

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR  
DOUTORADO EM BIOQUÍMICA**

**“CRISTAIS DE ÁCIDO GLUTÂMICO: CRESCIMENTO, CARACTERIZAÇÃO  
E CÁLCULOS *AB INITIO*”.**

**JOSÉ AURI PINHEIRO**

**FORTALEZA  
2006**

**“CRISTAIS DE ÁCIDO GLUTÂMICO: CRESCIMENTO, CARACTERIZAÇÃO  
E CÁLCULOS *AB INITIO*”.**

**JOSÉ AURI PINHEIRO**

**Tese apresentada à coordenação do  
curso de Pós-Graduação em  
Bioquímica da Universidade Federal  
do Ceará como requisito parcial  
para obtenção do grau de  
Doutorado em Bioquímica.**

**FORTALEZA**

**2006**

P72c Pinheiro, José Auri

Cristais de ácido glutâmico [manuscrito] : crescimento, caracterização, e cálculo AB-início / José Auri Pinheiro  
113 f. : il. color. ; enc.

Orientador: Dr. Benildo Sousa Cavada

Co-orientador: Dr. Valder Nogueira Freire

Área de concentração: Bioquímica

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008

1. Ácido glutâmico - Cristalização I. Cavada, Benildo Sousa (orient.) II. Universidade Federal do Ceará – Doutorado em Bioquímica III. Título

CDD 574.192

JOSÉ AURI PINHEIRO

**"CRISTAIS DE ÁCIDO GLUTÂMICO: CRESCIMENTO, CARACTERIZAÇÃO  
E CÁLCULOS AB NITIO"**

Tese apresentada à coordenação do curso de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Bioquímica, e encontra-se à disposição dos interessados na biblioteca Central da referida Universidade.

Tese aprovada em 18 de Setembro de 2006

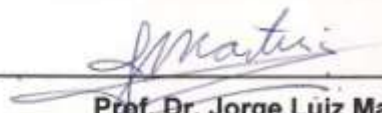
**BANCA EXAMINADORA**



**Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada (Orientador)**  
Universidade Federal do Ceará - UFC



**Prof. Dr. Valder Nogueira Freire (Co-orientador)**  
Universidade Federal do Ceará - UFC



**Prof. Dr. Jorge Luiz Martins**  
Universidade Federal de Pelotas - UFPel



**Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho**  
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE



**Prof. Dra. Maria da Conceição Ferreira de Oliveira**  
Universidade Federal do Ceará - UFC

**“A vida é efêmera, o exemplo é eterno”**

**José Auri Pinheiro**

**Aos meus filhos  
Dedico.**

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Benildo Sousa Cavada pelo acolhimento, desse trabalho, sem o qual esta tese não teria sido realizado.

Ao Professor Doutor Valder Nogueira Freire por ter aceito a co-orientação deste trabalho, contribuindo com excelentes idéias para o desenvolvimento do mesmo.

Aos Professores Drs. José Luiz de Lima Filho, Jorge Luiz Martins e Maria da Conceição Ferreira de Oliveira pela análise criteriosa e construtiva deste trabalho.

Aos colegas da Física Wagner e Marcelo pela enorme contribuição na realização dos cálculos como também na compreensão dos ensinamentos teóricos.

Ao colega da Física Ricardo pelo constante apoio nos momentos difíceis deste trabalho.

Um especial agradecimento a colega da Bioquímica Ana Júlia pela dedicada ajuda na obtenção dos cristais.

Aos colegas Gustavo e Tainá pela valiosa contribuição na revisão desta tese.

Ao meu colega, amigo e companheiro de todas as horas, Emmanuel Marinho pela dedicação apoio nos momentos cruciais deste trabalho, sem o qual não teria sido possível a realização do mesmo.

A colega Tatiani Santi Gadelha pelos primeiros ensinamentos no Laboratório de Bioquímica.

Aos colegas Bruno, Plínio, Pepeu, Luciana, Alexandre, Ramon, Lara, Lia, Emmanuel Prata, Eduardo, Raquel, Kyria pelo agradável convívio no Laboratório.

Aos meus colegas do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica pelo apoio.

## **ESTE TRABALHO FOI REALIZADO GRAÇAS AO AUXILIO DAS SEGUINTE INSTITUIÇÕES**

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelos convênios estabelecidos com o Curso de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelos constantes auxílios de pesquisa concedidos ao BioMol-lab (Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará).

Fundação Cearense de Amparo à Pesquisa (FUNCAP), pelos constantes auxílios de pesquisa concedidos ao BioMol-Lab (Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará).

Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, onde este trabalho foi realizado.



## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>6</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>9</b>
<b>ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES</b> .....	<b>11</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>12</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>13</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	18
<b>1.2. ELEMENTOS DE CRISTALOGRAFIA</b> .....	<b>23</b>
<b>1.3. PROCESSO DE CRISTALIZAÇÃO</b> .....	<b>28</b>
<b>1.4. CRISTAIS DE AMINOÁCIDOS</b> .....	<b>32</b>
<b>1.5. ÁCIDO GLUTÂMICO</b> .....	<b>34</b>
<b>1.6 APLICAÇÕES DO ÁCIDO GLUTÂMICO</b> .....	<b>42</b>
<b>1.7.MÉTODOS DE PRIMEIROS PRINCÍPIOS (AB INITIO)</b> .....	<b>45</b>
<b>1.8 LUMINESCÊNCIA</b> .....	<b>56</b>
1.8.1 TEORIA DE FLUORESCÊNCIA E FOSFORESCÊNCIA.....	57
1.8.2 SPIN ELETRÔNICO .....	57
1.8.3 ESTADO EXCITADO SINGLETE/TRIPLETE .....	57
1.8.4 DIAGRAMA DOS NÍVEIS DE ENERGIA PARA MOLÉCULAS FOTOLUMINESCENTES. ....	58
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>60</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>61</b>
3.1 CRESCIMENTO DE CRISTAIS DE ÁCIDO L-GLUTÂMICO .....	61
3.2. MEDIDAS DE FLUORESCÊNCIA.....	62
3.3. MEDIDAS DE ABSORÇÃO.....	63
3.4. CÁLCULOS AB-INITIO .....	63
<b>4.RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>65</b>
4.1.-CRESCIMENTO DE CRISTAIS DE ÁCIDO L-GLUTÂMICO .....	65
4.3. ANÁLISE DE POPULAÇÃO .....	85
4.4. ESTRUTURAS DE BANDAS – AGLU.....	87
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	<b>106</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS</b> .....	<b>107</b>

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. L- $\alpha$ -AMINOÁCIDOS SÃO CONSTITUINTES DAS PROTEÍNAS .....	20
FIGURA 2. EIXOS CRISTALINOS A, B E C, CUJOS MÓDULOS DENOMINAM-SE PARÂMETROS DE REDE, E ÂNGULOS A, B E $\gamma$ .....	24
FIGURA 3. REPRESENTAÇÃO DOS SETE (7) SISTEMAS CRISTALINOS PROVENIENTES DOS QUATORZE TIPOS DE REDES DE BRAVAIS.....	27
FIGURA 4. DIAGRAMA DE FASES MOSTRANDO A FORMAÇÃO DE NÚCLEOS E O CRESCIMENTO.....	30
FIGURA 5. APARATO DE CRESCIMENTO DE CRISTAIS PELO MÉTODO DA EVAPORAÇÃO LENTA (PINHEIRO, 2003).....	32
FIGURA 6. VISÃO GERAL DA UNIDADE ASSIMÉTRICA DO ÁCIDO D,L-GLUTÂMICO (CIUNIK & GLOWIAK, 1983) .....	36
FIGURA 7. VISTA ESTEREOSCÓPICA DO ÁCIDO L-GLUTÂMICO. EM (A) A FORMA A E (B) A FORMA B. EM AMBOS OS CASOS A VISTA SOBRE ESSE PLANO C2—C3—C4, O QUAL ESCLARECE AS DIFERENÇAS CONFORMACIONAIS. OS HIDROGÊNIO FORAM OMITIDOS PARA TORNAR MAIS CLARO O ESQUELETO CARBÔNICO (BERNSTEIN, 1991). .....	38
FIGURA 8. MORFOLOGIA DAS CONFORMAÇÕES A (A) E B (B) (KITAMURA & ISHIZU, 2000). .....	39
FIGURA 9. EFEITO DE VÁRIOS ADITIVOS NO CRESCIMENTO DA FORMA B DE CRISTAIS DE ÁCIDO GLUTÂMICO (SANO <i>ET AL.</i> , 1997).....	42
FIGURA 10. REPRESENTAÇÃO DOS ESTADOS: FUNDAMENTAL SINGLETE (A), EXCITADO SINGLETE (B) E EXCITADO TRIPLETE (C).....	58
FIGURA 11. DIAGRAMA PARCIAL DE ENERGIA DO SISTEMA FOTOLUMINESCÊNCIA .	59
FIGURA 12. FOTO DE UM CRISTAL DE ÁCIDO L-GLUTÂMICO (POLIMORFO $\alpha$ ) CRESCIDO PELO MÉTODO DE RESFRIAMENTO.....	66
FIGURA 13. CONFORMAÇÕES DO ÁCIDO GLUTÂMICO NOS CRISTAIS A E B. A NOTAÇÃO USADA PARA INDICAR OS ÁTOMOS DE CADA FORMAÇÃO TAMBÉM É APRESENTADA	68
FIGURA 14. SOBREPOSIÇÃO DOS POLIMORFOS $\alpha$ E B DO ÁCIDO L-GLUTÂMICO.....	71
FIGURA 15. VISTAS DAS CÉLULAS UNITÁRIAS DO ÁCIDO GLUTÂMICO PARA OS CRISTAIS A E B. ....	73
FIGURA 16. DIFERENTES PERSPECTIVAS DE VÁRIAS CÉLULAS UNITÁRIAS ADJACENTES DO CRISTAL A. . NOTA-SE A ESTRUTURA DE PONTES DE HIDROGÊNIO QUE ESTABILIZA	

A REDE CRISTALINA (LINHAS TRACEJADAS EM AZUL-CLARO). .....	74
FIGURA 17. VISTAS DE CÉLULAS UNITÁRIAS ADJACENTES DO CRISTAL B .....	75
FIGURA 18. COMPARAÇÃO DAS COORDENADAS ATÔMICAS RELATIVAS E ABSOLUTAS ENTRE OS RESULTADOS EXPERIMENTAIS (QUADRADOS, CÍRCULOS E TRIÂNGULOS SÓLIDOS) E TEÓRICOS (GGA-PBE, QUADRADOS, CÍRCULOS E TRIÂNGULOS ABERTOS) PARA O CRISTAL DE ÁCIDO GLUTÂMICO NA FASE A. A VARIAÇÃO RMS É OBTIDA A PARTIR DOS DADOS NAS TRÊS DIREÇÕES: A, B E C. ....	81
FIGURA 19. COMPARAÇÃO DAS COORDENADAS ATÔMICAS RELATIVAS E ABSOLUTAS ENTRE OS RESULTADOS EXPERIMENTAIS (QUADRADOS, CÍRCULOS E TRIÂNGULOS SÓLIDOS) E TEÓRICOS (GGA-PBE, QUADRADOS, CÍRCULOS E TRIÂNGULOS ABERTOS) PARA O CRISTAL DE ÁCIDO GLUTÂMICO NA FASE B. A VARIAÇÃO RMS É OBTIDA A PARTIR DOS DADOS NAS TRÊS DIREÇÕES: A, B E C. ....	82
FIGURA 20. ESTRUTURA DE BANDAS E DENSIDADE DE ESTADOS PARCIAL PARA O CRISTAL A. NA PARTE INFERIOR DETALHE DA ESTRUTURA NAS VIZINHANÇAS DO GAP DE ENERGIA PRINCIPAL. OS PRINCIPAIS GAPS SÃO ASSINALADOS. ....	88
FIGURA 21. DOS PARCIAL PARA OS ÁTOMOS DE OXIGÊNIO NO CRISTAL A.....	89
FIGURA 22. DOS PARCIAL PARA OS ÁTOMOS DE NITROGÊNIO, CARBONO E HIDROGÊNIO NO CRISTAL A. ....	90
FIGURA 23. VISTAS DOS ORBITAIS ELETRÔNICOS NO TOPO DA BANDA DE VALÊNCIA PARA O CRISTAL A. ....	91
FIGURA 24. VISTAS DOS ORBITAIS ELETRÔNICOS NA BASE DA BANDA DE CONDUÇÃO PARA O CRISTAL A. ....	92
FIGURA 25. ESTRUTURA DE BANDAS E DENSIDADE DE ESTADOS PARCIAL PARA O CRISTAL B . NA PARTE INFERIOR DETALHE DA ESTRUTURA NAS VIZINHANÇAS DO GAP DE ENERGIA PRINCIPAL. OS PRINCIPAIS GAPS SÃO ASSINALADOS .....	94
FIGURA 26. DOS PARCIAL PARA OS ÁTOMOS DE OXIGÊNIO NO CRISTAL B.....	95
FIGURA 27. DOS PARCIAL PARA OS ÁTOMOS DE NITROGÊNIO, CARBONO E HIDROGÊNIO NO CRISTAL B. ....	96
FIGURA 28. VISTAS DOS ORBITAIS ELETRÔNICOS NO TOPO DA BANDA DE VALÊNCIA PARA O CRISTAL B. ....	97
FIGURA 29. VISTAS DOS ORBITAIS ELETRÔNICOS NA BASE DA BANDA DE CONDUÇÃO PARA O CRISTAL B. ....	98
FIGURA 30. FUNÇÃO DIELÉTRICA (PARTES REAL E IMAGINÁRIA) PARA DIFERENTES POLARIZAÇÕES DA RADIAÇÃO INCIDENTE E UMA AMOSTRA POLICRISTALINA DE A-ÁCIDO GLUTÂMICO .....	100

<b>FIGURA 31. FUNÇÃO DIELÉTRICA (PARTES REAL E IMAGINÁRIA) PARA DIFERENTES POLARIZAÇÕES DA RADIAÇÃO INCIDENTE E UMA AMOSTRA POLICRISTALINA DE B-ÁCIDO L-GLUTÂMICO.....</b>	<b>101</b>
<b>FIGURA 32. ABSORÇÃO PARA DIFERENTES POLARIZAÇÕES DA RADIAÇÃO INCIDENTE E UMA AMOSTRA POLICRISTALINA DE A-ÁCIDO L-GLUTÂMICO.....</b>	<b>102</b>
<b>FIGURA 33. ABSORÇÃO PARA DIFERENTES POLARIZAÇÕES DA RADIAÇÃO INCIDENTE E UMA AMOSTRA POLICRISTALINA DE B-ÁCIDO L-GLUTÂMICO.....</b>	<b>103</b>
<b>FIGURA 34. ESPECTRO DE EMISSÃO DO CRISTAL DO POLIMORFO ALFA.....</b>	<b>104</b>
<b>FIGURA 35. ESPECTRO DE ABSORÇÃO DO CRISTAL DO POLIMORFO ALFA .....</b>	<b>105</b>

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - OS SETE SISTEMAS CRISTALINOS E OS 14 TIPOS DE REDES EM TRÊS DIMENSÕES.....	26
TABELA 2 - TÉCNICAS DE CRESCIMENTO DE CRISTAIS .....	30
TABELA 3 - COORDENADAS ATÔMICAS E PARÂMETROS TERMAIS DA FORMA A DO ÁCIDO L-GLUTÂMICO (LEHMANN & NUNES, 1980).....	34
TABELA 4 - ÂNGULOS DE TORSÕES DAS MODIFICAÇÕES $\alpha$ E $\beta$ DO ÁCIDO L-GLUTÂMICO (LEHMANN & NUNES, 1980).....	35
TABELA 5 - PARÂMETROS TÉRMICOS E POSICIONAIS DO ÁCIDO D,L GLUTÂMICO (CIUNIK & GLOWIAK, 1983).....	37
TABELA 6 - MATERIAIS, INSUMOS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS NO CRESCIMENTO DOS CRISTAIS.....	62
TABELA 7 - COORDENADAS REDUZIDAS DOS ÁTOMOS NA MOLÉCULA MI(1) DE ÁCIDO GLUTÂMICO DE ACORDO COM (LEHMANN & NUNES, 1980). .....	69
TABELA 8 - COORDENADAS ABSOLUTAS DOS ÁTOMOS NA MOLÉCULA MI(1) DE ÁCIDO GLUTÂMICO OBTIDAS EXPERIMENTALMENTE (HIROKAWA, 1955).....	70
TABELA 9 - PARÂMETROS DE REDE, VOLUME DA CÉLULA UNITÁRIA E DENSIDADE DE MASSA PARA AS DUAS FASES DO CRISTAL DE ÁCIDO GLUTÂMICO: COMPARAÇÃO ENTRE RESULTADOS EXPERIMENTAIS E CÁLCULOS DE PRIMEIROS PRINCÍPIOS. OS PERCENTUAIS SÃO RELATIVOS AOS DADOS EXPERIMENTAIS.....	78
TABELA 10 - COORDENADAS REDUZIDAS DOS ÁTOMOS NA MOLÉCULA MI(1) DE ÁCIDO GLUTÂMICO CALCULADAS USANDO O FUNCIONAL DE TROCA E CORRELAÇÃO GGA-PBE .....	79
TABELA 11 - COORDENADAS ABSOLUTAS DOS ÁTOMOS NA MOLÉCULA MI(1) DE ÁCIDO GLUTÂMICO CALCULADAS NO FORMALISMO GGA-PBE. ....	80
TABELA 12 - DISTÂNCIAS ENTRE ÁTOMOS PARA AS DUAS FASES DO CRISTAL DE ÁCIDO GLUTÂMICO: COMPARAÇÃO ENTRE RESULTADOS EXPERIMENTAIS E CÁLCULOS DE PRIMEIROS PRINCÍPIOS. OS PERCENTUAIS SÃO RELATIVOS AOS DADOS EXPERIMENTAIS .....	83
TABELA 13 - COMPRIMENTOS E ÂNGULOS DAS LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO PARA AS DUAS FASES DO CRISTAL DE ÁCIDO GLUTÂMICO: COMPARAÇÃO ENTRE RESULTADOS EXPERIMENTAIS E CÁLCULOS DE PRIMEIROS PRINCÍPIOS. OS PERCENTUAIS SÃO RELATIVOS AOS DADOS EXPERIMENTAIS. O PRIMEIRO NÚMERO CORRESPONDE AO COMPRIMENTO EM Å, ENQUANTO O SEGUNDO NÚMERO É O ÂNGULO DA LIGAÇÃO EM	

<b>GRAUS.....</b>	<b>84</b>
<b>TABELA 14 - ÂNGULOS ENTRE LIGAÇÕES COVALENTES E ÂNGULOS DE TORÇÃO PARA AS DUAS FASES DO CRISTAL DE ÁCIDO L-GLUTÂMICO: COMPARAÇÃO ENTRE RESULTADOS EXPERIMENTAIS E CÁLCULOS DE PRIMEIROS PRINCÍPIOS. OS PERCENTUAIS SÃO RELATIVOS AOS DADOS EXPERIMENTAIS.....</b>	<b>85</b>
<b>TABELA 15 - DE MULLIKEN DOS ÁTOMOS NAS DUAS FASES CRISTALINAS DO ÁCIDO GLUTÂMICO.....</b>	<b>86</b>

## ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

### Resíduos de aminoácidos (código protéico – IUPAC-IUB,1972)

Código de 1 letra	Código de 3 letras	Aminoácido
A	ALA	Alanina
C	CYS	Cisteína
D	ASP	Ácido aspártico
E	GLU	Ácido glutâmico
F	PHE	Fenilalanina
G	GLY	Glicina
H	HIS	Histidina
I	ILE	Isoleucina
K	LYS	Lisina
L	LEU	Leucina
M	MET	Metionina
N	ASN	Asparagina
P	PRO	Prolina
O	GLN	Glutamina
R	ARG	Arginina
S	SER	Serina
T	THR	Treonina
V	VAL	Valina
W	TRP	Triptofano
Y	TYR	Tirosina

Å: Angstrom

GABA: ácido gama-aminobutírico

DFT : Teoria de Densidade Funcional

LDA : Aproximação de Densidade Local

HOMO-LUMO: Orbital Molecular Ocupado de maior energia-Orbital molecular de menor energia

LSDA : Aproximação Local de Densidade de Spin.

GGA :Aproximação de Gradeinte Generalizado.

ppb : parte por bilhão

molaridade: concentração mol/L

nm: nanômetros

KDa:Kilo Dalton

GPa: Giga pascal

## RESUMO

O trabalho realizado nesta tese visa a cristalização do ácido glutâmico, favorecendo a obtenção da fase  $\alpha$  (metaestável) em relação ao polimorfo  $\beta$ . Após a obtenção dos cristais realizaram-se as medidas experimentais de fluorescência, com vistas a comparação com os dados teóricos obtidos, considerando as limitações do método de simulação *ab-initio* utilizado. Os cálculos de primeiros princípios foram realizados para estudar as propriedades do cristal do ácido glutâmico nas modificações  $\alpha$  e  $\beta$  no que se refere ao aspecto estrutural, eletrônico (estrutura de bandas) e óptico (função do complexo dielétrico), tudo isto em relação ao polimorfismo conformacional. A teoria do funcional da densidade (TFD) é considerada usando uma base de ondas planas, pseudopotenciais ultramacios, e o potencial de correlação-troca dentro do generalized gradient approximation (GGA). Os parâmetros de rede estão de acordo com os resultados experimentais, embora na forma  $\alpha$  é previsto ter um gap indireto entre os pontos de alta simetria  $\Gamma$  e X, igual a 4.69 eV, para a forma  $\beta$  não pode-se tirar uma conclusão sobre o *gap* direto ( $\Gamma$ - $\Gamma$ ), devido a imprecisão do cálculo. A função dielétrica de ambos os polimorfos são muito semelhantes no caso de uma amostra policristalina, mas difere fortemente no caso da polarização da luz das faces do cristal 100 e 010.



## ABSTRACT

The work in this thesis concerns the crystallization of glutamic acid that favors the  $\alpha$  phase (metastable) compared to polymorph  $\beta$ . After obtaining the crystals were carried out experimental measurements of fluorescence, with a view to comparison with theoretical data obtained, considering the limitations of the simulation method used ab-initio. The first principles calculations were performed to study the properties of the crystal modifications of glutamic acid in  $\alpha$  and  $\beta$  with respect to the structural aspect, electronic (band structure) and optical (of the complex dielectric function), all in relation to the polymorphism conformation. The density functional theory (DFT) is considered using a basis of plane waves, ultra pseudopotentials and exchange-correlation potential within the generalized Gradient Approximation (GGA).  $\Gamma$  and X, equal to 4.69 eV for the  $\beta$  form can not be drawn a conclusion about the the lattice parameters are in agreement with the experimental results, although the form  $\alpha$  is predicted to have an indirect gap between the points of high symmetry because of inaccuracy of the calculation direct band gap ( $\Gamma - \Gamma$ ). The dielectric function of both polymorphs are very similar in the case of a polycrystalline sample, but differs strongly in the case of the polarization of light from crystal faces of 100 and 010.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Na era pós-Organização Genoma Humano (HUGO) há uma grande migração de esforços da genômica em direção a proteômica, já que nesta se encontram as informações necessárias para a compreensão da relação genes - funções biológicas. Porém, atingir o entendimento proteômico é uma tarefa muito mais árdua, pois uma das principais diferenças entre genômica e proteômica é que a última lida com um número praticamente infinito de proteomas por organismo, enquanto que a primeira lida com somente um genoma (HUBER, 2003). As proteínas são as macromoléculas biológicas mais abundantes, ocorrendo em todas as células e em todas as partes destas; tendo as mais variadas funções e sendo os instrumentos moleculares pelos quais as informações genéticas são expressas e executadas. Por sua importância e versatilidade, é evidente a necessidade de se investigar a fundo estas macromoléculas de maneira a obter conhecimento de suas estruturas e, conseqüentemente, suas funções. A determinação de estruturas tridimensionais de proteínas é ainda crucial para a modelagem de fármacos, sendo atualmente um aspecto integral da pesquisa farmacológica. Todas as grandes companhias multinacionais têm a aparelhagem e mão de obra necessárias à resolução de estruturas por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e cristalografia de Raios-X (BLUNDELL, JHOTI & ABELL, 2002). Portanto, torna-se bastante clara a necessidade de uma investigação profunda dos blocos formadores das proteínas, os aminoácidos.

Aminoácidos são moléculas orgânicas que apresentam em suas estruturas um grupamento ácido carboxílico e um grupamento amino. Os aminoácidos mais comuns são os que tem estes dois grupos ligados no mesmo carbono, denominados  $\alpha$ -aminoácidos. Quase todos os aminoácidos, exceto a glicina, têm um carbono assimétrico (quiral), o carbono  $\alpha$ , responsável pela natureza quiral destas moléculas. Os estereoisômeros (enantiômeros) são então designados D ou L, não de acordo com a sua natureza dextrógera ou

levógera, mas de acordo com a sua configuração absoluta ser ou não semelhante ao L-gliceraldeído. As proteínas são formadas por estas moléculas através de uma ligação peptídica entre a porção amina de um aminoácido e a porção carboxila do outro, reação em que há liberação de uma molécula de água. (SOLOMONS, 1996)

Dentre dezenas de aminoácidos, somente 20 L- $\alpha$ -aminoácidos são constituintes das proteínas (Figura 1) e eles usualmente são classificados quanto a polaridade de suas cadeias laterais em:

1. Básicos ou carregados positivamente: lisina, histidina e arginina;
2. Ácidos ou carregados negativamente: aspartato e glutamato;
3. Não-polares alifáticos: glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina;
4. Não-polares aromáticos: fenilalanina, tirosina, triptofano; polares.
5. Neutros: serina, prolina, treonina, asparagina, glutamina.

Os aminoácidos, em estado sólido, existem como zwitterions (íons dipolares) (BHAT & DHARMAPRAKASH, 2002). Em solução aquosa há um equilíbrio entre o íon dipolar e as formas aniônica e catiônica. A forma predominante numa solução depende do pH da solução e da natureza do aminoácido. O pH em que a concentração do íon dipolar é máxima e as concentrações das formas catiônica e aniônica são iguais é denominado ponto isoelétrico e é um parâmetro característico de cada aminoácido (SOLOMONS, 1996).

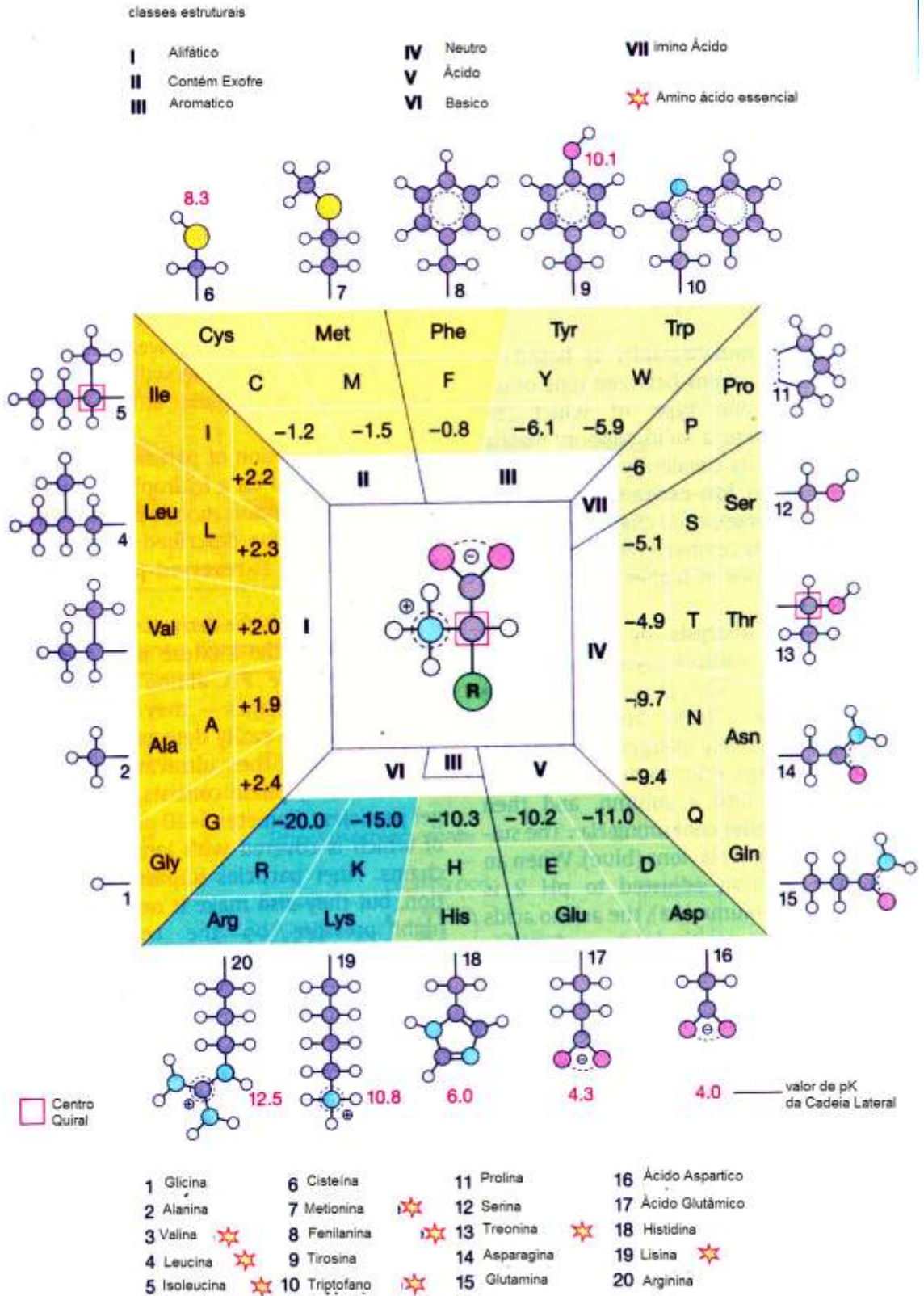


Figura 1: L- $\alpha$ -aminoácidos são constituintes das proteínas (Ref)

As ligações covalentes (principalmente as ligações peptídicas e ligações dissulfeto) que unem os resíduos de aminoácidos numa cadeia polipeptídica, formam a seqüência primária da proteína. O principal elemento da estrutura primária é a seqüência de resíduos de aminoácidos. O termo estrutura secundária se refere à conformação local de parte do polipeptídeo e deve-se às interações entre cadeias laterais dos aminoácidos dessa região. Estas conformações locais se descrevem em termos de padrões regulares, dentre as quais a  $\alpha$ -hélice e as conformações  $\beta$  são as mais proeminentes. A estrutura terciária diz respeito à forma tridimensional que provém do enovelamento das cadeias polipeptídicas. Aminoácidos que estão muito distantes na seqüência polipeptídica podem interagir dentro da estrutura tridimensional da proteína. As forças que dão suporte a esta estrutura são as interações hidrofóbicas entre cadeias laterais de carbono e hidrogênio e interações eletrostáticas entre resíduos ácidos e básicos (RAJKUMAR *et al.*, 1998). Muitas proteínas contêm duas ou mais cadeias ou subunidades polipeptídicas, que podem ser iguais ou diferentes. O arranjo destas subunidades em complexos tridimensionais constitui a estrutura quaternária das proteínas.(ref)

Há mais de 30 anos atrás, Christian Anfinsen relatou a desnaturação reversível da ribonuclease pancreática bovina demonstrando que a informação necessária para o processo de dobramento da proteína encontrava-se na seqüência primária. Logo veio a hipótese Termodinâmica, estabelecendo que a estrutura nativa de uma proteína não depende das condições iniciais e nem de como o estado final é alcançado, sendo, portanto, um estado global de energia mínima. Levithal destacou um outro ponto importante quanto a tal processo: o tamanho da cadeia de um polipeptídeo determina a impossibilidade de que um só estado nativo seja achado por combinações aleatórias. Assim, a seqüência teria que especificar não só uma estrutura, mas também um caminho para chegar a esta. Mais de trinta anos se passaram na tentativa de prever a estrutura de uma proteína a partir de sua seqüência e o problema se mantém resistente a todas as soluções sugeridas e testadas (ANFINSSENS, 1973 LEVITHAL, 1968 apud STEIPE, 1997). Até mesmo a previsão da estrutura secundária não consegue atingir níveis superiores a 60% de exatidão. A resposta para estes problemas seria obtida através da introdução de fatores

globais neste problema (ROST, 2001) e para isto seria importante o conhecimento das interações dos aminoácidos não só entre si, mas também com o meio em que se encontram.

A capacidade de prever a estrutura tridimensional e o mecanismo de enovelamento de uma proteína tendo como informação somente sua seqüência de aminoácidos tem sido descrita como a determinação da segunda metade do código genético (GIERASCH & KING, 1990 apud HARDIN, POGORELOV & SCHULTEN, 2002). Modelagens comparativas, feitas através do uso de proteínas existentes em bancos de dados, e cálculos de primeiros princípios (*ab initio*) são duas das técnicas usadas na tentativa de alcançar tal intento (HARDIN, POGORELOV & SCHULTEN, 2002).

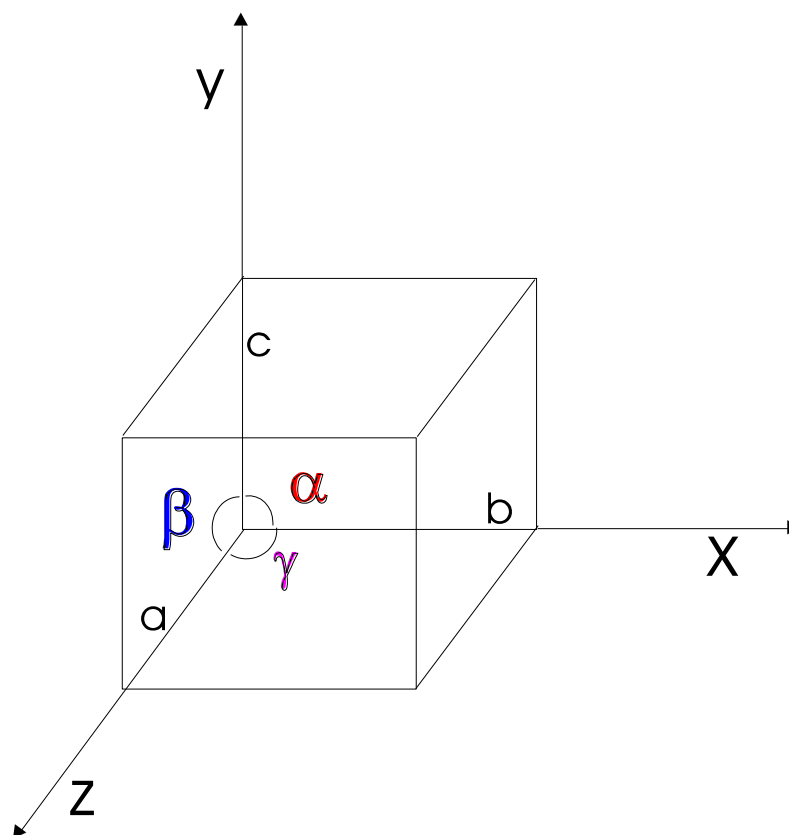
Através de métodos *ab initio* consegue-se uma aproximação razoável do que seria a resolução exata da equação de Schödinger da mecânica quântica que descreve as moléculas. Vários métodos *ab initio* têm sido empregados na resolução dos mais variados problemas, dentre estes os mais usados atualmente são os métodos: Hartree-Fock e o da Teoria Funcional de Densidade; sendo que neste trabalho foi utilizado a Teoria Funcional de Densidade (TFD). Aplicações da Teoria Funcional de Densidade em problemas químicos só se tornaram populares a partir da década de 90. No primeiro estágio da TFD, a energia é expressa como um funcional da densidade de um gás de elétron uniforme, que é então modificado de modo a expressar a densidade eletrônica em volta das moléculas. Para a cristalografia, a importância de técnicas *ab initio* cresce a cada dia, dado o aumento no poder computacional que vem ocorrendo nos últimos anos. Assim, a previsão acurada de estruturas e propriedades dos mais variados cristais torna-se mais próxima (MILMAN & WINKLER, 1999).

Ácido aspártico, ácido glutâmico, lisina, histidina e arginina compõem o grupo dos aminoácidos polares, responsáveis por determinar a solubilidade e as propriedades polieletrônicas das proteínas (RAJKUMAR *et al.*, 1998).

## 1.2. ELEMENTOS DE CRISTALOGRAFIA

A cristalografia, ou estudo da geometria dos cristais foi um dos tópicos que mais interesse despertou nos primórdios da investigação das propriedades macroscópicas dos sólidos. Esta especialidade teve sua grande impulsão no início do século passado, com a descoberta dos raios-X. No entanto, ainda hoje os cristalógrafos são numerosos e os problemas com que se defrontam não perderam a atualidade, sobretudo no que se relacionam as estruturas cristalinas extremamente complexas formadas por compostos orgânicos, sistemas biológicos ou pelos novos materiais artificialmente sintetizados (CULLITY, 1998).

Um cristal é um arranjo de átomos, moléculas ou íons que exhibe uma repetição regular nas três dimensões. Uma construção geométrica definida por três eixos e três ângulos entre os eixos, chamada de rede, ajuda na compreensão de tal objeto. Ao longo da direção de cada eixo um ponto se repete a uma distância referida como célula unitária, e são denominados **a**, **b** e **c**. Os ângulos entre **b** e **c**, **a** e **c**, e **a** e **b**, são  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , respectivamente (figura 1). Dessa forma, a constituição básica de um cristal é um paralelepípedo descrito pelas dimensões **a**, **b** e **c** e  $\alpha$ ,  $\beta$ , e  $\gamma$ , chamado de célula unitária (KITTEL *et al* 1978).



**Figura 2: Eixos cristalinos a, b e c, cujos módulos denominam-se parâmetros de rede, e ângulos  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$**

Existem dois níveis de simetria nos sólidos cristalinos. O mais diretamente associado ao conceito de cristal é o da simetria translacional. Isto significa que existem três vetores básicos,  $\mathbf{a}_1$ ,  $\mathbf{a}_2$  e  $\mathbf{a}_3$  tais que uma operação de translação do tipo

$$\mathbf{l} = n_1 \mathbf{a}_1 + n_2 \mathbf{a}_2 + n_3 \mathbf{a}_3, \text{ (Equação 1)}$$

onde  $n_1$ ,  $n_2$  e  $n_3$  são números inteiros quaisquer, positivos e negativos, conecta dois pontos do cristal que possua vizinhança absolutamente idêntica. O segundo nível de simetria se manifesta numa escala local e diz respeito às várias operações de rotação e reflexão que podemos executar com a unidade cristalina sem deslocá-la translacionalmente. Trata-se da chamada simetria do ponto.



A rede cristalina é um conceito geométrico empregado para caracterizar o arranjo microscópico de um cristal. A cada ponto da rede cristalina é agregado um átomo ou um conjunto de átomos. Se impusermos a condição de simetria translacional expressa pela Equação 1, resultará um número muito limitado de redes cristalinas possíveis: são as chamadas redes cristalinas de Bravais. As redes de Bravais são entidades geométricas que podem ser precisamente definidas. As duas definições dadas a seguir são equivalentes:

(i) Uma rede de Bravais é um conjunto infinito de pontos que ocupam posições no espaço tais que se nos colocarmos sobre qualquer um deles, observaremos exatamente o mesmo arranjo e orientações dos demais pontos. Isto significa que qualquer um dos infinitos pontos pode ser equivalentemente tomado como origem de um sistema de referência ligado ao cristal;

(ii) Uma rede de Bravais (tridimensional) consiste de todos os pontos cujos vetores de posição  $\mathbf{l}$  tem a forma,

$$\mathbf{l} = n_1 \mathbf{a}_1 + n_2 \mathbf{a}_2 + n_3 \mathbf{a}_3, \text{ (Equação 1)}$$

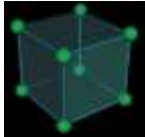
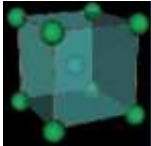
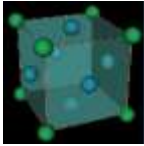
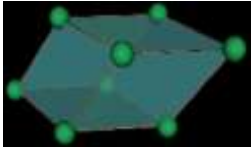
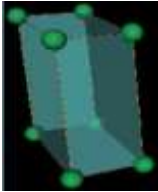
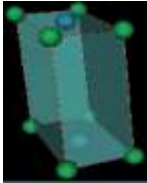

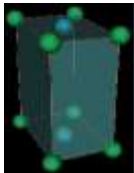
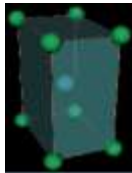
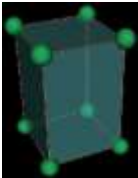
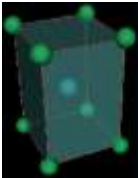
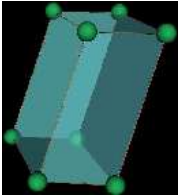
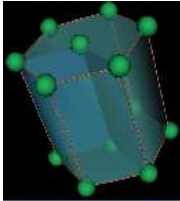
onde  $\mathbf{a}_1$ ,  $\mathbf{a}_2$ ,  $\mathbf{a}_3$  são três vetores básicos, denominados vetores primitivos e  $n_1$ ,  $n_2$ ,  $n_3$  assumem todos os valores inteiros, positivos ou negativos ( $n_i = \pm 0, \pm 1, \pm 2, \dots$ ). Diz-se que os vetores primitivos são geradores da rede cristalina. A superfície definida pelos vetores primitivos é chamada de cela unitária primitiva ou cela primitiva, simplesmente. Uma cela primitiva preenche todo o espaço sob a ação de operações de translação. Assim como os vetores primitivos não são unicamente definidos, as celas primitivas também não o são. No entanto, toda a cela primitiva contém exatamente um ponto de rede e pode-se mostrar que seu volume independe da escolha da cela, isto é, qualquer cela primitiva define uma região de volume mínimo.

Das combinações possíveis entre os parâmetros da célula unitária (Tabela 1) emergem 14 tipos de redes (redes de Bravais), as quais são agrupadas em 7 sistemas cristalinos (Figura 3). Dentro da célula unitária observam-se simetrias (inversão, translação, rotação). Pode ser demonstrado matematicamente que existem 230 combinações desses elementos de simetria possíveis em três dimensões. Portanto, qualquer cristal deve ter uma célula

unitária que apresenta uma dessas combinações, denominadas *grupos espaciais* (DUCRUIX *et al*, 1992).

**Tabela 1 - Os sete sistemas cristalinos e os 14 tipos de redes em três dimensões**

Sistema	Número de redes	Símbolos da rede	Restrições para a célula convencional (eixos e ângulos)
Triclínico	1	P	$a \neq b \neq c$ $\alpha \neq \beta \neq \gamma$
Monoclínico	2	P, C	$a \neq b \neq c$ $\alpha = \gamma = 90^\circ$
Ortorrômbico	4	P, C, I, F	$a \neq b \neq c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Tetragonal	2	P, I	$a = b \neq c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Cúbico	3	P ou scc, I ou bcc F ou fcc	$a = b = c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Romboédrica	1	R	$a = b = c$ $\alpha = \beta = \gamma < 120^\circ, \neq 90^\circ$
Hexagonal	1	P	$a = b \neq c$ $\alpha = \beta = \gamma = 120^\circ$

<b>Cúbico</b>			
	Cúbico simples	Cúbico corpo centrado	Cúbico face centrado
<b>Romboédrica</b>			
	Romboédrica		
<b>Monoclínico</b>			
	Monoclínico simples	Monoclínico base centrado	
<b>Ortorrômico</b>			
	Ortorrômica simples	Ortorrômica base centrado	Ortorrômica corpo centrado
<b>Tetragonal</b>			
	Tetragonal simples		Tetragonal plana
<b>Triclínica</b>		<b>Hexagonal</b>	
	Triclínica		Hexagonal

**Figura 3. Representação dos sete (7) sistemas cristalinos provenientes dos quatorze tipos de redes de Bravais.**

Um plano cristalino é definido por quaisquer 3 pontos de uma rede de Bravais que não sejam colineares. Uma família de planos cristalinos é constituída por um conjunto de planos paralelos igualmente espaçados. A notação empregada para identificar rápida e claramente os planos (ou família de planos) cristalinos é a dos índices de Miler. Para determiná-los, seguem-se as seguintes regras:

- 1) Encontra-se a interseção do plano cristalino em questão com os eixos definidos pelos três vetores geradores da rede,  $\mathbf{a}_1$ ,  $\mathbf{a}_2$ ,  $\mathbf{a}_3$ , que podem ser primitivos ou não.
- 2) Toma-se o recíproco destes números fracionários, reduzindo-os aos 3 menores inteiros que obedeçam a mesma proporcionalidade. O resultado é denotado como (hkl).

É muitas vezes útil a notação das direções cristalinas com os índices de Miler. Usa-se a forma (hkl).

Usa-se o termo estrutura cristalina para denotar os sistemas físicos reais e assim estabelecer uma diferenciação com relação ao ente geométrico rede cristalina. Uma estrutura cristalina consiste de cópias idênticas de um mesmo motivo físico, chamado base, que é associado aos pontos de uma rede de Bravais. A base é formada por um átomo ou conjunto de átomos. Podemos, então, escrever:

**Rede cristalina + base = estrutura cristalina**

### **1.3. PROCESSO DE CRISTALIZAÇÃO**

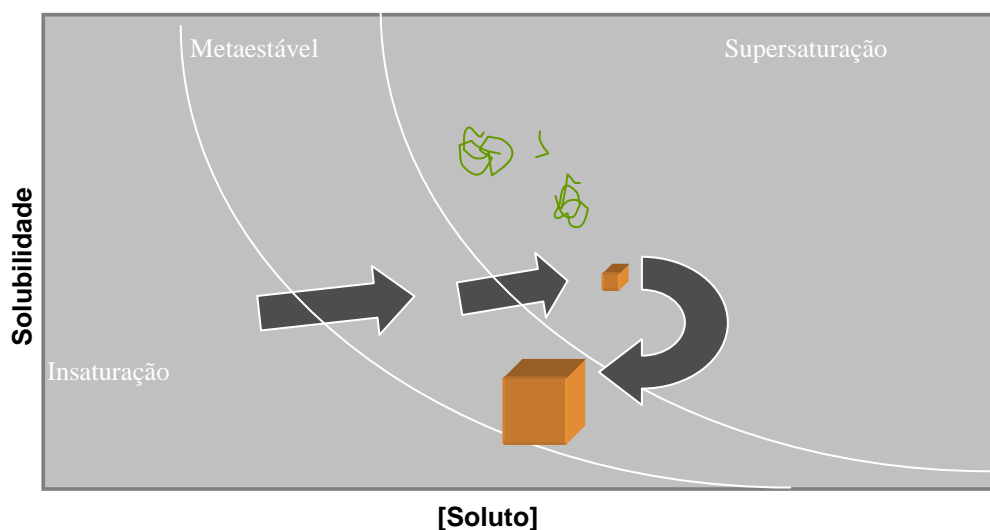
A cristalização é um dentre os processos possíveis pelo qual uma solução metaestável supersaturada pode chegar a um estado estável de mais baixa energia através da diminuição da concentração de soluto; acontecendo de forma semelhante para moléculas grandes ou pequenas, orgânicas ou inorgânicas. O processo tem três fases distintas: nucleação, crescimento e encerramento do crescimento. A nucleação é a formação de pequenos agregados do soluto, os núcleos, que apresentam a formação de uma determinada rede.

No aspecto microscópico, flutuações na concentração da solução podem fazer com que as moléculas do soluto se agreguem, formando *clusters*. Tais *clusters*, na forma de dímeros, trímeros, tetrâmeros e etc. são continuamente formados e destruídos. Ocasionalmente, um *cluster* adquire um tamanho crítico e forma-se um cristal ou uma semente (GINDE & MYERSON, 1993).

A teoria estabelece que para ocorrer o processo de nucleação, o ganho na energia livre devido à formação do sólido deve ser alto o suficiente para superar a perda na energia livre associada com a criação de uma nova interface. Existe um raio crítico ( $r$ ) o qual o cristal deve atingir antes de crescer continuamente. Portanto, o tempo requerido para os cristais se formarem (o tempo de indução,  $\tau$ ) depende da força termodinâmica direcionadora (a supersaturação,  $\sigma$ ) e da energia interfacial entre o sólido e a solução ( $\gamma$ ):

$$\tau = A \exp\left(16\pi\gamma^3 v^2 / 3k^3 T^3 \sigma^2\right) \text{ (Equação 2)}$$

O crescimento dos cristais começa a ocorrer em concentrações grandes o suficiente para haver nucleação e continua em estados de saturação menores (Figura 4). A velocidade de crescimento do cristal é determinada pela natureza da superfície do núcleo crescente e da taxa de difusão do soluto. Adicionar moléculas a superfícies rugosas requer menos energia do que adicioná-las a superfícies lisas. Outros fatores que afetam o processo de crescimento são os efeitos convectivos e sedimentares, e no intento de diminuir a influência destes que muitos experimentos de cristalização são conduzidos em gravidade reduzida. O término do crescimento acontece por várias razões dentre as quais pela mais óbvia que é a diminuição da quantidade de soluto; outras razões bem comuns são defeitos internos acumulativos e também a contaminação da superfície de crescimento por impurezas (BERRY, 1995).



**Figura 4.**Diagrama de fases mostrando a formação de núcleos e o crescimento

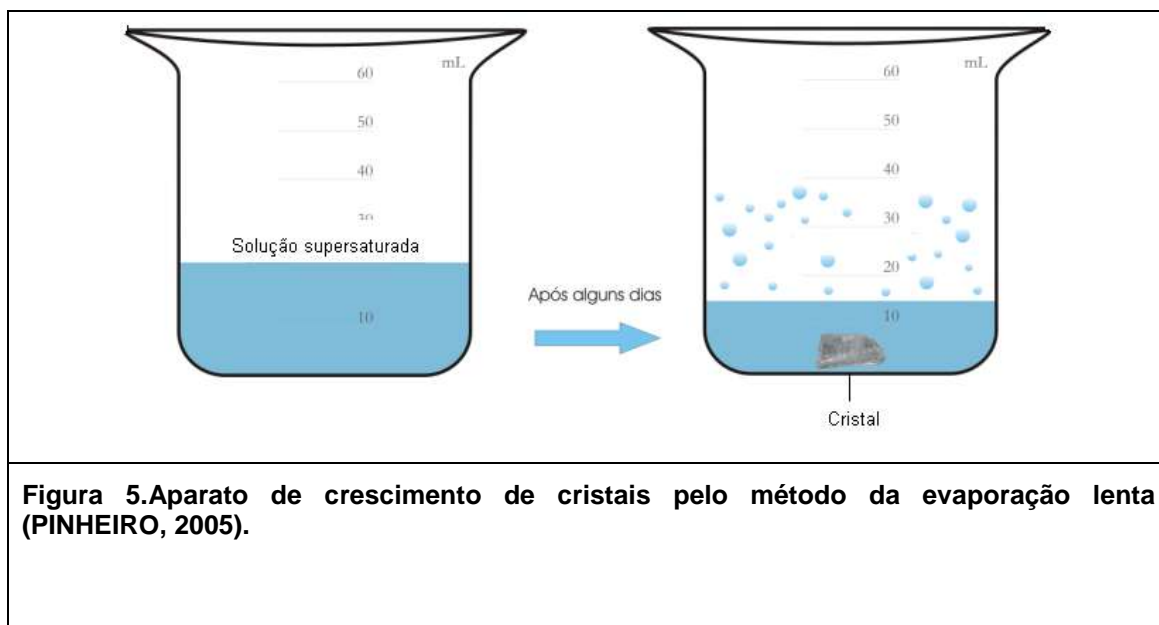
Muitas técnicas estão disponíveis para obtenção de cristais. O método ideal, no entanto, depende tanto da amostra a ser cristalizada quanto das propriedades que se deseja priorizar no cristal a ser obtido. É usual, entretanto, classificar tais técnicas em três categorias principais: (i) técnicas relacionadas com a fusão; (ii) técnicas relacionadas com a solução; (iii) técnicas relacionadas com a fase de vapor. Uma breve descrição delas encontra-se na tabela 2.

**Tabela 2-Técnicas de crescimento de cristais**

<b>Parâmetros</b>	<b>Fusão</b>	<b>Solução</b>	<b>Vapor</b>
<b>Temperatura de crescimento</b>	Temp. de fusão	Menor que a temp. de fusão	Menor que a temp. de fusão
<b>Composição entre as fases</b>	Similar	Diferente	Similar ou diferente
<b>Velocidade de crescimento</b>	Alta (mm/hora)	Baixa (mm/dia)	Baixa (mm/dia)
<b>Forma geométrica dos cristais</b>	Determinada pela técnica utilizada	Faces naturais	Faces naturais
<b>Pureza e perfeição estrutural dos cristais</b>	Alta pureza e baixa perfeição estrutural	Alta perfeição estrutural e baixa pureza	Alta pureza e alta perfeição estrutural

Na cristalização de aminoácidos, foco desta tese, os métodos mais empregados são o da evaporação lenta do solvente (OGAWA, 1980; MANNE *et al.*, 1993; BHAT & DHARMAPRAKASH, 2002) e o do resfriamento lento (KUMAR *et al.*, 2004; GIVAND, ROUSSEAU & LUDOVICE, 1998; KISHISHITA, KISHIMOTO & NAGASHIMA, 1996). O método da evaporação lenta do solvente consiste em deixar em repouso uma solução supersaturada à temperatura constante. A massa do sistema não permanece constante, já que o solvente por ter alta taxa de evaporação sai do sistema, deixando-no cada vez mais supersaturado até que o processo de cristalização se inicie com a nucleação. No método do resfriamento lento há o contrário, uma conservação na massa no sistema. Neste método se atinge a supersaturação necessária à nucleação pela diferença de solubilidade da substância em diferentes temperaturas. Já que a maioria das substâncias tem maior coeficiente de solubilidade a temperaturas mais altas, a diminuição lenta da temperatura faz atingir a supersaturação desejada e o processo de cristalização.

Uma extensão desse método consiste em utilizar uma solução com dois ou três solventes. O princípio empregado é que a variação na composição do solvente pode inibir ou promover o crescimento de determinadas faces dos cristais em relação às outras, resultando em cristais com morfologia e tamanho desejado. A escolha dos solventes deve se dar de forma que o soluto seja bem mais solúvel em um solvente do que no outro. O fator mais importante é que o solvente no qual a substância é dissolvida seja mais volátil do que o segundo solvente. Dessa forma, enquanto o primeiro solvente evapora, o segundo permanece, de forma que seja alcançado um ponto onde a solubilidade do composto não pode mais ser mantida e ele se deposite na forma de cristal. Além disso, para o sucesso da técnica, as polaridades dos solventes não devem ser muito diferentes. A figura 5 mostra a aparelhagem empregada para a cristalização do ácido glutâmico.



**Figura 5. Aparato de crescimento de cristais pelo método da evaporação lenta (PINHEIRO, 2005).**

#### 1.4. CRISTAIS DE AMINOÁCIDOS

Muitos trabalhos relatam à cristalização de aminoácidos puros ou de derivados semiorgânicos na tentativa de explorar suas propriedades físicas ou de obter esclarecimento quanto a processos biológicos. Dentre os puros há relatos da obtenção de cristais de  $\alpha$ -glicina e  $\beta$ -glicina (GU, EBISAWA & MCDERMOTT, 1996); L-alanine (RAZZETTI *et al.*, 2002); ácido L-glutâmico (KITAMURA & ISHIZU, 2000); L-isoleucina (GIVAND, ROUSSEAU & LUDOVICE, 1998); ácido L-aspártico (KISHISHITA, KISHIMOTO & NAGASHIMA 1996); L-leucina, L-valina e L-fenilalanina (MANNE *et al.*, 1993), L-treonina (KUMAR *et al.*, 2004) e L-asparagina (RAMANADHAM, SIKKA & CHIDAMBARAM, 1971).

No estado cristalino, os sistemas moleculares dos aminoácidos são bem definidos estruturalmente, e podem ser utilizados para um exame detalhado de diversas interações intermoleculares. Isto é de particular importância na Biologia, já que macromoléculas como as proteínas são sistemas fechados com grupos polares e não-polares (MICU *et al.*, 1995).

Por outro lado, cerca de 90% de todos os produtos farmacêuticos são formulados geralmente na forma cristalina. A sua produção, portanto, envolve cristalização a partir de soluções, como método de separação e/ou purificação do fármaco. Durante a cristalização, várias características físico-químicas da



substância são definidas, incluindo forma e tamanho, pureza química e estabilidade, biodisponibilidade, solubilidade, taxa de dissolução, dopagem etc. Por este motivo, a cristalização de moléculas de interesse biotecnológico é um importante campo de pesquisa. O controle sobre a forma dos cristais e características de suas faces permanece ainda pobre, principalmente porque os processos básicos que as governam, nucleação e crescimento, ainda não são completamente entendidos ou controlados (BISKER-LEIB & DOHERTY, 2003).

A importância dos cristais de aminoácidos para a Física reside em suas propriedades peculiares que os fazem candidatos ideais para aplicações em óptica não-linear graças à sua capacidade de geração de segundo harmônico (BHAT & DHARMAPRAKASH, 2002). Essa capacidade é consequência de :

(i) quiralidade molecular, responsável pela estrutura cristalográfica assimétrica;

(ii) ausência de ligações fortemente conjugadas, levando a uma zona de transparência nas regiões do UV e do visível;

(iii) natureza zwitteriônica das moléculas, o que favorece a dureza do cristal (RAZZETTI *et al.*, 2002).

Cristais não lineares são usados como moduladores de fase eletro-ópticos para gerar conversão de frequência óptica paramétrica, modulação de amplitude e em outros dispositivos processadores de sinais (KUMAR *et al.*, 2004).

Cristais de aminoácidos como os de glicina, alanina, treonina, serina, isoleucina, leucina, valina, fenilalanina, e asparagina tiveram suas propriedades estruturais (Raios-X e difração de nêutrons, em alguns raros casos) e vibracionais (espectros Infravermelho e Raman) estudadas, mas é raro o estudo das suas propriedades ópticas (luminescência e absorção, por exemplo). A exceção é que recentemente Freire, Cavada e colaboradores iniciaram o estudo das propriedades de luminescência e absorção de cristais de L-alanina e  $\alpha$ -glicina (PINHEIRO *et al.*, 2005).

## 1.5. ÁCIDO GLUTÂMICO

Os cristais de ácido L-glutâmico possuem dois polimorfos: uma forma granular chamada  $\alpha$  (metaestável) e uma forma  $\beta$  que ocorre em placas.

A modificação  $\alpha$  do ácido L-glutâmico cristaliza com uma célula unitária de simetria  $P2_12_12_1$  com parâmetros de célula  $a=10.282$ ,  $b=8.779$  e  $c=7.068$  Å e  $Z=8$ ; é metaestável e se transforma na forma  $\beta$ , que também tem grupo espacial  $P2_12_12_1$  e parâmetros de célula  $a=5.159$ ,  $b=17.30$  e  $c=6.948$  Å. (SANO *et al*, 1997)

A tabela 3 mostra as coordenadas atômicas e os parâmetros termiais em ambas as formas:  $\alpha$  e  $\beta$ .

**Tabela 3-Coordenadas atômicas e parâmetros termiais da forma  $\alpha$  do ácido L-glutâmico (LEHMANN & NUNES, 1980).**

	X	Y	Z	B (Å <sup>2</sup> )
N	0,59792(6)	0,33146(7)	0,20969(10)	1,61(1)
O(1)	0,76382(10)	0,48704(13)	0,45663(19)	2,14(1)
O(2)	0,62845(10)	0,68407(13)	0,42296(18)	1,98(1)
O <sup>ε</sup> (1)	0,21971(11)	0,43912(14)	0,63722(24)	2,83(1)
O <sup>ε</sup> (2)	0,33460(11)	0,65263(13)	0,62428(1)	2,31(1)
C	0,65626(8)	0,54346(9)	0,41785(13)	1,33(1)
C <sup>α</sup>	0,54672(8)	0,43405(9)	0,36040(12)	1,27(1)
C <sup>β</sup>	0,50098(9)	0,33529(10)	0,52589(14)	1,71(1)
C <sup>γ</sup>	0,44929(9)	0,42570(11)	0,69558(14)	1,88(1)
C <sup>δ</sup>	0,32320(9)	0,50525(9)	0,65085(13)	1,60(1)
H(1)	0,6450(2)	0,3939(2)	0,1029(3)	2,79(2)
H(2)	0,6640(2)	0,2554(2)	0,2661(3)	2,92(2)
H(3)	0,5220(2)	0,2689(2)	0,1505(3)	2,69(2)
H <sup>ε</sup> (2)	0,2475(2)	0,7062(2)	0,6019(3)	2,96(2)
H <sup>α</sup>	0,4658(2)	0,4981(2)	0,2979(3)	2,44(2)
H <sup>β</sup> (1)	0,4253(2)	0,2564(2)	0,4758(4)	3,45(3)
H <sup>β</sup> (2)	0,5842(2)	0,2669(2)	0,5742(3)	3,47(3)
H <sup>γ</sup> (1)	0,4301(3)	0,3454(3)	0,8108(3)	3,88(3)
H <sup>γ</sup> (2)	0,5218(2)	0,5088(3)	0,7448(3)	3,49(3)

Os estudos de difração de raios-X e de nêutrons da forma  $\beta$ , mostraram uma curta ligação de hidrogênio intermolecular com uma distancia entre O...O (dos dois grupos carboxilas na molécula) de 2.519 Å. A ligação é bastante assimétrica com o átomo de hidrogênio ligado a  $\delta$ -carboxila, o que foi explicado

a partir da acidez dos dois grupos com o grupo  $\delta$ -carboxila sendo o mais fraco e, portanto, o mais provável de aceitar o H. A pequena distância da ligação foi relacionada à relativamente pequena diferença de acidez entre os dois grupos. Esse mesmo comprimento de ligação também foi encontrado na forma  $\alpha$ , no entanto existem grandes diferenças em relação aos ângulos, que pode ser visto na Tabela 4.

**Tabela 4-Ângulos de Torsões das modificações  $\alpha$  e  $\beta$  do ácido L-glutâmico (LEHMANN & NUNES, 1980).**

		$\alpha$	$\beta$
$\varphi^1$	C-C $^\alpha$ -N-H(1)	-48,7(1)	-48,9(2)
$\varphi^2$	C-C $^\alpha$ -N-H(2)	71,2(1)	71,3(2)
$\varphi^3$	C-C $^\alpha$ -N-H(3)	- 169,9(1)	-168,6(2)
$\psi^1$	N-C $^\alpha$ -C-O(1)	- 50,2(1)	- 42,3(2)
$\psi^2$	N-C $^\alpha$ -C-O(2)	130,3(1)	141,2(2)
$\chi^1$	N-C $^\alpha$ -C $^\beta$ -C $^\gamma$	178,2(1)	- 51,8(1)
$\chi^2$	C $^\alpha$ -C $^\beta$ -C $^\gamma$ -C $^\delta$	68,3(1)	- 73,1(2)
$\chi^{3,4,1}$	C $^\beta$ -C $^\gamma$ -C $^\delta$ -O $^\epsilon$ (1)	74,2(1)	18,8(2)
$\chi^{3,4,2}$	C $^\beta$ -C $^\gamma$ -C $^\delta$ -O $^\epsilon$ (2)	- 104,6(1)	- 160,7(1)
$\chi^{4,2}$	O $^\epsilon$ (1)-C $^\delta$ -O $^\epsilon$ (2)-H $^\epsilon$ (2)	4,6(1)	-11,4(2)
$\theta^C$	C $^\gamma$ -C $^\delta$ -O $^\epsilon$ (2)-H $^\epsilon$ (2)	- 176,5(1)	168,2(2)

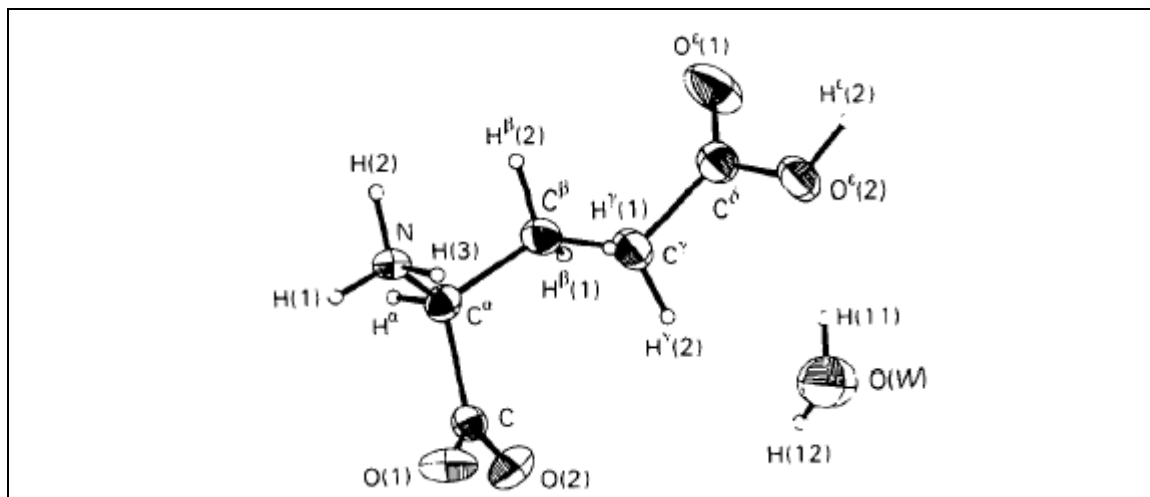
Os estudos dessa ligação nos cristais da forma  $\alpha$  também indicaram uma ligação curta entre as carboxilas, no entanto, na forma  $\beta$  essa ligação é mais curta.

Enquanto a parte  $\alpha$ -amino da molécula é aproximadamente igual nos dois casos, às cadeias laterais são diferentes, e obviamente a diferença de energia entre as várias configurações é pequena, já que cristais de  $\alpha$  e  $\beta$  podem coexistir na mesma solução aquosa.

O ácido D L-Glutâmico H<sub>2</sub>O também já foi cristalizado e apresentou uma conformação diferente daquela observada nas conformações  $\alpha$  e  $\beta$ , conforme esperado(CIUNIK & GLOWIAK, 1983).

A parte  $\alpha$ -amino é aproximadamente planar. O desvio do átomo de N do plano C $^\alpha$ CO(1)O(2) é de 0.050 Å e o ângulo de torsão O(1)C-C $^\alpha$ -N é 2.2 Å. C $^\gamma$  é “gauche” em relação a C e N. Isso implica que C $^\gamma$  é trans em relação a C $^\alpha$ , sendo a única conformação possível. A cadeia lateral é quase planar, e coplanar em relação ao grupo  $\gamma$ -carboxila.

Na modificação  $\alpha$ ,  $C_\gamma$  é trans em relação ao átomo N e  $C\delta$  é “gauche” ( $+\chi^2$ ) em relação a  $C_\alpha$ . Na modificação  $\beta$ ,  $C_\gamma$  é trans em relação ao átomo de carbono C e  $C\delta$  é “gauche” ( $-\chi^2$ ) em relação ao  $C_\alpha$  (CIUNIK & GLOWIAK 1983).



**Figura 6. Visão geral da unidade assimétrica do ácido D,L-glutâmico (CIUNIK & GLOWIAK, 1983)**

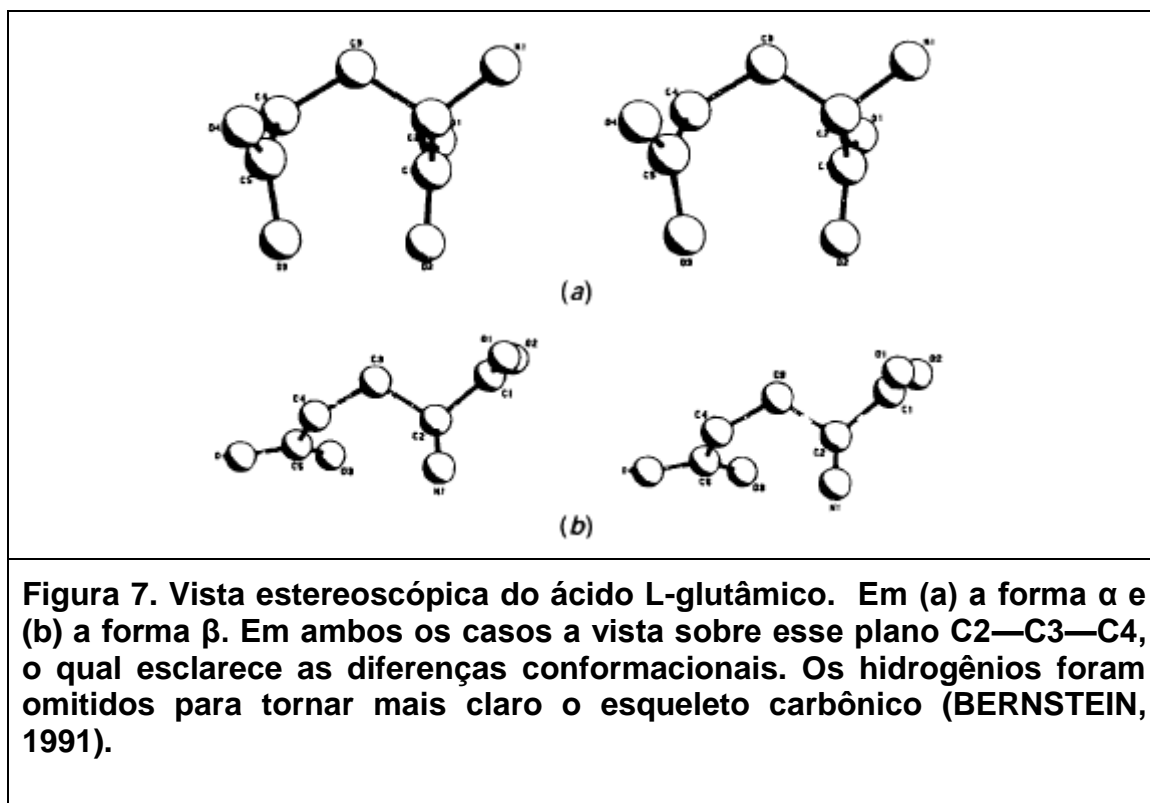
**Tabela 5 - Parâmetros térmicos e posicionais do ácido D,L glutâmico (CIUNIK & GLOWIAK, 1983).**

	X	Y	Z	$B_{eq} \setminus B_{iso} (\text{Å}^2)$
O(1)	0,3464(2)	0,2718(1)	0,1375(1)	2,8(1)
O(2)	0,1189(2)	0,3226(1)	0,1311(2)	2,5(1)
O <sup>ε</sup> (1)	0,1870(2)	0,5044(1)	0,5606(2)	4,4(2)
O <sup>ε</sup> (2)	0,3602(2)	0,5686(1)	0,4489(2)	2,8(1)
O(W)	0,5254(3)	0,5819(2)	0,2083(2)	4,5(2)
N	0,3478(2)	0,2367(1)	0,3780(2)	1,9(1)
C	0,2287(2)	0,2911(1)	0,1868(2)	1,8(1)
C <sup>α</sup>	0,2113(2)	0,2767(1)	0,3283(2)	1,8(1)
C <sup>β</sup>	0,1748(3)	0,3591(2)	0,4008(2)	2,1(2)
C <sup>γ</sup>	0,2827(3)	0,4318(2)	0,3787(2)	2,4(2)
C <sup>δ</sup>	0,2699(3)	0,5039(2)	0,4725(2)	2,3(2)
H <sup>α</sup>	0,134(2)	0,237(1)	0,339(2)	2,4(5)
H(1)	0,340(3)	0,227(2)	0,463(2)	2,0(5)
H(2)	0,364(3)	0,189(2)	0,343(3)	2,4(5)
H(3)	0,438(3)	0,273(2)	0,362(3)	3,3(7)
H <sup>β</sup> (1)	0,078(3)	0,377(1)	0,377(2)	2,5(5)
H <sup>β</sup> (2)	0,171(3)	0,342(2)	0,488(2)	2,8(6)
H <sup>γ</sup> (1)	0,383(3)	0,414(2)	0,382(2)	3,1(6)
H <sup>γ</sup> (2)	0,272(3)	0,456(2)	0,296(2)	5,9(9)
H <sup>ε</sup> (2)	0,361(3)	0,609(2)	0,513(3)	4,5(2)
H(11)	0,465(4)	0,558(2)	0,163(3)	5,4(9)
H(12)	0,492(4)	0,583(2)	0,383(4)	7,3(11)

As diferenças nos padrões das ligações de hidrogênio são importantes para o estudo dos dois polimorfos de ácido glutâmico, já que os cristais de ácido glutâmico são claramente dominados por ligações de hidrogênio. Um estudo de “Graph-set” foi realizado com o intuito de se estudar apenas essas ligações, de forma a esclarecer as diferenças estruturais entre os dois.

Em termos quantitativos, as diferenças significativas nas conformações moleculares estão essencialmente localizadas em três ângulos de torções N1—C2—C3—C4, C2—C3—C4—C5, C3—C4—C5—O3, com valores correspondentes para as formas  $\alpha$  e  $\beta$  de 178.4, -51.8; 68.8, -73.1; -150.0, -160.7 °, respectivamente. Em geral, os ângulos de torção podem ter uma variedade de valores, os quais recaem em seis bem definidas conformações moleculares para rotação sobre C2—C3 e C3—C4. Isso tem sido observado na estrutura cristalina de vários sais e complexos de ácido L-glutâmicos (figura 6):

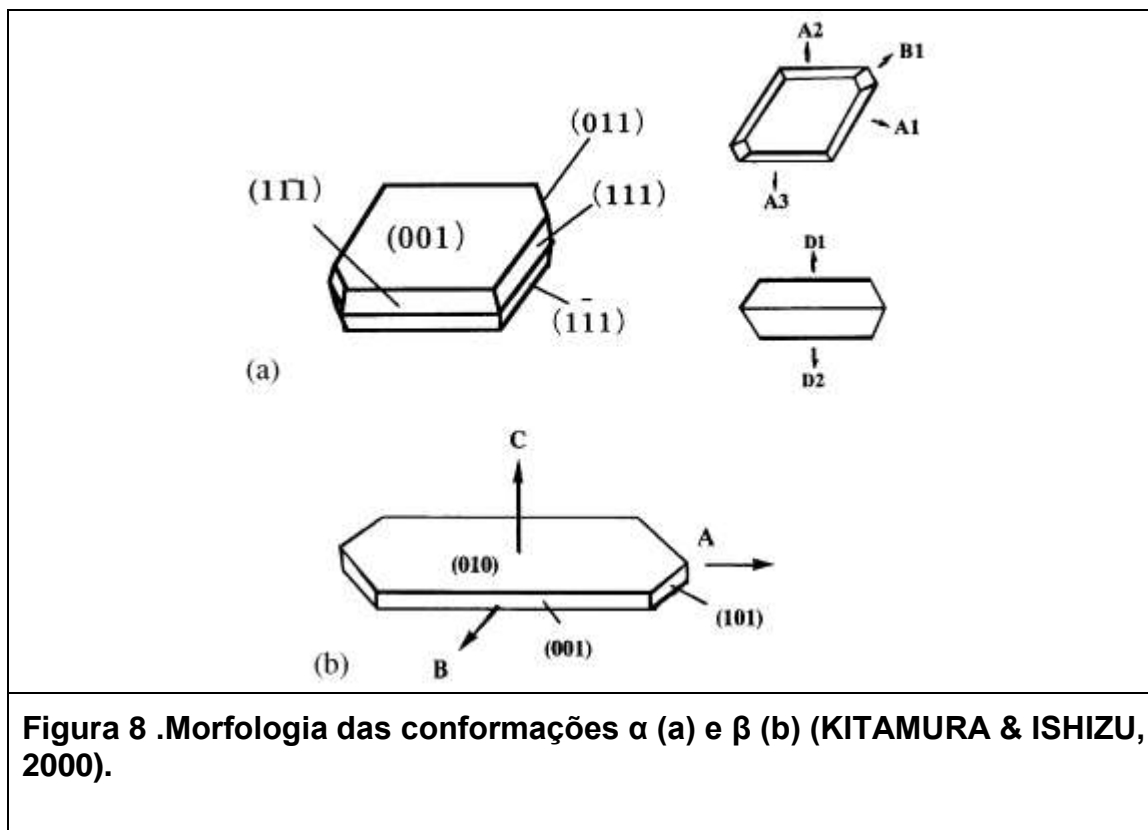
$(\bar{g}, t)$ ,  $(g, t)$ ,  $(\bar{g}, g)$ ,  $(g, g)$ ,  $(t, t)$  e  $(t, g)$ , onde  $g$ ,  $\bar{g}$  e  $t$  correspondem a ângulos de torção aproximadamente de 60, -60 e 180°. Na forma  $\alpha$ , o valor para o ângulo de torção sobre C2—C3 (-105.0) recai entre as conformações  $g$  e  $t$ , por isso ela deve ser considerada como constituindo uma “outlier” das conformações encontradas em uma variedade de estruturas de LGA e complexos. A conformação da molécula na forma  $\beta$  é  $(\bar{g})$  (BERSTEIN, 1991)



A cinética de crescimento e as mudanças morfológicas das conformações  $\alpha$  e  $\beta$  dos cristais de ácido glutâmico foram investigadas. Normalmente, durante a cristalização, cristais de cada polimorfo crescem competitivamente, e a cinética relativa de crescimento de cada polimorfo exerce um papel importante na composição dos polimorfos nos precipitados resultantes.

As taxas de crescimento da forma  $\alpha$  nas direções [110], [010] e [001] e dos cristais  $\beta$  na direção [100], mostradas na figura 7, parecem ser controladas por reações de superfície. Mudanças morfológicas também foram observadas no crescimento das sementes. A dependência da taxa de crescimento com supersaturação relativa indicou que o mecanismo de crescimento dos  $\alpha$  cristais

em todas as direções pertence ao mecanismo núcleo sobre núcleo; assim como os cristais  $\beta$ .



**Figura 8 .Morfologia das conformações  $\alpha$  (a) e  $\beta$  (b) (KITAMURA & ISHIZU, 2000).**

No processo de cristalização, o resfriamento lento de uma solução supersaturada de ácido glutâmico, com contínuas ou ocasionais agitações, é suficiente para estabilizar a forma  $\alpha$  para um tempo de cristalização de 24 horas a 45°C. Resfriamento rápido com agitação ou resfriamento lento sem agitação, favorece a formação da forma estável  $\beta$ . Duas hipóteses são apresentadas para explicar a estabilização das formas  $\alpha$ :

- i) a agitação é suficiente para romper a nucleação dos cristais  $\beta$  sobre a superfície dos cristais  $\alpha$
- ii) os cristais  $\alpha$  formados com agitação durante o resfriamento lento são pequenos e mal-formados e não possuem as faces cristalograficas bem formadas sobre as quais a forma  $\beta$  pode nuclear. A forma  $\beta$  pode ser favorecida durante o resfriamento rápido devido ao período reduzido de agitação.

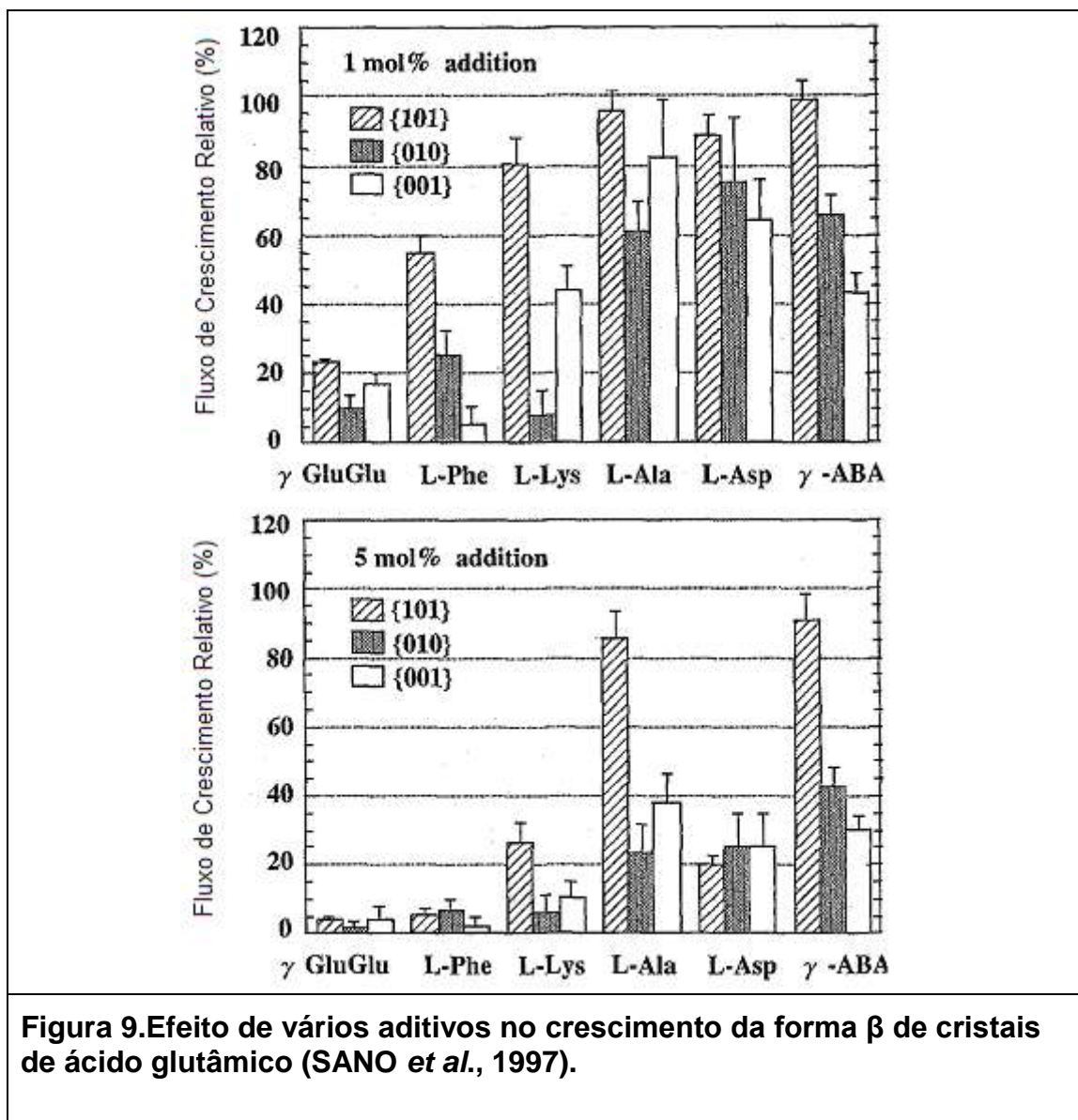
No sistema do ácido glutâmico, a quantidade relativa do  $\alpha$ -polimorfo decresce, à medida que a temperatura de cristalização aumenta, e a taxa de transformação polimórfica ocorre rapidamente à temperaturas maiores do que 40°C. Também foi verificado que a quantidade do  $\beta$ -polimorfo aumenta com o aumento da supersaturação, e esse parâmetro também aumenta a taxa de crescimento proporcional de  $\alpha$  em relação à  $\beta$ . Sendo a forma  $\beta$  a mais estável termodinamicamente, a forma  $\alpha$  irá se transformar completamente na forma  $\beta$  em solução, dado o tempo suficiente (CASHELL *et al.*, 2004).

Em um estudo a respeito da influência de surfactantes nos processos de cristalização (GARTI & ZOUR, 1997), encontrou-se um método eficiente para cristalizar preferencialmente a forma não estável (forma  $\alpha$ ) do ácido glutâmico na presença desses agentes. Encontrou-se que a taxa de transformação depende do grau de crescimento de  $\beta$ , e não da taxa de dissolução de  $\alpha$ . A taxa de crescimento de  $\alpha$  é uma função da supersaturação do soluto na solução. Foi, ainda, demonstrado que a transformação pode ser inibida pela adição de surfactantes. Os surfactantes são capazes de serem adsorvidos preferencialmente sobre os  $\alpha$ -cristais, retardando a transformação de  $\alpha$  para  $\beta$ . Foi sugerido que a natureza do surfactante e as condições estéricas são importantes para a inibição de ambas, a nucleação e o crescimento da forma  $\beta$ . Esse estudo encontrou relação entre os parâmetros cinéticos e o volume do surfactante adsorvido na superfície do cristal. Não foram observadas mudanças na morfologia do cristal, indicando que a adsorção não foi específica para nenhuma face (GARTI & ZOUR, 1997).

As diferenças conformacionais das moléculas de ácido glutâmico devem influenciar a orientação dos grupos funcionais dentro do cristal de cada polimorfo. Na forma  $\beta$ , os grupos carboxílicos com suas cargas negativas são orientados para a face do cristal onde a carga positiva dos grupos amino está abaixo da superfície e entre os grupos carboxílicos. Moléculas na forma  $\alpha$  são orientadas de forma que os grupos carboxílicos fiquem abaixo da superfície e os grupos amino são direcionados para fora e distante dos grupos carboxílicos. Tais diferenças formam a base para as distintas propriedades das superfícies dos dois polimorfos.



Em um outro estudo a respeito da influência de aditivos no crescimento da forma  $\beta$  de cristais de ácido L-glutâmico, foram testados vários aminoácidos (L-fenilalanina: L-Phe, L-lisina: L-Lys, ácido L-aspártico: L-Asp e a L-alanina: L-Ala), dois D-amino ácidos (D-alanina: D-Ala, ácido D-glutâmico, D-Glu), ácidos carboxílicos (ácido carboxílico L-pirrolidônico, ácido  $\alpha$ -ceto-glutárico e ácido  $\gamma$ -amino butílico) e o dipeptídeos ( $\gamma$ -L-glutamil-ácido-L-glutâmico). As três faces dominantes na forma  $\beta$  ( $\{101\}$ ,  $\{010\}$  e  $\{001\}$ ) foram estudadas experimentalmente e estruturalmente. O dipeptídeo e a fenilalanina mostraram aproximadamente o mesmo grau de inibição sobre a três faces dominantes, ao contrário dos comportamentos diferentes em relação às duas faces dominantes da forma  $\alpha$ . Essas diferenças são explicadas pelas características das pontes de hidrogênio de cada face. Encontrou-se que a forma  $\beta$  tem uma menor capacidade de discriminar o reconhecimento das moléculas do que a forma  $\alpha$  (SANO *et al.*, 1997).



## 1.6 APLICAÇÕES DO ÁCIDO GLUTÂMICO

O ácido glutâmico é o aminoácido livre mais abundante no cérebro e o mais importante neurotransmissor do sistema nervoso central dos mamíferos. Receptores específicos ligam-se ao glutamato e alguns desses quando ativados abrem canais integrais iônicos sendo, portanto, conhecidos como receptores ionotrópicos. Foram identificados três grandes subtipos de receptores dentro da família de receptores de glutamato; um deles, o NMDA (N-metil-D-aspartato) tem sítios adicionais ao seu sítio ligante-agonista, o qual parece modular positiva ou negativamente o efeito agonista. Esse receptor também é único no que concerne a outro aminoácido, a glicina, a qual atua

como co-agonista com o glutamato. Mudanças na transmissão do glutamato tem sido associadas com diversas patologias do sistema nervoso central, incluindo neurodegeneração crônica, dor crônica, dependência de drogas, epilepsia e Doença de Parkinson, dentre outras (TRIST, 2000).

O nível de ácido glutâmico no cérebro de humanos está relacionado a diversos distúrbios neurológicos como esquizofrenia, distúrbio bipolar e depressão conforme relatado por Fatemia e colaboradores (2005). Esse estudo evidenciou a diminuição do nível da enzima ácido glutâmico descarboxilase, passo limitante na conversão de ácido glutâmico para ácido gama-aminobutírico (GABA). Tal enzima existe em duas isoformas: a GAD 67 que está envolvida na síntese de GABA para atividades metabólicas gerais, e a GAD 65 que está envolvida na transmissão sináptica.

O ácido glutâmico é um aminoácido ubíquo presente em muitas comidas, na forma livre ou em peptídeos e proteínas. Proteínas animais contém de 11 a 22% e proteínas vegetais cerca de 40% de glutamato em peso. O glutamato de sódio é adicionado a vários alimentos para aumentar o sabor. A maior parte do ácido glutâmico livre no cérebro é derivado da síntese local de L-glutamina e de intermediários do ciclo de Krebs. Ele apresenta um papel claro na diferenciação neuronal, migração e sobrevivência no desenvolvimento cerebral através do transporte facilitado de  $Ca^{2+}$ . Isso contribui para o aprendizado e a memória através de mudanças uso-dependentes na eficiência sináptica e exerce um papel na formação e função do citoesqueleto (TAPIEO *et al.*, 2002).

Moléculas derivadas do ácido glutâmico também são alvos de estudos de ponta, como por exemplo, na liberação controlada de drogas (drug delivery). Sabe-se que os agentes quimioterápicos contra câncer tem efeito terapêutico limitado devido, na maioria das vezes, a limitação da toxicidade da dose. Baixa solubilidade aquosa, instabilidade *in vivo* e falta de seletividade têm sido as principais barreiras no desenvolvimento de drogas contra câncer. Dentro desse contexto, polímeros sintéticos estão sendo testados em estudos clínicos, de forma a superar esses desafios. Um dos mais promissores é um polímero de ácido glutâmico. Tal polímero é composto de ácidos glutâmicos ligados através de ligações amidas. O grupo pendente  $\delta$ -carboxila em cada unidade de L-glutâmico apresenta carga negativa em pH neutro, a qual confere alta

solubilidade em água ao composto e também funcionalidade para a ligação de drogas. Além disso, o polímero de ácido L-glutâmico é biodegradável e não-tóxico (CHUN, 2002).

Em um outro estudo, três polipeptídeos modificados contendo ácido  $\gamma$ -benzil glutâmico foram sintetizados e tiveram suas propriedades caracterizadas em relação a sua possível aplicação em “drug delivery”. Duas drogas foram usadas nesse estudo, o hidrocloreto de procainamida, uma droga hidrofílica, e sulfato de protamina, uma proteína de baixo peso molecular. Modificações nesses polímeros resultaram em diferenças significativas na taxa de liberação das drogas. Ocorreram mudanças nos atributos estruturais pela copolimerização aleatória dos isômeros D e L ácido  $\gamma$ -benzil glutâmico e alteração da hidrofobicidade do copolímero pela conjugação do mesmo com polietileno glicol. Essas alterações provocaram mudanças (de dias para meses) na taxa de liberação dessas drogas (MARKLAND *et al*, 1999).

Resíduos de ácidos glutâmicos também exercem papéis fundamentais em algumas proteínas. Bactérias, mas não organismos superiores, necessitam que um grupo formil seja retirado das proteínas recém-sintetizadas, o que é realizado pela ação da enzima peptídeo desformilase. Recentemente, essa enzima tem sido estudada como alvo para antibióticos. Uma gama de substâncias naturais foram identificadas como inibidores dessa enzima, a qual é uma metaloproteína com um resíduo catalítico de ácido glutâmico. O requerimento para protonação do glutamato no sítio ativo é um fator importante para o entendimento da potencia desses inibidores (MADISON *et al.*, 2002).

O uso indiscriminado de antibióticos está aumentando a resistência das bactérias a ação destes, o que tem sido motivo de preocupação. A maioria dos determinantes da resistência das bactérias entéricas é baseada no mecanismo de efluxo das drogas. Três resíduos de ácidos glutâmicos possuem papel importante no antiportador metal-tetraciclina/H Tet (K) de *Staphylococcus aureus*. Tais resíduos situam-se na região hidrofílica do “loop” putativo de Tet(K), onde três outros resíduos ácidos são conservados. A substituição desses resíduos inibiu a resistência à tetraciclina (KIMURA *et al*, 1997).

### **1.7.MÉTODOS DE PRIMEIROS PRINCÍPIOS (*ab initio*)**

Nos últimos anos do século XIX e nos primeiros anos do século XX importantes descobertas na Física abriram novas trilhas para a compreensão da estrutura da matéria. Em 1897, Joseph John Thomson descobriu o elétron (partículas de carga negativa que formam os raios catódicos) e em 1911 Ernst Rutherford propôs, com base em medidas experimentais, um modelo atômico no qual elétrons orbitam em torno de um núcleo extremamente denso dotado de carga elétrica positiva. A eletrodinâmica clássica, entretanto, revelou-se inconciliável com tal descrição da estrutura do átomo. De fato, segundo o eletromagnetismo de Maxwell, uma carga elétrica acelerada deve irradiar e, conseqüentemente, perder energia mecânica. Elétrons que giram em torno do núcleo, acelerando continuamente na direção do centro de rotação, devem emitir ondas eletromagnéticas e espiralar até uma eventual colisão. Para resolver este problema de estabilidade do átomo, Niels Böhr propôs em 1913, inspirado nos trabalhos de Max Planck sobre interações entre a radiação e a matéria, a hipótese da quantização do momento angular orbital. Segundo Böhr, os elétrons no átomo de hidrogênio podem girar em certas órbitas sem emitir qualquer radiação eletromagnética e, portanto, sem perda de energia mecânica. Um conjunto discreto de valores de energia surge naturalmente desse pressuposto e explica o espectro de raios do hidrogênio com ótima precisão. Mesmo errônea sob muitos aspectos e intelectualmente insatisfatória, a teoria de Böhr foi fundamental para o desenvolvimento posterior da mecânica quântica.

Nos anos 20, Louis de Broglie defendeu a tese de que tanto a matéria como a radiação apresentam características corpusculares e ondulatórias. Erwin Schrödinger desenvolveu uma mecânica ondulatória para descrever as ondas de matéria, enquanto Werner Heisenberg construiu um formalismo matemático bastante distinto, embora equivalente, empregando matrizes para a descrição das quantidades que podem ser objeto de medida experimental. Na

versão de Schrödinger, o estado de um sistema quântico passa a ser especificado não mais em termos de posições e velocidades, como na física clássica, mas por uma função matemática complexa - a função de onda  $\Psi$  - que contém toda informação física do sistema. Tal informação, contudo, é insuficiente para estabelecer uma trajetória bem definida, ou seja, a função de onda não determina exatamente o que o objeto físico estudado irá fazer, mas apenas a probabilidade de um dado experimento sobre o objeto produzir uma medida dentro de certa faixa de valores (o quadrado de  $\Psi$  é a densidade de probabilidade). Em outras palavras, a mecânica quântica possui intrinsecamente caráter probabilístico, removendo por princípio as certezas do determinismo newtoniano.

Em 1921, Otto Stern e Walther Gerlach defletiram átomos em campos magnéticos e tiveram seus resultados analisados nos termos da nova teoria do quantum. Compton, um pouco depois, apresentou a idéia do momentum magnético intrínseco do elétron e lançou as bases para o conceito de *spin* quântico. Através da nova teoria, foi possível explicar a tabela periódica através do modelo de camadas eletrônicas nas quais os elétrons obedecem ao princípio de exclusão de Pauli (dois elétrons não podem ocupar o mesmo estado, ou ter todos os seus números quânticos assumindo valores idênticos). Em 1926, Enrico Fermi obteve uma estatística para sistemas de partículas de *spin* semi-inteiro (caso dos elétrons) levando em conta tal princípio. Heisenberg e Dirac, em separado, relacionaram o tipo de estatística quântica com o comportamento da função de onda sob permutações de partículas entre diferentes estados. Tais resultados, juntamente com a teoria quântica relativística de Dirac formam o alicerce sobre o qual se edificam as modernas teorias sobre a estrutura da matéria condensada.

Após esta pequena revisão histórica, vejamos agora como a teoria quântica descreve um sistema formado por átomos (uma molécula ou um cristal de ácido glutâmico, por exemplo). Para cada átomo temos um certo número de elétrons e uma carga nuclear. Cada elétron  $i$  e cada núcleo  $l$  possui suas coordenadas espaciais e de *spin*, que denotaremos por  $r_i$  e  $R_l$ . A função

de onda do sistema ( $\Psi$ ) depende das coordenadas de todos os seus componentes, elétrons e núcleos, e do tempo  $t$ .

$$\Psi = \Psi(\mathbf{r}_i, \mathbf{R}_I, t) \quad (1)$$

De acordo com a mecânica quântica, a evolução temporal de  $\Psi$  obedece à equação de Schrödinger:

$$\hat{H}\Psi = i\hbar \frac{\partial \Psi}{\partial t} \quad (2)$$

Onde  $i$  é a unidade imaginária ( $\sqrt{-1}$ ) e  $\hbar$  é a constante de Planck reduzida.  $\hat{H}$  é o operador Hamiltoniano do sistema, obtido a partir do Hamiltoniano clássico, o qual pode ser escrito como:

$$\hat{H} = \hat{T}_e + \hat{T}_n + \hat{V}_{ee} + \hat{V}_{en} + \hat{V}_{nn} \quad (3)$$

Onde  $\hat{T}_e$  e  $\hat{T}_n$  são, respectivamente, as energias cinéticas eletrônica e nuclear.  $\hat{V}_{ee}$ ,  $\hat{V}_{en}$  e  $\hat{V}_{nn}$  são termos de energia potencial eletrostática correspondendo a interações elétron-elétron ( $ee$ ), elétron-núcleo ( $en$ ) e núcleo-núcleo ( $nn$ ). Neste Hamiltoniano não são incluídos termos de interação magnética ou outros efeitos relativísticos. Tais correções podem ser necessárias, dependendo dos elementos químicos presentes no sistema.

Separando a dependência temporal da dependência nas coordenadas espaciais, temos a chamada equação de Schrödinger independente do tempo:

$$\hat{H}\Psi = E\Psi \quad (4)$$

Aqui,  $E$  é a energia associada ao estado  $\Psi(\mathbf{r}_i, \mathbf{R}_I)$  estacionário (independente do tempo).

No formalismo quântico,  $\hat{H}$  é um operador que atua sobre  $\Psi$ . Cada componente de  $\hat{H}$ , portanto, deve ser um operador.  $\hat{T}_e$  e  $\hat{T}_n$ , no espaço de coordenadas reais  $(\mathbf{r}_i, \mathbf{R}_I)$ , tornam-se operadores diferenciais de segunda ordem, enquanto as interações eletrostáticas conservam sua forma clássica. Temos, portanto, que a equação de Schrödinger é uma equação diferencial parcial com um número potencialmente elevado de variáveis. Por exemplo, para descrever um mol de matéria, seria necessário resolver uma equação de Schrödinger com um número de parâmetros da mesma ordem de grandeza. Computacionalmente tal tarefa é impraticável. Faz-se necessário, por conseguinte, algum tipo de aproximação para tentar obter algum resultado útil.

A primeira tentativa consiste em separar os graus de liberdade eletrônicos dos graus de liberdade nucleares. Tal abordagem é conhecida como aproximação de Born-Oppenheimer, e é justificável na medida em que o acoplamento entre as excitações eletrônicas e as excitações vibracionais é negligenciável, o que ocorre em muitas situações. De fato, analisando o sistema formado por elétrons e núcleos, percebe-se que há enorme discrepância nas ordens de grandeza das massas envolvidas. Um núcleo é milhares de vezes mais pesado que um elétron, o que significa que este é muito mais fácil de acelerar do que aquele. A nuvem eletrônica, portanto, pode adaptar-se quase que instantaneamente a qualquer mudança nas coordenadas nucleares, atingindo rapidamente um novo estado de energia mínima. Pode-se considerar, portanto, que para cada configuração das coordenadas nucleares  $\mathbf{R}_I$ , os elétrons alcançam imediatamente o estado fundamental compatível com aquela configuração, sendo desprezível o acoplamento entre estados com elétrons excitados e as oscilações nas posições dos núcleos.

Com a separação efetuada entre coordenadas eletrônicas e nucleares, a equação de Schrödinger apenas para os elétrons fica:

$$(\hat{T}_e + \hat{V}_{ee} + \hat{V}_{en})\Psi(\mathbf{r}_i) = E\Psi(\mathbf{r}_i) \quad (5)$$



Note-se que a energia  $E$  aqui é puramente eletrônica. Para obter a energia total, faz-se necessário acrescentar a  $E$  as energias eletrostática de interação núcleo-núcleo e cinética nuclear. A dependência nas coordenadas nucleares ainda aparece em  $\hat{V}_{en}$ , embora agora  $\mathbf{R}_I$  seja apenas um conjunto de parâmetros mantidos fixos na equação.

A função de onda  $\Psi(\mathbf{r}_i)$  deve satisfazer, além da equação de Schrödinger, o princípio da exclusão de Pauli. É interessante para tanto efetuar a decomposição de  $\Psi$  em um produtório de funções independentes de uma só coordenada:

$$\Psi(\mathbf{r}_i) = \psi_1(\mathbf{r}_1)\psi_2(\mathbf{r}_2)\psi_3(\mathbf{r}_3)\dots\psi_n(\mathbf{r}_n) \quad (6)$$

Tal "produtório de Hartree" (é assim que o denominam os livros de química quântica) desacopla as diferentes coordenadas eletrônicas e é mais uma aproximação que se acrescenta para tentar resolver o problema quântico multieletrônico. Infelizmente, esta forma de expressar  $\Psi$  viola o princípio da exclusão, porque admite que dois elétrons possam ocupar o mesmo estado eletrônico, ou seja,  $\Psi$  é diferente de zero se  $\psi_i = \psi_j$ . Para resolver tal problema, substituímos o produtório de Hartree por um determinante de Slater:

$$\Psi(\mathbf{r}_i) = \frac{1}{\sqrt{n!}} \begin{vmatrix} \psi_1(\mathbf{r}_1) & \psi_1(\mathbf{r}_2) & \psi_1(\mathbf{r}_3) & \cdots & \psi_1(\mathbf{r}_n) \\ \psi_2(\mathbf{r}_1) & \psi_2(\mathbf{r}_2) & \psi_2(\mathbf{r}_3) & \cdots & \psi_2(\mathbf{r}_n) \\ \psi_3(\mathbf{r}_1) & \psi_3(\mathbf{r}_2) & \psi_3(\mathbf{r}_3) & \cdots & \psi_3(\mathbf{r}_n) \\ \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \psi_n(\mathbf{r}_1) & \psi_n(\mathbf{r}_2) & \psi_n(\mathbf{r}_3) & \cdots & \psi_n(\mathbf{r}_n) \end{vmatrix} \quad (7)$$

Tal formulação assegura imediatamente o princípio de exclusão, uma vez que  $\psi_i = \psi_j$  deixa duas linhas da matriz idênticas, anulando seu determinante e garantindo a anti-simetria da função de onda com efeitos de troca (a permuta

de coordenadas espaciais não altera a densidade de probabilidade, dada pelo quadrado da função de onda) e efeitos de correlação de troca (surge uma espécie de repulsão puramente quântica que impede os elétrons de ocuparem o mesmo estado quântico). Considerando, porém, que elétrons com *spins* opostos não são correlacionados nesta aproximação, é comum afirmar que a escrita da função de onda como um determinante de Slater não inclui efeitos de correlação eletrônica.

Substituindo a Equação (7) na equação de Schrödinger (5) e aplicando o princípio variacional para determinar as funções (orbitais)  $\psi_i$  que minimizam o valor esperado para a energia (ou seja, uma aproximação para o estado fundamental do sistema multieletrônico), encontram-se as equações de Hartree-Fock canônicas:

$$\left[ \hat{h}(\mathbf{r}) + \sum_{j=1}^n \left( \hat{C}_j(\mathbf{r}) + \hat{X}_j(\mathbf{r}) \right) \right] \psi_i(\mathbf{r}) = \varepsilon_i \psi_i(\mathbf{r}) \quad (8)$$

Nesta expressão,  $\hat{h}$  representa a energia cinética do elétron mais a energia potencial de interação com os núcleos,  $\hat{C}_j$  é o operador de Coulomb, associado a interações coulombianas com os elétrons nos estados  $j$ , enquanto  $\hat{X}_j$  é o operador de troca, não-local, que decorre da anti-simetria do determinante de Slater. As equações de Hartree-Fock são não-lineares, porquanto o orbital  $\psi_i$  depende de um modo não-trivial dos demais orbitais. Os orbitais de Hartree-Fock  $\psi_i$ , portanto, devem ser determinados de modo auto-consistente.

A simulação computacional de moléculas na aproximação de Hartree-Fock exige algumas adaptações. Primeiramente, expande-se cada orbital em um conjunto de funções de base finito. Em seguida, faz-se a substituição desta expansão nas equações de Hartree-Fock e, após algumas manipulações algébricas, obtém-se um conjunto de equações não-lineares (equações de

Roothan), cuja resolução resulta na configuração eletrônica que minimiza a energia molecular.

A aproximação de Hartree-Fock constitui um avanço no cálculo de propriedades eletrônicas de sistemas com muitos átomos. Entretanto, apresenta várias limitações. Por exemplo, não leva em conta efeitos de correlação e produz *gaps* de energia maiores que os observados experimentalmente. Além disso, o custo computacional cresce rapidamente com o tamanho da base usada na expansão dos orbitais. Para tentar solucionar estas dificuldades, várias propostas foram apresentadas, mas sem dúvida alguma a mais bem sucedida e amplamente utilizada em nossos dias é a teoria do funcional da densidade (*Density Functional Theory* - DFT). No ano de 1964, Hohenberg e Kohn publicaram um artigo (HOHENBERG *et al*, 1964) no qual demonstraram os teoremas basilares desta teoria. O primeiro teorema de Hohenberg-Kohn prova que a densidade eletrônica do estado fundamental determina de um modo único o operador Hamiltoniano e, portanto, todas as propriedades de um sistema multieletrônico. Já o segundo teorema afirma a existência de um funcional de energia da densidade eletrônica que só é minimizado pela densidade eletrônica correta para o estado fundamental. Juntando os dois teoremas, deduz-se que as propriedades de uma molécula ou de um cristal podem ser obtidas de modo exato se soubermos a forma correta do funcional da densidade eletrônica. Como esta densidade depende apenas de três coordenadas espaciais e do *spin*, o problema pode, em princípio, ser resolvido com uma facilidade muito maior que na aproximação de Hartree-Fock onde, como vimos, o número de coordenadas é diretamente proporcional ao número de elétrons. Um mol de moléculas necessita vários mols de equações de Hartree-Fock para ser descrito, ou apenas uma equação envolvendo a densidade eletrônica.

Infelizmente, no entanto, ainda não conhecemos a forma exata do funcional da densidade que minimizado leva ao estado fundamental correto. Além disso, a teoria do funcional da densidade não permite inferir as propriedades de um material diretamente a partir da forma da densidade de elétrons apesar desta ser suficiente, em princípio, para tal tarefa. A relação

entre densidade eletrônica e as propriedades que se deseja obter é não raramente bastante sutil e não existe um método geral (por enquanto) capaz de extraí-las (por exemplo, no caso de um sólido, verificar se o mesmo é condutor, semiconductor ou isolante). O funcional de troca e correlação varia de um modo não-analítico (descontínuo) com o número de elétrons. É difícil discernir, na densidade de elétrons, as estruturas normalmente usadas pela química para compreender as interações interatômicas, como ligações covalentes e iônicas. Para superar tais problemas, um método foi proposto por Kohn e Sham em um artigo publicado em 1965 (KOHN *et al.*, 1965). A idéia destes autores foi aproveitar a forma exata do funcional para um gás de elétrons não-interagentes, relacionando-a com o problema multieletrônico incluindo interações. Resolvendo o problema dos elétrons não-interagentes em um potencial (conhecido como potencial de troca e correlação) correto leva a um conjunto de equações diferenciais de Kohn-Sham bastante parecidas com as equações de Hartree-Fock, e os orbitais que satisfazem estas equações (orbitais de Kohn-Sham  $\theta_i$ ) geram uma densidade eletrônica para o estado fundamental:

$$\left[ \hat{h}(\mathbf{r}) + \hat{C}(\mathbf{r}) + \hat{V}_{XC}(\mathbf{r}) \right] \theta_i(\mathbf{r}) = \varepsilon_i \theta_i(\mathbf{r}) \quad (9)$$

$\hat{C}(\mathbf{r})$  é um termo de energia coulombiano e  $\hat{V}_{XC}(\mathbf{r})$  é o potencial de troca e correlação.  $\hat{h}$ , como nas equações de Hartree-Fock, inclui a energia cinética e a energia potencial elétron-núcleo. Sendo a energia cinética calculada usando orbitais - e não somente em termos de densidade eletrônica - ela se baseia em propriedades quânticas que não se relacionam de modo trivial com a densidade.

Kohn e Sham também propuseram uma forma aproximada para a energia de troca e correlação para o limite de uma lenta variação espacial da densidade eletrônica, conhecida como aproximação LDA (Local Density Approximation). Para obter a resolução do problema de muitos elétrons na aproximação LDA (ou em outras aproximações), o primeiro passo é escolher

um valor inicial para a densidade eletrônica, o que muitas vezes é feito a partir da superposição de várias densidades eletrônicas calculadas para os átomos individuais que formam o sistema em estudo. A partir desta densidade, estimam-se as energias de Coulomb e de troca e correlação e os correspondentes potenciais, que são inseridos na Equação (9). Esta é numericamente solucionada expandindo os orbitais de Kohn-Sham em uma base de funções adequada. A partir dos orbitais calculados, gera-se uma nova densidade eletrônica, que é novamente usada para calcular os potenciais e resolver novamente a Equação (9). O processo continua até que se alcance convergência (autoconsistência). As funções de base são escolhidas geralmente em função do problema abordado. Por exemplo, moléculas são descritas usando funções gaussianas ou orbitais atômicos, enquanto cristais, em virtude de sua periodicidade, são descritos usando uma base de ondas planas. Outras técnicas combinam os dois mundos, usando orbitais atômicos para regiões próximas dos núcleos e ondas planas no espaço restante.

Após a autoconsistência ter sido alcançada, várias propriedades podem ser obtidas, inclusive as forças atuando sobre cada átomo. Estas forças, por sua vez, podem ser empregadas para determinar uma nova configuração de coordenadas nucleares com menor energia. Em passos sucessivos, a geometria de uma molécula ou de um cristal pode ser otimizada até se chegar a um mínimo energético que deve corresponder ao estado fundamental observado na natureza. Computacionalmente, os cálculos DFT demandam o mesmo poder computacional que os cálculos Hartree-Fock. A vantagem reside no fato de a primeira forma de cálculo incluir efeitos de troca e correlação ausentes na segunda. As diferenças são bastante perceptíveis, por exemplo, quando se comparam os *gaps* de energia. Enquanto no método Hartree-Fock o *gap* HOMO-LUMO (*Highest Occupied Molecular Orbital-Lowest Unoccupied Molecular Orbital*) é maior que os valores experimentais, o método DFT produz *gaps* menores.

A aproximação LDA se baseia no modelo do gás eletrônico homogêneo, que é apropriado para um sistema no qual a densidade de elétrons se comporta de modo suave com a posição. Quando se incorpora o *spin*, esta

aproximação muda de nome para LSDA (*Local Spin Density Approximation*). No intuito de melhorar a qualidade do funcional, foram desenvolvidos funcionais que levam em conta também o modo como a densidade eletrônica varia, ou seja, incluindo no funcional a densidade e o seu gradiente. Tais funcionais GGA (*Generalized-Gradient Approximation*). A energia de troca e correlação GGA é comumente dividida em termos de troca e de correlação distintos. Os funcionais deste tipo são construídos em geral usando considerações teóricas sobre o comportamento que se espera do funcional de troca e correlação exato em situações limítrofes, ou então com alguma orientação de dados experimentais. Os funcionais de troca GGA mais usados foram desenvolvidos por Perdew e Wang em 1986 (PERDEW *et al.*, 1986) (BURKE *et al.*, 1998); (PERDEW *et al.*, 1991); (PERDEW *et al.*, 1996) e o de Becke, em 1988 (BECKE, 1988). O funcional de Becke inclui parâmetros empíricos ajustados a partir de dados experimentais para diversos átomos, bem como uma contribuição de densidade local. Esses funcionais são bastante úteis na predição de propriedades moleculares. Os funcionais de correlação GGA mais usados são o de Lee-Yang-Parr (LYP) (LEE, 1988), o de Perdew publicado em 1986 (PERDEW, 1986) e o de Perdew e Wang de 1991 (PERDEW, 1991), além do funcional de Becke denominado Bc95 ou B96 (BECKE, 1996), e o de Perdew-Burke-Ernzerhof (PBE) (PERDEW *et al.*, 1996), sem ajustes empíricos. Quaisquer combinações de funcionais de troca e correlação podem ser feitas. Além disso, é possível também misturar funcionais de tipos diferentes com pesos estimados com a ajuda de medidas experimentais. São os chamados funcionais de troca e correlação híbridos, dentre os quais um dos mais conhecidos chama-se B3LYP (BECKE *et al.*, 1993), que combina termos de troca e correlação LDA e GGA de modo a proporcionar um bom acordo com diversas energias de atomização moleculares. É grande o número de funcionais com ajustes obtidos experimentalmente. O funcional de troca e correlação de Van Voorhis-Scuseria (VSXC) (VOORHIS *et al.*, 1998), com 21 parâmetros, por exemplo, é um pouco melhor que o B3LYP para o cálculo de energias de atomização, mas um pouco pior na estimativa de comprimentos de ligação.

Estendendo a aproximação GGA, Becke construiu um funcional de troca e correlação com 10 parâmetros e que depende também da divergência do gradiente das densidades eletrônicas de *spin* e dos gradientes dos orbitais de Kohn-Sham (BECKE, 1988); (SCHMIDER *et al.*, 1998), que melhorou ligeiramente os resultados GGA ao preço de um enorme aumento no custo computacional dos cálculos. Tal resultado, de fato, diminui a esperança de que sucessivas correções incorporando ordens de variação superiores da densidade eletrônica no funcional de troca e correlação possam trazer algum benefício. De qualquer forma, os funcionais GGA e híbridos fornecem em geral boas geometrias de equilíbrio, frequências vibracionais, momentos de dipolo e energias de atomização.

Por conta de tantas correções e acertos empíricos, existe alguma discussão sobre se, de fato, a teoria DFT de Kohn-Sham pode ser considerada como um método *ab initio*. A ignorância do funcional de troca e correlação verdadeiro e as sucessivas tentativas de aproximá-lo impedem que seja feita uma declaração rigorosa neste sentido. No entanto, o número de parâmetros empíricos usados nos diversos funcionais, mesmo os híbridos, é muito menor que os utilizados nos métodos semi-empíricos, que costumam ter fatores experimentais para cada tipo de átomo. Por esta razão, a aproximação proposta por Kohn-Sham pode ser posta à parte, separada de métodos *ab initio* como o de Hartree-Fock e seus sucessivos aperfeiçoamentos perturbativos. Entre as limitações da teoria do funcional da densidade podem ser enumeradas: aplicabilidade restrita ao estado fundamental (algumas extensões para estados excitados, no entanto, já começam a aparecer), energias menores que a energia exata por conta do excesso na correção aproximada de troca e correlação, curvas de energia errôneas para núcleos muito separados, energias de ativação de reações químicas com erro considerável, inexistência de um procedimento padrão para aprimorar a qualidade dos funcionais, falhas ao lidar com interações de Van der Waals, entre outras.

## 1.8 LUMINESCÊNCIA

A luminescência compreende três métodos ópticos denominados de: fluorescência molecular, fosforescência e quimioluminescência. O espectro de emissão de cada uma destas técnicas fornece informações para análise qualitativa e quantitativa.

A fluorescência e fosforescência são semelhantes, pois ambas absorvem fótons na excitação. Por esta razão as duas técnicas são conhecidas como fotoluminescência.

A diferença entre a fluorescência e a fosforescência, é que na primeira a energia responsável pela transição eletrônica, não envolve mudança no spin do elétron. Como consequência a fluorescência possui um curto tempo de vida, com a luminescência cessando quase que imediatamente ( $10^{-5}$  s).

Em compensação, uma mudança na orientação do spin do elétron, na emissão fosforescente, causa um aumento de vários segundos na duração da radiação. O comprimento de onda da fluorescência e fosforescência é maior do que a radiação usada para sua excitação.

O terceiro tipo de luminescência é a quimioluminescência, que é baseada no espectro de emissão de um espécie excitada que se forma no curso de uma reação química.

A medida de intensidade da fotoluminescência e da quimioluminescência permite a determinação quantitativa de uma variedade de espécies orgânicas e inorgânica importantes em quantidade de traços.

Atualmente, o número de métodos fluorimétricos é bem maior do que as aplicações de fosforescência e quimioluminescência.

O que torna a luminescência um método atrativo, é a sua sensibilidade, com limite de detecção da ordem de um a três vezes menor do que aquelas encontradas em espectroscopia de absorção. Detecção típica ocorre na faixa de parte por bilhão (ppb). Outra vantagem do método de fotoluminescência é sua grande faixa de concentração, freqüentemente maiores do que aquelas encontradas em métodos de absorção.



### 1.8.1 TEORIA DE FLUORESCÊNCIA E FOSFORESCÊNCIA

A fluorescência ocorre nos estados gasosos, líquidos e sistema químicos sólidos. O tipo mais simples de fluorescência é aquele exibido por vapores atômicos diluídos. Por exemplo, o elétron 3s do átomo de sódio vaporizado pode ser excitado para o subnível 3p pela absorção de uma radiação de comprimento de onda de 5896 e 5890 Å. Após  $10^{-5}$  à  $10^{-8}$ s, o elétron retorna para o estado inicial emitindo radiação no mesmo comprimento de onda. Este tipo de fluorescência, em que a radiação emitida é a mesma que a absorvida, é conhecida como fluorescência de ressonância ou radiação de ressonância.

Espécies moleculares também exibem fluorescência de ressonância. Entretanto é mais freqüente, bandas de fluorescência ou fosforescência aparecerem em comprimentos de onda mais longos do que a linha de ressonância.

### 1.8.2 SPIN ELETRÔNICO

O princípio de exclusão de Pauli estabelece que dois elétrons em um átomo não podem possuir o mesmo conjunto de quatro números quânticos. Esta restrição requer que não mais que dois elétrons ocupem o mesmo orbital. Dois elétrons no mesmo orbital possuem obrigatoriamente spins opostos. Nestas circunstâncias, os elétrons estão emparelhados. Devido ao emparelhamento de elétrons, a maioria das moléculas são diamagnéticas, ou seja, elas não são repelidas por um campo magnético permanente (estático).

Já os radicais livres, são paramagnéticos por possuírem elétrons desemparelhados, tornando-os atraídos por um campo magnético, ou seja, são paramagnéticos.

### 1.8.3 ESTADO EXCITADO SINGLETE/TRIPLETE

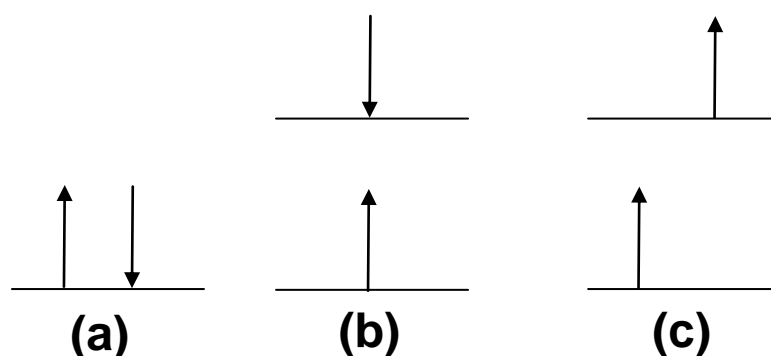
O estado singlete é aquele em que todos os spins eletrônicos de uma molécula encontram-se emparelhados e não ocorre desdobramento em níveis de energia quando a molécula é submetida a um campo magnético (neste caso negligencia-se os spins nucleares). No caso de um radical livre seu estado padrão é um dublete devido ao número ímpar de elétrons, de tal forma que

quando submetido a um campo magnético, duas orientações são possíveis, com níveis de energia ligeiramente diferentes.

Quando um dos elétrons de um par é excitado para um nível superior de energia, um estado singlete ou triplete é permitido.

**O estado singlete** é aquele no qual o elétron excitado mantém-se emparelhado com aquele que ficou no nível de energia inicial.

**O estado Triplete** é quando o elétron promovido torna-se desemparelhado de acordo com a Figura 10 .



**Figura 10 . Representação dos estados: fundamental singlete (a), excitado singlete (b) e excitado triplete (c).**

Normalmente, o estado triplete excitado é de menor energia que o estado singlete. As propriedades de uma molécula no estado triplete diferem significativamente do estado singlete. No caso do triplete, o mesmo é paramagnético, enquanto o singlete é diamagnético. Por outro lado é importante frisar que transição singlete/triplete e vice-versa envolve o estado do spin eletrônico, o que é menos provável na transição singlete/singlete. A consequência disso é que o elétron no estado triplete possui um tempo de vida variando entre  $10^{-4}$  à vários segundos.

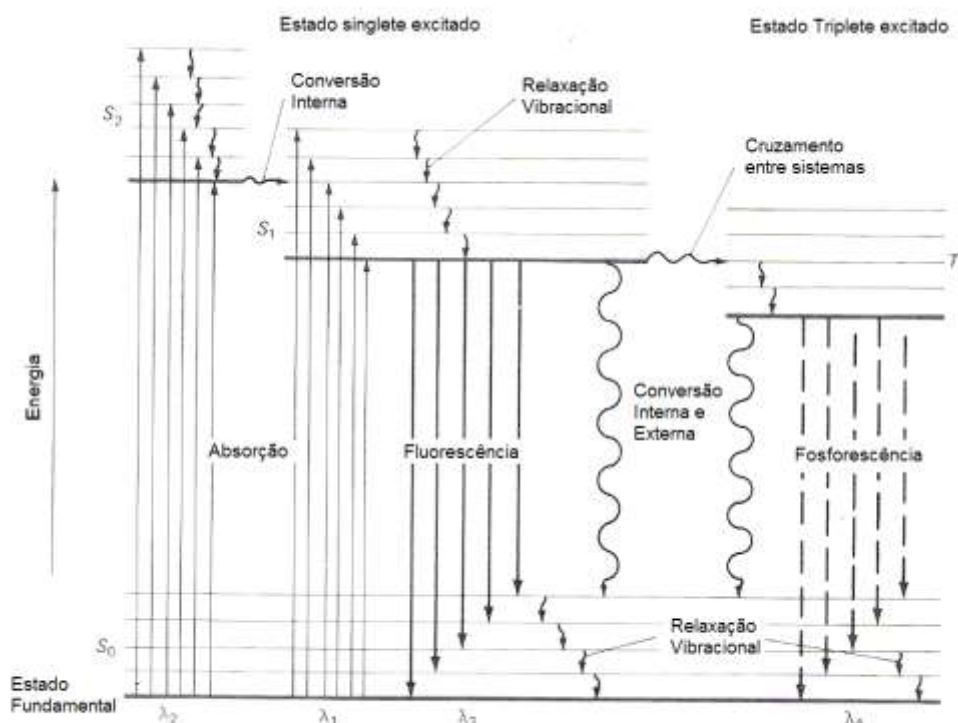
#### **1.8.4 DIAGRAMA DOS NÍVEIS DE ENERGIA PARA MOLÉCULAS FOTOLUMINESCENTES.**

A figura 11 é um diagrama dos níveis de energia para uma molécula fotoluminescente. A linha inferior em negrito representa o estado de energia

padrão (mínimo) da molécula, que normalmente é um estado singlete e é denominada  $S_0$ . A temperatura ambiente, este estado representa as energias de todas as moléculas em uma solução.

As linhas superiores em negrito são níveis de energia para o estado vibracional padrão. As duas linhas a esquerda representam o primeiro ( $S_1$ ) e o segundo ( $S_2$ ), que são estados singletos eletrônicos. O único à direita ( $T_1$ ) representa a energia do triplete. Como acontece de praxe a energia do triplete excitado é menor do que a energia do correspondente singlete.

Numerosos níveis de energia vibracionais estão associados com cada um dos quatro estados eletrônicos, como estão sugeridos pelas linhas mais claras horizontais. Como está mostrado na Figura 11, a excitação desta molécula pode ser levada pela absorção de duas bandas de radiações, uma centrada no comprimento de onda  $\lambda_1$  ( $S_0 \rightarrow S_1$ ) e a segunda em torno de um comprimento de onda mais curto  $\lambda_2$  ( $S_0 \rightarrow S_2$ ).



**Figura 11 Diagrama parcial de Energia do Sistema Fotoluminescência**

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Simular, cristalizar e caracterizar opticamente cristais da modificações  $\alpha$ (metaestável) do ácido L-glutâmico.

### 2.2. OBJETIVO ESPECÍFICO

Cristalização pelo método de resfriamento lento da modificação (alfa)  $\alpha$  metaestável.

Realizar o estudo teórico, através de simulação pelo método *ab-initio*, com a finalidade de:

- 1) Determinar a geometria e a conformação mais estável.
- 2) Calcular as estruturas de bandas e as propriedades eletrônicas e ópticas dos cristais.

Realizar estudos experimentais de absorção e fluorescência do cristal alfa  $\alpha$  (metaestável).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 CRESCIMENTO DE CRISTAIS DE ÁCIDO L-GLUTÂMICO

A massa do pó de alta pureza (>99%) do ácido L-glutâmico foi pesada com auxílio de uma balança eletrônica digital com precisão de 0,0001 g. Preparou-se com água Milli-Q várias séries de soluções de 40 mL a diferentes concentrações com base no coeficiente de solubilidade à 25 °C do ácido L-glutâmico (0,864 g/100 mL) de acordo com o seguinte procedimento:

- ◆ A massa de aminoácido pesada era misturada à água Milli-Q;
- ◆ A mistura era submetida a várias temperaturas com agitações ocasionais até a completa dissolução, através de um agitador magnético;
- ◆ Após a dissolução, a solução obtida era filtrada para uma proveta através de um funil contendo papel filtro, visando à retirada de possíveis impurezas;
- ◆ Depois da filtração, a solução era transferida para vários béqueres, os quais eram devidamente vedados com filme de PVC.

Os béqueres com as soluções eram deixados em repouso em diferentes temperaturas, de acordo com o método de resfriamento do solvente; após vários dias começavam a aparecer um número variável de pequenos cristais possíveis de serem vistos a olho nu. Quando o cristal parava de crescer, era retirado da solução de crescimento, secado e isolado em papel alumínio e caixa própria etiquetada com código referente aquele anotado no livro de crescimento de cristais do laboratório.

Na Tabela 06 constam às descrições com mais detalhes dos materiais, insumos e equipamentos usados nessa etapa do trabalho.

**Tabela 6 - Materiais, insumos e equipamentos utilizados no crescimento dos cristais.**

<b>Materiais</b>	Béquer de vidro de 50ml Balão volumétrico Massa magnética Pinças cirúrgicas Espátulas de aço Papel Filtro Pipetas automáticas Eppendorfs Provetas de vidro de 50mL Funis Filmes de PVC Papel alumínio
<b>Insumos</b>	Água Milli Q, resistividade de 18.2Ω Água destilada Pó de ácido L-glutâmico de alta pureza (99%)
<b>Equipamentos</b>	Agitador magnético Fisher Balança de precisão (4 dígitos) Denver Inst. Mold. A-200 <b>Banho-maria</b> Câmara fria de 4 °C Câmara fria de 8 °C

### 3.2. MEDIDAS DE TRANSMISSÃO

As medidas de transmissão de radiação (em percentual) foram realizadas com um espectrômetro J&M MSP800 acoplado a um microscópio Zeiss. Foi utilizado uma fonte de luz de Deutério-Halogênio-combinada e

objetiva Zeiss Ultrafluor 10x/0,2. A área da medição foi 40x160  $\mu\text{m}$ , com tempo de 10ms e 100 acumulações. A faixa de detecção foi de 182 - 998 nm. Para a obtenção da absorção, utilizou-se a seguinte relação:

$$\text{Absorção (\%)} = 1 - \text{Transmissão (\%)}$$

### 3.3. MEDIDAS DE FLUORESCÊNCIA

As medidas de fluorescência no cristal foram realizadas com um espectrômetro J&M MSP800 com Monochromador FL 3095, acoplado a um microscópio Zeiss. Foi utilizada uma fonte de luz de Deutério-Halogênio-combinada e objetiva Zeiss Ultrafluor 10x/0,2. Foram realizadas excitações de 247, 252, 262 e 272 nm. A área da medição foi 200 x 200  $\mu\text{m}$ , com tempo de 5s, sem acumulações. A faixa de detecção foi de 182 - 998 nm. Também foram realizadas medidas de luminescência em uma solução aquosa de 0,01 mol/L de ácido L-glutâmico (origem), nas excitações de 247, 252, 262 e 272 nm, em espectrômetro de fluorescência Hitachi - modelo F-4500, no Laboratório Bio-Inorgânica do Departamento de Química da Universidade Federal do Ceará (UFC).

### 3.4. CÁLCULOS *AB-INITIO*

As estruturas cristalinas dos polimorfos de ácido glutâmico  $\alpha$  e  $\beta$ , os quais estão mostrados na Figura 15 foram determinados por raios-X (KIROKAVA, 1955; BERNAL1931; NAGAHISMA, 1970; SHIAHATA, 1980) e difração de nêutrons (LEHMANN *et al.*,1980; LEHMANN *et al.*, 1972). São pontos de partida úteis para a realização de métodos quânticos de primeiros princípios para o cálculo de propriedades estruturais empregando a teoria funcional de densidade (DFT)(HOHENBERG *et al.*, 1964; KOHN *et al.*, 1965) com as mudanças do potencial de correlação considerados na aproximação generalizada de gradiente usando os termos de Perdew-Burke-Ernzerhof (PERDEW *et al.*, 1996). Os cálculos computacionais foram realizados com o código CASTEP, (SEGALL *et al.*, 2000) usando base de onda plana e

pseudopotenciais de Vanderbilt ultraleves (VADERBILT, 1990). Um corte de energia de 300eV para a base de onda-plana foi adotada, uma tolerância de  $5 \times 10^{-7}$  eV/ átomo para o campo de cálculos auto-consistente, e 232 elétrons de valência (36 H-1s<sup>2</sup>, 80 C-2s<sup>2</sup>2p<sup>2</sup>, 20 N-2s<sup>2</sup>2p<sup>3</sup>, 96 O-2s<sup>2</sup>2p<sup>4</sup>).

Na otimização geométrica, ambas as coordenadas internas e os parâmetros de rede foram permitidos relaxar de acordo com o algoritmo de Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shannon (PFROMMER,1997), com um número máximo de 500 passos de interações, 20  $\mu$ eV por átomo para a variação de energia total, 0,05 eV/Å como a variação para a força máxima em cada átomo, 0,2pm para o deslocamento atômico, e 0,1GPa para o estresse de tensor. De forma a encontrar a estrutura de mais baixa energia dos polimorfos  $\alpha$  e  $\beta$  de ácido glutâmico, nós checamos como limiar de convergência para a otimização de geometria uma variação de energia total menor do que  $5,0 \times 10^{-6}$  eV/ átomo em três passos sucessivos auto-consistentes, 0,01 eV/Å para a força máxima, 0,02 GPa para a pressão máxima e  $5 \times 10^{-4}$  Å para o deslocamento máximo.

Depois da otimização de geometria, as propriedades eletrônicas e ópticas foram calculadas. Doze bandas vazias foram consideradas para a estrutura de bandas, densidade de estados, e propriedades ópticas dos polimorfos  $\alpha$  e  $\beta$  de ácido glutâmico. O esquema de Monkhorst-pack (MONKHORST *et al.*, 1977; PACK *et al.*, 1977) para a integração na zona de Brillouin com grades de 2x2x3 e 4x1x3 foram adotados para os polimorfos  $\alpha$  e  $\beta$  de ácido glutâmico, respectivamente. A densidade de estados foi computada por meio de um esquema desenvolvido por Ackland, (ACKLAND, 1998) enquanto os cálculos das densidades parciais de estados foram baseados nas análises de populações de Mulliken com a contribuição relativa de cada átomo. (SEGAL, *et al.*, 1996a; SEGAL, *et al.*, 1996b).



## 4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1.-CRESCIMENTO DE CRISTAIS DE ÁCIDO L-GLUTÂMICO

Como a forma mais comum de cristal do ácido glutâmico é a  $\beta$ , o experimento teve que ser realizado de forma a favorecer o crescimento da forma  $\alpha$ , que é a de interesse. Diversas condições foram experimentadas, de forma a explorar a cinética de crescimento dos polimorfos, a qual constitui o fator principal resultante no aparecimento da forma  $\alpha$  ou  $\beta$ . (CASHELL *et al.*, 2004).

O método de resfriamento do solvente foi utilizado para a realização desse trabalho devido às descrições presentes na bibliografia (BERNSTEIN *et al.*, 1991; GARTI *et al.*, 1997; SANO *et al.*, 1997), além da disponibilidade do aparato e ao fato de já ter sido empregado com sucesso pelo nosso grupo de pesquisa.

Sabendo-se que o gradiente de temperatura (diferença entre a temperatura de dissolução e a alcançada no equilíbrio) influencia de forma decisiva na obtenção do cristal, 5 (cinco) temperaturas diferentes foram utilizadas:

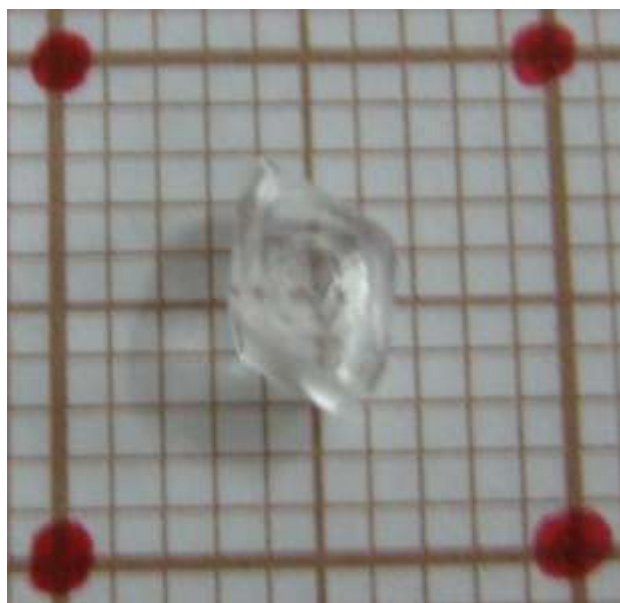
- 20 °C (temperatura da Sala de Crescimento de Cristais);
- Câmaras frias de 4 °C e 8 °C da Sala de Crescimento de Cristais;
- 20 °C aproximadamente, temperatura do Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas)
- 4 °C temperatura da geladeira.

Para a dissolução do aminoácido, duas temperaturas foram experimentadas:

A 25 °C, utilizando-se uma saturação de 100 %, correspondente a 0,0751 Mol/L, e a 62 °C, utilizando-se uma saturação arbitrária de 166 %, correspondente a 0,125 Molar.

De todas as condições testadas apenas duas apresentaram resultados satisfatórios:

- 1) A solução preparada a 62 °C (166% de saturação) e deixada em repouso na temperatura ambiente do Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (aproximadamente 20 °C) apresentou cristais na forma  $\alpha$  de dimensões : 5,0x4,0x2,0 mm após 72 horas (Figura 12)
- 2) A solução preparada a 62 °C e deixada em repouso na geladeira (4 °C) apresentou sementes (forma  $\alpha$ ) após 72 horas, as quais foram posteriormente utilizadas para otimizar o crescimento de cristais obtidos na condição supracitada.



**Figura 12 .Foto de um cristal de ácido L-glutâmico (polimorfo  $\alpha$ ) crescido pelo método de resfriamento.**

Nas demais temperaturas não houve sinal de crescimento de cristais.

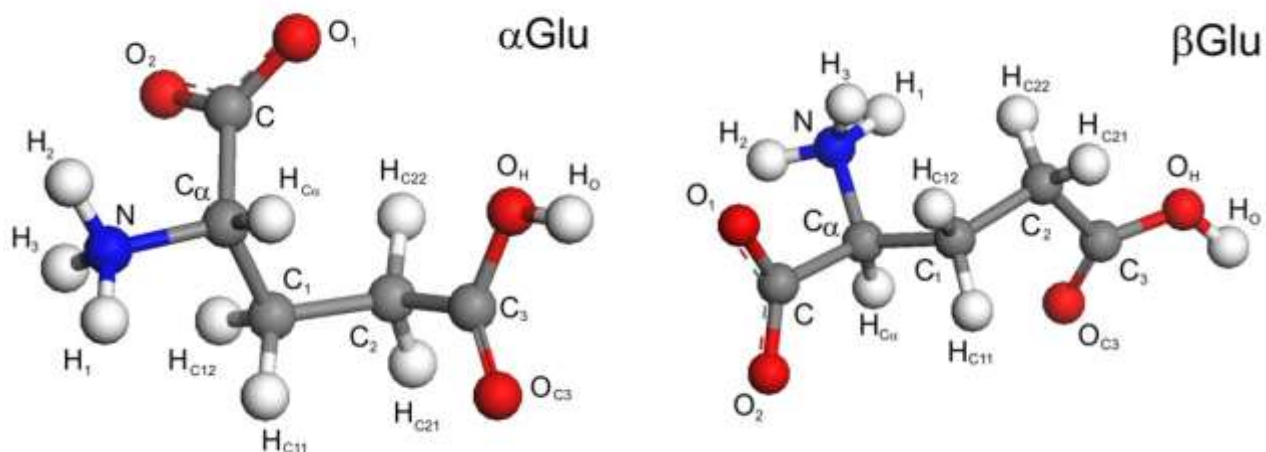
O provável motivo pelo qual as formas  $\alpha$  dos cristais de ácido L-glutâmico cresceram na bancada do Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas e na geladeira deve ser a vibração presente, a qual pode ter sido suficiente para impedir a nucleação de cristais da forma  $\beta$  na superfície dos  $\alpha$

cristais ou os  $\alpha$ - cristais formados com vibração não apresentaram faces cristalinas suficientemente bem formadas, sobre as quais os cristais da forma  $\beta$  deveriam nuclear. Todas as outras condições testadas apresentavam ausência de vibração.

## 4.2. CÁLCULOS DE PRIMEIROS PRINCÍPIOS

### 4.2.1. OTIMIZAÇÃO ESTRUTURAL

O ácido glutâmico cristaliza-se em duas fases,  $\alpha$  e  $\beta$ , ambas ortorrômbricas (ângulos  $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ ), com quatro moléculas por célula unitária ( $4 \times 19 = 76$  átomos por célula) e 4 operações de simetria (1 identidade + 3 *screw axis*), pertencendo ao grupo espacial  $P2_12_12_1$ . As diferenças entre os dois cristais aparecem nos parâmetros de rede e nas posições relativas dos átomos. Os parâmetros de rede experimentais para a fase  $\alpha$  são  $a = 10.282 \text{ \AA}$ ,  $b = 8.779 \text{ \AA}$  e  $c = 7.068 \text{ \AA}$  (LEMHMANN & NUNES, 1980), com um volume igual a  $638 \text{ \AA}^3$  e densidade de  $1.53 \text{ g/cm}^3$ . Já para a fase  $\beta$  temos  $a = 5.17 \text{ \AA}$ ,  $b = 17.34 \text{ \AA}$  e  $c = 6.95 \text{ \AA}$  (HIROKAWA, 1955), volume igual a  $623.05 \text{ \AA}^3$  e densidade de  $1.57 \text{ g/cm}^3$ . As moléculas no interior das células unitárias serão identificadas usando-se a notação  $M_i(j)$ , onde  $i = \alpha, \beta$  para a fase cristalina e  $j = 1, 2, 3, 4$ . A figura 13 mostra a disposição espacial dos átomos nas conformações de cada cristal, bem como seus rótulos.



**Figura 13 .Conformações do ácido glutâmico nos cristais  $\alpha$  e  $\beta$ . A notação usada para indicar os átomos de cada formação também é apresentada**

A Tabela 7 apresenta as coordenadas internas reduzidas, ou seja, relativas aos parâmetros de rede , de uma molécula do cristal ( $M(1)$ ) obtidas experimentalmente.  $C_\alpha$  é o carbono  $\alpha$  e C é o carbono que se liga aos oxigênios do grupo carboxila (respectivamente,  $O_1$  e  $O_2$ ). Os carbonos do radical do aminoácido são enumerados de 1 a 3, em seqüência. Ao carbono  $C_3$  ligam-se um átomo de oxigênio  $O_{C3}$  e o grupo O-H (átomos  $O_H$  e  $H_O$ , respectivamente). Os hidrogênios que se ligam ao nitrogênio N são indicados por  $H_1$ ,  $H_2$  e  $H_3$ . Os hidrogênios ligados aos carbonos 1 e 2 são indicados por  $H_{C11}$ ,  $H_{C12}$ ,  $H_{C21}$  e  $H_{C22}$ , e o hidrogênio ligado ao carbono  $\alpha$  é representado por  $H_{C\alpha}$ .

**Tabela 7 - Coordenadas reduzidas dos átomos na molécula Mi(1) de ácido glutâmico de acordo com (LEHMANN & NUNES, 1980).**

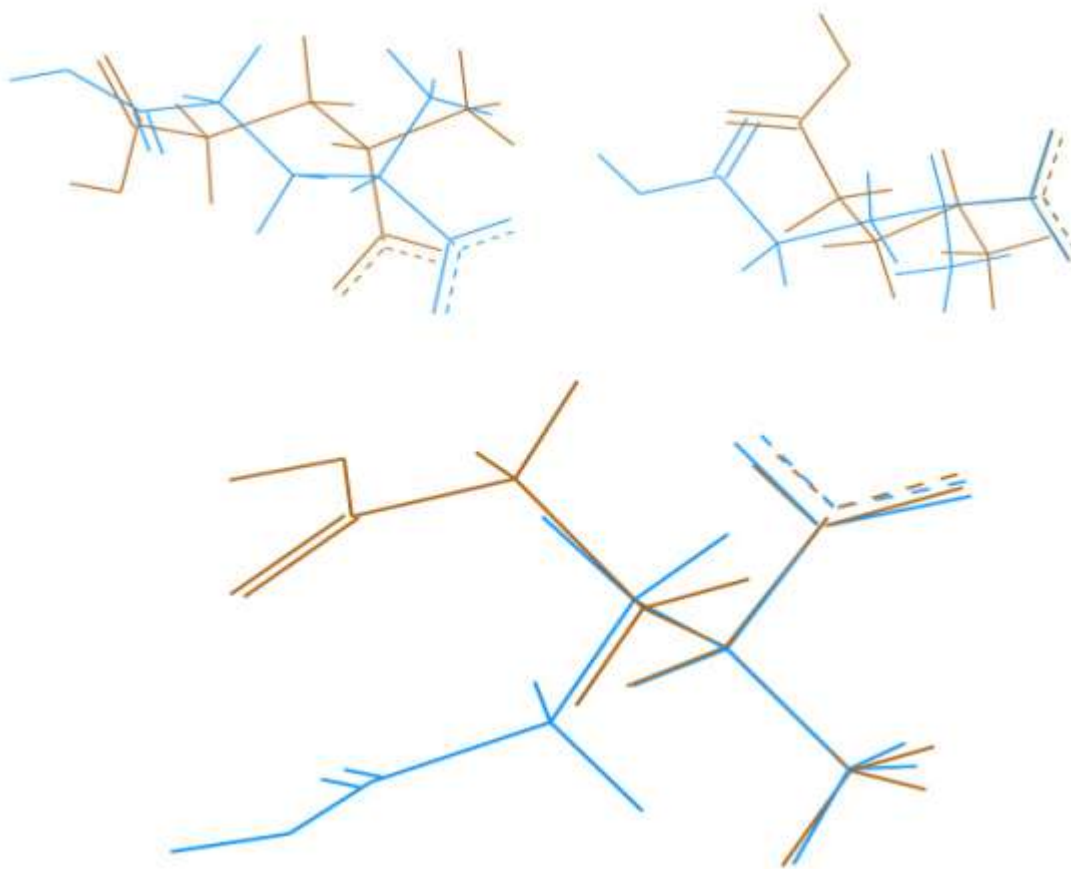
Átomo	Cristal $\alpha$			Cristal $\beta$		
	$x/a$	$y/b$	$z/c$	$x/a$	$y/b$	$z/c$
C $_{\alpha}$	0.546720	0.434050	0.360400	0.537000	0.591000	0.601000
C	0.656260	0.543460	0.417850	0.675000	0.513000	0.637000
C $_1$	0.500980	0.335290	0.525890	0.429000	0.623000	0.794000
C $_2$	0.449290	0.425700	0.695580	0.250000	0.694000	0.781000
C $_3$	0.323200	0.505250	0.650850	0.393000	0.773000	0.746000
N	0.597920	0.331460	0.209690	0.337000	0.579000	0.457000
O $_1$	0.628450	0.684070	0.422960	0.525000	0.455000	0.658000
O $_2$	0.763820	0.487040	0.456630	0.908000	0.516000	0.680000
O $_{C3}$	0.219710	0.439120	0.637220	0.600000	0.776000	0.670000
O $_H$	0.334600	0.652630	0.624280	0.254000	0.825000	0.808000
H $_1$	0.522000	0.268900	0.150500	0.243000	0.628000	0.415000
H $_2$	0.645000	0.393900	0.102900	0.430000	0.546000	0.362000
H $_3$	0.664000	0.255400	0.266100	0.192000	0.558000	0.533000
H $_{C\alpha}$	0.465800	0.498100	0.297900	0.677000	0.630000	0.539000
H $_{C11}$	0.425300	0.256400	0.475800	0.589000	0.633000	0.887000
H $_{C12}$	0.584200	0.266900	0.574200	0.333000	0.575000	0.872000
H $_{C21}$	0.430100	0.345400	0.810800	0.138000	0.697000	0.910000
H $_{C22}$	0.521800	0.508800	0.744800	0.112000	0.684000	0.668000
H $_O$	0.247500	0.706200	0.601900	0.333000	0.873000	0.823000

Na Tabela 8 acham-se indicadas as posições absolutas (em Å) dos átomos na célula unitária. Um comparativo com os dados obtidos teoricamente será feito posteriormente. A figura 14 exibe uma superposição das conformações moleculares de cada fase cristalina. Nota-se que a grande diferença entre ambas reside na orientação espacial da cadeia lateral. As figuras 15, 16 e 17 mostram as células unitárias e diversas vistas dos cristais, que são estabilizados por ligações de hidrogênio.

**Tabela 8 - Coordenadas absolutas dos átomos na molécula Mi(1) de ácido glutâmico obtidas experimentalmente (HIROKAWA, 1955).**

Átomo	Cristal $\alpha$			Cristal $\beta$		
	x(Å)	y(Å)	z(Å)	x(Å)	y(Å)	z(Å)
C $_{\alpha}$	5.621380	3.810520	2.547310	2.776290	10.247940	4.176950
C	6.747670	4.771040	2.953360	3.489750	8.895420	4.427150
C $_1$	5.151080	2.943510	3.716990	2.217930	10.802820	5.518300
C $_2$	4.619600	3.737220	4.916360	1.292500	12.033960	5.427950
C $_3$	3.323140	4.435590	4.600210	2.031810	13.403820	5.184700
N	6.147810	2.909890	1.482090	1.742290	10.039860	3.176150
O $_1$	6.461720	6.005450	2.989480	2.714250	7.889700	4.573100
O $_2$	7.853600	4.275720	3.227460	4.694360	8.947440	4.726000
O $_{C3}$	2.259060	3.855030	4.503870	3.102000	13.455840	4.656500
O $_H$	3.440360	5.729440	4.412410	1.313180	14.30550	5.615600
H $_1$	5.367200	2.360670	1.063730	1.256310	10.889520	2.884250
H $_2$	6.631890	3.458050	0.727300	2.223100	9.467640	2.515900
H $_3$	6.827250	2.242160	1.880790	0.992640	9.675720	3.704350
H $_{C\alpha}$	4.789360	4.372820	2.105560	3.500090	10.92420	3.746050
H $_{C11}$	4.372930	2.250940	3.362950	3.045130	10.976220	6.164650
H $_{C12}$	6.006740	2.343120	4.058450	1.721610	9.97050	6.060400
H $_{C21}$	4.422290	3.032270	5.730730	0.713460	12.085980	6.324500
H $_{C22}$	5.365150	4.466760	5.264250	0.579040	11.860560	4.642600
H $_O$	2.544800	6.199730	4.254230	1.721610	15.137820	5.719850

Comparando os comprimentos de ligação  $l$  nas duas fases cristalinas, temos, para a fase  $\alpha$  ( $\beta$ ):  $l(\text{C}_\alpha\text{-C}) = 1,535 \text{ \AA}$  ( $1,549 \text{ \AA}$ ),  $l(\text{C}_\alpha\text{-N}) = 1,491 \text{ \AA}$  ( $1,454 \text{ \AA}$ ),  $l(\text{O}_\text{H}\text{-H}_\text{O}) = 1,024 \text{ \AA}$  ( $0,933 \text{ \AA}$ ),  $l(\text{C-O}_1) = 1,268 \text{ \AA}$  ( $1,278 \text{ \AA}$ ) e  $l(\text{C-O}_2) = 1,242 \text{ \AA}$  ( $1,242 \text{ \AA}$ ); e a distância  $d(\text{N-O}_\text{H}) = 4,885 \text{ \AA}$  ( $4,933 \text{ \AA}$ ). Nota-se que a molécula no cristal  $\beta$  é mais alongada que no cristal  $\alpha$ . Para os ângulos de ligação temos, no caso da fase  $\alpha$  ( $\beta$ ):  $\theta(\text{O}_1\text{-C-O}_2) = 125,644^\circ$  ( $126,424^\circ$ ),  $\theta(\text{C-C}_\alpha\text{-N}) = 107,934^\circ$  ( $108,281^\circ$ ),  $\theta(\text{N-C}_\alpha\text{-C}_1) = 108,205^\circ$  ( $112,916^\circ$ ),  $\theta(\text{C}_\alpha\text{-C}_1\text{-C}_2) = 114,280^\circ$  ( $116,714^\circ$ ),  $\theta(\text{C}_1\text{-C}_2\text{-C}_3) = 111,975^\circ$  ( $114,922^\circ$ ),  $\theta(\text{C}_2\text{-C}_3\text{-O}_\text{H}) = 114,218^\circ$  ( $107,993^\circ$ ) e  $\theta(\text{C}_3\text{-O}_\text{H}\text{-H}_\text{O}) = 113,376^\circ$  ( $115,915^\circ$ ). Os ângulos entre os átomos de carbono são mais abertos na estrutura  $\beta$ . Finalmente, os ângulos de torção:  $\tau(\text{C-C}_\alpha\text{-C}_1\text{-C}_2) = 59,217^\circ$  ( $-170,989^\circ$ ),  $\tau(\text{N-C}_\alpha\text{-C}_1\text{-C}_2) = 178,817^\circ$  ( $50,103^\circ$ ) e  $\tau(\text{C}_\alpha\text{-C}_1\text{-C}_2\text{-C}_3) = 68,303^\circ$  ( $-77,100^\circ$ ). A variação nos ângulos  $\tau$  revela diferenças significativas na disposição espacial dos átomos de carbono entre os dois cristais de ácido glutâmico.



**Figura 14. Sobreposição das conformações dos polimorfos  $\alpha$  e  $\beta$  do ácido L-glutâmico.**

Sobrepondo as duas conformações do ácido glutâmico: a molécula marrom é a que aparece na fase  $\alpha$ , enquanto a de cor azul corresponde à estrutura  $\beta$ . A superposição na parte superior esquerda tenta minimizar a diferença média quadrática entre as coordenadas atômicas. A da parte superior direita alinha o grupo carboxila de ambas as conformações, enquanto o desenho na parte inferior ajusta os grupos amina e carboxila, juntamente com o carbono  $C_\alpha$ , mostrando a diferença na disposição espacial do radical do aminoácido. Vê-se claramente que a conformação na fase  $\beta$  é mais “comprida”, por causa dos ângulos mais abertos no *backbone* formado pelos átomos de carbono.



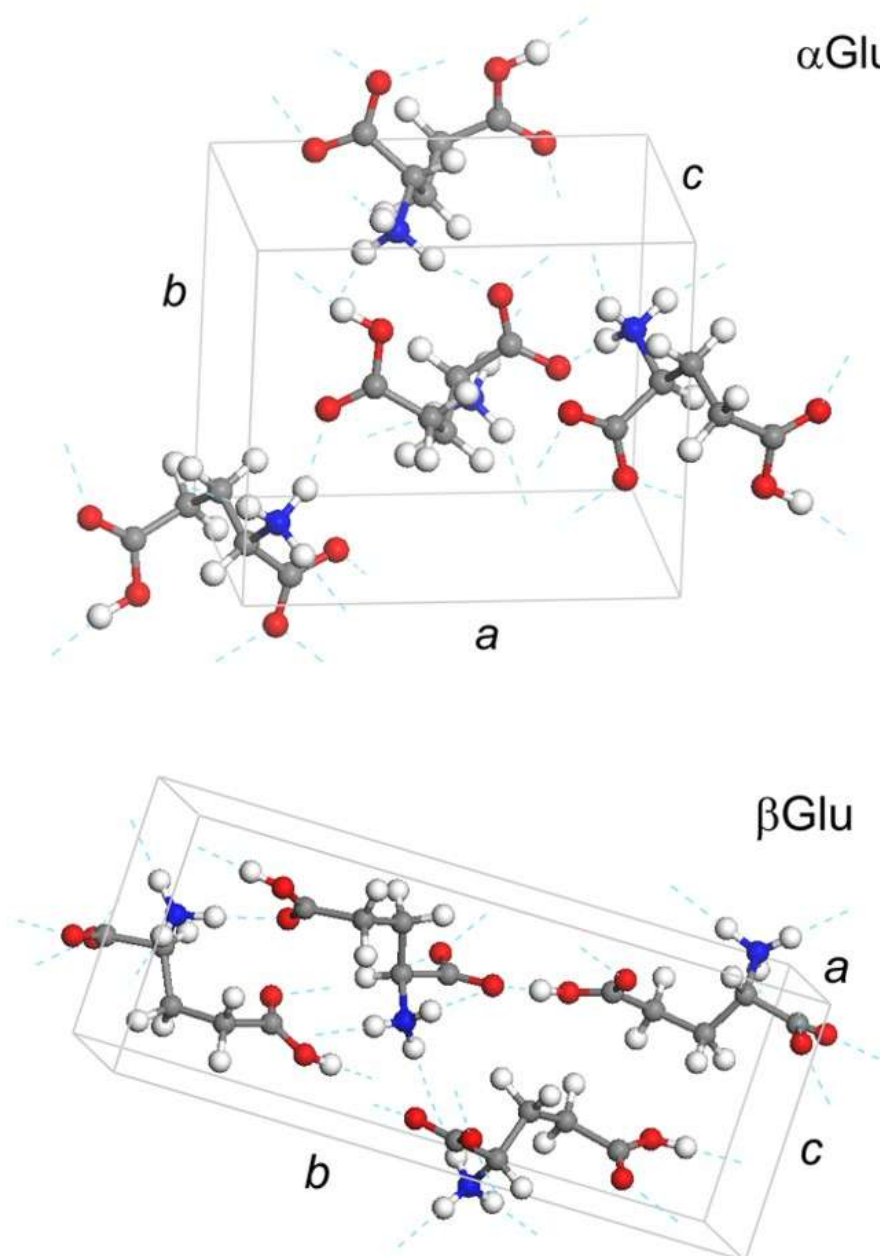


Figura 15. Vistas das células unitárias do ácido glutâmico para os cristais  $\alpha$  e  $\beta$ .

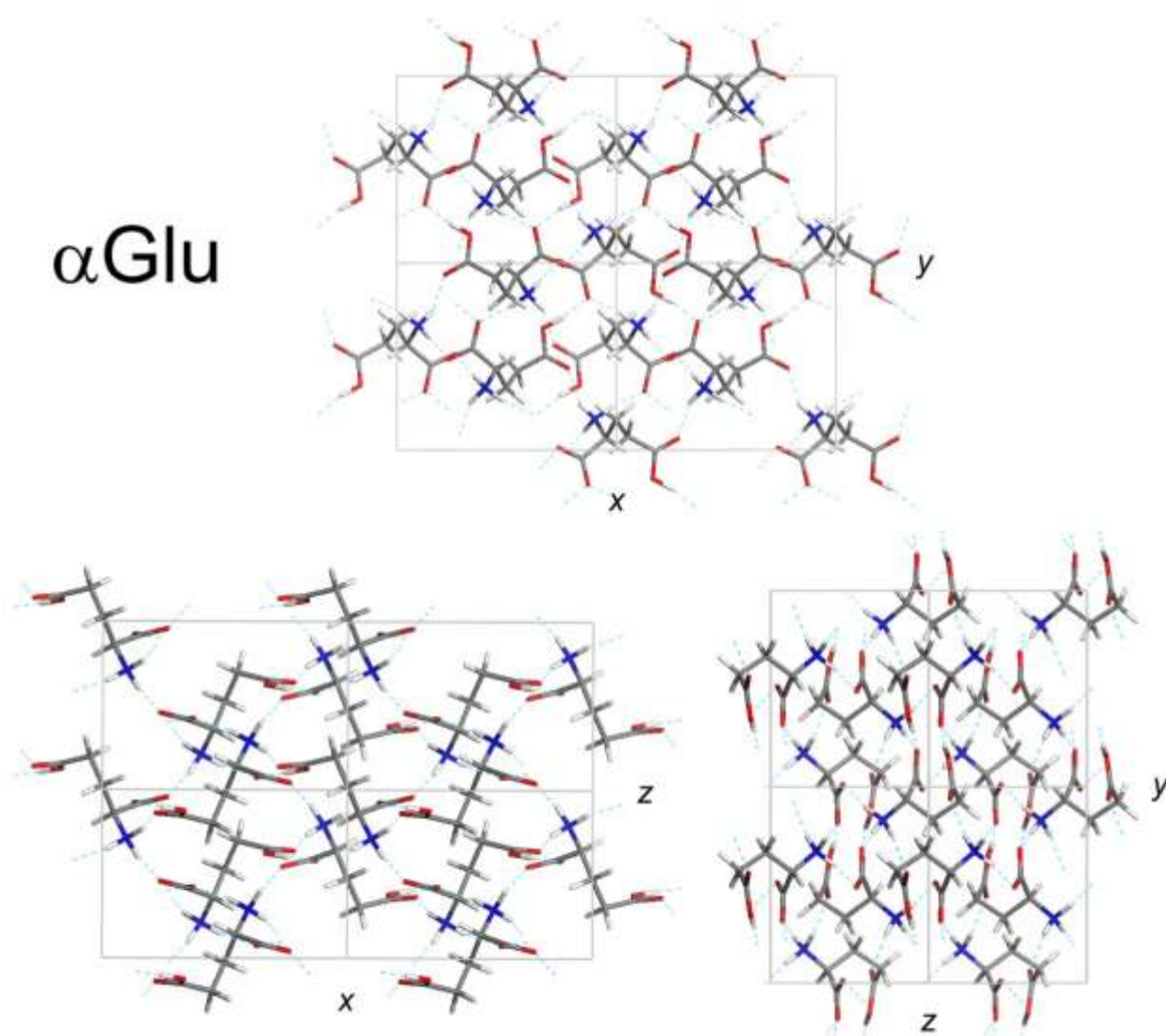
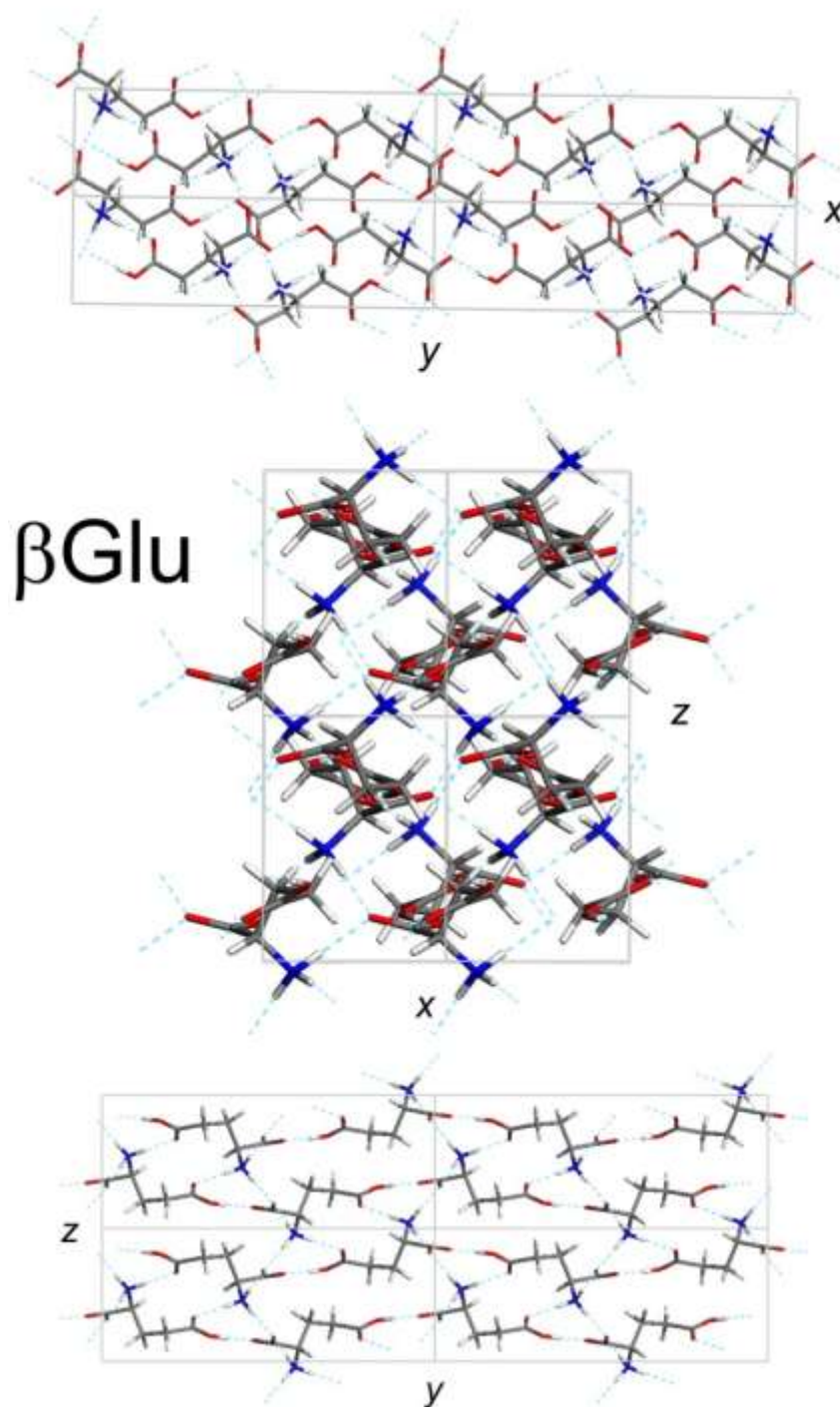


Figura 16. Diferentes perspectivas de várias células unitárias adjacentes do cristal  $\alpha$ . Nota-se a estrutura de pontes de hidrogênio que estabiliza a rede cristalina (linhas tracejadas em azul-claro).



**Figura 17. Vistas de células unitárias adjacentes do cristal  $\beta$**

A estrutura de pontes de hidrogênio que estabiliza a rede cristalina é assinalada pelas linhas tracejadas em azul-claro.

A otimização da geometria dos cristais de ácido glutâmico em função da energia total (ou seja, minimizando a energia total da célula unitária em cada fase) foi realizada usando o código CASTEP, parte do *Materials Studio Modeling* 4.0. Os cálculos empregaram o funcional GGA (*Generalized Gradient Approximation*) desenvolvido por Perdew, Burke e Ernzerhof (PERDEW *et al.*, 1996). A expansão da função de onda eletrônica foi feita numa base de ondas planas com energia de corte de 300 eV em ambas as configurações cristalinas, considerando 232 elétrons de valência para cada sistema (36 elétrons para os hidrogênios H-1s<sup>2</sup>, 80 elétrons para os carbonos C-2s<sup>2</sup> 2p<sup>2</sup>, 20 elétrons para os nitrogênios N-2s<sup>2</sup> 2p<sup>3</sup>, 96 elétrons para os oxigênios O-2s<sup>2</sup> 2p<sup>4</sup>). Não foram levados em conta efeitos relativísticos, tendo em vista os baixos números de massa das espécies envolvidas. Para a autoconsistência os seguintes critérios foram considerados: energia total por átomo com variação menor que 2 µeV em três iterações consecutivas e autoenergias com variação menor que 1 µeV. O número máximo de ciclos autoconsistentes para não-convergência foi igual a 100, com um *smearing* gaussiano nos níveis de energia de 0.1 eV e uma tolerância na variação da energia de Fermi inferior a 0.1 µeV. O esquema de mistura da densidade eletrônica de Pulay foi escolhido com histórico de 20 iterações e amplitude de mistura igual a 0.5. Para a otimização de geometria foi adotado o método BFGS (PFROMMER *et al.*, 1997), permitindo relaxar, juntamente com as coordenadas internas, os próprios parâmetros de rede das células unitárias. O tamanho do conjunto de base foi mantido fixo, e o número de passos máximo para não-convergência foi mantido em 500 iterações. As tolerâncias de convergência foram de: 20 µeV na variação da energia total por átomo, 0.05 eV/Å na variação da força máxima sobre cada átomo, 0.2 pm na variação máxima do deslocamento atômico e 0.1 GPa na componente máxima do tensor de *stress*. Para a janela de convergência na otimização da geometria, foram consideradas duas iterações.

Pseudopotenciais ultramacios de Vanderbilt (VANDERBILT, 1990) foram utilizados para descrever os elétrons de caroço. Os pseudopotenciais foram gerados usando o funcional LDA (*Local Density Approximation*) de troca e correlação desenvolvido por Ceperley e Alder (CEPERLEY *et al.*, 1980). As integrais no espaço recíproco foram computadas usando a amostragem de

Monkhorst-Pack (MONKHORST *et al.*, 1976); (MONKHORST *et al.*, 1977). Para o cristal na fase  $\alpha$ , foi escolhido um conjunto de pontos  $2 \times 2 \times 3$ , enquanto que para a fase  $\beta$  adotou-se uma amostragem de  $4 \times 1 \times 3$  pontos (a diferença deve-se ao diferente formato das células unitárias, com a fase  $\beta$  mais alongada ao longo da direção  $b$  em comparação com a fase  $\alpha$ ). Um conjunto de 12 bandas vazias foi considerado nos cálculos para a estrutura de bandas, densidade de estados total e parcial e propriedades ópticas (função dielétrica e absorção), sendo usado na obtenção destas propriedades o mesmo funcional de troca e correlação dos cálculos de otimização de geometria.

A Tabela 9 apresenta os parâmetros de rede, volume e densidade calculados no formalismo de primeiros princípios, em comparação com os dados experimentais. Nota-se que os valores dos parâmetros de rede são sensivelmente menores para o cálculo GGA-PBE quando confrontados com os dados de raio-X. A maior variação é observada para a fase  $\beta$ , com um volume quase 21% menor (e, conseqüentemente, uma densidade quase 26% maior). Espera-se, num cálculo GGA, que o volume da célula unitária seja um pouco maior que o valor experimental, porquanto este método tende a subestimar a intensidade das interações entre os componentes de um cristal. Os resultados aqui apresentados, entretanto, contradizem esta expectativa. Testes com um nível maior de refinamento na energia de corte e o emprego de pseudopotenciais mais duros podem dar uma idéia melhor da causa desta discrepância, elucidando se a mesma decorre de um erro intrínseco da metodologia - talvez por conta de particularidades da estrutura eletrônica do material - ou do nível de cálculo. A Tabela 10 apresenta as coordenadas reduzidas calculadas dos átomos nos cristais e a tabela 11 as coordenadas absolutas. As Figuras 18 e 19 comparam estes dados teóricos com os dados experimentais, para os dois tipos de cristal, revelando as flutuações nas coordenadas teóricas observadas ao longo das diversas direções cristalinas e o deslocamento quadrático em relação aos valores experimentais. A variação maior é observada para o cristal  $\beta$  de ácido glutâmico. Por exemplo, os valores absolutos das coordenadas da molécula de referência  $M_1(1)$  calculadas para o cristal  $\alpha$  variam de 0.25 e 0.4% em comparação com as medidas de raios-X, enquanto que para o cristal  $\beta$  a mesma variação oscila entre 0.5 e 1%. Nas diferentes direções cristalinas, em comparação com os dados experimentais, o

crystal  $\alpha$  possui maior variação nas coordenadas absolutas calculadas ao longo da direção  $a$ , enquanto o cristal  $\beta$ , na mesma condição, varia mais ao longo da direção  $b$ .

**Tabela 9 -Parâmetros de rede, volume da célula unitária e densidade de massa para as duas fases do cristal de ácido glutâmico: comparação entre resultados experimentais e cálculos de primeiros princípios. Os percentuais são relativos aos dados experimentais.**

Parâmetro	Cristal $\alpha$		Cristal $\beta$	
	Experimental	GGA-PBE	Experimental	GGA-PBE
$a$ (Å)	10.882	9.88252 (-9.18%)	5.17	4.73629 (-8.39%)
$b$ (Å)	8.779	8.44506 (-3.80%)	17.34	16.5529 (-4.54%)
$c$ (Å)	7.068	6.79410 (-3.88%)	6.95	6.30104 (-9.34%)
$V$ (Å <sup>3</sup> )	638	567.025 (-11.12%)	623.05	493.997 (-20.71%)
$P$ (g/cm <sup>3</sup> )	1.53	1.72349 (+12.65%)	1.57	1.97287 (+25.66%)

**Tabela 10 - Coordenadas reduzidas dos átomos na molécula Mi(1) de ácido glutâmico calculadas usando o funcional de troca e correlação GGA-PBE**

Átomo	Cristal $\alpha$			Cristal $\beta$		
	$x/a$	$y/b$	$z/c$	$x/a$	$y/b$	$z/c$
C $_{\alpha}$	0.546090	0.425740	0.369680	0.552060	0.592570	0.582470
C	0.660740	0.533950	0.427080	0.683660	0.511480	0.608780
C $_1$	0.502330	0.322630	0.538570	0.434040	0.613930	0.796940
C $_2$	0.449440	0.416930	0.710570	0.239070	0.684350	0.800030
C $_3$	0.324590	0.503580	0.655920	0.384510	0.761320	0.759530
N	0.593260	0.324580	0.208120	0.330460	0.590670	0.423090
O $_1$	0.636470	0.682560	0.430510	0.522750	0.450390	0.612780
O $_2$	0.772880	0.473680	0.465820	0.944130	0.509090	0.640770
O $_{C3}$	0.213470	0.438260	0.634600	0.631670	0.764260	0.694770
O $_H$	0.341840	0.655030	0.626530	0.233240	0.824770	0.802100
H $_1$	0.510820	0.263090	0.146550	0.267840	0.648990	0.374960
H $_2$	0.639840	0.394010	0.097700	0.398030	0.558640	0.288700
H $_3$	0.661370	0.239770	0.262350	0.157210	0.560300	0.489230
H $_{C\alpha}$	0.462130	0.495230	0.312190	0.709730	0.636210	0.535250
H $_{C11}$	0.424400	0.240150	0.488400	0.610550	0.626210	0.901060
H $_{C12}$	0.588580	0.253200	0.587480	0.320800	0.562790	0.862010
H $_{C21}$	0.424500	0.334500	0.828060	0.146510	0.689080	0.956960
H $_{C22}$	0.525870	0.499200	0.764760	0.058010	0.679500	0.694100
H $_O$	0.251340	0.716540	0.596500	0.349380	0.880980	0.829610

**Tabela 11 - Coordenadas absolutas dos átomos na molécula Mi(1) de ácido glutâmico calculadas no formalismo GGA-PBE.**

Átomo	Cristal $\alpha$			Cristal $\beta$		
	x(Å)	y(Å)	z(Å)	x(Å)	y(Å)	z(Å)
C $_{\alpha}$	5.396700	3.595390	2.511650	2.614730	9.808810	3.670190
C	6.529780	4.509220	2.901630	3.237990	8.466370	3.835930
C $_1$	4.964260	2.724600	3.659100	2.055720	10.162280	5.021570
C $_2$	4.441610	3.521000	4.827650	1.132290	11.327930	5.041040
C $_3$	3.207800	4.252760	4.456350	1.821160	12.602030	4.785820
N	5.862930	2.741100	1.413960	1.565140	9.777270	2.665920
O $_1$	6.289960	5.764250	2.924930	2.475880	7.455270	3.861140
O $_2$	7.638030	4.000270	3.164800	4.471700	8.426970	4.037520
O $_{C3}$	2.109640	3.701110	4.311530	2.991780	12.650700	4.377780
O $_H$	3.378240	5.531770	4.256740	1.104700	13.652360	5.054050
H $_1$	5.048170	2.221840	0.995650	1.268560	10.742600	2.362660
H $_2$	6.323240	3.327430	0.663810	1.885190	9.247080	1.819110
H $_3$	6.535960	2.024850	1.782450	0.744570	9.274550	3.082690
H $_{C\alpha}$	4.567020	4.182250	2.121020	3.361510	10.531020	3.372610
H $_{C11}$	4.194130	2.028110	3.318200	2.891760	10.365510	5.677590
H $_{C12}$	5.816670	2.138280	3.991420	1.519380	9.315780	5.431570
H $_{C21}$	4.195130	2.824880	5.625950	0.693910	11.406170	6.029850
H $_{C22}$	5.196930	4.215790	5.195850	0.274750	11.247600	4.373550
H $_O$	2.483880	6.051200	4.052700	1.654770	14.582760	5.227430



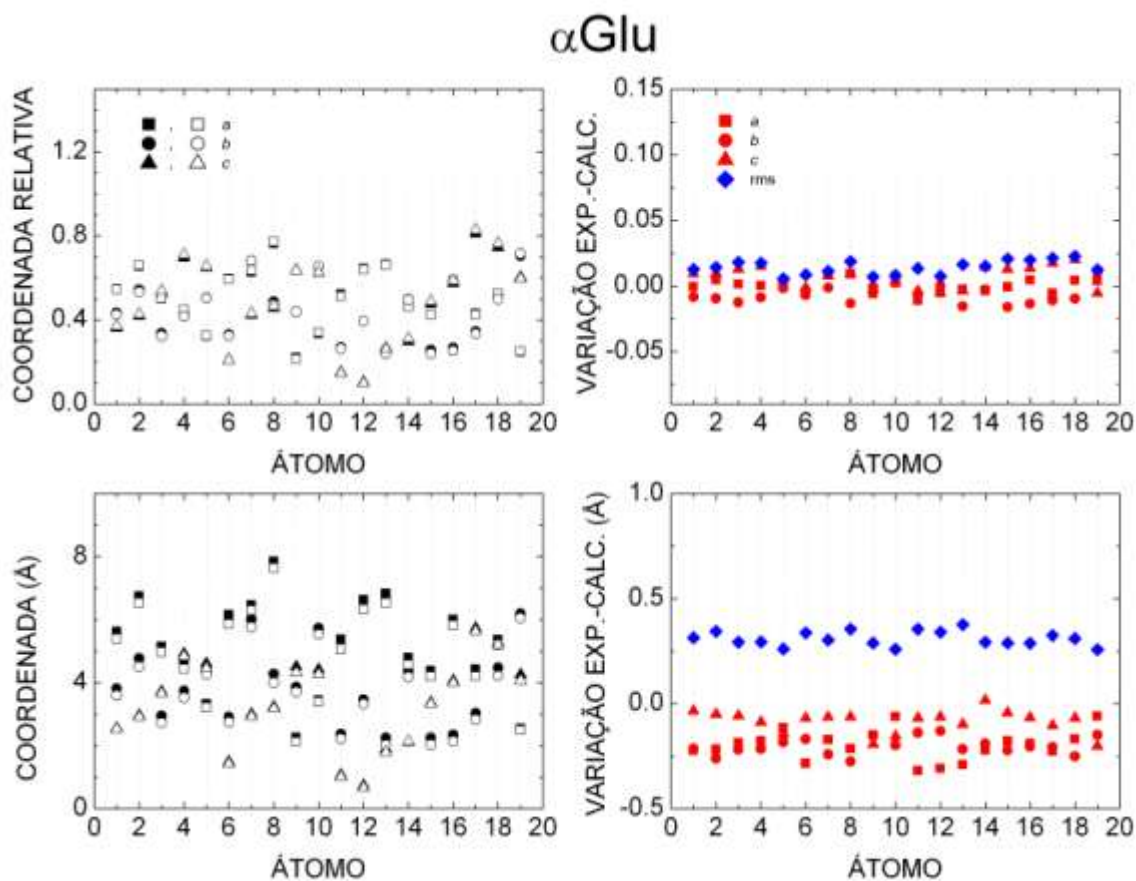
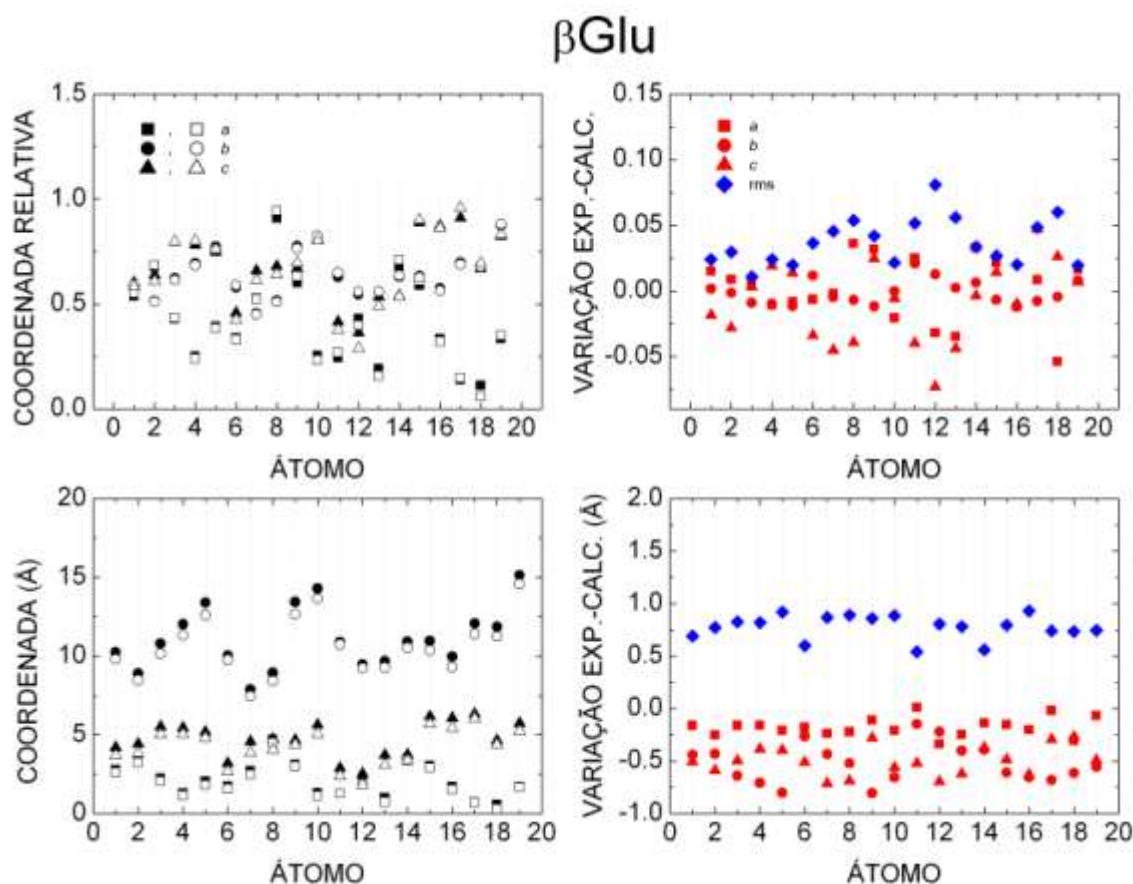


Figura 18. Comparação das coordenadas atômicas relativas e absolutas entre os resultados experimentais (quadrados, círculos e triângulos sólidos) e teóricos (GGA-PBE, quadrados, círculos e triângulos abertos) para o cristal de ácido glutâmico na fase  $\alpha$ . A variação rms é obtida a partir dos dados nas três direções: *a*, *b* e *c*.



**Figura 19. Comparação das coordenadas atômicas relativas e absolutas entre os resultados experimentais (quadrados, círculos e triângulos sólidos) e teóricos (GGA-PBE, quadrados, círculos e triângulos abertos) para o cristal de ácido glutâmico na fase  $\beta$ . A variação rms é obtida a partir dos dados nas três direções: *a*, *b* e *c*.**

Na Tabela 6 vemos um quadro comparativo das distâncias interatômicas ou comprimentos de ligação entre os valores calculados e os obtidos experimentalmente. A tendência dominante nas duas fases é pela redução nos comprimentos de ligação (7 distâncias menores que os valores experimentais em ambos os tipos de cristal, contra 4 distâncias maiores). A maior diferença para mais foi observada na fase  $\beta$ , com uma variação de mais de 17% para o comprimento  $O_H-H_O$ , e para menos com quase 7% para o comprimento  $N-C_3$ . A menor diferença também foi observada nesta fase, para a ligação  $C_\alpha-N$ . As variações observadas na fase  $\alpha$  foram menores, em comparação com a fase  $\beta$ . O comprimento  $N-C_3$  para a fase  $\alpha$  foi de 4.31 Å, quase 4% menor que o valor experimental de 4.48 Å. Também foram comparados os comprimentos e ângulos das ligações de hidrogênio, como indicado na Tabela 7. Novamente as

distâncias tendem a ser menores em confronto com os resultados experimentais, com diferenças menos pronunciadas para o cristal do tipo  $\alpha$ . Também se observou o surgimento de uma ligação de hidrogênio na fase  $\beta$  que não aparece nos dados de raio-X. De fato, como os cálculos tendem a estimar valores reduzidos para as dimensões da célula unitária e, conseqüentemente, para as distâncias interatômicas, o átomo de hidrogênio H<sub>2</sub> e o oxigênio O<sub>1</sub> aproximaram-se o suficiente para formar esta ligação. Os ângulos de ligações de hidrogênio tendem a ser maiores na fase  $\alpha$  em comparação com os dados experimentais. O cristal do tipo  $\beta$ , por sua vez, apresenta ângulos de ligação de hidrogênio consistentemente menores, com exceção da ponte H<sub>2</sub>-O<sub>1</sub>.

**Tabela 12 - Distâncias entre átomos para as duas fases do cristal de ácido glutâmico: comparação entre resultados experimentais e cálculos de primeiros princípios. Os percentuais são relativos aos dados experimentais**

Distância (Å)	Cristal $\alpha$		Cristal $\beta$	
	Experimental	GGA-PBE	Experimental	GGA-PBE
C $\alpha$ -N	1.49096	1.46701 (-1.61%)	1.45398	1.45299 (-0.07%)
C $\alpha$ -C	1.53492	1.50700 (-1.82%)	1.54950	1.48932 (-3.88%)
C-O <sub>1</sub>	1.26762	1.27795 (+0.81%)	1.27835	1.25069 (-2.16%)
C-O <sub>2</sub>	1.24240	1.24760 (+0.42%)	1.24222	1.26641 (+1.95%)
C $\alpha$ -C <sub>1</sub>	1.53005	1.50396 (-1.71%)	1.55527	1.50455 (-3.26%)
C <sub>1</sub> -C <sub>2</sub>	1.53327	1.50761 (-1.67%)	1.54282	1.48723 (-3.60%)
C <sub>2</sub> -C <sub>3</sub>	1.50615	1.48177 (-1.62%)	1.57552	1.47073 (-6.65%)
C <sub>3</sub> -O <sub>H</sub>	1.31265	1.30566 (-0.53%)	1.23091	1.29940 (+5.56%)
C <sub>3</sub> =O <sub>C3</sub>	1.21598	1.23743 (+1.76%)	1.19457	1.24064 (+3.86%)
O <sub>H</sub> -H <sub>O</sub>	1.02383	1.05420 (+2.97%)	0.93297	1.09467 (+17.33%)
N-C <sub>3</sub>	4.47500	4.31200 (-3.64%)	4.79800	4.47400 (-6.75%)

**Tabela 13- Comprimentos e ângulos das ligações de hidrogênio para as duas fases do cristal de ácido glutâmico: comparação entre resultados experimentais e cálculos de primeiros princípios. Os percentuais são relativos aos dados experimentais. O primeiro número corresponde ao comprimento em Å, enquanto o segundo número é o ângulo da ligação em graus.**

Ligação	Cristal $\alpha$		Cristal $\beta$	
	Experimental	GGA-PBE	Experimental	GGA-PBE
H <sub>1</sub> -O <sub>1</sub>	1.79365	1.68980 (-5.79%)	NA	NA
	168.828	171.199 (+1.40%)	NA	NA
H <sub>2</sub> -O <sub>2</sub>	1.74363	1.67192 (-4.11%)	1.85937	1.63851 (-11.88%)
	170.453	167.221 (-1.90%)	177.890	160.765 (-9.63%)
H <sub>3</sub> -O <sub>C3</sub>	1.92646	1.73657 (-9.86%)	NA	NA
	154.922	157.284 (+1.52%)	NA	NA
H <sub>O</sub> -O <sub>1</sub>	1.56755	1.43125 (-8.70%)	1.60566	1.34855 (-16.01%)
	169.313	172.339 (+1.79%)	177.941	172.948 (-2.81%)
H <sub>1</sub> -O <sub>C3</sub>	NA	NA	1.91483	1.63433 (-14.65%)
	NA	NA	174.277	173.082 (-0.69%)
H <sub>3</sub> -O <sub>2</sub>	NA	NA	1.93132	1.62742 (-15.74%)
	NA	NA	179.413	165.476 (-7.77%)
H <sub>2</sub> -O <sub>1</sub>	NA	NA	2.74700	2.28536 (-16.81%)
	NA	NA	86.1270	99.1215 (+15.09%)

NA: Não se Aplica.

Finalizando a análise estrutural, temos os ângulos entre as ligações covalentes e principais ângulos de torção nas moléculas de ácido glutâmico. Para os ângulos formados pelas ligações covalentes, o erro comparativo com as medidas experimentais é de no máximo 1.4% para menos no caso do cristal  $\alpha$  (ângulo C $\alpha$ -C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>) e de 7.5 % para mais no cristal beta (ângulo H<sub>C11</sub>-C<sub>1</sub>-H<sub>C12</sub>). Já a discrepância no ângulo de torção calculado para a espinha dorsal C $\alpha$ -C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> da molécula de ácido glutâmico no cristal  $\alpha$  ficou quase 6% menor do que o experimento. Para a fase  $\beta$ , a diferença neste mesmo ângulo ficou em quase -10%. A maior diferença foi observada para a fase  $\beta$ , ângulo C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>-O<sub>C3</sub>, com uma variação de quase 55% para menos, de 25 para 11.4 graus (na fase  $\alpha$  a variação foi irrisória, 0.05%).

**Tabela 14 - Ângulos entre ligações covalentes e ângulos de torção para as duas fases do cristal de ácido L-glutâmico: comparação entre resultados experimentais e cálculos de primeiros princípios. Os percentuais são relativos aos dados experimentais**

Ângulo (graus)	Cristal $\alpha$		Cristal $\beta$	
	Experimental	GGA-PBE	Experimental	GGA-PBE
O <sub>1</sub> -C-O <sub>2</sub>	125.644	124.297 (-1.07%)	126.424	124.420 (-1.59%)
C $\alpha$ -C-O <sub>2</sub>	117.520	118.367 (+0.72%)	116.667	118.037 (+1.17%)
N-C $\alpha$ -C	107.934	107.926 (-0.01%)	108.281	111.079 (+2.58%)
N-C $\alpha$ -C <sub>1</sub>	108.205	108.971 (+0.71%)	112.916	110.948 (-1.74%)
C-C $\alpha$ -C <sub>1</sub>	112.204	111.707 (-0.44%)	109.722	105.503 (-3.84%)
C $\alpha$ -C <sub>1</sub> -C <sub>2</sub>	114.280	112.655 (-1.42%)	116.714	115.251 (-1.25%)
C <sub>1</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>3</sub>	111.975	110.812 (-1.04%)	114.922	112.700 (-1.93%)
O <sub>H</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>2</sub>	114.218	114.417 (+0.17%)	107.993	113.964 (+5.53%)
O <sub>C3</sub> -C <sub>3</sub> -O <sub>H</sub>	122.507	122.321 (-0.15%)	130.235	123.810 (-4.93%)
H <sub>C11</sub> -C <sub>1</sub> -H <sub>C12</sub>	107.852	107.715 (-0.13%)	99.967	107.460 (+7.50%)
H <sub>C21</sub> -C <sub>2</sub> -H <sub>C22</sub>	108.301	108.483 (+0.17%)	105.138	104.225 (-0.87%)
N-C $\alpha$ -C <sub>1</sub> -C <sub>2</sub>	-178.187	-178.860 (+0.38%)	-50.103	-47.102 (-5.99%)
N-C $\alpha$ -C <sub>1</sub> -H <sub>C12</sub>	58.014	60.676 (+4.59%)	76.010	74.490 (-2.00%)
C-C $\alpha$ -C <sub>1</sub> -C <sub>2</sub>	59.217	61.986 (+4.68%)	-170.989	-167.488 (-2.05%)
C $\alpha$ -C <sub>1</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>3</sub>	68.303	64.266 (-5.91%)	-77.100	-69.589 (-9.74%)
C <sub>1</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>3</sub> -O <sub>C3</sub>	74.206	74.168 (-0.05%)	25.0284	11.4259 (-54.35%)

### 4.3. ANÁLISE DE POPULAÇÃO

As cargas elétricas de Mulliken (aqui apresentadas em frações da carga de um elétron) dos átomos de ácido glutâmico não apresentam uma variação significativa entre as duas fases. O carbono C $\alpha$  tende a ficar um pouco negativo (-0.17 para  $\alpha$  e -0.15 para  $\beta$ , e os carbonos C<sub>1</sub> e C<sub>2</sub> exibem carga negativa um pouco mais pronunciada. Os dois oxigênios de cada grupo carboxila tem carga negativa em torno de -0.6, enquanto o nitrogênio possui

carga praticamente invariável (-0.75 para a fase  $\alpha$  e -0.74 para a fase  $\beta$ ). Os hidrogênios ligados ao átomo de nitrogênio e o hidrogênio ligado ao oxigênio de um dos grupos carboxila são carregados mais positivamente (carga entre 0.41 e 0.46), enquanto os carbonos C e C<sub>3</sub>, ao contrário dos carbonos C <sub>$\alpha$</sub> , C<sub>1</sub> e C<sub>2</sub>, possuem carga positiva de 0.6 aproximadamente. A carga do grupo carboxila do aminoácido é de -0.61 na fase  $\alpha$  e -0.59 na fase  $\beta$ . Já a carboxila do radical possui carga igual a -0.11 (cristal  $\alpha$ ) e -0.16 (cristal  $\beta$ ). Comparando as carboxilas, vê-se que o radical do ácido está menos carregado com carga negativa. Já o grupo amina do cristal  $\alpha$  tem carga de 0.52 e o do cristal  $\beta$ , carga 0.5. O dipolo elétrico zwitteriônico, portanto, é mais intenso que aquele que se forma ao longo da linha que une o grupo amina ao grupo carboxila do radical do ácido glutâmico.

**Tabela 15 – Cargas de Mulliken dos átomos nas duas fases cristalinas do ácido glutâmico**

Átomo	Cristal $\alpha$	Cristal $\beta$
C <sub><math>\alpha</math></sub>	-0.17	-0.15
C	0.62	0.62
C <sub>1</sub>	-0.50	-0.46
C <sub>2</sub>	-0.55	-0.51
C <sub>3</sub>	0.64	0.62
N	-0.75	-0.74
O <sub>1</sub>	-0.62	-0.61
O <sub>2</sub>	-0.61	-0.60
O <sub>C3</sub>	-0.60	-0.59
O <sub>H</sub>	-0.63	-0.62
H <sub>1</sub>	0.42	0.41
H <sub>2</sub>	0.42	0.42
H <sub>3</sub>	0.43	0.41
H <sub>C<math>\alpha</math></sub>	0.29	0.27
H <sub>C11</sub>	0.28	0.27
H <sub>C12</sub>	0.29	0.26
H <sub>C21</sub>	0.30	0.29
H <sub>C22</sub>	0.28	0.27
H <sub>O</sub>	0.46	0.43

#### 4.4. ESTRUTURAS DE BANDAS – $\alpha$ Glu

A estrutura de bandas do cristal da modificação  $\alpha$  do ácido L-glutâmico aparece indicada na figura 20, juntamente com a densidade de estados eletrônica parcial. Na parte inferior, temos o detalhamento da estrutura de bandas perto do band gap principal. O cristal de  $\alpha$ -ácido glutâmico exhibe *gap* indireto entre os pontos de alta simetria  $\Gamma$  e X, igual a 4.69 eV, enquanto o *gap* direto ( $\Gamma$ - $\Gamma$ ) é de 4.78 eV. Perto do *gap* a contribuição principal para os estados eletrônicos vem de estados tipo p tanto na banda de valência como na banda de condução. O máximo da banda de valência fica no ponto  $\Gamma$ .

A figura 21 mostra as contribuições relativas para a densidade de estados dos oxigênios nos grupos carboxila e radical do aminoácido, bem como sua soma. Vê-se que a principal contribuição para estados no topo da banda de valência é oriunda desses estados O-2p, com uma contribuição mais forte do grupo carboxila no limiar do *gap* de energia. A figura 23 ilustra bem este fato, mostrando que os orbitais eletrônicos desta faixa de energia concentram-se em volta dos oxigênios. Os níveis profundos O-2s do radical possuem energias menores que os dos oxigênios do grupo carboxila. Para a banda de condução, temos uma contribuição do tipo p aproximadamente simétrica entre os grupos contendo oxigênio, somando um total que, dado o *smearing* adotado de 0.05 eV, chega a 10 elétrons por eV.

Por fim, na figura 22 temos as densidades de estados parciais para os átomos de nitrogênio, carbono e hidrogênio. O nitrogênio exhibe um nível profundo N-2s em torno de -17.5 eV e uma contribuição do tipo p bastante pequena na região do topo da banda de valência e praticamente desprezível na base da banda de condução. Já a densidade de estados para os átomos de carbono é mais rica, com níveis profundos do tipo s em -22 eV, -21 eV, -17.6 eV e um pico bem intenso em -13 eV. A contribuição para o topo da banda de valência é pequena, sendo facilmente suplantada pela contribuição dos oxigênios. Já a base da banda de condução, do tipo p, exhibe uma contribuição C-2p mais significativa que a dos oxigênios combinados. A figura 24 ilustra claramente este fato, onde vemos os orbitais eletrônicos concentrados em torno do carbono do grupo carboxila e do carbono C<sub>3</sub> do radical. Já os

hidrogênios contribuem com estados s para estados de valência entre -7 e -2 eV e estados de condução a partir de 7 eV.

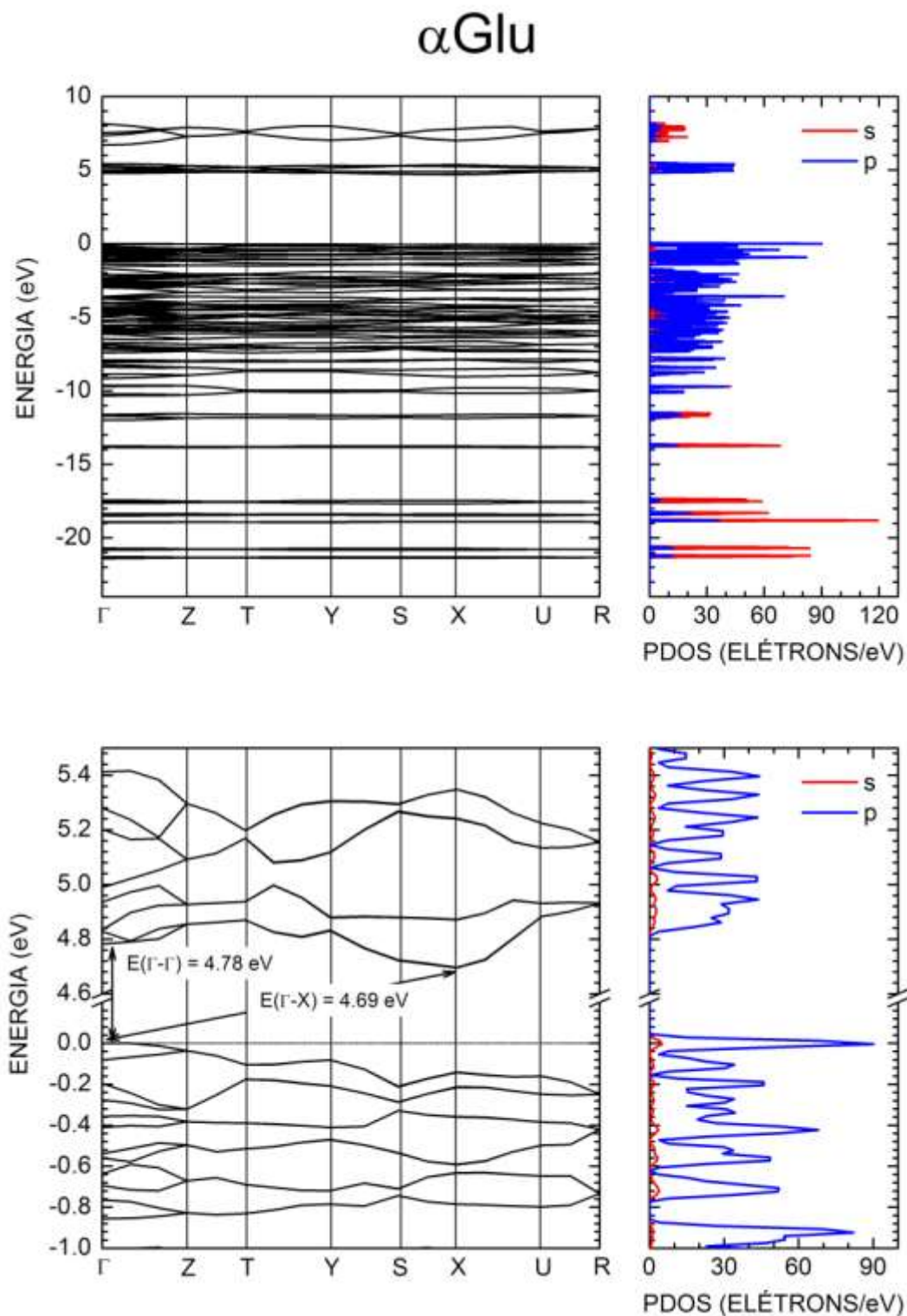


Figura 20. Estrutura de bandas e densidade de estados parcial para o cristal  $\alpha$ . Na parte inferior detalhe da estrutura nas vizinhanças do gap de energia principal. Os principais gaps são assinalados.



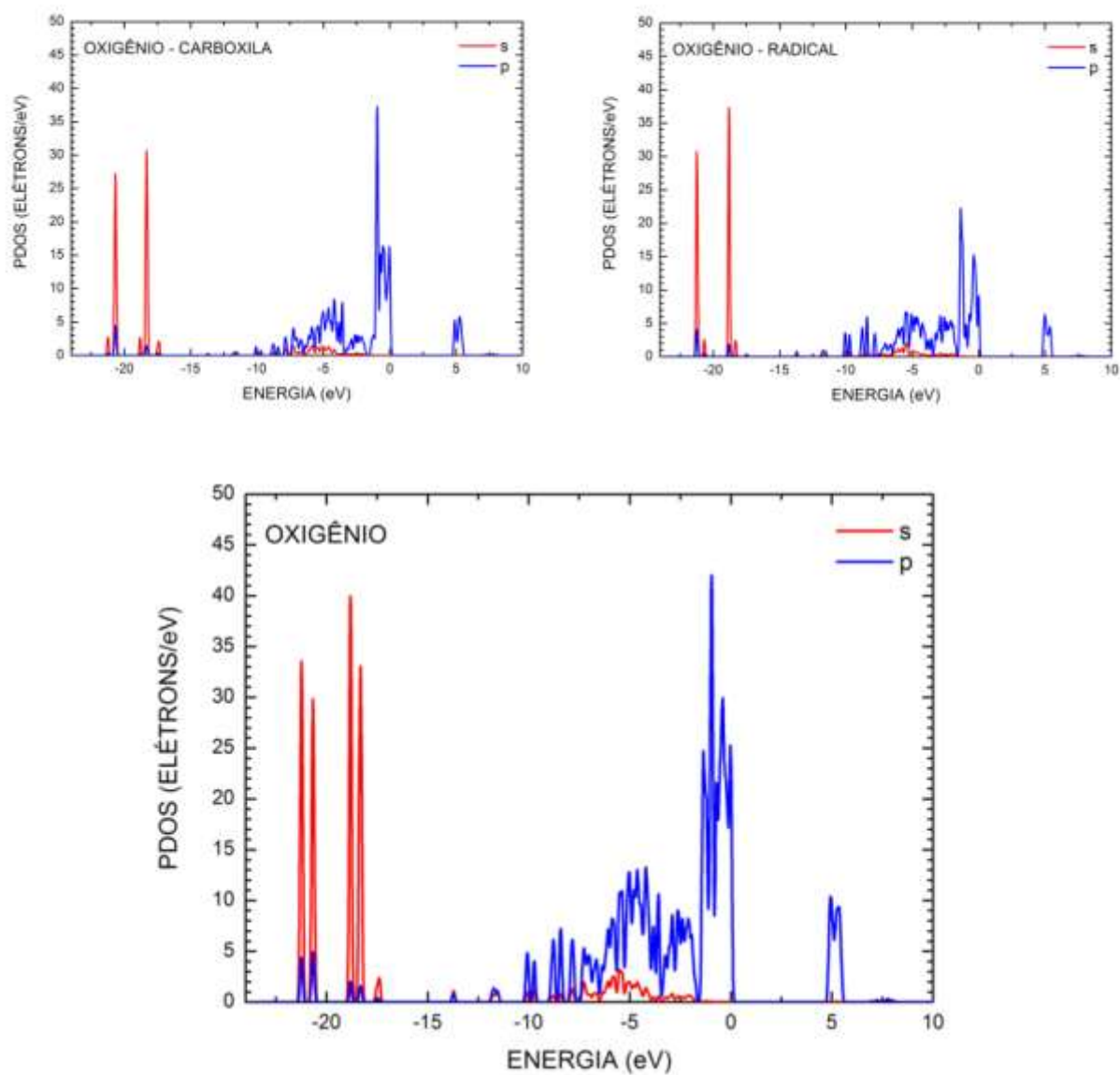
$\alpha$ Glu

Figura 21. DOS parcial para os átomos de oxigênio no cristal  $\alpha$

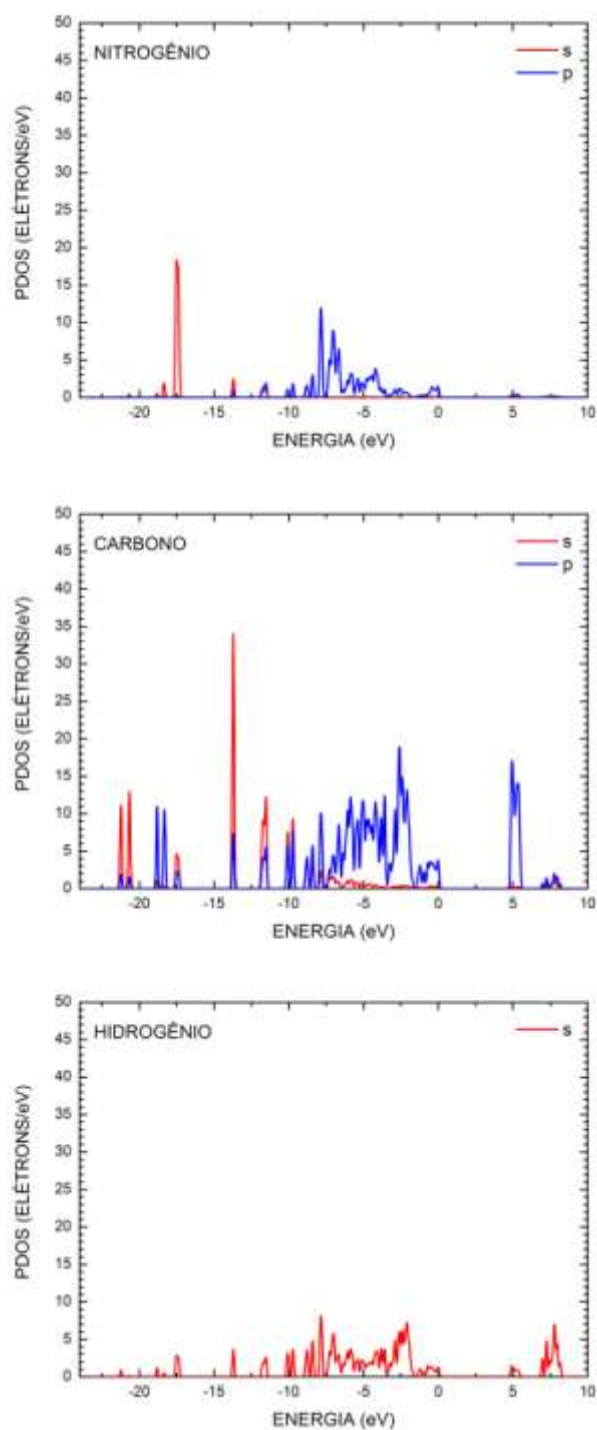
$\alpha$ Glu

Figura 22- DOS parcial para os átomos de nitrogênio, carbono e hidrogênio no cristal  $\alpha$ .

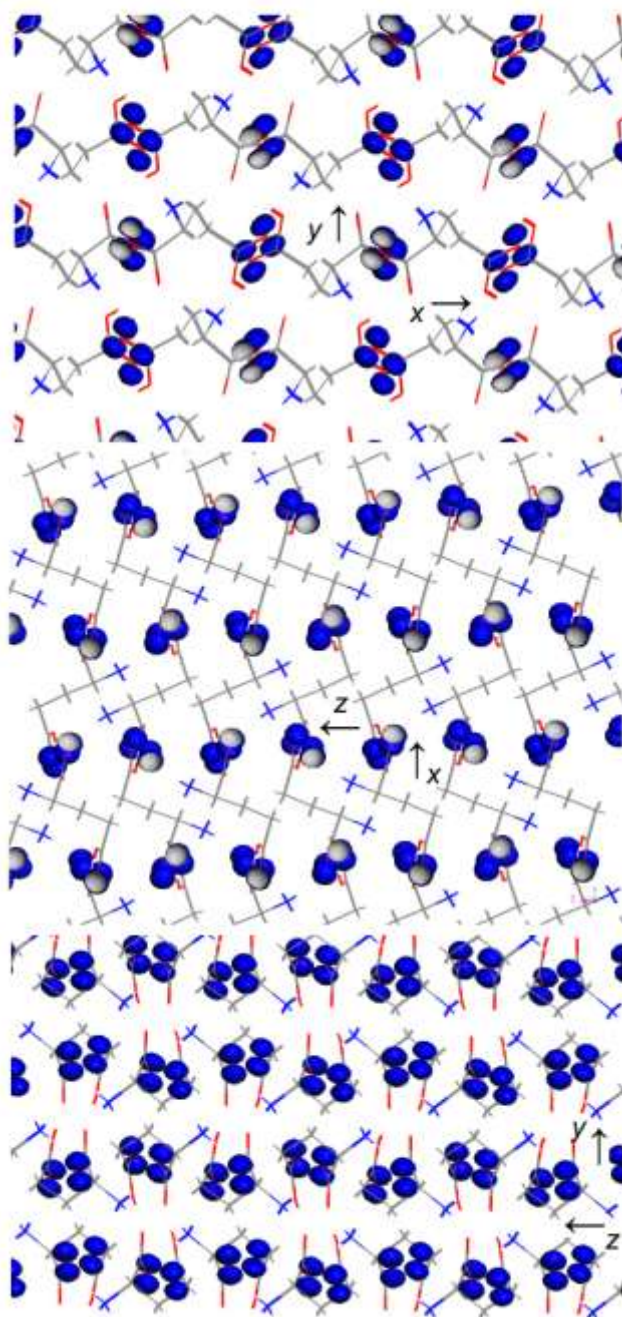
$\alpha$ Glu - Topo da Banda de Valência

Figura 23 - Vistas dos orbitais eletrônicos no topo da banda de valência para o cristal  $\alpha$ .

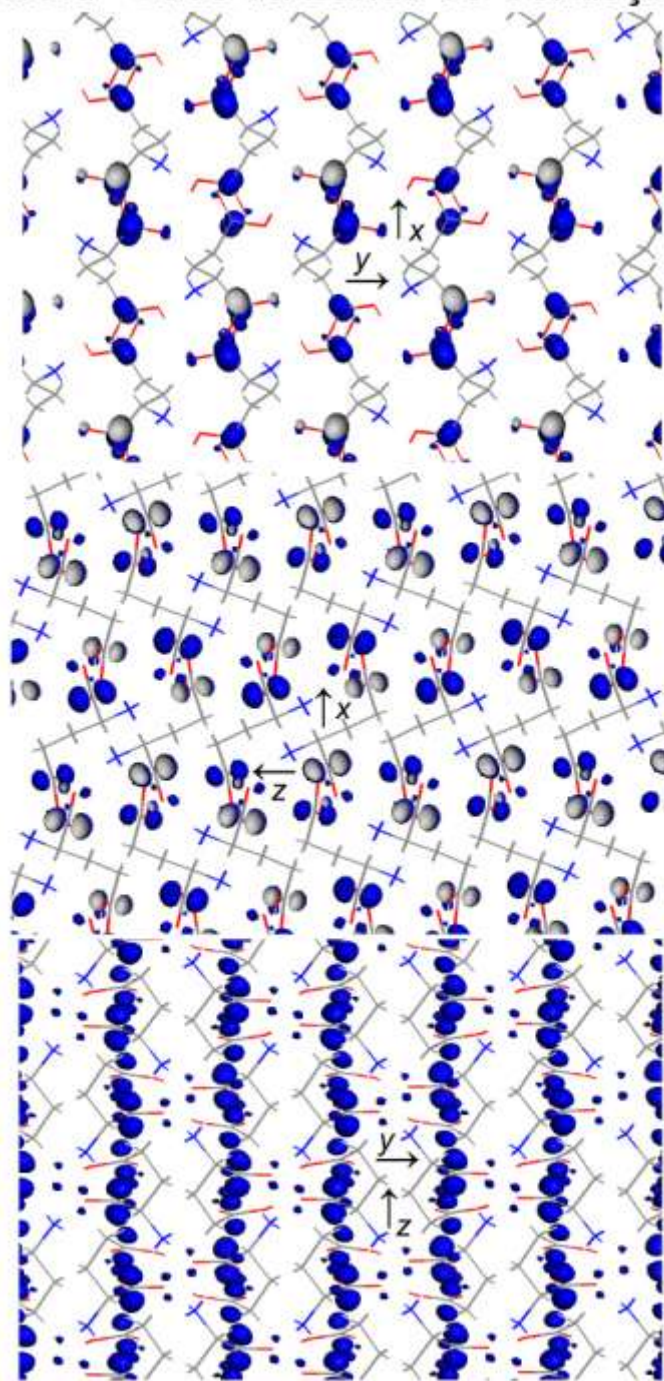
$\alpha$ Glu - Base da Banda de Condução

Figura 24 - Vistas dos orbitais eletrônicos na base da banda de condução para o cristal  $\alpha$ .

4.5. ESTRUTURAS DE BANDAS –  $\beta$ Glu

Comparando a figura 25, contendo a estrutura de bandas da modificação  $\beta$ , com a figura 20, que descreve a estrutura de bandas da modificação  $\alpha$ , vemos muitas semelhanças, o que era de se esperar, tendo em vista que os parâmetros de rede são a única diferença entre ambas as fases cristalinas. Assim, por exemplo, os gaps principais ocorrem entre os mesmos pontos de alta simetria. Para a modificação  $\beta$ , o gap entre os pontos  $\Gamma$  e X é de 4.70 eV (comparar com 4.69 eV para o cristal  $\alpha$ ), enquanto o gap direto fica bastante próximo, e é menor, 4.69 eV. Uma diferença tão pequena, de 10 meV, não permite determinar com segurança se o caráter da transição fundamental entre a banda de valência e a banda de condução é direto ou indireto. Quanto à densidade de estados, novamente, como ocorreu para o cristal na fase  $\alpha$ , a maior contribuição na região do gap de energia é do tipo p.

Analisando as contribuições de cada tipo de átomo, como feito na seção anterior, começamos pelos átomos de oxigênio. A densidade de estados parcial desses átomos aparece na figura 26. Os picos O-2s profundos são praticamente os mesmos que aparecem no cristal do tipo  $\alpha$ , variando apenas na intensidade. Novamente o topo da banda de valência é fortemente dominado por estados O-2p, o que aparece claramente na Figura 16, com os orbitais eletrônicos nesta faixa de energia. Já a base da banda de condução exibe contribuição O-2p perto de 5 eV, mas bem menos significativa que a contribuição dos carbonos C-2p, como veremos a seguir.

O nitrogênio pouco contribui para os estados de valência e praticamente não afeta os estados de condução (ver topo da figura 27). Aqui, também, outra semelhança com o cristal do tipo  $\alpha$ . Os átomos de carbono, por sua vez, exibem um pico de caráter p na densidade de estados perto de 5 eV que é um pouco mais alto que o registrado na fase  $\alpha$  (21 elétrons/eV contra 17 elétrons/eV) e mais relevante que o pico de 13 elétrons/eV na densidade de estados parcial dos oxigênios. Os orbitais eletrônicos na base da banda de condução concentram-se mais fortemente em torno dos átomos de carbono C<sub>3</sub>, como revela a figura 29, distinguindo-se da situação observada no cristal  $\alpha$ , onde a contribuição dos carbonos C e C<sub>3</sub> para os orbitais é similar. Pequenas contribuições C-2p aparecem no topo da banda de condução, mas mais

significativas entre -7 e -2 eV. Finalmente, os hidrogênios exibem um pequeno pico de densidade de estados do tipo s em torno de 5 eV.

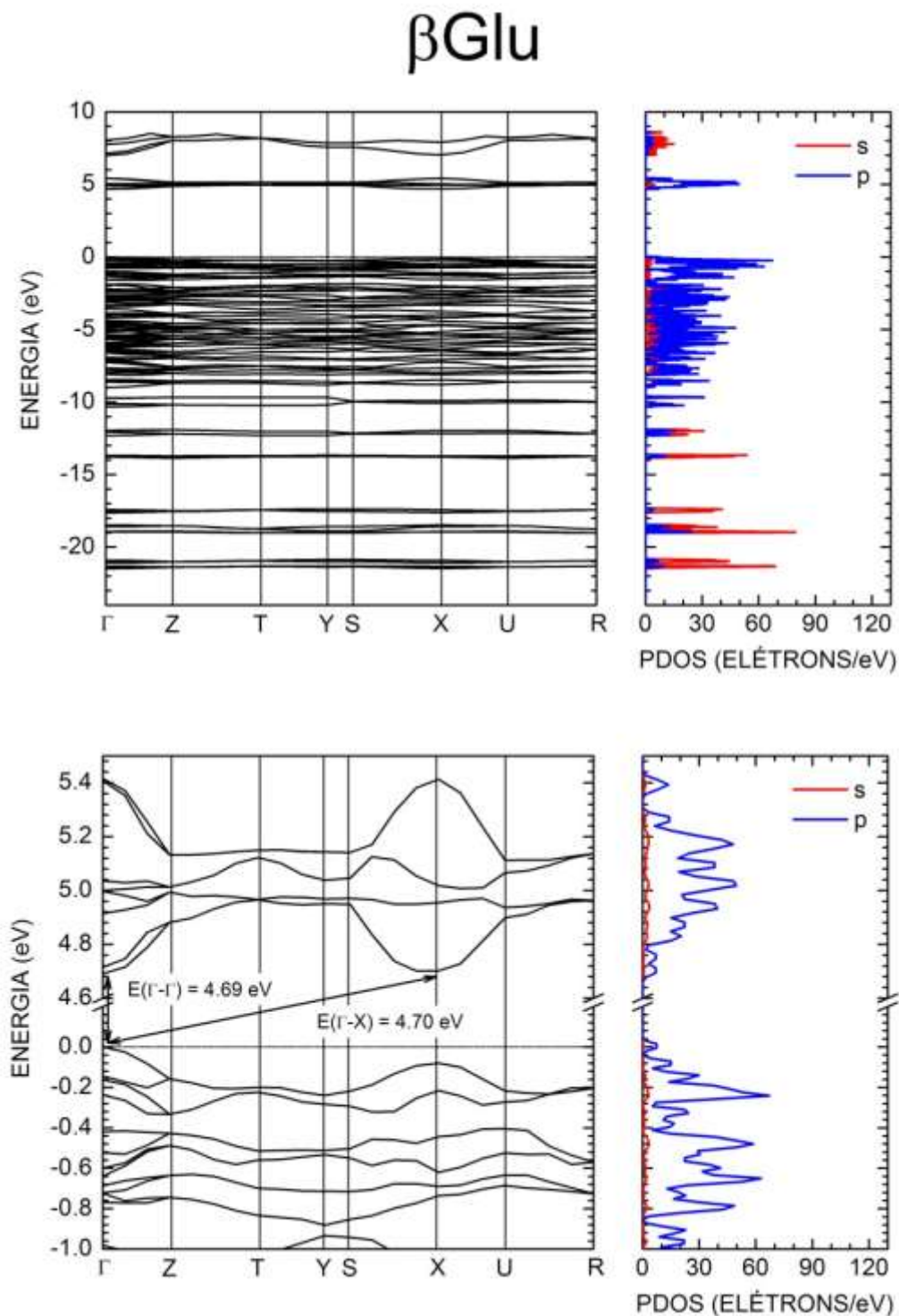


Figura 25 - Estrutura de bandas e densidade de estados parcial para o cristal  $\beta$ . Na parte inferior detalhe da estrutura nas vizinhanças do gap de energia principal. Os principais gaps são assinalados

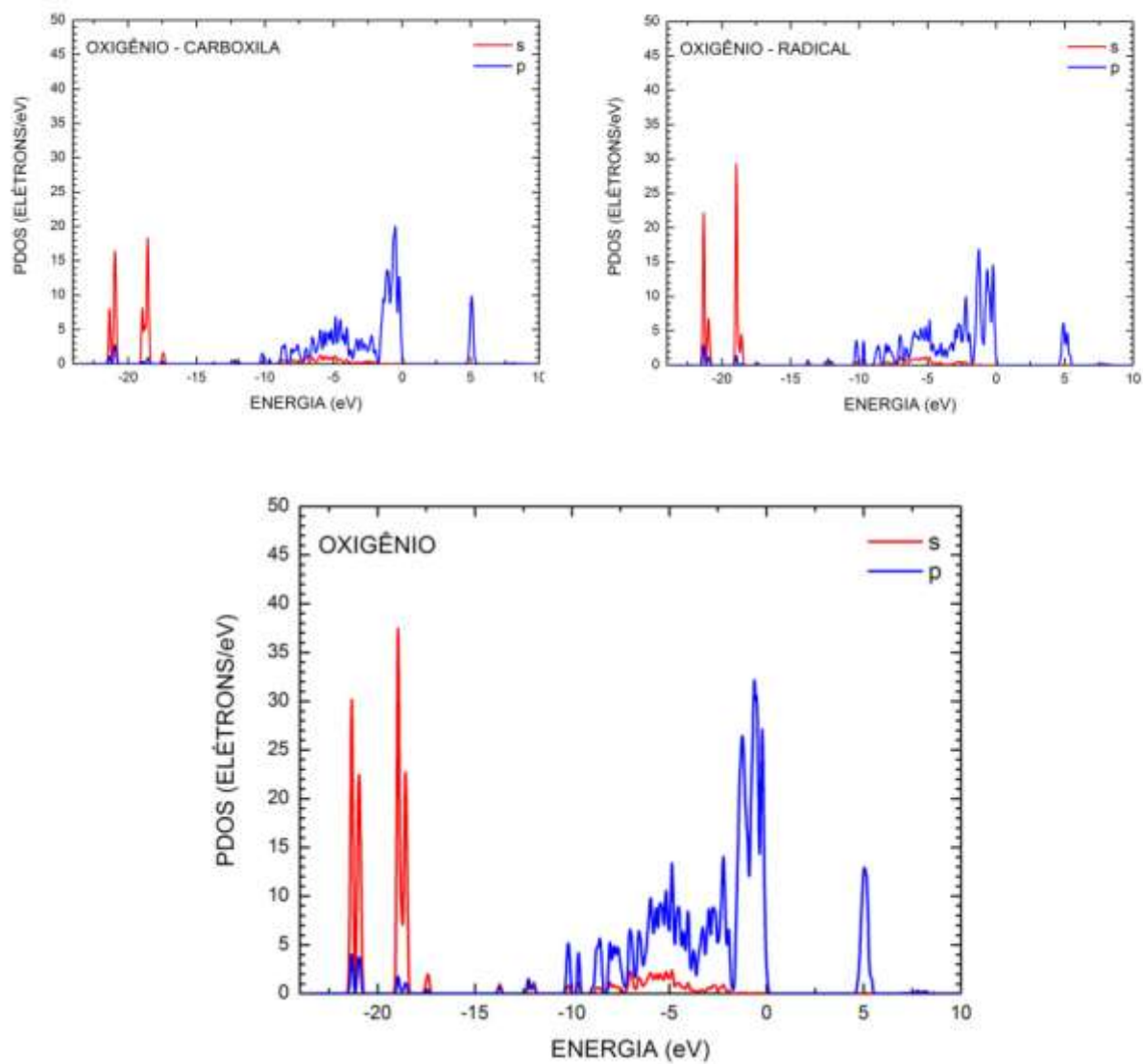
$\beta$ Glu

Figura 26 - DOS parcial para os átomos de oxigênio no cristal  $\beta$ .

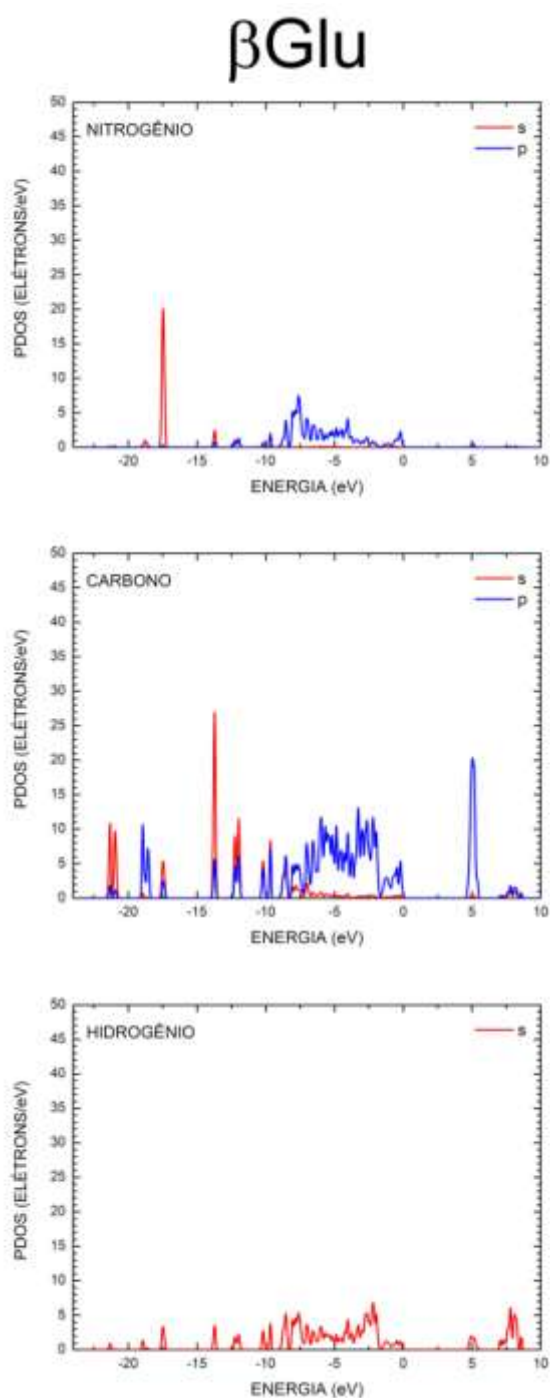


Figura 27- DOS parcial para os átomos de nitrogênio, carbono e hidrogênio no cristal  $\beta$ .



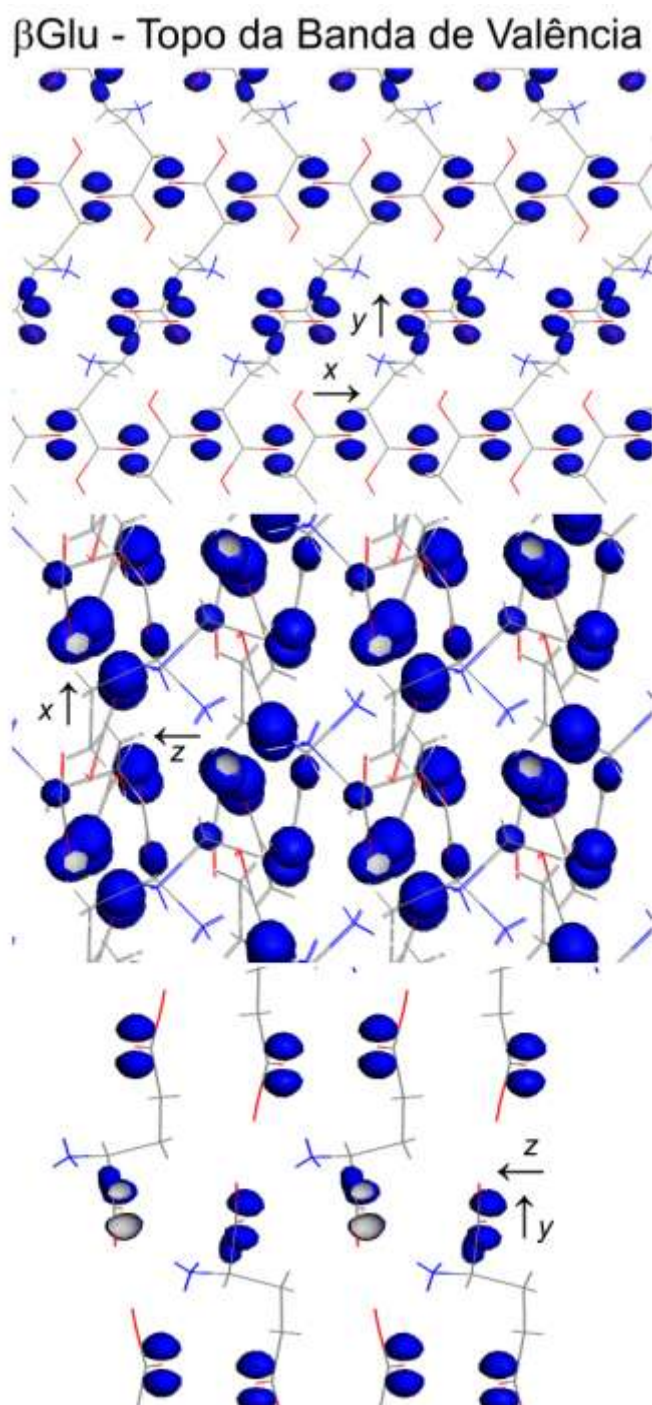


Figura 28 - Vistas dos orbitais eletrônicos no topo da banda de valência para o cristal  $\beta$ .

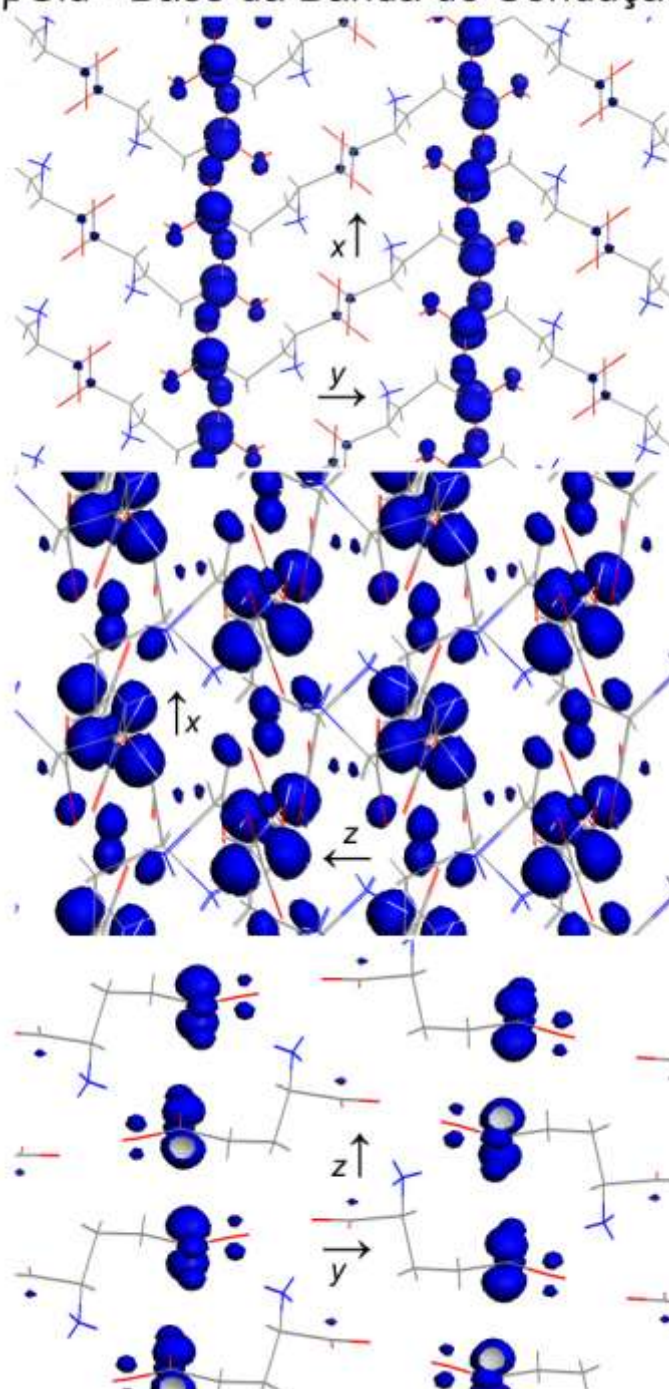
$\beta$ Glu - Base da Banda de Condução

Figura 29 - Vistas dos orbitais eletrônicos na base da banda de condução para o cristal  $\beta$ .

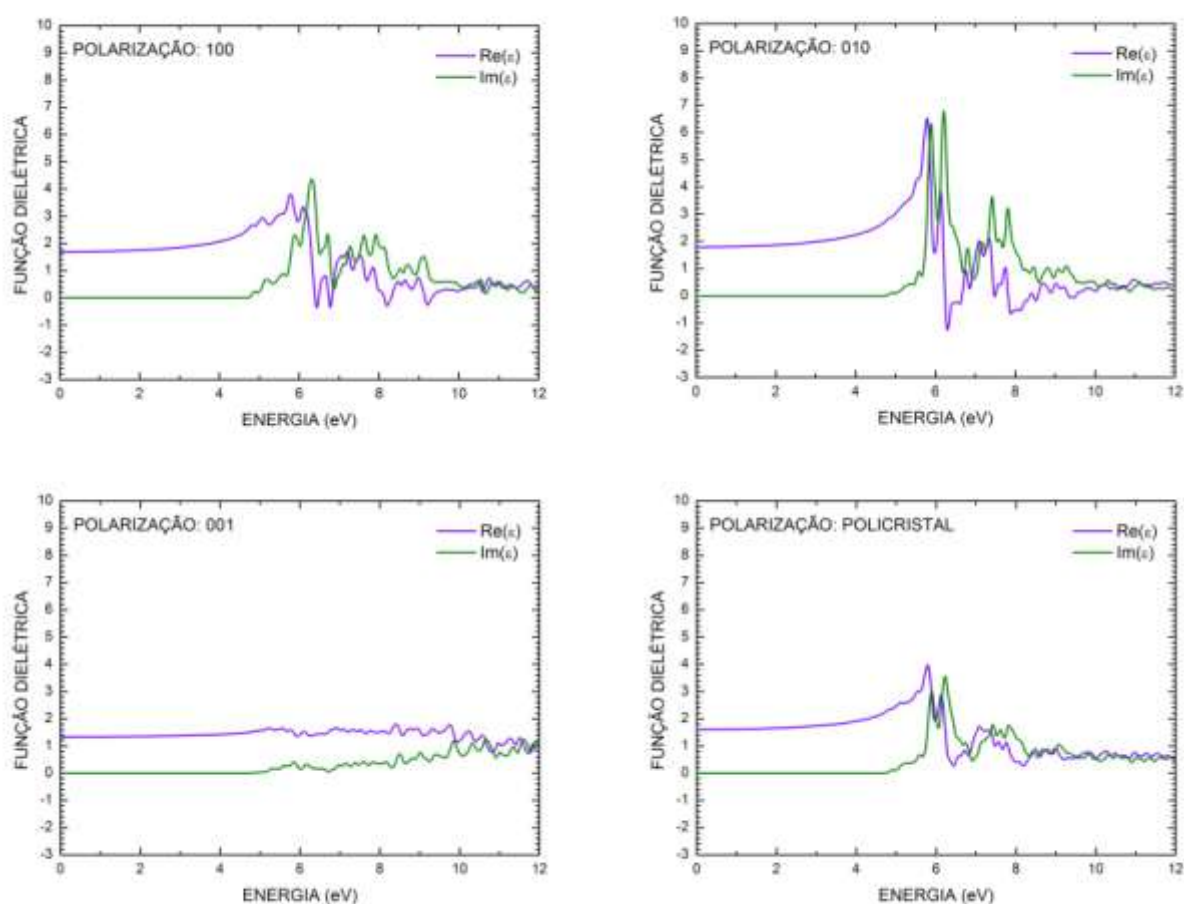
#### 4.6. PROPRIEDADES ÓPTICAS

A função dielétrica de um material fornece uma descrição do modo como a radiação eletromagnética nele se propaga. Para cada frequência ou energia da radiação, a função dielétrica devolve um número complexo, cuja parte real relaciona-se com a refração que a luz sofre ao passar do vácuo para o material considerado, enquanto a parte imaginária especifica a absorção óptica. A radiação incidente pode ser polarizada ou não, e a amostra de material pode ser um cristal simples ou policristalina. Os resultados aqui apresentados para as duas estruturas do cristal de ácido glutâmico foram obtidos considerando que a radiação incidente é polarizada ao longo de cada eixo da célula unitária (100, 010 e 001) atingindo uma amostra de cristal simples. Também foi levado em conta o caso de um feixe radiação não-polarizada incidindo sobre uma amostra policristalina. As figuras 30 e 31 apresentam a função dielétrica para os cristais  $\alpha$  e  $\beta$  do ácido glutâmico. Para ambas as fases, observa-se claramente que a função dielétrica é sensível à polarização da radiação incidente. Um elemento comum aos dois tipos de cristal são as pequenas amplitudes de variação da função dielétrica ao longo da direção 001, indicando que ao longo desta direção as forças de oscilador são pequenas. Deveras, pode-se notar que ao longo da direção z do cristal, tanto na modificação  $\alpha$  como na modificação  $\beta$ , o grupo carboxila do radical (negativo) fica a meio caminho na linha que conecta o grupo carboxila que se liga ao carbono  $\alpha$  (pólo mais negativo da molécula, vide análise de população) e o grupo amino (pólo positivo), o que deve reduzir sensivelmente o momento de dipolo elétrico e, portanto, a interação da radiação eletromagnética que vibra ao longo desta direção e os elétrons em cada molécula.

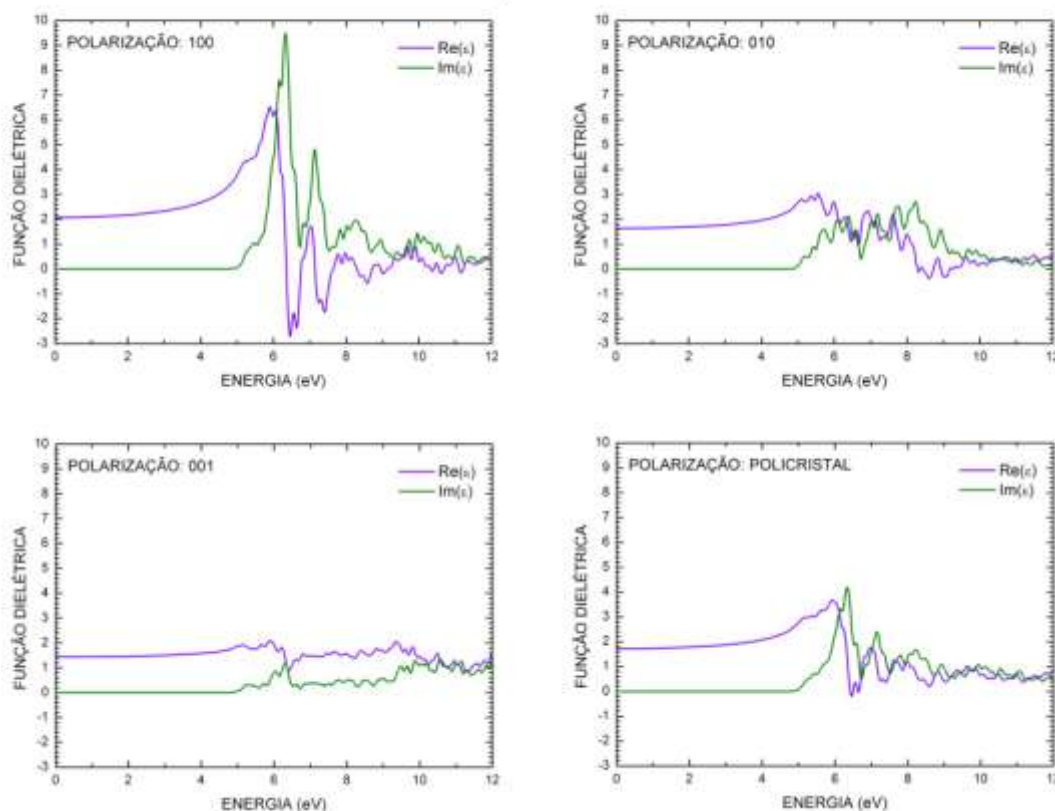
No cristal  $\alpha$ , a função dielétrica apresenta maiores amplitudes ao longo da direção 010. Olhando para a figura 23 e a figura 24, vê-se que as transições perto do *gap* principal de energia envolvem transferência de carga entre os oxigênios e os carbonos C e C<sub>3</sub>, que acham-se justamente alinhados ao longo do eixo y do cristal. Por outro lado, no cristal  $\beta$ , temos picos das partes real e imaginária com magnitude maior para a direção 100. As figuras 28 e 29

revelam um nítido alinhamento de orbitais eletrônicos ao longo do eixo x que deve reforçar significativamente a absorção nesta direção. O valor calculado da constante dielétrica estática (parte real) para a fase  $\alpha$  é de 1.6 e para a fase  $\beta$ , 1.73, no caso de uma amostra policristalina. O máximo da parte real ocorre para uma energia 5.7 eV no cristal  $\alpha$  ( $\text{Re}(\epsilon) = 3.9$ ) e 5.6 eV para a fase  $\beta$  ( $\text{Re}(\epsilon) = 3.6$ ), o que recai no extremo ultravioleta do espectro eletromagnético.

### $\alpha$ Glu



**Figura 30 - Função dielétrica (partes real e imaginária) para diferentes polarizações da radiação incidente e uma amostra policristalina de  $\alpha$ -ácido glutâmico**

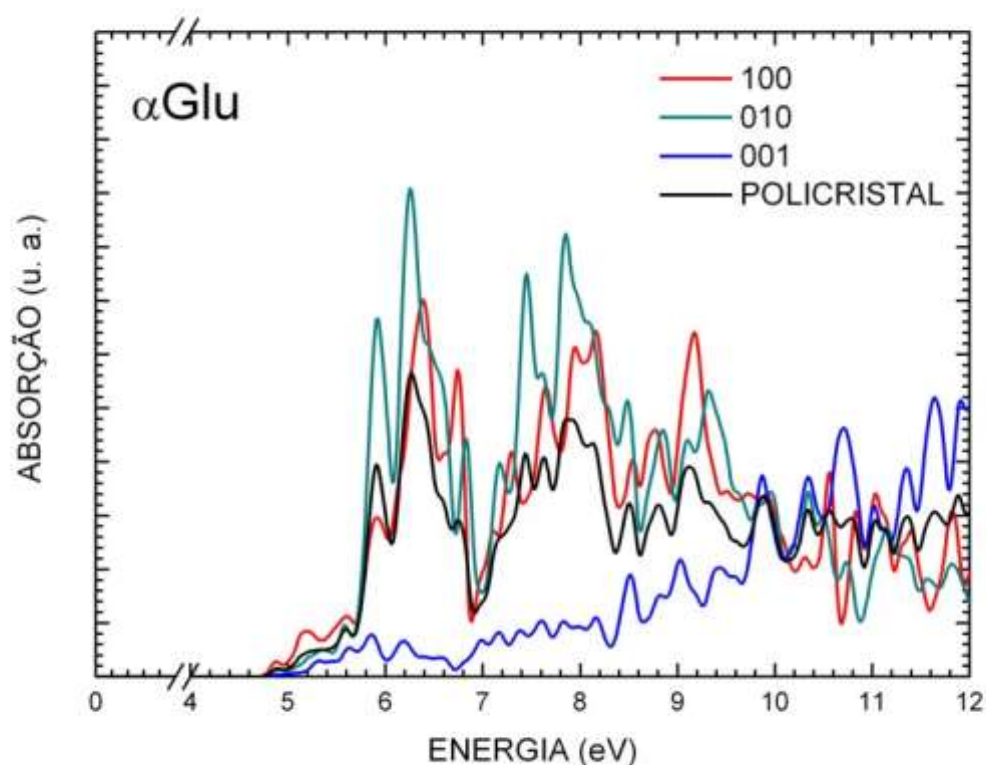
$\beta$ Glu

**Figura 31 - Função dielétrica (partes real e imaginária) para diferentes polarizações da radiação incidente e uma amostra policristalina de  $\beta$ -ácido L-glutâmico.**

Por último, temos nas figuras 32 e 33 as absorções teóricas dos dois tipos de cristal de ácido glutâmico. A intensidade dos picos de absorção é, como comentamos anteriormente, bastante distinta ao longo das diversas direções de polarização incidente, sendo maior nas direções 010 e 100 para os cristais alfa e beta, respectivamente (a razão para tal discrepância direcional foi explicada na discussão da função dielétrica). Para o cristal alfa, amostra policristalina, ocorrem picos para energias de 4.9 eV, 5.3 eV, 5.6 eV, 5.83 eV, 6.33 eV e 6.6 eV. Os quatro primeiros picos, menos intensos, envolvem transições entre estados O-2p na banda de valência e estados de condução com uma pequena contribuição dos orbitais s dos hidrogênios. Tendo em vista a baixa densidade de estados desses orbitais, não é de estranhar que estes picos sejam bem menores que aqueles que aparecem para energias superiores

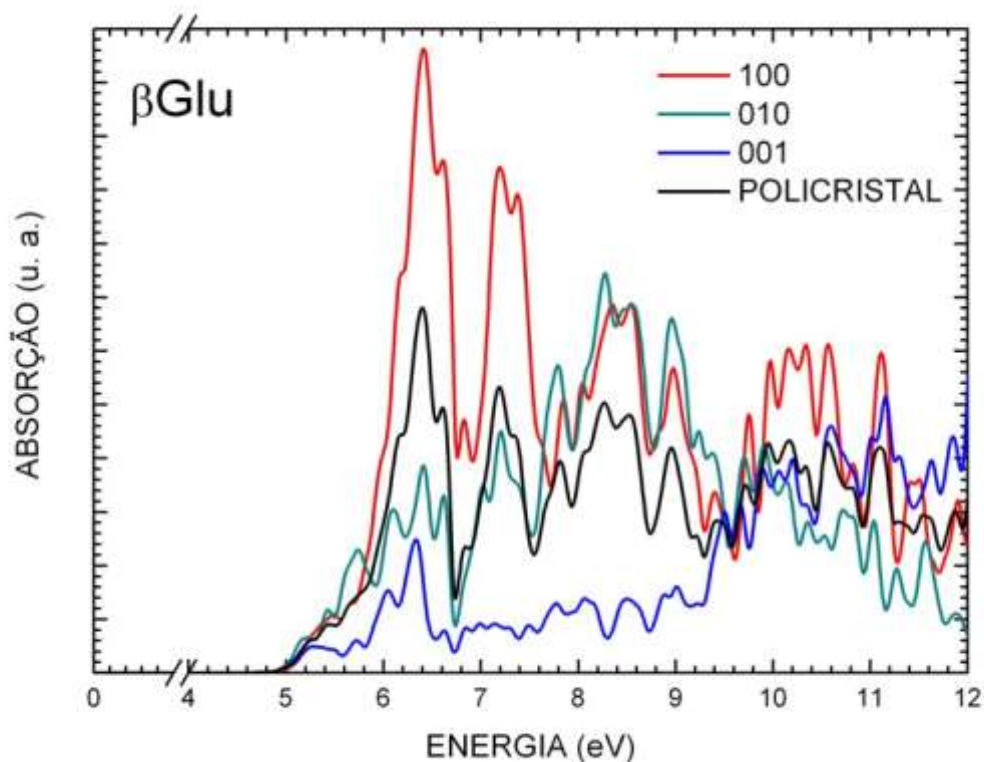
a 6 eV. Olhando para a estrutura de bandas da figura 20, percebe-se que, para energias acima de 6 eV os estados 1s dos átomos de hidrogênio fornecem uma contribuição para a densidade de estados que é mais importante que a contribuição p, o que contribui para aumentar a intensidade da absorção. Vale lembrar que existe uma regra de seleção de primeira ordem para transições ópticas afirmando serem permitidas apenas transições entre estados eletrônicos cujo momento angular varie de mais ou menos uma unidade, ou seja, transições de p para p são proibidas (em primeira ordem), enquanto transições de p para s ou de s para p são permitidas.

Já os picos de absorção da amostra policristalina na fase beta nas proximidades do *gap* de energia ocorrem em 5.23 eV, 5.42 eV, 5.71 eV, 6.2 eV, 6.4 eV (mais intenso) e 6.6 eV. A mesma explicação envolvendo níveis O-2p e H-1s pode ser dada para as intensidades calculadas.



**Figura 32 - Absorção para diferentes polarizações da radiação incidente e uma amostra policristalina de  $\alpha$ -ácido L-glutâmico.**

..



**Figura 33 - Absorção para diferentes polarizações da radiação incidente e uma amostra policristalina de  $\beta$ -ácido L-glutâmico**

## FLUORESCÊNCIA

O espectro de fluorescência (figura 34) apresenta duas emissões nos comprimentos de onda 394 e 425 nm, para as excitações de 247 (5,02 eV), 252 (4,92 eV), 262 (4,73 eV) e 272 nm (4,55 eV). As duas primeiras correspondem a excitações acima dos gap's teóricos (4,69 e 4,78 eV), enquanto as últimas, correspondem respectivamente a regiões entre e abaixo dos gap's teóricos. Na melhor das hipóteses, os gap's teóricos são no mínimo 20% abaixo dos experimentais, que neste caso, estariam em torno de 5,62 e 5,74 eV. Como a maior energia de excitação (5,02 eV) está abaixo dos possíveis gap's experimentais (considerando um erro mínimo de 20%) então, possivelmente, os espectros de fluorescência observados estão associados a fenômenos de luminescência molecular, representando assim, a "assinatura" molecular da

molécula de ácido L-glutâmico. Esta conclusão é corroborada pelas medidas de fluorescência em solução (estado molecular) na mesma faixa de excitação, conforme figura 35.

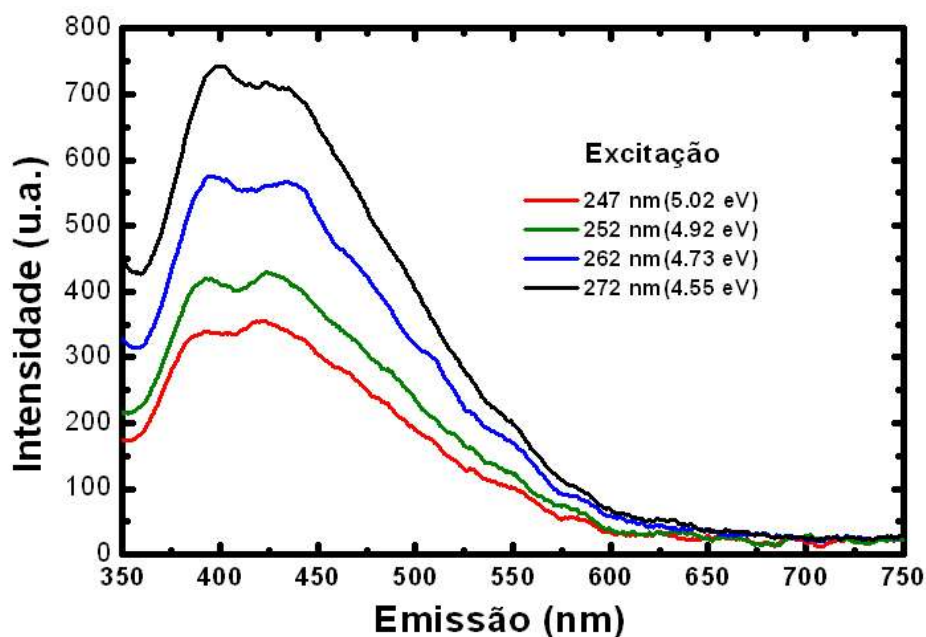


Figura 34 - Espectro de emissão de fluorescência do cristal do polimorfo alfa

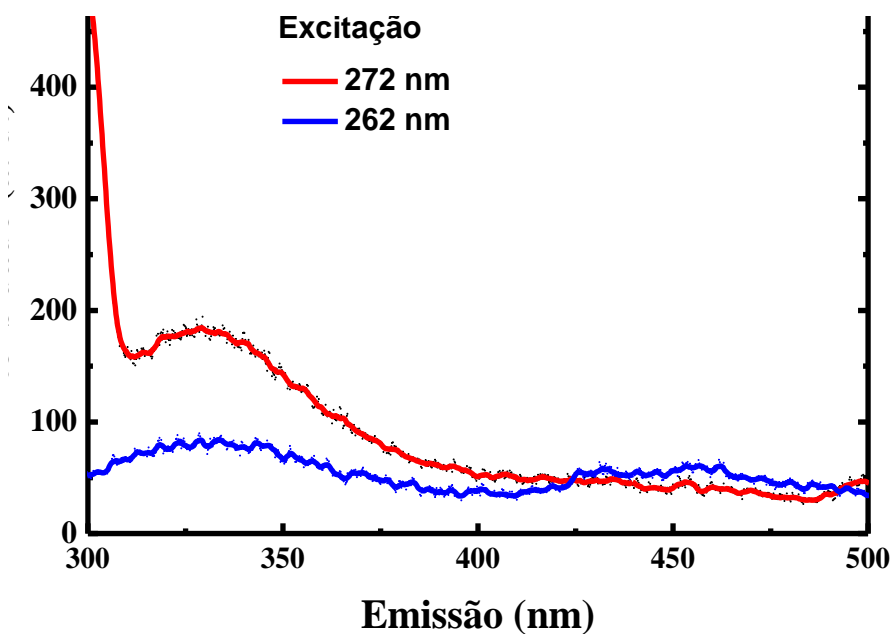


Figura 35 - Espectro de emissão de fluorescência da solução de ácido L-glutâmico para as excitações de 262 e 272 nm.



## ABSORÇÃO

A figura 36 mostra o espectro de absorção medido no cristal do ácido L-Glutâmico modificação  $\alpha$ . O comprimento de onda de maior absorção (99,19%) foi de 240 nm. Também aparece indicado no gráfico a região de excitação utilizada nas medidas de fluorescência (247 – 272 nm). A absorção em 240 nm deve-se a uma transição  $\pi$ - $\pi^*$ , do grupamento carboxila.

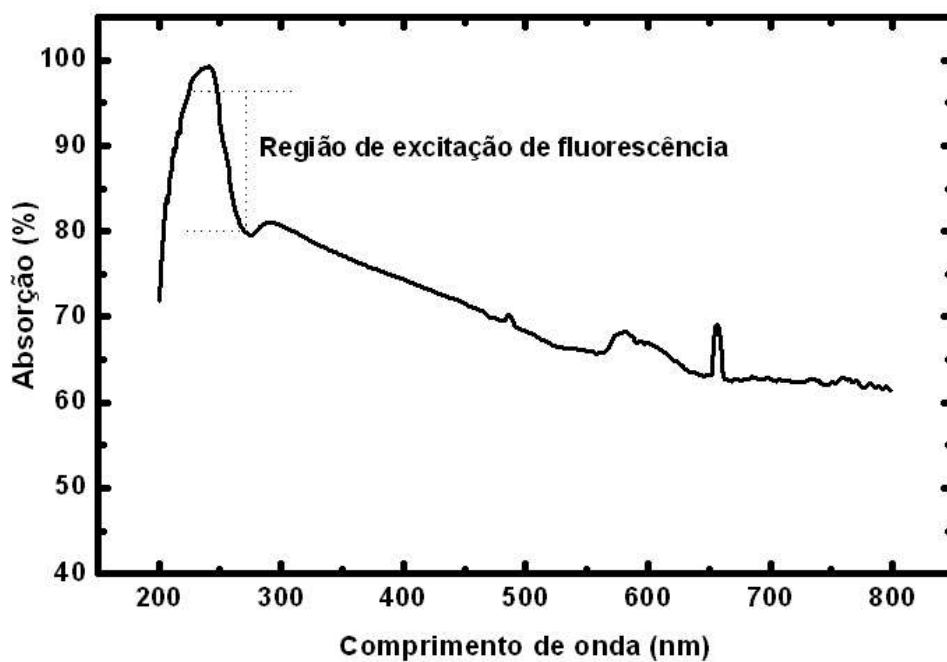


Figura 36- Espectro de absorção do cristal do polimorfo  $\alpha$

## 5. CONCLUSÃO

Nesta tese, foi realizada a cristalização do ácido L-glutâmico favorecendo a obtenção da fase  $\alpha$  (metainstável) em relação ao polimorfo  $\beta$ . Também foram realizadas a simulação *ab-initio* e as medidas óticas de transmissão e fluorescência (no cristal e em solução). Os resultados dos cálculos *ab-initio* mostram que os parâmetros de rede estão de acordo com os resultados experimentais, embora na forma  $\alpha$  é previsto ter um gap indireto entre os pontos de alta simetria  $\Gamma$  e X, igual a 4.69 eV, para a forma  $\beta$  não pode-se tirar uma conclusão sobre o *gap* direto ( $\Gamma$ - $\Gamma$ ), devido a imprecisão do cálculo. A função dielétrica de ambos os polimorfos são muito semelhantes no caso de uma amostra policristalina, mas difere fortemente no caso da polarização da luz das faces do cristal 100 e 010. Os resultados das medidas óticas indicaram o comprimento de onda de maior absorção (99,19%) igual a 240 nm, originada de uma transição  $\pi$ - $\pi^*$ , do grupamento carboxila. Já as medidas de fluorescência resultaram em uma assinatura molecular do ácido L-glutâmico, com máximos de emissão nos comprimentos de onda 394 e 425 nm.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKLAND, G. J. Embrittlement and the Bistable Crystal Structure of Zirconium Hydride. **Physical Reviews Letters**, v. 80, p. 2233–2236, 1998.

BECKE, A. D. **J. Chem. Phys.** v 104, p1040, 1996.

BECKE, A. D. **J. Chem. Phys.** v 109, p2092, 1998.

BECKE, A. D. **J. Chem. Phys.** v 98, p 5648 ,1993.

BECKE, A. D., **Phys. Rev. A** v 38, p 3098, 1988.

BECKE, A. D.; REIMANN, R.; FRISCHAT, G. H.; MA, H. L.; BLANCHETIÈRE, C.; ZHANG, X. H. AND LUCAS, J. Mechanical properties of several TeXAs glasses **Journal of Non-Crystalline Solids**, v 161, p 313-315 ;1993

BERNAL, J. D. Z. Crystal structure of the natural aminoacids and related compounds. **Krystallography**, v. 78, p. 363, 1931.

BERNSTEIN, J. Polymorphism of L-Glutamic Acid: Decoding the alpha-beta Phase Relationship *via* Graph-Set Analysis. **Acta Crystallographica B**, v. 47, p. 1004-1010, 1991.

BERRY, M. B: Protein Crystallization: Theory and Practice. W. M. **Keck Center for Computational Biology** ,1997.

BHAT, M. N.; DHARMAPRAKASH, S. M. Growth of nonlinear optical  $\alpha$ -glycine crystals. **Journal of Crystal Growth**, v. 236, p. 376-380, 2002.

BLUNDELL, T. L.; JHOTI, H.; ABELL, C. High-throughput crystallography for lead discovery in drug design. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.1, p. 45 – 54, 2002.

BURKE, V.M. new method for calculating angular integrals in electron—atom scattering . **Computer Physics Communications**, v 114, p 210-224, 1998

CASHELL, C.; CORCORAN, D.; HODNETT, B.K. Control of polymorphism and crystal size of L-glutamic acid in the absence of additives. **Journal of Crystal Growth**, v. 273, p. 258-265, 2004.

CEPERLEY, D. M. AND ALDER B. J. The calculation of the properties of metallic hydrogen using Monte Carlo • *Physica B+C*, v 108, p 875-876 ,1981

CHUN, L. and CUI M. How to solve the equation  $AuBu+Cu=f$  • **Applied Mathematics and Computation**, v. 133, p 643-653, 2002.

CIUNIK, Z.; GLOWIAK, T. DL-Glutamine Acid Monohydrate  $C_5H_9NO_4 \cdot H_2O$ . **Acta Crystalligraphica C**, v. 39, p. 1271-1273, 1983.

CULLITY, B. D.. *Elements of X-Ray Diffraction*. 3rd. Massachusetts: Addison-Wesley, 1998.

DUCRUIX, A. F.; GUILLOTEAU ,J.; RIE`S-KAUTT M .Variation of lysozyme solubility as a function of temperature in the presence of organic and inorganic salts • **Journal of Crystal Growth**, v 122, Pages 223-230, 1992

FATEMI, S. H.; STARY, J.M., EARLE, J.A. et al. GABAergic dysfunction in schizophrenia and mood disorders reflected by decreased levels of glutamic acid decarboxylase 65 and 67 kDa and Reelin proteins in cerebellum. **Schizophrenia Research**, v. 11072, p. 109-122, 2005.

FUJIHIRA, E.; KIMURA, T.; YAMAGUCHI, A. Roles of acidic residues in the hydrophilic loop regions of metal-tetracycline/H<sup>+</sup> antiporter Tet(K) of *Staphylococcus aureus*. **FEBS Letters**, v. 419, p. 211-214, 1997.

GARTI, N.; ZOUR, H. The effect of surfactants on the crystallization and polymorphic transformation of glutamic acid. **Journal of Crystal Growth**, v. 172, p. 486-498, 1997.

GINDE R. M. AND MYERSON, A. S. Effect of impurities on cluster growth and nucleation. **Journal of Crystal Growth**, v 126, Pages 216-222, 1993.

GIVAND, J. C.; ROUSSEAU, R. W. ; LUDOVICE ,P. J. Characterization of L - isoleucine crystal morphology from molecular modeling • **Journal of Crystal Growth**, v 194, p 228-238 , 1998.

GU, Z., EBISAWA,K. ; MCDERMOTT ,A. Hydrogen bonding effects on amine rotation rates in crystalline amino acids **Solid State Nuclear Magnetic Resonance**, v 7, p 161-172 , 1996.

HARDIN, C.; POGORELOV, T. V.; LUTHEY-SCHULTEN, Z. *Ab initio* protein structure prediction. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 12, p. 176-181, 2002.

HIROKAWA, S. (1955). **Acta Cryst.** 8, 637-641.

HOHENBERG, P.; KOHN, W. Inhomogeneous Electron Gas. **Physical Reviews**, v. 136, p. B864, 1964.

HUBER, L. A. Is proteomics heading in the wrong direction? **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 4, p. 74-80, 2003.

KIMURA ,Y. and KATODA, K.Effects of strain on crystallization of amorphous silicon characterized by laser Raman spectroscopy **Applied Surface Science**, v 117-118, Pages 790-793, 1997 .

KIROKAWA, S. **Acta Crystallographica**, v. 637, 1955.

KITAMURA, M.; ISHIZU, T. Growth kinetics and morphological change of polymorphs of L-glutamic acid. **Journal of Crystal Growth** v. 209, p. 138-145, 2000.

KITTEL, G. ; KÖHLER, G.; GETOFF, N. Determination of triplet quantum yields by sensitized ketonization of ethyl acetoacetate .**Journal of Photochemistry**, v 9, p 257-259 , 1978.

KOHN, W.; SHAM, L. J. Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. **Physical Reviews**, v. 140, p. A1133, 1965.

KUMAR, S.; TRIPATHI, S.K.; SINGH, H. B.; WOLMERSHÄUSER, G. Synthesis, reactivity, electrochemical and crystallographic studies of diferrocenoyl diselenide and ferrocenoyl selenides .**Journal of Organometallic Chemistry**, v 689, p 3046-3055 , 2004.

LEE R. W. Plasma line shapes for selected transitions in hydrogen-, helium- and lithium-like ions •**Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer**, v 40, Pages 561-568 , 1988.

LEHMANN, M. S.; NUNES, A. C. A short hydrogen bond between near identical carboxyl groups in the  $\alpha$ -modification of L-glutamic acid. **Acta Crystallogr. B**, v. 36, p. 1621, 1980.

LEHMANN, M. S.; KOETZLE, T. F.; HAMILTON, W. C. **Journal of Crystal and Molecular Structure**, v. 2, p. 225, 1972.

LI, C. Poly(L-glutamic acid)–anticancer drug conjugates. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. 695–713, 2002.

MADISON, V.; DUCA, J.; BENNETT, F. et al. Binding affinities and geometries of various metal ligands in peptide deformylase inhibitors. **Biophysical Chemistry** v. 101–102, p. 239–247, 2002.

MANNE, R.; LIANG, Y. M.; O. KVALHEIM White, grey and black multicomponent systems : A classification of mixture problems and methods for their quantitative analysis. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v 18, p 235-250 , 1993.

MARKLAND, P.; AMIDON, G.L.; YANG, V.C. Modified polypeptides containing g-benzyl glutamic acid as drug delivery platforms. **Journal of Pharmaceutics**, v. 178, p. 183–192, 1999.

MICU, A. M., Durand, D., Quilichini, M., Field, M. J., Smith, J. C.: “*Collective Vibrations in Crystalline L-Alanine*”. **J. Phys. Chem.** **99**, 5645 (1995).

MIEHLICH B.; SAVIN A.; STOLL H. AND PREUSS H. Results obtained with the correlation energy density functionals of Becke and Lee, Yang and Parr **Chemical Physics Letters**, v 157, p 200-206 1989

MILMAN, V.; WINKLER, B. Ab initio modeling in crystallography. **International Journal of Inorganic Materials**, v. 1, p. 273-279, 1999.

MONKHORST, H. J.; PACK, J. D. Special points for Brillouin-zone integrations. **Physical Reviews B**, v. 13, p. 5188, 1976.

MONKHORST, H. J.; PACK, J. D. Special points for Brillouin-zone integrations. **Physical Reviews B**, v. 16, 1748-1749 ,1977.

NAGASHIMA, N. **Proc. Symp. Protein Research Laboratories**, 1970.

PACK, J. D.; MONKHORST, H. J. Special Points for Brillouin-Zone Integrations-A Reply, **Physical Reviews B**, v. 16, p. 1748, 1977.

PERDEW, J. P.; WANG Y., **Phys. Rev. B**, v.33, p. 8800, 1986.

PERDEW, in **Electronic Structure of Solids 91**, eds. P. Ziesche e H. Eschrig, Akademie Verlag, Berlin, p. 11, 1991.

PERDEW, J. P.; BURKE, K.; ERNZERHOF, M. Generalized gradient approximation made simple. **Physical Reviews Letters**, v. 77, p. 3865, 1996.

PFROMMER, B. G. COTE, M. LOUIE, S. G. COHEN, M. L. Electron-Phonon Interactions in Solid C<sub>36</sub>. **Journal of Computational Physics**, v. 131, p. 133, 1997.

PINHEIRO, J. R., CAETANO, E. W. S.; FLORES, M. Z. S ; FARIAS, G. A.; FREIRE, V. N.; FERNANDEZ, J. R. L.; SCOLFARO, L. M. R.; DE OLIVEIRA, M. C. F.; DE OLIVEIRA, T. M., BEZERRA, G. A.; CAVADA, B. S.; DE LIMA FILHO, J. L.; ALVES H.W. L., COURROL, L. C.; SAMAD, R. E. ; FREITAS, A. Z.; TARELHO L. V. G.; VIEIRA JR N. D. Light absorption and ultraviolet photoluminescence of L-alanine crystals (Submetido) - **Physical Reviews Letters** . vxx, p xx, 2005

RAJKUMAR, B. J. M. et al. Infrared and Raman spectra of DL-aspartic acid nitrate Monohydrate. **Spectrochimica Acta**, v. 54, p. 1527-1532, 1998.

RAZETTI, C., ARDOINO, M., ZANOTTI, L., ZHA, M., PAORICI, C.: *Solution Growth and Characterisation of L-alanine Single Crystals*. **Cryst. Res. Technol.** **37**, 456-465, 2002.

ROST, B. Review: Protein Secondary Structure Prediction Continues to Rise. **Journal of Structural Biology**. 2001.

SANO, C.; KASHIWAGI, T; NAGASHIMA, N.. Effects of additives on the growth of L-glutamic acid crystals ( $\beta$ -form). **Journal of Crystal Growth**, v178, p. 568-574, 1997.



SEGALL, M. D.; LINDAN, P. L. D.; PROBERT, M. J. et al. First-principles simulation: ideas, illustrations and the castep code. **Journal of Physics Condensation Materials**. v. 14, p. 2717, 2002.

SEGALL, M. D.; SHAH, R.; PICKARD, C. J.; et al.. Population analysis of plane-wave electronic structure calculations of bulk materials. **Physical Reviews B**, v. 54, p. 16317–16320, 1996.

SEGALL, M.D.; PICKARD, C.J.; SHAH, R. et al. Population Analysis in Plane Wave Electronic Structure Calculations. **Molecular Physics**, v. 89, p. 571, 1996.

SHIRAHATA, N.C. K., OHASHI, Y., SASADA, Y. Structure of  $\alpha$  Form of L-Glutamic Acid.  $\alpha$ - $\beta$  Transition. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 53, p. 30-35, 1980.

SKOOG, D. A.; LEARY, J. J. **Principles Of Instrumental Analysis**. 4<sup>a</sup> edição, 1992.

SOLOMONS, G. T. W. **Química Orgânica 2**. 6<sup>a</sup> edição. 1996.

STEIPE, B. Protein design concepts. In: SCHREINER *et al.* **The Encyclopedia of Computational Chemistry**. John Wiley and sons. Chichester., p. 2168-2185, 1998.

TAPIERO, H. ; MATHE, G. ; COUVREUR P. et al. Dossier: Free amino acids in human health and pathologies II. **Glutamine and Glutamate Biomed Pharmacotherapy**, v. 56, p. 446–457, 2002.

TRIST, D.G. Excitatory amino acid agonists and antagonists: pharmacology and therapeutic applications. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 74, p. 221–229, 2000.

VANDERBILT, D. Soft self-consistent pseudopotentials in a generalized eigenvalue formalism. **Physical Reviews B**, v. 41, p. 7892-7895, 1990.