UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE FÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA

ADRIANE DO NASCIMENTO

ESTUDO DE TRANSIÇÃO DE FASE NO AMINOÁCIDO L-LEUCINA POR ESPECTROSCOPIA RAMAN

Maringá-PR
2016

ADRIANE DO NASCIMENTO

ESTUDO DE TRANSIÇÃO DE FASE NO AMINOÁCIDO L-LEUCINA POR ESPECTROSCOPIA RAMAN

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

Orientador (a): Profa. Dra. Francielle Sato

Maringá-PR

2016

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

N244e

Nascimento, Adriane do
Estudo de transição de fase no aminoácido L-Leucina por espectroscopia Raman / Adriane do Nascimento. -- Maringá, PR, 2016.
83 f. : il. col. figs. tabs

Orientadora: Profª Drª Francielle Sato.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Exatas, Departamento de Física, Programa de Pós-Graduação em Física, 2016.

1. Espectroscopia Raman. 2. Leucina. 3. Transição de fase. 4. Temperatura. I. Sato Francielle, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Exatas. Departamento de Física. Programa de Pós-Graduação em Física. III. Título.

CDD 23.ed. 535.846

MRP-003552

Dedico este trabalho com muito carinho a pessoa mais importante da minha vida, que está ao meu lado em todos os momentos me dando amor, apoio e me encorajando a cada novo desafio, a minha mãe Miriam Franchetti.

AGRADECIMENTOS

Esta Dissertação é resultado de muita dedicação, conhecimento adquirido e colaborações que não poderia deixar de agradecer:

- Agradeço primeiramente a Deus, que me permitiu alcançar mais essa etapa e que nos momentos de dificuldades me dá conforto nas minhas orações e força pra continuar.
- À minha familía, minha mãe Miriam, meu pai Mário e meu irmão Lucas, pelos cuidados, pelo apoio, suporte emocional e por acompanharem toda minha caminhada.
- Agradeço a minha orientadora Professora Doutora Francielle Sato, a quem tenho imensa admiração e respeito, pela sua amizade, exemplo profissional e como pessoa. Sua dedicação, compreensão com minhas limitações e sua confiança a mim dedicadas contribuíram grandemente na minha formação e amadurecimento.
- Ao Professor Doutor Antonio Medina Neto, a quem tenho grande estima e respeito, muito obrigada pelos ensinamentos, pela paciência, auxílios, e contribuição com este trabalho, muito obrigada.
- Ao Professor Doutor Guilherme Miranda Pereira, do Departamento de Química, pela contribuição ao realizar as medidas de calorimetria e sanar minhas dúvidas quanto a técnica, muito obrigada.
- Ao Professor Doutor Paulo Pozza, do Departamento de Zootecnia, por ceder as primeiras amostras de aminoácidos no início dos estudos deste trabalho, muito obrigada.
- Ao Fernando Enz, técnico do Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (Comcap), pela amizade adquirida durante esta pesquisa e por toda ajuda com as medidas de espectroscopia Raman em funçao de temperatura, pelos revesamentos de almoço e muitas horas de laboratório, muito obrigada.
- Aos amigos Gisele, Gutierrez, Nicolaz, Odair e Robson que além da amizade durante este período me ajudaram com os programas e tratamentos matemáticos, pelas discussões sobre as técnicas, vocês contribuiram grandemente com este trabalho.

- À Camilla, pela amizade sincera, por todos os conselhos e apoio, muito obrigada.
- Ao William agradeço por todo carinho, por todas as conversas e por me apoiar durante o período de maior dificuldade deste trabalho.
- Às minhas amigas Paula e Priscila, pela compreensão com minha ausência neste período, por todo apoio e estímulo, sua amizade é muito importante para mim.
- À todos os amigos do GEEF, obrigada pelos momentos de descontração que se fazem necessário, pela amizade e apoio.
- À todos os funcionários do DFI/PFI-UEM, e em especial à Mônica e a Keila.
- À CNPq, CAPES, FINEP e Fundação Araucária pelo apoio financeiro.
- Ao Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa e a Universidade Estadual de Maringá por toda infraestrutura disponível para a realização deste trabalho.
- Agradeço aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade de participar e pelas contribuições pessoais acerca desta dissertação.

RESUMO

Neste trabalho, foi realizado um estudo sobre as transições de fase para o aminoácido L-Leucina em função da temperatura. Para tal, utilizou-se da técnica de Espectroscopia Raman a qual permite uma análise qualitativa meticulosa a respeito dos modos vibracionais de um composto. As técnicas, Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) que fornece informações a respeito das propriedades físicas e químicas de um composto em função de uma temperatura programada e do tempo e Difratometria de Raios-X (DRX) que identifica e caracteriza estruturas de compostos cristalinos foram empregadas para estudo complementar da transição de fase observada no Raman. Após a caracterização do aminoácido L-Leucina à temperatura ambiente por espectroscopia Raman foram realizadas medidas em função de temperatura no intervalo de -60°C a 180°C e o processo reverso. Comparando-se os resultados obtidos pelos espectros Raman em função da temperatura com os termogramas e difratogramas do L-Leucina, identificou-se ocorrer mudanças nos espectros Raman dos grupos funcionais de CH, CH_3, CO_2^- e NH_3^+ aproximadamente nos mesmos intervalos de temperatura em que foram detectadas transições de fase, pelos termogramas e difratogramas, o que sugere que essas mudanças espectrais estão associadas às transições de fase nestes grupos funcionais detectadas pela espectroscopia Raman. Assim, a técnica de espectroscopia Raman além de permitir a caracterização e identificação dos modos vibracionais do L-Leucina mostrou-se eficiente na identificação de transição de fase pela análise dos espectros.

Palavras-chave: Espectroscopia Raman, L-leucina, Vibracional, Temperatura

ABSTRAC

In this study, an investigation was conducted on the phase transition for the L-Leucine amino acids, as a function of temperature. The chosen method for this evaluation was the Raman Spectroscopy, which enable an accurate qualitative analysis for the vibrational modes of a composite. Additionally, the Differential Scanning Calorimetry (DSC) and X-Ray Diffraction (XRD) techniques were used, since it can provide, respectively, information regarding the physical and chemical properties of a composite for a given temperature and time, and characterization and identification of the crystalline structure composites. After the L-Leucine amino acid characterization at room temperature using Raman Spectroscopy, measures were taken at temperature intervals ranging from -60^{o} C to 180^{o} C, for both increase and decrease of temperature. Analyzing the data obtained from the Raman spectrum with temperature variation along with the thermographs and XRD patterns of the L-Leucine, modifications were observed on the Raman spectra of the CH, CH_3, CO_2^- and NH_3^+ functional groups, with temperature intervals approximately the same as the ones observed in the phase shift, found in the thermographs and XRD patterns. This indicates that spectra modifications are related to the phase transitions in these functional groups. Therefore, the Raman Spectroscopy method in addition to enable the characterization and identification of the vibrational modes of the L-Leucine, was found effective for the identification of the phase transition by means of spectra analysis.

Palavras-chave: Raman Spectroscopy, L-leucine, Vibrational, Temperature

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1: ESTRUTURA GERAL DA CADEIA PRINCIPAL DE UM AMINOÁCIDO DE RADICAL QUALQUER. ADAPTADO DE [2]. 18
FIGURA 2.2: OS 20 AMINOÁCIDOS ENCONTRADOS NAS PROTEÍNAS, SEPARADOS POR SEUS GRUPOS R. AS FÓRMULAS ESTRUTURAIS APRESENTAM O ESTADO DE IONIZAÇÃO PREDOMINANTE EM PH 7,0. AS PARTES NÃO CIRCUNDADAS (CADEIA PRINCIPAL) SÃO COMUNS A TODOS OS AMINOÁCIDOS E AS PORÇÕES CIRCULADAS CONSTITUEM OS GRUPOS R (CADEIA LATERAL). ADAPTADO DE [16]. 20
FIGURA 2.3: CLASSIFICAÇÃO DOS CARBONOS DE ACORDO COM A IUPAC [17]. 21
FIGURA 2.4: ESQUEMA APRESENTANDO AS FORMAS DE CÁTION (PH ÁCIDO), *ZWITTERION* (PH NEUTRO) E ÂNIONS (PH BÁSICO) DOS AMINOÁCIDOS. ADAPTADO DE [14]. 22
FIGURA 2.5: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE L E D ISÔMEROS DOS AMINOÁCIDOS [13]. 23
FIGURA 2.6: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA FORMAÇÃO DE UMA LIGAÇÃO PEPTÍDICA [1]. 25
FIGURA 2.7: REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA EM HÉLICE A: (A) ESTRUTURA EM TORNO DO EIXO IMAGINÁRIO LONGITUDINAL MOSTRANDO AS LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO ENTRE AS CADEIAS POLIPEPTÍDICAS. A VOLTA COM DISTÂNCIA DE 5,4 Å É UMA UNIDADE QUE SE REPETE. (B) VISÃO TRANSVERSAL DA HÉLICE [2]. 27
FIGURA 2.8: REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA EM FOLHA B PREGUEADA: (A) COM VISTA LATERAL ENFATIZANDO O ARRANJO EM FORMA DE PREGAS COM AS CADEIAS LATERAIS DISPOSTAS PARA FORA DO PLANO DA FOLHA PREGUEADA. (B) MOSTRANDO A VISTA SUPERIOR COM A INTERAÇÃO DAS LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO COM AS CADEIAS POLIPEPTÍDICAS. AS SETAS INDICAM A EXTREMIDADE AMINOTERMINAL PARA CARBOXITERMINAL [2]. 28
FIGURA 2.9: APRESENTA OS NÍVEIS ESTRUTURAIS EM PROTEÍNAS [2]. 29
FIGURA 2.10: FIGURA ESQUEMÁTICA: (A) BASE DE TRÊS ÁTOMOS; (B) CRISTAL. A BASE DE TRÊS ÁTOMOS É POSICIONADA EM CADA PONTO DA REDE PARA FORMAR O CRISTAL [26]. 30
FIGURA 2.11: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS 14 REDES DE BRAVAIS. ADAPTADO DE [27]. 32
FIGURA 2.12: CÉLULA UNITÁRIA COM EIXOS COORDENADOS *X, Y* E *Z*, COM COMPRIMENTOS AXIAIS (*A, B* E *C*) E OS ÂNGULOS ENTRE EIXOS (*A, B* E *Γ*) [28]. 32
FIGURA 2.13: ILUSTRAÇÃO DA INDEXAÇÃO DE UM PLANO CRISTALOGRÁFICO INDICADO PELOS ÍNDICES DE MILLER PARA O PLANO (110) [20]. 33
FIGURA 2.14: MOLÉCULA DO AMINOÁCIDO L-LEUCINA COM A DISPOSIÇÃO DOS NÚMEROS DE ÁTOMOS [29]. 34
FIGURA 2.15: REPRESENTAÇÃO DA CÉLULA UNITÁRIA DO AMINOÁCIDO L-LEUCINA CONSTITUÍDA POR QUATRO MOLÉCULAS NO PLANO *AC*. 35

FIGURA 2.16: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO PARA AS DUAS CONFIGURAÇÕES DA MOLÉCULA DE L-LEUCINA, *GAUCHE 1 E TRANS*, COM VALORES DAS DISTÂNCIAS DAS LIGAÇÕES [30]. 35
FIGURA 2.17: DESCRIÇÃO DA REPRESENTAÇÃO DOS MOVIMENTOS DOS N ÁTOMOS (N=4) EM TERMOS DAS VARIAÇÕES DAS COORDENADAS ΔX, ΔY E ΔZ. FONTE: OBTIDA DE [45]. 40
FIGURA 2.18: MODOS DE VIBRAÇÕES MOLECULARES DE ESTIRAMENTO E DEFORMAÇÃO [45]. 43
FIGURA 2.19: MECANISMOS DE ESPALHAMENTO: (A) RAMAN STOKES; (B) RAYLEIGH; (C) RAMAN ANTI-STOKE. TIPOS DE ESPALHAMENTO [41]. 45
FIGURA 2.20: CURVA CARACTERÍSTICA DE DSC MOSTRANDO PICOS DE TRANSIÇÕES DE PRIMEIRA E SEGUNDA ORDEM [53]. 47
FIGURA 2.21: ESQUEMA DE UM ANALISADOR TÉRMICO DE DSC POR FLUXO DE CALOR [54]. 47
FIGURA 2.22: DIFRAÇÃO DOS FEIXES DE RAIO-X PARA UM CRISTAL [20]. 48
FIGURA 2.23: REPRESENTAÇÃO DE UM DIFRATÔMETRO DE RAIOS-X [20]. 49
FIGURA 3.1: (A) ESPECTRÔMETRO CONFOCAL SENTERRA. (B) FIGURA ESQUEMÁTICA DO SISTEMA CONFOCAL DE CAPTAÇÃO DE RADIAÇÃO [57]. 51
FIGURA 3.2: (A) CONTROLADOR DE TEMPERATURA T95, FONTE E RESERVATÓRIO DE NITROGÊNIO LÍQUIDO. (B) CÂMARA DE TEMPERATURA ACOPLADO AO MICROSCÓPIO. 51
FIGURA 4.1: ESPECTRO RAMAN GERAL DO AMINOÁCIDO L-LEUCINA (L-LEU) À TEMPERATURA AMBIENTE (21°C) NA REGIÃO DE 3200 A 80 CM^{-1}. 53
FIGURA 4.2: ESPECTRO RAMAN DO AMINOÁCIDO L-LEUCINA (L-LEU) À TEMPERATURA AMBIENTE (21°) NA REGIÃO DE 3200 A 2600 CM^{-1}. 54
FIGURA 4.3: ESPECTRO RAMAN DO AMINOÁCIDO L-LEUCINA (L-LEU) À TEMPERATURA AMBIENTE (21°) NA REGIÃO DE 1800 A 800 CM^{-1}. 55
FIGURA 4.4: ESPECTRO RAMAN DO AMINOÁCIDO L-LEUCINA (L-LEU) À TEMPERATURA AMBIENTE (21°) NA REGIÃO DE 800 A 80 CM^{-1}. 56
FIGURA 4.5: TERMOGRAMA DO AMINOÁCIDO L-LEUCINA COM VARIAÇÃO TÉRMICA DE -60 °C A 190 °C: (A) AQUECIMENTO E (B) RESFRIAMENTO. 58
FIGURA 4.6: TERMOGRAMA COM INTERVALO DE DECOMPOSIÇÃO TÉRMICA DO AMINOÁCIDO L-LEUCINA COMPREENDIDO ENTRE 281 ºC E 336 ºC. 59
FIGURA 4.7: (A) DIFRATOGRAMA DE RAIOS-X DO L-LEUCINA EM TEMPERATURA AMBIENTE (~21 °C); (B) LINHAS DE DIFRAÇÃO REFERENTES À FICHA PADRÃO JCPDS: 00-030-1779. 61
FIGURA 4.8: ESPECTROS RAMAN DO AMINOÁCIDO L-LEUCINA SOB VARIAÇÃO DE TEMPERATURA DE -60 °C A 180 °C, NA REGIÃO ESPECTRAL DE 3100- 80 CM^{-1}. 62
FIGURA 4.9: ESPECTROS RAMAN DO AMINOÁCIDO L-LEUCINA SOB VARIAÇÃO DE TEMPERATURA DE 180 °C A -60 °C, NA REGIÃO ESPECTRAL DE 3100- 80 CM^{-1}. 62
FIGURA 4.10: ESPECTROS RAMAN DO AMINOÁCIDO L-LEUCINA EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA NA REGIÃO ESPECTRAL DE 3000 - 2950 CM^{-1}: (A) AQUECIMENTO E (B) RESFRIAMENTO. 64

FIGURA 4.11: ESPECTROS RAMAN DO AMINOÁCIDO L-LEUCINA EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA NA REGIÃO ESPECTRAL DE 1575 A 150 CM^{-1} : (A, C, E, G, I, K) AQUECIMENTO DE -60 °C A 180 °C E (B, D, F, H, J, L) RESFRIAMENTO DE 180 °C A -60 °. 65
FIGURA 4.12: DIFRATOGRAMAS DO POLICRISTAL DE L-LEUCINA COM VARIAÇÃO DE TEMPERATURA DE 30 A 130 °C. EM DESTAQUE O DESLOCAMENTO DO EM 2Θ = 24° CORRESPONDENTE AO PLANO (0 0 4)..... 67
FIGURA 4.13: POSIÇÃO DOS CENTROS DAS BANDAS RAMAN E TERMOGRAMA DE DSC PARA O PROCESSO DE AQUECIMENTO DO POLICRISTAL DE L-LEUCINA PARA AS BANDAS SELECIONADAS E SUAS ATRIBUIÇÕES. 69
FIGURA 4.14: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA CÉLULA UNITÁRIA DO L-LEUCINA NO PLANO *BC*, ORIENTADO NA DIREÇÃO DO PARÂMETRO DE REDE A. 70
FIGURA 4.15: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA CÉLULA UNITÁRIA DO L-LEUCINA NO PLANO *AC*, ORIENTADO NA DIREÇÃO DO PARÂMETRO DE REDE C..... 71
FIGURA 4.16: PARÂMETROS DE REDE (A, B, C) DO L-LEUCINA EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA: (A), (B) E (C). RELAÇÃO ENTRE VOLUME DA CÉLULA UNITÁRIA E VARIAÇÃO DE TEMPERATURA: (D)..... 74

LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1: VINTE AMINOÁCIDOS COMUNS: ESSENCIAIS E NÃO ESSENCIAIS [13]. 23
TABELA 2.2: OS 7 SISTEMAS CRISTALINOS APRESENTADOS COM SEUS EIXOS E ÂNGULOS AXIAIS [24]. 31
TABELA 2.3: GRAUS DE LIBERDADE PARA MOLÉCULA MONOATÔMICA, MOLÉCULA LINEAR E MOLÉCULA NÃO-LINEAR..... 42
TABELA 4.1: ATRIBUIÇÃO DOS MODOS VIBRACIONAIS DO POLICRISTAL DE L-LEUCINA A TEMPERATURA AMBIENTE (21°). 57

LISTA DE SÍMBOLOS

ν: modo vibracional de estiramento

ν_s: modo vibracional de estiramento simétrico

ν_{as}: modo vibracional de estiramento assimétrico

δ: deformação angular

δ_s: deformação angular simétrica

δ_{as}: deformação angular assimétrica

r: deformação angular do tipo balanço (*rocking*) – deformação angular assimétrica no plano

w: deformação angular do tipo abano (*wagging*) – deformação angular assimétrica fora do plano

t: deformação angular do tipo torção (*twisting*) – deformação angular simétrica fora do plano

s: deformação angular do tipo tesoura (*scissoring*) – deformação angular simétrica no plano

SUMÁRIO

1 Introdução 15

1.1 Objetivos 17

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA 18

2.1 Considerações gerais sobre aminoácidos 18

2.2 Considerações gerais sobre peptídeos e proteínas 24

2.3 Considerações gerais sobre estrutura cristalina 30

2.4 Aminoácido L-Leucina 34

2.5 Transição de Fase em Aminoácidos 36

2.6 Espectroscopia Vibracional 39

2.6.1 Vibrações Moleculares 40

2.6.2 Espectroscopia Raman 43

2.7 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) 46

2.8 Difratometria de Raios-X (DRX) 48

3 MATERIAL E MÉTODOS 50

3.1 Espectroscopia Raman 50

3.2 DSC 52

3.3 DRX 52

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 53

4.1 Caracterização do policristal de L-Leucina em temperatura ambiente (~21ºC) por Espectroscopia Raman 53

4.2 Análise Termica DSC e DTA 58

4.3 DRX em temperatura ambiente (~21°C) 60

4.4 Espectroscopia Raman do L-Leucina em função de temperatura 61

4.5 DRX em função de temperatura 67

4.6 Análise da transição de fase do policristal de L-Leucina 68

5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS 75

6 BIBLIOGRAFIA 77

1 INTRODUÇÃO

Os aminoácidos são compostos orgânicos que quando combinados formam proteínas, que estão presentes em qualquer processo que ocorra em uma célula. Proteínas são as macromoléculas biológicas mais abundantes encontradas em um organismo [1]. Todas as proteínas são polímeros de aminoácidos construídos a partir de um mesmo conjunto de vinte aminoácidos comuns ligados por ligações moleculares covalentes formando uma sequência de resíduos. Em consequência de cada um dos vinte aminoácidos possuírem uma cadeia lateral R distinta. Sua função na proteína é mudada, já que as propriedades químicas e as conformações dependem da cadeia lateral R [2]. Diante de toda essa funcionalidade os aminoácidos e as proteínas são considerados os blocos de construção da vida [2].

Quando uma proteína é quebrada, por exemplo, durante sua ingestão em um organismo vivo, os aminoácidos resultantes são utilizados para sintetizar novas proteínas que auxiliam em funções tais como, digestão de alimentos, crescimento, reparação dos tecidos biológicos e fonte de energia para o organismo [3].

As proteínas são formadas unicamente pelos L-aminoácidos. De acordo com sua propriedade de isomeria óptica os aminoácidos podem ser classificados em L-aminoácidos (levógiro) ou D-aminoácidos (dextrógiro) por polarizarem o plano de luz incidente em sentido horário ou anti-horário, respectivamente. Os D-aminoácidos não ocorrem nos seres vivos, sendo utilizados principalmente na produção de antibióticos [4]. Transições de fase em função da temperatura são possíveis e podem alterar a isomeria óptica de um aminoácido, e consequentemente modificar sua função biológica [5].

Outro aspecto sobre a forma e função das proteínas se dá com a disposição espacial dos aminoácidos ligados que as formam. Tal disposição está correlacionada com a configuração espacial das ligações de hidrogênio, em caso de mudança nessa configuração mediante o agente externo, como variação de pressão é esperado transições de fase estruturais que mudam significativamente propriedades físicas das moléculas ou rearranjos conformacionais alterando o papel biológico da proteína [6]. Embora as reações dos aminoácidos e proteínas existentes nos organismos vivos ocorram em solução, quando em forma cristalina as ligações de hidrogênio desempenham um papel importante na estabilidade da estrutura cristalina [7]. Sendo

assim o estudo da transição de fase induzidas em aminoácidos cristalinos por condições externas, como por exemplo, temperatura podem fornecer informações relevantes sobre alterações em sua estrutura cristalina e conformações das ligações químicas.

Diversas propriedades referentes aos aminoácidos podem ser estudadas quando estes se encontram como cristais na natureza. Os estudos de suas estruturas, bem como, de suas vibrações moleculares são de interesse para a ciência [8], para melhor compreensão das propriedades físicas e químicas que podem envolver transições de fases, que possivelmente servirão de base para estudos relacionados aos mecanismos dos processos vitais.

Sob essa perspectiva, é necessário aplicar diversas técnicas para que estes processos sejam investigados. Uma delas é a espectroscopia Raman que tem sido cada vez mais utilizada para o estudo de compostos biológicos e tem se mostrado promissora em relação às técnicas convencionais de análises estruturais, como difratometria de raios-X (DRX) e propriedades térmicas, como calorimetria diferencial de varredura (DSC), pois a espectroscopia Raman reflete mudanças no estado molecular, ou seja, os espectros vibracionais fornecem informações associadas aos níveis energéticos referentes aos movimentos vibracionais dos núcleos dos átomos das moléculas [9].

Contudo, as técnicas de DRX e DSC utilizadas como complementares ao presente estudo, as quais fornecem outros parâmetros, como por exemplo, estrutura cristalina, distância interplanar, fluxo de calor, transições endotérmicas ou exotérmicas, são de fundamental importância para confirmação dos processos físicos e químicos quando se trata de um composto ou molécula como um todo.

A escolha do L-Leucina deu-se por motivo da grande importância funcional deste aminoácido no organismo, onde atua participando da regulação do balanço proteico corporal, além se ser fonte de nitrogênio para a síntese de alanina e glutamina [10]. Ao que se refere à síntese proteica muscular, estudos relatam que o L-Leucina age como estimulador da fase inicial de tradução do RNA[1]-mensageiro nas proteínas [11]. Outras funcionalidades do L-Leucina estão envolvidas nos processos corpóreos de secreção de insulina, na modulação da imunocompetência e diminuições das lesões musculares [12]. Deve-se lembrar que embora apresente inúmeras

[1] RNA : do inglês *Ribonucleic acid.*

funcionalidades para o organismo, este é um aminoácido essencial, ou seja, deve ser consumido pela alimentação [13].

Desta forma, a investigação e identificação de mudanças no comportamento vibracional e em especial transições de fase no L-Leucina pode fornecer informações importantes auxiliando estudos correlacionados às suas funcionalidades vitais.

O presente trabalho está dividido da seguinte forma. No primeiro capítulo apresenta-se uma introdução tratando-se dos aminoácidos, em particular do aminoácido L-Leucina, via espectroscopia Raman em função de temperatura com o objetivo de identificar mudanças nos modos vibracionais e transição de fase com a variação de temperatura como agente externo.

No segundo capítulo tem-se uma revisão teórica dos conceitos gerais relacionado aos aminoácidos e ao L-Leucina especificamente. Logo após, são apresentados os conceitos gerais que tratam do estudo de materiais cristalinos, seguidos por uma revisão referente aos estudos gerais de transição de fase realizados em aminoácidos cristalinos em função de temperatura. Por fim são apresentadas as fundamentações teóricas gerais das técnicas utilizadas.

No terceiro capítulo realiza-se a descrição do material e métodos utilizados nessa pesquisa.

No quarto capítulo apresentam-se as caracterizações do L-Leucina à temperatura ambiente. E os espectros obtidos por variação de temperatura. Em seguida, são apresentados os resultados obtidos pelas técnicas complementares de Calorimetria Diferencial de Varredura e Difratometria de Raios-X e as discussões dos resultados associados às três técnicas empregadas.

No quinto capítulo tem-se uma breve conclusão e perspectivas futuras.

1.1 Objetivos

Este trabalho tem como objetivo principal estudar transições de fase por espectroscopia Raman do policristal de L-Leucina sob variação de temperatura. Também foram utilizadas as técnicas de DSC e DRX como forma de complementar este estudo fornecendo análises com relação a mudanças macroscópicas e estruturais.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Neste capítulo são apresentadas considerações gerais sobre aminoácidos, peptídeos e proteínas, sistemas cristalinos e L-Leucina em fase cristalina. Ainda serão abordados os princípios físicos e funcionamento da instrumentação das técnicas utilizadas: espectroscopia Raman, DSC e DRX, considerados relevantes para o desenvolvimento deste trabalho.

2.1 Considerações gerais sobre aminoácidos

Os vinte comuns aminoácidos que são encontrados em proteínas e vitais para sua síntese possuem uma mesma formação, chamada de cadeia principal, são α-aminoácidos constituídos por um grupo amina (NH_2) e um grupo carboxilíco (COOH) diretamente ligados ao mesmo átomo de carbono, o carbono α (Figura 2.1). A distinção entre os aminoácidos comuns se dá quando observada a composição de suas cadeias laterais, ou também chamados, grupos R. Esses grupos R variam em estrutura, tamanho, carga elétrica e também influenciam a solubilidade desses aminoácidos em água [2].

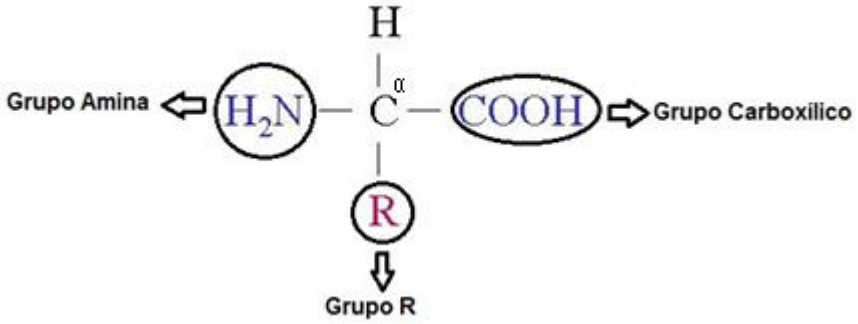

Figura 2.1: Estrutura geral da cadeia principal de um aminoácido de radical qualquer. Adaptado de [2].

Para entender mais facilmente as características dos aminoácidos é possível classificá-los de acordo com suas propriedades químicas, ópticas, funcionais e estruturais.

Considerando a polaridade das cadeias laterais são subdivididos em quatro principais classes, que variam amplamente desde apolares hidrofóbicos (insolúveis em água) a altamente polares e hidrofílicos (solúveis em água) [14].

A primeira classe é composta dos aminoácidos apolares hidrofóbicos. Ela é composta por nove dos vinte aminoácidos comuns. Os que possuem cadeia lateral alifática[2] composto pela alanina, isoleucina, leucina, prolina e valina. Os com cadeia aromática[3] constituídos da fenilalanina e triptofano. A metionina que contém átomos de enxofre e possuí um grupo tioéter na cadeia lateral. Por fim a glicina, que possui uma estrutura simples e sua cadeia lateral não contribui de forma significativa nas interações hidrofóbicas [15].

Uma particularidade interessante desta classe, é que os aminoácidos apolares apresentam característica “oleosa”, ou semelhante a lipídios. Esse aspecto promove as interações hidrofóbicas. Encontrados geralmente no interior das proteínas, o caráter oleoso ajuda a estabelecer sua forma tridimensional [15].

A segunda classe é composta pelos aminoácidos polares não carregados. Os grupos R destes aminoácidos são mais hidrofílicos, ou seja, solúveis em água se comparados com os citados anteriormente. Esta classe inclui a serina, tirosina e treonina, em que a polaridade das cadeias laterais resulta dos grupos hidroxílicos, a asparagina e glutamina dos grupos amida e a cisteína por seu grupo sulfidril, componente importante do sítio ativo de muitas enzimas [15].

Os aminoácidos pertencentes à terceira classe são os polares carregados positivamente em pH 7,0. Considerados como básicos, têm suas cadeias laterais aceptoras de prótons. Tais aminoácidos são a lisina, que possuí um segundo grupo amina em sua cadeia lateral. Arginina com um grupamento guanidina e a histidina com cadeia lateral ionizável em que hora pode estar carregado positivamente, hora estar próxima à neutralidade. Esse comportamento facilita várias reações de catálise das enzimas ao servir como doador/aceptor de prótons [14].

A quarta classe de aminoácidos é composta pelos que possuem o grupo R polar e carregado negativamente em pH 7,0, ou também, chamados de ácidos. Os

[2] Cadeia alifática: O termo alifático se refere a cadeias carbônicas abertas. Possuí pelo menos duas extremidades. Não há ciclo, fechamento ou anel presente [2].
[3] Cadeia aromática: O termo aromático se refere ao anel benzênico, ou também chamado anel aromático (C_6H_6) presente na estrutura destas cadeias [2].

dois aminoácidos que compõe essa categoria são o asparato e o glutamato, em que ambos possuem um segundo grupo carboxila, ionizável em suas cadeias laterais [14].

Na Figura 2.2 estão apresentados os vinte aminoácidos comuns, indispensáveis para a síntese de proteínas, classificados pela polaridade dos grupos R.

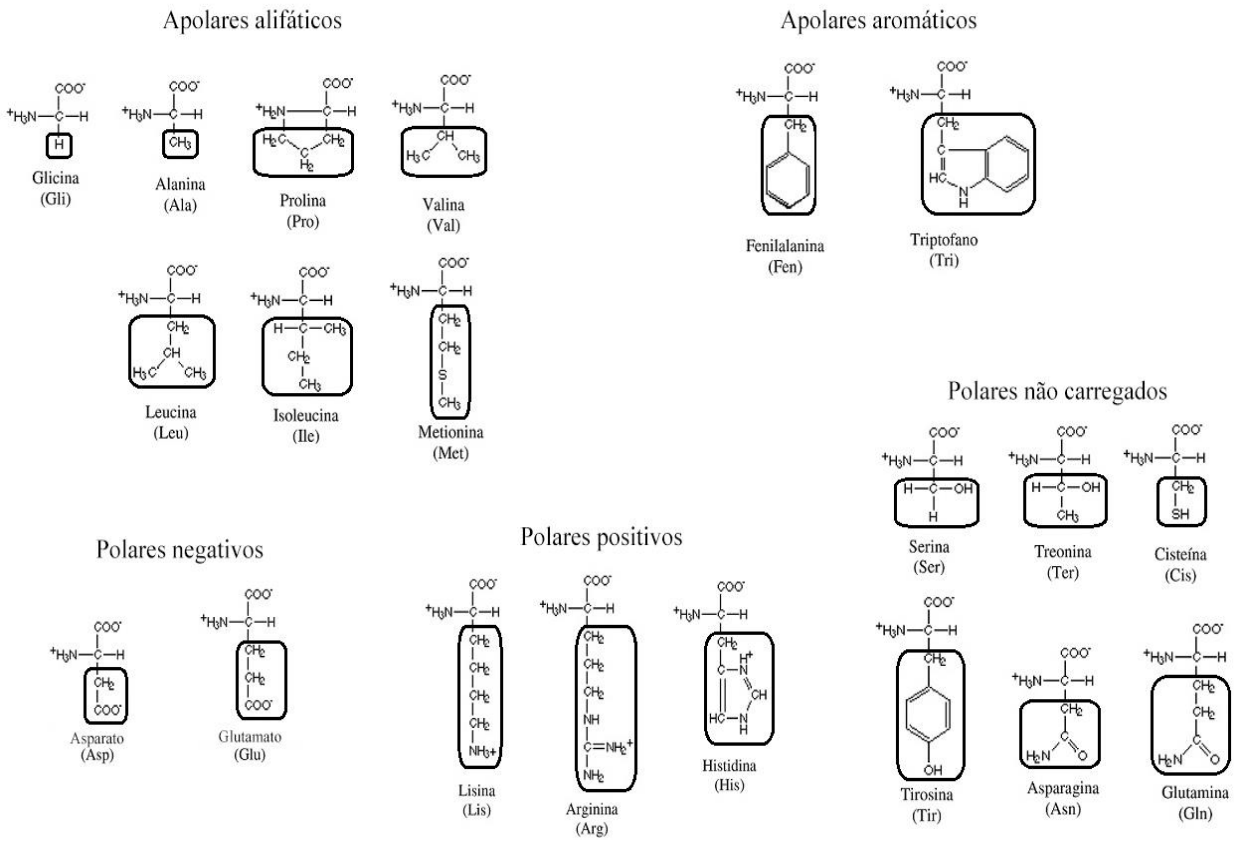

Figura 2.2: Os 20 aminoácidos encontrados nas proteínas, separados por seus grupos R. As fórmulas estruturais apresentam o estado de ionização predominante em pH 7,0. As partes não circundadas (cadeia principal) são comuns a todos os aminoácidos e as porções circuladas constituem os grupos R (cadeia lateral). Adaptado de [16].

De acordo com a nomenclatura, os aminoácidos devem obedecer as regras da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC). Dessa forma, os carbonos na cadeia principal são numerados a partir do grupo carboxila. Os α-aminoácidos são os aminoácidos em que no mesmo carbono estão ligados os grupos carboxila e amina. Conforme o afastamento entre os grupos, por meio das cadeias carbônicas a que estão ligados, são denominados como β (2 carbonos), γ (3 carbonos), δ (4 carbonos) e ε (separação de mais de 4 carbonos) [17]. Essa classificação existe devido a

aminoácidos que possuem mesma composição, mas estruturas diferentes (Figura 2.3).

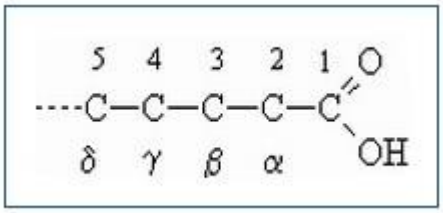

Figura 2.3: Classificação dos carbonos de acordo com a IUPAC [17].

Considerando suas propriedades acidobásicas pode-se dizer que os aminoácidos são substâncias que em soluções podem atuar tanto como um ácido, quanto como uma base, são chamados de anfóteros. Os aminoácidos apresentam este comportamento por serem substâncias que contém numa mesma molécula uma base e um ácido, que em solução aquosa à pH neutro são predominantemente dipolares, ou mais usualmente conhecidos por *zwitterion*[4]. Nesta forma o grupo carboxílico é desprotonado (COO^-) e este próton se liga à amina, que protonada forma a amônia (NH_3^+) (Figura 2.4) [14].

O estado de ionização de um aminoácido varia com o pH. Em soluções ácidas, se manifestam na forma de cátions e são representados pelo grupo amônia. Em soluções básicas, se manifestam na forma de ânions e são representados pelo grupo carboxílico. Em valores de pH, em que um aminoácido é eletricamente neutro a soma das cargas positivas e a soma das cargas negativas são iguais. Esse valor de pH é conhecido como ponto isoelétrico (pI) [18].

[4] Zwitterion: O termo *Zwitterion,* do alemão, “íon híbrido”, é dado quando um aminoácido em solução aquosa a pH neutro, passa a se comportar como um íon dipolar, ou seja, pode atuar tanto como uma base quanto como um ácido [2].

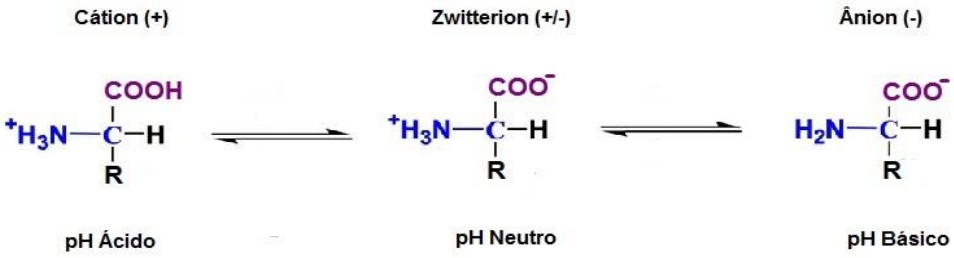

Figura 2.4: Esquema apresentando as formas de cátion (pH ácido), *zwitterion* (pH neutro) e ânions (pH básico) dos aminoácidos. Adaptado de [14].

Analisando suas propriedades ópticas todos os aminoácidos comuns, com exceção da glicina, que possui em seu grupo R apenas um átomo de hidrogênio, apresentam quiralidade[5], ou seja, o carbono α se liga a quatro grupos diferentes e, portanto, é um centro quiral, moléculas que apresentam quiralidade são conhecidas como estereoisômeras [2]. Para os aminoácidos existem duas formas de estereoisomerismo que apresentam atividades ópticas diferentes. Quando um feixe de luz polarizada e monocromática incide sobre essas moléculas o plano de polarização da luz é rotacionado, polarizando circularmente a luz. Moléculas que desviam o plano de rotação no sentido horário são chamadas Dextrogiras e, portanto, os aminoácidos que possuem este comportamento apresentam a configuração D. Se o plano de rotação é desviado no sentido anti-horário, as moléculas são chamadas de Levogiras, assim os aminoácidos que possuem este comportamento apresentam configuração L (Figura 2.5) [3]. Todos os aminoácidos encontrados na síntese de proteínas possuem configuração L [14].

[5]Quiralidade: Propriedade que distingue uma configuração espacial de átomos da imagem especular desta configuração [65].

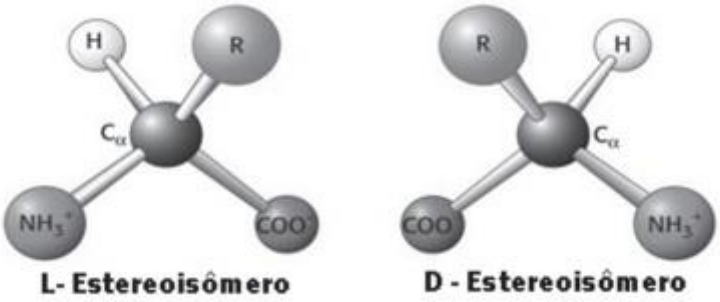

Figura 2.5: Representação esquemática de L e D isômeros dos aminoácidos [13].

Quanto à funcionalidade, os aminoácidos são classificados em duas grandes categorias: essenciais e não essenciais.

Essenciais ou indispensáveis são os aminoácidos que o organismo humano não sintetiza em quantidades suficientes no corpo e, portanto, devem ser consumidos obrigatoriamente na alimentação. São eles: arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina [13].

Os aminoácidos não essenciais ou dispensáveis são os produzidos pelo organismo e sintetizados por atividade metabólica. Dados por: alanina, asparagina, cisteína, asparato, glutamato, glutamina, glicina, prolina, serina e tirosina [13]. Os aminoácidos essenciais e não essenciais estão apresentados na Tabela 2.1.

Tabela 2.1: Vinte aminoácidos comuns: Essenciais e não essenciais [13].

Aminoácidos essenciais	Aminoácidos não essenciais
Arginina	Alanina
Histidina	Asparagina
Isoleucina	Asparato
Leucina	Cisteína
Lisina	Glutamato
Metionina	Glutamina
Fenilalanina	Glicina
Treonina	Prolina
Triptofano	Serina
Valina	Tirosina

Outra característica de fundamental importância dos aminoácidos diz respeito às ligações hidrogênio. Também chamadas de pontes de hidrogênio essas interações ocorrem quando um átomo de hidrogênio posicionado entre dois átomos altamente

eletronegativos age como uma "ponte" entre eles fazendo uma ligação [19]. Em aminoácidos esse tipo de interação ocorre nos grupos carboxila, que atua como doador de prótons e o grupo amina que atua como receptor, o que leva a forma anfótera dos aminoácidos. As ligações de hidrogênio variam entre 2 a 10 kcal/mol sendo consideradas interações fracas se comparadas a energia de ligação de ligações covalentes que estão em torno de 50 a 100 kcal/mol, consideradas interações fortes [20]. Apesar de consideradas interações fracas, são de grande relevância para estabilidade de cristais orgânicos [21].

2.2 Considerações gerais sobre peptídeos e proteínas

Os aminoácidos possuem um papel fundamental na constituição das proteínas, pois a formação de uma sequência única de aminoácidos fará com que uma proteína execute sua devida função no organismo [22].

A esta sequência única denomina-se peptídeos. Quando ocorre a junção de duas moléculas de aminoácidos ligadas covalentemente têm-se uma ligação peptídica [2]. Para duas moléculas de aminoácidos então forma-se um dipeptídeo. Para três moléculas um tripeptídeo. Para quatro ou mais moléculas forma-se a chamada cadeia polipeptídica [23].

Em um polipeptídeo, os aminoácidos que o compõe são denominados resíduos de aminoácidos. Um resíduo de um aminoácido presente na extremidade α-amino é chamado de resíduo aminoterminal e na extremidade α-carboxil de resíduo carboxiterminal [14].

Uma ligação peptídica é formada pela desidratação de um grupo α-amino e um grupo α-carboxil entre dois aminoácidos. Esta formação é um exemplo de reação de condensação, um tipo de reação comum em células vivas [2]. Quimicamente, a representação da formação de uma ligação peptídica está ilustrada na Figura 2.6.

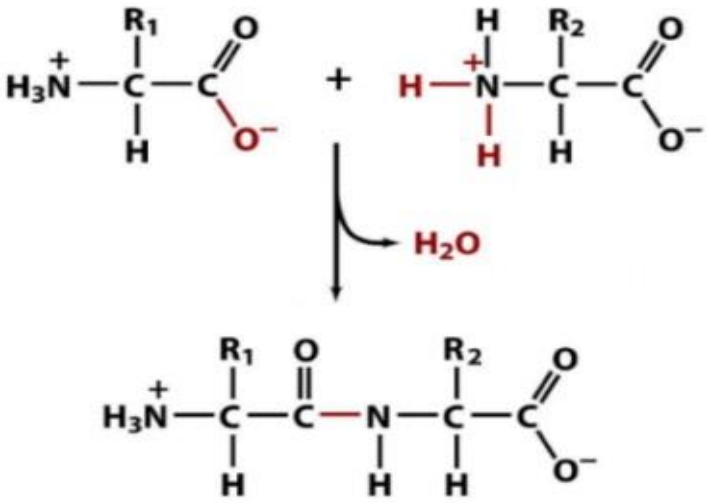

Figura 2.6: Representação esquemática da formação de uma ligação peptídica [1].

Proteínas são moléculas grandes e complexas classificadas em quatro níveis estruturais: Estrutura primária, estrutura secundária, estrutura terciária e estrutura quaternária.

A estrutura primária é constituída da sequência de aminoácidos unidos covalentemente pelas ligações peptídicas [22]. Um dos fatores mais importantes quando se trata da estrutura primária é a ordem de cada aminoácido na sequência de resíduos, pois se esta ordem for modificada em uma proteína, isto fará com que a função biológica desta proteína seja comprometida no organismo [2].

Um exemplo é da proteína hemoglobina relacionada à anemia falciforme, uma doença genética grave, em que um único resíduo de aminoácido (Glu^6 por Val^4) é substituído nas cadeias β da hemoglobina. Esta mudança causa a associação das moléculas em feixes longos e fibrosos devido a formação de uma região hidrofóbica na superfície da hemoglobina [22].

A estrutura secundária de uma proteína é definida pelo arranjo espacial do esqueleto polipeptídico, sem considerar a conformação dos átomos presentes nas cadeias laterais [2]. Duas importantes condições para estabilidade das proteínas foram propostas por Linus Pauling e Robert Corey, no final dos anos de 1930, que se baseavam em: 1) Todos os átomos pertencentes às ligações peptídicas devem estar contidos em um mesmo plano. 2) Presença das ligações de hidrogênio entre o carbono α e o nitrogênio do grupo amina. E das ligações de hidrogênio e do carbono α com o carbono do grupo carboxila de um mesmo resíduo [23].

Com estes requisitos foi possível chegar-se a dois modelos estruturais diferentes, estáveis para a proteína:

- Estrutura em hélice α: A estrutura em hélice α é o arranjo mais simples que uma cadeia polipeptídica pode assumir [2]. Nesse arranjo a cadeia de polipeptídeos é enrolada em torno de um eixo imaginário longitudinal a uma distância vertical de 5,4 Å entre cada unidade que se repete ao longo do eixo e possui 3,6 resíduos de aminoácidos por volta [19]. Desse modo, as cadeias laterais dos aminoácidos são projetadas para fora da hélice [22]. Esta configuração faz com que de certa forma a estabilidade da estrutura em hélice α independa das cadeias laterais, pois as mesmas não participam das ligações de hidrogênio entre o átomo de hidrogênio e os átomos de nitrogênio e oxigênio dos grupos amina (-NH) e carboxílico (C=O) dos aminoácidos da cadeia polipeptídica. As ligações de hidrogênio entre as ligações peptídicas são fundamentais na estabilidade da hélice. Em geral, são encontrados em hélices α, aproximadamente um quarto de todos os resíduos de aminoácidos das proteínas [2]. Porém, para determinados polipeptídeos essa formação não ocorre, por exemplo, se uma cadeia polipeptídica conter muitos resíduos de aminoácidos vizinhos com mesma carga, estes irão se repelir fortemente e assim não formam a hélice. Alguns aminoácidos que apresentam este aspecto são a argina e a lisina, que em solução a pH 7,0 ficam com suas cadeias laterais carregadas positivamente e, portanto, não formam a estrutura em hélice α [22]. A Figura 2.7 apresenta a representação de uma estrutura em hélice α vista de duas formas diferentes.

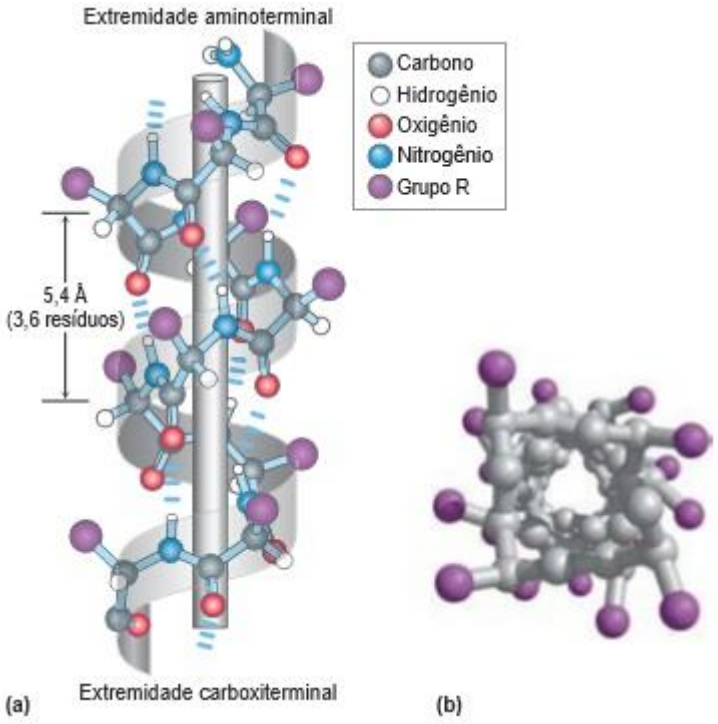

Figura 2.7: Representação da estrutura em hélice α: (a) Estrutura em torno do eixo imaginário longitudinal mostrando as ligações de hidrogênio entre as cadeias polipeptídicas. A volta com distância de 5,4 Å é uma unidade que se repete. (b) visão transversal da hélice [2].

- Estrutura em folha β pregueada: A estrutura em folha β pregueada, assim como a hélice α, também é sustentada pelas ligações de hidrogênio entre as cadeias polipeptídicas. O que leva essas ligações a serem as principais responsáveis pela estabilidade da estrutura [22]. No entanto, sua formação se dá em forma de zigue zague, pois o esqueleto polipeptídico está estendido e arranjado paralelamente formando uma estrutura semelhante a pregas com distância entre as unidades que se repetem de aproximadamente 7Å [2]. Nessa disposição, duas cadeias polipeptídicas adjacentes interagem pelas ligações de hidrogênio entre os grupos C=O e N-H. As cadeias laterais dos aminoácidos são projetadas para fora do plano, da folha pregueada, intercaladamente [19]. A Figura 2.8 é uma representação da estrutura em folha β pregueada comum em proteínas.

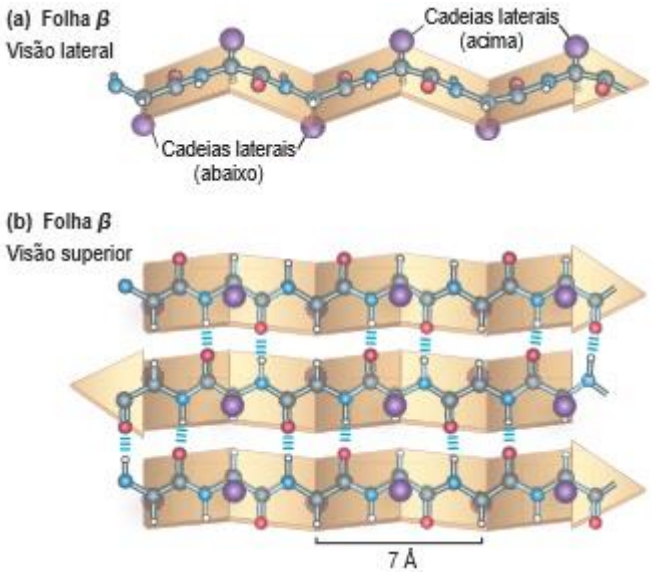

Figura 2.8: Representação da estrutura em folha β pregueada: (a) Com vista lateral enfatizando o arranjo em forma de pregas com as cadeias laterais dispostas para fora do plano da folha pregueada. (b) Mostrando a vista superior com a interação das ligações de hidrogênio com as cadeias polipeptídicas. As setas indicam a extremidade aminoterminal para carboxiterminal [2].

A estrutura terciária se dá pelo arranjo tridimensional de todos os átomos de uma proteína [23]. Ao contrário da estrutura secundária, na qual ocorre interação entre resíduos de aminoácidos de cadeias polipeptídicas adjacentes, na estrutura terciária as interações ocorrem entre aminoácidos distantes na cadeia polipeptídica e as configurações hélice α e folhas β pregueadas podem aparecer em conjunto na estrutura de uma proteína dobrada [2]. Na estrutura terciária, além das ligações de hidrogênio, ligações do tipo covalente como a ponte dissulfeto (-S-S-) são de grande importância para a estabilidade dessa estrutura [22].

Na estrutura quaternária, duas ou mais cadeias polipeptídicas podem ser arranjadas em complexos tridimensionais [23]. Nessa formação as proteínas podem ser classificadas em dois grupos: as proteínas fibrosas, na qual as cadeias polipeptídicas aparecem dispostas em filamentos longos ou folhas e as proteínas globulares, em que as cadeias polipeptídicas possuem dobramentos esféricos ou globulares [2]. Para as proteínas fibrosas geralmente na sua composição aparece uma estrutura secundária e a estrutura terciária. Um exemplo é o colágeno, suas fibras são responsáveis por exercer função estrutural e de sustentação em tecidos como a pele, em tendões, cartilagens, matriz óssea [22]. As proteínas globulares geralmente são formadas por vários tipos de estruturas secundárias e terciárias sendo mais complexas que as fibrosas e podendo dobrar-se muitas vezes sobre si mesmas.

Exemplos de proteínas globulares incluem enzimas, proteínas reguladoras, motoras, transportadoras dentre muitas outras funções [2]. A Figura 2.9 apresenta os níveis estruturais de proteínas desde a estrutura primária formada pela cadeia polipeptídica até as subunidades reunidas da estrutura quaternária.

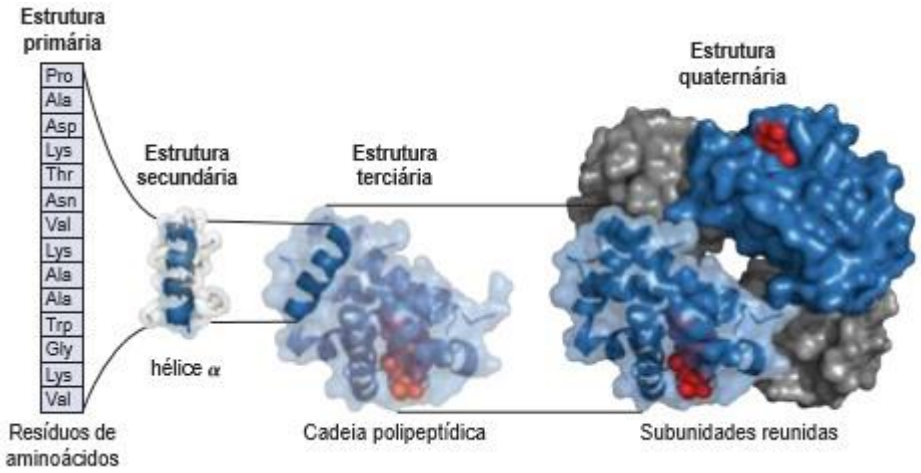

Figura 2.9: Níveis estruturais em proteínas [2].

2.3 Considerações gerais sobre estrutura cristalina

Materiais sólidos podem ser classificados segundo a regularidade com que os átomos ou íons ordenam-se entre si. Para cristais, a formação de sua estrutura consiste em uma repetição periódica de grupos idênticos de átomos, onde cada átomo está ligado aos seus átomos vizinhos mais próximos a cada ponto desta rede. Cada um destes grupos é denominado base, apresentados na Figura 2.10(A). A maneira como as bases são arranjadas espacialmente determinam a estrutura cristalina e as propriedades da maioria dos materiais sólidos cristalinos [24].

Uma rede espacial é um conceito geométrico definido como o conjunto de pontos no espaço aos quais as bases estão associadas formando assim a estrutura cristalina, representada na Figura 2.10(B). A escolha dos eixos da rede, eixos primitivos *a*, *b* e *c*, deve representar sempre a menor área e o menor volume possível para um núcleo primitivo, denominado célula primitiva [25]. A célula primitiva é um tipo de célula unitária e está apresentada na Figura 2.10 [26].

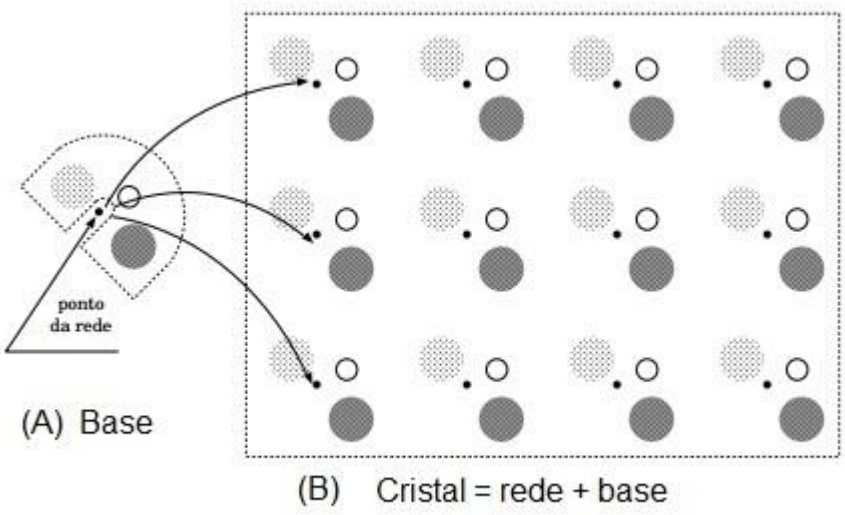

Figura 2.10: Figura esquemática: (A) base de três átomos; (B) cristal. A base de três átomos é posicionada em cada ponto da rede para formar o cristal [26].

Uma célula unitária é dada por qualquer volume (de área) finito que preenche completamente o espaço mediante translações convenientes sem superposição ou falhas. É escolhida para representar a simetria da estrutura cristalina sendo a unidade

básica da estrutura e determinando a estrutura cristalina em função da disposição de seus átomos e de sua geometria [21].

As redes cristalinas possuem algumas operações de simetria. Uma delas é a operação de translação, em que a rede cristalina pode ser transformada nela mesma por um vetor de translação da rede. Outras operações de simetria características são as de rotação em volta de um eixo que passa por um ponto da rede e a de reflexão em relação a planos que passam por um ponto da rede [24]. Quando as operações de simetria são satisfeitas, elas constituem os diferentes tipos de redes que podem ser formadas, as chamadas redes de Bravais (Figura 2.11). Demonstradas por Auguste Bravais, em 1848, derivou 14 células unitárias que permitem descrever qualquer estrutura cristalina.

Para tal, foram utilizados 7 arranjos atômicos básicos que definem 7 sistemas cristalinos (Tabela 2.2). Estes sistemas são descritos pela adoção de até três valores específicos de eixos (*a, b, c*) e ângulos (*α, β, γ*) (Figura 2.12) permitindo obter células de diversas naturezas.

Tabela 2.2: Os 7 sistemas cristalinos apresentados com seus eixos e ângulos axiais [24].

Sistemas Cristalinos	Eixos	Ângulos Axiais
Cúbico	$a = b = c$	α = β = γ = 90°
Tetragonal	$a = b \neq c$	α = β = γ =90°
Otorrômbico	$a \neq b \neq c$	α = β = γ = 90°
Monoclínico	$a \neq b \neq c$	α = γ = 90°; β≠ 90º
Triclínico	$a \neq b \neq c$	α ≠β≠γ≠ 90°
Hexagonal	$a = b \neq c$	α = β = 90°; γ= 120°
Romboédrico	$a = b = c$	α = β = γ≠ 90°

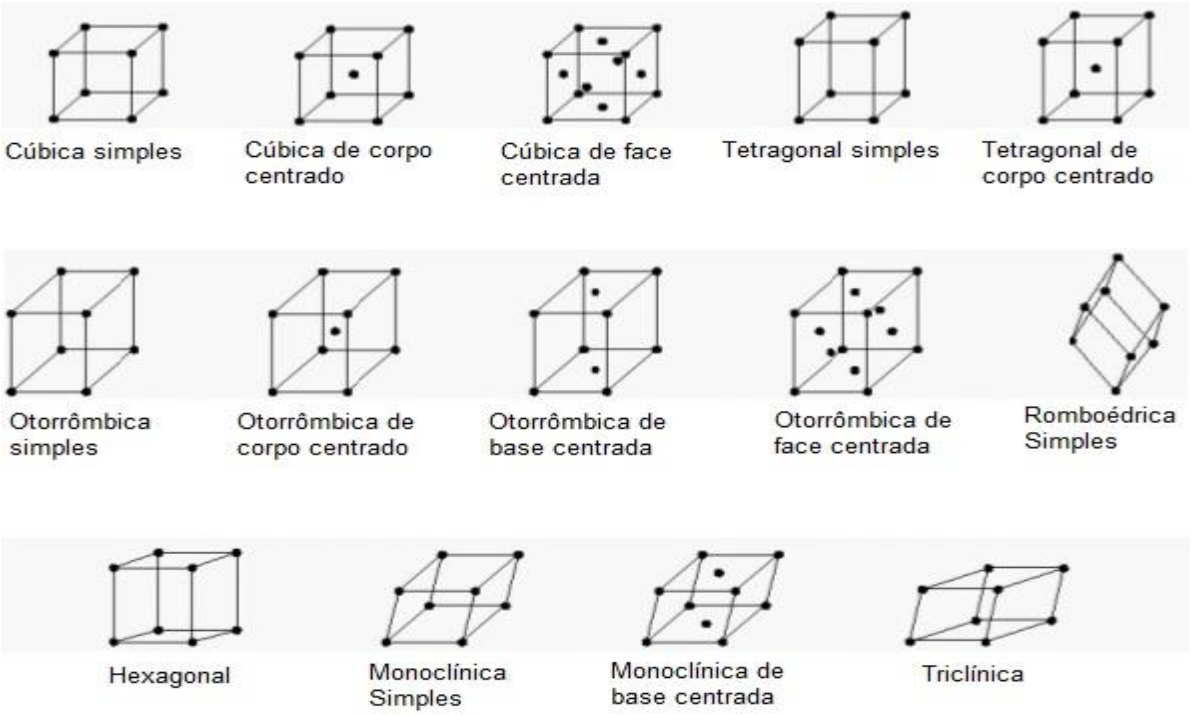

Figura 2.11: Representação esquemática das 14 redes de Bravais. Adaptado de [27].

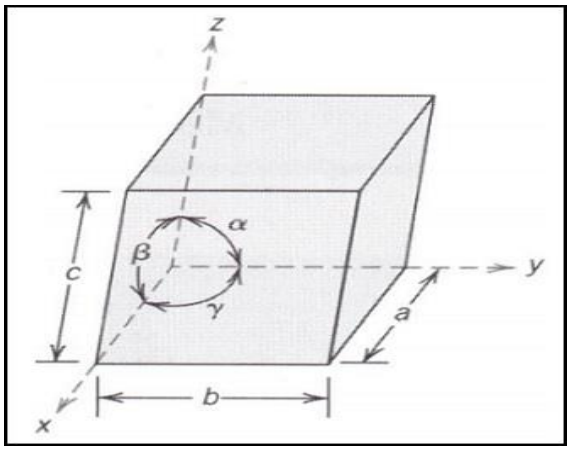

Figura 2.12: Célula unitária com eixos coordenados *x*, *y* e *z*, com comprimentos axiais (*a*, *b* e *c*) e os ângulos entre eixos (*α*, *β* e *γ*) [28].

Apresentados os sistemas cristalinos e as redes de Bravais, que permitem descrever qualquer estrutura cristalina, faz-se necessário para seu estudo o conhecimento de determinadas direções e planos cristalinos. Para tal, William Hallowes Miller (1801-1880) propôs um sistema de índices, denominado índices de Miller, que representa as direções e os planos cristalinos [20].

Quando se trata de direções em redes cristalinas, estas são estabelecidas por linhas ou vetores partindo da origem e passando pela rede. Para que ela seja determinada segundo os índices de Miller, alguns aspectos devem ser seguidos [20, 26]: 1) Deve-se passar um vetor pela origem do sistema de coordenadas; 2) O vetor deve ser projetado sobre cada um dos três eixos e seus tamanhos medidos em função dos parâmetros da célula unitária, *a, b e c;* 3) Deve-se determinar o menor valor inteiro referente ao tamanho dos vetores projetados; 4) Os índices são apresentados entre colchetes e não são separados por vírgulas [*u v w*]. Para os planos cristalográficos deve-se destacar que este é um conceito matemático usado como sistema de referência para a descrição dos átomos na estrutura cristalina [8].

Para todos os sistemas cristalinos é possível descrever os planos cristalográficos pelos índices de Miller (h k l) tendo como base uma célula unitária, no sistema de 3 eixos coordenados, exemplificado na Figura 2.13. Quando os planos são paralelos entre si possuem índices idênticos e os mesmos são equivalentes. Para que os planos sejam determinados, segundo os índices de Miller, alguns aspectos devem ser seguidos [20, 21]: 1) As interseções entre os planos e os eixos cristalinos são determinadas em função dos parâmetros de rede *a*, *b* e *c*; 2) Deve-se determinar o menor valor inteiro referente à interseção do plano nos eixos cristalográficos (quando o plano for paralelo ao eixo o valor do índice de Miller é 0); 3) Deve-se calcular os valores recíprocos; 4) Os índices são representados entre parênteses por (h k l).

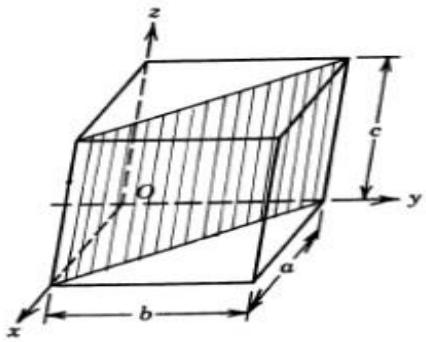

Figura 2.13: Ilustração da indexação de um plano cristalográfico indicado pelos índices de Miller para o plano (110) [20].

2.4 Aminoácido L-Leucina

O aminoácido L-Leucina ou ácido 2-amino-4-metilvalérico tem fórmula molecular dada por $C_6H_{13}NO_2$, apresentado na Figura 2.14. Possuí cadeia lateral aberta, apolar e hidrofóbica, o que lhe garante característica de estabilizar a estrutura proteica por suas interações hidrofóbicas [2].

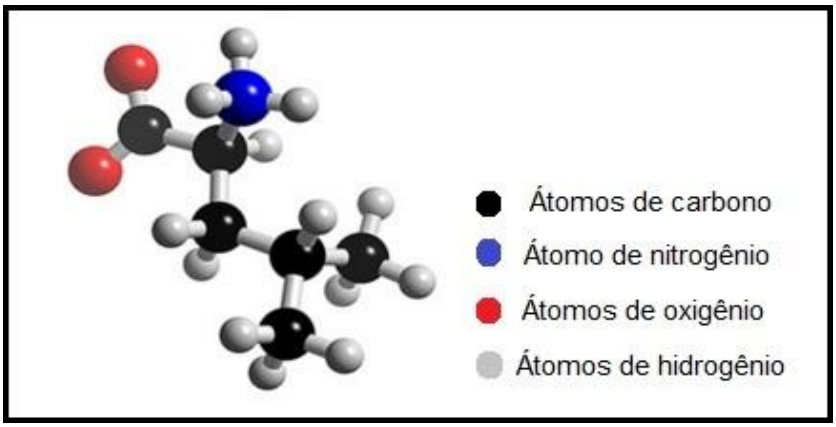

Figura 2.14: Molécula do aminoácido L-Leucina com a disposição dos números de átomos [29].

Na forma cristalina, à temperatura ambiente, o aminoácido L-Leucina apresenta estrutura monoclínica pertencente ao grupo espacial $P2_1$ com quatro moléculas por célula unitária. As moléculas presentes na célula unitária, apresentadas na Figura 2.15, estão arranjadas por camadas paralelas ao plano *ac* e interagem por meio das ligações de hidrogênio. Esta característica se dá ao fato dessas moléculas apresentarem a forma de *zwitterions* [15].

Os parâmetros de rede e ângulos que constituem a estrutura cristalina do L-Leucina foram obtidos pela ficha padrão JCPDS[6] 00-030-1779, dados por:
a = 9,7610 Å, b = 5,3070 Å, c = 14,6860 Å, $\alpha = \gamma = 90°$ e β = 94,09°, à temperatura ambiente (~21ºC).

[6] JCPDS: *Joint Committee on Powder Diffraction Standards* – base de dados de difração [63].

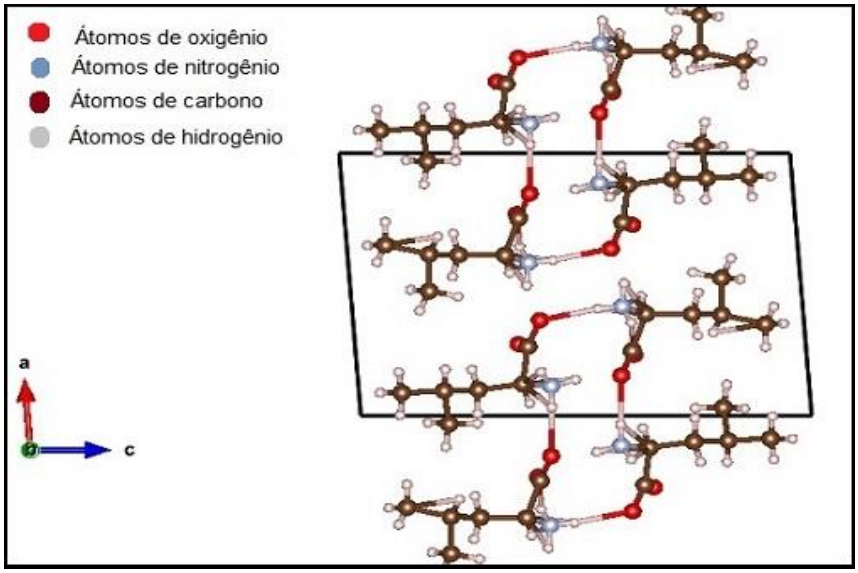

Figura 2.15: Representação da célula unitária do aminoácido L-Leucina constituída por quatro moléculas no plano *ac*.

É interessante destacar que a célula unitária assimétrica do L-Leucina apresenta duas moléculas independentes cristalograficamente. Esta configuração permite dois tipos de conformações moleculares: *Gauche 1*e *Trans* [30].

Para a configuração *Gauche 1* o átomo de nitrogênio do grupo amina se liga por ligações de hidrogênio aos átomos de oxigênio do grupo carboxílico vizinho, com distância de ligação de 2,79 e 2,89 Å. Para a configuração *Trans* o átomo de nitrogênio do grupo amina faz quatro ligações com átomos de oxigênios diferentes do grupo carboxílico. Duas ligações com distância de ligação 2,76 e 2,84 Å e a terceira ligação de hidrogênio, chamada de bifurcada, é ligada a dois átomos de oxigênio com distância de ligação de 2,95 e 3,07 Å [30]. Na Figura 2.16 estão representadas as ligações de hidrogênio para as duas configurações.

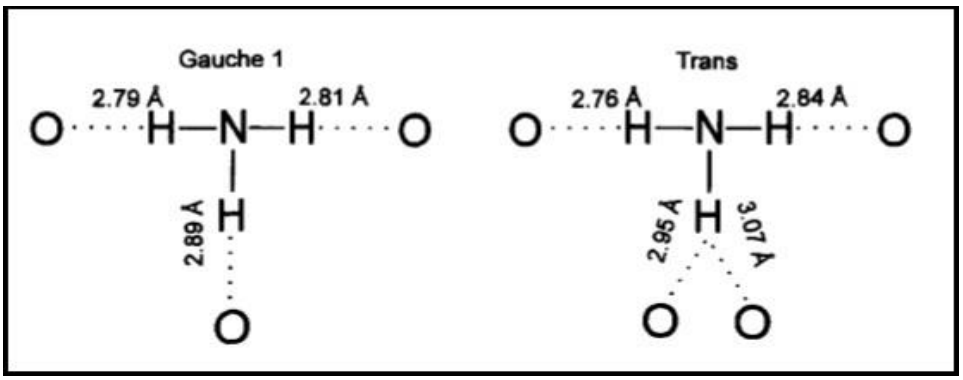

Figura 2.16: Representação esquemática das ligações de hidrogênio para as duas configurações da molécula de L-Leucina, *Gauche 1 e Trans*, com valores das distâncias das ligações [30].

Quanto às vibrações moleculares do L-Leucina destacam-se as referentes aos modos atribuídos aos grupos funcionais CH, CH_3, NH_3^+ e CO_2^-. Estes grupos quando independentes possuem modos vibracionais e simetrias características. Contudo quando limitados a uma estrutura cristalina apresentam modificações em suas freqüências de vibração e grupos de simetria. Estas unidades são identificadas na estrutura cristalina do L-Leucina, assim como, na maioria dos aminoácidos [16].

2.5 Transição de Fase em Aminoácidos

Aminoácidos podem ser encontrados como cristais na natureza e diversas propriedades no estado sólido podem ser estudadas [31]. Uma propriedade fundamental para entender a estrutura e a conformação molecular dos cristais de aminoácidos, assim como, suas interações intermoleculares e intramoleculares, é investigar suas vibrações moleculares pelo comportamento de seus grupos funcionais. Outro aspecto seria o conhecimento da disposição dos átomos numa rede cristalina e sua forma de representação.

Na sua grande maioria os aminoácidos no estado sólido, por serem encontrados na forma de *zwitterions*, leva a uma mesma molécula possuir dois grupos funcionais com cargas opostas e infere diretamente nos grupos funcionais de aminoácidos alifáticos de forma a mantê-los unidos por meio das ligações de hidrogênio [32]. Estas ligações, de acordo com Tulip [33], desempenham um papel importante servindo como estabilizadoras de cristais moleculares. Se porventura os aminoácidos no estado cristalino forem submetidos a variações externas, como por exemplo de temperatura, estes sofrem mudanças no comportamento vibracional de seus grupos funcionais levando a modificações nas ligações químicas moleculares e como consequência a transições de fase.

Em virtude disso, diversas técnicas estão sendo utilizadas nos últimos anos para o estudo dos aspectos vibracionais e estruturais de aminoácidos visando a detecção de transição de fase [34]. Por analisarem propriedades físicas e químicas e ainda serem suscetíveis a variações de condições externas à amostra, tais como temperatura ou pressão, ou ainda com relação à composição da amostra correlacionadas principalmente a concentração, a difratometria de raios-X e análises

térmicas, são comumente utilizadas para estudo de transição de fase em aminoácidos cristalinos. Ainda com relação a estudo de transição neste tipo de material são aplicadas técnicas que evidenciam os movimentos internos moleculares associados às rotações ou oscilações torcionais nos grupos funcionais e em radicais, como por exemplo, Espalhamento Inelástico de Neutrons (INR) e técnicas que propiciam estudos associados aos comportamentos vibracionais moleculares, como por exemplo, Espectroscopia Raman e de Infravermelho.

Utilizando-se as técnicas conjuntas de espectroscopia Raman e calorimetria diferencial de varredura foi realizado um estudo no aminoácido DL-Norvalina [35]. Nesta pesquisa, foi identificado para os espectros Raman, que no intervalo entre 1500 a 1300 cm^{-1} durante um processo de aquecimento, ocorreu uma forte diminuição na frequência das bandas relacionadas aos grupos funcionais de CH_3, CH_2 e CH em cerca de -76°C onde foi detectada transição de fase por DSC.

Outro estudo realizado com estas mesmas técnicas, para o aminoácido β-Glicina [36], mostra que foram observadas mudanças com variação de temperatura onde o β-Glicina sofre uma transição de fase em -21°C caracterizada pela técnica de DSC.

O estudo realizado por Lima, J. A. e colaboradores [37], utilizando a técnica de espectroscopia Raman em função de temperatura, relatam uma transição de fase entre -173°C a -163°C. Foi verificado que a banda na região de 51 cm^{-1}, atribuída aos modos de rede, diminui em intensidade com a diminuição de temperatura, desaparecendo entre o intervalo citado. A interpretação dada pelos pesquisadores é de que este comportamento está associado a uma quebra de simetria na célula unitária do aminoácido.

Outra análise referente ao L-Valina, pelas técnicas de espectroscopia Raman por temperatura e INR [30], relata que para altas temperaturas não foi identificada transição de fase. Porém, com as medidas de INR para a L-Valina parcialmente deuterada e totalmente hidrogenada, foi identificada transição para baixas temperaturas, no intervalo de -3°C a 47°C. De acordo com os resultados apresentados, a transição de fase identificada foi relacionada com a ativação de modos vibracionais na espectroscopia Raman.

Relacionados com as técnicas de análise térmica, é observada uma gama de análises. Por exemplo, empregando análises de termogravimetria e calorimetria

diferencial de varredura, F. Rodante e G. Marrosu [38], realizam um estudo generalizado para todos os α-aminoácidos. De acordo com seus resultados foram identificadas transições de fase no aminoácido Leucina, à temperatura de 71°C, para a Lisina, no intervalo de 60 a 80°C com pico de transição em 67,2°C, e para Cisteína, à temperatura de 67,5°C.

Ainda com relação a investigações pela técnica de DSC, um estudo realizado para vinte e dois aminoácidos cristalinos de cadeia neutra [32], identificou transição de fase em alguns deles como: L-Metionina em 34 e 120ºC e DL-Metionina em 53 e 107ºC e L-Leucina em 79ºC, sendo o intervalo de temperatura medido entre -40°C a 150°C.

Com relação ao aminoácido L-Leucina P. F. Façanha Filho e colaboradores [39], relatam ocorrer transição de fase no aminoácido L-Leucina na forma cristalina, por DSC, onde duas transições são observadas. Primeiramente, a uma temperatura de -123°C e em seguida em -16°C. Esses valores são confirmados pela técnica de DRX, onde é relatado haver transição de fase na temperatura de 80°C.

Associando à técnica de espectroscopia Raman à transição ocorrida em T_3 está relacionada com mudanças de simetria dos grupos[7] C_2 para C_s próxima a -23°C, relacionada a uma reorientação das moléculas na célula unitária do cristal.

Logo, é razoável obter-se uma visão geral de que aminoácidos investigados no estado cristalino tendem a ter variações em seus comportamentos com a variação de temperatura e como consequência transições de fase estruturais, mudanças no comportamento vibracional de seus grupos funcionais e modificações nas suas estruturas foram identificadas.

[7] Simetria dos grupos C_2 e C_s : Os termos C_2 e C_s são conjuntos de operações de simetria que correspondem às propriedades de um grupo matemático. Em uma molécula se referem ao eixo de rotação [64].

2.6 Espectroscopia Vibracional

A espectroscopia é o campo da ciência aplicado ao estudo da interação da radiação eletromagnética com a matéria. Essas interações são resultadas de transições de níveis de energia de átomos ou moléculas que dependem diretamente da energia incidente determinada pelo espectro de radiação eletromagnético. Elas fornecem informações essenciais a respeito das características das estruturas moleculares e suas aplicabilidades [40].

A região espectral em que as transições energéticas são observadas depende do tipo de nível abrangido, que pode ser eletrônico, vibracional ou rotacional. Para os níveis eletrônicos as transições são observadas na região do ultravioleta-visível resultando na absorção e/ou emissão da radiação incidente. Para os níveis vibracionais as transições são observadas na região do infravermelho, podendo resultar absorção da radiação incidente e/ou espalhamento inelástico da radiação emitida, e para os níveis rotacionais as transições são verificadas na região de micro-ondas [41].

Os principais tipos de espectroscopias que estudam a interação da radiação eletromagnética com a matéria são:

1) espectroscopia de absorção, a quantidade de radiação absorvida pelo sistema é monitorada em função do comprimento de onda da radiação incidente;

2) espectroscopia de emissão, analisa a transição de níveis de energia, de um estado de alta energia para um estado de energia menor, sofrida por uma molécula que emite o excesso de energia na forma de fótons. Pode ocorrer de forma espontânea ou estimulada na qual, respectivamente, o sistema emite um fóton mesmo sem interações externas e o sistema se encontra em um estado excitado inicialmente e pode ser estimulado com a radiação incidente a perder um fóton;

3) espectroscopia de espalhamento, um feixe incidente monocromático passa pela amostra e as frequências da radiação espalhada pela amostra são registradas. A amostra sofre a colisão de um fóton que é espalhado e assim ocorre transferência de energia entre o fóton e a amostra. O espalhamento pode ser elástico no qual o fóton é espalhado com a mesma energia do fóton incidente denominado Rayleigh. Ou inelástico, o fóton espalhado não tem a mesma energia do fóton incidente, e este é denominado Raman [19].

2.6.1 Vibrações Moleculares

Vibrações moleculares são originadas dos movimentos dos átomos presentes em uma molécula. Os átomos que constituem uma molécula nunca estão imóveis, mesmo à baixa temperatura permanecem em contínuas oscilações em torno de uma posição de equilíbrio [42]. Essa movimentação gera deformações angulares e alongamentos das ligações moleculares, que podem ser decompostas em modos normais de vibração de acordo com níveis de energia [43].

Moléculas têm vibrações cujos movimentos podem ser resolvidos como uma superposição de um número limitado de movimentos fundamentais chamados modos normais de vibração. As vibrações possíveis dependem do número de graus de liberdade da molécula [44].

Se em um sistema existem *N* átomos não agrupados que se movimentam livres em três dimensões, é dito que o sistema tem *3N* graus de liberdade. Contudo, se estes átomos estão combinados, formando uma molécula, os *3N* graus de liberdade devem ser descritos em função de *3N* coordenadas, *x*, *y*, *z*, que descrevem a posição de cada átomo na molécula. Quando ocorre mudança na posição dos átomos, suas posições são descritas em termos das variações para cada coordenada como Δx, Δy, Δz, para cada átomo da molécula, como mostra o esquema na Figura 2.17 [44].

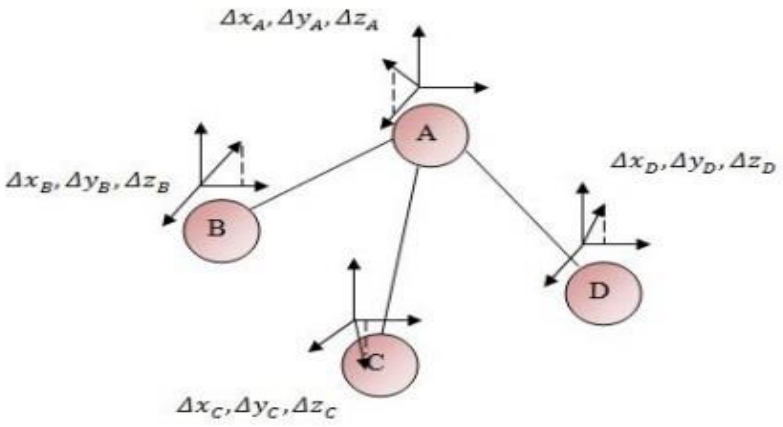

Figura 2.17: Descrição da representação dos movimentos dos N átomos (N=4) em termos das variações das coordenadas ∆x, ∆y e ∆z. Fonte: Obtida de [45].

Por se mover no espaço como um todo, os movimentos da molécula podem ser descritos como translações do seu centro de massa. Quando há movimento translacional, os átomos não se movem uns em relação aos outros. Quando há

movimento rotacional sobre um eixo molecular, as mudanças nas coordenadas podem ser escolhidas [19].

Para moléculas não lineares haverá três graus de liberdade equivalentes à sua rotação, e três graus de liberdade em torno de três eixos perpendiculares, logo tem-se *3N-6* graus de liberdade para as vibrações. Para moléculas lineares não há rotação em torno do eixo internuclear, consequentemente, tem-se *3N-5* graus de liberdade para as vibrações. Nas moléculas lineares essa falta é compensada por um grau de liberdade vibracional extra. Pelo menos uma vibração será perpendicular à outra vibração de mesma frequência e mesma energia, o que acarreta degenerescência. Estes graus de liberdade correspondem aos diferentes modos normais de vibração em uma molécula [19].

Um modo normal de vibração é tal que, cada núcleo realiza uma oscilação harmônica simples em torno de sua posição de equilíbrio e os conjuntos de núcleos se movem em fase com mesma frequência, o centro de massa da molécula como um todo não muda. Os átomos em uma molécula podem também mover-se entre si, ou seja, um átomo pode sair do seu plano ou os comprimentos das ligações variam.

Essas características estão relacionadas com movimentos de flexão e alongamento, que são chamados de vibrações [46].

Rigorosamente as vibrações moleculares devem ser estudadas quanticamente. No entanto, para certas propriedades físicas, como no caso de frequências vibracionais, o modelo clássico fornece resultados próximos ao quântico [41]. Dessa forma, a frequência de vibração molecular para a molécula diatômica, oscilando harmonicamente, é dada por

$$\nu = \frac{1}{2\pi}\sqrt{\frac{k}{\mu}} \qquad (2.1)$$

Sendo k a constante de força relacionada à molécula e $\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1+m_2}$ é a massa efetiva, sendo m_1, e m_2 as massas dos átomos.

Para moléculas complexas, como no caso de moléculas orgânicas, é possível relacionar a frequência de vibração molecular com os modos normais devido aos chamados grupos funcionais. Esses grupos possuem frequências características que quase não variam entre diferentes moléculas. Alguns deles são: C-H, C-C, C=C, C=O, C≡N, N-H, O-H, entre outros [19]. Portanto, mesmo que uma molécula seja complexa,

se ela possuir um ou mais desses grupos em sua estrutura, isso permitirá a caracterização e observação dos espectros referentes à vibração de cada grupo funcional.

Para moléculas diatômicas, tem-se apenas um único modo normal, de distensão e compressão alternadas, da ligação. O que representa um grau de liberdade vibracional. Para moléculas poliatômicas são permitidos vários modos normais de vibração, pois cada átomo *N* terá *3N* graus de liberdade, estes valores estão apresentados na Tabela 2.3.

Tabela 2.3: Graus de liberdade para molécula monoatômica, molécula linear e molécula não-linear.

	Monoatômica	Molécula linear	Molécula não linear
Translação (*x, y, z*)	3	3	3
Rotação (*x, y, z*)	0	2	3
Vibração	0	$3N - 5$	$3N - 6$
Total	3	$3N$	$3N$

Os *3N-6* e *3N-5* modos de vibrações normais que uma molécula apresenta podem ser classificados quanto ao tipo de vibração.

Em geral, são destacadas vibrações de estiramento que envolve variações nas distâncias internucleares. Elas podem ser simétricas (estiramento em fase) ou assimétricas (estiramento fora da fase). São representadas, respectivamente, por ν_s e ν_{as} vibrações de estiramento no plano molecular.

São considerados os movimentos de tesoura *s* para vibrações simétricas e balanço *r* para vibrações assimétricas. Vibrações de deformação fora do plano molecular envolvem variações infinitesimais de distâncias internucleares ou de ângulos de ligações. Neste caso são considerados os movimentos de abano *w* para vibrações assimétricas e torção τ para vibrações simétricas. A Figura 2.18 representa os modos de vibrações.

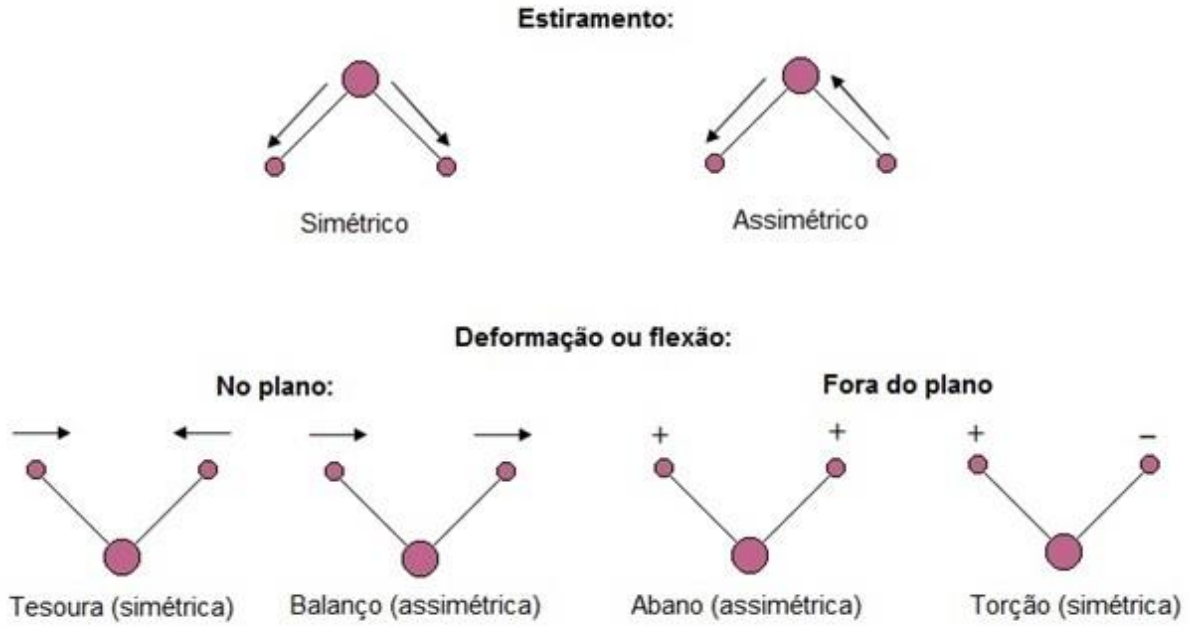

Figura 2.18: Modos de vibrações moleculares de estiramento e deformação [45].

2.6.2 Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman é uma espectroscopia vibracional baseada na detecção do espalhamento Raman fornecendo os modos de vibração das moléculas do material, desde que estas sejam Raman ativas [41]. O efeito Raman foi descoberto experimentalmente pelo físico indiano Chandrasekhara Venkata Raman em 1928 [47], que dois anos após foi agraciado com o Prêmio Nobel de Física por suas descobertas sobre a "difração molecular da luz" [48].

A descoberta do efeito Raman, lhe rendeu um artigo publicado na revista *Nature*, onde descreveu o arranjo experimental que o possibilitou observar o espalhamento inelástico de luz.

Em seu experimento foi utilizada uma lâmpada de mercúrio como fonte de excitação, um prisma de vidro como elemento dispersivo e filmes fotográficos, já disponíveis na época, como detectores [49]. Suas observações se baseavam na luz espalhada por um espectrógrafo, no qual verificou que algumas linhas e bandas eram deslocadas se comparadas ao espectro original da lâmpada. Outra característica

observada foi a diferença entre as frequências da radiação incidente e da radiação espalhada.

Dessa forma, concluiu que as variações nas frequências eram referentes às frequências de oscilação dos átomos de uma molécula e dependiam da geometria e das ligações químicas que compunham essa molécula [50].

O efeito Raman se baseia no espalhamento inelástico de luz por átomos e moléculas quando uma radiação intensa monocromática é incidida sobre os mesmos. A radiação que é espalhada inelasticamente possui frequência diferente da incidente e esta variação de frequência se dá pela diferença de energia entre dois estados vibracionais [49].

Se inicialmente a molécula, que se encontra no estado fundamental, sofrer colisão com um fóton de energia $h\nu_0$ e passar por um nível de energia intermediário (virtual) e em seguida decair para um nível de energia excitado e_{vn}, o fóton é reemitido em uma direção qualquer e sua energia é diminuída, $h\nu - e_{vn}$, este caso é do espalhamento Raman Stokes (Figura 2.19 (A)).

Se a molécula se encontrar no estado fundamental e após sofrer colisão com um fóton voltar ao mesmo nível de energia inicial, este caso é chamado de espalhamento Rayleigh, neste efeito o fóton espalhado não sofre variação na frequência (Figura 2.19 (B)).

Por fim, se a molécula já se encontrar em um estado excitado de maior energia e após sofrer colisão com um fóton voltar ao estado fundamental, este caso é dado pelo espalhamento Raman anti-Stokes, no qual a diferença de energia é cedida ao fóton que é reemitido com energia $h\nu + e_{vn}$ (Figura 2.19 (C)) [41].

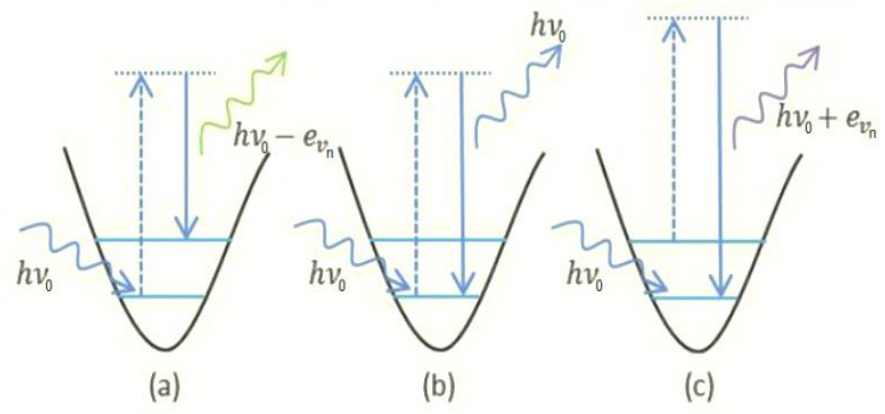

Figura 2.19: Mecanismos de espalhamento: (A) Raman Stokes; (B) Rayleigh; (C) Raman Anti-Stoke. Tipos de espalhamento [41].

Na espectroscopia Raman, quando um espectro é obtido, diz-se que o espalhamento Raman é ativo. Para tal, a interação da radiação incidente com as moléculas deve satisfazer a regra de seleção no efeito Raman, na qual a polarizabilidade molecular deve variar quando há vibração da molécula [19].

A luz espalhada é coletada por um espectrômetro (Raman e Rayleigh) o sinal que chega ao detector é convertido na forma de espectro, onde a intensidade é dada em função da sua mudança de frequência. Os espectros Raman são respostas dos modos normais de vibração de uma substância que são visualizados na forma de bandas e picos para cada região espectral.

Quando ocorre interação da radiação com a matéria o campo elétrico incidido influencia as distribuições de carga positiva e negativa da molécula, causando uma deformação em sua nuvem eletrônica. Assim, o campo elétrico da radiação incidente $\vec{E}$ pode induzir um momento de dipolo $\vec{p}$ na molécula, dado por:

$$\vec{\boldsymbol{p}} = \alpha \vec{\boldsymbol{E}}. \quad (2.2)$$

Sendo α a polarizabilidade da molécula.

A polarizabilidade tem um papel fundamental no estudo da espectroscopia Raman, pois quando ocorre uma excitação vibracional durante a colisão fóton-molécula, a molécula será alongada ou comprimida pela radiação incidente, o que leva à variação do controle dos núcleos moleculares sobre os elétrons, com isso a polarizabilidade também é variada [10].

2.7 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

Análises térmicas são essenciais no conhecimento do comportamento térmico de um material, pois monitora-se mudanças em suas propriedades físicas e químicas e/ou seus produtos de reação em função da temperatura e do tempo, enquanto o material é submetido a uma programação controlada de temperatura [8].

O uso de análises térmicas em materiais sólidos abrange o estudo de reações de estado sólido, transições de fase, decomposições térmicas dentre outras propriedades [51].

Existem diversas técnicas de análises térmicas como, por exemplo, a Análise Térmica Diferencial (DTA) que detecta basicamente alterações na variação de calor, a Termogravimetria (TG) que investiga a massa de uma amostra em função do tempo e da temperatura e a Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) que afere quantitativamente as variações de entalpia com variação de temperatura [20].

Neste trabalho, foi escolhido utilizar a técnica de Calorimetria Diferencial de Varredura por fluxo de calor, com o intuito de analisar transições de fase no L-Leucina, que trataremos a seguir.

A DSC por fluxo de calor é uma técnica de análise térmica que registra a diferença entre a absorção de energia por um material e uma referência quando submetidos ao mesmo programa de temperatura controlada. Essa mudança é monitorada como variações no fluxo de calor medido por sensores térmicos posicionados próximos ao material e a referência. Quando o material sofre uma transição, implica uma variação de entalpia.

As transições de primeira ordem expressam variações de entalpia endotérmica ou exotérmica e dão origem à formação de pico. O ponto que marca o pico referente às transições de primeira ordem é denominado $T_{Transição}$. As transições de segunda ordem são caracterizadas por variações na capacidade calorífera, não havendo variação de entalpia. Essas transições não dão origem a picos nas curvas de DSC, mas geram deslocamentos na linha de base [52]. A Figura 2.20 ilustra as principais características encontradas em termogramas resultantes de uma análise de DSC, na qual é estudado o fluxo de calor em função da temperatura.

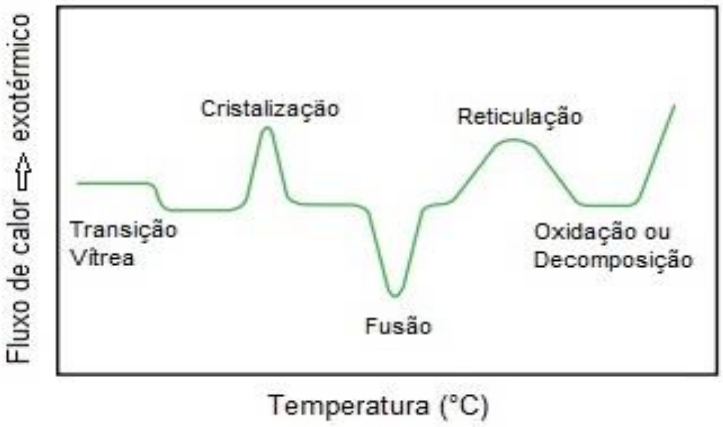

Figura 2.20: Curva característica de DSC mostrando picos de transições de primeira e segunda ordem [53].

O funcionamento do DSC por fluxo de calor ocorre basicamente de forma que a amostra e a referência são dispostas sobre uma placa condutora e ambas aquecidas pela mesma fonte de calor. Neste sistema, a cada reação o fluxo de calor é determinado pela placa condutora e medido por sensores térmicos que captam a diferença de capacidade térmica entre a amostra e a referência. Um esquema está apresentado na Figura 2.21.

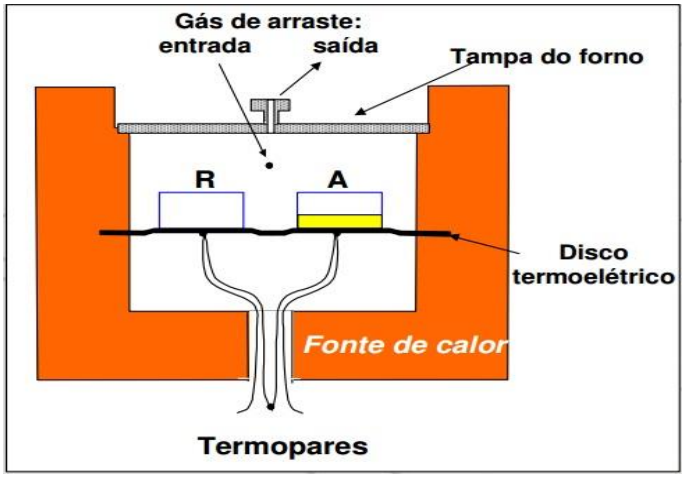

Figura 2.21: Esquema de um analisador térmico de DSC por fluxo de calor [54].

2.8 Difratometria de Raios-X (DRX)

A Difratometria de Raios-X (DRX) é uma técnica elementar na identificação e caracterização de estruturas de compostos cristalinos. A partir dela, podem-se estudar com detalhes as características que compõe um material cristalino, como a identificação de fases, os parâmetros de rede e distâncias Inter atômicas [20].

Quando um feixe de Raios-X com frequência conhecida incide sobre uma rede cristalina em que o comprimento de onda (λ) é da mesma ordem que os espaçamentos entre os átomos da rede acontecem os fenômenos de interferência construtiva e destrutiva [20, 55].

A interferência construtiva somente ocorrerá se para cada feixe a diferença das distâncias percorridas for um múltiplo inteiro do comprimento de onda (λ), satisfazendo assim, a lei de Bragg. O feixe difratado pelo segundo plano de átomos percorre uma distância a mais que o feixe difratado pelo primeiro plano de átomos, dada por $\overline{PO} + \overline{OQ}$ (Figura 2.22). Matematicamente [55], podemos escrever a condição de Bragg como:

$$\overline{PO} + \overline{OQ} = 2d_{hkl} sen\theta = m\lambda \qquad (2.3)$$

Sendo d_{hkl} a distância interplanar, λ o comprimento de onda incidente, θ o ângulo de Bragg e m a ordem de difração ($m = 1,2,3, ...$).

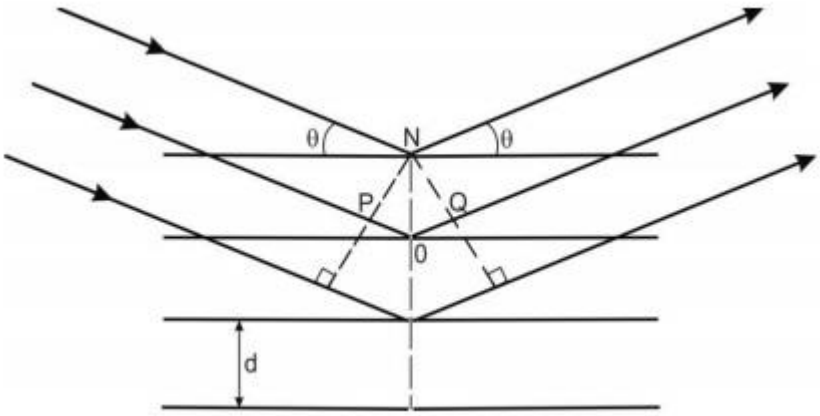

Figura 2.22: Difração dos feixes de raio-X para um cristal [20].

O funcionamento do difratômetro de Raios-X (Figura 2.23) depende da forma que a fonte S gera o feixe de Raios-X que passa pelo colimador A e incide na amostra C que se encontra sobre o suporte H. Por consequência, a amostra é rotacionada em torno do eixo O perpendicular ao plano da Figura 2.23.

O feixe difratado passa pelos colimadores B e F e incide no detector G, localizado sobre o suporte E. Os suportes E e H são anexados mecanicamente de forma que o movimento de 2θ graus do detector é acompanhado pela rotação de θ graus da amostra. Toda faixa de ângulos pode ser varrida pelo contador com velocidade constante, ou o mesmo pode ser posicionado em uma posição desejada.

A intensidade do feixe difratado é aferida pelo contador que pode ser um contador Geiger, proporcional, de cintilação ou um semicondutor [20].

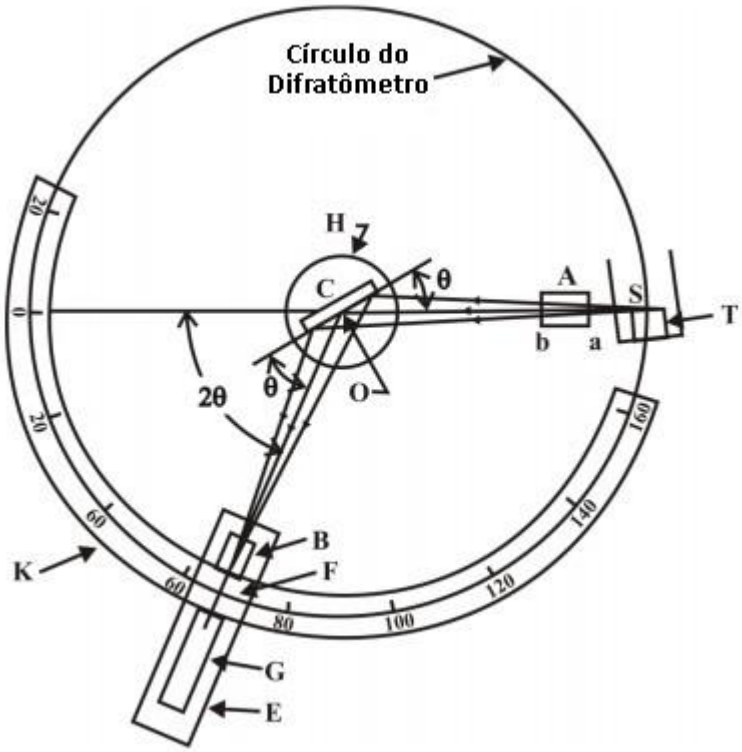

Figura 2.23: Representação de um difratômetro de Raios-X [20].

3 MATERIAL E MÉTODOS

Para as análises com as técnicas de Espectroscopia Raman, DSC e DRX foi utilizado o aminoácido L-Leucina (BioUltra) com grau de pureza ≥ 99,5% na forma de pó policristal.

3.1 Espectroscopia Raman

As análises de espectroscopia Raman foram realizadas em um microscópio Raman confocal (SENTERRA, Bruker, Alemanha) equipado com três lasers de excitação (532 nm, 633 nm e 785 nm) e uma plataforma motorizada com movimentos nos eixos xyz, pertencente ao Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP-UEM).

Por ser um microscópio confocal, deve-se destacar que somente a radiação dispersada pela área focada é detectada (plano confocal 2). Isso elimina a radiação dispersada por uma área menos focada (plano confocal 1), pois estas são bloqueadas pela abertura confocal. A abertura confocal pode ser na forma orifício ou fenda retangular. Um esquema do modelo confocal está apresentado na (Figura 3.1(b)).

Para efetuar as medidas foi selecionado o laser excitação de 532 nm, para minimizar efeitos de luminescência, com potência nominal de 20 mW sendo focado na amostra por uma lente de magnitude de 20 x. Por esta mesma lente o espalhamento Raman é coletado e conduzido ao detector, uma câmera CCD refrigerada à 65 ºC. A abertura confocal selecionada foi uma fenda retangular de 25x1000 µm. A aquisição foi realizada utilizando o programa de OPUS 7.2 configurado com 3 s de tempo de integração, 20 varreduras, resolução espectral de 9-15 cm^{-1} na região entre 4000-400 cm^{-1}. Os espectros obtidos são uma média das varreduras programadas. O tratamento matemático em todos os espectros foi realizado utilizando o programa gráfico.

Para as medidas em função da temperatura foi utilizado o sistema de controle de temperatura (T95, Linkam Scientific, Reino Unido) compatível com o microscópio Raman confocal (Figura 3.2), composto com sensores de gás e de umidade. A amostra foi condicionada na câmara com janelas de quartzo e refrigerada à nitrogênio líquido. O intervalo de temperatura medido foi entre -60°C a 200°C.

Foram executadas medidas aquecendo a amostra e posteriormente resfriando-a a uma taxa de 10°C/min. Para ambos os processos o sistema foi estabilizado por 6 minutos a cada 10°C variados. As medidas em temperatura ambiente (~21ºC) foram realizadas sem a câmara de temperatura. A aquisição dos espectros Raman em função da temperatura foi obtida utilizando o programa Linkys 32 [56].

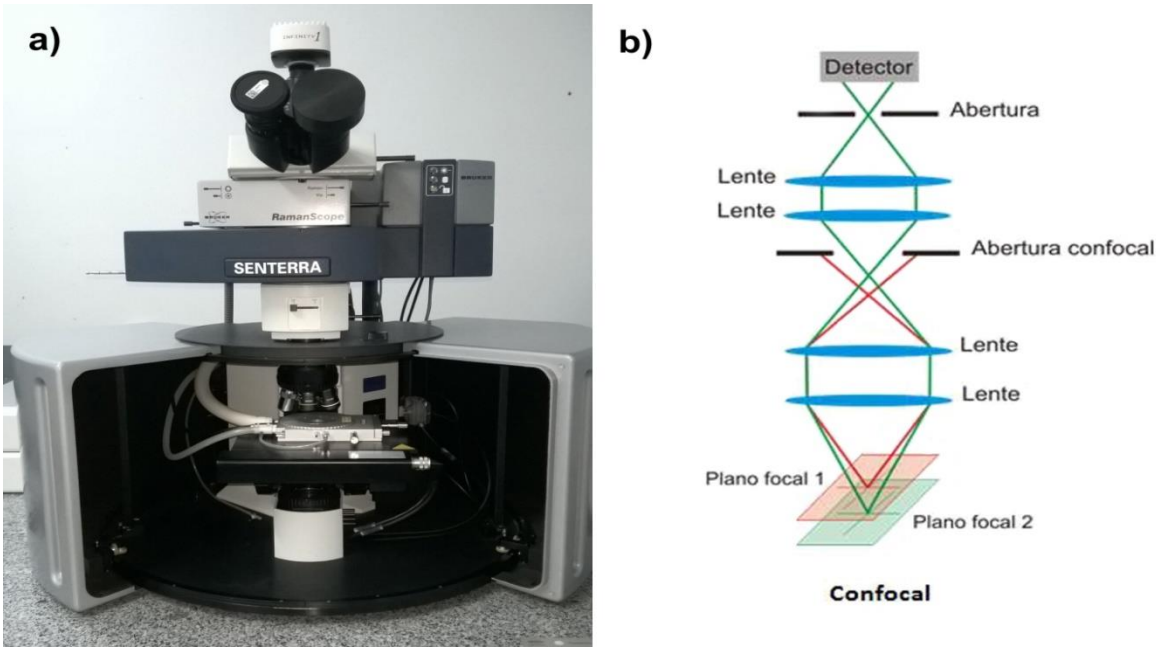

Figura 3.1: (a) Espectrômetro confocal Senterra. (b) Figura esquemática do sistema confocal de captação de radiação [57].

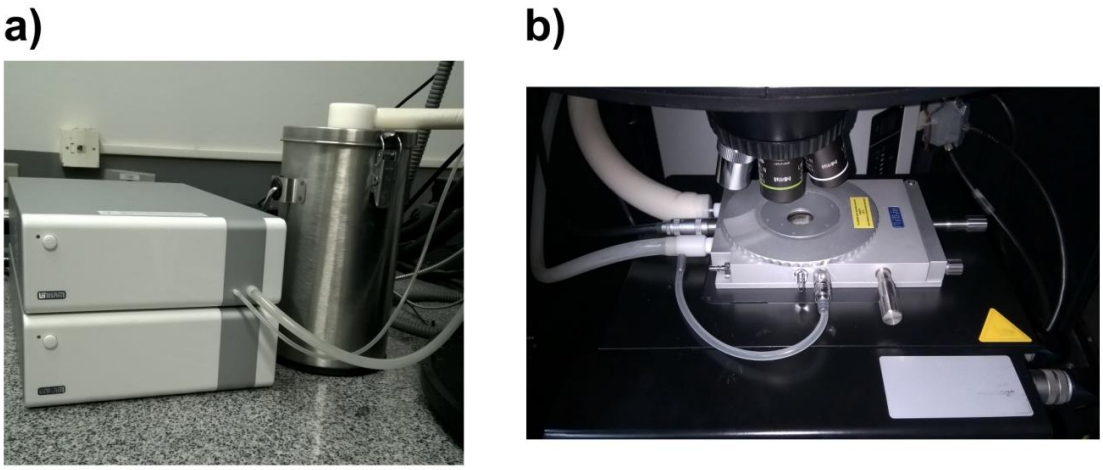

Figura 3.2: (a) Controlador de temperatura T95, fonte e reservatório de nitrogênio líquido. (b) Câmara de temperatura acoplado ao microscópio.

3.2 DSC

As medidas foram realizadas em um calorímetro (Q20, TA instruments, USA) pelo Professor Dr. Guilherme Miranda Pereira, Grupo GMPC do Departamento de Química no COMCAP-UEM. A amostra, condicionada em um porta amostra de alumina, foi submetida a uma taxa de aquecimento de 10°C/min, num intervalo entre -60°C a 200°C com processo de aquecimento e resfriamento da amostra. A atmosfera de aquecimento foi controlada com um fluxo de ar de 50 ml/min.

3.3 DRX

As medidas foram realizadas em um difratômetro de Raios-X (D8 Advanced, Bruker, Alemanha) pertencente também ao COMCAP-UEM, com radiação CuKα na amostra em pó sobre porta amostra de plástico, no intervalo de 2θ de 5° a 45° e passos de 0,01º. Primeiramente foram realizadas medidas em temperatura ambiente (~21 ºC) com velocidade de varredura de 1,37 º/min. Posteriormente a amostra foi condicionada em uma câmara de temperatura controlada (XRD-900, Anton Paar) no intervalo de temperatura entre 30 °C a 120 °C e velocidade de varredura de 1 º/min com 0,5 s de interação por ponto. Não foi realizada análise por refinamento estrutural, sendo os difratogramas obtidos comparados a ficha padrão 00-030-1779-JCPDS.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo é dedicado a apresentação dos resultados de transição de fase no aminoácido L-Leucina em função da temperatura utilizando espectroscopia Raman, e para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos foram também utilizadas as técnicas de DSC e DRX. O L-Leucina foi caracterizado em temperatura ambiente para as técnicas de Raman e DRX. Os símbolos utilizados para os modos vibracionais descritos para o L-Leucina se encontram na lista de símbolos.

4.1 Caracterização do policristal de L-Leucina em temperatura ambiente (~21ºC) por Espectroscopia Raman

A caracterização do policristal de L-Leucina se deu no emprego da técnica de Micro-Raman à temperatura ambiente (21ºC), na qual os espectros referem-se aos modos vibracionais da amostra [59,60]. Foi possível identificar os modos vibracionais relacionados a importantes grupos funcionais, tais como, CH, CH_2, CH_3, NH_3, CO_2 que, em geral, são encontrados nos aminoácidos de cadeia alifática.

Na Figura 4.1 está apresentado um espectro Rama do policristal de L-Leucina à temperatura ambiente, na região de 3200 a 80 cm^{-1}. Nas Figuras 4.2, 4.3 e 4.4 estão apresentados os espectros divididos nas regiões de 3200 a 2600 cm^{-1}, de 1800 a 800 cm^{-1} e 800 a 80 cm^{-1}, respectivamente.

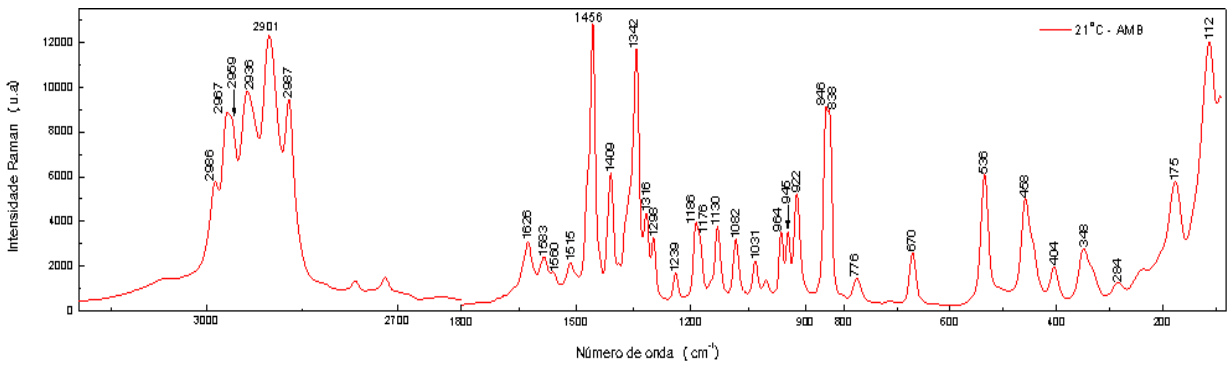

Figura 4.1: Espectro Raman geral do aminoácido L-Leucina (L-LEU) à temperatura ambiente (21°C) na região de 3200 a 80 cm^{-1}.

Na região de altas frequências (Figura 4.2) pode-se destacar as bandas associadas as vibrações do tipo estiramento de CH (ν CH) e CH_3 (ν CH_3) [58]. As

bandas observadas em 2986 e 2967 cm^{-1} são atribuídas ao estiramento assimétrico do CH_3 (ν_{as} CH_3), enquanto que as bandas em 2901 e 2870 cm^{-1} estão associadas ao estiramento simétrico do CH_3 (ν_s CH_3). As bandas em 2959 e 2936 cm^{-1} estão relacionadas com os estiramentos de CH (ν CH) [58].

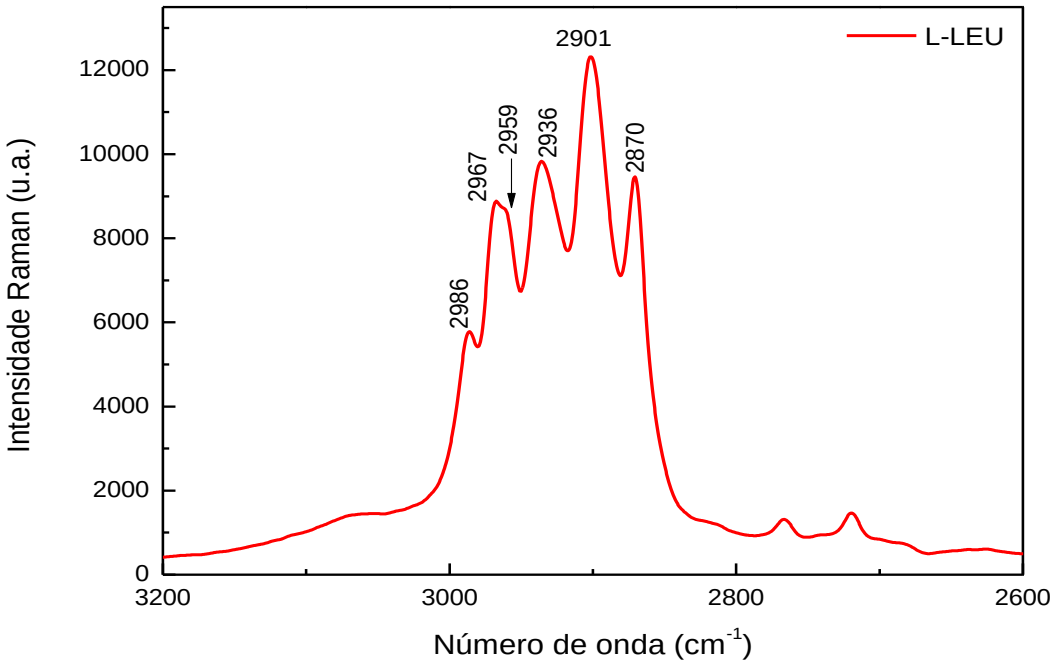

Figura 4.2: Espectro Raman do aminoácido L-Leucina (L-LEU) à temperatura ambiente (21°) na região de 3200 a 2600 cm^{-1}.

Na Figura 4.3 está apresentado o espectro Raman do L-Leucina para a região compreendida entre 1800 a 800 cm^{-1}. Destacam-se as bandas de 1626, 1583 e 1560 cm^{-1} referentes aos modos vibracionais associados ao estiramento de CO_2^- (ν CO_2^-) [59]. A banda de 1456 cm^{-1} corresponde a deformação angular assimétrica de CH_3 (δ_{as} CH_3) ao passo que em 1409 cm^{-1} é associada a deformação angular simétrica de CH_3 (δ_s CH_3) [59]. A maioria das bandas compreendidas entre a região de 1375 a 1300 cm^{-1} são associadas a deformação angular da unidade CH (δ CH) [59]. Em 1239 cm^{-1} foi identificado o modo vibracional correspondente à torção do CH_2 (τ CH_2). Já em 1186, 1176 e 1130 cm^{-1} foram verificadas as bandas relacionadas a deformação angular do tipo balanço do NH_3^+ (r NH_3) que refere-se ao grupo amida presente nos aminoácidos e proteínas [2]. A região espectral compreendida entre 1100 a 900 cm^{-1}

é caracterizada por bandas associadas ao estiramento das unidades CC (ν C-C) e CN (ν C-N) [58]. As duas bandas em 846 e 838 cm^{-1} são caracterizadas, respectivamente, por deformação angular do tipo balanço do CH_3 (r CH_3) e por deformação angular fora do plano de CO_2^- (γ CO_2^-) [59].

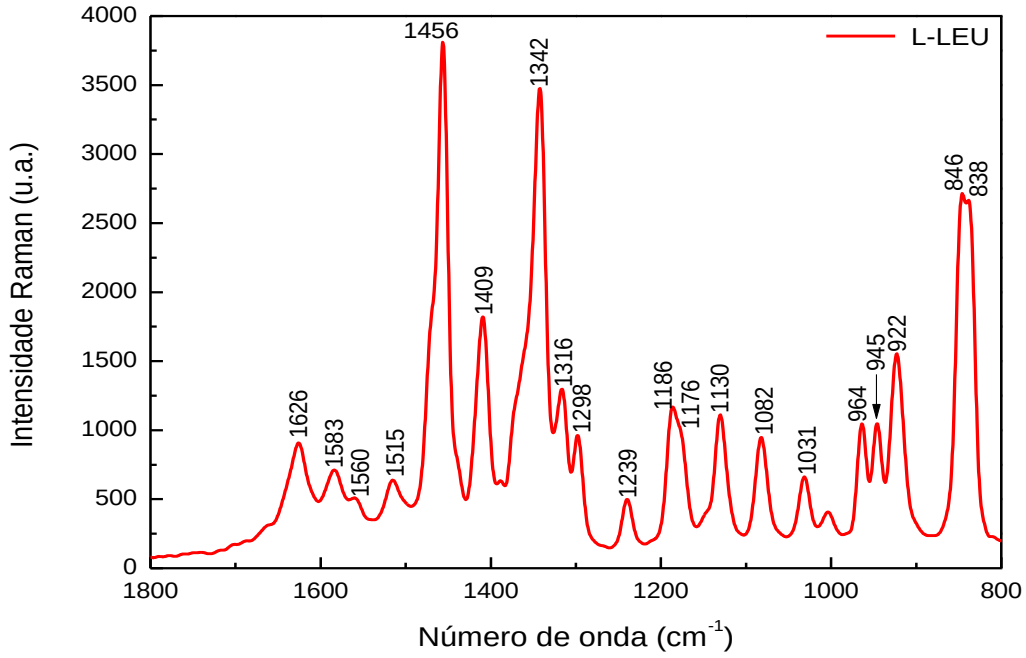

Figura 4.3: Espectro Raman do aminoácido L-Leucina (L-LEU) à temperatura ambiente (21°) na região de 1800 a 800 cm^{-1}.

Para baixas frequências (Figura 4.4), geralmente quando se tem número de onda abaixo de 150 cm^{-1} são atribuídos as bandas Raman, modos vibracionais de rede, que são modos em que todos os átomos presentes na célula unitária do cristal em questão, vibram em conjunto [16].

De acordo com a literatura para a região no intervalo de 800 a 80 cm^{-1} pode-se verificar transição de fase estrutural [39]. No espectro Raman do aminoácido L-Leucina foram identificadas as banda em 112 cm^{-1} associada ao modo de rede da estrutura do policristal [16], bandas acima de 150 cm^{-1} em que destacam-se as bandas presentes em 175 cm^{-1} atribuída às torções da unidade CO_2^- (τ CO_2^-) e em 284 cm^{-1} da unidade CH_3 (τ CH_3) [59]. Foram caracterizadas também as bandas em 458, 404

e 348 cm^{-1} que referem-se às deformações estruturais do esqueleto[8] da molécula (δ esqueleto). Ressalta-se que em 458 cm^{-1} foi identificada uma torção da unidade NH_3^+ (τ NH_3^+). Entretanto, esta característica é encontrada em todos os aminoácidos para esta região espectral [16, 61].

Encontram-se ainda as bandas 670 e 536 cm^{-1} com fortes intensidades, referentes aos modos vibracionais de deformação angular do tipo abano e balanço da unidade CO_2^- (w CO_2^- e r CO_2^-) [59].

Os centros das bandas obtidas e todas as atribuições discutidas acima estão exibidos naTabela 4.1 a seguir.

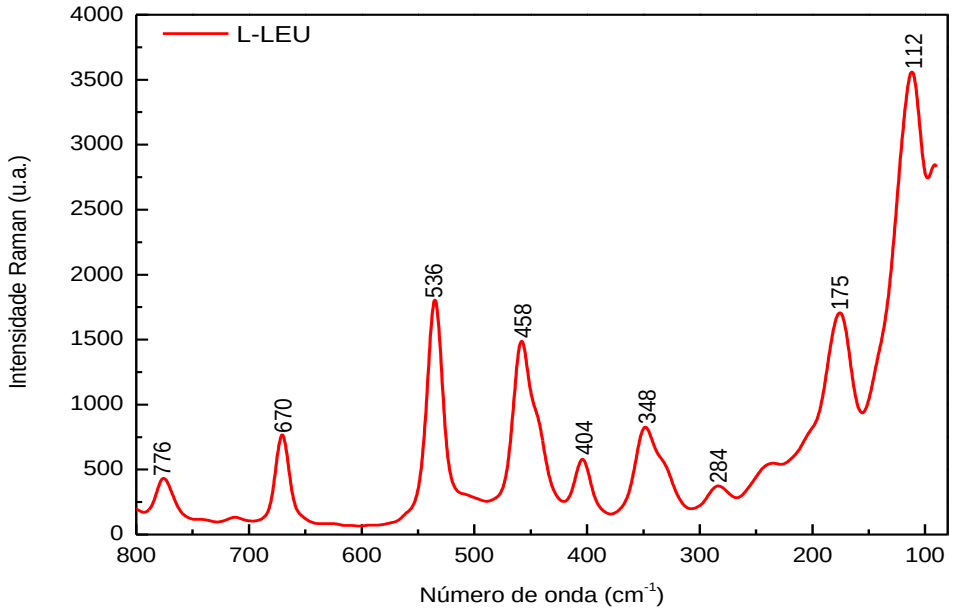

Figura 4.4: Espectro Raman do aminoácido L-Leucina (L-LEU) à temperatura ambiente (21°) na região de 800 a 80 cm^{-1}.

[8] O esqueleto de uma molécula representa a maior cadeia de ligações de átomos consecutivos presentes na molécula [30].

Tabela 4.1: Atribuição dos modos vibracionais do policristal de L-LEUCINA a temperatura ambiente (21°).

Centro da banda	Centro da banda obtido na literatura (cm^{-1})	Atribuição
2986	2990 [58]	ν_{as} (CH_3)
2967	2971 [58]	ν_{as} (CH_3)
2959	2959 [58]	ν (CH)
2936	2939 [58]	ν (CH)
2901	2900 [58]	ν_s (CH_3)
2870	2871 [58]	ν_s (CH_3)
1626	1623 [59]	vw; ν(CO_2^-)
1583	1583 [59]	vw; ν (CO_2^-)
1560	1560 [58]	vw; ν (CO_2^-)
1515	1514 [59]	Vw
1456	1457 [59]	m; δ_{as} (CH_3)
1409	1410 [59]	w; δ_s (CH_3)
1342	1342 [59]	m; δ (CH)
1316	1315 [59]	Vw
1298	1296 [59]	Vw
1239	1240 [58]	vw; τ (CH_2)
1186	1187 [59,60]	w; r (NH_3^+)
1176	1178 [59]	w; r (NH_3^+)
1130	1131 [59,60]	w; r (NH_3^+)
1082	1083 [59,60]	w; ν (CN)
1031	1032 [58]	vw; ν (CN)
964	965 [58]	w; ν (CC)
945	947 [58]	w; ν (CC)
922	926 [58]	w; ν (CC)
846	849 [58]	m; r (CH_3)
838	838 [58]	m; γ (CO_2^-)
776	777 [58]	vw; δ (CO_2^-)
670	671 [58]	w; w (CO_2^-)
536	536 [58]	r (CO_2^-)
458	460 [58]	δ (esqueleto) + τ (NH_3^+)
404	445 [58]	δ (esqueleto)
348	348 [16]	δ (esqueleto)
284	348 [16]	τ (CH_3)
175	175 [16]	τ (CO_2^-)
112	112 [16]	Modos de rede

Símbolos: ν: estiramento; δ: deformação angular; τ: torção; γ: deformação angular fora do plano; r: balanço; w: abano; s: simétrico; as: assimétrico; w: fraco; vw: muito fraco.

4.2 Análise Termica DSC e DTA

Na Figura 4.5 estão exibidos os termogramas do policristal de L-Leucina. O intervalo de temperatura utilizado foi de -60 °C a 190 °C e foram efetuados os processos de aquecimento (Figura 4.5 (A)) e de resfriamento (Figura 4.5 (B)) da amostra. As linhas tracejadas em preto, indicadas na Figura 4.5, mostram as temperaturas de T_{onset} e T_{offset} obtidas da intersecção com a linha de tendência (em verde) da linha de base.

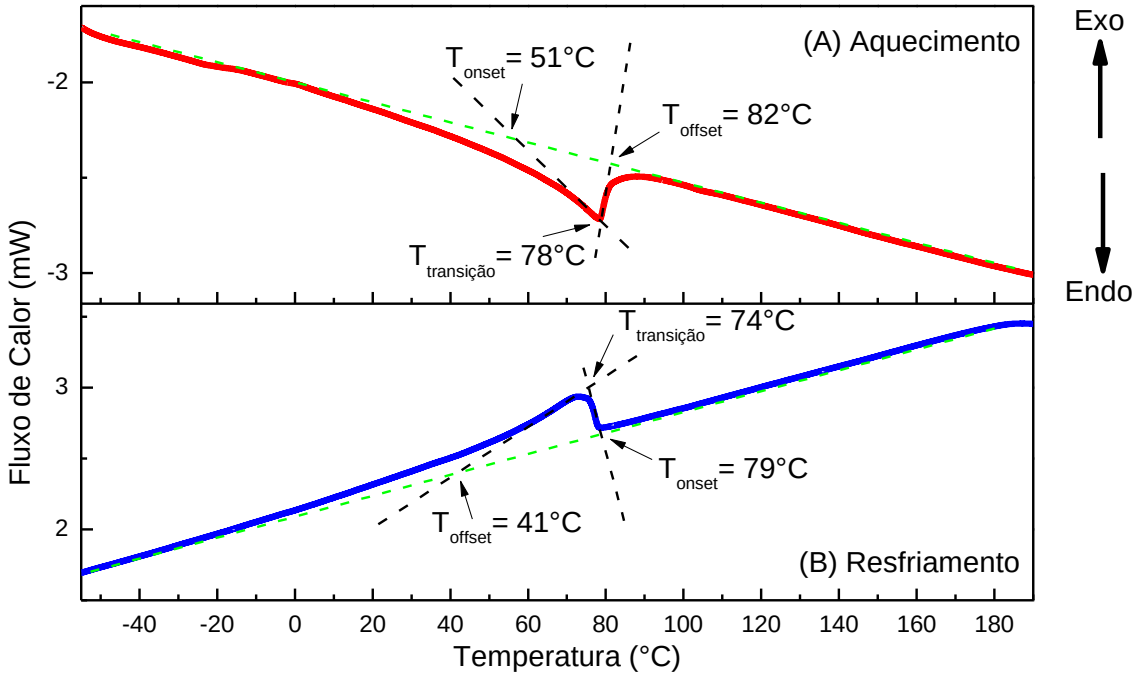

Figura 4.5: Termograma do aminoácido L-Leucina com variação térmica de -60 °C a 190 °C: (A) Aquecimento e (B) Resfriamento.

Analisando os termogramas, verificou-se que para o processo de aquecimento foi observada uma temperatura máxima no pico endotérmico, $T_{transição}$ em aproximadamente 78 °C, que está de acordo com a literatura encontrada para valores de transição de primeira ordem do L-Leucina [32,38]. Outro aspecto observado foi o início da transição, T_{onset}, que se dá em aproximadamente 51 °C e o seu fim, T_{offset}, em aproximadamente 82 °C. No processo de resfriamento tem-se que a temperatura

máxima no pico exotérmico, $T_{transição,}$ se encontra em aproximadamente 74 °C com início da transição, T_{onset}, em aproximadamente 79 °C e final, T_{offset}, em 41 °C.

Sabe-se, de acordo com a literatura, que o intervalo de decomposição térmica dos aminoácidos de cadeia alifática se encontra aproximadamente entre 160 °C a 370 °C e para o L-Leucina este intervalo está compreendido entre 207 °C a 342 °C, com ponto de fusão em 305,8 °C [60]. Confirmando estes valores, medidas de DTA foram realizadas juntamente com as medidas de DSC, em que, verificou-se perda de massa do policristal de L-Leucina entre 281 °C e 336 °C Figura 4.6. Desta maneira, no intervalo de temperatura estudado no Raman (-60 à 180 ºC) não há processos de decomposição do L-Leucina.

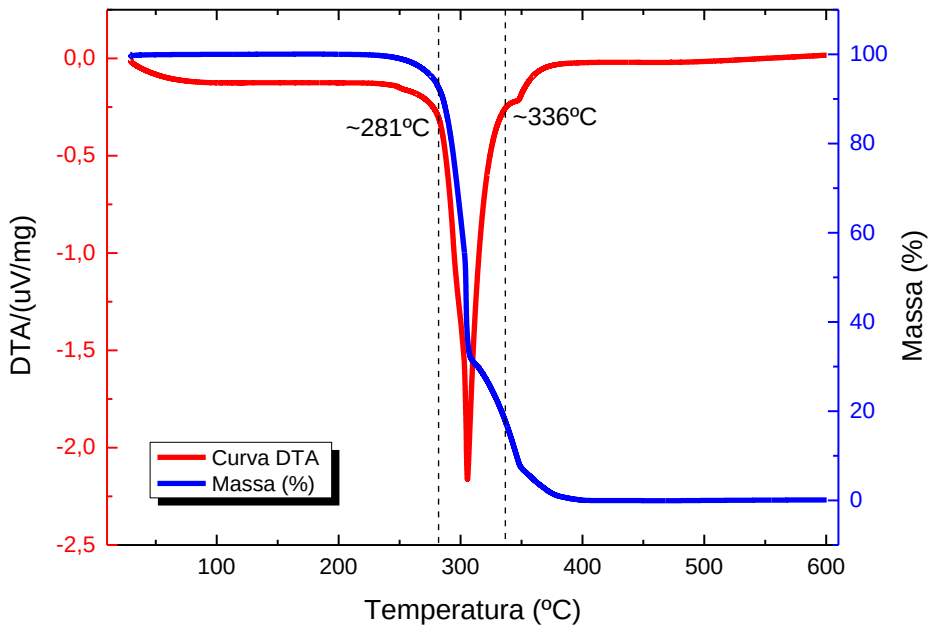

Figura 4.6: Termograma com intervalo de decomposição térmica do aminoácido L-Leucina compreendido entre 281 ºC e 336 ºC.

Os termogramas mostram que a $T_{transição}$ (Figura 4.5) tanto para o aquecimento como para o resfriamento, são as mesmas nas quais foram observadas mudanças nos espectros Raman, e ainda confirmam que o efeito térmico é reversível. Estas mudanças espectrais não estariam mostrando mudança estrutural, mas sim pequenas

deformações na molécula, sem a quebra de nenhuma estrutura ou ligação, devido à variação de volume na célula unitária.

É razoável admitir que para temperaturas acima da $T_{transição}$ a célula unitária do L-Leucina esteja sofrendo uma expansão e para baixas temperaturas uma contração, desta maneira os modos de vibração ficam comprometidos, sendo os da rede menos afetados do que os modos internos das molécula, isto porque as interações são mais fracas para os modos internos, que para o L-Leucina envolvem muito mais modos de estiramento e deformações, do que torções que estão mais associados aos modos de vibração da rede.

Uma interpretação dos resultados de Raman, para o policristal em função da temperatura, em termos da célula unitária é plausível, por esta ser a menor unidade que se repete e que possui todas as características de simetria da estrutura cristalina, sendo assim foram realizadas medidas de difratometria de Raios-X (DRX) em função da temperatura, já que esta técnica propicia informações para o entendimento das propriedades estruturais de um material cristalino como formação de fases, identificação dos planos cristalográficos, parâmetros de rede, intensidade, distância entre planos, dentre outras características [21].

4.3 DRX em temperatura ambiente (~21°C)

Na Figura 4.7 (A) é mostrado o difratograma do policristal de L-Leucina em temperatura ambiente com ângulo interplanar 2θ entre 5° e 45° e seus respectivos índices de Miller (hkl). As reflexões na Figura 4.7 (B) são referentes à ficha padrão 00-030-1779-JCPDS obtida pelo programa X´ExpertHighScore[9]. A identificação da fase foi realizada por comparação à ficha. Observa-se a fase do L-Leucina ($C_6H_{13}NO_2$) referente à estrutura monoclínica de grupo espacial P_{21}. As intensidades (Figura 4.7 (A)) mostram que o L-Leucina deste trabalho apresenta direção preferencial com relação ao eixo *c*. Um dos possíveis motivos para esta escolha preferencial pela amostra pode ser devido a forma de preparação da amostra que foi utilizada pura, em pó e na forma de policristal. Não foram realizados os procedimentos de moagem e peneiramento.

[9]Programa gratuito, disponível em: http://www.panalytical.com/Xray-diffraction-software/HighScore.htm

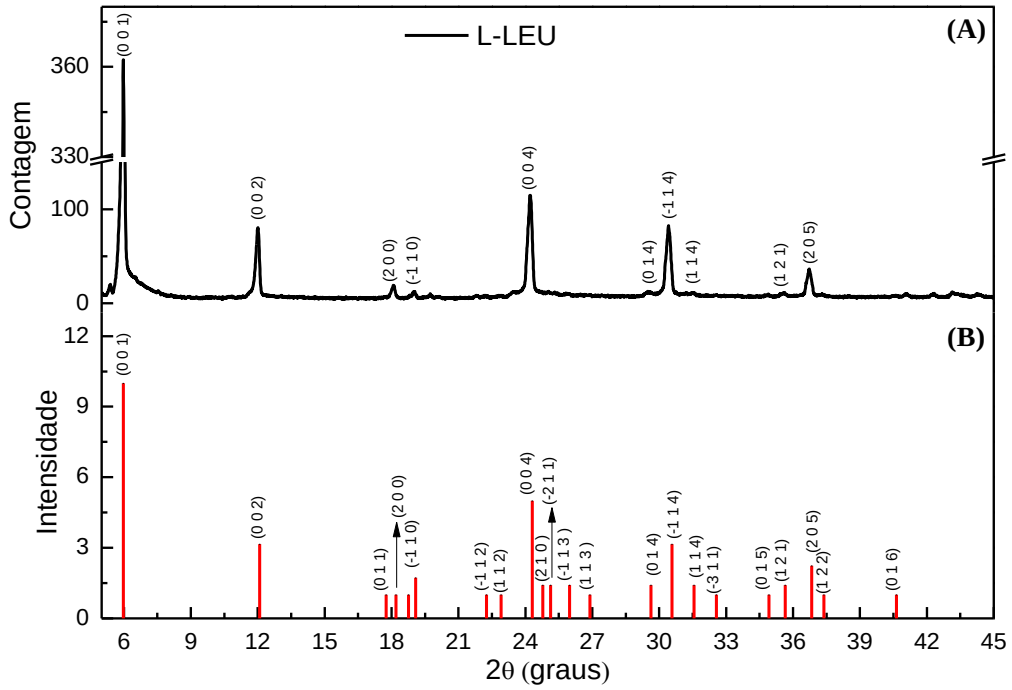

Figura 4.7: (A) Difratograma de raios-X do L-Leucina em temperatura ambiente (~21 °C); (B) Linhas de difração referentes à ficha padrão JCPDS: 00-030-1779.

4.4 Espectroscopia Raman do L-Leucina em função de temperatura

Nas Figuras 4.8 e 4.9 estão apresentados os espectros Raman, de 3100 a 80 cm^{-1}, durante os processos de aquecimento e o resfriamento do L-Leucina, respectivamente. O intervalo de temperatura foi de -60º a 180 ºC variando à uma taxa de 10 ºC a cada medida. O aquecimento e o resfriamento foram realizados sem remover a amostra da câmara de temperatura, primeiramente foi realizada uma medida em temperatura ambiente (~21°C), e em seguida realizado o processo de aquecimento e posteriormente o resfriamento da amostra. A intenção de investigar o resfriamento foi verificar se as alterações espectrais seriam processos reversíveis ou não.

A escolha do intervalo de temperatura foi baseada nas medidas realizadas utilizando a técnica de DSC, utilizada para monitorar possíveis transições em uma amostra mediante variação térmica. Para melhor vizualização dos espectros Raman

em função da temperatura, em ambas, Figura 4.8 e 4.9, o número de curvas em função da temperatura foi reduzido.

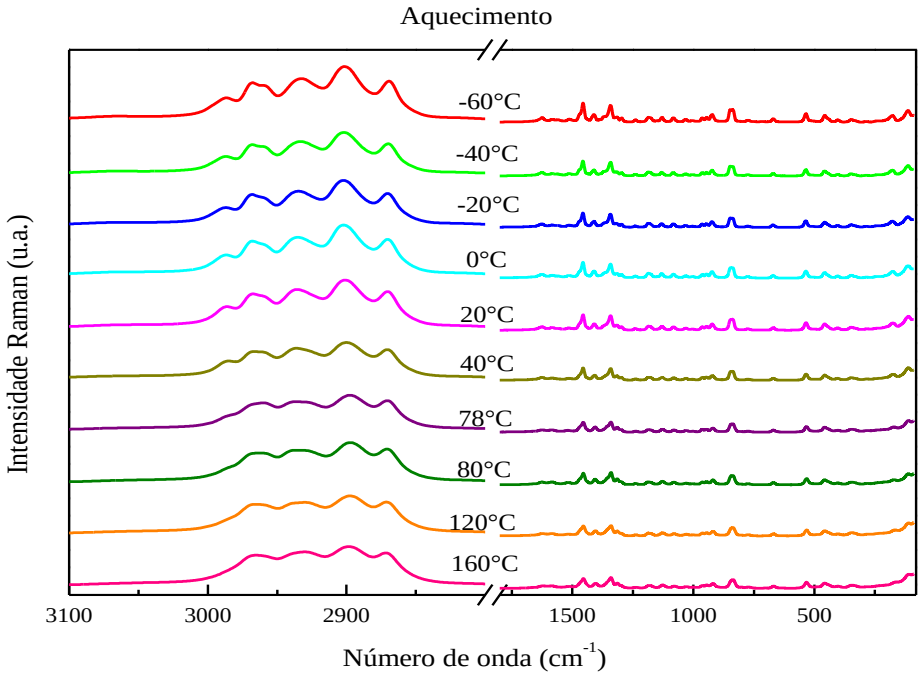

Figura 4.8: Espectros Raman do aminoácido L-Leucina sob variação de temperatura de -60 °C a 180 °C, na região espectral de 3100- 80 cm^{-1}.

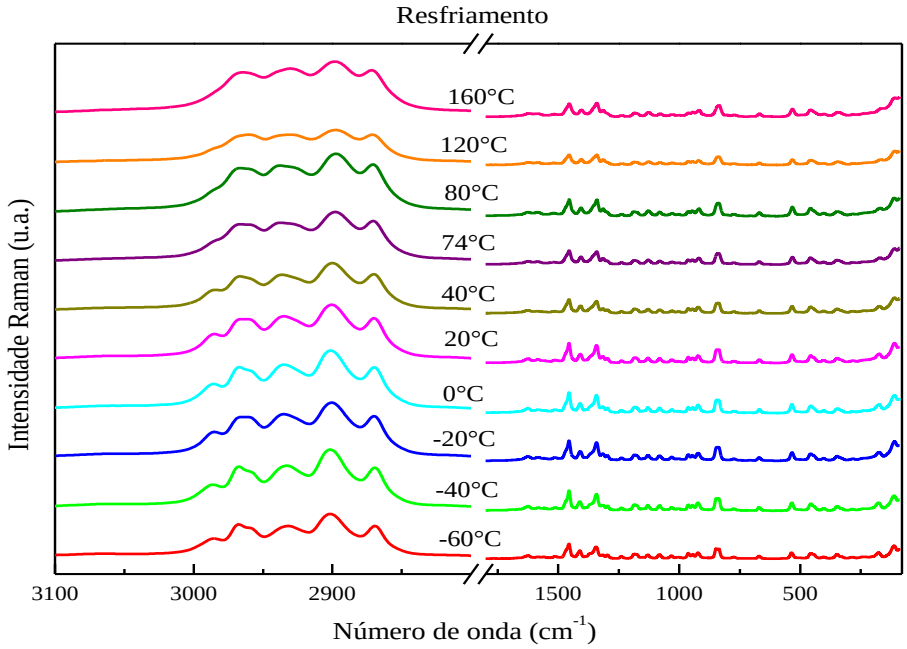

Figura 4.9: Espectros Raman do aminoácido L-Leucina sob variação de temperatura de 180 °C a -60 °C, na região espectral de 3100- 80 cm^{-1}.

Devido as sútis mudanças nas bandas Raman em função da temperatura, os espectros foram selecionados em regiões espectrais, apresentados nas Figura 4.10 e 4.11, para melhor visualização, tendo também seu número de espectros reduzido. Em destaque os espectros para as temperaturas de 78 ºC e 74 ºC para os processos de aquecimento e resfriamento, respectivamente, nas quais detectou-se o ínicio das mudanças espectrais, a estas temperaturas foram atribuídas o nome de temperatura de transição.

Foram observados comportamentos similares para os processos de aquecimento e resfriamento da amostra, com relação a deslocamento de bandas e aparecimento ou desaparecimento das bandas Raman. As variações de intensidade não foram investigadas neste trabalho. Para os picos em 2986, 2968, 2960, 1559, 1373 e 1150 cm^{-1}, sendo os três primeiros mostrados na Figura 4.10 e os demais na Figura 4.11, foi observado comportamento semelhantes.

Durante o aquecimento do L-Leucina estas bandas tornam-se cada vez menos expressivas, porém ao atingir a temperatura próxima à 78 ºC, praticamente desaparecem para as temperaturas superiores, sendo a maior temperatura de 180 ºC. Durante o resfriamento as bandas começam a reaparecer a partir de 74 ºC, com o centro próximo ao da temperatura ambiente, até atingir forma espectral similar as baixas temperaturas visualizadas no processo de aquecimento. Desta maneira, nota-se que o processo é reversível.

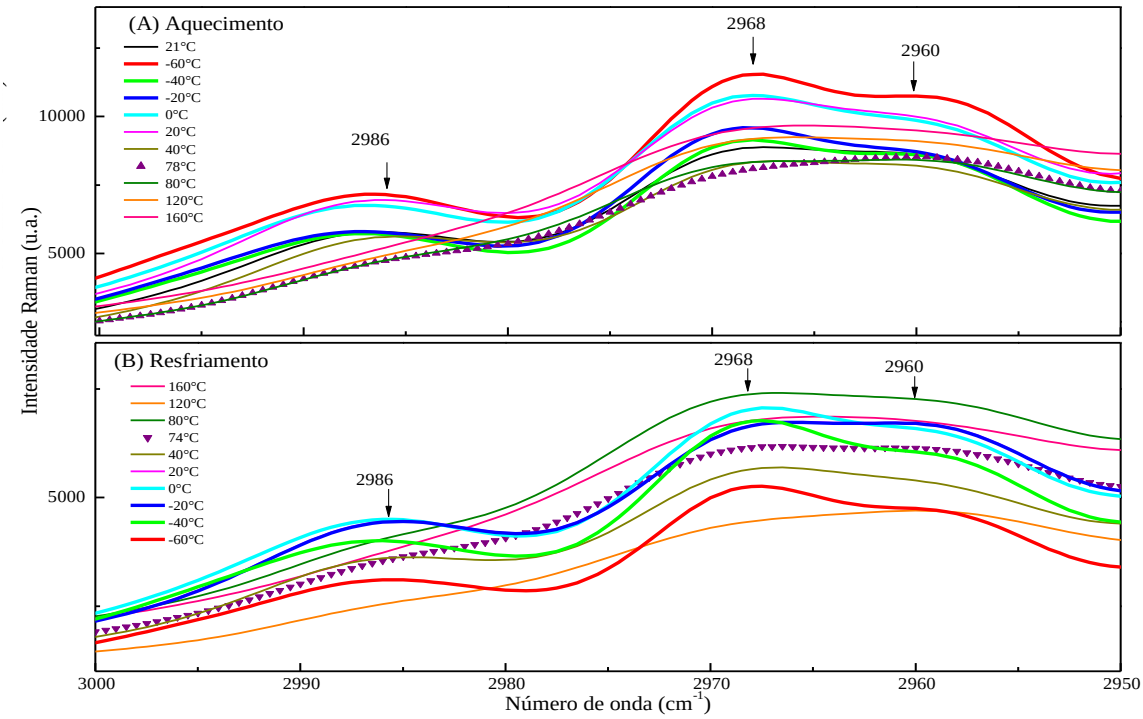

Figura 4.10: Espectros Raman do aminoácido L-Leucina em função da temperatura na região espectral de 3000 - 2950 cm^{-1}: (A) aquecimento e (B) resfriamento.

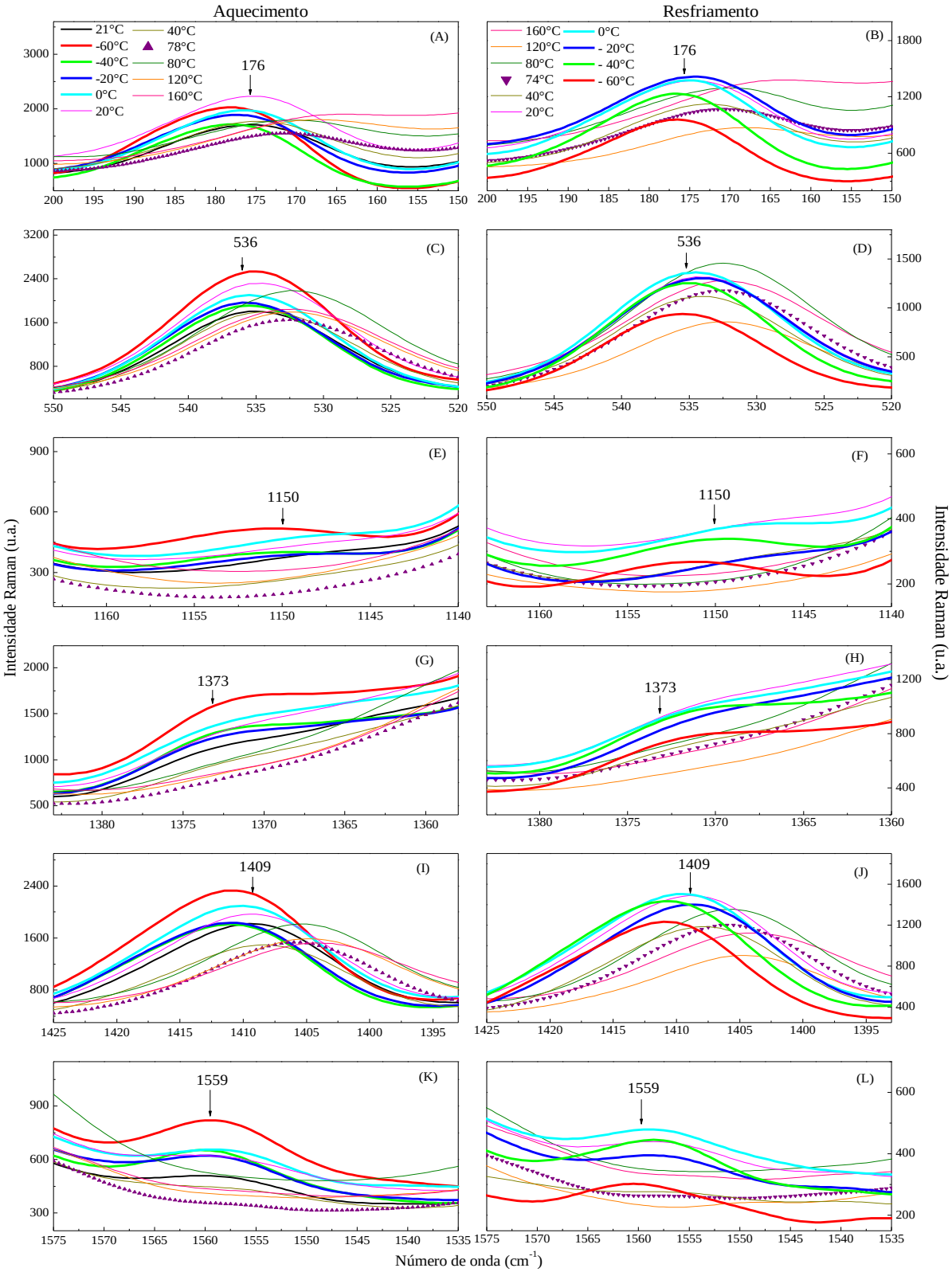

Figura 4.11: Espectros Raman do aminoácido L-Leucina em função da temperatura na região espectral de 1575 a 150 cm^{-1} : (A, C, E, G, I, K) aquecimento de -60 °C a 180 °C e (B, D, F, H, J, L) resfriamento de 180 °C a -60 °.

Foi observado a reversibilidade em função da temperatura também para os picos centrados em 176, 536 e 1409 cm^{-1} (Figura 4.11), porém nestes ao invés do desaparecimento das bandas houve deslocamento dos centros.

No aquecimento o deslocamento ocorreu para frequências menores a partir da temperatura de 78 ºC, e durante o resfriamento a partir de 74 ºC as bandas tenderam a retornar aos centros nos quais se localizavam nos espectros de baixa temperatura para o processo de aquecimento. As atribuições estão descritas na Tabela 4.1.

Para efeito de análise serão estudados os comportamentos das bandas Raman centradas em 176, 536, 2960 e 2986 cm^{-1} devido à estas terem expressado modificações mais significativas com a variação de temperatura.

À vista dos comportamentos observados para baixas temperaturas o comportamento do L-Leucina se manteve estável e semelhante ao obtido à temperatura ambiente (~21 °C), sendo que as mudanças no comportamento vibracional do L-Leucina ocorreram mais facilmente para altas temperaturas, aproximadamente acima 76 °C.

As mudanças espectrais observadas em função da temperatura fornecem informações sobre a ativação ou inativação das bandas Raman, no caso do aparecimento ou desaparecimento de bandas, ou ainda sobre alteração de modo vibracional, relacionado ao deslocamento das bandas. Estas características indicam a existência de duas fases no L-Leucina, a primeira para baixa temperatura e a segunda para uma temperatura maior, sendo a temperatura de transição de uma fase para outra em torno de 76 ºC.

De acordo com a literatura [16], quando se estuda o comportamento vibracional para regiões de baixas frequências deve-se investigar a relação entre os modos internos e modos externos, este identificado para frequências abaixo de 150 cm^{-1}. Esta região foi investigada e próximo a temperatura de 80 °C (353 K), afirma-se ocorrer transição de fase estrutural no L-Leucina.

De modo geral, uma transição de fase envolve variação da energia interna do sistema analisado, a qual, usualmente, é estudada por calorimetria, pois esta fornece informações sobre transferências de calor do sistema para o meio das quais podem envolver calor latente (transição de primeira ordem) ou mudanças no calor específico (transição de segunda ordem).

Sendo assim para analisarmos as transições de fase observadas nos espectros Raman em função da temperatura foi realizada análise térmica do L-Leucina utilizando a calorimetria diferencial de varredura (DSC) que registra o fluxo de energia calorífica associado a transições de fase nos materiais em função da temperatura, estas medidas fornecem dados qualitativos e quantitativos dos processos endotérmicos e exotérmicos da amostra [51].

4.5 DRX em função de temperatura

Na Figura 4.12 estão os difratogramas do policristal de L-Leucina em função da temperatura, em destaque o pico em 2θ = 24° correspondente ao plano (0 0 4), o qual mostrou maior deslocamento com o aumento da temperatura. Os difratogramas foram obtidos variando-se a temperatura de 30 a 130 °C, sendo as medidas realizada a cada 10 ºC.

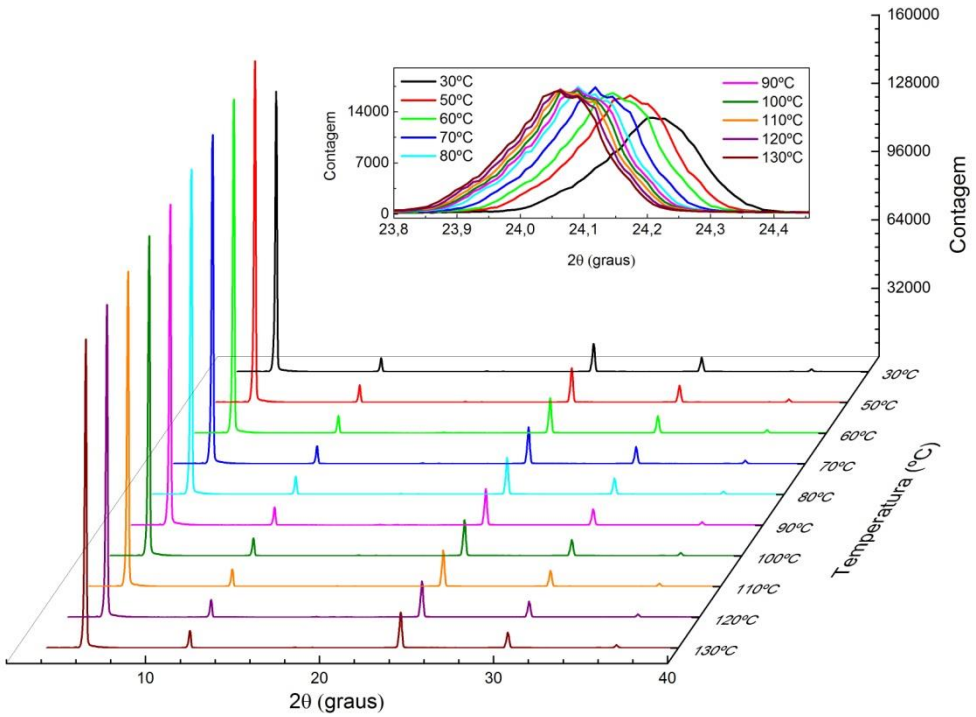

Figura 4.12: Difratogramas do policristal de L-Leucina com variação de temperatura de 30 a 130 °C. Em destaque o deslocamento do em 2θ = 24° correspondente ao plano (0 0 4).

Observou-se pelos difratogramas do L-Leucina em função da temperatura um maior deslocamento dos picos de difração relacionados ao parâmetro de rede *c*, enquanto que os picos relacionados aos parâmetros *a* e *b* não apresentaram deslocamento significativo. Nota-se que os picos de difração que se deslocam em função da temperatura estão alterando-se para a direção de menor θ.

Considerando a condição de difração de Bragg (Equação 2.3) podemos dizer que com o aumento da temperatura a distância interplanar dos planos cristalográficos no eixo *c* está aumentando. Não foi observada a presença de novos picos ou desaparecimento dos existentes mostrando que não há a formação de uma nova fase cristalina, corroborando mais uma vez com os dados de Raman e DSC que indicam transições de fase sem mudança da estrutura cristalina.

4.6 Análise da transição de fase do policristal de L-Leucina

Para buscar um melhor entendimento da transição de fase do L-Leucina em função da temperatura foi construída a Figura 4.13 (aquecimento), que mostra as variações dos centros das bandas Raman para alguns grupos funcionais presentes na cadeia principal (NH_3^+ e CO_2^-) e na cadeia lateral (CH e CH_3) do L-Leucina. Juntamente estão mostrados os termogramas do DSC para efeito de comparação.

Como se trata de transição de fase reversível, o mesmo comportamento foi observado para o processo de resfriamento, por isso o dado não está mostrado neste trabalho.

Verifica-se na Figura 4.13 a presença de três tipos diferentes de comportamentos dos centros das bandas Raman com relação a $T_{transição}$: 1) bandas que se tornam desprezíveis em altas temperaturas (2960 e 2986 cm^{-1}); 2) deslocamento do centro das bandas para menores energias em altas temperaturas (176 e 536 cm^{-1}); 3) bandas que permanecem invariantes em função da temperatura (1186 cm^{-1}).

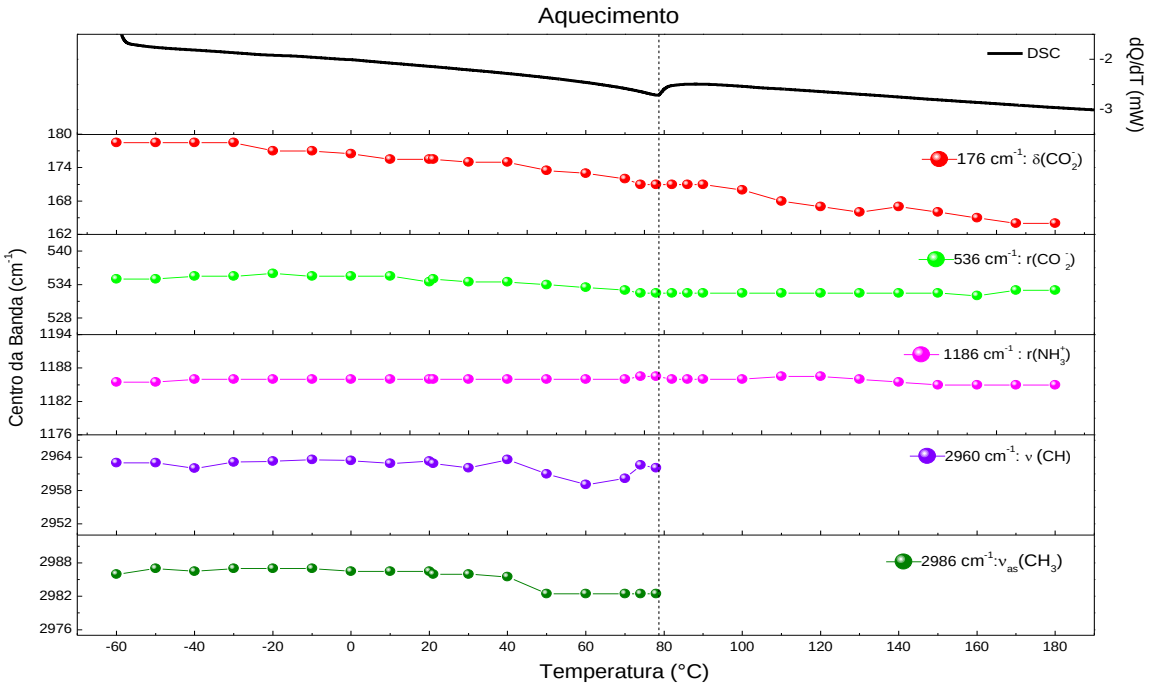

Figura 4.13: Posição dos centros das bandas Raman e termograma de DSC para o processo de aquecimento do policristal de L-Leucina para as bandas selecionadas e suas atribuições.

As bandas correlacionadas à cadeia principal do L-Leucina sofrem deslocamento dos centros das bandas em altas temperaturas ou se mantém invariantes em função da temperatura, já as relacionadas à cadeia lateral mostram desaparecimento da banda Raman para altas temperaturas. Estes comportamentos podem ser descritos em termos das interações entre os grupos funcionais na molécula do L-Leucina dentro da célula unitária.

Para melhor entender a relação entre os grupos funcionais que apresentam modo de vibração no espectro Raman e suas posições dentro célula unitária foi confeccionada a Figura 4.14 e 4.15 utilizando o programa cristalográfico Vesta[10].

Entender a configuração molecular e as interações entre as moléculas no policristal L-Leucina torna-se um fator de grande relevância nas análises qualitativas

[10] Programa gratuito, disponível em: http://jp-minerals.org/vesta/en/download.html

para estudo de transição de fase via espectroscopia Raman em função da temperatura.

Na Figura 4.14 está apresentada a estrutura cristalina do L-Leucina para mais de uma célula unitária, demarcada pelo retângulo, no plano *bc*. É possível observar que os grupos funcionais referentes à cadeia principal (NH_3^+ e CO_2^-) se localizam nos planos cristalinos dos eixos cristalográficos *a* e *b*, enquanto que os grupos funcionais da cadeia lateral (CH e CH_3) estão dispostos no eixo *c*.

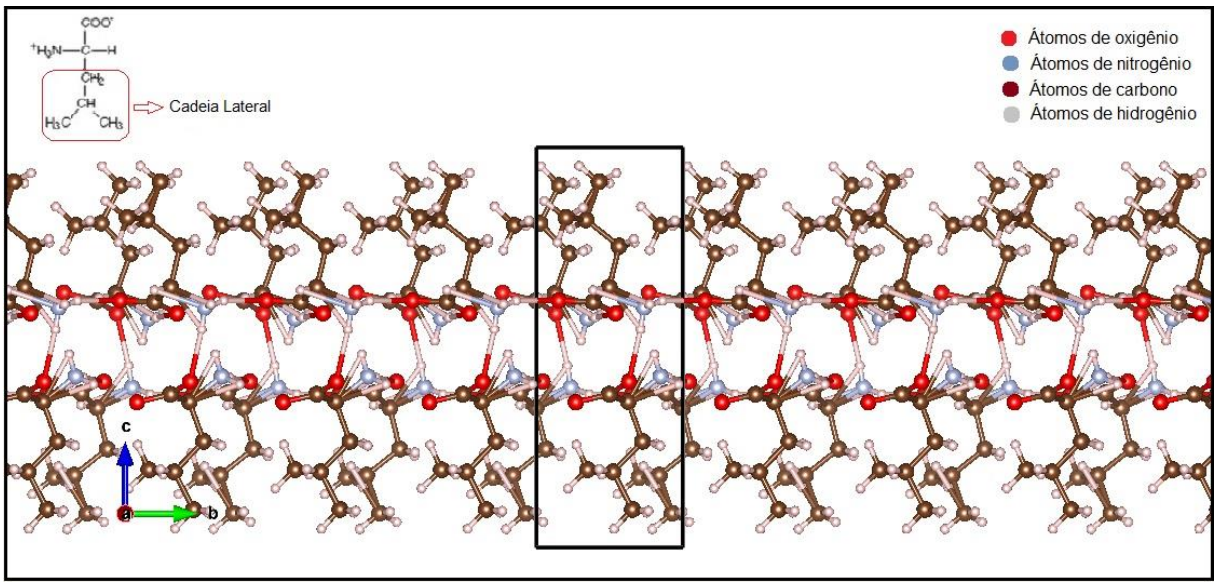

Figura 4.14: Representação esquemática da célula unitária do L-Leucina no plano *bc*, orientado na direção do parâmetro de rede a.

Na Figura 4.15 novamente é mostrada a representação esquemática da estrutura cristalina do L-Leucina para mais de uma célula unitária, porém agora no plano *ac*. Nesta configuração é possível observar que devido ao tipo de arranjo molecular do policristal, a formação da estrutura cristalina é estabelecida por meios de camadas paralelas ao plano *ac*. Tais camadas são mantidas unidas por meio de interações fracas, pelas ligações de hidrogênio [24].

Quando se tem cadeias laterais alifáticas grandes, como o caso do L-Leucina, os grupos funcionais estão restritos a interagir com moléculas de cargas opostas o que leva ao arranjo de camadas [33]. Para aminoácidos de cadeia lateral alifática curta verifica-se uma maior proximidade entre as moléculas, por consequência não há a formação de camadas e sim uma espécie de entrelaçamento entre as moléculas dentro da célula unitária.

Por apresentarem a forma *zwitterion*, na qual o grupo carboxílico (CO_2^-) doa um próton ao grupo amina (NH_3^+), leva a uma mesma molécula conter dois grupos funcionais com cargas opostas. A interação entre os grupos funcionais se dá por meio das ligações de hidrogênio. Este tipo de interação fraca ocorre quando átomos de hidrogênio são ligados de forma covalente a átomos fortemente eletronegativos, tais como oxigênio, nitrogênio ou flúor. Quanto mais eletronegativo o átomo, maior a atratividade entre eles e os átomos de hidrogênio [20]. Esta interação é observada para a cadeia principal da estrutura cristalina onde encontram-se os grupos funcionais de CO_2^- e NH_3^+ dispostos nos planos *a* e *b*.

Entre moléculas vizinhas, além das interações por ligações de hidrogênio, existe também a possibilidade de ocorrer interações dipolo-dipolo, de forma que os grupos funcionais amina ionizados negativamente estão muito próximos aos grupos funcionais carboxílicos vizinhos ionizados positivamente. Assim, uma ligação entre as moléculas pode ser formada por meio dos grupos funcionais carregados [33].

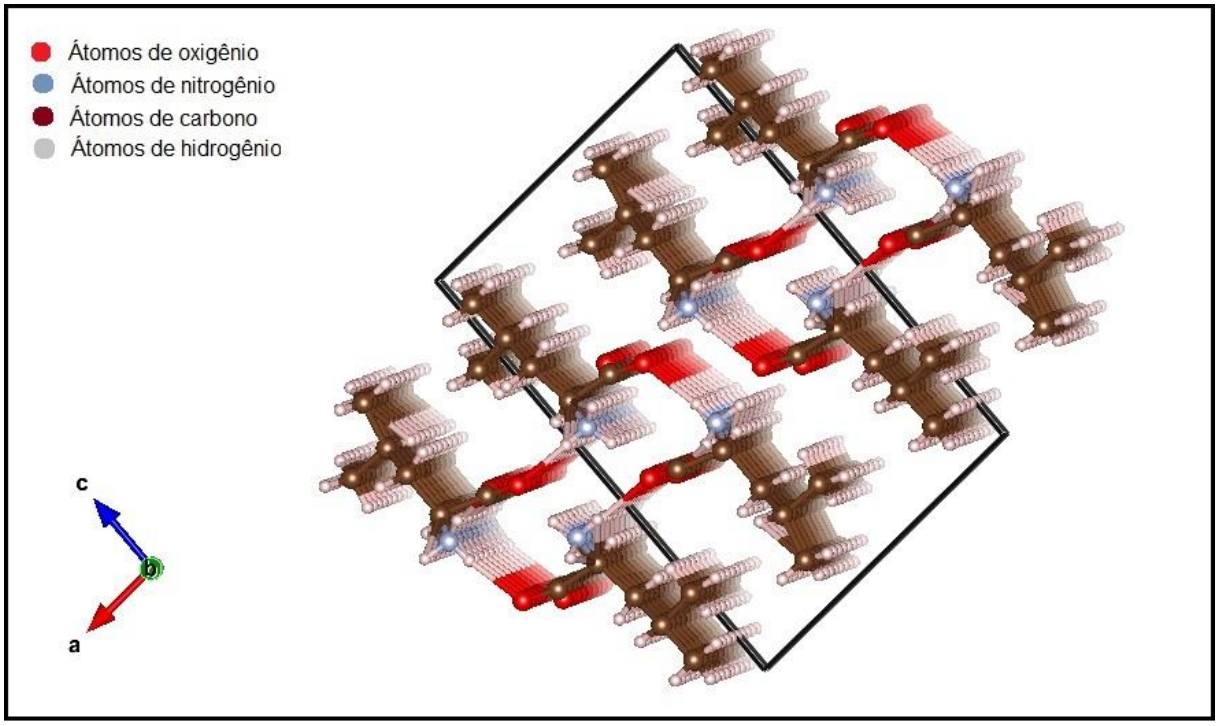

Figura 4.15: Representação esquemática da célula unitária do L-Leucina no plano *ac*, orientado na direção do parâmetro de rede c.

Diante do exposto com relação ao arranjo molecular do L-Leucina na célula unitária e dos tipos de interações entre as moléculas em uma célula e com sua

vizinhança, pode-se entender que mesmo as interações sendo fracas entre as moléculas de L-Leucina, dentro da estrutura cristalina, a variação de temperatura de -60 até 180 ºC, aplicada para espectroscopia Raman, não foi suficiente para mudanças estruturais, e sim uma transição de fase para baixa e alta temperaturas.

Verificou-se também mudança dos modos vibracionais para grupos funcionais da cadeia principal e inativação Raman para os grupos funcionais da cadeia lateral.

Entretanto os resultados do DRX mostram que há uma direção com relação aos planos cristalográficos no qual é possível observar mudanças em função da temperatura.

Para melhor entender a relação da transição de fase observada no Raman e os parâmetros de rede da estrutura cristalina do L-Leucina foram calculados os parâmetros *a*, *b* e *c* em função da temperatura.

Primeiramente foram calculadas as distâncias interplanares (d_{hkl}) utilizando a Equação 2.3 e o plano (0 0 4) com 2θ = 24,306º, λ = 1,5409 Å e m = 1, em função da variação de temperatura no DRX. Com posse destes dados foram calculados os parâmetros *c* também para cada temperatura utilizando a Equação 4.1 [55].

$$\frac{1}{{d_{hkl}}^2} = \frac{1}{sen^2\beta}\left[\frac{h^2}{a^2} + \frac{k^2}{b^2} - \frac{2hkcos\beta}{ab} + \frac{l^2}{c^2}\right] \quad (4.1)$$

Descrita para uma estrutura monoclínica, que fornece as relações entre o espaçamento interplanar d_{hkl}, os parâmetros de rede (*a*, *b*, *c*), os ângulos entre planos (α, β, γ) e os planos (*hkl*), com α = γ= 90º e β = 94,09° (de acordo com a ficha padrão 00-030-1779-JCPDS).

Com o parâmetro *c* foram calculados os também em função da temperatura, os parâmetros *a* e *b* sucessivamente, utilizando as equações 2.3 e 4.1 e os planos (2 0 5) (2θ = 36,837º) para o parâmetro *a* e (-1 1 4) (2θ= 30,570º) para o parâmetro *b*. O ângulo entre planos β = 94,09° foi considerado constante em função da temperatura para o intervalo estudado.

Com os parâmetros *a*, *b* e *c* calculados foi possível também calcular o volume da célula unitária (V) expresso por: $V = (abc)sen\beta$.

A Figura 4.16 apresenta os valores calculados para os parâmetros *a*, *b* e *c* e o volume da célula unitária em função da temperatura. Pode-se verificar que os

parâmetros de rede *a* e *b* apresentam um comportamento linear para o policristal em função da temperatura, já na o parâmetro de rede *c* mostra dois comportamentos distintos com $T_{transição}$ próxima a 80 ºC, tal como para espectroscopia Raman.

O volume da célula unitária varia com a temperatura, porém, por ser uma grandeza dependente diretamente dos três parâmetros de rede, não é possível evidenciar uma $T_{transição}$, mas sim o intervalo de temperatura no qual o volume da célula sofre alterações que está, aproximadamente, entre 70 a 110 ºC.

Correlacionando os resultados de Raman com os de DRX pode-se mostrar que o policristal L-Leucina tem transição de fase em torno de 74 ºC, devido a expansão da célula unitária para altas temperaturas, sem que esta sofra qualquer mudança em sua estrutura cristalina. E que as cadeias laterais das moléculas, dispostas paralelamente ao eixo *c*, compostas majoritamente por vibrações do tipo estiramento de grupamentos CH são as que mais se alteram no espectro Raman, pois suas bandas tornam-se inexistentes para altas temperaturas.

Nesta região espectral, de altas frequências, sabe-se que a mesma é conhecida por ser muito sensível a rearranjos conformacionais, especialmente para estes grupos funcionais, o que leva a mudanças na orientação das moléculas na célula unitária [25]. Além disso, de acordo com Andrew, E. R. e colaboradores [31], a partir da transição de fase detectada, que para o cristal de L-Leucina se dá em aproximadamente 79 °C, são observadas mudanças conformacionais nas cadeias laterais de aminoácidos alifáticos, grupo ao qual pertence o L-Leucina.

As cadeias principais compostas por grupamentos amina e grupos carboxílicos, apresentam mais atividade Raman com relação a torções e deformações fora e dentro do plano, estas são menos influenciadas com a variação de temperatura, pois os picos Raman ou sofrem pequenos deslocamentos para menor energia com o aumento da temperatura ou não se alteram significativamente, sendo a cadeia principal disposta paralelamente aos eixos *a* e *b*.

De acordo com o DRX a expansão da célula unitária durante o aumento de temperatura está na direção do parâmetro *c*, corroborando com as alterações no espectro Raman.

De acordo com a literatura [39], é relatada uma transição de fase para o L-Leucina na temperatura de 80 °C (353 K), relacionada com mudança de simetria devida a rápida reorientação (da ordem de picosengundos) do hidrogênio da cadeia

principal, entretanto no mencionado trabalho os autores consideram β variável com a temperatura.

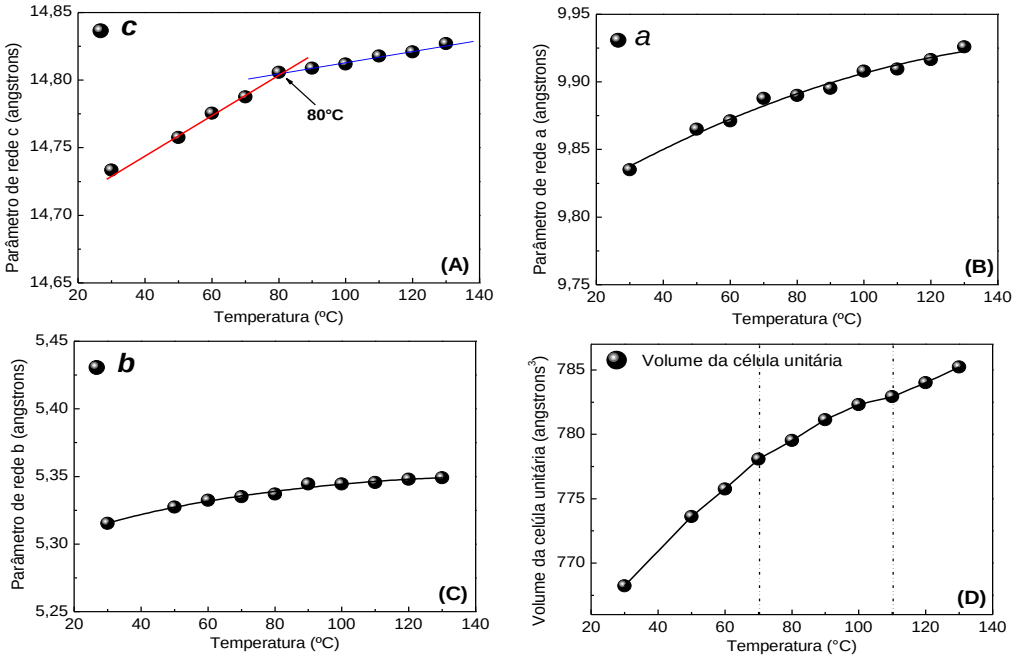

Figura 4.16: Parâmetros de rede (a, b, c) do L-Leucina em função da temperatura: (A), (B) e (C). Relação entre volume da célula unitária e variação de temperatura: (D).

O policristal L-Leucina por ter arranjo em camadas dentro da estrutura cristalina permite o distanciamento entre suas moléculas sem quebra de nenhuma ligação entre os grupamentos químicos, desde que o intervalo de temperatura ao qual seja submetido não esteja envolvendo processos de perda de massa. Este sistema em camadas é possível devido a cadeia lateral alifática grande do L-Leucina que propicia interações fracas entre suas moléculas, o que possivelmente facilita a transição de fase para altas e baixas temperaturas, garantido a sua reversibilidade.

Isto mostra que a transição de fase observada no Raman também pode ser analisada no DRX, porém os espectros Raman além de fornecer as mesmas informações que o DRX em termos da estrutura cristalina, permite ainda avaliar quanto aos modos vibracionais de molécula com relação a cada grupo funcional Raman ativo. A espectroscopia Raman ainda corrobora com a detecção da temperatura de transição de fase obtida por meio do DSC.

5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

Concluiu-se que com a espectroscopia Raman obteve-se uma análise em nível molecular dos modos vibracionais do L-Leucina na região do infravermelho médio. Foi realizada a caracterização dos espectros primeiramente a temperatura ambiente. Em seguida foram realizadas as medidas Raman em função de temperatura em intervalo de -60 °C a 180 °C em processos de aquecimento e resfriamento, com a intenção de verificar a reversibilidade da transição de fase observada para o L-Leucina.

Os espectros Raman em função de temperatura mostraram mudança no comportamento das bandas relacionadas aos grupos funcionais de CH, CH_3, CO_2^- e NH_3^+. Os comportamentos observados foram três: 1) Bandas que tornaram-se inexistentes com o aumento da temperatura; 2) Bandas que sofreram deslocamento para valores de menores energias com o aumento da temperatura; 3) Bandas que permaneceram invariantes com a variação de temperatura. Para todos os processos, observou-se que se trata de processos reversíveis.

Com a utilização a técnica de DSC foi confirmada duas fases para o L-Leucina uma em alta e outra em baixa temperatura, sendo a temperatura de transição de ~76 ºC. A técnica ainda mostrou que as transições são reversíveis dentro do intervalo de temperatura estudado. Os mesmos fatos foram observados na espectroscopia Raman em termos das análises das bandas em função da temperatura.

Com o DRX confirmou-se também transição de fase e a temperatura de transição, avaliada pela variação do parâmetro de rede *c* da estrutura cristalina do L-Leucina em função da temperatura. Os demais parâmetros de rede *a* e *b* pertinentes a estrutura monoclínica do L-Leucina mostraram comportamento linear dentro do intervalo de temperatura estudado neste trabalho.

Ainda com o DRX foi possível confirmar que a transição de fase afetava principalmente os grupos funcionais da cadeia lateral do L-Leucina, pois estes estão dispostos paralelos ao eixo cristalográfico *c*, parâmetro que mostrou a transição de fase no DRX, e verificar que os grupos funcionais dispostos paralelamente aos eixos *a* e *b*, pertencentes a cadeia principal do policristal, não sofrem alterações significativas, possivelmente por se terem vibrações moleculares de deformações e torções, mais evidentes nos modos vibracionais da rede.

A transição de fase no L-Leucina é uma resposta da expansão da célula unitária do policristal, composta por quatro moléculas de L-Leucina que tem seus modos de estiramentos afetados durante o aquecimento, entretanto esse processo é reversível, o qual não permite afirmar que a transição seja estrutural.

Portanto, a espectroscopia Raman, apesar de não ser uma técnica clássica para a obtenção de transições de fase, demonstrou-se eficiente para este fim por fornecer informações tanto quanto a estrutura, bem como vibrações moleculares.

Como perspectiva de trabalhos futuros e para a continuidade desse trabalho, fica a possibilidade de um estudo mais aprofundado por difratometria de raios-X, assim como, o estudo teórico de simetria de grupos relacionado aos modos vibracionais de rede da estrutura cristalina. Além do policristal L-Leucina, será buscado realizar estudos pelas técnicas utilizadas em outros aminoácidos, como por exemplo em outros aminoácidos alifáticos e nos aromáticos, buscando correlacionar os efeitos investigados com os processos biológicos do organismo humano.

6 BIBLIOGRAFIA

1. VOET, D.; VOET, J. G. **Bioquímica**. 4. ed. [S.l.]: Artmed, 2013.

2. NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5. ed. [S.l.]: Artmed, 2011.

3. GREENSTEIN, J. P.; WINITZ, M. J. P. **Chemistry of Amino Acids**. New York: Willy, v. 1, 1960.

4. MELO, W. D. C. **Transições de Fase em Monocristais de D-Metionina**. Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal do Ceará, UFC. Fortaleza - CE. 2012.

5. WANG, W. et al. **Salam Hypotheshis and the Role of Phase Transitions in Amino Acids**. [S.l.]: Springer Nertherlands, 2004. 79-82 p.

6. ZAKHAROV, B.; BOLAYREVA, E. A High Pressure Single-Crystal Phase Transition DL Alaninum Semi-Oxylate Monohydrate With Switching over Hydrogens Bonds. **Acta Cristallography Section B**, p. 271-280, 2013.

7. SANTOS, J.; ET, A. **Síntese e Propriedades Vibracionais do Aminoácido Rancêmico da Metionina**. Livro de resumos publicado no 54° Congresso Brasileiro de Química. Natal - RN: [s.n.]. 2014.

8. WEST, R. A. **Solid State Chemistry and its Applications**. 2. ed. United Kingdom: Wiley, 2014.

9. ARÊAS, E. P. G.; KAWANO, Y. Aplicações de Técnicas Espectroscópicas Vibracionais ao Estudo Conformacional de Protéinas. **Química Nova**, v. I, n. 14, p. 31-43, 1991.

10. ROGERO, M. M.; TIRAPEGUI, J. Aspectos Atuais Sobre Aminoácidos de Cadeia Ramificada e Exercício Físico. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 4, p. 563-575, 2008.

11. ANTHONY, J. C.; ET, A. Signaling Pathways Involved in Translational Control of Protein Synthesis in Skeletal Muscle by Leucine. **The Journal of Nutrition**, n. 25, p. 856S-860S, 2016.

12. HORCEL, F.; GIMENÉZ, L. D. http://www.lineadermatologia.com.br/. **Linea Dermatologia**. Disponivel em: <http://lineadermatologia.com.br/2011/wp-content/uploads/2011/08/BCAA-Estudo.pdf>. Acesso em: 25 Janeiro de 2016.

13. MORAES, C. S.; ET, A. **Série em Biologia Celular e Molecular - Métodos Experimentais no Estudo de Proteínas.** 1. ed. Rio de Janeiro: IOC - Instituto Oswaldo Cruz, 2013.

14. BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Bioquímica**. 5. ed. [S.l.]: Guanabara Koogan S.A., 2004.

15. HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Bioquímica Ilustrada**. 5. ed. [S.l.]: Artmed, 2012.

16. FAÇANHA FILHO, P. F. **Estudo de Espalhamento Raman em Cristais de L-Leucina Submetidos a Altas Temperaturas e a Altas Pressões**. Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal do Ceará, UFC. Fortaleza-CE. 2007.

17. MOSS, G. P. http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/AminoAcid/. **INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY**. Disponivel em: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/AminoAcid/>. Acesso em: 21 Janeiro de 2016.

18. SOLOMONS, T. W. G. **Química Orgânica**. 6. ed. Rio de Janeiro: LCT, 1996.

19. ATKINS, P.; DE PAULA, J. **Físico - Química Biológica**. Rio de Janeiro: LCT, 2008.

20. PADILHA, A. F. **Materiais de Engenharia:** Microestrutura e Propriedades. Curitiba: Hemus S.A., 2000.

21. CALLISTER, W. D. **Materials Science and Engineering:** An Introduction. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1991.

22. MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica Básica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

23. CAMPBELL, M. K.; FARRELL, S. O. **Bioquímica:** Combo. 5. ed. [S.l.]: Cengage Learning, 2007.

24. KITTEL, C. **Introdução à Física do Estado Sólido**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois S.A., 1978.

25. CARDOSO, A. V. www.cienciadosmateriais.org. **LMDM - Laboratório de Material Didático Multimídia**, 2005. Disponivel em: <http://www.cienciadosmateriais.org/index.php?acao=exibir&cap=6>. Acesso em: 13 Dezembro de 2015.

26. AMOREIRA, J. D.; JESUS, M. D. Apontamentos de Física do Estado Sólido, 2001-2002. Disponivel em: <http://www.dfisica.ubi.pt/~amoreira/lectnotes/fesnts.pdf>. Acesso em: 28 Dezembro de 2015.

27. CUZZUOL, G. Disponivel em: <http://pt.slideshare.net/guilhermecuzzuol9/estrutura-cristalina-37503063>. Acesso em: 28 Janeiro de 2016.

28. SANTOS, G. M. **Estudo de Propriedades Físicas de Cerâmicas do Composto Multiferróico FeAl3**. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Estadual de Maringá, UEM. Maringá. 2012.

29. HÉRNANDEZ, B. et al. Vibrational Analysis of Amino Acids and Short Peptides in Hydrated Media. VI. Amino Acids with Hydrophobic Side Chains: L-Alanine, L-Valine, and L-Isoleucine. **J. Phys. Chem. B.**, n. 113, p. 3169-3178, 2009.

30. PAWLUKOJC, A.; ET, A. The NIR spectroscopy of amino acids: l-leucine. **Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy**, v. 52, n. 1, p. 29 -32, 1996.

31. ANDREW, E. R.; ET, A. A solid-state proton NMR investigation of amino acids found in proteins. **Chemical Physics Letter**, v. 26, n. 1, p. 50-52, 1974.

32. GRUNENBERG, A.; BOUGEARD, D.; SCHRADER, B. DSC-Investigations of 22 Crystalline Neutral Aliphatic Amino Acids in the Temperature Range 233 to 423 K. **Thermochimica Acta**, v. 77, p. 59-66, 1984.

33. TULIP, P. R. **Dielectric and Lattice Dynamical Properties of Molecular Crystals via Density Functional Perturbation Theory: Implementation within a First Principles Code**. Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade de Durham. Durham. 2004.

34. GUSMÃO, G. O. M. **Estudo das Propriedades Vibracionai do Aminoácido DL-Metionina por Espectroscopia Raman**. Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal do Ceará, UFC. Fortaleza - CE. 2014.

35. CHATZIGEORGIOU, P.; ET, A. Solid-Solid Phase Transitions in DL-Norvaline Studied by Differential Scanning Calorimetry and Raman Spectroscopy. **J. Phys. Chem. B**, n. 114, p. 1294-1300, 2010.

36. DREBUSHCHAK, V. A.; ET, A. Low-Temperature Heat Capacity of β-Glycine and a Phase Transition at 252K. **Journal of Thermal Analusis and Calorimetry**, v. 79, p. 65-70, 2005.

37. LIMA, J. A.; ET, A. Raman Scattering of L-Valine Crystals. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 36, p. 1076-1081, 2005.

38. RODANTE, F.; MARROSU, G. Thermal Analysis of Some A-Amino Acids Using Simultaneous TG-DSC Apparatus. The use of Dynamic Thermogravimetry to

Study the Chemical Kinetics of Solid State Decomposition. **Thermochimica Acta**, Amsterdam, n. 171, p. 15-29, 1990.

39. FAÇANHA FILHO, P. F. et al. Structure-property relations in crystalline L-leucine obtained from calorimetry, X-rays, neutron and Raman scattering. **Phys. Chem. Chem. Phys**, n. 13, p. 6576-6583, 2011.

40. OLIVEIRA, L. F. C. Espectroscopia Molecular. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, n. 4, p. 24-30, 2001.

41. SALA, O. **Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho**. 2. ed. [S.l.]: Unesp, 2008.

42. BRADY, J. E.; HUMISTON, G. E. **Química Geral**. 2. ed. [S.l.]: JC Livros Técnicos e Científicos, v. 1.

43. FERRARO, J. R.; NAKAMOTO, K.; BROWN, C. W. **Introductory Raman Spectroscopy**. 2. ed. San Diego, CA: Elsevier, 2003.

44. ANDO, R. A. **Espectroscopia Vibracional, Raman Ressonante e Eletrônica de Nitroderivados em Sistemas Conjugados**. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, USP. São Paulo, p. 144. 2005.

45. CASTRO, L. V. D. **Estudo de Lesão de Cárie Experimental Via Espectroscopia Fotoacústica e Raman**. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisica da Universidade Estadual de Maringá, UEM. Maringá, PR. 2015.

46. SANTOS, M. N. B. **Espectroscopia (Princípios de Quimica- Física)**. Instituto Superior Técnico. [S.l.], p. 1-69. 2012.

47. RAMAN, C. V. **Indian J. Phys**, n. 2, p. 387, 1928.

48. MANSOUR, H. M.; HICKEY, A. J. Raman Characterization and Chemical Imaging of Biocolloidal Self-Assemblies, Drug Delivery Systems, and Pulmonary

Inhalation Aerosols: A Review. **AAPS Pharm. Sci. Tech.**, n. 99, p. E1-E16, Novembro 2007.

49. CHALMERS, J.; GRIFFITHS, P. **Handbook of Vibrational Spectroscopy**. [S.l.]: Wiley, v. 5, 2002.

50. COELHO, M. N. **Espectroscopia Raman de policristais de Clorohidrato de L-cisteína sob altas pressões**. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal do Ceará, UFC. Fortaleza - CE. 2010.

51. GALLAGHER, P. K. **Handbook of Thermal Analysis and Calorimetry**. Amsterdam: Elsevier Science B.V. , v. I, 1998.

52. HTTP://WWW.PERKINELMER.COM/CATALOG/CATEGORY/ID/THERMAL%20ANALYSIS. **Site da Perkin Elmer Inc**, 2013-2014. Disponivel em: <http://www.perkinelmer.com>. Acesso em: 20 Dezembro de 2015.

53. HTTP://WWW.TAINSTRUMENTS.COM/. **TA Instruments**. Disponivel em: <http://www.tainstruments.com/product.aspx?id=17&n=1&siteid=0>. Acesso em: 15 Dezembro de 2015.

54. HTTP://WWW.PROPFIS.ORG/. **PropFis**. Disponivel em: <http://www.propfis.org/index_arquivos/lectures/e1p12.pdf>. Acesso em: 15 Dezembro de 2015.

55. CULLITY, B. D. **Elements of X- Ray Diffraction**. [S.l.]: Publisher Addison, Wesley Publishing, INC, 1956.

56. HTTP://WWW.LINKAM.COM.UK/T95-SYSTEM-CONTROLLERS/. **Site da Linkam Scientific Instruments**. Disponivel em: <http://www.linkam.com.uk/>. Acesso em: 18 Dezembro de 2015.

57. WWW.BRUKER.COM. **Site da Bruker Corporation**. Disponivel em: <https://www.bruker.com/pt/products/infrared-near-infrared-and-raman-

spectroscopy/raman/senterra/overview.html>. Acesso em: 18 Dezembro de 2015.

58. FAÇANHA FILHO, P. F.; ET, A. High Temperature Raman Spectra of L-Leucine Crystals. **Brazilian Journal of Physic**, v. 38, n. 1, 2008.

59. ZHU, G. et al. Raman spectra of amino acids and their aqueous solutions. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, p. 1187-1195, 2011.

60. RODANTE, F.; MARROSU, G.; CATALANI, G. Thermal analysis of some alpha-amino acids with similar structures. **Thermochimica Acta**, n. 194, p. 197-213, 1992.

61. MACHIDA, K. et al. Polarized Raman spectra and intermolecular potential of a-alanine crystal. **Spectrochimica Acta A**, v. 34, n. 9, p. 909-914, 1978.

62. BONADIO, T. G. M. **Estudo dos Compósitos TiO2 - Hidroxiapatita e Nb2O5 - Hidroxiapatita: Comportamento Físico-Mecânico, Estrutural e de Bioatividade**. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Estadual de Maringá, UEM.. Maringá. 2011.

63. **The International Center for Diffraction Data**. Disponivel em: <http://www.icdd.com/translation/port/about.htm>. Acesso em: 28 Janeiro de 2016.

64. **LQES - Laboratório de Química do Estado Sólido - UNICAMP**. Disponivel em: <http://lqes.iqm.unicamp.br/>. Acesso em: 28 Janeiro de 2016.

65. HTTP://MICHAELIS.UOL.COM.BR/MODERNO/PORTUGUES/. **Michaelis Moderno Dicionário da Língua Portuguesa**. Disponivel em: <http://michaelis.uol.com.br/moderno/portugues/>. Acesso em: 20 Janeiro de 2016.