



Universidade Estadual de Maringá
Centro de Ciências Exatas
Departamento De Física
Programa De Pós-Graduação Em Física

Raquel da Silva Palácios

**Estudo do aminoácido Glicina em função do pH
por espectroscopia Raman**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Francielle Sato

Maringá
2017

Raquel da Silva Palácios

Estudo do aminoácido Glicina em função do pH por espectroscopia Raman

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre.

Orientador (a): Prof.^a Dr.^a Francielle Sato.

Maringá
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

P153e Palácios, Raquel da Silva
Estudo do aminoácido Glicina em função do pH por espectroscopia Raman / Raquel da Silva Palácios. -- Maringá, 2017.
98 f. : il. color., figs., tabs.

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Francielle Sato.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Exatas, Programa Associado de Pós-Graduação em Física, 2017.

1. Glicina. 2. Espectroscopia Raman. 3. Variação de pH. I. Sato, Fracielle, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Física. III. Título.

CDD 21.ed. 535.846

AHS-CRB-9/1065

Raquel da Silva Palácios

Estudo do aminoácido Glicina em função do pH por espectroscopia Raman.

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre.

BANCA EXAMINADORA

Prof(a). Dr(a). Francielle Sato
Universidade Estadual de Maringá

Prof(a). Dr(a). Gisele Strieder Philippsen
Universidade Federal do Paraná
Campus Avançado Jandáia do Sul

Prof. Dr. Wilson Ricardo Weinand
Universidade Estadual de Maringá

Dedico esse trabalho a minha família.

Agradecimentos

Agradeço a todos que me apoiaram e incentivaram durante todo esse tempo do mestrado, em especial meus pais Ramão e Irenilda, que sempre me apoiaram e incentivaram aos estudos, e sempre acreditaram e nunca desistiram de mim.

Aos meus irmãos, Fernando, Rafael, Rodrigo (in memoriam), Renato e Renan e ao meu sobrinho Carlos Daniel, que me fazem querer conquistar sempre mais, me superando de diversas maneiras.

Aos amigos e colegas adquiridos no decorrer do mestrado, em especial a Adriane, Camila, Jaci, Lidi, Mari, Bárbara que participaram de diversos momentos, sempre colaborando.

Ao técnico do laboratório Fernando, que mesmo me sabotando nas medidas, proporcionou momentos de descontração, e provou que podemos ter uma vida repleta de amigos, ainda que a gente não tenha coração.

Ao Jean Michel, por me aturar todos esses anos e me apoiar independente das minhas escolhas.

A minha orientadora Francielle Sato, por todo o apoio, paciência, dedicação e competência ao me orientar, pela disposição de tempo dedicado, e pelos conselhos e idéias oferecidos.

Ao Professor Doutor Antonio Medina Neto, agradeço pelos ensinamentos, e

contribuições para com este trabalho.

A todos os funcionários do DFI/PFI-UEM, especialmente à Mônica e a Keila.

À CNPq, CAPES, pelo apoio financeiro.

Ao Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa e a Universidade Estadual de Maringá por toda infra-estrutura disponível para a realização deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade de participar e pelas contribuições pessoais acerca desta dissertação.

Enfim, agradeço de coração todos que acreditaram e torceram por mim, que contribuíram de forma direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Obrigada!

Resumo

No presente trabalho foi realizado um estudo do aminoácido Glicina por espectroscopia Raman, em solução aquosa com variação de pH, com o intuito de observar alterações espectrais devido aos processos de protonação e desprotonação da molécula de Glicina. A partir dos espectros Raman foi possível identificar alguns marcadores Raman atribuídos as espécies químicas da Glicina: catiônica aniônica e neutra. Estes marcadores foram mudanças espectrais devido à aceitação ou doação do íon H^+ na molécula de Glicina, nos terminais NH_3^+ e COO^- , entretanto, modos de vibração de outros grupos funcionais da molécula também sofreram alteração, inferindo que a distribuição da massa efetiva bem como alteração no comprimento das ligações químicas da molécula causou mudanças nos espectros Raman mediante a variação de pH. Além disso, foram crescidos cristais de Glicina em meio neutro, ácido e básico. Os cristais crescidos também foram avaliados por espectroscopia Raman, e revelaram características espectrais semelhantes, aos marcadores das espécies químicas da Glicina em solução, mostrando que a protonação e desprotonação do aminoácido influencia no crescimento de cristais, sendo assim foram realizadas medidas de difratometria de raios-X a fim de identificar as formas polimórficas do cristal de Glicina quando crescido em meios de diferentes valores de pH. A espectroscopia Raman e a difratometria de raios-X mostraram que os cristais crescidos em meio neutro e básico são semelhantes, porém crescido em meio ácido apresentaram características diferenciadas dos demais. Desta forma, mesmo as duas técnicas monitorando efeitos físicos diferentes corroboraram sobre as duas formas de cristal de Glicina crescidos em pH diferente. Portanto, a espectroscopia Raman demonstrou-se eficiente para fornecer informações sobre as alterações das vibrações moleculares do aminoácido Glicina com a variação de pH tanto em soluções aquosas quanto em sua forma cristalina.

Palavras-chave: Glicina, Espectroscopia Raman, Variação de pH.

Abstract

In this work a study about glycine amino acid as a function of pH was performed using the Raman spectroscopy to evaluate spectral changes due to protonation and deprotonation processes on the glycine molecule in aqueous solution. From Raman spectra were possible identify Raman markers of glycine chemical species: anionic, cationic and neutral ones. These markers were spectral changes due to adding or donating H^+ ion in the glycine terminals molecule, NH_3^+ e COO^- , though vibrational modes of others molecule functional groups also underwent alteration, implying that effective mass distribution as well as changes in the chemical bond length of the molecule causing changes in Raman spectra due to pH change. Furthermore, glycine crystals were grown in neutral, acid and basic media. The growth crystals also evaluated by Raman spectroscopy revealed similar spectral features as Raman markers of glycine chemical species in aqueous solution, showing that protonation and deprotonation of the amino acid influenced in the crystal growth, therefore X-ray diffraction measurements were performed to identify polymorphic forms of glycine crystal grown into the different pH media values. The Raman spectroscopy and x-ray diffraction showed that crystal grown into the neutral and basic media were similar, but both were different of crystal grown into acid media. Thus, even the two techniques monitoring different physical effects corroborated about the two glycine crystals forms grown in different pH. Therefore, Raman spectroscopy showed efficient to provide information about molecular vibrations of glycine amino acid as a function of pH for both aqueous solution and crystalline form.

Keywords: Glycine, Raman Spectroscopy, pH variation.

Lista de Figuras

Figura 2. 1. Estruturas das proteínas..	20
Figura 2. 2. Estrutura geral de um aminoácido.	20
Figura 2. 3. Uma forma de representar o estereoisomerismo em aminoácidos.....	21
Figura 2. 4. Convenções utilizadas para identificar os carbonos de um aminoácido.....	21
Figura 2. 5. Exemplo de mudança de carga de um aminoácido ao receber ou doar prótons ..	24
Figura 2. 6: Curvas de titulação para o glutamato e a histidina. O pK_a do grupo R é designado como pK_R . Aminoácidos com um grupo R ionizável têm curvas de titulação mais complexas, com três estágios correspondendo às três etapas possíveis de ionização.....	24
Figura 2. 7. Estrutura do aminoácido Glicina (a) Estrutura tridimensional (N – Azul, C – preta, O – Vermelha e H - Branca) (b) Fórmula estrutural da Glicina	26
Figura 2. 8. Curva de titulação do aminoácido Glicina em temperatura ambiente.	27
Figura 2. 9. Efeito que o ambiente químico pode causar nos valores pK_a do aminoácido Glicina.....	28
Figura 2. 10. Diagrama Ramachandram da Glicina. A região azul escura são as zonas permitidas sem sobreposição de átomos.....	30
Figura 2. 11. Formas polimórficas da Glicina sob variação de pressão. As formas γ e β perdem sua natureza cristalina ou sofrem transição de fase sob pressão de poucos GPa, enquanto que a fase α torna-se estável sob a maior pressão utilizada no experimento (23 GPa). A transição da fase β para δ ocorre em 0,76 GPa. A transição da fase γ para ϵ ocorre no intervalo de 2,7 a 7,6 GPa paralelamente a fragmentação do cristal. Já a fase descrita como desconhecida, ζ , ocorre em processo de descompressão até 0,62 GPa, numa transição irreversível da fase ϵ estável para ζ	31
Figura 2. 12. Estrutura cristalina do aminoácido Glicina com configuração de carga neutra. a,	

b e c indicam os eixos cristalográficos da célula unitária.....	32
Figura 3. 1. Esquema de coordenadas para descrever os N átomos diferentes. Cada átomo com 3N coordenadas, fornecendo assim 12 graus de liberdade	35
Figura 3. 2. Modos de vibrações moleculares	36
Figura 3. 3. Esquema do experimento realizado por Raman.....	37
Figura 3. 4. Esquema dos tipos de espalhamento: (a) Raman Stokes; (b) Rayleigh; (c) Raman Anti-Stokes.	39
Figura 3. 5. No espectro Raman, os fótons na linha central, representando o espalhamento Rayleigh e os da esquerda e direita representando o espalhamento Anti-Stokes e Stokes, respectivamente.....	39
Figura 3. 6. Variação da polarizabilidade da molécula de água (elipsóides). ν_1 , ν_2 e ν_3 são os modos de vibração Raman ativos da molécula.....	40
Figura 3. 7. Os sete grupos de simetria de células unitárias. Estão indicados em cada simetria os eixos cristalográficos a, b e c, bem como os ângulos entre os eixos cristalinos α , β e γ	42
Figura 3. 8. As 14 redes Bravais espaciais.	42
Figura 3. 9. Obtenção dos raios-X (a) Produção de raios-X (b) Espectro de radiação branco dos raios-X (c) Obtenção de radiação de raios-X K_α e K_β	44
Figura 3. 10. Formas de interferências entre as ondas eletromagnéticas	44
Figura 3. 11: Esquema da difração de Bragg entre os planos cristalinos.....	45
Figura 3. 12. Representação de um Difratorômetro de raios-X.....	46
Figura 4. 1. (a) Cristais de Glicina obtidos em pH neutro. (b) Cristais de Glicina crescidos em solução de pH 9,80. (c) Cristais de Glicina crescidos em solução de pH 2,40.....	52
Figura 4. 2. Equipamento utilizado para as medidas de FT-Raman.....	53
Figura 4. 3. Microscópio Raman confocal (Micro Raman).....	54
Figura 5. 1. Espectro Raman da Glicina (a) na região de $400\text{-}2000\text{cm}^{-1}$ e (b) de 2000 a 4000cm^{-1}	56
Figura 5. 2. Amostras em diferentes concentrações das soluções aquosas da Glicina. A1 = $3,33\text{Mol/L}$, A2 = $2,22\text{Mol/L}$, A3= $1,66\text{Mol/L}$, A4= $1,33\text{Mol/L}$, A5= $1,11\text{Mol/L}$ e A6= $0,96\text{Mol/L}$	59

- Figura 5. 3.** Espectros Raman (a) Menor concentração da Glicina em solução aquosa $A_6=0,96\text{Mol/L}$, (b) Maior concentração da Glicina em solução aquosa $A_1=3,33\text{Mol/L}$ e (c) Glicina comercial em pó. 60
- Figura 5. 4.** Curvas de titulações da Glicina: (a) obtida neste trabalho para a solução aquosa de Glicina a $0,05\text{Mol/L}$, (b) obtida neste trabalho para a solução aquosa de Glicina a 3Mol/L e (c) obtida na literatura, sendo pK_a a tendência de um grupo fornecer próton e pI o ponto isoelétrico..... 62
- Figura 5. 5.** Solução aquosas da Glicina em 3Mol/L em $\text{pH} = 6,28$ (neutro). Espectro normalizado com relação à intensidade da banda centrada em 1617cm^{-1} 64
- Figura 5. 6.** Espectros Raman das soluções aquosas da Glicina em 3Mol/L na forma catiônica (a) Glicina 3Mol/L em $\text{pH} 1,06$, (b) Glicina 3Mol/L em $\text{pH} 2,47$ (c) Glicina 3Mol/L em $\text{pH} 6,28$. Os espectros estão normalizados com relação à intensidade da banda centrada em 1617cm^{-1} 65
- Figura 5. 7.** Espectros Raman das soluções aquosas da Glicina em 3Mol/L na forma aniônica (a) Glicina 3Mol/L em $\text{pH} 12,42$ (b) Glicina 3Mol/L em $\text{pH} 9,86$ (c) Glicina 3Mol/L em $\text{pH} 6,28$. Os espectros estão normalizados com relação à intensidade da banda centrada em 1617cm^{-1} 68
- Figura 5. 8.** Espectros Raman das soluções aquosas da Glicina à 3Mol/L para pH de valores $1,06, 2,47, 6,28, 9,86, 12,42$. Os espectros estão normalizados com relação à intensidade da banda centrada em 1617cm^{-1} 69
- Figura 5. 9.** Estrutura química das espécies de Glicina: neutra Glicina (0), aniônica Glicina (-1) e catiônica Glicina (+1) e a localização dos ângulos conformacionais Ψ e ϕ . 70
- Figura 5. 10.** Exemplo de ajuste gaussiano para a solução de Glicina neutra na região de 1200 a 800cm^{-1} 72
- Figura 5. 11.** Posição dos centros das bandas em função da variação de pH : (a) 507cm^{-1} (referente ao grupo carboxílico), (b) 897cm^{-1} (estiramento $C_\alpha-C$), (c) 1412cm^{-1} (deformação da cadeia lateral) e (d) 1032cm^{-1} (estiramento $N-C_\alpha$). As posições dos centros na figura são referentes à solução de Glicina em $\text{pH} 6,28$ (forma neutra). 73
- Figura 5. 12.** Diagrama da distribuição de energia das espécies químicas da Glicina. 74
- Figura 5. 13.** Espectros Raman dos cristais crescidos em diferentes valores de pH (a) Cristal Glicina em $\text{pH} 2,40$ (b) Cristal Glicina em pH Neutro (c) Cristal Glicina em $\text{pH} 9,80$ 77
- Figura 5. 14.** Difrátogramas dos cristais de Glicina crescidos em pH (a) básico ($2,40$), (b) neutro ($6,36$) e (c) ácido ($9,80$). As intensidades foram normalizadas para fins de melhor visualização. 79
- Figura 5. 15.** Difrátogramas obtidos por meio do programa Vesta utilizando os parâmetros de rede contidos nos arquivos de informações cristalográficas (*.cif) obtidos das referências para as estruturas polimórficas da Glicina (a) $\gamma\text{-Gly}$, (b) $\beta\text{-Gly}$ e (c) $\alpha\text{-Gly}$.

Gly, respectivamente.	80
Figura 5. 16. Difrátogramas dos cristais de Glicina comercial comparado com as informações cristalográficas obtidas om um programa de análise de dados de DRX com a ficha cristalográfica (barras em vermelho) PDF 032-1702	82
Figura 5. 17. Difrátogramas dos cristais de Glicina: (a) crescido em meio de pH = 9,80, (b) crescido em pH neutro obtido com um programa de análise de dados de DRX com a ficha cristalográfica PDF 06-0230 [68] (barras em vermelho) e do arquivo das informações cristalográficas para a γ -Gly.	83
Figura 5. 18. Representação esquemática das células unitárias das formas polimórficas α -Gly, β -Gly e γ -Gly. Os eixos a, b e c representam as orientações dos eixos cristalográficos.....	84
Figura 5. 19. Difrátograma do cristal de Glicina crescido em pH = 2,40 e do cristal de diGlicina-HCl obtido om um programa de análise de dados de DRX com a ficha cristalográfica PDF 32-1649 (barras em verde).....	85

Lista de Tabelas

Tabela 2. 1. Relação de aminoácidos em essenciais e não-essenciais e seus respectivos símbolos.....	22
Tabela 5. 1. Bandas Raman observadas para o aminoácido Glicina na forma sólida	57
Tabela 5. 2. Valores de concentração e molaridade das soluções aquosas de Glicina	59
Tabela 5. 3. Dados cristalográficos das formas polimórficas da Glicina.	81

Lista de Símbolos e Abreviações

°C – Graus Celsius

M – Molaridade

Mol/L – Mol por litro

δ – modo vibracional de deformação angular

ρ – modo vibracional de torção fora do plano

ν – modo vibracional de estiramento

Asym – modo vibracional de estiramento assimétrico

Rock - modo vibracional de deformação angular assimétrica no plano

Twist - modo vibracional de deformação angular simétrica fora do plano

Sciss – modo vibracional de deformação angular do tipo tesoura no plano

DFT – Teoria de Densidade Funcional

DRX – Difractometria de Raios-X

HCl – Ácido Clorídrico

Glicina – Aminoácido Glicina

Med – Medium (Média)

NaOH – Hidróxido de Sódio

pI – Ponto Isoelétrico

Str – Strong (Forte)

Wk – Weak (Fraca)

Xc – Centro da banda Raman

Sumário

Introdução e Objetivos.....	16
1.1 INTRODUÇÃO	16
Fundamentação Teórica	19
2.1 AMINOÁCIDOS	19
2.2 GLICINA	26
2.3 CRESCIMENTO DE CRISTAIS DE GLICINA	30
Conceitos Gerais das Técnicas Utilizadas	34
3.1 VIBRAÇÃO MOLECULAR	34
3.2 ESPECTROSCOPIA RAMAN.....	36
3.3 ESTRUTURAS CRISTALINAS.....	41
3.4 DIFRATOMETRIA DE RAIOS-X (DRX).....	43
Materiais e Métodos	47
4.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	47
4.1.1 SOLUÇÕES AQUOSAS DE GLICINA	48
4.1.2 SOLUÇÕES AQUOSAS DE GLICINA COM DIFERENTES VALORES DE pH.....	49
4.1.3 CRESCIMENTO DE CRISTAIS DE GLICINA EM DIFERENTES VALORES DE pH.....	50
4.2 ESPECTROSCOPIA RAMAN.....	52
4.3 DIFRATOMETRIA DE RAIOS-X	54
Resultados e Discussão.....	55
5.1. CARACTERIZAÇÃO DO AMINOÁCIDO GLICINA NA FORMA SÓLIDA	55
5.2. ESTUDO DA SOLUÇÃO AQUOSA DE GLICINA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES	58
5.3. VARIAÇÃO DE pH EM SOLUÇÕES AQUOSAS DE GLICINA.....	61
5.4 CRESCIMENTO DE CRISTAL DE GLICINA EM DIFERENTES VALORES DE pH	75
Conclusão e Perspectivas Futuras	87
Referências Bibliográficas	89

Introdução e Objetivos

1.1 INTRODUÇÃO

Aminoácidos podem ser considerados como unidades fundamentais de proteínas, as quais são fundamentais para a existência e manutenção da vida. São 20 os aminoácidos principais que se subdividem em dois grandes grupos: essenciais e não essenciais. Os essenciais não são produzidos pelo organismo humano, por isso há necessidade de sua ingestão em dietas apropriadas; já os não essenciais são produzidos por nosso organismo, muitas vezes sendo sintetizado a partir de outros aminoácidos, como o caso da tirosina que é sintetizada a partir da fenilalanina [1]. A estrutura geral de um aminoácido envolve um átomo de carbono, chamado carbono alfa, C_{α} , ligado a um grupo carboxílico (COO^{-}), a um grupo amino (NH_3^{+}), a um átomo de hidrogênio e a um grupo R, chamado de cadeia lateral, que é único para cada aminoácido. A estrutura do C_{α} é um centro quiral, isto é, este átomo de carbono está ligado a quatro grupos diferentes. A quiralidade refere-se a uma molécula que tem atividade óptica, de modo que os aminoácidos são moléculas opticamente ativas. A única exceção é a Glicina, o aminoácido mais simples, em que a cadeia lateral R é constituída de um átomo de hidrogênio ($R = H$) [2].

A Glicina (Gly) é um aminoácido não essencial descoberto por Henri Braconnot em 1820, que a obteve a partir do hidrolisado de gelatina, denominando como açúcar de gelatina. Porém, em meados de 1840, Eben N. Horsford e Jöns J. Berzelius estudaram paralelamente o açúcar de gelatina identificando a presença de nitrogênio em sua composição, denominando-o de Glicina [3]. Por apresentar uma estrutura química relativamente simples, a Glicina é utilizada como modelo para outros aminoácidos em estudos de características estruturais e modos vibracionais, tanto em fase sólida como gasosa, bem como em solução [4].

Dependendo do meio e do estado físico os aminoácidos podem exibir propriedades estruturais diferentes, e isto não é diferente com a Glicina. Em solução aquosa, de pH neutro, a Glicina é eletricamente neutra, mas possui cargas opostas em diferentes átomos (NH_3^+ e COO^-) chamada de molécula *zwitterion*, em pH ácido a Glicina tende a se tornar espécie ácida e em pH básico espécie básica, o que ocorre, respectivamente, é o processo de protonação do grupo COO^- que se torna COOH e desprotonação do grupo NH_3^+ que perde um íon de H^+ tornando-se NH_2 . Esse caráter anfótero da Glicina é importante em reações enzimáticas, na farmacologia e de interesse em aplicações de óptica não linear [5-7].

No estado sólido, a forma de *zwitterion*, o grupo NH_3^+ , geralmente, tem interações com o grupo COO^- de outras moléculas, já em solução esta forma dipolar tem interações com as moléculas de água da vizinhança por meio de ligações de hidrogênio. Desta maneira, diferentes estruturas químicas originadas destas interações influenciam os modos vibracionais da molécula, os quais podem ser monitorados por espectroscopia vibracional [8]. Técnicas espectroscópicas como absorção no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e espalhamento Raman tem sido utilizadas no estudo de aminoácidos [4, 8-11] por permitirem identificar as mudanças moleculares decorrentes das ligações químicas estabelecidas, bem como devido à afinidade entre cargas elétricas das moléculas e/ou íons nas vizinhanças de molécula alvo, as quais podem variar o momento de dipolo e/ou a polarizabilidade da mesma. Estes efeitos de variação são os princípios físicos, chamados de regra de seleção, para que haja absorção no infravermelho ou espalhamento Raman. Sendo assim, técnicas de espectroscopia vibracional são poderosas ferramentas para estudo de aminoácidos mediante a alteração do meio.

Aliada a espectroscopia vibracional, os trabalhos científicos apresentam aproximações matemáticas, tais como teoria de densidade funcional (DFT), que fornecem informações importantes com respeito às interações da molécula alvo com o meio, podendo ser calculados os modos vibracionais da molécula e comparados aos espectros vibracionais experimentais [12, 13]. Na forma sólida a difratometria de Raios-X (DRX), também é bastante utilizada por fornecer as características quanto à estrutura cristalina de aminoácidos, a qual pode sofrer mudança em sua organização mediante as interações de uma molécula com o meio [14, 15].

Entre as técnicas de vibracionais, a espectroscopia Raman é muito utilizada no monitoramento de reações químicas, fornecendo informações detalhadas sobre as vibrações moleculares. Tais vibrações são sensíveis a variação e tipo de ligações químicas, além da vizinhança que as circundam [16]. Cada banda Raman fornecida pelo espectro da amostra é

representativa de um modo de vibração específico entre átomos da molécula, desde que seja Raman ativo. Além disso, é possível realizar análises tanto em amostras líquidas como sólidas.

Devido à forma neutra, catiônica e aniônica em solução, além de suas características cristalinas polimórficas e estrutura simplificada, a Glicina tem sido estudada por espectroscopia Raman a fim de se obter melhor entendimento de suas interações com moléculas de água da vizinhança, das diferentes configurações moleculares nos processos de protonação e desprotonação, entre outros aspectos [4, 9, 16, 17].

Diante do exposto, o principal objetivo deste trabalho é o estudo da estrutura do aminoácido Glicina por meio da espectroscopia Raman, em solução aquosa, com variação de pH desde ácido até básico. Complementar ao estudo das soluções foi crescido cristais de Glicina em soluções aquosas neutra, ácida e básica, que posteriormente foram analisados quanto às possíveis alterações moleculares por espectroscopia Raman e, em se tratando de estruturas cristalinas, foram identificadas as possíveis formas polimórficas dos cristais crescidos em diferentes valores de pH por DRX.

O presente trabalho está dividido de forma que neste primeiro capítulo apresenta-se uma breve introdução, no segundo capítulo tem-se uma revisão bibliográfica dos conceitos gerais relacionados ao objetivo deste estudo. Em seguida, no terceiro capítulo, são apresentados os conceitos gerais que tratam das técnicas experimentais utilizadas. No quarto capítulo é apresentada a descrição da preparação das amostras e dos métodos utilizados para as análises. No quinto capítulo, resultados e discussão, apresentam-se as caracterizações da Glicina em forma sólida e em solução aquosa, seguidas dos resultados e análises das soluções aquosas e cristais de Glicina em função da variação do pH por meio da técnica de espectroscopia Raman e DRX. Por fim, no sexto capítulo, são apresentadas as conclusões e perspectivas de continuidade deste trabalho.

Fundamentação Teórica

Neste capítulo são apresentados conceitos sobre aminoácidos, em especial a Glicina, e algumas considerações sobre crescimento de cristais.

2.1 AMINOÁCIDOS

São 20 aminoácidos principais que formam as proteínas, e essas subunidades monoméricas são as chaves das milhares de estruturas de proteínas. Embora sejam constituídas a partir dos mesmos 20 aminoácidos, estas podem apresentar milhares de combinações entre si, e cada combinação nos fornece um tipo de estrutura com determinada função biológica. No geral o que difere os aminoácidos entre si são as cadeias laterais, pois cada um possui uma cadeia lateral com determinadas propriedades e características químicas. Os 20 aminoácidos podem ser considerados a base da linguagem que permite a interpretação das estruturas das proteínas [18].

A sequência de aminoácidos que origina a proteína ocorre devido à ligação peptídica entre um grupo amino e um grupo carboxílico, desta forma as proteínas apresentam conformações moleculares, chamadas de estruturas das proteínas, que dependem das ligações entre os aminoácidos, resultando em interações intermoleculares entre partes de uma mesma proteína ou entre várias cadeias de proteínas. As estruturas das proteínas são separadas em primária, secundária, terciária e quaternária. A cadeia principal da proteína formada pela ligação dos aminoácidos é chamada de estrutura primária, a estrutura secundária, geralmente é resultante de ligações de hidrogênio entre o hidrogênio do grupo – NH e o oxigênio do grupo C = O. Já a estrutura terciária ocorre quando as estruturas primárias das proteínas dobram-se sobre si mesmas e a quaternária é oriunda da união de várias estruturas terciárias que

assumem formas espaciais bem definidas [19]. As estruturas das proteínas estão representadas na Figura 2.1.

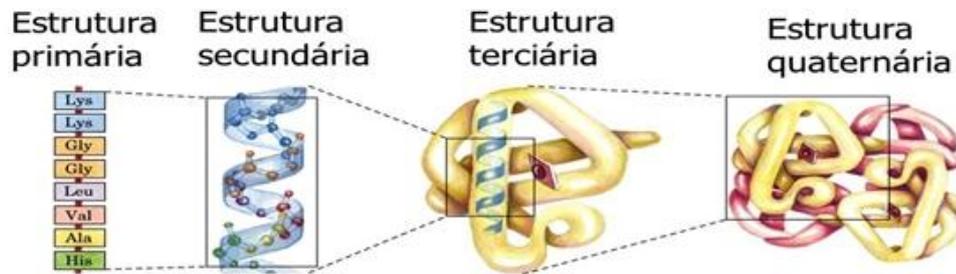


Figura 2. 1. Estruturas das proteínas. Adaptado de [20].

Sendo as proteínas macromoléculas responsáveis pela maioria das atividades biológicas em nossas vidas, fica claro o importante papel que os aminoácidos têm para manutenção e evolução das espécies vivas. Neste viés, compreender um pouco sobre as características dos aminoácidos é essencial em muitos campos do conhecimento científico.

Os aminoácidos apresentam em sua estrutura, um carbono α (C_{α}) quiral ligado a quatro outros grupos funcionais, sendo o que diferencia um aminoácido do outro é a sua cadeia lateral. A quiralidade se refere a uma molécula que tem atividade óptica, os aminoácidos, em sua maioria (menos a Glicina) são moléculas opticamente ativas, ou seja, polarizam a luz que atravessa a molécula no sentido horário (levógiro) ou anti-horário (destrogiro). A Figura 2.2, ilustra a estrutura principal de um aminoácido, composto por um C_{α} ligado a um grupo amina ($-NH_3^+$), a um grupo carboxila ($-COO^-$), um grupo R (cadeia lateral) e um átomo de hidrogênio.

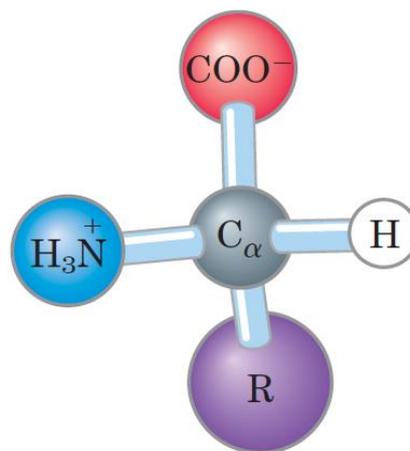


Figura 2. 2. Estrutura geral de um aminoácido. [19]

Em decorrência do arranjo tetraédrico dos orbitais de ligação em volta do átomo de carbono α , os quatro grupos diferentes podem ocupar dois arranjos espaciais únicos e, portanto, os aminoácidos têm dois estereoisômeros¹ possíveis, uma vez que são imagens especulares não que não se sobrepõe uma a outra [19,20].

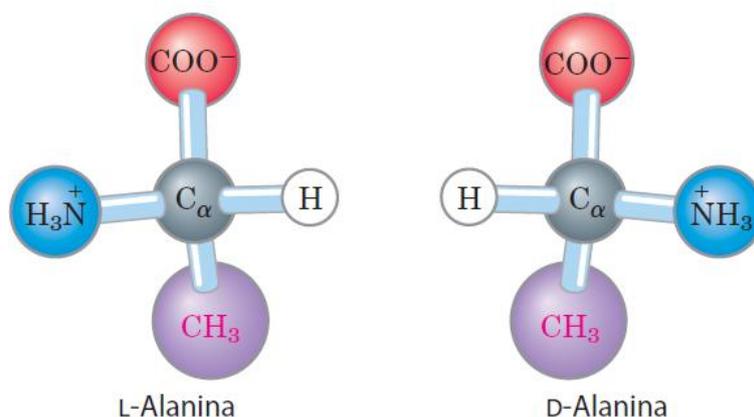


Figura 2. 3. Uma forma de representar o estereoisomerismo em aminoácidos [19].

Há algumas convenções utilizadas para identificar os carbonos na cadeia de um aminoácido, como visto em figuras anteriores; o centro quiral é designado por C_α , e desta forma os próximos carbonos seriam designados por outros símbolos como β , γ , δ , ϵ , e assim por diante. Mas, por vezes, é observada outra designação, já que para a maioria das outras moléculas orgânicas, os átomos de carbono são numerados a partir de uma extremidade. Nessa última convenção, o carbono na extremidade (o primeiro na contagem) de um aminoácido seria o C-1 e o carbono α seria o C-2.

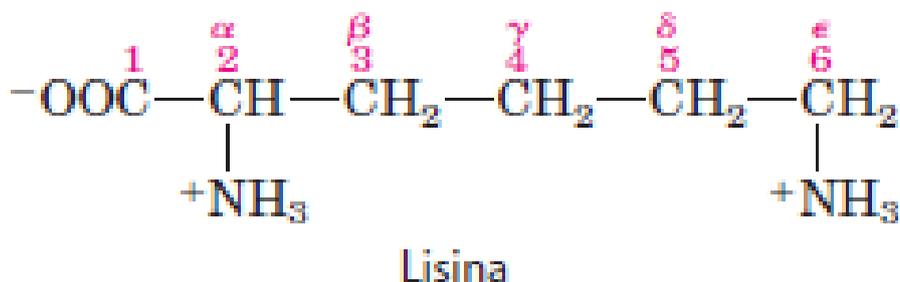


Figura 2. 4. Convenções utilizadas para identificar os carbonos de um aminoácido [19].

¹ Estereoisômeros - isômeros que têm a mesma conectividade, mas que diferem no arranjo de seus átomos no espaço [21]

Os aminoácidos podem ser classificados inicialmente como não essenciais (aqueles que o corpo consegue sintetizar, sem ser necessária a ingestão por alimentação) e essenciais (aqueles que não podemos produzir, e por isso devem ser incluídos na alimentação), e também com base nas propriedades dos seus grupos R, particularmente por sua polaridade ou tendência para interagir com a água em pH biológico, que é a faixa de valores na qual o sangue deve se manter. A Tabela 2.1 mostra os 20 aminoácidos principais essenciais e não essenciais.

Tabela 2. 1. Relação de aminoácidos em essenciais e não-essenciais e seus respectivos símbolos [22].

Não essenciais	Símbolo	Essenciais	Símbolo
Ácido Aspártico	Asp ou D	Fenilalanina	Phe ou F
Ácido Glutâmico	Glu ou E	Isoleucina	Ile ou I
Alanina	Ala ou A	Leucina	Leu ou L
Arginina	Arg ou R	Lisina	Lys ou K
Asparagina	Asn ou N	Metionina	Met ou M
Cisteína	Cys ou C	Treonina	Thr ou T
Glicina	Gly ou G	Triptofano	Trp ou W
Glutamina	Gln ou Q	Valina	Val ou V
Histidina	His ou H		
Prolina	Pro ou P		
Serina	Ser ou S		
Tirosina	Tyr ou Y		

A polaridade dos grupos R varia, de apolar e hidrofóbico² a altamente polar e hidrofílico³. Baseado na sua cadeia lateral R, os 20 principais aminoácidos podem ser divididos em grupos, sendo eles:

- Grupos R apolar, alifático: os aminoácidos desta classe são apolares e hidrofóbicos. Pertencem a este grupo os aminoácidos: Alanina, Valina, Leucina, Glicina, Metionina, Prolina e Isoleucina. A Glicina embora seja agrupada com os aminoácidos apolares, devido a sua cadeia lateral, não contribui de fato para interações hidrofóbicas.

²Hidrofóbico: As substâncias hidrofóbicas possuem aversão à água, são insolúveis em água [23].

³Hidrofílico: As substâncias hidrofílicas possuem afinidade com a molécula de água e são solúveis nela [23].

- Grupos R aromáticos: Fenilalanina, Tirosina e Triptofano, com suas cadeias laterais aromáticas, são relativamente apolares (hidrofóbicas). Podem participar em interações hidrofóbicas.

- Grupos R polares, não carregados: os grupos R desses aminoácidos são mais solúveis em água, do que os apolares incluem a Serina, Treonina, Cisteína, Asparagina e Glutamina.

- Grupos R carregados positivamente (básicos): são os grupos R mais hidrofílicos são aqueles carregados positivamente ou negativamente. Pertencem a esse grupo a Lisina, a Arginina e a Histidina. Seus resíduos facilitam muitas reações catalisadas por enzimas, funcionando como doador-aceptores de prótons.

- Grupos R carregados negativamente (ácidos): os dois aminoácidos que pertencentes a esse grupo são o Aspartato e o Glutamato, possuindo um segundo grupo carboxila.

Os radicais laterais dos aminoácidos possuem reações específicas, que determinam as funções biológicas das proteínas. Alguns resíduos de aminoácidos em uma proteína, ao serem alterados de modo ocasionalmente, podem alterar as funções que a proteína exercia. A interação com outros grupos como, por exemplo, metil, acetil ou fosforil com resíduos de aminoácidos específicos pode aumentar ou diminuir a atividade biológica de uma proteína [19, 22].

Os aminoácidos quando em solução aquosa, podem se comportar tanto como ácido ou como base; devido a essa natureza dupla, são conhecidas como anfóteros. Este comportamento é proveniente da interação dos grupos amina (NH_3^+) e carboxila (COO^-) com os grupos ionizáveis R.

Quando dissolvidos em água de pH neutro, formam íons dipolares, por serem substâncias anfóteras, o grupo carboxila ioniza-se em solução aquosa liberando prótons e se carregando negativamente, e o grupo amina em solução, aceita prótons carregando positivamente. Mas este comportamento depende do pH da solução no qual o aminoácido está diluído.

Um aminoácido, quando em meio ácido, aceita prótons, ionizando o grupo amina. E em meio básico, doa prótons, ionizando o grupo carboxila. No valor de pH no qual as cargas elétricas se igualam, é denominado de ponto isoelétrico (pI).

Aminoácidos com grupos R ionizáveis têm mais espécies iônicas, dependendo do pH do meio e do pK_a do grupo R ionizável, visto que o ponto isoelétrico nesses casos consiste em uma média entre o pK_a do grupo carboxílico (ou amina) e do valor de pK_a do grupo R. Para o glutamato e a histidina, os pontos isoelétricos demonstram a classe dos grupos R ionizáveis presentes, ou seja, eles possuem um pK_a para o grupo R designado como pK_R , o glutamato tem um pK_R em 4,25 e pK_1 em 2,19 desta forma o pI é dado pela média desses grupos

$$pI = \left(\frac{pK_1 + pK_R}{2} \right) = \left(\frac{2,19 + 4,25}{2} \right) = 3,22 \quad (1)$$

Seus dois grupos carboxila, que contribuem para uma carga final de -1 que se equilibra ao $+1$ vindo do grupo amina. O pI da histidina, em contrapartida com o glutamato é uma média entre os seus grupos protonados, designados como pK_2 e pK_R [6,12].

$$pI = \left(\frac{pK_2 + pK_R}{2} \right) = \left(\frac{9,17 + 6}{2} \right) = 7,59 \quad (2)$$

A curva de titulação da Glicina será apresentada posteriormente. Ácidos tem tendência de perder um próton quando em solução aquosa. Quanto mais forte o ácido, maior será tendência de perder o próton. Essa tendência é definida por uma constante, denominada constante de equilíbrio pK_a , dada por:

$$pK_a = \log \frac{1}{K_a} = -\log K_a \quad (3)$$

Sendo K_a definida como,

$$k_a = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]} \quad (4)$$

com $[A^-]$ representando a base conjugada na reação.

Para a Glicina, que não possui grupo ionizável em sua cadeia lateral, o médio denominado por ponto isoelétrico é a média aritmética dos dois valores de pK_a .

$$pI = \frac{1}{2}(pK_1 + pK_2) = \left(\frac{2,34 + 9,60}{2} \right) = 5,97 \quad (5)$$

Os valores de pK_a dos aminoácidos refletem os ambientes químicos no qual estão submetidos seus grupos R, desta forma estes podem apresentar diferenças entre si. Aminoácidos com grupos R ionizáveis, como no caso do glutamato e histidina vistos anteriormente, apresentam espécies iônicas adicionais devido ao novo pK_a do grupo R, designado por pK_R [19].

2.2 GLICINA

A Glicina é um aminoácido simples, e embora possua um C_{α} não possui quiralidade, pois não está ligado a quatro grupos químicos diferentes, como mostra a Figura 2.7(b), sendo o único entre os 20 principais aminoácidos que não possui atividade óptica. É classificada como não essencial e apolar com uma massa molecular 75,07 g/mol, com fórmula geral $C_2H_5NO_2$ [47]. A Figura 2.7 (a) mostra a estrutura tridimensional e a fórmula estrutural do aminoácido Glicina.

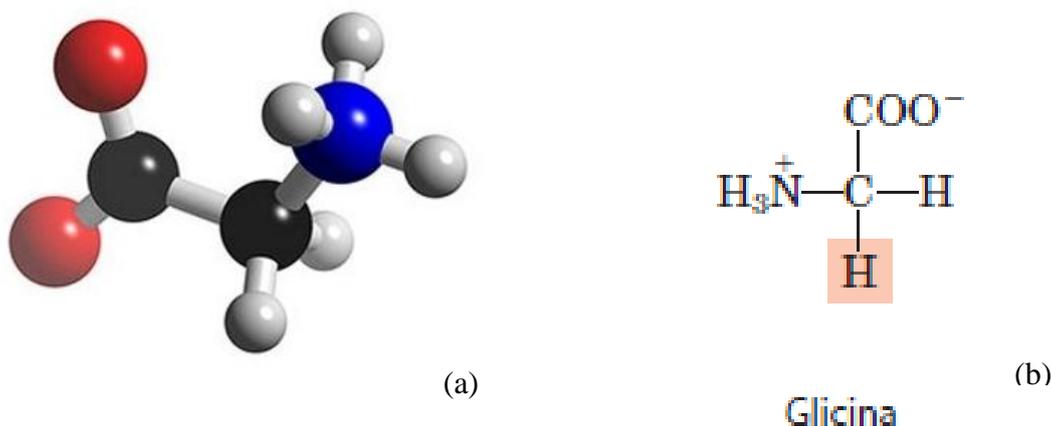


Figura 2. 7. Estrutura do aminoácido Glicina (a) Estrutura tridimensional (N – Azul, C – preta, O – Vermelha e H - Branca) [24] (b) Fórmula estrutural da Glicina [19].

Embora tenha uma estrutura simples, pois o seu grupo R é composto por um átomo de hidrogênio, é um aminoácido que vem se destacando, devido à diversidade de aplicações que apresenta, como por exemplo, na área biológica devido ao seu papel como neurotransmissor inibitório no sistema nervoso central, que foi expandido também para outros órgãos e tecido [15]. E cada vez mais vem se destacando na área de materiais com propriedades ópticas não lineares, justificada pela sua eficiência na geração do segundo harmônico [25], e por não ter um centro quiral, o que o torna um candidato conveniente para aplicações ópticas piezoelétricas não lineares [7].

Como visto anteriormente, aminoácidos podem se comportar como ácido ou base, dependendo do meio em que se encontram, e a Glicina é um dos aminoácidos que apresentam essa característica, pois é anfótera e tem uma curva de titulação bastante definida.

Quando a Glicina se encontra em pH ácido, a forma iônica presente é a protonada (${}^+H_3N - CH_2 - COOH$). Quando a titulação se inicia o valor de pH aumenta, e o grupo carboxila da Glicina perde um próton. Em um ponto médio estão presentes na solução, concentrações equimolares das espécies doadoras (${}^+H_3N - CH_2 - COOH$) e receptoras (${}^+H_3N$

– CH₂ – COO⁻); quando se chega a esse ponto médio o pH é igual ao pK₁ do grupo protonado, no caso da Glicina em 2,34 no valor de pK₁ é o ponto em que 50% das moléculas do grupo carboxílico estão protonadas. Continuando com a titulação, se alcança outro ponto, que é conhecido como ponto isoelétrico, que é exatamente onde o primeiro próton foi removido e o segundo próton começou a ser removido, sendo a Glicina diprótica pode doar dois prótons um de cada grupo ionizável. Neste ponto a Glicina se apresenta com uma configuração de íon dipolar chamado *zwitterion* (⁺H₃N – CH₂ – COO⁻), no qual a sua carga elétrica resultante é nula. A partir daí se inicia outra etapa, que é a remoção de um próton do grupo amina da Glicina, que também possui um ponto médio no qual o pH e o pK₂ se igualam em 9,6, sendo completada a titulação em pH 12 quando a forma iônica presente é a desprotonada (⁺H₂N – CH₂ – COO⁻) [19].

A Figura 2.8 apresenta a curva de titulação para o aminoácido Glicina a 0,1Mol/L em temperatura ambiente. Os retângulos em azul representam o intervalo no qual os valores de pK_a se estendem do pK_a do grupo carboxila é pK₁ = pH 2,34, do grupo amina é pK₂ = pH 9,60 e o ponto isoelétrico (pI) pI = pH 5,97.

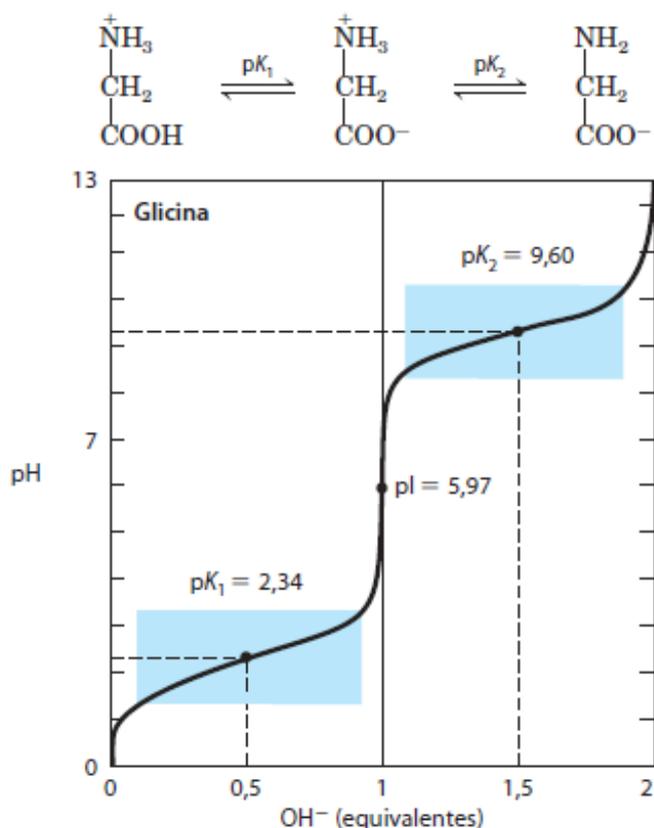


Figura 2. 8. Curva de titulação do aminoácido Glicina em temperatura ambiente [19].

A partir da curva de titulação, podemos obter informações importantes sobre a espécie titulada, como por exemplo, uma medida quantitativa do pK_a dos grupos ionizáveis e das suas regiões com poder de tamponamento.

A Figura 2.9 ilustra os processos de protonação e desprotonação da Glicina. Geralmente o pK_a dos grupos carboxila são próximos, exceto para a Glicina, essa alteração é devido à repulsão entre o próton que está sendo doado e o grupo amina próximo, que está carregado positivamente. Da mesma forma o pK_a da Glicina para o grupo amino também é alterado (para menores valores de pH) em relação ao pK_a do grupo amino nos aminoácidos, em parte este efeito se deve aos átomos de oxigênio carregados negativamente nos grupos carboxilas, e que tendem a repelir elétrons, afastando-os do grupo amino, contribuindo para que o grupo amino doe um próton, lembrando que os valores de pK_a (pK_1 e pK_2) são influenciados pelo meio químico em que se encontram [19].

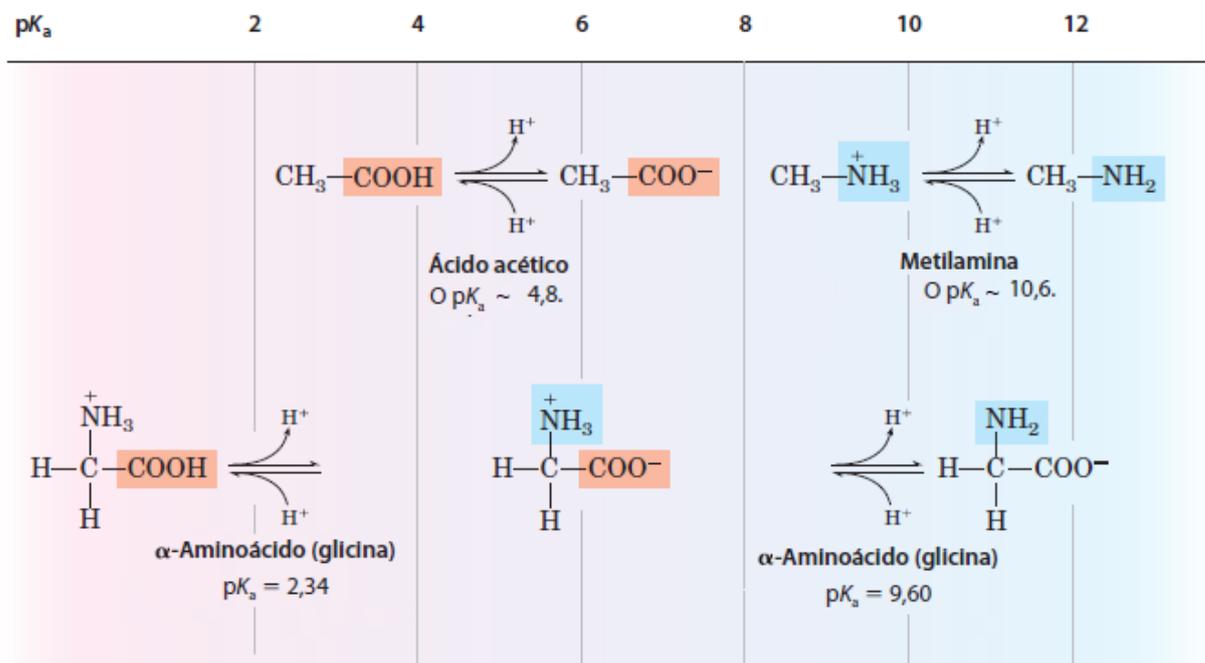


Figura 2. 9. Efeito que o ambiente químico pode causar nos valores pK_a da Glicina [19].

Na Figura 2.9 é possível identificar que os grupos ionizáveis, pK_a , do aminoácido Glicina são mais baixos do que aqueles dos grupos simples de carboxila e amino substituídos por metil (CH_3) para a molécula de ácido acético (CH_3-COOH) e metilamina (CH_3-NH_2) [19]. Demonstrando a dependência do ambiente químico.

O pI da Glicina, que ocorre quando a carga final é zero, é obtido por meio da média dos valores dos dois pK_a .

Quando a Glicina estiver em um valor de pH menor que seu pI, ela estará carregada positivamente, quanto mais afastada de seu pI maior a carga elétrica final, em pH 1 ela se encontra completamente protonada, com carga final igual a +1, quando se encontra no valor do pK_a em $pH = pK_1 = 2,34$, para este aminoácido, há um equilíbrio e 50% das moléculas encontram-se protonadas e 50% neutras.

Outra característica deste aminoácido, que tem destaque, são os graus de liberdade dos ângulos de torção, por possuir em sua cadeia lateral apenas um átomo de hidrogênio, a Glicina é o aminoácido com maior liberdade de rotação, ou seja, possui maior liberdade para torções sem que haja colisão entre os átomos da molécula.

Geralmente as ligações entre $N-C_\alpha$ e $C_\alpha-C$ tem uma liberdade para girar e os ângulos ϕ e ψ definem a restrição de rotação, estes ângulos são representados no diagrama de Ramachandran, que descreve a combinação desses ângulos na estrutura do peptídeo, indicando se a rotação é permitida ou não permitida por impedimentos estéricos⁶. A Figura 2.9 ilustra o diagrama de Ramachandran para a Glicina, acompanhada da sua estrutura química com as localizações dos ângulos ϕ e ψ . As conformações possíveis são aquelas que envolvem quase nenhum impedimento estérico. As áreas coloridas em azul-escuro representam as conformações que não envolvem sobreposição estérica, considerando os raios de van der Waals de cada átomo modelados como esferas rígidas, sendo, portanto totalmente permitidas. Em verde indica as conformações permitidas, dependendo das distâncias dos átomos, podendo ocorrer um leve choque. As regiões em branco são as regiões consideradas não permitidas [19, 26].

⁶Impedimentos Estérico - Interferência de dois ou mais grupos atômicos que não podem ocupar o mesmo espaço[28].

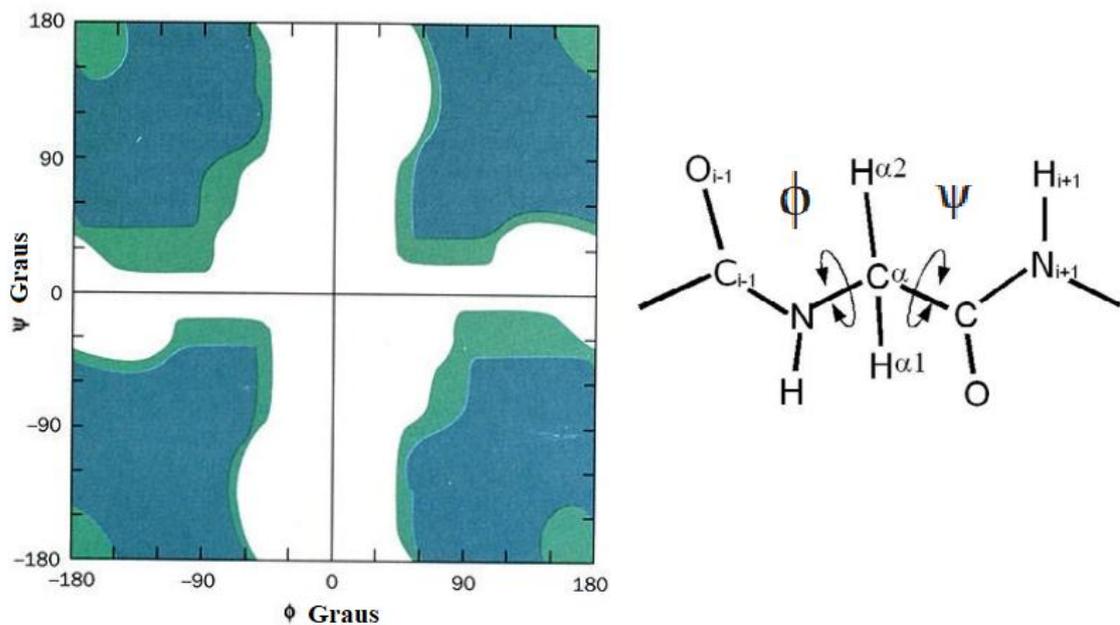


Figura 2. 10. Diagrama Ramachandram da Glicina. A região azul escura são as zonas permitidas sem sobreposição de átomos [26, 27].

2.3 CRESCIMENTO DE CRISTAIS DE GLICINA

Diversos estudos a respeito de materiais com propriedades ópticas não lineares têm sido realizados, pelas utilidades que estes apresentam em uma série de aplicações, desde telecomunicações a sistemas ópticos [29]. Os aminoácidos são materiais como o caso da Glicina, que cada vez mais vem se destacando nesta área, justificada pela sua eficiência óptica não linear, assim como por mostrarem uma boa eficiência na geração do segundo harmônico [25].

Além do caráter anfótero da Glicina, outro fator que incentiva a pesquisa e interesse por esse aminoácido, é o seu polimorfismo, no qual exibe diferentes estruturas cristalinas [25]. Naturalmente, se encontram três formas cristalinas α , γ e β Glicina, entretanto, há trabalhos que descrevem outros arranjos estruturais do aminoácido [30-32]. A Figura 2.11 [33] ilustra as três fases polimórficas α , β e γ da Glicina, além das formas δ e ϵ , obtidas somente por variação de pressão e uma forma ainda desconhecida, nomeada de ζ , todas obtidas por variação de pressão. Vale ressaltar que as formas polimórficas α , β e γ da Glicina podem ser obtidas, também por variação de temperatura e pH.

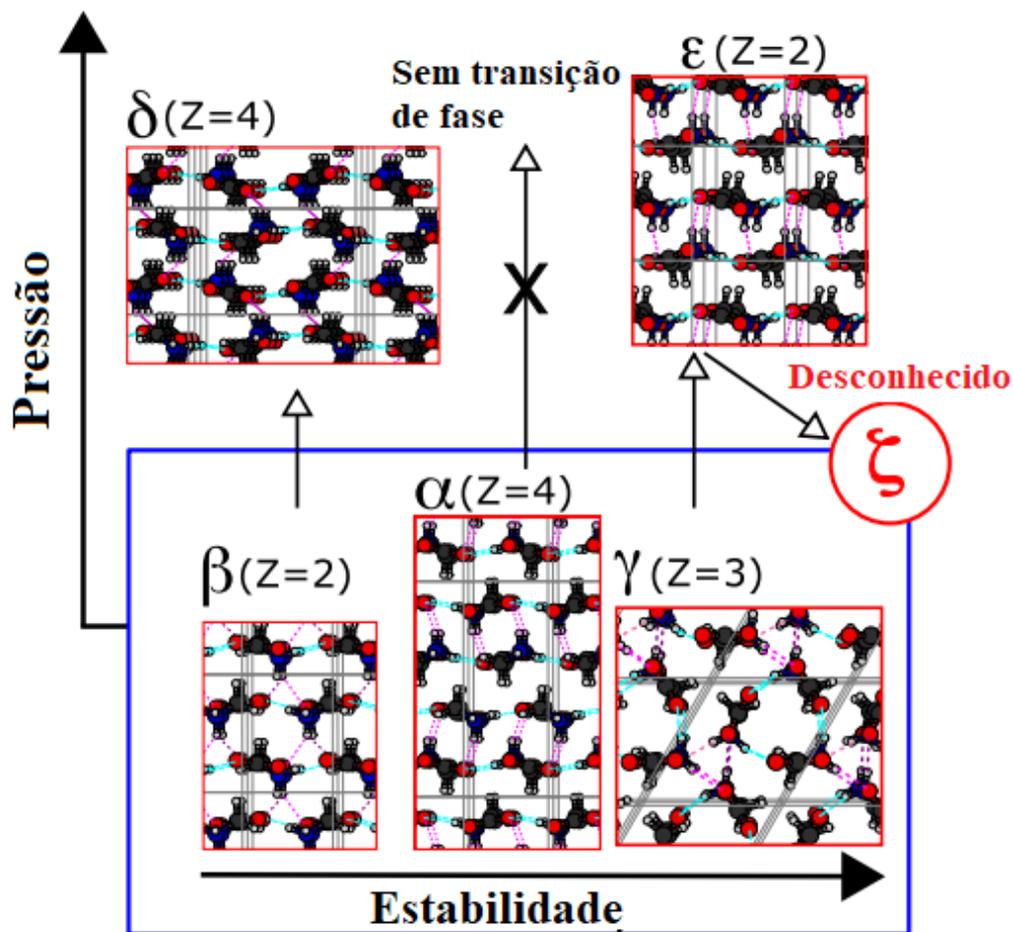


Figura 2. 11. Formas polimórficas da Glicina sob variação de pressão. As formas γ e β perdem sua natureza cristalina ou sofrem transição de fase sob pressão de poucos GPa, enquanto que a fase α torna-se estável sob a maior pressão utilizada no experimento (23 GPa). A transição da fase β para δ ocorre em 0,76 GPa. A transição da fase γ para ϵ ocorre no intervalo de 2,7 a 7,6 GPa paralelamente a fragmentação do cristal. Já a fase descrita como desconhecida, ζ , ocorre em processo de descompressão até 0,62 GPa, numa transição irreversível da fase ϵ estável para ζ [33].

O polimorfismo é algo a ser levado em consideração, por exemplo, na indústria farmacêutica, pois diferentes formas sólidas levam a diferentes propriedades físicas, tais como solubilidade, taxa de dissolução, densidade, capacidade térmica, ponto de fusão, condutividade térmica, atividade óptica e partículas morfologia, o que pode afetar a aceitabilidade do processo e biodisponibilidade das substâncias medicamentosas [34].

A diferença entre as formas polimórficas α , β e γ da Glicina, em sua forma cristalina, é apenas no ângulo entre a ligação C-N e o modo de vibração em torno do grupo C_{α} -C. As três formas α , β e γ da Glicina podem ser atribuídas a alguns tipos de interações em suas estruturas, tais como as de Van der Waals, eletrostáticas e as das ligações de átomos de

hidrogênio (pontes de hidrogênio) [35]. A Figura 2.12 representa as células unitárias das três formas (α , β e γ) do aminoácido Glicina e o arranjo molecular dentro de cada uma delas.

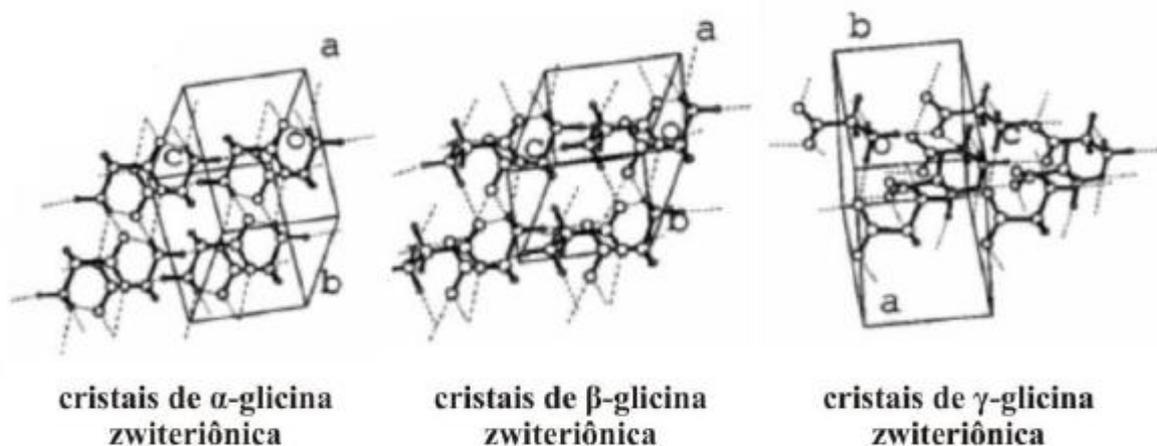


Figura 2. 12. Estrutura cristalina do aminoácido Glicina com configuração de carga neutra. a, b e c indicam os eixos cristalográficos da célula unitária [35].

Por ser um aminoácido simples, ter uma cadeia lateral curta, ser solúvel em água, entre outras características, diversos trabalhos de crescimento tem sido realizados com a Glicina, que por vezes é dopada com algum outro material, a fim de alterar algumas das suas características para diversas aplicações [12, 36, 37].

A habilidade de uma molécula existir em mais de uma estrutura cristalina é o resultado de diferentes arranjos moleculares dentro das células unitárias, o que resulta no polimorfismo, que pode ser influenciado por condições adversas como variação de temperatura, pH ou pressão. Estas variações das condições podem ser impostas ao sistema durante o processo de crescimento de cristais; assim, o cristal resultante pode assumir uma ou mais características polimórficas cristalinas. Na literatura são reportados alguns processos de crescimentos de cristais de Glicina e as condições para a formação das fases α , β e γ . No caso da Glicina a forma α pode ser obtida por crescimento de cristais em soluções aquosas, pelo método de evaporação lenta. A forma β -Glicina pode ser obtida adicionando álcool etílico em solução aquosa de Glicina, entretanto, por ser a forma menos estável, é convertida rapidamente em α -Glicina em contato com o ar. Já cristais na forma γ -Glicina podem crescer por processo de resfriamento lento de soluções aquosas de Glicina ácidas ou básicas. Em temperatura ambiente, a fase γ -Glicina é a considerada mais estável [38]. Sung e colaboradores [34] sugerem que meios com as espécies protonadas e desprotonadas da Glicina, inibem o

crescimento da forma α -Glicina, permitindo a cristalização da forma γ -Glicina.

A forma α -Glicina é construída a partir de dímeros *zwitterion* centrossimétricos, enquanto que as formas β e γ -Glicina são de estrutura não centrossimétricas, o que lhes garante suas propriedades piezoelétricas⁷ [34].

⁷ piezoelectricidade é a capacidade que alguns cristais possuem de gerarem corrente elétrica em resposta a uma pressão mecânica exercida sobre o mesmo [39].

Conceitos Gerais das Técnicas Utilizadas

Neste capítulo serão abordados alguns conceitos fundamentais para melhor entendimento das técnicas aplicadas para as análises realizadas no aminoácido Glicina.

3.1 VIBRAÇÃO MOLECULAR

Dependendo da quantidade de átomos e das suas disposições espaciais em uma molécula, é possível determinar de quantas maneiras estes átomos ligados podem vibrar, rotacionar ou transladar com relação a um eixo de coordenadas. A vibração de uma molécula é uma superposição de uma seqüência de vibrações denominadas modos normais [40].

Antes de entendermos os modos normais, faz-se necessário entender o conceito de graus de liberdade, definido como o número de variáveis exigidas para descrever inteiramente o movimento de uma partícula.

No caso de termos um átomo se movendo no espaço tridimensional, em três coordenadas x , y e z , o seu grau de liberdade será igual a 3. Neste caso seu movimento é somente translacional, suas posições são descritas em termos das variações para cada coordenada como Δx , Δy , Δz [41].

Para uma molécula que possui N átomos, o grau de liberdade se torna $3N$, de modo que cada átomo possui 3 graus de liberdade. Como temos vários átomos, podemos dizer que agora os movimentos não são puramente translacionais, alguns se convertem em movimentos rotativos, e outros em vibração. No geral, para as moléculas não-lineares, todos os movimentos de rotação podem ser descritos em termos de rotações em torno de 3 eixos, o grau de liberdade rotacional é 3 e os restantes $3N-6$ graus de liberdade constituem movimentos vibracionais. Contudo, para uma molécula linear, a rotação em torno de seu próprio eixo não é rotação porque deixa a molécula inalterada. Portanto, existem apenas 2 graus rotacionais de liberdade para qualquer molécula linear, de modo que tornam possíveis

3N-5 graus de liberdade para vibração [40, 41].

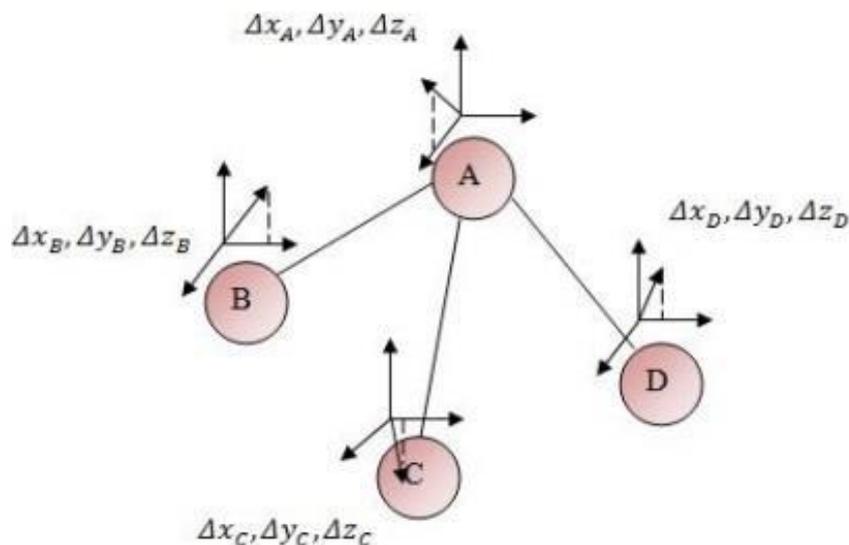


Figura 3. 1. Esquema de coordenadas para descrever os N átomos diferentes. Cada átomo com 3N coordenadas, fornecendo assim 12 graus de liberdade [41].

Os modos normais são vibrações moleculares cujos átomos vibram em conjunto com a mesma frequência, sendo esse movimento independente. Os átomos da molécula vibram sem que ocorra alteração em nenhum dos modos vibracionais pertencentes aos demais átomos, são ortogonais uns dos outro.

Cada modo tem uma frequência de vibração específica, e mesmo que alguns modos apresentem a mesma frequência, eles são modos diferentes, a esses modos chamamos de degenerados [40].

A frequência das vibrações depende da energia de ligação interatômica que determina a força necessária para esticar ou comprimir uma ligação. Os modos normais são usados para descrever os diferentes movimentos vibratórios nas moléculas, sendo que cada modo pode ser caracterizado por um tipo diferente de movimento e cada modo tem certa simetria associada a ele [42].

Como visto, os átomos possuem movimentos característicos, de rotação, translação e vibração. As moléculas poliatômicas sofrem vibrações complexas que podem ser somadas em modos normais de vibração, que são divididos em: estiramentos, podendo ser assimétricos ou simétricos e deformações que podem ocorrer no plano ou fora dele [41, 43]. A Figura 3.2 ilustra alguns modos vibracionais de estiramento e deformação.

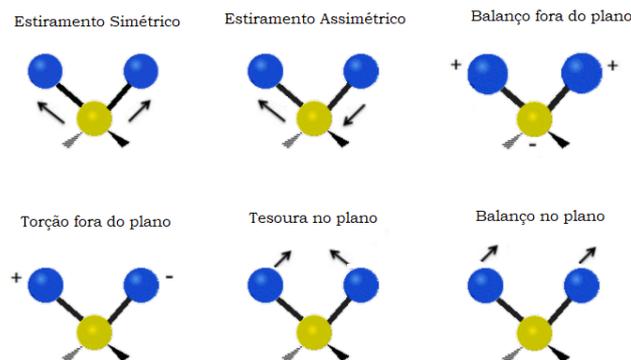


Figura 3. 2. Modos de vibrações moleculares. Adaptado de [44].

As vibrações de estiramento envolvem variações em distâncias intermoleculares e as deformações fora do plano compreendem as variações infinitesimais das distâncias entre os ângulos de ligação dos átomos [41, 44].

Os grupos químicos presentes em moléculas possuem frequências características, o que permite que ao analisar suas frequências seja possível associá-las com esses grupos, que são denominados grupos funcionais. As frequências desses grupos funcionais quase não se alteram de uma molécula para a outra, de forma que a análise dos seus modos vibracionais nos permite distinguir e determinar os grupos funcionais presentes [41, 44].

3.2 ESPECTROSCOPIA RAMAN

As técnicas de espectroscopia podem ser utilizadas para a caracterização de materiais, ao analisar a interação entre a energia eletromagnética incidente e a matéria. Quando um fóton de energia é absorvido, totalmente ou parcialmente, pelo material, podem acontecer processos de decaimentos, isolados ou simultâneos, tais como decaimento não radiativo e radiativo, sendo o último com emissão de fótons com a mesma energia ou não do fóton incidente.

A exemplo de técnicas espectroscópicas podemos citar as espectroscopias infravermelho, Raman e a de luminescência, que embora sejam fundamentadas pela interação da radiação com a matéria, cada uma delas parte de um fenômeno físico distinto. A espectroscopia Raman, técnica fundamental para o desenvolvimento deste trabalho, é baseada no efeito de espalhamento inelástico durante a interação do fóton incidente com o material de interesse. Tal técnica está dentro do grupo da espectroscopia vibracional que monitora a região do infravermelho do espectro da radiação eletromagnética, permitindo avaliar as transições entre os níveis vibracionais de moléculas. Se estas transições vibracionais

satisfizerem a regra de seleção para o acontecimento do efeito Raman, ou seja, a variação da polarizabilidade da molécula, os modos de vibração das moléculas de interesse podem ser interpretados em forma de espectro, e assim possibilitar as atribuições de grupos químicos referentes a cada modo vibracional Raman ativo.

Em nível molecular a radiação pode interagir com a matéria por processos de espalhamento, que podem ser elástico ou inelástico. O espalhamento elástico de fótons pela matéria é chamado de espalhamento Rayleigh, no qual o fóton espalhado tem a mesma energia do fóton incidente. No espalhamento inelástico o fóton espalhado pode ter energia maior ou menor que o fóton incidente. Quando a energia do fóton espalhado é menor que a energia do fóton incidente, o espalhamento é chamado de Stokes, já quando a energia é maior que a do incidente, o espalhamento recebe o nome de anti-Stokes [45, 46].

A espectroscopia Raman leva o nome do efeito Raman descoberto pelo físico indiano C.V. Raman, que recebeu o Prêmio Nobel de Física de 1930, devido à sua descoberta de espalhamento da luz ao atravessar determinados materiais.

Raman estudou para entender esse fenômeno, que inicialmente despertara sua curiosidade, e o experimento realizado por ele para demonstrar o efeito de espalhamento era bem simples; neste uma lâmpada de mercúrio foi utilizado como fonte de excitação um prisma de vidro como elemento dispersivo e filmes fotográficos, já disponíveis na época, como detectores. Com esse simples aparato, ele conseguiu demonstrar o efeito de espalhamento em diversas soluções. A ideia da experiência utilizada por Raman é apresentado na Figura 3.3.

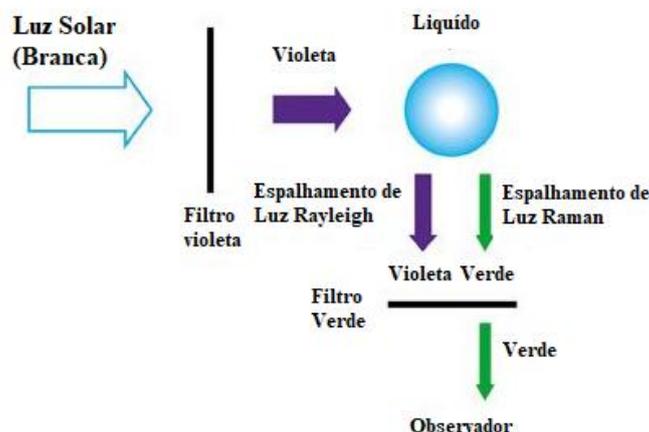


Figura 3. 3. Esquema do experimento realizado por Raman. Adaptado de [47].

Em seu experimento, com amostras líquidas, Raman observou que a luz violeta do espectro solar foi isolada em um filtro violeta e após isso passaria pela amostra, e que grande parte da luz que passa pelo líquido é do mesmo comprimento de onda incidente, o já conhecido como espalhamento Rayleigh; além disso, demonstrou que em alguns dos líquidos a luz espalhada era em comprimentos de onda diferentes e que estes poderiam ser isolados por um filtro entre o observador e a amostra. Uma das vantagens neste experimento visual foi que diversas substâncias puderam ser analisadas, cerca de 60 líquidos, os quais apresentavam luz espalhada diferente da cor de luz incidente [47].

Depois de descoberto, o efeito Raman se tornou a principal técnica para analisar materiais, pois além de fornecer informações características das amostras, com um espectro único para qualquer amostra, é uma técnica não destrutiva, podendo ser utilizada em compostos orgânicos e inorgânicos, líquidos, gases e sólidos [47].

Quando a luz atinge a amostra é espalhada, esse espalhamento pode ser espalhamento Rayleigh (elástico) ou espalhamento Raman (inelástico). O espalhamento inelástico permite identificar diversas informações das amostras analisadas, como a composição química, sendo que a variação das frequências dada pela diferença de energia entre os estados vibracionais da molécula ($E = hv$ ou $E = h.c.\lambda^{-1}$) [41, 48].

A Figura 3.4 apresenta o esquema dos espalhamentos Raman observado, ilustra o espalhamento Stokes no qual o fóton de energia $h\nu_0$ encontra uma molécula no estado fundamental, e leva o sistema a um estado intermediário (virtual) com energia $h\nu_0$, que em seguida decai para o nível vibracional excitado e_v , logo a energia final do fóton espalhado é menor que a inicial, ou seja, $h_0 - e_v$. Quando o fóton volta a estado fundamental sem alteração da energia, temos o espalhamento Rayleigh. E por fim temos o espalhamento denominado anti-Stokes, ocorre quando o fóton espalhado tem energia maior que a energia inicial, sendo $h\nu_0 + e_v$, nesta condição o fóton incidente encontra a molécula em um estado excitado, esta decresce de acordo com a lei de distribuição de Boltzmann, desta forma o espalhamento anti-Stokes tem intensidade menor que o Stokes [49]. A Figura 3.5 ilustra um espectro Raman, mostrando a relação de intensidade entre os espalhamentos Stokes, anti-Stokes e Rayleigh. Nota-se que a posição dos picos é a mesma para o espalhamento Stokes e anti-Stokes.

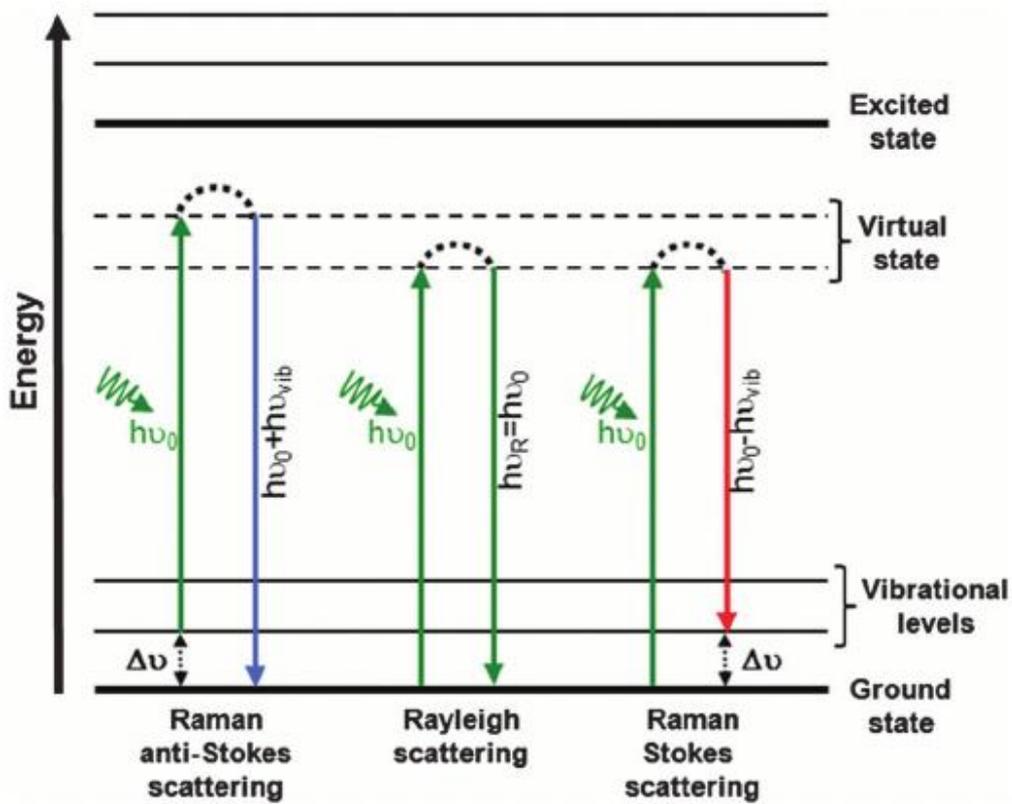


Figura 3. 4. Esquema dos tipos de espalhamento: (a) Raman Stokes; (b) Rayleigh; (c) Raman Anti-Stokes. Adaptado de [49].

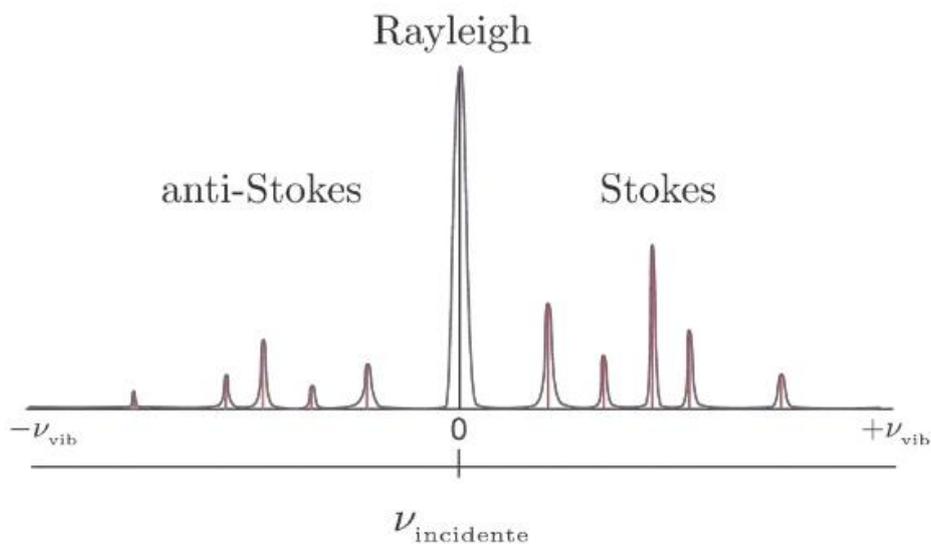


Figura 3. 5. Espectro Raman, os fónons na linha central, representando o espalhamento Rayleigh e os da esquerda e direita representando o espalhamento Anti-Stokes e Stokes, respectivamente. Adaptada de [50].

A atividade Raman de uma molécula depende da variação da polarizabilidade, ou seja, se o campo elétrico que está incidindo na molécula pode alterar sua distribuição de cargas, de forma a causar alterações na nuvem eletrônica; deste modo, o campo elétrico incidente pode levar a um momento de dipolo na molécula, dado por:

$$\vec{p} = \alpha \cdot \vec{E} \quad (6)$$

Sendo \vec{p} o momento de dipolo causado, α a polarizabilidade da molécula e \vec{E} o campo elétrico incidente. A polarizabilidade tem importante função quando se fala em Raman, pois para existir o efeito Raman a polarizabilidade deve variar. Quando temos a interação do fóton com a molécula, a molécula pode ser alongada pela radiação incidente, variando desta forma a distribuição de carga dos núcleos moleculares com relação aos elétrons. A Figura 3.6 mostra as distorções da nuvem eletrônica da molécula de água, ou seja, a variação da polarizabilidade representada pelas elipsóides, os respectivos modos de vibração Raman ativos [41, 51].

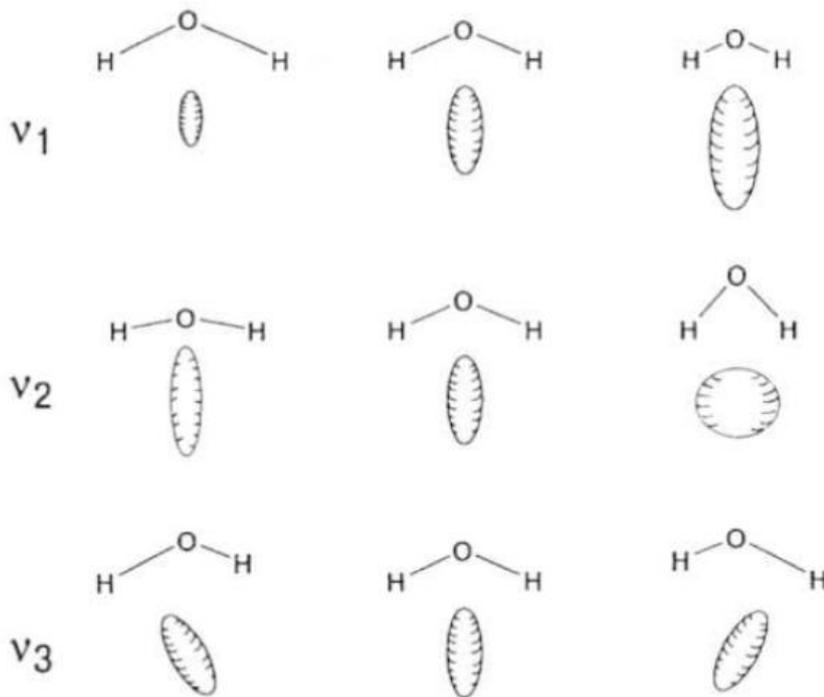


Figura 3. 6. Variação da polarizabilidade da molécula de água (elipsóides). v_1 , v_2 e v_3 são os modos de vibração Raman ativo da molécula [51].

3.3 ESTRUTURAS CRISTALINAS

Os materiais sólidos podem ser classificados de acordo com a regularidade do arranjo de seus átomos ou íons que se dispõem em relação aos seus vizinhos. No caso de metais a regularidade ou ordenação é de longo alcance, em vidros ocorre em curto alcance e em polímeros, de maneira geral, não ocorre ordenamento [52]. Desta forma podemos separar os materiais em dois grandes grupos: cristalinos e não cristalinos, também conhecidos como amorfos. Os materiais cristalinos apresentam ordenação a longas distâncias atômicas, formando uma estrutura tridimensional chamada de rede cristalina. Já os materiais ditos amorfos não apresentam ordenamento-disposição dos átomos ou íons a longo alcance. Existem sólidos que apresentam uma parte de sua estrutura cristalina e outra parte amorfa, sendo chamados de semicristalinos, como o caso de alguns polímeros [52].

As estruturas cristalinas são arranjos regulares tridimensionais nos quais os átomos ordenados se agregam no sólido sobre longas distâncias atômicas. Tal regularidade depende da condição geométrica imposta pelos átomos envolvidos, do tipo de ligação química e do fator de empacotamento. Os arranjos tridimensionais são chamados de rede cristalina. As redes cristalinas mais estáveis são aquelas que minimizam a energia por unidade de volume.

As unidades cristalinas são formadas por unidades repetitivas chamadas de célula unitária, que é o menor arranjo de átomos que pode apresentar um sólido cristalino, no qual os átomos são representados por esferas rígidas. Já a geometria é como um poliedro, especificada em termos do comprimento das arestas (parâmetros de rede) e ângulos interaxiais. Os parâmetros de rede são eixos da rede cristalina representados por a , b e c , enquanto que os ângulos por α , β e γ .

As redes cristalinas possuem operações de simetrias que devem ser satisfeitas: i) translação, na qual a rede pode ser transformada nela mesma por um vetor de translação da rede; ii) rotação em volta de um eixo deve passar por um ponto da rede e iii) reflexão em relação aos planos devem passar por um ponto da rede. Desta forma, ao satisfazer essas operações de simetria, as redes cristalinas podem constituir diferentes tipos de células unitárias, chamadas de redes de Bravais. São 7 sistemas cristalinos e 14 redes de Bravais que podem representar a estrutura cristalina de qualquer sólido. As Figuras 3.7 e 3.8 mostram os 7 sistemas cristalinos e as 14 redes de Bravais [52].

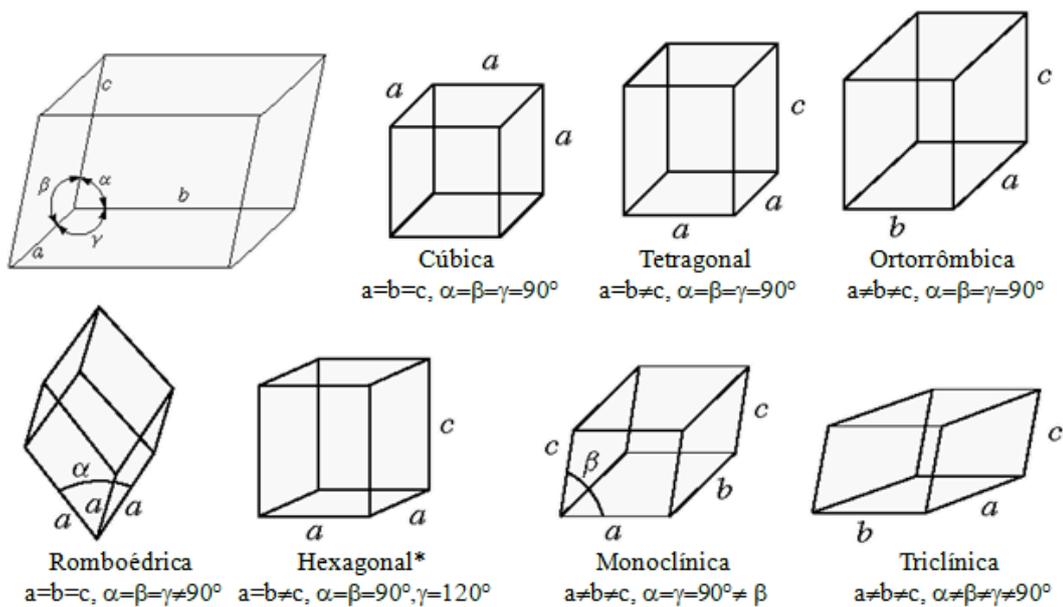


Figura 3. 7. Os sete grupos de simetria de células unitárias. Estão indicados em cada simetria os eixos cristalográficos a, b e c, bem como os ângulos entre os eixos cristalinos α , β e γ [53].

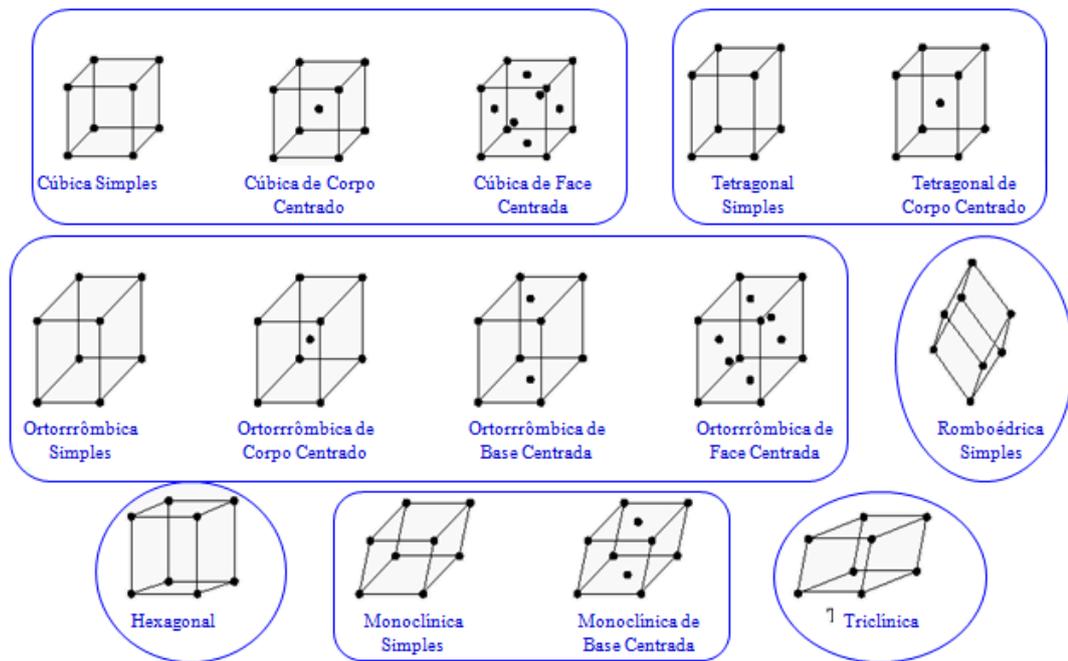


Figura 3. 8. As 14 redes Bravais espaciais [53].

Quando o material exibe mais de uma estrutura cristalina devido a fatores externos como variação de pressão, temperatura ou acidez do meio é dito polimórfico. As fases polimórficas, bem como as demais fases cristalinas, usualmente são identificadas por DRX

resultado da interação do feixe de raios-X incidente com uma série de planos atômico da estrutura cristalina. Contudo esta técnica apresenta algumas limitações, pois as análises de raios-X se baseiam na presença de uma rede cristalina ou na periodicidade do arranjo atômico, de forma que não é possível utilizá-la em materiais sólidos que são totalmente amorfos [54].

3.4 DIFRATOMETRIA DE RAIOS-X (DRX)

A DRX mede diretamente a distância entre planos paralelos de pontos da rede cristalina, a partir dessas distâncias determina os parâmetros de rede (a, b e c) do sólido cristalino, bem como os ângulos interaxiais (α , β e γ) do cristal [55].

Os raios-X são ondas eletromagnéticas, cujos comprimentos de onda são aproximadamente iguais às distâncias entre os planos atômicos dos sólidos cristalinos. Foram descobertos em novembro de 1895, pelo físico alemão Wilhelm Conrad Roentgen. Há dois fenômenos diferentes que podem produzir os raios-X: um é por feixe de elétrons acelerados por diferença de potencial, denominado de espalhamento de elétrons e o outro chamado de salto quântico [54].

A Figura 3.9 apresenta a obtenção dos raios-X e os dois fenômenos que o produzem. No caso do espalhamento de elétrons, o fenômeno equivale à curva na trajetória do elétron incidente sobre um núcleo atômico, causando desta forma a emissão de raios-X; entretanto, alguns elétrons não desaceleram de mesma maneira e a emissão de radiação tem um espectro contínuo, denominado de radiação branca. Já para o salto quântico, que ocorre quando a diferença de potencial V atinge um valor crítico V_c chamado de potencial de excitação, os elétrons incidentes tem energia cinética o bastante, de forma que ao colidir com elétrons de camadas mais internas do elemento do alvo, expulsam estes elétrons deixando suas posições vagas; assim os elétrons de camadas exteriores podem preencher esses sítios liberando raios-X no processo. Desta forma se um elétron da camada K for removido, um elétron da camada L, M ou N pode preencher o sítio liberando os raios-X em diferentes e específicos comprimentos de onda [53,54].

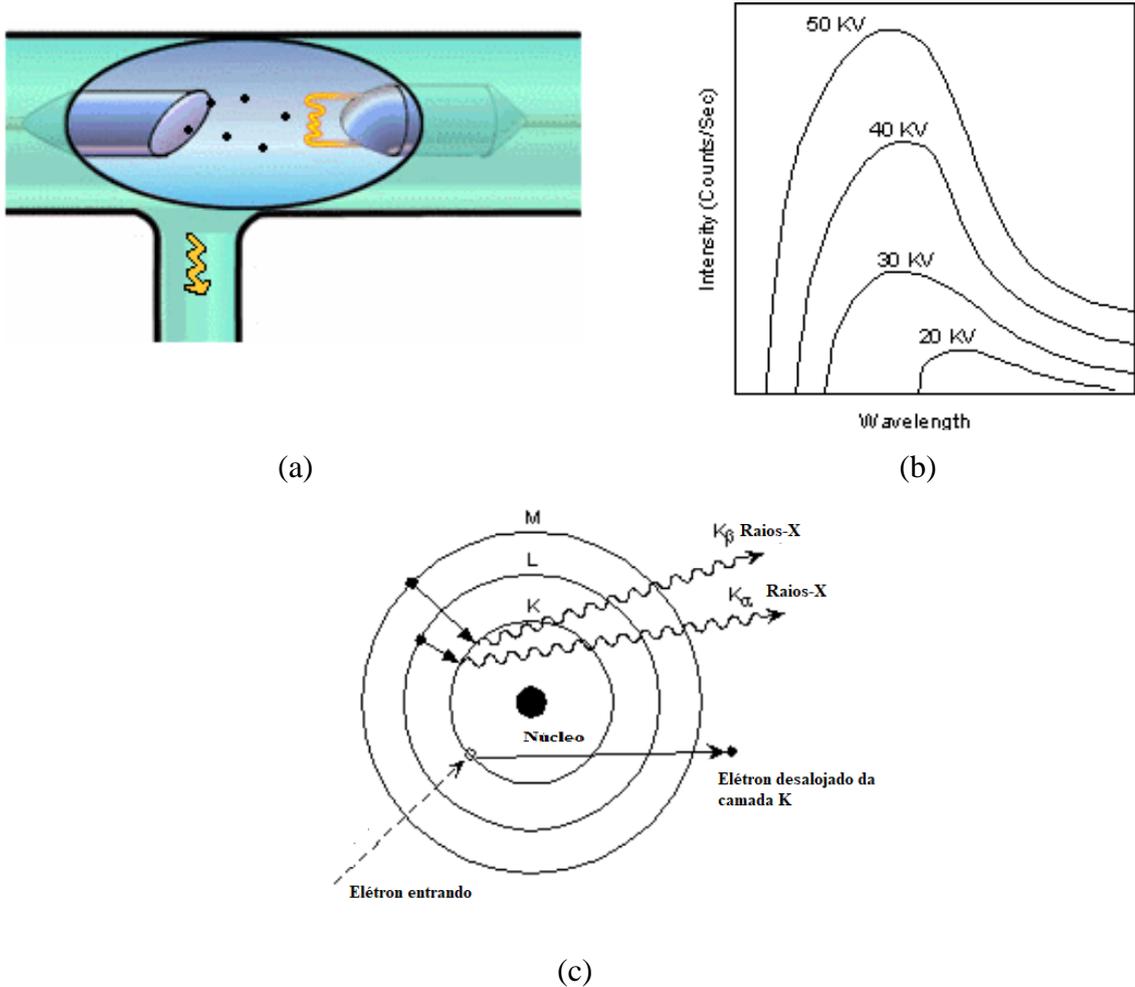


Figura 3. 9. Obtenção dos raios-X (a) Produção de raios-X (b) Espectro de radiação branco dos raios-X (c) Obtenção de radiação de raios-X K_{α} e K_{β} . Adaptado de [54].

Quando se incide raios-X em um cristal, cujos átomos são normalmente espaçados de maneira periódica, é como se cada átomo agisse como uma fonte de emissão esférica de radiação. Desta forma pode haver interferência, do tipo construtiva ou destrutiva entre as ondas propagadas, conforme a Figura 3.10.

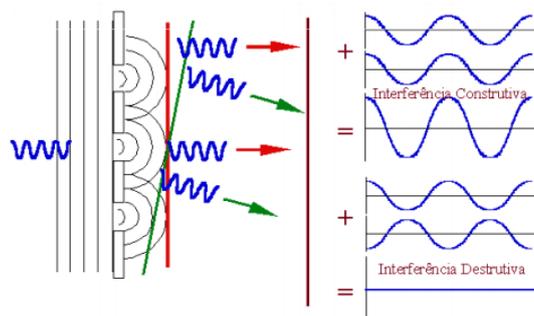


Figura 3. 10. Formas de interferências entre as ondas eletromagnéticas [53].

Considerando-se o fato de que os feixes percorrem diferentes distâncias, dependendo do plano de átomos dos quais foram difratados, a interferência será construtiva quando a diferença percorrida for um múltiplo inteiro de comprimento de onda (λ), como expresso pela lei de Bragg [56]:

$$n \lambda = 2d_{hkl} \text{sen} \theta \quad (7)$$

A lei de Bragg determina a relação entre as posições angulares dos feixes difratados reforçados, em termos do comprimento de onda λ do feixe incidente de raios-X dado em Angstrom (\AA), da distância interplanar d_{hkl} entre os planos cristalográficos, sendo Θ o ângulo de Bragg e n a ordem de difração ($n = 1, 2, 3, \dots$) [41, 55].

A Figura 3.11 apresenta o esquema da difração, segundo a Lei de Bragg, no qual os planos cristalinos são formados por átomos ordenados.

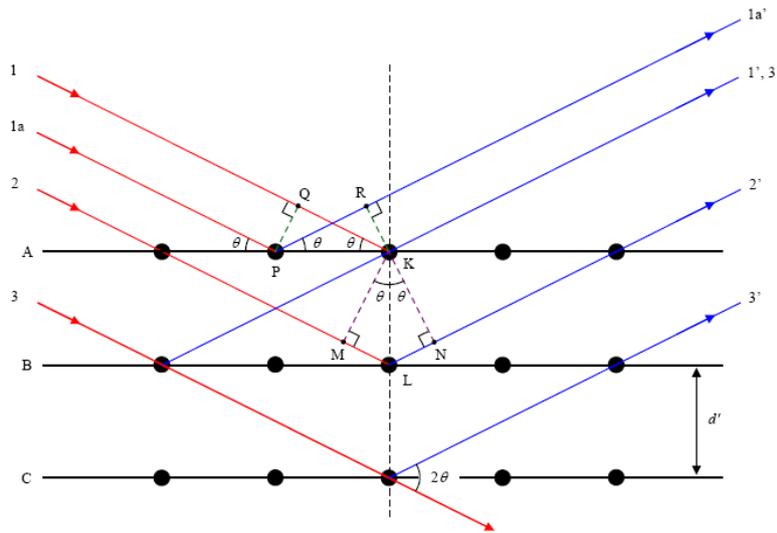


Figura 3. 11: Esquema da difração de Bragg entre os planos cristalinos [54].

Dependendo do tipo de interferência sofrido, a superposição das ondas pode dobrar a intensidade ao interferir construtivamente e se anular completamente no caso de interferir destrutivamente. Os resultados dessas interferências é o que define a forma do espectro dos raios-X na análise de determinada estrutura cristalina.

A Figura 3.12 apresenta o esquema de funcionamento de um difratômetro de raios-X, que depende da forma que a fonte T gera o feixe de raios-X que incide na amostra S, sendo a amostra rotacionada em torno do eixo O.

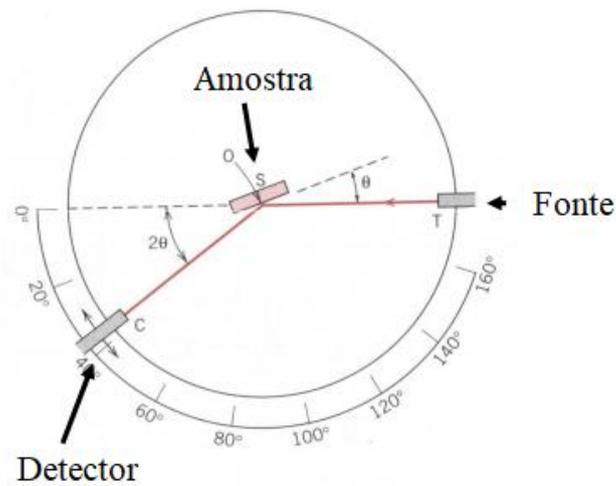


Figura 3. 12. Representação de um Difratorômetro de raios-X [53].

A faixa de ângulos medida pode ser realizada por um contador com velocidade constante, ou ele pode ser posicionado no local desejado. Geralmente o feixe difratado é medido pelo contador, podendo ser um contador de Geiger, que é um detector de radiação usado em aparelhos de DRX, o qual relaciona a intensidade da radiação com uma corrente elétrica gerada [3, 41].

Materiais e Métodos

Para o estudo do aminoácido Glicina foi utilizada a técnicas de espectroscopia Raman para as amostras: comercial (em pó), solução aquosa em diferentes concentrações (pH neutro), uma concentração fixa de solução aquosa com diferentes valores de pH e cristais de Glicina crescidos em soluções aquosas de Glicina em diferentes valores de pH. Para a difratometria de raios-X foram analisados os cristais crescidos nas mesmas condições que para espectroscopia Raman.

4.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Para preparação de todas as amostras neste trabalho foi utilizado o aminoácido Glicina comercial (Sigma-Adrich) com 99% de pureza em pó, que possui limite de solubilização em água de 25g para 100mL [16].

As amostras em pó da Glicina foram medidas em uma balança analítica de precisão de 0,01mg (A&D Company, série 202). Foi utilizada água ultra pura (Milli-Q, Direct-Q) em todos os processos de solubilização para a preparação das soluções.

A amostra na forma sólida da Glicina e a água ultra pura foram depositadas em um becker de 25mL para realizar a solubilização. Desta maneira a amostra foi levada para agitação em agitador mecânico (Corning, PC 420), equipamento que oferece a opção de aquecimento, que neste caso não foi utilizado (velocidade nove em todas as amostras). O tempo de agitação foi padronizado em 1h30min, tempo suficiente para que não haja mais na solução corpo de fundo.

As leituras de pH foram aferidas em pHmetro (mPA-210) com precisão $\pm 0,01$ com controle para pH/mV/ORP e temperatura (com precisão de $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$). Foram realizadas as calibrações com solução tampão para a faixa de pH entre 1 e 14.

4.1.1 SOLUÇÕES AQUOSAS DE GLICINA

Como visto o aminoácido Glicina possui um limite de solubilidade, e para verificar se o pH sofreria alteração devido à diferença de concentrações, adotamos essa concentração limite e a partir dela obtivemos concentrações mais baixas com a diluição da amostra inicial.

Para a preparação da solução inicial foi aferida a massa de $(2,5006 \pm 0,0001)$ g para a Glicina na balança de precisão. Para facilitar o manuseio, a amostra foi depositada para a medida em um papel alumínio devidamente esterilizado, a balança foi zerada com o alumínio antes do início de cada medida. A concentração molar para esta amostra em seu limite de solubilização é de 3,33Mol/L.

Após aferida a massa do aminoácido, este foi depositado em um becker de 25mL que continha 10mL de água ultra pura para a solubilização. Foi utilizado este volume de 10mL, pois é o valor de volume mínimo necessário para uma boa leitura do valor de pH da solução, devido ao eletrodo do pHmetro precisar estar imerso até certa altura na solução para a leitura do pH.

Em seguida o becker contendo a solução aquosa de Glicina foi levado para o agitador no qual permaneceu em agitação constante por 1h30min. Com cerca de 30 min de agitação a maior parte do aminoácido já havia solubilizado, no entanto, padronizamos um tempo maior para evitar que o tempo de agitação nas próximas amostras fosse diferente. Para não ficar repetindo o termo solução aquosa de Glicina, vamos nos referir a amostra apenas como solução de Glicina daqui em diante.

Após o tempo de agitação de 1h30min o pH da solução foi aferido, sempre em temperatura de 22°C, apresentando um pH de 6,36. Depois desta etapa de preparação da solução de Glicina, foram realizadas as medidas de espectroscopia Raman (FT-Raman); para as medidas em função da concentração foi adicionado mais solvente (água ultra pura) para obter as demais concentrações.

A diluição foi realizada adicionando 5mL de água ultra pura na solução inicial; após adição do solvente a amostra em solução de Glicina foi levada ao agitador, no qual permaneceu durante 15min em agitação constante. A nova solução possuía uma concentração de 2,22Mol/L e o pH manteve-se o mesmo, em seguida realizou-se uma medida da amostra no FT-Raman.

Para as demais soluções obtidas o processo foi o mesmo, adicionando mais 5mL de água ultra pura, agitando por 15min, aferindo o pH e depois fazendo a medida de FT-Raman, lembrando que o pH foi aferido sempre na mesma temperatura.

A diluição da solução inicial foi repetida cinco vezes, até obtermos uma concentração de 0,95Mol/L, com a adição total final de 25mL de solvente. Este valor de concentração foi considerado limite para uma boa visualização no FT-Raman, e a partir dela realizou-se a variação de pH com os reagentes adotados.

4.1.2 SOLUÇÕES AQUOSAS DE GLICINA COM DIFERENTES VALORES DE PH

A variação de pH da solução de Glicina foi realizada em duas etapas, na primeira etapa realizou-se a variação do pH da solução final obtida na variação de concentrações, ou seja, na amostra em solução de Glicina com uma concentração de 0,95Mol/L. E na segunda variou-se o pH de uma solução de Glicina com uma concentração de 3Mol/L. Mais a frente será justificada essa segunda etapa.

Após aferido o pH da solução de Glicina em 0,95Mol/L e observado que este não variou com a concentração, dividimos a solução em duas partes de 10mL, para adicionar os reagentes escolhidos, que neste caso foram o Ácido Clorídrico (HCl) e o Hidróxido de Sódio (NaOH), ambos em uma concentração de 0,1N. Estes reagentes foram escolhidos por serem solúveis em água, que foi o solvente adotado para as análises. Como não era conhecida a resposta do aminoácido devido à variação do pH, os reagentes foram adicionados em pequenos volumes com uma pipeta, iniciando com 0,4mL, sendo dobrado o valor adicionado sempre que considerado necessário, de acordo com o valor de pH aferido eram realizadas as medidas no FT-Raman.

Como a relação entre as concentrações da amostra-reagente não estavam adequadas, a variação de pH foi extremamente lenta, sendo necessária a adição de grande volume de reagente para variar o pH da solução de Glicina, sendo adicionados, por exemplo, 12,4mL de NaOH (ou HCl) para alcançar um pH 9,58 (ou pH 3,16). As quantidades, em volume, de reagente adicionada por vez, tanto de NaOH quanto de HCl sempre foram às mesmas.

Outro fator levado em consideração foi que, para análises no FT-Raman, a amostra com 0,95Mol/L em pH 9,58 tem um volume grande de reagente, e como o reagente está diluído em água, a quantidade de água na amostra aumentou consideravelmente, o que prejudicou a visualização das bandas Raman do aminoácido devido à excitação do FT-Raman ser em 1064nm e neste comprimento de onda a banda Raman da água acabou por interferir, nos levando então à segunda etapa.

Na segunda etapa as análises passaram a ser realizadas no equipamento Micro Raman, adotamos então uma concentração de 0,05Mol/L de Glicina, que seria a concentração de

amostra adequada para os reagentes adotados com 0,1N [57], no entanto a baixa intensidade das bandas ao alterar o pH, nos levou a pensar em outro valor de concentração, assim adotou-se uma concentração de 3Mol/L, por fornecer uma boa intensidade das bandas da solução de Glicina, e por ser um valor próximo do limite de solubilidade do aminoácido, e permitiu realizar um ensaio de crescimento de cristais em diferentes pH em paralelo com o estudo da variação de pH da solução. Para alterar o pH utilizou-se os mesmos reagentes (NaOH e HCl), mas agora com concentração de 6N, que foi baseado na proporção adequada amostra-reagente utilizada para a concentração mais baixa [57].

Para preparar a solução de 3Mol/L de Glicina o processo foi o mesmo realizado anteriormente, preparou-se 20mL de solução de modo a dividir em duas partes de 10mL para a adição dos reagentes. Foi aferida a massa de $(4,5037 \pm 0,0001)$ g para a Glicina na balança de precisão, adicionando em um becker de 25mL, a massa de Glicina em um volume de 20mL de água ultra pura; em seguida a solução foi agitada, com velocidade constante, por 1h30min, e o pH a 22°C aferido, apresentando um pH de 6,27.

Depois de realizada a medida no Micro Raman na solução de Glicina em pH neutro, dividiu-se a solução em duas partes de 10mL e adicionando-se os reagentes, de 0,2mL em 0,2mL, devido a sua alta concentração. Ao atingir o valor de pH desejado, a medida Raman era realizada. Lembrando que o pH sempre foi aferido com a solução a 22°C. Como os reagentes estavam concentrados (6N) o volume final adicionado foi de 4mL de HCl para obter um pH = 0,48 e 4,8mL de NaOH para obter um pH = 12,42.

O tempo de reação entre as soluções de Glicina e os reagentes foi considerado, desta forma padronizou-se um intervalo entre a adição do reagente e a medida Raman, antes e após as zonas tamponantes este intervalo sendo 1h ou 24h, o que não alterava significativamente os valores de pH; no entanto, ao entrar na zona tamponante, o tempo de reação passou a interferir, desta forma para a concentração mais baixa adotou-se um padrão de 1h de intervalo e para a mais concentrada um intervalo de 24h, o valor de concentração dos reagentes adotados foram de 0,1N e 6N, respectivamente.

4.1.3 CRESCIMENTO DE CRISTAIS DE GLICINA EM DIFERENTES VALORES DE PH

O crescimento de cristais foi realizado pela técnica de evaporação lenta do solvente [58,59] sendo a solução aquosa de Glicina preparada com água ultra pura em uma concentração de 3,33Mol/L, valor limite de solubilização do aminoácido Glicina. Esta solução será chamada de solução de partida, para o caso do crescimento de cristais.

Para a preparação da solução de partida foi adicionado ($2,5038 \pm 0,0001$) g de Glicina comercial em 10mL de água em um becker de 15mL; a solução ficou 1h30min no agitador com velocidade de agitação nove. Após esse tempo o pH, neutro de 6,40 foi aferido a 22°C, e em seguida o becker foi tampado com papel alumínio com furos, de modo a possibilitar a evaporação, condicionado em uma caixa de isopor fechada minimizando as influências externas. Com cerca de aproximadamente 3h já era possível observar a formação de alguns precipitados no fundo do becker.

Para o crescimento de cristais em soluções de pH básico e ácido o processo foi praticamente o mesmo, diferenciando que após o término da agitação mecânica foram adicionados os reagentes HCl (ácido) e NaOH (base), respectivamente, com concentração de 6N, até atingir um pH próximo dos valores de pK_1 e pK_2 do aminoácido Glicina, sendo em $pH=pK_2= 9,60$ para a parte básica e $pH=pK_1= 2,34$ para a parte ácida [19]. Após atingir o pH desejado o recipiente contendo a solução básica ou ácida foi fechada com papel alumínio possuindo furos, e também condicionado em caixa de isopor fechada.

Para a preparação da solução básica de Glicina foi utilizada a solução de partida a pH neutro obtida pelo mesmo processo descrito anteriormente. Após a etapa do agitador mecânico, adicionou-se 1mL de NaOH, permanecendo a solução em repouso em torno de 1h para aferir o pH à 22°C, de pH 9,80. Diferentemente da forma neutra, após aproximadamente 10 dias a solução não apresentava nenhum precipitado, desta forma utilizamos o método de inserção de sementes [60], o qual consiste em adicionar cristais da Glicina comercial a solução básica de Glicina. Com este método, após 7 dias formaram-se alguns precipitados na solução, de forma aglomerada, bem diferente dos observados na solução neutra. Ao retirar os cristais da solução básica foi possível observar que os mesmos eram mais frágeis que os oriundos da solução neutra.

Para o crescimento de cristais em solução ácida de Glicina, foi adicionado 1,8mL de HCl, a solução de partida, que também foi submetida à agitação mecânica, no mesmo procedimento descrito anteriormente. Após a agitação, aguardando 1h, o pH foi aferido, em 22°C, apresentando um valor de pH 2,40. Após medir o pH a solução foi deixada em repouso, e assim como para a solução básica, após 10 dias a solução ácida também não apresentava nenhuma precipitado, desta forma utilizamos a mesma técnica de sementes. Após 12 dias foi possível observar a formação de precipitados na solução; estes também se apresentavam de forma aglomerada, porém com aspectos morfológicos diferentes daqueles provenientes das

soluções neutra e básica, com forma mais pontiaguda assemelhando-se a finos espinhos. Além disso, mostravam-se mais opacos e frágeis comparados aos das outras soluções. A opacidade foi adquirida com o tempo de crescimento. A Figura 4.1 apresenta as fotos dos cristais obtidos a partir das soluções neutras e em pH 9,80 e pH 2,40, respectivamente.

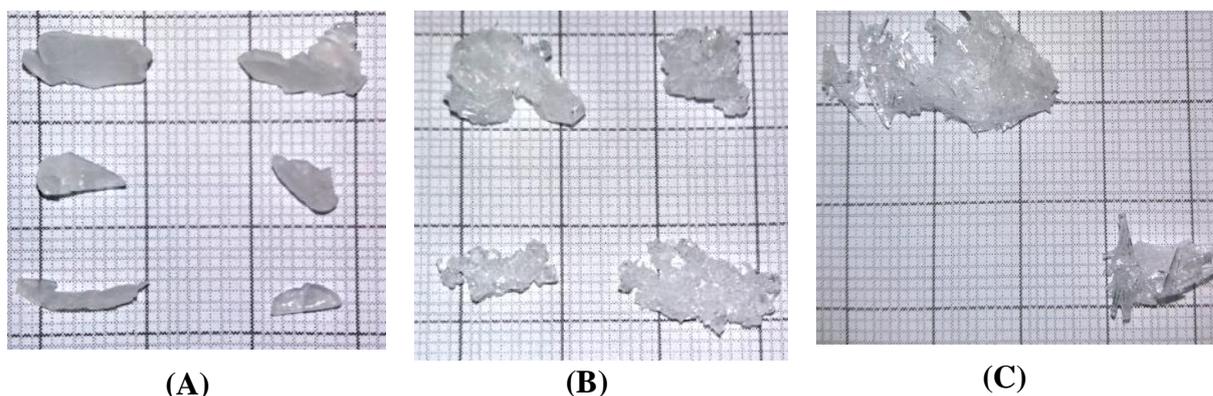


Figura 4. 1. (a) Cristais de Glicina obtidos em pH neutro. (b) Cristais de Glicina crescidos em solução de pH 9,80. (c) Cristais de Glicina crescidos em solução de pH 2,40.

O período final de crescimento dos cristais foi de 23 dias para a solução neutra, 21 dias para a solução básica e 34 dias para a solução ácida.

Para as análises realizadas nos cristais, os mesmos foram macerados tanto para a análise Raman, quanto para de DRX. Foi utilizado um almofariz de pedra de ágata, os quais foram cuidadosamente preparados para a não contaminação das amostras.

4.2 ESPECTROSCOPIA RAMAN

Para as análises das soluções aquosas de Glicina em função da concentração foi utilizada a espectroscopia Raman por transformada de Fourier, conhecida como FT-Raman, pertencente ao Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa da Universidade Estadual de Maringá (COMCAP-UEM). Os espectros Raman das amostras foram obtidos por meio de um espectrômetro FTIR (Bruker, Vertex 70v) acoplado a um módulo Raman (Bruker, RAM II) equipado com um detector de germânio resfriado a nitrogênio líquido, e um laser de excitação Nd:YAG com comprimento de onda em 1064nm com potência nominal de 500mW.

As amostras foram condicionadas em uma cubeta de quartzo de caminho óptico de 5mm com uma face espelhada, oposta a incidência do laser de excitação. Os espectros finais para

cada concentração foram obtidas por média de 128 varreduras com uma resolução de 4cm^{-1} , num intervalo espectral de 400 a 4000cm^{-1} . A Figura 4.2 apresenta o equipamento utilizado.

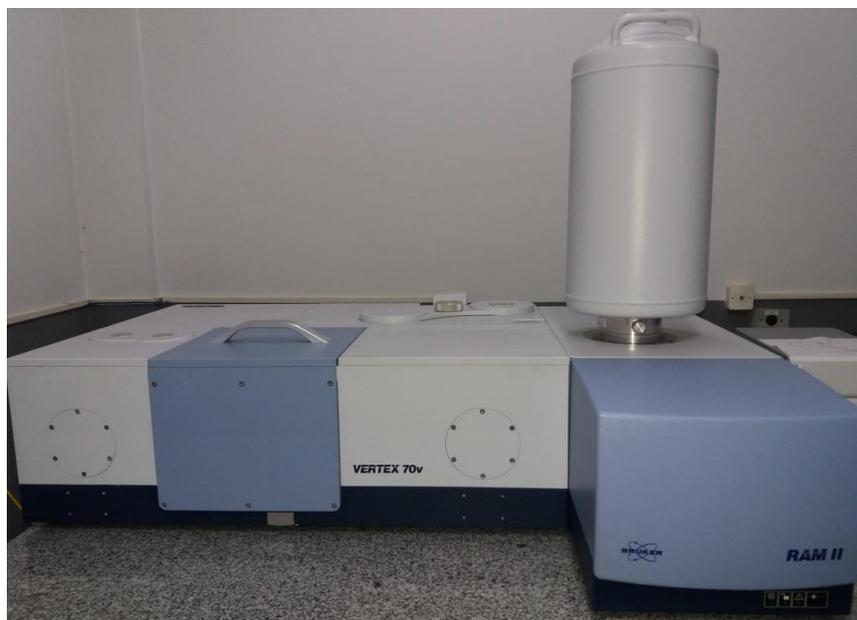


Figura 4. 2. Equipamento utilizado para as medidas de FT-Raman.

Para as medidas em função da variação do pH foi utilizado o microscópio Raman confocal (Bruker, Senterra). Na Figura 4.3 temos uma foto do equipamento, pertencente ao COMCAP-UEM, com excitação em 532nm e potência nominal de 20mW . Foi escolhido outro comprimento de onda de excitação de forma a minimizar a contribuição da água nos espectros Raman das soluções, bem como efeitos de luminescência. Cada espectro Raman foi uma média de 100 varreduras em um mesmo ponto na amostra, no qual o laser de excitação é focado por uma objetiva de $20\times$ de aumento, com resolução espectral de $3\text{-}5\text{cm}^{-1}$, obtidos no intervalo entre 290 a 1700cm^{-1} . A detecção do espalhamento Raman das amostras é feito por meio de uma câmera CCD (*charged-coupled device*) refrigerada a -85°C , com tempo de integração de 10s para cada uma das 100 varreduras.

Os espectros Raman das amostras de Glicina comercial na forma sólida também foram obtidos por meio do Micro Raman, com configuração semelhante diferindo apenas no tempo de integração.



Figura 4. 3. Microscópio Raman confocal (Micro Raman).

4.3 DIFRATOMETRIA DE RAIOS-X

As medidas foram realizadas em um difratômetro de Raios-X (Bruker, D8 Advanced) pertencente ao COMCAP-UEM, com radiação CuK_α , na amostra em pó, sobre porta amostra de vidro no intervalo em 2θ de 10° a 80° . As medidas foram realizadas em temperatura ambiente ($\sim 21^\circ\text{C}$) com velocidade de varredura de $0,29^\circ/\text{min}$. Não foram realizadas análises por refinamento estrutural. A identificação das fases cristalinas foi realizada comparando os difratogramas obtidos com as fichas padrões disponíveis no *Crystallography Open Database* (COD) e *International Center for Diffraction Data* (ICDD).

Resultados e Discussão

Neste capítulo serão apresentados os resultados, obtidos por espectroscopia Raman para o estudo dos efeitos moleculares em soluções aquosas do aminoácido Glicina com a de variação de pH. Além disso, foram avaliadas possíveis alterações moleculares em cristais de Glicina crescidos a partir de soluções aquosas de Glicina com pH neutro, ácido e básico, bem como uma comparação qualitativa sobre as estruturas cristalinas obtidas nos cristais crescidos.

5.1. CARACTERIZAÇÃO DO AMINOÁCIDO GLICINA NA FORMA SÓLIDA

Inicialmente foi realizada caracterização do aminoácido Glicina comercial com a técnica de FT-Raman, em temperatura ambiente, de modo a identificar seus modos vibracionais e associá-los com seus grupos funcionais. A região espectral analisada abrange de 400 a 4000 cm^{-1} , que pode ser visualizada nas Figuras 5(a) e 5(b) nas regiões entre 4000-2000 cm^{-1} e 2000- 400 cm^{-1} , respectivamente.

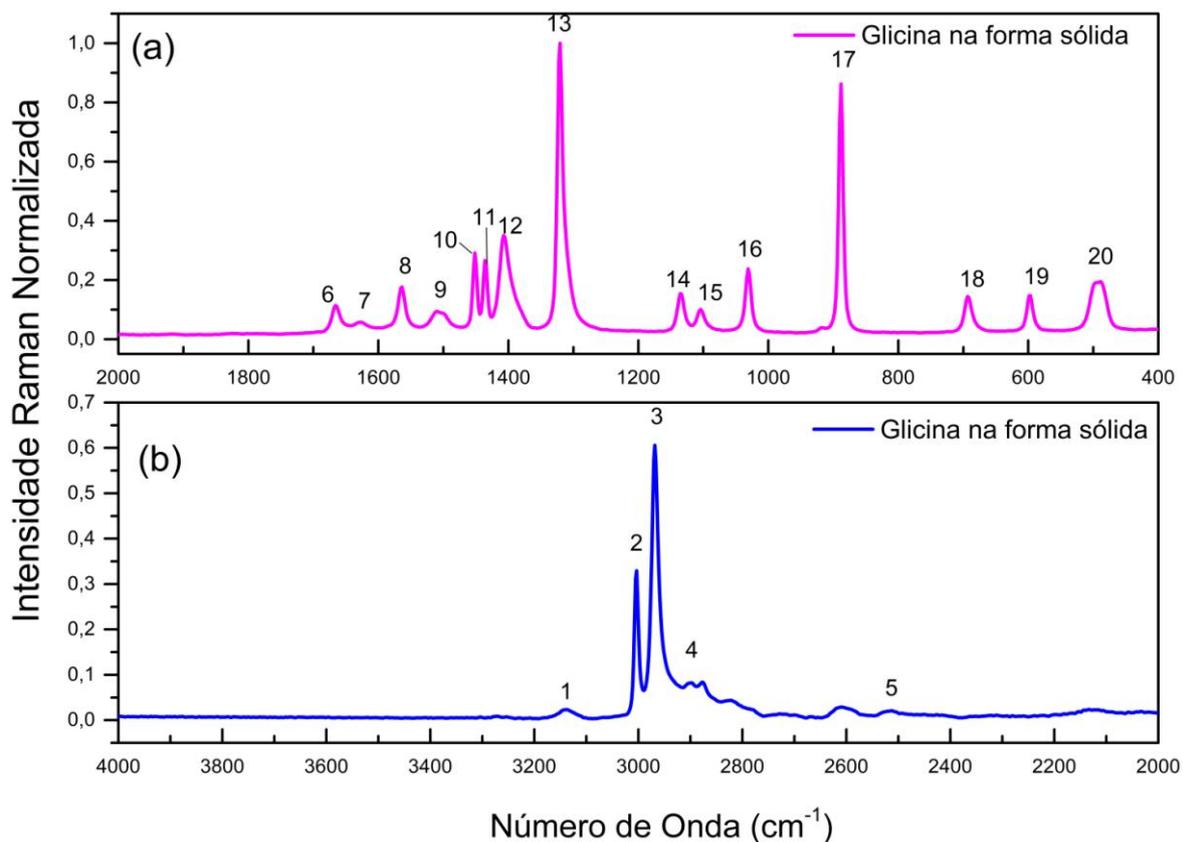


Figura 5. 1. Espectro Raman da Glicina (a) na região de 400-2000cm⁻¹ e (b) de 2000 a 4000cm⁻¹.

Foram identificados alguns dos grupos funcionais do aminoácido Glicina, os centros das bandas Raman e suas atribuições se encontram na tabela 5.1.

O espectro obtido foi normalizado, usando como referência o pico mais intenso em 1320cm⁻¹ que representa uma torção $\delta(\text{HOC})$ [61].

Tabela 5. 1. Bandas Raman observadas para o aminoácido Glicina na forma sólida

Nº Banda	Xc (cm ⁻¹)	Atribuição vibracional
1	3138	$\nu(\text{OH})$ ^[63]
2	3003	$\nu(\text{CH})$ ^[61]
3	2968	$\nu(\text{CH})$ ^[61]
4	2898	$\nu(\text{C-H})_{\text{Str}}$ ^[62]
5	2522	N-H ^[64]
6	1665	$\delta(\text{NH}_2)$ sciss ^[61] ; $\delta(\text{NH}_3^+)$ ^[63]
7	1627	$\nu(\text{C=O})$ ^[61]
8	1563	$\delta(\text{HCH})$ sciss ^[61] ; $\nu(\text{COO}^-)$ ass ^[63]
9	1509	$\delta(\text{HCH})$ ^[61]
10	1451	$\delta(\text{CH}_3)$ Asym _{Med} ^[62]
11	1436	$\delta(\text{HCH})$ ^[61]
12	1407	$\nu(\text{COO}^-)$ ^[63]
13	1320	$\delta(\text{HOC})$ ^[61]
14	1135	$\delta(\text{HNH}) + \delta(\text{HCH})$ ^[61]
15	1104	$\nu(\text{C-O-C})_{\text{Wk}}$ ^[61]
16	1031	$\nu(\text{CO})$ ^[62]
17	888	$\rho(\text{CH}_2)$ ou $\nu(\text{CO})$ ^[61]
18	693	$\delta(\text{COO}^-)$ ^[63]
19	596	$\rho(\text{OH})$; $\rho(\text{CO})$ fora do plano ^[61]
20	488	$\delta(\text{O=CO})$ ^[61]

Legenda: Xc – Centro de banda / Wk – Weak (Fraca) / Med – Medium (Média) / Str – Strong (Forte)
/ δ – deformação angular / ρ – Torção fora do plano / ν – modo vibracional de estiramento / sciss –
deformação angular do tipo tesoura no plano / asym - modo vibracional de estiramento assimétrico.

Algumas das atribuições encontradas para as bandas Raman basearam-se no espectro calculado pelo procedimento da teoria dos funcionais da densidade (DFT) [61].

A teoria dos funcionais de densidade é um método cada vez mais utilizado para tratar problemas que envolvem as estruturas da matéria. Criada por Walter Kohn nos anos 60 se tornou popular para cálculos em física de estado sólido na década de 70 e somente foi considerado preciso o suficiente para cálculos em química quântica na década de 90, quando a

teoria foi adaptada de modo a representar as interações de intercâmbio e correlação [64].

Mesmo tendo as raízes no modelo de Thomas-Fermi, a DFT foi colocada em uma base teórica firme pelos dois teoremas de Hohenberg-Kohn, mantidos apenas para estados não degenerados na ausência de um campo magnético, embora desde então tenham sido generalizados para abranger estes [64, 65].

Esta teoria pode prever uma grande variedade de propriedades moleculares, como por exemplo, as estruturas moleculares, as frequências vibratórias, as energias de ionização e propriedades elétricas e magnéticas [65].

Depois de caracterizado, o aminoácido Glicina foi solubilizado em água ultra pura em diferentes concentrações.

5.2. ESTUDO DA SOLUÇÃO AQUOSA DE GLICINA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES

A análise da dependência da concentração em soluções aquosas de Glicina fez-se necessária a fim de verificar qual seria a concentração mais adequada para o estudo da variação de pH por espectroscopia Raman. Dentro do limite de solubilização do aminoácido, os efeitos de concentração poderiam acarretar variação de intensidade nos espectros. Sendo assim, o efeito de espalhamento elástico podem originar contribuição nos espectros Raman, decorrente de partículas não solubilizadas presentes na amostra.

Como descrito em Materiais e Métodos, na solução inicial de 25g de Glicina sólida solubilizada em 100mL de água foi adicionado o mesmo solvente para obter as soluções de menor concentração. Desta maneira, por mais que o efeito Raman da água seja de baixa intensidade, conforme a diminuição, em massa, da Glicina sólida, a contribuição da mesma pode se tornar relevante nos espectros Raman das soluções aquosas de Glicina. Além disso, por ter sido utilizado o comprimento de onda 1064nm para excitação na técnica de FT-Raman nesta etapa do trabalho, a contribuição da água nos espectros Raman das soluções ficou evidente, uma vez que a água, absorve na região do infravermelho.

A Tabela 5.2 apresenta os valores das amostras de Glicina em diferentes valores de concentração em g/L, assim como suas respectivas molaridades em Mol/L. As diferentes concentrações foram denominadas de A1 a A6, na qual A1 é a Glicina em sua concentração de solubilidade e a A6 é a última solução, menos concentrada, obtida ao adicionar solvente.

Tabela 5. 2. Valores de concentração e molaridade das soluções aquosas de Glicina

Amostra	Concentração (g/L)	Molaridade (Mol/L)
A1	250	3,33
A2	166	2,22
A3	125	1,66
A4	100	1,33
A5	83	1,11
A6	71	0,96

A Figura 5.2, apresenta os espectros das soluções aquosas da Glicina nos valores de molaridade representados na Tabela 5.2, cujos espectros foram normalizados em relação ao pico em 893cm^{-1} que representa $\nu(\text{CO})$ [61].

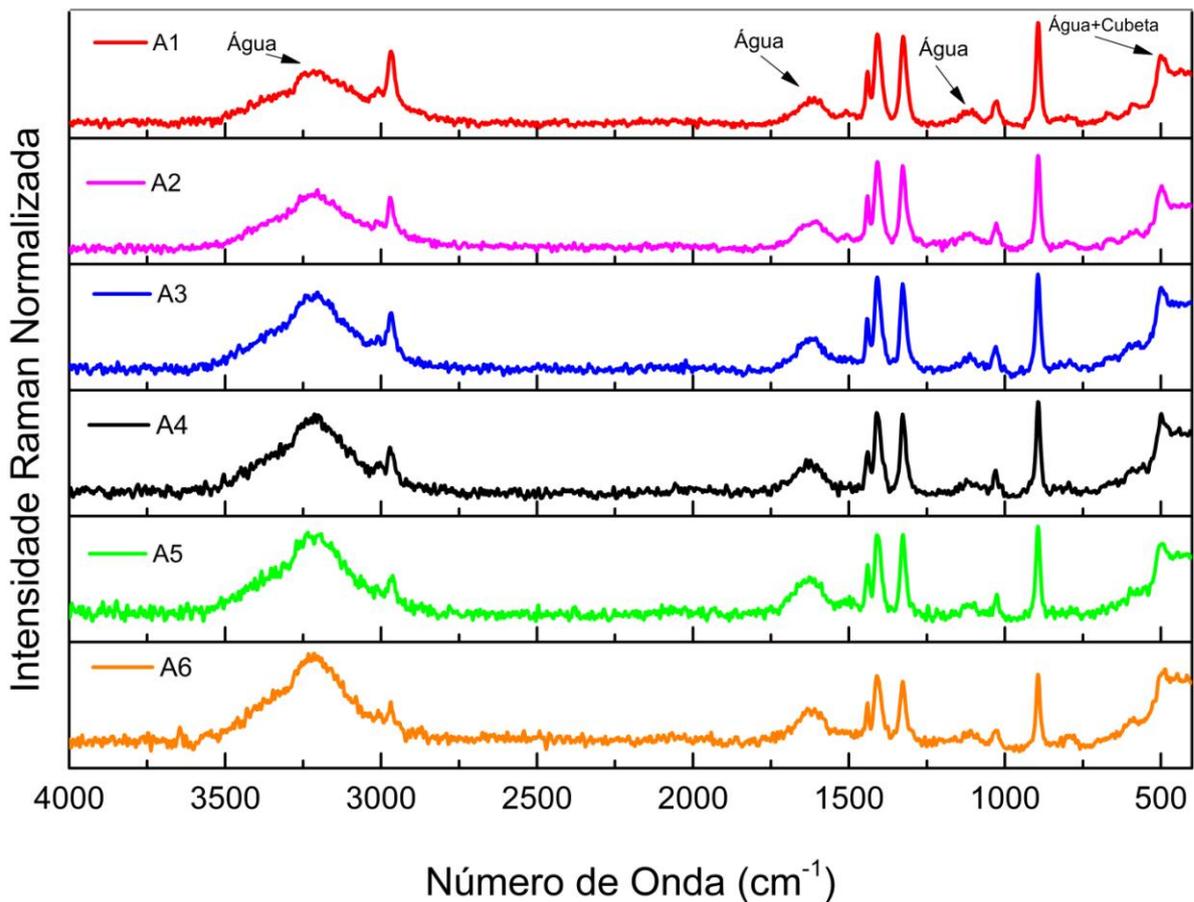


Figura 5. 2. Amostras em diferentes concentrações das soluções aquosas da Glicina. A1 = 3,33Mol/L, A2 = 2,22Mol/L, A3 = 1,66Mol/L, A 4= 1,33Mol/L, A5 = 1,11Mol/L e A6 = 0,96Mol/L.

Na Figura 5.2 é possível identificar e relacionar algumas bandas observadas no aminoácido solubilizado com seus grupos funcionais e suas atribuições, sendo algumas bandas mais representativas: em 894cm^{-1} que representa no espectro Raman uma ligação forte entre $\nu(\text{C-O})$, em 1326cm^{-1} um $\delta(\text{HOC})$, em 1409cm^{-1} e outro em 1440cm^{-1} aos quais são atribuídos uma deformação de $\delta(\text{CH}_2)$ ou $\delta(\text{CH}_3)$ assimétrica, em 1627cm^{-1} que representa uma ligação forte de $\nu(\text{C=N})$, já o pico em 2968cm^{-1} e em 3009cm^{-1} representam um $\nu(\text{C-H})$.

A Figura 5.3 compara os espectros Raman da maior e da menor concentração das soluções aquosas com forma sólida da Glicina.

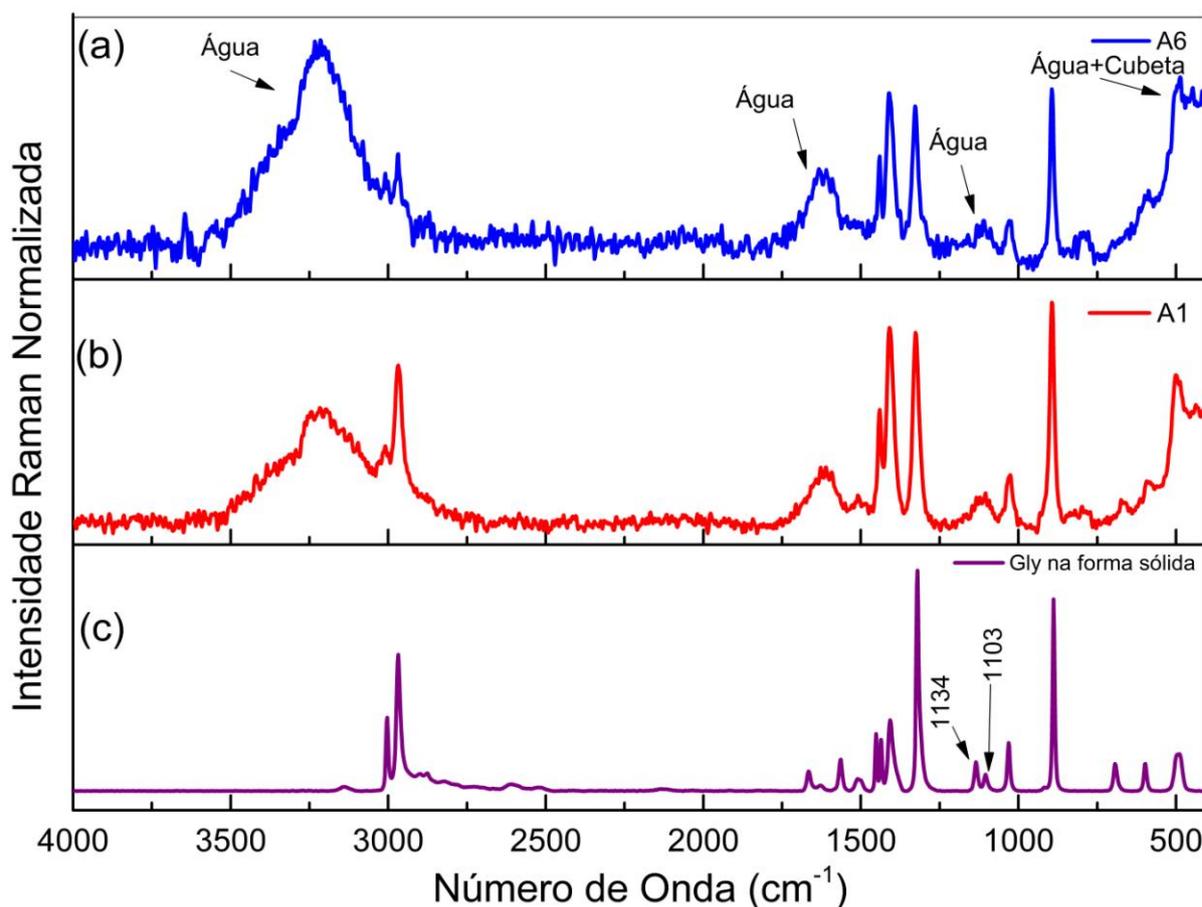


Figura 5. 3. Espectros Raman da Glicina em solução aquosa (a) A6 = 0,96Mol/L, (b) A1 = 3,33Mol/L e (c) Glicina comercial em pó.

É possível observar que as bandas da Glicina na forma sólida localizadas 1134 e 1103cm^{-1} , respectivamente, ao ser solubilizada têm a intensidade diminuída significativamente, isso se deve ao fato da ligação existente entre os átomos de carbono e

oxigênio ser de baixa intensidade, e ao adicionar água algumas dessas ligações são desfeitas, causando a diminuição de suas intensidades.

As mudanças observadas até então nos espectros, nas diferentes concentrações da Glicina em solução aquosa, foram apenas a diminuição da intensidade das bandas observadas, e embora se tenha a contribuição das bandas da água, estas não interferiram na visualização das bandas do aminoácido Glicina em solução aquosa. Desta forma, com a amostra Glicina em solução aquosa, cuja molaridade é de $A6 = 0,96\text{Mol/L}$, adicionou-se os reagentes para alterar o pH.

5.3. VARIAÇÃO DE PH EM SOLUÇÕES AQUOSAS DE GLICINA

Inicialmente foi testada a solução aquosa de Glicina com concentração de $0,96\text{Mol/L}$ para o estudo das mudanças moleculares na Glicina mediante a variação de pH da solução. Estas análises também foram realizadas pela técnica de FT-Raman. No entanto, ao adicionar os reagentes, as intensidades das bandas do aminoácido Glicina, nos espectros (não presentes no trabalho), diminuem sua intensidade. A isto se atribui o fato dos reagentes estarem diluídos em água e, ao adicionar os reagentes na amostra, a quantidade de água total na solução aquosa da Glicina com $0,96\text{Mol/L}$ aumentou, de forma que a contribuição das bandas Raman da água aumentaram nos espectros. Apesar de comprimentos de onda maiores, geralmente, minimizam os efeitos de luminescência, no caso de amostras com presença de água, a excitação no infravermelho próximo acaba por contribuir com a absorção da água e minimiza o espalhamento Raman dos demais componentes da amostra. Devido a este fato, foi utilizado o Microscópio Raman confocal com laser de excitação em 532nm .

De acordo com trabalhos encontrados na literatura [4,66], as concentrações para estudo de soluções de Glicina em função do pH foram menor ou igual a $0,05\text{Mol/L}$. Baseados nestes, iniciamos os estudos utilizando o Micro Raman em soluções aquosas de $0,05\text{Mol/L}$. No entanto, só foi possível identificar algumas das bandas do aminoácido; sendo assim optou-se por trabalhar com outra concentração de 3Mol/L , que está bem próxima a concentração de solubilidade ($3,33\text{Mol/L}$) do aminoácido Glicina. Nesta concentração as bandas Raman da Glicina foram observadas com forma mais definida e intensa, facilitando a análise das mudanças moleculares devido à variação de pH.

É possível notar neste estudo que os valores obtidos para pK_a do grupo carboxílico $2,47$ e do grupo amina $9,86$ e do ponto isoelétrico, pH neutro ($6,28$) não são idênticos aos

encontrados na literatura [19] 2,34, 9,60 e 5,97, na mesma ordem que os dados citados anteriormente. A Figura 5.4 mostra curva de titulação para Glicina obtida na literatura comparada às curvas obtidas neste trabalho em duas concentrações de solução aquosa de Glicina 3Mol/L e 0,05Mol/L.

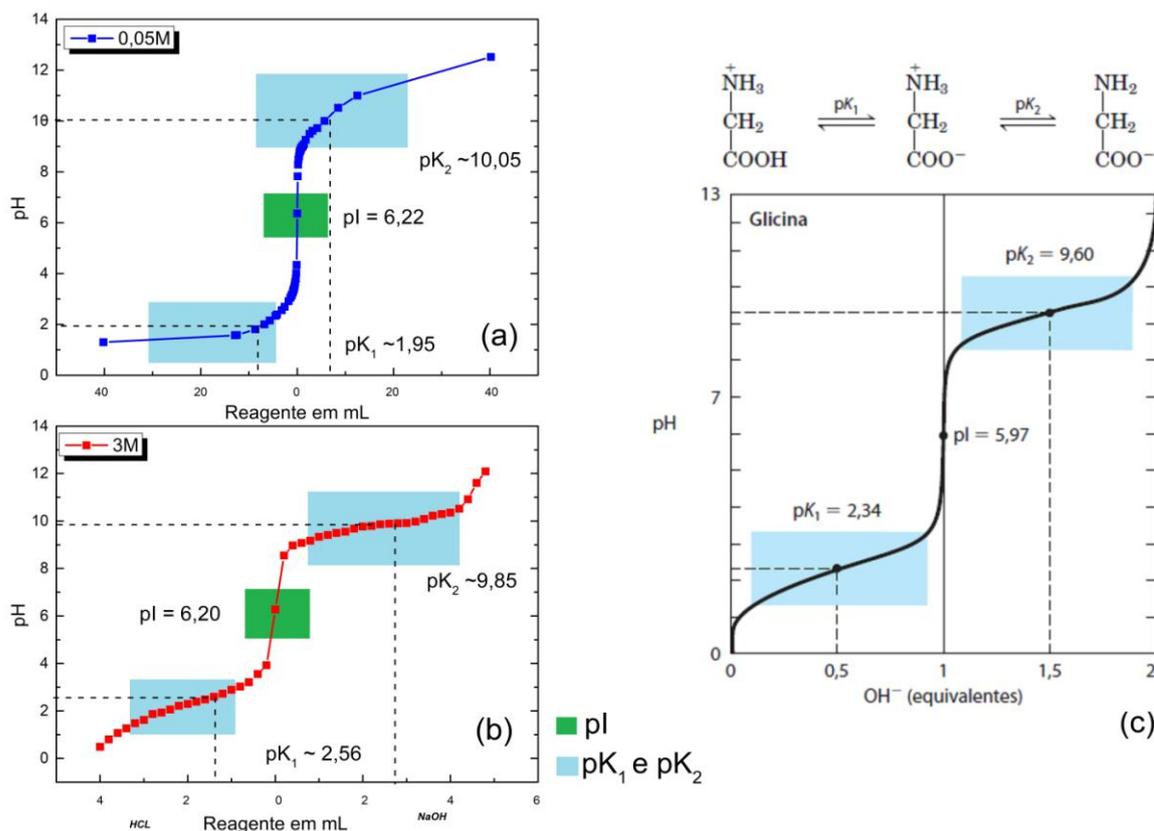


Figura 5. 4. Curvas de titulações da Glicina: (a) obtida neste trabalho para a solução aquosa de Glicina a 0,05Mol/L, (b) obtida neste trabalho para a solução aquosa de Glicina a 3Mol/L e (c) obtida da literatura, sendo pK_a a tendência de um grupo fornecer próton e pI o ponto isoelétrico. Adaptada de [19].

A curva de pH da Glicina é bastante definida, sendo possível identificar as regiões dos pK_a (pK_1 e pK_2), como visto no Capítulo 2. Por meio da na curva obtida nas concentrações de 0,05 e 3Mol/L, é possível observar o comportamento na região de pK_1 e pK_2 , com a variação dos valores de pH, a curva tem um comportamento semelhante para ambos os grupos (carboxila e amina). Nota-se que as curvas de titulações obtidas neste trabalho têm comportamento semelhante à curva da literatura, porém com os valores de pK_1 , pK_2 e pI um pouco deslocados.

As curvas obtidas para a titulação do aminoácido foram realizadas, como visto anteriormente, partindo de uma solução neutra para valores ácidos e básicos, adicionando HCl ou NaOH. A titulação da Glicina, comumente, é realizada fazendo a diluição do aminoácido em meio ácido, até o pH no valor de 1, depois quantidades de solução de Glicina são adicionadas, até atingir o ponto de equilíbrio (pI), e após é adicionado base até atingir um valor de pH 12. Percebe-se que a curva de titulação tem dependência das concentrações tanto das soluções de Glicina, quanto dos reagentes, pois o comportamento nas curvas de titulações para as duas concentrações mostradas fornecem valores de pK_1 e pK_2 diferentes.

Os valores de pI para as duas concentrações não apresentou diferença entre elas, já que a solução de partida de pH neutro depende do pH da água utilizada. As concentrações dos reagentes foram calculadas de acordo com a concentração da solução neutra, ou seja, quanto mais concentrada a solução aquosa de Glicina (pH neutro), maior a concentração dos reagentes utilizados. Este processo foi adotado para evitar que os volumes de reagentes adicionados fossem desproporcionais aos volumes utilizados para a preparação da solução final, pois a concentração da solução de Glicina é um fator crucial para as medidas de Micro Raman realizadas neste trabalho.

Apesar dos valores de pK_1 , pK_2 e pI estarem um pouco deslocados com relação aos valores da literatura, o comportamento dos espectros Raman ocorreram como previsto com relação à protonação e desprotonação da molécula de Glicina na presença de meio ácido e básico.

A Figura 5.5 mostra o espectro Raman para a solução de Glicina a 3Mol/L, com pH = 6,28 e as assinaturas das bandas principais identificadas como do aminoácido [46,50]. Ainda é visível a contribuição da água no espectro, banda centrada em 1617cm^{-1} , porém com menor intensidade. Em pH neutro a Glicina exibe sua forma eletricamente neutra (pH = 6,28), chamada de *zwitterion*, cuja fórmula química é $^+\text{NH}_3\text{CH}_2\text{COO}^-$.

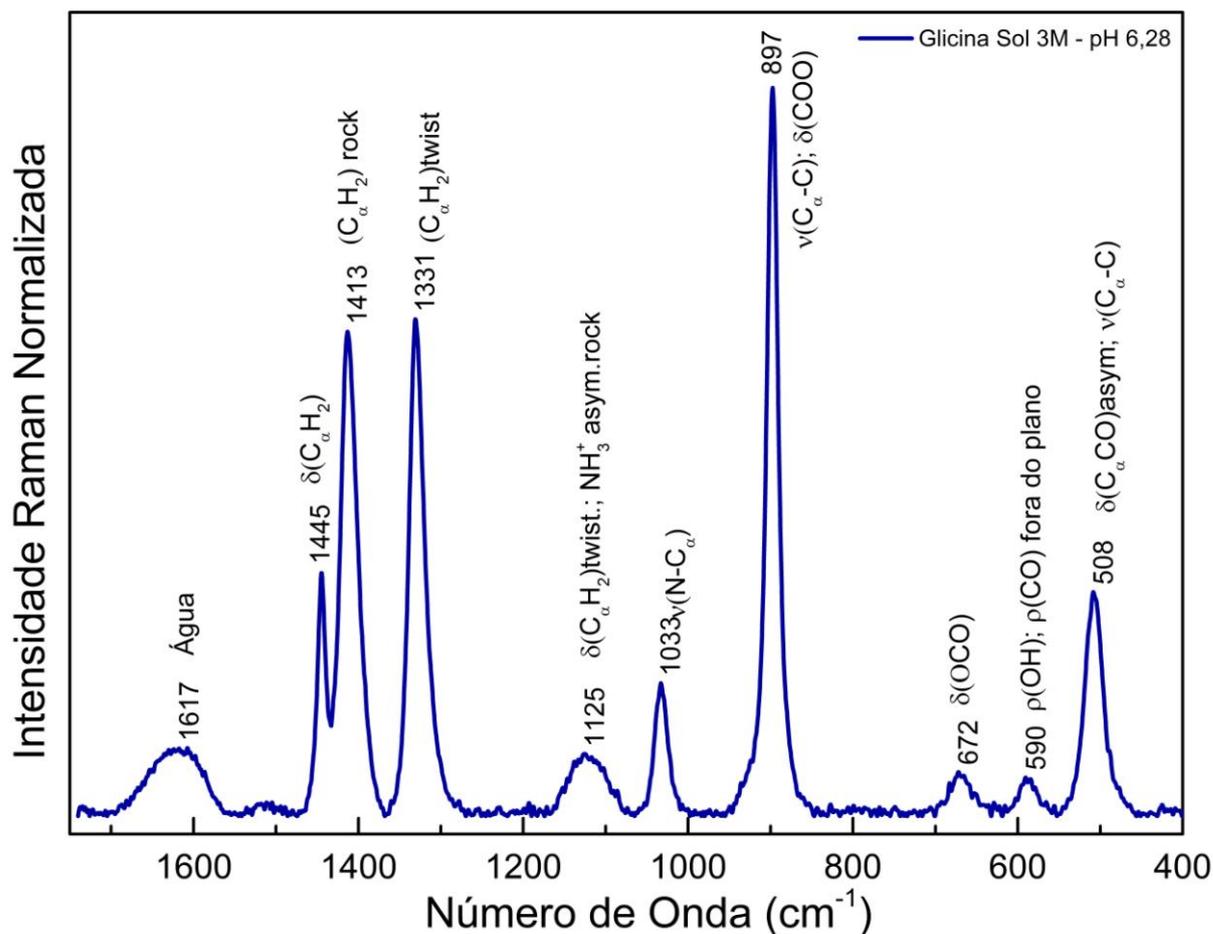


Figura 5. 5. Solução aquosas da Glicina em 3Mol/L em pH = 6,28. Espectro normalizado com relação à intensidade da banda centrada em 1617cm^{-1} .

Foram preparados 20mL de solução em pH 6,28 a 3Mol/L, separando-as em duas partes iguais de 10mL, uma para adição de reagente ácido e outra para básico.

A Figura 5.6, mostra os espectros obtidos para a forma catiônica ($^+\text{NH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$) da Glicina à 3Mol/L em pH de valores 1,06 e 2,47 próximos do $\text{pK}_1 = 2,34$ [19] do grupo carboxílico, e comparados ao espectro em pH = 6,28, forma neutra da Glicina.

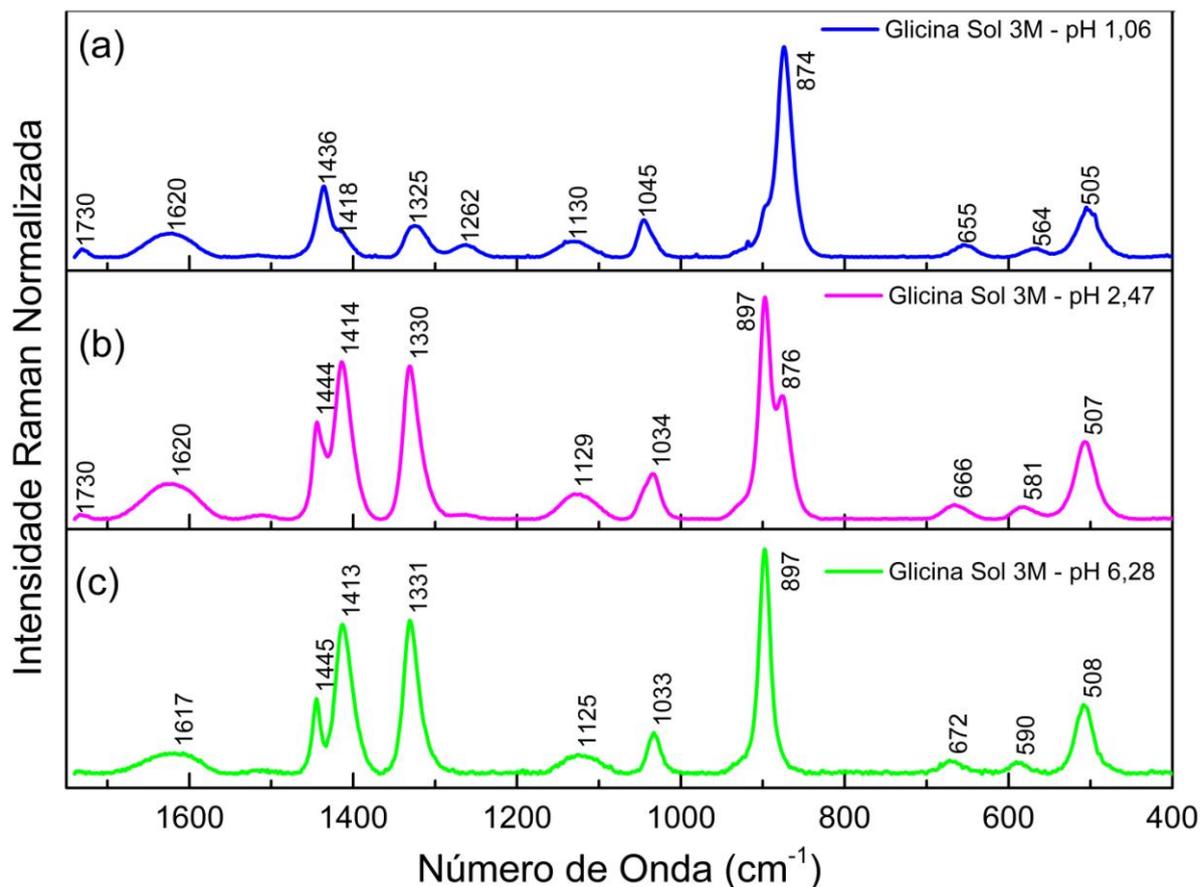


Figura 5. 6. Espectros Raman das soluções aquosas da Glicina em 3Mol/L na forma catiônica (a) em pH 1,06, (b) em pH 2,47 e neutra (c) em pH 6,28. Os espectros estão normalizados com relação à intensidade da banda centrada em 1617cm^{-1} .

Na Figura 5.6 é possível observar diferenças espectrais com relação à diminuição do pH, quando o meio torna-se mais ácido. As mudanças mais evidentes nos espectros das soluções ácidas (pH = 2,47 e 1,06), quando comparadas à solução de pH = 6,28 (neutra), estão presentes na região espectral entre 1500 e 1050cm^{-1} , assinadas como deformações CH_2 , com deslocamento da banda e diminuição de intensidade das bandas. Observa-se também deslocamento na banda entre 1050 e 1000cm^{-1} (estiramento da ligação N-C_α). Na região entre 1000 e 800cm^{-1} observa-se um deslocamento da banda atribuída ao estiramento da ligação $\text{C}_\alpha\text{-C}$, e por fim na região entre 700 e 400cm^{-1} ocorre deslocamento das bandas correlacionadas às deformações do grupo carboxílico associadas a torções do grupo NH_3^+ [3,4].

As regiões de pH próximas aos valores pK_a , geralmente uma unidade acima e uma abaixo do pK_a , são chamadas de zona tamponante, na qual o valor do pH da solução varia mais lentamente. Após esta região, ou seja, para valores de pH abaixo do $\text{pK}_1 = \text{pH} = 2,34$ e acima do $\text{pK}_2 = \text{pH} = 9,80$ há predominância das formas catiônicas e aniônicas nas soluções,

respectivamente. A variação do pH é mais lenta nas zonas tamponantes, pois quando $\text{pH} = \text{pK}_1$ (pK_2) há um equilíbrio entre as espécies doadoras e receptoras. Como comentado anteriormente, o pK_a é a constante de equilíbrio para ionização, a qual mede a tendência de um grupo doar um próton.

Em uma solução com pH neutro, ao adicionar um ácido, os íons H^+ diminuem o valor de pH. Adicionando HCl na solução neutra de Glicina haverá uma abundância de íons H^+ . Estes se ligam ao grupo carbonila (COO^-) da Glicina formando COOH , protonando a molécula de Glicina, a reação 1 mostra o produto entre Glicina anfótera e o HCl [67].



De acordo com o princípio de Le Chatelier, a qual diz que diante de uma perturbação externa, tal como alteração de concentração de íons em um sistema químico em equilíbrio, esse equilíbrio é deslocado de forma a minimizar tal perturbação, desta forma o deslocamento do equilíbrio químico favorecerá a forma protonada da Glicina com a diminuição do pH. Os íons Cl^- , por eletro afinidade, posicionam-se nas vizinhanças do grupo NH_3^+ . Deste modo abaixo do valor de pK_1 é esperado a predominância das espécies catiônicas.

Em pH 2,47, próximo ao pK_1 previsto na literatura, a solução ácida de Glicina deveria tender ao equilíbrio entre a espécie neutra e ácida. Entretanto, é possível notar na Figura 5.6 que a banda centrada em 897cm^{-1} para a solução neutra, quando observada na solução de pH 2,47, apresenta outra banda em 876cm^{-1} , o que indica que há as espécies ácidas e neutras, a ácida representada pela banda em 876cm^{-1} e a neutra em 897cm^{-1} , porém não há ainda o equilíbrio entre as duas, já que a banda em 876cm^{-1} possui menor intensidade. Nota-se que para pH 1,06 há predominância da banda centrada em 874cm^{-1} , indicando majoritariamente as espécies ácidas da Glicina ($^+\text{NH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$). Esse deslocamento da banda em 897cm^{-1} é devido ao aumento do comprimento da ligação entre $\text{C}_\alpha\text{-C}$, decorrentes da substituição do grupo COO^- por COOH [4].

Na região entre 1500 e 1050cm^{-1} , deformações do CH_2 , comparando os espectros das soluções neutras e pH 2,47, não se observam mudanças significativas com relação às bandas Raman, possivelmente porque as espécies neutras da Glicina ainda são maioria. Para o pH 1,06 as mudanças ocorrem de forma mais intensa, estas variações espectrais podem estar correlacionadas devido à protonação no terminal COO^- e a distribuição de carga na vizinhança ocasionada pelos íons Cl^- no terminal NH_3^+ [4,68].

O deslocamento da banda centrada em 1033cm^{-1} na solução neutra de Glicina, referente ao estiramento de N-C_α , também é resultado da substituição de COO^- por COOH , pois pode ter mudança no comprimento da ligação N-C_α .

O deslocamento em espectros vibracionais, geralmente, está correlacionado à mudança do comprimento de ligação química de interesse, decorrente da variação da massa efetiva dos íons ligados por meio desta, ou até mesmo de outros grupos funcionais que não participem diretamente da ligação.

Na região característica das deformações do grupo carboxílico associadas a torções do grupo NH_3^+ , entre 700 e 400cm^{-1} há deslocamento para região espectral de menor número de onda com a diminuição do pH. Não há aparecimento de novas bandas Raman, indicando que ligação do H^+ com o grupo COO^- , pode ter resultado em alterações nos ângulos das deformações e da torção.

Ainda na Figura 5.6 é possível notar uma banda de baixa intensidade centrada em $\sim 1730\text{cm}^{-1}$ para as soluções ácidas, este modo vibracional é atribuído ao estiramento do C=O [69] formado no processo de protonação.

A Figura 5.7 mostra os espectros Raman para duas soluções de Glicina com pH básico, 9,86 e 12,42 comparadas à solução de Glicina em pH neutro. O espectro com pH 9,86 é aproximadamente o valor do pK_2 descrito na literatura [19].

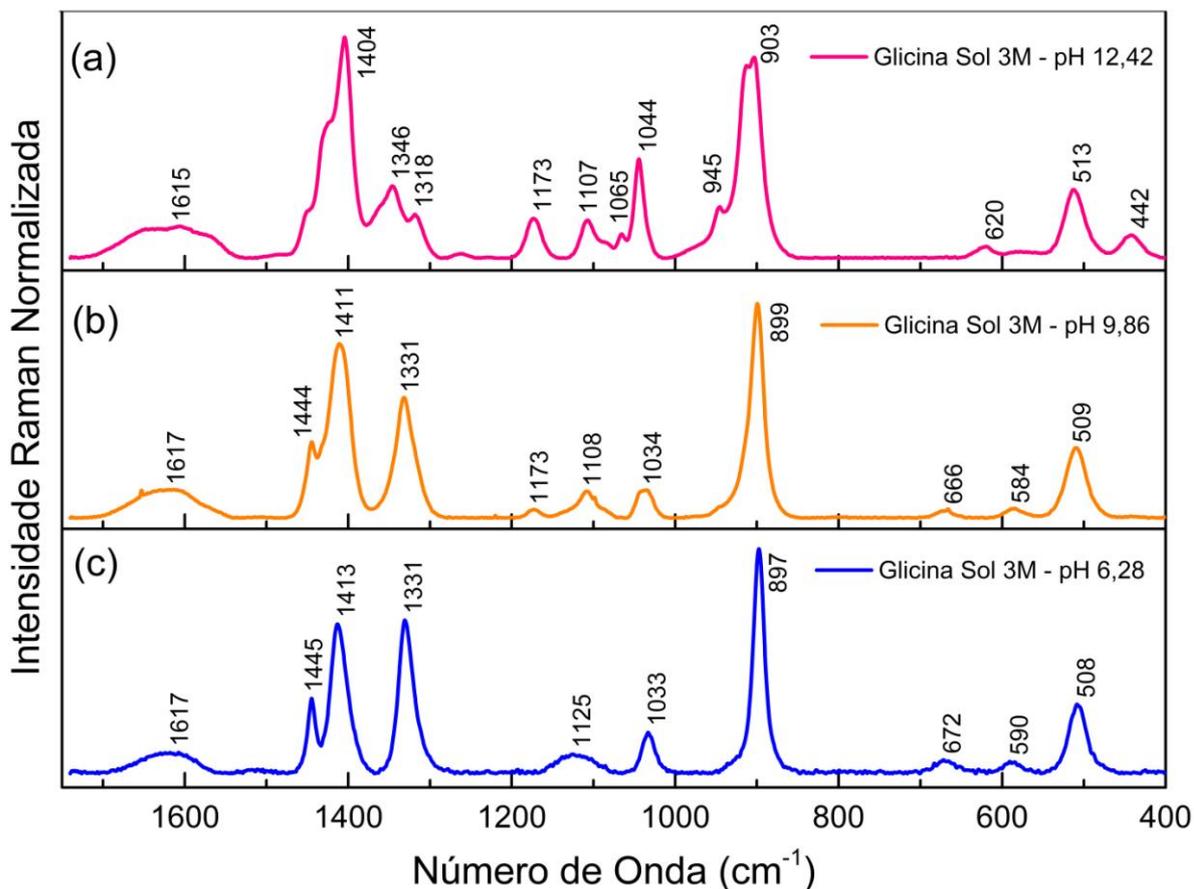


Figura 5. 7. Espectros Raman das soluções aquosas da Glicina em 3Mol/L na forma aniônica (a) Glicina 3Mol/L em pH 12,42 (b) Glicina 3Mol/L em pH 9,86 (c) Glicina 3Mol/L em pH 6,28. Os espectros estão normalizados com relação à intensidade da banda centrada em 1617cm⁻¹.

Adicionando NaOH na solução neutra de Glicina haverá a desprotonação da molécula por meio da perda do íon H⁺ do grupo NH₃⁺ tornando-se NH₂, conforme mostra a reação 2 [67]:



Há a formação da forma aniônica da Glicina NH₂ CH₂COO⁻ da mesma forma que para a solução ácida, na zona tamponante, próxima ao pK₂ = pH = 9,8, a variação do pH é mais lenta pelo fato da transição das espécies neutras presentes na solução, que perdem um próton H⁺, para as espécies aniônicas. Seguindo o princípio de Le Chatelier, quanto maior o valor de pH acima do pK₂ a tendência é que a solução tenha predominância das espécies desprotonadas. A molécula de H₂O formada na desprotonação colabora na dissociação do NaOH em OH⁻ e Na⁺ tornando o pH mais básico.

Tal como para as soluções ácidas é possível notar algumas diferenças espectrais com o aumento do pH. De modo geral, as variações espectrais para as soluções básicas estão nas mesmas regiões espectrais que para as soluções ácidas. Desta forma, como são as mesmas assinaturas espectrais que para as soluções mencionadas anteriormente, a discussão que se segue é baseada nas diferenças entre os espectros das soluções neutra, básica e ácida. A Figura 5.8 mostra uma comparação do espectro da solução neutra (pH = 6,28) em comparação com as soluções nos valores de pH = pK₁ = 2,34, pH = pK₂ = 9,84, pH = 1,06 e pH = 12,41.

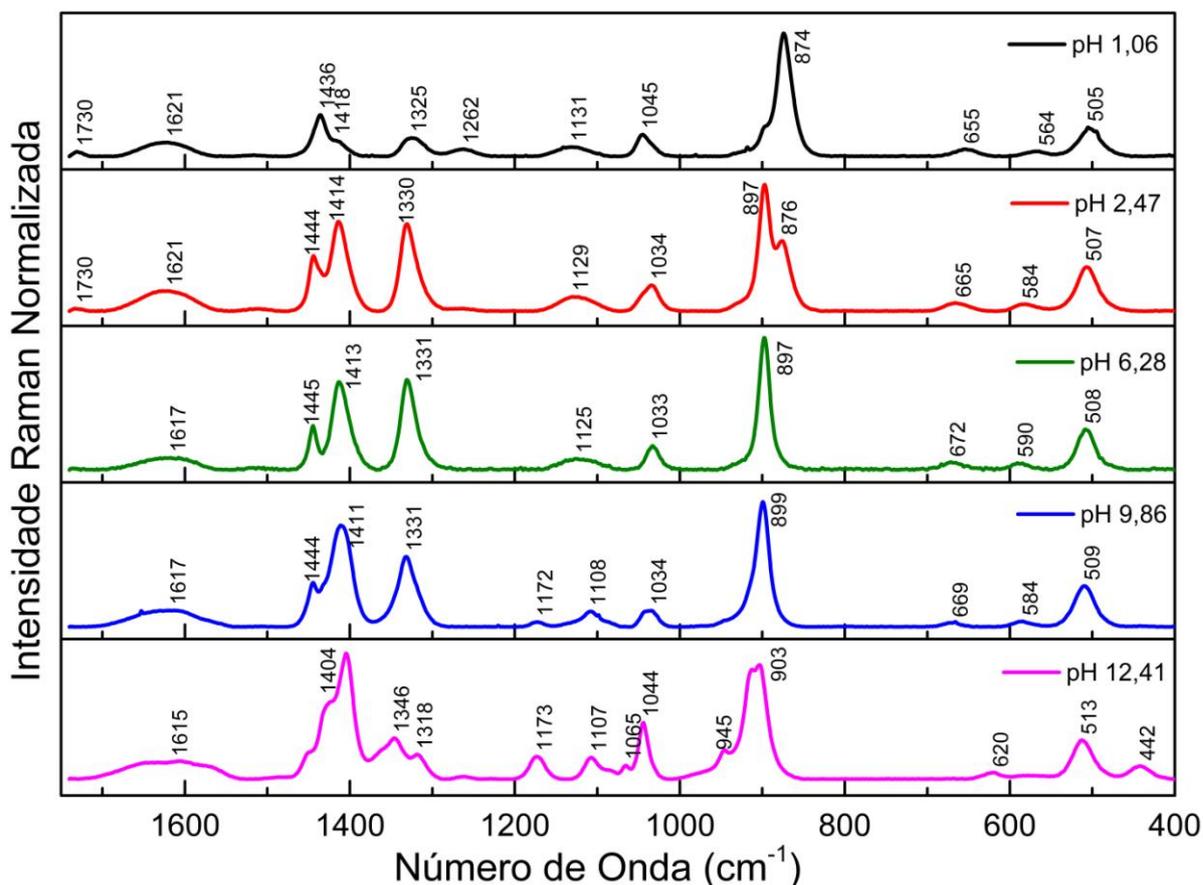


Figura 5. 8. Espectros Raman das soluções aquosas da Glicina à 3Mol/L para pH de valores 1,06, 2,47, 6,28, 9,86, 12,42. Os espectros estão normalizados com relação à intensidade da banda centrada em 1617cm⁻¹.

Para as soluções básicas não há a presença da banda centrada em 1730 cm⁻¹, pois na desprotonação não há formação da ligação C=O.

Na região entre 1500 e 1050cm⁻¹, deformações do CH₂, podemos observar que as bandas em 1445 e 1413cm⁻¹ presentes nos espectros da solução neutra (pH = 6,27) sofre inversão de intensidade e deslocamentos com a variação para pH ácido e básico. Com a diminuição do pH a banda em 1445cm⁻¹ tende a deslocar-se para números de onda menores

em oposto do comportamento da banda em 1413cm^{-1} . A banda em 1413cm^{-1} tende a diminuir sua intensidade comparada à banda de 1445cm^{-1} . Nas soluções básicas, aumentando o pH, a banda centrada em 1445cm^{-1} não se desloca e a banda em 1413cm^{-1} desloca-se para número de ondas menores e sua intensidade é maior quando comparada a banda em 1445cm^{-1} . As deformações das bandas em 1445 e 1413cm^{-1} são afetadas de forma diferente frente à protonação e desprotonação da molécula de Glicina, pois estes modos vibracionais envolvem ângulos entre as ligações químicas da molécula. Os aminoácidos possuem ângulos de torção de um grupo químico com relação a outro, chamados ângulos conformacionais, no caso da Glicina em sua forma neutra há o ângulo Ψ e ϕ , que envolvem as ligações do esqueleto (N-C $_{\alpha}$ -C-O) e (H-N- C $_{\alpha}$ -C), respectivamente. Com a adição ou perda do íon H^+ há mudança nos centros de massa da molécula, que estão envolvidos nas rotações, e assim com as mudanças dos modos vibracionais que envolvem deformação a molécula pode ter algumas rotações restringidas, pois os ângulos Ψ e ϕ torcem a molécula de modo que se seus átomos não colidam entre si. A Figura 5.9 mostra as formas neutra, catiônica e aniônica com a localização dos ângulos Ψ e ϕ .

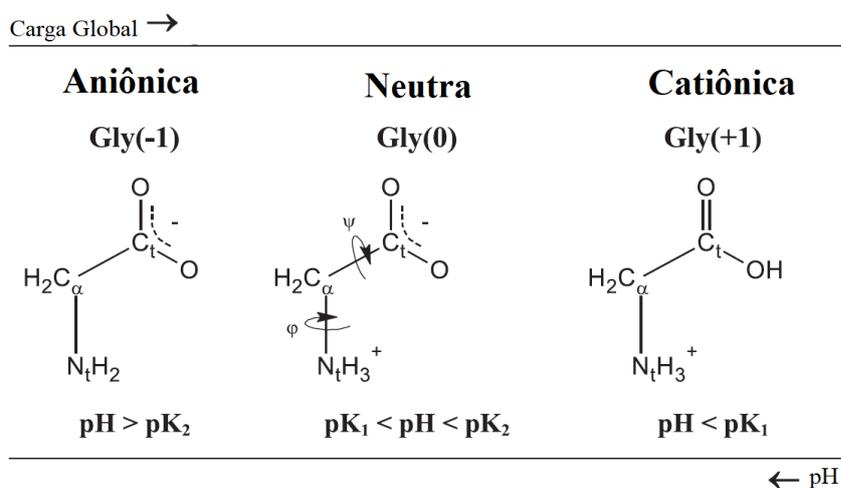


Figura 5. 9. Estrutura química das espécies de Glicina: neutra (0), aniônica (-1) e catiônica (+1), mostrando a localização dos ângulos conformacionais Ψ e ϕ . Adaptado de [4].

Outro marcador encontrado para a solução aquosa Glicina 3Mol/L mediante a variação de pH é a banda atribuída ao alongamento de ligação entre nitrogênio e o carbono α (N-C $_{\alpha}$), localizado a $\sim 1033\text{cm}^{-1}$ na Glicina neutra, que é deslocada para 1045cm^{-1} na Glicina catiônica e aniônica. Esta variação do número de onda, tal como discutido anteriormente, está correlacionado ao comprimento de ligação do N-C $_{\alpha}$, após do grupo NH_3^+ ser substituído pelo

grupo NH₂.

Diferente das soluções ácidas, a banda em 897cm⁻¹ encontrada na solução neutra não sofre deslocamento para número de onda menor; há uma tendência de deslocamento para número de onda maiores, uma vez que na solução de pH 12 a banda encontra-se em 903cm⁻¹, a adição do íon H⁺ ao grupo COO⁻ altera de maneira mais intensa o comprimento da ligação C_α-C assinatura química atribuída a esta banda, pois com a diminuição da concentração ocorreu um maior deslocamento para a banda Raman.

Entre 700 e 400cm⁻¹, também há deslocamento para região espectral de menor número de onda com o aumento do pH, novamente sem o aparecimento de novas bandas Raman. Entretanto, os deslocamentos para as bandas nesta região mostram-se maiores com o aumento do pH, mostrando que a adição de NaOH à solução neutra causa maior mudança nas torções da molécula de Glicina, o que pode ser visto também na Figura 5.9, na qual a Gly (-1) tem suas torções mais limitadas com relação ao ângulo φ que rotação a molécula por meio da ligação (H-N-C_α-C), mostrado pela redução na região de menor energia.

A fim de investigar as variações espectrais com a variação de pH foram realizados ajustes gaussianos nos espectros das soluções neutra, ácidas e básicas. Para se obter um bom ajuste gaussiano é necessário que a curva teórica, a soma das funções gaussianas impostas aos espectros, corresponda aos dados experimentais e que o número de funções gaussianas inseridas seja justificado por meio das atribuições químicas referentes à molécula estudada. Foram ajustados os espectros das soluções em pH neutro, ácidos e básicos, e a partir do melhor ajuste obtido foram analisadas as variáveis fornecidas. Um exemplo dos ajustes realizados está na Figura 5.10, para a solução neutra de Glicina.

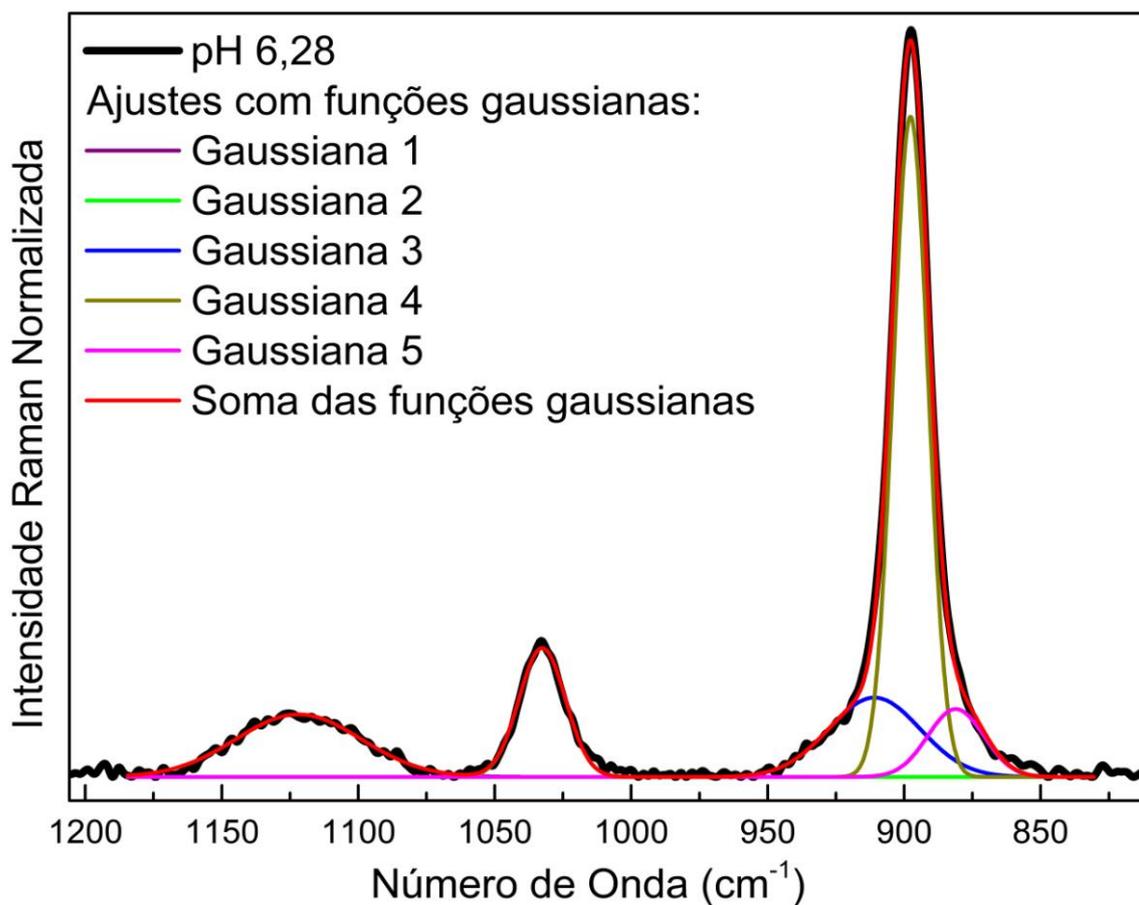


Figura 5. 10. Exemplo de ajuste gaussiano para a solução de Glicina neutra na região de 1200 a 800 cm^{-1} .

Optamos por avaliar somente os deslocamentos dos centros, pois as variações na área e na largura das funções gaussianas, devido ao sinal de pouca intensidade, não permitiram avaliar com clareza estes parâmetros.

A Figura 5.11 mostra o comportamento dos centros das bandas de algumas regiões da molécula de Glicina em função da variação de pH. É possível observar que as ligações envolvidas tanto com a cadeia principal, $\text{C}_\alpha\text{-C}$ e N-C_α , bem como as relacionadas com a cadeia lateral, deformações do C-H, variam significativamente com o aumento ou diminuição do pH da solução aquosa de Glicina, possivelmente pelo fato de ser um aminoácido de cadeia lateral curta os modos de vibração acabam sendo afetados pela adição ou subtração do íon H^+ . Neste estudo, nota-se que a região da molécula menos afetado pelos processos de protonação e desprotonação é o grupo carboxílico, e que a região da ligação C-C_α é o qual mais sofre variação.

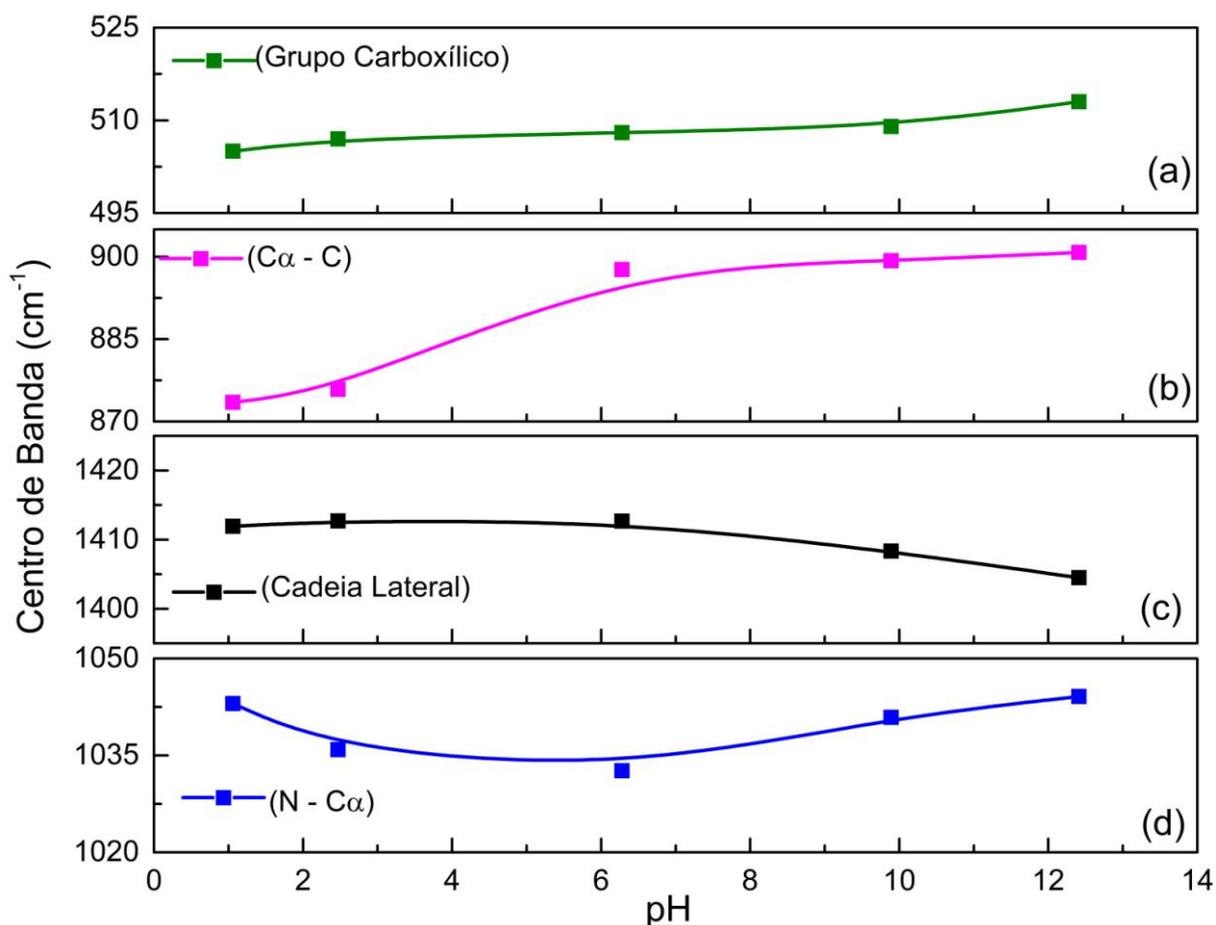


Figura 5. 11. Posição dos centros das bandas em função da variação de pH: (a) 507cm^{-1} (referente ao grupo carboxílico), (b) 897cm^{-1} (estiramento $\text{C}_\alpha\text{-C}$), (c) 1412cm^{-1} (deformação da cadeia lateral) e (d) 1032cm^{-1} (estiramento $\text{N}-\text{C}_\alpha$). As posições dos centros na figura são referentes à solução de Glicina em pH 6,28 (forma neutra).

Hernández e colaboradores [50] realizaram simulações com relação aos ângulos de torções Ψ e ϕ nos quais poderiam formar conformadores⁸ de acordo com o pH do meio, assim avaliou as três estruturas químicas da Glicina: Gly (0) forma neutra, Gly (+1) forma catiônica e Gly (-1) forma aniônica.

A Figura 5.12 mostra os diagramas obtidos pelos autores [50], para as três espécies no qual o eixo vertical indica as torções do ângulo Ψ ($+180^\circ$ a -180°) e o eixo horizontal as torções do ângulo ϕ ($+180^\circ$ a -180°). Os cálculos foram realizados utilizando DFT, nos quais foi variada a energia relativa (ΔE) de cada *cluster* para cada espécie em função dos ângulos conformacionais. Cada energia ΔE possui um par de ângulos Ψ e ϕ , maiores detalhes sobre o método computacional encontram-se na referência [4].

⁸ Conformadores: Um conformador é um isômero de uma molécula que difere de outro isômero pela rotação da ligação simples na molécula [70].

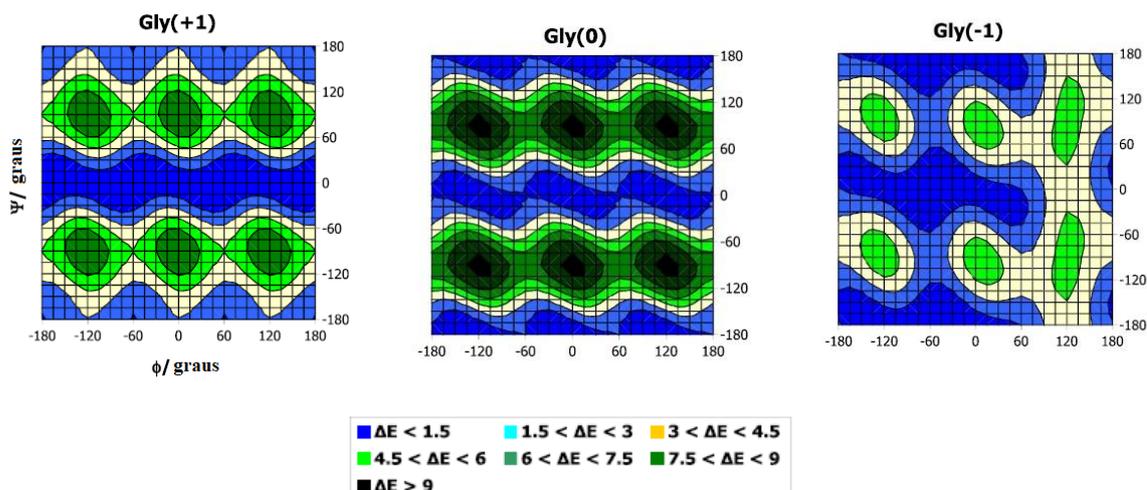


Figura 5. 12. Diagrama da distribuição de energia das espécies químicas da Glicina. Adaptado de [4].

Diagramas similares como os da Figura 5.9 são conhecidos como diagramas de Ramachadran, que são utilizados para visualizar todas as combinações possíveis de ângulos Ψ e φ nos aminoácidos de um polipeptídeo, e que contribuem para o estudo da conformação das estruturas das proteínas, neste tipo de diagrama costuma-se indicar as regiões das conformações protéicas [26].

Na Figura 5.12 a área com menor energia ΔE indica as torções que possibilitam formar conformadores mais estáveis, e o aumento da energia ΔE indica formação de conformadores menos estáveis. Podemos observar que as energias são praticamente as mesmas para as três formas, porém as formas Gly (0) e Gly (+1) têm mais torções permitidas, menor energia, que as espécies Gly (-1), sendo esta última limitada em φ de -180° a 60° e as demais podendo variar de -180° a 180° . No processo de adicionar ácido ou base à solução aquosa neutra de Glicina os modos vibracionais sofrem mudanças, pois houve mudança na liberdade de torção dos ângulos Ψ e φ correlacionadas às ligações da cadeia principal da Glicina, ou seja, as alterações observadas nas bandas Raman não são necessariamente restritos as regiões nas quais ocorrem as alterações na molécula.

Além das mudanças com a conformação da molécula de Glicina em suas três espécies químicas, sua forma cristalina pode ser alterada com a variação de pH, isto porque a Glicina possui polimorfismo estrutural, podendo se ordenar em estruturas chamadas α -Gly, β -Gly e γ -Gly, além de mais duas estruturas δ e ϵ Gly que podem ser obtidas por meio de variação de pressão [71]. Neste viés, realizamos o crescimento de cristais de Glicina, pelo método de evaporação lenta, em meio neutro, ácido e básico, os resultados serão discutidos a seguir.

A concentração da solução para análise foi definida em 3Mol/L, inicialmente pela

necessidade de uma solução com concentração maior que 0,05Mol/L, para uma melhor visualização das bandas pertencentes ao aminoácido, e posteriormente pelo interesse em crescimento de cristais, a algumas técnicas que pressupõe que é possível obter cristais de Glicina por evaporação lenta de uma solução saturada do aminoácido. Desta forma, além de analisar se observaríamos numa solução concentrada os mesmos efeitos com a variação de pH observados em uma solução com concentração baixa, também preparamos algumas soluções saturadas de Glicina em valores de pH diferentes para observar se obteríamos cristais crescidos a partir dessas soluções. Este foi um ensaio que ocorreu em paralelo com a análise das alterações das linhas Raman em diferentes pH.

5.4 CRESCIMENTO DE CRISTAL DE GLICINA EM DIFERENTES VALORES DE pH

Como visto em capítulos anteriores pesquisas vem sendo desenvolvidas a respeito do crescimento de cristais de aminoácido Glicina, devido à grande gama de aplicabilidade do mesmo, principalmente, devido ao seu polimorfismo estrutural, que ocorre mediante a variação de temperatura, pressão, pH, entre outros fatores externos. Este polimorfismo proporciona características ópticas não lineares de interesse para as áreas da fotônica e optoeletrônica [29, 72]. Existem várias técnicas que são aplicadas para o crescimento e cada vez mais as técnicas são aperfeiçoadas de forma a obter diferentes configurações estruturais; por exemplo, com a adição dopantes é possível alterar a estrutura cristalina [29]. Essas alterações têm como objetivo modificar condições específicas, como temperatura de fusão ou transparência em determinada região do espectro para um melhor aproveitamento do material [25]. Além disso, a característica polimórfica dos aminoácidos tem sido explorada no campo da Medicina, uma vez que as proteínas são formadas por diferentes sequências de aminoácidos que conferem suas funcionalidades biológicas. Desta forma mudanças nas estruturas dos aminoácidos podem causar interrupções de interações hidrofóbicas, ou mudança de conformações em estruturas protéicas, entre outras modificações que podem resultar em diferentes fenótipos, comprometendo o desempenho das atividades biológicas do corpo [73,74].

O crescimento de qualquer cristal depende de alcançar um estado de supersaturação, um estado termodinamicamente instável, no qual pode-se desenvolver uma fase amorfa ou cristalina quando o sistema retorna ao equilíbrio. O estado de supersaturação pode ser obtido por evaporação lenta do solvente, ou por variação de parâmetros externos como pH e

temperatura. Além disso, no processo de crescimento de cristais em solução aquosa, o soluto envolvido deve apresentar boa solubilidade na solução, pois um fator importante é a dissolução dos cristais que estão se formando devido ao movimento térmico das partículas dissolvidas na solução ao seu redor. Outro ponto importante no crescimento de cristais, é que se tenha uma distribuição ordenada das partículas, de maneira a se obter máximas ligações químicas. Atingido o estado de supersaturação, a cristalização depende de duas fases, inicialmente a nucleação na qual se formam os primeiros agregados ordenados e em seguida o crescimento da fase sólida. O crescimento de um cristal é um processo dinâmico que envolve a troca recíproca entre átomo, moléculas e íons com a fase de origem, passando por um processo de difusão das moléculas para superfície de crescimento e a incorporação na rede cristalina [58, 75, 83].

A técnica adotada para o crescimento de cristais de Glicina, neste trabalho, foi a evaporação lenta do solvente [75], obtendo cristais em pH neutro pH 6,36 e em valores de pH extremos, próximos dos valores de pK_1 e pK_2 do grupo carboxila e amina, em pH=2,40 e pH=9,80, respectivamente. Para alterar o valor de pH das soluções utilizadas para o crescimento, foram utilizados os mesmos reagentes (HCl e NaOH com 6N) adotados para o estudo de variação de pH em solução aquosa do aminoácido Glicina.

Para o pH neutro não houve qualquer dificuldade de crescimento: já com algumas horas foi visível a formação de alguns cristais, que com o tempo aumentaram de tamanho e adquiriram aspecto opaco. Já para os valores próximos dos pK_1 e pK_2 , houve uma maior dificuldade para se observar a formação cristais de Glicina. Neste caso, a solução ácida e básica foram perturbadas, inserindo um pequeno cristal da própria Glicina comercial, chamado de semente, essa técnica por vezes é designada como *seeding* [75].

Desta forma sementes de Glicina foram utilizadas nas soluções em pH 2,40 e 9,80 próximos aos valores de pK_1 e pK_2 da Glicina. Todas as soluções utilizadas de base possuíam uma concentração de 3,33Mol/L que é a concentração do aminoácido em seu limite de solubilização, alterando o pH com HCl e NaOH, ambos os reagentes com concentração de 6N. Alguns trabalhos utilizam o método *seeding* associado à variação de temperatura, devido ao fato de que este fator favorece a solubilização. Entretanto, no presente trabalho o único fator alterado foi os valores de pH, uma vez que processos de variação de temperatura poderiam desencadear outros processos não pertinentes ao objetivo do estudo que é avaliar as alterações na molécula de Glicina em função da variação de pH.

Para a avaliação dos cristais de Glicina crescidos em meios neutro, ácido e básico foram

utilizadas as técnicas de espectroscopia Raman e DRX. O enfoque deste trabalho é utilizar a espectroscopia Raman para estudar as mudanças moleculares na Glicina mediante a variação de pH, porém na literatura correlacionada ao crescimento de cristais outros estudos são desenvolvidos como a solubilidade em função da temperatura e mudanças na estrutura cristalina, sendo assim complementamos as análises de espectroscopia Raman com a técnica de DRX nos cristais crescidos, podendo assim avaliar a vizinhança das moléculas de Glicina dentro de uma célula unitária.

A Figura 5.13 apresenta os espectros Raman do aminoácido Glicina crescida por evaporação lenta, em diferentes valores de pH.

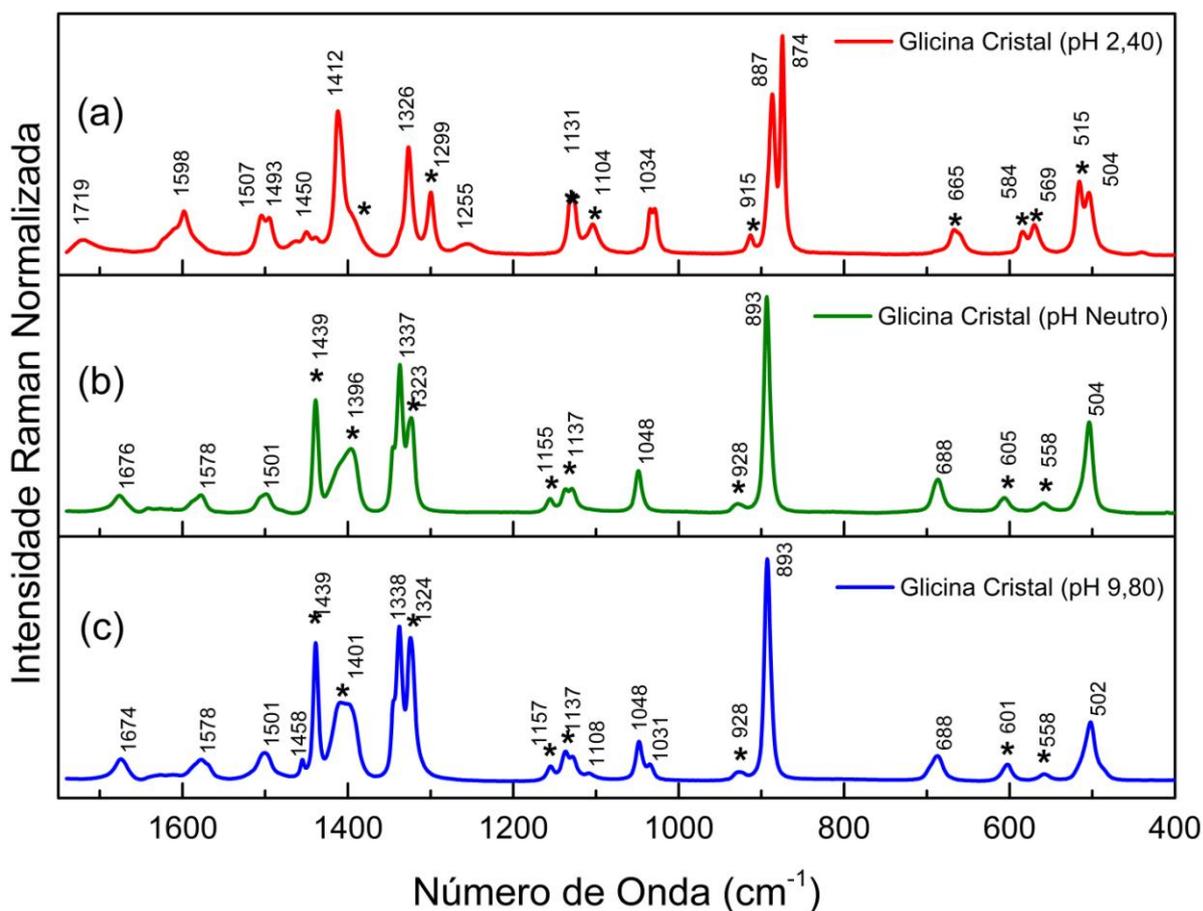


Figura 5. 13. Espectros Raman dos cristais crescidos em diferentes valores de pH (a) Cristal Glicina em pH 2,40 (b) Cristal Glicina em pH Neutro (c) Cristal Glicina em pH 9,80. (*) Bandas Raman que foram observadas somente nos cristais, indicando que o processo de crescimento nos três meios atribuiu características espectrais diferentes das soluções com valores de pH neutro, ácido e básico.

É possível identificar pelos espectros obtidos na Figura 5.13, que os cristais formados mantiveram alguns dos modos vibracionais que foram observados nas soluções neutra, ácida e

básica (Figura 5.7), em valores de pH próximos dos valores de pK_a da Glicina. A exemplo disso pode-se citar duas bandas 887 e 874cm^{-1} associadas à ligação entre C_α -C no processo de protonação do aminoácido Glicina para o pH ácido, sendo o pico em 874cm^{-1} devido à ligação do H^+ no grupo COO^- . Nota-se, tal como para as solução ácida ($pH \sim pK_1$) que para o cristal crescido em meio ácido coexistem as duas espécies de Glicina a protonada e a neutra representada pelo pico em 887cm^{-1} . Sem a contribuição da água, pode-se notar a banda em $\sim 1720\text{cm}^{-1}$ no cristal crescido em meio ácido; esta banda é atribuída ao estiramento $C=O$, ligação química decorrente do processo de protonação.

As medidas nos cristais permitiram a observação das bandas em ~ 1676 , 1580 e 1590cm^{-1} atribuídas na literatura [66] para estiramento assimétrico de $-COO^-$ e deformação do NH_3^+ e NH_2^+ , respectivamente, não observadas nas soluções, possivelmente decorrente das concentrações das soluções de Glicina e dos reagentes utilizados.

Pode-se notar que as bandas pertencentes aos cristais ocorrem nos mesmo números de onda, na maioria dos casos, nos três meios, exceto para as bandas centradas em 1439cm^{-1} observadas nos cristais que cresceram nas soluções neutra e básica. Para os cristais formados em solução ácida as bandas diferenciadas com relação aos demais cristais ocorrem entre $700 - 400\text{cm}^{-1}$.

As regiões espectrais nas quais as bandas Raman dos cristais crescidos diferem-se das soluções de pH diferentes correspondem às deformações de CH_3 $1470 - 1170\text{cm}^{-1}$, entre $950 - 900\text{cm}^{-1}$ referentes às deformações de $-CN$ e $700 - 400\text{cm}^{-1}$ atribuídas às deformações de $(-CO)$ [4,66,83]. Nota-se que há semelhança nos espectros dos cristais crescidos em meio neutro e básico, indicando que o processo de crescimento adotado sofre maior influência quando o reagente ácido, o HCl, é adicionado à solução de Glicina.

Diante da dificuldade de avaliar as novas bandas Raman dos cristais, foi realizada análise complementar por meio da DRX. Tal técnica permite avaliar a vizinhança de uma molécula, ou seja, a célula unitária de cada um dos cristais de Glicina fornecendo informações a respeito das estruturas cristalinas. A análise dos difratogramas de DRX neste trabalho foi tratada de maneira superficial, somente como um estudo complementar à técnica de espectroscopia Raman.

A Figura 5.14 mostra os difratogramas obtidos para os cristais crescidos nos meios neutro, básico e ácido, em temperatura ambiente (21°C). Para as medidas os cristais foram macerados de forma homogênea, assim minimizando a contribuição de direção preferencial que cada um dos cristais poderia exibir.

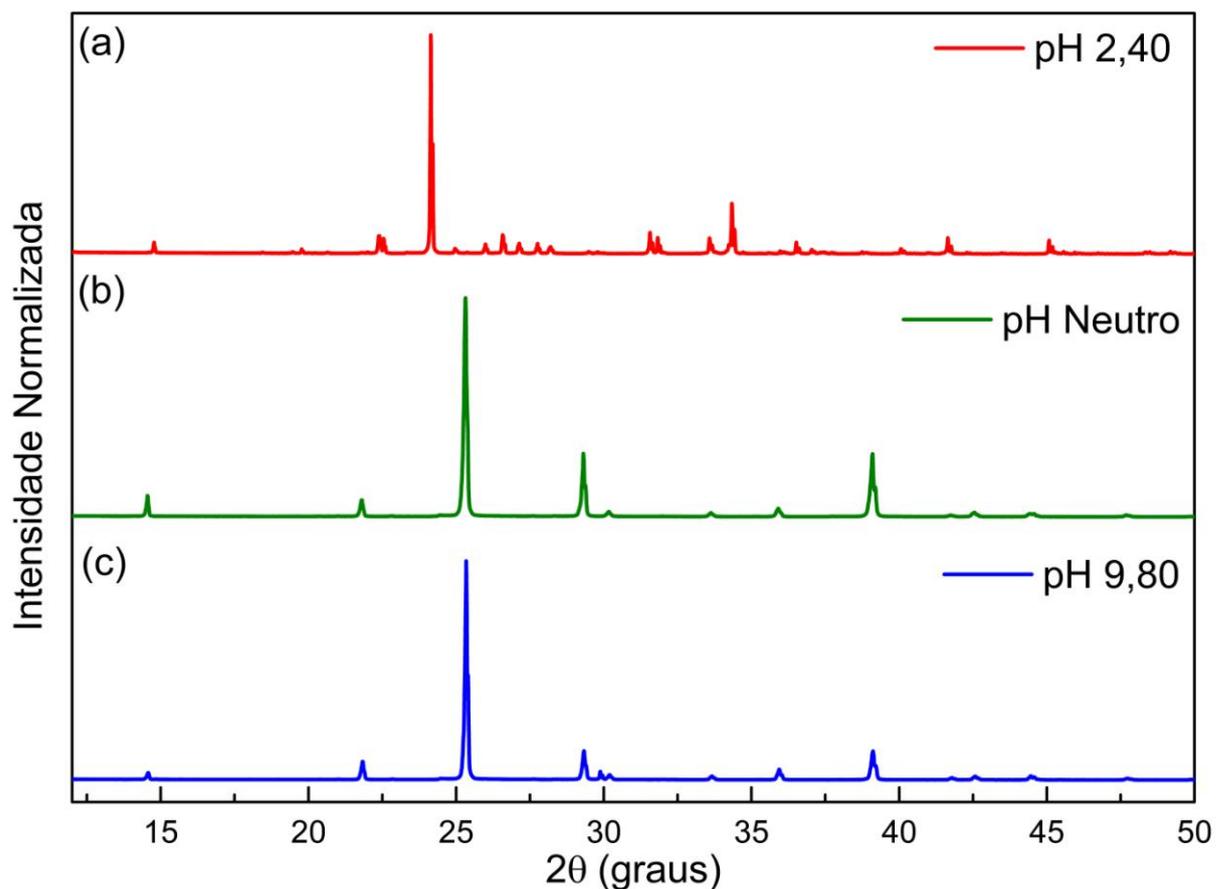


Figura 5. 14. Difratogramas dos cristais de Glicina crescidos em pH (a) básico (2,40), (b) neutro (6,36) e (c) ácido (9,80). As intensidades foram normalizadas para fins de melhor visualização.

Tal como nos espectros Raman dos cristais, é possível observar uma semelhança nos difratogramas dos cristais crescidos em meio básico e neutro, mostrando que além de um arranjo molecular similar, ainda exibem estruturas cristalinas semelhantes.

Como visto em capítulos anteriores, a Glicina possui três configurações em estado sólido, sendo elas α , β e γ na qual a principal diferença entre as três é o ângulo entre as moléculas em relação ao carbono α . De modo geral, a mudança polimórfica deste aminoácido é estudada a partir da variação de pressão ou temperatura exercida sobre o cristal [71], inclusive por crescimento de cristais em função da variação de pH [34]. É relatado na literatura que o crescimento em soluções de pH neutro ocorre, em sua maioria, com cristais de Glicina na forma α , sendo as formas β e γ obtidas ao alterar o pH. Contudo a forma γ é a forma considerada mais estável entre as três (com maior ocorrência em pH ácido) e a forma β tem maior ocorrência em pH básico. A forma na qual ocorre a cristalização também depende do valor da concentração molar, da solução de Glicina e dos reagentes utilizados para a

crystalização [34].

A Figura 5.15 mostra os difratogramas para as estruturas polimórficas da Glicina, α (α -Gly), β (β -Gly) e γ (γ -Gly) obtidos por meio do programa Vesta [76].

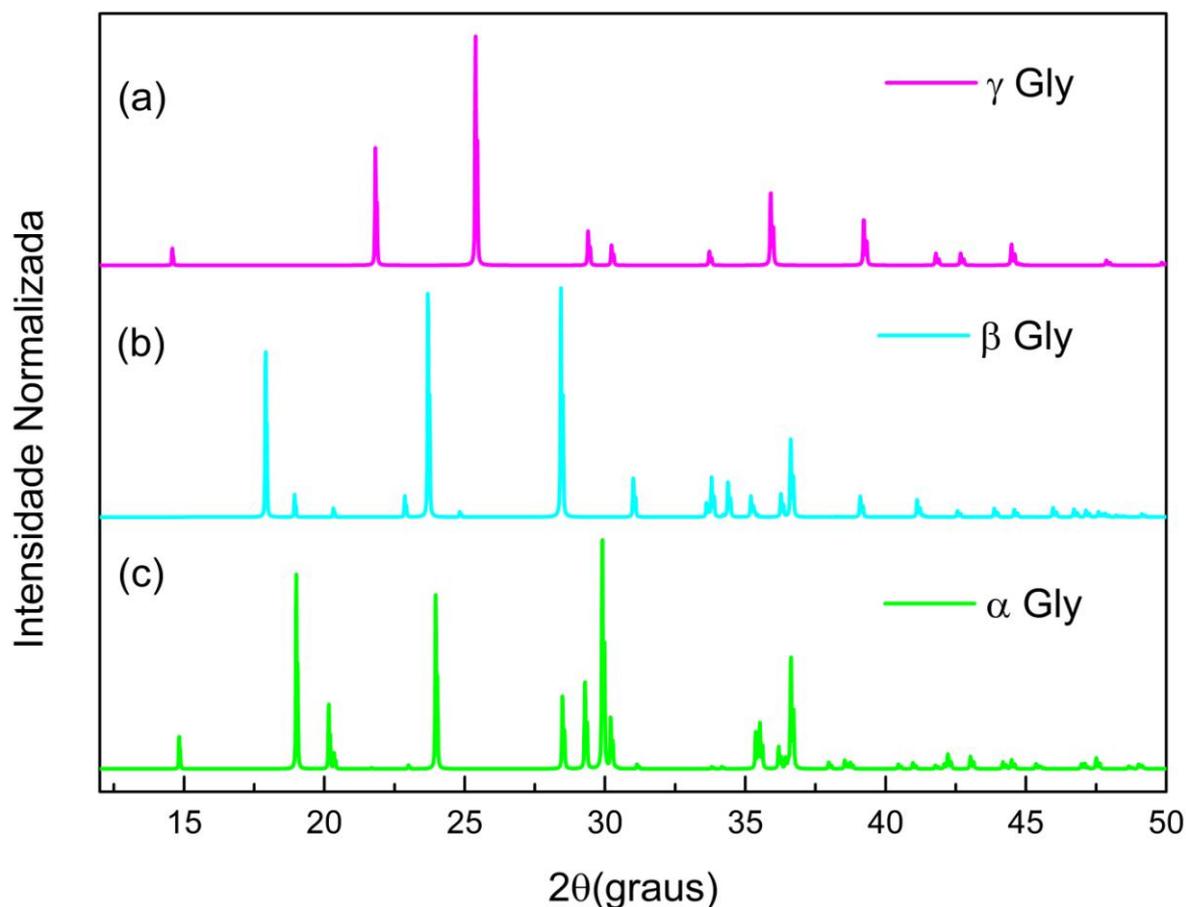


Figura 5. 15. Difratogramas obtidos por meio do programa Vesta [76] utilizando os parâmetros de rede contidos nos arquivos de informações cristalográficas (*.cif) obtidos das referências [77], [78] e [79] para as estruturas polimórficas da Glicina (a) γ -Gly, (b) β -Gly e (c) α -Gly, respectivamente.

A Tabela 5.3 apresenta algumas informações sobre as estruturas polimórficas da Glicina, como grupo espacial e parâmetros da estrutura. Esses dados foram obtidos em arquivos de informações cristalográficas (*.cif) obtidos das referências [77], [78] e [79] para as estruturas γ -Gly, β -Gly e α -Gly, respectivamente.

Tabela 5. 3. Dados cristalográficos das formas polimórficas da Glicina.

	α -Gly [79]	β -Gly [78]	γ -Gly [77]
Grupo espacial	$P_{21/n}$	P_{21}	$P3_1$
Sistema de cristalização	Monoclínico	Monoclínico	Trigonal
a (Å)	5,09930(3)	5,0938(11)	7,011(3)
b (Å)	11,94160(6)	6,274(2)	7,011
c(Å)	5,46080(3)	5,3847(12)	5,4843(3)
V (Å ³)	308,78(3)	158,18(8)	233,47(3)
α (°)	90	90	90
β (°)	111,7840(2)	113,19(2)	90
γ (°)	90	90	120
Z	1	2	3
a, b e c: eixos cristalográficos; V: volume da célula unitária; α , β e γ : ângulos entre os eixos cristalográficos; Z: unidades de moléculas na célula unitária.			

As três formas polimórficas citadas da Glicina contêm moléculas na forma neutra ($^+H_3NCH_2COO^-$). As estruturas α -Gly e β -Gly cristalizam em estrutura centrossimétrica, enquanto que a forma γ não cristaliza no centrossimétrico, pertencendo ao grupo espacial $P3_1$, que é exatamente a característica que torna esse aminoácido um candidato em potencial para aplicações piezoelétricas e em materiais não ativos opticamente. O cristal γ mostra essa característica piezoelétrica marcada ao longo do eixo c. Em temperatura ambiente, a Glicina é a forma termodinamicamente mais estável [71].

A Figura 5.16 apresenta o difratograma da amostra de Glicina comercial, utilizada para a preparação das soluções utilizadas como solução de partida para o crescimento dos cristais comparada com o arquivo para a forma α da Glicina viabilizado pelo PDF: 032-1702, obtido

com um programa de análise de dados de DRX. Nota-se que a Glicina comercial utilizada em nossos estudos tem majoritariamente a fase α da Glicina.

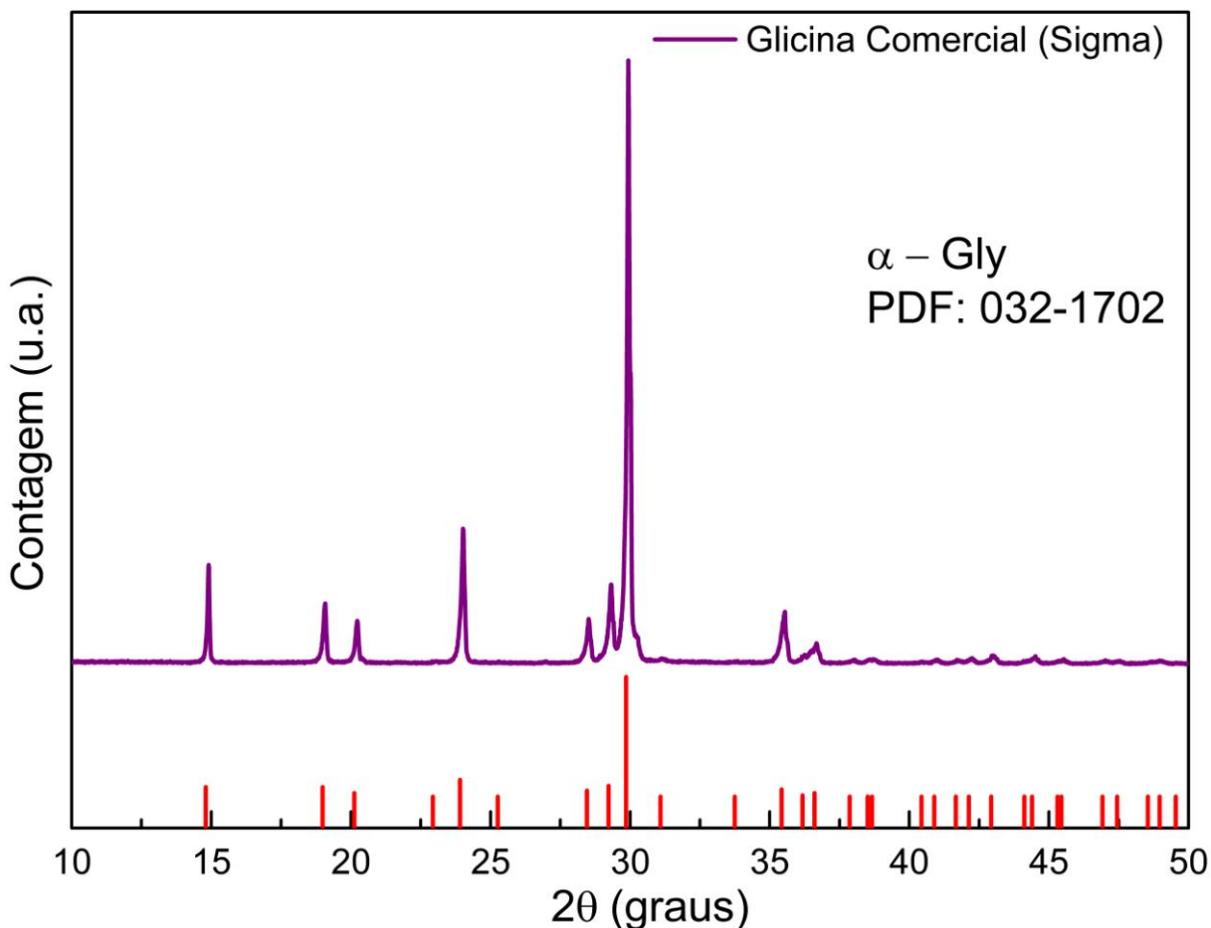


Figura 5. 16. Difratogramas dos cristais de Glicina comercial comparado com as informações cristalográficas obtidas por meio de um programa de análise de dados de DRX com a ficha cristalográfica (barras em vermelho) PDF 032-1702 [71].

Sabendo das estruturas polimórficas da Glicina que podem ser originadas no crescimento de cristais em meios de diferentes valores de pH, comparamos os difratogramas calculados com os obtidos para os cristais formados nas soluções de pH neutro, 2,40 e 9,80. A partir destes resultados observamos que os cristais crescidos nos meios neutro e básico exibem difratogramas majoritariamente da forma γ -Gly, conforme mostra a Figura 5.17.

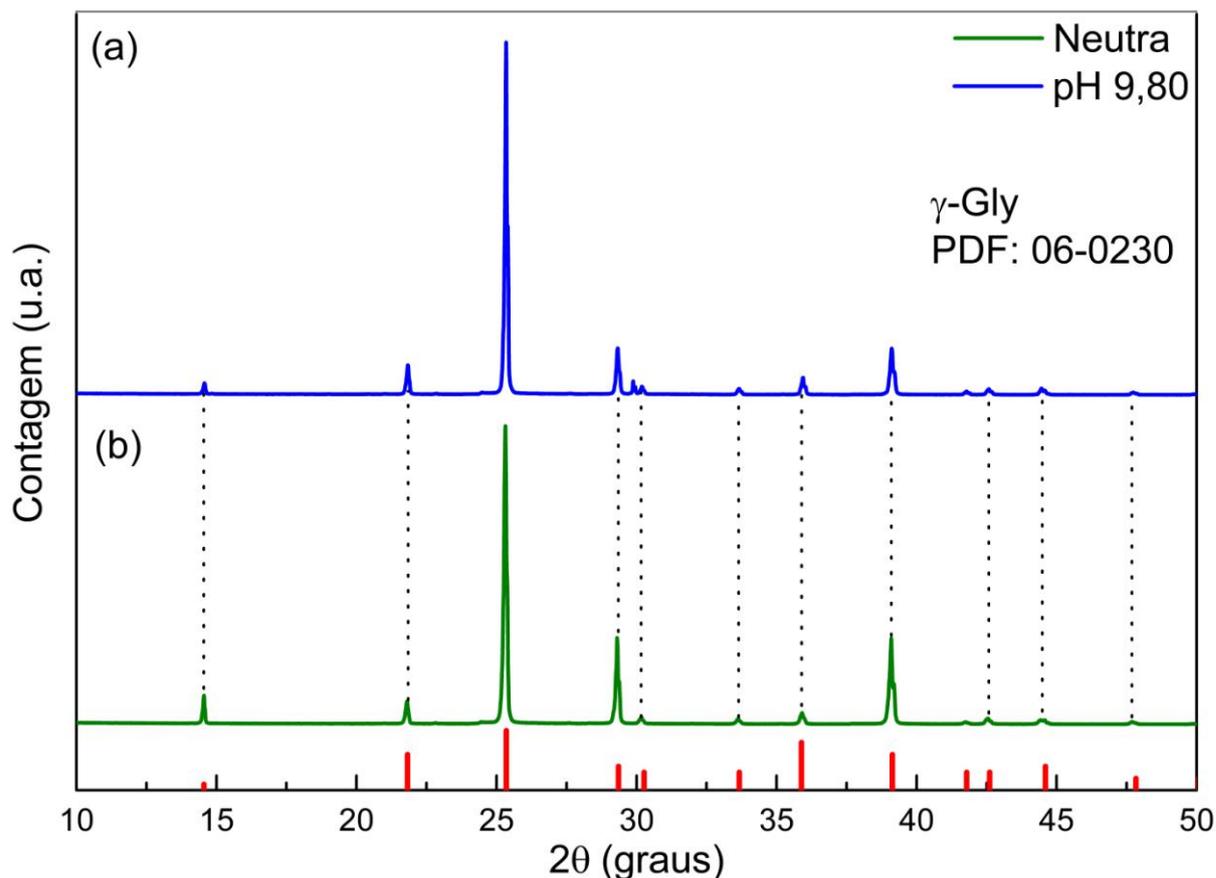


Figura 5. 17. Difratogramas dos cristais de Glicina: (a) crescido em meio de pH = 9,80, (b) crescido em pH neutro obtido por meio de um programa de análise de dados de DRX com a ficha cristalográfica PDF 06-0230 [68] (barras em vermelho) e do arquivo das informações cristalográficas para a γ -Gly [77].

Como a forma de partida do cristal de Glicina para o preparo das soluções para crescimento tenha sido a forma α , preferencialmente esta seria a forma predominante obtida em solução neutra. No entanto alguns fatores podem influenciar na forma cristalina obtida, mesmo em pH neutro, como por exemplo, o valor de concentração adotados para as soluções bases, que acabam por modificar as probabilidades de se obter um ou outra forma. O efeito das espécies carregadas pode interferir na formação predominante da forma α na solução neutra de modo que a diminuição da frequência de formação da forma α pode resultar no crescimento em massa da forma γ , uma vez que o crescimento dos cristais nucleados influenciam um no crescimento um do outro [34].

A Figura 5.18 ilustra a configuração da célula unitária para cada uma das formas polimórficas da Glicina citadas anteriormente. Estas estruturas foram geradas no programa Vesta, utilizando os arquivos com as informações cristalográficas mencionadas anteriormente.

Yu e colaboradores [82], em seu estudo sobre a ação da técnica de *spray drying* com soluções aquosas de Glicina mediante a variação de pH obteve a formações de cristais com as formas polimórficas α -Gly e γ -Gly, e também de sais de Glicina-HCl e diGlicina-HCl, cujas fórmulas químicas são $^+H_3NCH_2CO_2H.Cl^-$ e $^+H_3NCH_2CO_2^- \cdot ^+H_3NCH_2CO_2H.Cl^-$.

Comparando o difratograma obtido para o cristal crescido em pH = 2,40, nota-se que há grande semelhança com o difratograma da diGlicina-HCl, Figura 5.19. Yu e colaboradores descrevem que a cristalização da diGlicina-HCl indica que a solução perdeu 50% de HCl na sua formação, sendo assim, a espécie protonada da Glicina não é menor que a quantidade de espécie neutra. Ainda, por meio de imagens com a microscopia de varredura eletrônica, mostra que os cristais crescidos no meio ácido, em pH < pK₁ carboxílico (~2,40) apresentaram menos aglomerados, indicando cristais de melhor qualidade, uma vez que possuem somente a cristalização da diGlicina-HCl.

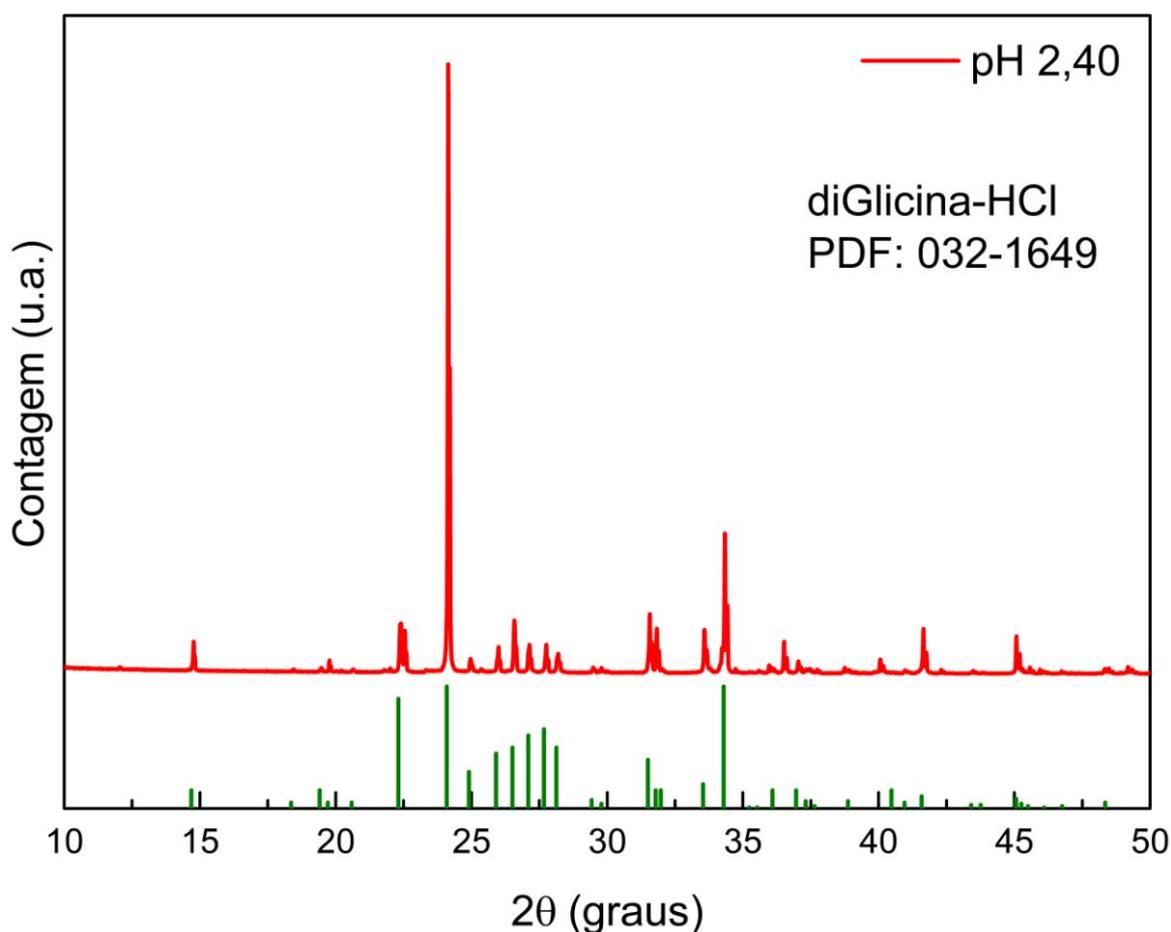


Figura 5. 19. Difratograma do cristal de Glicina crescido em pH = 2,40 e do cristal de diGlicina-HCl obtido por meio de um programa de análise de dados de DRX com a ficha cristalográfica PDF 32-1649 (barras em verde)

[82].

Deste modo, com as medidas por DRX, podemos mostrar neste trabalho que os meios de solução aquosa de Glicina a 3Mol/L (pH neutro) solubilizada em solventes ácido e básico até atingirem valores próximos ao pK_1 e pK_2 da Glicina apresentaram a formação de cristais, com uma forma polimórfica, γ -Gly e a formação de um sal de diGlicina-HCl. A técnica de DRX mostrou que mudanças moleculares observadas pela espectroscopia Raman, nas regiões da cadeia principal e lateral, também causam alteração no sistema cristalino da Glicina quando a mesma é submetida a variações de pH.

A interação das moléculas de Glicina com as moléculas de água em suas vizinhanças mostrou tendência de afinidade com os terminais carregados do aminoácido, ou seja, COO^- e NH_3^+ , por meio de ligações dos átomos de H^+ , tanto do aminoácido como da água, podendo ocorrer ligações entre as próprias moléculas de água, formando dímeros ou trímeros com a cadeia principal do aminoácido. Além disso, no estudo citado foram calculadas 5 moléculas na vizinhança de cada molécula de Glicina, por meio de uma construção de uma rede aptos a ligações de H^+ , com sítios tanto de doadores como receptores, para a Glicina em sua forma neutra, protonada e desprotonada [4].

Conclusão e Perspectivas Futuras

O objetivo principal deste trabalho foi reunir dados vibracionais por meio da espectroscopia Raman na região de 290 a 1800 cm^{-1} , com o intuito de observar as alterações sofridas nos modos vibracionais ao ocorrer a protonação e a desprotonação da molécula do aminoácido Glicina em solução aquosa mediante a variação de pH, desde ácido até o básico passando pelas duas zonas tamponantes, às quais delimitam os valores de pH para protonação e desprotonação.

Por meio de titulação da solução aquosa de Glicina, obtivemos valores de pI e pK_a para as duas concentrações (0,05Mol/L e 3Mol/L) utilizadas e estas apresentaram valores diferentes dos esperados segundo a literatura, resultado do processo de titulação utilizado neste, o qual partiu da solução em pH neutro de Glicina e ora foi adicionado reagente ácido e ora básico, a fim de se atingir os extremos. Apesar dos valores de pK_1 e pK_2 e pI estarem um pouco deslocados com relação aos valores da literatura, foi possível observar, por meio do comportamento das bandas Raman, que os processos de protonação e desprotonação da molécula da Glicina ocorriam nos valores de pK_1 e pK_2 encontrados neste trabalho, e que para $\text{pH} < \text{pK}_1$ houve a predominância das espécies catiônicas e para $\text{pH} > \text{pK}_2$ das espécies aniônicas. Além disso, com a análise das bandas observou-se que por mais que a adição e remoção do íon H^+ ocorressem nos grupos funcionais COO^- e NH_3^+ , respectivamente, toda a molécula, tanto a cadeia lateral quanto a principal sofreram mudanças espectrais. Principalmente com relação às torções permitidas no diagrama de Ramachandran para a Glicina em pH neutro, que se tornaram mais restritas em pH básico.

Paralelamente ao estudo da solução aquosa de Glicina em função do pH, foram crescidos cristais, por evaporação lenta de solvente, do aminoácido em pH neutro, ácido ($\text{pH} \sim \text{pK}_1$ carboxílico) e básico ($\text{pH} \sim \text{pK}_2$ amino) e analisados pela espectroscopia Raman.

Notou-se que os cristais crescidos em meio neutro e básico possuíam espectros semelhantes, já os crescidos em ácido apresentavam características espectrais diferentes, permanecendo algumas bandas das espécies químicas (aniônica ou catiônica) encontradas nas soluções. Por possuir estrutura cristalina bem definida, foram realizadas medidas de DRX, para identificação das fases cristalinas formadas devido à mudança de pH, pois a Glicina nestas condições apresenta polimorfismo. Assim com a DRX foi possível identificar o polimorfismo nos cristais de Glicina, que quando crescido em meio neutro ou básico apresentaram a fase cristalina γ -Gly e em meio ácido a formação do sal diGlicina-HCl.

Portanto a espectroscopia Raman, demonstrou-se eficiente para fornecer informações sobre as alterações das vibrações moleculares, bem como as mudanças das estruturas do aminoácido Glicina com variação de pH das soluções e dos cristais crescidos, respectivamente. E a técnica de DRX mostrou que mudanças moleculares observadas pela espectroscopia Raman, nas regiões da cadeia principal e lateral, dos cristais crescidos também causam alteração no sistema cristalino da Glicina quando a mesma é submetida a variações de pH.

Futuras pesquisas devem ser efetuadas para investigar de forma mais aprofundada por difratometria de raios-X, assim como, um estudo teórico de simetria de grupos relacionado aos modos vibracionais de rede da estrutura cristalina, nos cristais obtidos por crescimento em diferentes valores de pH, podendo ainda alterar, por exemplo, a concentração da solução base de modo a investigar qual a influência da concentração em diferentes valores de pH, nas formas polimórficas obtidas para a Glicina. Outro ponto importante a ser explorado são os efeitos de titulação devido à concentração tanto da solução de Glicina, quanto dos reagentes a serem utilizados.

Finalizando, espera-se que por meio das análises em soluções, seja possível correlacionar a mudança dos modos vibracionais da Glicina, quando esta estiver submetida a variações de pH aos efeitos investigados em processos biológicos. E que as análises dos cristais em diferentes pH possam contribuir em pesquisas que visam o desenvolvimento de diferentes formas polimórficas da Glicina, com o objetivo de aplicá-las tanto em áreas de materiais ópticos não-lineares orgânicos (NLO) com o intuito de utilizar em telecomunicações a sistemas ópticos, bem como em área médica com aplicação no desenvolvimento de novos medicamentos.

Referências Bibliográficas

- [1] The Biology Project. Department of Biochemistry and Molecular Biophysics. **The Chemistry of Amino Acids**. University of Arizona, 2003. Disponível em <http://www.biology.arizona.edu/biochemistry/problem_sets/aa/aa.html> Acesso em 15 Jan 2017.
- [2] Khan Academy. **Chemistry of amino acids and protein structure**. Disponível em <<https://www.khanacademy.org/test-prep/mcat/biomolecules/amino-acids-and-proteins1/a/chemistry-of-amino-acids-and-protein-structure>> Acesso em 13 Fev 2017.
- [3] Partha Sarathi, T.V. N; Nageswara Rao, G. & Vani, P. **Protonation equilibria of glycine, 1,10- phenanthroline and 2,2-bipyridyl in ethylene glycol –water mixtures, Chemical Speciation and Bioavailability** (2010).
- [4] Hernández, B; Pflüger, F; Kruglik, S.G; Ghomi, M. **Protonation–deprotonation of the glycine 24 backbone as followed by Raman scattering and multiconformational analysis**. Pag. 104–113, Chemical Physics, 2013.
- [5] Armando S. Ito, Marina Berardi e Wallance M. Pazin, **Fluorescência e aplicações em biofísica – capítulo 4 (A molécula fluorescente e suas interações com o ambiente)**. Editora Livraria da Física, 2016.
- [6] Peter Atkins e Julio de Paula, **Físico-Química Biológica – capítulo IV Espectroscopia Bioquímica**, Ed. LTC, 2006.
- [7] Nithya,N; Mahalakshmi,R; Sagadevan,S. **Growth, optical, thermal and electrical properties of nonlinear optical γ -glycine single crystal**. Pag. 421-429, Academic journals, 2015.

- [8] Trivella, A; Gaillard,T; Stote, R.H; Hellwig, P. **Far infrared spectra of solid state aliphatic amino acids in different protonation states.** Journal of Chemical Physics, American Institute of Physics, 2010.
- [9] Messer, B. M; Cappa, C. D; Smith, J. D; Wilson, K. R; Gilles, M. K; Cohen, R. C. and Saykally. R. J. **pH Dependence of the Electronic Structure of Glycine,** Journal of Chemical Physics B, 2004.
- [10] Khan Academy. **Ordens da estrutura da proteína.** Um artigo adaptado de “Proteins,” de OpenStax College, Biology Disponível em < <https://pt.khanacademy.org/science/biology/macromolecules/proteins-and-amino-acids/a/orders-of-protein-structure>> Acesso em: 15 Fev 2017.
- [11] Xia Yang, Jie Lu, Xiujuan Wang and Chi Bun Ching, **In situ monitoring of the solution-mediated polymorphic transformation of glycine: characterization of the polymorphs and observation of the transformation rate using Raman spectroscopy and Microscopy,** Journal Raman Spectroscopy, 2008.
- [12] Silva, A. M. (2015). **Propriedades estruturais, eletrônicas e vibracionais de Cristais do Ácido Aspártico (ASP): simulações computacionais no formalismo DFT.** Disponível em < <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/19799> l> Acesso em 15 Jan 2017.
- [13] Vieira, J.; Câmara,A.A; Bezerra, E. M; Costa, R. F; Sales, F. A; Freire, V.N. **Propriedades vibracionais e ópticas da cisteína em solução aquosa com variação de pH: uma comparação entre resultados teóricos e experimentais,** Pag. 309-317. In: Anais do V Encontro Regional de Química & IV Encontro Nacional de Química, 2015.
- [14] Rilleandes, A. S. **Estudo de altas pressões por espectroscopia Raman no cristal de nitrato de L-Alanina.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Maranhão. Programa de pós-graduação em ciência dos materiais/CCSST. 2016.
- [15] Gundersen, R.Y, Vaagenes, P, Breivik,T, Fonnum, F and Opstad, P.K. **Glycine —**

an important neurotransmitter and cytoprotective agent. Pag. 1108—1116, Acta Anaesthesiol Scand 2005.

[16] Guangyong Zhu, Xian Zhu, Qi Fan, Xueliang Wan - **Raman spectra of amino acids and their aqueous solutions-** Pag. 1187–1195, Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2011.

[17] Tsehai A.J. Grell, Melissa A. Pinard , Danielle Pettis, and Kadir Aslan, **Rapid crystallization of glycine using metal-assisted and microwave-accelerated evaporative crystallization: the effect of engineered surfaces and sample volume,** Pag. 125–131, Nano Biomed Engineering, 2013.

[18] McKee, T and McKee, J.R. **Biochemistry: The Molecular Basis of Life**, 5E. Disponível em <http://global.oup.com/us/companion.websites/fdscontent/uscompanion/us/static/companion.websites/9780199730841/McKee_Chapter5_Sample.pdf> Acesso em 15 Mar 2017.

[19] Nelson, David L. **Princípios de bioquímica de Lehninger** [recurso eletrônico] / David L. Nelson, Michael M. Cox; 6º edição. Porto Alegre: Artmed, 2014.

[20] Champe, Harvey & Ferrier. **Bioquímica Ilustrada**, 3º edição, Porto Alegre, Editora Artmed , 2006.

[21] Lopes, da Silva E. e Lima,Guimarães R. Química. **Isomeria (2): Estereoisômeros.** 2011. Disponível em <<http://educacao.uol.com.br/disciplinas/quimica/isomeria-2-estereoisomeros.htm?cmpid=copiaecola>> Acesso 12 Fev 2017.

[22] Gallo, A.L – **Aminoácidos e Proteínas-** Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Departamento de Ciências Biológicas. Disponível em <<http://docentes.esalq.usp.br/luagallos/aminoacidos.html>> Acesso em 23 Mar 2017.

[23] Gonçalves, F. S. **Água: Solvente Universal.** InfoEscola, aprendendo e navegando. Química. Compostos Químicos. Disponível em:<

<http://www.infoescola.com/compostos-quimicos/agua-solvente-universal/>> Acesso em 19 Set 2017.

[24] Secretaria da Educação do Paraná. Dia a dia educação. Química. **Glicina**. Galeria de imagens. Química sintética. Disponível em: <<http://www.quimica.seed.pr.gov.br/modules/galeria/detalhe.php?foto=1790&evento=5>> Acesso em 17 Set 2017.

[25] Vijayan, N; Bhagavannarayana, G; Sharma, S.N; Subhasis Das. **Synthesis, growth and structural perfection of nonlinear optical material of glycine hydrofluoride (GHF)**. Springer Science Business, 2009.

[26] Bosco, K. Ho e Robert Brasseur, **The Ramachandran plots of glycine and proline**, BMC Structural Biology, 2005.

[27] Martel, P.J. **A estrutura tridimensional das Proteínas. Aula 3**. Disponível em <<http://w3.ualg.pt/~pmartel/cadeiras/bq-mieb/aula3.pdf>> Acesso em 14 Abr 2017.

[28] Ciência dos materiais multimídia. **Capítulo 06: Sólidos não-cristalinos**. 6.10 Definições. Disponível em: <<http://www.cienciadosmateriais.org/index.php?acao=exibir&cap=11&top=47>> Acesso em 18 Set 2017.

[29] Santos, P. E. C; Meneses, C. T.; Almeida, J. M. A. **Crescimento e caracterização estrutural de cristais de aminoácidos puros e dopados com metais**. Scientia Plena, 2012.

[30] Kirubavathi, K, Selvaraju, K; Vijayan, N; Kumararaman, S. **Growth and characterization of glycine hydrobromide single crystal for nonlinear optical applications**. Pag. 2035-2042. Modern Physics Letters B, 2008.

[31] Sankar,S.;Manikandan, M.R.; GopalRam, S.D.; Mahalingam, T.; Ravi, G. **Gel growth of α and γ glycine and their characterization**. Pag. 2729–2733. Journal of Crystal Growth, 2010.

- [32] Sekar, C.; Parimaladevi, R. **Effect of silver nitrate (AgNO₃) on the growth, optical, spectral, thermal and mechanical properties of γ -glycine single crystal.** Pag. 215 – 225. Journal of Optoelectronics and Biomedical, 2009.
- [33] Cong Huy Pham, Emine Kucukbenli and Stefano de Gironcoli, **Crystal Structure Prediction of Molecular Crystals from First Principles: Are we there yet?.** Disponível em <<https://arxiv.org/abs/1605.00733>>. Acesso em 17 Set 2017.
- [34] Sung L.; Kim, K.T.; Lee, A. Y.; Myerson, A.S. **Concomitant Crystallization of Glycine on Patterned Substrates: The Effect of pH on the Polymorphic Outcome.** Crystal Growth & Design, 2008.
- [35] Srinivasan, K. **Crystal growth of α and γ glycine polymorphs and their polymorphic phase transformations.** Pag. 156–162. Journal of Crystal Growth. Journal of Crystal Growth, 2008.
- [36] Esthaku, M. P.; Ramasamy,P. **Growth of gamma glycine crystal and its characterization.** Pag. 1417–1421. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2010.
- [37] Dillip, G.R; Raghavaiah, P; Mallikarjuna, K; Madhukar Reddy, C; Bhagavannarayana, G; Ramesh Kumar, V; Deva Prasad Raju, B. **Crystal growth and characterization of γ -glycine grown from potassium fluoride for photonic applications.** Pag. 1123–1127. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2011.
- [38] Elena V. BoldyrevaI, Svetlana N. IvashevskayaI, Heidrun Sowa, Hans Ahsbahs and Hans-Peter Weber, **Effect of hydrostatic pressure on the g-polymorph of glycine 1. A polymorphic transition into a new δ -form, Z.** Pag. 50–57. Kristallography, 2005.
- [39] Mecânica industrial. **O que é um sensor piezoelétrico.** Disponível em: <<https://www.mecanicaindustrial.com.br/634-o-que-e-um-sensor-piezoelétrico/>> Acesso em 18 Set 2017.

[40] Banks, R.; Chu, C.; Sinha. **Introduction to Vibrations**. Chemistry LibreTexts. University of California. 27 January 2017. Disponível em <https://chem.libretexts.org/Core/Physical_and_Theoretical_Chemistry/Spectroscopy/Vibrational_Spectroscopy/Vibrational_Modes/Introduction_to_Vibrations> Acesso em 23 Jun 2017.

[41] Nascimento, A. **Estudo de transição de fase no aminoácido L-Leucina por espectroscopia Raman**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Maringá. Pós-Graduação em Física, 2016.

[42] Kowolik, K.; Davis. **Normal Modes**. Chemistry LibreTexts. University of California. 26 November 2016. Disponível em <https://chem.libretexts.org/Core/Physical_and_Theoretical_Chemistry/Spectroscopy/Vibrational_Spectroscopy/Vibrational_Modes/Normal_Modes> Acesso em 23 Jun 2017.

[43] Chemistry LibreTexts. **Number of vibrational modes for a molecule**. University of California. 19 July 2016. Disponível em <https://chem.libretexts.org/Core/Physical_and_Theoretical_Chemistry/Spectroscopy/Vibrational_Spectroscopy/Vibrational_Modes/Number_of_vibrational_modes_for_a_molecule> Acesso em 25 Jun 2017.

[44] Santos, A.A.J. **Determinação de parâmetros de óleos lubrificantes de motores de ciclo Otto e ciclo Diesel através da Espectroscopia no Infravermelho, métodos multivariados e cartas de controle**. Dissertação de mestrado. Universidade de Brasília Instituto de Química. Programa de Pós-Graduação em Química, 2011.

[45] Rodrigues, A.G; **Espectroscopias de infravermelho, Raman e de fotoluminescência: potencialidades e complementaridades**. Departamento de Física, Universidade Federal de São Carlos, Revista Brasileira de Ensino de Física, 2012.

[46] Alcantara, P.J. **Espectroscopia molecular**. Universidade Federal do Pará, Centro de Ciências Exatas e Naturais, Departamento de Física Curso Física Moderna II, 2002.

[47] American Chemical Society International Historic Chemical Landmarks. **The Raman Effect**. Disponível em <<http://www.acs.org/content/acs/en/education/whatischemistry/landmarks/ramaneffect.html>> Acesso em: 25 Jun 2017.

[48] L. A. de Faria, D. **Entenda o que é espectroscopia Raman**. Laboratório de Espectroscopia Molecular. Instituto de Química da USP, 2011.

[49] Baker, Matthew & Hussain, Shawn & Lovergne, Lila & Untereiner, Valérie & Hughes, Caryn & A Lukaszewski, Roman & Thieffn, Gerard & Sockalingum, Ganesh. **Developing and understanding biofluid vibrational spectroscopy: A critical review**. Chemical Society reviews, 2015.

[50] Vargas, M. V. **Fundamentos de Espectroscopia Raman**. ITESM Campus Monterrey, 13 Jun 2012. Disponível em: <<https://pt.slideshare.net/marcelovidea1/espectroscopa-raman/16>> Acesso em 10 set 2017.

[51] MSE209-3 Home. **Chapter 3. Structure of Crystals**. - Spring 2004. Disponível em <<http://www.virginia.edu/bohr/mse209/home.htm>> Acesso em 02 Jul 2017.

[52] Charles Kittel, **Introdução à Física do Estado Sólido**, Editora LTC, 2006.

[53] Laboratório de Material Didático Multimídia. **Capítulo 03 - Estrutura Cristalina**. Laboratório de Material Didático (LMDM) do Centro Tecnológico de Minas Gerais (CETEC) 2005. Disponível em <<http://www.cienciadosmateriais.org/index.php?acao=exibir&cap=6>> Acesso em 12 Jun 2017.

[54] Técnicas de Caracterização. **Capítulo 5: Algumas técnicas de caracterização de materiais**. Disponível em <<http://www.foz.unioeste.br/~lamat/downmateriais/materiaiscap5.pdf>> Acesso 03 Jul 2017.

- [55] Queiroz, A.; Kurosawa, R.; Barreto, R. **Difração de Raios-X**. Universidade de São Paulo. Instituto de Física de São Carlos. Laboratório Avançado de Física Computacional.
- [56] Becker, D. Estrutura de Sólidos Cristalinos. **Aula 3 - Estrutura Cristalina**, 2009.
- [57] Arantes, P.R.; Zanatta, G. **Curva de Neutralização do Aminoácido Glicina**. Disciplina de Bioquímica I. Curso de Farmácia. Departamento de Bioquímica UFRGS-2010.
- [58] Fujita, A. K. L. **Crescimento e Caracterização Óptica de Cristais de L-Aspargina . H₂O Pura e Irradiada**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Sergipe, 2012.
- [59] Rodrigues Junior, J.J. **Crescimento e Caracterização Óptica de Cristais de L-Treonina e L-Lisina. HCl**. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. Instituto de Física de São Carlos. Departamento de Física e Ciência dos Materiais, 1999.
- [60] Nogueira, N. P.; Rodrigues, J. J. **Crescimento e caracterização óptica e elétrica de cristais orgânicos**. Universidade Federal do Vale do São Francisco, Juazeiro, BA. Pag.26-32, Evolvere Scientia, 2013.
- [61] Ramos, Joanna Maria Teixeira de Azeredo. **Estudo espectroscópico vibracional de complexos de Ni(II) com os aminoácidos serina, glicina e ácido guanidoacético**. Dissertação de Mestrado em Química. Universidade Federal Fluminense, 2006.
- [62] Horiba. **Raman data and analysis – Raman Spectroscopy for Analysis and Monitoring** – Application Note
- [63] Baran, J. Ratajczak, H. - **Polarised vibrational studies of the α -glycine single crystal Part I. Polarised Raman spectra—the Problem of effective local Raman tensors for the glycine zwitterions-** Vibrational Spectroscopy 43 (2007) 125–139.
- [64] Erich Runge and E. K. U. Gross. **Density-Functional Theory for Time-**

Dependent Systems. Physical Review Letters, 1984.

[65] Cueva, J.C - **Introduction to Density Functional Theory**- Institut für Theoretische Festkörperphysik. Universität Karlsruhe.

[66] Sonois, V. et al. **Raman study and DFT calculations of amino acids.** NSTI-Nanotech, 2008.

[67] Raymond Chang, **Physical Chemistry for the Biosciences, capítulo 8 Ácidos e Bases**, Ed. University Science Book, 2005, 290 páginas.

[68] Sergei V Bykov, Nataliya S. Myshakina, and Sanford A. Asher, **Dependence of Glycine CH₂ Stretching Frequencies on Conformation, Ionization State, and Hydrogen Bonding**, J Phys Chem B. 2008 May 8; 112(18): 5803–5812.

[69] Socrates, G. **Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts.** Third Edition. England. Published in 2001.

[70] Helmenstine, A. M. **Conformer Definition.** Science, Tech, Math. Disponível em: < <https://www.thoughtco.com/definition-of-conformer-604949>> Acesso em 19 Set 2017.

[71] The Shodhganga. **Chapter 2: Growth of gamma glycine crystals and their characterization.** Disponível em < http://shodhganga.inflibnet.ac.in/bitstream/10603/10572/7/07_chapter%202.pdf> Acesso em 17 Jan 2017.

[72] Sugandhi, K. et al., **Effect of pH on the growth, crystalline perfection, nonlinear optical and mechanical of tris-glycine zinc chloride single crystals.** Pag. 347 -352. Optics & Laser Technology, 2013.

[73] Ruifang Cao, Yan Shi, Shuanguan Chen, Yimin Ma, Jiajun Chen, Juan Yang, Geng Chen and Tieliu Shi. **dbSAP: single amino-acid polymorphism database for protein variation detection.** Nucleic Acids Research, 2017.

- [74] Schaefer, C. Rost, B. **Predict impact of single amino acid change upon protein structure.** Schaefer and Rost BMC Genomics 2012.
- [75] Azevedo, W.F. **Cristalização de macromoléculas biológicas.** Laboratório de Sistemas Biomoleculares. Departamento de Física-Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas-UNESP, 2004.
- [76] Momma, K and Izumi, F. "**Vesta 3** for three-dimensional visualization of crystal, volumetric and morphology data," J. Appl. Crystallogr., 2011.
- [77] Kazuhiko Ishikawa, et al., **Absolute chirality of thec-polymorph of glycine: correlation of the absolute structure with the optical rotation,** Pag. 6031-6033. Chem. Commun, 2012.
- [78] Tat'yana N. Drebuscha, et al., **β -Glycine,** Acta Crystallographica Section E, Acta Cryst, 2002.
- [79] Paul Langan, P., et al., **Structural characterization of crystals of α -glycine during anomalous electrical behaviour,** Pag. 728-733. Acta Crystallographica Section B, Acta Cryst, 2002.
- [80] Gianluca Di Profio, et al., **Insights into the polymorphism of glycine: membrane crystallization in an electric Field,** Phys. Chem. Chem. Phys., 2013.
- [81] Narayana Moolya, B et al., **Hydrogen bonded nonlinear optical α -glycine: Crystal growth and characterization.** Pag. 581–586. Journal of Crystal Growth, 2005.
- [82] Lian Yu, Kingman NG, **Glycine Crystallization during Spray Drying: The pH Effect on Salt and Polymorphic Forms,** Journal of pharmaceutical sciences, 2002.
- [83] Santosh, K. et al. **Vibrational spectrum of glycine molecule,** Spectrochimica Acta Part A, 2005.