

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE FÍSICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA

PEDRO DE FREITAS FAÇANHA FILHO

ESTUDO DE ESPALHAMENTO RAMAN EM CRISTAIS DE L-LEUCINA
SUBMETIDOS A ALTAS TEMPERATURAS E A ALTAS PRESSÕES

FORTALEZA
AGOSTO DE 2007

PEDRO DE FREITAS FAÇANHA FILHO

**ESTUDO DE ESPALHAMENTO RAMAN EM CRISTAIS DE L-LEUCINA
SUBMETIDOS A ALTAS TEMPERATURAS E A ALTAS PRESSÕES**

Tese à coordenação do Curso de Pós-Graduação em Física, da
Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a
obtenção do grau de Doutor em Física.

Orientador: Prof. Dr. Paulo de Tarso Cavalcante Freire

FORTALEZA-CE

AGOSTO DE 2007

F123e Façanha Filho, Pedro de Freitas
Estudo de espalhamento Raman em cristais de L-leucina submetidos a altas temperaturas e altas pressões / Pedro de Freitas Façanha Filho – Fortaleza: [s.n.], 2007.
113f.:il

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Departamento de Física.
Orientador: Paulo de Tarso Cavalcante Freire

1. Espectroscopia Raman. 2. Cristais de Aminoácidos. 3. Pressão hidrostática. 4. Temperatura. 5. L-leucina.

CCD – 535.846

A minha querida filha Clarice.

*A Elenívia, minha esposa, pelo amor
e apoio incondicionais.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Paulo de Tarso Cavalcante Freire pela orientação dispensada a mim de forma tão dedicada e amigável. Pelas discussões, pela confiança e por estar sempre à disposição para o esclarecimento de dúvidas.

Ao Prof. Dr. Francisco Erivan de Abreu Melo pela confiança e por estar sempre disposto a ajudar a qualquer momento.

Ao Prof. Dr. Josué Mendes Filho pelas valiosas discussões, feitas com entusiasmo tal a nos incentivar a conhecer mais e mais.

Ao Prof. Dr. Antônio Gomes pelos esclarecimentos na parte teórica do trabalho.

Ao Prof. Dr. Alexandre Magno pelas discussões acerca das medidas Raman a altas temperaturas.

Aos colegas João José, Aparecida, Izabel, Wagner, Euzenil, Handrei, José Alves, Diniz, Hermínio, Ricardo e Gilberto.

Aos funcionários da secretaria Rejane, Ana Cleide e Creuza.

A minha esposa e filha Elenívia e Clarice por serem minha fonte de persistência.

A meus pais Pedro e Stela pela educação que me deram.

A minha irmã Jacyara pelo apoio constante.

Ao meu sogro e sogra Elenilson e Noenívia, sempre dispostos a ajudar.

Ao Padetec por ceder o espectrômetro para as medidas de absorção infravermelho.

Ao apoio financeiro da Funcap.

A Deus.

“O dia da linguagem universal há de chegar... Essa linguagem falará de alma para alma, resumindo todos os perfumes, sons, cores, ligando todo o pensamento.”

Arthur Rimbaud.

RESUMO

Neste trabalho foram realizadas medidas de espalhamento Raman polarizado à temperatura ambiente e medidas de absorção no infravermelho em cristais do aminoácido L-leucina com o objetivo de se determinar os modos normais de vibração do material. Para isto, utilizou-se auxiliariamente a classificação dos modos normais de vibração disponíveis para outros três aminoácidos protéicos alifáticos, a L-alanina, a L-valina e a L-isoleucina. Na segunda parte do trabalho estudou-se o comportamento dos modos normais de vibração do cristal de L-leucina no intervalo de temperatura 290 – 413 K. À temperatura ambiente a L-leucina cristaliza-se numa estrutura monoclinica C_2^2 com quatro moléculas por célula unitária. A análise dos modos normais do cristal naquele intervalo de temperatura revelou mudanças nas intensidades relativas de bandas relacionadas a modos internos, como aqueles por volta de 800 e 920 cm^{-1} , que fornecem indícios de uma transição de fase em 353 K. A confirmação da transição de fase estrutural se deu através da observação do desaparecimento do modo de rede em 110 cm^{-1} no mesmo valor de temperatura. Como sugestão para explicar esta mudança estrutural argumenta-se que durante a transição de fase o grupo pontual do cristal passa de C_2 para C_s , o que permitiria o entendimento do desaparecimento de modos LO existentes abaixo da temperatura de transição. Finalmente na terceira parte desta Tese, são apresentados estudos de espalhamento Raman com a pressão hidrostática no cristal de L-leucina. Verificou-se que o cristal de L-leucina sofre duas transições de fase estruturais entre 0 e 4.0 GPa. A primeira delas envolve unidades CH e CH_3 , bem como partes da molécula da L-leucina relacionadas às ligações de hidrogênio. Os resultados sugerem ainda que a transição 0 – 0,46 GPa leve o cristal de L-leucina para uma estrutura bastante diferente da estrutura original, uma vez que uma nova banda está surgindo numa região onde normalmente ocorrem, no máximo, desvios de frequências. Na segunda transição de fase, entre 0,80 e 1,46 GPa, observou-se o desaparecimento de modos da rede, surgimento de vários modos internos e separação de modos de alta energia. Novamente, sugere-se o envolvimento de unidades CH e CH_3 na transição de fase por causa da separação da banda na região de altas frequências, bem como se argumenta a favor do envolvimento de ligações de hidrogênio na mesma transição. A mudança de inclinação nas curvas $d\omega / dP$ para pressões acima de 4 GPa pode indicar uma possível terceira transição de fase.

Palavras chave: Espectroscopia Raman. Cristais de Aminoácidos. Pressão hidrostática. Temperatura. L-leucina.

ABSTRACT

In this work we performed polarized Raman scattering and infrared absorption measurements in L-leucine amino acid crystal at room temperature with the objective to determine the vibrational normal modes of the material. For this purpose, it was utilized the classification of vibrational modes available for three other aliphatic protein amino acids, L-alanine, L-valine and L-isoleucine. In the second part of the work we have studied the behavior of the vibrational modes of L-leucine crystal in the temperature range 290 – 413 K. At room temperature the L-leucine crystallizes in a monoclinic structure C_2^2 with four molecules per unit cell. The analysis of the behavior of normal modes in the same temperature range has revealed changes in the relative intensity of bands related to internal modes, like those observed around 800 and 920 cm^{-1} , giving indications of a structural phase transition undergone by L-leucine crystal at 353 K. The structural transition has been confirmed by the observation of vanishing of a lattice modes at 110 cm^{-1} in the same temperature value. As a suggestion to explain the structural change one argues that during the phase transition the point group of the crystal changes from C_2 to C_s , a fact that would allow the vanishing of LO modes below the transition temperature. Finally, in the third part of this Thesis, studies of Raman scattering of L-leucine crystal as function of pressure are presented. It was found that the L-leucine crystal exhibits two structural phase transition between 0 and 4.0 GPa. The first of them involves CH and CH_3 units, as well as parts of the L-leucine molecule related to hydrogen bonds. The results also suggest that the first transition 0-0.46 GPa changes the L-leucine crystal to a very different structure from the original, since a new band rises in a region where usually are observed only shifts of frequencies. In the second phase transition, between 0.80 and 1.46 GPa, it was observed (i) the vanishing of lattice modes, (ii) the rising of various internal modes and (iii) the shifting of high energy modes. Again, it is supposed that the units CH and CH_3 are involved as well as some hydrogen bonds. The change of slope $d\omega / dP$ for some peaks to pressures above 4 GPa can indicate the occurrence of a third phase transition for L-leucine crystal.

keywords: Raman spectroscopy. Amino acid crystals. Hydrostatic pressure. Temperature. L-leucine.

LISTA DE FIGURAS:

FIGURA 2.1 - Rede unidimensional monoatômica com seus átomos em movimento oscilatório longitudinal, como se fossem ligados por molas	5
FIGURA 2.2 - relação de dispersão de uma rede monoatômica. Para $k \ll \pi/a$, a frequência da rede se comporta de modo similar a uma onda sonora que se propaga num meio contínuo	6
FIGURA 2.3 - Exemplo de duas ondas transversais se propagando na rede monoatômica. As duas ondas descrevem equivalentemente o movimento dos átomos. Na primeira zona de Brillouin estão contidos todos os possíveis modos da rede	9
FIGURA 2.4 - Rede unidimensional monoatômica. A rede possui em sua célula unitária dois átomos de massas iguais a M_1 e M_2 . A constante de força entre cada átomo é considerada a mesma.	10
FIGURA 2.5 - Relação de dispersão de uma rede diatômica unidimensional. O ramo ótico aqui surge com característica bem diferente do ramo acústico, pois para $k = 0$, $\omega \neq 0$, diferentemente do ramo acústico que apresenta $\omega = 0$ para $k = 0$	12
FIGURA 2.6 - a) Os três modos acústicos de uma rede tridimensional monoatômica em uma direção. b) medida de difração de nêutrons num cristal de Al nas direções [100] e [110], sendo que na primeira os ramos TA's são degenerados. c) difração de nêutrons nas direções [100] e [111] num cristal de Ge (rede diatômica). Aqui os modos TO's surgem e são degenerados em ambas as direções, o mesmo ocorrendo aos modos TA's [2].....	15
FIGURA 2.7 - Modos normais de vibração das moléculas de CO e de água. A molécula de CO possui somente um <i>stretching</i> como modo normal, enquanto que a molécula de água possui três modos normais, um <i>stretching</i> simétrico, outro assimétrico e um <i>bending</i>	18
FIGURA 2.8 - Esquema representativo de absorção infravermelho por uma molécula diatômica. A frequência $\nu_3 = \nu_m$ da radiação é absorvida pela molécula	20
FIGURA 2.9 - Curvas de energia potencial e níveis de energia de uma molécula diatômica comparando os osciladores harmônico e anarmônico.	

Oscilador harmônico é representado por linha tracejada e o anarmônico por linha cheia	23
FIGURA 2.10 - Efeito Raman. a) interação da luz incidente (de energia $h\nu_0$) com a amostra e seu conseqüente espalhamento nas energias $h\nu_0-h\nu_m$, $h\nu_0$ e $h\nu_0+h\nu_m$. b) as três transições moleculares mais prováveis, provocadas por um fóton incidente, responsáveis pelos espalhamentos Rayleigh, Stokes e anti-Stokes. c) gráfico que mostra o valor da freqüência e a intensidade da radiação espalhada	26
FIGURA 2.11 - Efeito Raman sob ponto de vista clássico. A radiação incidente de freqüência ν_0 interage com a amostra. A radiação espalhada pela amostra é modulada pela vibração molecular. Decompondo-se a onda espalhada, as contribuições dos espalhamentos Rayleigh, Stokes e anti-Stokes são evidenciadas	30
FIGURA 2.12 - Forma molecular de um aminoácido de radical R qualquer.....	31
FIGURA 2.13 - Esquema mostrando as formas catiônica, <i>zwitterion</i> e aniônica dos aminoácidos quando expostos a soluções de PH ácido, neutro e alcalino, respectivamente.	32
FIGURA 2.14 - Os vinte aminoácidos que participam da síntese de proteína classificados segundo a polaridade de seus radicais: a) Aminoácidos hidrofóbicos b) Aminoácidos hidrofílicos;.....	33
FIGURA 2.14 - continuação. c) Aminoácidos ácidos d) Aminoácidos básicos	34
FIGURA 2.15 - Polimerização de dois aminoácidos promovendo a eliminação de água e formando a ligação peptídica $-\text{CO}-\text{NH}-$. O resultado é um dipeptídeo..	35
FIGURA 2.16 - As extremidades de uma cadeia peptídica são denominadas por resíduo termina N, por convenção localizado sempre à esquerda, e resíduo terminal C, à direita	36
FIGURA 2.17 - Estrutura primária da proteína lisozima. As pontes de dissulfeto são as principais responsáveis pela estabilidade da proteína	37
FIGURA 2.18 -Estruturas primárias das proteínas oxitocina e vasopressina. Apesar de possuírem estruturas muito parecidas, com a diferença de apenas dois aminoácidos em pontos equivalentes, as duas proteínas desempenham funções bem diversas no organismo	38

FIGURA 2.19 - Formação em hélice α . As ligações de hidrogênio ocorrem com espaçamento de quatro resíduos e são as principais responsáveis pela estabilidade da estrutura	40
FIGURA 2.20 - Formação em lâminas ou placas pregueadas. As cadeias polipeptídicas se estendem paralelamente formando ziguezague, onde em cada vértice se encontra um carbono α . As cadeias adjacentes estão unidas por ligação de hidrogênio e os radicais se alternam acima e abaixo das placas	41
FIGURA 2.21 - Estrutura secundária e terciária da mioglobina. Os aminoácidos hidrofóbicos se encontram no interior da estrutura e são os principais responsáveis pela estabilidade da mesma	42
FIGURA 2.22 - Estrutura quaternária da hemoglobina. Duas formações em cadeia α e duas em cadeia β fazem parte da estrutura. A estabilidade da estrutura se deve, principalmente, às interações hidrofóbicas das subunidades	42
FIGURA 2.23 - Replicação do DNA. Os filamentos se separam, sendo expostos ao mar de nucleotídeos e duas novas moléculas de DNA são criadas ...	44
FIGURA 3.1 - Cristal de L-leucina	45
FIGURA 3.2 - À esquerda, Prensa manual usada para compactar a mistura para a formação do disco. À direita, matriz usada na compactação da mistura, composta de três partes	46
FIGURA 3.3 - Espectrômetro Spectrum One usado nas medidas de absorção infravermelho. O disco de Kbr é preso ao acessório indicado pela seta	47
FIGURA 3.4 - Espectrômetro usado nas medidas Raman à temperatura ambiente	48
FIGURA 3.5 - Representação esquemática de uma célula de pressão a extremos de diamantes.....	50
FIGURA 3.6 - Representação esquemática do interior de uma célula de pressão a extremos de diamante e um corte lateral da gaxeta onde a amostra fica localizada durante os experimentos. Sobre e sob a gaxeta encontram-se os diamantes e dentro do orifício são colocados a amostra (tipicamente com 80 μm de espessura), o rubi e o meio compressor.....	50
FIGURA 4.1 - Célula unitária do cristal de L-leucina. As duas diferentes configurações da molécula A e B interagem através das LH. As LH são representadas por linhas tracejadas. Os átomos de nitrogênio são representados	

por esferas hachuradas enquanto os átomos de carbono por esferas brancas (os átomos de hidrogênio foram ocultados)	52
FIGURA 4.2 - Quatro células unitárias adjacentes do cristal de L-leucina no plano <i>ac</i>	52
FIGURA 4.3 - Desenho esquemático de uma ligação de hidrogênio, típica de um cristal de aminoácido	54
FIGURA 4.4 - Representação esquemática das LH presentes nas duas conformações da molécula de L-leucina. As distância apresentadas são <i>r</i> (N-O).....	56
FIGURA 4.5 - As duas diferentes conformações das moléculas de L-Leucina. a) Conformação <i>gauche 1</i> (A) mostrando os ângulos e distâncias intramoleculares. b) Conformação <i>trans</i> (B) com os respectivos ângulos e distâncias intramoleculares.....	57
FIGURA 4.6 - Espectros Raman do cristal de L-leucina a temperatura ambiente em duas diferentes geometrias de espalhamento na região 50-700 cm^{-1}	61
FIGURA 4.7 - Espectros comparativos dos cristais de aminoácido de L-leucina, L-valina e L-isoleucina em diversas representações na região 25-700 cm^{-1}	63
FIGURA 4.8 - Espectros Raman do cristal de L-leucina na região 700-1270 cm^{-1} a temperatura ambiente nas geometrias de espalhamento <i>z(yy)z</i> e <i>z(xx)x</i>	64
FIGURA 4.9 - Espectros comparativos dos cristais de aminoácido de L-leucina, L-valina e L-isoleucina em diversas representações na região 700-1270 cm^{-1}	66
FIGURA 4.10 - Espectros Raman do cristal de L-leucina na região 1280-1700 cm^{-1} a temperatura ambiente nas geometrias de espalhamento <i>z(yy)z</i> e <i>z(xx)x</i>	67
FIGURA 4.11 - Espectros comparativos dos cristais de aminoácido de L-leucina, L-valina e L-isoleucina em diversas representações na região 1280-1700 cm^{-1}	68
FIGURA 4.12 - Espectros Raman do cristal de L-leucina na região 2800-3100 cm^{-1} a temperatura ambiente nas geometrias de espalhamento <i>z(yy)z</i> e <i>z(xx)x</i>	69
FIGURA 4.13 - Espectros comparativos dos cristais de aminoácido de L-leucina, L-valina e L-isoleucina em diversas representações na região 1800-3100 cm^{-1}	71

FIGURA 4.14 - Espectro de absorção no infravermelho do cristal de L-leucina na região 400-4000 cm^{-1} à temperatura ambiente.	74
FIGURA 5.1 - Evolução dos espectros Raman com a temperatura do cristal de L-leucina na região 1800-3100 cm^{-1} para a geometria de espalhamento z(yy)z.	77
FIGURA 5.2 - Dependência da frequência em função da temperatura na região 1800-3100 cm^{-1} do cristal de L-leucina.	78
FIGURA 5.3 - Evolução dos espectros Raman do cristal de L-leucina com a temperatura na região de frequência 1285-1750 cm^{-1} para a geometria de espalhamento z(yy)z.	80
FIGURA 5.4 - Comportamento da frequência vs. temperatura do cristal de L-leucina na região espectral 1285-1750 cm^{-1} , para a geometria de espalhamento z(yy)z.	81
FIGURA 5.5 - Evolução dos espectros Raman com a temperatura do cristal de L-leucina para a geometria de espalhamento z(yy)z na região 700-1250 cm^{-1}	83
FIGURA 5.6 - Comportamento da frequência com a temperatura do cristal de L-leucina na região 700-1250 cm^{-1} para a geometria de espalhamento z(yy)z.	84
FIGURA 5.7 -Evolução dos espectros Raman com a temperatura do cristal de L-leucina na geometria de espalhamento z(yy)z na região de frequência 50-700 cm^{-1}	87
FIGURA 5.8 -Comportamento da frequência com a temperatura do cristal de L-leucina para a geometria de espalhamento z(yy)z na região de frequência 50-700 cm^{-1}	88
FIGURA 5.9 - Perfil do cristal de L-leucina no plano yz evidenciando a participação de fônons L.O. abaixo da temperatura de transição de fase (353 K) e fônons T.O. acima da mesma temperatura de transição	89
FIGURA 6.1 - Espectros Raman do cristal de L-leucina no intervalo de frequência entre 2750 e 3150 cm^{-1} para diversos valores de pressão (em GPa)	94
FIGURA 6.2 - Comportamento da frequência com a pressão para os modos de vibração do cristal de L-leucina na região entre 2820 e 3070 cm^{-1} . A frequência da nova banda que aparece no espectro Raman entre 0 e 0,46 GPa.	95
FIGURA 6.3 - Espectros Raman do cristal de L-leucina no intervalo de frequência entre 1370 e 1700 cm^{-1} para diversos valores de pressão (em GPa)	97
FIGURA 6.4 - Espectros Raman do cristal de L-leucina no intervalo de frequência entre 730 e 1280 cm^{-1} para diversos valores de pressão (em GPa)	100

FIGURA 6.5 - Comportamento da frequência com a pressão para os modos de vibração do cristal de L-leucina na região entre 740 e 1300 cm^{-1}	101
FIGURA 6.6 - Espectros Raman do cristal de L-leucina no intervalo de frequência entre 230 e 740 cm^{-1} para diversos valores de pressão (em GPa)	102
FIGURA 6.7 - Comportamento da frequência com a pressão para os modos de vibração do cristal de L-leucina na região entre 320 e 700 cm^{-1}	104
FIGURA 6.8 - Espectros Raman do cristal de L-leucina no intervalo de frequência entre 70 e 250 cm^{-1} para diversos valores de pressão (em GPa)	106

LISTA DE TABELAS:

TABELA 4.1 - Valores médios dos principais parâmetros envolvidos nas ligações de hidrogênio.	54
TABELA 4.2 - Distância das LH no cristal de L-leucina em Å.....	56
TABELA 4.3 - Coordenadas atômicas fracionárias das moléculas de L-leucina A e B.	58
TABELA 4.4 - Identificação dos modos normais do cristal de L-leucina nas geometrias de espalhamento $z(yy)z$ e $z(xx)z$ a temperatura ambiente (297 K).....	72

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

1. INTRODUÇÃO	1
2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	4
2.1. Estudo da vibração de uma rede cristalina	4
2.1.1 Introdução.....	4
2.1.2. Rede monoatômica unidimensional.....	4
2.1.3. Limite de grandes comprimentos de onda.....	6
2.1.4. Velocidade de fase e velocidade de grupo.....	7
2.1.5. A primeira zona de Brillouin	8
2.1.6. Rede diatômica unidimensional	9
2.1.7. A rede em três dimensões	13
2.2. Grupos de frequência	16
2.2.1. Modos normais de vibração.....	17
2.2.2. O papel do momento de dipolo na absorção infravermelho.....	19
2.2.3. Transições vibracionais e absorção no infravermelho.....	21
2.2.4. Efeito Raman	23
2.2.5. A polarizabilidade e a visão clássica do efeito Raman.....	27
2.3. Os Aminoácidos e As Proteínas.....	31
2.3.1. Aminoácidos e suas Propriedades	31
2.3.2. Proteínas e a ligação peptídica.....	35
2.3.3. Estrutura das proteínas.....	36
2.3.4. Síntese de proteína.....	43
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	45
3.1. Crescimento dos cristais de L-leucina	45
3.2. Medidas de absorção no infravermelho	46
3.3. Medidas de espalhamento Raman	47
4. PROPRIEDADES VIBRACIONAIS DO CRISTAL DE L-LEUCINA.....	51
4.1. Estrutura do cristal de L-leucina	51
4.1.1. Ligações de hidrogênio em cristais orgânicos.....	53
4.1.2. Configurações gauche 1 e trans no cristal de L-leucina	55

4.2. Modos normais de vibração do cristal de L-leucina (introdução)	59
4.2.1 Geometrias de Espalhamento	60
4.2.2 Região 50-700 cm^{-1}	60
4.2.3 Região 700-1270 cm^{-1}	64
4.2.4 Região 1280-1700 cm^{-1}	67
4.2.4 Região 2700-3100 cm^{-1}	69
4.3 Absorção infravermelho do cristal de L-leucina a temperatura ambiente	73
5 CRISTAIS DE L-LEUCINA SOB ALTAS TEMPERATURA.....	75
5.1 Introdução	75
5.2 Comportamento dos modos normais de vibração do cristal de L-leucina em função da temperatura.....	76
5.3 Região 1800-3100 cm^{-1}	76
5.4. Região 1280-1750 cm^{-1}	79
5.5. Região 700-1250 cm^{-1}	82
5.6 Região 50-700 cm^{-1}	85
6. Espalhamento Raman em cristais de L-leucina a altas pressões	90
6.1. Introdução	90
6.2. Resultados	92
7. Conclusões e perspectivas	107
REFERÊNCIAS	109

1 INTRODUÇÃO

Por serem as unidades básicas das proteínas os aminoácidos desempenham papel fundamental à existência dos organismos vivos. Além disso, os aminoácidos participam de um amplo leque de reações químicas do corpo humano e são vitais no ciclo de produção e transferência de energia e na atividade muscular. Como se não bastasse sua importância biológica os aminoácidos têm sido objeto de aplicações tecnológicas tais como na geração de segundo harmônico para laser. Para se ter uma idéia do seu papel nos organismos vivos, expomos abaixo as funções mais conhecidas de alguns dos vinte aminoácidos formadores de proteínas.

A cisteína, por exemplo, desempenha papel importante na estabilidade das proteínas através das ligações dissulfeto. Em proteínas do cabelo a disposição das ligações dissulfeto determina se o cabelo é encaracolado ou liso. O ácido glutâmico ou glutamato é um neurotransmissor excitatório do sistema nervoso. Cogita-se que tal aminoácido pode estar envolvido em funções cognitivas no cérebro como a aprendizagem e a memória. O excesso de glutamato no espaço extracelular (excitotoxicidade) ocorre em episódios de isquemia cerebral e apoplexia e está associada a doenças como a de Alzheimer. A arginina desempenha importante função na divisão celular, na cicatrização de feridas, na remoção de amônia no corpo, no sistema imunológico e na produção de hormônios. O ácido aspártico ou aspartato é um possível neurotransmissor excitatório no cérebro. É também um metabólito do ciclo da uréia e participa na glucogênese.

A leucina (objeto de nosso estudo) atua como fonte de energia durante exercícios físicos, aumentando a resistência e reduzindo a fadiga. Segundo pesquisas divulgadas pelo instituto nacional Francês de pesquisas agronômicas (INRA) a ingestão freqüente de alimentos ricos em leucina contribui para a redução da perda de massa muscular durante a velhice; sendo os derivados do leite ricos em leucina.

A espectroscopia Raman tem se mostrado uma técnica bastante eficiente no estudo do comportamento dos modos normais de vibração dos cristais de aminoácido submetidos a agentes externos, tais como temperatura e pressão. Nesses cristais as ligações de hidrogênio (ou pontes de hidrogênio) desempenha função de grande importância em sua estabilidade. A técnica é capaz de detectar mudanças mínimas nas distâncias das ligações de hidrogênio.

Motivados pelas interessantes propriedades que os aminoácidos têm mostrado em trabalhos anteriores, bem como pela ausência de estudos de espectroscopia vibracional sobre

o cristal de L-leucina, expomos nesse trabalho a classificação dos modos normais de vibração desse cristal baseada na classificação de aminoácidos também de cadeia alifática já estudados. O comportamento dos modos normais também é analisado sob influência da temperatura. Abaixo segue um apanhado do que trata cada capítulo desta Tese.

O capítulo 2 foi dividido em três partes: a primeira trata da teoria clássica de vibração de uma rede monoatômica e diatômica unidimensional. A relação de dispersão é analisada e em seguida extrapolada ao caso tridimensional. Na segunda parte, a teoria das técnicas de absorção no infravermelho e espalhamento Raman é exposta. Finalmente, noções sobre a importância dos aminoácidos na formação das proteínas são apresentadas, assim como também um breve relato acerca da síntese de proteínas é feito.

Ao capítulo 3 foi reservado o procedimento experimental: descrição da técnica empregada no crescimento dos cristais; descrição dos equipamentos de absorção no infravermelho e espalhamento Raman, bem como o equipamento para a realização das medidas de espalhamento de luz a altas pressões.

O capítulo 4 trata primeiramente da parte estrutural do cristal de L-leucina e de algumas informações sobre a natureza das ligações de hidrogênio. Estas ligações, como será visto ao longo da discussão, são fundamentais para a estabilidade de diversas estruturas cristalinas, em particular, dos cristais de aminoácidos. Em seguida é feita a classificação dos modos normais do cristal de L-leucina a partir dos espectros Raman em duas diferentes geometrias de espalhamento a temperatura ambiente. Para esta identificação são utilizados como auxílio os dados das identificações dos modos normais de vibração de outros cristais de aminoácidos, principalmente da L-valina e da L-isoleucina, que são dois aminoácidos alifáticos com muitas semelhanças com a molécula que será investigada nesta Tese.

O capítulo 5 é destinado ao comportamento dos modos normais do cristal de L-leucina sob variação de temperatura (297-413 K). A temperatura tem sido, durante muito tempo, o parâmetro termodinâmico mais utilizado na investigação do comportamento dos modos normais de vibração de materiais cristalinos, principalmente pelo fato de, do ponto de vista experimental, ser o mais fácil de ser aplicado e também de ser medido. Nesta Tese esteve-se particularmente interessado no comportamento dos modos de vibração da L-leucina para a região de altas temperaturas, ou seja, temperaturas acima da ambiente. O desaparecimento de um modo na região dos modos de rede sugere transição de fase estrutural por volta da temperatura de 353 K. Uma possível explicação para esta mudança estrutural é fornecida.

No capítulo 6 são apresentados os resultados de espalhamento Raman em cristais de L-leucina no intervalo de pressão 0-5,40 GPa para todas as regiões espectrais onde ocorrem modos de vibração ativos no Raman. A pressão é um parâmetro termodinâmico que nos últimos anos tem sido mais sistematicamente utilizado em diversos laboratórios de todo o mundo. Quando comparado à temperatura, o estudo dos materiais submetidos à pressão é mais complicado do ponto de vista experimental, dada a delicadeza do instrumental utilizado. Da análise cuidadosa dos resultados obtidos nesta Tese, relacionados aos modos normais de vibração de um cristal de L-leucina, foi possível inferir-se que o mesmo sofre duas transições de fase estruturais. O estudo da inclinação $d\omega / dP$ indica a possibilidade de haver uma terceira transição, apesar do comportamento dos modos normais de rede não indicarem tal fato.

Finalmente, no capítulo 7, são fornecidas as principais conclusões e as perspectivas de trabalhos futuros.

2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1 Estudo das vibrações de uma rede cristalina

2.1.1 Introdução

O estudo do comportamento vibracional de um material, seja cristalino ou amorfo, é de fundamental importância para o entendimento de suas propriedades físicas. O cristal, por possuir átomos (ou moléculas) posicionados de forma periódica, dá como resposta, comportamentos vibracionais que podem ser previstos e entendidos com grande precisão. Um estudo do comportamento vibracional é feito considerando-se primeiramente uma rede unidimensional monoatômica, a seguir uma rede unidimensional diatômica e finalmente uma rede tridimensional. Discute-se também o porquê de se utilizar a radiação eletromagnética para a investigação do comportamento vibracional dos átomos numa rede cristalina. Finalmente, discute-se sobre as propriedades dos aminoácidos e sua importância na composição das proteínas.

2.1.2 Rede monoatômica unidimensional

Para se ter uma idéia do comportamento vibracional de uma rede cristalina, considera-se inicialmente o caso de uma rede monoatômica unidimensional, que, apesar da aparente simplificação em relação ao cristal tridimensional, tal condição, como será visto, se aproxima da realidade devido à simetria do cristal. Nesse modelo os átomos se distribuem ordenadamente sobre uma linha, e a distância entre os mesmos, quando na posição de equilíbrio, é dada por a (parâmetro de rede), Figura 2.1. Aqui, cada átomo tem influência nos átomos vizinhos, de modo que toda a rede permanece em constante movimento. Na condição de que o deslocamento de cada átomo seja muito menor do que o parâmetro de rede, a força atuante em cada átomo terá a forma daquela prevista pela lei de Hooke, como se os átomos fossem esferas interligadas por molas de mesma constante elástica. Fixando-se a atenção sobre o n -ésimo átomo da rede e considerando que somente seus vizinhos $n - 1$ e $n + 1$ contribuem para o cômputo da força resultante sobre o mesmo e que, portanto, a contribuição

dos demais é desprezada¹, parte-se para o uso da terceira lei de Newton com o intuito de se conhecer a equação de movimento do átomo. Sendo u_n o deslocamento instantâneo do n -ésimo átomo e u_{n-1} e u_{n+1} os deslocamentos dos seus vizinhos, pode-se escrever

$$M \frac{d^2 u_n}{dt^2} = K(u_{n+1} - u_n) + K(u_{n-1} - u_n) = -K(2u_n - u_{n+1} - u_{n-1}) \quad (2.1)$$

onde, M é a massa do átomo e K é a constante de força que há entre os átomos. A equação acima mostra que o n -ésimo átomo está acoplado àqueles de números $n - 1$ e $n + 1$. Similarmente, o mesmo pode ser feito para cada átomo da rede de forma a se obter uma equação similar. O resultado será N equações diferenciais que serão resolvidas simultaneamente, onde N é o número de átomos na rede.

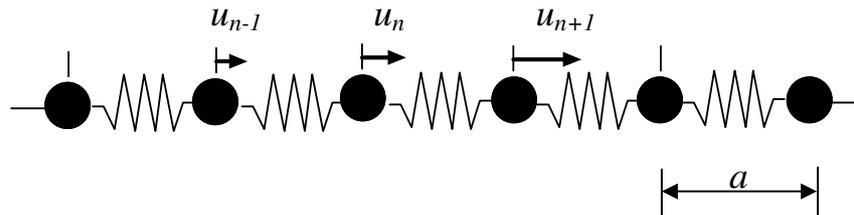


FIGURA 2.1 - Rede unidimensional monoatômica com seus átomos em movimento oscilatório longitudinal, como se fossem ligados por molas.

Uma possível solução para a equação (2.1) é

$$u_n = A e^{i(kX_n - \omega t)} \quad (2.2)$$

onde, $X_n = na$ é a posição de equilíbrio do n -ésimo átomo. Essa equação representa uma onda que se propaga pela rede de forma que os átomos oscilam com mesma frequência ω e mesma amplitude A e a diferença de fase entre cada átomo é de ka .

Substituindo (2.2) em (2.1), chega-se a

¹ Considerando uma energia potencial, entre dois átomos, do tipo $U_{ij} = \pm q^2/4\pi\epsilon_0 r_{ij} + A/r_{ij}^b$, onde a primeira contribuição é de origem Coulombiana e a segunda descreve a energia potencial repulsiva, em que o termo b é muito maior do que um, se a constante de força entre o átomo n e seus dois primeiros vizinhos é K , quando se considera a contribuição dos dois segundos vizinhos sobre o mesmo átomo n , o valor de K é vinte vezes menor que o anterior [1].

$$M(-\omega^2)e^{ikna} = -K \left[(2e^{ikna} - e^{ik(n+1)a} - e^{ik(n-1)a}) \right]. \quad (2.3)$$

Usando a fórmula de Euler $\frac{e^{iy} + e^{-iy}}{2} = \cos y$ e fazendo manipulações matemáticas, obtêm-se

$$\omega = \omega_m \left| \text{sen} \left(\frac{ka}{2} \right) \right|. \quad (2.4)$$

onde $\omega_m = (4K/M)^{1/2}$, tomando-se somente ω positivo. A equação (2.4) representa a relação de dispersão para a rede monoatômica unidimensional. A Figura 2.2 mostra o gráfico $\omega \times k$, cujo período é $2\pi/a$. A análise de (2.4) revela interessantes resultados, que serão abordados em seguida.

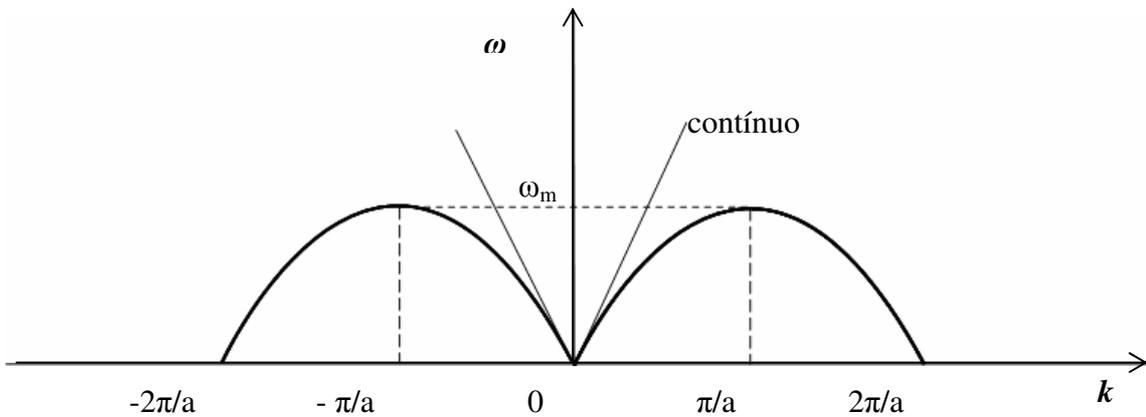


Figura 2.2 - Relação de dispersão de uma rede monoatômica. Para $k \ll \pi/a$, a frequência da rede se comporta de modo similar a uma onda sonora que se propaga num meio contínuo.

2.1.3 Limite de grandes comprimentos de onda

Como a curva de dispersão é periódica e simétrica, a análise da região $0 < k < \pi/a$ é suficiente para se obter os resultados desejados a respeito das propriedades do sistema. Pelo gráfico da Figura 2.2, a rede funciona como um filtro mecânico passa-baixo, pois os valores

das frequências são limitados à faixa $0 < \omega < \omega_m$ e valores maiores do que ω_m são fortemente atenuados.

No limite de grandes comprimentos de onda, ou seja, quando $k \rightarrow 0$, tem-se $\text{sen} \frac{ka}{2} \sim \frac{ka}{2}$ e, portanto a relação de dispersão se reduz a

$$\omega = \left(\frac{\omega_m a}{2} \right) k \quad (2.5)$$

que é uma relação linear entre ω e k , similar à relação de dispersão de uma onda sonora que se propaga num meio contínuo².

Por outro lado, quando k cresce, a curva sofre um desvio e satura quando $k = \pi / a$, com a frequência chegando ao seu valor máximo ω_m .

Qualitativamente, o comportamento da rede pode ser entendido do seguinte modo: para k pequeno, $\lambda \gg a$, onde os átomos se movem em fase ($u_{n+1}/u_n = e^{ika} = 1$), a força restauradora atuando em cada átomo é pequena e, portanto, a frequência da rede também é pequena. Se $k = 0$, $\lambda \rightarrow \infty$, toda a rede estaria se movendo como um corpo rígido e a força restauradora seria zero. Por outro lado, quando $k = \pi / a$, os átomos estão fora de fase ($u_{n+1}/u_n = e^{ika} = -1$) e tanto a frequência como a força restauradora chegam ao valor máximo.

2.1.4 Velocidade de fase e velocidade de grupo

A energia e o momento são transmitidos através da rede muito mais por pulsos de onda do que por ondas individuais que estão contidas nos pulsos, por isso a importância em diferenciar velocidade de fase e velocidade de grupo. A primeira diz respeito à velocidade de uma onda individual com frequência ω e vetor de onda \mathbf{k} , enquanto a segunda, descreve a velocidade de um pulso de onda cuja frequência e vetor de onda médios são dependentes de ω e de k . As velocidades de fase e de grupo são dadas, respectivamente, por (2.6) e (2.7)

² Pode-se estimar o valor da constante de força K comparando-se (2.5) com a relação de dispersão de uma onda sonora que se propaga num meio contínuo $\omega = (Y/\rho)^{1/2} K$, onde Y é o módulo de Young e ρ a densidade volumétrica. Do exposto e lembrando que $\omega_m = (4K/M)^{1/2}$, chega-se a $K = aY$. Usando valores típicos de a e Y chega-se a $K = 5 \times 10^3$ dinas/cm. Conhecendo-se K e M , pode-se também estimar ω_m , que, usando o K encontrado e a massa do hidrogênio, para se ter uma idéia da ordem de grandeza da frequência, chega-se a $\omega_m = 2 \times 10^{13} \text{ s}^{-1}$, que se localiza na região do infravermelho.

$$v_p = \frac{\omega}{k} \quad (2.6)$$

$$v_g = \frac{\partial \omega}{\partial k} \quad (2.7)$$

No limite de grandes comprimentos de onda $\omega = v_p k$, e então $v_p = v_g$. No entanto, quando k cresce, como mostra a Figura 2.2, v_g tende a decrescer até ao ponto de zerar quando $k = \pi / a$. Tal fato se deve ao aumento no espalhamento da onda pelos átomos da rede, onde as ondas espalhadas por cada átomo estão em fase entre si e fora de fase em π com relação à onda incidente. Portanto, nesta região ($k = \pi / a$) uma onda estacionária é formada. Tal situação é similar à condição de Bragg, só que aplicada aqui às ondas elásticas. Vê-se então que a condição de Bragg é uma característica geral de uma rede periódica, não importando a natureza do campo, se eletromagnético ou acústico [2].

2.1.5 A primeira zona de Brillouin

Como já mencionado, a relação de dispersão (2.4) possui período igual a $2\pi / a$ bem como simetria em torno de $k = 0$ e, portanto, deve-se ter $\omega(k') = \omega(k + n(2\pi / a))$. Um ponto importante a ser ressaltado é que, qualquer onda com $k > \pi / a$ pode corresponder a ondas contidas na região $0 < k < \pi/a$. Pegando como exemplo ondas transversais que possuem números de onda iguais a $k = \pi / 2a$ e $k' = k + 2\pi / a = 5\pi / 2a$, de comprimentos de onda correspondentes a $\lambda = 4a$ e $\lambda' = 4a/5$, como mostra a Figura 2.3, vê-se que, tanto uma onda como a outra descrevem de formas equivalentes o movimento dos átomos. Escolhendo-se a região $-\pi/a < k < \pi/a$, tanto a condição de simetria é satisfeita como tal região corresponde exatamente à primeira zona de Brillouin. Portanto, toda a atenção pode ser confinada à primeira zona de Brillouin.

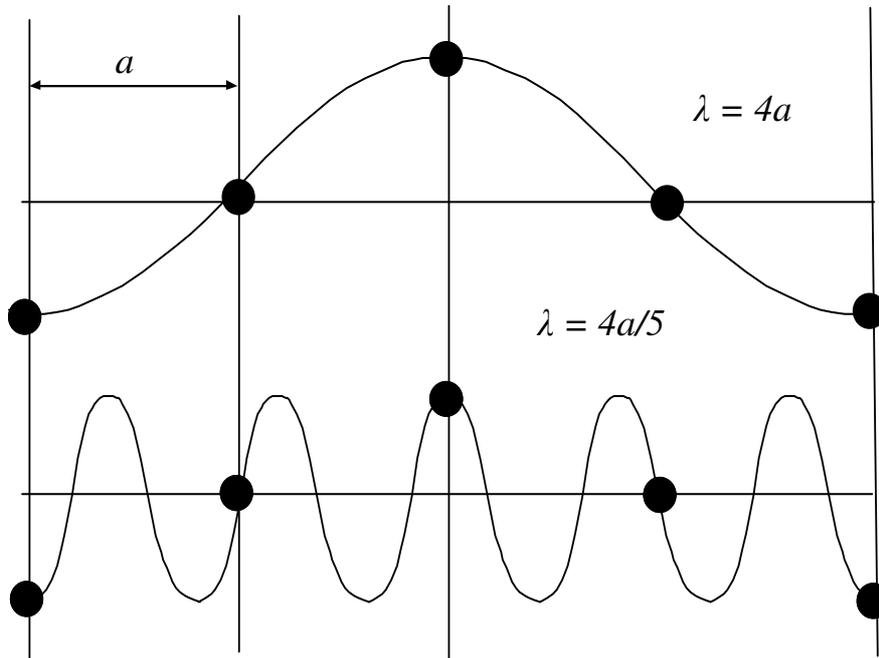


FIGURA 2.3 - Exemplo de duas ondas transversais se propagando na rede monoatômica. As duas ondas descrevem equivalentemente o movimento dos átomos. Na primeira zona de Brillouin estão contidos todos os possíveis modos da rede.

2.1.6 Rede diatômica unidimensional

Outra consideração que produz importantes resultados de natureza vibracional é a rede diatômica unidimensional. A Figura 2.4 mostra uma rede unidimensional em que a célula unitária possui dois átomos de massas M_1 e M_2 e a distância entre dois átomos vizinhos é a . O movimento dos átomos aqui será tratado de maneira similar ao caso da rede monoatômica, somente a interação dos dois átomos vizinhos, sobre cada átomo, é considerada. A constante de força é tomada como sendo a mesma entre cada ligação. Como há dois átomos diferentes, serão necessárias duas equações de movimento para os átomos localizados nas posições $2n + 1$ e $2n + 2$, de modo a se obter

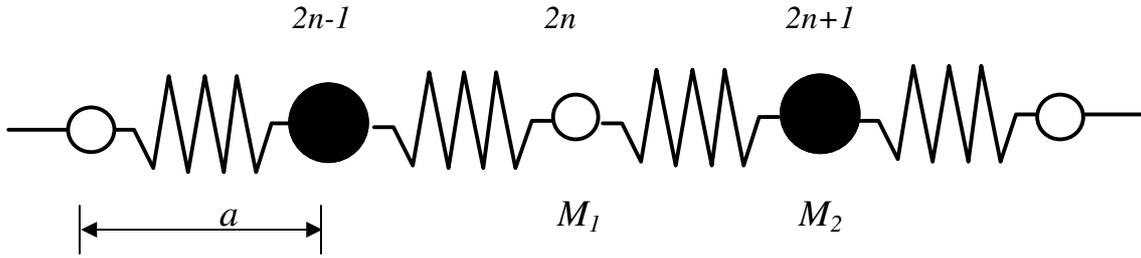


FIGURA 2.4 - Rede unidimensional monoatômica. A rede possui em sua célula unitária dois átomos de massas iguais a M_1 e M_2 . A constante de força entre cada átomo é considerada a mesma.

$$M_2 \frac{d^2 u_{2n+1}}{dt^2} = -K(2u_{2n+1} - u_{2n} - u_{2n+2})$$

$$M_1 \frac{d^2 u_{2n+2}}{dt^2} = -K(2u_{2n+2} - u_{2n+1} - u_{2n+3})$$
(2.8)

onde os índices pares e ímpares nos deslocamentos são associados, respectivamente, aos deslocamentos dos átomos de massa M_1 e M_2 . No total, $2N$ equações como (2.8) precisam ser resolvidas simultaneamente. N é o número de células unitárias da rede. Uma solução para (2.8) é

$$\begin{bmatrix} u_{2n+1} \\ u_{2n+2} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_1 e^{ikX_{2n+1}} \\ A_2 e^{ikX_{2n+2}} \end{bmatrix} e^{i\omega t}.$$
(2.9)

Substituindo (2.9) em (2.8) e fazendo as devidas simplificações chega-se a

$$\begin{bmatrix} 2K - M_1 \omega^2 & -2K \cos(ka) \\ -2K \cos(ka) & 2K - M_2 \omega^2 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} A_1 \\ A_2 \end{bmatrix} = 0$$
(2.10)

para uma solução não trivial, o determinante da matriz acima deve ser zero. A *equação secular* fica então

$$\begin{bmatrix} 2K - M_1 \omega^2 & -2K \cos(ka) \\ -2K \cos(ka) & 2K - M_2 \omega^2 \end{bmatrix} = 0. \quad (2.11)$$

a solução de (2.11) produz duas raízes com a forma

$$\omega^2 = K \left(\frac{1}{M_1} + \frac{1}{M_2} \right) \pm K \sqrt{\left(\frac{1}{M_1} + \frac{1}{M_2} \right)^2 - \frac{4 \operatorname{sen}^2(ka)}{M_1 M_2}}. \quad (2.12)$$

Os sinais em (2.12) revelam a existência de duas relações de dispersão, e, portanto, duas curvas de dispersão ou dois ramos são associados à rede diatômica.

As curvas são mostradas na Figura 2.5. A curva na parte inferior do gráfico (que corresponde ao sinal negativo) é conhecida como *ramo acústico* e revela comportamento similar àquele apresentado no caso da rede monoatômica. Nas proximidades de $k = 0$ a curva se aproxima de uma reta e com o crescimento de k , se desvia da reta e satura em $k = \pi/2a$ (a célula unitária tem parâmetro de $2a$) que corresponde à frequência $(2K/M_2)^{1/2}$, onde se considerou $M_1 < M_2$.

A curva na parte superior, conhecida como *ramo ótico*, possui comportamento bem diferente daquele do ramo acústico quando $k = 0$. A frequência nesse ponto é

$$\omega = \left[2K \left(\frac{1}{M_1} + \frac{1}{M_2} \right) \right]^{1/2}, \quad (2.13)$$

e decresce lentamente até saturar em $k = \pi/2a$ com frequência $(2K/M_1)^{1/2}$. O valor da frequência no intervalo $0 < k < \pi/2a$, permanece praticamente constante. A Figura 2.4 também mostra que frequências contidas entre os ramos acústico e ótico são proibidas e, portanto, ondas com frequências nessa região são fortemente atenuadas. Tais frequências são chamadas *frequências de gap*.

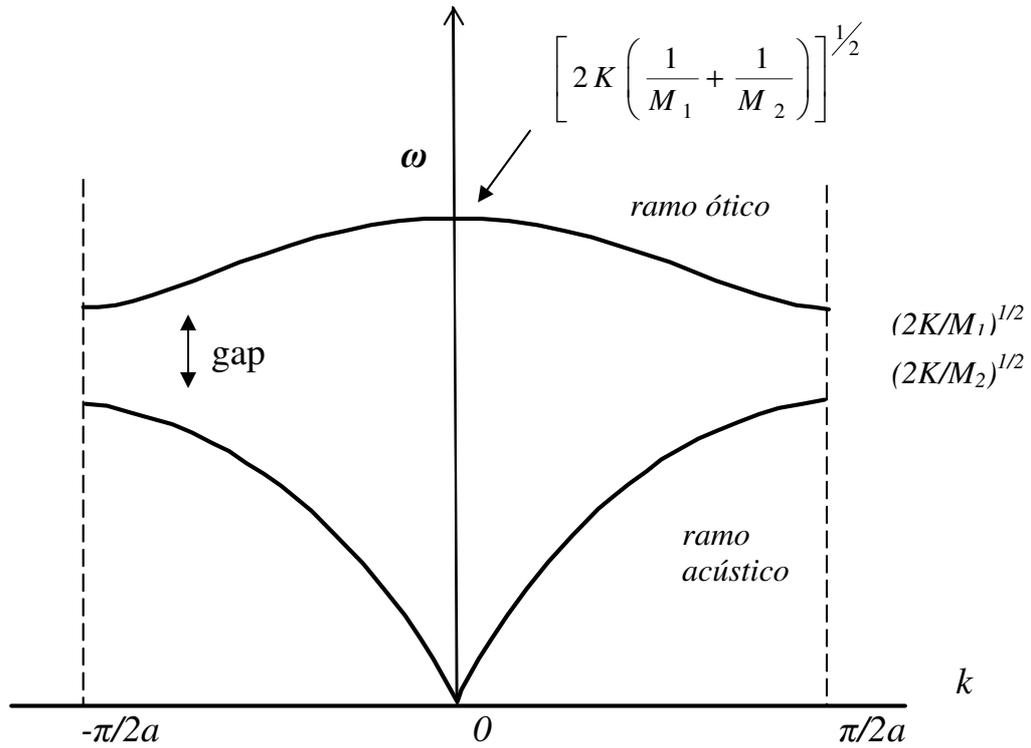


FIGURA 2.5 - Relação de dispersão de uma rede diatômica unidimensional. O ramo ótico aqui surge com característica bem diferente do ramo acústico, pois para $k = 0$, $\omega \neq 0$, diferentemente do ramo acústico que apresenta $\omega = 0$ para $k = 0$.

Para se distinguir a dinâmica de rede traduzida pelos ramos acústico e ótico, o conhecimento da razão de amplitude A_2/A_1 obtido por (2.10), quando $k = 0$ e $k = \pi/2a$, se torna valioso. Após manipulações matemáticas, a razão de amplitude para os dois ramos fica

$$\frac{A_1}{A_2} = \frac{1 - \frac{M_2}{M_1} \mp \left[\left(\frac{M_1 + M_2}{M_1} \right)^2 - 4 \frac{M_2}{M_1} \text{sen}^2(ka) \right]^{1/2}}{2 \cos(ka)}, \quad (2.14)$$

onde o sinal negativo superior representa o ramo ótico e o positivo inferior o acústico.

Investigando primeiramente o ramo acústico, quando $k = 0$, $A_2/A_1 = 1$. Significando que os átomos estão todos em fase, possuindo mesma amplitude. A rede oscila

como se fosse um corpo rígido com centro de massa oscilando em torno do equilíbrio. Com o crescimento de k , a relação entre as amplitudes praticamente não sofre modificação e os átomos permanecem em fase.

O valor de frequência para o ramo ótico quando $k = 0$ é dado por (2.13), que, substituído em (2.14) produz a relação

$$M_1 A_1 + M_2 A_2 = 0. \quad (2.15)$$

Pela equação acima, os dois átomos da célula unitária estão fora de fase, pois seus centros de massa permanecem fixos durante a oscilação dos átomos. Os átomos possuem diferença de fase igual a π um em relação ao outro, com razão de amplitude de $A_1/A_2 = -M_2/M_1$. Com o crescimento de k até o valor $\pi/2a$, a frequência decresce muito pouco em relação à (2.13), pois os átomos continuam fora de fase.

2.1.7. A rede em três dimensões

Até aqui, somente ondas longitudinais foram consideradas. No entanto, todos os resultados obtidos para as ondas longitudinais são equivalentes para as ondas transversais, tendo como único diferencial o valor da constante de força, que geralmente para ondas transversais é menor. A simetria da rede propicia a possibilidade de generalização dos resultados obtidos de uma rede unidimensional para uma tridimensional. Uma análise qualitativa e superficial será feita aqui.

Considera-se, por simplicidade, uma rede monoatômica tridimensional. Todas as considerações feitas anteriormente para a rede unidimensional são aplicadas para a rede tridimensional, de modo que a equação de movimento de cada átomo pode ser escrita como

$$\mathbf{u}_n = \mathbf{A} e^{i(\mathbf{k} \cdot \mathbf{r} - \omega t)} \quad (2.16)$$

onde o vetor de onda \mathbf{k} especifica o comprimento de onda e a direção de propagação da onda. O vetor \mathbf{A} além de especificar a amplitude de oscilação dos átomos, também informa a direção de vibração dos mesmos, indicando, portanto, se a onda é longitudinal ou transversal

(\mathbf{A} se decompõe em suas três componentes A_x , A_y , A_z). Se \mathbf{A} é paralelo à \mathbf{k} , a onda é longitudinal, se é perpendicular, a onda é transversal.

Realizando o mesmo procedimento já usado para a rede unidimensional, encontra-se uma expressão para a relação de dispersão análoga à (2.11), sendo cúbica em ω^2 . O resultado é mostrado na Figura 2.6a, onde três ramos acústicos se apresentam, como esperado, já que se trata de uma rede monoatômica. Dos três ramos, dois são oriundos de ondas transversais e um de ondas longitudinais. Não necessariamente, as relações de dispersão são isotrópicas no espaço \mathbf{k} , ou seja, para uma determinada direção da rede, modos transversais podem não ter o mesmo valor. Para o caso do Al, como mostra a Figura 2.6b, duas direções são consideradas [100] e [110], onde a primeira, por possuir maior simetria em relação à segunda, apresenta suas duas curvas TA (*transverse acoustic*) exatamente iguais, ditas degeneradas. O ramo acústico longitudinal é representado por LA (*longitudinal acoustic*).

Quando uma rede diatômica tridimensional é considerada, modos óticos surgem, de forma análoga ao da rede unidimensional. A Figura 2.6.c mostra as relações de dispersão para duas diferentes direções, [100] e [111], do cristal de Ge, que possui dois átomos por célula unitária. Nota-se a presença dos ramos acústicos LA (*longitudinal acoustic*) e óticos TO (*transverse optics*). Nesse caso, deve haver seis ramos a se considerar: um LA e dois TA e um LO e dois TO. Nas duas direções, os dois ramos TA e TO são degenerados. Nos dois exemplos acima, difração de nêutrons foi usada.

A técnica de espalhamento Raman, que será discutida na próxima seção, também pode ser usada com sucesso para se conhecer os modos vibracionais de um cristal próximo ao centro da zona de Brillouin. Quando se incide luz monocromática polarizada sobre um cristal, a mesma é espalhada inelasticamente, trazendo informações acerca da magnitude da frequência dos modos da rede. O fato de a luz ser polarizada propicia também o conhecimento do modo ter origem longitudinal ou transversal. Outra técnica que também pode ser usada para se conhecer as frequências de uma rede cristalina é a absorção no infravermelho, que também será discutida na próxima seção. As referências [1-5] foram usadas como base para o assunto discutido na presente seção.

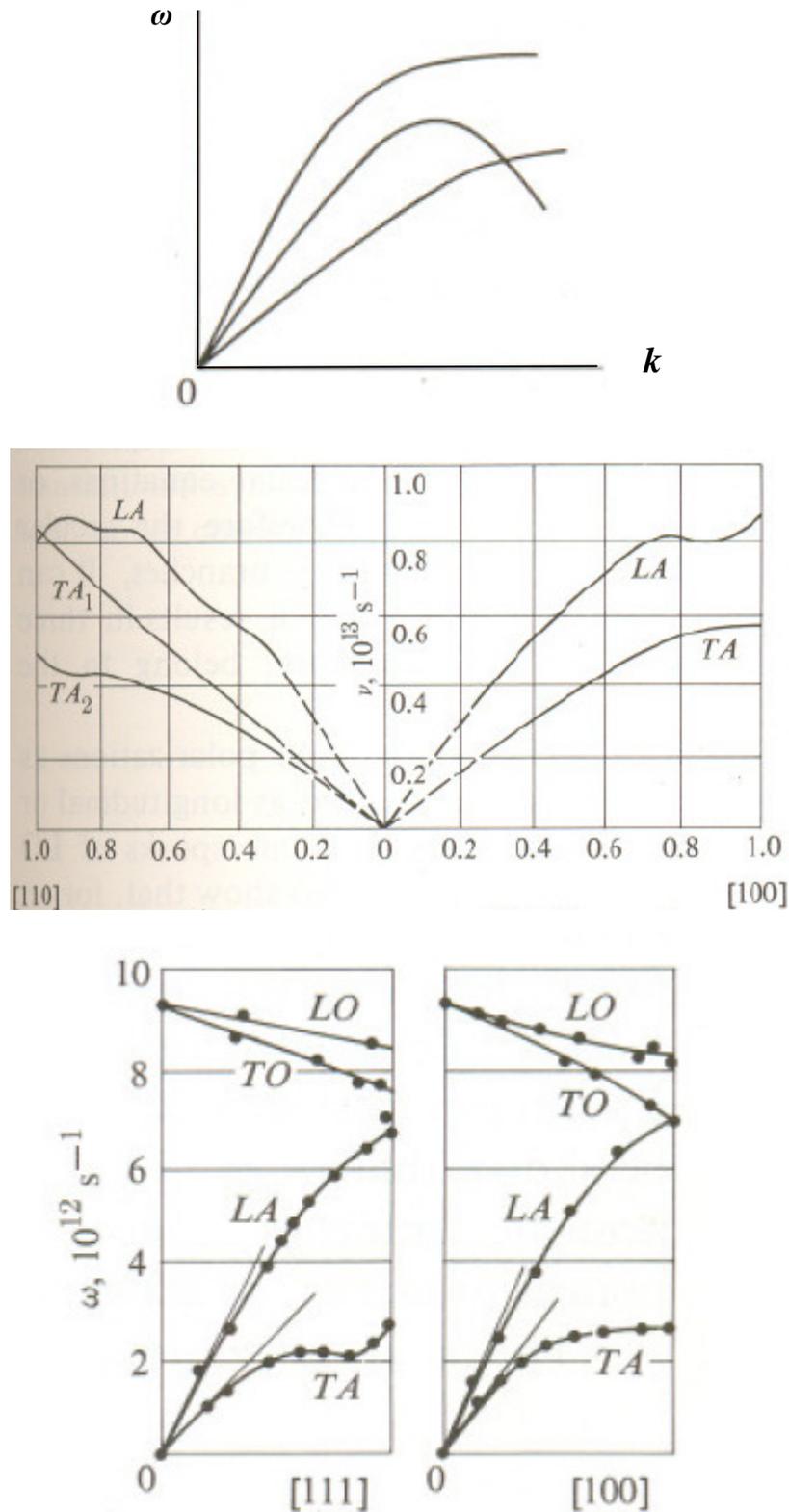


FIGURA 2.6 - a) Os três modos acústicos de uma rede tridimensional monoatômica em uma direção. b) medida de difração de nêutrons num cristal de Al nas direções $[100]$ e $[110]$, sendo que na primeira os ramos TA's são degenerados. c) difração de nêutrons nas direções $[100]$ e $[111]$ num cristal de Ge (rede diatômica). Aqui os modos TO's surgem e são degenerados em ambas as direções, o mesmo ocorrendo aos modos TA's [2].

2.2 Grupos de frequência

No modelo clássico para a molécula diatômica, que oscila harmonicamente, a frequência de vibração molecular é dada por,

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{K}{\mu}} \quad (2.17)$$

onde K é a constante de força associada à molécula e $\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}$, e μ é a massa reduzida, sendo m_1 e m_2 as massas dos átomos envolvidos. A equação acima exprime o único modo normal de vibração para uma molécula diatômica. *Em cada modo normal de vibração todos os átomos na molécula vibram com a mesma frequência e todos os átomos passam simultaneamente por suas posições de equilíbrio.* À medida que as moléculas se tornam mais complexas a dificuldade matemática para se calcular seus modos normais cresce enormemente. Empiricamente, para muitas moléculas complexas, alguns valores de frequências associadas aos modos normais são determinados devido aos conhecidos *grupos de frequência*. Esses grupos possuem frequências características que variam muito pouco de molécula para molécula. Como exemplo de grupos de frequência pode-se citar: C=O, C-O, O-H, N-H, C-H, etc.[6-10]. Portanto, apesar de sua complexidade, se uma molécula possui um ou mais desses grupos em sua estrutura, as frequências associadas a tais grupos poderão ser detectadas com variações muito pequenas em relação a outras moléculas que contenham os mesmos grupos de frequência. A equação (2.17) pode ser usada para calcular aproximadamente as frequências dos grupos de frequência em uma molécula complexa [11]. No estudo dos modos normais de vibração de um cristal de aminoácido, por exemplo, através da teoria de grupos é possível se conhecer o número de modos, embora suas classificações (*stretching, bending, rocking, wagging, etc.*) exijam mais cálculos ou um estudo com material deuterado. Os grupos de frequência podem ajudar a relacionar as frequências, obtidas por (2.17), bem como auxiliar na classificação dos modos normais de vibração. O conhecimento do número de modos normais de vibração de uma molécula é vital para a interpretação dos dados experimentais obtidos através das técnicas de espectroscopia Raman e infravermelho. Será então discutida a determinação do número de modos normais de vibração das moléculas.

2.2.1 Modos normais de vibração

Para uma molécula com N átomos, tendo cada átomo três coordenadas espaciais x , y e z independentes para localizá-los com o passar do tempo, o número de graus de liberdade que descreve o posicionamento de cada átomo é igual a $3N$. Sendo a molécula confinada, por exemplo, ao estado sólido, não poderá conter movimentos translacionais nem rotacionais. Portanto, no caso de moléculas não-lineares, é preciso subtrair do total, três componentes de translação e três componentes de rotação, restando, portanto, $3N - 6$ coordenadas chamadas modos normais de vibração. Quando a molécula é linear, o número de modos normais é $3N - 5$, pois a rotação sobre o próprio eixo da molécula não causa qualquer modificação nas posições dos átomos constituintes da molécula. No caso da molécula de CO, por exemplo, o número de átomos é dois, então $3 \times 2 - 5 = 1$. Portanto, o número de modos é igual a um, esse modo é de estiramento. Outro exemplo simples é o da molécula de água, que é não-linear e possui três átomos. Neste caso o número de modos normais é $3 \times 3 - 6 = 3$. A Figura 2.7 mostra os modos normais das moléculas de CO e da água.

Boa parte das vibrações moleculares pode ser revelada através das técnicas de absorção infravermelho e espalhamento Raman. Será visto adiante, que as duas técnicas citadas são complementares e, dependendo do grau de simetria da molécula, os modos revelados por espalhamento Raman também são confirmados por absorção infravermelho. Conhecer a simetria da molécula é imprescindível para se calcular quais modos são ativos no infravermelho e no Raman, que deverão ser confirmados experimentalmente através dessas duas técnicas. Há, portanto, uma inter-relação entre as espectroscopias infravermelho e Raman e a teoria de grupos, esta que é o embasamento matemático que descreve a simetria da molécula, simplificando enormemente a complexidade que se poderia ter para se determinar os modos. A teoria básica de absorção no infravermelho, espalhamento Raman, teoria de grupos e a relação entre esses três assuntos serão tratados nas seções seguintes.

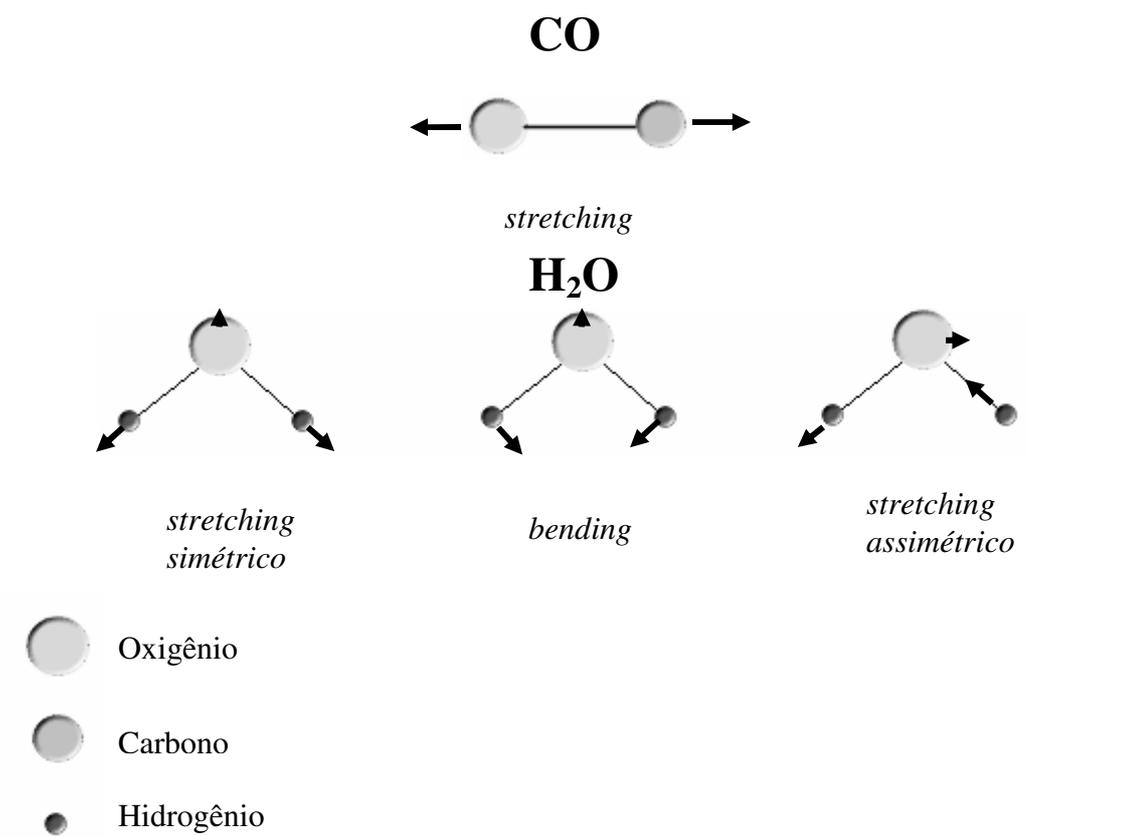


FIGURA 2.7 - Modos normais de vibração das moléculas de CO e de água. A molécula de CO possui somente um *stretching* como modo normal, enquanto que a molécula de água possui três modos normais, um *stretching* simétrico, outro assimétrico e um *bending*.

2.2.2 O papel do momento de dipolo na absorção infravermelho

Quando a radiação eletromagnética com comprimentos de onda na faixa do infravermelho penetra a amostra, somente algumas contribuições do pacote, com determinados comprimentos de onda, ou frequências, serão absorvidos pela amostra. As ondas absorvidas têm valor de frequência igual a alguns modos vibracionais da molécula. Nesse processo, a molécula absorve energia da radiação incidente, aumentando sua energia de vibração e, portanto, analisando-se a radiação que emerge da amostra, constata-se a ausência de uma ou mais contribuições da radiação incidente, que correspondem exatamente a alguns modos de vibração da molécula, ditos ativos no infravermelho. Usando um exemplo representativo, a Figura. 2.8 mostra uma molécula diatômica que possui frequência vibracional igual a ν_m e interage com a radiação infravermelha, que possui frequências $\nu_1, \nu_2, \nu_3 = \nu_m$. A molécula absorve somente a contribuição da radiação que possui frequência igual a sua. Vê-se então, que a frequência de absorção depende da frequência de vibração natural da molécula.

A intensidade de absorção depende de quão efetivamente a energia do fóton da radiação infravermelho incidente pode ser transferida à molécula, e isso depende da variação do momento de dipolo, que ocorre devido à vibração molecular. O campo elétrico da radiação eletromagnética exercerá força tendendo a induzir o momento de dipolo da molécula a oscilar na sua frequência. Em certas frequências o núcleo e o momento de dipolo oscilam simultaneamente. Nesse caso há mudança no momento de dipolo e, portanto, o fóton que vibra na mesma frequência poderá ser absorvido mais facilmente, deixando o núcleo com uma energia de vibração maior que a anterior. Se o momento de dipolo não sofrer variação durante a vibração, o fóton não poderá ser absorvido e o núcleo continuará no mesmo estado de energia. O exposto pode ser resumido pela seguinte regra de seleção: *para que a radiação infravermelha seja absorvida, a vibração molecular deve produzir variação do momento de dipolo da molécula.*

Felizmente, substâncias orgânicas possuem frequências de vibração que coincidem com a faixa de frequências do infravermelho e, portanto, poderão ser conhecidas através da absorção dos fótons incidentes.

A harmonia existente entre vibração molecular, variação do momento de dipolo e energia do fóton incidente permitirá à molécula absorver energia e passar a um estado

energético superior. Na próxima seção, será discutido o ponto de vista quântico da absorção no infravermelho.

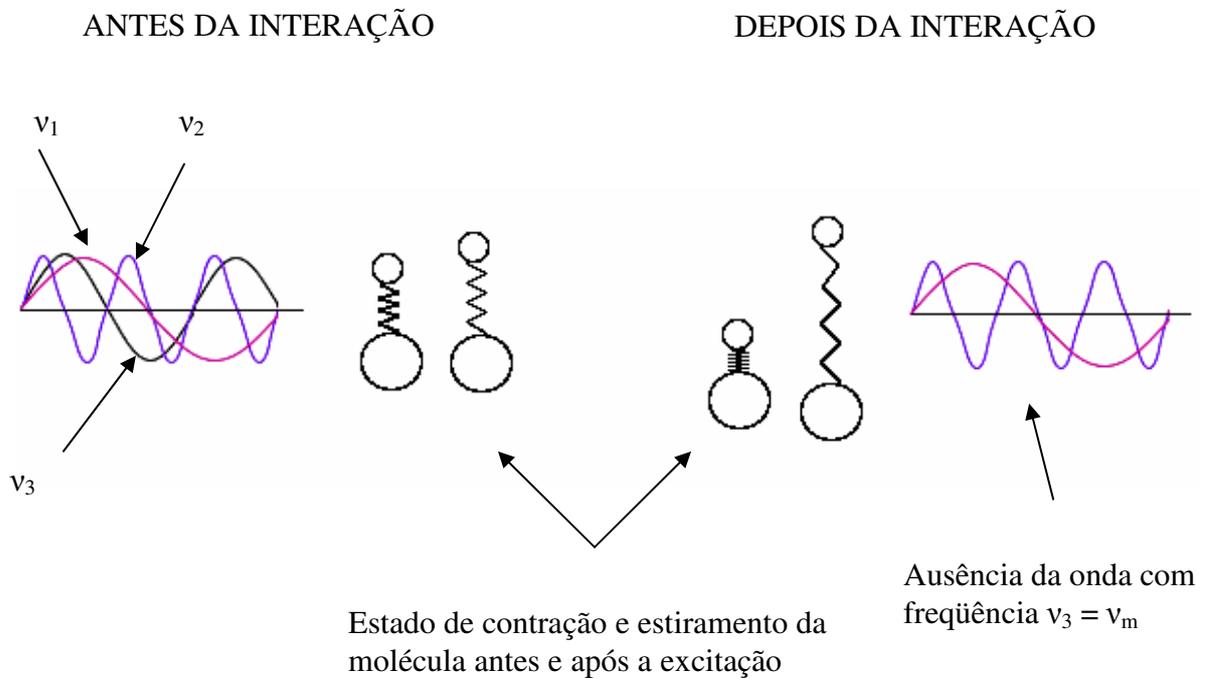


FIGURA 2.8 - Esquema representativo de absorção infravermelho por uma molécula diatômica. A frequência $\nu_3 = \nu_m$ da radiação é absorvida pela molécula.

2.2.3 Transições vibracionais e absorção no infravermelho

Ao contrário da mecânica clássica, na mecânica quântica a energia vibracional molecular não varia continuamente, mas é quantizada, significando que tal energia somente pode ter valores discretos. Os níveis de energia de um oscilador harmônico para uma molécula diatômica são dados por

$$E_{\text{vib}} = (n + 1/2)h\nu_m, \quad (2.18)$$

onde, ν_m representa a frequência de vibração molecular e $n = 0, 1, 2, \dots$

Considere a interação de um fóton de energia $h\nu_f$ e uma molécula diatômica. Sendo o fóton absorvido pela molécula, a mesma sofre transição de um estado de energia de um nível E_i para outro E_j , de modo que

$$h\nu_f = \Delta E_m, \quad (2.19)$$

em que ΔE_m representa a energia de transição necessária para levar a molécula de um nível energético para outro. Para uma transição de um nível n a outro $n + 1$, através de (2.18) pode-se escrever

$$\Delta E_m = (n + 3/2)h\nu_m - (n + 1/2)h\nu_m = h\nu_m \quad (2.20)$$

Comparando (2.19) e (2.20)

$$\begin{aligned} h\nu_m &= h\nu_f \\ \nu_m &= \nu_f \end{aligned} \quad (2.21)$$

Isto significa que, para que ocorra uma transição de um nível para outro imediatamente superior, a frequência da radiação incidente deve possuir valor igual ao da frequência de vibração molecular clássica. Quando $\Delta E_m = -h\nu_m$, a molécula perde energia e emite um fóton com mesma frequência do fóton incidente. Através da função distribuição de Boltzmann, pode-se calcular a população relativa dos níveis de energia de um ensemble de

moléculas diatômicas. Assumindo que não existam estados degenerados, a população do nível i relativa àquela no nível fundamental é dada por

$$\frac{n_i}{n_0} = \frac{e^{\varepsilon_i/KT}}{e^{\varepsilon_0/KT}} = e^{-(\varepsilon_i - \varepsilon_0)/KT} \quad (2.22)$$

Supondo que se deseje saber a relação entre o número de moléculas diatômicas que vibram no primeiro nível e as que vibram no nível fundamental de energia, a energia de transição entre os níveis, para um oscilador harmônico, é

$$(\varepsilon_i - \varepsilon_0) = \left[\left(n + \frac{1}{2} \right) - \frac{1}{2} \right] h\nu_m = nh\nu_m = nhc\bar{\nu}_m \quad \text{e} \quad \text{então} \quad \frac{n_i}{n_0} = e^{-nhc\bar{\nu}_m/KT}. \quad \text{À temperatura}$$

ambiente, $T = 300^\circ \text{ K}$, $hc/KT = 1/209 \text{ cm}$. Considerando que a maioria das moléculas possui $\bar{\nu}_m$ maior do que 209 cm^{-1} , as mesmas devem pertencer ao estado fundamental e, portanto, havendo uma transição, esta ocorrerá mais provavelmente do nível fundamental para o primeiro nível de energia.

Na realidade, as moléculas possuem comportamento anarmônico. No entanto, para os primeiros níveis de energia, tanto o modelo harmônico como o anarmônico possui valores muito próximos, como mostra a Figura. 2.9, que representa as curvas de energia potencial e os níveis de energia de uma molécula diatômica, onde r_e é a distância de equilíbrio entre os átomos. Como a maioria das transições ocorre entre o nível fundamental e o primeiro nível excitado, a equação (2.18) pode ser usada mesmo que a vibração seja anarmônica.

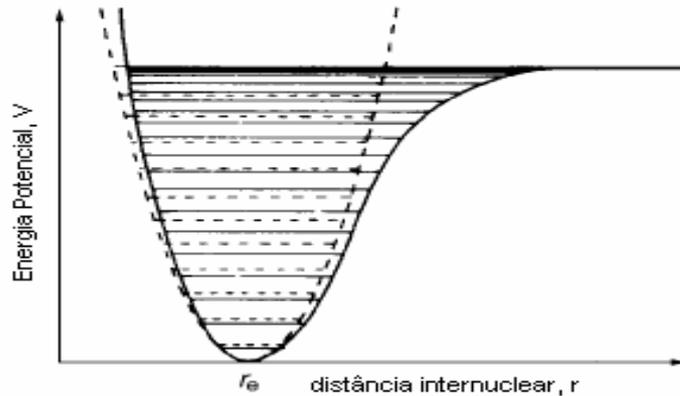


FIGURA 2.9 - Curvas de energia potencial e níveis de energia de uma molécula diatômica comparando os osciladores harmônico e anarmônico. Oscilador harmônico é representado por linha tracejada e o anarmônico por linha cheia.

2.2.4 Efeito Raman

Quando uma radiação monocromática de frequência ν_0 incide sobre um sólido transparente qualquer (poderia ser um líquido), a maioria da radiação é transmitida sem qualquer mudança de suas propriedades, mas uma pequena porção é espalhada. Analisando-se a parte espalhada, verifica-se que não somente a frequência ν_0 está presente, mas também outras duas porções, com frequências acima e abaixo de ν_0 . A parte espalhada que possui mesma frequência da onda incidente é conhecida como espalhamento Rayleigh, descoberto por Lord Rayleigh [12] em 1871. As outras duas porções só puderam ser evidenciadas pouco mais de meio século depois por C.V. Raman.

Em 1928, C.V. Raman e Krishnan [13], mostraram experimentalmente um outro tipo de espalhamento, já predito teoricamente por Smekal [14], em que a luz emergente da amostra possuía não somente o mesmo comprimento de onda da luz incidente, mas também outros dois, que teriam grande importância na revelação das vibrações moleculares. Tal comportamento ficou conhecido por *espalhamento Raman*.

Para se entender de forma básica o processo de espalhamento Raman, considere um fóton de luz, de energia $h\nu_0$, interagindo com uma molécula. O fóton excita a molécula a um nível de energia instável, de modo que a molécula permanece nesse nível por um instante ínfimo e volta ao nível a que pertencia ou ainda a um nível de energia E_i acima ou abaixo. Pela lei de Boltzmann, como já mencionado, o nível mais populoso é o nível fundamental, portanto, levando-se em consideração esse fato, após a excitação, a molécula deverá voltar

para o nível fundamental E_0 ou a um nível imediatamente superior E_1 . No entanto, há a possibilidade de que moléculas que já vibram no primeiro nível de energia, depois da excitação molecular, caíam para o nível fundamental. O experimento de C. V. Raman mostrou que a maior parte da luz espalhada, possui a mesma frequência da luz incidente, o já citado espalhamento Rayleigh. O restante possui frequência abaixo (espalhamento ou linha Stokes) e acima (espalhamento ou linha anti-Stokes).

A lei de conservação da energia é providencial para revelar importantes informações sobre a vibração da molécula utilizando o processo de espalhamento Raman. O balanço de energia do processo deve ser tal que

$$h\nu_e = h\nu_o \pm h\nu_m \quad (2.23)$$

ou

$$\nu_e = \nu_o \pm \nu_m \quad (2.24)$$

onde, ν_e se refere à frequência da radiação espalhada, ν_o a frequência do fóton incidente e ν_m a frequência da molécula.

O sinal “ \pm ” em (2.24) corresponde às duas transições mais prováveis para a molécula após a interação com a luz. No caso da molécula estar vibrando no nível fundamental E_0 , e, após a excitação, passar ao primeiro nível de energia E_1 , absorvendo assim, energia, a frequência do fóton espalhado fica $\nu_e = \nu_o - \nu_m$, que representa a linha Stokes. No caso em que a molécula já vibra no primeiro nível de energia E_1 , e, após a excitação, cai ao nível fundamental E_0 , a frequência do fóton espalhado fica $\nu_e = \nu_o + \nu_m$, representando a linha anti-Stokes. O processo descrito também pode ser entendido da seguinte forma: um fóton incidente é aniquilado e um outro fóton é criado pela molécula com frequência $\nu_o - \nu_m$ ou $\nu_o + \nu_m$. No espalhamento elástico um fóton incidente é aniquilado e outro é criado pela molécula possuindo mesma frequência, $\nu_e = \nu_o$. A Figura 2.10 mostra todo o processo descrito acima.

Evidentemente, o espalhamento Raman sempre existiu juntamente com o espalhamento Rayleigh, no entanto, só para se ter uma idéia, aproximadamente 10^{-3} da luz incidente é destinada ao espalhamento Rayleigh e 10^{-3} de toda a porção espalhada pertence aos espalhamentos Stokes e anti-Stokes [15]. Não é de se admirar que o efeito Raman só fosse percebido tanto tempo depois da descoberta do espalhamento Rayleigh. Apesar das linhas

Stokes possuem baixa intensidade para serem percebidas, o advento do laser e toda a instrumentação usada para se analisar a luz espalhada, tornaram o espalhamento Raman uma técnica de grande importância na determinação das vibrações moleculares.

É importante também se entender o efeito Raman sob o ponto de vista clássico, o que será feito na próxima seção.

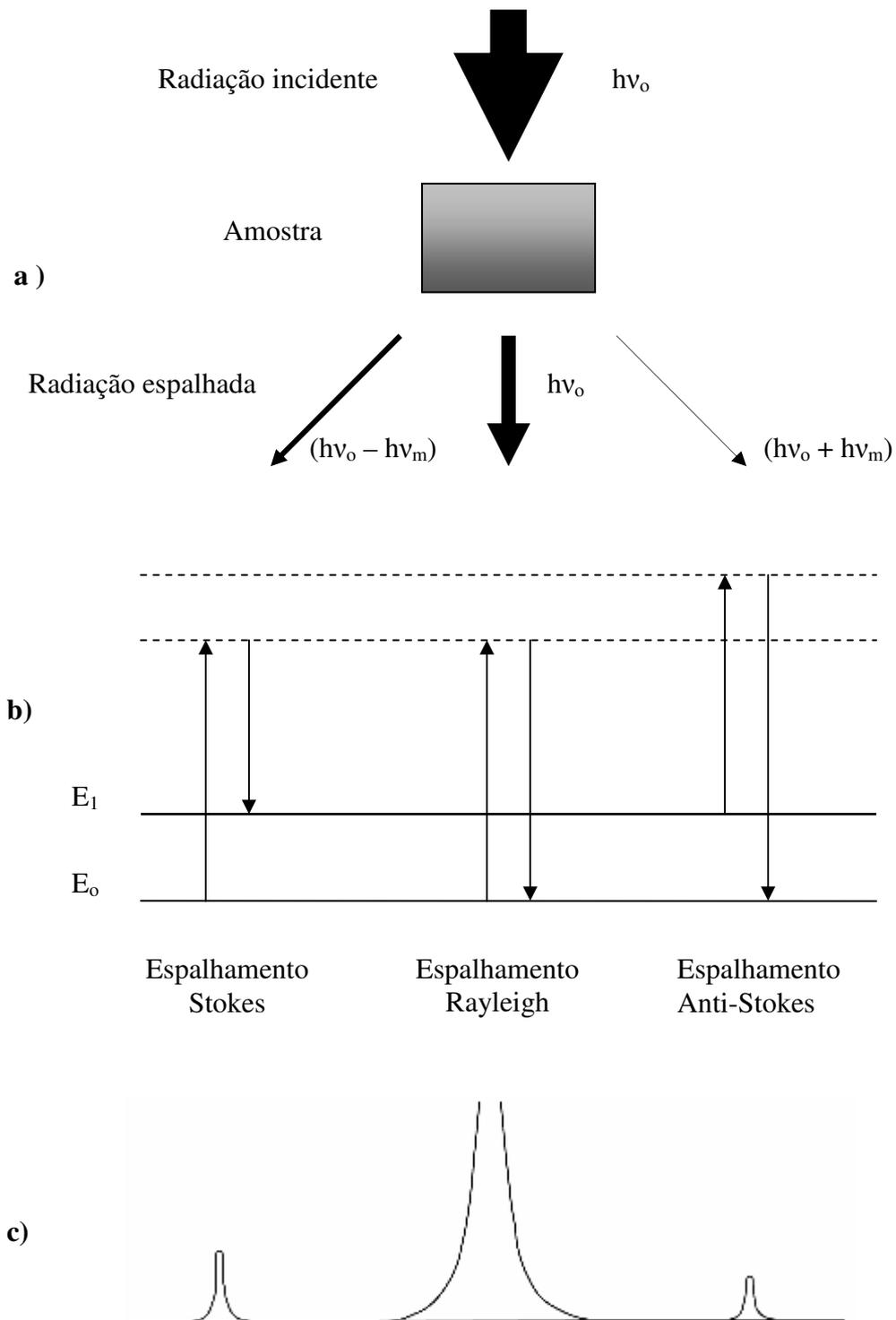


FIGURA 2.10 - Efeito Raman. a) interação da luz incidente (de energia $h\nu_0$) com a amostra e seu conseqüente espalhamento nas energias $h\nu_0 - h\nu_m$, $h\nu_0$ e $h\nu_0 + h\nu_m$. b) as três transições moleculares mais prováveis, provocadas por um fóton incidente, responsáveis pelos espalhamentos Rayleigh, Stokes e anti-Stokes. c) gráfico que mostra o valor da freqüência e a intensidade da radiação espalhada.

2.2.5 A polarizabilidade e a visão clássica do efeito Raman

A intensidade da banda espectral, como já mencionado, depende de quão efetivamente a energia do fóton é transferida à molécula. No caso da radiação infravermelha, foi visto que tal transferência de energia se efetua com maior facilidade quando o momento de dipolo da molécula varia com a coordenada normal. No caso do efeito Raman, a variação na polarizabilidade com respeito à coordenada normal é que promove uma melhor transferência de energia do fóton incidente para a molécula.

Quando uma molécula é exposta a um campo elétrico oscilante de alta frequência, há uma separação entre núcleos e elétrons, de modo que um momento de dipolo é induzido, adquirindo mesma frequência de oscilação da radiação incidente. O momento de dipolo induzido depende da flexibilidade entre o núcleo e os elétrons da molécula, descrita pela polarizabilidade. O movimento vibracional de estiramento e compressão da molécula causa uma modulação na amplitude do momento de dipolo induzido e conseqüentemente a radiação emitida também será modulada pela frequência de vibração da molécula, dando, assim, informações sobre a vibração molecular.

O processo descrito acima pode ser deduzido matematicamente, considerando-se uma radiação incidente de alta frequência ν_0 , interagindo com uma molécula que é livre somente para vibrar. Haverá então o surgimento de um momento de dipolo induzido \mathbf{P} , que em primeira aproximação é dado por

$$\mathbf{P} = \boldsymbol{\alpha} \cdot \mathbf{E}^3 \quad (2.259)$$

em que $\boldsymbol{\alpha}$ é o tensor polarizabilidade e \mathbf{E} é o campo da radiação incidente. A polarizabilidade, para cada modo normal da molécula deve variar com respeito às coordenadas normais das mesmas. Expandindo então a polarizabilidade em série de Taylor com relação a uma configuração de equilíbrio, pode-se escrever,

³ Para radiações de intensidades mais altas do que as tratadas aqui, o momento de dipolo induzido produz efeitos não lineares, de modo que (2.25) precisa ser escrita como $\mathbf{P} = \boldsymbol{\alpha} \cdot \mathbf{E} + \frac{1}{2} \boldsymbol{\beta} : \mathbf{E}\mathbf{E} + \frac{1}{6} \boldsymbol{\lambda} : \mathbf{E}\mathbf{E}\mathbf{E} + \dots$, onde $\boldsymbol{\beta}$ e $\boldsymbol{\lambda}$ são respectivamente, os tensores de hiperpolarizabilidade e hiperpolarizabilidade segunda (ver Long). No presente trabalho, a intensidade da radiação incidente usada, permite que o momento de dipolo induzido seja escrito somente com a aproximação linear dada por (2.25).

$$\alpha_{ij} = (\alpha_{ij})_0 + \sum_k \left(\frac{\partial \alpha_{ij}}{\partial Q_k} \right)_0 Q_k + \frac{1}{2} \sum_{k,r} \left(\frac{\partial^2 \alpha_{ij}}{\partial Q_k \partial Q_r} \right)_0 Q_k Q_r + \dots \quad (2.26)$$

onde, $(\alpha_{ij})_0$ é o valor de α_{ij} na configuração de equilíbrio, Q_k, Q_r, \dots são as coordenadas normais associadas aos modos normais de frequência ν_k, ν_r, \dots e os somatórios são sobre todas as coordenadas normais. Negligenciando termos de Q com potências acima de um, e considerando o valor da polarizabilidade para um determinado modo normal Q_k (2.26) pode ser escrita como

$$\mathbf{\alpha}_k = \mathbf{\alpha}_0 + \mathbf{\alpha}'_k Q_k \quad (2.27)$$

onde,

$\mathbf{\alpha}_k = (\alpha_{ij})_k$, é a polarizabilidade em relação à coordenada normal Q_k .

$\mathbf{\alpha}'_k = \left(\frac{\partial \alpha_{ij}}{\partial Q_k} \right)_0$, é a derivada das componentes da polarizabilidade com respeito à coordenada normal Q_k . Assumindo uma oscilação harmônica para a coordenada normal Q_k , pode-se escrever,

$$Q_k = Q_{ko} \cos(2 \pi \nu_k t + \delta_k) \quad (2.28)$$

onde Q_{ko} é a amplitude da coordenada Q_k e δ_k um fator de fase. Substituindo (2.12) em (2.27), a polarizabilidade com relação ao modo k fica

$$\mathbf{\alpha}_k = \mathbf{\alpha}_0 + \mathbf{\alpha}'_k Q_{ko} \cos(2 \pi \nu_k t + \delta_k) \quad (2.29)$$

O momento de dipolo induzido sobre a molécula para o modo vibracional k fica então,

$$\mathbf{P}^k = \mathbf{\alpha}_k \cdot \mathbf{E} \quad (2.30)$$

desde que \mathbf{E} varia com o tempo como

$$\mathbf{E} = \mathbf{E}_0 \cos(2\pi \nu_0 t), \quad (2.31)$$

da substituição de (2.31) e (2.29) em (2.30) obtém-se

$$\mathbf{P}^k = \boldsymbol{\alpha}_0 \cdot \mathbf{E}_0 \cos(2\pi \nu_0 t) + \boldsymbol{\alpha}'_k \cdot \mathbf{E}_0 Q_{k0} \cos(2\pi \nu_k t + \delta_k) \quad (2.32)$$

usando a identidade

$$\cos A \cos B = \frac{1}{2} [\cos(A+B) + \cos(A-B)] \quad (2.33)$$

(2.32) fica

$$\begin{aligned} \mathbf{P}^k = & \boldsymbol{\alpha}_0 \cdot \mathbf{E}_0 \cos(2\pi \nu_0 t) + \\ & \frac{1}{2} Q_{k0} \boldsymbol{\alpha}'_k \cdot \mathbf{E}_0 \left\{ \cos 2\pi [(\nu_0 - \nu_k)t - \delta_k] + \cos 2\pi [(\nu_0 + \nu_k)t + \delta_k] \right\} \end{aligned} \quad (2.34)$$

A equação acima mostra que o momento de dipolo induzido \mathbf{P}^k possui três componentes distintas de frequência como argumento da função cosseno. Tais frequências são iguais a ν_0 , $\nu_0 - \nu_k$ e $\nu_0 + \nu_k$, que representam respectivamente, os espalhamentos Rayleigh, Stokes e anti-Stokes. Vê-se também, que se $\boldsymbol{\alpha}'_k = 0$, o efeito Raman não pode existir, pois, nesse caso, as componentes de frequência Raman teriam amplitude zero. Portanto, uma condição necessária para que haja efeito Raman é que $\boldsymbol{\alpha}'_k \neq 0$.

O resultado em (2.34) é mostrado na Figura 2.11 em que a radiação incidente de frequência ν_0 , interage com a amostra e, em seguida, é espalhada pela mesma como uma onda de amplitude modulada, onde, a informação da vibração molecular está presente. Decompondo-se a onda espalhada, as contribuições dos espalhamentos Rayleigh, Stokes e anti-Stokes são evidenciadas.

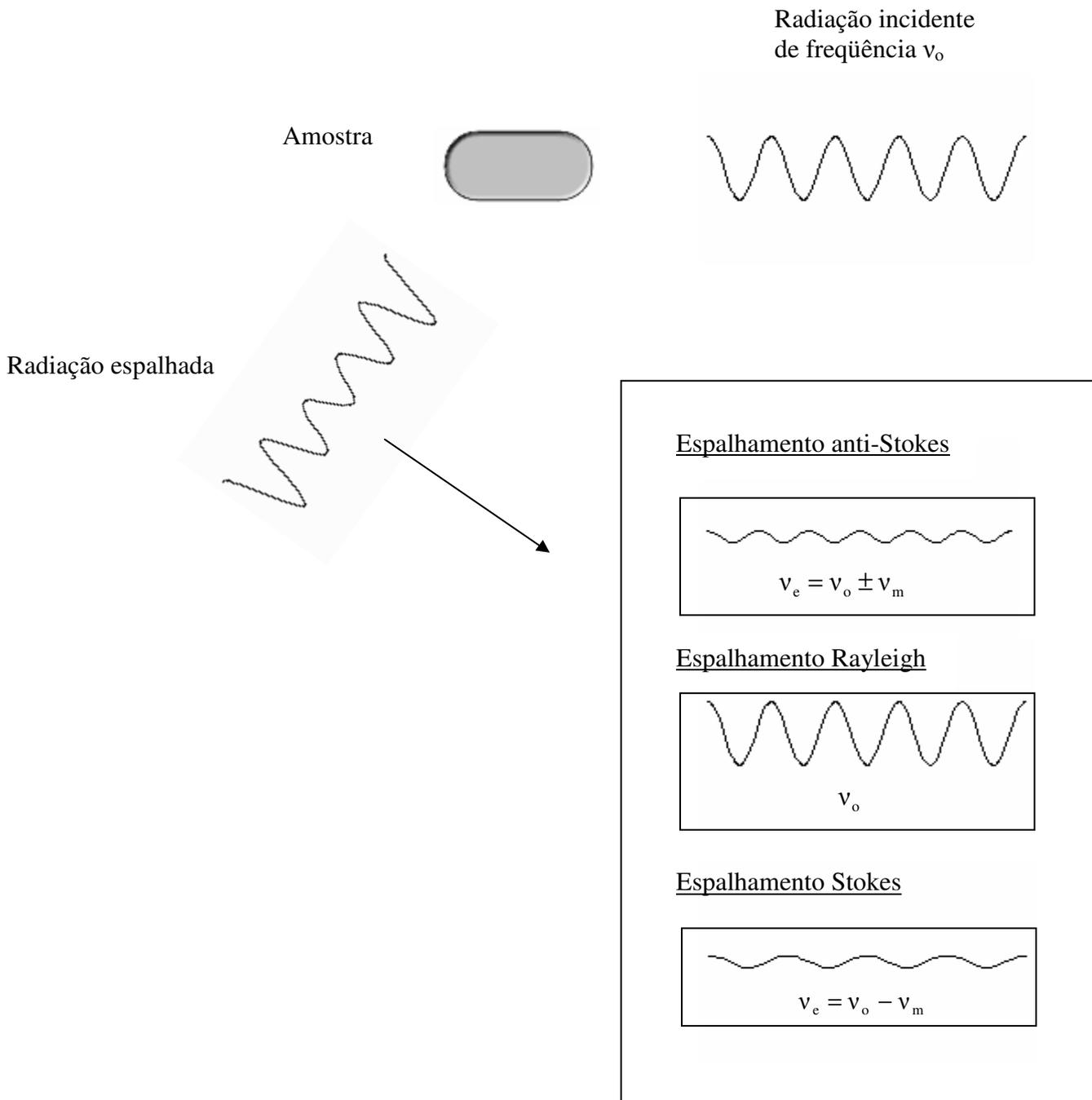


FIGURA 2.11 - Efeito Raman sob ponto de vista clássico. A radiação incidente de frequência ν_0 interage com a amostra. A radiação espalhada pela amostra é modulada pela vibração molecular. Decompondo-se a onda espalhada, as contribuições dos espalhamentos Rayleigh, Stokes e anti-Stokes são evidenciadas.

2.3 Os Aminoácidos e As Proteínas

2.3.1 Aminoácidos e suas Propriedades

Todos os aminoácidos são constituídos de um grupo carboxílico (COOH) e um grupo amina (NH₂), ligados ao mesmo carbono, conhecido por carbono α. O carbono α também se liga a um átomo de hidrogênio e a um radical R (Figura 2.12). O radical é o principal responsável pelas diferenças existentes entre os aminoácidos, dentre as quais: variação da estrutura, tamanho da molécula, carga elétrica e influência na solubilidade em água.

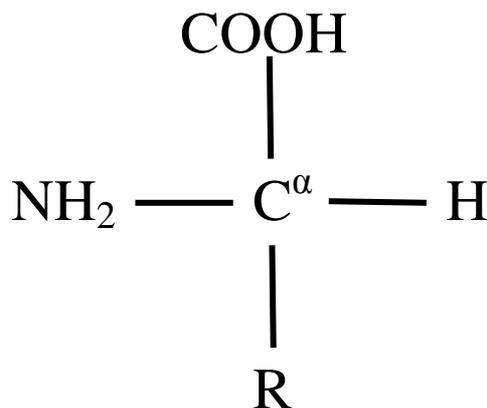


FIGURA 2.12 - Forma molecular de um aminoácido de radical R qualquer.

Por conter numa mesma molécula um ácido e uma base e sabendo que entre essas funções ocorre reação, os aminoácidos se apresentam, em geral, na forma de íon dipolar ou mais comumente conhecida *zwitterion*, onde o grupo carboxílico perde um próton que se liga ao grupo amina, que se torna amônia.

Na verdade, a forma predominante do aminoácido depende do pH da solução, bem como da natureza do aminoácido. Em soluções muito ácidas, por exemplo, todos os aminoácidos se apresentam, principalmente, na forma de cátions (forma catiônica), representados pelo grupo amônia (NH₃⁺). Por outro lado, em soluções muito alcalinas se apresentam, principalmente, como ânions (forma aniônica), representado pelo grupo carboxílico (COO⁻). Em valores de pH intermediários os íons dipolares possuem concentração

máxima e as concentrações dos ânions e cátions são iguais. O valor de PH mencionado é conhecido por *ponto isoelétrico*. A Figura 2.13 esboça o exposto.

Dos tantos aminoácidos existentes, somente 20 são imprescindíveis à vida animal. Desses vinte, oito são conhecidos como *aminoácidos essenciais*, pois, o organismo dos seres humanos não é capaz de realizar sua síntese, tendo que, obrigatoriamente, fazer parte da sua dieta. Os aminoácidos essenciais são: leucina, isoleucina, valina, fenilalanina, triptofano, treonina, metionina e lisina. Todos os outros 12 aminoácidos são sintetizados pelo organismo humano e são conhecidos como aminoácidos não-essenciais. A principal razão da grande importância dos aminoácidos é que os mesmos são os constituintes básicos das proteínas.

Os aminoácidos podem ser classificados de acordo com a natureza do radical R. Na Figura 2.14 estão dispostos os aminoácidos vitais para a síntese de proteínas, que são classificados pela polaridade de seus radicais. Os radicais chamados hidrofóbicos (pouco solúveis em água) possuem, geralmente, grupamentos alquila (são formados somente por carbono e hidrogênio), exceto a metionina que contém um átomo de enxofre. Na mesma figura estão os aminoácidos cujos radicais são classificados como hidrofílicos (solúveis em água), mas não possuem excesso de carga. E, finalmente, os que têm radicais carregados positiva e negativamente, conhecidos por ácidos e básicos, respectivamente.

Todos os aminoácidos da Figura 2.14, exceto a glicina, apresentam quiralidade, pois, o carbono α está ligado a quatro diferentes grupos, de tal sorte que, a imagem da molécula projetada por um espelho é diferente da molécula real. O carbono α é chamado

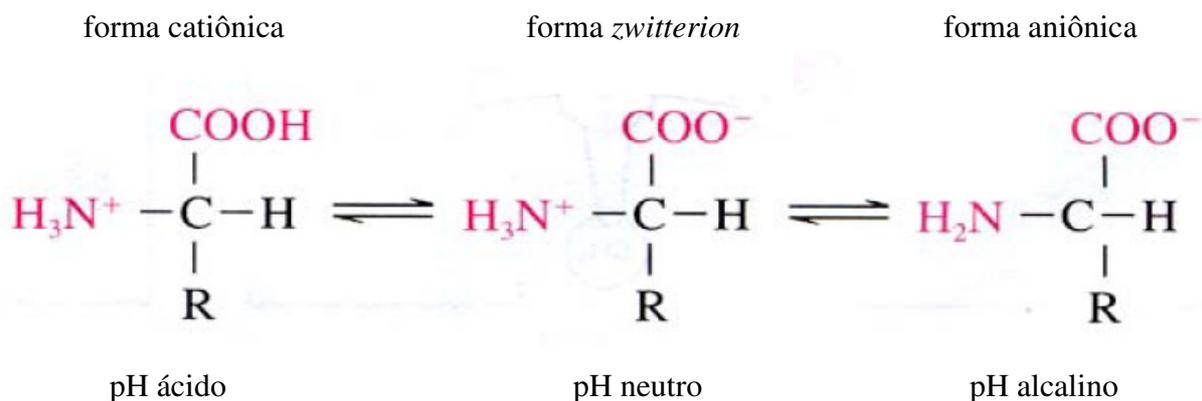
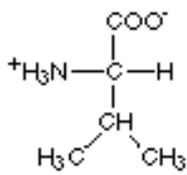
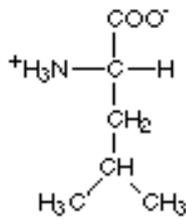
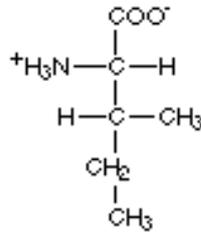
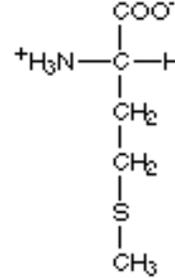
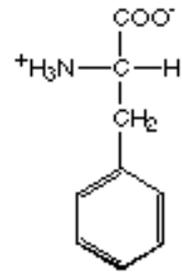
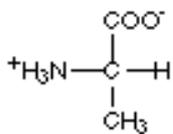
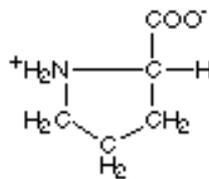
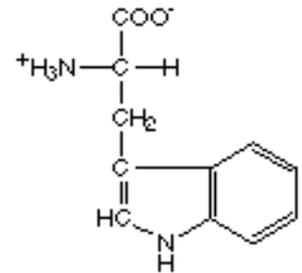


FIGURA 2.13 - Esquema mostrando as formas catiônica, *zwitterion* e aniônica dos aminoácidos quando expostos a soluções de PH ácido, neutro e alcalino, respectivamente.

a) Aminoácidos hidrofóbicos

Valina
(Val)Leucina
(Leu)Isoleucina
(Ile)Metionina
(Met)Fenilalanina
(Fen)Alanina
(Ala)Prolina
(Pro)Triptofano
(Tri)

b) Aminoácidos hidrofílicos

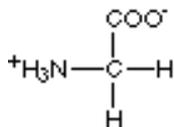
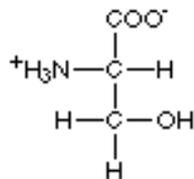
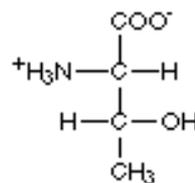
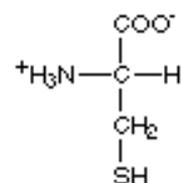
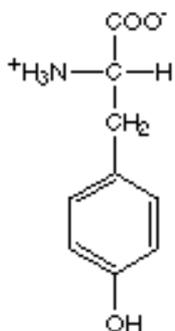
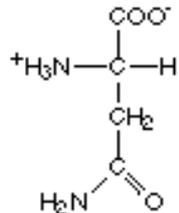
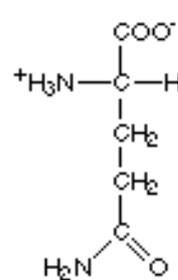
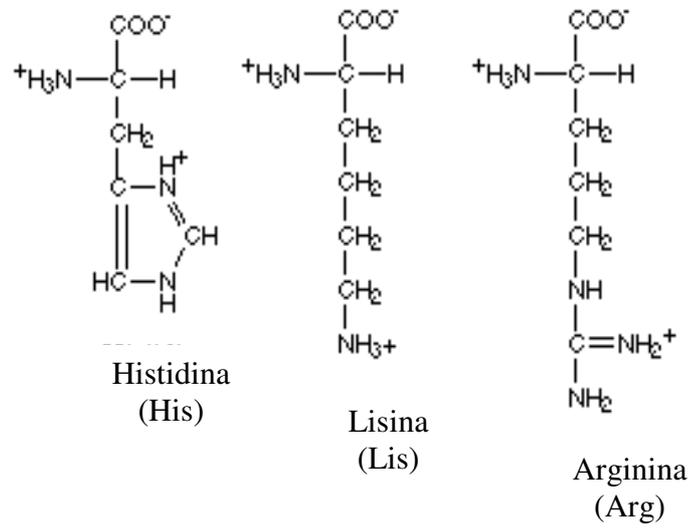
Glicina
(Gli)Serina
(Ser)Treonina
(Ter)Cisteína
(Cis)Tirosina
(Tir)Asparagina
(Asn)Glutamina
(Gln)

FIGURA 2.14 - Os vinte aminoácidos que participam da síntese de proteína classificados segundo a polaridade de seus radicais: a) Aminoácidos hidrofóbicos b) Aminoácidos hidrofílicos;

c) Aminoácidos ácidos



d) Aminoácidos básicos

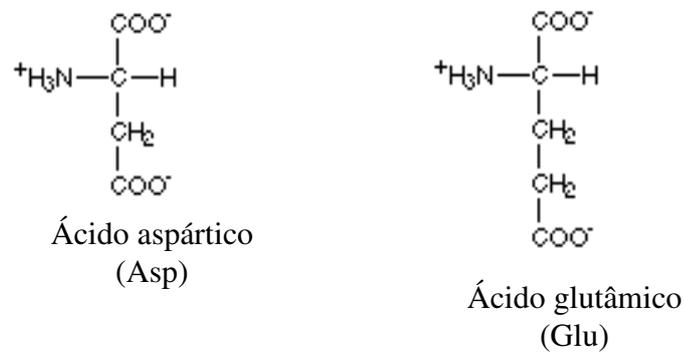


FIGURA 2.14 - Continuação. c) Aminoácidos ácidos d) Aminoácidos básicos.

carbono quiral ou *carbono assimétrico*. Moléculas que possuem quiralidade são conhecidas por enantiômeros. Os dois enantiômeros dos aminoácidos apresentam atividades óticas diferentes. Quando luz plano-polarizada incide sobre tais moléculas o plano de polarização da luz sofre rotação; se a rotação ocorrer no sentido horário, a molécula tem comportamento dextrógiro, e então o aminoácido apresenta configuração d; se a rotação acontece no sentido anti-horário, diz-se que a molécula tem comportamento levógiro e o aminoácido apresenta configuração l. Na síntese de proteína todos os aminoácidos possuem configuração l.

Devido ao papel fundamental dos aminoácidos na constituição das proteínas, falaremos na próxima seção da importância da sequência única dos aminoácidos na composição de uma proteína para que a mesma desempenhe sua devida função no organismo. Em seguida falaremos, brevemente, sobre a síntese de proteína, destacando em especial o papel do DNA naquele mecanismo.

2.3.2. Proteínas e a ligação peptídica

Pela ação de enzimas (proteínas) os α -aminoácidos podem sofrer polimerização com a eliminação de água. A ligação $-\text{CO}-\text{NH}-$ que se forma entre os aminoácidos é conhecida como *ligação peptídica* (Figura 2.15). Quando o polímero é formado por dois aminoácidos é chamado *dipeptídio*. A partir de 10 aminoácidos o polímero passa a ser um polipeptídio. As proteínas são moléculas que possuem uma ou mais cadeias de polipeptídios. Os aminoácidos, quando compõem um polipeptídio são chamados *resíduos de aminoácidos*.

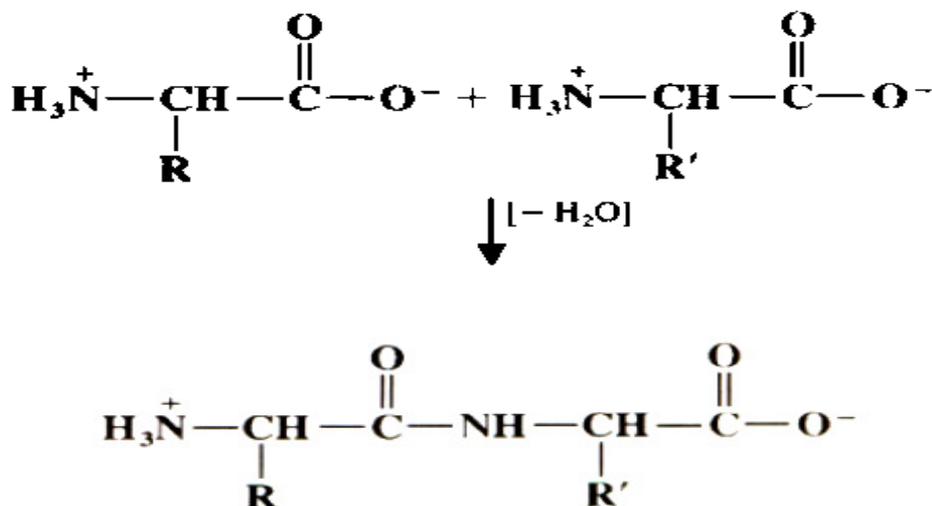


FIGURA 2.15 - Polimerização de dois aminoácidos promovendo a eliminação de água e formando a ligação peptídica $-\text{CO}-\text{NH}-$. O resultado é um dipeptídio.

Os polipeptídios são polímeros lineares e apresentam numa extremidade (por convenção na extremidade esquerda) um resíduo de aminoácido com grupo -NH_3^+ livre, e na outra extremidade um resíduo de aminoácido com o grupo -CO_2^- livre. Tais grupos são designados, respectivamente por resíduo terminal N e resíduo terminal C (Figura 2.16).

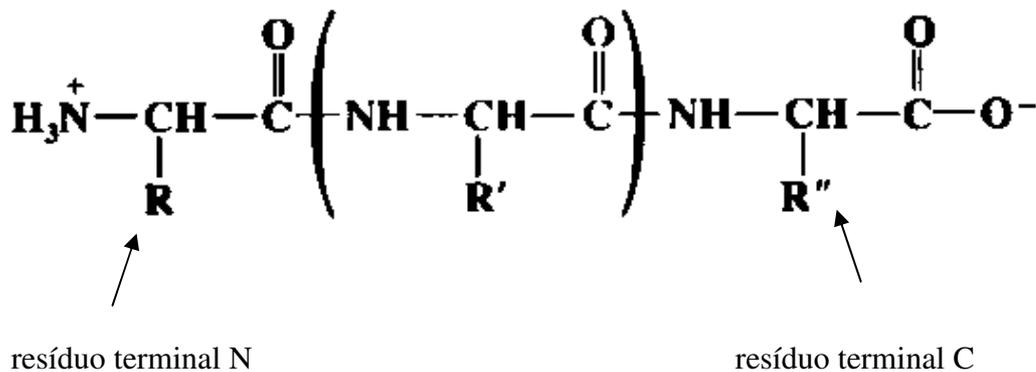


FIGURA 2.16 - As extremidades de uma cadeia peptídica são denominadas por resíduo terminal N, por convenção localizado sempre à esquerda, e resíduo terminal C, localizado à direita.

2.3.3 Estruturas das proteínas

Por serem moléculas grandes e complexas as proteínas apresentam quatro níveis de estrutura: estrutura primária, estrutura secundária, estrutura terciária e estrutura quaternária.

A estrutura primária de uma proteína representa a seqüência dos aminoácidos, incluindo, principalmente, as ligações peptídicas e as ligações dissulfeto entre pares de cisteína. A Figura 2.17 mostra a representação da estrutura primária da proteína lisozima, uma enzima que ataca a parede celular das bactérias, que possui 129 aminoácidos em sua estrutura. Nota-se a existência de quatro pontes de dissulfeto que contribuem para o enrolamento da proteína. A lisozima foi a primeira proteína a ter sua estrutura tridimensional totalmente determinada, isto no ano de 1965 [16].

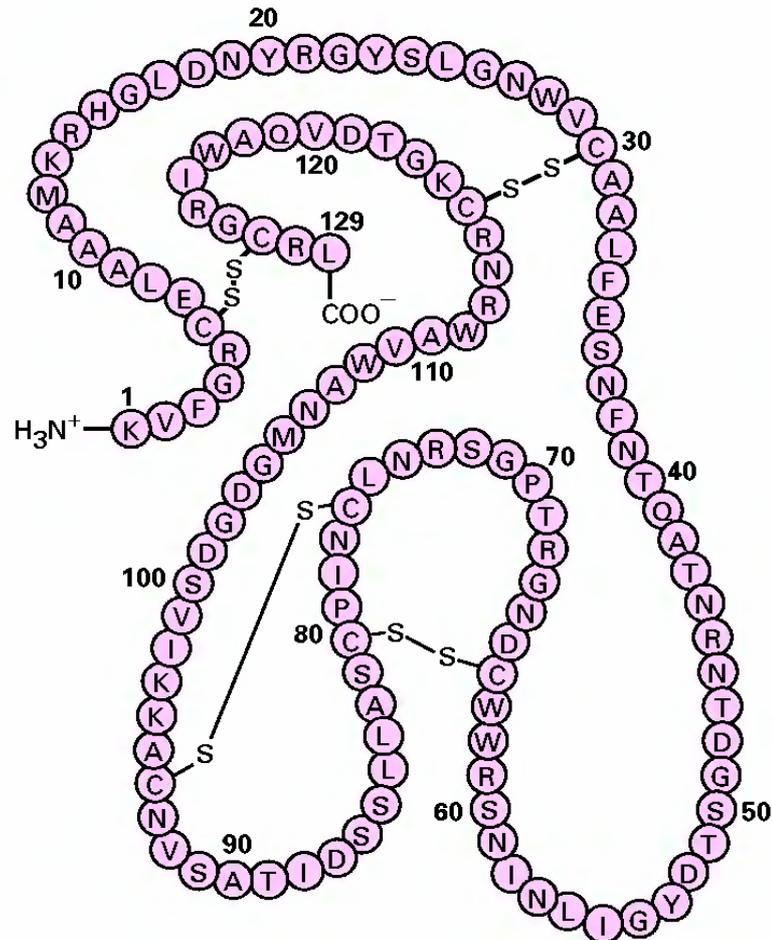
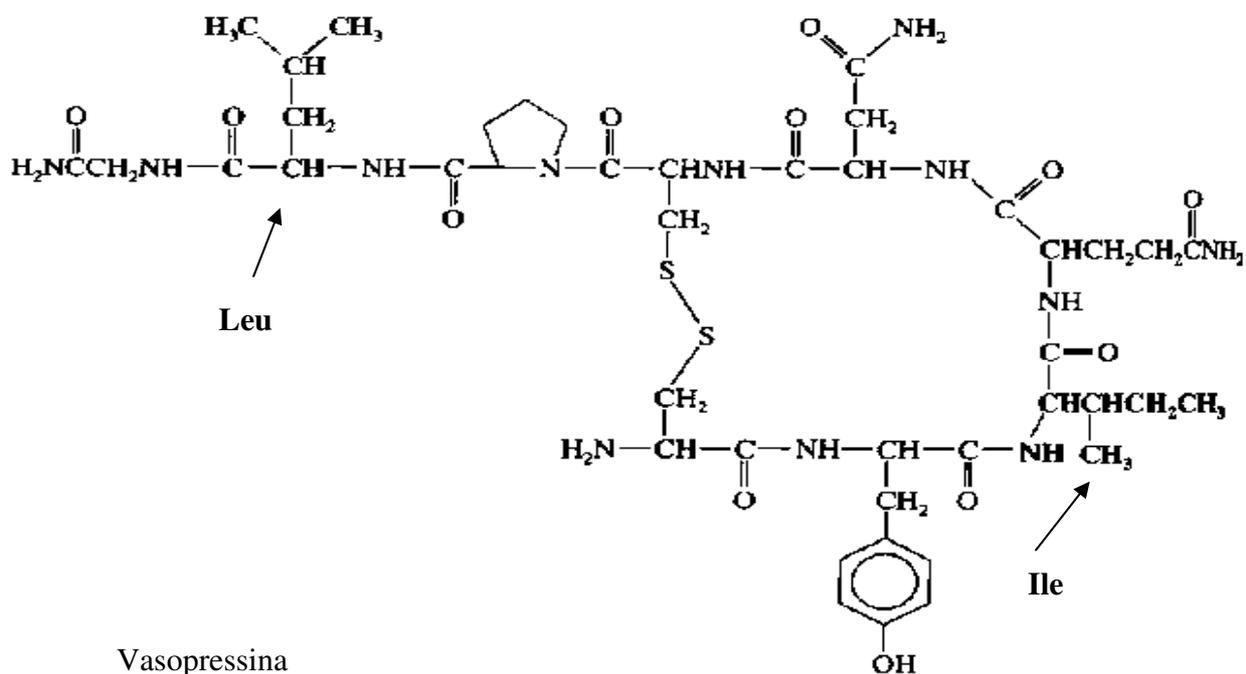


FIGURA 2.17 - Estrutura primária da proteína lisozima. As pontes de dissulfeto são as principais responsáveis pela estabilidade da proteína.

Se imaginarmos uma proteína composta de 20 diferentes aminoácidos e 100 resíduos, chega-se a $20^{100} = 1,27 \times 10^{130}$ polipeptídios diferentes, número astronômico. Mudanças nas seqüências de aminoácidos localizados em determinados pontos da proteína pode acarretar grandes mudanças no que diz respeito à função da proteína. Bom exemplo disso é o papel desempenhado pelas proteínas oxitocina e vasopressina, em que a primeira está presente nas fêmeas de animais e estimula as contrações uterinas durante o parto, enquanto que a segunda ocorre tanto em machos quanto em fêmeas e provoca a contração dos vasos sanguíneos, causando aumento da pressão sanguínea. Apesar de funções tão diversas as duas proteínas são quase idênticas (Figura 2.18), tendo como única diferença a troca de uma leucina por uma arginina e de uma isoleucina por uma fenilalanina em pontos equivalentes das duas proteínas.

Oxitocina



Vasopressina

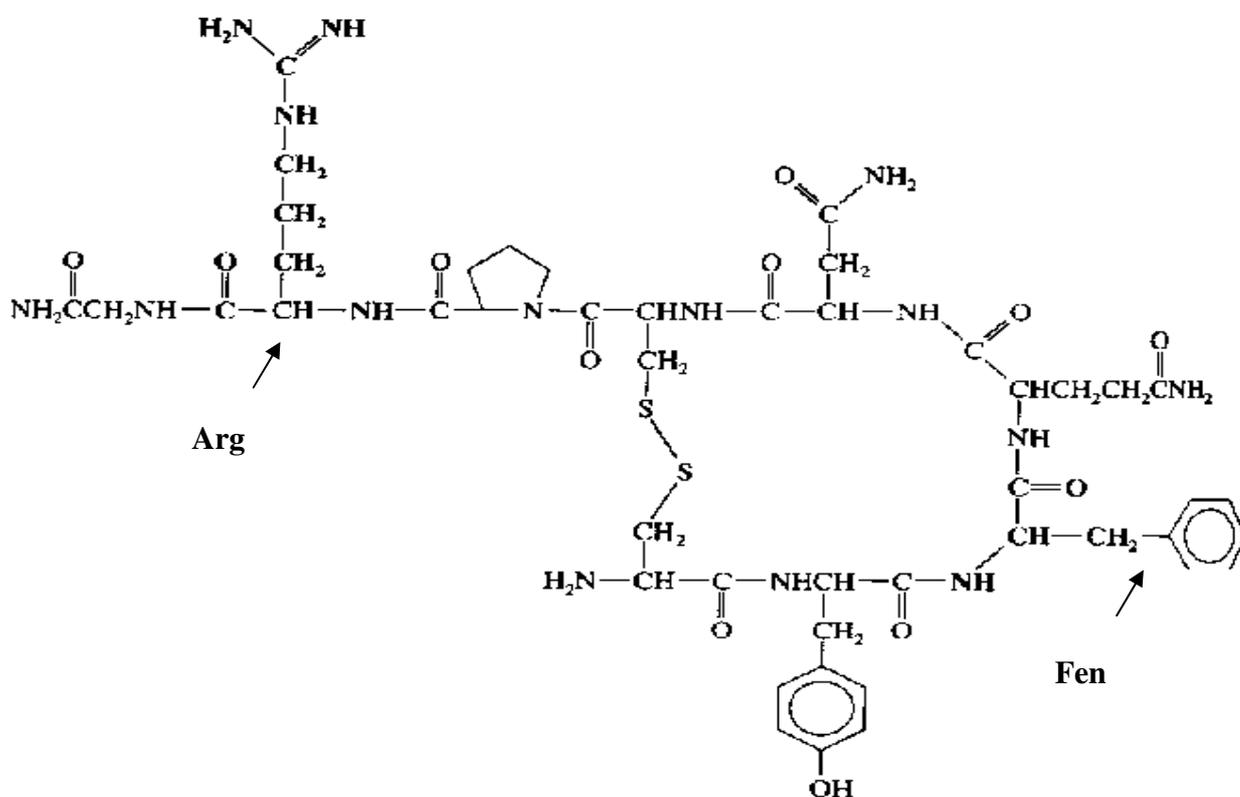


FIGURA 2.18 - Estruturas primárias das proteínas oxitocina e vasopressina. Apesar de possuírem estruturas muito parecidas, com a diferença de apenas dois aminoácidos em pontos equivalentes, as duas proteínas desempenham funções bem diversas no organismo.

A estrutura secundária de uma proteína se define como a conformação local do seu esqueleto polipeptídico. Foram Linus Pauling e Robert Corey que em 1939, propuseram dois importantes pré-requisitos para a estabilidade das proteínas: a) Todos os átomos que participam da ligação peptídica fazem parte do mesmo plano e b) A existência da ligação de hidrogênio entre o N-H de uma ligação peptídica e o C=O de outra. A partir desses pré-requisitos, Pauling e Corey chegaram a dois diferentes modelos estruturais particularmente estáveis: a formação em *hélice α* e em *placas pregueadas β* .

Como mostra a Figura 2.19, na formação em hélice α a cadeia de polipeptídios se enrola em espiral em torno de um eixo com 3,6 resíduos por volta ou uma distância vertical de 5,6 Å [16, 17, 18]. Dessa forma, ligações de hidrogênio entre o nitrogênio e o oxigênio de cada ligação peptídica são formadas com espaçamentos de quatro resíduos. Estas ligações de hidrogênio são as principais responsáveis pela estabilidade da hélice. Com tal formação, os radicais dos resíduos de aminoácido se posicionam na parte externa da hélice, em contato com o ambiente aquoso. A prolina, por ter seu radical ligado diretamente ao nitrogênio, que participa da ligação peptídica, introduziria dobras inflexíveis no polipeptídio e não pode fazer parte de uma formação em hélice. A estrutura helicoidal α é predominante nas proteínas fibrosas como a *miosina*, proteína dos músculos, e a queratina α , proteína dos cabelos.

A formação em placas ou lâminas pregueadas β consiste em cadeias de polipeptídios dispostas paralelamente de modo que as ligações peptídicas de duas cadeias adjacentes interagem através de ligações de hidrogênio entre os grupos N-H e C=O (na formação em hélice α as ligações de hidrogênio ocorrem na mesma cadeia peptídica). O radical R de cada resíduo se posiciona, alternadamente, acima e abaixo das placas. As cadeias peptídicas são também a seu longo, dispostas em ziguezague, formando placas, contendo o carbono α sempre no vértice formado pelas placas. Novamente, aqui, as ligações de hidrogênio são as responsáveis pela estabilidade da estrutura. A Figura 2.20 retrata o exposto.

Usa-se o termo estrutura terciária quando se considera a disposição tridimensional como um todo de uma cadeia simples de polipeptídios. Portanto, numa estrutura terciária, configurações tipo hélice e de lâminas pregueadas β fazem parte de sua formação. As ligações dissulfeto, assim como na estrutura primária, desempenham papel importante na estabilidade da estrutura terciária.

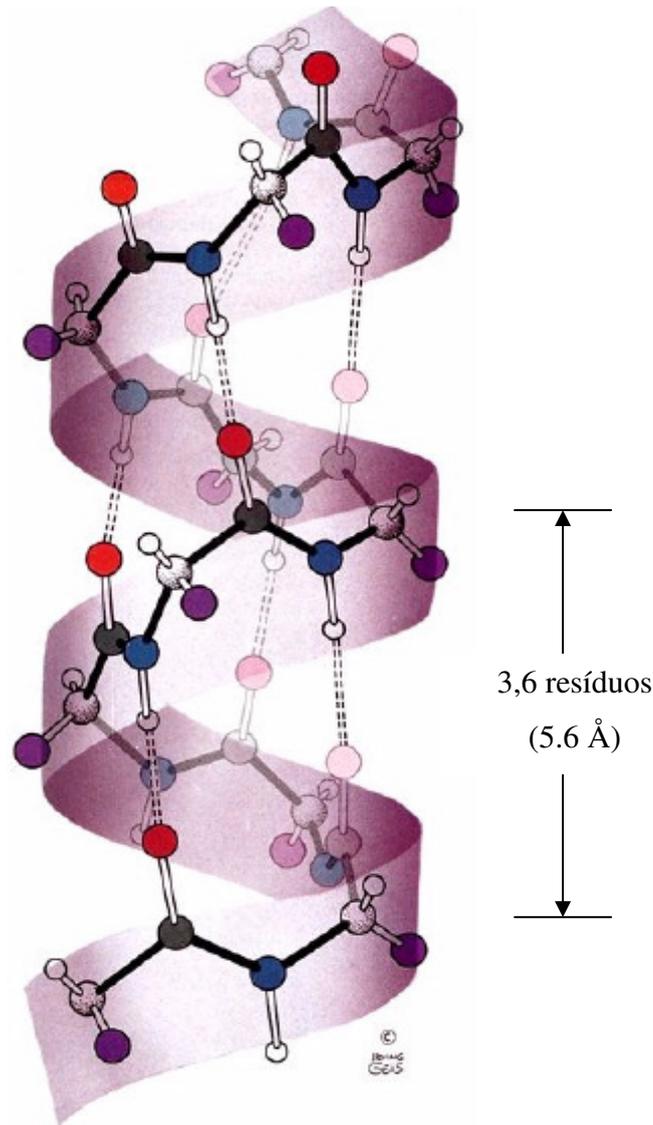


FIGURA 2.19 - Formação em hélice α . As ligações de hidrogênio ocorrem com espaçamento de quatro resíduos e são as principais responsáveis

A mioglobina e a hemoglobina foram as primeiras proteínas objeto de análise completa por difração de raios-x nos anos de 1957 e 1959, respectivamente. J.C. Kendrew e Max Perutz foram os autores do trabalho. A mioglobina, cuja estrutura secundária e terciária estão apresentadas na Figura 2.21, possui 153 aminoácidos, que estão divididos em cerca de oito sessões de formações hélice α separadas por dobramentos na cadeia peptídica [17, 19].

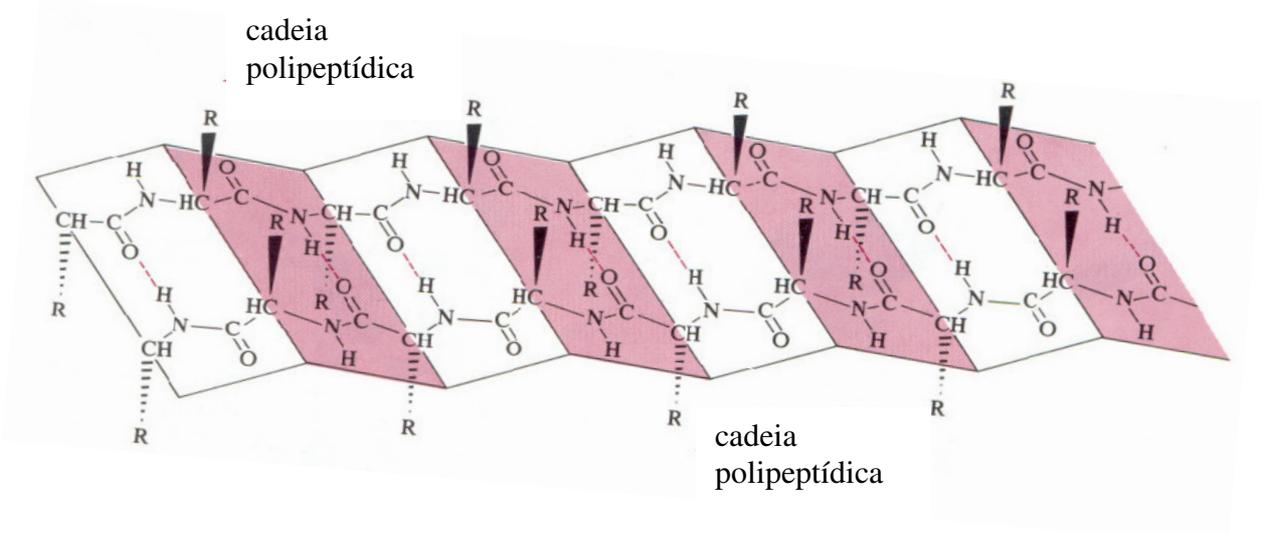


FIGURA 2.20 - Formação em lâminas ou placas pregueadas. As cadeias polipeptídicas se estendem paralelamente formando zig-zague

Como já mencionado, a natureza dos radicais dos aminoácidos desempenha importante papel na função que a proteína deve exercer. Radicais hidrofóbicos como aqueles pertencentes aos aminoácidos de leucina, isoleucina, valina, fenilalanina, alanina, e metionina [19] são quase sempre encontrados no interior das proteínas, livres do contato com a água que permeia o seu exterior. As interações não-polares desses radicais são as principais responsáveis pela compacta formação tridimensional da mioglobina. Por outro lado, na parte superficial, em contato com a água por ligações de hidrogênio, se encontram os radicais hidrofílicos dos aminoácidos lisina, arginina, serina, ácido glutâmico, histidina e glutamina [19]. Outra contribuição na estabilidade da estrutura da mioglobina é a atração eletrostática entre os radicais de lisina ($-\text{NH}_3^+$) e ácido glutâmico ($-\text{CO}_2^-$) [19].

O arranjo espacial entre duas ou mais subunidades de polipeptídios é o que representa a estrutura quaternária. A hemoglobina, proteína que transporta o oxigênio nas células do sangue é formada por quatro cadeias individuais de polipeptídios, duas cadeias α , cada uma com 146 resíduos e duas cadeias β também com 146 resíduos cada (Figura 2.22). Um único erro num aminoácido da cadeia β da hemoglobina é o suficiente para originar a doença de origem genética anemia falciforme; a posição 6 na hemoglobina normal ocupada pelo ácido glutâmico é substituída pela valina na hemoglobina do anêmico falciforme. A

estabilidade desse nível de estrutura é devida, principalmente, às interações hidrofóbicas das subunidades.

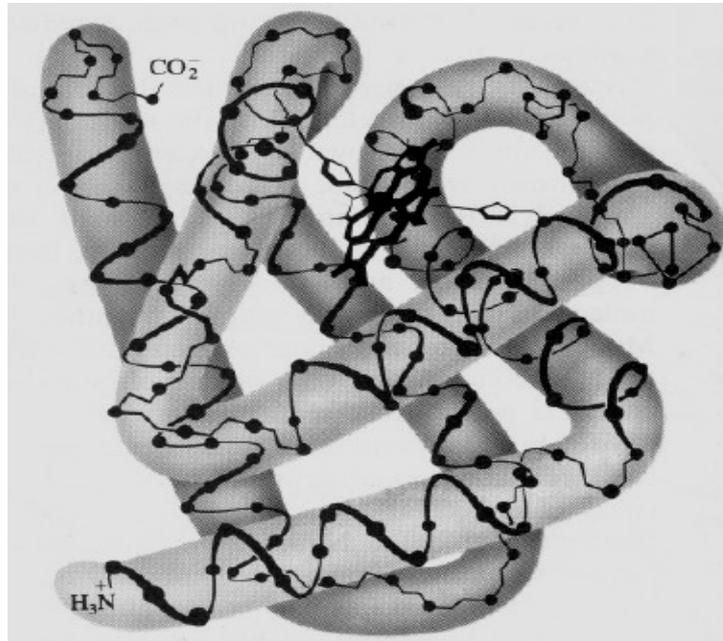


FIGURA 2.21 Estrutura secundária e terciária da mioglobina. Os aminoácidos hidrofóbicos se encontram no interior da estrutura e são os principais responsáveis pela estabilidade da mesma.

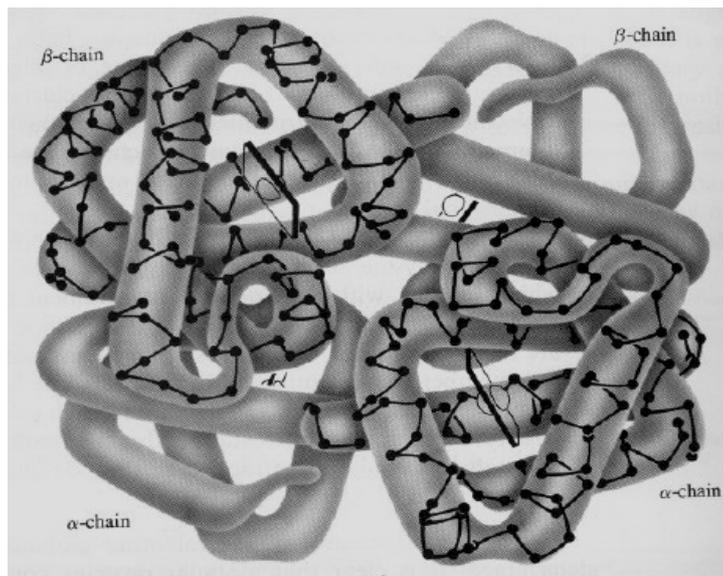


FIGURA 2.22 - Estrutura quaternária da hemoglobina. Duas formações em cadeia α e duas em cadeia β fazem parte da estrutura. A estabilidade da estrutura se deve, principalmente, às interações hidrofóbicas das subunidades.

As proteínas são classificadas de acordo com suas funções (enzimas, regulatórias, transportadoras, armazenamento, contráteis e móveis, protetoras, exóticas). Pelos exemplos que expomos nesse trabalho podemos chegar à conclusão de que a função que uma proteína exerce no organismo depende, essencialmente, da seqüência de aminoácidos que a compõe, de modo que as estruturas secundária, terciária e quaternária são conseqüências da estrutura primária. A natureza dos radicais dos aminoácidos é determinante na definição estrutural da proteína; a hidrofobicidade dos radicais talvez seja a propriedade mais importante para a estabilidade da proteína. O estudo das estruturas das proteínas, suas funções e interações entre elas próprias no organismo, tem crescido nos últimos anos e é conhecido por *proteoma* ou *proteômica*.

2.3.4. Síntese de proteína

Em 1953, James Watson e Francis Crick, baseados nas medidas de difração de raios-X em um cristal de DNA realizadas por Rosalind Franklin e Maurice Wilkins, propuseram um modelo para o DNA, no qual tal molécula se constituiria de dois filamentos, cada um formado por ligações fosfato-açúcar, dispostos de forma helicoidal, que são interligados por ligações de hidrogênio formadas entre os pares definidos de bases nitrogenadas: adenina (A), timina (T), guanina (G) e citosina (C). Segundo esse modelo o DNA seria o equivalente a uma escada torcida.

Não é a toa que os dois filamentos de polinucleotídeos das moléculas de DNA são unidos por ligações de hidrogênio. Por serem fracas, tais ligações propiciam maior facilidade na separação da molécula, expondo cada uma das partes ao mar de nucleotídeos presente na célula. Cada metade separada servirá como um molde e atrairá seletivamente os nucleotídeos, formando os devidos pares, de modo que no final do processo duas novas moléculas de DNA estarão formadas. Desta maneira, a estrutura em dupla hélice consegue explicar a capacidade de replicação do DNA (Figura 2.23).

O comando para a síntese das proteínas vem do DNA. Seqüências de trinças (códon) formadas pelas bases nitrogenadas representam o código para a formação das proteínas; cada trinca representa o código para um aminoácido; o número de diferentes trinças possíveis é 64 ($4 \times 4 \times 4$). Como são 20 os aminoácidos, chegou-se à conclusão que alguns responderiam por mais de um código, ou seja, o código do DNA é degenerado; é o que

acontece com a L-leucina, que corresponde às seguintes trincas: UUA, UUG, CUU, CUC, CUA, CUG. O RNA mensageiro (RNAm) é o responsável por transportar as informações delegadas pelo DNA para a formação das proteínas. Após a codificação feita pelo DNA (que nunca deixa o núcleo), o RNA deixa o núcleo da célula e é capturado pelos ribossomos; este lê as informações contidas no RNAm e, através do RNA transportador (RNAt), atrai os aminoácidos dispondo-os em seqüência à medida que as trincas são lidas, formando assim, uma proteína [20]. Tanto para o início como para o fim do processo de síntese de uma proteína, existem, igualmente, trincas específicas; para o início da síntese os genes usam a trinca ATG, enquanto que para o final da síntese o códon TAA é usado. Para maior aprofundamento dos assuntos aqui discutidos ver referências [16-21].



FIGURA 2.23 - Replicação do DNA. Os filamentos se separam, sendo expostos ao mar de nucleotídeos e duas novas moléculas de DNA são criadas.

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1. Crescimento dos cristais de L-leucina

Para o crescimento de cristais de L-leucina, uma solução composta de água destilada e pó de L-leucina (Vetec) foi preparada. Um agitador-aquecedor foi usado com o intuito de promover uma mistura o mais homogênea possível até que a solução chegasse à supersaturação; a concentração da solução foi baseada na curva de solubilidade do material. O pH após a supersaturação foi igual a 6. A solução foi filtrada e colocada num Becker, que foi fechado com filme e este perfurado várias vezes. Em seguida, a solução foi levada à geladeira, onde lá ficou até o recolhimento dos cristais que na solução cresceram. O método usado para o crescimento dos cristais de L-leucina foi o de evaporação lenta do solvente, onde a água presente na solução evapora, gerando uma precipitação do soluto na forma cristalina; o filme perfurado promove uma evaporação mais lenta do solvente, o que, geralmente, propicia o crescimento de cristais de boa qualidade.



FIGURA 3.1 - Cristal de L-leucina com seu hábito de crescimento típico

Uma boa quantidade de cristais bem transparentes foi recolhida do Becker; os mesmos eram bastante delgados, comparáveis a lâmina bastante fina. Os eixos foram

definidos de acordo com a seguinte convenção: O eixo z foi definido como aquele perpendicular ao plano cristalino, o eixo y como coincidente à maior dimensão do cristal e o eixo x foi definido como perpendicular aos eixos y e z. A Figura 1 mostra um dos cristais de L-leucina recolhidos da solução. Os cristais foram crescidos no laboratório de Crescimento de Cristais do Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará.

3.2. Medidas de absorção no infravermelho



FIGURA 3.2 - À esquerda, Prensa manual usada para compactar a mistura para a formação do disco. À direita, matriz usada na compactação da mistura composta de três partes.

A técnica utilizada para as medidas de absorção no infravermelho no cristal de L-leucina foi a dispersão em pastilhas de Kbr, onde um pedaço do cristal é moído e misturado ao pó de Kbr numa proporção de aproximadamente uma parte para dez. Em seguida uma

pequena porção da mistura é colocada cuidadosamente numa matriz para peletização (Figura 3.2). A matriz contendo a mistura é levada a uma prensa manual (Figura 3.2), onde nela permanece por cerca de vinte minutos. O resultado é um disco delgado e transparente. Em seguida o disco é preso a um dos acessórios do espectrômetro FTIR Spectrum One da Perkin Elmer (Figura 3.3) pertencente ao Parque de Desenvolvimento Tecnológico (PADETEC), onde as medidas de absorção são realizadas. Oito mapeamentos foram feitos com resolução espectral de 4 cm^{-1} .



FIGURA 3.3 Espectrômetro *Spectrum One* usado nas medidas de absorção no infravermelho. O disco de KBr é preso ao acessório indicado pela seta.

3.3. Medidas de espalhamento Raman

As medidas de espalhamento Raman foram realizadas utilizando-se um sistema de micro-Raman preparado para geometria de retroespalhamento num espectrômetro triplo da Jobin Yvon Triplemate 64000 equipado com CCD (*coupled charge device*) resfriado a nitrogênio líquido. Para se verificar a superfície da amostra nas medidas de pressão, também

foi utilizada uma câmera CCD. As fendas foram ajustadas a fim de se obter resolução espectral de 2 cm^{-1} . Um laser de argônio operando na linha 514,5 nm foi a fonte de excitação para as medidas de espalhamento Raman. A Figura 3.4 mostra uma vista geral do espectrômetro usado nas medidas Raman à temperatura ambiente. As medidas em altas temperaturas foram realizadas usando um forno resistivo.

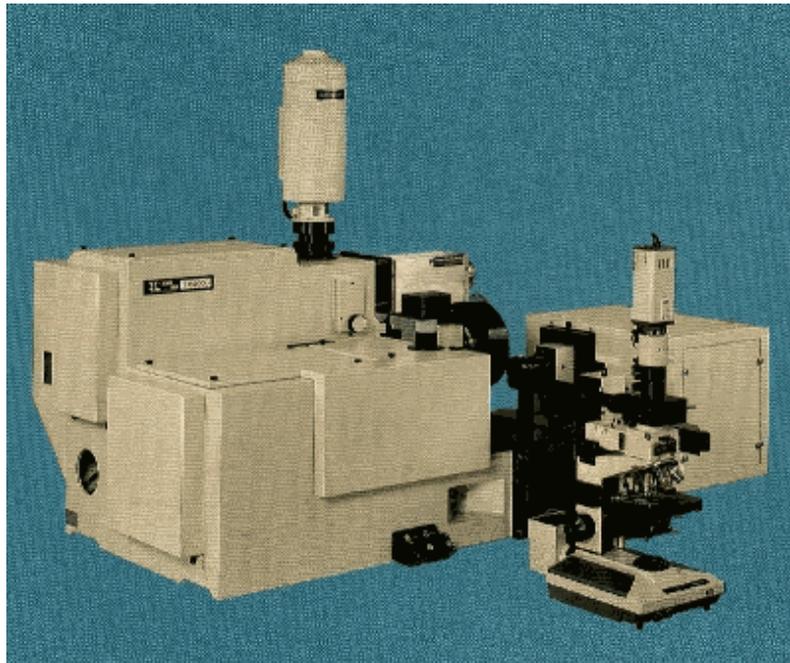


FIGURA 3.4 - Espectrômetro usado nas medidas de espalhamento Raman à temperatura ambiente.

Para as medidas de altas pressões hidrostáticas foi utilizada uma célula de pressão a extremos de diamantes do tipo NBS, sigla de *National Bureal of Standards*. Tal célula é usada, geralmente, em experiências nas quais a geometria de espalhamento é *backscattering* ou retroespalhamento, que foi aquele utilizado no nosso trabalho. Para facilitar a focalização da luz do laser sobre o rubi, no momento de se calibrar o valor da pressão no interior da célula, utilizou-se uma câmera CCD. A Figura 3.5 apresenta uma esquema típico da célula de pressão a extremos de diamante. Já a Figura 3.6 apresenta uma visão esquemática do interior da célula de pressão, mostrando-se a marca do diamante que é deixada sobre a gaxeta metálica, bem como um corte transversal da mesma.

No que diz respeito à calibração, a técnica comumente utilizada é a da luminescência do rubi, que foi usada em nossos experimentos. A técnica de luminescência do $\text{Al}_2\text{O}_3 : \text{Cr}^{3+}$ foi originalmente introduzida por Forman [22], embora outros materiais também sejam utilizados como o $\text{MgO} : \text{Cr}^{3+}$. De qualquer forma, descobriu-se que a luminescência dos

íons se desloca linearmente com a pressão, permitindo-se uma calibração bastante precisa da pressão no interior das células. Ademais, mostrou-se que quando o ambiente não é perfeitamente hidrostático no interior da célula as linhas R sofrem um alargamento característico; assim, além de ser uma sonda para se determinar o valor da pressão, também é uma sonda para se inferir a hidrostaticidade no interior do compartimento de pressão. À pressão atmosférica as linhas R possuem comprimentos de onda de 6227 a 6942 Å. Até cerca de 190 kbar o desvio de energia destas linhas com a pressão é linear [23] com um deslocamento de $7,53 \text{ cm}^{-1}/\text{GPa}$ [22-26].

No que diz respeito ao meio compressor, existem várias possibilidades, algumas delas sendo uma mistura de metanol-etanol (4:1), metanol-etanol-água (8:4:1), argônio líquido [26] ou mesmo hélio líquido [27]. Nos experimentos apresentados no Capítulo 6 desta tese foi utilizado como meio compressor a mistura metanol-etanol na proporção de 4:1.

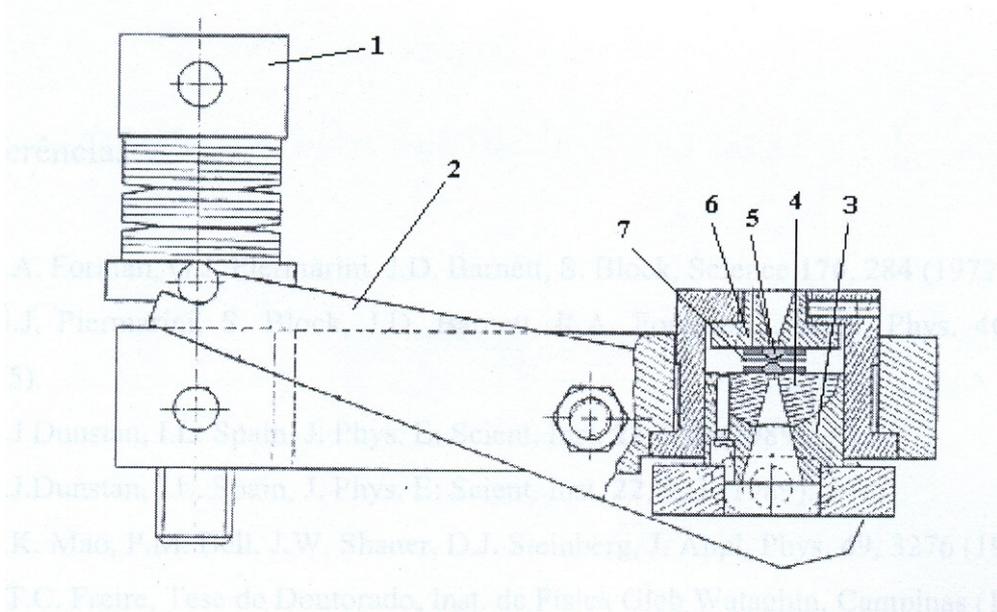


FIGURA 3.5 - Representação esquemática de uma célula de pressão a extremos de diamante.

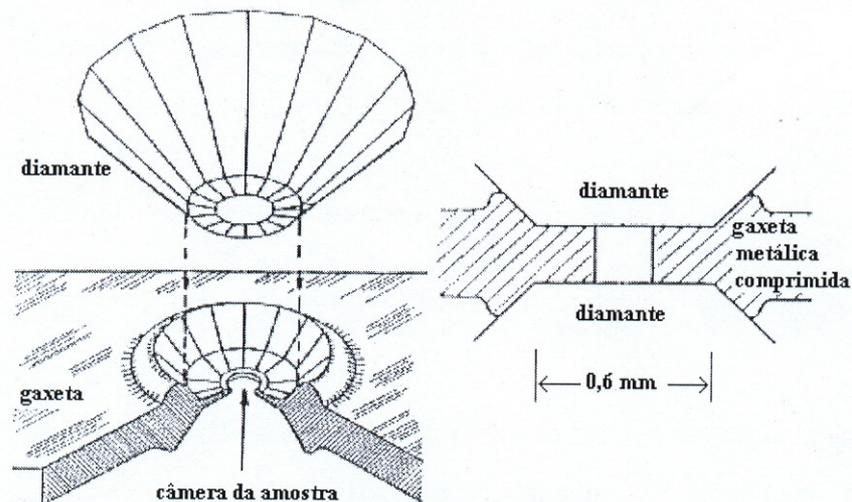


FIGURA 3.6 - Representação esquemática do interior de uma célula de pressão a extremos de diamante e um corte lateral da gaxeta onde a amostra fica localizada durante os experimentos. Sobre e sob a gaxeta encontram-se os diamantes e dentro do orifício são colocados a amostra (tipicamente com 80 μm de espessura), o rubi e o meio compressor.

4 PROPRIEDADES VIBRACIONAIS DO CRISTAL DE L-LEUCINA

O conhecimento da disposição dos átomos numa rede cristalina é imprescindível para se entender seu comportamento vibracional. Nesse capítulo descrevemos detalhes da estrutura do cristal de L-leucina, assim como também, discutimos a identificação de seus modos normais de vibração baseados em trabalhos já publicados acerca dos cristais de L-isoleucina e L-valina dentre outros aminoácidos.

4.1 Estrutura do cristal de L-leucina

A L-leucina ($C_6H_{13}NO_2$), à temperatura ambiente apresenta estrutura monoclínica, com quatro moléculas por célula unitária e pertence ao grupo espacial $P2_1$ (C_2^2); seus parâmetros de rede possuem as seguintes dimensões: $a = 14,666(2) \text{ \AA}$, $b = 5,324(7) \text{ \AA}$, $c = 9,606(3) \text{ \AA}$, $\beta = 94,06(3)^\circ$ [28]. Embora exista um outro trabalho sobre a estrutura da L-leucina [29], no qual os autores relatam que a posição dos átomos não foi acuradamente determinada devido à baixa qualidade de seus cristais, utilizamos como base o trabalho de M. Coll *et al.* [28] em que uma redeterminação da estrutura do cristal de L-leucina à temperatura ambiente foi feita de modo a garantir maior acurácia nas suas posições atômicas.

A célula unitária do cristal de L-leucina é mostrada na Figura 4.1 [28], onde as moléculas, na forma *zwitterion*, são dispostas em camadas paralelas à face *bc* da célula. Tais camadas interagem através de pontes de hidrogênio ou ligações de hidrogênio (LH) localizadas no centro da célula unitária. As duplas camadas ao longo do eixo *a* que separam as células unitárias são constituídas por hidrocarbonetos, mais especificamente de grupos metil, pertencentes ao radical da molécula de L-leucina. Portanto, a estrutura cristalina da L-leucina possui camadas hidrofóbicas que são intercaladas por camadas hidrofílicas. A Figura 4.2 mostra quatro células unitárias adjacentes do cristal de L-leucina dispostas no plano *ac* (os átomos de hidrogênio estão presentes no desenho).

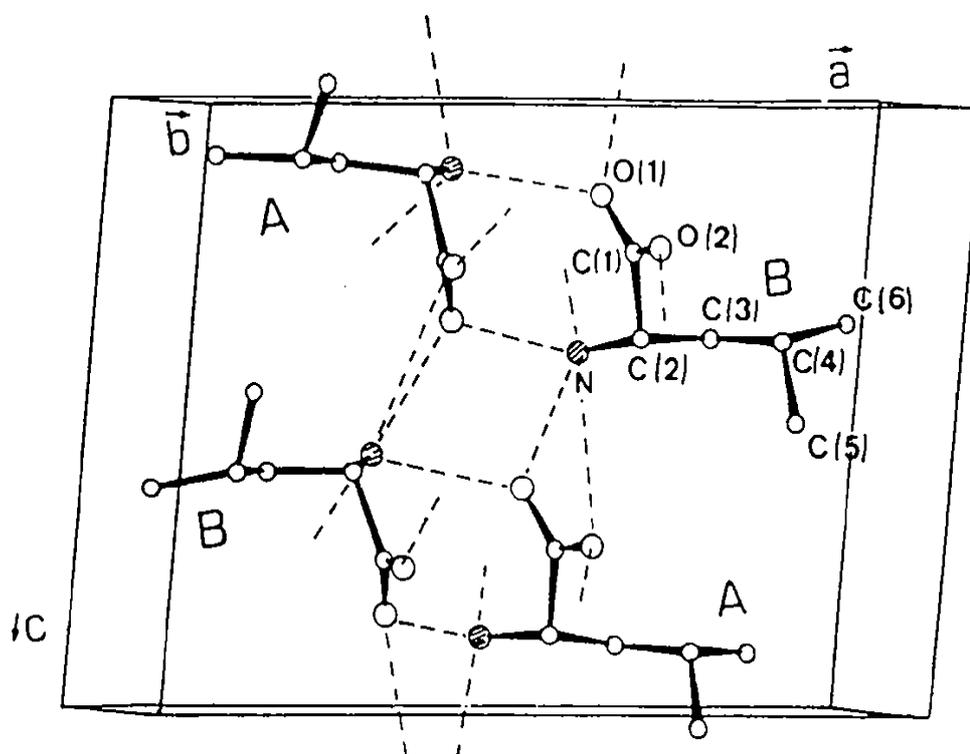


FIGURA 4.1 - Célula unitária do cristal de L-leucina. As duas diferentes configurações da molécula A e B interagem através das LH. As LH são representadas por linhas tracejadas. Os átomos de nitrogênio são representados por esferas hachuradas enquanto os átomos de carbono por esferas brancas (os átomos de hidrogênio foram ocultados) [28].

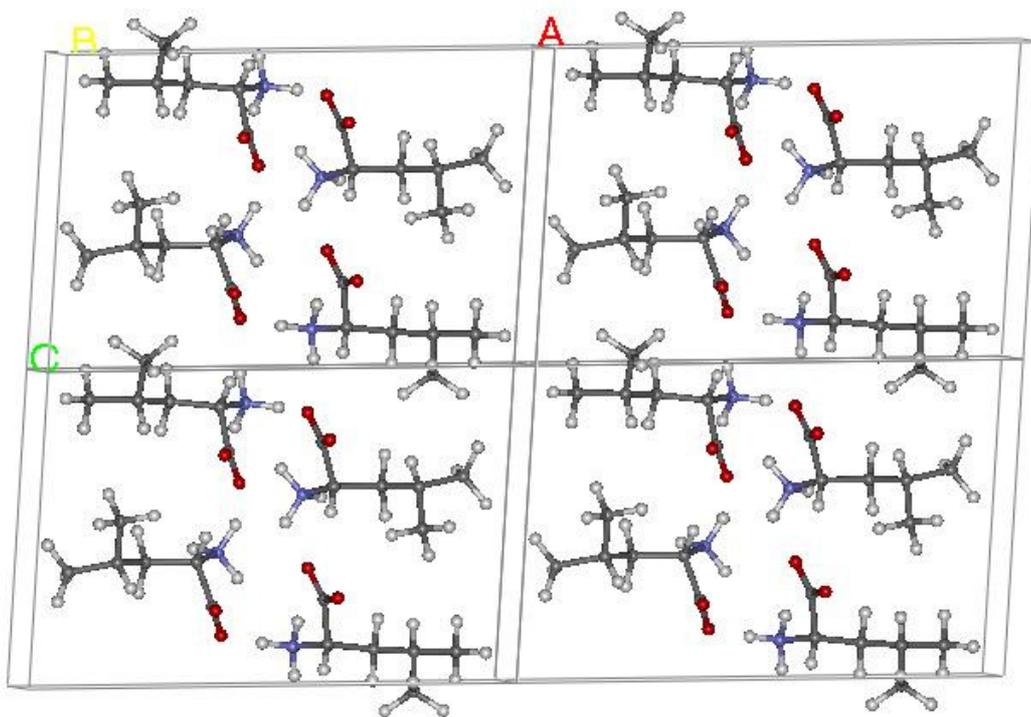


FIGURA 4.2 - Quatro células unitárias adjacentes do cristal de L-leucina no plano ac .

Outro ponto que chama atenção é o fato de existirem dois tipos independentes de configuração ou conformação para a molécula de L-leucina quando a mesma compõe o cristal (a Figura 4.1 mostra a relação espacial das duas conformações A e B). Antes de apresentarmos com maiores detalhes essa curiosa e surpreendente disposição estrutural do cristal de L-leucina, falaremos, de forma sintética, de algumas características das LH.

4.1.1 Ligações de Hidrogênio em Cristais Orgânicos

De modo geral, convencionou-se a simbologia B-H...A para a representação da ligação de hidrogênio, onde o traço representa, mais provavelmente, uma ligação covalente, enquanto que os pontos representam a LH. Para se ter uma idéia, a energia de ligação da ponte de hidrogênio varia entre 2 e 10 kcal/mol, enquanto que para a ligação covalente fica em torno de 50 a 100 kcal/mol [30]. Apesar de pequena comparada à energia de ligação da ligação covalente, a LH desempenha papel de grande relevância na estabilidade do cristal de L-leucina. Uma representação esquemática de uma LH envolvendo os átomos de nitrogênio, hidrogênio e oxigênio, é apresentada na Figura 4.3.

As distâncias H...O pertencentes às LH são bastante sensíveis às mudanças de natureza e vizinhança dos grupos doador e receptor, como mostra um estudo em 889 cristais orgânicos usando difração de raios-x e nêutrons [31]. A Tabela 4.1 mostra as médias das principais medidas envolvidas nas ligações de hidrogênio dos cristais orgânicos estudados. Uma ligação de hidrogênio pode ser formada tanto numa mesma molécula como em moléculas diferentes. A tendência a uma conformação linear para a LH é também observada; a linearidade aumenta quando a distância na ligação diminui. Uma relação entre os parâmetros listados na Tabela 4.1 pode ser feita no intuito de se realizar comparações entre a contribuição das pontes de hidrogênio intermolecular e intramolecular. Tais parâmetros, por exemplo, mostram que ligações intermoleculares do tipo r (H...O) são, geralmente, menores do que às intramoleculares. Por outro lado, a mesma tabela também nos diz que as ligações intramoleculares r (N-O) são menores que as intermoleculares correspondentes, sendo consistente, portanto, com a tendência do ângulo α (N-H...O) ser maior para as ligações intermoleculares do que para as intramoleculares. Quanto mais linear, mais forte a LH [31], e, portanto, as LH intermoleculares são mais fortes do que as intramoleculares; pode-se correlacionar, então, inversamente o ângulo α (N-H...O) à distância r (H...O). Para os cristais de aminoácidos, em geral, o ângulo α (N-H...O) tende a se aproximar de 180° e a ausência de LH intramoleculares também é observada.

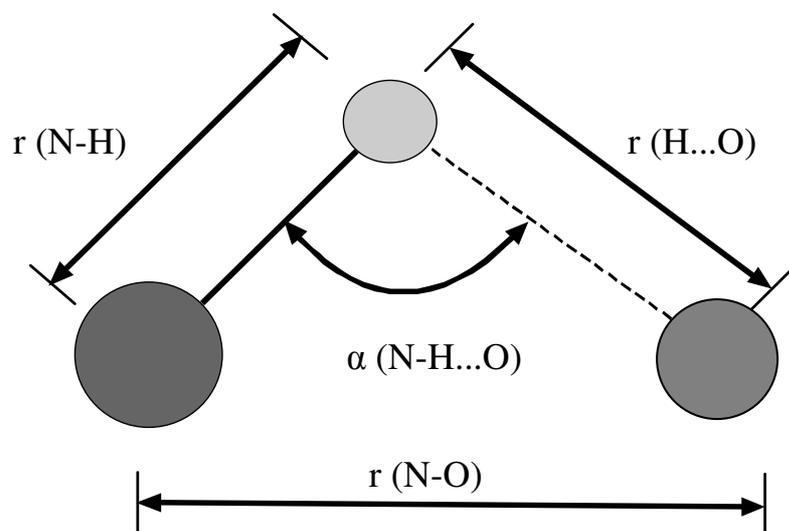


FIGURA 4.3 - Desenho esquemático de uma ligação de hidrogênio, típica de um cristal de aminoácido.

TABELA 4.1 - Valores médios dos principais parâmetros envolvidos nas ligações de hidrogênio.

Distribuição	Valor Médio
$r(\text{H} \cdot \text{O})$, todas as LH	1,921(4) Å
$r(\text{H} \dots \text{O})$, intermolecular	1,913(4) Å
$r(\text{H} \dots \text{O})$, intramolecular	1,988(13) Å
$r(\text{N} \cdot \text{O})$, todas as LH	2,878(3) Å
$r(\text{N} \cdot \text{O})$, intermolecular	2,892(3) Å
$r(\text{N} \cdot \text{O})$, intramolecular	2,755(12) Å
$\alpha(\text{N} \cdot \text{H} \dots \text{O})$, todas as LH	158,3(4)°
$\alpha(\text{N} \cdot \text{H} \dots \text{O})$, intermolecular	161,2(3)°
$\alpha(\text{N} \cdot \text{H} \dots \text{O})$, intramolecular	132,5(15)°

Voltaremos em seguida à discussão sobre a disposição estrutural do cristal de L-leucina; mais especificamente, trataremos das diferentes conformações da L-leucina, conhecidas como *gauche 1* e *trans*.

4.1.2 Configurações *gauche 1* e *trans* no cristal de L-leucina

A molécula de L-leucina, como já mencionado, possui duas diferentes conformações quando compõe a estrutura cristalina. Tais conformações estão presentes na mesma célula unitária e são conhecidas como *gauche 1* e *trans*. Na verdade, os aminoácidos hidrofóbicos como a L-valina, L-isoleucina e L-metionina também apresentam essa interessante característica de possuir duas diferentes conformações na mesma célula unitária; além de pertencerem ao mesmo grupo espacial. Na conformação *gauche 1* o átomo de nitrogênio do grupo amina (NH_3^+) se liga a três diferentes átomos de oxigênio do grupo carboxílico através de LH. Por outro lado, na conformação *trans*, o nitrogênio possui quatro ligações com diferentes átomos de oxigênios, onde um dos hidrogênios é responsável por duas ligações simultaneamente; esse tipo de ligação é comumente chamada de ligação de hidrogênio bifurcada (LHB). Um desenho esquemático das pontes de hidrogênio das duas conformações é exposto na Figura 4.4, onde as distâncias $r(\text{N-O})$ das LH são apresentadas, enquanto que a Tabela 4.2 expõe além dessas, as distâncias $r(\text{H}\dots\text{O})$. A ligação $\text{N(A)-H}\dots\text{O(1B)}$, por exemplo, representa a ligação do nitrogênio da molécula A (conformação *gauche 1*) e o oxigênio 1 da molécula B (conformação *trans*). A média das distâncias $r(\text{H}\dots\text{O})$ do cristal de L-leucina, pela Tabela 4.2, é de 1,849 Å, compatível com o valor médio apresentado na Tabela 4.1. As duas diferentes conformações da molécula de L-leucina (sem os hidrogênios), contendo os principais ângulos e distâncias intramoleculares, são apresentadas na Figura 4.5, enquanto que na Tabela 4.3 as coordenadas atômicas fracionárias são mostradas.

TABELA 4.2 - Distância das LH no cristal de L-leucina em Å.

A-H...B	A...B	H...B
N(A)-H...O(1B)	2,881(9)	1,753(9)
N(A)-H...O(2A ⁱ)	2,885(11)	1,887(11)
N(A)-H...O(1B ⁱⁱ)	2,789(9)	1,721(9)
N(B)-H...O(1A)	2,764(9)	1,689(9)
N(B)-H...O(1A ⁱⁱⁱ)	2,952(9)	2,104(9)*
N(B)-H...O(2A ⁱⁱⁱ)	3,070(10)	2,027(10)*
N(B)-H...O(2B ⁱ)	2,842(11)	1,765(11)

Código de simetria: (i)x, -1+y, z; (ii)1-x, -1/2+y, 2-z;(iii)1-x, -1/2+y, 1-z.

* Ligação de hidrogênio bifurcada.

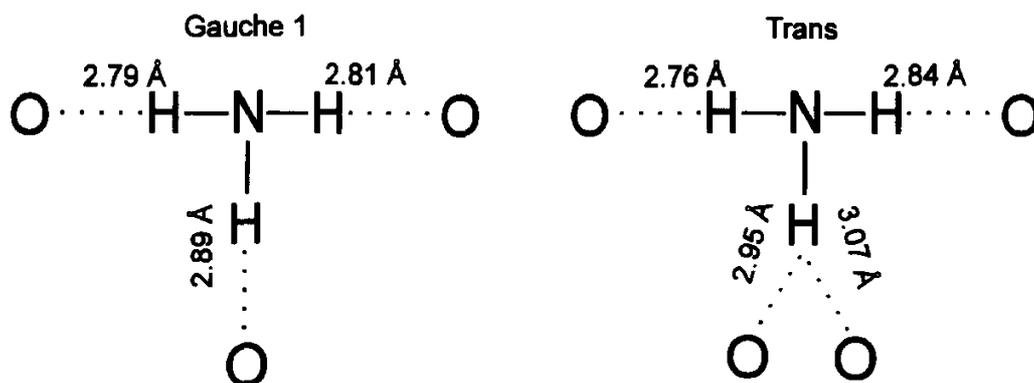


FIGURA 4.4 - Representação esquemática das LH presentes nas duas conformações da molécula de L-leucina. As distâncias apresentadas são r (N-O).

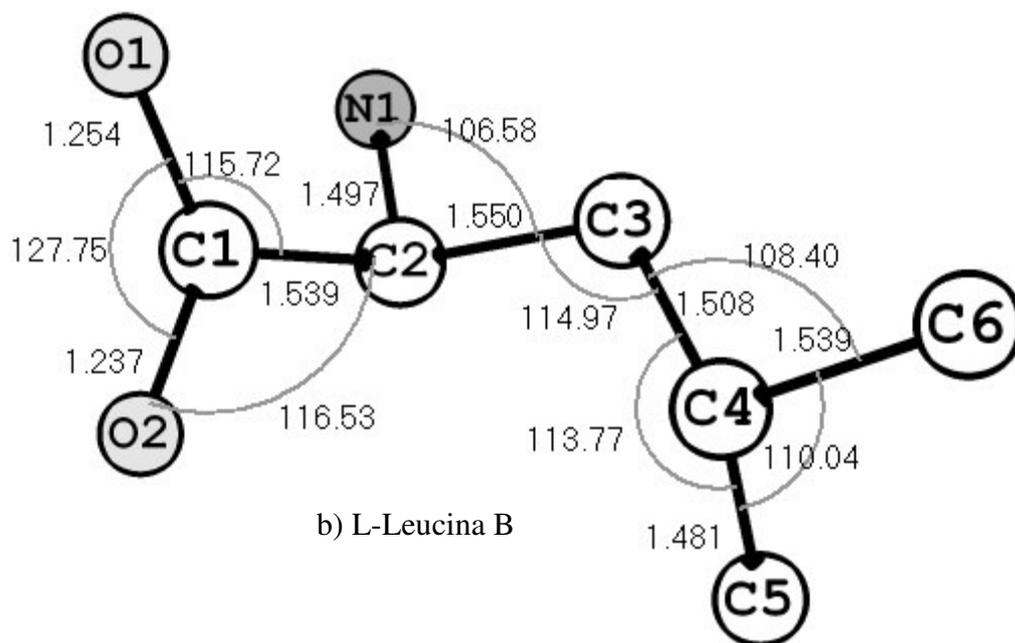
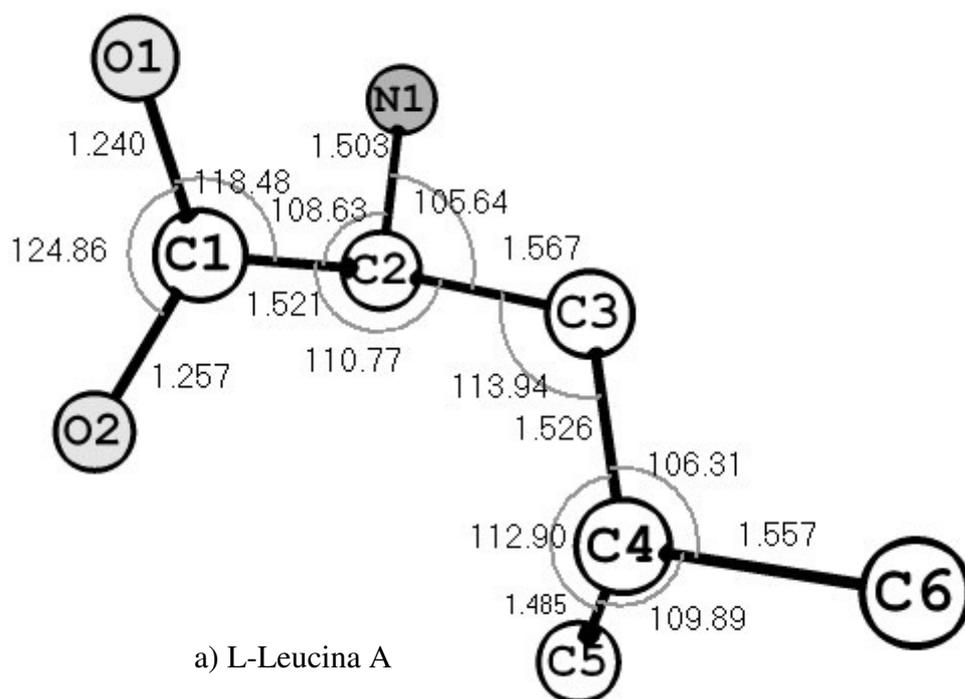


FIGURA 4.5 - As duas diferentes conformações das moléculas de L-Leucina. a) Conformação *gauche 1* (A) mostrando os ângulos e distâncias intramoleculares. b) Conformação *trans* (B) com os respectivos ângulos e distâncias intramoleculares.

TABELA 4.3 - Coordenadas atômicas fracionárias das moléculas de L-leucina A e B.

	x	y	z
N(A)	0,5746	0,1644	0,8874
O(1A)	0,5870	0,3815	0,6389
O(2A)	0,6363	0,7426	0,7305
C(1A)	0,6184	0,5122	0,7379
C(2A)	0,6363	0,3888	0,8800
C(3A)	0,7361	0,2829	0,8979
C(4A)	0,8100	0,4853	0,9049
C(5A)	0,8073	0,6485	1,0299
C(6A)	0,9032	0,3446	0,9079
N(B)	0,4050	0,2545	0,5873
O(1B)	0,4136	0,4496	0,8471
O(2B)	0,3820	0,8350	0,7645
C(1B)	0,3861	0,6036	0,7547
C(2B)	0,3526	0,4893	0,6130
C(3B)	0,2507	0,4123	0,6130
C(4B)	0,1841	0,6283	0,6114
C(5B)	0,1781	0,7725	0,4792
C(6B)	0,0894	0,5242	0,6405

4.2 Modos normais de vibração do cristal de L-leucina

De posse do espectro Raman de uma substância, podemos tentar identificar cada modo normal de vibração que o efeito Raman nos expõe. A identificação de modos associados a importantes grupos funcionais desvenda parte do problema. Modos relacionados às unidades CO_2 , CH_3 e NH_3 presentes na estrutura cristalina da L-leucina e em outros aminoácidos, são relativamente fáceis de se reconhecer devido à forte regularidade de comportamento que tais grupos funcionais apresentam nas diversas substâncias. Tais unidades, quando livres, possuem determinadas simetrias e modos normais característicos. No entanto, quando essas unidades estão confinadas a uma estrutura pertencente a uma rede cristalina, seus grupos de simetria e frequências de vibração, sofrem modificações, especialmente nos cristais de aminoácidos, onde as pontes de hidrogênio exercem importante influência sobre elas.

A deuteração de um aminoácido (troca de átomos de hidrogênio por átomos de deutério) também tem papel importante na identificação dos modos normais, uma vez que o deutério, por ter massa maior do que o hidrogênio, provoca uma diminuição nos valores de frequências associadas a unidades contendo este elemento como, por exemplo, a unidade NH_3^+ . Outra ferramenta importante na identificação dos modos de vibração de um aminoácido é a comparação do seu espectro Raman com espectros de substâncias similares já estudadas e que são geralmente mais simples. A L-leucina, por ser um aminoácido, pode ser comparada a outros aminoácidos já estudados, principalmente àqueles que só possuem radical composto de cadeia alifática como a glicina, L-alanina, L-isoleucina e L-valina.

Quando um material é submetido a perturbações externas tais como temperatura ou pressão, importantes propriedades vibracionais podem ser obtidas quando se usa, por exemplo, a técnica de espalhamento Raman como sonda eletromagnética. Qualquer transição de fase que por ventura a substância apresente, poderá ser revelada por tal técnica. Os espectros Raman de uma substância submetida a perturbações externas apresentam algumas características principais como: 1) deslocamento no número de onda dos modos de vibração; 2) alterações nas intensidades relativas das bandas; 3) mudança na forma das bandas. A identificação dos modos normais de vibração da substância é importante na elucidação do mecanismo da transição, já que um mapeamento das regiões onde ocorrem as mudanças espectrais pode ser feito. Portanto, antes de expormos o estudo das propriedades vibracionais do cristal de L-leucina sob variação da temperatura (apresentado no capítulo 5), destinamos

essa seção ao estudo de identificação de seus modos normais de vibração. Os modos do cristal de L-leucina foram comparados aos modos de outros cristais de aminoácidos, especialmente à L-isoleucina e à L-valina. Estes dois últimos aminoácidos além de serem de cadeia alifática, ambos pertencem ao mesmo grupo de simetria, à temperatura ambiente, daquele do cristal de L-leucina.

4.2.1 Geometrias de Espalhamento

As medidas no cristal de L-leucina foram feitas em duas diferentes geometrias de espalhamento. Adotamos nesse trabalho a notação de Porto [32], que utiliza 4 letras dispostas na forma a(bc)d. As letras a e b representam a direção e a polarização da radiação incidente, respectivamente, enquanto que c e d representam, respectivamente, a polarização e a direção da radiação espalhada. As duas geometrias de espalhamento que usamos no cristal de L-leucina foram z(xx)z e z(yy)z (que pertencem à mesma representação irreduzível A), já que só nos foi possível usar o retroespalhamento. Isto acontece porque o cristal de L-leucina tem a dimensão c muito pequena, tornando-o quase bidimensional e impossibilitando geometrias de espalhamento do tipo x(bc)x e y(bc)y. A seguir, apresentamos os espectros Raman do cristal de L-leucina à temperatura ambiente divididos por regiões.

4.2.2 Região 50-700 cm^{-1}

Nessa região, números de onda abaixo de 150 cm^{-1} , geralmente são observadas bandas que estão associadas a modos em que os átomos da célula unitária vibram como um todo. Daí tais modos serem conhecidos por modos de rede ou ainda modos externos. A região dos modos da rede é, portanto, de grande importância na detecção de eventuais transições de fase estruturais.

A Figura 4.6 mostra os espectros Raman da L-leucina para as duas geometrias de espalhamento. Logo acima de 150 cm^{-1} destacamos a banda em 175 cm^{-1} , pertencente às duas geometrias de espalhamento z(xx)z e z(yy)z, que associamos à torção da unidade CO_2^- , bem como também as bandas em 185 e 205 cm^{-1} para a geometria z(yy)z, que podem ser associadas a torções do CH $\{\tau(\text{CH})\}$ [33]. Na geometria z(xx)z as bandas em 245 e 288 cm^{-1} são associadas à vibração fora do plano de torção do CH ($\tau(\text{CH})$) e CH_3 $\{\tau(\text{CH}_3)\}$ [34],

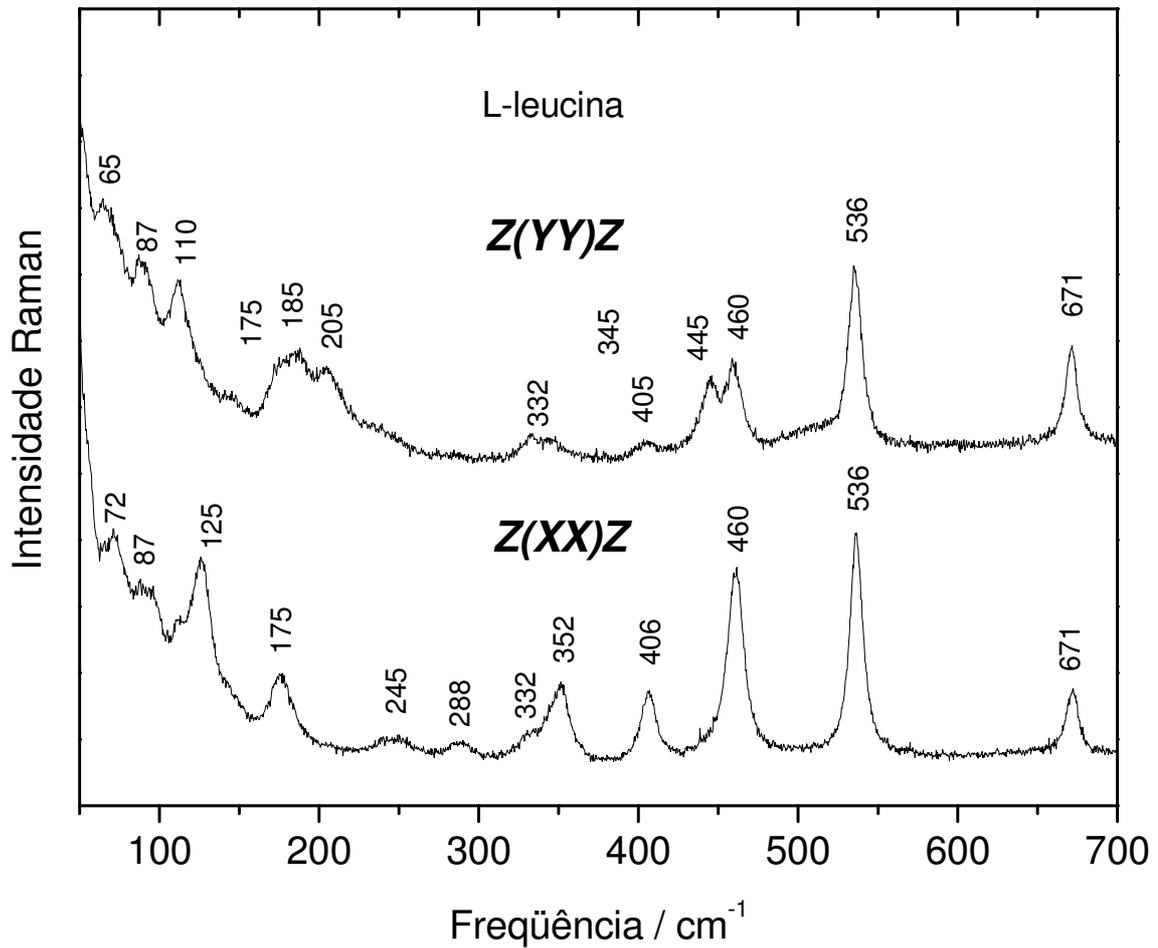


FIGURA 4.6 - Espectros Raman do cristal de L-leucina à temperatura ambiente em duas diferentes geometrias de espalhamento na região 50-700 cm^{-1} .

respectivamente. Na L-valina, a título de comparação, a $\tau(\text{CH}_3)$ é observada em 297 cm^{-1} [35].

A banda de baixa intensidade em 332 cm^{-1} é identificada com a deformação do NCC $\{\delta(\text{NCC})\}$ [9], e as bandas em 352, 406, 445 e 460 cm^{-1} (todas pertencentes às duas geometrias de espalhamento, exceto a de 445 cm^{-1} , que pertence à geometria z(yy)z) são designadas como deformação estrutural do esqueleto da molécula [34]. No entanto, em todos os aminoácidos as torções do NH_3^+ ($\tau(\text{NH}_3^+)$) encontram-se nesta região espectral [36-38]. Para finalizar essa região, temos as bandas em 536 e 671 cm^{-1} que possuem forte intensidade e são associadas, respectivamente, ao *rocking* e ao *wagging* da unidade de CO_2^- $\{r(\text{CO}_2^-)$ e $w(\text{CO}_2^-)\}$ [33, 34]. Na L-Alanina, por exemplo, o $r(\text{CO}_2^-)$ é observado em 532 cm^{-1} [35],

enquanto que na L-Treonina o modo $w(\text{CO}_2^-)$ é observado em 714 cm^{-1} [8]. O *rocking* (oscilação) e o *wagging* (balanço) são ramificações do *bending* (dobramento). Tomando como exemplo a unidade CO_2^- , o *rocking* equivale ao movimento dos átomos de oxigênio em fase no plano desta unidade. Quando o movimento é fora de fase a vibração é classificada como *scissoring* (corte) assemelhando-se a uma tesoura em movimento de corte. O *wagging* equivale ao movimento dos átomos de oxigênio em fase fora do plano da unidade CO_2^- , enquanto que o movimento fora do plano e fora de fase é classificado como *twisting*

Para fazer uma comparação do comportamento vibracional entre os aminoácidos, apresentamos na Figura 4.7 os espectros dos cristais de L-leucina, L-valina e L-isoleucina em diversas geometrias de espalhamento para a região espectral $50\text{-}700\text{ cm}^{-1}$.

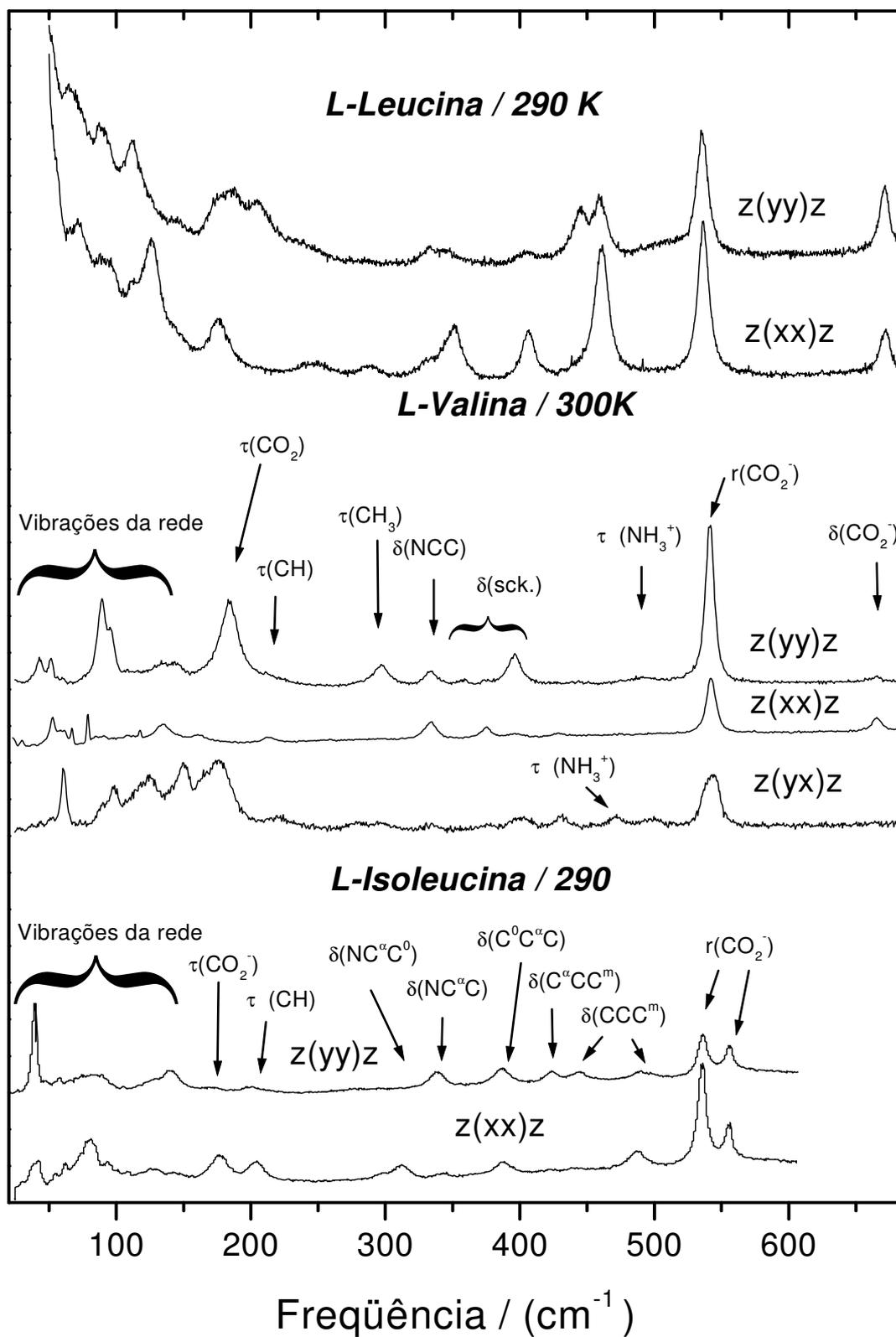


FIGURA 4.7 - Espectros comparativos dos cristais de aminoácido de L-leucina, L-valina e L-isoleucina em diversas representações na região $25\text{-}700\text{ cm}^{-1}$.

4.2.3 Região 700-1270 cm^{-1}

Os espectros Raman à temperatura ambiente para as duas geometrias de espalhamento do cristal de L-leucina são apresentados na Figura 4.8. Nessa região, começamos por assinalar a banda em 777 cm^{-1} , na geometria $z(xx)z$, como associada à deformação do CO_2^- $\{\delta(\text{CO}_2^-)\}$ [34]. As bandas em 838 e 849 cm^{-1} apresentam inversão de intensidade quando as duas geometrias de espalhamento são comparadas e são atribuídas, respectivamente, a vibrações fora do plano do CO_2^- $\{\gamma(\text{CO}_2^-)\}$ e *rocking* de CH_3 $\{r(\text{CH}_3)\}$ [33]. Na L-valina o modo $\gamma(\text{CO}_2^-)$ é observado em 825 cm^{-1} . A região espectral $900\text{-}1100 \text{ cm}^{-1}$

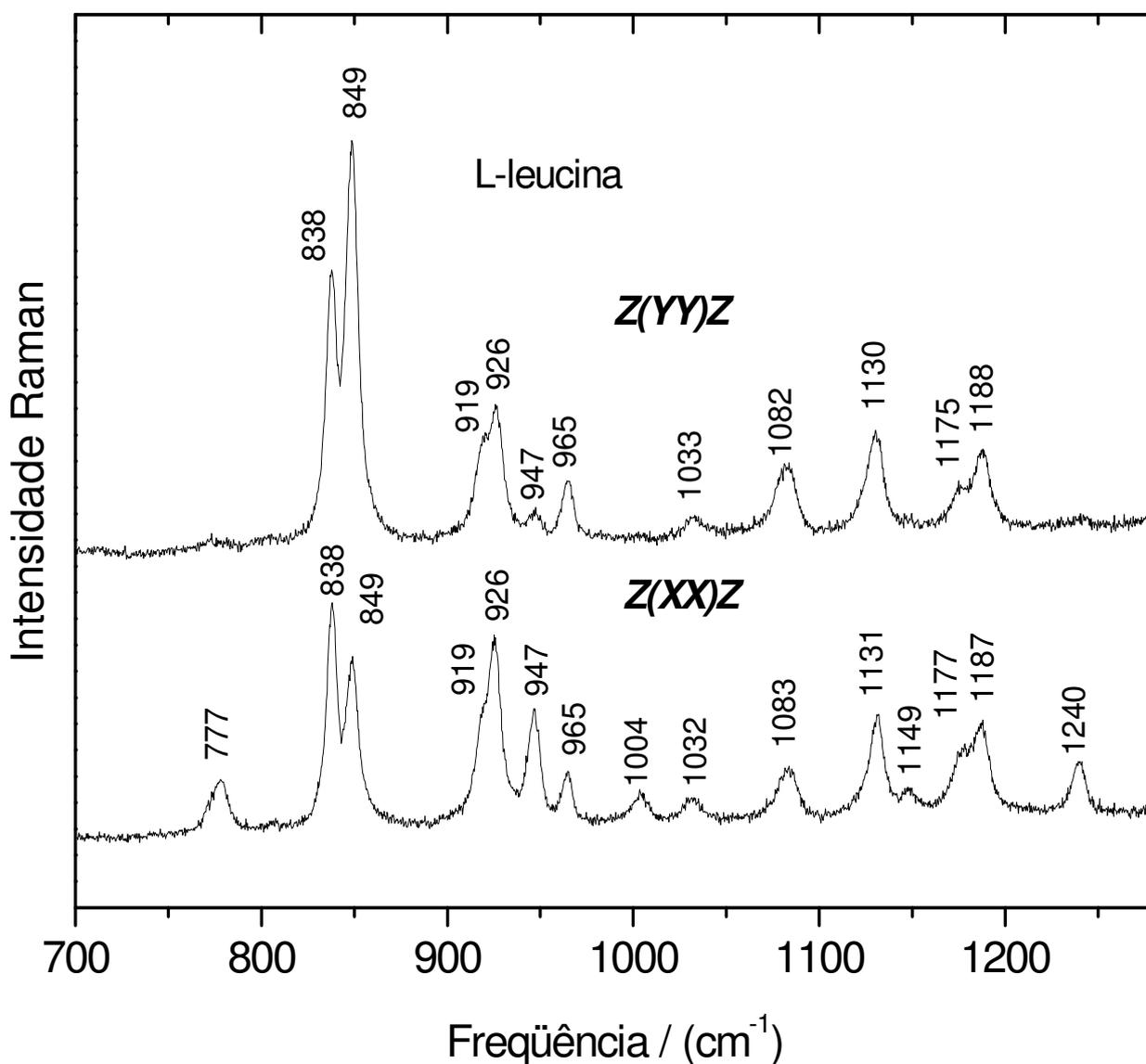


FIGURA 4.8 - Espectros Raman do cristal de L-leucina na região $700\text{-}1270 \text{ cm}^{-1}$ a temperatura ambiente nas geometrias de espalhamento $z(yy)z$ e $z(xx)z$.

é caracterizada por bandas associadas a *stretching* de CC e CN [33, 9, 39]. As bandas em 1131, 1177 e 1188 cm^{-1} , observadas em ambas as geometrias, são atribuídas ao *rocking* da unidade $\text{NH}_3^+ \{r(\text{NH}_3^+)\}$ [9]. Na L-treonina observam-se os modos $r(\text{NH}_3^+)$ em 1117 e 1124 cm^{-1} [8]. A banda em 1240 cm^{-1} aparece somente em $z(xx)z$ e é atribuída, por tentativa, à torção do $\text{CH}_2 \{\tau(\text{CH}_2)\}$ [33]. O gráfico comparando os espectros dos três aminoácidos nessa região espectral pode ser visto na Figura 4.9.

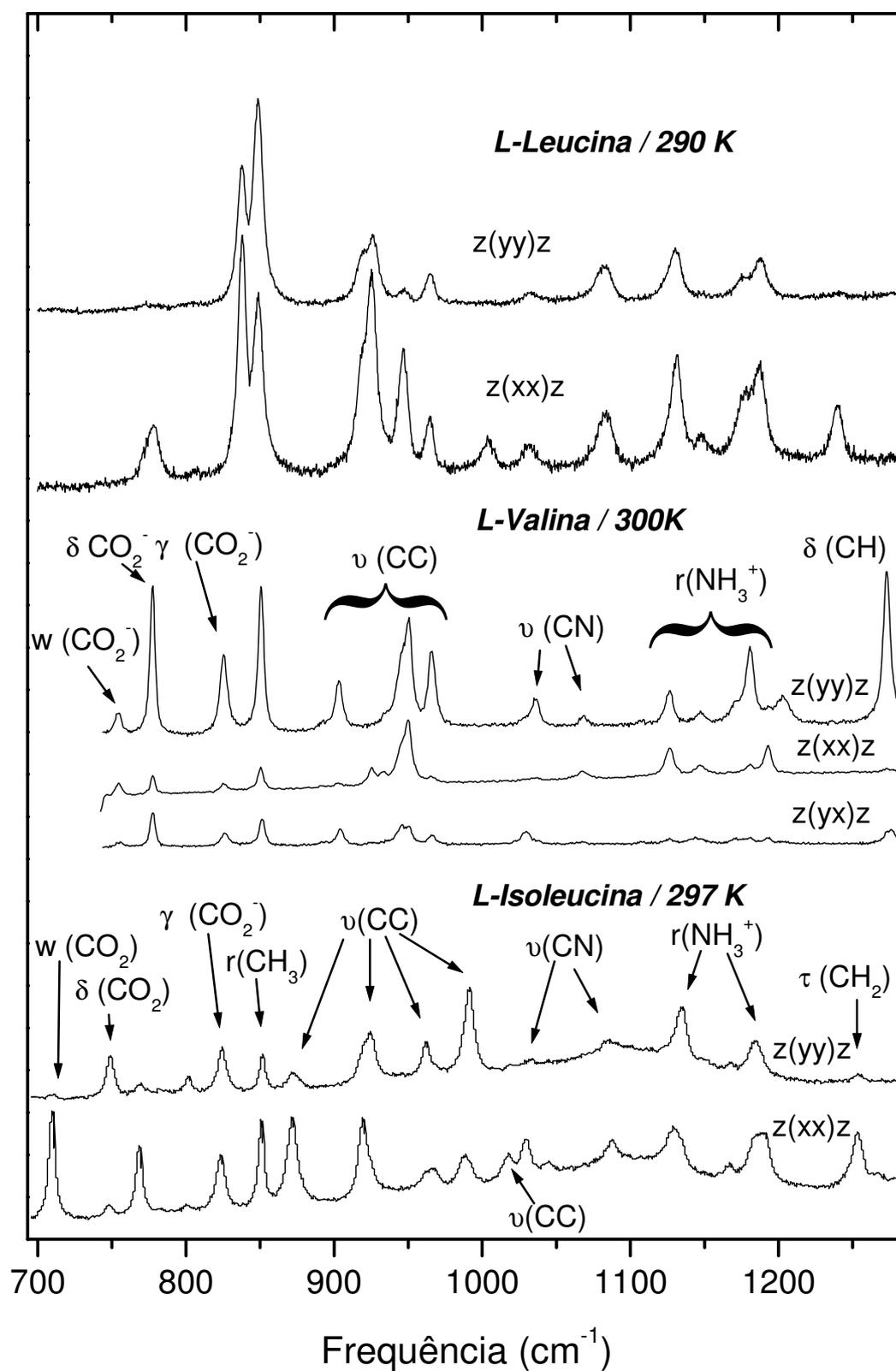


FIGURA 4.9 - Espectros comparativos dos cristais de aminoácido de L-leucina, L-valina e L-isoleucina em diversas representações na região $700-1270\text{ cm}^{-1}$

4.2.4 Região 1280-1700 cm^{-1}

Na Figura 4.10 estão apresentados os dois espectros do cristal de L-leucina em duas geometrias de espalhamento à temperatura ambiente. A maioria das bandas na região 1300-1375 cm^{-1} são atribuídas a deformações da unidade CH [33, 40]. Para ambas as geometrias de espalhamento as bandas observadas em 1391 e 1411 cm^{-1} são associadas ao dobramento simétrico do $\text{CH}_3\{\delta_s(\text{CH}_3)\}$, enquanto que as bandas em 1458 e 1475 cm^{-1} são

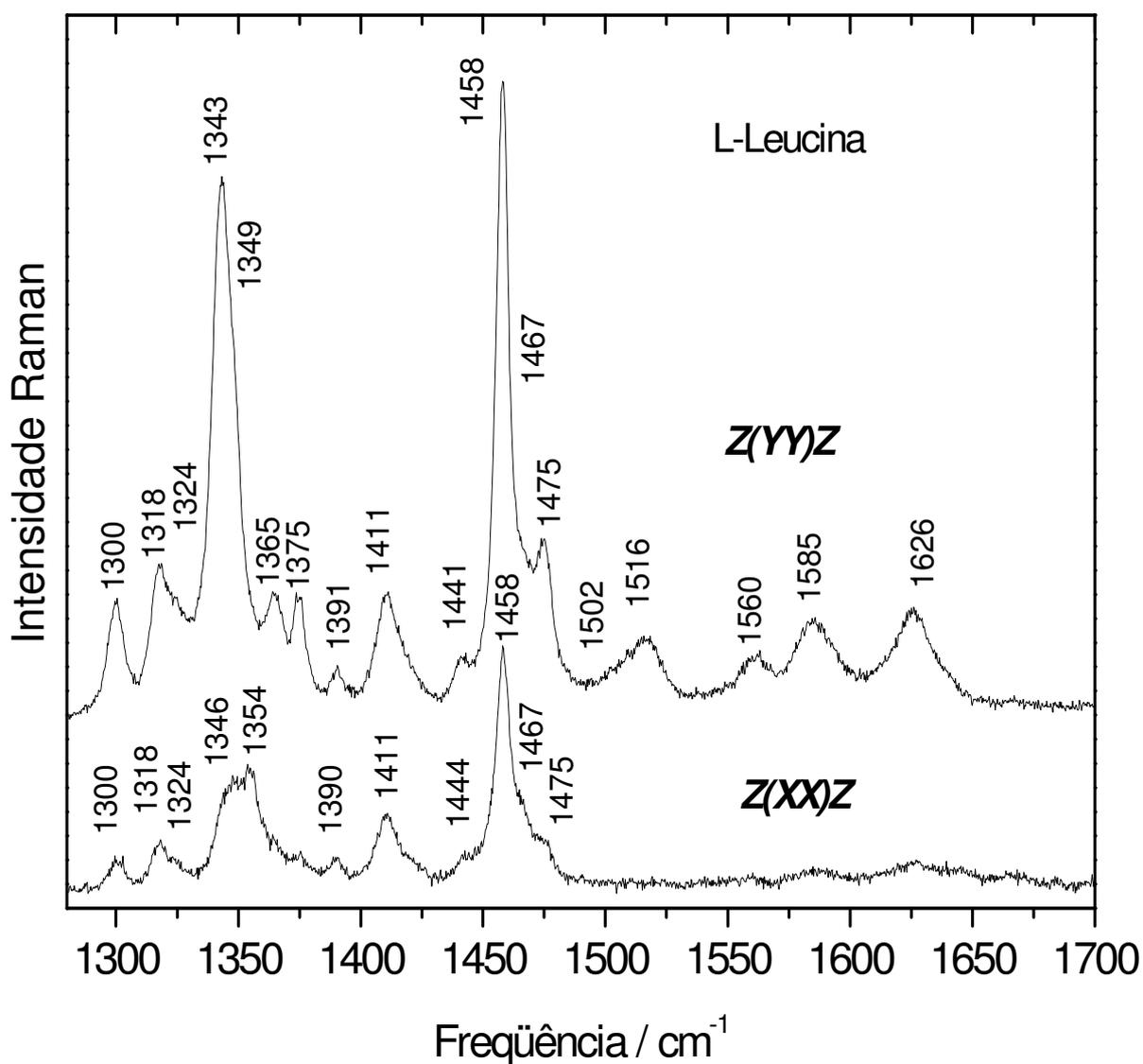


FIGURA 4.10 - Espectros comparativos dos cristais de aminoácido de L-leucina, L-valina e L-isoleucina em diversas representações na região 700-1270 cm^{-1} .

atribuídas ao dobramento assimétrico do $\text{CH}_3\{\delta_a(\text{CH}_3)\}$. As bandas em 1560 , 1585 e 1626 cm^{-1} são associadas ao stretching do $\text{CO}_2^- \{\nu(\text{CO}_2^-)\}$. Através do gráfico comparativo da Figura 4.11 é possível perceber comportamento similar para as três bandas atribuídas ao $\nu(\text{CO}_2^-)$; além da proximidade das bandas, as mesmas guardam intensidades relativas muito semelhantes.

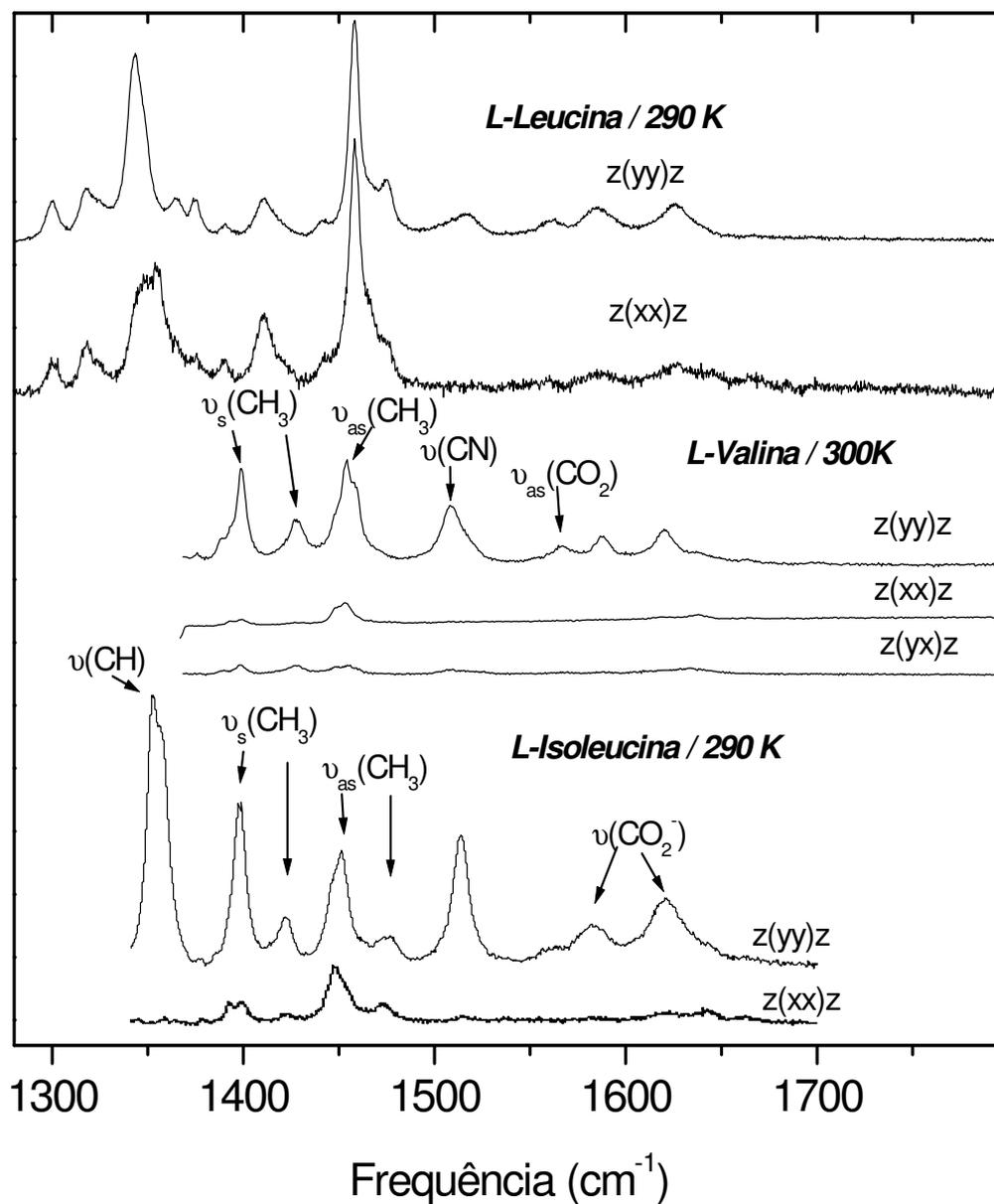


FIGURA 4.11 - Espectros comparativos dos cristais de aminoácido de L-leucina, L-valina e L-isoleucina em diversas representações na região $1280\text{-}1700$ cm^{-1}

4.2.5 Região 2700-3100 cm^{-1}

A região de alta frequência dos espectros Raman do cristal de L-leucina, 2700-3100 cm^{-1} , é apresentada na Figura 4.12 para duas geometrias de espalhamento. A ausência de bandas acima de 3100 cm^{-1} indica que o cristal cresceu em sua forma anidra, pois a presença do *stretching* de OH se caracteriza por uma banda larga centrada por volta de 3400 cm^{-1} .

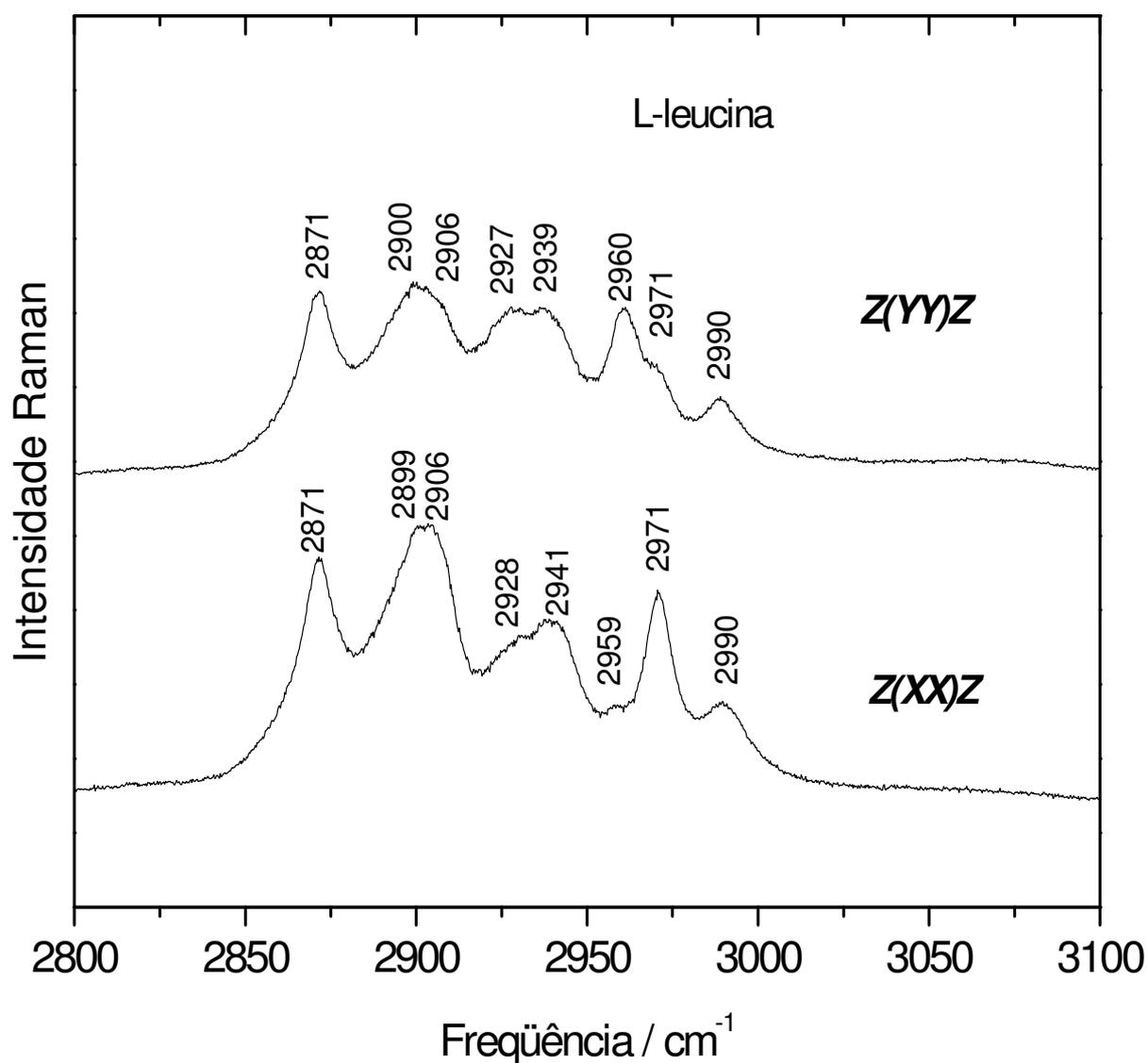


FIGURA 4.12 - Espectros Raman do cristal de L-leucina na região 2800-3100 cm^{-1} a temperatura ambiente nas geometrias de espalhamento z(yy)z e z(xx)z.

De fato, no cristal de L-arginina clorohidrato monohidratado observa-se uma banda larga centrada em $\sim 3340 \text{ cm}^{-1}$ [41] e no cristal de L-histidina clorohidrato monohidratado [42] observa-se uma banda centrada em 3400 cm^{-1} , ambas associadas a vibrações do tipo estiramento da unidade OH. As bandas contidas nessa região, geralmente, são atribuídas à *stretchings* de CH, CH₃ e NH₃. No entanto, sabe-se, que bandas associadas ao stretching do grupo NH₃ possuem baixa intensidade no espectro Raman. O gráfico que compara os espectros dos três aminoácidos é mostrado na Figura 4.13. A Tabela 4.4 apresenta um apanhado de todas as atribuições discutidas acima.

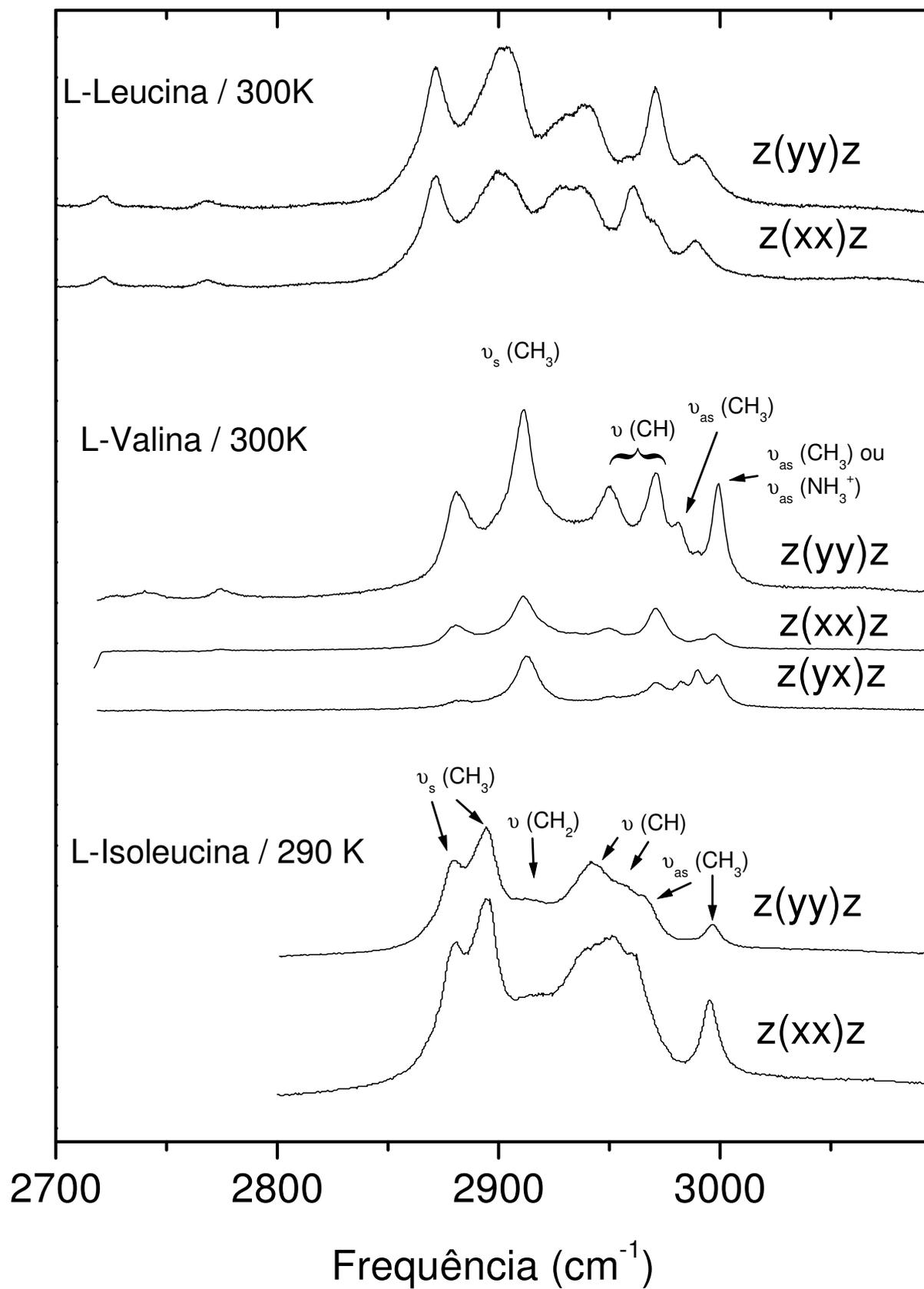


FIGURA 4.13 - Espectros comparativos dos cristais de aminoácido de L-leucina, L-valina e L-isoleucina em diversas representações na região 1800-3100 cm⁻¹.

TABELA 4.4 - Identificação dos modos normais do cristal de L-leucina nas geometrias de espalhamento $z(yy)z$ e $z(xx)z$ a temperatura ambiente (297 K).

$z(xx)z$ (cm^{-1})	$z(yy)z$ (cm^{-1})	Identificação ^a	$z(xx)z$ (cm^{-1})	$z(yy)z$ (cm^{-1})	Identificação ^a
72	65	Modos de rede	1149	-	
87	87	Modos de rede .	1177	1175	$r(\text{NH}_3^+)$
-	110	Modos de rede	1187	1188	$r(\text{NH}_3^+)$
125	-	Modos de rede	1240	-	$\tau(\text{CH}_2)$
175	175	$\tau(\text{CO}_2^-)$	1300	1300	
-	185	$\tau(\text{CH})$	1318	1318	
-	205	$\tau(\text{CH})$	1346	1343	$\delta(\text{CH})$
245	-	$\gamma(\text{CH})$	1354	1351	
288	-	$\tau(\text{CH}_3)$	-	1365	
332	332	$\delta(\text{NCC})$	-	1375	
352	-	$\delta(\text{esquel.})$	1390	1391	$\delta_s(\text{CH}_3)$
406	405	$\delta(\text{esquel.})$	1411	1411	$\delta_s(\text{CH}_3)$
-	445	$\delta(\text{esquel.}) + \tau(\text{NH}_3^+)$	1444	1441	-
460	460	$\delta(\text{esquel.}) + \tau(\text{NH}_3^+)$	1458	1458	$\delta_a(\text{CH}_3)$
536	536	$r(\text{CO}_2^-)$	1475	1475	$\delta_a(\text{CH}_3)$
671	671	$w(\text{CO}_2^-)$	-	1516	-
777	-	$\delta(\text{CO}_2^-)$	-	1560	$\nu(\text{CO}_2^-)$
838	838	$\gamma(\text{CO}_2^-)$	-	1585	$\nu(\text{CO}_2^-)$
849	849	$r(\text{CH}_3)$	-	1626	$\nu(\text{CO}_2^-)$
919	919	$\nu(\text{CC})$	2871	2871	$\nu_s(\text{CH}_3)$
926	926	$\nu(\text{CC})$	2899	2900	$\nu_s(\text{CH}_3)$
947	947	$\nu(\text{CC})$	2906	2906	$\nu(\text{CH}_2)$
965	965	$\nu(\text{CC})$	2928	2927	$\nu(\text{CH}_2)$
1004	-	$\nu(\text{CC})$	2941	2939	$\nu(\text{CH})$
1032	1033	$\nu(\text{CN})$	2959	2960	$\nu(\text{CH})$
1083	1082	$\nu(\text{CN})$	2971	2971	$\nu_a(\text{CH}_3)$
1131	1131	$r(\text{NH}_3^+)$	2990	2990	$\nu_a(\text{CH}_3)$

4.3 Absorção no infravermelho do cristal de L-leucina a temperatura ambiente

Por pertencer ao grupo pontual C_2 , todos os modos da L-leucina são ativos tanto no Raman como no infravermelho. Portanto, os modos já identificados através da técnica de espalhamento Raman são igualmente associados àqueles ativos no infravermelho. A Figura 4.14 mostra o espectro de absorção no infravermelho do cristal de L-leucina na região 400-4000 cm^{-1} à temperatura ambiente.

Algumas bandas na região em torno de 2000 e 3000 cm^{-1} são visíveis somente no infravermelho (Figura 4.14). Isso acontece porque modos correspondentes, quando comparadas as duas técnicas, possuem intensidades diferentes. Em seguida, discute-se a classificação desses modos.

Uma das bandas que só aparecem no infravermelho é aquela em 2129 cm^{-1} . Em sais de amina primária tal banda isolada é geralmente associada a uma combinação da torção do NH_3^+ (por volta de 480 cm^{-1}) com uma deformação da mesma unidade (em torno de 1580 cm^{-1}) [43]. A ausência de absorção, nessa região, do ácido p-aminofenilacético sugere a associação desta banda à forma *zwitterion* [44]. Por outro lado, as aminas hidroclóricas, que contém a unidade NH_3^+ em sua composição, absorvem nessa região [44].

Bandas de sais de aminas primárias compreendidas à região 2400-2800 cm^{-1} são associadas a *bendings* de NH_3^+ [43]. Pode-se então associar a banda em 2623 cm^{-1} a esses modos.

Finalmente, a banda em 3050 cm^{-1} é identificada como *stretching* simétrico do NH_3^+ em concordância tanto com um trabalho sobre nitrato de L-leucina [39] como no conhecimento de que *stretchings* de NH_3^+ de sais de aminas primárias absorvem à região 2800-3200 cm^{-1} [43, 45].

Conclui-se do exposto que a existência das bandas em torno de 2000 cm^{-1} e 3000 cm^{-1} podem ser de grande valor para diagnosticar a existência ou não da forma *zwitterion* nos cristais de aminoácidos.

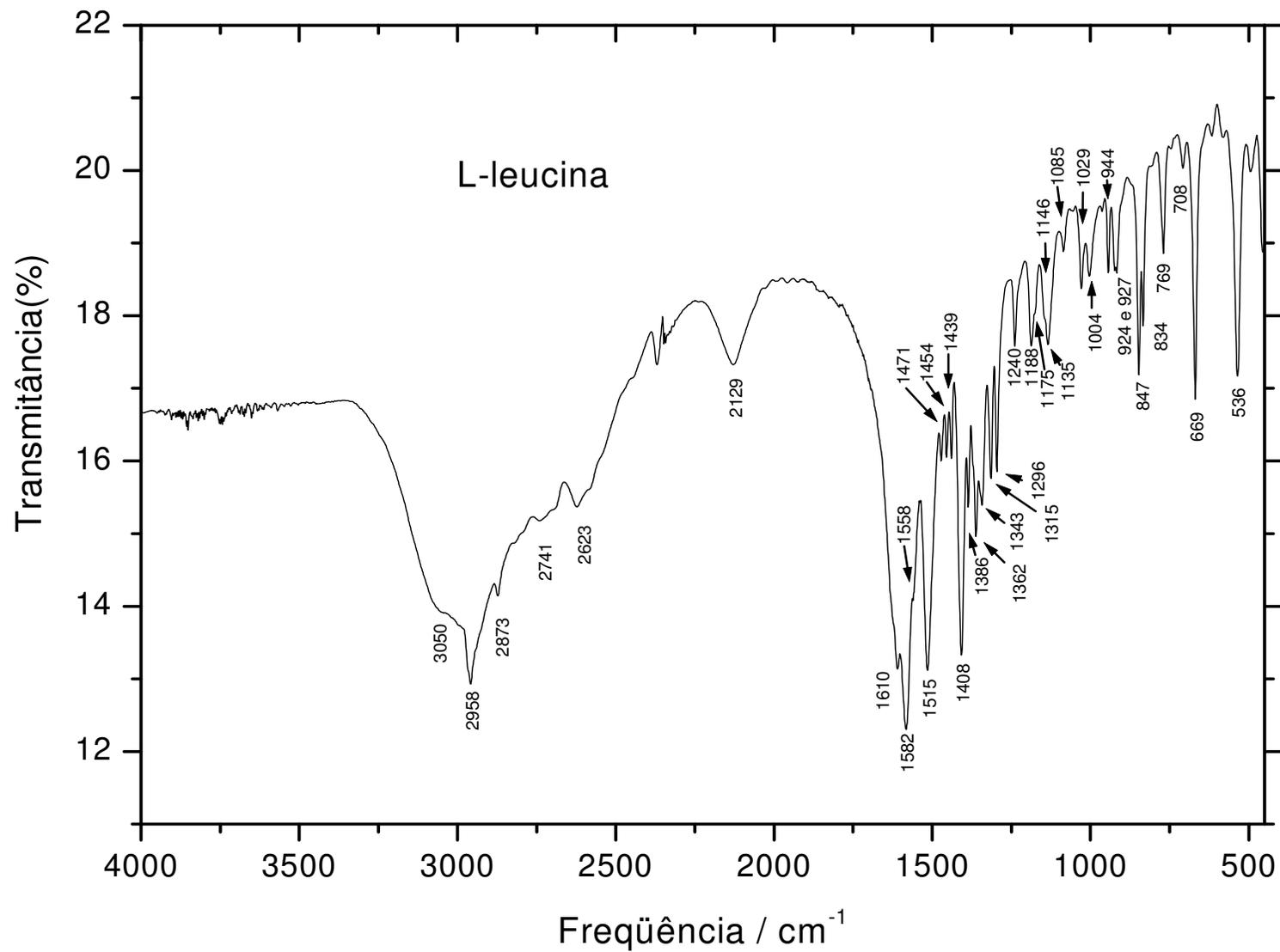


FIGURA 4.14 – Espectro de absorção no infravermelho do cristal de L-leucina na região 450-4000 cm^{-1} à temperatura ambiente.

5 CRISTAIS DE L-LEUCINA SOB VARIAÇÃO DE TEMPERATURA

5.1 Introdução

Nesta seção discute-se o efeito da temperatura no comportamento dos modos normais de vibração de cristais de L-leucina. Sabe-se que sob variação de temperatura os cristais, de uma forma geral, sofrem acomodações de suas moléculas. Nesta acomodação as interações entre as moléculas são modificadas, no sentido de que as moléculas na célula unitária modificam suas distâncias umas em relação às outras e, conseqüentemente, a intensidade das forças entre elas. No caso dos cristais de aminoácidos, como a interação básica entre as moléculas é a ligação de hidrogênio, a variação de temperatura produzirá uma mudança nas distâncias N-H...O. Eventualmente a modificação é de tal monta que uma ou mais ligações de hidrogênio são destruídas e a célula unitária passa a ter uma nova simetria; em outras palavras, o cristal sofre uma transição de fase.

Para os cristais de aminoácidos muitos trabalhos existem discutindo o comportamento vibracional e estrutural quando a temperatura destes é modificada. No que se refere aos cristais de glicina [46], L-alanina [35, 47], L-isoleucina [33], nenhuma modificação estrutural, a baixas temperaturas, foi observada. Acrescenta-se que existe um trabalho de difração de raios-X efetuado em cristais de L-leucina a baixa temperatura (120 K) que também não aponta evidências de transição de fase entre 120 e 300 K [48]. Ou seja, para estes cristais de aminoácidos alifáticos parece que as estruturas de temperatura ambiente são bastante estáveis.

Diferentemente, um comportamento anômalo foi observado a baixas temperaturas quando se investigou cristais de L-valina [9] através de medidas de espalhamento Raman. Em particular observou-se mudanças nos modos vibracionais de baixas energias ou modos da rede. Duas bandas são observadas para números de onda até 60 cm^{-1} , em 43 e em 51 cm^{-1} . A banda de menor número de onda é observada nos espectros desde a temperatura ambiente até 17 K. A banda em 51 cm^{-1} diminui de intensidade e vai a zero em torno de 120 K num experimento de resfriamento da amostra. Destaca-se que uma outra banda começa a aparecer nos espectros Raman em $\sim 120 \text{ cm}^{-1}$ no intervalo de temperatura entre 130 e 100 K confirmando, desta forma, que realmente a estrutura do cristal se modifica a baixas temperaturas.

Resumindo o comportamento dos cristais de aminoácidos alifáticos têm-se que a glicina, a L-alanina, a L-isoleucina e a L-leucina são estáveis a baixas temperaturas enquanto que a L-valina sofre uma transição de fase.

A questão natural a ser feita a seguir é a seguinte: qual o comportamento destes cinco cristais (aminoácidos alifáticos) quando a temperatura é modificada para valores superiores à temperatura ambiente? A seguir discute-se parcialmente esta questão abordando-se o comportamento dos modos vibracionais da L-leucina a altas temperaturas.

5.2 Comportamento dos modos normais de vibração do cristal de L-leucina em função da temperatura

Apenas um resultado incipiente de espalhamento Raman em cristal de L-leucina era conhecido na literatura. Nele, um espectro Raman não polarizado à temperatura ambiente e um em $T = 253$ K foi apresentado [40]. O mesmo trabalho relata medidas de DSC que indicam transição de fase à temperatura de 353 K.

Nosso trabalho apresenta espectros Raman (mais especificamente usamos um intervalo de temperatura de 10 K entre cada medida) no intervalo de temperatura 297-413 K, que evidenciam claramente, mudanças em torno da temperatura de 353 K. A principal característica das mudanças se relaciona com as intensidades relativas dos modos. Todas as medidas foram feitas na geometria de espalhamento $z(yy)z$.

5.3 Região 1800-3100 cm^{-1}

A Figura 5.1 apresenta a evolução dos espectros Raman com a temperatura do cristal de L-leucina na região 1800-3100 cm^{-1} , na geometria de espalhamento $z(yy)z$. Como já exposto, essa região se caracteriza por apresentar, principalmente, modos relacionados à $\nu(\text{CH}, \text{CH}_2 \text{ e } \text{CH}_3)$. Pequenas mudanças foram observadas nessa região, mas que são dignas de menção: as bandas em 2927 e 2939 cm^{-1} (indicadas por asteriscos) a temperatura ambiente, parecem ser uma só. No entanto, a partir da temperatura de 323 K as bandas passam a ficar cada vez mais distinguíveis, atingindo distinção mais definida à temperatura de 353 K.

Outra mudança que nos chama atenção está relacionada às bandas em 2960, 2971 e 2990 cm^{-1} , que são bem distintas à temperatura ambiente. A partir de 353 K a banda em

2990 cm^{-1} , indicada por uma seta, passa a ter baixa intensidade relativa, tornando-se um ombro das outras mais intensas bandas ($2960/2971\text{ cm}^{-1}$). Não somente nessa, mas, em todas as outras regiões do espectro do cristal de L-leucina, as mudanças, na maioria das vezes, começam a ocorrer por volta da temperatura de 323 K e culminam à temperatura de 353 K . Estas mudanças nos espectros podem ser interpretadas como decorrentes de um processo precursor da mudança estrutural correspondendo a uma acomodação das moléculas na célula unitária.

Para todas as regiões dos espectros não se observou grandes mudanças nos valores das frequências com a variação da temperatura. A Figura 5.2 apresenta o comportamento da frequência dos modos em função da temperatura para a região $1800\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$.

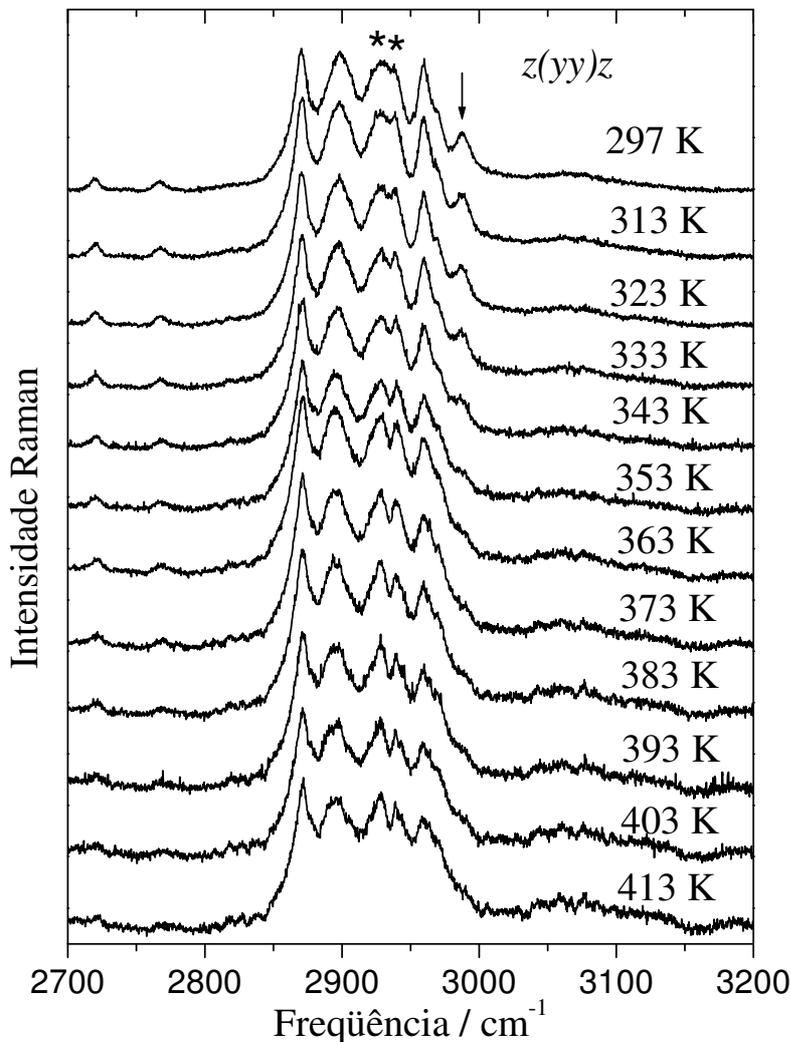


FIGURA 5.1 – Evolução dos espectros Raman com a temperatura do cristal de L-leucina na região $1800\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ para a geometria de espalhamento $z(yy)z$.

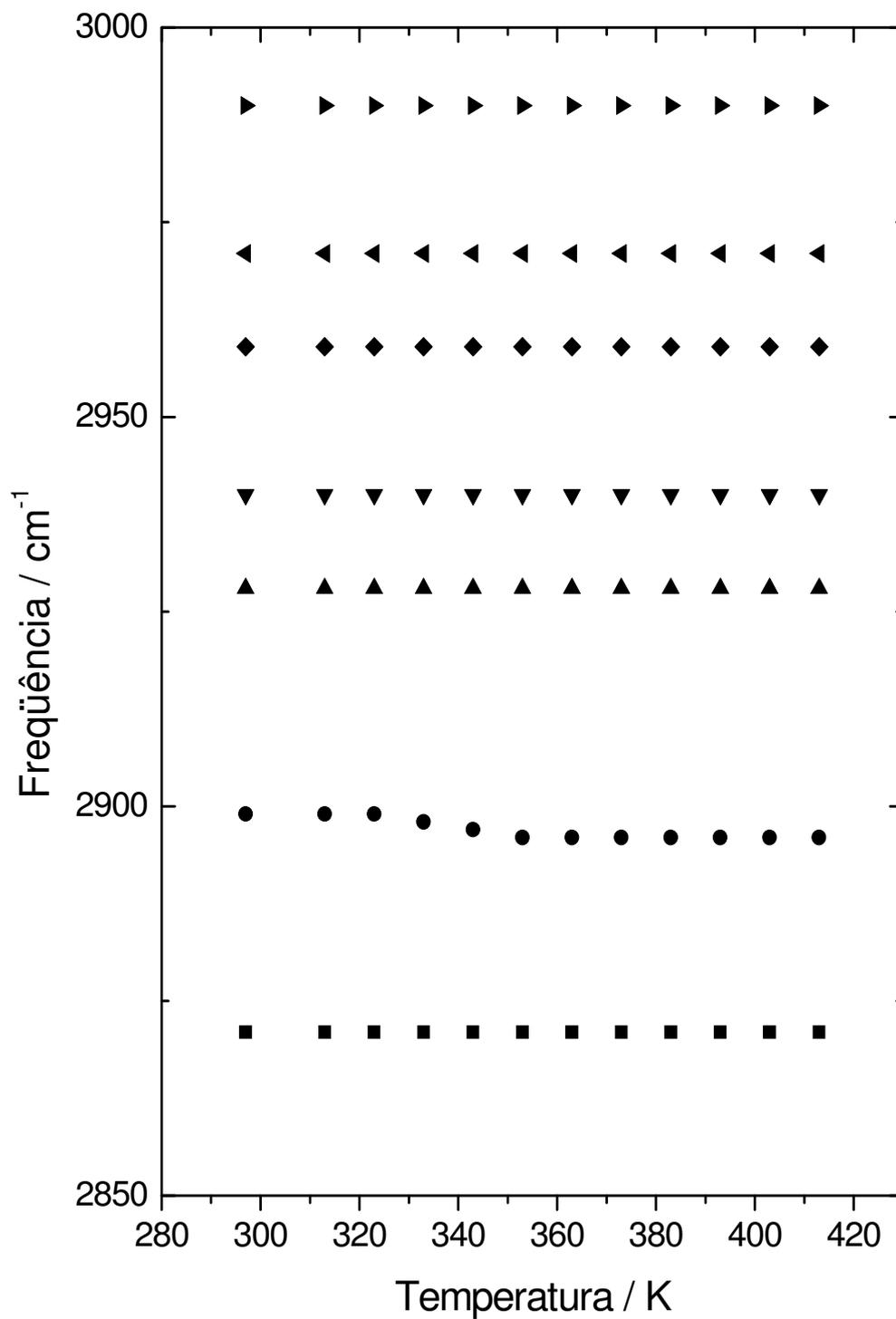


FIGURA 5.2 - Dependência da frequência em função da temperatura na região 1800-3100 cm⁻¹ do cristal de L-leucina.

5.4 Região 1280-1750 cm^{-1}

A Figura 5.3 apresenta os espectros Raman do cristal de L-leucina em diversas temperaturas, na geometria de espalhamento $z(yy)z$. Nessa região são várias as mudanças observadas. O primeiro aspecto se relaciona às bandas em torno de 1300 cm^{-1} , em que o dubleto 1318 e 1324 cm^{-1} , indicado por um quadrado, apresenta interessante comportamento com o aumento da temperatura: a banda em 1324 cm^{-1} diminui sua intensidade até desaparecer à temperatura de 353 K , enquanto que a banda em 1318 cm^{-1} parece sofrer aumento na sua intensidade relativa; em outras palavras, o dubleto se torna degenerado a partir da temperatura 353 K .

Observa-se também que as bandas de baixa intensidade em 1365 e 1441 cm^{-1} (círculo) a partir de 393 K se tornam ombro das bandas mais intensas em 1343 e 1458 cm^{-1} . Outra observação nos espectros da Figura 5.3 refere-se à região $1550\text{-}1650 \text{ cm}^{-1}$. A banda observada à temperatura ambiente em 1560 cm^{-1} (seta) desaparece na temperatura de 353 K . Entre as bandas 1585 e 1626 cm^{-1} ocorre inversão de intensidade quando a temperatura varia de 297 a 413 K . Efeito similar ocorre ao cristal de L-valina em bandas de baixa frequência a baixas temperaturas [9] e ao cristal de L-alanina na região de baixa frequência e altas pressões [49]. É importante lembrar que as três bandas na região $1550\text{-}1650 \text{ cm}^{-1}$ foram identificadas como estiramentos de CO_2^- , implicando, portanto, no envolvimento das pontes de hidrogênio. A dependência da frequência com a temperatura nessa região está representada na Figura 5.4.

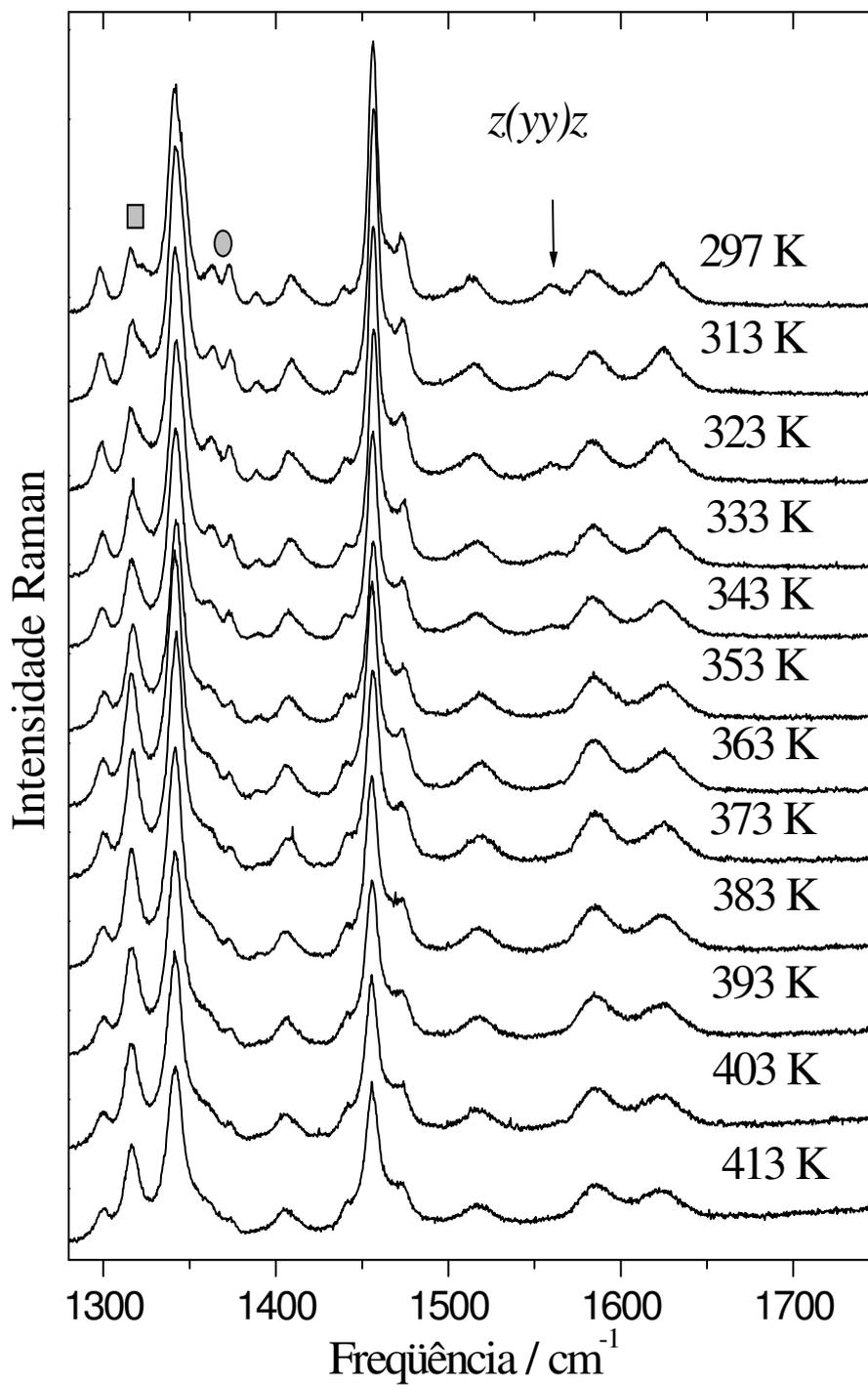


FIGURA 5.3 - Evolução dos espectros Raman do cristal de L-leucina com a temperatura na região de frequência $1285\text{-}1750\text{ cm}^{-1}$ para a geometria de espalhamento $z(yy)z$.

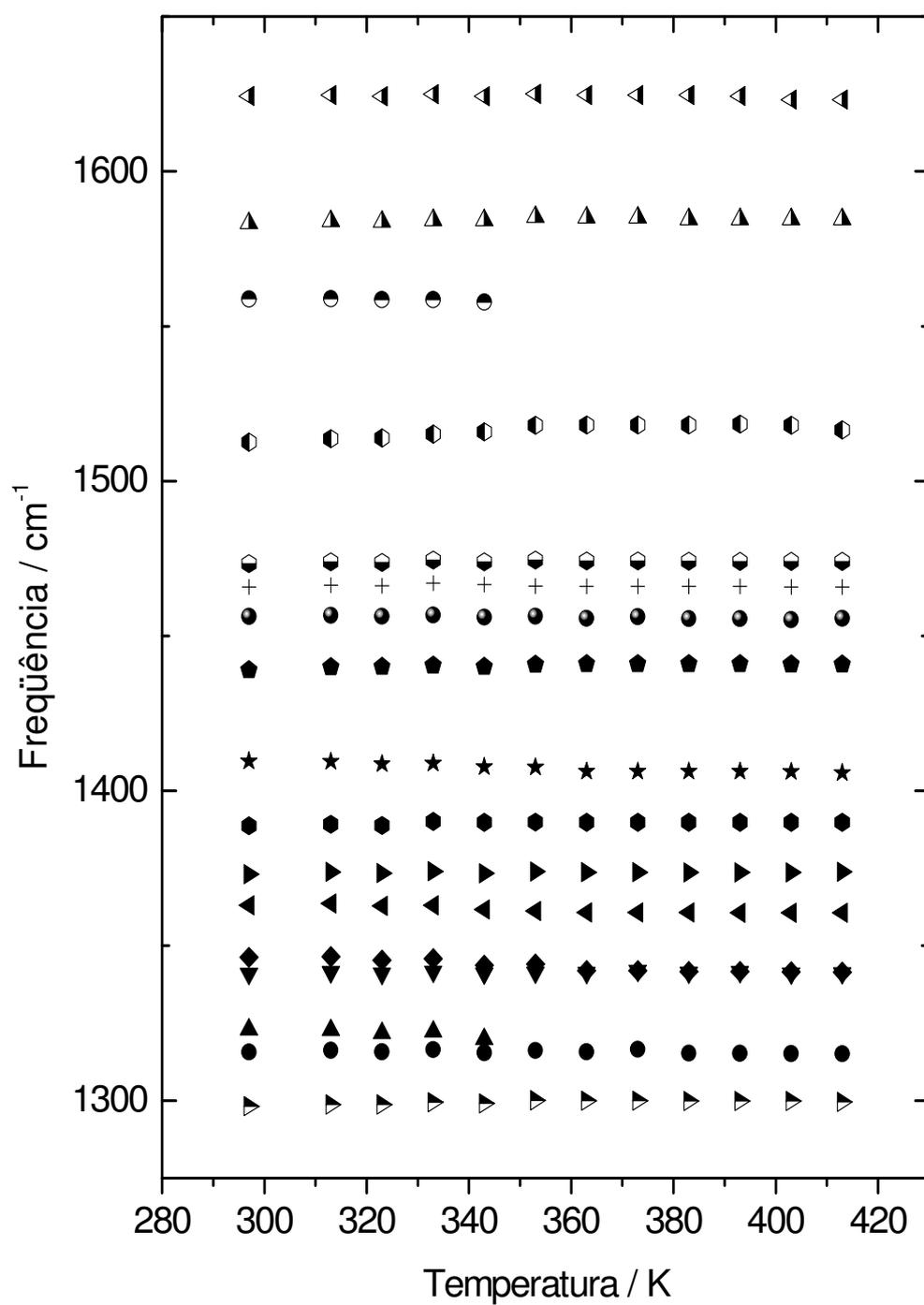


FIGURA 5.4 – Comportamento da frequência vs. temperatura do cristal de L-leucina na região espectral $1285\text{-}1750\text{ cm}^{-1}$, para a geometria de espalhamento $z(yy)z$.

5.5 Região 700-1250 cm^{-1}

A Figura 5.5 apresenta os espectros Raman do cristal de L-leucina na região de frequência 700-1250 cm^{-1} para a geometria de espalhamento $z(yy)z$. A primeira observação que apontamos é o curioso surgimento da banda de baixa intensidade por volta de 800 cm^{-1} (seta) quando a temperatura se aproxima de 353 K, pois, geralmente a intensidade das bandas diminui com o aumento da temperatura. Esta banda ainda não foi identificada; o que será possivelmente resolvido com a aplicação do cálculo de *ab initio*.

Digno de menção também é o dubleto em 919 e 926 cm^{-1} (asterisco), em que ambas as bandas são distinguíveis à temperatura ambiente, mas, com o aumento da temperatura a banda de maior frequência desaparece quando a temperatura de 353 K é atingida. Já a banda em 919 cm^{-1} diminui sua intensidade, mas permanece visível em toda faixa de temperatura. A Figura 5.6 apresenta o comportamento da frequência com a temperatura para a região espectral 700-1250 cm^{-1} .

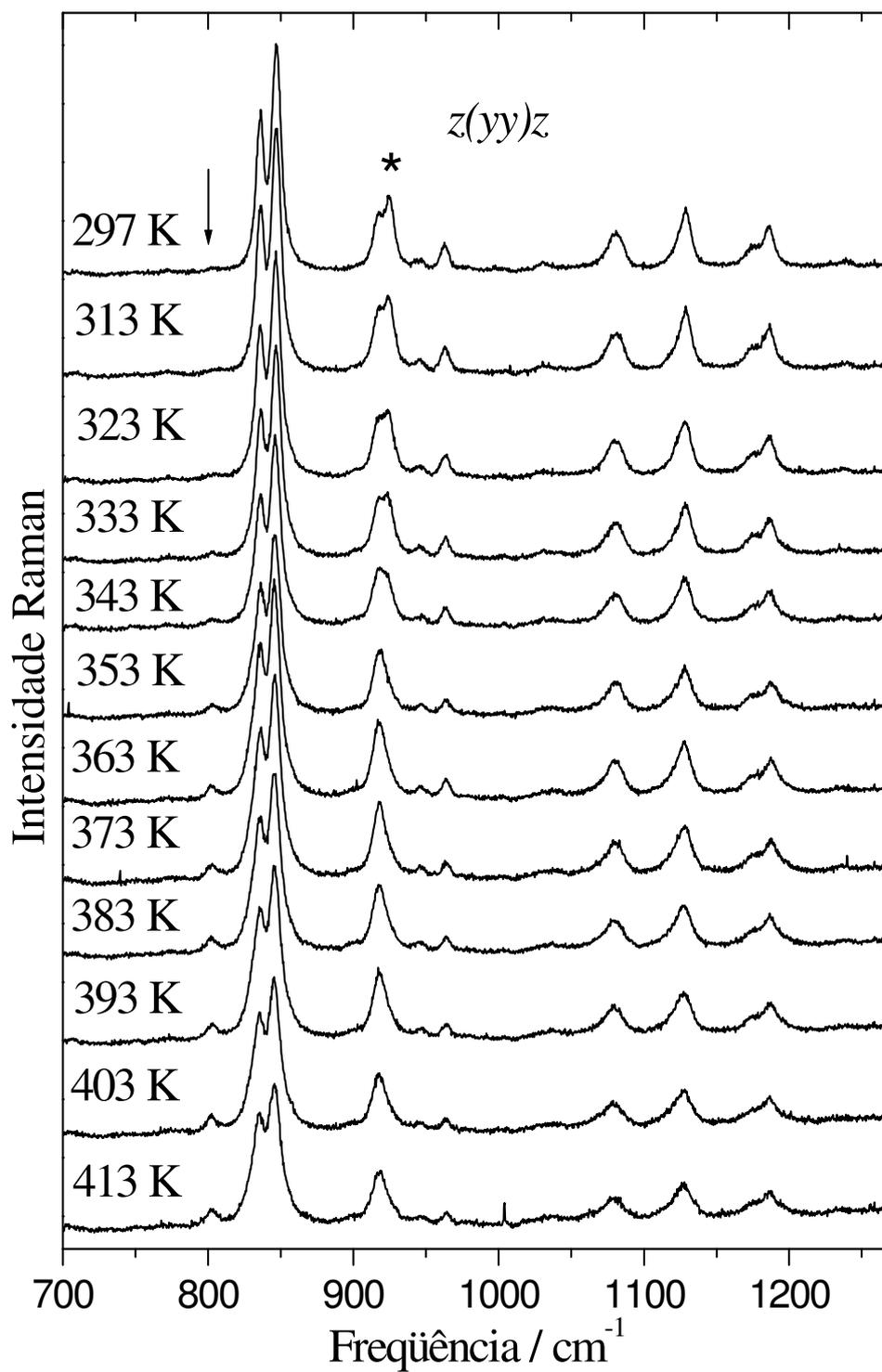


FIGURA 5.5 - Evolução dos espectros Raman com a temperatura do cristal de L-leucina para a geometria de espalhamento $z(yy)z$ na região $700\text{-}1250\text{ cm}^{-1}$.

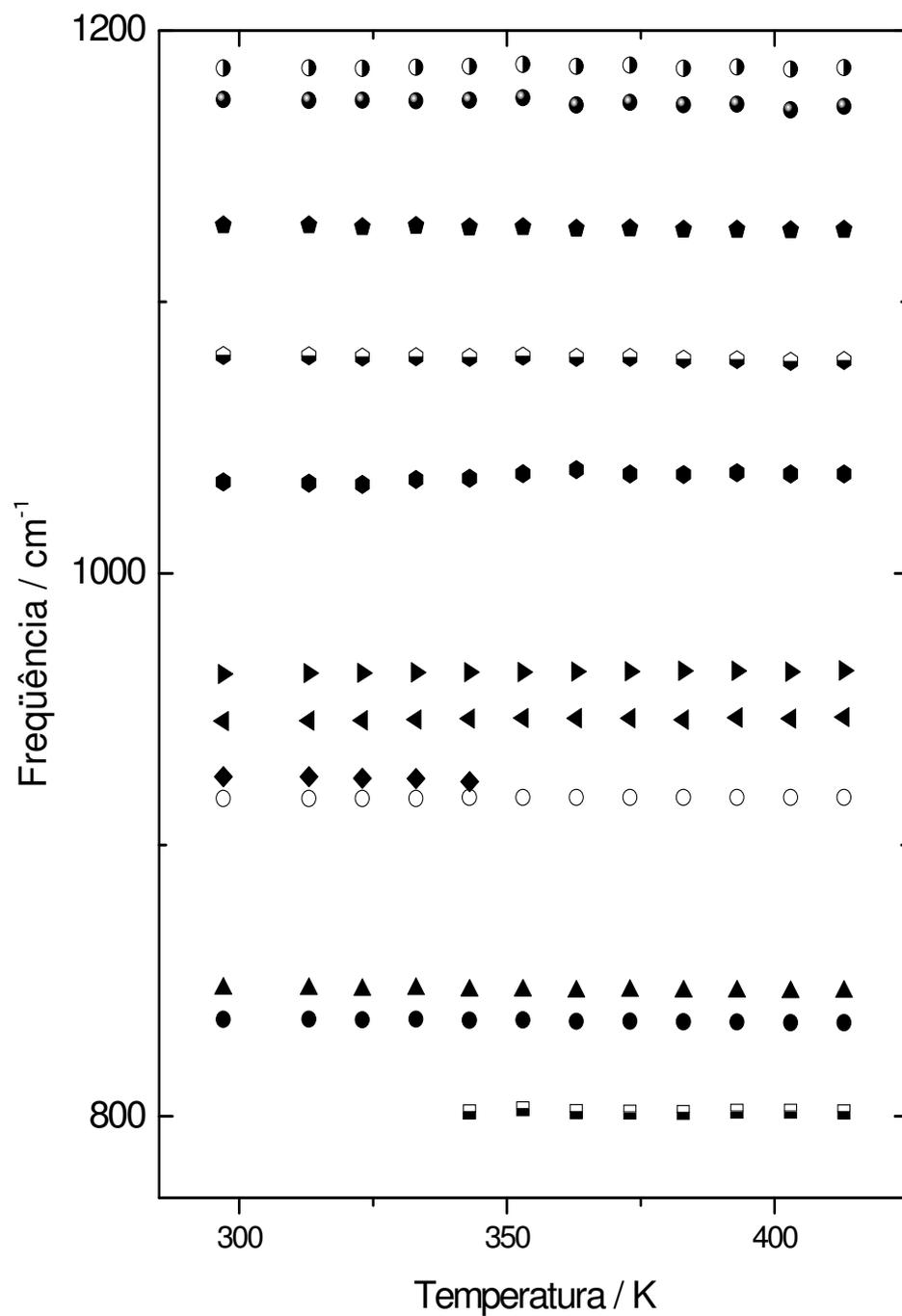


FIGURA 5.6 - Comportamento da frequência com a temperatura do cristal de L-leucina na região 700-1250 cm⁻¹ para a geometria de espalhamento z(yy)z.

5.6 Região 50-700 cm^{-1}

A evolução dos espectros Raman com a temperatura do cristal de L-leucina na região 50-700 cm^{-1} para a geometria de espalhamento $z(yy)z$ são apresentados na Figura 5.7. As bandas observadas na região 300-700 cm^{-1} possuem comportamento similar, diminuindo de intensidade com o aumento da temperatura. Por outro lado, bandas em 175, 185 e 205 cm^{-1} (marcadas por três setas a temperatura ambiente) apresentam o seguinte comportamento: as bandas em 175 e 205 cm^{-1} sofrem redução da intensidade com o aumento da temperatura, enquanto que a banda em 185 cm^{-1} decresce de intensidade até desaparecer quando submetida à temperatura de 353 K; apesar de termos identificado o modo em 185 cm^{-1} como τ (CH) o mesmo poderia ser identificado como τ (CO_2^-). A razão de tal possibilidade se deve à similaridade de comportamento que esse modo apresenta, quando a temperatura varia, com os modos de estiramento do CO_2^- .

Até aqui temos mostrado inúmeras mudanças relacionadas aos modos internos ocorrendo em torno da temperatura 353 K. Nem sempre mudanças nos modos internos estão associadas a mudanças estruturais; um exemplo disso é o cristal de L-alanina, onde o *splitting* do modo de torção do NH_3^+ é observado em torno de 220 K, mas que somente representa pequenas distorções no grupo NH_3^+ , não implicando em transição de fase estrutural [50]. Por outro lado, o cristal de taurina apresenta mudanças em bandas associadas a modos internos (vibração da camada CSH) e que, conjuntamente com mudanças em bandas de baixa energia, são relacionados a modificações estruturais [51].

Para se afirmar que o cristal de L-leucina sofre uma transição de fase estrutural por volta de 353 K, se faz necessário investigar a região dos modos externos. Tal região, como já exposto, se encontra abaixo de 150 cm^{-1} . Nessa região, nos chama atenção a banda em 110 cm^{-1} , marcada com uma seta. Sua intensidade é gradualmente diminuída com o aumento da temperatura, mas, à temperatura de 353 K, a mesma apresenta intensidade praticamente igual à zero. Tal comportamento evidencia a transição de fase estrutural do cristal de L-leucina em 353 K, confirmando assim, a correlação existente entre os modos internos e os modos de rede para esse cristal. A relação entre frequência e temperatura na região 300-700 cm^{-1} está representada no gráfico da Figura 5.8.

Uma interpretação possível para a ocorrência desta transição de fase é a seguinte: na temperatura ambiente o cristal pertence a uma estrutura C_2 . Acima da temperatura de 350

K o cristal passaria a uma estrutura C_s . Assim sendo, quando a temperatura do cristal fosse se aproximando do ponto de transição um modo longitudinal ótico (LO) começaria a diminuir e na nova fase ele deixaria de existir. Isto é o que deve estar acontecendo com os modos de baixa energia, bem como aqueles em torno de 920 cm^{-1} . A FIGURA 5.9 mostra o perfil do cristal no plano yz (a temperaturas abaixo de 353 K) e os respectivos vetores de onda incidente e espalhado (a geometria de espalhamento é $z(yy)z$). Pela conservação do momento, $k_f = k_i - k_s$. Como os vetores de onda incidente e espalhado estão na direção de z, os fônons que participam do espalhamento, também propagam em z. Consultando-se a tabela de caracteres do grupo C_2 , vê-se que somente fônons polarizados em z são permitidos. Portanto, os modos envolvidos no espalhamento são L.O. (longitudinal ótico). Supondo uma mudança de simetria do grupo C_2 para o grupo C_s para temperaturas acima de 353 K, os fônons envolvidos no espalhamento propagam na direção z, mas pela tabela de caracteres do grupo C_s , eles são polarizados em x e em y. Portanto, somente fônons T.O. (transversais óticos) são envolvidos no espalhamento. Assim, a nossa sugestão é que a transição ocorra de uma estrutura C_2 para uma estrutura C_s .

De acordo com a disposição espacial das moléculas de L-leucina no cristal, em camadas interligadas de um lado pelas LH e por outro pelos grupos metil [28], acreditamos que haja o rompimento de uma das três LH que envolve o átomo de nitrogênio e três outras moléculas de L-leucina. Mas a verdadeira compreensão do mecanismo das mudanças será evidenciada através de outras técnicas como difração de raios-x e difração de nêutrons.

Para finalizar esta seção ressaltamos um ponto em favor de se investigar o comportamento das LH baseado nos efeitos que a temperatura ou a pressão exercem sobre o modo de torção do grupo NH_3^+ . É possível que, no cristal de L-leucina, a região de frequência entre as bandas 460 e 536 cm^{-1} contenha vestígios do modo $\tau(\text{NH}_3^+)$, Figura 5.7. Seria interessante realizar medidas de espalhamento Raman a temperaturas abaixo da ambiente para se estudar, por exemplo, o comportamento da largura de linha com a temperatura. Os cristais de aminoácidos L-alanina [52] e L-asparagina monohidratada [53], por exemplo, apresentam dependência linear para baixas temperaturas e dependência não-linear para altas temperaturas na relação entre largura de linha e temperatura para o modo $\tau(\text{NH}_3^+)$.

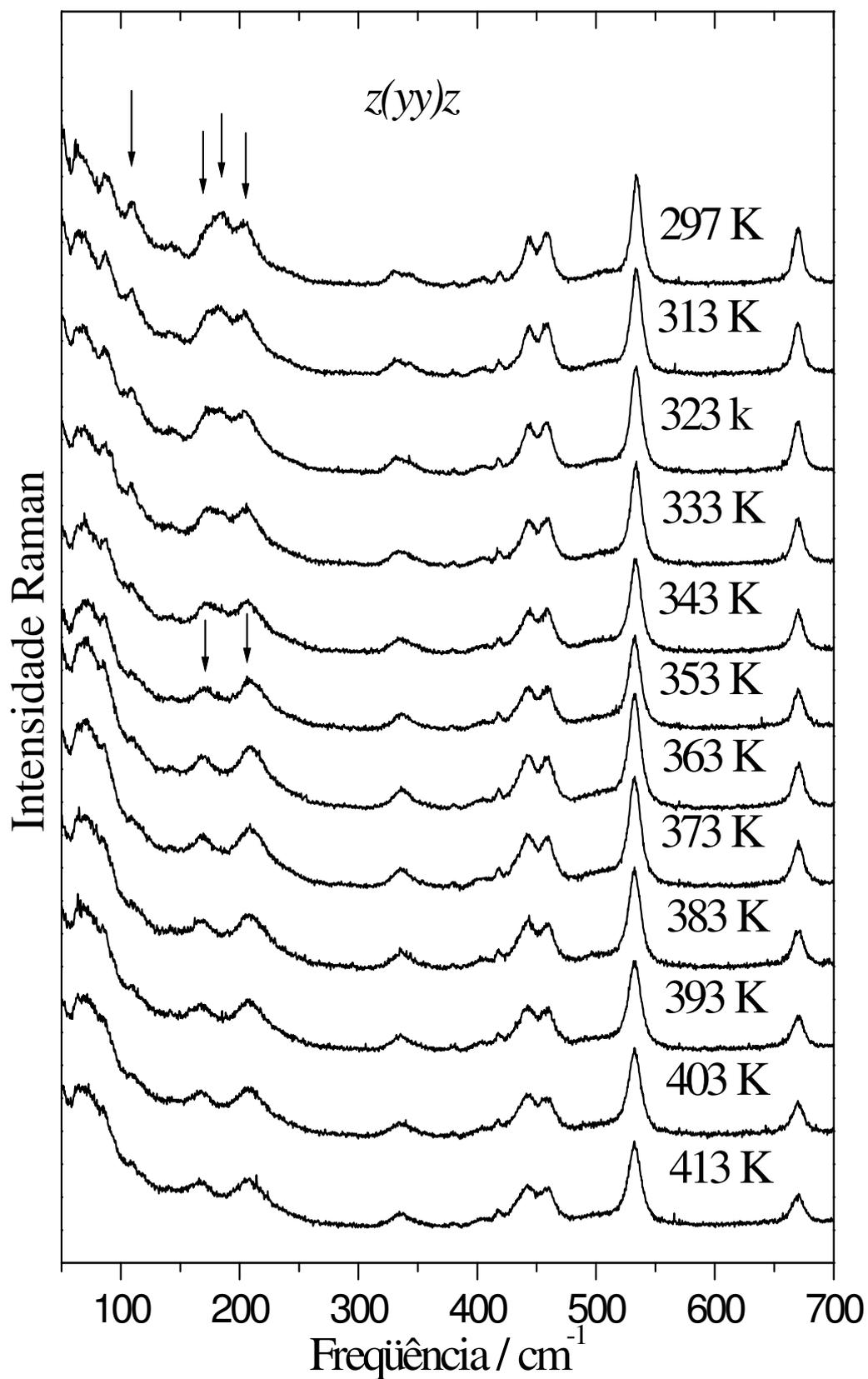


FIGURA 5.7 - Evolução dos espectros Raman com a temperatura do cristal de L-leucina na geometria de espalhamento $z(yy)z$ na região de frequência 50-700 cm⁻¹.

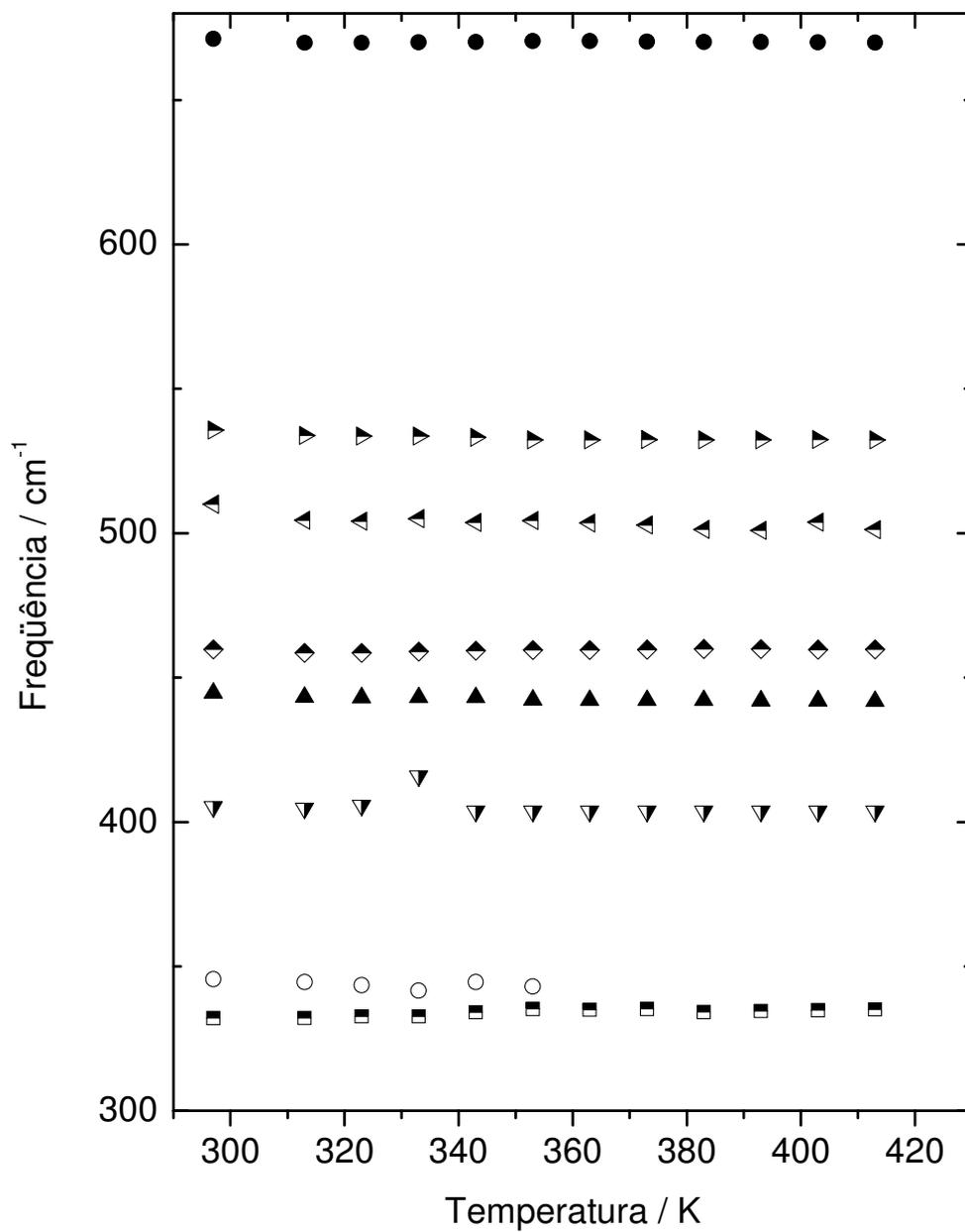


FIGURA 5.8 - Comportamento da frequência com a temperatura do cristal de L-leucina para a geometria de espalhamento $z(yy)z$ na região de frequência 50-700 cm^{-1} .

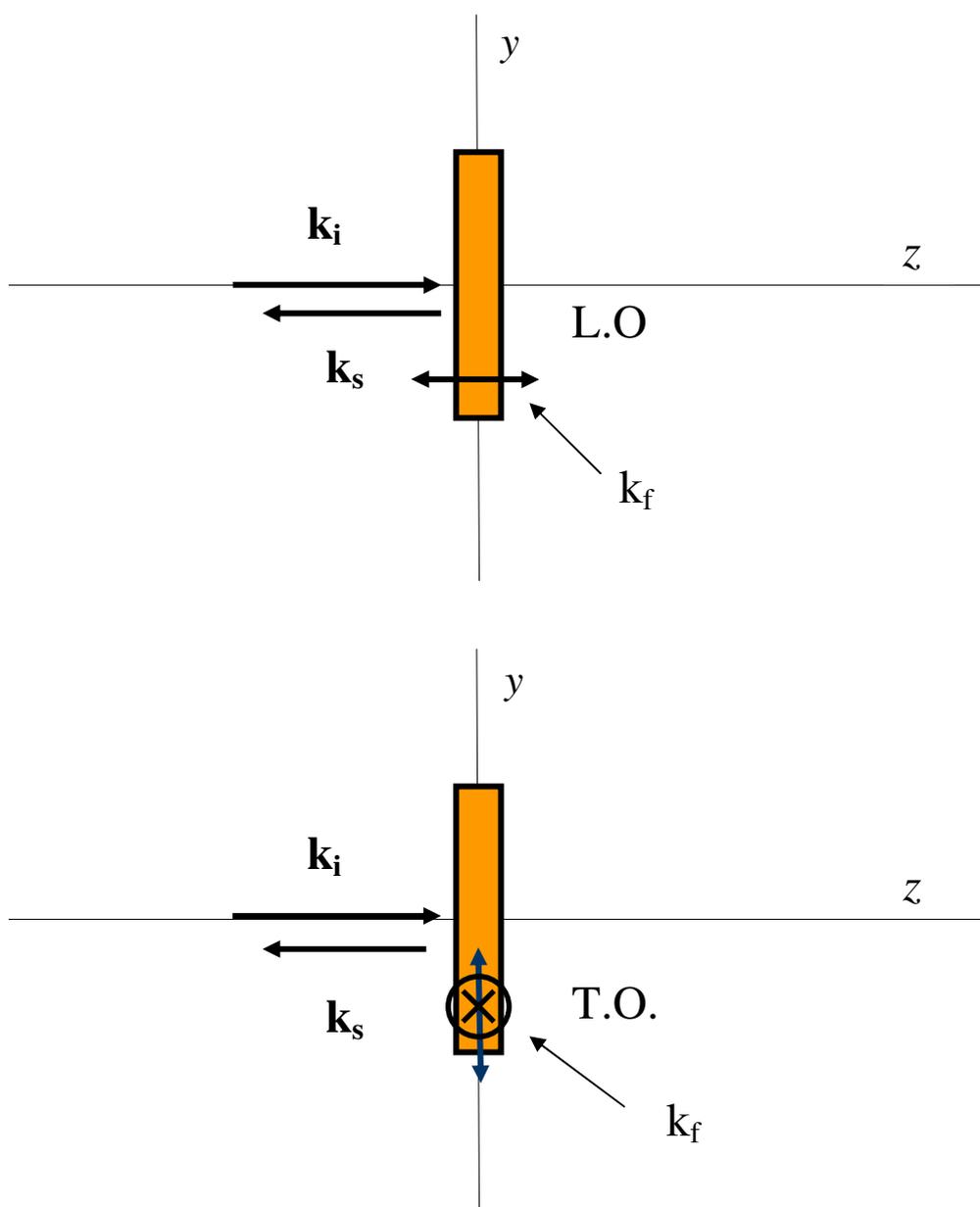


FIGURA 5.9 – Perfil do cristal de L-leucina no plano yz evidenciando a participação de fônons L.O. abaixo da temperatura de transição de fase (353 K) e fônons T.O. acima da mesma temperatura de transição.

6 ESPALHAMENTO RAMAN EM CRISTAIS DE L-LEUCINA A ALTAS PRESSÕES

6.1 Introdução

Nos últimos anos tem havido um grande interesse no efeito da pressão em sistemas orgânicos e em proteínas [49, 54-60]. As razões para este interesse são diversas. Sabe-se, por exemplo, que a pressão é uma técnica interessante para ser utilizada na conservação de alimentos, bem como existe um crescente interesse em sistemas vivos que vivem em ambientes com condições extremas, como é o caso de bactérias encontradas em fossas abissais, a vários quilômetros de profundidade no fundo do mar.

Entre os sistemas orgânicos investigados sob altas pressões certamente um dos que despertam maiores interesses, seja pela relativa simplicidade da molécula (quando comparado a outras moléculas orgânicas) seja pelo apelo científico (uma vez que são as unidades básicas das proteínas), estão os aminoácidos. Alguns dos cristais de aminoácidos já estudados sob pressão são a glicina e os seus cinco diferentes polimorfos [54-57], a L-alanina [49], a L-asparagina monohidratada [58], a L-serina [59] e a L-cisteína [60].

A glicina é um caso particularmente interessante. A partir de solução aquosa da glicina obtêm-se a forma α . De uma solução aquosa ácida obtêm-se a forma γ e de uma solução com água e etanol obtêm-se a forma monoclínica β da glicina. À temperatura ambiente, enquanto a forma α é estável até 23 GPa, a forma β apresenta uma transição de fase em 0,76 GPa [54, 61]. Por outro lado, estudando-se o efeito da pressão numa mistura das formas α e γ , observa-se que as linhas do difratograma associadas à forma γ desaparecem em torno de 4,0 GPa [55].

Uma fase δ da glicina é obtida da β -glicina quando esta última é comprimida entre 0 e 0,8 GPa [57]. Um aspecto particularmente interessante nesta transição é que a pressão aumenta fortemente a densidade da amostra, ocorrendo também um aumento no número de ligações de hidrogênio CH...O [57]. Partindo-se da fase γ da glicina e submetendo-se a amostra a condições de altas pressões hidrostáticas observa-se uma transição de fase estrutural na pressão de 1,9 GPa [57]; a nova fase é denominada de fase ϵ .

No que se refere a L-alanina, o aminoácido quiral mais simples, o quadro é menos complexo do que aquele apresentado para a glicina. De fato estudos de espalhamento de luz indicam que a L-alanina sofre uma transição de fase em torno de 2,2 GPa [49]. Esta transição de fase foi confirmada recentemente por medidas de difração de raios-X utilizando-se luz

síncrotron [62]. Segundo estas últimas medidas o cristal de L-alanina passaria de uma fase estrutural ortorrômbica para uma estrutura monocínica e, acima de 9 GPa, ele iria para uma estrutura tetragonal.

O cristal de L-asparagina monohidratado também apresenta diversas mudanças estruturais quando ele é submetido a condições de altas pressões. Pressões nas quais o material apresenta modificações estruturais são relativamente baixa quando se olha as potencialidades das células de pressão a extremos de diamantes, onde valores de dezenas de GPa são conseguidos até com uma certa facilidade. No material discutido neste parágrafo as pressões nas quais ele modifica de estrutura são: (i) 0 a 0,1 GPa; (ii) 0,2 a 0,6 GPa; (iii) 0,9 a 1,3 GPa [49]. Em todos estes três intervalos de pressão verifica-se nos espectros Raman mudanças claras e indiscutíveis, em particular na região de baixo número de onda onde são observados os modos externos. Modificações nos modos externos, ou modos de rede, como visto no capítulo anterior, significa mudança de simetria da célula unitária. Estas mudanças ocorrem porque ao aumentar-se a pressão ocorre um encurtamento das ligações de hidrogênio da estrutura, obrigando a mesma a adaptar-se a uma nova configuração.

Vale destacar que também foi observada mudança estrutural no cristal de L-treonina entre 2 e 2,2 GPa quando o material é estudado por espalhamento Raman numa célula a extremos de diamante. Os resultados apontam para uma possível segunda transição de fase sofrida pela L-treonona numa pressão de cerca de 3 GPa [63]. Estas mudanças estruturais foram identificadas pelo aparecimento de novas linhas nos espectros Raman, pela descontinuidade das curvas dv/dP e por mudanças nas intensidades relativas de bandas associadas a ligações de hidrogênio. Acredita-se que o mecanismo da transição esteja ligado ao encurtamento das pontes de hidrogênio como acontece com o cristal de L-asparagina monohidratada.

Do panorama desenhado acima observa-se que os cristais de aminoácidos mesmo submetidos a baixas pressões sofrem mudanças estruturais facilmente identificáveis pela técnica de espalhamento Raman (a exceção, nos vários materiais anteriormente descritos, é a glicina na sua fase α , que é estável até cerca de 23 GPa). Isto sugere que submetendo o cristal de L-leucina a altas pressões seja possível descobrir-se novos polimorfos em valores que possamos atingir com as células de pressão a extremos de diamantes existentes em nossos laboratórios. Na próxima seção discutimos os resultados de espalhamento Raman em cristais de L-leucina até a pressão de aproximadamente 6 GPa.

6.2 Resultados

A Fig. 6.1 apresenta os espectros Raman do cristal de L-leucina no intervalo de frequência entre 2750 e 3150 cm^{-1} para diversos valores de pressão. Nesta região, como visto anteriormente, espera-se observar os modos de estiramentos dos grupos CH, CH₃ e NH₃. A amostra utilizada nas medidas também é anídrica, como o foram as amostras utilizadas nas medidas de Raman à temperatura ambiente e nas medidas a altas temperaturas. Este fato pode ser inferido pela ausência de uma banda larga em torno de 3400 cm^{-1} característico de moléculas de água estrutural.

Nos experimentos realizados neste trabalho conseguiu-se pressões de até 5,4 GPa. Aumentando-se a pressão entre 0 e 0,46 GPa observam-se diversas mudanças nos espectros Raman. Em primeiro lugar observa-se uma mudança nas intensidades relativas de praticamente todas as bandas. Entretanto, este não é o efeito mais pronunciado verificado com o aumento da pressão até 0,46 GPa. De fato, observa-se que no espectro de 0,46 GPa aparece uma nova banda marcada por uma seta na Fig. 6.1. O aparecimento desta banda pode estar associado a uma transição de fase estrutural e esta possibilidade será discutida mais adiante de uma forma mais aprofundada.

Entre 0,80 e 1,46 GPa, além de um claro *blue shift* (deslocamento das bandas para frequências mais altas) das frequências de todas as bandas também se verifica o seguinte fato: a quantidade de bandas que aparece no espectro em 0,80 GPa é inferior àquela que aparece no espectro de 1,46 GPa. Isto pode ser melhor entendido pela análise apresentada na Figura 6.2 onde o gráfico das frequências dos modos que aparecem nesta região espectral em função da pressão é apresentado. Tal fato também sugere fortemente que uma transição de fase estrutural esteja acontecendo entre estes dois valores de pressão (0,80 e 1,46 GPa). Acima de 1,46 GPa não são observadas mais grandes mudanças nos espectros Raman até as mais altas pressões atingidas neste trabalho. Quando a pressão é baixada novamente para a pressão ambiente (espectro superior, denotado por 0* GPa) observa-se que o espectro obtido é qualitativamente semelhante ao espectro da pressão ambiente original (espectro na base da figura). Isto significa que após sofrer as duas transições de fase o cristal recupera sua fase monoclinica original. Ressalta-se também o desaparecimento daquela banda, que surgiu à pressão 0,46 GPa, para pressões acima de 4 GPa, indicando uma possível transição de fase.

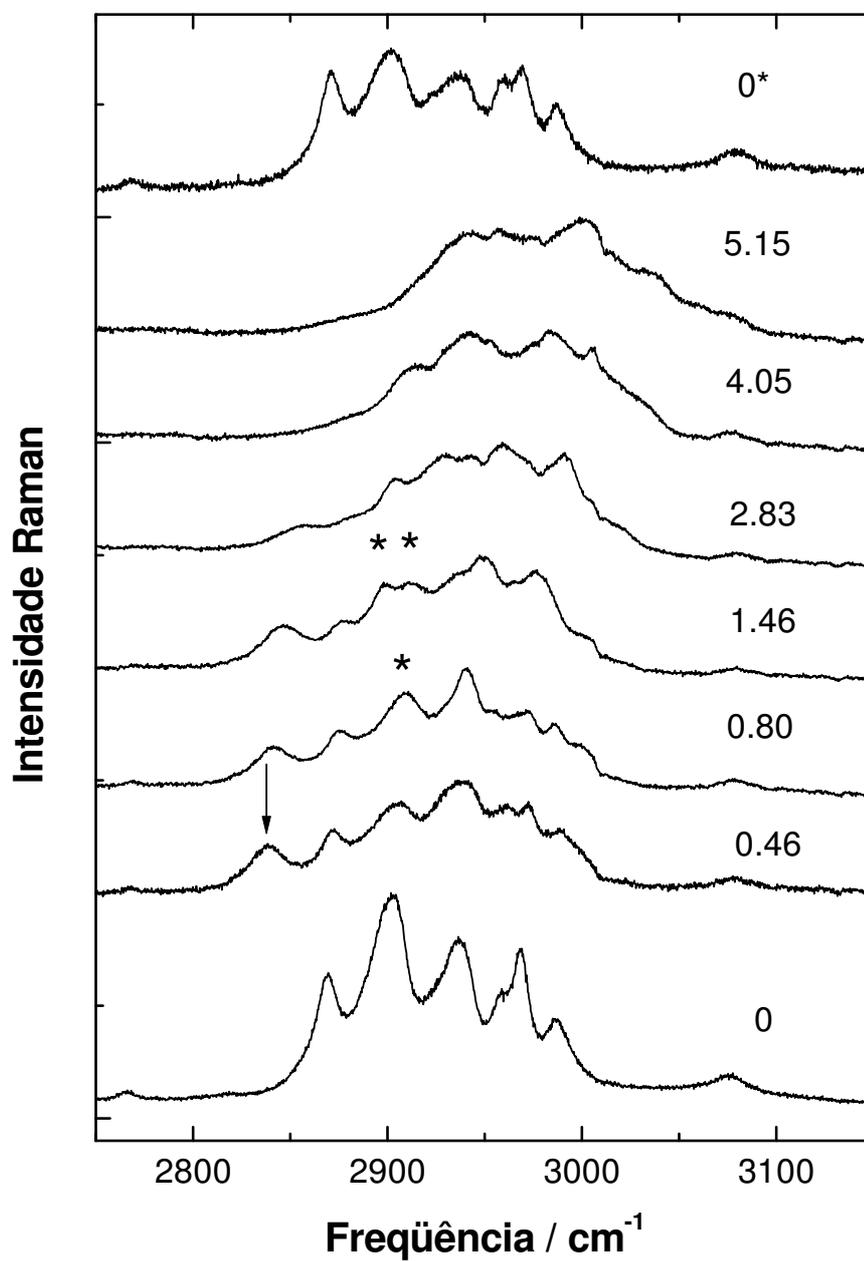
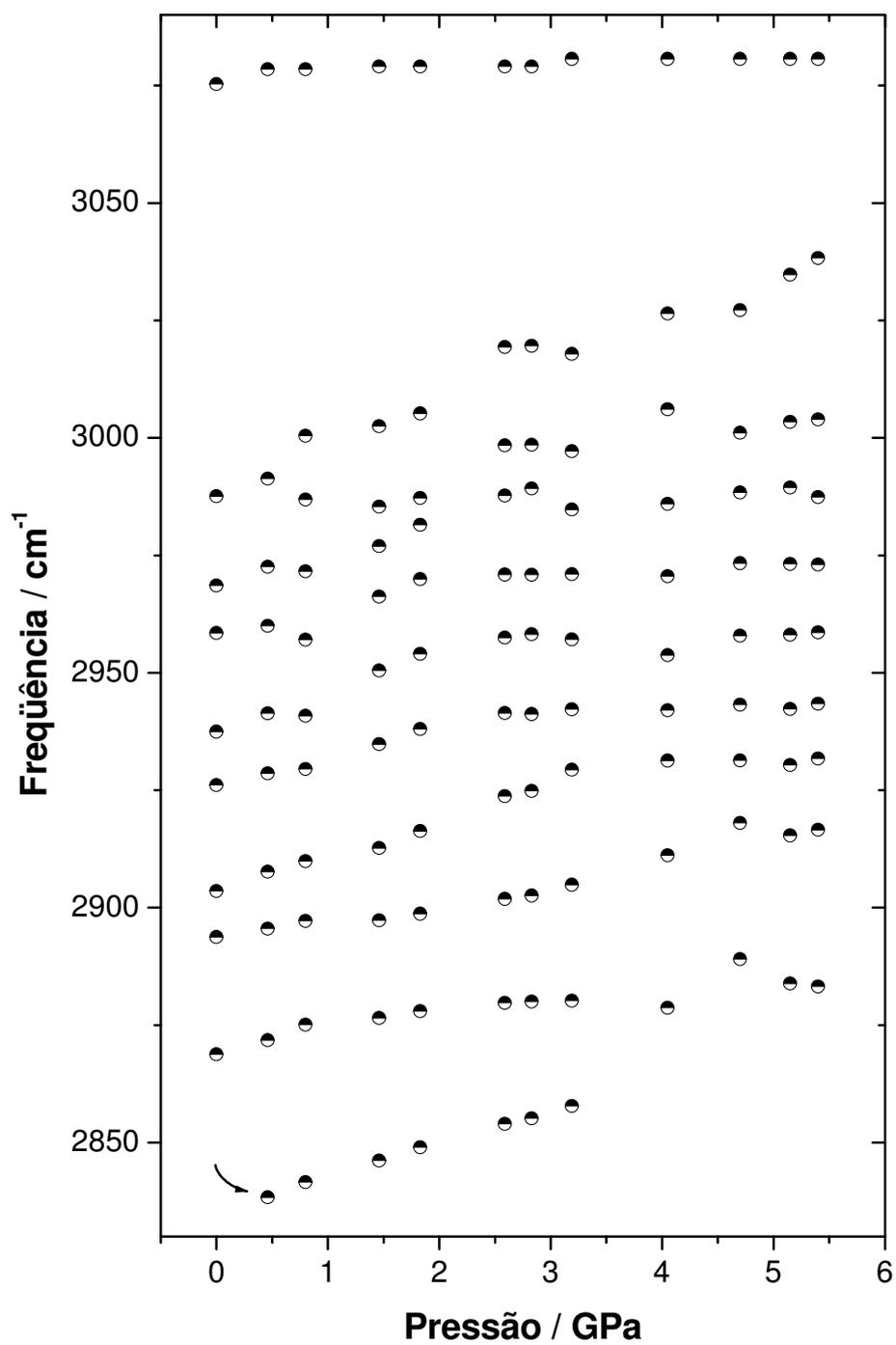


FIGURA 6.1 - Espectros Raman do cristal de L-leucina no intervalo de frequência entre 2750 e 3150 cm⁻¹ para diversos valores de pressão



FI
GURA 6.2 - Comportamento da frequência com a pressão para os modos de vibração do cristal de L-leucina na região entre 2820 e 3070 cm⁻¹. A frequência da nova banda que aparece no espectro Raman entre 0 e 0,46 GPa está marcada por uma seta (veja-se a nova banda marcada também por uma seta na Figura 6.1)

A Fig. 6.3 apresenta os espectros Raman do cristal de L-leucina com a pressão (0-5,40 GPa) na região espectral 1370-1750 cm^{-1} . As bandas compreendidas entre 1400 e 1500 cm^{-1} são associadas ao *bending* simétrico e assimétrico do CH_3 . Todos os modos, de uma forma geral, têm suas frequências aumentadas com o aumento da pressão. No entanto, alguns aspectos se destacam na evolução dos espectros Raman. O primeiro aspecto é que entre 0 e 0,46 GPa a banda larga centrada em aproximadamente 1420 cm^{-1} é separada em duas outras e esta novas bandas perdem bastante intensidade. O segundo aspecto relacionado a mudanças entre os espectros de 0 e 0,46 GPa é que a banda em aproximadamente 1625 cm^{-1} sofre um *red shift* (deslocamento das bandas para frequência mais baixas) de vários cm^{-1} . Estas duas mudanças no intervalo 0 – 0,46 GPa acontece exatamente no intervalo de pressão onde nos espectros de altas frequências havíamos cogitado a ocorrência de uma transição de fase.

Entre 0,80 e 1,46 cm^{-1} observa-se também algumas modificações nos espectros. A primeira é uma mudança de intensidade relativa entre as duas bandas mais intensas nesta região espectral. A segunda mudança é a grande diminuição de intensidade da banda larga centrada em aproximadamente 1625 cm^{-1} . Novamente estas mudanças acontecem no mesmo intervalo de pressão onde através dos resultados apresentados na Fig. 6.1 acredita-se estar ocorrendo uma segunda transição de fase para o cristal de L-leucina.

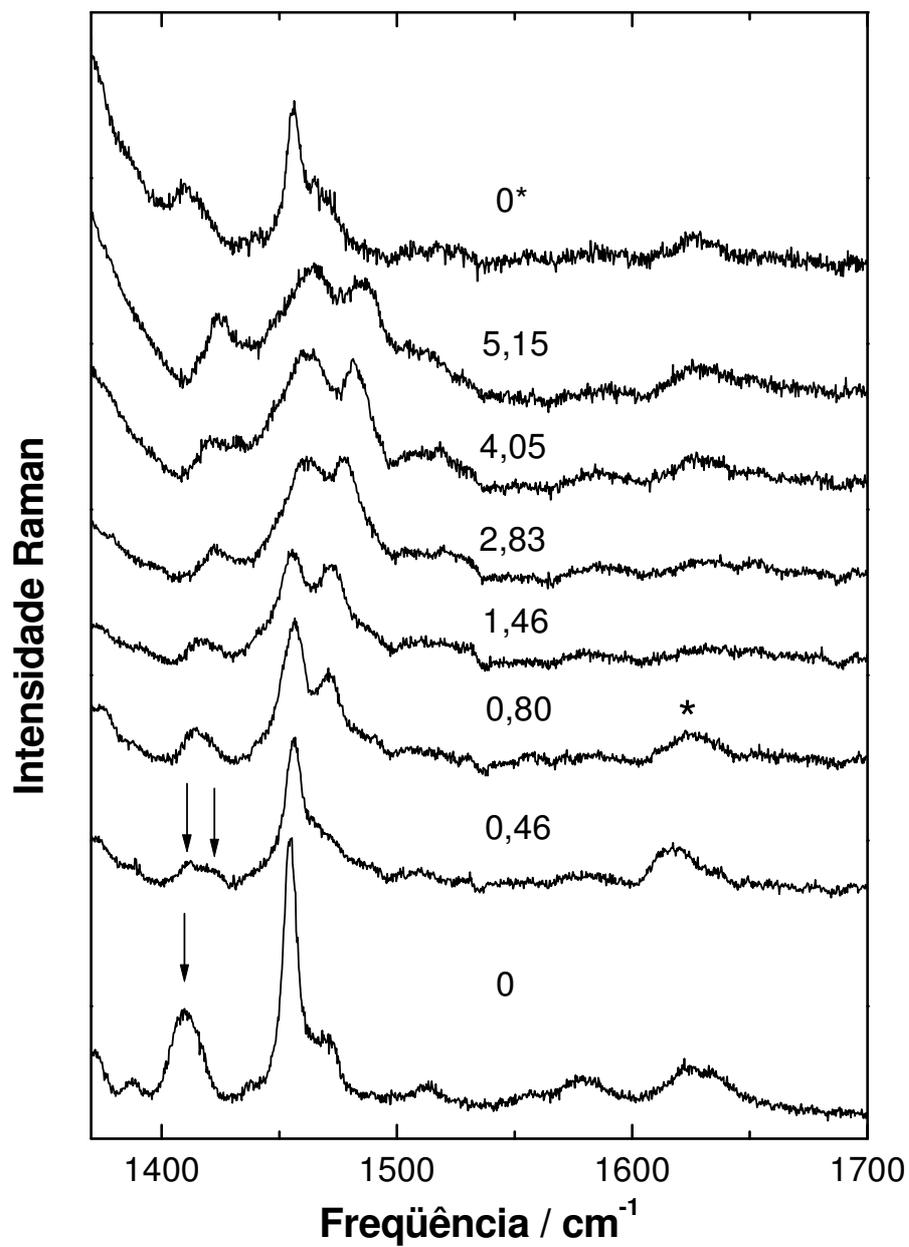


FIGURA 6.3 - Espectros Raman do cristal de L-leucina no intervalo de frequência entre 1350 e 1750 cm⁻¹ para diversos valores de pressão.

A Fig. 6.4 apresenta os espectros Raman do cristal de L-leucina com a pressão (0 – 5,40 GPa) na região espectral 730-1280 cm^{-1} . Nesta região espectral, assim como na região dos modos de estiramentos das unidades CH e CH_3 , aparecem diversos modos que sofrem grandes modificações com o aumento da pressão hidrostática ao qual o cristal é submetido. Observemos o que acontece entre 0 e 0,46 GPa. Primeiramente, observa-se uma grande variação na intensidade de todos os picos. Em segundo lugar uma nova banda, de baixa intensidade aparece em torno de 885 cm^{-1} . Em terceiro lugar, observa-se que uma banda em aproximadamente 1015 cm^{-1} , de baixa intensidade, dá lugar a uma banda relativamente intensa em torno de 1020 cm^{-1} . Observa-se, finalmente, que duas bandas em torno de 1180 cm^{-1} praticamente ficam com intensidade nula quando a pressão de 0,46 GPa é atingida. A partir deste quadro de indiscutíveis mudanças chega-se também à conclusão de que mudanças estruturais devem estar ocorrendo no cristal de L-leucina no intervalo de pressão apresentado, ficando a análise completamente coerente com a análise realizada com os espectros apresentados de outros intervalos de número de onda (Figuras 6.1 e 6.3)..

Entre 0,80 e 1,46 GPa drásticas mudanças no espectro Raman do cristal de L-leucina também são verificadas no intervalo espectral entre 730 e 1280 cm^{-1} . A primeira grande modificação é que as bandas em 838 e 849 cm^{-1} , identificadas por $\gamma(\text{CO}_2^-)$ e $\nu(\text{CH}_3)$, sofrem uma nova modificação de intensidade. A segunda modificação é que uma nova banda de alta intensidade aparece em aproximadamente 810 cm^{-1} . Observa-se ainda um alargamento da banda em 1020 cm^{-1} . Tal conjunto de modificações está associado a uma segunda transição de fase sofrida pelo cristal de L-leucina no intervalo de pressão 0,80 e 1,46 GPa.

A Figura 6.5 apresenta um gráfico do comportamento da frequência dos picos que aparecem no espectro Raman da L-leucina em função da pressão na região espectral entre 740 e 1300 cm^{-1} . Nesta figura destacam-se o aparecimento de uma banda entre 0 e 0,46 GPa, cujas frequências estão representadas por estrelas, e o aparecimento de uma segunda banda entre 0,80 e 1,46 GPa, cujas frequências estão representadas por uma quadrado.

A Fig. 6.6 apresenta os espectros Raman do cristal de L-leucina com a pressão (0 – 5,40 GPa) na região espectral entre 230 e 740 cm^{-1} . Novamente, como nas outras regiões espectrais analisadas entre 0 e 0,46 GPa ocorrem diversas modificações nos espectros Raman do cristal. Em primeiro lugar, todas as bandas perdem intensidade: observe-se, por exemplo, a banda em 671 cm^{-1} no espectro de pressão ambiente, que em 0,46 GPa praticamente não é mais visível. Até a banda associada à vibração do tipo *rocking* do CO_2^- , que é a mais intensa nesta região em $P = 0$ GPa, perde bastante intensidade quando atinge a pressão de 0,46 GPa.

Entretanto, o aparecimento de novas bandas, como ocorre nas outras três regiões espectrais já analisadas, não é verificado.

Entre 0,80 e 1,46 GPa, por outro lado, claríssimas modificações são observadas. Digno de particular atenção é o aparecimento da banda em 494 cm^{-1} (asterisco) à pressão de 1,46 GPa. Tal banda tem número de onda aumentado e intensidade diminuída com o aumento da pressão. Uma outra banda (outro asterisco) também aparece no espectro da pressão de 1,46 GPa com uma frequência em torno de 640 cm^{-1} . Estas modificações foram associadas à segunda transição de fase sofrida pela L-leucina entre 0,80 e 1,46 GPa.

Um ponto ainda merece atenção na Fig. 6.6. Ele diz respeito ao modo torsional do NH_3 , $\tau(\text{NH}_3)$. De acordo com uma identificação anterior a banda em 460 cm^{-1} é assinalada como $\tau(\text{NH}_3) + \delta(\text{skel.})$, ou seja, elas são aproximadamente degeneradas. Observe-se que com o aumento da pressão a degenerescência é quebrada: no espectro de 0.8 GPa, como comentado anteriormente, três bandas são observadas enquanto que no espectro de 0 GPa apenas duas bandas são visíveis. De qualquer forma $d\omega/dP$ é positivo para todas as bandas, incluindo-se aí a banda associada ao $\tau(\text{NH}_3)$.

Recentemente foi investigada a influência da alta pressão nos modos torsionais da L-alanina, L-treonina e taurina [64]. Deste trabalho foi observado que para a L-treonina e para a taurina o aumento da pressão produz um aumento da frequência da banda associada ao $\tau(\text{NH}_3)$, enquanto que para a L-alanina uma diminuição da frequência é verificada. Estas diferenças foram explicadas em termos do comprimento da ligação de hidrogênio para estas estruturas cristalinas. Para a L-treonina e a taurina as distâncias médias N – O são 2.86 \AA [65] e 2.90 \AA [66], respectivamente. O efeito da pressão nestes dois cristais é diminuir o comprimento das ligações de hidrogênio. Por outro lado, para a L-alanina [67], a distância média N – O é 2.83 \AA . Assim, o efeito da pressão neste último material seria distorcer as ligações de hidrogênio, tirando de uma mesma linha reta os átomos de N, H e O. Para o cristal de L-leucina, o trabalho da Ref. [28] mostra que a distância intermolecular média N- O é 2.88 \AA ; o grande comprimento da ligação de hidrogênio no cristal de L-leucina explica porque a frequência do modo $\tau(\text{NH}_3)$ possui um valor positivo para $d\omega/dP$ seguindo a mesma tendência da L-treonina e L-aurina.

Ainda na Figura 6.6 destaca-se o aparecimento da banda por volta de 714 cm^{-1} (asterisco) quando a pressão de 4,05 GPa é atingida. Tal banda pode estar relacionada com a unidade CO_2^- . O surgimento desta banda pode estar indicando uma transição de fase no cristal.

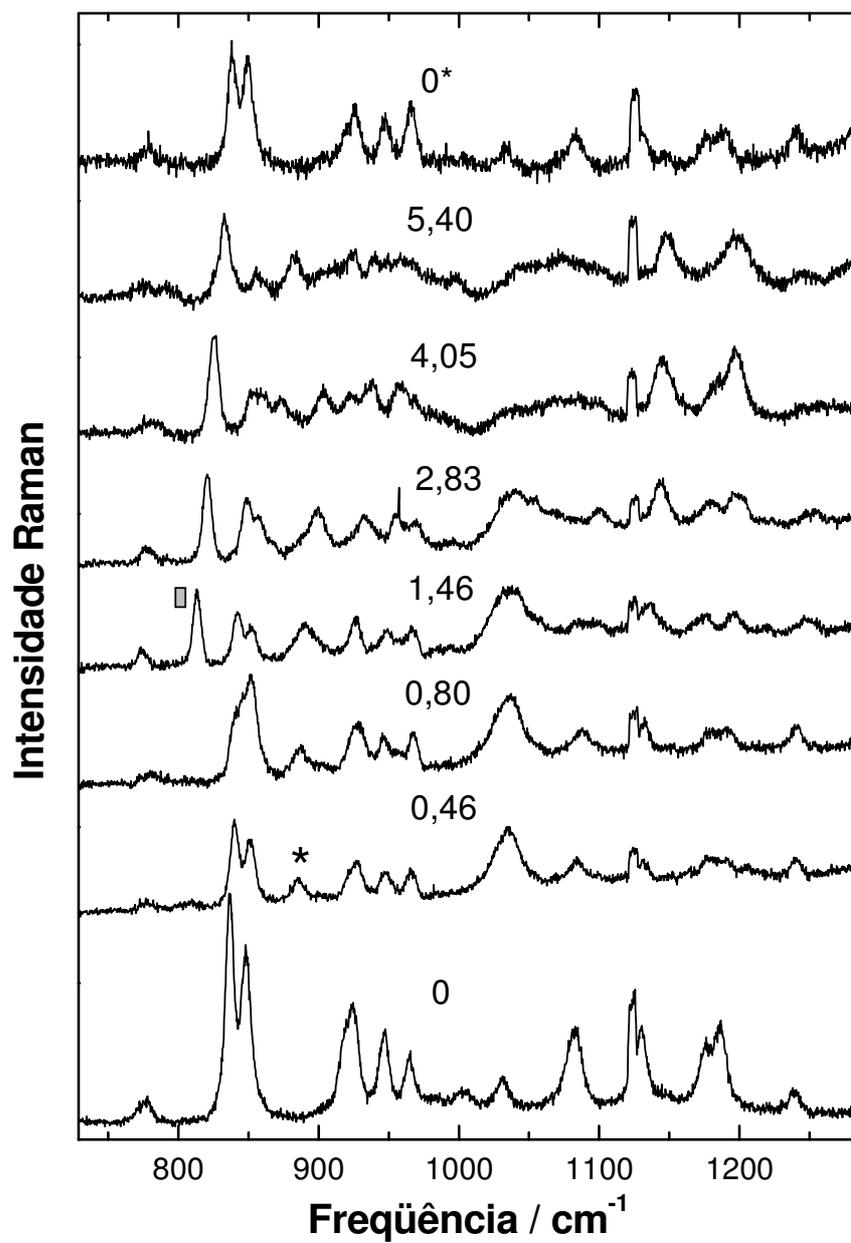


FIGURA 6.4 - Espectros Raman do cristal de L-leucina no intervalo de frequência entre 70 e 250 cm^{-1} para diversos valores de pressão (em GPa).

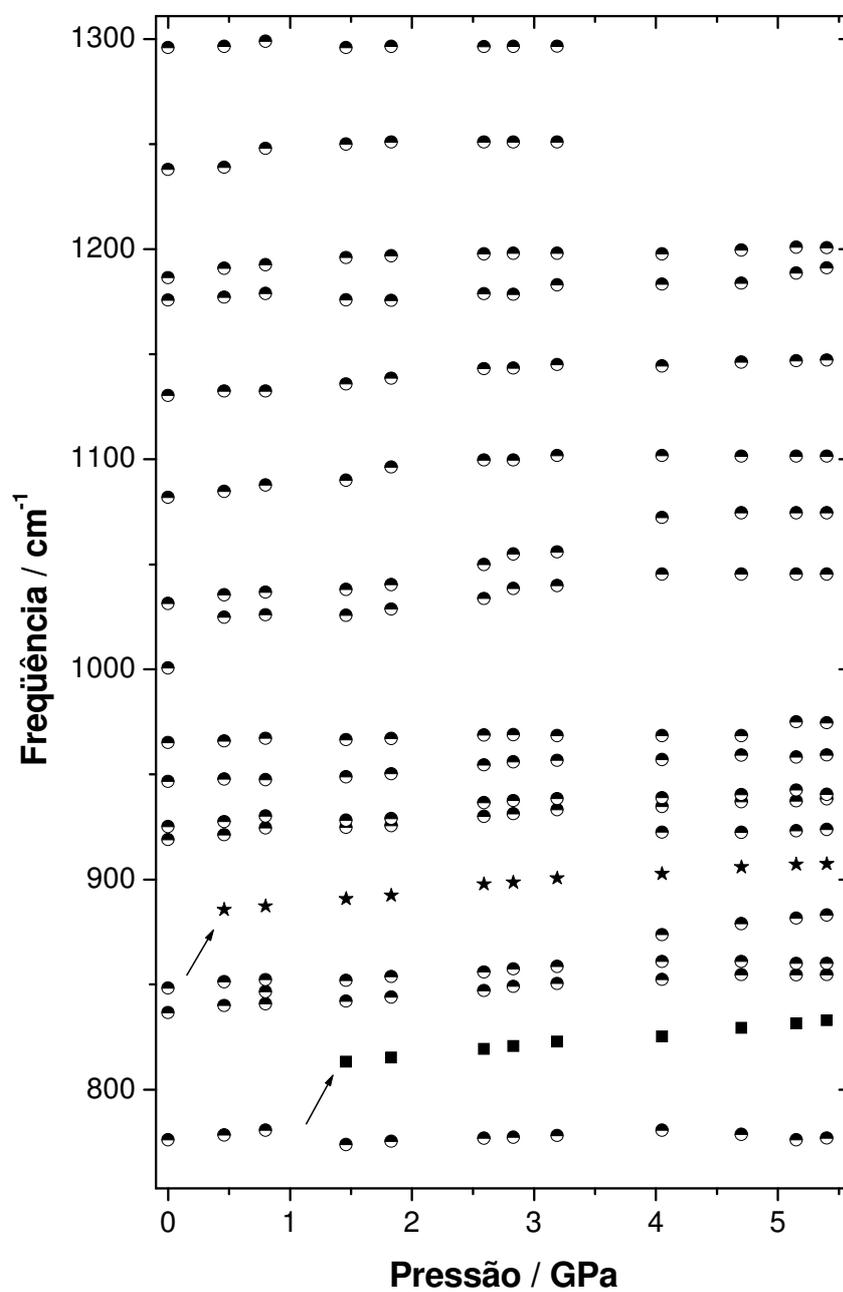


FIGURA 6.5 – Comportamento da frequência com a pressão para modos de vibração do cristal de L-leucina na região entre 740 e 1300 cm⁻¹.

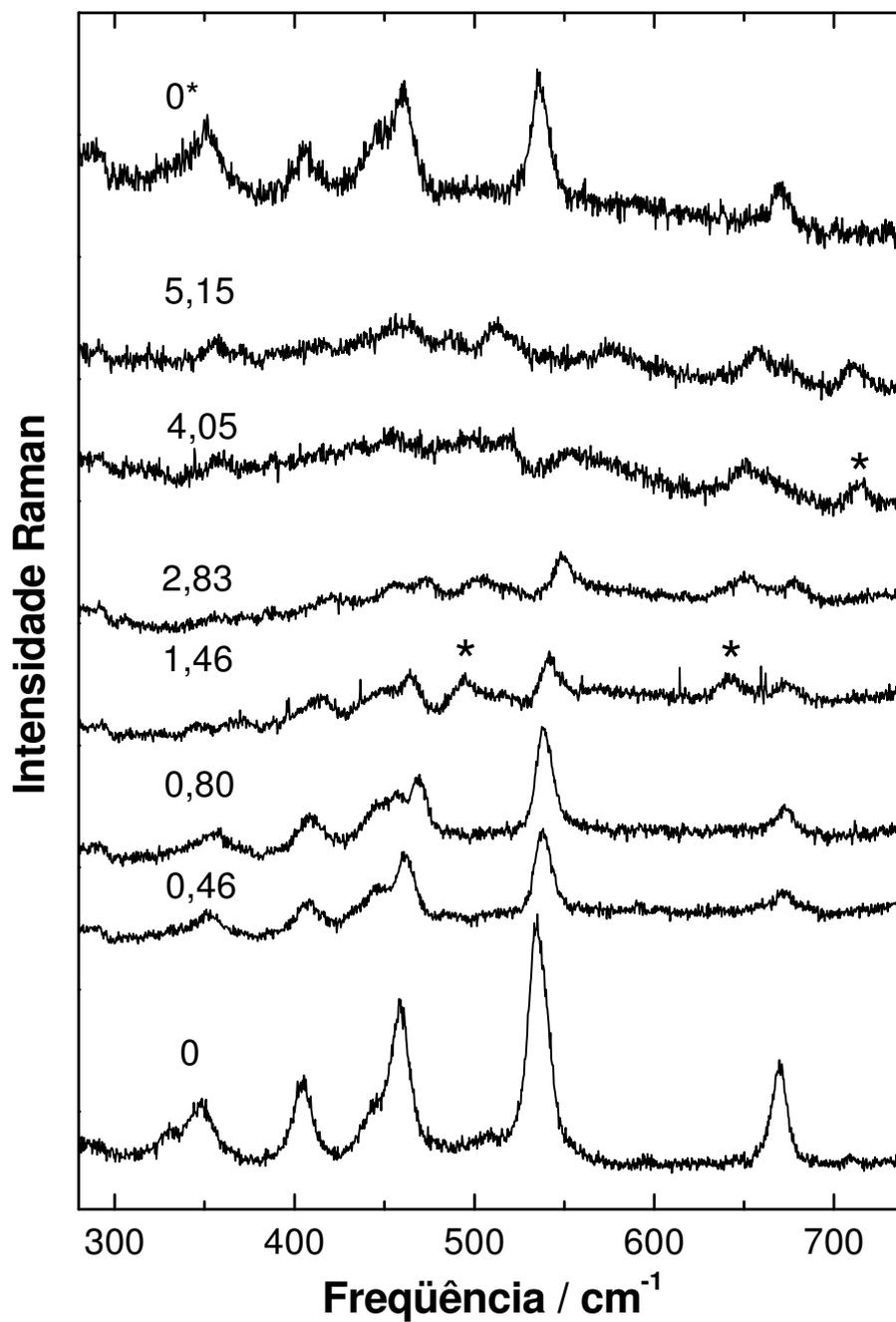


FIGURA 6.6 - Espectros Raman do cristal de L-leucina no intervalo de frequência entre 230 e 740 cm⁻¹ para diversos valores de pressão (em GPa).

A Figura 6.7 apresenta um gráfico do comportamento da frequência dos picos que aparecem no espectro Raman da L-leucina em função da pressão na região espectral entre 320 e 700 cm^{-1} . Nesta figura destacam-se o aparecimento de duas bandas entre 0,86 e 1,46 GPa, cujas frequências estão representadas por estrelas (no espectro da Figura 6.7 as bandas estão representadas por asteriscos). A região delimitada por uma elipse possui certa imprecisão (se dois ou três picos) devido à baixa intensidade das bandas naquela região de pressão. De qualquer forma, o ponto de destaque na figura é exatamente o aparecimento de duas bandas na segunda transição de fase. Ainda na Figura 6.7 o surgimento da banda em 714 cm^{-1} é também evidenciado (estrelas). Nesta região (230-740 cm^{-1}), os espectros de pressões acima de 4 GPa nos chama atenção tanto devido ao surgimento da banda em 714 cm^{-1} quanto à mudança na inclinação das curvas $d\omega/dP$ (Figura 6.7) de alguns modos em relação às pressões inferiores a 4 GPa. Tais mudanças podem indicar uma nova transição de fase para pressões acima de 4 GPa.

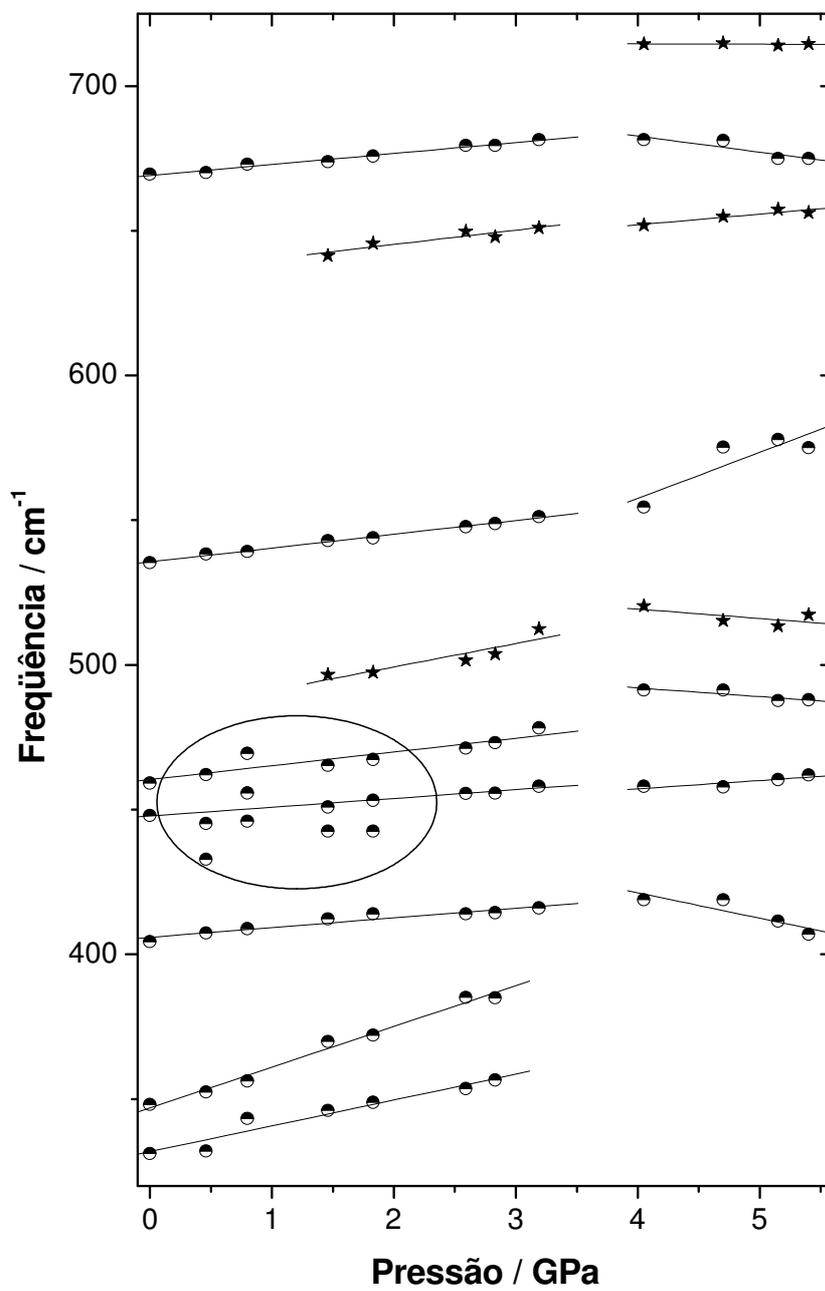


FIGURA 6.7 – Comportamento da frequência com a pressão para modos de vibração do cristal de L-leucina na região entre 320 e 700 cm^{-1} .

A Fig. 6.8 apresenta os espectros Raman do cristal de L-leucina no intervalo de pressão (0 – 5,04 GPa) na região espectral entre 70 e 250 cm^{-1} . Os modos marcados por A, B, C, D, E e F correspondem às frequências de 72, 87, 110, 125, 141 e 175 cm^{-1} , respectivamente. Esta região é aquela que pode confirmar com mais precisão a existência das transições de fases já sugeridas nos parágrafos anteriores.

Assim, vejamos inicialmente o espectro tomado à pressão atmosférica ($P = 0$ GPa). As bandas A-E estão associadas a modos da rede, enquanto que a banda F, que podem ser decomposta em dois picos, está associada às vibrações de torção CO_2^- e CH, conforme classificação fornecida na Tab. 4.4. O que se observa nos espectros entre 0 e 0,46 GPa é o seguinte: (i) grande diminuição da intensidade das bandas A (modo da rede) e F (modos torsionais); (ii) por outro lado, a banda B, que também está associada a modo da rede, aumenta sua intensidade relativa em relação às bandas A e C. (iii) a banda D aparece no espectro de 0,46 GPa apenas como um ombro da banda C; (iv) a mudança mais importante: o desaparecimento da banda E. Tal conjunto de modificações espectrais, juntamente com todas as outras modificações comentadas nos espectros das Figs. 6.1 a 6.7 abrangendo todos os modos internos do material nos levam a concluir com segurança que entre 0 e 0,46 GPa o cristal de L-leucina sofre *uma transição de fase estrutural*.

A análise agora, diz respeito ao que foi observado entre os espectros de 0,80 e 1,46 GPa. Novamente os resultados obtidos através de espectroscopia Raman não deixam margens para dúvidas. Vejamos: (i) a banda D, que é bem visível no espectro de 0,80 GPa desaparece no espectro tomado em 1,46 GPa. Observe-se que em torno de 150 cm^{-1} há uma banda bastante fraca no espectro de 1,46 GPa, que poderia ser a banda D após sofrer uma grande descontinuidade de frequência. De uma forma ou de outra (a banda D desaparecendo ou sofrendo uma grande descontinuidade em sua frequência) o fato só pode ser explicado como sendo devido a uma transição de fase estrutural experimentada pelo material. Observe-se, como segundo ponto de relevância, a grande diminuição de intensidade da banda associada aos modos torsionais. Finalmente, outro ponto de grande destaque é o aparecimento de uma banda larga onde anteriormente havia a banda B. Todo este conjunto de modificações nos espectros Raman na região de baixa energia e mais todas aquelas modificações observadas nos espectros Raman na região dos modos internos do cristal de L-leucina nos leva a concluir, novamente, que entre 0,80 e 1,46 GPa o referido cristal sofre *uma segunda transição de fase estrutural*. Após a pressão chegar a um valor máximo de 5,40 GPa, retornando-se a pressão atmosférica, observa-se que os espectros são recuperados, com uma pequena diferença de intensidade apenas na banda B. Tal fato confirma aquilo verificado em outras regiões dos

espectros Raman da L-leucina, qual seja, que a fase original monoclnica é recuperada quando se retorna às condições de pressão atmosférica.

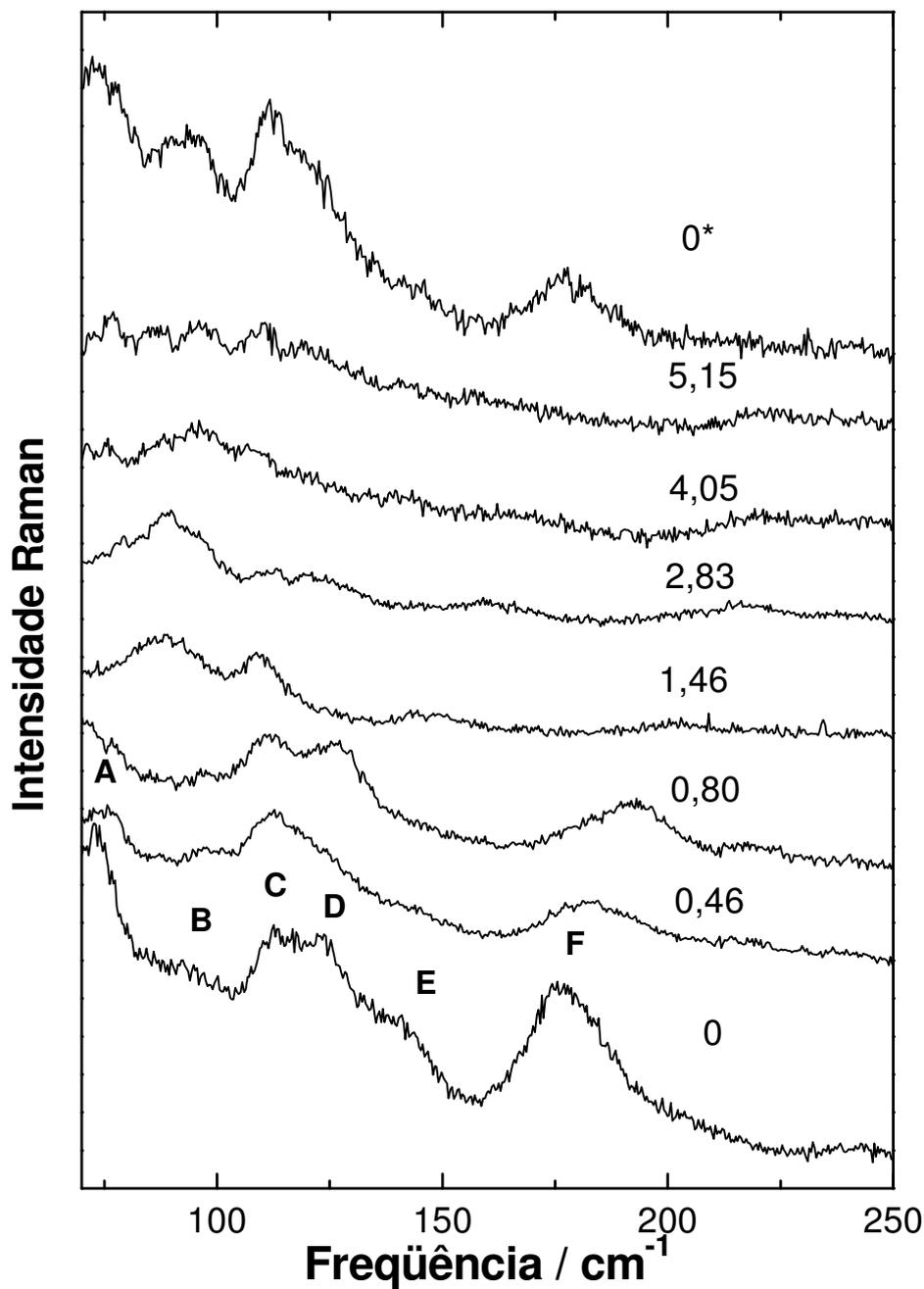


FIGURA 6.8 – Espectros Raman do cristal de L-leucina no intervalo de frequência entre 70 e 250 cm^{-1} para diversos valores de pressão (em GPa).

Concluimos, portanto, este capítulo com a constatação de que o cristal de L-leucina sofre duas transições de fase estruturais reversíveis entre 0 e 5,4 GPa. A primeira transição de fase está envolvendo unidades CH e CH₃, como pode ser visto principalmente pelo aparecimento de uma banda na região de alta energia onde estão localizadas as bandas associadas aos modos de estiramentos daquelas unidades. Esta transição também deve envolver, de certa forma, partes da molécula da L-leucina envolvidas nas ligações de hidrogênio. Veja-se, por exemplo, o grande alargamento da banda associada à torção do CO₂⁻ (Figura 6.8) durante a transição de fase. Os resultados ainda sugerem que a transição 0 – 0,46 GPa leve o cristal de L-leucina para uma estrutura bastante diferente da estrutura original, uma vez que uma nova banda está surgindo numa região onde normalmente ocorrem, no máximo, desvios de frequências das bandas; este fato pode ser verificado, por exemplo, num dos polimorfos da glicina [68]. Quanto a segunda transição de fase, entre 0,80 e 1,46 GPa, ela também é absolutamente clara: há desaparecimento de modos de rede, surgimento de vários modos internos e separação de modos de alta energia. Por conta dessas mudanças não é trivial explicar o mecanismo exato da transição de fase. Certamente há envolvimento das unidades CH e CH₃, por causa da separação da banda na região de altas frequências. Também, é razoável supor que as ligações de hidrogênio estejam envolvidas nesta transição; a banda associada ao modo de torção do CO₂⁻ praticamente tem sua intensidade indo a zero e a banda relacionada com a vibração do tipo *rocking* do CO₂⁻, que é muito intensa, também possui sua intensidade bastante diminuída. É possível que também ocorra uma transição de fase para pressões acima de 4 GPa. Embora não exista evidência associada aos modos externos, a mudança de inclinação de curvas $d\omega/dP$ de alguns modos, bem como o aparecimento da banda em 714 cm⁻¹, podem representar indícios desta nova eventual transição de fase. Uma melhor visão sobre as transformações na célula unitária do cristal de L-leucina certamente passará pelo estudo de alguma medidas de levantamento de estrutura como a difração de raios-X ou mesmo o espalhamento de nêutrons.

7 Conclusões e perspectivas

Foi apresentado nesta Tese um estudo dos modos normais de vibração do cristal de um dos aminoácidos essenciais, a L-leucina. Através das técnicas de espalhamento Raman e de absorção no infravermelho foi possível fazer uma identificação tentativa dos modos normais de vibração do cristal. Para as medidas de espalhamento Raman, duas diferentes geometrias de espalhamento foram utilizadas, sendo a identificação realizada baseada em trabalhos publicados em outros cristais de aminoácidos. Particularmente interessante foi um estudo comparativo entre os espectros Raman dos aminoácidos hidrofóbicos L-leucina, L-isoleucina e L-valina.

Estudos sobre o comportamento dos modos normais do cristal foram realizados quando o mesmo foi submetido a altas temperaturas. À temperatura ambiente a L-leucina cristaliza-se numa estrutura monoclinica C_2^2 com quatro moléculas por célula unitária. A análise do comportamento dos modos normais do cristal no intervalo de temperatura 290 – 413 K apresentou mudanças nas intensidades relativas de bandas relacionadas a modos internos, como aqueles por volta de 800 e 920 cm^{-1} , que dão indícios de uma transição de fase em 353 K. A confirmação da transição de fase estrutural se dá com o desaparecimento do modo de rede em 110 cm^{-1} no mesmo valor de temperatura. Provavelmente a mudança da estrutura leva de um grupo de pontual C_2 para um grupo C_s , o que permitiria o entendimento do desaparecimento de modos LO existentes abaixo da temperatura de transição após a transição de fase.

Estudos de espalhamento Raman com a pressão hidrostática foram igualmente bastante reveladores. Verificou-se que o cristal de L-leucina sofre duas transições de fase estrutural entre 0 e 5,4 GPa. A primeira transição de fase está envolvendo unidades CH e CH_3 , bem como partes da molécula da L-leucina relacionadas às ligações de hidrogênio. Os resultados sugerem ainda que a transição 0 – 0,46 GPa leve o cristal de L-leucina para uma estrutura bastante diferente da estrutura original, uma vez que uma nova banda está surgindo numa região onde normalmente ocorrem, no máximo, desvios de frequências dos modos. Quanto a segunda transição de fase, entre 0,80 e 1,46 GPa, observou-se o desaparecimento de modos da rede, surgimento de vários modos internos e separação de modos de alta energia. Novamente, espera-se a ocorrência do envolvimento das unidades CH e CH_3 , por causa da separação da banda na região de altas frequências. Também, é razoável supor que as ligações de hidrogênio estejam envolvidas nesta transição. Há indícios de uma terceira transição a

pressões acima de 4 GPa. A mudança de inclinação das curvas $d\omega / dP$ de alguns modos normais podem está associadas a esta provável transição, embora nenhuma evidência relacionada aos modos de rede possa atestar tal transição.

Como perspectivas de trabalhos futuros podemos citar:

(i) Estudos de cálculo do tipo *ab initio*, para se proceder a uma identificação mais precisa dos modos normais de vibração do cristal;

(ii) O estudo dos modos de vibração a baixas temperaturas, com o objetivo de se comparar o comportamento da L-leucina com a L-alanina e a L-isoleucina (que não apresentam mudanças em baixas temperaturas) e com a L-valina (que não apresenta uma mudança estrutural para $T < 300$ K);

(iii) Um estudo através de medidas de difração de raios-X ou mesmo por espalhamento de nêutrons para se determinas a estrutura das novas fases descobertas neste trabalho para a L-leucina.

REFERÊNCIAS:

- 1 J. P. McKelvey, Solid State Physics (for engineering and materials science) Krieger Publishing Company – Malabar, Florida (1993).
- 2 M. A. Omar, Elementary solid state physics: principles and applications. Reading, Massachusetts: Addison - Wesley, c1975.
- 3 N. W. Ashcroft, N. D. Mermin, Solid State Physics, Philadelphia: Saunders College, c1976.
- 4 C. Kittel, Introduction to solid state physics. 6th.ed. New York: John Wiley, 1986.
- 5 J. R. Christman, Fundamentals of solid state physics. New York: John Wiley, c1988.
- 6 A. L. Jenkis, R.A. Larsen, R. B. Williams, *Spectroc. Acta A* **61**, 1585 (2005).
- 7 A. J. D. Moreno, P. T. C. Freire, I. Guedes, F. E. A. Melo, J. M. Filho, J. A. Sanjurjo, *Braz. J. Phys.* **29**, 380 (1999).
- 8 B. L. Silva, P. T. C. Freire, F. E. A. Melo, I. Guedes, M. A. A. Silva, J. M. Filho, A. J. D. Moreno, *Braz. J. Phys.* **28**, 19 (1998).
- 9 J. A. Lima, P. T. C. Freire, R. J. C. Lima, A. J. D. Moreno, J. M. Filho, F. E. A. Melo, *J. Raman Spectrosc.* **36**, 1076 (2005).
- 10 A. Matei, N. Drichko, B. Gompf, M. Dressel, *Chem. Phys.* **316**, 61 (2005).
- 11 N. B. Colthup, L. H. Daly, S. E. Wiberley, Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy, Academic Press, second edition, USA (1975).
- 12 Lord Rayleigh, *Phil.Mag.*, XLI ,274 , 447 , (1871).
- 13 C.V. Raman, K.S. Krishnam, *Nature*, **121**, 521, (1928).
- 14 A. Smekal, *Naturwis.*,**16**, 557, 772, (1928).

- 15 D. A. Long, Raman Spectroscopy, McGraw-Hill, Inc., (1977).
- 16 Bolsover, S. R., Hyams, J. S., Shephard E. A., White H. A., Wiedemann C. G., Cell Biology a Short Course, Wiley-Liss, second edition, 2004.
- 17 Solomons, T.W.G., H. Macedo, Química orgânica. 6. ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, c1996.
- 18 Garrett R. H., Charles M.G., Biochemistry. 2.ed. Philadelphia: Saunders College Publishing, 1999.
- 19 Brown W.H., Introduction to organic chemistry. 4th.ed. Pacific Grove, Calif.: Brooks/Cole, c1988.
- 20 K.Davies, Decifrando o Genoma a corrida para desvendar o DNA, São Paulo: Companhia das letras, 2001.
- 21 Brookes, Fique por dentro da genética , São Paulo: Cosac & Naify, 2001.
- 22 R. A. Forman, G. J. Piermarini, J. D. Barnett, S. Block, *Science* **176**, 284 (1972).
- 23 G. J. Piermarini, S. Block, J. D. Barnett, R. A. Forman, *J. Appl. Phys.* **46**, 2774 (1975).
- 24 D. J. Dustan, I. L. Spain, *J. Phys. E: Scient. Inst.* **22**, 913 (1989).
- 25 D. J. Dustan, I. L. Spain, *J. Phys. E: Scient. Inst.* **22**, 923 (1989).
- 26 H. K. Mao, P. M. Bell, J. W. shaner, D. J. Steinberg, *J. Appl. Phys.* **49**, 3276 (1978).
- 27 A. Jayaraman, *Rev. Mod. Phys.* **55**, 65 (1983).
- 28 M. Coll, X. Solans and M. Font-Altaba and J. A. Subirana, *Acta Cryst.* **C42**, 599-661 (1986).
- 29 Marjorie M. Harding and R.M. Howieson, *Acta Cryst.* **B32**, 633 (1976).

- 30 G. Turrell, *Infrared and Raman Spectra of Crystals*, Academic Press, London (1972).
- 31 R. Taylor, O. Kennard, W. Versichel, *Acta Cryst.* **B40**, 280 (1984).
- 32 D. L. Rousseau, R. P. Bauman, S. P. S. Porto, *J. Raman Spectrosc.* vol. 10 (1981).
- 33 F. M. Almeida, P. T. C. Freire, R. J. C. Lima, C. M. R. Remédios, J. Mendes, F. E. A. Melo, *J. Raman Spectrosc.* **37**, 1296-1301 (2006).
- 34 A. Pawlukojs, J. Leciejewicz, I. Natkaniec, *Spectroc. Acta A*, **52**, 29 (1996).
- 35 C. H. Wang and R. D. Storms, *J. Chem. Phys.* **55**, 3291 (1971).
- 36 K. Machida, A. Kagayama, Y. Saito, T. Uno, *Spectrochimica Acta A* 34 (9), 909-914 (1978).
- 37 K. Machida, A. Kagayama, Y. Saito, *J. Raman Spectrosc.*, 7(4), 188-193 (1978).
- 38 K. Machida, A. Kagayama, Y. Saito, Y. Kuroda, T. Uno, *Spectrochimica Acta A* 33 (5), 569-574 (1977).
- 39 J. M. Beulah Rajkumar and V. Ramakrishnan, *J. Raman Spectrosc.* **31**, 1107-1112 (2000).
- 40 D. Bougeard *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **87**: 279 (1983).
- 41 R. J. C. Lima, P. T. C. Freire, J. M. Sasaki, F. E. A. Melo, J. Mendes, *J. Raman Spectrosc.* **33**, 625 (2002).
- 42 J. L. B. Faria, O. Pilla, F. Rossi, J. M. Sasaki, F. E. A. Melo, J. Mendes, P. T. C. Freire, *J. Raman Spectrosc.* **35**, 242 (2004).
- 43 C. Brissette, C. Sandorfy, *Can. J. Chem.* **38**, 34 (1960).

- 44 L. J. Bellamy, *The infrared spectra of complex molecules*. 2nd ed. London: Chapman & Hall, c1980.
- 45 B. Chenon, C. Sandorfy, *Can. J. Chem.* **36**, 1181 (1958).
- 46 C. Murli, S. Thomas, S. Venlateswaran, S. M. Shorme, *Physica B* **364**, 233 (2005).
- 47 C. H. Wang, R. D. Storms, *J. Chem. Phys.* **55**, 5110 (1971).
- 48 C. H. Gorbitz, B. Dalhus, *Acta Cryst. C* **52**, 1754 (1996).
- 49 A. M. R. Teixeira, P. T. C. Freire, A.J.D. Moreno, J.M. Sasaki, AP Ayala, J. Mendes, F. E. A. Melo. *Solid State Commun.* **116**, 405 (2000).
- 50 M. Barthes, HN. Bordallo, F. Dénoyer, J-E Lorenzo, J. Zaccaro, A. Robert, F.Zontone, *Eur. Phys. J. B.* **37**, 375 (2004).
- 51 R. J. C. Lima, PTC Freire, JM Sasaki, F.E.A. Melo, J. Mendes, R.L. Moreira, *J. Raman Spectrosc.* **32**, 751 (2001).
- 52 S. Forss, *J. Raman Spectroc.* **vol. 12**, N0 3, (1982).
- 53 A.J.D. Moreno, *Estudo de Transições de Fase por Espectroscopia Raman em Monocristais de L-asparagina Monohidratada*, Tese de Doutorado, (1996).
- 54 C. Murli, S. M. Sharma, S. Karmakar, S. K. Sikka, *Physica B* **339**, 23 (2003).
- 55 E. V. Boldyreva, H. Ahsbahs, H. -P. Weber, *Z. Kristallogr.* **218**, 231 (2003).
- 56 E. V. Boldyreva, S. N. Ivashevskaya, H. Sowa, H. Ahsbahs, H. -P. Weber, *Dok. Phys. Chem.* **396**, 111 (2004).
- 57 A. Dawson, D. R. Allan, S. A. Belmonte, S. J. Clark, W. I. F. David, P. A. McGregor, S. Parsons, C. R. Pulham, L. Sawyer, *Cryst. Growth Des.* **5**, 1415 (2005).

- 58 A. J. D. Moreno, P. T. C. Freire, F. E. A. Melo, M. A. A. Silva, I. Guedes, J. Mendes, *Solid State Commun.* **103**, 655 (1997).
- 59 E. N. Kolesnik, S. V. Goryainov, E. V. Boldyreva, *Dok. Phys. Chem.* **404**, 169 (2005).
- 60 S. A. Moggach, D. R. Allan, C. A. Morrison, S. Parsons, L. Sawyer, *Acta Crystallogr. B* **61**, 58 (2005).
- 61 S. V. Goryainov, E. N. Kolesnik, E. V. Boldyreva, *Physica B* **357**, 340 (2005).
- 62 J. M. Sasaki, P. T. C. Freire, A. J. D. Moreno, F. E. A. Melo, I. Guedes, J. Mendes, J. Shu, J. Hu, H-K. Mão, *Science and Technology of High Pressure*, in: M. H. Manghnani, W. J. Nellis, M. F. Nicol (Eds.) *Proceedings of AIRAPT-17*, University Press, Hiderabad, India, 200, p.502.
- 63 B. L. Silva, P. T. C. Freire, P. T. C. Freire, J. Mendes, M. A. Pimenta, M. S. S. Dantas, *J. Raman Spectrosc.* **31**, 519 (2000).
- 64 P. T. C. Freire, F. E. A. Melo, J. Mendes Filho, R. J. C. Lima, *Vib. Spectrosc.* (2007), doi: 10.1016/j.vibspec.2007.05.003.
- 65 D. P. Shoemaker, J. Donojye, V. Schomaker, R. B. Corey, *J. Am. Chem. Soc.* **72**, 2328 (1950).
- 66 Y. Okaya, *Acta Cryst.* **21**, 726 (1966).
- 67 M. S. Lehmann, T. F. Koetzle, W. C. Hamilton, *J. Am. Soc.* **94**, 2657 (1972).
- 68 S. V. Goryainov, E. V. Boldyreva, E. N. Kolesnik, *Chem. Phys. Lett.* **419**, 496 (2006).