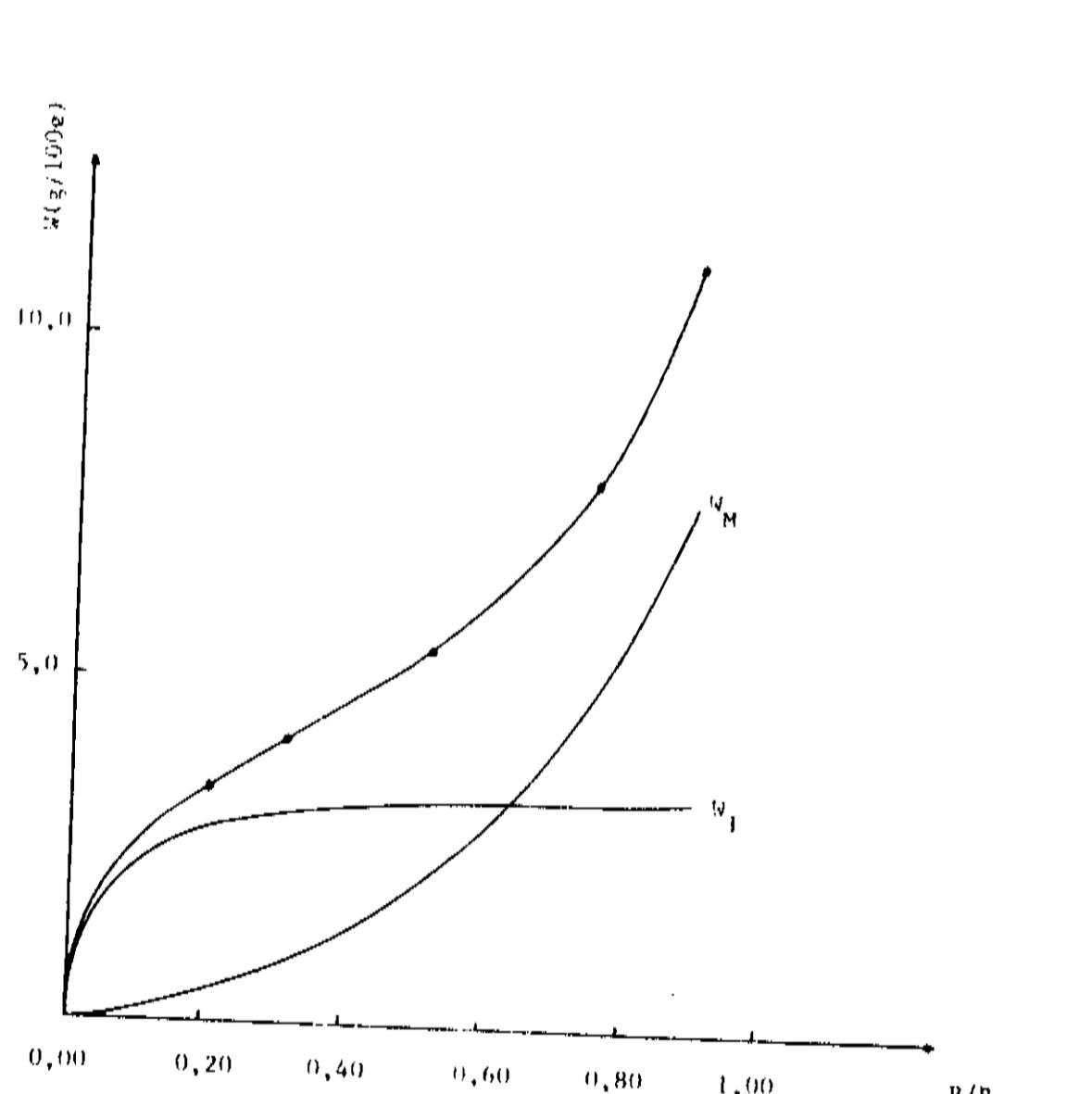
117



119



P 17



P 19

Fig. 5.12 - continuação

TABELA 5,5

Parâmetros Termodinâmicos / Dessorção Celulose de Algodão Nativo / IAC 17, IAC 19

AMOSTRA	A17	A19	I 17	I 19	P 17	P 19
$W_m(g/100g)$	4,12	3,97	3,26	3,04	3,45	3,37
p^*/P_0	1,41	1,31	1,27	1,24	1,32	1,28
C	13,77	27,59	21,33	33,48	25,80	34,78
$\Delta\mu_m(kcal/mol)$	-1,32	-1,77	-1,64	-1,92	-1,73	-1,92
$\Delta\mu_n(kcal/mol)$	0,20	0,16	0,14	0,13	0,16	0,15

5.5.4. Hidratação e Cristalinidade

Vários resultados interessantes foram obtidos através das medidas de cristalinidade em fibras de celulose em função do grau de hidratação da amostra. A figura 5.13 mostra dois difratogramas, com as curvas ajustadas, da amostra P20, a 90% e 31% de umidade relativa. Observa-se que não há variação nas posições dos picos. Esse resultado, observado para as várias amostras submetidas à dessorção, confirma que a água não penetra nas regiões cristalinas.

Foi observado que o índice de cristalinidade diminui com o crescente grau de umidade a que é submetida a amostra. As figuras 5.14 e 5.15 mostram o índice de cristalinidade em função de p/p_0 para a amostra P20, somente na dessorção, e para a amostra A20, no ciclo completo dessorção-absorção.

Para a amostra P20 o índice de cristalinidade, de 55,3% quando a amostra foi umidecida a $p/p_0 = 0,90$, chega a 60% para a amostra seca. Já para a amostra A20, a variação foi de 58,5% para a amostra úmida a $p/p_0 = 0,90$, até 63,8% para a amostra seca, caindo então para 58,2% quando ela foi rehidratada. Não foram detectadas diferenças significativas entre o processo de dessorção e o de absorção.

Quanto ao tamanho médio dos cristalitos, L_{002} , na direção perpendicular aos planos (002), observa-se que cresce com a umidade crescente. A figura 5.16 mostra os resultados para a amostra P20. O tamanho médio, de $\sim 49\text{\AA}$ para a amostra submetida ao

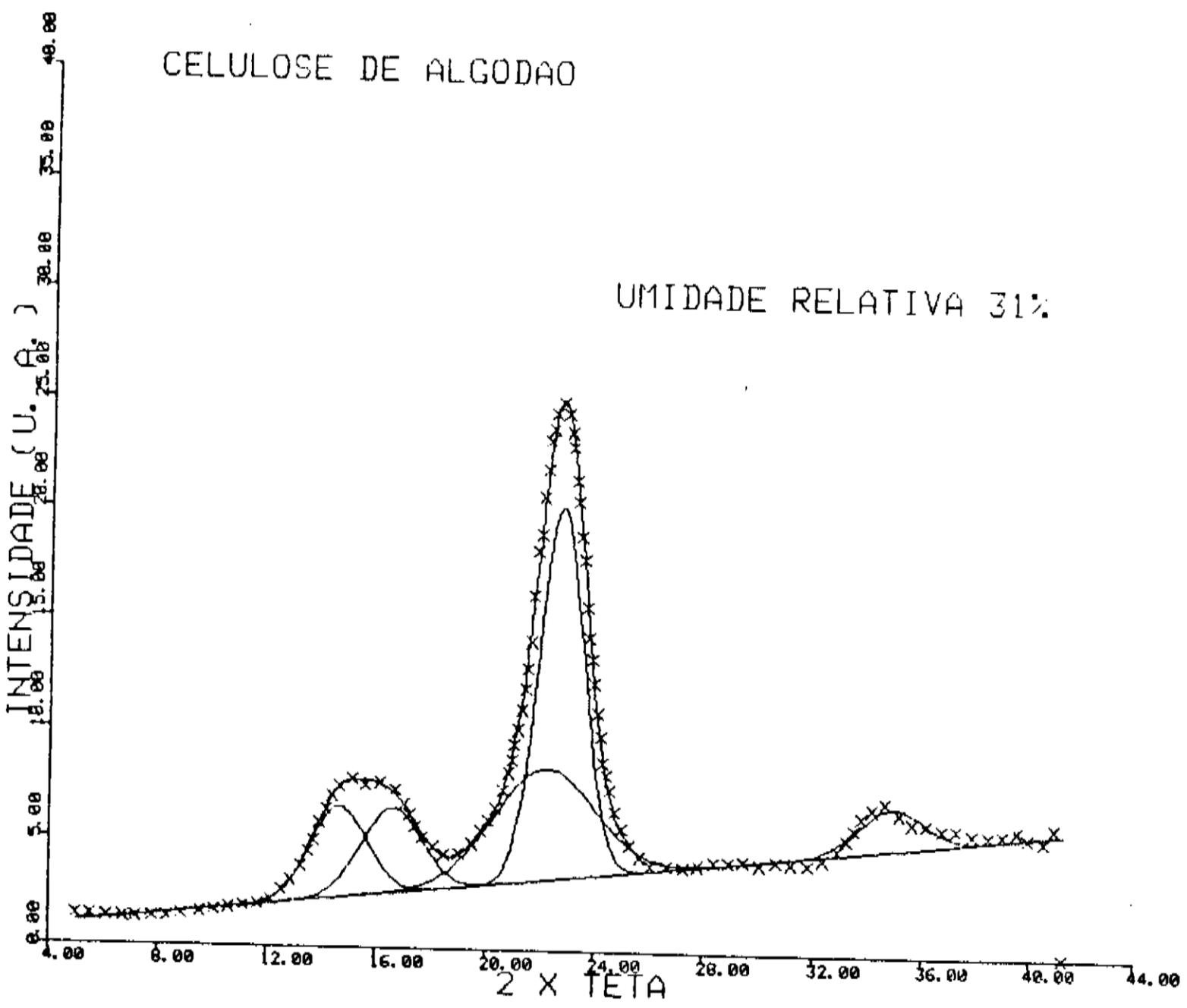
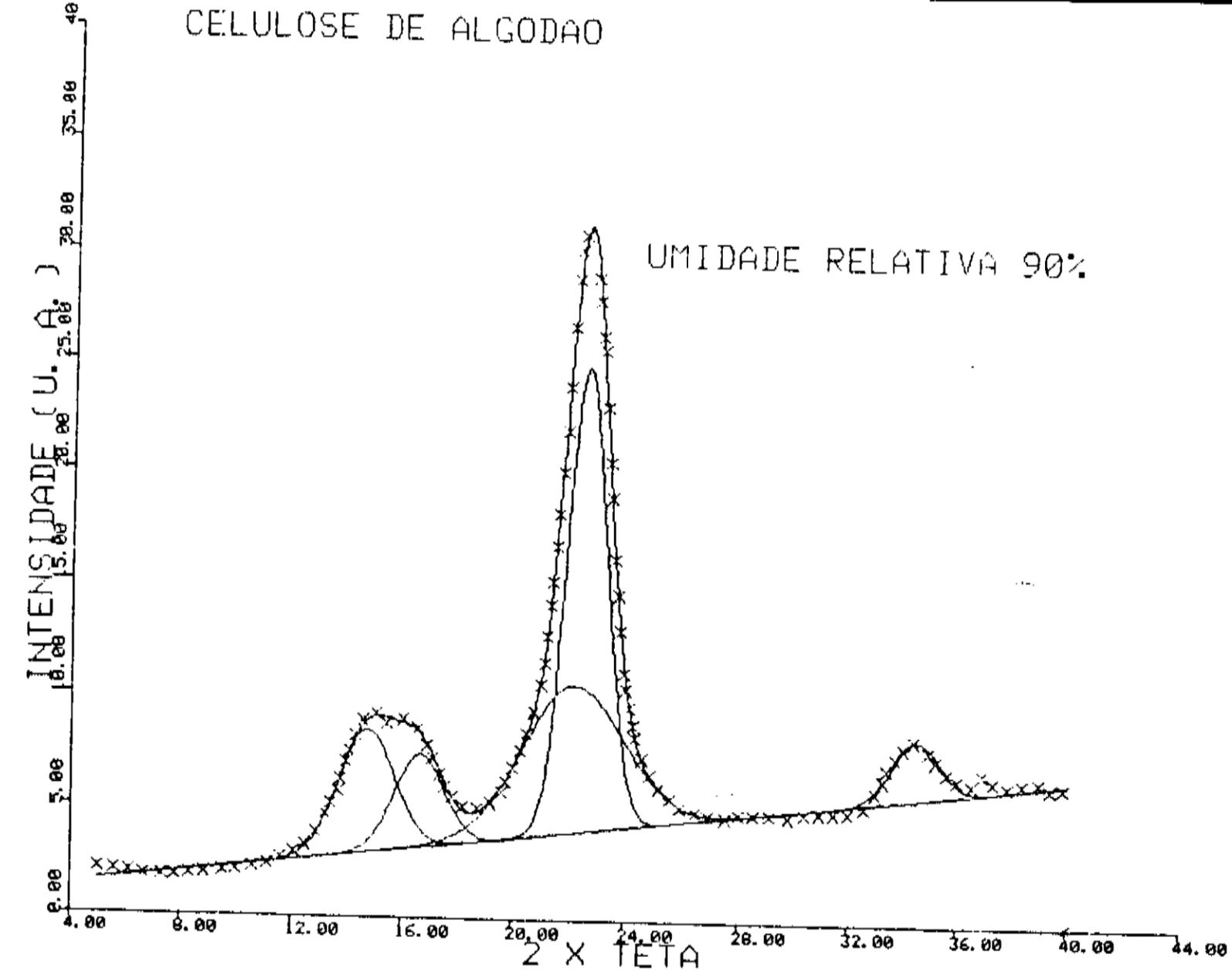


Fig. 5.13 - Difratomogramas, com os ajustes, da amostra P-20 a 90% e 31% de umidade relativa

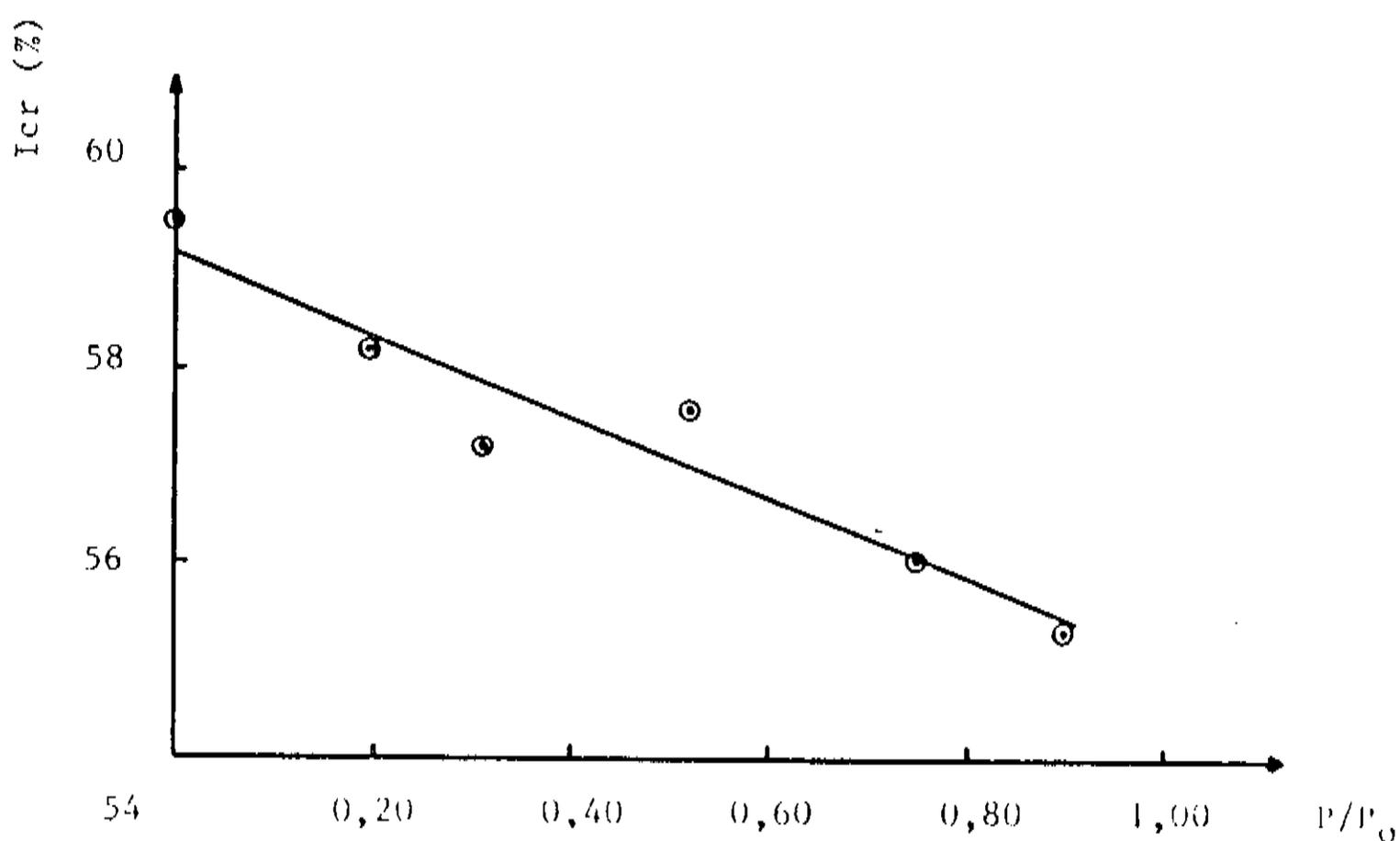


Fig. 5.14 - Índice de cristalinidade em função de p/p_0 para a amostra P20

maior grau de umidade, cai para 40A quando a amostra é seca.

Uma comparação entre os resultados obtidos pelo estudo através das isotermas de sorção e as medidas de cristalinidade oferece alguns dados dignos de nota. Comparando-se a acessibilidade, ϕ , (a fração fisicamente acessível dos sítios quimicamente receptivos às moléculas de água), com o conteúdo de substância amorfa nas fibras (A_m), observa-se que a acessibilidade cresce com a fração amorfa, havendo uma correlação muito boa entre

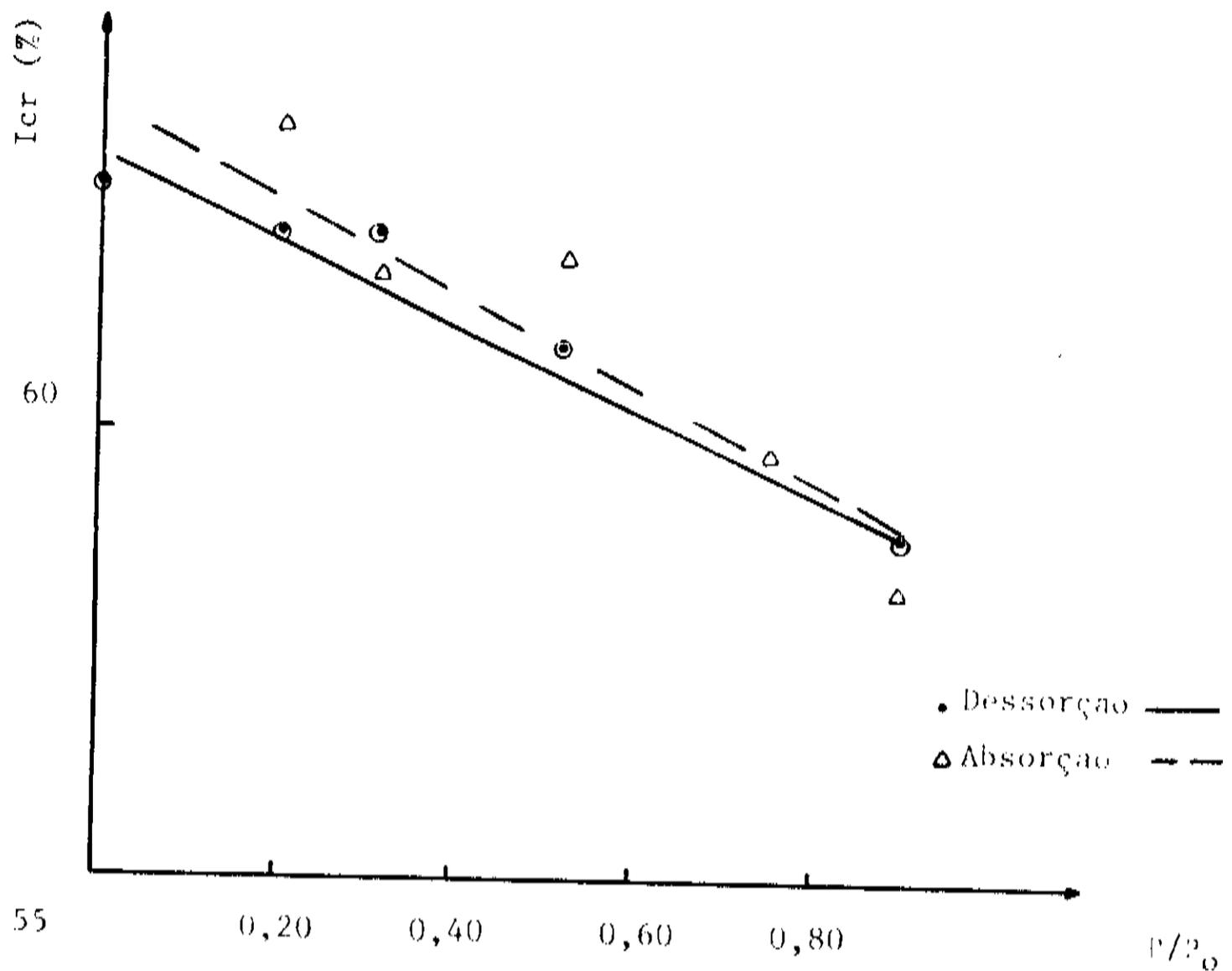


Fig. 5.15 - Índice de cristalinidade em função de p/p_0 para a amostra A-20

as duas grandezas, como se pode verificar na figura 5.17.

Quanto ao número de sítios de hidratação primária ω_m , relacionado com a fração de água fortemente ligada, decresce com o índice de cristalinidade, como se pode verificar pela figura 5.18.

É interessante observar-se também que esse parâmetro cresce com o maior tamanho médio de cristalito, L_{002} , quando se considera amostras com valores próximos de maturidade. A figura 5.19 mostra a dependência de ω_m em função de L_{002} para as amostras de maior e menor maturidade, ~ 60% e 40%, respectivamente.

Por se tratarem de parâmetros termodinâmicos que dão uma importante informação sobre a ligação da água nas moléculas, de

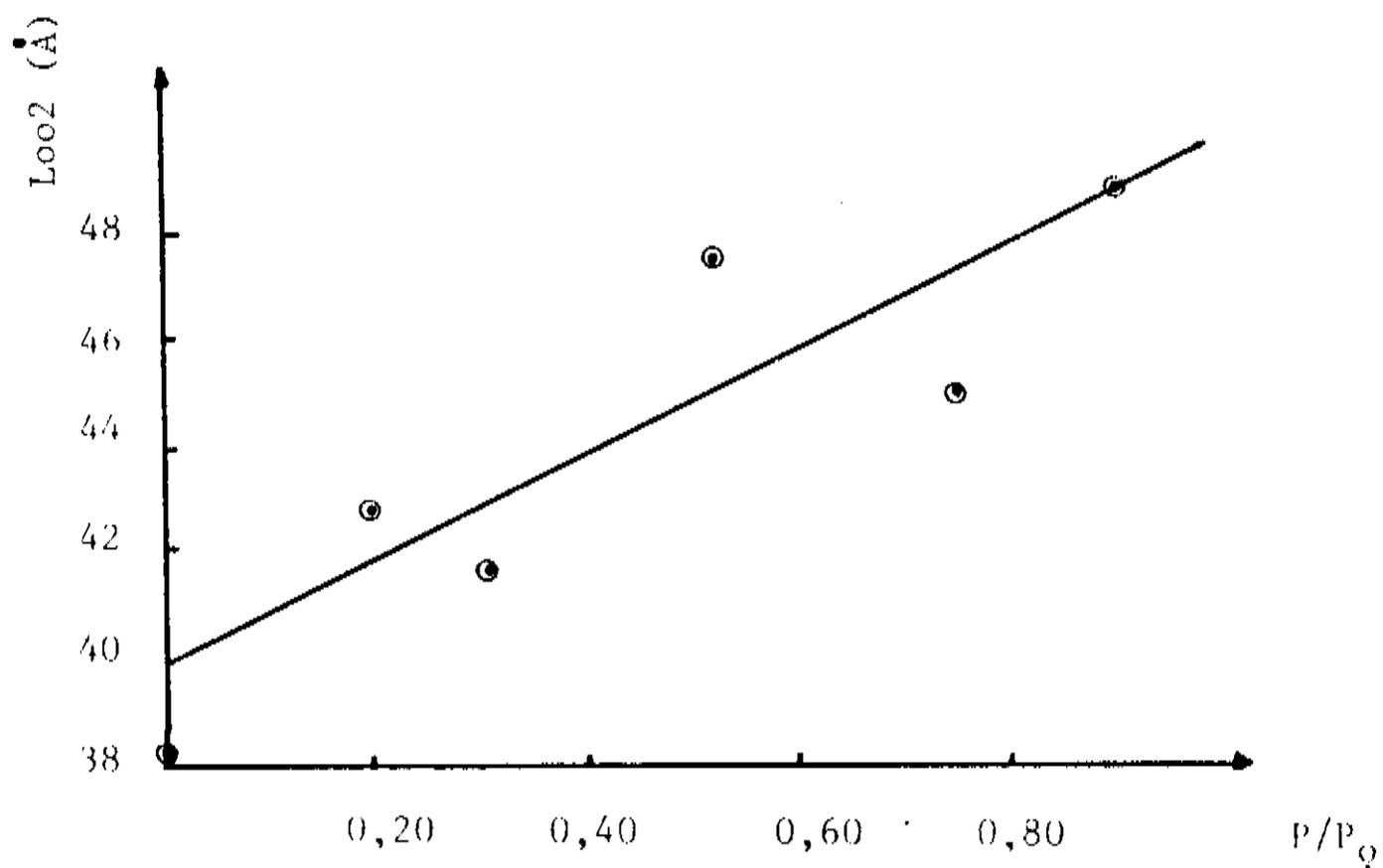


Fig. 5.16 - Tamanho médio dos cristalitos, L_{002} , em função de P/P_0

celulose, procurou-se verificar se há alguma relação entre os potenciais químicos de ligação na primeira monocamada e nas multicamadas sucessivas e a cristalinidade das fibras. Na figura 5.20, vê-se essas dependências para as amostras de maior maturidade. Observa-se que a diferença entre o potencial químico da água ligada na monocamada e o da água livre ($\Delta\mu_m$), cresce com o índice de cristalinidade, ao passo que a mesma diferença para a água ligada nas multicamadas decresce. A mesma tendência é observada para os valores mais baixos de maturidade.

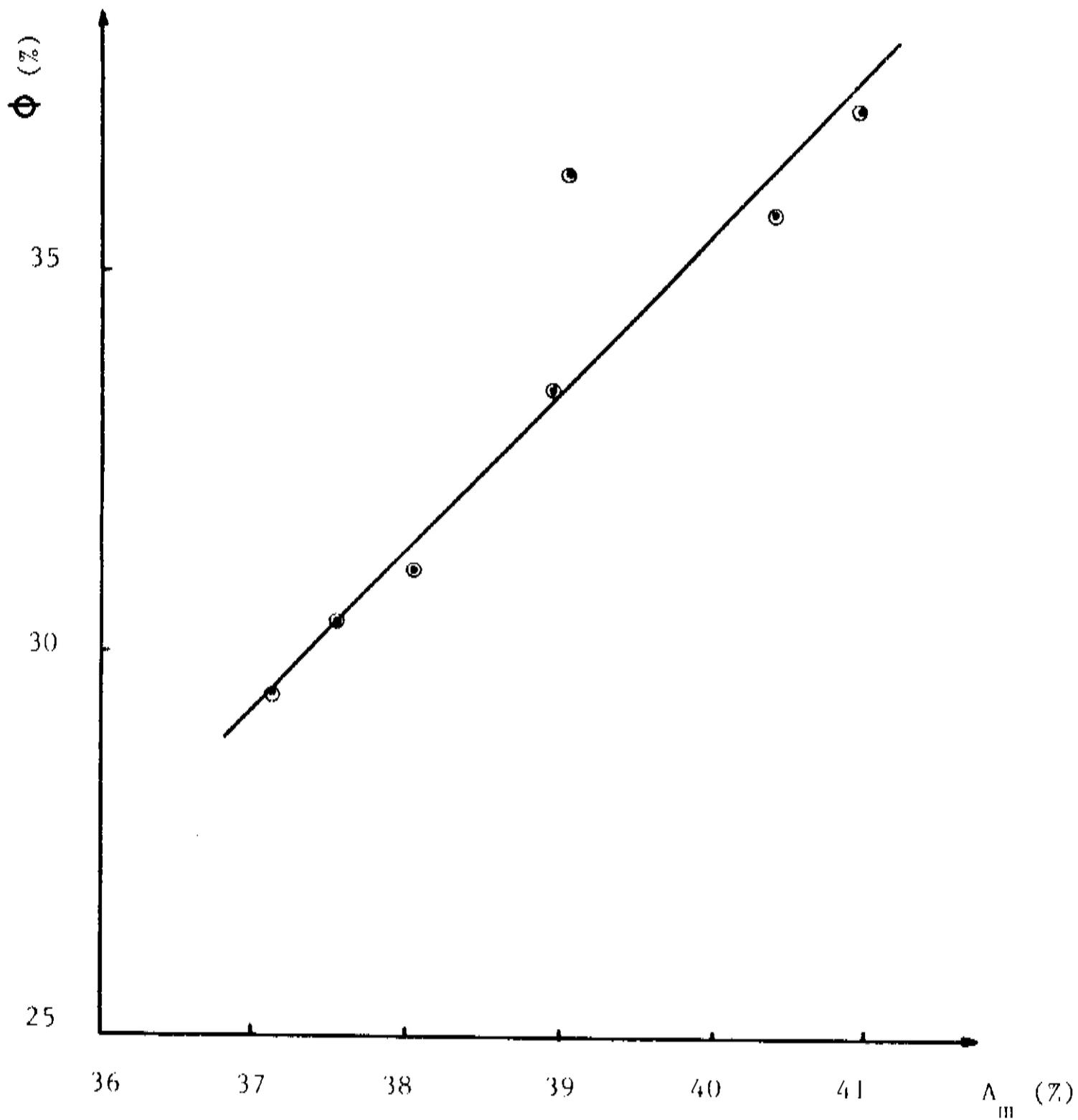


Fig. 5.17 - Acessibilidade em função da fração amorfa

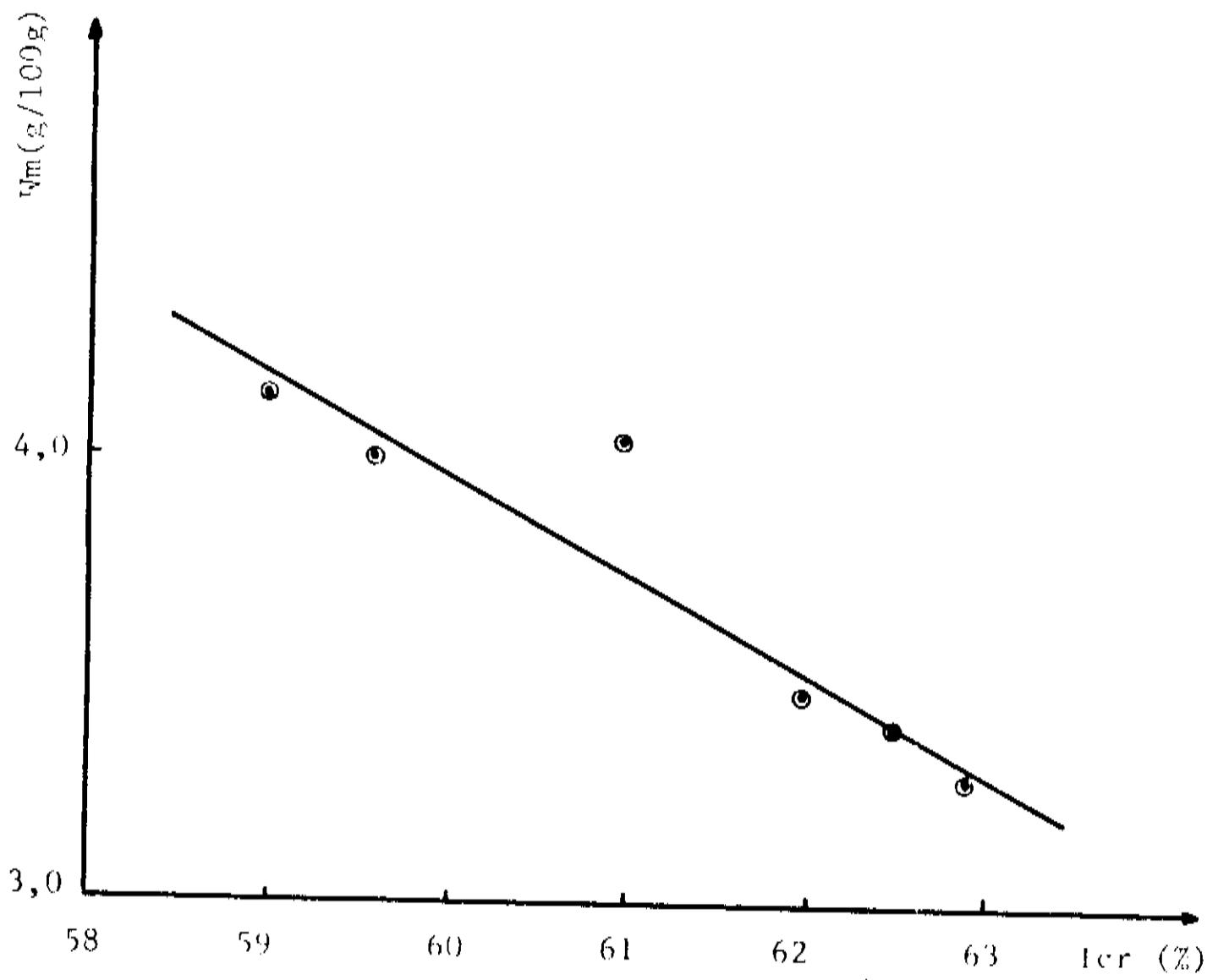


Fig. 5.18 - ω_m em função do índice de cristalinidade

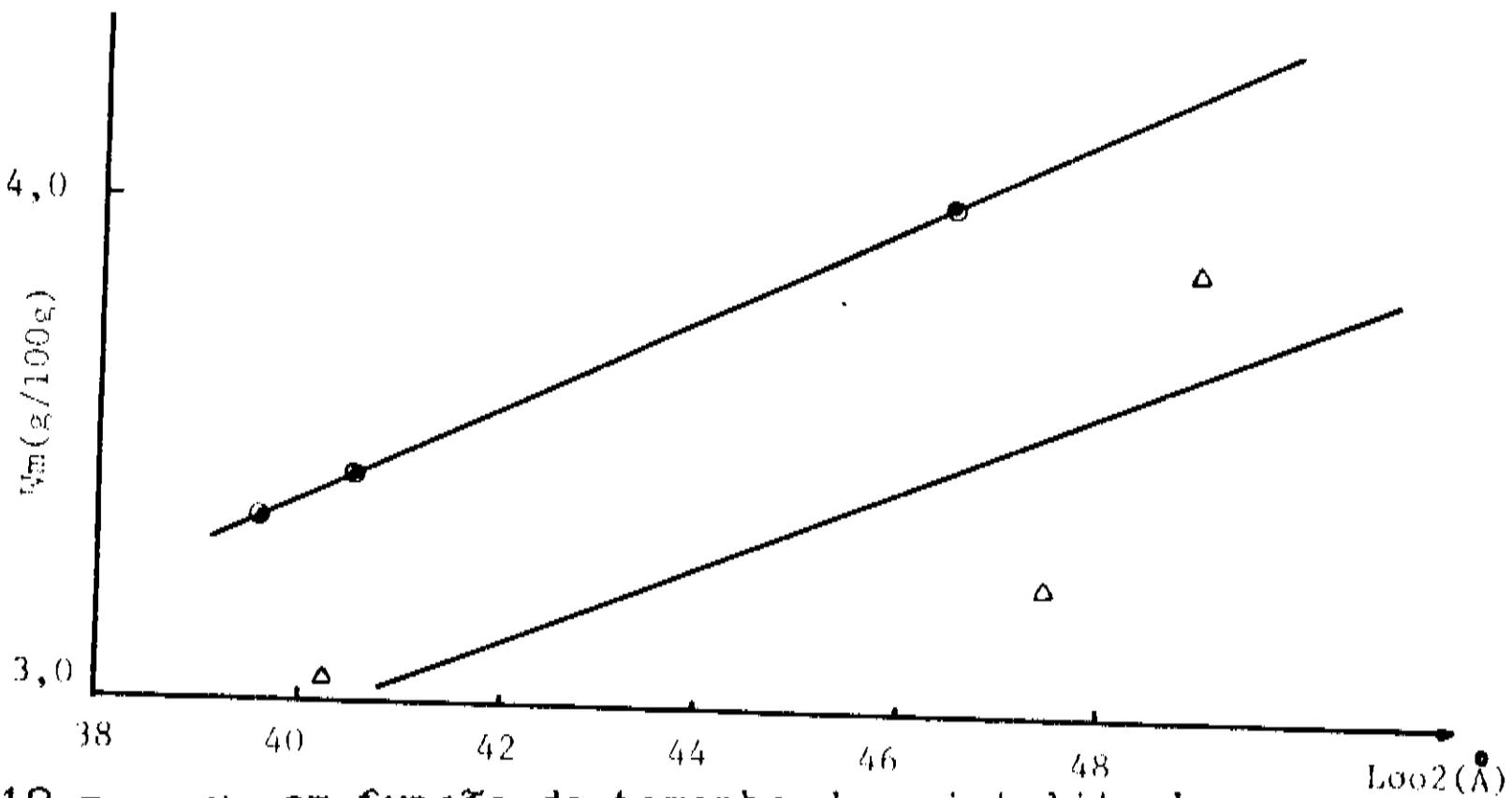


Fig. 5.19 - ω_m em função do tamanho de cristalito L_{002}
 círculos: maturidade ~ 60%
 triângulos: maturidade ~ 40%

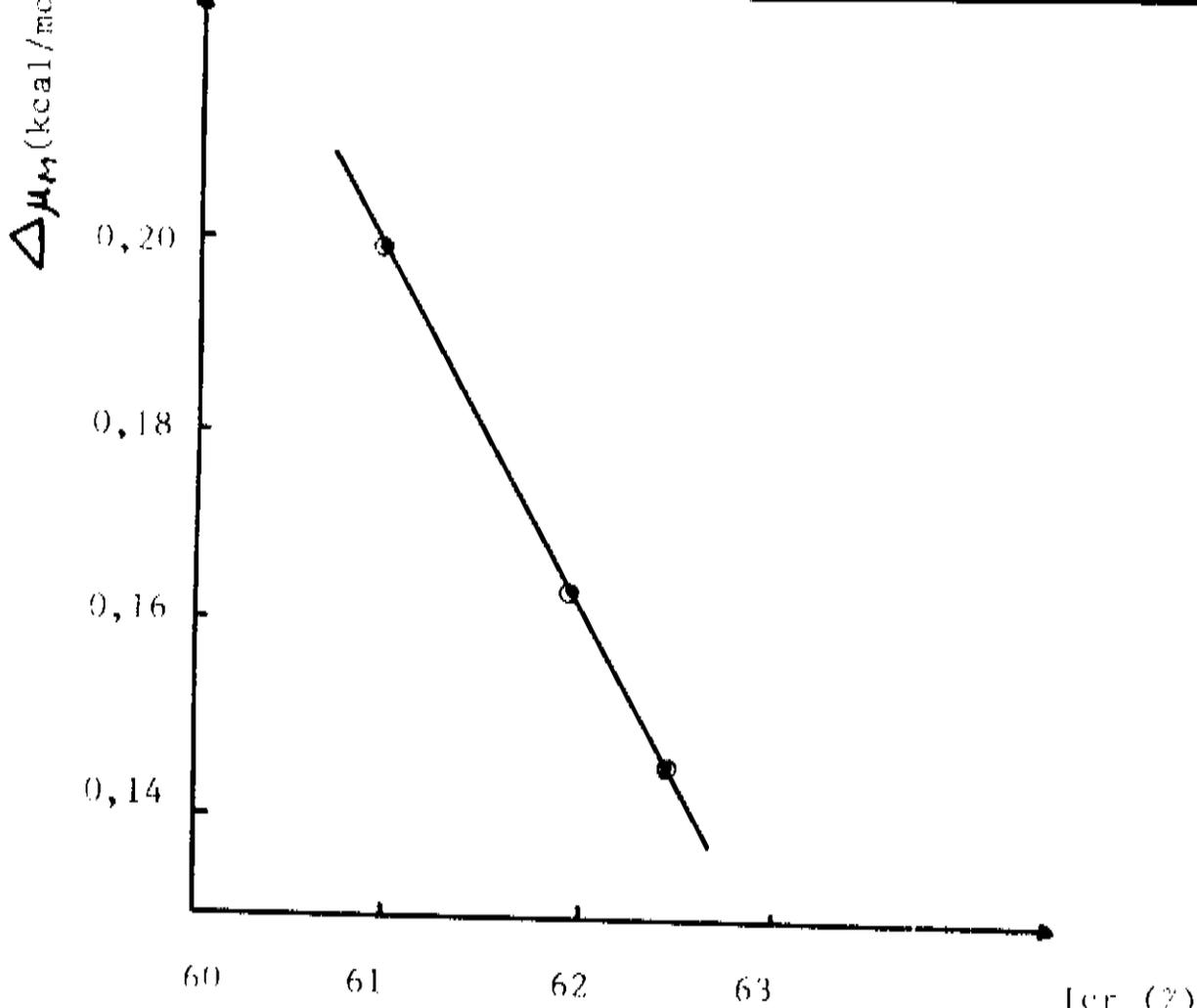


Fig. 5.20 - a) $\Delta\mu_M$ em função do índice de cristalinidade

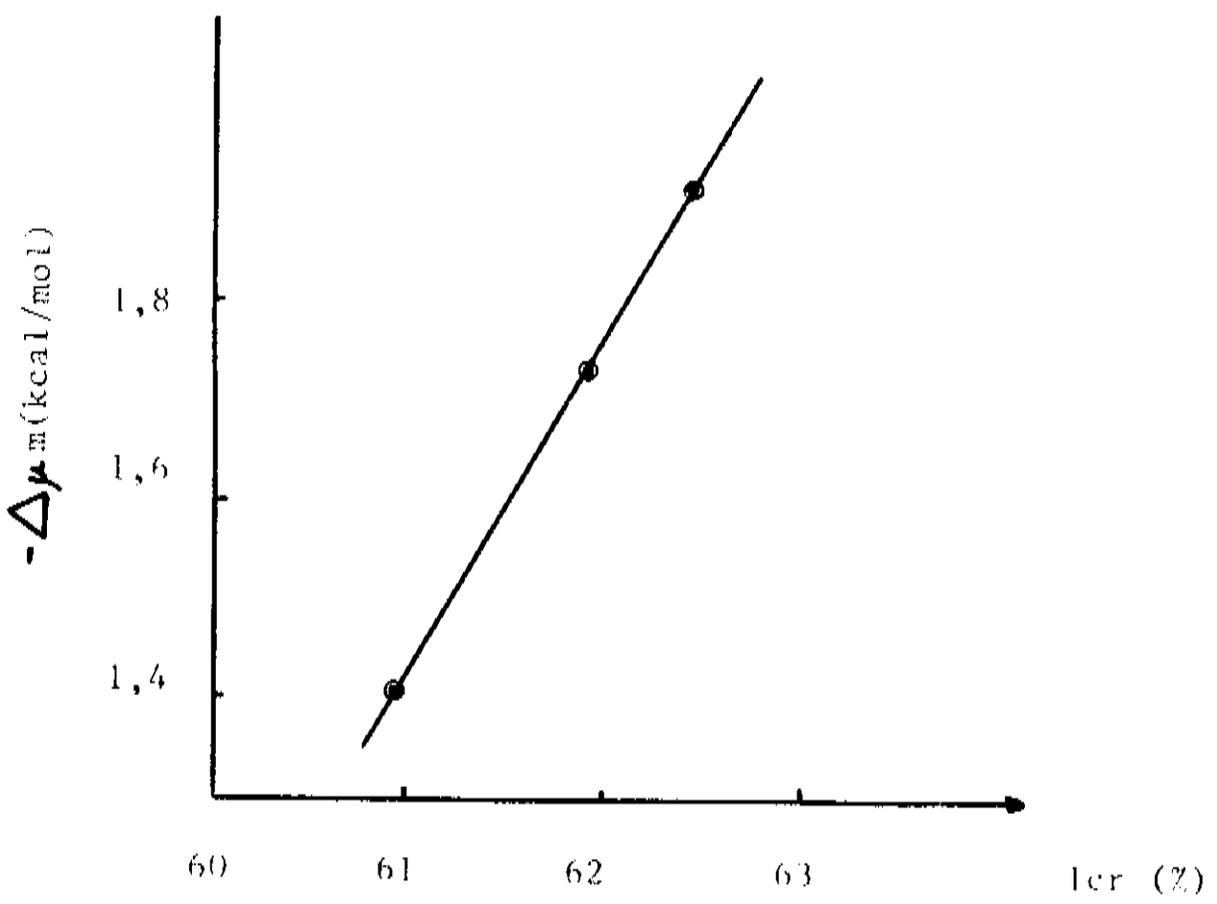


Fig. 5.20 - b) $\Delta\mu_m$ em função do índice de cristalinidade

5.6. Discussão

É fato conhecido que as regiões cristalinas da celulose são inacessíveis às moléculas de água, o que foi confirmado também pelos resultados obtidos neste trabalho. Os espaçamentos interplanares não variam apreciavelmente com o grau de hidratação.

No estágio inicial de crescimento, as fibras de algodão são envolvidas por uma grande quantidade de água, que vai evaporando com o amadurecimento (Howsmon e Sisson, 1954). Assim, a tendência a um aumento da cristalinidade das fibras com a maturidade, aqui observada, parece ser um resultado coerente: nas fibras mais jovens, devido à maior quantidade de água haveria um maior volume de regiões amorfas.

Os resultados obtidos para os diversos parâmetros que medem o grau de orientação cristalina das fibras demonstraram ser bastante coerentes. Um resultado esperado, por já haver sido constatado há bastante tempo, é o fato da resistência intrínseca das fibras depender de seu grau de orientação cristalina (Tripp e Conrad, 1972). Os resultados de nosso trabalho mostraram que isso realmente acontece, quando se compara a resistência com a orientação, mas para amostras de maturidades próximas. Isso confirma estar correto o critério adotado, de controlar a maturidade das fibras, para que se possa estabelecer relações entre a estrutura física e as propriedades mecânicas das mesmas.

Quanto ao papel da água, pelos resultados obtidos na parte de hidratação da celulose, há vários pontos a serem considerados. Ficou evidente, pelos resultados aqui indicados, que

há uma dependência direta entre a acessibilidade às moléculas de água e a fração de substância amorfa na fibra. Isso significa que os sítios disponíveis para absorção das moléculas de água são os grupos hidroxila que não estejam participando de pontes de hidrogênio de uma maneira regular, cristalina. Segundo Mann e Marrinan, 1956, as cadeias de superfície são completamente desordenadas e têm todos os seus grupos hidroxila disponíveis para ligação com moléculas de água. Esse fato está, portanto, coerente com o nosso resultado de que o número de sítios de hidratação primária é proporcional ao tamanho médio dos cristalitos. Se os cristalitos são maiores, há maior possibilidade de ocorrerem sítios acessíveis às moléculas de água em sua superfície. A água penetra, portanto, nas regiões amorfas e nas superfícies das regiões cristalinas.

Quando se varia o grau de umidade a que é submetida a fibra de celulose, observa-se que o tamanho médio do cristalito cresce com a maior hidratação, ao passo que o índice de cristalinidade diminui. Uma explicação plausível para esse fato seria a de que, em presença de água, cujas moléculas são absorvidas em grande parte nas regiões desordenadas, estas se tornam mais inchadas. Ao mesmo tempo, há moléculas de água se ligando às superfícies dos cristalitos, que se tornam mais ordenados, com a possível formação de agregados, isto é, novas cadeias moleculares se agregariam à superfície do cristalito. Esse fato, sozinho, levaria a supor um aumento da cristalinidade, pois há maior conteúdo de substância ordenada na fibra. Como simultaneamente ocorre o inchamento das regiões amorfas, esse

fenômeno acaba prevalecendo, pois seu volume aumenta em proporções maiores que o das regiões ordenadas. A cristalinidade então diminui.

À medida que vai sendo retirada a água, ocorrem novamente dois processos concorrentes entre si: há uma cristalização maior da celulose durante a secagem, como resultado da formação de pontes de hidrogênio, inter e intramoleculares, entre grupos hidroxila anteriormente ligados às moléculas de água (Heyn, 1969). Além da cristalização maior da celulose, há uma diminuição do volume das regiões amorfas, devido à retirada das moléculas de água. Portanto, a cristalinidade aumenta com a secagem. Ao mesmo tempo, pode ocorrer um processo de quebra de pontes de hidrogênio intramoleculares, devido à retirada de água, o que faria com que algumas cadeias se "desagregassem" dos cristalitos, diminuindo assim seu tamanho médio.

Um outro fato digno de nota entre os resultados experimentais é a relação entre os potenciais químicos e a cristalinidade. A diferença de potencial químico entre as moléculas de água na monocamada e a água livre é crescente, em módulo, com o índice de cristalinidade. Uma possível explicação para esse fato é que, numa estrutura mais ordenada, um maior número de moléculas de água, tenderá a se ligar às superfícies dos cristalitos, em comparação com aquelas que se ligariam às regiões desordenadas. Quanto à água ligada em multicamadas, a diferença de potencial químico é muito pequena, isso é, seu potencial químico é bastante próximo do da água livre ($\Delta\mu_m \sim -1,5$ kcal/mol, ao passo que $\Delta\mu_M \sim 0,15$ kcal/mol).

A tendência seria, portanto, das moléculas de água se ligarem em monocamadas nas superfícies dos cristalitos. A absorção em multicamadas aconteceria com maior probabilidade nas regiões amorfas.

6. EXPERIMENTAL: COLÁGENO

6.1. Amostras Seleccionadas

A grande maioria dos estudos feitos sobre o papel da água na estrutura do colágeno tem sido realizada em fibras isoladas, mas resultados semelhantes têm sido obtidos tanto para fibras orientadas como não orientadas (Esipova e colaboradoras, 1958). Levando-se em conta também o fato de que, para se obter um bom diagrama de fibras, essas devem ser esticadas, com uma possível alteração em parte da estrutura das fibras (Crick e Kendrew, 1957), considerou-se interessante realizar esse trabalho utilizando-se agregados fibrilares, o chamado "po" de colágeno. Este é bem adequado para o preparo de amostras planas e compactas, necessárias para se obter um bom difratograma.

Foram utilizadas então amostras de pó de pele bovina, que nos foram fornecidas pelo IFLYSIB de La Plata, Argentina.

6.2. Difração de Raios X

As condições experimentais para a obtenção dos diagramas de difração de raios X pelo colágeno são as mesmas descritas na seção 5.2.

Foram obtidos, em condições de umidade controlada, a temperatura de 22°C, difratogramas de amostras submetidas a diferentes graus de umidade. Para o controle de umidade as amostras foram deixadas em dessecadora contendo solução saturada de um sal com pressão de vapor de saturação conhecida, por um

período de pelo menos dez dias. Através de pesagem, constatou-se que um período de sete a oito dias é suficiente para ser atingido o equilíbrio. Para secagem, as amostras foram deixada sobre P_2O_5 , à temperatura ambiente.

Passado esse período, as amostras eram colocadas num porta-amostras especial, para que, durante a exposição, a umidade pudesse ser controlada, através de uma corrente de N_2 passando através da solução adequada de sal.

Com o objetivo de verificar até que ponto há perda na estrutura do colágeno, quando este é submetido a processos de dessorção-absorção, e se há histerese nesses processos, foram realizados três tipos de experiências. No primeiro deles, a mesma amostra era submetida a dois ciclos consecutivos de secagem e rehidratação, partindo de uma pressão de vapor relativa $p/p_0 = 0,90$, diminuindo-se então gradativamente o grau de umidade, até o ponto seco (sobre P_2O_5). O processo era então revertido, rehidratando-se gradualmente a amostra até $p/p_0 = 0,90$. O ciclo todo era repetido mais uma vez.

O segundo tipo de experiência realizado foi o seguinte: ciclos de secagem-rehidratação, a partir de $p/p_0 = 0,90$, para duas amostras preparadas de maneira idêntica, mas em que uma delas era submetida a dessorção até o ponto seco, e a outra até $p/p_0 = 0,31$. O objetivo era verificar se há histerese na modificação da estrutura quando a amostra é seca até um teor de água $\omega \approx \omega_m$. Para $p/p_0 = 0,31$, pelos resultados obtidos das isotermas de dessorção-absorção, o teor de umidade era de $0,13 \text{ g/g}$ ($\text{gH}_2\text{O/g}$ proteína seca), isto é, um pouco acima do valor da fração de água

fortemente ligada (hidratação primária), $\omega_m \simeq 0,11$ g/g, valor obtido no ajuste dos dados experimentais pela equação de Guggenheim.

Com o objetivo de verificar se, sob diferentes condições no processo de dessorção-absorção, há recuperação ou não da estrutura, foram realizados ciclos de secagem e rehidratação numa única etapa, isto é, ciclos em que a amostra, hidratada a um alto grau de umidade relativa (90%) passava diretamente a secagem sobre P_2O_5 , sendo então novamente hidratada diretamente a 90%. O ciclo era então realizado mais uma vez.

A partir dos difratogramas obtidos, foram analisados os seguintes parâmetros:

a) Reflexão equatorial principal: a posição angular do máximo da reflexão e o respectivo espaçamento, correspondente às distâncias na rede fibrilar, além da intensidade integrada, relativa à do primeiro diagrama, sempre realizado a um máximo valor de umidade relativa (90%).

b) Reflexão meridional, correspondente à altura unitária h (2,9Å): a posição, a intensidade integrada, também relativa à do primeiro difratograma, com máximo teor de água.

c) Banda difusa centrada em $\sim 4,5\text{Å}$: a intensidade integrada, tomada em relação à reflexão equatorial principal.

As intensidades foram obtidas pelo cálculo das áreas de cada reflexão, sendo esse cálculo realizado por planimetria, com

um erro estimado em 5%.

Todos esses ciclos foram realizados várias vezes, o que demonstrou a reprodutibilidade dos resultados.

6.3. Isotermas de Sorção de Água

Foram levantadas as isotermas de sorção de água em colágeno de pele bovina pelo método gravimétrico, descrito na seção 5.4.

Um dos objetivos desse trabalho era o de verificar a possibilidade de obtenção, para o colágeno nativo, de isotermas de sorção-dessorção reversíveis. Através de uma série de ciclos de sorção-dessorção para a α -quimotripsina, Lüscher-Mattli e Rüegg, 1982, demonstraram que o efeito da histerese é consequência da remoção completa da água da proteína. Se a dessorção ocorre até um teor de água correspondente à fração de água fortemente ligada (ω_m), o efeito da histerese desaparece.

Três amostras de pó de pele bovina foram então submetidas ao processo de pesagem de precisão. Para todas se partiu de um valor máximo da umidade relativa (90%), sendo então gradualmente desidratadas: a primeira delas até a secagem completa sobre P_2O_5 , a segunda até $p/p_0 = 0.20$ e a terceira até $p/p_0 = 0.31$; em seguida iniciou-se o processo de absorção, até o ponto inicial ($p/p_0 = 0.90$).

Para os dois primeiros ciclos dessorção-absorção, foi feito o ajuste dos dados experimentais, por mínimos quadrados, à equação de Guggenheim, e determinados os parâmetros termodinâmicos

para cada caso. Foi determinada também a ocupância dos sítios de hidratação primária, definida como a porcentagem de água ligada na primeira monocamada em relação à ocupação máxima (ω_m):

$$OC(\%) = \frac{\omega_1}{\omega_m} \cdot 100$$

6.4. Resultados

O papel da água na manutenção da estrutura do colágeno pode ser claramente observado pelos diagramas de difração de raios X a alto ângulo. A amostra seca revela pequena orientação, sendo que o grau de ordem aumenta bastante com a hidratação da proteína. A figura 6.1 mostra dois difratogramas obtidos da mesma amostra de colágeno, o primeiro para a amostra seca e o segundo para a amostra hidratada a 90% de umidade relativa.

A reflexão equatorial principal desloca-se para ângulos maiores com a secagem: o espaçamento lateral das moléculas na fibrila varia de 10,4Å em material bem seco até 13,0Å em colágeno umedecido. A intensidade da reflexão também é menor com a secagem. A banda difusa, centrada em aproximadamente 4,5Å, que corresponde a distâncias médias entre as três cadeias polipeptídicas, é muito mais proeminente em colágeno seco, mas sua posição não se desloca apreciavelmente. A reflexão meridional, superposta à banda difusa, e correspondente ao período axial de 2,9Å, apresenta uma intensidade maior com a hidratação. Sua posição praticamente não varia com o grau de umidade.

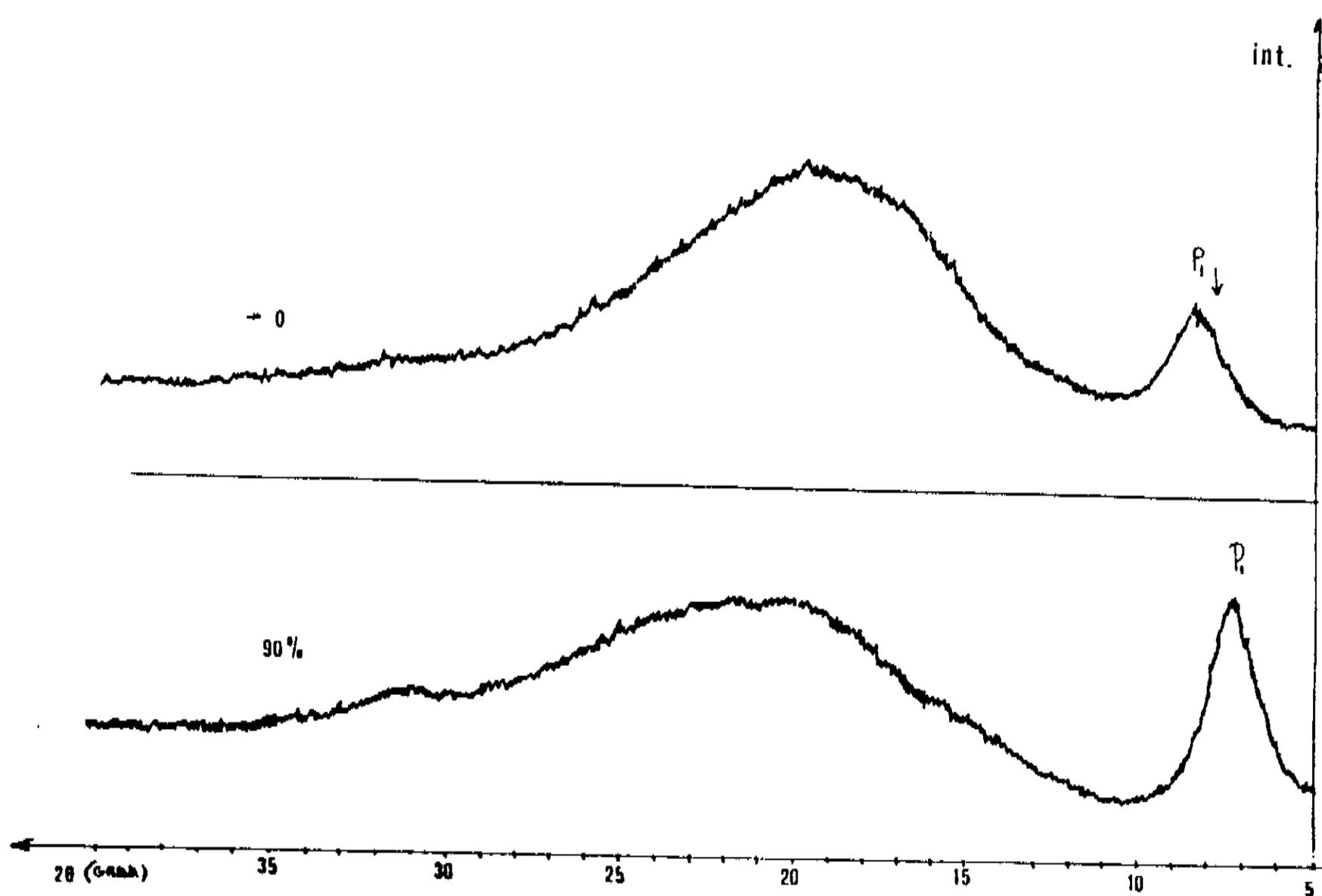


Fig. 6.1 - Difractogramas de amostras de colágeno: a) amostra seca; b) amostra umidecida a $p/p_0 = 0,90$

6.4.1. Ciclos Consecutivos de Secagem e Rehidração

O espaçamento lateral das moléculas foi monitorado através de dois ciclos de secagem-rehidração. A figura 6.2 mostra a curva obtida, com o espaçamento em função de umidade

relativa. Confirma-se o resultado já conhecido de que o espaçamento equatorial aumenta com a hidratação. Observa-se também que, para cada valor do grau de umidade, o espaçamento permanece praticamente constante, isto é, a variação nesse espaçamento é perfeitamente reversível através desses ciclos.

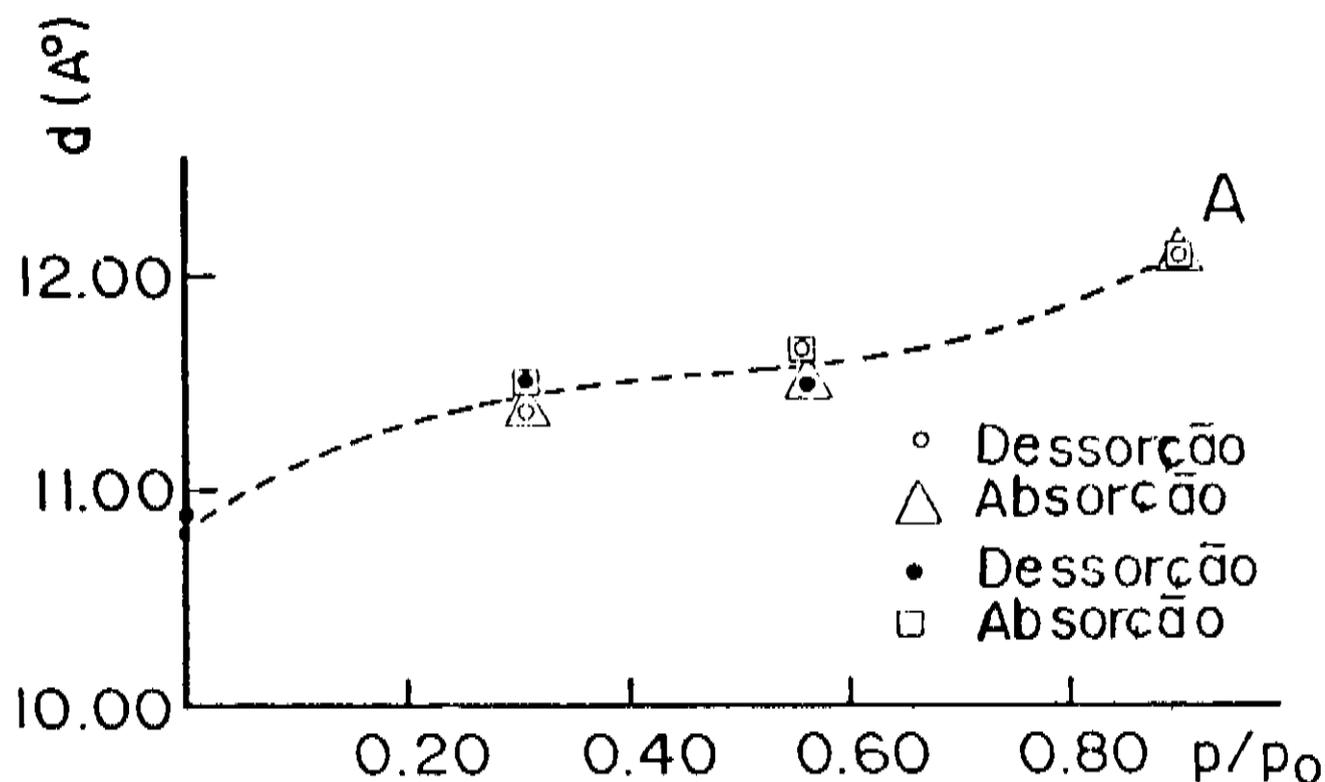


Fig. 6.2 - Espaçamento equatorial em função de p/p_0

Com o objetivo de observar as mudanças no espaçamento equatorial em função do teor de água contido na proteína, uma amostra foi inicialmente molhada, colocada em atmosfera com 90% de umidade relativa e submetida à desidratação e rehidratação. O teor de água foi obtido pela pesagem de precisão. O resultado obtido pode ser observado na figura 6.3. O espaçamento atinge um valor de 13Å para a amostra molhada, chegando ao extremo de 10,8Å quando a amostra é seca. Pode-se verificar que as variações na separação das moléculas de colágeno acontecem de acordo com vários regimes

de fixação da água.

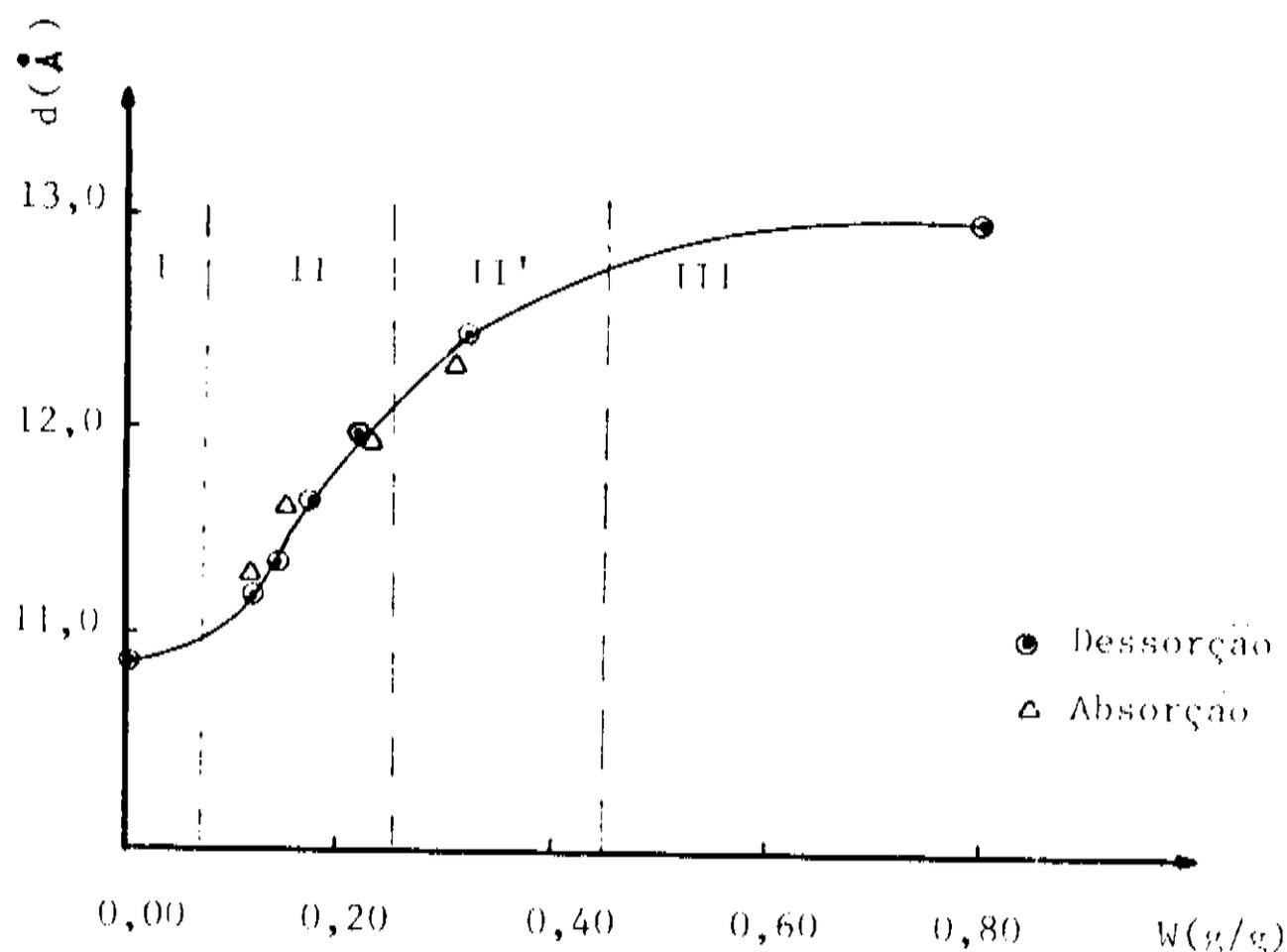


Fig. 6.3 - Espaçamento equatorial em função do teor de água contido na amostra

Na figura 6.4 observa-se a variação das intensidades integradas da mesma reflexão equatorial, calculadas tomando-se como referência a intensidade para o primeiro difratograma, obtido com a amostra submetida à máxima pressão de vapor relativa ($p/p_0 = 0,90$). A intensidade integrada vai diminuindo com a diminuição da umidade relativa. As curvas obtidas têm a mesma forma sigmóide das isotermas de absorção, apresentando o conhecido efeito da histerese. Pelo gráfico pode-se ver que a intensidade atinge 82% de seu valor inicial após o primeiro ciclo secagem-rehidratação. Na segunda secagem, atinge 30% do valor

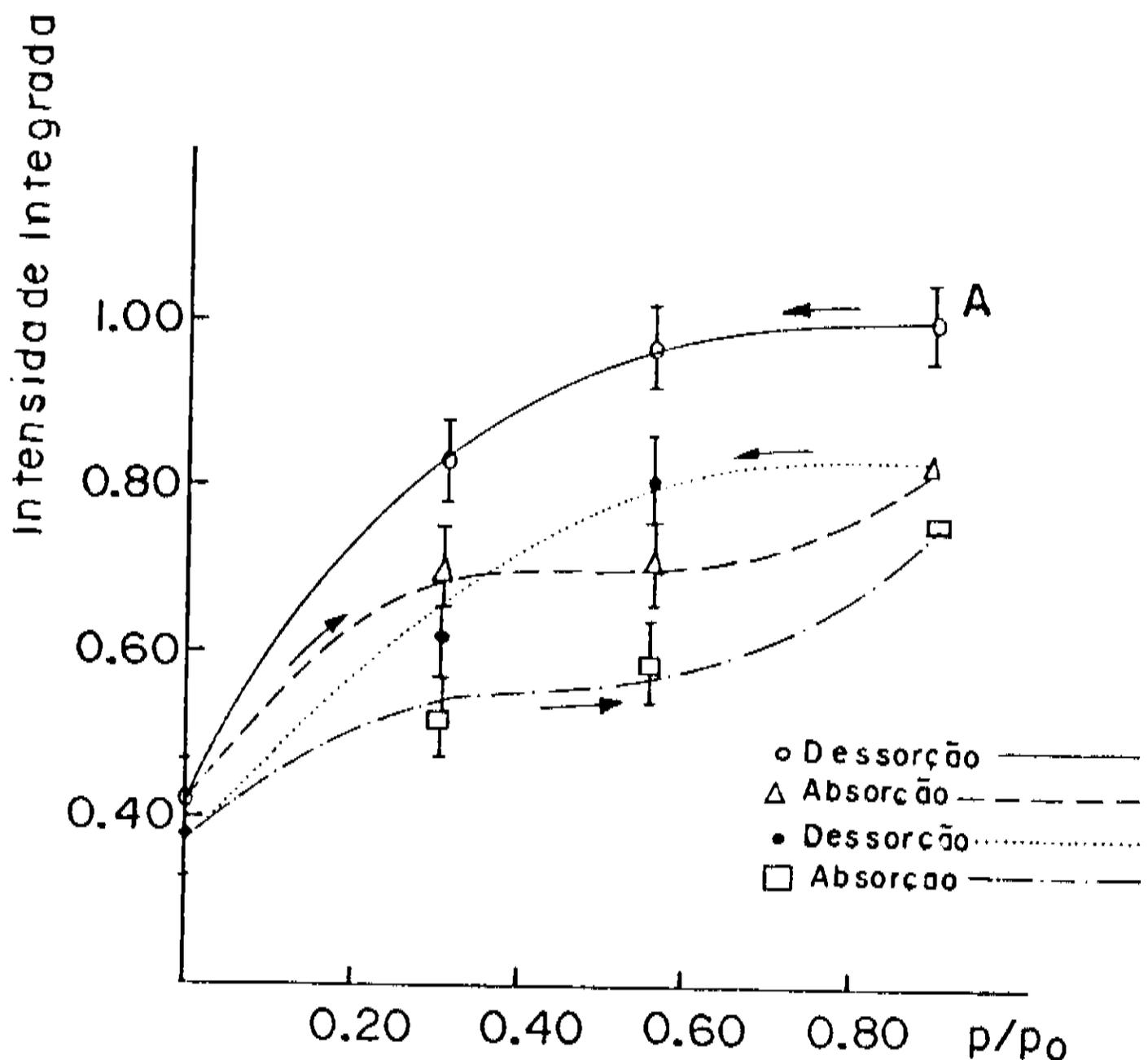


Fig. 6.4 - Intensidade integrada da reflexão equatorial, normalizada pelo valor em A (início do ciclo), em função de p/p_0

inicial e, depois de nova hidratação, recupera apenas 76% da intensidade original.

A posição do pico correspondente à reflexão meridional de 2.9\AA praticamente não se modifica durante todo o ciclo, o que mostra que a altura da hélice não é afetada pela quantidade de moléculas de água presentes na proteína. Por outro lado, a

intensidade integrada dessa reflexão, medida em relação à do primeiro difratograma obtido com máxima umidade, diminui com o decréscimo no teor de água. A figura 6.5 mostra sua variação em

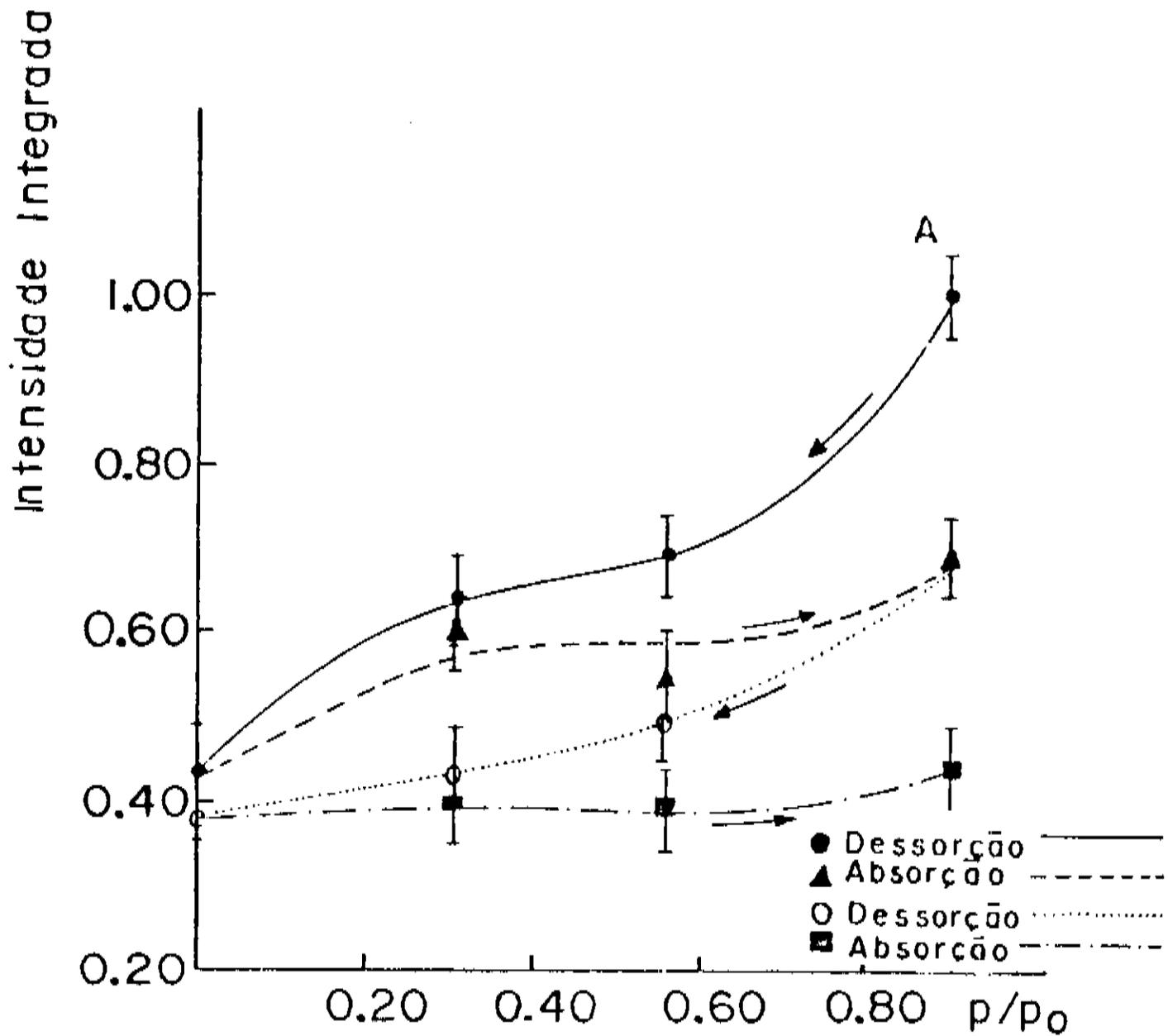


Fig. 6.5 - Intensidade integrada da reflexão meridional, normalizada pelo valor em A (início do ciclo), em função de p/p_0

função de p/p_0 : nota-se claramente o efeito de histerese, havendo uma alteração pronunciada após o segundo ciclo secagem-rehidratação.

A banda difusa centrada em aproximadamente $4,5\text{\AA}$ não se desloca com os diferentes graus de umidade, mas sua intensidade,

tomando-se como referência a da reflexão equatorial principal, atinge um máximo para a amostra seca, o que indicaria um crescimento das regiões desordenadas nas fibrilas.

6.4.2. Comparação entre Secagem Total e Parcial

Essa parte do trabalho foi realizada com o objetivo de verificar se os efeitos de histerese continuam presentes quando a água é removida apenas parcialmente, isto é, até um teor de água não inferior à hidratação primária ($\omega_m \approx 0,11$ g/g).

As amostras, preparadas nas mesmas condições, foram hidratadas até 90% de umidade relativa, e submetidas a secagem gradual, uma até o ponto seco (sobre P_2O_5) e outra até 31% de umidade relativa. Para esse valor, o teor de água na amostra, segundo as isotermas, é $\sim 0,13$ g/g, um pouco acima de ω_m . Em seguida as amostras foram novamente hidratadas.

A figura 6.6 mostra a intensidade integrada da reflexão equatorial, normalizada como anteriormente, em função do teor de água presente na proteína. Observa-se que quando a amostra é seca totalmente, a intensidade integrada, após a rehidratação, não recupera o valor inicial. O mesmo não acontece quando a amostra é seca apenas parcialmente. Neste caso, o valor inicial da intensidade integrada é totalmente recuperado, nos limites do erro experimental.

Resultado semelhante foi obtido para a intensidade integrada da reflexão meridional, como se pode ver na figura 6.7.

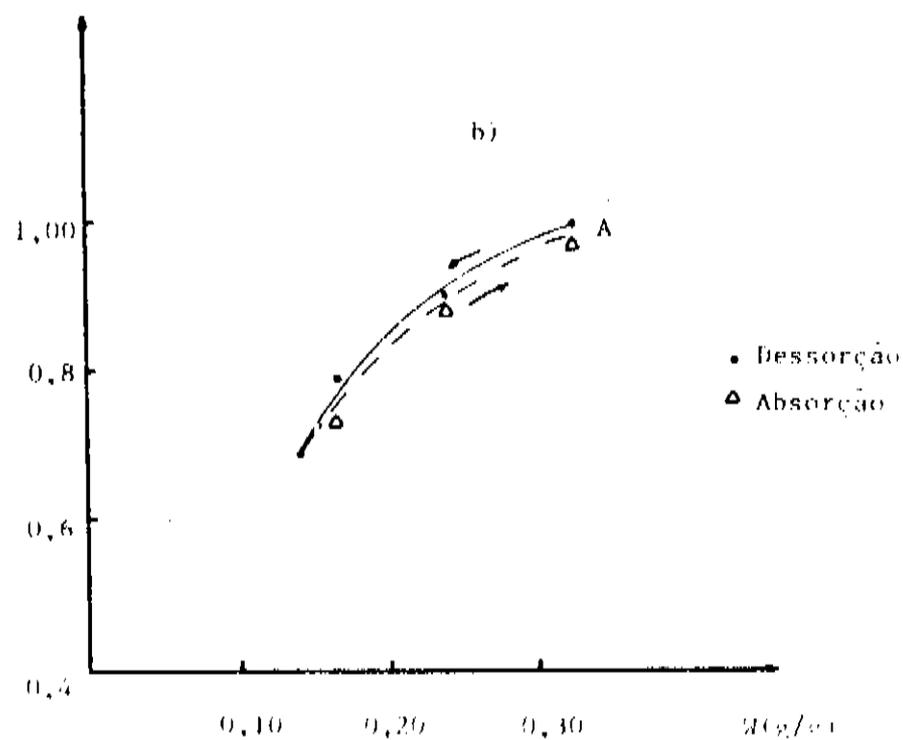
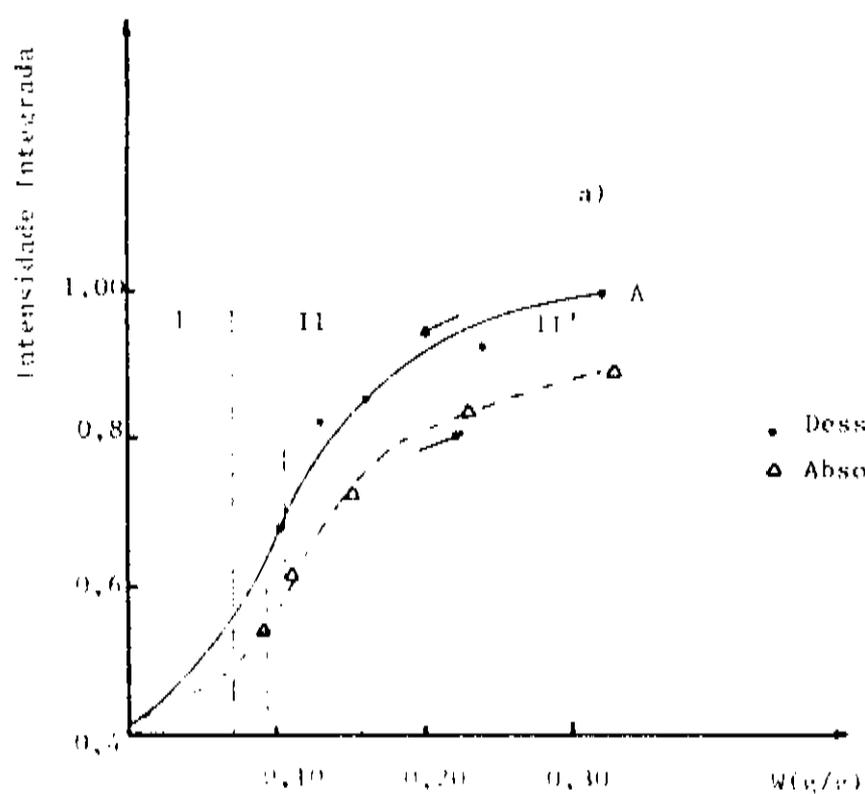


Fig. 6.6 - Intensidade integrada da reflexão equatorial a) secagem total; b) secagem parcial

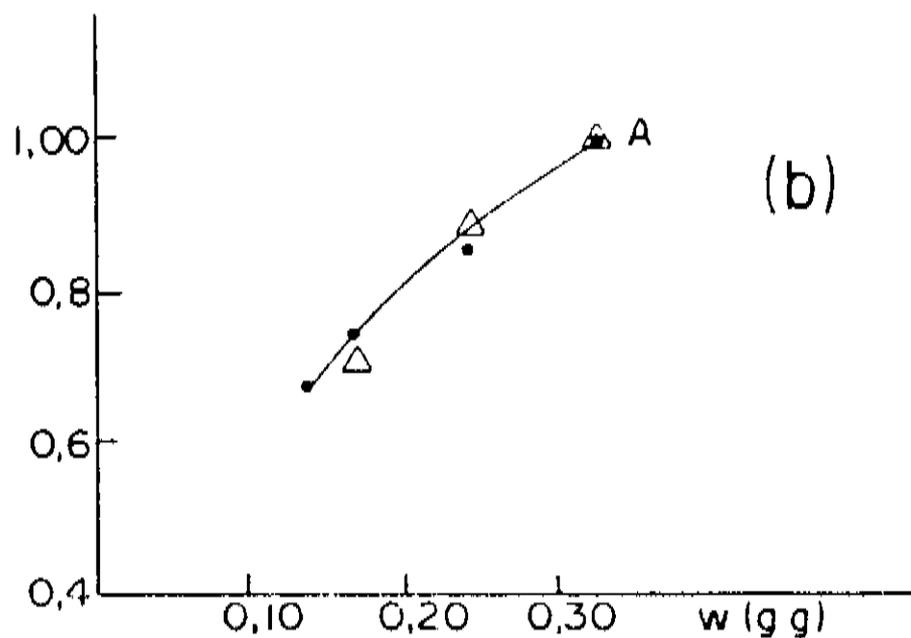
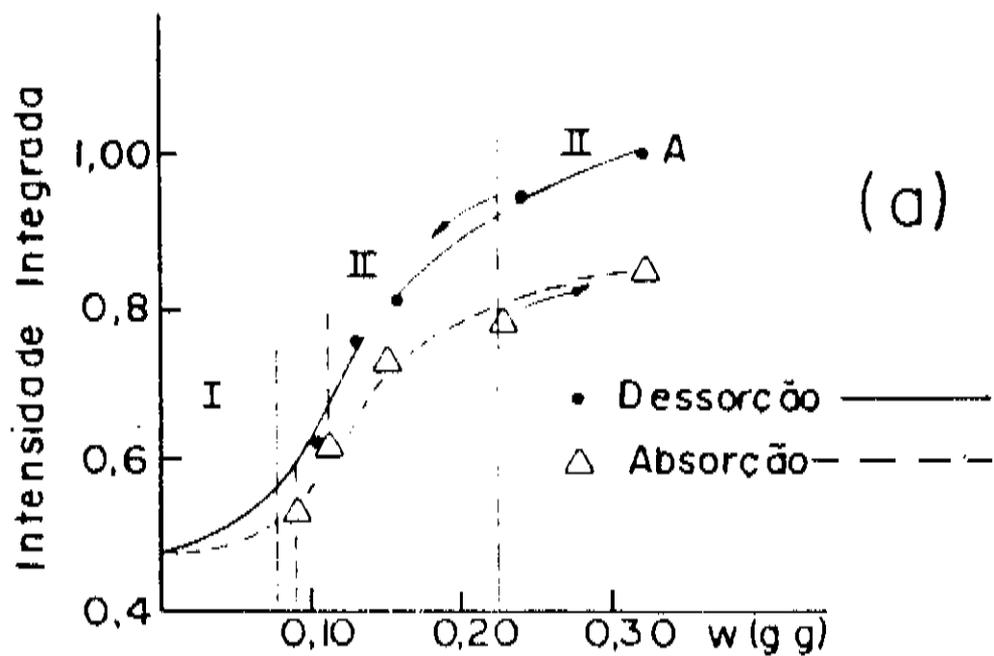


Fig. 6.7 - Intensidade integrada da reflexão meridional a) secagem total; b) secagem parcial

Esses resultados mostram que existe um valor crítico do teor de água presente no colágeno, acima do qual variações nas intensidades não apresentam o efeito de histerese.

6.4.3. Ciclos de Secagem e Hidratação Realizados numa Única Etapa

Foram realizados com o intuito de verificar até que ponto as condições de secagem (mais rápida ou mais lenta) poderiam influir na recuperação da estrutura.

As amostras foram hidratadas até 90% de umidade relativa, em seguida secas diretamente sobre P_2O_5 e então novamente hidratadas a 90%. Essa experiência foi realizada para tempos de equilíbrio diferentes, de três a quatro dias, ou até duas semanas. Verificou-se que nestes casos houve uma reversibilidade praticamente total no diagrama de difração: a intensidade integrada da reflexão equatorial chegou a 0.53 na amostra seca, pelo mesmo critério de normalização, assumindo o valor 1,00 na rehidratação. Quanto à reflexão meridional, sua intensidade integrada chegou a 0.52 para a amostra submetida à secagem sobre P_2O_5 ; na rehidratação, seu valor foi de 0.96. Esses são os resultados quando a amostra foi equilibrada por duas semanas. Para um período menor, eles praticamente se repetiram.

6.4.4. Isotermas de Sorção de Água

Os resultados obtidos no levantamento das isotermas de sorção para o colágeno nativo são indicados na tabela 6.1, para a

TABELA 6,1

ISOTERMA DESSORÇÃO - ABSORÇÃO: Colágeno Nativo
 Ciclo: 0,90 -- 0,00 -- 0,90 (P/Po)

p/Po	Wexp (g/g)	W ^G (g/g)	Wl (g/g)	Wm (g/g)	φ (%)
0,90	0,321	0,318	0,107	0,212	98,5
0,75	0,240	0,237	0,106	0,131	97,6
0,52	0,162	0,167	0,103	0,064	95,2
0,31	0,130	0,127	0,098	0,029	90,5
0,20	0,107	0,108	0,092	0,016	84,7
0,00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,0
0,20	0,091	0,091	0,077	0,014	79,0
0,31	0,112	0,113	0,084	0,027	86,7
0,52	0,151	0,151	0,091	0,060	93,3
0,75	0,230	0,227	0,094	0,133	96,6
0,90	0,319	0,321	0,095	0,225	98,0

TABELA 6,2

ISOTERMA DESSORÇÃO - ADSORÇÃO: COLÁGENO NATIVO
 CICLO: 0,90 -- 0,20 -- 0,90 (p/po)

p/P_0	W_{exp} (g/g)	W (g/g)	W_1 (g/g)	W_m (g/g)	θ (%)
0,90	0,323	0,322	0,106	0,216	98,7
0,75	0,242	0,238	0,105	0,133	97,9
0,52	0,162	0,168	0,103	0,065	95,8
0,31	0,131	0,128	0,098	0,030	91,6
0,20	0,108	0,109	0,093	0,016	
0,31	0,125	0,124	0,094	0,029	96,5
0,52	0,158	0,160	0,095	0,065	98,3
0,75	0,233	0,231	0,096	0,135	99,2
0,90	0,322	0,322	0,097	0,225	99,5

TABELA 6,3

ISOTERMA DESSORÇÃO - ABSORÇÃO: Colágeno Nativo
 CICLO: 0,90 - 0,31 - 0,90 (p/po)

p/P_0	W_{exp} (g/g)	
	DESSORÇÃO	ABSORÇÃO
0,90	0,325	0,327
0,75	0,238	0,239
0,52	0,166	0,165
0,31	0,140	0,140

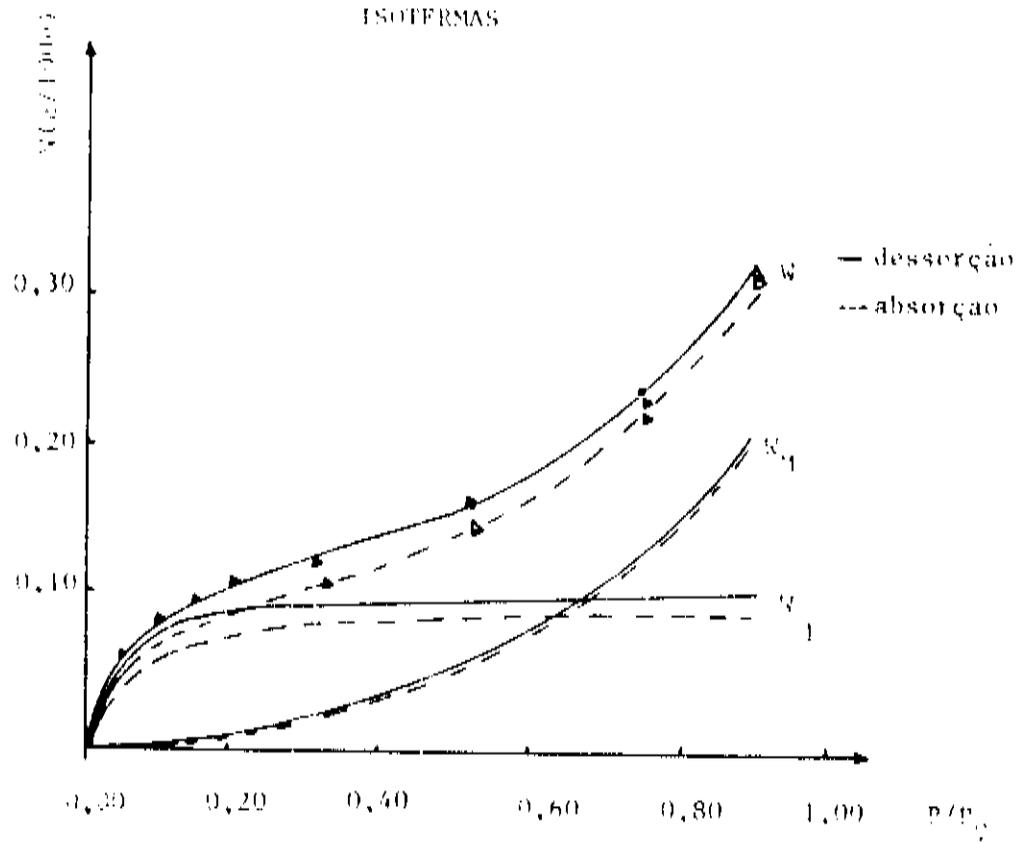
dessorção completa (ciclo p/p_0 : 0,90 - 0,00 - 0,90). A tabela mostra os dados experimentais, os dados do ajuste pela equação de Guggenheim, e a fração de água absorvida respectivamente na primeira monocamada (ω_1) e nas multicamadas (ω_M). Por último, aparece a ocupância dos sítios de hidratação primária. Na tabela 6.2 estão indicados os mesmos dados para o ciclo p/p_0 : 0,90 - 0,20 - 0,0. Finalmente, a tabela 6.3 mostra os dados experimentais obtidos para o ciclo p/p_0 : 0,90 - 0,31 - 0,90.

Os parâmetros ajustados foram os seguintes:

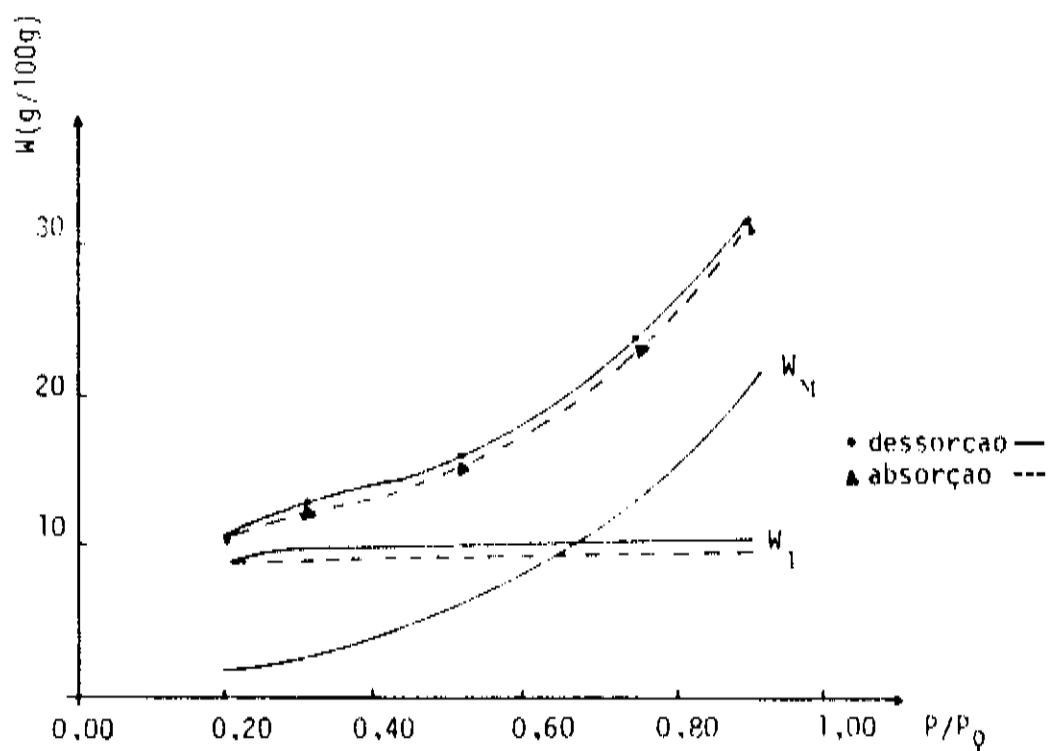
$\omega_m = 10,83\text{g}/100\text{g}$, $p^*/p_0 = 1,35$, $c = 32,02$, $\Delta\mu_m = -1,84$ kcal/mol e $\Delta\mu_M = 0,18$ kcal/mol no processo de dessorção, e $\omega_m = 9,73\text{g}/100\text{g}$, $p^*/p_0 = 1,28$, $c = 20,33$, $\Delta\mu_m = -1,61$ kcal/mol e $\Delta\mu_M = 0,14$ kcal/mol para a absorção.

Os resultados obtidos são vistos na figura 6.8. Para os dois primeiros ciclos é apresentada a separação da isoterma em duas componentes. A histerese está claramente presente no primeiro deles, mas é interessante observar que é bem mais pronunciada na absorção da primeira monocamada do que na absorção em multicamadas. Deve-se notar também, pelos dados da tabela 6.1, que mais de 80% dos sítios de hidratação forte já estão ocupados para uma umidade relativa de 20%. Na isoterma obtida no ciclo p/p_0 : 0,90 - 0,20 - 0,90, a curva de absorção está muito próxima da curva de dessorção. À umidade relativa de 20%, o teor de água absorvida é de 10,7g/100g, muito próximo do parâmetro ω_m .

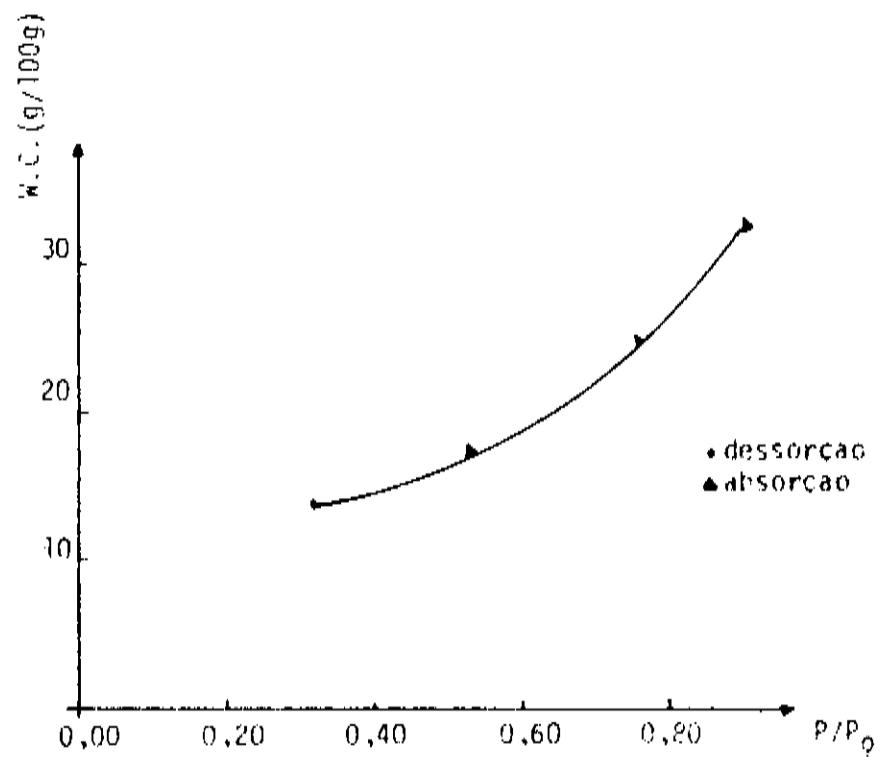
Um processo totalmente reversível pode ser observado no terceiro gráfico, quando a dessorção foi até 31%. As curvas correspondentes aos processos de dessorção e absorção são



a)



b)



c)

Fig. 6.8 - Isothermas de sorção de água pelo colágeno
 a) secagem total; b) secagem até $p/p_0 = 0,20$;
 c) secagem até $p/p_0 = 0,31$

praticamente coincidentes.

6.5. Discussão

As mudanças no espaçamento equatorial principal confirmam resultados já conhecidos através de estudos por diagramas de fibras de colágeno. O fato desse espaçamento ser maior com a hidratação é certamente devido à expansão dos grupos laterais e ao esticamento das ligações intermoleculares, que ocorrem de modo a acomodar as moléculas de água. Isto pode ser confirmado pela alteração drástica no espaçamento equatorial para um teor de água entre 0,10 e 0,25 g/g, que corresponderia à fixação de moléculas de água entre as hélices triplas (regime de transição entre a água fortemente ligada e a água livre). A distância intermolecular cresce, e seu aumento é detectado pela difração produzida pelas regiões ordenadas na rede quasihexagonal (Lees e colaboradores, 1984). Assim, a expansão e contração desse espaçamento aparece como uma alteração reversível através dos ciclos repetidos absorção-dessorção.

Os efeitos de histerese observados na variação da intensidade integrada para a mesma reflexão equatorial mostram que há alguma alteração irreversível nesse processo, que afeta a intensidade, mas não o espaçamento lateral. Uma diminuição no volume das regiões ordenadas das fibrilas poderia ser responsável por esse efeito.

A reflexão meridional está relacionada à estrutura helicoidal. Como as moléculas de água absorvidas, além da água

fortemente ligada, ocorrem na periferia da molecula, contribuindo para estabilizar a estrutura helicoidal, o efeito da histerese observado na intensidade integrada dessa reflexão poderia indicar que parte dessa estrutura é afetada irreversivelmente nesse processo. O fato de não ser observada a histerese quando a amostra é seca até um teor de água $\sim \omega_m$ mostra que a perda de ordem na estrutura helicoidal só é irreversível quando parte da água fortemente ligada (água ligada estruturalmente) é removida. A água estrutural até 1g/100g não é removível a temperatura ambiente (Bigi e colaboradores, 1987).

O fato de mudanças irreversíveis só ocorrerem quando é extraída a água fortemente ligada é confirmado pelos resultados obtidos através das isotermas de sorção de água. Foram obtidos, para uma proteína fibrilar, resultados semelhantes aos de Lüscher-Mattli e colaboradores, 1982, para uma proteína globular (α -quimotripsina). O fato de que a histerese é bem mais pronunciada na fração de água ligada estruturalmente mostra que é a remoção desse tipo de água a responsável pelas mudanças irreversíveis na estrutura do colágeno nativo.

Com relação às experiências de secagem e rehidratação numa única etapa, seus resultados só poderiam ser explicados se, como afirmam Chirgadze e Ovsepyan, 1972, o estado conformacional de um biopolímero sólido depender não só da umidade relativa ambiente como também da velocidade do processo de hidratação ou desidratação: uma remoção rápida da água fixaria a estrutura presente a uma umidade maior. Esipova e colaboradoras, 1958, também afirmam que mudanças estruturais devidas à remoção de água

do colágeno ocorrem vagarosamente.

7. CONCLUSÕES

Esse trabalho representa uma contribuição ao estudo do papel da água na estrutura de biopolímeros estruturais: celulose e colágeno.

Para o estudo de celulose nativa, a maturidade das fibras de algodão nativo apareceu como o parâmetro a ser controlado para a correlação entre características estruturais e as propriedades mecânicas dessas fibras. O conceito de maturidade não é bem explicitado na literatura existente.

Foi desenvolvido um método para a separação dos picos de difração, que ajusta a curva experimental em soma de gaussianas e uma reta-base, o qual demonstrou ser bastante adequado para a determinação do índice de cristalinidade e tamanho de cristalito em fibras de celulose nativa. Através desse método tornou-se possível não só determinar esses parâmetros para as fibras em estudo, como também correlacioná-los com o grau de hidratação da amostra.

Os resultados sobre hidratação da celulose obtidos por difração de raios X foram correlacionados com os parâmetros obtidos pelo ajuste das isotermas de sorção de água à equação de Guggenheim: A acessibilidade às moléculas de água é maior nas amostras que apresentam maior fração de substância amorfa. Ao mesmo tempo, a cristalinidade diminui com a hidratação, e o tamanho médio dos cristalitos aumenta. Concluimos, portanto, que as regiões amorfas são mais acessíveis às moléculas de água, havendo porém absorção de água também na superfície dos

cristalitos, com uma possível formação de agregados de cadeias moleculares.

Os resultados obtidos quando amostras de colágeno foram submetidas a repetidos ciclos de secagem e hidratação mostraram que a histerese, que já se sabia presente nas isotermas de sorção de água, acontece também quando se monitoram as intensidades integradas dos picos de difração de raios X, relacionados com a estrutura do colágeno.

As modificações na estrutura dessa proteína, que acontecem com a retirada da água são irreversíveis quando é retirada a água estrutural. Desidratação até um teor de água próximo à fração de água fortemente ligada produz modificações reversíveis na sua estrutura, fato que havia sido verificado para proteínas globulares, mas não para o colágeno. Mudanças estruturais em colágeno nativo dependem também das condições em que se processam a secagem e hidratação. Secagem e hidratação numa única etapa não produzem modificações irreversíveis.

Há ainda muita coisa a ser feita nesse campo de estudo. Para as fibras de celulose seria interessante que os estudos da estrutura física fossem aplicados a análises químicas. Propriedades como capacidade de tingimento e grau de mercerização, isto é, a conversão de parte da estrutura da celulose I (nativa) em celulose II, podem ser investigadas através da análise por raios X.

Também para o colágeno nativo abrem-se novas perspectivas de estudo, como a investigação de transformações estruturais em filmes de colágeno purificado. O empacotamento das

moléculas de colágeno em fibrilas, aspecto que ainda não está completamente elucidado, é um tema instigante para estudos posteriores.

REFERÊNCIAS

- Alexander, L.E., "X-Ray Diffraction Methods in Polymer Science",
Wiley Interscience, New York (1969)
- Azaroff, L.V., "Elements of X-Ray Crystallography", McGraw-Hill,
New York (1969)
- Battista, O.A., Microcrystal Polymer Science, McGraw-Hill, New
York (1975)
- Bear, R.S., Advan. Protein Chem. 7, 69 (1952)
- Berg, C. and Bruin, S., in "Water Activity: Influences on Food
Quality" (L.B. Rockland and G.F. Stewart, eds.) p. 1,
Academic Press, New York (1981)
- Bettelheim, F.A., Block, A. and Kaufman, L.J., Biopolymers 9, 1531
(1970)
- Bevington, P.R., "Data Reduction and Error Analysis for the
Physical Sciences", McGraw-Hill, New York (1969)
- Bigi, A., Fichera, A.M., Roveri, N. and Koch, M.H.J., Int. J.
Biol. Macrom. 9, 176 (1987)
- Brunauer, S., Emmett, P.H. and Teller, E., J. Am. Chem. Soc. 60,
309 (1938)
- Buchanan, D.R. and Miller, R.L., J. Appl. Physics 37, 4003 (1966)
- Bull, H.B., J. Am. Chem. Soc. 66, 1499 (1944)
- Chirgadze, Y.N. and Ovsepyan, A.M., Biopolymers 11, 2179 (1972)
- Clark, G.L. and Terford, H.C., Anal. Chem. 27, 888 (1955)
- Creely, J.J. and Tripp, V.W., Textile Res. J. 41, 371 (1971)
- Crick, F.H., Acta Cryst. 6, 685 (1953)
- Crick, F.H.C. and Kendrew, J.C., Advan. Protein Chem. 12, 133

(1957)

- Cochran, W., Crick, F.H.C. and Vand, V., *Acta Cryst.* 5, 581 (1952)
- Cusack, S. and Lees, S., *Biopolymers* 23, 337 (1984)
- DeLuca, L.B. and Orr, R.S., *J. Polymer Sci.* 54, 457 (1961)
- Dent, R.W., *Textile Res. J.* 47, 145 (1977)
- Durand, M. e Favard, P., "A Celula", Ed. Edgard Blücher, Ed. da USP, S. Paulo (1972)
- Ellefsen, Ø. and Tønnesen, B.A., in "Cellulose and Cellulose Derivatives" (N.M. Bikales and L. Segal, Eds.) p. 151, Wiley Interscience, New York (1971)
- Esipova, N.G., Andreeva, N.S. and Gatovskaia, T.V., *Biofísica* 3, 505 (1958)
- Eyre, D.R., *Science* 207, 1315 (1980)
- Frey-Wissling, A. and Mühlethaler, K., *Makromol. Chem.* 62, 25 (1963)
- Froix, M.F. and Nelson, R., *Macromolecules* 8, 726 (1975)
- Grigera, J.R. and Berendsen, H.J.C., *Biopolymers* 18, 47 (1979)
- Grigera, J.R. and Mascarenhas, S., *Stud. Biophys.* 73, 19 (1978)
- Guggenheim, E.A., "Applications of Statistical Mechanics", chap. 11, Clarendon Press, Oxford (1966)
- Hailwood, A.J. and Horrobin, S., *Trans. Faraday Soc.* 42B, 84 (1946)
- Heidemann, E. and Keller, H., *J. Am. Leather Chem. Ass.* 65, 512 (1970)
- Hermans, J.J., Hermans, P.H., Vermaas, D. and Weidinger, A., *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas* 65, 427 (1946)
- Hermans, P.H. and Weidinger, A., *J. Appl. Physics* 19, 491 (1948)

- Hermans, P.H. and Weidinger, A., *J. Polymer Sci.* **4**, 135 (1949)
- Hermans, P.H. and Weidinger, A., *Textile Res. J.* **31**, 558 (1961)
- Heyn, A.N.J., *J. Polymer Sci.* **A3**, 1251 (1965)
- Hindeleh, A.M. and Johnson, D.J., *J. Phys.* **D4**, 259 (1971)
- Hindeleh, A.M., Johnson, D.J. and Montague, P.E., *Fiber Diffraction Methods*, ACS Symposium Series, n^o 141, p. 149 (1980)
- Hindeleh, A.M., *Textile Res. J.* **50**, 667 (1980)
- Hodge, A.J. and Petruska, J.A., in "Aspects of Protein Structure" (Ramachandran, G.N. ed.) p. 289, Academic Press, New York (1963)
- Hoseman, R., *Polymer* **3**, 349 (1962)
- Howsmon, J.A., in "Cellulose and Cellulose Derivatives" (E. Ott, H.M. Spurlin and M.W. Grafflin, eds.) p. 393, Interscience, New York (1954)
- Howsmon, J.A. and Sisson, W.A., in "Cellulose and Cellulose Derivatives" (E. Ott, H.M. Spurlin and M. Grafflin, eds.) p. 231, Interscience, New York (1954)
- Hulmes, D.J.S. and Miller, A., *Nature* **282**, 878 (1979)
- Iyer, P.B., Iyer, K.R.K. and Patil, N.B., *Textile Res. J.* **51**, 679 (1981)
- Johnson, D.J., *Advances in X-ray Analysis*, vol. 24, 25 (1981)
- Jones, D.W., *J. Polymer Sci.* **32**, 371 (1958)
- Jones, D.W., *J. Polymer Sci.* **42**, 173 (1960)
- Jones, D.W., in "Cellulose and Cellulose Derivatives" (N.M. Bikales and L. Segal, eds.) p. 117, Wiley Interscience, New York (1971)

- Kapsalis, J.G., in "Water Activity: Influences on Food Quality" (Rockland, L.B. and Stewart, G.F., Eds.) p. 143, Academic Press, New York (1981)
- Klug, H.P. and Alexander, L.E., "X-ray Diffraction Procedures for Polycrystalline and Amorphous Materials", Wiley-Interscience, New York (1974)
- Kuntz, I.D. and Kauzmann, W., *Advan. Protein Chem.* 28, 239 (1974)
- Küntzel, A. and Pranke, F., *Biochem. Z.* 267, 243 (1933)
- Langsford, J.I. and Wilson, A.J.C., in "Crystallography and Crystal Perfection" (G.N. Ramachandran, Ed.) p. 207, Academic Press, New York (1963)
- Langmuir, I., *J. Am. Chem. Soc.* 40, 1361 (1918)
- Lees, S., Pineri, M. and Escoubes, M., *Int. J. Biol. Macrom.* 6, 133 (1984)
- Legrand, C., *Acta Cryst.* 5, 800 (1952)
- Lehninger, A.L., "Biochemistry. The Molecular Basis of Cell Structure and Function", Worth Publisher, New York (1975)
- Lüscher, M., Giovanoli, R. and Hirter, P., *Chimia* 27, 112 (1973)
- Lüscher-Mattli, M. and Rüegg, M., *Biopolymers* 21, 403 (1982)
- Manley, R. St.J., *Nature* 204, 1155 (1964)
- Mann, J. and Marrison, H.J., *Trans. Faraday Soc.* 52, 481 (1956)
- Marchessault, R.H. and Sarko, A., *Advan. Carbohydr. Chem.* 22, 421 (1967)
- Mark, H., in "Cellulose and Cellulose Derivatives" (E. Ott, H.M. Spurlin and M.W. Grafflin, eds.) p. 217, Interscience, New York (1954)
- McLaren, A.D. and Rowen, J.W., *J. Polymer Sci.* 7, 289 (1951)

- Meyer, K.H. and Misch, L., *Helv. Chem. Acta* 20, 232 (1937)
- Miller, A., *New Scientist* 85, 470 (1980)
- Miller, A. and Wray, J., *Nature* 230, 437 (1971)
- Miller, R.L., "Cristallinity" in *Enc. of Polymer Science and Technology*, vol. 4 (H.F. Mark, N.G. Gaylord and N.M. Bikales, eds.) p. 449, Wiley Interscience, New York (1966)
- Morosoff, N. and Ingram, P., *Textile Res. J.* 40, 250 (1970)
- Morrison, J.L. and Dzieciuch, M.A., *Can. J. Chem.* 37, 1379 (1959)
- Morton, W.E. and Hearle, J.W.S., "Physical Properties of Textile Fibres", Textile Institute and Heinemann, London (1975)
- Mühlethaler, K., *J. Polymer Sci.* C28, 305 (1969)
- Nakamura, N., Hatakeyama, T. and Hatakeyama, H., *Textile Res. J.* 51, 607 (1981)
- Nakamura, N., Hatakeyama, T. and Hatakeyama, H., *Textile Res. J.* 53, 682 (1983)
- Neuber, E.E., in "Water Activity: Influences on Food Quality" (Rockland, L.B. and Stewart, G.F., eds.) p. 199, Academic Press, New York (1981)
- Nieduszynski, I. and Preston, R.D., *Nature* 225, 273 (1970)
- Nissan, A.H., Hunger, G.K. and Sternstein, S.S., "Cellulose", in *Enc. of Polymer Science and Technology*, vol. 3 (H.F. Mark, N.G. Gaylord and N.M. Bikales, eds.) p. 131, Wiley Interscience, New York (1966)
- Nomura, S., Hiltner, A., Lando, J.B. and Baer, E., *Biopolymers* 16, 231 (1977)
- Pauling, L., *J. Am. Chem. Soc.* 67, 555 (1945)
- Perepechko, I.I., "An Introduction to Polymer Physics", Mir

Publishers, Moscow (1981)

- Pineri, M.H., Escoubes, M. and Roche, G., *Biopolymers* 17, 2799 (1978)
- Ramachandran, G.N., in "Treatise on Collagen" (G.N. Ramachandran, ed.), vol. I, p. 103, Academic Press, New York (1967)
- Ramachandran, G.N. and Chandrasekharan, R., *Biopolymers* 6, 1649 (1968)
- Ramachandran, G.N. and Kartha, G., *Nature* 176, 593 (1955)
- Ramakrishnan, C. and Ramachandran, G.N., *Biophys. J.* 5, 909 (1965)
- Ray, P.K., *J. Appl. Polym. Sci.* 13, 2593 (1969)
- Ray, P.K., *Textile Res. J.* 41, 944 (1971)
- Rich, A. and Crick, F.H.C., *J. Molec. Biol.* 3, 483 (1961)
- Rougvie, M.A. and Bear, R.S., *J. Am. Leather Chem. Ass.* 48, 735 (1953)
- Ruland, W., *Acta Cryst.* 14, 1180 (1961)
- Sarko, A. and Marchessault, R.H., *J. Polymer Sci.* C28, 317 (1969)
- Segal, L., Creely, J.J. and Conrad, C.M., *Rev. Sci. Instrum.* 21, 431 (1950)
- Segal, L., Creely, J.J., Martin, A.E. and Conrad, C.M., *Textile Res. J.* 29, 786 (1959)
- Seitsonen, S. and Mikkonen, I., *J. Polym. Sci.* 10, 1743 (1972)
- Shenouda, S.G. and Viswanatham, A., *J. Appl. Polym. Sci.* 15, 2259 (1971)
- Sisson, W.A., *Ind. Eng. Chem.* 27, 51 (1935)
- Sisson, W.A. and Clark, G.L., *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.* 5, 296 (1933)
- Statton, W.O., *J. Polym. Sci.* C18, 33 (1967)

- Stryer, L., "Bioquímica", 2^a ed., Ed. Reverté, Barcelona (1982)
- Svendsen, K.H. and Koch, M.H.J., The EMBO Journal 1, 669 (1982)
- Thibodeaux, D.P. and Evans, J.P., Textile Res. J. 56, 130 (1986)
- Tomlin, S.G. and Worthington, C.R., Proc. Roy. Soc. (London) A235,
189 (1956)
- Traub, W. and Piez, K.A., Advan. Protein Chem. 25, 243 (1971)
- Tripp, V.W. and Conrad, C.M., in "Instrumental Analysis of Cotton
Cellulose and Modified Cotton Cellulose" (R.T. O'Connor, ed.)
p. 339, Marcel Dekker, New York (1972)
- Urquhart, A.R., J. Text. Inst. 20, 125T (1929)
- Urquhart, A.R. and Williams, A.M., J. Text. Inst. 15, 1385 (1924)
- Vainshtein, B.K., "Diffraction of X-Ray by Chain Molecules",
Elsevier, London (1966)
- Valentine, I., J. Polym. Sci. 27, 313 (1958)
- Wakelin, J.H., Virgin, H.S. and Crystal, E., J. Appl. Phys. 30,
1654 (1959)
- Walton, A.G. and Blackwell, J., "Biopolymers", Academic Press, New
York (1973)
- Ward, K., in "Cellulose and Cellulose Derivatives" (E. Ott, H.M.
Spurlin and M.W. Grafflin, eds.) p. 9; Interscience, New York
(1954)
- Wellard, H.J., J. Polymer Sci. 13, 471 (1954)
- Woodhead-Galloway, J., Acta Cryst. B33, 1212 (1977)