



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE FÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA

ROCICLER OLIVEIRA HOLANDA

***PROPRIEDADES VIBRACIONAIS DE L-GLUTAMINA SOB
ALTAS PRESSÕES E SOB ALTAS TEMPERATURAS***

FORTALEZA-CE

JULHO DE 2010

Rocicler Oliveira Holanda

***PROPRIEDADES VIBRACIONAIS DE L-GLUTAMINA SOB
ALTAS PRESSÕES E SOB ALTAS TEMPERATURAS***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Física.

Orientador:

Prof. Dr. Paulo de Tarso Cavalcante Freire

MESTRADO EM FÍSICA
DEPARTAMENTO DE FÍSICA
CENTRO DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FORTALEZA-CE

JULHO DE 2010

Dissertação de Mestrado sob o título de Propriedades Vibracionais de L-Glutamina Sob Altas Pressões e Sob Altas Temperaturas, defendida por Rocicler Oliveira Holanda em 21 de julho de 2010 em Fortaleza, Ceará, pela banca examinadora constituída pelos doutores:

Prof. Dr. Paulo de Tarso Cavalcante Freire

UFC

Orientador

Prof. Dr. Josué Mendes Filho

UFC

Prof. Dr. Gilberto Dantas Saraiva

UECE

Prof. Dr. Alexandre Magno Rodrigues Teixeira

UVA

Dedicatória

Ao meu Deus, Senhor da minha vida.

Agradecimentos

- Ao meu Deus, por ter sido e ser a fonte de minha força tanto física quanto emocional, por todo seu imenso amparo e amor;
- À minha amada mãe, Noeme da Silva Oliveira Holanda, pelo seu amor incondicional; ao meu padrasto João Rodrigues de Oliveira, *in memoriam*, pelo apoio e carinho; minha tia Filomena Veras pelo apoio, meu querido Francilio Marques Bispo por seu amor e compreensão; minhas sobrinhas Alexsandra Holanda de Castro e Sandra Moreira de Alencar pelas palavras de fé e por suas orações; à minha amiga Grace Kelly Mendonça pelas palavras de incentivo;
- Aos professores de minha graduação no CEFET, atual IFCE, José Carlos Carneiro, Márcio André de Melo Gomes e Vanderley Sombra;
- Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo de Tarso Cavalcante Freire por sua atenção, confiança e disposição a ajudar no esclarecimento de dúvidas pertinentes tanto à dissertação quanto às disciplinas ministradas por ele;
- Aos professores das disciplinas que cursei durante o mestrado: Paulo de Tarso Cavalcante Freire, Euclimar Passos, Jeanlex Soares de Sousa, Eduardo Bedê Barros;
- Ao aluno de doutorado Cleânio da Luz Lima pelo auxílio em toda a parte experimental deste trabalho e pela discussão dos resultados;
- Aos meus queridos amigos Nádia Ferreira de Andrade, José Robson Maia, Diego Araújo Frota, João Philipe Macedo Braga e Gardenia de Sousa Pinheiro pela ajuda e disposição em trocar idéias durante as disciplinas que cursamos juntos;
- Aos professores que compõem a banca examinadora: Prof. Dr. Josué Mendes Filho, Prof. Dr. Gilberto Dantas Saraiva, Prof. Dr. Alexandre Magno;
- Finalmente, ao CNPq pelo apoio financeiro.

*Aprendam de mim, pois sou manso e humilde de coração.
Jesus Cristo (Mt11.29)*

Resumo

Neste trabalho, cristais de l-glutamina ($C_5H_{10}N_2O_3$) foram submetidos à análises através da técnica de espectroscopia Raman. Inicialmente realizou-se uma identificação tentativa de todas as bandas Raman e em uma segunda etapa obteve-se os espectros do material variando os parâmetros termodinâmicos de pressão hidrostática e temperatura. A região espectral para os experimentos realizados em função da pressão hidrostática esteve entre 40 cm^{-1} e 3550 cm^{-1} e a variação da pressão entre 0 GPa e $5,8\text{ GPa}$. Os resultados mostram que o cristal de l-glutamina sofre uma transição de fase estrutural reversível em torno de aproximadamente $3,0\text{ GPa}$. As medidas em função da temperatura foram realizadas em duas polarizações distintas na região espectral entre 30 cm^{-1} e 3600 cm^{-1} e no intervalo de temperatura entre 20°C e 140°C . Os resultados obtidos em função da temperatura não apresentam indícios de que o cristal de l-glutamina sofra uma transição de fase ou mudanças conformacionais em suas moléculas na célula unitária

PALAVRAS-CHAVE: L-Glutamina. Espectroscopia Raman. Pressão Hidrostática. Transição de Fase. Temperatura.

Abstract

In this work, crystals of l-glutamine ($C_5H_{10}N_2O_3$) were subjected to analysis by Raman spectroscopy. Initially there was a identification attempt of all Raman bands and a second step we obtained the spectra of material ranging from the thermodynamic parameters of hydrostatic pressure and temperature. The spectral region for the experiments as a function of hydrostatic pressure was between 40 cm^{-1} and 3550 cm^{-1} and the variation of pressure between 0 GPa and 5.8 GPa. The results show that the crystal of l-glutamine undergoes a transition reversible structural phase around 3.0 GPa. Measures in function of temperature were made at two different biases in the spectral region between 30 cm^{-1} and 3600 cm^{-1} and in the temperature range between $20\text{ }^\circ\text{C}$ and $140\text{ }^\circ\text{C}$. The results as a function of temperature does not provide evidence that the crystal of l-glutamine undergoes a transition phase or conformational changes in their molecules in the unit cell.

KEY-WORDS: L-Glutamine. Raman Spectroscopy. Hydrostatic Pressure. Transition Phase. Temperature.

Sumário

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Lista de Figuras. | i |
| Lista de Tabelas. | vi |
| INTRODUÇÃO. | 1 |
| 1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS. | 3 |
| 1.1 Vibrações em cristais. | 3 |
| 1.2 Espectroscopia Raman. | 10 |
| 1.3 Os aminoácidos. | 16 |
| 2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL. | 19 |
| 2.1 As amostras de l-glutamina. | 19 |
| 2.2 Experimentos de Espectroscopia Raman. | 21 |
| 2.2.1 Espectroscopia Raman a Altas Pressões Hidrostáticas. | 23 |
| 2.2.2 Espectroscopia Raman a Altas Temperaturas. | 26 |
| 3 CLASSIFICAÇÃO DOS MODOS NORMAIS DE VIBRAÇÃO DO CRISTAL DE L-GLUTAMINA. | 28 |
| 3.1 Estrutura da l-glutamina. | 28 |
| 3.2 Espectros de l-glutamina (pó) à temperatura e pressão ambientes. | 36 |
| 3.2.1 Região espectral entre 30 cm^{-1} e 700 cm^{-1} | 36 |
| 3.2.2 Região espectral entre 750 cm^{-1} e 1750 cm^{-1} | 39 |
| 3.2.3 Região espectral entre 2730 cm^{-1} e 3500 cm^{-1} | 42 |
| 3.3 Espectros de cristais de l-glutamina à temperatura e pressão ambientes. | 44 |
| 4 PROPRIEDADES VIBRACIONAIS DO CRISTAL DE L-GLUTAMINA EM FUNÇÃO DA PRESSÃO HIDROSTÁTICA. | 46 |
| 4.1 Região espectral entre 40 cm^{-1} e 340 cm^{-1} | 46 |
| 4.2 Região espectral entre 400 cm^{-1} e 690 cm^{-1} | 49 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.3 Região espectral entre 700 cm^{-1} e 1200 cm^{-1} | 52 |
| 4.4 Região espectral entre 2800 cm^{-1} e 3060 cm^{-1} | 55 |
| 4.5 Sobre a transição de fase. | 56 |
| 4.6 Conclusões. | 59 |
| 5 PROPRIEDADES VIBRACIONAIS DO CRISTAL DE L-GLUTAMINA EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA. | 60 |
| 5.1 Discussão inicial. | 60 |
| 5.2 Espectros Raman de l-glutamina em função da temperatura. | 61 |
| 5.2.1 Região espectral entre 30 cm^{-1} e 260 cm^{-1} na polarização (\parallel) | 62 |
| 5.2.2 Região espectral entre 300 cm^{-1} e 650 cm^{-1} na polarização (\parallel) | 65 |
| 5.2.3 Região espectral entre 800 cm^{-1} e 1200 cm^{-1} na polarização (\parallel) | 67 |
| 5.2.4 Região espectral entre 1200 cm^{-1} e 1700 cm^{-1} na polarização (\parallel) | 69 |
| 5.2.5 Região espectral entre 2800 cm^{-1} e 3100 cm^{-1} na polarização (\parallel) | 72 |
| 5.2.6 Região espectral entre 20 cm^{-1} e 270 cm^{-1} na polarização (\perp) | 75 |
| 5.2.7 Região espectral entre 270 cm^{-1} e 700 cm^{-1} na polarização (\perp) | 77 |
| 5.2.8 Região espectral entre 750 cm^{-1} e 1250 cm^{-1} na polarização (\perp) | 79 |
| 5.2.9 Região espectral entre 1200 cm^{-1} e 1740 cm^{-1} na polarização (\perp) | 81 |
| 5.2.10 Região espectral entre 2800 cm^{-1} e 3600 cm^{-1} na polarização (\perp) | 83 |
| 5.3 Conclusões. | 86 |
| CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS. | 87 |
| APÊNDICE. | 88 |
| REFERÊNCIAS. | 92 |

Lista de Figuras

- Figura 1.1 Rede Monoatômica Unidimensional.** A rede possui em sua célula unitária dois átomos de massas iguais a $m_1 = m_2 = m$. A constante de força entre cada átomo é considerada a mesma. 6
- Figura 1.2 Relação de dispersão para rede linear infinita para átomos iguais.** 7
- Figura 1.3 Rede linear diatômica com átomos de massa M e m .** A constante de força entre cada átomo é considerada a mesma. 8
- Figura 1.4 Relação de dispersão para rede linear com dois átomos diferentes.** 9
- Figura 1.5 Ilustração de espectro Raman típico.** As diferenças de intensidade entre as linhas anti-Stokes, Rayleigh e Stokes são expostas. 13
- Figura 1.6 Espalhamento Raman.** Interação da luz incidente, de energia $h\nu_0$, com a amostra e seu conseqüente espalhamento nas energias $h\nu_0 - h\nu_m$, $h\nu_0$ e $h\nu_0 + h\nu_m$ 15
- Figura 1.7 Estrutura geral de um aminoácido com um radical R qualquer.** 17
- Figura 1.8 Estrutura zwitteriônica de um aminoácido com radical R qualquer.** 18
- Figura 2.1 Cristal de l-glutamina obtido pelo método de evaporação lenta do solvente.** 19
- Figura 2.2 Difratoograma obtido com a análise de difração de raios x da amostra de l-glutamina.** 20
- Figura 2.3 Padrão de referência disponível no banco de dados PDF-2 ICDD, onde se identifica a amostra de l-glutamina.** 21
- Figura 2.4 Espectrômetro Jobin Yvon Triplemate T-64000 utilizado nas medidas Raman.** 22
- Figura 2.5 Representação ilustrada da montagem do experimento Raman na geometria de retroespalhamento.** 22
- Figura 2.6 Representação ilustrativa do sistema de micro análise Raman.** 23

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 2.7 Célula de pressão utilizada nos experimentos a altas pressões hidrostáticas. | 24 |
| Figura 2.8 Ilustração esquemática de uma célula de pressão a extremos de diamantes. | 25 |
| Figura 2.9 Equipamento utilizado nos experimentos a altas temperaturas. | 27 |
| Figura 3.1 Célula unitária da l-glutamina ao longo da direção cristalográfica c para pressão ambiente (0GPa).[11] | 29 |
| Figura 3.2 Comprimentos de ligações intramolecular e ângulos de ligações numa estrutura planar da l-glutamina.[9] | 29 |
| Figura 2.3 Esquema representativo das ligações de hidrogênio de uma molécula de l-glutamina em sua estrutura cristalina ortorrômbica. [11] | 31 |
| Figura 3.4 Vista ao longo do eixo b da estrutura cristalina da l-glutamina onde se observa que as moléculas estão conectadas via ligações de hidrogênio intracamadas. Estas ligações são representadas pelas linhas azuis mais espessas. [11] | 32 |
| Figura 3.5 Vista ao longo do eixo a das ligações de hidrogênio intercamadas da l-glutamina na estrutura cristalina ortorrômbica. [11] | 33 |
| Figura 3.6 Espectro Raman de l-glutamina (pó) à temperatura e pressão ambiente na região espectral entre 30 cm^{-1} e 700 cm^{-1} . | 38 |
| Figura 3.7 Espectro Raman de l-glutamina (pó) à temperatura e pressão ambiente na região espectral entre 750 cm^{-1} e 1750 cm^{-1} . | 41 |
| Figura 3.8 Espectro Raman de l-glutamina (pó) à temperatura e pressão ambiente na região espectral entre 2730 cm^{-1} e 3500 cm^{-1} . | 43 |
| Figura 3.9 Espectros Raman do cristal de l-glutamina à temperatura e pressão ambiente na região espectral entre 0 cm^{-1} e 1800 cm^{-1} em duas diferentes geometrias de espalhamento. | 44 |
| Figura 3.10 Espectros Raman do cristal de l-glutamina à temperatura e pressão ambiente na região espectral entre 2570 cm^{-1} e 3600 cm^{-1} em duas diferentes geometrias de espalhamento. | 45 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 4.1 Espectros Raman do cristal de l-glutamina para diversos valores de pressão na região espectral entre 40 cm^{-1} e 340 cm^{-1} | 47 |
| Figura 4.2 Gráfico do número de onda versus pressão na região espectral entre 40 cm^{-1} e 340 cm^{-1} | 48 |
| Figura 4.3 Espectros Raman do cristal de l-glutamina para diversos valores de pressão na região espectral entre 400 cm^{-1} e 690 cm^{-1} | 50 |
| Figura 4.4 Gráfico do número de onda versus pressão na região espectral entre 400 cm^{-1} e 690 cm^{-1} | 51 |
| Figura 4.5 Espectros Raman do cristal de l-glutamina para diversos valores de pressão na região espectral entre 700 cm^{-1} e 1200 cm^{-1} | 53 |
| Figura 4.6 Gráfico do número de onda versus pressão na região espectral entre 700 cm^{-1} e 1200 cm^{-1} | 54 |
| Figura 4.7 Espectros Raman do cristal de l-glutamina para diversos valores de pressão na região espectral entre 2800 cm^{-1} e 3060 cm^{-1} | 56 |
| Figura 4.8 Comparação entre compressão e a descompressão dos espectros Raman do cristal de l-glutamina. | 58 |
| Figura 5.1 Representação ilustrada da polarização paralela e perpendicular na análise do cristal de l-glutamina. | 61 |
| Figura 5.2 Espectros Raman da l-glutamina na polarização (\parallel) para diversos valores de temperatura na região espectral entre 30 cm^{-1} e 260 cm^{-1} | 63 |
| Figura 5.3 Gráfico do número de onda versus temperatura na região espectral entre 30 cm^{-1} e 260 cm^{-1} | 64 |
| Figura 5.4 Espectros Raman de um cristal de l-glutamina na região espectral entre 300 cm^{-1} e 650 cm^{-1} para diversos valores de temperatura na geometria (\parallel). | 65 |
| Figura 5.5 Gráfico do número de onda versus temperatura na região espectral entre 300 cm^{-1} e 650 cm^{-1} | 66 |
| Figura 5.6 Espectros Raman de um cristal de l-glutamina no intervalo de frequência entre 800 cm^{-1} e 1200 cm^{-1} para diversos valores de temperaturas na polarização (\parallel). | 67 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 5.7 Gráfico do número de onda versus temperatura na região espectral entre 800 cm^{-1} e 1200 cm^{-1} | .68 |
| Figura 5.8 Espectros Raman de um cristal de l-glutamina no intervalo de frequência entre 1200 cm^{-1} e 1700 cm^{-1} para diversos valores de temperaturas na polarização (\parallel) | 69 |
| Figura 5.9a Gráfico do número de onda versus temperatura na região espectral entre 1200 cm^{-1} e 1700 cm^{-1} | .70 |
| Figura 5.9b Gráfico do número de onda versus temperatura na região espectral entre 1200 cm^{-1} e 1700 cm^{-1} | .71 |
| Figura 5.10 Espectros Raman de um cristal de l-glutamina no intervalo de frequência entre 2800 cm^{-1} e 3100 cm^{-1} para diversos valores de temperaturas na polarização (\parallel) | 73 |
| Figura 5.11 Gráfico do número de onda versus temperatura na região espectral entre 2800 cm^{-1} e 3100 cm^{-1} | .74 |
| Figura 5.12 Espectros Raman de um cristal de l-glutamina no intervalo de frequência entre 20 cm^{-1} e 270 cm^{-1} para diversos valores de temperaturas na polarização (\perp). . . | 75 |
| Figura 5.13 Gráfico do número de onda versus temperatura na região espectral entre 20 cm^{-1} e 270 cm^{-1} | 76 |
| Figura 5.14 Espectros Raman de um cristal de l-glutamina no intervalo de frequência entre 270 cm^{-1} e 700 cm^{-1} para diversos valores de temperaturas na polarização (\perp). . . | 77 |
| Figura 5.15 Gráfico do número de onda versus temperatura na região espectral entre 270 cm^{-1} e 700 cm^{-1} | .78 |
| Figura 5.16 Espectros Raman de um cristal de l-glutamina no intervalo de frequência entre 750 cm^{-1} e 1250 cm^{-1} na polarização (\perp).. . . . | 79 |
| Figura 5.17 Gráfico do número de onda versus temperatura na região espectral entre 750 cm^{-1} e 1250 cm^{-1} | .80 |
| Figura 5.18 Espectros Raman de um cristal de l-glutamina no intervalo de frequência entre 1200 cm^{-1} e 1740 cm^{-1} na polarização (\perp).. . . . | .81 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Figura 5.19 Gráfico do número de onda versus temperatura na região espectral entre 1200 cm^{-1} e 1740 cm^{-1} | 82 |
| Figura 5.20 a) Espectros Raman de um cristal de l-glutamina no intervalo de frequência entre 2800 cm^{-1} e 3100 cm^{-1} na polarização (\perp). | .84 |
| Figura 5.20 b) Espectros Raman de um cristal de l-glutamina no intervalo de frequência entre 2800 cm^{-1} e 3600 cm^{-1} na polarização (\perp). | .85 |
| Figura 5.21 a) Gráfico do número de onda versus temperatura na região espectral entre 2800 cm^{-1} e 3600 cm^{-1} | 86 |
| Figura 5.21 b) Gráfico do número de onda versus temperatura na região espectral entre 2800 cm^{-1} e 3600 cm^{-1}. | 87 |

Lista de tabelas

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabela 3.1 Coordenadas atômicas apresentadas pelas moléculas de l-glutamina conforme a referência. [9] | .30 |
| Tabela 3.2 Distâncias intermoleculares típicas da l-glutamina em sua estrutura cristalina ortorrômbica. [9] | .30 |
| Tabela 3.3a Frequências das bandas observadas nos espectros Raman da l-glutamina (região 100cm^{-1} a 1000cm^{-1}) no pó e no cristal. | .34 |
| Tabela 3.3b Frequência das bandas Raman observadas nos espectros Raman da l-glutamina tanto no pó quanto no cristal em duas polarizações. | .35 |
| Tabela 3.4 Modos normais de vibração do cristal de l-glutamina ativos no Raman registrados em condições ambiente no intervalo de frequência de 30 cm^{-1} a 700 cm^{-1} | .36 |
| Tabela 3.5 Modos normais de vibração do cristal de l-glutamina ativos no Raman registrados em condições ambiente no intervalo de frequência de 750 cm^{-1} a 1750 cm^{-1} | .39 |
| Tabela 3.6 Modos normais de vibração ativos no Raman do cristal de l-glutamina registrados em condições ambiente no intervalo de 2730 cm^{-1} a 3500 cm^{-1} | .42 |
| Tabela 4.1 Coeficientes dos ajustes lineares ($\omega = \omega_0 + \alpha P$) para os modos Raman do cristal de l-glutamina em função da pressão hidrostática na região espectral entre 40 cm^{-1} e 340 cm^{-1} | .49 |
| Tabela 4.2 Coeficientes dos ajustes lineares ($\omega = \omega_0 + \alpha P$) para os modos Raman do cristal de l-glutamina em função da pressão na região espectral entre 400 cm^{-1} e 690 cm^{-1} | .52 |
| Tabela 4.3 Coeficientes dos ajustes lineares ($\omega = \omega_0 + \alpha P$) para os modos Raman do cristal de l-glutamina em função da pressão na região espectral entre 700 cm^{-1} e 1200 cm^{-1} | .54 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 5.1 Coeficientes dos ajustes lineares ($\omega = \omega_0 + \alpha T$) para os modos Raman do cristal de l-glutamina em função da temperatura na região espectral entre 30 cm^{-1} e 260 cm^{-1} | 63 |
| Tabela 5.2 Coeficientes dos ajustes lineares ($\omega = \omega_0 + \alpha T$) para os modos Raman do cristal de l-glutamina em função da temperatura na região espectral entre 300 cm^{-1} e 650 cm^{-1} | 65 |
| Tabela 5.3 Coeficientes dos ajustes lineares ($\omega = \omega_0 + \alpha T$) para os modos Raman do cristal de l-glutamina em função da temperatura na região espectral entre 800 cm^{-1} e 1200 cm^{-1} | 67 |
| Tabela 5.4 Coeficientes dos ajustes lineares ($\omega = \omega_0 + \alpha T$) para os modos Raman do cristal de l-glutamina em função da temperatura na região espectral entre 1200 cm^{-1} e 1700 cm^{-1} | 70 |
| Tabela 5.5 Coeficientes dos ajustes lineares ($\omega = \omega_0 + \alpha T$) para os modos Raman do cristal de l-glutamina em função da temperatura na região espectral entre 2800 cm^{-1} e 3100 cm^{-1} | 73 |
| Tabela 5.6 Coeficientes dos ajustes lineares ($\omega = \omega_0 + \alpha T$) para os modos Raman do cristal de l-glutamina em função da temperatura na região espectral entre 20 cm^{-1} e 270 cm^{-1} | 75 |
| Tabela 5.7 Coeficientes dos ajustes lineares ($\omega = \omega_0 + \alpha T$) para os modos Raman do cristal de l-glutamina em função da temperatura na região espectral entre 270 cm^{-1} e 700 cm^{-1} | 77 |
| Tabela 5.8 Coeficientes dos ajustes lineares ($\omega = \omega_0 + \alpha T$) para os modos Raman do cristal de l-glutamina em função da temperatura na região espectral entre 750 cm^{-1} e 1250 cm^{-1} | 79 |
| Tabela 5.9 Coeficientes dos ajustes lineares ($\omega = \omega_0 + \alpha T$) para os modos Raman do cristal de l-glutamina em função da temperatura na região espectral entre 1200 cm^{-1} e 1740 cm^{-1} | 81 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Tabela 5.10 Coeficientes dos ajustes lineares ($\omega = \omega_0 + \alpha T$) para os modos Raman do cristal de l-glutamina em função da temperatura na região espectral entre 2800 cm^{-1} e 3600 cm^{-1} | .85 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|

INTRODUÇÃO

A l-glutamina, objeto de estudo desta dissertação, é um aminoácido de cinco carbonos classificado como um aminoácido neutro em pH fisiológico. A l-glutamina é o aminoácido livre mais abundante no plasma e no tecido muscular, podendo ainda ser encontrada em concentrações relativamente altas em muitos tecidos. No tecido muscular seu conteúdo intracelular corresponde de cinquenta a sessenta por cento do total dos aminoácidos livres. Aproximadamente, oitenta por cento da glutamina corporal encontra-se no músculo esquelético e esta concentração é trinta vezes superior à do plasma.

A l-glutamina possui importante papel no metabolismo celular dos animais e é o único aminoácido capaz de atravessar a barreira do tecido cerebral. Encontram-se diversas aplicações do seu uso, que vão desde a área nutricional até mesmo na indústria de alimentos.

Na nutrição clínica é um componente útil em agentes nutricionais orais e enterais. Na indústria de alimentos é usada como um componente de suplementos nutricionais esportivos e alimentos para a saúde. O uso da mesma como fármaco está associado a componentes de terapias de úlcera gastroduodenal e gastrite, como medicamentos reguladores da função gástrica e promotores da digestão e também em preparações integrais de aminoácidos.

O presente trabalho tem como objetivo apresentar os resultados de um estudo detalhado realizado em cristais de l-glutamina utilizando a técnica de espectroscopia Raman com a variação dos seguintes parâmetros termodinâmicos: pressão hidrostática e temperatura.

No capítulo um será apresentado uma discussão teórica sobre redes cristalinas, espectroscopia Raman e aminoácidos e no capítulo dois se apresenta o método pelo qual se obtiveram as amostras analisadas nesta dissertação bem como uma descrição do aparato experimental utilizado nas medidas de espectroscopia Raman a altas pressões e a altas temperaturas.

A estrutura dos cristais estudados, além da descrição e a identificação dos modos normais de vibração da l-glutamina à temperatura e pressão ambientes são apresentados no capítulo três. Os resultados de espectroscopia Raman para a l-glutamina em função da pressão hidrostática são apresentados no capítulo quatro, e os resultados em função da temperatura se apresentam no capítulo cinco.

Finalmente, após o capítulo cinco se apresentam as conclusões e perspectivas futuras deste trabalho e no apêndice se encontra uma tabela com o radical e a fórmula molecular dos vinte aminoácidos protéicos.

1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Neste capítulo são apresentados os fundamentos teóricos que guiarão o entendimento dos resultados experimentais que serão propostos no decorrer desta dissertação.

1.1 Vibrações em cristais

Quando um fóton incide sobre um cristal ele pode criar ou destruir um fônon, sendo este considerado como o quantum de energia que separa os níveis vibracionais de energia da rede cristalina. De maneira que se compreende por vibração da rede tanto os modos internos, característicos de um agrupamento molecular, quanto os modos externos, movimentos tipo translação ou rotação de íons ou de agrupamentos moleculares.

Os cristais são formados por um arranjo regular de átomos. Tal arranjo, que pode se repetir ao longo do cristal, compõe uma célula unitária. Quando esta célula unitária possui um volume mínimo, esta é denominada de célula primitiva. No entanto nem sempre a célula primitiva contém a simetria completa de uma rede cristalina por isso é necessário definir uma célula unitária que apresente a simetria completa da rede; tais células são conhecidas como células de Bravais ou redes de Bravais.

Para um cristal deve-se considerar as vibrações de cada átomo influenciando os átomos vizinhos, ou seja, os movimentos oscilatórios na rede cristalina. Em virtude da periodicidade do arranjo de átomos os modos vibracionais corresponderão à ondas de deslocamentos que percorrem o cristal, constituindo as vibrações da rede.

Estas vibrações da rede, ou seja as vibrações dos átomos, (moléculas ou íons), com certa frequência, irão acarretar uma onda que se propaga na rede e cujo comprimento de onda dependerá da diferença de fase entre uma célula e sua vizinha. Quando o deslocamento dos átomos ocorrer paralelamente à direção de propagação da onda, apresentam-se as denominadas ondas longitudinais; caso este deslocamento seja perpendicular à direção de propagação da onda ocorrerão as ondas transversais.

Para que ocorra interação entre as vibrações da rede e a radiação eletromagnética é imprescindível que as vibrações da rede tenham comprimento de onda comparável ao da radiação, cujo comprimento de onda é da ordem de 10^5 \AA no infravermelho e $5 \cdot 10^3 \text{ \AA}$ no visível. No entanto só ocorrem interações com vibrações da rede de longo comprimento de onda, haja vista que a dimensão da célula unitária no cristal é da ordem de 10 \AA a 100 \AA . [1]

Entre células adjacentes as vibrações de longo comprimento de onda estarão em fase; sendo ainda conhecidas como modos óticos por sua capacidade de interação com a radiação eletromagnética. As vibrações da rede são descritas em termos do vetor de onda \mathbf{k} , e de λ , número de onda, cujo módulo é:

$$\mathbf{k} = \frac{2\pi}{\lambda}, \quad (1.1)$$

sendo sua direção a da propagação do movimento ondulatório na rede cristalina.

A frequência de um modo qualquer e o comprimento de onda de sua propagação na rede estão relacionados pela relação de dispersão. A chamada curva de dispersão é uma representação gráfica da frequência do modo considerado em função de \mathbf{k} , o vetor de onda.

Se n é o número de átomos da célula unitária, onde cada átomo tem três coordenadas espaciais x , y e z , existirão $3n$ modos normais onde cada um destes está associado com um ramo da curva de dispersão. Três destes modos compõem os ramos acústicos. Quando \mathbf{k} for igual a zero, comprimento de onda infinito, os modos acústicos terão frequência nula correspondendo à translações em todo o cristal. Os $3n-6$ modos restantes compõem os ramos óticos ativos no Raman e no infravermelho.

Seja a a dimensão da célula unitária, a qual define o menor comprimento de onda para vibração da rede. Supondo que as células unitárias vibram fora de fase, de tal modo que:

$$\lambda = 2a, \quad (1.2)$$

resultará em

$$k = \frac{\pi}{a}. \quad (1.3)$$

Uma região entre $-\pi/a$ e $+\pi/a$, definida pela relação de fases entre células adjacentes, é conhecida como primeira zona de Brillouin. As vibrações com \mathbf{k} igual a zero se encontram no centro da primeira zona de Brillouin. [1]

Considerando a propagação das ondas ao longo do eixo x , lembrando que tal propagação considera a diferença de fase entre modos vibracionais em células unitárias adjacentes, pode-se escrever a equação do movimento como:

$$s = A \sin\left(\frac{2\pi x}{\lambda} - \Phi\right), \quad (1.4)$$

com

$$\Phi = 2\pi vt = \omega t, \quad (1.5)$$

sendo ω a frequência angular. A equação (1.4) pode ser reescrita como:

$$s = A \sin(kx - \omega t) \quad (1.4a)$$

ou em uma forma mais geral

$$s = A \exp[i(kx - \omega t)]. \quad (1.4b)$$

Considerando o caso de ondas longitudinais se propagando numa rede linear infinita composta de átomos iguais, onde estes átomos se movimentam uns contra os outros como se fossem ligados por molas. Pode-se escrever a equação do movimento como:

$$s_r = A \exp[i(kra - \omega t)]. \quad (1.6)$$

Para encontrar a relação de dispersão considere que os átomos, de massa m , são ligados por molas com constantes de força f (Figura 1.1) e que as interações aconteçam com os primeiros átomos vizinhos; de maneira que se pode aplicar as leis de Newton e de Hooke:

$$m\ddot{s}_r = -m\omega^2 s_r = -f[(s_r - s_{r-1}) - (s_{r+1} - s_r)]; \quad (1.7)$$

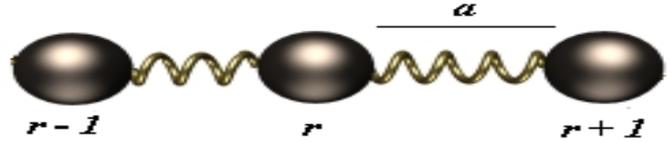


Figura 3. 1 Rede Monoatômica Unidimensional. A rede possui em sua célula unitária dois átomos de massas iguais a $m_1 = m_2 = m$. A constante de força entre cada átomo é considerada a mesma.

retirando o valor de ω^2

$$\omega^2 = \frac{f}{m} \left(2 \frac{s_r}{s_r} - \frac{s_{r+1}}{s_r} - \frac{s_{r-1}}{s_r} \right). \quad (1.8)$$

Substituindo os valores de s pelos da equação (1.8):

$$\begin{aligned} \omega^2 &= \frac{f}{m} \{ 2 - \exp i[k(r+1)a - kra] - \exp i[k(r-1)a - kra] \} = \\ &= \frac{f}{m} [2 - \exp(ika) - \exp(-ika)] = 2 \frac{f}{m} [1 - \cos(ka)] = 4 \frac{f}{m} \text{sen}^2 \left(\frac{ka}{2} \right). \end{aligned} \quad (1.9)$$

Retirando a raiz da equação (1.9) se obtém a relação de dispersão para ondas longitudinais propagando-se numa rede linear infinita composta por átomos iguais:

$$\omega = \pm 2 \sqrt{\frac{f}{m}} \text{sen} \left(\frac{ka}{2} \right). \quad (1.10)$$

A representação da relação de dispersão no intervalo de $-\pi/a$ a $+\pi/a$ se encontra na Figura 1.2:

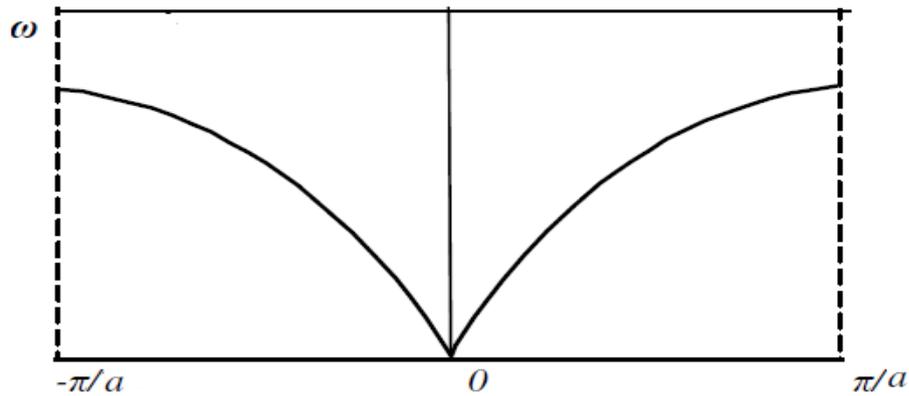


Figura 1.2 Relação de dispersão para rede linear infinita para átomos iguais.

Na equação (1.10) o sinal positivo significa propagação da onda para a direita enquanto que o sinal negativo indica propagação da onda para a esquerda. Para $k = 0$ ou $2\pi/a$ ($-2\pi/a$) a função se anula, e em $k = \pi/a$ ($-\pi/a$) possui valor máximo. Se k for muito pequeno aparecerá uma onda acústica de comprimento de onda longo; quando o comprimento de onda vai diminuindo chega-se ao valor limite $2 (f/m)^{1/2}$.

Quando os átomos vizinhos se movem em oposição de fase se tem que $|\mathbf{k}| = \pi/a$, ou seja $\lambda = 2a$, e portanto a velocidade de grupo, $(d\omega/dk)$, que é proporcional a $\cos(ka/2)$ se anula; neste caso se tem uma onda estacionária e a velocidade de fase apresenta uma grande dispersão para os comprimentos de onda nesta região. O intervalo $-\pi/a < k < +\pi/a$ contém todos os valores de frequência, portanto, abrangendo todo o espectro. Tal intervalo é denominado de primeira zona de Brillouin.

Para o caso em que a rede linear é formada com dois átomos diferentes (Figura 1.3), com massas M e m onde M é maior que m , separados por uma distância a e com isso a distância de repetição da rede será $2a$, considerando ainda que uma perturbação longitudinal se propaga ao longo do cristal, é possível escrever a equação para o deslocamento destes átomos como:

$$s_r = A \exp[i(2kra - \omega t)] \quad (1.11a)$$

$$s_{r-1} = B \exp[i(2k(r+1)a - \omega t)]. \quad (1.11b)$$



Figura 1.3 Rede linear diatômica com átomos de massa M e m . A constante de força entre cada átomo é considerada a mesma.

Tomando o procedimento descrito anteriormente se apresentam as equações de movimento como:

$$m\omega^2 s_r = f[2s_r - s_{r+1} - s_{r-1}] \quad (1.12a)$$

$$M\omega^2 s_{r+1} = f[2s_{r+1} - s_{r+2} - s_r] \quad (1.12b)$$

Substituindo os valores de (1.11a) em (1.12a) e (1.11b) em (1.12b) e dividindo cada equação respectivamente por s_r e s_{r+1} obtém-se:

$$m\omega^2 = f \left(2 - \frac{B}{A} \exp(iKa) - \frac{B}{A} \exp(-iKa) \right) \quad (1.13a)$$

$$M\omega^2 = f \left(2 - \frac{A}{B} \exp(iKa) - \frac{A}{B} \exp(-iKa) \right) \quad (1.13b)$$

ou

$$A(2f - m\omega^2) = 2Bf \cos(Ka) \quad (1.14a)$$

$$B(2f - M\omega^2) = 2Af \cos(Ka). \quad (1.14b)$$

Disto segue a relação de dispersão dada por:

$$\omega^2 = f \left(\frac{1}{m} + \frac{1}{M} \right) \pm f \left[\left(\frac{1}{m} + \frac{1}{M} \right)^2 - \frac{4\text{sen}^2(Ka)}{mM} \right]^{1/2}, \quad (1.15)$$

onde além das duas raízes que são correspondentes à onda se deslocam para a direita ou para a esquerda, existem duas raízes de ω para cada k . Estas últimas estão representadas na Figura 1.4.

Nesta figura o ramo inferior, encontrado pela solução de (1.15) para o sinal negativo, é denominado como ramo acústico; e o ramo superior, encontrado através da solução de (1.15) para o sinal positivo, corresponde ao ramo ótico. Nesta situação, em virtude da rede se repetir periodicamente na distância de $2a$, o intervalo definido para a primeira zona de Brillouin é dado por $|\mathbf{k}| \leq \pi/2a$. Quando $k = 0$ as raízes são:

$$\omega = 0 \quad (\text{ponto zero na figura 1.4}) \text{ para o ramo acústico e} \quad (1.16a)$$

$$\omega = \sqrt{2f \left(\frac{1}{m} + \frac{1}{M} \right)} \quad (\text{ponto A na figura 1.4}) \text{ para o ramo ótico.} \quad (1.16b)$$

Quando $k = \pi/2a$ a equação (1.15) se torna:

$$\omega^2 = f \left(\frac{1}{m} + \frac{1}{M} \right) \pm f \left[\left(\frac{1}{m} + \frac{1}{M} \right)^2 - \frac{4}{mM} \right]^{1/2} = f \left(\frac{1}{m} + \frac{1}{M} \right) \pm f \left(\frac{1}{m} + \frac{1}{M} \right), \quad (1.17)$$

e as raízes são dadas por:

$$\omega = \sqrt{\frac{2f}{M}} \quad (\text{ponto B na figura 1.4}) \text{ para o ramo acústico e} \quad (1.18a)$$

$$\omega = \sqrt{\frac{2f}{m}} \quad (\text{ponto C para na figura 1.4}) \text{ pra o ramo ótico.} \quad (1.18b)$$

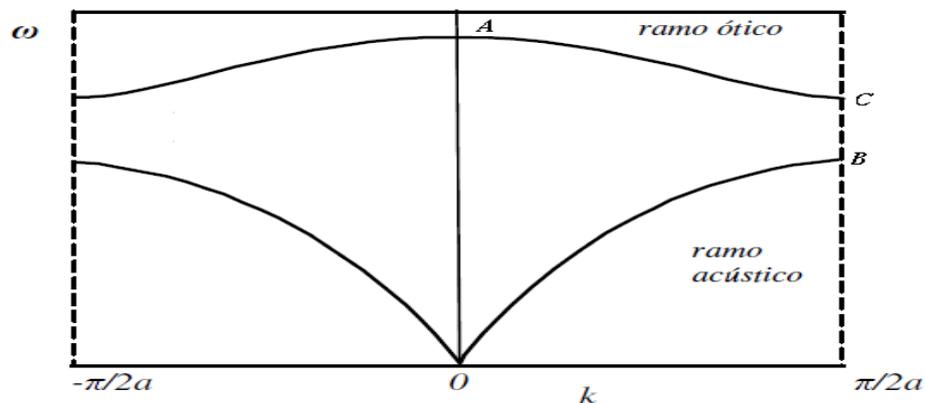


Figura 1.4 Relação de dispersão para rede linear com dois átomos diferentes.

Estes resultados indicam que no ramo acústico a frequência máxima, quando $k = \pi/2a$, depende da massa do átomo mais pesado, enquanto que no ramo ótico a frequência depende da massa do átomo mais leve para este mesmo valor de k . Para que a frequência do ramo ótico dependa das duas massas é necessário que a frequência esteja em seu valor máximo, isto ocorre quando $k = 0$.

Para uma rede multiatômica e tridimensional existirá um maior número de modos vibracionais. Caso existam agrupamentos moleculares no sólido pode-se considerar vibrações entre as moléculas como um todo, isto acarreta modos translacionais ou movimentos tipo rotação. Tais movimentos são considerados como os modos rotacionais ou libracionais e constituem parte dos modos externos. Dentro destes agrupamentos o movimento vibracional dos átomos origina os modos internos. O acoplamento entre estes agrupamentos, cujos movimentos podem ter diferentes fases, juntamente com a periodicidade na rede cristalina definem a relação de dispersão, produzindo novos modos óticos. [1,2]

1.2 Espectroscopia Raman

Técnicas como ressonância magnética nuclear, difração de elétrons, de nêutrons e de raios X, espectroscopia Raman e no infravermelho, entre outras permitem obter informações sobre estrutura molecular, níveis de energia e ligações químicas.[1]

De um modo geral a espectroscopia estuda a interação da radiação eletromagnética com a matéria, onde a determinação dos níveis de energia de átomos ou moléculas é considerada como um de seus principais objetivos.

Com isto o espalhamento Raman é considerado como uma forma fundamental de espectroscopia molecular. Este, juntamente com a absorção do infravermelho, é utilizado para obter informações sobre a estrutura e as propriedades das moléculas e de suas propriedades vibracionais.

No efeito Raman a atividade está ligada ao momento de dipolo induzido na molécula pelo campo elétrico da radiação. Os grupos moleculares ou as redes que formam um cristal

são caracterizados por um número de modos vibracionais determinados pelas massas dos átomos constituintes, das forças interatômicas e da geometria de sua disposição. [2]

As vibrações modificam o momento de dipolo dielétrico dos grupos, e como uma consequência, a absorção da radiação eletromagnética ocorre, tipicamente na região de número de onda de $10^4 \text{ cm}^{-1} - 10^2 \text{ cm}^{-1}$ correspondente para o domínio da espectroscopia no infravermelho.

Similarmente, quando a luz de frequência ν_0 passa através de um meio transparente, seu campo elétrico faz a distribuição local das cargas elétricas vibrarem. Estes elétrons oscilantes se comportam como dipolos elétricos emissores de luz difusa com a mesma frequência da radiação incidente: este é o espalhamento Rayleigh.

Ocorrendo um acoplamento entre a polarizabilidade elétrica e os modos vibracionais do meio, a energia dos fótons espalhados pode ser aumentada pela liberação da energia vibracional do meio (linhas anti-Stokes) ou diminuída pela absorção da energia vibracional do meio (linhas Stokes). Tal evento é conhecido como espalhamento Raman. Com isso a luz difusa, ao passar por um espectrômetro, apresenta um espectro Raman, no qual as linhas espectrais adicionais (bandas, picos) são alteradas em relação à linha Rayleigh por uma quantidade correspondente à energia dos diferentes modos vibracionais acoplados.

A seguir se apresenta uma formulação matemática para o processo descrito acima. Classicamente pode-se escrever o vetor do momento de dipolo induzido como:

$$\mathbf{P} = \alpha \mathbf{E}, \quad (1.19)$$

sendo α a polarizabilidade da molécula e \mathbf{E} o vetor do campo elétrico da radiação incidente. Para cada modo normal da molécula a polarizabilidade, α , deve variar em relação às coordenadas normais desta. No entanto, considerando q como a única coordenada normal do sistema em estudo, é possível escrever α num desenvolvimento em série de tal coordenada interna:

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{d\alpha}{dq} \right)_0 q + \dots \quad (1.20)$$

Supondo que a coordenada q e o campo \mathbf{E} sejam descritos por:

$$q = q_0 \cos(2\pi \nu_m t) \quad (1.21)$$

e

$$\mathbf{E} = \mathbf{E}_0 \cos(2\pi \nu_0 t) \quad (1.22)$$

onde ν_m é a frequência vibracional e ν_0 a frequência da radiação incidente. Então, o momento de dipolo induzido será:

$$P = \alpha_0 \mathbf{E}_0 \cos(2\pi \nu_0 t) + \left(\frac{d\alpha}{dq}\right)_0 q_0 \mathbf{E}_0 \cos(2\pi \nu_0 t) \cos(2\pi \nu_m t). \quad (1.23)$$

Para uma pequena variação da coordenada q os termos de ordem mais alta podem ser desprezados. Utilizando em (1.23) a seguinte relação:

$$\cos(a)\cos(b) = \frac{1}{2} [\cos(a+b) + \cos(a-b)] \quad (1.24)$$

se obtém que:

$$P = \alpha_0 \mathbf{E}_0 \cos(2\pi \nu_0 t) + \frac{1}{2} \left(\frac{d\alpha}{dq}\right)_0 q_0 \mathbf{E}_0 \{ \cos[2\pi (\nu_0 + \nu_m)t] + \cos[2\pi (\nu_0 - \nu_m)t] \}. \quad (1.25)$$

Com relação à equação (1.25), o primeiro termo, correspondente ao espalhamento Rayleigh, contém apenas a frequência da radiação incidente; no segundo aparecem as radiações espalhadas com frequência $\nu_0 + \nu_m$ (espalhamento ou linha anti-Stokes) e $\nu_0 - \nu_m$ (espalhamento ou linha Stokes).

Para que os últimos termos da equação (1.25) tenham contribuição é necessário que haja variação da polarizabilidade com o pequeno deslocamento da coordenada q em torno da posição de equilíbrio, ou seja: $(d\alpha/dq)_0$ seja diferente de zero.

Simetricamente em relação à linha Rayleigh, aparece no espectro uma banda do lado de frequências mais baixas, a Stokes, e uma do lado de frequências mais altas, a anti-Stokes. Observa-se que a intensidade da linha Stokes é maior do que a linha anti-Stokes; tal comportamento pode ser explicado quando se recorre ao modelo quântico. Veja um esquema ilustrativo de um espectro Raman típico:

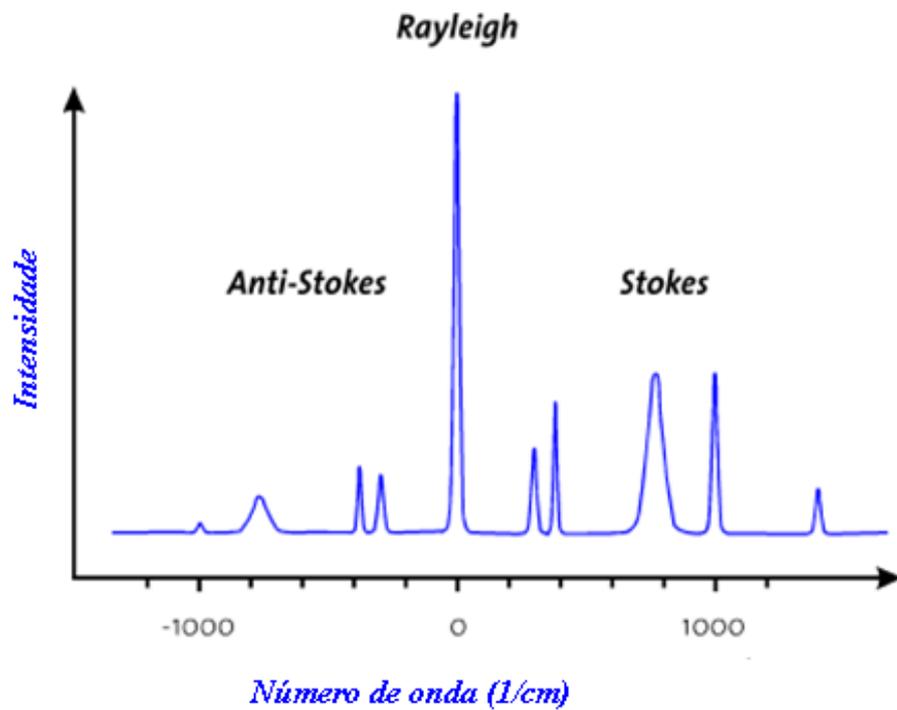


Figura 1.5 Ilustração de espectro Raman típico. As diferenças de intensidade entre as linhas anti-Stokes, Rayleigh e Stokes são expostas.

É possível introduzir para a polarizabilidade a seguinte expressão que corresponde ao momento de transição de dipolo:

$$\alpha_{mn} = \int \psi_m \alpha \psi_n d\tau, \quad (1.26)$$

onde a relação entre as componentes do momento de dipolo induzido e as componentes do campo elétrico é dada por:

$$P_x = \alpha_{xx}E_x + \alpha_{xy}E_y + \alpha_{xz}E_z,$$

$$P_y = \alpha_{yx}E_x + \alpha_{yy}E_y + \alpha_{yz}E_z,$$

$$P_z = \alpha_{zx}E_x + \alpha_{zy}E_y + \alpha_{zz}E_z. \quad (1.27)$$

No efeito Raman normal um tensor simétrico é formado pelas componentes, α_{ij} , que relacionam os dois vetores, ou seja:

$$\begin{aligned}\alpha_{xy} &= \alpha_{yx} , \\ \alpha_{xz} &= \alpha_{zx} \text{ e} \\ \alpha_{yz} &= \alpha_{zy} .\end{aligned}\tag{1.28}$$

Deve-se considerar as componentes $(\alpha_{ij})_{mn}$, com i e j igual a x, y ou z, para cada transição entre os estados vibracionais m e n. Pelo menos uma das componentes das seis integrais, dada pela equação (1.26) deve ser diferente de zero para que haja atividade no Raman. Com isso, ao substituir a equação (1.20) em (1.26) se obtém:

$$\alpha_{mn} = \alpha_0 \int \psi_m \psi_n d\tau + \left(\frac{d\alpha}{dq}\right)_0 \int \psi_m q \psi_n d\tau\tag{1.27}$$

Os estados vibracionais m e n são diferentes no espalhamento Raman Stokes ou anti-Stokes e em virtude da ortogonalidade entre ψ_m e ψ_n a primeira integral do segundo termo de (1.27) é sempre nula. No entanto para que o segundo termo de (1.27) não seja nulo é necessário que duas condições sejam satisfeitas. São elas:

- haja variação da polarizabilidade com a pequena vibração em torno da posição de equilíbrio, portanto: $(d\alpha/dq)_0$ seja diferente de zero;
- o termo $\int \psi_m q \psi_n d\tau$ ser diferente de zero. Para que isto aconteça o produto $\psi_m q \psi_n$ deve ser função par.

A intensidade Raman, dependente da probabilidade de transição, é dada por:

$$I_{mn} = \left(\frac{16\pi^2}{9c^4}\right) I_0 v^4 \sum_i \sum_j |\alpha_{(ij)mn}|^2,\tag{1.28}$$

onde v é a frequência da radiação espalhada e I_0 é a intensidade da radiação incidente. O esquema de espalhamento está representado na Figura 1.6:

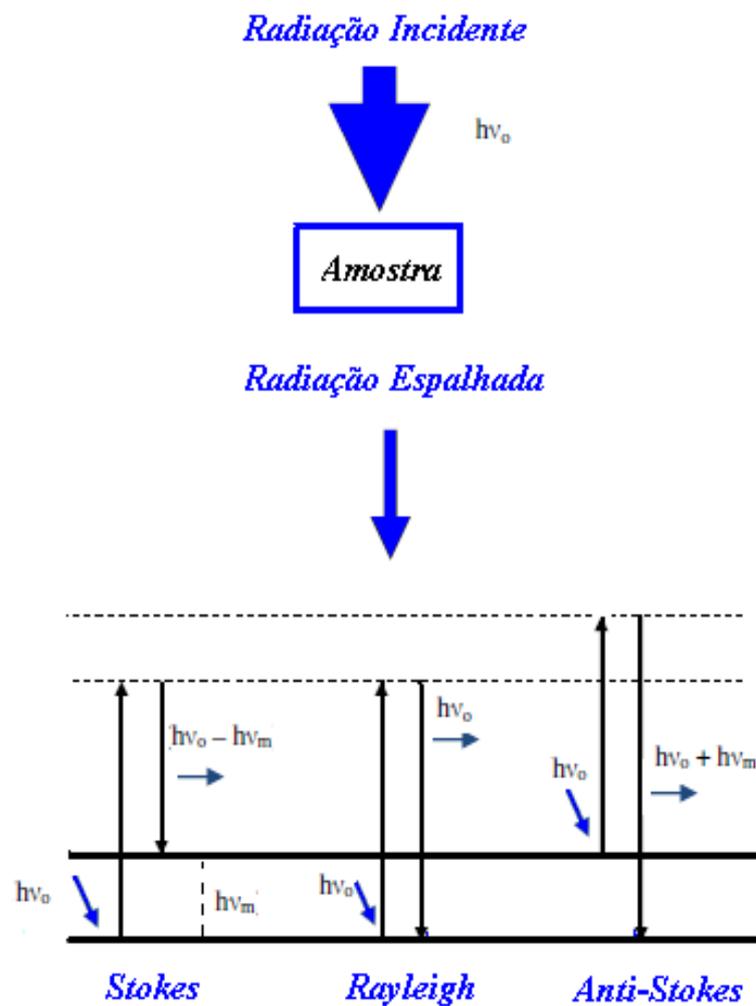


Figura 1.6 Espalhamento Raman. Interação da luz incidente, de energia $h\nu_0$, com a amostra e seu conseqüente espalhamento nas energias $h\nu_0 - h\nu_m$, $h\nu_0$ e $h\nu_0 + h\nu_m$. Mais abaixo as três transições moleculares mas prováveis para os espalhamentos Stokes, Rayleigh e anti-Stokes.

No espalhamento Raman Stokes, no estado fundamental, a molécula sofre colisão com o fóton de energia $h\nu_0$ e passa para um estado intermediário. Em seguida decai para um estado de energia $h\nu_m$, vibracionalmente excitado, e como consequência o fóton espalhado terá energia menor que o incidente. No espalhamento Rayleigh, depois da interação com o fóton, a molécula volta ao mesmo nível de energia inicial e o fóton é espalhado sem que sua frequência seja alterada. No espalhamento Raman anti-Stokes, a molécula se encontra num

estado excitado quando o fóton a colide, e após esta interação a molécula decai para o estado fundamental e o fóton é espalhado com maior energia, $h\nu_0 + h\nu_m$. Em condições reais após a colisão do fóton com a molécula, o mesmo é aniquilado enquanto ocorre uma perturbação em todos os estados de energia da molécula. [2]

A relação entre as intensidades anti-Stokes e Stokes é dada por:

$$\frac{I_A}{I_B} = \left(\frac{\nu_0 + \nu_m}{\nu_0 - \nu_m} \right)^4 \exp\left(\frac{-h\nu_m}{KT} \right), \quad (1.29)$$

onde a população dos estados excitados segue a distribuição de Boltzman, cujo o nível mais populoso é o nível fundamental. Com isso é esperado que as bandas anti-Stokes tenham menor intensidade do que as bandas Stokes. Para frequências mais baixas as intensidades das duas bandas são comparáveis, porém para frequências vibracionais muito altas as bandas anti Stokes tornam-se difíceis de serem observadas.

1.3 Os aminoácidos

Os aminoácidos são moléculas que formam as diversas proteínas orgânicas, onde estes podem ser representados por símbolos de uma ou três letras para facilitar a apresentação de sua sequência na estrutura protéica. Além disso, estes se unem através das ligações peptídicas para formar as proteínas corporais. No apêndice deste trabalho encontra-se uma tabela com o radical e a fórmula molecular dos vinte aminoácidos protéicos.

Estruturalmente os aminoácidos são compostos que possuem uma fórmula básica comum. Unem-se a um carbono α um grupo ($-\text{NH}_2$), um grupo carboxila ($-\text{COOH}$), um hidrogênio (H) e um grupo variável denominado de cadeia lateral ou grupo R. Veja abaixo a estrutura geral de um aminoácido:

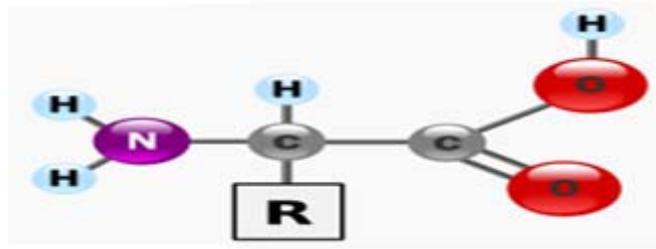


Figura 1.7 Estrutura geral de um aminoácido com um radical R qualquer.

Baseando-se principalmente na sua cadeia lateral ou grupamento R existem ainda distintas maneiras de se classificar os aminoácidos. Em termos de nutrição os aminoácidos podem ser classificados como essenciais ou indispensáveis, aqueles que o organismo humano considerado não é capaz de sintetizar, entretanto é requerido para seu funcionamento; e não essenciais, aqueles que o organismo sintetiza a partir dos alimentos ingeridos.

Considerando a polaridade é possível classificar os aminoácidos em quatro classes principais. A classe um é composta por aminoácidos com grupos R não polares ou hidrofóbicos, sendo estes menos solúveis em água e com localização interna na molécula protéica. A classe um é constituída no total por oito aminoácidos; cinco com cadeia alifática hidrocarbonada (alanina, leucina, isoleucina, valina e prolina), dois com anéis aromáticos (fenilalanina e triptofano) e um sulfurato (metionina).

Os sete aminoácidos que compõem a classe dois possuem os grupos R polares não carregados. Estes apresentam as seguintes particularidades com relação à cadeia lateral: a polaridade da serina, tirosina e treonina sendo resultante dos grupos hidroxílicos, glutamina e asparagina dos seus grupos amídicos, cisteína do seu grupamento sulfidrílico (-SH) e a glicina como membro limítrofe do grupo; algumas vezes ela é classificada como não polar. Tais aminoácidos são encontrados na parte superficial da molécula protéica proveniente da capacidade deste grupo interagir com a água.

A classe três é composta por aminoácidos com o grupo R carregados positivamente. Os três aminoácidos básicos, em que o grupo R apresenta uma carga positiva efetiva em pH igual a sete, possuem seis carbonos em seu esqueleto. A lisina apresenta um aminogruppo e a

arginina um grupamento guanidínico carregados positivamente. A histidina contém a função imidazólica fracamente básico e é o aminoácido limítrofe quanto a essas propriedades.

Os aminoácidos que pertencem à classe quatro apresentam o grupo R carregado negativamente. Dois membros desta classe, ácido glutâmico e o ácido aspártico, apresentam um grupo carboxílico além dos α - carboxílicos, que são inteiramente ionizáveis e, portanto, carregados negativamente.

Quando os aminoácidos estão em meio ácido agem como uma base e em meio básico agem como um ácido: são denominados de compostos anfóteros. Ou seja, quando estão em solução e até quando formam uma estrutura cristalina, o grupo carboxílico perde o átomo de hidrogênio e este se liga ao grupo amina. Então o composto passa a um estado de íon bipolar, também denominado de estado zwitterion. A Figura 1.8 mostra uma representação esquemática da estrutura de um aminoácido na estrutura zwitteriônica.

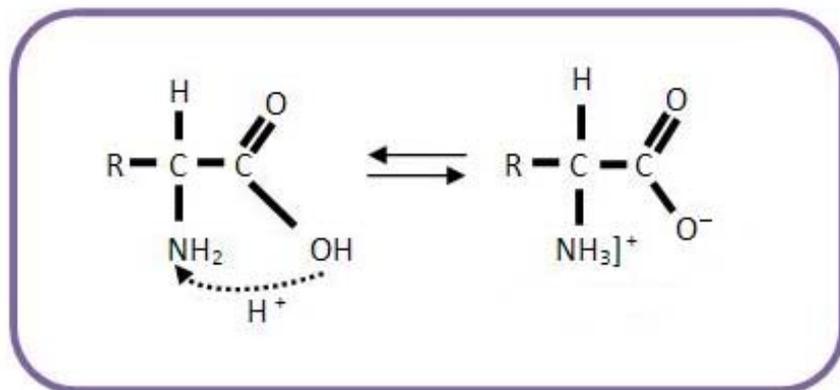


Figura 1.8 Estrutura zwitteriônica de um aminoácido com radical R qualquer.

2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Neste capítulo se apresenta a descrição do método pelo qual as amostras analisadas neste trabalho foram obtidas e do aparato experimental utilizado nos experimentos de espectroscopia Raman a altas pressões hidrostáticas e a altas temperaturas.

2.1 As amostras de L-Glutamina

As amostras de l-glutamina utilizadas neste trabalho foram originadas do reagente comercial fabricado pela Vetec Química Fina Ltda. Os cristais de l-glutamina foram obtidos através do método de evaporação lenta do solvente. Este consiste em dissolver certa quantidade de reagente em determinada quantidade de água destilada, baseando-se na curva de solubilidade do reagente para assegurar que a solução fique supersaturada. Após, a solução é filtrada, colocada em um béquer, fechando-o em seguida com um plástico PVC. No plástico são feitos pequenos orifícios para permitir que o solvente, água destilada, evapore.

A solução preparada é posta em repouso em um ambiente com temperatura controlada entre 17°C e 18°C e após duas semanas observou-se a formação dos primeiros cristais. A Figura 2.1 mostra a foto de um dos cristais, com aproximadamente três centímetros de comprimento, obtido por tal método.



Figura 2.1 Cristal de l-glutamina obtido pelo método de evaporação lenta do solvente.

Para confirmar a estrutura cristalina das amostras obtidas, foram realizados experimentos de difração de Raios X de pó no laboratório de Raios X do Departamento de Física da UFC utilizando um difratômetro de Raios X modelo X'Pert PRO da marca PANalytical utilizando radiação de cobalto. Os parâmetros de operação dos equipamentos foram os seguintes: potência no tubo de Raios X de 1kW (40kV:30mA), com radiação de $K_{\alpha 1}$ e $K_{\alpha 2}$ do cobalto (1,78901Å e 1,79290 Å); o intervalo angular 2θ foi de 10 graus a 60 graus, com um passo de 0,013°.

A identificação das fases foi feita através de um programa comercial da Phillips (X'Pert High Score) associado com um banco de dados do PDF-2 ICDD, fornecido pela CAPES. As fases da l-glutamina foram identificadas pela microficha do banco de dados 00-039-1835. A Figura 2.2 representa o difratograma obtido com a análise de difração de Raios X e a Figura 2.3 o padrão de referência disponível no banco de dados.

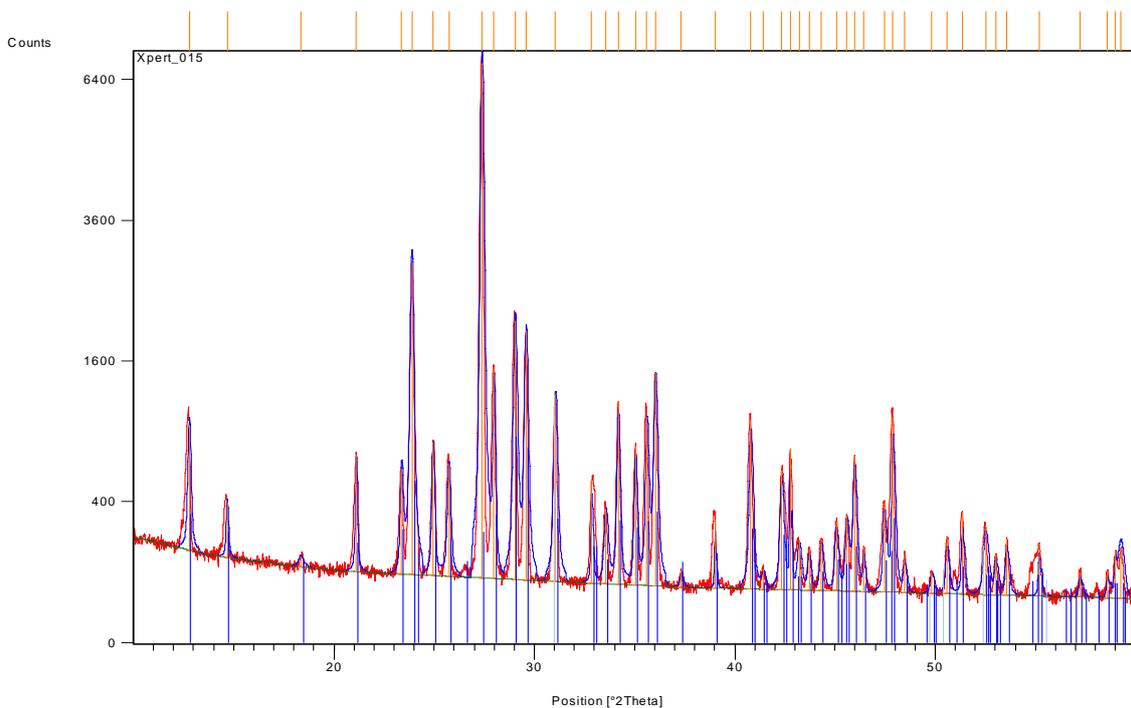


Figura 2.2 Difratograma obtido com a análise de difração de Raios X da amostra de l-glutamina.

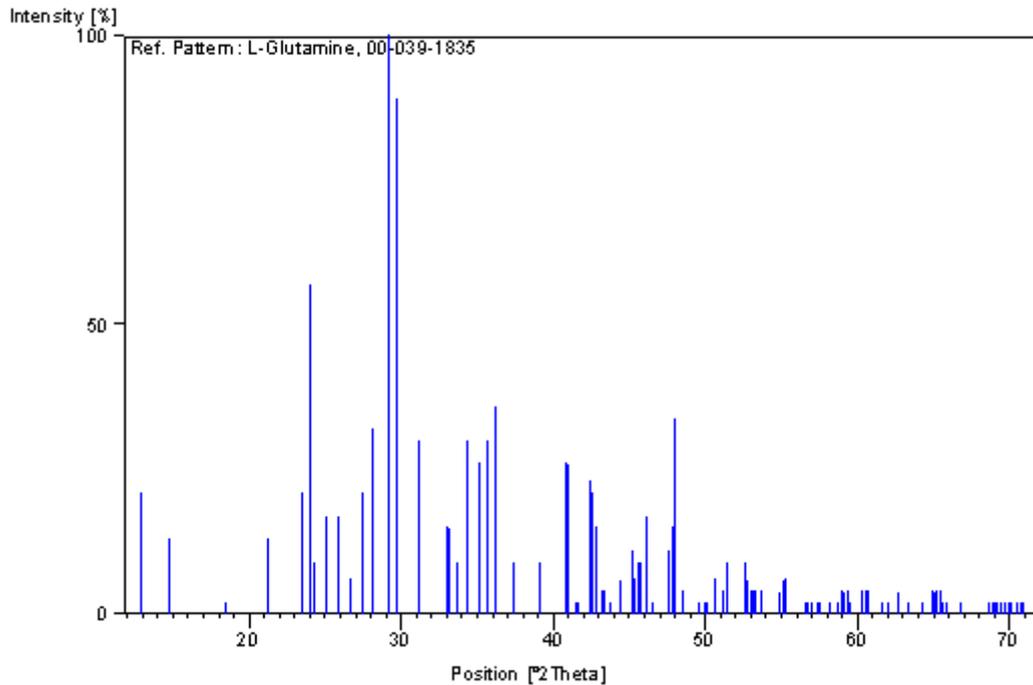


Figura 2.3 Padrão de referência disponível no banco de dados PDF-2 ICDD, onde se identifica a amostra de l-glutamina.

2.2 Experimentos de Espectroscopia Raman

Utilizou-se um espectrômetro triplo, da Jobin Yvon Triplemate T64000, para analisar a luz espalhada. Encontrava-se aplicado a este um sistema de micro análise, na geometria de retroespalhamento, um micro-computador e um sistema de detecção tipo CCD (*Coupled Charge Device* – Dispositivo de Carga Acoplada) resfriado a nitrogênio líquido.

O sistema de micro análise continha ainda uma câmera de vídeo conectada a um monitor e um microscópio da Olympus BX40 com uma lente objetiva plana cromática com 20mm de distância focal e 0,35 de abertura numérica. As fendas do espectrômetro foram adaptadas de modo a obter-se uma resolução espectral de aproximadamente 2cm^{-1} . As Figuras 2.4 e 2.5 mostram o espectrômetro da Jobin Yvon Triplemate T64000 e um esquema representativo da geometria de retroespalhamento respectivamente.



Figura 2.4 Espectrômetro Jobin Yvon Triplemate T-64000 utilizado nas medidas Raman.

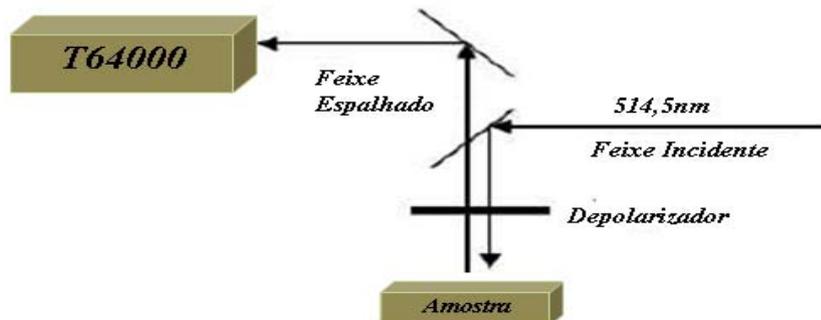


Figura 2.5 Representação ilustrada da montagem do experimento Raman na geometria de retroespalhamento.

Para excitar a amostra empregou-se um laser de argônio, modelo Innova 70 da Coherent Inc., operando na linha 514,5nm com potência incidente na amostra de 5,08 mW nos experimentos realizados. Para estes o intervalo da região espectral estava entre 40 cm^{-1} e 3550 cm^{-1} . Pelo caminho ótico foram dispostos espelhos, prismas, lentes, polarizadores, rodadores de polarização e diafragmas.

A Figura abaixo mostra uma representação do sistema experimental de medidas de espalhamento Raman:

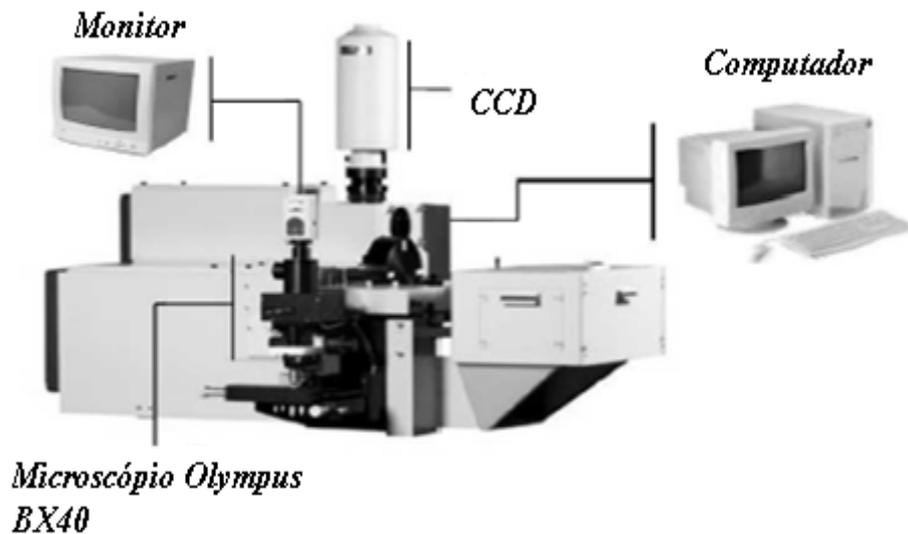


Figura 2.6 Representação ilustrativa do sistema de micro análise Raman.

Para calibrar o sistema utilizou-se uma amostra padrão de silício, onde uma intensa banda Raman se encontra na posição de 521cm^{-1} . A transferência dos sinais coletados no espectrômetro para o computador é alcançada através de uma interface apropriada.

Utilizou-se os programas de computador PeakFit da SPSS Inc. e Origin versão 8 da OriginLab Corporation para analisar os dados obtidos. O ajuste dos espectros ocorreu através da deconvolução dos picos com o uso da função Lorentziana-Gaussiana, que permitiu fornecer informações sobre a posição e largura de linha das bandas Raman observadas.

2.2.1 Espectroscopia Raman a Altas Pressões Hidrostáticas

Para as medidas de altas pressões hidrostáticas foi utilizada uma célula do tipo bigorna com diamantes, DAC- *Diamond Anvill Cell*, apresentada na Figura 2.7.



Figura 2.7 Célula de pressão utilizada nos experimentos a altas pressões hidrostáticas.

O funcionamento desta ocorre quando se aplica uma força externa para pressionar a amostra que se encontra imersa em um fluido transmissor de pressão, dentro de uma gaxeta entre dois extremos de diamantes.

A força externa é produzida pela rotação de um parafuso, sendo transmitida ao diamante montado sobre o pistão móvel através de uma alavanca. Com isso a gaxeta, onde se encontra a amostra, é pressionada contra o diamante fixo. O processo de montagem da célula de pressão é sutil, pois caso os diamantes fiquem descentralizados, estes poderão quebrar durante o experimento. Deste modo deve-se observar o alinhamento dos diamantes antes de iniciar o carregamento da amostra.

A Figura 2.8 apresenta uma representação esquemática da célula de pressão, onde os números um, dois, três, quatro e cinco indicam o parafuso, a alavanca, o pistão móvel, a gaxeta onde se encontra a amostra e os diamantes fixos respectivamente:

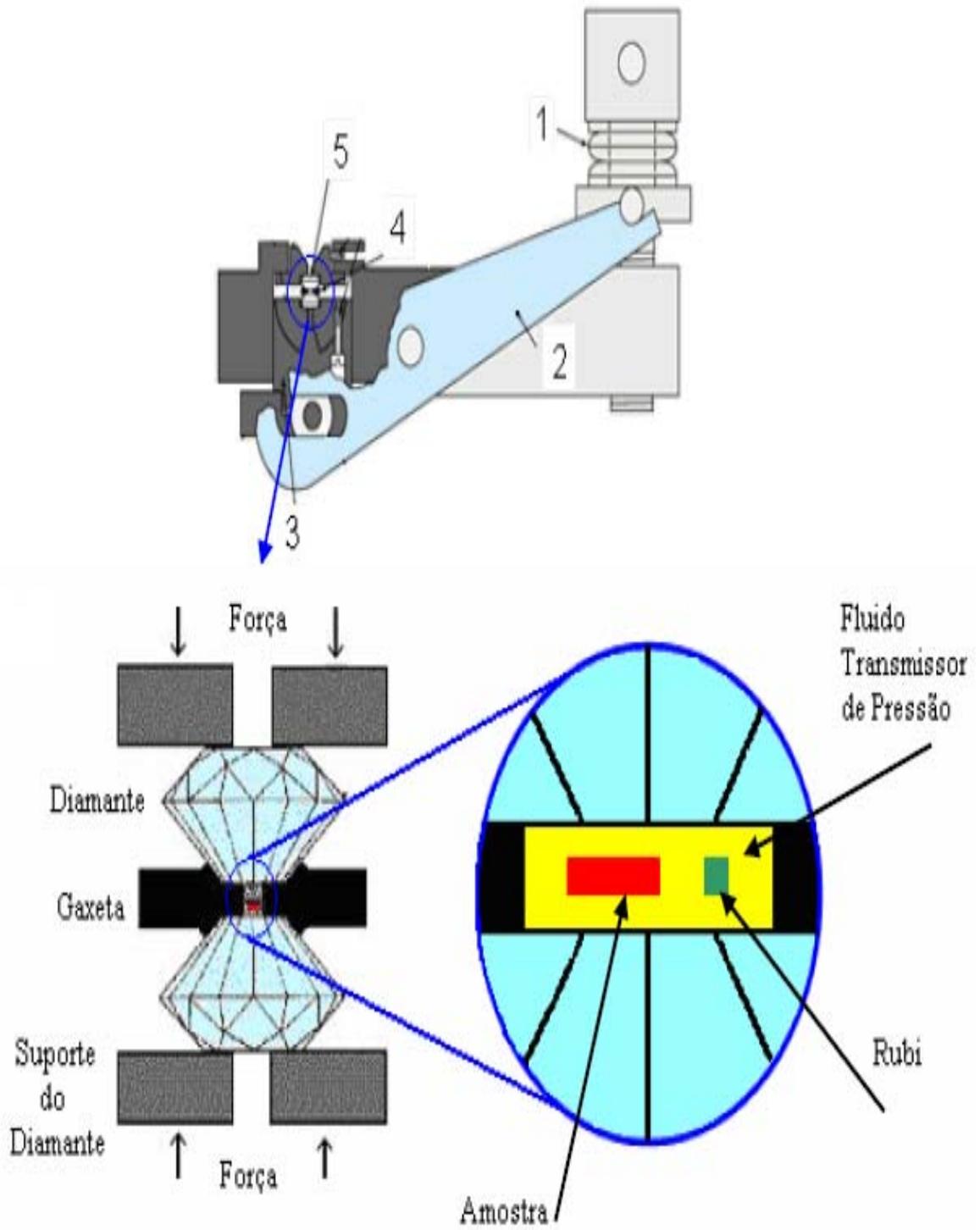


Figura 2.8 Ilustração esquemática de uma célula de pressão a extremos de diamantes.

Para obter o paralelismo dos diamantes utiliza-se o auxílio de um microscópio, movimentando-se as mesas que apóiam os mesmos de forma a alcançar a menor quantidade de franjas de interferência sob a luz branca.

As gaxetas empregadas nos experimentos eram lâminas de uma liga metálica especial, aço inox 301, com espessura de 210 μ m. O orifício das gaxetas, com diâmetro da ordem de 300 μ m, foi feito a laser. Após furadas as gaxetas, estas são lixadas com a finalidade de eliminar rebarbas na borda do orifício.

Para carregar a gaxeta coloca-se esta sobre o diamante fixo e a preenche com a amostra de rubi, Al₂O₃: Cr³⁺, e a amostra a ser medida. Então o orifício é preenchido com um fluido transmissor de pressão e a célula é fechada com o diamante móvel sobre a gaxeta. Nos experimentos realizados utilizou-se o óleo mineral nujol como fluido transmissor de pressão, pois não há reatividade deste com a amostra analisada e este mantém sua hidrostática no intervalo de pressão esperado.

Empregou-se a técnica de luminescência do rubi, para calibrar a pressão no interior da célula. [7] Tal técnica informa que as duas linhas R₁ e R₂ de luminescência do rubi, Al₂O₃: Cr³⁺, deslocam-se linearmente em função da pressão até o limite de 30GPa. Com isso é possível encontrar o valor da pressão (em GPa) no interior da célula utilizando a seguinte expressão:

$$P = \frac{\omega_{Ri} - \omega_{Ri}^0}{7,535}, \quad (3.1)$$

onde ω_{Ri} é o número de onda de qualquer uma das duas linhas do rubi, expressa em cm⁻¹, à pressão P e ω_{Ri}^0 é o número de onda da respectiva linha à pressão ambiente.

2.2.2 Espectroscopia Raman a Altas Temperaturas

Para as medidas a altas temperaturas foi empregado um forno resistivo. Este é refrigerado com água e o controle da temperatura é obtido com o uso de um termopar tipo S (Platina/Ródio-Platina) e um controlador modelo HW4200 da Coel Controles Elétricos LTDA.

O intervalo de temperatura utilizado nas medidas nos cristais de l-glutamina estava entre 20°C, temperatura ambiente, e 140°C. Apresenta-se na Figura 2.6 o sistema utilizado nos experimentos a altas temperaturas:

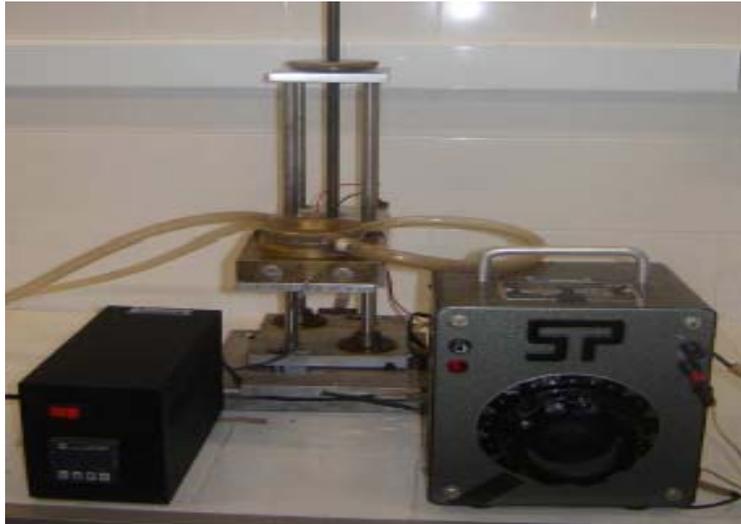


Figura 2.9 Equipamento utilizado nos experimentos a altas temperaturas.

3 CLASSIFICAÇÃO DOS MODOS NORMAIS DE VIBRAÇÃO DO CRISTAL DE L-GLUTAMINA

Neste capítulo são apresentadas as características estruturais da l-glutamina baseadas em dados de difração de Raios X e características vibracionais obtidas por medidas de espalhamento Raman à temperatura e pressão ambiente tanto no pó quanto num cristal. A partir destes resultados buscou-se identificar a maior parte dos modos normais de vibração da l-glutamina por comparação com trabalhos anteriores existentes na literatura.

3.1 Estrutura da l-glutamina

À temperatura e pressão ambiente a l-glutamina, cuja densidade é $1,54\text{g/cm}^3$, cristaliza-se em uma estrutura ortorrômbica pertencente ao grupo espacial $P2_12_12_1$ (D_2^4) com quatro unidades moleculares ($\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3$) com configurações zwitteriônica por célula unitária. [12] É interessante destacar que este é o mesmo grupo espacial no qual se cristalizam os aminoácidos l-alanina e l-asparagina monohidratada.[16,13] Os parâmetros de rede da l-glutamina possuem as seguintes dimensões: $a = 16,020 \text{ \AA}$, $b = 7,76 \text{ \AA}$ e $c = 5,10 \text{ \AA}$. A célula unitária da l-glutamina ao longo da direção cristalográfica c para pressão ambiente (0 GPa) é apresentada na Figura 3.1. [11]

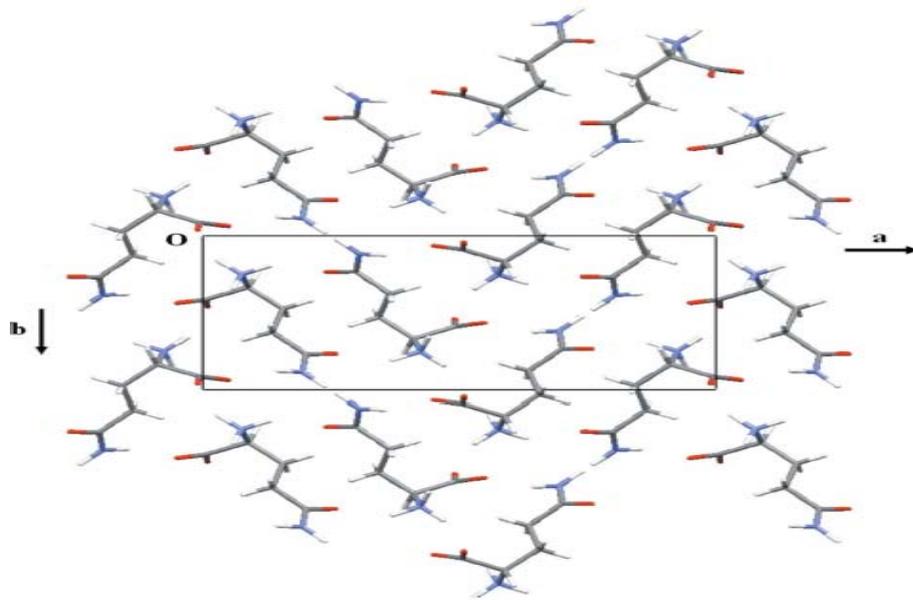


Figura 3.1 Célula unitária da l-glutamina ao longo da direção cristalográfica c para pressão ambiente (0 GPa).[11]

Na estrutura planar a molécula de l-glutamina se apresenta como aquela mostrada no diagrama da Figura 3.2 no qual estão presentes os comprimentos de ligação intramolecular e os ângulos de ligação. Um resumo dos dados das coordenadas atômicas e das distâncias intermoleculares é mostrado nas Tabelas 3.1 e 3.2.

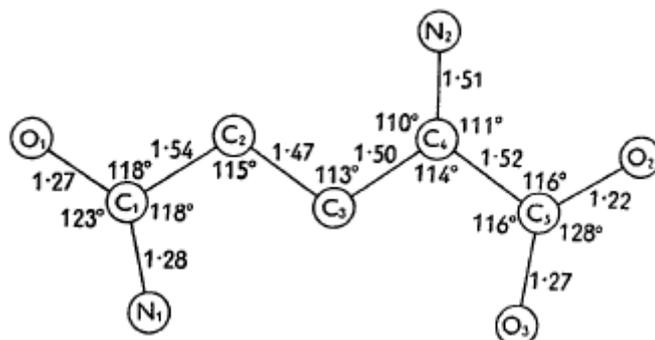


Figura 3.2 Comprimentos de ligações intramolecular e ângulos de ligações numa estrutura planar da l-glutamina.[9]

Tabela 3.1 Coordenadas atômicas apresentadas pelas moléculas de *l*-glutamina conforme a Ref. [9].

| <i>Átomo</i> | <i>x (Å)</i> | <i>y (Å)</i> | <i>z (Å)</i> | <i>Átomo</i> | <i>x (Å)</i> | <i>y (Å)</i> | <i>z (Å)</i> |
|----------------|--------------|--------------|--------------|-----------------|--------------|--------------|--------------|
| C ₁ | 0,77 | 1,82 | 3,55 | H ₁ | 2,09 | 3,25 | 2,65 |
| C ₂ | 1,83 | 2,93 | 3,60 | H ₂ | 2,71 | 2,57 | 3,97 |
| C ₃ | 1,46 | 4,11 | 4,39 | H ₃ | 1,17 | 3,78 | 5,34 |
| C ₄ | 2,56 | 5,13 | 4,49 | H ₄ | 0,58 | 4,51 | 3,96 |
| C ₅ | 3,87 | 4,56 | 5,01 | H ₅ | 2,21 | 5,87 | 5,11 |
| N ₁ | 0,89 | 0,91 | 2,66 | H ₆ | 0,59 | -0,06 | 2,34 |
| N ₂ | 2,76 | 5,80 | 3,15 | H ₇ | 1,82 | 0,72 | 2,05 |
| O ₁ | -0,14 | 1,82 | 4,43 | H ₈ | 1,79 | 5,80 | 2,67 |
| O ₂ | 3,87 | 4,19 | 6,17 | H ₉ | 3,25 | 6,59 | 3,48 |
| O ₃ | 4,78 | 4,38 | 4,14 | H ₁₀ | 3,20 | 5,16 | 2,38 |

Tabela 3.2 Distâncias intermoleculares típicas da *l*-glutamina em sua estrutura cristalina ortorrômbica. [9]

| | |
|------------------------------------|--------|
| N ₁ -O ₁ (B) | 2,94 Å |
| N ₁ -O ₃ (C) | 2,91 Å |
| N ₂ -O ₂ (A) | 2,85 Å |
| N ₂ -O ₂ (C) | 2,79 Å |
| N ₂ -O ₁ (B) | 2,91 Å |
| N ₂ -O ₃ (C) | 3,31 Å |
| N ₂ -N ₁ (A) | 3,46 Å |
| C ₃ -O ₁ (B) | 3,37 Å |

No cristal de l-glutamina existem cinco diferentes ligações de hidrogênio intermoleculares, três formadas com o grupo NH_3^+ e duas formadas com o grupo NH_2 . A Figura 3.3 indica um esquema representativo das ligações de hidrogênio de uma molécula de l-glutamina em sua estrutura cristalina, onde as linhas pontilhadas representam as interações de hidrogênio. É ainda interessante destacar que o grupo NH_3^+ forma ligações de hidrogênio bifurcado com dois diferentes átomos de oxigênio.

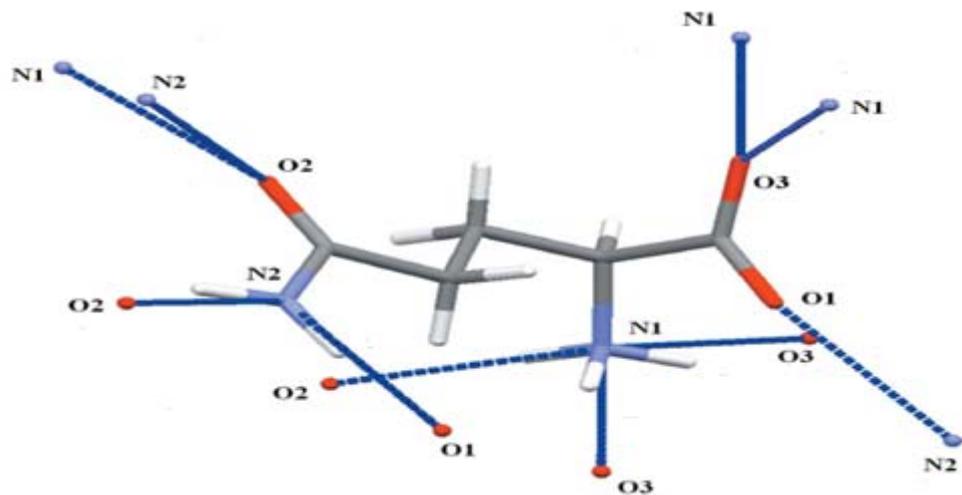


Figura 3.3 Esquema representativo das ligações de hidrogênio de uma molécula de l-glutamina em sua estrutura cristalina ortorrômbica. [11]

Pela Figura 3.4 observa-se que a estrutura da l-glutamina também pode ser apresentada como camadas de moléculas carregadas ao longo do eixo b. Dentro de cada camada as moléculas são unidas por meio de ligações de hidrogênio intracamadas: através de duas interações formadas pelos grupos NH_2 ($\text{N2} \cdots \text{O1}$ e $\text{N2} \cdots \text{O2}$) e $\text{N1} \cdots \text{O2}$, formada pelo grupo NH_3^+ . Além disso, existem duas ligações de hidrogênio intercamadas ($\text{N1} \cdots \text{O3}^{\text{i}}$ e $\text{N1} \cdots \text{O3}^{\text{ii}}$) conforme pode ser observado através da Figura 3.5.

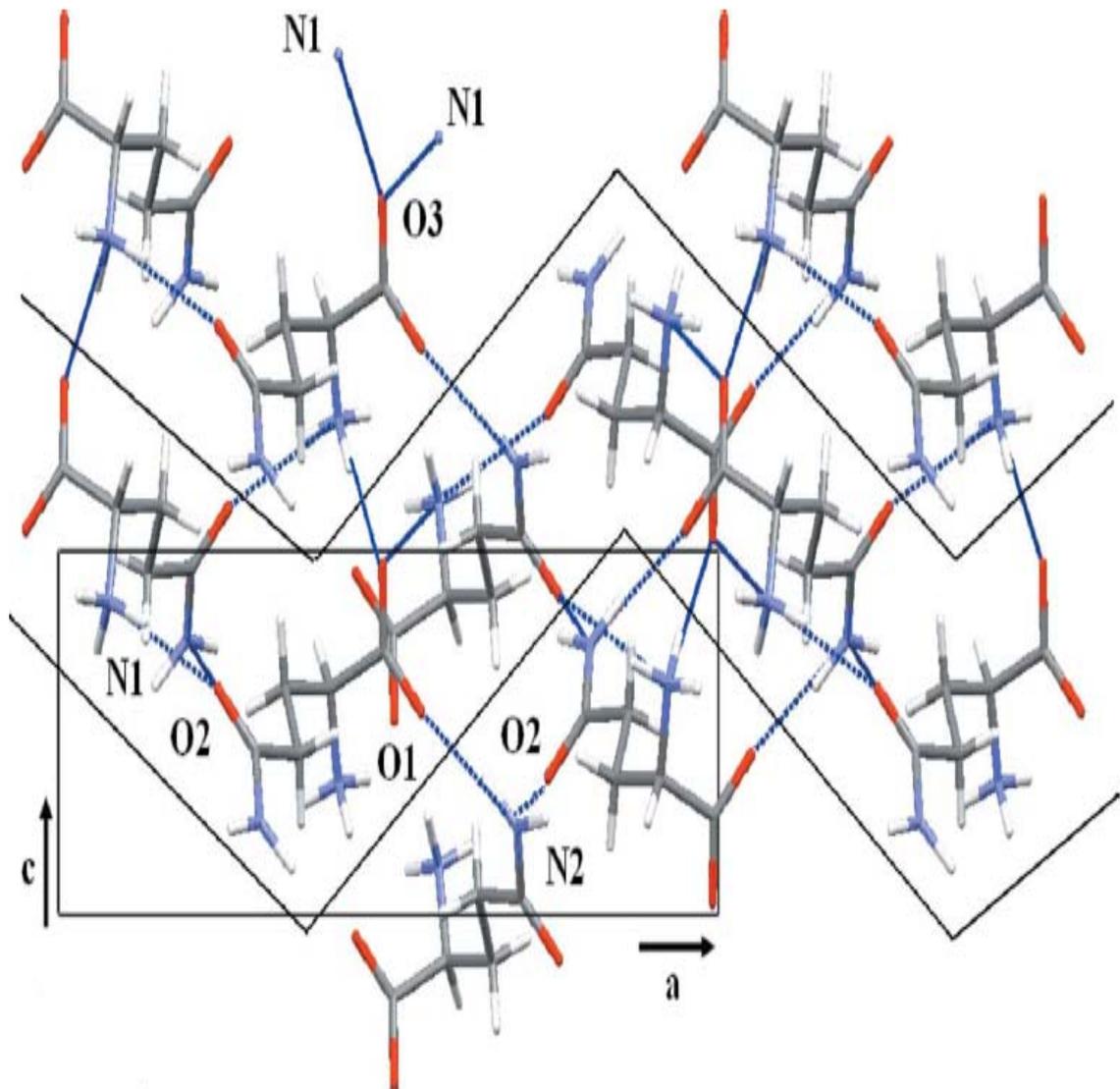


Figura 3.4 Vista ao longo do eixo b da estrutura cristalina da l-glutamina onde se observa que as moléculas estão conectadas via ligações de hidrogênio intracamadas. Estas ligações são representadas pelas linhas azuis mais espessas. [11]

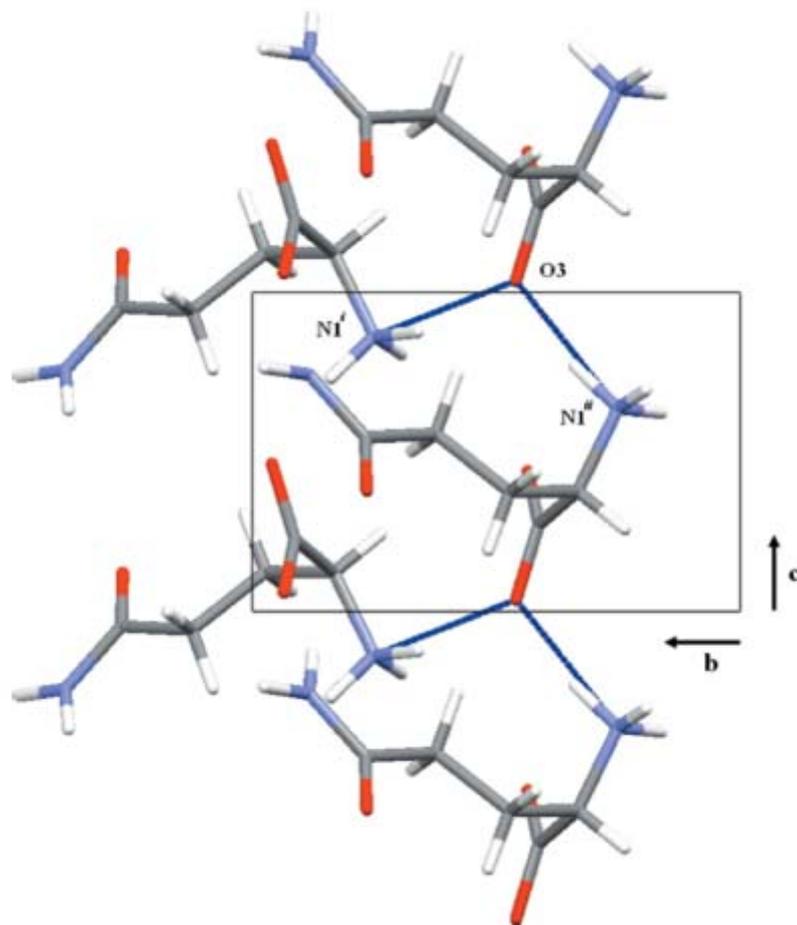


Figura 3.5 Vista ao longo do eixo *a* das ligações de hidrogênio intercadas da *l*-glutamina na estrutura cristalina ortorrômbica. [11]

Ainda relacionado à estrutura do cristal de *l*-glutamina existem interações mais fracas do tipo C–H•••O que são importantes para a estabilidade da estrutura. Como é descrito em diversos estudos este tipo de interação possui influência nas estruturas primárias e secundárias das proteínas. Por exemplo, sabe-se que interações C–H•••O são os tipos mais comuns de interações C–H•••O=C encontradas nas chamadas β sheets. [11]

Com relação às propriedades vibracionais da *l*-glutamina um estudo realizado na década de noventa do século passado apresentou resultados de espalhamento Raman e de infravermelho à temperatura ambiente. Fazendo uma análise tanto na *l*-glutamina hidrogenada quanto na *l*-glutamina deuterada ND_3^+ e ND^2 os autores da referência [12] conseguiram

realizar a identificação de todas as bandas que apareceram nos espectros Raman tanto do cristal quanto do pó.

As quatro moléculas na célula unitária da l-glutamina, cada uma delas com vinte átomos, originam 240 modos normais de vibração, sendo 3 acústicos e 237 óticos que são decompostos segundo as representações irredutíveis do grupo fator D_2 como:

$$\Gamma_{ot.} = 60A + 59(B_1 + B_2 + B_3). \quad (3.1)$$

Um resumo de todas as bandas Raman no pó observadas em um experimento de espalhamento Raman na l-glutamina com as respectivas identificações tanto no pó quanto no cristal (em duas polarizações), de acordo com a referência [12], é apresentado na Tabela 3.3.

Tabela 3.3a Frequências das bandas observadas nos espectros Raman da l-glutamina (região 100 cm^{-1} a 1000 cm^{-1}) no pó e no cristal.

| Polarizada | Polarizada | Pó | Denominação | Polarizada | Polarizada | Pó | Atribuições |
|-----------------------|-------------------|-----|-----------------------|-----------------------|-------------------|-----|-------------------------------------|
| $\parallel \parallel$ | $\perp \parallel$ | | | $\parallel \parallel$ | $\perp \parallel$ | | |
| | | 98 | Modo da rede | 476 | 476 | 475 | $\tau(\text{NH}_3^+)$ |
| | 108 | 107 | Modo da rede | 543 | 542 | 541 | $\tau(\text{NH}_2)$ |
| | | 124 | Modo da rede | | 561 | 560 | $\delta(\text{CONH}_2)$ |
| 133 | 133 | 132 | Modo da rede | 625 | 622 | 622 | $\delta(\text{CONH}_2)$ |
| | | 159 | $\tau(\text{skel})$ | | 654 | 654 | $\gamma(\text{CCN})$ |
| | 185 | 184 | $\tau(\text{CO}_2^-)$ | 777 | 776 | 776 | $\delta(\text{CH}_2)_{\text{rock}}$ |
| 210 | 212 | 210 | $\tau(\text{skel})$ | | | 807 | $\gamma(\text{OCC})$ |
| | 291 | 291 | $\delta(\text{skel})$ | 848 | 848 | 849 | $\nu(\text{CC})$ |
| 343 | 345 | 343 | $\delta(\text{skel})$ | 894 | 896 | 895 | $\delta(\text{CH}_2)_{\text{rock}}$ |

| | | | | | | | |
|-----|-----|-----|--------------------------|------|-----|------|------------|
| 431 | 431 | 432 | δ (<i>skel</i>) | 923 | 924 | 925 | ν (CC) |
| 452 | 453 | 452 | δ (<i>skel</i>) | 1000 | 999 | 1000 | ν (CC) |

Tabela 3.3b Frequência das bandas Raman observadas nos espectros Raman da l-glutamina (região 1000 cm^{-1} a 3500 cm^{-1}) tanto no pó quanto no cristal em duas polarizações.

| Polarizada $\parallel \parallel$ | Polarizada $\perp \parallel$ | Pó | Atribuições | Polarizada $\parallel \parallel$ | Polarizada $\perp \parallel$ | Pó | Atribuições |
|-------------------------------------|---------------------------------|------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|------|--------------------------------------------|
| 1052 | 1052 | 1051 | ν (CC) | | 1589 | 1590 | δ (NH ₂) |
| 1097 | 1097 | 1094 | ν (CN) | 1603 | 1603 | 1604 | δ (NH ₃ ⁺) |
| | 1105 | 1104 | δ (NH ₂), <i>rock</i> | 1622 | 1623 | 1622 | ν_a (CO ₂ ⁻) |
| 1133 | 1134 | 1133 | δ (NH ₃ ⁺), <i>rock</i> | | 1646 | 1645 | δ_a (NH ₃ ⁺) |
| 1164 | 1167 | 1163 | δ (NH ₃ ⁺), <i>rock</i> | | 1685 | 1690 | ν (C=O) |
| | 1205 | 1203 | δ (CH ₂), <i>twist</i> | 2931 | 2931 | 2933 | ν_s (CH ₂) |
| | 1260 | 1259 | δ (CH ₂), <i>twist</i> | 2950 | 2950 | 2952 | ν (CH) |
| 1285 | 1283 | 1283 | δ (CH ₂), <i>wag</i> | 2959 | 2958 | 2962 | ν_s (CH ₂) |
| 1308 | 1308 | 1307 | δ (CH ₂), <i>wag</i> | 2988 | 2990 | 2991 | ν_a (CH ₂) |
| 1331 | 1331 | 1330 | δ (CH) | | 3180 | 3176 | ν_s (NH ₂) |
| 1357 | 1358 | 1358 | δ (CH) | 3206 | 3209 | 3210 | ν_s (NH ₃ ⁺) |
| 1413 | 1415 | 1415 | ν (CN) | | 3280 | 3273 | ν_a (NH ₃ ⁺) |
| 1424 | | | ν (CN ₂) | | 3317 | 3313 | ν_a (NH ₃ ⁺) |
| 1449 | 1450 | 1449 | δ (CH ₂) | | 3406 | 3403 | ν_a (NH ₂) |
| 1498 | 1497 | 1496 | δ (NH ₃ ⁺) | | | | |

δ - dobramento; ν - estiramento; γ - deformação fora do plano; τ - torção; a- assimétrico; s- simétrico.

3.2 Espectros de l-glutamina (pó) à temperatura e pressão ambiente

Os experimentos de espectroscopia Raman na l-glutamina foram realizados na região espectral entre 70 cm^{-1} e 3500 cm^{-1} , com um laser emitindo em $\lambda = 5145\text{Å}$, com o objetivo de identificar todas as bandas Raman observadas. Nesta seção se apresenta a classificação dos modos normais de vibração da l-glutamina tal como visto nos espectros Raman baseando-se principalmente no trabalho da referência [12]. Os espectros são mostrados a seguir.

3.2.1 Região espectral entre 30 cm^{-1} e 700 cm^{-1}

A Figura 3.6 apresenta o espectro Raman de um cristal de l-glutamina no intervalo espectral de 30 cm^{-1} a 700 cm^{-1} . Nesta região foram observados vinte e dois modos que estão listados na Tabela 3.4. Nos parágrafos a seguir os vários modos normais de vibração serão identificados por números entre parênteses.

Tabela 3.4 Modos normais de vibração do cristal de l-glutamina ativos no Raman registrados em condições ambiente no intervalo de frequência de 30 cm^{-1} a 700 cm^{-1} .

| <i>Modo</i> | <i>Número de onda (cm^{-1})</i> | <i>Identificação</i> |
|-------------|-----------------------------------------------------|----------------------|
| 1 | 50 | Modo da rede |
| 2 | 60 | Modo da rede |
| 3 | 70 | Modo da rede |

| | | |
|----|-----|----------------------------------------|
| 4 | 77 | Modo da rede |
| 5 | 87 | Modo da rede |
| 6 | 99 | Modo da rede |
| 7 | 107 | Modo da rede |
| 8 | 125 | Modo da rede |
| 9 | 137 | Modo da rede |
| 10 | 160 | τ (<i>skel</i>) |
| 11 | 185 | τ (CO ₂ ⁻) |
| 12 | 211 | τ (<i>skel</i>) |
| 13 | 240 | |
| 14 | 291 | δ (<i>skel</i>) |
| 15 | 344 | δ (<i>skel</i>) |
| 16 | 432 | δ (<i>skel</i>) |
| 17 | 453 | δ (<i>skel</i>) |
| 18 | 477 | τ (NH ₃ ⁺) |
| 19 | 541 | τ (NH ₂) |
| 20 | 560 | δ (CONH ₂) |
| 21 | 623 | δ (CONH ₂) |
| 22 | 656 | γ (CCN) |

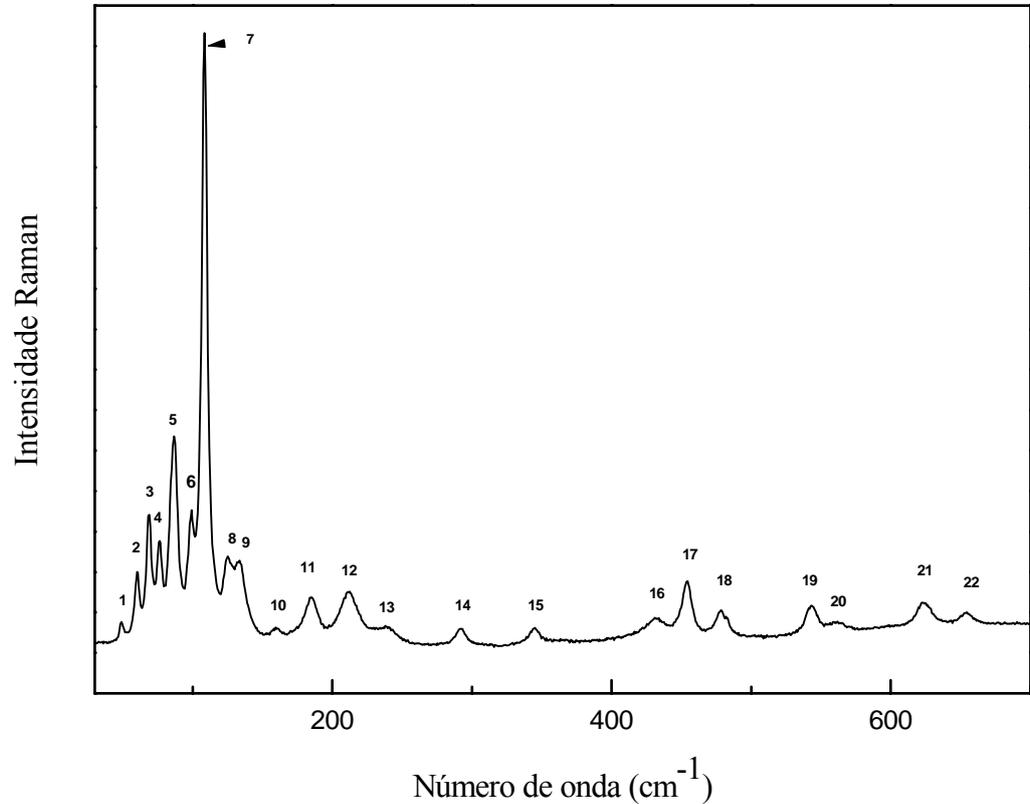


Figura 3.6 Espectro Raman de *l*-glutamina (pó) à temperatura e pressão ambiente na região espectral entre 30 cm^{-1} e 700 cm^{-1} .

Em geral para os cristais de aminoácidos se espera observar na região entre aproximadamente 30 cm^{-1} e 200 cm^{-1} os modos externos ou modos da rede. De fato, acredita-se que as bandas que se apresentam nesta região estão associadas com as vibrações da rede como um todo, incluindo-se aí tanto os modos translacionais quanto os modos rotacionais. A título de ilustração os modos externos foram classificados em $\omega < 200\text{ cm}^{-1}$ nos cristais de *l*-valina [17], de *l*-isoleucina [15], da leucina [14], entre outros. No caso da *l*-glutamina todos os modos localizados com número de onda inferior à 160 cm^{-1} foram classificados como modos da rede.

Porém não há nenhuma dificuldade de que modos internos associados a certas ligações moleculares também possam aparecer nesta região de $\omega < 200 \text{ cm}^{-1}$. No caso da l-glutamina se encontra uma torção do esqueleto, τ (skel), na banda posicionada em 160 cm^{-1} (10).

A banda localizada em 185 cm^{-1} (11) foi identificada como uma torção do CO_2^- , τ (CO_2^-); de uma forma geral, nos cristais de aminoácidos, é a região entre 180 cm^{-1} e 200 cm^{-1} que apresenta os modos associados à τ (CO_2^-). A banda posicionada em 211 cm^{-1} (12) foi identificada como uma torção do esqueleto, τ (skel). Os modos em 291 cm^{-1} (14), 344 cm^{-1} (15), 432 cm^{-1} (16) e 453 cm^{-1} (17) foram identificados como dobramento do esqueleto, δ (skel).

Os modos observados em 477 cm^{-1} (18) e 541 cm^{-1} (19) são identificados como torção do NH_3^+ , τ (NH_3^+), e torção do NH_2 , τ (NH_2), respectivamente e os modos em 560 cm^{-1} (20) e 623 cm^{-1} (21) como dobramento do CONH_2 , $\delta(\text{CONH}_2)$. O último modo (22) observado nesta primeira região é classificado como uma deformação fora do plano de CCN , $\gamma(\text{CCN})$, localizado em 656 cm^{-1} . [12]

3.2.2 Região espectral entre 750 cm^{-1} e 1750 cm^{-1}

A Figura 3.7 apresenta o espectro Raman do cristal de l-glutamina à temperatura e pressão ambientes na região espectral entre 750 cm^{-1} e 1750 cm^{-1} . Nesta região foi observado o maior número de modos, vinte e cinco modos, que estão listados na Tabela 3.5.

Tabela 3.5 Modos normais de vibração do cristal de l-glutamina ativos no Raman registrados em condições ambiente no intervalo de frequência de 750 cm^{-1} a 1750 cm^{-1} .

| <i>Modo</i> | <i>Número de onda (cm^{-1})</i> | <i>Identificação</i> |
|-------------|-----------------------------------------------------|------------------------------|
| 23 | 778 | $\delta(\text{CH}_2)$, rock |
| 24 | 808 | $\gamma(\text{OCC})$ |

| | | |
|----|------|---------------------------------------|
| 25 | 848 | $\nu(\text{CC})$ |
| 26 | 895 | $\delta(\text{CH}_2), \textit{rock}$ |
| 27 | 926 | $\nu(\text{CC})$ |
| 28 | 1002 | $\nu(\text{CC})$ |
| 29 | 1051 | $\nu(\text{CC})$ |
| 30 | 1097 | $\nu(\text{CN})$ |
| 31 | 1106 | $\delta(\text{NH}_2), \textit{rock}$ |
| 32 | 1134 | $\delta(\text{NH}_3^+) \textit{rock}$ |
| 33 | 1165 | $\delta(\text{NH}_3^+) \textit{rock}$ |
| 34 | 1203 | $\delta(\text{CH}_2), \textit{twist}$ |
| 35 | 1260 | $\delta(\text{CH}_2), \textit{twist}$ |
| 36 | 1285 | $\delta(\text{CH}_2) \textit{wag}$ |
| 37 | 1308 | $\delta(\text{CH}_2) \textit{wag}$ |
| 38 | 1330 | $\delta(\text{CH})$ |
| 39 | 1357 | $\delta(\text{CH})$ |
| 40 | 1419 | $\nu(\text{CN})$ |
| 41 | 1450 | $\delta(\text{CH}_2)$ |
| 42 | 1498 | $\delta_s(\text{NH}_3^+)$ |
| 43 | 1590 | $\delta(\text{NH}_2)$ |
| 44 | 1604 | $\delta_a(\text{NH}_3^+)$ |
| 45 | 1623 | $\nu_a(\text{CO}_2^-)$ |
| 46 | 1646 | $\delta_a(\text{NH}_3^+)$ |
| 47 | 1689 | $\nu(\text{CO})$ |

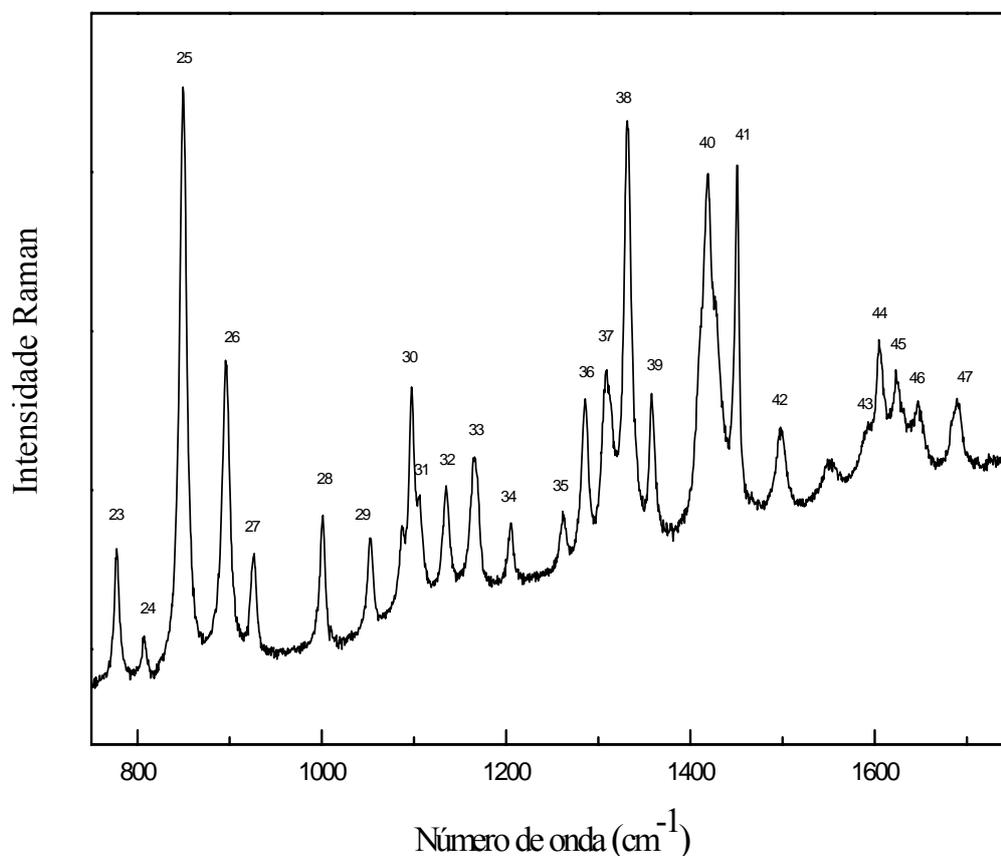


Figura 3.7 Espectro Raman de *l*-glutamina (pó) à temperatura e pressão ambiente na região espectral entre 750 cm^{-1} e 1750 cm^{-1} .

As bandas posicionadas em 778 cm^{-1} (23) e em 895 cm^{-1} (26) foram identificadas como dobramento do tipo *rocking* do CH_2 , $\delta(\text{CH}_2)$ e as bandas em 1134 cm^{-1} (32) e 1165 cm^{-1} (33) foram assinaladas como dobramento do tipo *rocking* do NH_3^+ , $\delta(\text{NH}_3^+)$. Um dobramento do tipo *rocking* do NH_2 , $\delta(\text{NH}_2)$ aparece com a banda posicionada em 1106 cm^{-1} (31).

Alguns modos *stretching* ou estiramento aparecem nesta região. O pico mais intenso desta região, identificado como estiramento C-C, $\nu(\text{CC})$, é observado na posição 848 cm^{-1} (25). Além deste as bandas em 926 cm^{-1} (27), 1002 cm^{-1} (28) e 1051 cm^{-1} (29) também recebem a mesma identificação. Já as bandas em 1097 cm^{-1} (29) e 1419 cm^{-1} (40) estão associadas a um estiramento do C-N, $\nu(\text{CN})$, conforme a referência [12].

A banda observada com frequência em 808 cm^{-1} (24) é atribuída a uma deformação OCC fora do plano, $\gamma(\text{OCC})$. Dobramentos do tipo *twisting* do CH_2 , $\delta(\text{CH}_2)$, são atribuídas às

bandas em 1203 cm^{-1} (34) e 1260 cm^{-1} (35), bandas estas que apresentam baixa intensidade. Já os dobramentos do tipo *wagging* do CH_2 , $\delta(\text{CH}_2)$, são associadas às bandas em 1285 cm^{-1} (36) e 1308 cm^{-1} (37).

As bandas de frequência 1330 cm^{-1} (38), observada com média intensidade, e 1357 cm^{-1} (39), observada com forte intensidade, são identificadas como dobramento do CH, $\delta(\text{CH})$. O modo de dobramento simétrico do NH_3^+ , $\delta_s(\text{NH}_3^+)$, foi identificado na banda posicionada em 1498 cm^{-1} (42), enquanto que o modo de dobramento assimétrico do NH_3^+ foi localizado nas bandas posicionadas em 1604 cm^{-1} (44) e em 1646 cm^{-1} (46).

As últimas bandas desta região são classificadas como modos de dobramento do CH_2 , $\delta(\text{CH}_2)$, encontrada em 1450 cm^{-1} (41), com forte intensidade; dobramento do NH_2 , $\delta(\text{NH}_2)$, posicionada em 1590 cm^{-1} (43); estiramento assimétrico do CO_2^- , $\nu_a(\text{CO}_2^-)$, localizada em 1623 cm^{-1} (45) e estiramento do C=O, $\nu(\text{C=O})$ identificado com a banda de frequência 1689 cm^{-1} (47).

3.2.3 Região espectral entre 2730 cm^{-1} e 3500 cm^{-1}

A Figura 3.8 apresenta o espectro Raman do cristal de l-glutamina à temperatura e pressão ambientes na região espectral entre 2730 cm^{-1} e 3500 cm^{-1} . Nesta, considerada região de alta frequência, foram observados onze modos de vibração que estão listados na Tabela 3.6.

Tabela 3.6 Modos normais de vibração ativos no Raman do cristal de l-glutamina registrados em condições ambiente no intervalo de 2730 cm^{-1} a 3500 cm^{-1} .

| <i>Modo</i> | <i>Número de onda (cm^{-1})</i> | <i>Identificação</i> |
|-------------|-----------------------------------------------------|----------------------|
| 48 | 2884 | |
| 49 | 2933 | $\nu_s(\text{CH}_2)$ |
| 50 | 2952 | $\nu(\text{CH})$ |

| | | |
|----|------|------------------------|
| 51 | 2962 | $\nu_s(\text{CH}_2)$ |
| 52 | 2990 | $\nu_a(\text{CH}_2)$ |
| 53 | 3180 | $\nu_a(\text{NH}_2)$ |
| 54 | 3206 | $\nu_s(\text{NH}_3^+)$ |
| 55 | 3218 | |
| 56 | 3280 | $\nu_a(\text{NH}_3^+)$ |
| 57 | 3312 | $\nu_a(\text{NH}_3^+)$ |
| 58 | 3404 | $\nu_a(\text{NH}_2)$ |

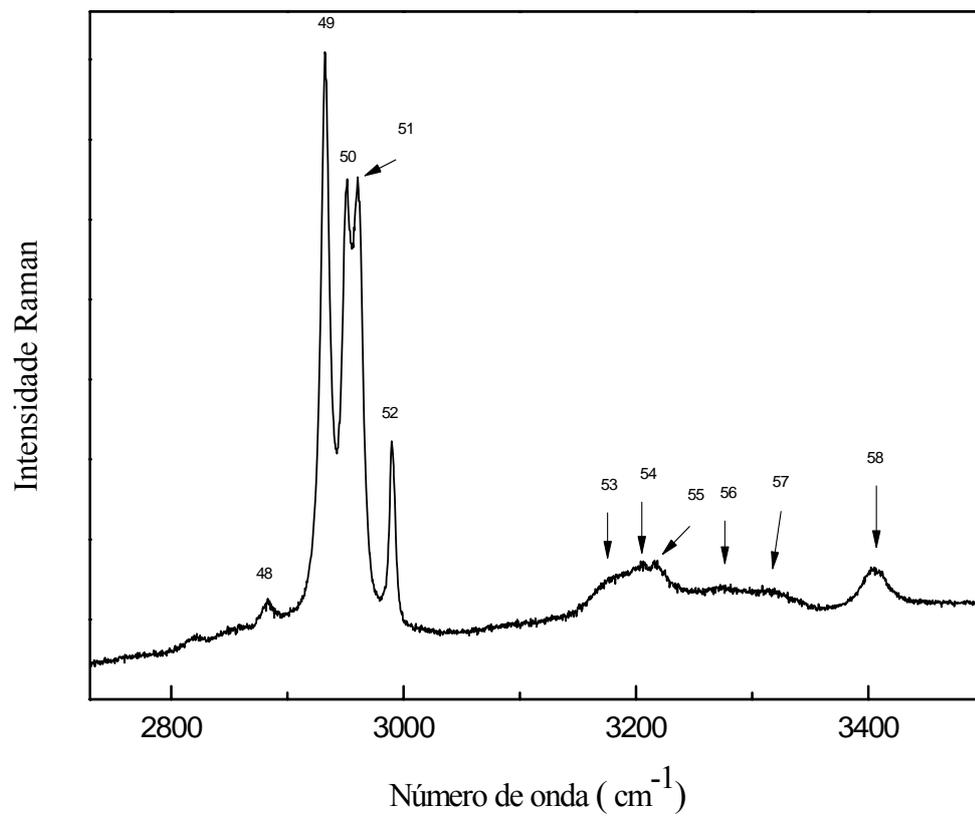


Figura 3.8 Espectro Raman de l-glutamina (pó) à temperatura e pressão ambiente na região espectral entre 2730 cm^{-1} e 3500 cm^{-1} .

As bandas observadas nesta região são associadas à estiramentos de várias unidades. Encontrou-se o modo de estiramento do CH, $\nu(\text{CH})$, em 2952 cm^{-1} (50); o modo de estiramento simétrico do CH_2 , $\nu_s(\text{CH}_2)$, foi associado às bandas de frequência 2933 cm^{-1} (49) e 2962 cm^{-1} (51) e o modo de estiramento assimétrico do CH_2 , $\nu_a(\text{CH}_2)$, à banda observada na posição 2990 cm^{-1} (52).

As bandas posicionadas em 3280 cm^{-1} (56) e em 3312 cm^{-1} (57) foram identificadas como estiramento assimétrico do NH_3^+ , $\nu_a(\text{NH}_3^+)$, e a banda posicionada em 3206 cm^{-1} (54) como estiramento simétrico do NH_3^+ , $\nu_s(\text{NH}_3^+)$. Finalmente, a banda observada em 3180 cm^{-1} (53) foi identificada com um estiramento simétrico do NH_2 , $\nu_s(\text{NH}_2)$, e a banda observada em 3404 cm^{-1} (58) foi associada um estiramento assimétrico, $\nu_a(\text{NH}_2)$, do NH_2 .

3.3 Espectros de cristais de l-glutamina à temperatura e pressão ambiente

A título de completude nas Figuras 3.9 e 3.10 são apresentados os espectros Raman no cristal de l-glutamina em duas geometrias de espalhamento; de maneira que uma discussão mais detalhada sobre os mesmos encontra-se no capítulo cinco desta dissertação.

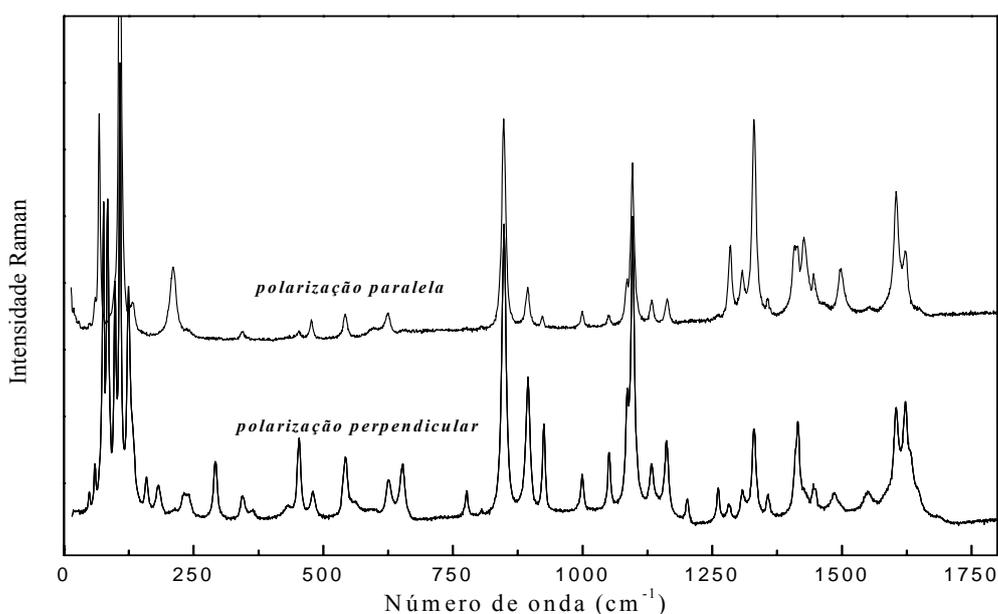


Figura 3.9 Espectros Raman do cristal de l-glutamina à temperatura e pressão ambiente na região espectral entre 0 cm^{-1} e 1800 cm^{-1} em duas diferentes geometrias de espalhamento.

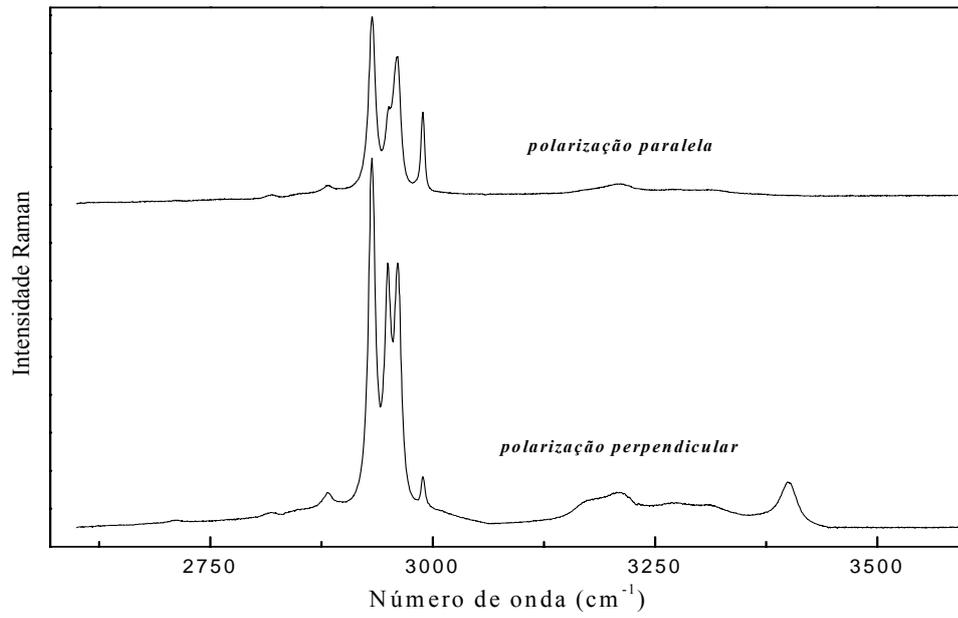


Figura 3.10 Espectros Raman do cristal de l-glutamina à temperatura e pressão ambiente na região espectral entre 2570 cm⁻¹ e 3600 cm⁻¹ em duas diferentes geometrias de espalhamento.

4 PROPRIEDADES VIBRACIONAIS DO CRISTAL DE L-GLUTAMINA EM FUNÇÃO DA PRESSÃO HIDROSTÁTICA

Neste capítulo são apresentados os resultados de experimentos Raman no cristal de l-glutamina em função da pressão hidrostática. Discute-se o comportamento dos modos Raman do cristal de l-glutamina com a pressão hidrostática e se apresentam os coeficientes dos ajustes lineares do número de onda de todos os modos em função da pressão.

Os experimentos foram realizados na região espectral entre 40 cm^{-1} e 3550 cm^{-1} e no intervalo de pressão hidrostática entre 0 GPa e 5,8 GPa para nove diferentes valores de pressão em um experimento de compressão. Os espectros obtidos fornecem indícios de que o cristal de l-glutamina sofre uma transição de fase no intervalo de pressão estudado. A seguir apresentam-se os resultados, com a discussão separada em quatro seções.

4.1 Região espectral entre 40 cm^{-1} e 340 cm^{-1}

A Figura 4.1 mostra o espectro Raman do cristal de l-glutamina na região espectral entre 40 cm^{-1} a 340 cm^{-1} . Daqui por diante o termo pressão hidrostática será substituído apenas pelo termo pressão. Para a discussão das várias bandas que aparecem nos espectros as mesmas serão denotadas por números inteiros.

De uma forma geral as bandas que aparecem com frequências inferiores a 200 cm^{-1} são associadas a modos externos ou modos da rede. Estes modos são bastante sensíveis a mudanças de simetria da célula unitária. Assim, quando ocorre uma transição de fase estrutural em cristais orgânicos, modificações nos espectros Raman nesta região espectral geralmente são observadas. No caso da l-glutamina, inicialmente nota-se que as bandas com frequência abaixo de 150 cm^{-1} estão entre as mais intensas do espectro, correspondendo a

algumas vibrações da rede. Além disso, de uma maneira geral, a intensidade das bandas nesta região não permanece constante.

Dentre as modificações mais perceptíveis pode-se destacar uma descontinuidade na frequência do modo associado à banda de número 1, bem como na da banda de número 5. Além disso, se observa o aparecimento de uma nova banda entre 3,0 GPa e 3,1 GPa, entre os picos de números 3 e 4. Observe que em torno de 1,4 GPa o pico de número 2 desaparece; em torno de 0,9 GPa e 1,0 GPa as bandas de números 9 e 11 desaparecem, e em torno de 2,9 GPa a banda de número 8 também desaparece. Todas essas mudanças são um forte indicativo de que está ocorrendo uma transição de fase.

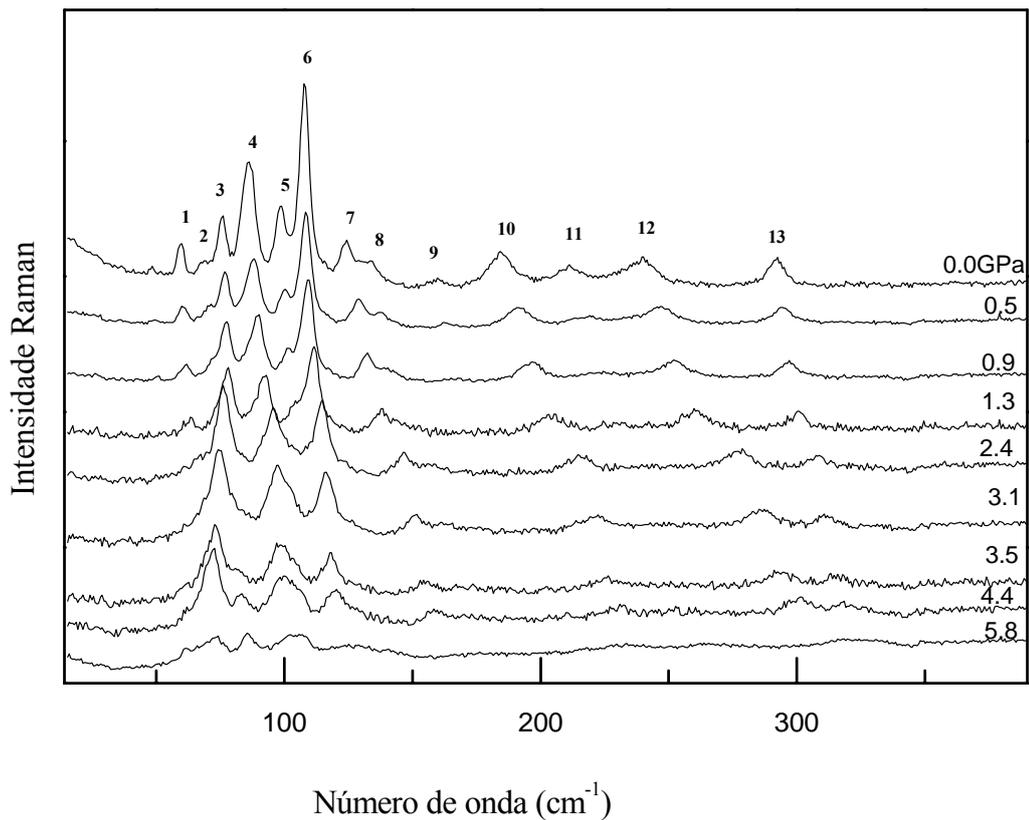


Figura 4.1 Espectros Raman do cristal de l-glutamina para diversos valores de pressão na região espectral entre 40 cm^{-1} e 340 cm^{-1} .

A Figura 4.2 apresenta a evolução das frequências dos modos Raman com a pressão na região espectral entre 40 cm^{-1} e 340 cm^{-1} bem como ajustes lineares do tipo $\omega = \omega_0 + \alpha P$ dos pontos experimentais desta região. Nesta expressão, ω é a frequência do modo observado à pressão ambiente, ω_0 é o ponto do eixo vertical que é cortado pelo ajuste linear, α é o coeficiente de ajuste linear e P a pressão analisada. Os coeficientes dos ajustes lineares dos modos Raman desta região são apresentados na Tabela 4.1.

Da Figura 4.2 é possível notar que os modos associados as bandas de números 4, 6, 7, 10, 12 e 13 sofrem um deslocamento para a região de maior número de onda (*blue shift*) com o aumento da pressão. Ao analisar a Tabela 4.1 é possível constatar que as bandas com valores de frequência menores que 110 cm^{-1} são pouco dependentes do valor da pressão, enquanto que as outras bandas desta mesma região possuem grande dependência da pressão aplicada.

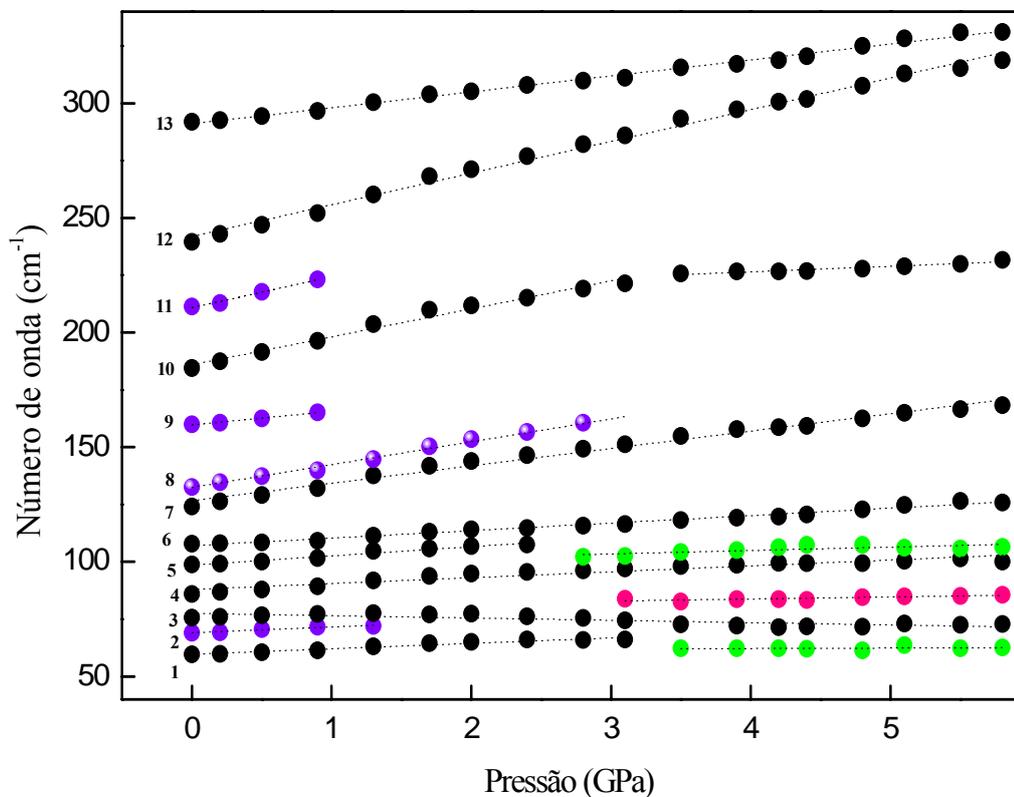


Figura 4.2 Gráfico do número de onda versus pressão na região espectral entre 40 cm^{-1} e 340 cm^{-1} .

Tabela 4.1 Coeficientes dos ajustes lineares ($\omega = \omega_0 + \alpha P$) para os modos Raman do cristal de l-glutamina em função da pressão hidrostática na região espectral entre 40 cm^{-1} e 340 cm^{-1} .

| <i>Modo</i> | $\omega(\text{cm}^{-1})$ | $\omega_0(\text{cm}^{-1})$ | $d\omega/dP (\text{cm}^{-1}/\text{GPa})$ | <i>Identificação</i> |
|-------------|--------------------------|----------------------------|------------------------------------------|----------------------------|
| 1 | 60 | 59, 70 | 2, 37 | Modo da rede |
| 2 | 70 | 69, 08 | 2, 50 | Modo da rede |
| 3 | 76 | 77, 52 | -1, 00 | Modo da rede |
| 4 | 86 | 87, 91 | 2, 57 | Modo da rede |
| 5 | 99 | 98, 55 | 4, 01 | Modo da rede |
| 6 | 108 | 107, 03 | 3, 27 | Modo da rede |
| 7 | 124 | 126, 68 | 7, 58 | Modo da rede |
| 8 | 132 | 132, 44 | 9, 96 | Modo da rede |
| 9 | 160 | 159,7 | 6 | τ (skel) |
| 10 | 185 | 185, 89 | 12, 22 | τ (CO_2^-) |
| 11 | 211 | 210, 84 | 13, 52 | τ (skel) |
| 12 | 240 | 241, 91 | 13, 81 | |
| 13 | 292 | 291, 05 | 6, 95 | δ (skel) |

4.2 Região espectral entre 400 cm^{-1} e 690 cm^{-1}

A Figura 4.3 apresenta espectros Raman do cristal de l-glutamina na região espectral entre 400 cm^{-1} e 690 cm^{-1} . Nesta região foram observadas seis bandas; destas, a de maior intensidade, identificada pelo número 14, é associada a um dobramento do esqueleto, δ (skel).

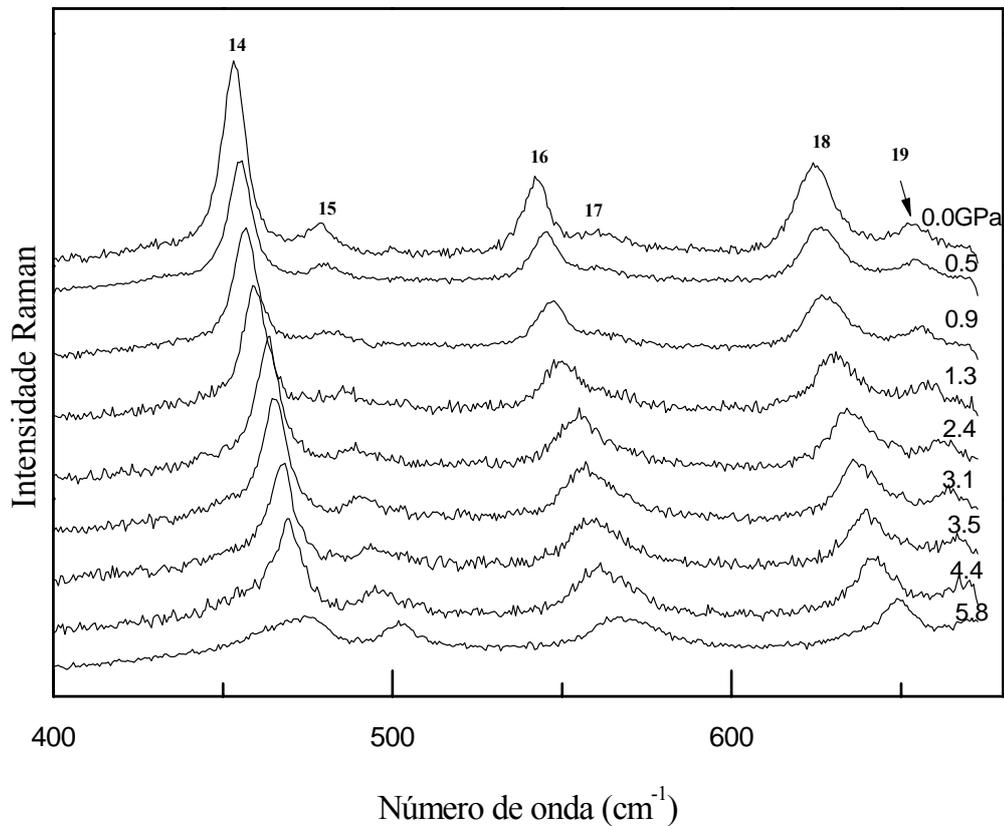


Figura 4.3 Espectros Raman do cristal de *l*-glutamina para diversos valores de pressão na região espectral entre 400 cm^{-1} e 690 cm^{-1} .

Observando a Figura 4.3, é possível notar que todas as bandas perdem intensidade com o aumento da pressão; com destaque para a banda de número 16 que apresenta um aumento em sua largura de linha a mais alta pressão. No entanto, de uma maneira geral não ocorrem mudanças significativas nesta região espectral.

Na Figura 4.4 se apresenta a evolução dos modos Raman com a pressão na região espectral entre 400 cm^{-1} e 690 cm^{-1} bem como o ajuste linear do tipo $\omega = \omega_0 + \alpha P$ dos pontos experimentais desta região e na Tabela 4.2 são divulgados os coeficientes dos ajustes lineares dos modos Raman desta região.

De uma maneira geral, da Figura 4.4, é possível interpretar que os modos são bem comportados, no sentido de não aparecerem descontinuidades. Além disso, de todas as bandas a única que desaparece com o aumento da pressão é a banda de número 17 identificada como modo de dobramento do CONH_2 , δ (CONH_2). Entretanto, deve-se levar em consideração o fato de que a banda de número 17, mesmo no espectro em $P = 0,0$ GPa, já possui uma intensidade bastante reduzida.

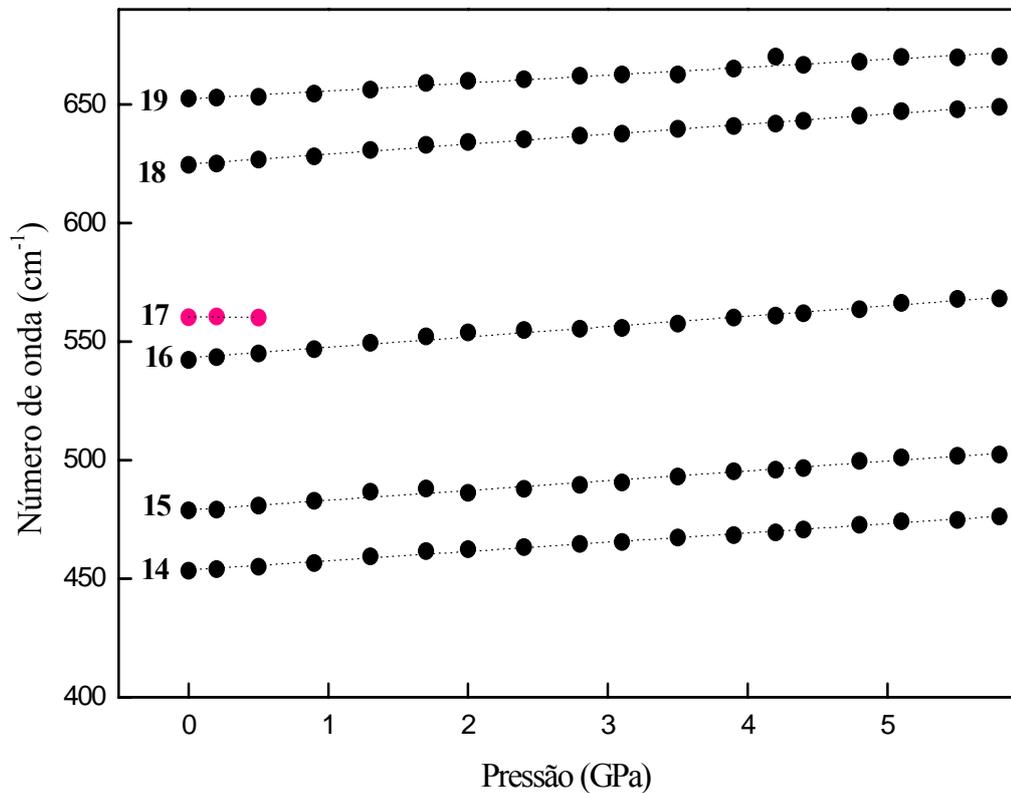


Figura 4.4 Gráfico do número de onda versus pressão na região espectral entre 400 cm^{-1} e 690 cm^{-1} .

Tabela 4.2 Coeficientes dos ajustes lineares ($\omega = \omega_0 + \alpha P$) para os modos Raman do cristal de l-glutamina em função da pressão na região espectral entre 400 cm^{-1} e 690 cm^{-1} .

| <i>Modo</i> | $\omega(\text{cm}^{-1})$ | $\omega_0(\text{cm}^{-1})$ | $d\omega/dP (\text{cm}^{-1}/\text{GPa})$ | <i>Identificação</i> |
|-------------|--------------------------|----------------------------|------------------------------------------|-------------------------|
| 14 | 453 | 453,67 | 3,90 | $\delta(\text{skel})$ |
| 15 | 479 | 478,96 | 4,12 | $\tau(\text{NH}_3^+)$ |
| 16 | 542 | 543,2 | 4,36 | $\tau(\text{NH}_2)$ |
| 17 | 560 | 560,37 | -0,31 | $\delta(\text{CONH}_2)$ |
| 18 | 624 | 624,81 | 4,21 | $\delta(\text{CONH}_2)$ |
| 19 | 652 | 652,32 | 3,33 | $\gamma(\text{CCN})$ |

4.3 Região espectral entre 700 cm^{-1} e 1200 cm^{-1}

A Figura 4.5 apresenta o espectro Raman do cristal de l-glutamina na região espectral entre 700 cm^{-1} a 1200 cm^{-1} ; nesta região foram observadas onze bandas. Dentre estas bandas, quatro estão relacionadas ao modo de estiramento CC, $\nu(\text{CC})$, incluindo a banda mais intensa, assinalada com o número 22. Com o aumento da pressão, como acontece com a maior parte dos modos deste material, as frequências aumentam.

Nesta região, assim como na anterior, todas as bandas perdem intensidade com o aumento da pressão. Dentre estas se destacam: a banda assinalada com o número 21 que foi associada a uma deformação fora do plano do OCC, $\gamma(\text{OCC})$, que desaparece em torno de 0,9 GPa; e as bandas assinaladas com os números 29 e 30, associadas ao modo de dobramento do tipo *rocking* das unidades NH_3^+ e NH_2 respectivamente, que no espectro à pressão ambiente a intensidade da banda de número 30 se apresenta maior que a da banda de número 29, no

entanto no espectro a mais alta pressão ocorre uma mudança em suas intensidades relativas de maneira que a banda de número 29 apresenta maior intensidade que a banda de número 30.

Na Figura 4.6 se apresenta a evolução da frequência dos modos Raman com a pressão na região espectral de 700 cm^{-1} a 120 cm^{-1} bem como o ajuste linear do tipo $\omega = \omega_0 + \alpha P$ dos pontos experimentais nesta região. Finalmente na Tabela 4.3 são apresentados os coeficientes dos ajustes lineares das frequências dos modos Raman nesta mesma região.

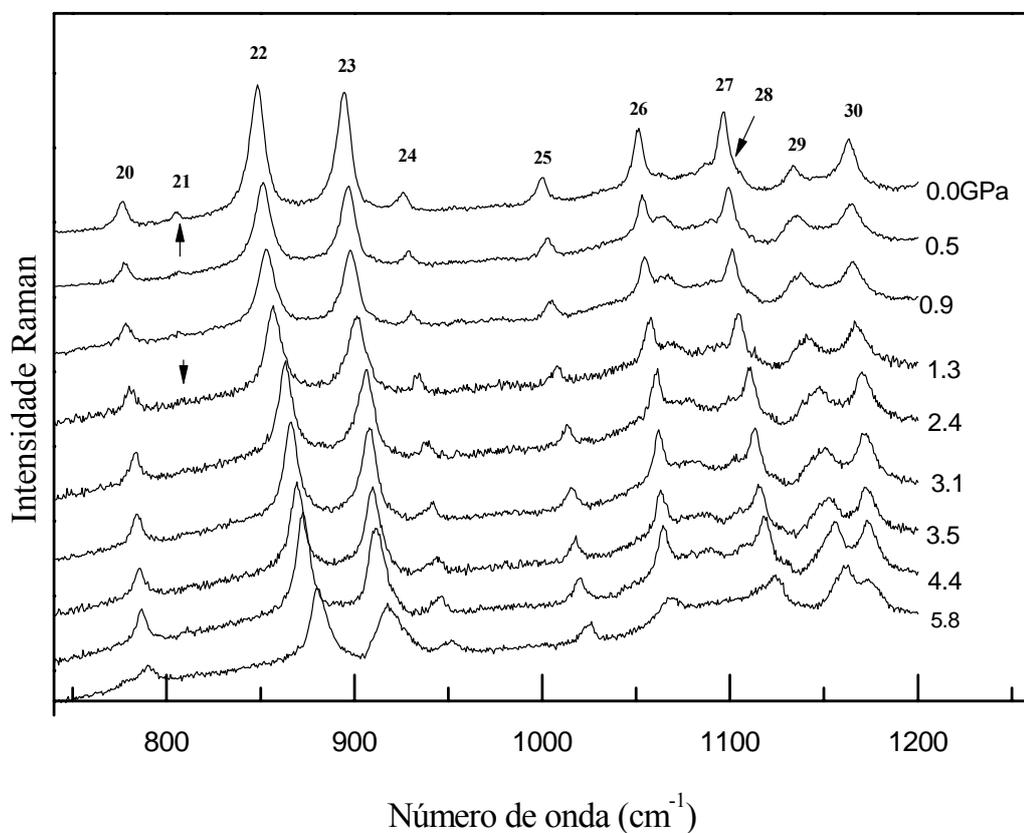


Figura 4.5 Espectros Raman do cristal de *l*-glutamina para diversos valores de pressão na região espectral entre 700 cm^{-1} e 1200 cm^{-1} .

Da Figura 4.6, observa-se que todos os modos na região espectral entre 700 cm^{-1} e 1200 cm^{-1} são bem comportados, ou seja, não apresentam nenhuma descontinuidade. Observe na Tabela 4.3 os coeficientes dos ajustes lineares dos modos Raman para esta região. Desta é

possível identificar que todos os modos sofrem um deslocamento para a região de maior número de onda (*blue shift*) com o aumento da pressão.

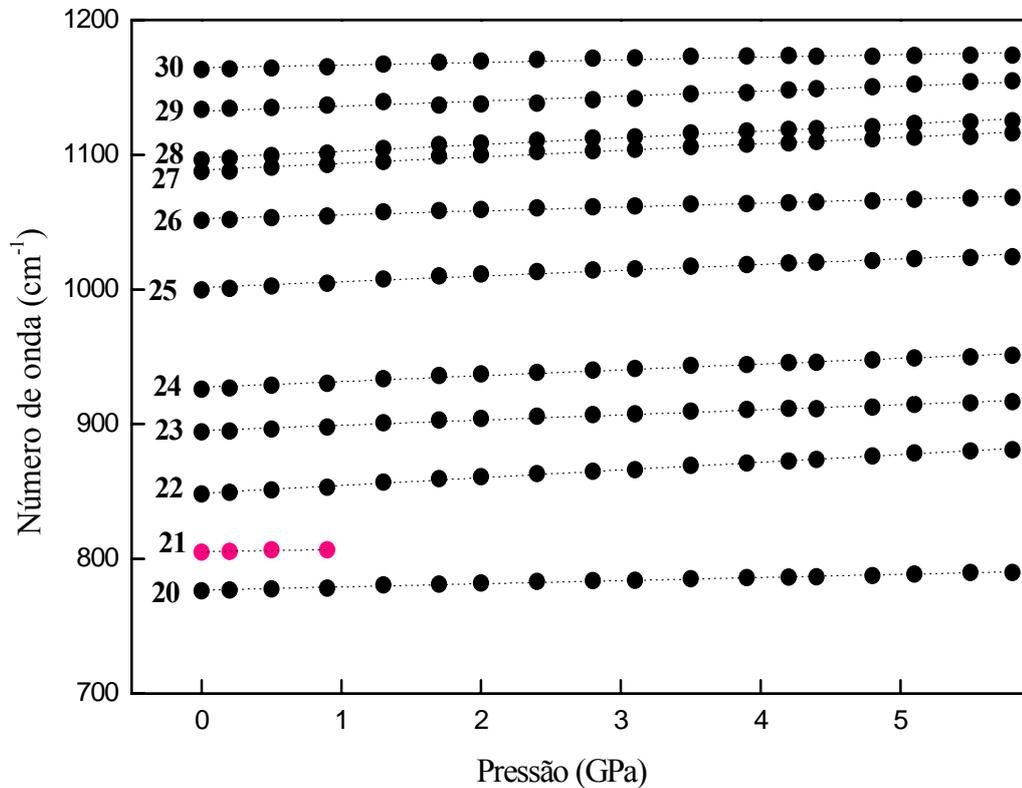


Figura 4.6 Gráfico do número de onda versus pressão na região espectral entre 700 cm^{-1} e 1200 cm^{-1} .

Tabela 4.3 Coeficientes dos ajustes lineares ($\omega = \omega_0 + \alpha P$) para os modos Raman do cristal de *l*-glutamina em função da pressão na região espectral entre 700 cm^{-1} e 1200 cm^{-1} .

| Modo | $\omega(\text{cm}^{-1})$ | $\omega_0(\text{cm}^{-1})$ | $d\omega/dP(\text{cm}^{-1}/\text{GPa})$ | Identificação |
|------|--------------------------|----------------------------|-----------------------------------------|------------------------------|
| 20 | 776 | 776, 84 | 2, 33 | $\delta(\text{CH}_2)_{rock}$ |
| 21 | 805 | 805,3 | 1, 83 | $\gamma(\text{OCC})$ |
| 22 | 848 | 848, 78 | 5, 73 | $\nu(\text{CC})$ |

| | | | | |
|----|------|---------|------|--------------------------------|
| 23 | 895 | 896,41 | 4,82 | $\delta(\text{CH}_2)_{rock}$ |
| 24 | 927 | 927,31 | 4,30 | $\nu(\text{CC})$ |
| 25 | 1001 | 1001,45 | 4,25 | $\nu(\text{CC})$ |
| 26 | 1051 | 1052,55 | 2,86 | $\nu(\text{CC})$ |
| 27 | 1085 | 1088,75 | 4,81 | |
| 28 | 1098 | 1097,55 | 4,99 | $\nu(\text{CN})$ |
| 29 | 1134 | 1137,82 | 4,25 | $\delta(\text{NH}_3^+)_{rock}$ |
| 30 | 1163 | 1164,57 | 1,94 | $\delta(\text{NH}_2)_{rock}$ |

4.4 Região espectral entre 2800 cm^{-1} e 3060 cm^{-1}

A Figura 4.7 apresenta os espectros Raman do cristal de l-glutamina na região espectral entre 2800 cm^{-1} e 3060 cm^{-1} , nesta região foram observados três modos. As bandas assinaladas pelos números 31 e 32 estão associadas com o modo de estiramento simétrico do CH_2 , $\nu_s(\text{CH}_2)$, e a banda marcada com o número 33 está associada ao modo de estiramento assimétrico do CH_2 , $\nu_a(\text{CH}_2)$. As bandas largas que aparecem entre 2800 cm^{-1} e 2900 cm^{-1} estão associadas ao líquido compressor nujol. Observa-se novamente um aumento das frequências dos três modos com o aumento da pressão, embora uma análise mais detalhada seja impedida pelo espectro do nujol, que se caracteriza nesta região por uma banda bastante larga que encobre parcialmente o espectro da l-glutamina.

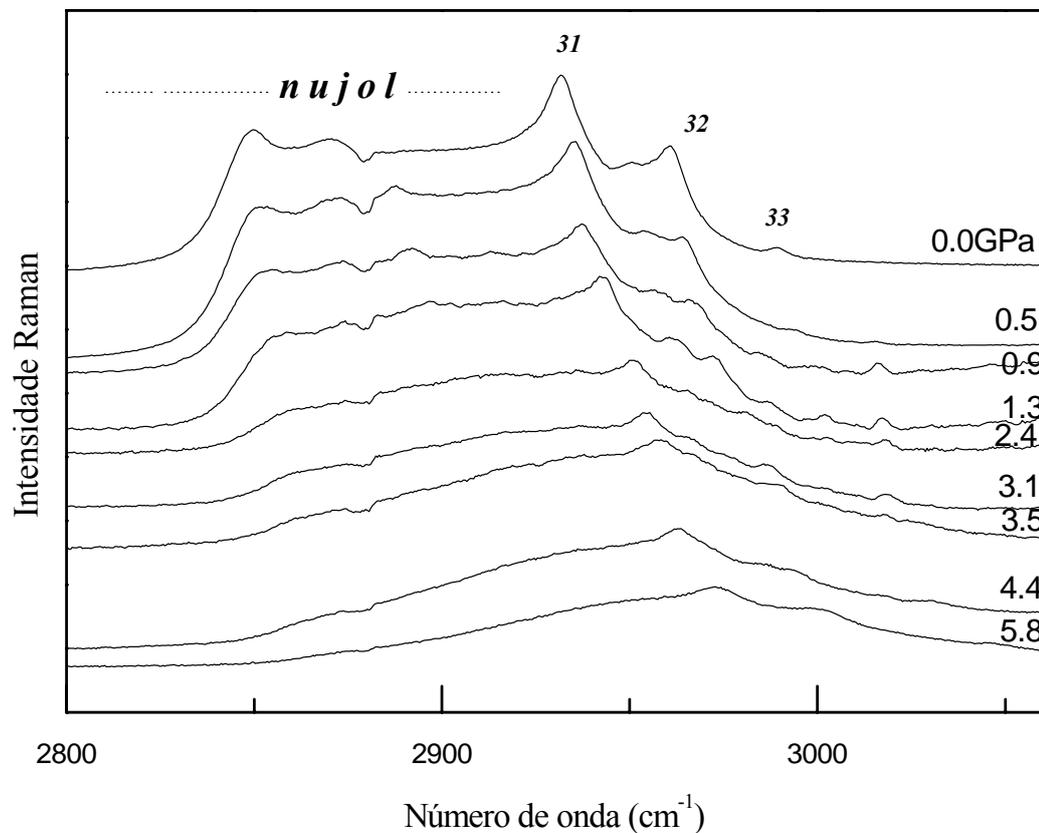


Figura 4.7 Espectros Raman do cristal de l-glutamina para diversos valores de pressão na região espectral entre 2800 cm^{-1} e 3060 cm^{-1} .

4.5 Sobre a transição de fase

Nos espectros de l-glutamina sob altas pressões ocorreram modificações, algumas delas na região de frequência entre 40 cm^{-1} e 340 cm^{-1} , considerada de baixa frequência. Nesta região, entre 3,0 GPa e 3,5 GPa, ocorre uma diminuição da intensidade das bandas de frequência de números 4, 6, 12, associadas aos modos da rede, e 13 associada com dobramento do esqueleto, $\delta(\text{skel})$; observa-se ainda o aparecimento de uma banda em 83 cm^{-1} entre 3,0 GPa e 3,1 GPa entre as bandas de frequência de números 3 e 4, também associadas

aos modos externos da rede. Além disso, ocorre uma descontinuidade na banda de frequência de número 1, associada a um modo da rede, neste mesmo intervalo de pressão. Todas essas alterações indicam que o cristal de l-glutamina sofre uma transição de fase estrutural em torno de 3,0 GPa.

Neste ponto é fundamental fazer uma comparação com um estudo de difração de raios-x com pressão num cristal de l-glutamina, recentemente publicado. [11] No referido trabalho foram realizadas medidas até 4,9 GPa, observando-se que a pressão diminui as dimensões das ligações de hidrogênio intramolecular e intermolecular entre 4,2% e 8,3%. Mais especificamente, registrou-se que ligações do tipo N1•••O2 variam em 8,3%, ligações N1•••O3ⁱ variam de 5,1%, ligações do tipo N1•••O3ⁱⁱ variam de 4,6% e ligações N2••• O1 variam de 4,2%. (ver Figuras 3.4 e 3.5)

Como consequência destas variações, as moléculas dentro de uma determinada camada são obrigadas a ficar mais juntas, além das camadas serem comprimidas ao longo da direção c. Além disso, observou-se que ocorrem mudanças significativas nas interações mais fracas C-H•••O, com as distâncias C•••O diminuindo entre 4,5% a 10,9% quando a pressão passa de 0 GPa a 4,9 GPa.

Entretanto, o estudo de referência [11] não reportou a ocorrência de nenhuma transição de fase no intervalo entre 0 GPa e 4,9 GPa. Os autores ainda comentam que esta pressão, 4,9 GPa, é bastante intensa e seria esperado que uma transição de fase ocorresse; a não ocorrência de transição de fase estaria associada ao fato da l-glutamina ter um grande tamanho e poder se deformar sem necessariamente mudar a simetria da célula unitária.

É claro, a partir dos nossos resultados, que os dados de difração de Raios X não são compatíveis com os resultados de espectroscopia Raman. Como entender esta discrepância? Em primeiro lugar, lembramos que o espalhamento Raman fornece uma informação local sobre a simetria da célula unitária, enquanto que a difração de Raios X fornece uma medida que é uma média do que ocorre nas células unitárias do material.

Em segundo lugar, a medida de difração de Raios X com um material submetido a altas pressões envolve dados muito sutis (o da amostra) num conjunto de muitos dados oriundos do aparato experimental (do diamante, principalmente). Assim, lapidar os dados da amostra em um imenso conjunto de dados espúrios é uma tarefa bastante árdua que pode conduzir o pesquisador a erros. Então, admite-se que o cristal de l-glutamina sofre uma

transição de fase estrutural em aproximadamente 3,0 GPa baseados nos dados de espectroscopia Raman.

Adicionalmente realizou-se um estudo dos espectros Raman do material baixando-se a pressão do valor máximo conseguido nos experimentos até novamente a pressão atmosférica. Um espectro do cristal de l-glutamina antes de submetê-lo às altas pressões e um segundo espectro do mesmo material após o mesmo ter sido descomprimido e retornado à pressão atmosférica são mostrados na Figura 4.8.

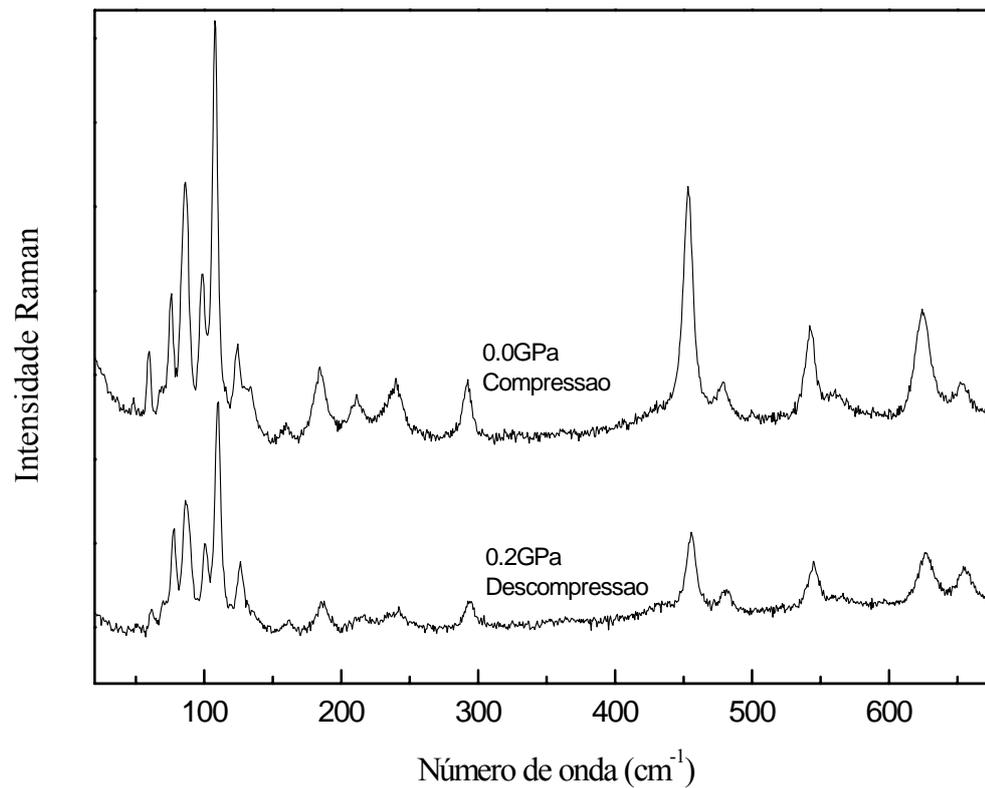


Figura 4.8 Comparação entre compressão e a descompressão dos espectros Raman do cristal de l-glutamina.

Observando a Figura 4.8 pode-se perceber que se recupera praticamente o espectro original do material após a descompressão. Com isso é possível dizer que a transição de fase que ocorre no cristal de l-glutamina submetido à variação de pressão é reversível, embora não tenha sido possível determinar precisamente a existência de alguma histerese.

4.6 Conclusões

Medidas de espalhamento Raman em função da pressão hidrostática foram realizadas no cristal de l-glutamina. O estudo foi realizado comprimindo a amostra desde a pressão atmosférica até 5,8 GPa no intervalo espectral entre 40 cm^{-1} e 3060 cm^{-1} , e em seguida, descomprimindo-a até a pressão atmosférica. Os espectros obtidos evidenciam uma transição de fase reversível sofrida pelo cristal de l-glutamina dentro do intervalo de pressão estudado.

5 PROPRIEDADES VIBRACIONAIS DO CRISTAL DE L-GLUTAMINA EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA

Neste capítulo são apresentadas medidas de espalhamento Raman em função da temperatura realizadas em cristais de l-glutamina. Uma vez que as medidas foram feitas em uma amostra cristalina foi possível obter-se espectros em duas polarizações distintas, conforme discussão a seguir.

5.1 Discussão inicial

Na literatura já foram reportadas diversas medidas de espalhamento Raman e/ou difração de raios-x em cristais de aminoácidos em função da temperatura com o objetivo de se inferir propriedades vibracionais e estruturais. Como alguns exemplos ilustrativos se mencionam a l-alanina, a l-valina e a l-leucina.

A l-alanina, o aminoácido quiral mais simples, que se cristaliza em uma estrutura ortorrômbica D_2^4 , não apresenta nenhuma modificação estrutural, seja a baixas ou a altas temperaturas. Porém, quando esta é completamente deuterada ($C_3O_2ND_7$), passa a apresentar uma transição de fase a baixas temperaturas. [16] Este resultado foi interpretado como sendo consequência do fato de que, na amostra deuterada, as ligações de hidrogênio, que permitem o empacotamento das moléculas de l-alanina na célula unitária, estão ligeiramente mais longas. Deste modo, a estrutura deuterada torna-se um pouco mais instável do que a estrutura hidrogenada ($C_3O_2NH_7$) o que possibilita a transição de fase a baixas temperaturas.

No caso da l-valina observou-se através da espectroscopia Raman que o cristal sofre uma transição de fase em torno de 110K. [17] Esta mudança foi entendida quando se verificou que modos de baixa frequência, que estão associados aos modos externos, desaparecem para temperaturas inferiores à temperatura de transição de fase.

Finalmente, para encerrar esta rápida discussão relacionada ao comportamento de cristais de aminoácidos com a temperatura, cita-se o exemplo da l-leucina. Este material cristaliza-se numa estrutura monoclinica C_2^2 à temperatura ambiente. Resfriando-se o cristal até cerca de 20K não se observa nenhuma mudança nos espectros Raman que possa ser

interpretada como advinda de alguma mudança estrutural. [20] No entanto, quando se aquece o material apreende-se que pouco acima da temperatura ambiente o cristal de l-leucina sofre uma transição de fase que de acordo com a espectroscopia Raman foi interpretada como sendo devida a uma mudança de simetria dos grupos pontuais $C_2 \rightarrow C_s$.

Muitos outros exemplos poderiam ser apresentados nesta dissertação, no entanto estes três casos descritos nos parágrafos anteriores deste capítulo ilustram de maneira clara o fato de que é possível que alguns materiais sejam estáveis num grande intervalo de temperatura, como no caso da l-alanina, apresentem transições de fase a baixas temperaturas, como ocorre com a l-valina, ou apresentem mudanças estruturais a altas temperaturas, como foi verificado com a l-leucina.

5.2 Espectros Raman de l-glutamina em função da temperatura

Nesta seção se apresentam os resultados de espectroscopia Raman em cristais de l-glutamina obtidos para temperaturas entre 20°C e 140°C. Os dados referem-se a duas polarizações diferentes, que serão designadas de (\parallel) e (\perp).

No primeiro caso, (\parallel), significa que a luz do laser entrou no cristal, na geometria de retroespalhamento, polarizada ao longo da maior dimensão do cristal e foi analisada na mesma direção. No segundo caso, (\perp), a luz do laser entrou no cristal perpendicularmente à maior dimensão do cristal e foi analisada na mesma direção. A Figura 5.1 mostra uma representação esquemática deste processo:

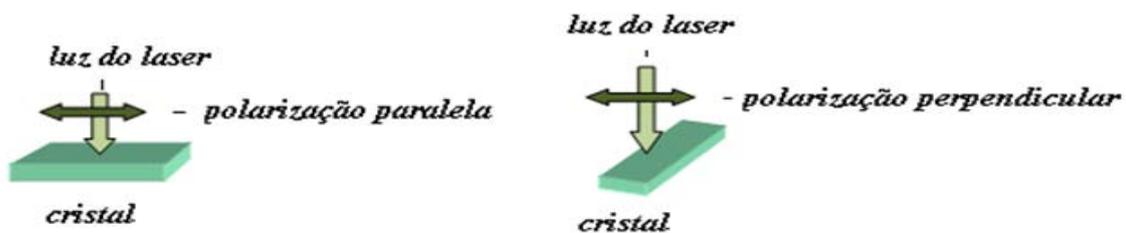


Figura 5.1 Representação ilustrada da polarização paralela e perpendicular na análise do cristal de l-glutamina.

Embora não tenha sido possível determinar exatamente as direções cristalográficas do material, este estudo mostra o quão distintas são as duas polarizações, além de fornecer uma boa visão do comportamento vibracional do cristal de l-glutamina a altas temperaturas.

A seguir uma explanação sobre os espectros Raman da l-glutamina em função da temperatura para a polarização (//).

5.2.1 Região espectral entre 30 cm^{-1} e 260 cm^{-1} na polarização (//)

A Figura 5.2 apresenta a evolução dos espectros Raman da l-glutamina na polarização (//) para diversos valores de temperatura na região espectral entre 30 cm^{-1} e 260 cm^{-1} . À temperatura ambiente são observados dois picos intensos, denotados pelos números 3 e 5, e outros de menor intensidades, que permanecem visíveis em toda a faixa de temperatura, conforme gráfico da frequência (ω) versus temperatura (T), que é apresentado na Figura 5.2. Como todos os modos externos estão presentes em todos os espectros, isto significa que a simetria do cristal permanece constante até a temperatura de 140°C . Ou seja, por esta geometria de espalhamento não é possível perceber nenhuma evidência de que o cristal sofra uma transição de fase a altas temperaturas.

Ainda na Figura 5.3 se apresentam os ajustes lineares do tipo $\omega = \omega_0 + \alpha T$ de todos os valores de frequência desta região. Nesta expressão, ω é a frequência do modo observado à temperatura ambiente, ω_0 é o ponto do eixo vertical que é cortado pelo ajuste linear, α é o coeficiente de ajuste linear e T a temperatura analisada. Na Tabela 5.1 são divulgados os coeficientes dos ajustes lineares dos modos Raman desta região.

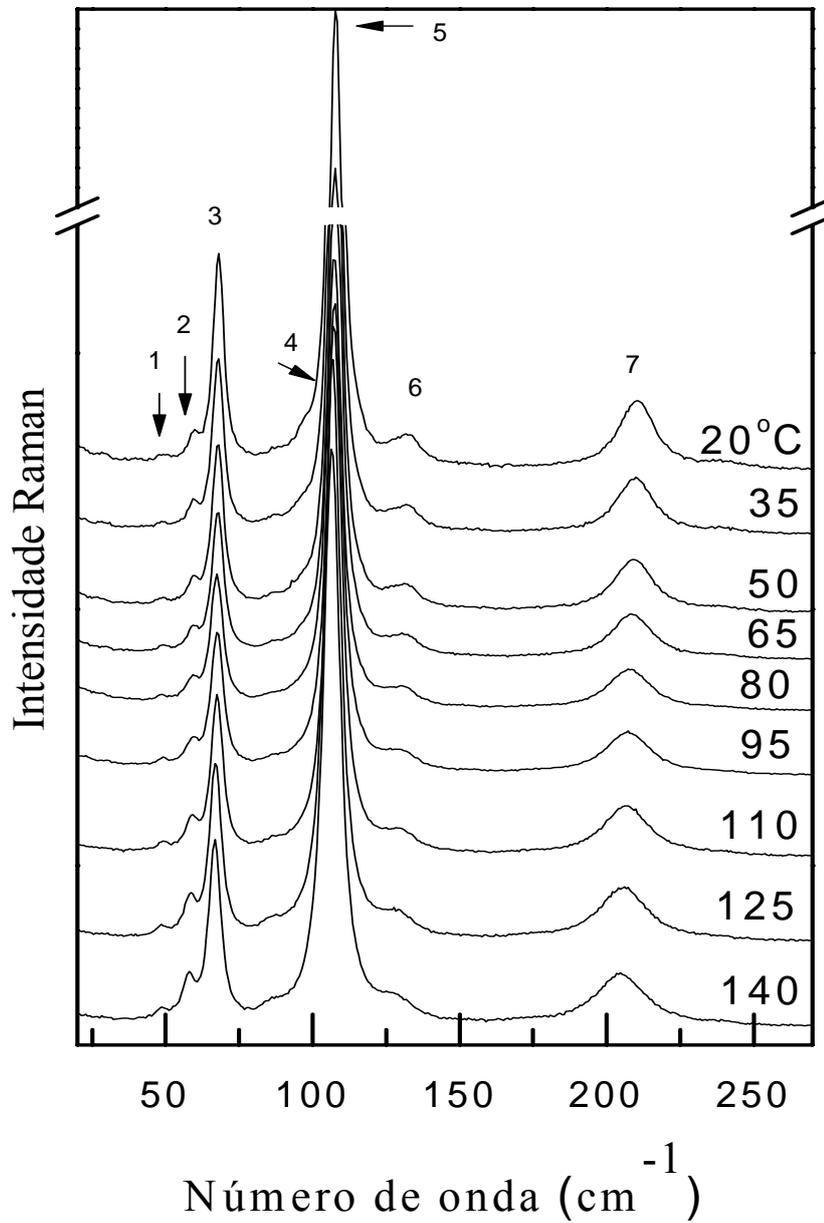


Figura 5.2 Espectros Raman da l-glutamina na polarização (//) para diversos valores de temperatura na região espectral entre 30 cm⁻¹ e 260 cm⁻¹.

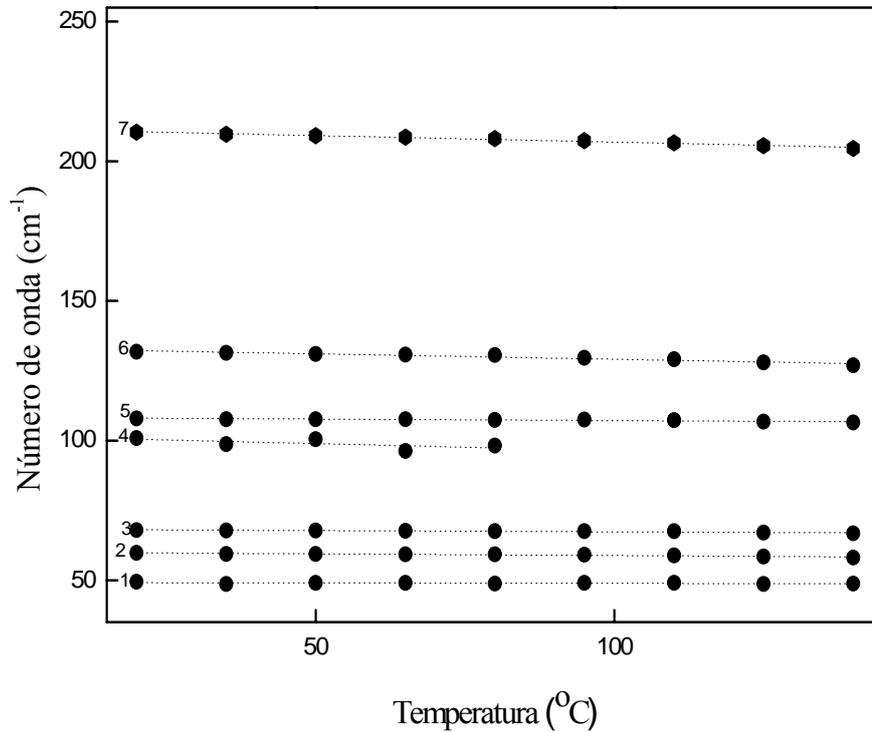


Figura 5.3 Gráfico do número de onda versus temperatura na região espectral entre 30 cm^{-1} e 260 cm^{-1} .

Tabela 5.1 Coeficientes dos ajustes lineares ($\omega = \omega_0 + \alpha T$) para os modos Raman do cristal de *l*-glutamina em função da temperatura na região espectral entre 30 cm^{-1} e 260 cm^{-1} .

| Modo | $\omega(\text{cm}^{-1})$ | $\omega_0(\text{cm}^{-1})$ | $d\omega/dT(\text{cm}^{-1}/\text{K})$ | Identificação |
|------|--------------------------|----------------------------|---------------------------------------|-----------------|
| 1 | 49 | 49,17 | -0,00 | Modo da rede |
| 2 | 60 | 60,02 | -0,01 | Modo da rede |
| 3 | 68 | 68,22 | -0,00 | Modo da rede |
| 4 | 101 | 101,52 | -0,05 | Modo da rede |
| 5 | 108 | 108,23 | -0,01 | Modo da rede |
| 6 | 133 | 133,02 | -0,03 | Modo da rede |
| 7 | 211 | 211,52 | -0,04 | δ (skel) |

5.2.2 Região espectral entre 300 cm^{-1} e 650 cm^{-1} na polarização (\parallel)

A Figura 5.4 apresenta a evolução dos espectros Raman de um cristal de l-glutamina na região espectral entre 300 cm^{-1} e 700 cm^{-1} para diversos valores de temperatura na geometria (\parallel). Com exceção de uma banda em aproximadamente 600 cm^{-1} que está presente no espectro de 20°C , mas que não é visível nos espectros tomados as mais altas temperaturas, todas as outras permanecem visíveis em todo o intervalo de temperatura.

Na Figura 5.5 se apresenta um gráfico das frequências dos modos e os ajustes lineares dos dados experimentais nesta região espectral em função da temperatura. Na Tabela 5.2 são divulgados os coeficientes dos ajustes lineares dos modos Raman desta região.

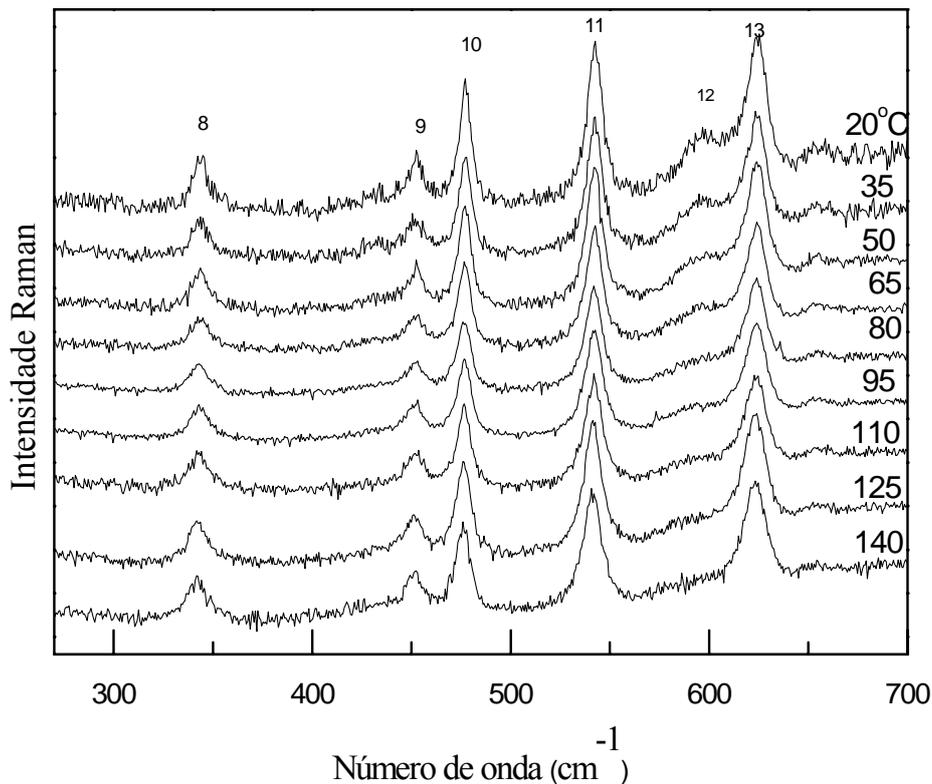


Figura 5.4 Espectros Raman de um cristal de l-glutamina na região espectral entre 300 cm^{-1} e 650 cm^{-1} para diversos valores de temperatura na geometria (\parallel).

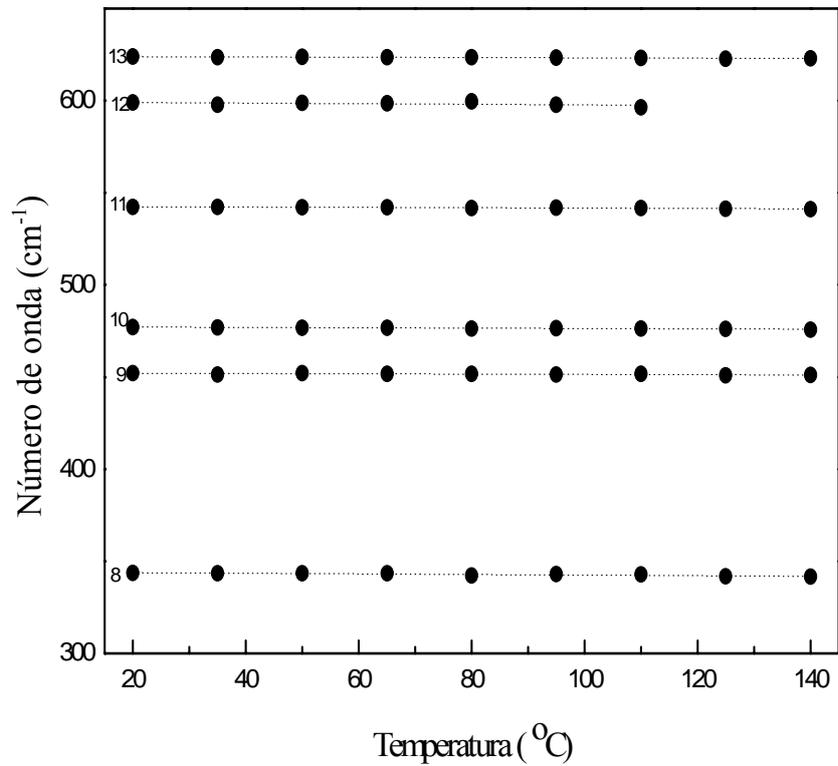


Figura 5.5 Gráfico do número de onda versus temperatura na região espectral entre 300 cm^{-1} e 650 cm^{-1} .

Tabela 5.2 Coeficientes dos ajustes lineares ($\omega = \omega_0 + \alpha T$) para os modos Raman do cristal de l-glutamina em função da temperatura na região espectral entre 300 cm^{-1} e 650 cm^{-1} .

| Modo | $\omega(\text{cm}^{-1})$ | $\omega_0(\text{cm}^{-1})$ | $d\omega/dT(\text{cm}^{-1}/\text{K})$ | Identificação |
|------|--------------------------|----------------------------|---------------------------------------|-------------------------|
| 8 | 345 | 344,12 | -0,01 | $\delta(\text{skel})$ |
| 9 | 453 | 452,17 | -0,00 | $\delta(\text{skel})$ |
| 10 | 478 | 477,32 | -0,00 | $\tau(\text{NH}_3^+)$ |
| 11 | 543 | 542,62 | -0,00 | $\tau(\text{NH}_2)$ |
| 12 | 600 | 599,32 | -0,01 | |
| 13 | 625 | 624,08 | -0,00 | $\delta(\text{CONH}_2)$ |

5.2.3 Região espectral entre 800 cm^{-1} e 1200 cm^{-1} na polarização (\parallel)

A Figura 5.6 apresenta a evolução dos espectros Raman de um cristal de l-glutamina no intervalo de frequência entre 800 cm^{-1} e 1200 cm^{-1} para temperaturas entre 20°C e 140°C tomados na polarização (\parallel). Novamente observa-se que todas as bandas que são observadas em $T = 20^\circ\text{C}$ também são visíveis em $T = 140^\circ\text{C}$, embora seja possível notar que elas diminuem de intensidade e aumentem suas larguras de linha. Observa-se que as duas bandas no intervalo entre 1080 cm^{-1} e 1100 cm^{-1} que originalmente são bem separadas ficam bastantes juntas no espectro de mais alta temperatura. Fora este pequeno efeito, nenhuma outra grande mudança é observada.

A Figura 5.7 resume o comportamento das frequências dos modos nesta região mostrando o gráfico de frequência por temperatura, bem como os ajustes lineares aos pontos experimentais. Na Tabela 5.3 são divulgados os coeficientes dos ajustes lineares dos modos Raman desta região.

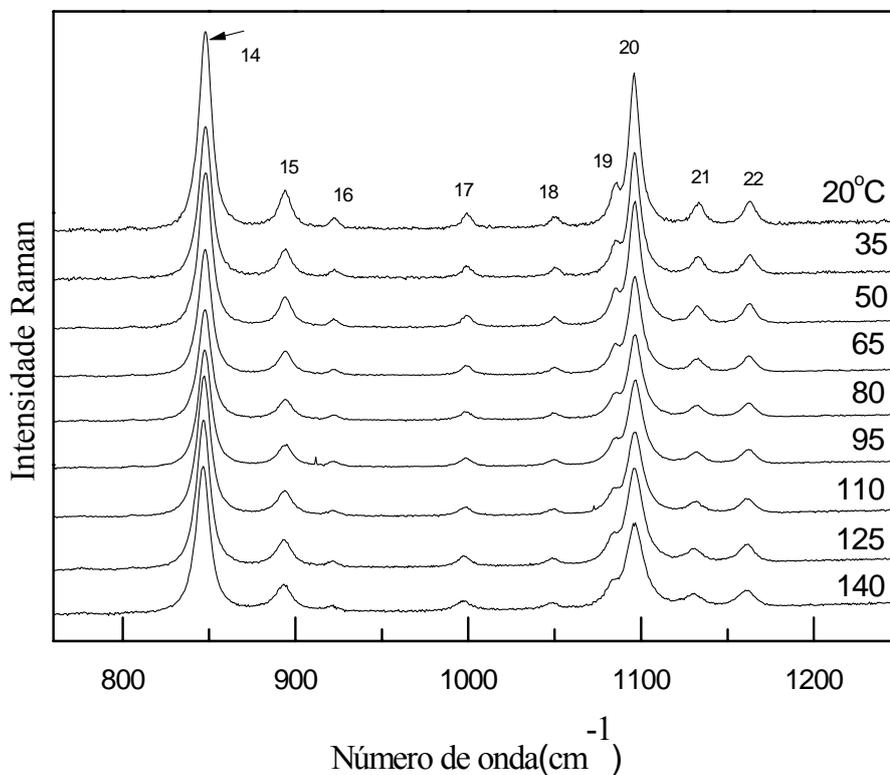


Figura 5.6 Espectros Raman de um cristal de l-glutamina no intervalo de frequência entre 800 cm^{-1} e 1200 cm^{-1} para diversos valores de temperaturas na polarização (\parallel).

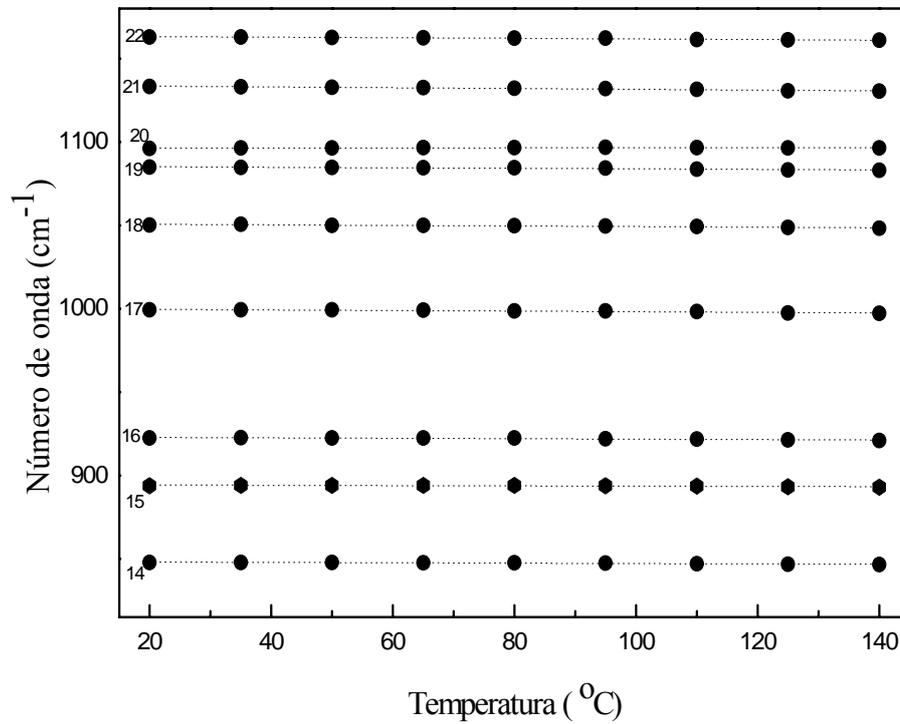


Figura 5.7 Gráfico do número de onda versus temperatura na região espectral entre 800 cm^{-1} e 1200 cm^{-1} .

Tabela 5.3 Coeficientes dos ajustes lineares ($\omega = \omega_0 + \alpha T$) para os modos Raman do cristal de l-glutamina em função da temperatura na região espectral entre 800 cm^{-1} e 1200 cm^{-1} .

| Modo | $\omega(\text{cm}^{-1})$ | $\omega_0(\text{cm}^{-1})$ | $d\omega/dT(\text{cm}^{-1}/\text{K})$ | Identificação |
|------|--------------------------|----------------------------|---------------------------------------|-----------------------|
| 14 | 848 | 848,29 | -0,01 | $\nu(\text{C-C})$ |
| 15 | 895 | 894,4 | -0,00 | $\delta(\text{CH}_2)$ |
| 16 | 924 | 923,04 | -0,01 | $\nu(\text{C-C})$ |
| 17 | 1000 | 999,92 | -0,01 | $\nu(\text{C-C})$ |
| 18 | 1052 | 1052,92 | -0,01 | $\nu(\text{C-C})$ |
| 19 | 1086 | 1085,37 | -0,01 | |
| 20 | 1097 | 1096,26 | -0,00 | $\nu(\text{CN})$ |

| | | | | |
|----|------|---------|-------|-------------------------|
| 21 | 1134 | 1133,90 | -0,02 | $\delta(\text{NH}_3^+)$ |
| 22 | 1164 | 1163,51 | -0,01 | $\delta(\text{NH}_3^+)$ |

5.2.4 Região espectral entre 1200 cm^{-1} e 1700 cm^{-1} na polarização (//)

A Figura 5.8 apresenta a evolução dos espectros Raman de l-glutamina no intervalo de frequência entre 1200 cm^{-1} e 1700 cm^{-1} para diversos valores de temperatura.

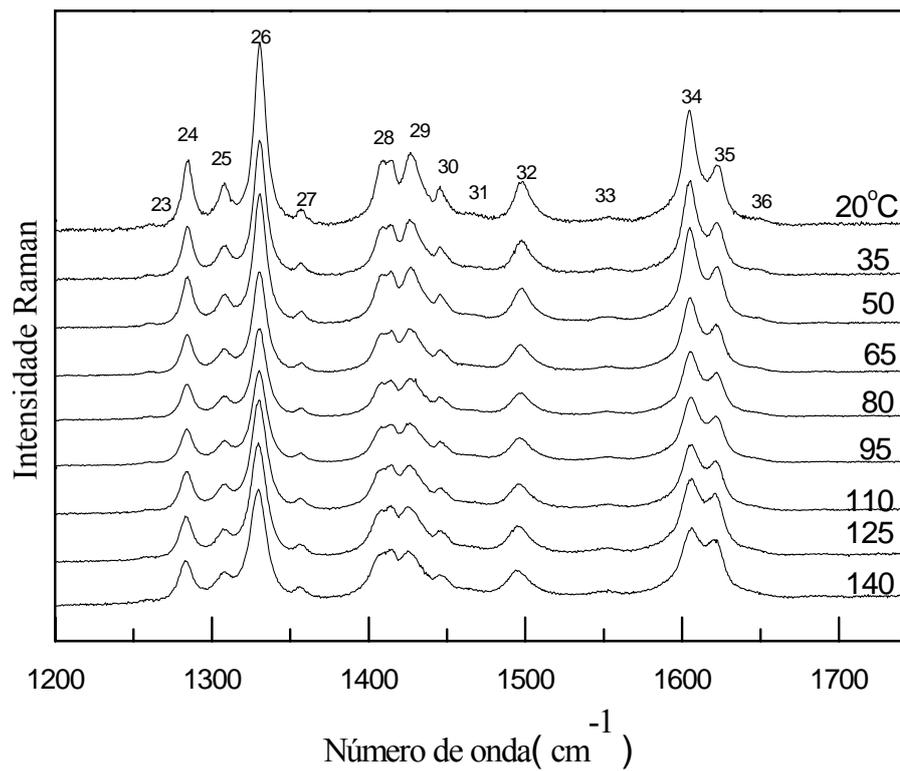


Figura 5.8 Espectros Raman de um cristal de l-glutamina no intervalo de frequência entre 1200 cm^{-1} e 1700 cm^{-1} para diversos valores de temperaturas na polarização (//).

Observe que, assim como ocorre nas outras regiões espectrais, à medida que a temperatura aumenta os picos vão ficando menos intensos e as larguras de linha vão aumentando de tal modo que, em altas temperaturas, aparentemente as bandas ficam mais próximas. Observa-se ainda que alguns picos variam de intensidade numa razão diferente das dos outros picos. Por exemplo, as duas bandas que originalmente encontram-se entre 1600 cm^{-1} e 1640 cm^{-1} para a temperatura de 20°C com intensidades relativas na razão de 2:1, claramente possuem quase as mesmas intensidades quando a temperatura é igual a 140°C .

Um gráfico com as freqüências destas bandas em todas as temperaturas e os ajustes lineares do tipo $\omega = \omega_0 + \alpha T$ aos pontos experimentais é apresentado na Figura 5.9 e os coeficientes dos ajustes lineares dos modos Raman desta região são mostrados na Tabela 5.4.

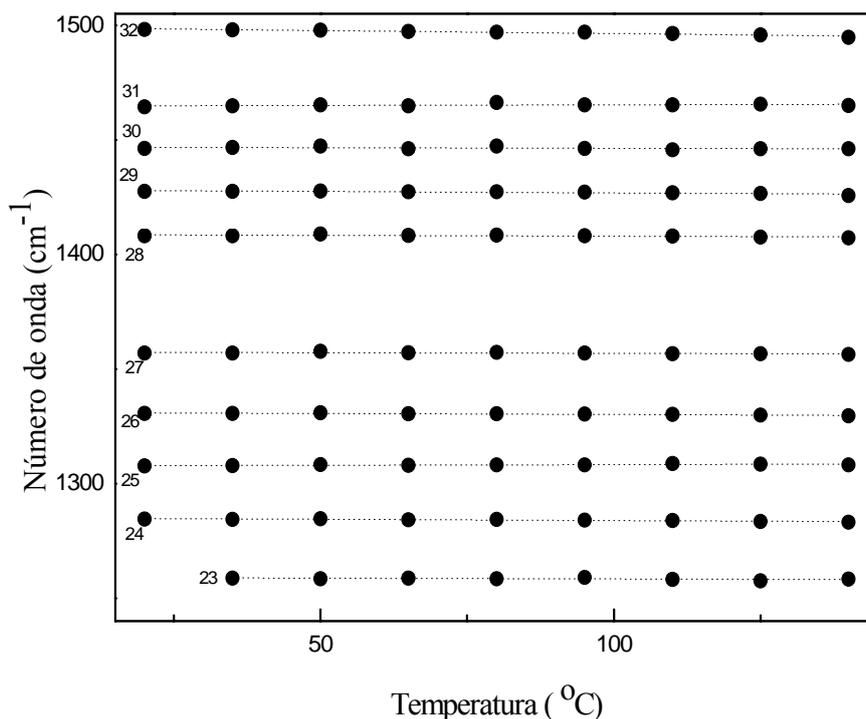


Figura 5.9a Gráfico do número de onda versus temperatura na região espectral entre 1200 cm^{-1} e 1500 cm^{-1} .

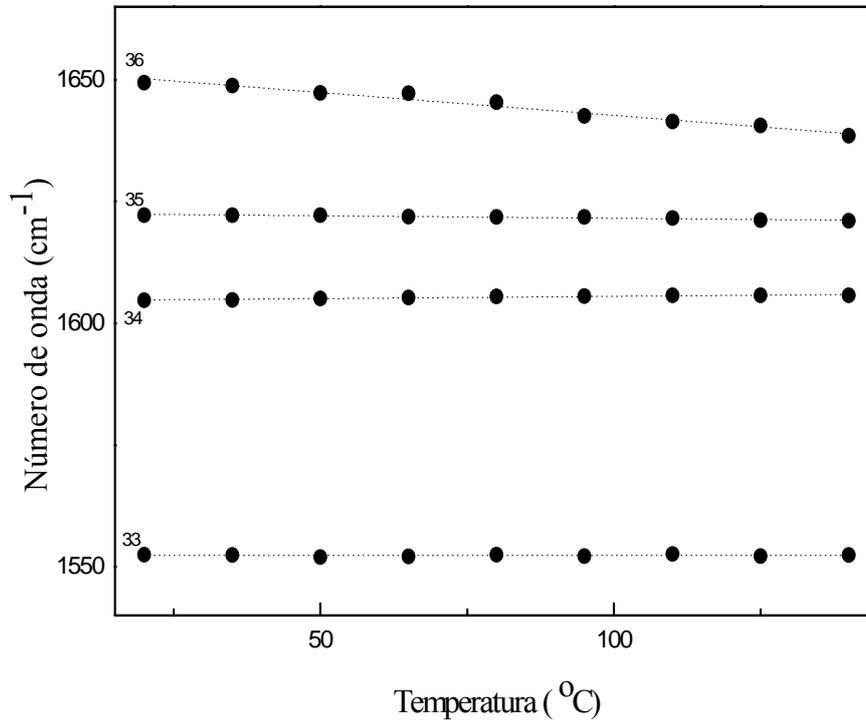


Figura 5.9b Gráfico do número de onda versus temperatura na região espectral entre 1500 cm^{-1} e 1700 cm^{-1} .

Tabela 5.4 Coeficientes dos ajustes lineares ($\omega = \omega_0 + \alpha T$) para os modos Raman do cristal de *l*-glutamina em função da temperatura na região espectral entre 1200 cm^{-1} e 1700 cm^{-1} .

| Modo | $\omega(\text{cm}^{-1})$ | $\omega_0(\text{cm}^{-1})$ | $d\omega/dT(\text{cm}^{-1}/\text{K})$ | Identificação |
|------|--------------------------|----------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|
| 23 | 1260 | 1259,11 | -0,00 | $\delta(\text{CH}_2)_{\text{twist}}$ |
| 24 | 1285 | 1284,95 | -0,01 | $\delta(\text{CH}_2)_{\text{wag}}$ |
| 25 | 1308 | 1307,74 | -0,00 | $\delta(\text{CH}_2)_{\text{wag}}$ |
| 26 | 1333 | 1331,03 | -0,00 | $\delta(\text{CH})$ |
| 27 | 1358 | 1357,43 | -0,00 | $\delta(\text{CH})$ |
| 28 | 1409 | 1408,71 | -0,00 | $\nu(\text{CN})$ |
| 29 | 1428 | 1428,09 | -0,01 | $\nu_s(\text{CO}_2^-)$ |
| 30 | 1447 | 1446,85 | -0,00 | $\delta(\text{CH}_2)$ |

| | | | | |
|----|------|---------|-------|---------------------------|
| 31 | 1465 | 1464,74 | 0,00 | |
| 32 | 1500 | 1498,99 | -0,00 | $\delta_s(\text{NH}_3^+)$ |
| 33 | 1552 | 1552,29 | 3,33 | |
| 34 | 1604 | 1604,61 | 0,00 | $\delta_a(\text{NH}_3^+)$ |
| 35 | 1623 | 1622,57 | -0,01 | $\nu_a(\text{CO}_2^-)$ |
| 36 | 1653 | 1652,27 | -0,09 | |

5.2.5 Região espectral entre 2800 cm^{-1} e 3100 cm^{-1} na polarização (//)

Espectros Raman no intervalo de frequência entre 2800 cm^{-1} e 3600 cm^{-1} para um cristal de l-glutamina para temperaturas entre 20°C e 140°C são apresentados na Figura 5.10. Esta região espectral é bastante sensível a mudanças conformacionais das moléculas dos aminoácidos em suas células unitárias, conforme mostrado para a l-metionina através de análises de cálculos de primeiros princípios. [18] Isto significa que quando ocorrem mudanças conformacionais com a variação de temperatura, ou algum outro parâmetro termodinâmico como a pressão, a intensidade relativa das bandas Raman nesta região espectral pode mudar apreciavelmente.

Analisando os espectros da Figura 5.10 percebe-se que as intensidades das bandas praticamente não variam. Isto significa que além de não haver indícios que apontem para a ocorrência de uma transição de fase, como discutido anteriormente, também não há indícios de mudanças conformacionais significativas das moléculas de l-glutamina no intervalo de temperatura investigado.

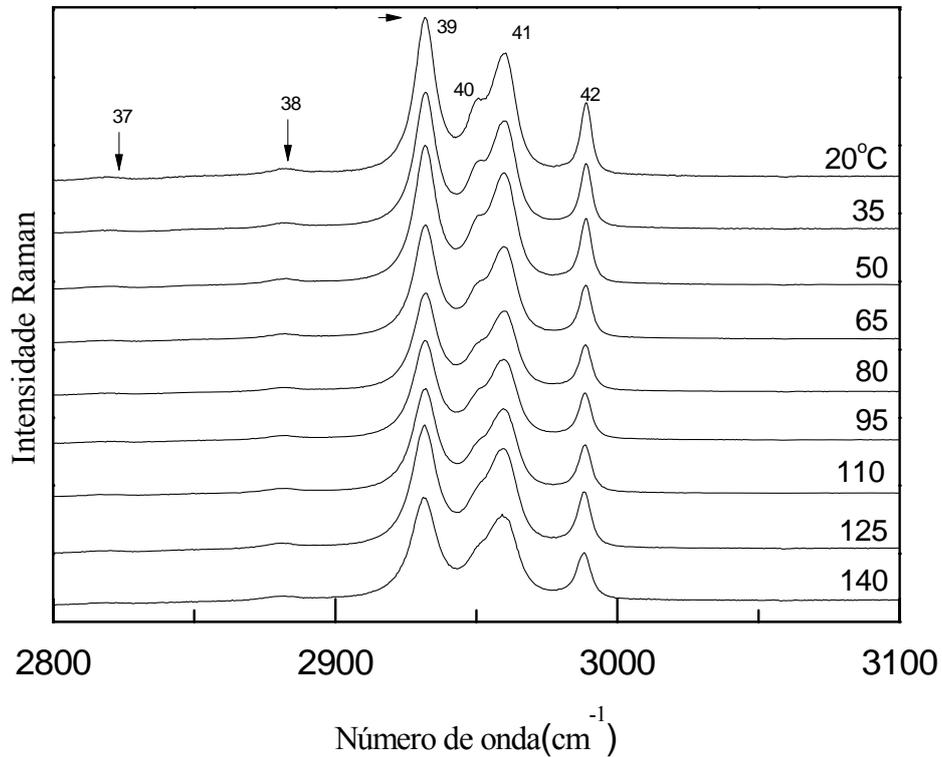


Figura 5.10 Espectros Raman de um cristal de *l*-glutamina no intervalo de frequência entre 2800 cm^{-1} e 3100 cm^{-1} para diversos valores de temperaturas na polarização (\parallel).

É interessante destacar ainda que na outra polarização, cujos espectros desta região serão apresentados mais adiante, também não se percebe grandes variações na intensidade relativa das diversas bandas. Finalmente na Figura 5.11 se apresenta um gráfico do comportamento das frequências dos modos nesta região, bem como os ajustes lineares aos pontos experimentais. Na Tabela 5.5 são divulgados os coeficientes dos ajustes lineares dos modos Raman desta região.

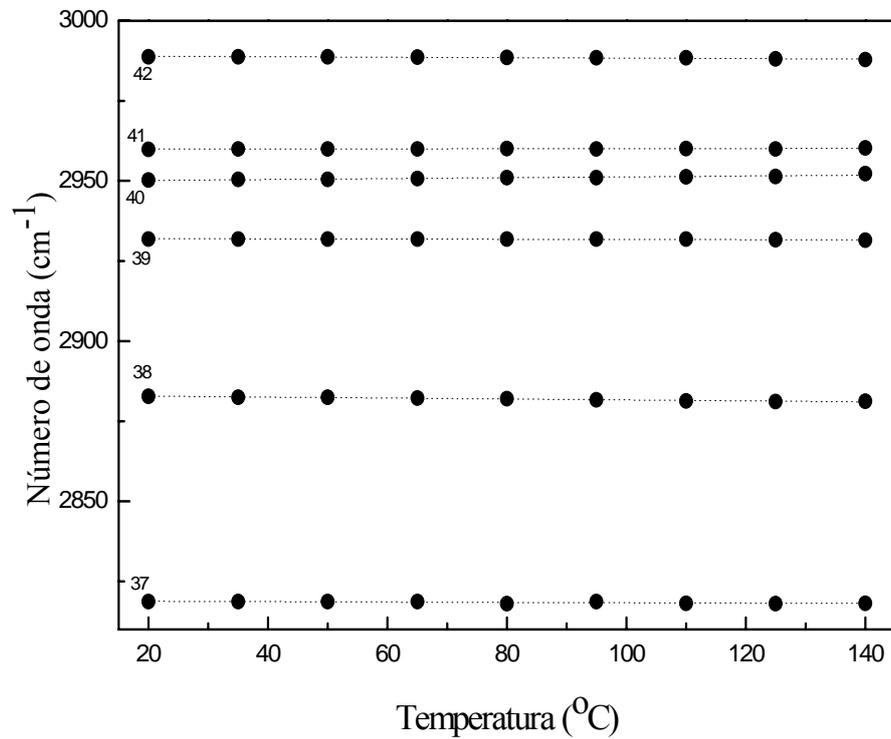


Figura 5.11 Gráfico do número de onda versus temperatura na região espectral entre 2800 cm^{-1} e 3100 cm^{-1} .

Tabela 5.5 Coeficientes dos ajustes lineares ($\omega = \omega_0 + \alpha T$) para os modos Raman do cristal de *l*-glutamina em função da temperatura na região espectral entre 2800 cm^{-1} e 3100 cm^{-1} .

| Modo | $\omega(\text{cm}^{-1})$ | $\omega_0(\text{cm}^{-1})$ | $d\omega/dT(\text{cm}^{-1}/\text{K})$ | Identificação |
|------|--------------------------|----------------------------|---------------------------------------|----------------------|
| 37 | 2819 | 2818,89 | -0,00 | |
| 38 | 2884 | 2883,11 | -0,01 | |
| 39 | 2932 | 2931,81 | -0,00 | $\nu_s(\text{CH}_2)$ |
| 40 | 2950 | 2949,90 | -0,01 | $\nu(\text{CH})$ |
| 41 | 2960 | 2959,88 | -0,02 | $\nu_s(\text{CH}_2)$ |
| 42 | 2990 | 2989,04 | -0,00 | $\nu_a(\text{CH}_2)$ |

5.2.6 Região espectral entre 20 cm^{-1} e 270 cm^{-1} na polarização (\perp)

A Figura 5.12 apresenta a evolução dos espectros Raman da l-glutamina na polarização (\perp) para diversos valores de temperatura. Nesta região, de baixa frequência, foram identificadas doze bandas que estão representados por números inteiros nos espectros Raman.

Destas, todas permanecem visíveis em toda a faixa de temperatura $20^\circ\text{C} - 140^\circ\text{C}$, conforme gráfico da frequência (ω) versus temperatura (T), que é apresentado na Figura 5.13. Assim como na outra geometria de espalhamento, (\parallel), nesta também não é possível perceber nenhuma evidência de que o cristal de l-glutamina sofra uma transição de fase a altas temperaturas.

Ainda na Figura 5.12 se apresentam os ajustes lineares do tipo $\omega = \omega_0 + \alpha T$ de todos os valores de frequência desta região. Na Tabela 5.6 são mostrados os coeficientes dos ajustes lineares dos modos Raman desta região, bem como suas respectivas identificações.

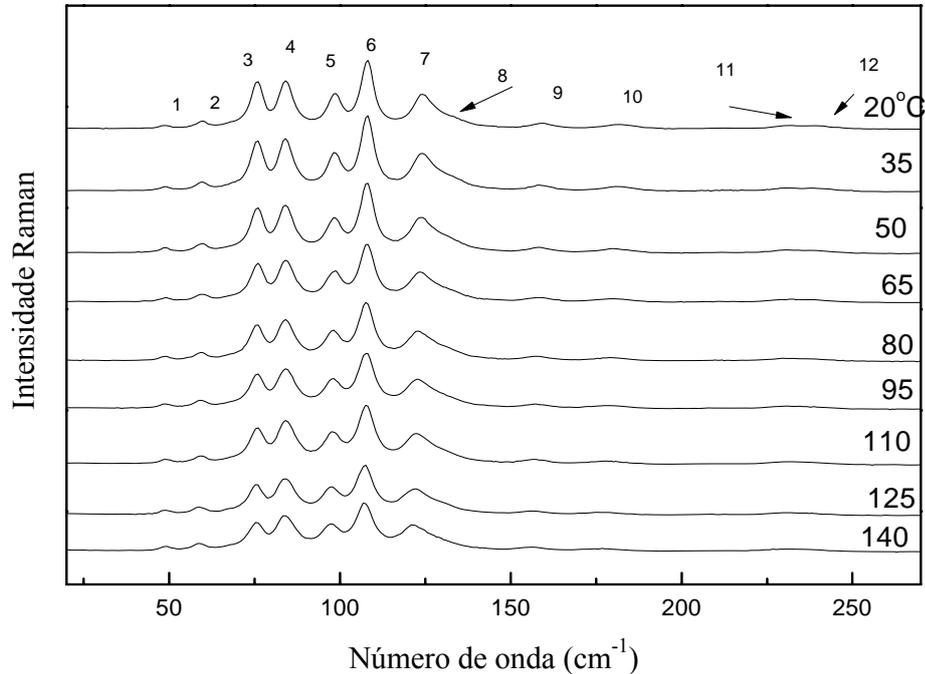


Figura 5.12 Espectros Raman de um cristal de l-glutamina no intervalo de frequência entre 20 cm^{-1} e 270 cm^{-1} para diversos valores de temperaturas na polarização (\perp).

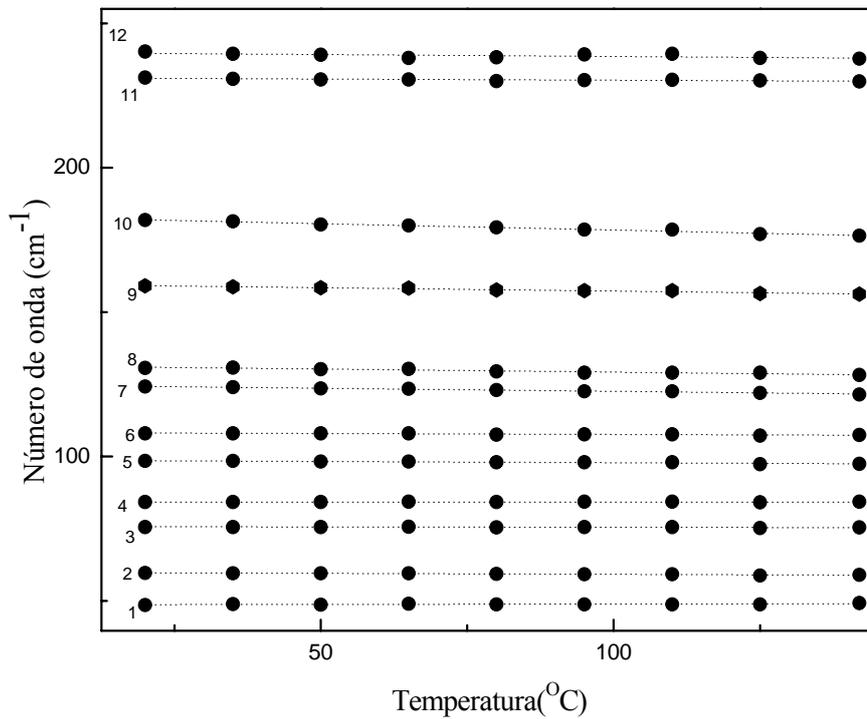


Figura 5.13 Gráfico do número de onda versus temperatura na região espectral entre 20 cm^{-1} e 270 cm^{-1} .

Tabela 5.6 Coeficientes dos ajustes lineares ($\omega = \omega_0 + \alpha T$) para os modos Raman do cristal de l-glutamina em função da temperatura na região espectral entre 20 cm^{-1} e 270 cm^{-1} .

| Modo | $\omega(\text{cm}^{-1})$ | $\omega_0(\text{cm}^{-1})$ | $d\omega/dT(\text{cm}^{-1}/\text{K})$ | Identificação |
|------|--------------------------|----------------------------|---------------------------------------|---------------|
| 1 | 49 | 48,65 | -0,00 | Modo da rede |
| 2 | 60 | 59,86 | -0,00 | Modo da rede |
| 3 | 75 | 75,71 | -0,00 | Modo da rede |
| 4 | 84 | 84,20 | 3,37 | Modo da rede |
| 5 | 99 | 98,68 | -0,00 | Modo da rede |
| 6 | 108 | 108,23 | -0,00 | Modo da rede |
| 7 | 125 | 124,72 | -0,02 | Modo da rede |
| 8 | 131 | 131,32 | -0,00 | Modo da rede |
| 9 | 160 | 159,64 | -0,00 | τ (skel) |

| | | | | |
|----|-----|--------|-------|----------------------------------------|
| 10 | 183 | 182,87 | -0,00 | τ (CO ₂ ⁻) |
| 11 | 231 | 231,12 | -0,00 | |
| 12 | 240 | 239,90 | -0,00 | |

5.2.7 Região espectral entre 270 cm⁻¹ e 700 cm⁻¹ na polarização (⊥)

A Figura 5.14 apresenta a evolução dos espectros Raman de um cristal de l-glutamina na região espectral entre 270 cm⁻¹ e 700 cm⁻¹. Novamente, como na região anterior para esta mesma polarização, todas as bandas permanecem visíveis em todo o intervalo de temperatura analisado. Um gráfico das frequências dos modos e os ajustes lineares aos dados experimentais em função da temperatura se apresenta na Figura 5.15.

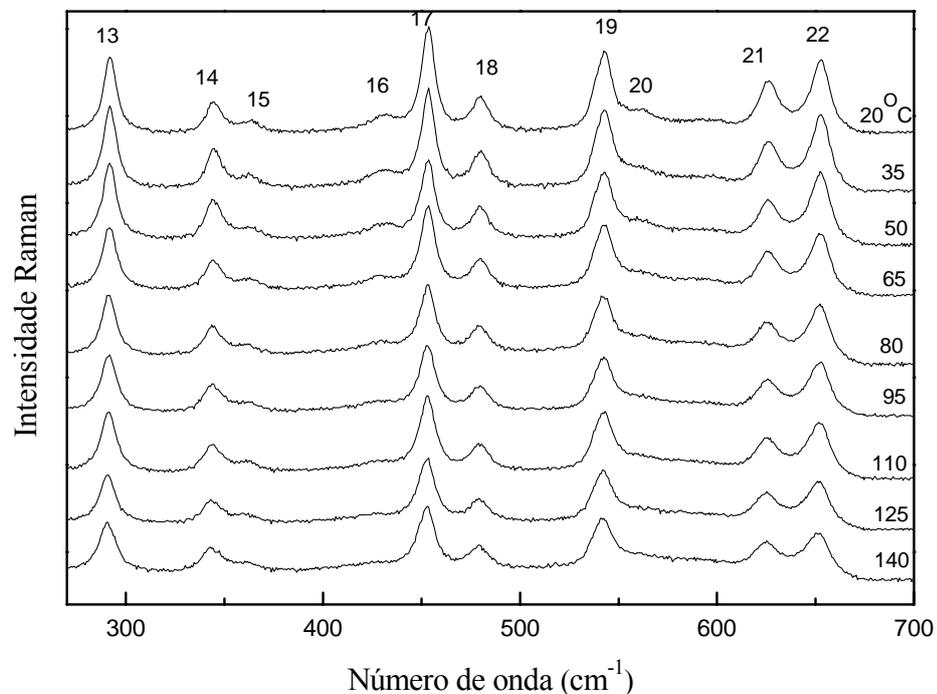


Figura 5.14 Espectros Raman de um cristal de l-glutamina no intervalo de frequência entre 270 cm⁻¹ e 700 cm⁻¹ para diversos valores de temperaturas na polarização (⊥).

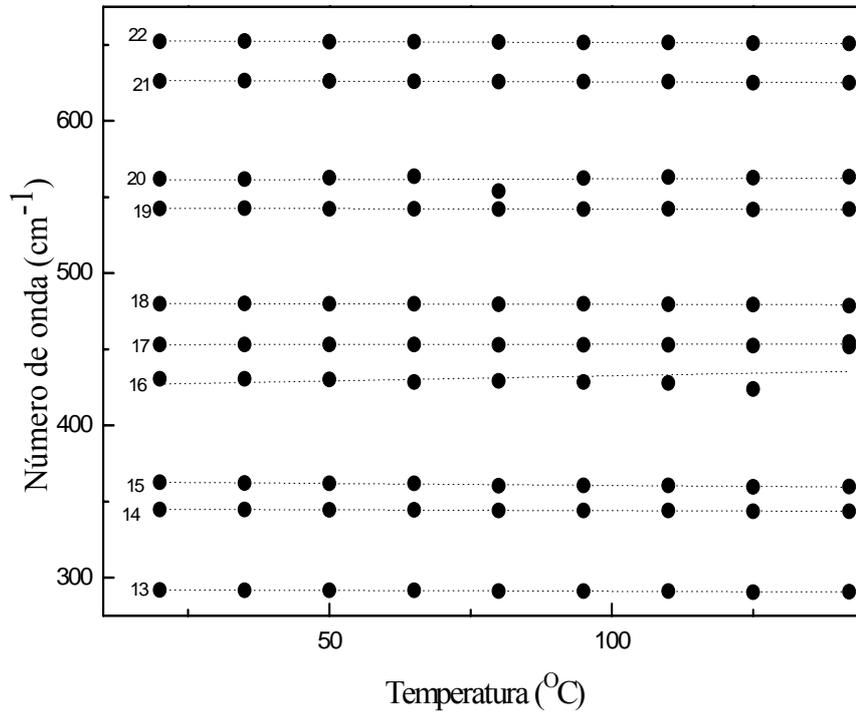


Figura 5.15 Gráfico do número de onda versus temperatura na região espectral entre 270 cm^{-1} e 700 cm^{-1} .

Tabela 5.7 Coeficientes dos ajustes lineares ($\omega = \omega_0 + \alpha T$) para os modos Raman do cristal de *l*-glutamina em função da temperatura na região espectral entre 270 cm^{-1} e 700 cm^{-1} .

| Modo | $\omega(\text{cm}^{-1})$ | $\omega_0(\text{cm}^{-1})$ | $d\omega/dT(\text{cm}^{-1}/\text{K})$ | Identificação |
|------|--------------------------|----------------------------|---------------------------------------|-------------------------|
| 13 | 292 | 292,19 | -0,01 | $\delta(\text{Skel})$ |
| 14 | 345 | 345,12 | -0,01 | $\delta(\text{Skel})$ |
| 15 | 362 | 363,21 | -0,02 | |
| 16 | 431 | 427,83 | 0,06 | $\delta(\text{Skel})$ |
| 17 | 453 | 452,97 | 0,00 | $\delta(\text{Skel})$ |
| 18 | 482 | 480,19 | -0,00 | $\nu(\text{C-C})$ |
| 19 | 541 | 542,75 | -0,00 | $\tau(\text{NH}_2)$ |
| 20 | 563 | 561,03 | -0,00 | $\delta(\text{CONH}_2)$ |
| 21 | 625 | 626,69 | -0,01 | $\delta(\text{CONH}_2)$ |

| | | | | |
|----|-----|--------|-------|----------------|
| 22 | 651 | 652,75 | -0,01 | γ (CCN) |
|----|-----|--------|-------|----------------|

5.2.8 Região espectral entre 750 cm^{-1} e 1250 cm^{-1} na polarização (\perp)

A Figura 5.16 apresenta a evolução dos espectros Raman de um cristal de l-glutamina no intervalo de frequência entre 750 cm^{-1} e 1250 cm^{-1} na polarização (\perp). Novamente se observa que todas as bandas em $T = 20^\circ\text{C}$ também são visíveis em $T = 142^\circ\text{C}$, embora seja possível notar que elas diminuem de intensidade com o aumento da temperatura. Nesta região nenhuma grande mudança é observada.

A Figura 5.17 resume o comportamento das frequências dos modos nesta região, onde não são observadas descontinuidades. Na Tabela 5.8 são apresentados os coeficientes dos ajustes lineares das frequências dos modos Raman nesta região.

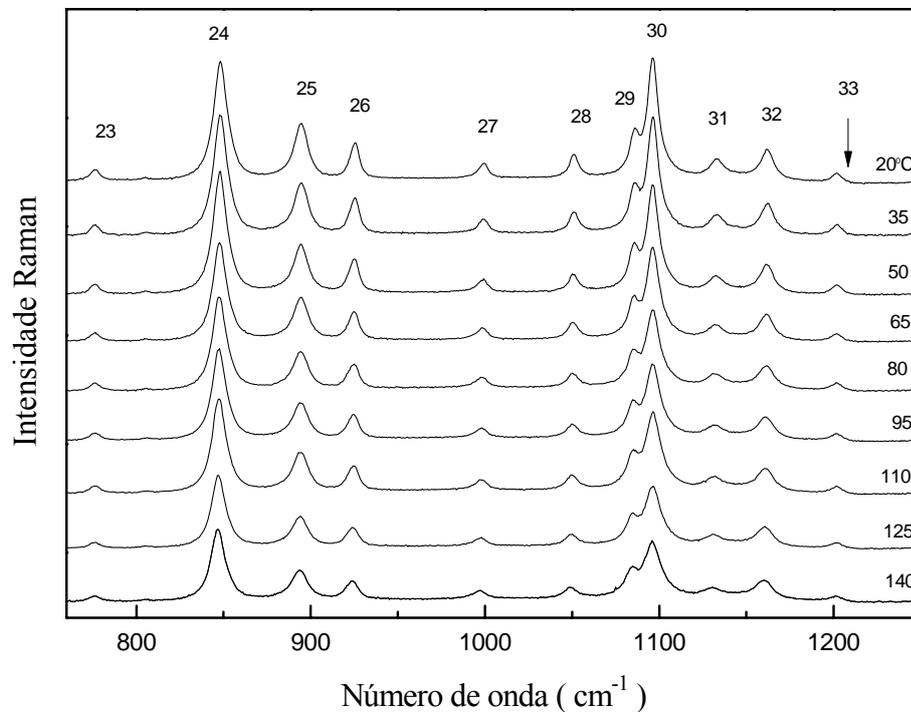


Figura 5.16 Espectros Raman de um cristal de l-glutamina no intervalo de frequência entre 750 cm^{-1} e 1250 cm^{-1} na polarização (\perp).

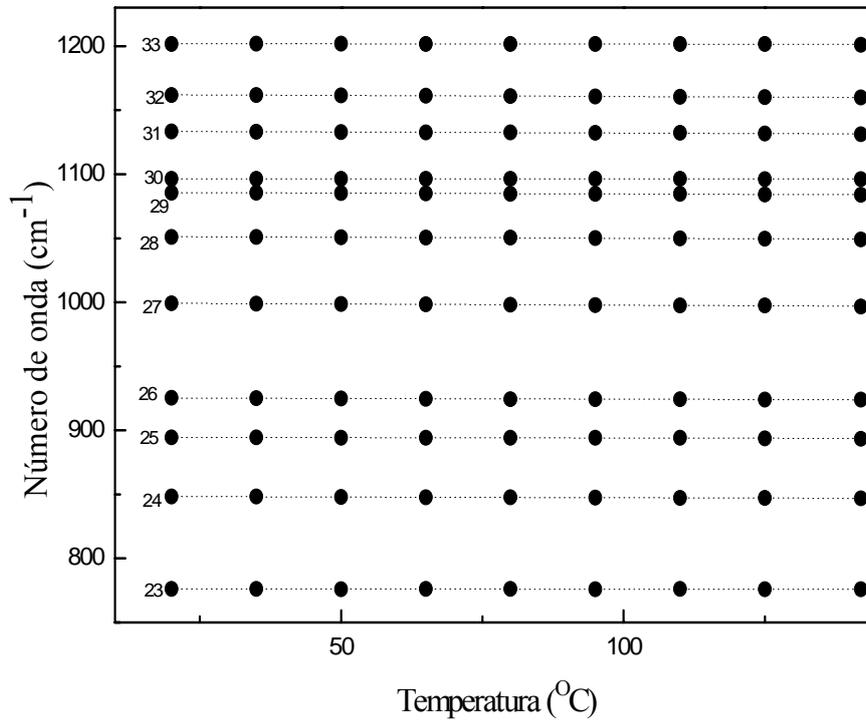


Figura 5.17 Gráfico do número de onda versus temperatura na região espectral entre 750 cm^{-1} e 1250 cm^{-1} .

Tabela 5.8 Coeficientes dos ajustes lineares ($\omega = \omega_0 + \alpha T$) para os modos Raman do cristal de L-glutamina em função da temperatura na região espectral entre 750 cm^{-1} e 1250 cm^{-1} .

| Modo | $\omega(\text{cm}^{-1})$ | $\omega_0(\text{cm}^{-1})$ | $d\omega/dT(\text{cm}^{-1}/\text{K})$ | Identificação |
|------|--------------------------|----------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| 23 | 776 | 776,27 | -0,00 | $\delta(\text{CH}_2)_{\text{rock}}$ |
| 24 | 848 | 848,53 | -0,01 | $\nu(\text{CC})$ |
| 25 | 895 | 894,77 | -0,00 | $\delta(\text{CH}_2)_{\text{rock}}$ |
| 26 | 925 | 925,44 | -0,01 | $\nu(\text{CC})$ |
| 27 | 1000 | 999,54 | -0,01 | $\nu(\text{CC})$ |
| 28 | 1051 | 1051,50 | -0,01 | $\nu(\text{CC})$ |
| 29 | 1085 | 1085,92 | -0,01 | $\nu(\text{CN})$ |
| 30 | 1096 | 1096,39 | -8,90 | $\nu(\text{CC})$ |
| 31 | 1134 | 1133,70 | -0,01 | $\delta(\text{NH}_3^+)_{\text{rock}}$ |

| | | | | |
|----|------|---------|-------|--------------------------------------|
| 32 | 1163 | 1162,32 | -0,01 | $\delta(\text{NH}_3^+), \text{rock}$ |
| 33 | 1202 | 1201,98 | -0,00 | $\delta(\text{CH}_2), \text{twist}$ |

5.2.9 Região espectral entre 1200 cm^{-1} e 1740 cm^{-1} na polarização (\perp)

A Figura 5.18 apresenta a evolução dos espectros Raman de l-glutamina no intervalo de frequência entre 1200 cm^{-1} e 1740 cm^{-1} para diversos valores de temperatura. É possível observar que à medida que a temperatura aumenta os picos se tornam menos intensos e as larguras de linha vão aumentando de tal modo que, em altas temperaturas, aparentemente as bandas ficam mais próximas.

Um gráfico com as frequências destas bandas, em função da temperatura e os ajustes lineares aos pontos experimentais é apresentado na Figura 5.19 e na Tabela 5.9 são apresentados os coeficientes dos ajustes lineares das frequências dos modos Raman nesta região.

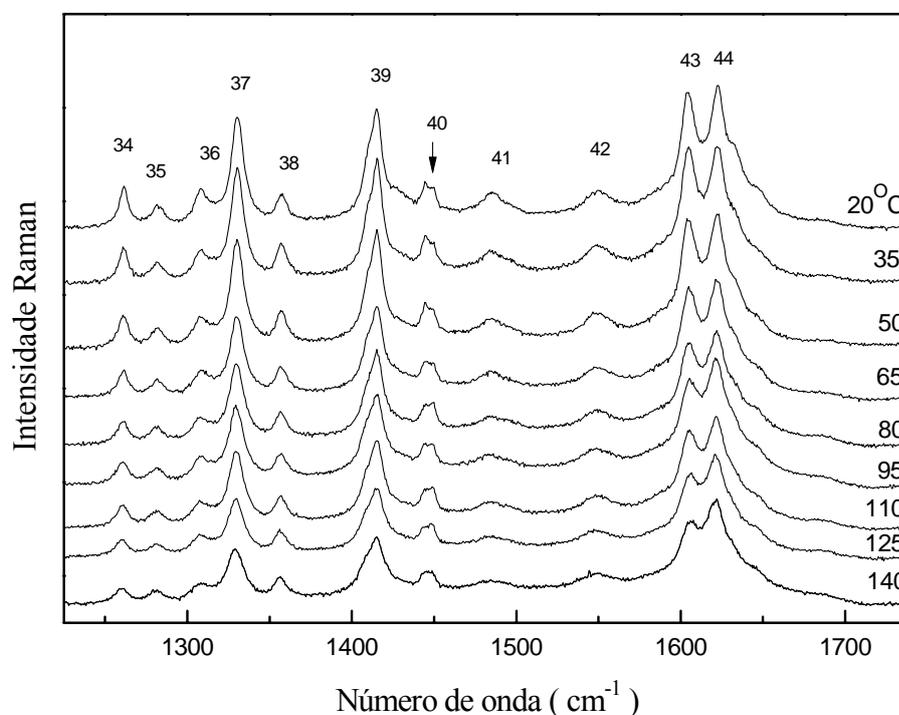


Figura 5.18 Espectros Raman de um cristal de l-glutamina no intervalo de frequência entre 1200 cm^{-1} e 1740 cm^{-1} na polarização (\perp).

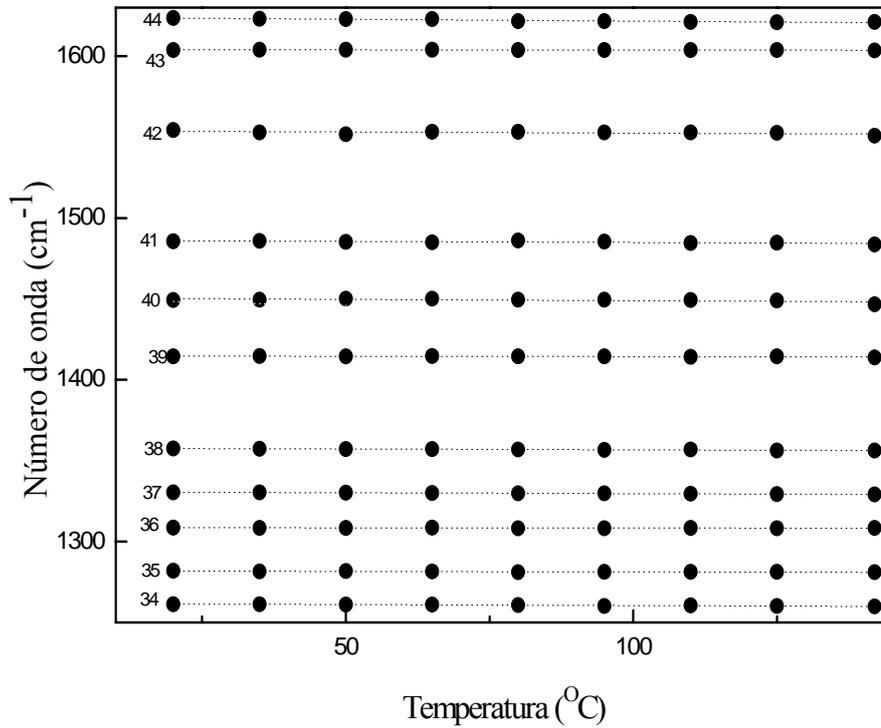


Figura 5.19 Gráfico do número de onda versus temperatura na região espectral entre 1200 cm^{-1} e 1740 cm^{-1} .

Tabela 5.9 Coeficientes dos ajustes lineares ($\omega = \omega_0 + \alpha T$) para os modos Raman do cristal de *l*-glutamina em função da temperatura na região espectral entre 1200 cm^{-1} e 1740 cm^{-1} .

| Modo | $\omega(\text{cm}^{-1})$ | $\omega_0(\text{cm}^{-1})$ | $d\omega/dT(\text{cm}^{-1}/\text{K})$ | Identificação |
|------|--------------------------|----------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|
| 34 | 1261 | 1261,64 | -0,01 | $\nu(\text{CH}_2)_{\text{twist}}$ |
| 35 | 1282 | 1281,90 | -0,00 | $\delta(\text{CH}_2)_{\text{wag}}$ |
| 36 | 1308 | 1308,64 | -0,00 | $\delta(\text{CH}_2)_{\text{wag}}$ |
| 37 | 1332 | 1330,76 | -0,01 | $\delta(\text{CH})$ |
| 38 | 1358 | 1357,72 | -0,01 | $\delta(\text{CH})$ |
| 39 | 1415 | 1414,70 | -0,00 | $\nu(\text{CN})$ |
| 40 | 1450 | 1450,49 | -0,01 | $\delta(\text{CH}_2)_{\text{sciss}}$ |

| | | | | |
|----|------|---------|-------|---------------------------|
| 41 | 1486 | 1486,21 | -0,01 | |
| 42 | 1550 | 1553,87 | -0,01 | |
| 43 | 1604 | 1604,02 | -0,00 | $\delta_a(\text{NH}_3^+)$ |
| 44 | 1623 | 1623,97 | -0,02 | $\nu_a(\text{CO}_2^-)$ |

5.2.10 Região espectral entre 2800 cm^{-1} e 3600 cm^{-1} na polarização (\perp)

Espectros Raman para um cristal de l-glutamina no intervalo de frequência entre 2800 cm^{-1} e 3600 cm^{-1} para diversos valores de temperatura são apresentados na Figura 5.20, dividida em duas partes para facilitar a visualização das bandas desta região.

Tal região, considerada de alta frequência, não apresenta mudanças significativas na intensidade das bandas Raman, portanto assim como na região de mesmo intervalo espectral para a polarização (\parallel), esta não apresenta indícios que apontem para uma ocorrência de uma transição de fase nem para mudanças conformacionais para as moléculas de l-glutamina no intervalo de temperatura analisado.

Finalmente, um gráfico com as frequências dos modos nesta região e os ajustes lineares aos pontos experimentais é apresentado na Figura 5.21 e na Tabela 5.10 se apresentam os coeficientes dos ajustes lineares das frequências dos modos Raman nesta região.

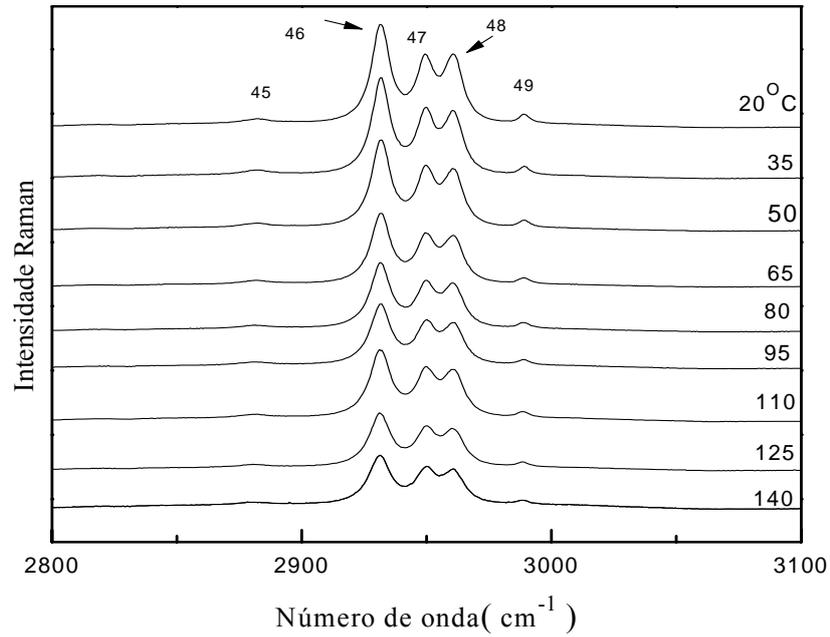


Figura 5.20 a) Espectros Raman de um cristal de *l*-glutamina no intervalo de frequência entre 2800 cm^{-1} e 3100 cm^{-1} na polarização (\perp)

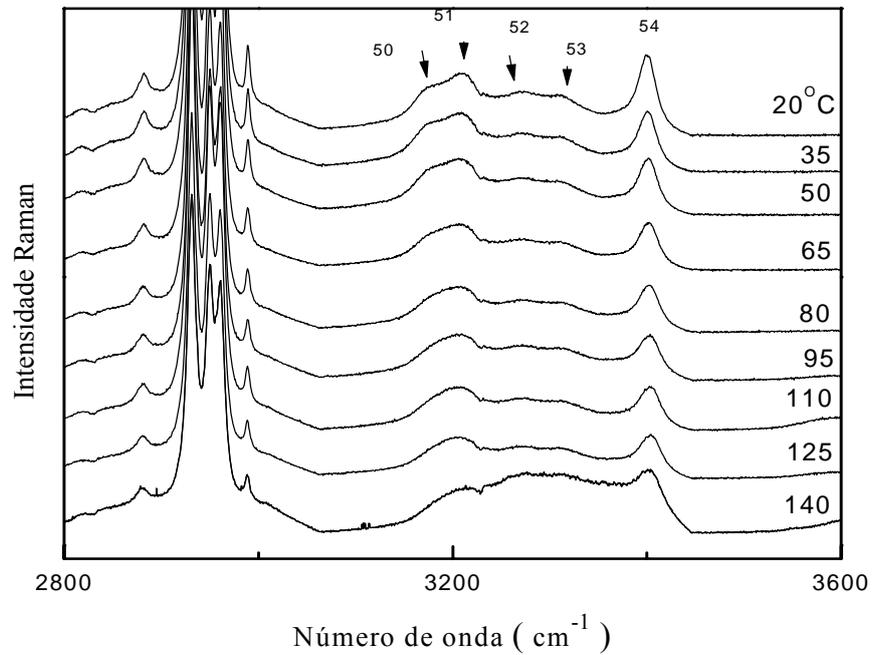


Figura 5.20 b) Espectros Raman de um cristal de *l*-glutamina no intervalo de frequência entre 2800 cm^{-1} e 3600 cm^{-1} na polarização (\perp)

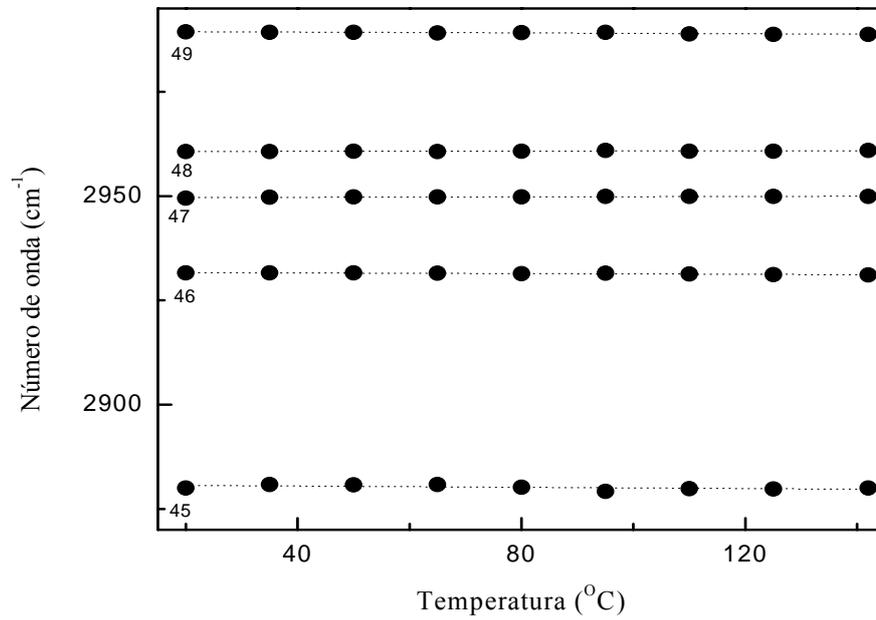


Figura 5.21 a) Gráfico do número de onda versus temperatura na região espectral entre 2800 cm^{-1} e 3100 cm^{-1} .

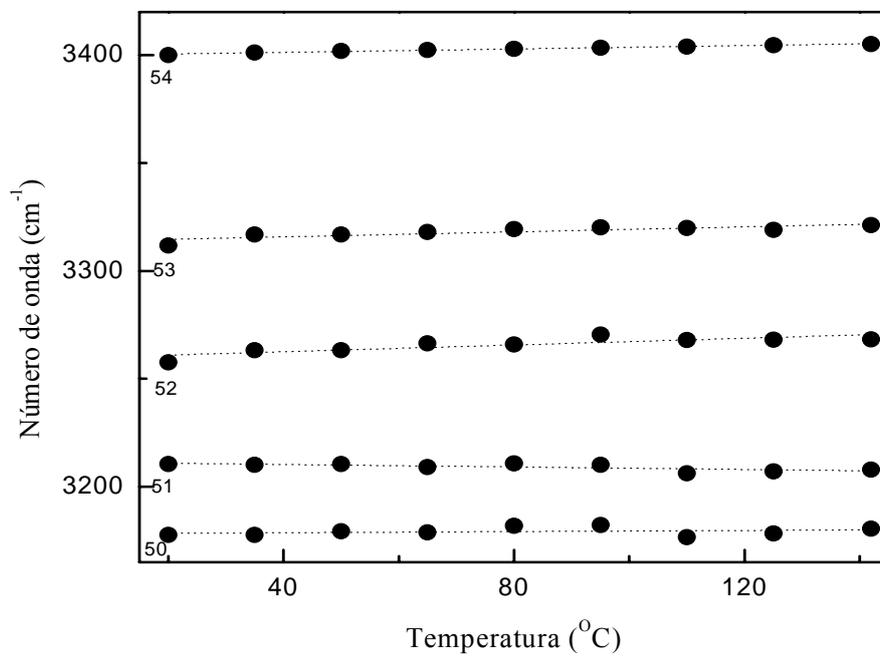


Figura 5.21 b) Gráfico do número de onda versus temperatura na região espectral entre 3100 cm^{-1} e 3400 cm^{-1} .

Tabela 5.10 Coeficientes dos ajustes lineares ($\omega = \omega_0 + \alpha T$) para os modos Raman do cristal de l-glutamina em função da temperatura na região espectral entre 2800 cm^{-1} e 3600 cm^{-1} .

| <i>Modo</i> | $\omega(\text{cm}^{-1})$ | $\omega_0(\text{cm}^{-1})$ | $d\omega/dT(\text{cm}^{-1}/\text{K})$ | <i>Identificação</i> |
|-------------|--------------------------|----------------------------|---------------------------------------|------------------------|
| 45 | 2880 | 2880,78 | -0,00 | |
| 46 | 2931 | 2931,75 | -0,00 | $\nu_s(\text{CH}_2)$ |
| 47 | 2950 | 2949,57 | 0,00 | $\nu(\text{CH})$ |
| 48 | 2961 | 2960,67 | 0,00 | $\nu_s(\text{CH}_2)$ |
| 49 | 2988 | 2989,51 | -0,00 | $\nu_a(\text{CH}_2)$ |
| 50 | 3177 | 3178,15 | 0,01 | $\nu_s(\text{NH}_2)$ |
| 51 | 3209 | 3211,49 | -0,02 | $\nu_s(\text{NH}_3^+)$ |
| 52 | 3258 | 3259,44 | 0,07 | |
| 53 | 3313 | 3313,49 | 0,05 | $\nu_a(\text{NH}_3^+)$ |
| 54 | 3400 | 3399,70 | 0,03 | $\nu_a(\text{NH}_2)$ |

5.3 Conclusões

Medidas de espalhamento Raman em função da temperatura foram realizadas em cristais de l-glutamina para temperaturas entre 20°C e 140°C para duas diferentes geometrias de espalhamento (\parallel) e (\perp). A evolução dos espectros Raman com o aumento da temperatura não apresentou modificações significativas nas bandas observadas; apenas um alargamento sutil na largura de linha de algumas bandas e uma diminuição da intensidade das mesmas. Além disso, verificou-se a inexistência de indícios de que o cristal de l-glutamina sofra uma transição de fase ou mudanças conformacionais em suas moléculas na célula unitária durante o aquecimento.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O presente trabalho apresentou um estudo sobre as propriedades vibracionais da l-glutamina em função da pressão hidrostática e da temperatura. A tentativa de identificação dos modos normais de vibração foi realizada através da comparação com trabalhos existentes na literatura.

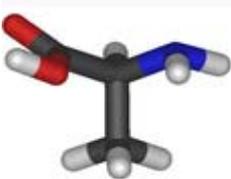
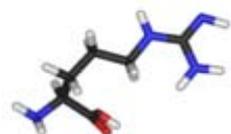
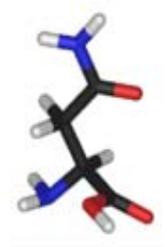
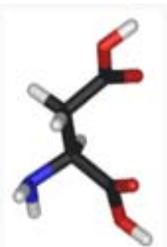
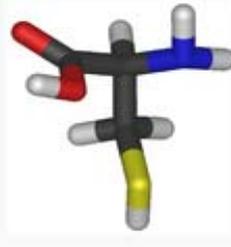
As medidas de espalhamento Raman em função da pressão hidrostática no cristal de l-glutamina foram realizadas no intervalo espectral entre 40 cm^{-1} e 3060 cm^{-1} e comprimindo a amostra desde a pressão atmosférica até 5,8 GPa, e em seguida descomprimindo-a até a pressão atmosférica, tendo o nujol como meio compressor hidrostático. Os resultados sugerem que o cristal de l-glutamina sofra uma transição de fase estrutural reversível em torno de aproximadamente 3,0 GPa.

As medidas de espalhamento Raman em função da temperatura realizadas na l-glutamina foram realizadas no intervalo entre 20°C e 140°C e na região espectral entre 30 cm^{-1} e 3600 cm^{-1} para duas diferentes geometrias de espalhamento (\parallel) e (\perp). A evolução dos espectros Raman com o aumento da temperatura não apresentou indícios de que o cristal de l-glutamina sofra uma transição de fase ou mudanças conformacionais em suas moléculas na célula unitária.

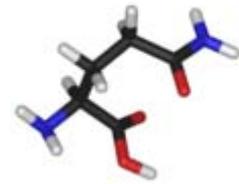
Como perspectivas de trabalhos futuros sugere-se: estudos de cálculos do tipo *ab initio* para calcular as frequências dos modos normais de vibração da l-glutamina e confirmar a identificação dos modos sugeridos no presente trabalho; realizar medidas de espalhamento Raman a baixas temperaturas com o objetivo de se aferir o comportamento da l-glutamina e compará-lo com o comportamento de outros aminoácidos; realizar medidas de calorimetria, tanto a altas como a baixas temperaturas, com o objetivo de obter uma melhor caracterização do cristal de l-glutamina.

APÊNDICE

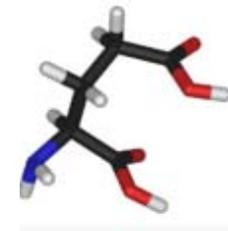
Radical, fórmula molecular e estrutura tridimensional dos vinte aminoácidos protéicos.

| <u>Aminoácido</u> | <u>Radical</u> | <u>Forma Molecular</u> | <u>Estrutura tridimensional</u> |
|------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Alanina</i> (<i>ALA</i>) | CH ₃ | C ₃ H ₇ NO ₂ |  |
| <i>Arginina</i> (<i>ARG</i>) | NH ₂ C(NH) ₂ (CH ₂) ₃ | C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂ H ₁₅ |  |
| <i>Asparagina</i> (<i>ASP</i>) | NH ₂ CO(CH ₂) | C ₄ H ₈ N ₂ O ₃ |  |
| <i>Ácido Aspártico</i> (<i>ASP</i>) | COOH(CH ₂) | C ₄ H ₇ NO ₄ |  |
| <i>Cisteína</i> (<i>CYS</i>) | SH(CH ₂) | C ₃ H ₇ NO ₂ S |  |

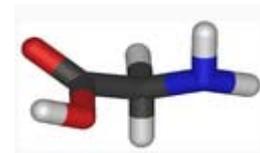
Glutamina
(GLN)



**Ácido
Glutâmico**
(GLU)



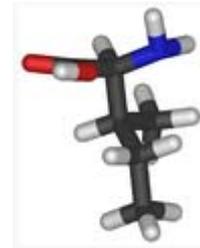
Glicina
(GLY)



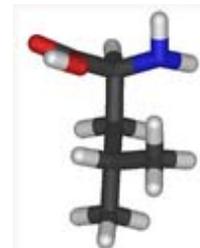
Histidina
(HIS)



Isoleucina
(ILEU)



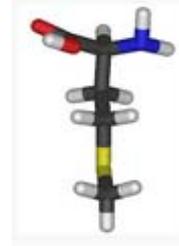
Leucina
(LEU)



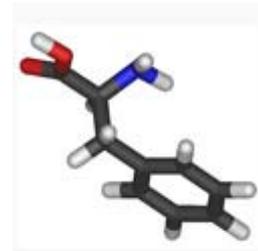
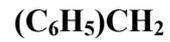
Lisina
(LYS)



Metionina
(*MET*)



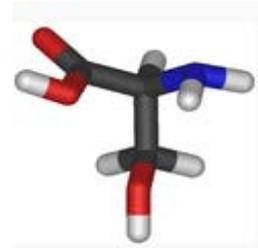
Fenilalanina
(*PHE*)



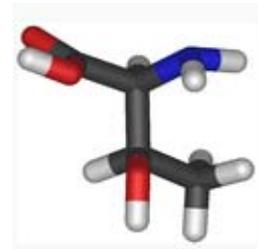
Prolina
(*PRO*)



Serina
(*SER*)



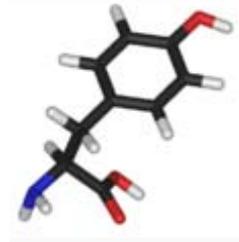
Treonina
(*THR*)



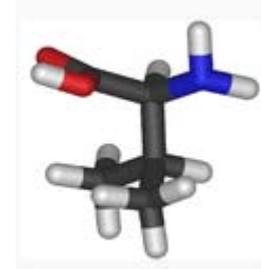
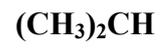
Triptófano
(*TRY*)



Tirosina
(TYR)



Valina
(VAL)



REFERÊNCIAS

- [1] SALA, O. **Fundamentos de espectroscopia Raman e no infravermelho**. São Paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista, 1996.
- [2] LEWIS, I. R.; EDWARDS, H. G. M. **Handbook of Raman Spectroscopy: From the Research Laboratory to the Process Line**. Vol.28, Nova Iorque: CRC Press, 2001.
- [3] KITTEL, C. **Introdução à física do estado sólido**. Rio de Janeiro: LTC, 2006.
- [4] <http://www.ajinomoto.com.br/novo/industria.php?prod=glutamina.shtml>; acesso em 20/05/2010
- [5] TIRAPEGUI, J. **Nutrição, metabolismo e suplementação na atividade física**. Atheneu, 2005.
- [6] PIERMANI, G. P.; BLOCK, S. **Ultrahigh pressure diamond-anvil cell and several semiconductor phase transition pressures in relation to the fixed point pressure scale**. Review of Scientific Instruments, Vol.46, n.8, 1975.
- [7] JAYARAMAN, A. **Diamond Anvil Cell and High-Pressure Physical Investigations**. Reviews of Modern Physics, Vol. 55, p.65-108, n. 1, 1983.
- [8] ROUSSEAU, D. L.; BAUMAN, R. P.; PORTO, S. P. S. **Normal mode determination in crystals**. Journal of Raman Spectroscopy, v. 10, n. 1, 1981.
- [9] COCHRAN, W.; PENFOLD, B. R. **The Crystal Structure of L-Glutamine**. Acta Crystallographica. Vol.5, p. 644, 1952.
- [10] KOETZLE, T. F.; FREY, M. N.; LEHMANN, M. S.; HAMILTON, W. C. **Precision Neutron Diffraction Structure Determination of Protein and Nucleic Acid Components. XIII. Molecular and Crystal Structure of the Amino Acid L-Glutamine**. Acta Crystallographica. Vol.B29, p.2571, 1973.

- [11] CASAL, L. P.; ALLAN, D. R.; PARSONS, S. **High-Pressure structural study of L- α -Glutamine and the use of Hirshfeld surfaces and graph-set notation to investigate the hydrogen bonding present in the structure up to 4.9 GPa.** Acta Crystallographica. Vol.B64, p.466-475, 2008.
- [12] DHAMELINCOURT, P.; RAMIREZ, F. J. **Polarized Micro-Raman and FT-IR Spectra of L-Glutamine.** Applied Spectroscopy. Vol.47, n.4, p.446-451, 1993.
- [13] MORENO, A. J. D. **Estudos de Transições de Fase por Espectroscopia Raman em Monocristais de L-Asparagina Monohidratada.** Tese (Tese de Doutorado) Departamento de Física, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1996.
- [14] FILHO, P. F. F. et al. **High Temperature Raman Spectra of L-Leucine Crystals.** Brazilian Journal of Physics, v.38, p.131-137, 2008.
- [15] ALMEIDA, F. M. et al. **Raman Spectra of L-Isoleucine Crystals.** Journal of Raman Spectroscopy, v.37, p.1296-1301, 2006.
- [16] GONÇALVES, R. O. et al. **High-Pressure Raman Spectra of Deuterated L-Alanine Crystal.** Journal of Raman Spectroscopy, v.40, p.958-963, 2009.
- [17] JÚNIOR, J. A. L. et al. **Raman Scattering of L-Valine Crystals.** Journal of Raman Spectroscopy, v.36, p.1076-1081, 2005.
- [18] CAO, X.; FISCHER, G. Journal Physics Chemistry, vol.A106, p.41, 2002.
- [19] JÚNIOR, J. A. L. **Espectroscopia Raman dos aminoácidos L-Metionina e DL-Alanina e de Nanotubos de Carbono.** Tese (Tese de Doutorado) Departamento de Física, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.
- [20] FILHO, P. F. F. **Estudo de Espalhamento Raman em Cristais de L-Leucina Submetidos a Altas Temperaturas e a Altas Pressões.** Tese (Tese de Doutorado) Departamento de Física, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.
- [21] LIMA, R. J. C. et al. **High-Pressure Raman Study of Taurine Crystal.** Journal of Raman Spectroscopy, v.32, p.27-32, 2001.
- [22] PINHEIRO, G. S. **Espectroscopia Vibracional em Cristais de L-Histidina.** Dissertação (Dissertação de Mestrado) Departamento de Física, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.
- [23] ABAGARO. B. T. O. **Espalhamento Raman em Policristais de L-Prolina Sob Altas Pressões Hidrostáticas.** Dissertação (Dissertação de Mestrado) Departamento de Física, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.
- [24] CAMPBELL, Mary K. **Bioquímica.** Artmed, 2006.

