



Universidade Estadual de Maringá
Centro de Ciências Exatas
Departamento de Física

Trabalho de Conclusão de Curso

**Alterações moleculares e estruturais
influenciadas por variação de pH no
aminoácido L-Alanina**

Acadêmica: Mariana Sversut Gibin

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

Maringá
Novembro, 2018



Universidade Estadual de Maringá
Centro de Ciências Exatas
Departamento de Física

Trabalho de Conclusão de Curso

Alterações moleculares e estruturais influenciadas por variação de pH no aminoácido L-Alanina

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Física da Universidade Estadual de Maringá, sob orientação da Prof^a Dr^a. Francielle Sato, como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em Física.

Acadêmica: Mariana Sversut Gibin

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

Maringá
Novembro, 2018

Ao meu pai Osmar (*in memoriam*) e a minha mãe Mara,
com todo o meu amor!

AGRADECIMENTOS

Não poderia deixar de expressar a minha gratidão a todos que contribuíram, diretamente ou indiretamente, na minha formação acadêmica, bem como, deste trabalho.

Primeiramente, sou grata a Deus pelo privilégio da vida e por permitir que pessoas maravilhosas cruzassem o meu caminho.

Também, sou grata a minha orientadora Prof^a. Dr^a. Francielle Sato, que desde o início da iniciação científica tem compartilhado uma parte de todo o seu conhecimento comigo, demonstrando disposição para auxiliar as pesquisas e também, este trabalho.

Em igual grau, agradeço ao Prof^o. Dr. Antonio Medina Neto e à todos os professores, integrantes do Departamento de Física, os quais tenho um enorme respeito e admiração. Destacando os professores Dr. Gustavo Sanguino Dias e Dr. Gutierrez Rodrigues de Moraes que prontamente aceitaram contribuir com o meu trabalho participando da banca.

De forma especial, ao meu pai, Osmar Ribeiro Gibin, que infelizmente não encontra-se entre nós, mas que deixou seu legado nesta Terra, com ensinamentos que levarei por toda vida. À minha mãe, Mara Lúcia Gibin, e ao meu irmão, Vitor Gibin, por todo o suporte, convívio, conselhos e paciência todos os dias. Também, ao meu namorado, Thiago Brandão, pelo amor, companheirismo e compreensão nos momentos de ausência.

Ainda, sou grata ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por incentivar e conceder suporte financeiro à pesquisa por meio das bolsas de iniciação científica.

Por fim, mas não menos importante, agradeço aos meus amigos da graduação pela parceria, especialmente ao Eduardo Bergmann, Vinícius Tonsic e Gustavo Meneghetti. Aos meus amigos de longa data, de forma singular, à Bianca Larissa, ao Yuri Merlotti e ao Renan Biagio.

Do mesmo modo, agradeço à Lidiane Hoshino, Adriane do Nascimento, Raquel Palácios, Camilla Ogawa, Robson Muniz, aos integrantes dos grupos GEOPT e GEFF por todas as conversas e ensinamentos compartilhados dentro e fora do laboratório.

RESUMO

Neste trabalho estudamos o aminoácido L-alanina por espectroscopia Raman quando solubilizado em meio aquoso mediante a variação pH, com o objetivo de investigar possíveis alterações espectrais devido à este agente externo. Quando solubilizado em meio aquoso, o aminoácido tende a apresentar forma *zwitterion* enquanto que, para meios ácidos e básicos, apresenta forma protonada e desprotonada, na devida ordem. Os processos de protonação e desprotonação podem ser observados por meio dos modos vibracionais característicos de cada grupo funcional, como consequência da admissão ou da concessão do íon H^+ para a solução, alterando os grupos funcionais COO^- e NH_3^+ , respectivamente. Complementarmente, fizemos o crescimento de cristais de L-alanina em meios ácidos, básicos e neutro. Da mesma maneira, os cristais foram analisados por espectroscopia Raman, onde os cristais ácidos apresentaram alterações espectrais semelhantes aos solubilizados em pH ácido, já os cristais básicos resistiram a sua forma *zwitterion*. Ainda, estes cristais foram submetidos a análises de difração de raios X com o intuito de visualizar alterações estruturais da célula unitária, técnica esta que corroborou com os resultados obtidos por espectroscopia Raman, observando mudanças nos cristais ácidos apenas. Portanto, apesar das técnicas observarem efeitos físicos diferentes, ambas foram complementares nas análises dos cristais. Além disto, a espectroscopia Raman também mostrou-se eficiente em relação as alterações moleculares do aminoácido L-alanina solubilizados em diferentes meios.

Palavras chave: Aminoácido, variação de pH, espectroscopia Raman.

SUMÁRIO

Resumo	II
Introdução e Objetivos	2
1 Fundamentação Teórica	4
1.1 Aminoácidos:	4
1.2 L-alanina:	9
1.3 Crescimento de Cristais:	12
2 Conceitos gerais das técnicas utilizadas	15
2.1 Vibrações Moleculares:	15
2.2 Espectroscopia Raman:	18
2.3 Estrutura Cristalina:	22
2.4 Difração de raios X (DRX):	25
3 Materiais e Métodos	29
3.1 L-alanina policristalina:	29
3.1.1 Soluções aquosas do aminoácido L-alanina:	29
3.1.2 Crescimento de cristais em diferentes pH:	30
3.2 Espectroscopia Raman:	32
3.3 Difração de raios-X (DRX):	32

4 Resultados e Discussão	34
4.1 Caracterização do L-alanina comercial por espectroscopia Raman:	34
4.2 Soluções aquosas:	37
4.3 Variação do pH nas soluções aquosas:	40
4.4 Crescimento de cristais:	44
Conclusões e Perspectivas Futuras	54
Referências Bibliográficas	56

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Os aminoácidos foram descobertos à partir de 1806 e desde então, muitos estudos a cerca deste material estão sendo desenvolvidos, principalmente devido à sua importância biológica. Estes compostos são normalmente conhecidos como monômeros de proteínas, já que quando combinados são a base formadora destas macromoléculas [1].

As proteínas estão diretamente ligadas a processos biológicos e são formadas por meio de ligações covalentes entre os aminoácidos. Quando os aminoácidos combinam-se uns com os outros distintivamente, geram proteínas diferentes e com funções diferentes. Existem cerca de 20 aminoácidos encontrados em mamíferos, os quais possuem uma estrutura muito semelhante, diferindo-se uns dos outros pelo seu radical. Estes radicais determinam não só a atividade biológica destes compostos, como também, propriedades químicas, ópticas e estruturais [2].

Dentre essas propriedades, a propriedade estrutural do aminoácido pode ser afetada de diferentes formas, como por exemplo, solubilizando-o em diferentes meios. Por possuir caráter anfótero, em meio aquoso e de pH neutro, estes compostos são encontrados em sua forma *zwitterion* sendo eletricamente neutro e possuindo dois grupos funcionais iônicos: COO^- e NH_3^+ . Quando em pH ácido ocorre o processo de protonação, o qual o grupo COO^- do aminoácido recebe um íon H^+ do meio, tornando-se $COOH$. Já, para o meio básico, ocorre o processo de desprotonação, onde o grupo NH_3^+ perde um íon para a solução, tornando-se NH_2 . Quando estes processos ocorrem, tem-se as respectivas formas do aminoácido: catiônica, neutra e aniônica [2].

Ainda, algumas outras propriedades podem ser influenciadas como consequência da

variação de pH do meio, como as propriedades ópticas. Ou seja, quando o material cristaliza-se, como resultado de uma solução supersaturada entre soluto e solvente, temos a formação de cristais. Estes cristais estão sendo estudados por possuírem propriedades ópticas não lineares, dentre elas, ser promissores no desenvolvimento de sensores e sistema piezoelétricos [3–6].

Desta forma, o objetivo neste trabalho é avaliar as alterações moleculares existentes na solubilização do aminoácido em diferentes meios e observar se estas mudanças podem fornecer informações a cerca dos cristais crescidos em diferentes valores de pH. Para que em um próximo trabalho, seja possível a avaliação das propriedades ópticas destes cristais resultantes da variação de pH. Para isto, a espectroscopia Raman vem sendo muito utilizada para caracterizar e monitorar mudanças nos modos vibracionais das moléculas, tanto solubilizada como em amostras cristalinas. Complementarmente, a técnica de difração de raios X, a qual visa a análise estrutural de moléculas cristalinas, pode auxiliar na detecção destas possíveis mudanças [5, 7].

Portanto, este trabalho está dividido em cinco capítulos basicamente. De forma que, no primeiro capítulo expõe uma breve fundamentação teórica à respeito dos aminoácidos, abordando o aminoácido L-alanina, o qual foi utilizado neste trabalho. Posteriormente, no segundo capítulo, preocupou-se em abranger os conceitos gerais das técnicas utilizadas, no caso, espectroscopia Raman e difração de raios X. Ainda, no terceiro capítulo, descreveu-se os materiais utilizados, bem como, a forma como foram preparados e também, as configurações de análise para cada técnica. Adiante, no quarto capítulo, apresentou-se os dados coletados experimentalmente juntamente com suas respectivas análises. Por fim, encontra-se as conclusões obtidas para este trabalho, seguido das perspectivas futuras de continuidade.

CAPÍTULO 1

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Este capítulo apresenta uma breve fundamentação teórica, com base na literatura, a respeito dos aminoácidos, em especial o L-alanina. Além de considerações gerais sobre proteínas e crescimento de cristais.

1.1 Aminoácidos:

Os aminoácidos naturais foram notados à partir de 1806, por meio do aminoácido Asparagina que foi encontrado e isolado no aspargo pelos químicos Pierre Jean Robiquet (1780-1840) e Louis Nicolas Vauquelin (1736-1829) [8]. À partir desta descoberta, novos aminoácidos foram encontrados e atualmente, já foi possível a identificação de mais de 300 [1].

Dentre estes aminoácidos, apenas 22 são considerados proteínogênicos¹ [10]. Entre eles, apenas 20 são comumente encontrados em mamíferos [1] e os outros dois: Selenocisteína e Pirrolisina podem ser encontrados apenas em procariotos² [10].

Os 20 aminoácidos são também conhecidos como α -aminoácidos, pois nessas moléculas, o carbono central (α) liga-se com um grupamento amino ($-NH_2$), um grupamento de ácido carboxílico ($-COOH$), um hidrogênio ($-H$) e uma cadeia lateral, também chamada

¹Aminoácidos proteínogênicos são aminoácidos que podem constituir proteínas e que são produzidos pelas células mediante um determinado código genético [9].

²Procariotos englobam todos os tipos de bactérias por serem unicelulares e não possuírem verdadeiramente um núcleo, nem organelas em seu citoplasma [11].

de radical ($-R$), conforme esquematizado na figura 1.1.

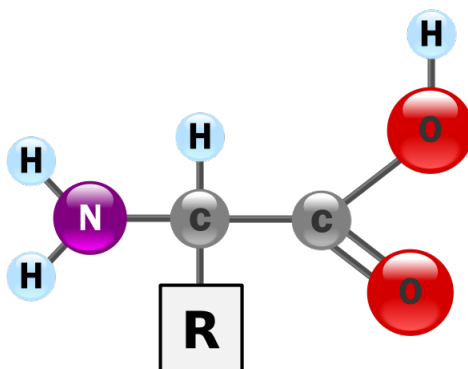


Figura 1.1: Representação da estrutura de um aminoácido [12].

O carbono α é assimétrico em todos os aminoácidos, conhecido também como carbono quiral ou opticamente ativo devido ao arranjo tetraédrico dos orbitais de ligação dos quatro grupos substituintes, os quais, podem ocupar duas disposições espaciais distintas [2, 10]. Com exceção do aminoácido glicina, que apresenta em seu radical um outro hidrogênio ligado ao carbono central, sendo opticamente inativo [1].

As disposições espaciais dos grupos ligados ao carbono quiral podem gerar imagens especulares que não se sobrepõem umas às outras [10], conhecidos como enantiômeros. Esta característica faz com que as moléculas que possuem centros quirais ativos consigam desviar a luz plano-polarizada. Quando a luz é desviada para a esquerda, designa-se que a molécula é levógira, abreviada por meio da letra L. Quando a luz desvia-se para a direita, abrevia-se por meio da letra D de dextrógiro [2]. A figura 1.2 mostra a representação dos enantiômeros de aminoácidos.

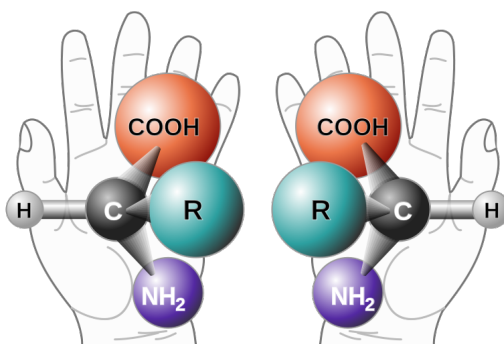


Figura 1.2: Esquematização dos enantiômeros de um aminoácido [13].

Os aminoácidos do tipo L-estereoisômeros são sempre encontrados nas moléculas protéicas. Enquanto que, os D-aminoácidos foram notados apenas em pequenos peptídeos,

incluindo antibióticos e paredes celulares bacterianas [2].

Já as cadeias laterais tem por objetivo definir o aminoácido e o caracterizar em tamanho, solubilidade e carga elétrica. Podendo também, ser classificados de acordo com suas propriedades ópticas, funcionais, químicas e estruturais [2]. Desta forma, pode-se classificar os aminoácidos principalmente em: **a)** essenciais e não essenciais [10] e **b)** polaridade e carga dos radicais [2].

a) Essenciais e não essenciais:

Essenciais são os aminoácidos que estão contidos nos alimentos e que o organismo humano não tem a capacidade de sintetizar. Por outro lado, aminoácidos não-essenciais são aqueles que o organismo pode sintetizar, não sendo necessário a ingestão deles. Na tabela 1.1 é apresentado os aminoácidos e suas respectivas classificações.

Tabela 1.1: Classificação dos aminoácidos em essenciais e não essenciais.

Essenciais	Não-essenciais
Arginina	Alanina
Histidina	Aspargina
Isoleucina	Ácido Aspártico
Leucina	Cisteína
Lisina	Ácido Glutâmico
Metionina	Glutamina
Fenilalanina	Glicina
Treonina	Prolina
Triptofano	Serina
Valina	Tirosina

b) Polaridade e carga dos radicais:

Os aminoácidos também podem ser classificados de acordo com suas cadeias laterais, conforme esquematizado na figura 1.3, na qual a polaridade e carga das cadeias foram utilizadas como critério de especificação.

- Aminoácidos com cadeias laterais apolares e alifáticas: os radicais desta classe são hidrocarbonetos sendo caracterizados como grupamentos químicos hidrofóbicos apolares, ou seja, possuem dificuldade em dissolver-se em água;

- Aminoácidos com cadeias laterais aromáticas: possuem em sua cadeia lateral um anel aromático e são relativamente apolares (hidrofóbicos);
- Aminoácidos com cadeias laterais polares não carregadas: os radicais deste grupo são hidrofílicos, interagindo sem dificuldade com a água devido a formação de ligações de hidrogênio;
- Aminoácidos com cadeias laterais carregadas negativamente - ácidos: os radicais deste grupo encontram-se completamente ionizados devido ao grupo carboxílico carregado negativamente à pH neutro;
- Aminoácidos com cadeias laterais carregadas positivamente - básicos: os radicais destes aminoácidos apresentam carga positiva quando em pH neutro.

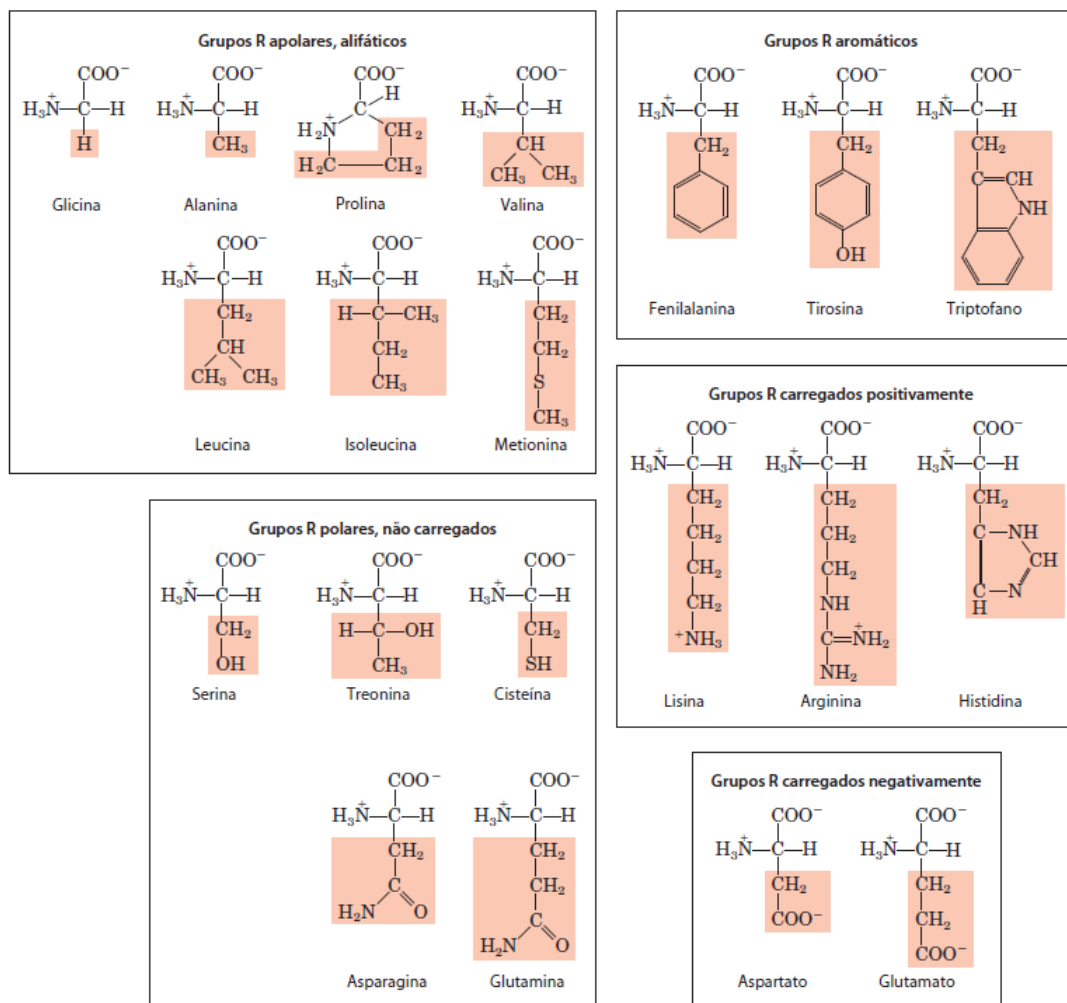


Figura 1.3: Classificação dos aminoácidos considerando suas cadeias laterais [2].

Além disto, os aminoácidos são considerados anfóteros devido aos dois grupos funcionais ionizáveis: um que atua como base - grupo amino e outro que atua como ácido - ácido carboxílico. Assim, pode ocorrer transferência de prótons entre os grupos, formando íons dipolares, conhecido como *zwitterion*. A maioria dos aminoácidos são encontrados nesta forma quando neutros ou solubilizados [2].

Desta forma, pode-se afirmar que ocorre mudança da carga do aminoácido em função da variação do pH do meio em que a molécula está imersa. Logo, quando o pH do meio é ácido o grupo ácido carboxílico recebe um íon H^+ da solução, e o grupo amino tende a ficar ionizado, originando um cátion, assim, o aminoácido é dito protonado. Já para o caso contrário, no qual o pH do meio é básico, o grupo amino doa H^+ ao meio e o grupo ácido carboxílico torna-se um ânion [2], desta forma, o aminoácido é dito desprotonado. No valor de pH no qual as cargas dos aminoácidos se igualam, ou seja, a concentração da forma *zwitterion* é máxima, denomina-se ponto isoelétrico (pI) [1], conforme ilustrado na figura 1.4.

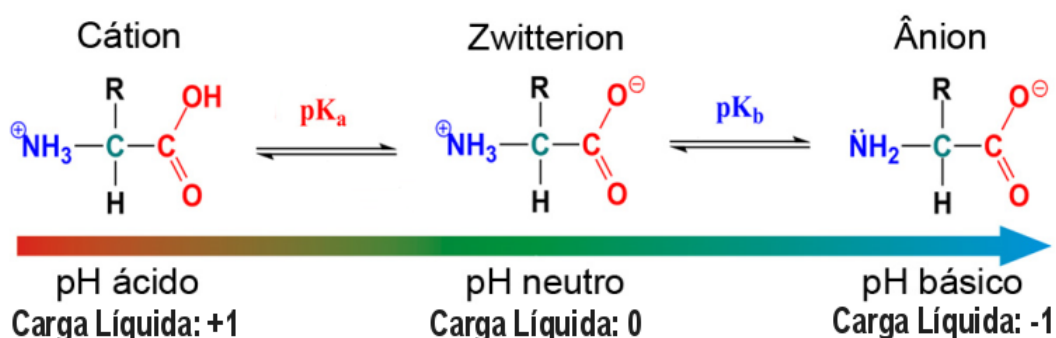


Figura 1.4: Esquema da dissociação do aminoácido em diferentes meios, com suas respectivas cargas. Adaptado de [14].

Os valores de pH e pK, indicado na figura 1.4, são formas de representar a concentração de prótons (pH) e a constante de equilíbrio para ionização (pK). Sendo o pK a medida quantitativa da disposição de um determinado grupo de doar prótons [2], definido por meio da expressão 1.1.

$$pK = \log \frac{1}{K} = -\log K \quad (1.1)$$

sendo K uma constante de dissociação do grupo carboxílico, que pode ser expressa por.

$$K = \frac{[H^+][II]}{[I]} \quad (1.2)$$

no qual II a forma isoeletrica e I a parte protonada [1].

Desta forma, é possível também obter estes valores por meio de curvas de titulação, as quais indicam as propriedades ácidas e básicas do aminoácido, conforme será apresentado na figura 1.6 para o aminoácido L-alanina.

Assim, cada aminoácido possui suas características próprias que são determinadas por meio do radical acoplado a um carbono quiral, juntamente com os outros grupos. Como já dito, os aminoácidos são extremamente importantes para o bom funcionamento do organismo, sendo dividido em essenciais e não essenciais [1], estando presente em alimentos [15], sínteses proteicas [2] e até suplementação alimentar de atletas [15,16]. Ademais, atuam diretamente na agricultura de forma à aumentar a resistência da planta ao estresse hídrico e de alta temperatura, aumentar a tolerância ao ataque de pragas e doenças, são compostos intermediários dos hormônios vegetais endógenos e apresentam efeito complexante em nutriente e outros agroquímicos [17]. Complementarmente, por serem cristais orgânicos, os aminoácidos tem demonstrado um grande potencial em aplicações ópticas não lineares, como: conversão de frequências [3], modulação eletro-óptica [3], aplicações piezoelétricas [18] e em sensores [4]. Logo, para cada aminoácido é possível obter diferentes respostas devido a suas diversas propriedades.

1.2 L-alanina:

O aminoácido L-alanina possui em seu radical um grupamento metil ($-CH_3$), devido a isto, é considerado um aminoácido de cadeia curta e aberta [2]. Também, por não possuir diferença de eletronegatividade na molécula, é considerado um aminoácido apolar [2]. Como consequência disto, não possui um alto índice de solubilização em meio aquoso [19].

Seu carbono α (C_α) possui quiralidade, pois está ligado a quatro grupos químicos diferentes: radical metil (CH_3), grupo carboxílico ($-COOH$), grupo amino (NH_2) e um hidrogênio (H). A forma molecular do alanina é $C_3H_7NO_2$. A figura 1.5 (a) apresenta a molécula não iônica e a (b) a forma iônica.

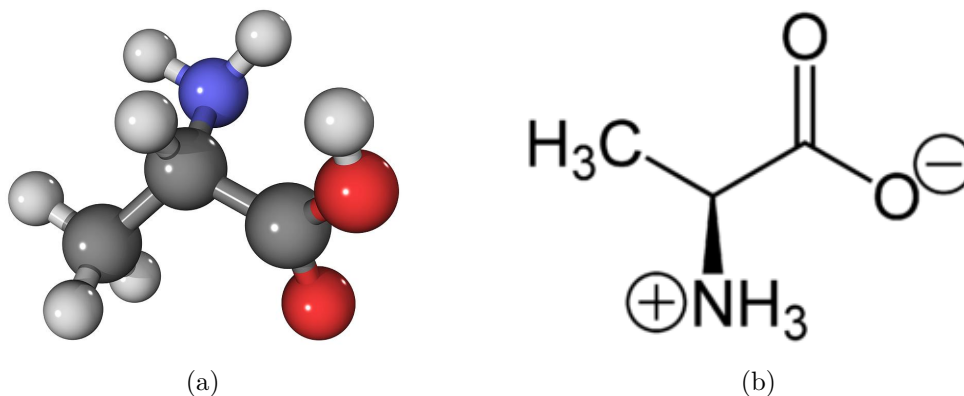


Figura 1.5: Representação da molécula de L-Alanina: (a) forma não iônica [20], sendo carbono=cinza, hidrogênio=cinza claro, oxigênio=vermelho e nitrogênio=azul (b) forma iônica - *zwitterion* [21].

Considerando as propriedades ácido-base dos aminoácidos, o aminoácido L-alanina é encontrado em sua forma iônica, também dita *zwitterion* apresentado na figura 1.5 (b), quando sólido ou solubilizado. Por possuir caráter anfótero, assim como os outros aminoácidos, interage tanto em meios ácidos como em meios básicos, gerando uma curva de titulação característica, conforme apresenta a figura 1.6.

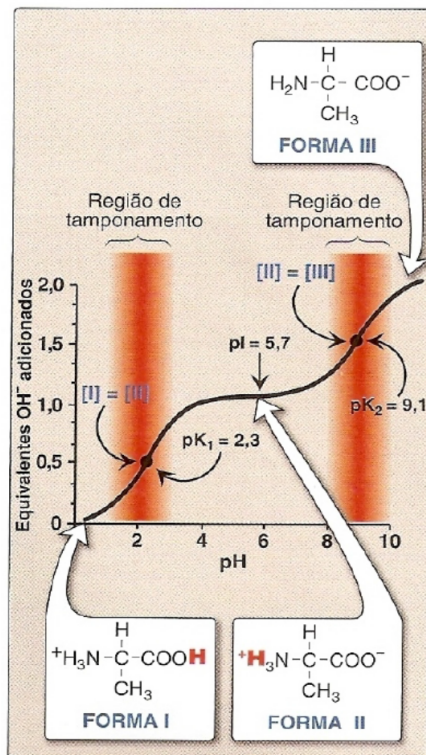


Figura 1.6: Curva de titulação para o aminoácido L-alanina [1].

Desta forma, descrevem-se três situações: pH ácido, pH básico e pH neutro.

- pH ácido: à medida que o pH do meio torna-se mais ácido, obtém-se a forma protonada deste aminoácido, devido o recebimento de H^+ do meio para o grupo carboxílico, ficando com a forma I da figura 1.6: $CH_3CH(NH_3^+)COOH$. Em um ponto médio estão presentes, na solução, concentrações equimolares das espécies doadoras ($CH_3CH(NH_3^+)COOH$) e receptoras ($CH_3CH(NH_3^+)COO^-$), denominando-se ponto de pK_a ou pK_1 . Este ponto equivale ao valor do pH quando as espécies doadoras e receptoras igualam-se. Para o L-alanina este ponto é dado em 2,34 [1,2].
- pH básico: conforme o pH do meio torna-se mais básico, a forma desprotonada do aminoácido L-alanina fica mais evidente devido à doação de um próton H^+ por parte do grupo amino para o meio. Consequentemente, sua forma é a III na figura 1.6: $CH_3CH(NH_2)COO^-$. O ponto de pK , conhecido como pK_b ou pK_2 é de 9,1 [1] ou de 9,69 [2]. Esta diferença pode estar relacionada a temperatura e a concentração das soluções, a qual não foi informada na literatura.
- pH neutro: como já dito anteriormente, este ponto é denominado isoelétrico, no qual o aminoácido encontra-se totalmente na sua forma II, *zwitterion*, da figura 1.6 ($CH_3CH(NH_3^+)COO^-$), no qual sua carga resultante é nula e assume valores de $pI = 5,7$ [1] ou $pI = 6,01$ [2].

Por meio da curva de titulação, é possível obter informações à respeito da solução, como: medida quantitativa do pK dos grupos ionizáveis, bem como as eventuais regiões com potencial de tamponamento³.

Além do alanina ter este caráter anfótero, ele é classificado como não-essencial e possui massa molecular de 89,09 g/mol [23]. Este aminoácido foi sintetizado em 1850 por Adolph Strecker sendo o primeiro obtido sinteticamente. Já em 1888, Weill definiu sua estrutura química após isolar o L-alanina ao estado cristalino partindo da hidrólise⁴ da fibroína da seda [24].

Este aminoácido possui grande importância funcional no organismo, atuando principalmente no processo de construção e manutenção de proteínas. Como por exemplo: durante a biossíntese de proteínas, o alanina é incorporado na cadeia polipeptídica nascente como resposta a 4 códons genéticos. Além disto, por ter radical pequeno, o alanina

³Região de Tamponamento - Região onde a solução age como um tampão, ou seja, possui capacidade de atenuar a variação dos valores de pH, mantendo-se constante mesmo com adição de ácidos ou bases [22].

⁴Hidrólise - alteração ou reação de decomposição de uma substância pela água [11].

possui entre todos os resíduos dos aminoácidos, a maior tendência a adquirir a conformação de α -hélice em peptídeos, além de ser frequente em estruturas de proteínas com esta conformação [25].

Um papel importante é desempenhado também pelo alanina nos músculos, a qual transporta o nitrogênio e o carbono para o fígado, sendo este ciclo conhecido como ciclo do alanina. No fígado, este nitrogênio serve para a síntese de ureia e o carbono para a síntese de glicose, que ao ser liberado, pode ser usada como combustível pelo músculo [26]. Como consequência, o alanina é muito utilizada em suplementação alimentar, com o objetivo de promover energia, principalmente mediante exercícios físicos e, auxiliar no ganho de massa muscular [27, 28], além de outras funções desempenhadas por este aminoácido não abordadas, como: auxílio na formação dos neurotransmissores no sistema nervoso central [29] e auxílio no sistema imunológico por meio da produção de linfócitos [30].

O L-alanina também possui características ópticas não-lineares, ou seja, quando ocorre a formação de cristais monocristalinos deste aminoácido, eles apresentam um regime não linear mediante a interação da luz com a matéria, tendo suas propriedades ópticas modificadas. Dentre essas propriedades, este aminoácido apresenta geração do segundo harmônico (GSH) [5], além de possuir um *cut-off* para comprimentos de onda abaixo de 245 nm, sendo um ótimo transmissor na região do visível e ultravioleta [6]. Há também um sistema piezoelétrico devido ao seu coeficiente de acoplamento eletromecânico [6]. Ainda, o aminoácido L-alanina pode ser utilizado em dosímetros que respondem a irradiação térmica, pois minimiza a incerteza das medidas devido à pouca variação do seu coeficiente de temperatura, que pode variar de 0,14%/K a 0,17%/K, permitindo leituras em mais altas temperaturas [31].

1.3 Crescimento de Cristais:

Os materiais com características ópticas não-lineares estão sendo estudados desde muito tempo por apresentarem um potencial elevado em telecomunicações, computação óptica, armazenamento de dados, conversão de frequências, dentre outros [32]. Para isto, precisam apresentar estabilidade química e mecânica, grande janela de transparência e ponto de fusão relativamente alto. Devido à isto, há uma busca interminável por materiais que apresentem características cada vez melhores [5].

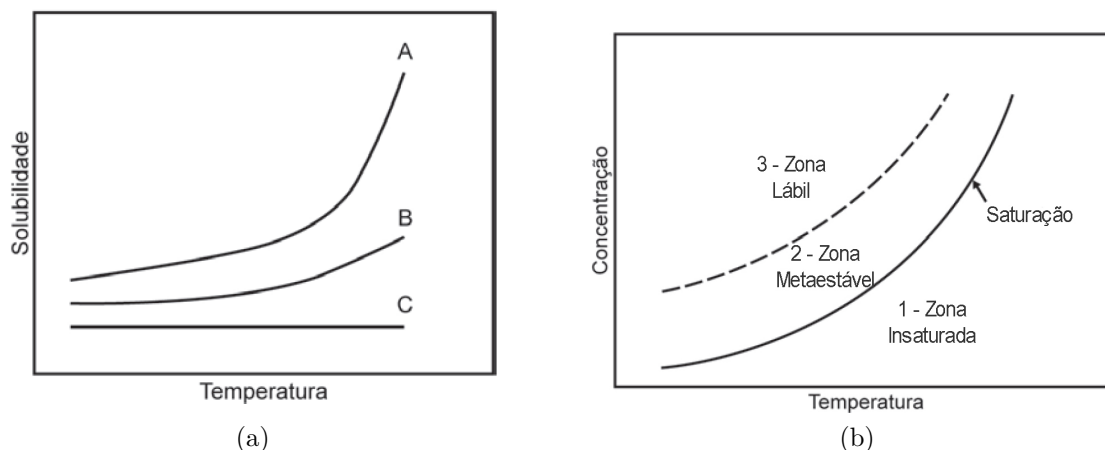


Figura 1.7: (a) Exemplo de curva de solubilização e (b) curva de supersaturação. Adaptado de [33].

Dentre estes materiais, os compostos orgânicos podem apresentar propriedades não-lineares mais acentuadas que cristais inorgânicos devido as suas ligações fracas, como do tipo Van der Waals, dipolo-dipolo e pontes de hidrogênio, apresentando alto grau de deslocalização de moléculas e partículas [32]. Porém, apresentam algumas desvantagens, visto que possuem banda limitada de transparência, limitação do comprimento de onda de corte devido as ligações intermoleculares, grandes momentos de dipolos e são estruturalmente frágeis [5, 32].

A formação de cristais se dá pelo processo de cristalização a partir de soluções, como consequência de uma mudança do soluto para a fase sólida. Isto ocorre graças a um sistema multicomponente e multifásico, que possui troca de massa entre as fases, bem como, troca de calor. Consequentemente, o tamanho e a conformação das partículas formadas podem variar durante a operação e para garantir o resultado desejado, é preciso monitorar todas as variáveis que afetam este processo [33].

Para este processo, é necessário que o soluto seja dissolvido em um meio conforme seu limite de solubilidade. Geralmente, este limite é alterado em função da temperatura [34]. A figura 1.7 (a) apresenta a relação da solubilidade e a temperatura para três compostos: A, B e C, no qual os compostos A e B aumentam sua solubilidade em função da temperatura com regimes diferentes. Enquanto que, o C mantém-se constante. Logo, é de extrema necessidade o conhecimento do material trabalhado, bem como, o meio no qual será solubilizado.

Quando uma solução contém menos soluto dissolvido do que aquele determinado pela concentração de equilíbrio, esta solução é dita insaturada. Esta zona está identificada no

gráfico 1.7(b). É nesta região que qualquer soluto se dissociará completamente [33].

Quando a solução está no limite, é conhecida como solução saturada, e está identificada exatamente em cima da curva contínua na figura 1.7(b). Nesta fase, pode ocorrer a coexistência com alguma fase sólida do soluto atingindo o equilíbrio termodinâmico [33].

Por fim, uma solução altamente concentrada em soluto, é dita supersaturada. É apenas nesta região que pode ocorrer a cristalização, como consequência da retirada de soluto da solução e sua deposição na fase sólida. Esta região pode ser dividida em duas zonas: 2 - zona metaestável e 3 - zona lábil. A zona metaestável é comumente atingida enquanto que, a zona lábil raramente é atingida na prática, visto que depende da intensidade de agitação, presença de impurezas na solução e a taxa com que a solução supersaturada é estabelecida [33, 34].

Nesta solução existe um equilíbrio dinâmico de formação, a qual gera-se corpos cristalinos, conhecido como nucleação. A nucleação envolve a formação dos clusters⁵ que são favorecidos quanto maior for o grau de supersaturação [33]. A passagem dos clusters maiores à núcleos se dá devido ao arranjo cristalino dos seus constituintes e também, pela interface sólido-líquido, acompanhada por uma variação da energia livre de Gibbs do sistema (energia livre global) [33].

Por fim, o crescimento destes cristais na solução dão-se por transferência de massa, nos processos de difusão ou convecção, do soluto para a superfície cristalina seguida de uma incorporação nesta superfície, de forma a gerar uma integração à rede cristalina [33].

As técnicas de cristalização são diversas e estão diretamente ligadas ao método no qual a supersaturação é alcançada: por resfriamento, por evaporação lenta de solvente, vácuo (resfriamento adiabático), adição de antissolvente (*drowning out* ou *salting out*) ou reação química. Não há como definir uma melhor técnica, pois, de forma geral, para cada crescimento há uma técnica na qual fornece um maior rendimento com um consumo menor de energia [33, 35].

⁵Clusters é o nome dado a união de moléculas organizadas de modo regular e ligadas por forças intermoleculares relativamente fracas [33]

CAPÍTULO 2

CONCEITOS GERAIS DAS TÉCNICAS UTILIZADAS

Neste capítulo será discutido a base teórica e os princípios físicos das técnicas utilizadas.

2.1 Vibrações Moleculares:

Quando uma molécula é atingida por uma radiação de mesma frequência que a natural de oscilação desta molécula, esta radiação é absorvida ou emitida fazendo com que as ligações entre os átomos pertencentes à molécula se movimentem. É possível decompor esses movimentos em modos normais de vibração, os quais estão associados à níveis de energia. Desta forma, nos modos normais de vibrações os átomos vibram na mesma frequência, mas em amplitudes e direções diferentes [36,37].

Para compreender os modos normais de vibração, é necessário fazer uso das propriedades de simetria molecular. Assim, cada átomo possui três graus de liberdade que representam movimentos nas direções x , y e z . A medida que este átomo desloca-se com relação a sua posição inicial, sofre uma variação para cada coordenada, identificada por Δx , Δy e Δz [36].

Como cada átomo possui 3 graus de liberdade, em uma molécula com N átomos haverá $3N$ graus de liberdade de movimento, conforme a figura 2.1.

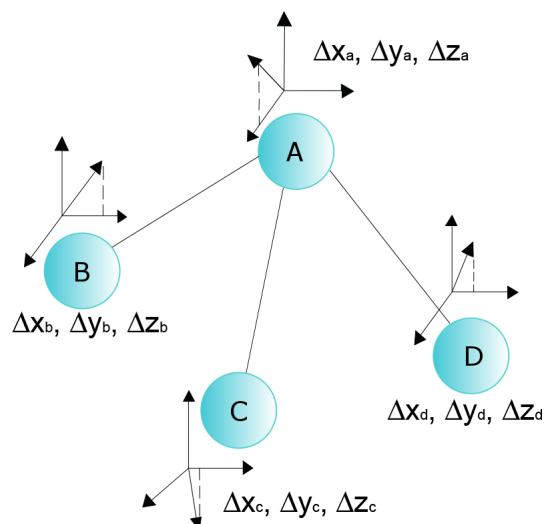


Figura 2.1: Esquema dos movimentos dos N átomos ($N=4$) em termos das variações das coordenadas Δx , Δy e Δz . Adaptado de [38].

No entanto, a molécula toda pode se mover no espaço tridimensional, ou seja, a molécula pode transladar o seu centro de massa em mais 3 graus de liberdade, sem que haja movimento dos átomos um em relação ao outro. Ainda, a molécula pode apresentar movimentos de rotação, os quais mantêm o centro de massa da molécula fixo no espaço de tal maneira que os átomos se movimentam juntos, assim como no movimento de translação. Sendo que as moléculas não lineares exibem 3 graus de liberdade para o movimento de rotação, conforme apresenta a figura 2.2 (b), enquanto que as moléculas lineares apresentam apenas 2, isto porque elas não apresentam movimento de rotação definida sobre o seu eixo internuclear [37], conforme descreve a figura 2.2 (a).

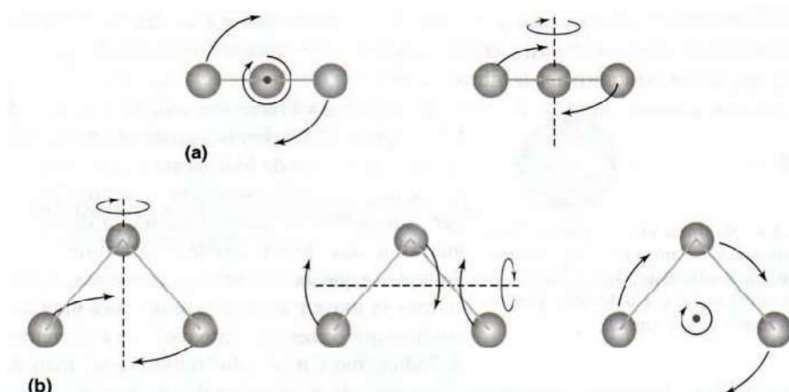


Figura 2.2: Esquema dos movimentação de rotação de uma (a) molécula linear com três átomos e (b) uma molécula não linear também com três átomos [39].

Por fim, os átomos ainda se movem uns em relação aos outros mantendo o centro de

massa da molécula fixo. Sendo que estes movimentos atômicos internos são os graus de liberdade vibracionais, conhecidos também como modos normais de vibração ou simplesmente, vibrações da molécula. Estes graus de liberdade podem ser expressos pelo total de graus de liberdade de uma molécula excluindo os movimentos de translação e rotação. Assim, moléculas lineares terá $3N-5$ graus de liberdade de vibração e moléculas não lineares $3N-6$ [37], conforme expressa a tabela 2.1.

Tabela 2.1: Graus de liberdade para uma molécula poliatômica [37].

Tipo de Grau de Liberdade	Linear	Não Linear
Translação	3	3
Rotação	2	3
Vibracional	$3N-5$	$3N-6$

O sistema vibracional para moléculas poliatômicas é caracterizado por mudanças nos deslocamentos das ligações e nos ângulos de equilíbrios entre as mesmas [40]. Devido ao fato de possuir frequências de vibrações características, os modos normais de vibração podem ser associados aos grupos funcionais e divididos em: estiramentos (deformações axiais) e deformações angulares. Os estiramentos podem ser simétricos ou assimétricos, enquanto as deformações podem ser simétricas ou assimétricas e no plano ou fora do plano [40], conforme a figura 2.3.

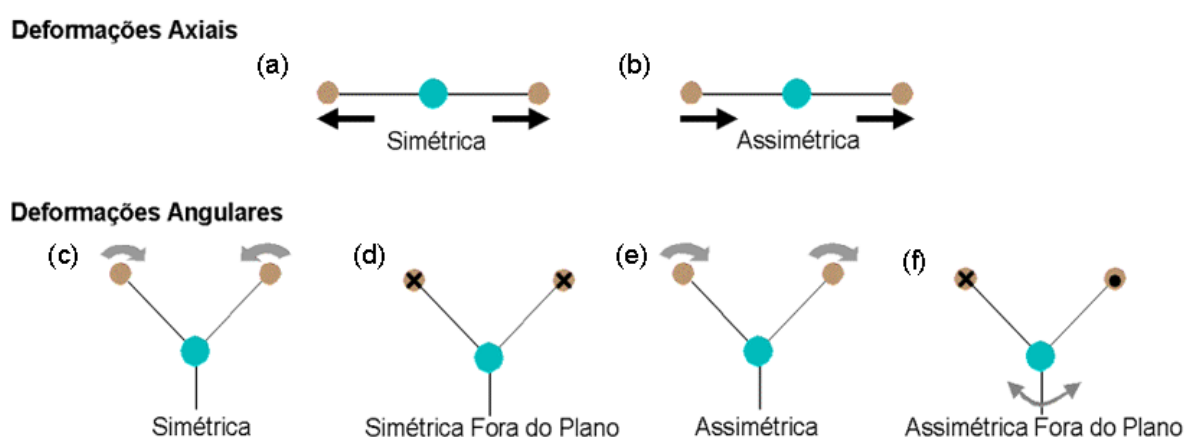


Figura 2.3: Exemplos de modos de vibrações para uma molécula poliatômica: (a-b) deformações axiais (estiramentos no plano) e (c-f) deformações angulares. Sendo “x” movimento para dentro do plano e “•” movimento para fora do plano. Adaptado de [41].

Estes modos normais de vibrações podem ser visualizados por meio de espectros Ra-

man devido a colisão inelástica de uma radiação monocromática com uma molécula [36].

2.2 Espectroscopia Raman:

Uma radiação eletromagnética é uma oscilação em fase dos campos elétricos e magnéticos seguindo um comportamento senoidal. Estes campos oscilam em planos perpendiculares entre si [42], conforme a figura 2.4.

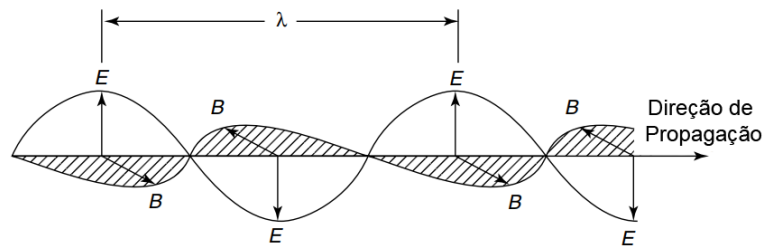


Figura 2.4: Esquema de uma onda eletromagnética. Adaptado de [40].

Pode-se considerar esta radiação com uma frequência (ν) e um campo elétrico (\vec{E}), descrita por meio da equação 2.1.

$$E = E_0 \cos 2\pi\nu t \quad (2.1)$$

sendo E_0 a amplitude e t o tempo.

Se esta radiação atinge uma molécula, o campo elétrico oscilante (\vec{E}) causará uma variação do momento de dipolo induzido da mesma (\vec{P}), que ocorre como resultado da polarizabilidade molecular (α) [37], expresso pela equação 2.2 e representado por meio da figura 2.5.

$$\vec{P} = \alpha \vec{E} \quad (2.2)$$

a polarizabilidade representa a deformação da nuvem eletrônica de elétrons sobre a molécula por um campo elétrico externo [42].

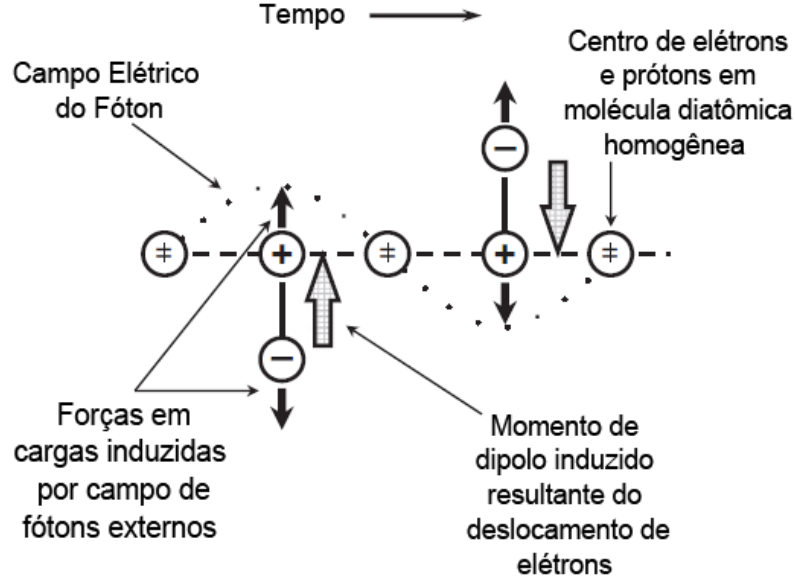


Figura 2.5: Representação do momento de dipolo induzido na molécula diatômica não-polar devido a um campo elétrico externo. Adaptado de [42].

Sendo, o momento de dipolo induzido expresso por 2.2, podendo ser escrito da seguinte forma:

$$P = \alpha E_0 \cos 2\pi\nu t \quad (2.3)$$

Considerando também, que a molécula vibre com frequência (ν_i), o deslocamento do núcleo é descrito da seguinte forma:

$$q = q_0 \cos 2\pi\nu_i t \quad (2.4)$$

sendo q_0 é a amplitude vibracional.

Para pequenas amplitudes de vibração, α é uma função linear de q que pode ser expandida em série de Taylor, com relação a posição inicial do núcleo, da seguinte maneira:

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_0 q + \dots \quad (2.5)$$

no qual q é dado pela expressão 2.4 e que pode ser substituído em 2.3, obtendo:

$$P = \alpha_0 E_0 \cos 2\pi\nu t + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_0 q_0 \cos(2\pi\nu_i t) E_0 (\cos 2\pi\nu t) \quad (2.6)$$

como: $\cos(a) \cos(b) = \frac{1}{2}[\cos(a + b) + \cos(a - b)]$, obtem-se:

$$P = \alpha_0 E_0 \cos 2\pi\nu t + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_0 q_0 E_0 \{ \cos[2\pi(\nu + \nu_i)t] + \cos[2\pi(\nu - \nu_i)t] \} \quad (2.7)$$

O primeiro termo corresponde ao espalhamento *Rayleigh* por conter somente a frequência de radiação incidente. Este espalhamento é oriundo da colisão elástica de fótons com a molécula. Desta forma, o fóton espalhado possui a mesma energia do fóton incidido, conseqüentemente a mesma frequência (ν) [37]. Este efeito acontece quando a molécula está no estado fundamental, é atingida por um fóton e excita-se. Ao decair, a mesma retorna para o seu estado de energia inicial [36]. Este processo está representado na figura 2.6(b).

No espalhamento inelástico de fótons, no qual o efeito Raman baseia-se, a molécula em seu estado fundamental é perturbada por um fóton, cuja energia é $h\nu_0$, transitando do estado fundamental para um estado “virtual” de energia da molécula [36]. Este estado é dito virtual devido a interação da energia da radiação e a nuvem eletrônica da molécula, o qual possui um tempo de vida muito curto, e como o estado não é estável a radiação logo é emitida como radiação espalhada. Assim, este estado de interação entre a radiação e a nuvem eletrônica é chamado de estado virtual [43].

Desta maneira, quando a molécula retorna ao estado fundamental, o fóton espalhado pode ter energia maior ($h\nu_0 + e_{vn}$) ou menor ($h\nu_0 - e_{vn}$) que a do fóton incidente [36]. Quando a energia do fóton espalhado é menor, temos que o nome dado ao espalhamento é Stokes [36], figura 2.6(a). E, quando o fóton espalhado possui energia maior, este recebe o nome de anti-Stokes [36], figura 2.6(c). Estes efeitos são representados pelo segundo termo da equação 2.7. Porém, para que o segundo termo exista, é necessário que $(\partial\alpha/\partial q) \neq 0$, desta forma, haverá variação da polarizabilidade molecular [36], que é uma das regras de seleção para o efeito Raman [43].

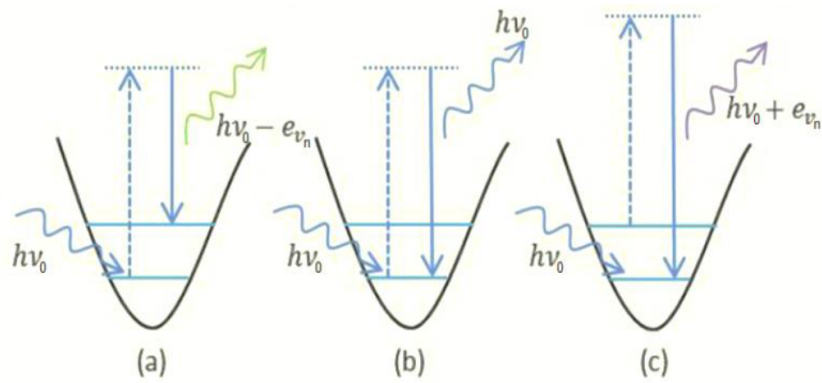


Figura 2.6: Ilustração dos tipos de espalhamento: (a) Raman Stokes; (b) *Rayleigh*; (c) Raman Anti-Stokes. Adaptado de [36].

O espectro Raman pode ser adquirido por meio de um espectrômetro que possui uma luz monocromática. A luz é incidida sobre a amostra e espalhada (Raman e *Rayleigh*) sendo captada por um detector e transformada em espectro por meio de um *software*, no qual a intensidade é dada em função da mudança de frequência [38].

Este espectro será formado por um pico referente ao espalhamento *Rayleigh* e simetricamente, uma banda referente a frequências mais baixas de vibração, Stokes, e uma do lado de frequências mais altas, anti-Stokes. Sendo o Stokes mais intenso, neste caso, em virtude da maior quantidade de moléculas no estado fundamental [36], conforme a figura 2.7.

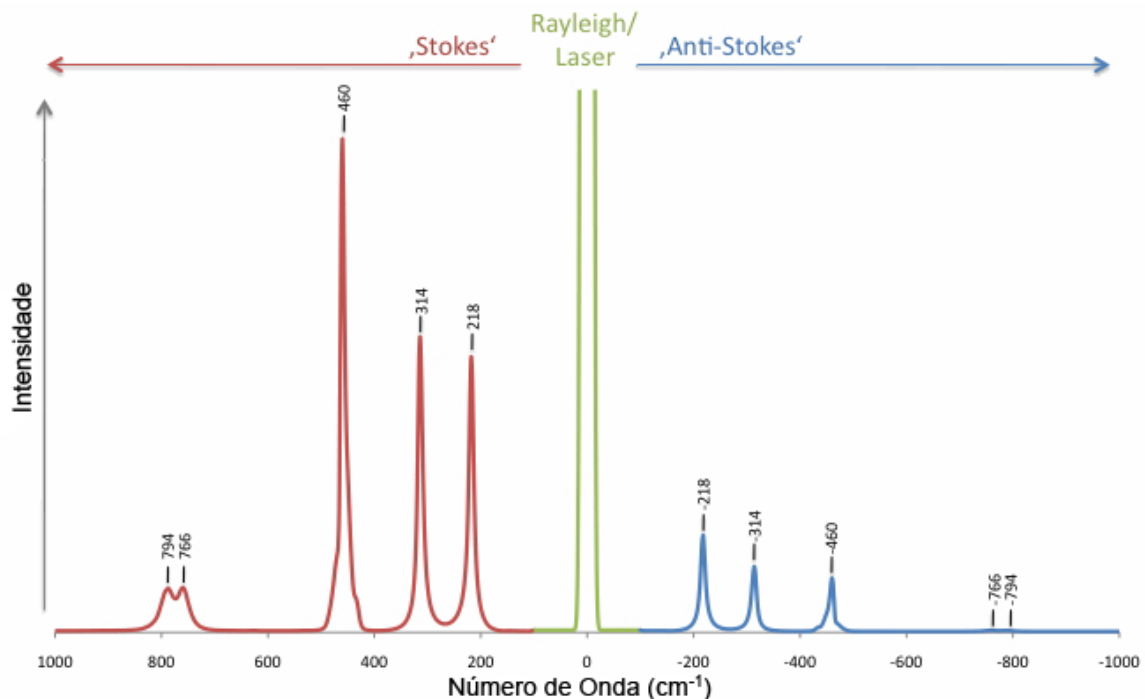


Figura 2.7: Representação de um espectro com os espalhamentos Stokes, Rayleigh e Anti-Stokes. Adaptado de [44].

Assim, os espectros Raman são respostas dos modos normais de vibração de um material que são representados por bandas e picos para cada região espectral.

2.3 Estrutura Cristalina:

Os sólidos podem ser classificados em dois principais grupos: sólidos cristalinos e sólidos não cristalinos, conhecidos como amorfos. Sempre que um material exibir um arranjo geométrico regular de seus átomos dispostos em posições fixas no espaço, estes contituem uma estrutura cristalina. Já os materiais amorfos, não apresentam um ordenamento de longo alcance e sua estrutura é considerada, de fato, desorganizada [45].

A estrutura cristalina, de forma geral, pode ser descrita por grupos de átomos ligados uns aos outros, que repetem-se, em pontos específicos de uma rede. Os grupos são formadores de uma base, conforme a figura 2.8 (A), a qual, liga-se na rede por meio de pontos específicos. Logo, a rede tem como objetivo principal, organizar estes pontos geometricamente no espaço [46], representado na figura 2.8 (B).

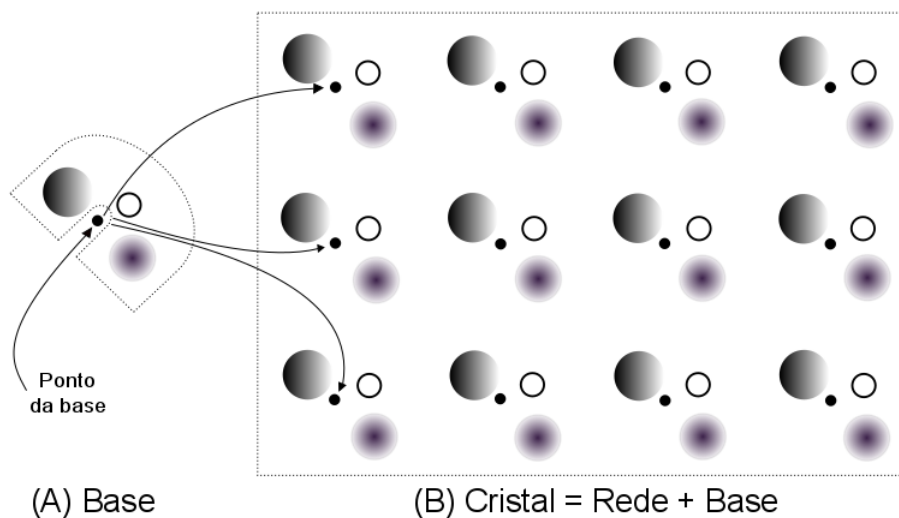


Figura 2.8: Esquema da base com três átomos (A); Cristal (B). A base é posicionada em cada ponto da rede para formar o cristal. Adaptado de [47].

A menor parte de um cristal pode ser denominado como célula unitária. Cada célula unitária pode ser descrita por três vetores de rede, conhecidos por \mathbf{a} , \mathbf{b} e \mathbf{c} , cujos ângulos formados entre estes vetores são representados por α , β e γ [45], estes parâmetros são conhecidos como parâmetros de rede da célula unitária, conforme apresenta a figura 2.9.

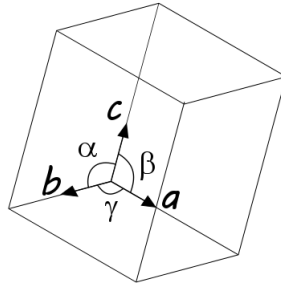


Figura 2.9: Esquema dos vetores de rede (\mathbf{a} , \mathbf{b} e \mathbf{c}) e seus respectivos ângulos (α , β e γ).

A escolha dos eixos da rede (\mathbf{a} , \mathbf{b} e \mathbf{c}) deve representar a menor área e o menor volume possível para a célula unitária [48]. Além disto, por possuir operações de simetria, como translação e rotação [46], as redes cristalinas podem enquadrar-se em diferentes tipos de redes, conhecidas como redes de Bravais, figura 2.10. Desta forma, do ponto de vista simétrico, há 14 redes de Bravais que permitem descrever células unitárias diferentemente uma das outras [48], sendo necessário a adoção de valores diferentes de eixos (\mathbf{a} , \mathbf{b} e \mathbf{c}) e ângulos (α , β e γ) para cada um dos 7 arranjos atômicos básicos que definem 7 sistemas cristalinos, conforme a tabela 2.2.

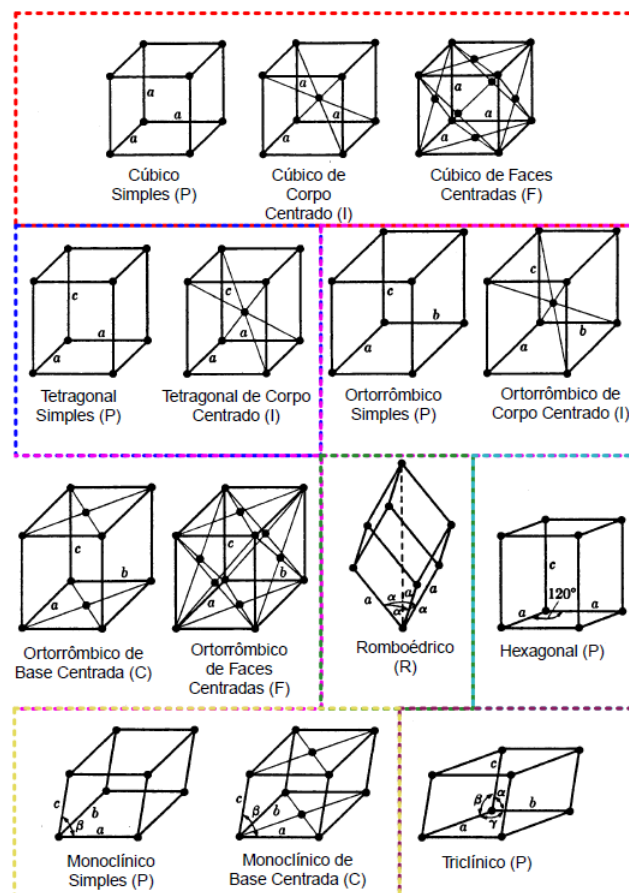


Figura 2.10: Esquema das 14 redes de Bravais. Adaptado de [45].

Tabela 2.2: Os 7 sistemas cristalinos com seus respectivos eixos e ângulos axiais [46].

Sistemas Cristalinos	Eixos	Ângulos Axiais
Cúbico	$\mathbf{a} = \mathbf{b} = \mathbf{c}$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Tetragonal	$\mathbf{a} = \mathbf{b} \neq \mathbf{c}$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Ortorrômico	$\mathbf{a} \neq \mathbf{b} \neq \mathbf{c}$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Monoclínico	$\mathbf{a} \neq \mathbf{b} \neq \mathbf{c}$	$\alpha = \gamma = 90^\circ; \beta \neq 90^\circ$
Triclínico	$\mathbf{a} \neq \mathbf{b} \neq \mathbf{c}$	$\alpha \neq \beta \neq \gamma \neq 90^\circ$
Hexagonal	$\mathbf{a} = \mathbf{b} \neq \mathbf{c}$	$\alpha = \beta = 90^\circ ; \gamma = 120^\circ$
Romboédrico	$\mathbf{a} = \mathbf{b} = \mathbf{c}$	$\alpha = \beta = \gamma \neq 90^\circ$

Com três pontos não colineares em uma rede de Bravais é possível definir um plano [46]. Porém, este plano precisa ser orientado e localizado nesta rede. Desta forma, em 1839, William Hallowes Miller determinou que descreve-se a orientação de um plano fornecendo-se um vetor normal a este plano [49], com algumas regras estabelecidas: 1) Encontrar as interseções sobre os eixos \mathbf{a} , \mathbf{b} e \mathbf{c} em termos das constantes da rede. 2) Tomar os inversos destes números e reduzi-los a três menores inteiros de mesma razão. O resultado é colocado entre parentêses, da seguinte forma: (hkl) [46], conforme a figura 2.11.

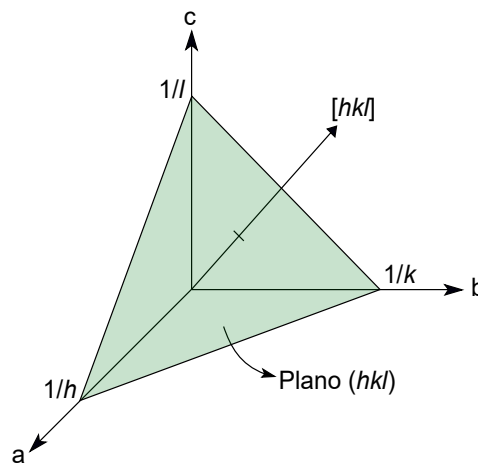


Figura 2.11: Plano representado pelos índices de Miller (hkl) nas coordenadas \mathbf{a} , \mathbf{b} e \mathbf{c} . Adaptado de [50].

A estrutura cristalina dos materiais pode ser determinada por diversas técnicas atuais, sendo a difração de raios X uma delas, a qual pode fornecer informações a respeito da estrutura cristalina do material, como: tipo de rede, parâmetros de rede, orientação do

cristal, dentre outros [45].

2.4 Difração de raios X (DRX):

O raio X é uma radiação eletromagnética que possui como principal característica pequenos comprimentos de onda. Ele foi descoberto por Wilhelm Conrad Röntgen em 1895 enquanto trabalhava com tubos de raios catódicos evacuados de Hittorf-Crookes [45].

Toda partícula carregada ao ser acelerada emite radiação eletromagnética. Dentre as diversas formas de produção de raios X, o que tem-se em difratômetros de pequeno porte é um tubo contendo um filamento que é estimulado através de uma corrente elétrica a produzir brilho e consequentemente emitir elétrons. Uma diferença de potencial é aplicada entre o cátodo e o ânodo, com o objetivo de acelerar estes elétrons. Já em alta velocidade, o elétron atinge um alvo metálico sendo desacelerado. Esta desaceleração causa a emissão de fótons de raios X de forma contínua [51]. Esquema em 2.12.

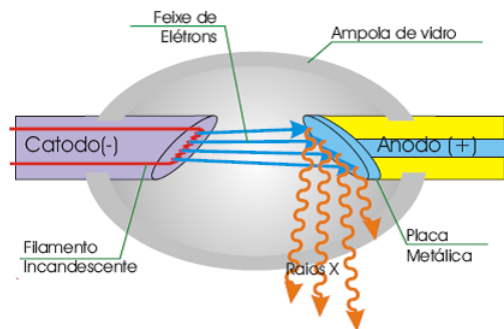


Figura 2.12: Esquema da produção de raios-X. Adaptado de [52].

Ainda, ao atingir o alvo metálico, os elétrons podem penetrar em camadas mais profundas de um átomo, interagindo com os orbitais mais internos. Desta forma, se a energia recebida for da ordem da energia de ligação destes elétrons, este será ejetado da sua camada, deixando uma lacuna, que será preenchido por um elétron de camada mais externa. Quando este elétron de uma camada mais externa decai, ocorre a liberação de energia em forma de raio X característico, processo esquematizado na figura 2.13. Como estas transições discretas ocorrem entre as camadas L e K, e M e K temos que a radiação característica será descrita como K_{α} e K_{β} , a qual por estar relacionada aos níveis de energia dos átomos do alvo apresenta uma emissão consideravelmente mais intensa e monocromática [51].

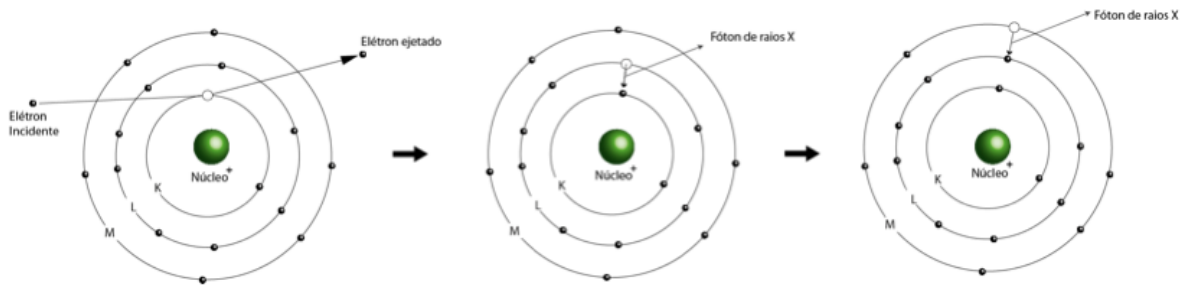


Figura 2.13: Esquema da geração de um fóton de raios X [53].

Esta radiação tem algumas propriedades, como: propagação em linhas retas, absorção exponencial pela matéria, ser imutável diante de campos elétricos e magnéticos, produção de fluorescência e fosforescência em algumas substâncias e velocidade de propagação característica [45]. Além de apresentar a emissão superposta de dois espectros (conforme os dois processos já descritos acima), esquematizado na figura 2.14: Um espectro contínuo, contendo diversos comprimentos de onda que são gerados como consequência da desaceleração dos elétrons e, um espectro característico, contendo os comprimentos de onda característicos do material atingido [45].

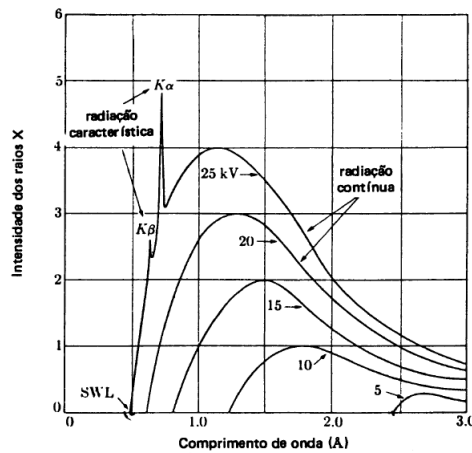


Figura 2.14: Representação do espectro de emissão superposto de raios X [51].

Quando um feixe de raio-X deixa a fonte, todas as suas ondas de raios-X encontram-se em fase. Ao atingir um material cristalino, este feixe incidente pode ser parcialmente difratado na superfície e, também pode atingir camadas mais internas deste material, percorrendo distâncias maiores. Estas distâncias dependem do espaçamento entre duas camadas atômicas, desta forma, pode-se dizer que o feixe sofre difração e o material atua como uma grade dispersiva [54], representado em 2.15.

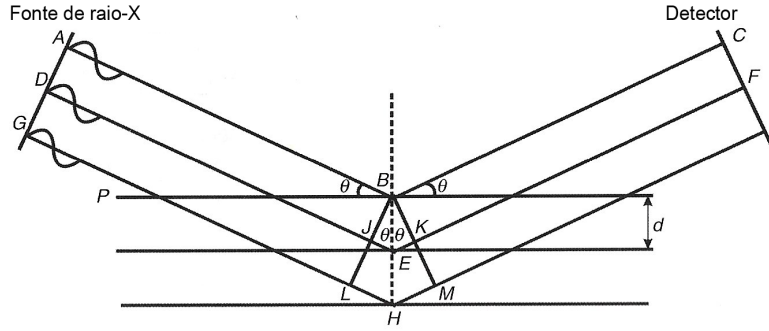


Figura 2.15: Difração dos feixes de raios X em uma rede cristalina. Adaptado de [54].

Quando os feixes são difratados podem formar perfis de interferências construtivas ou destrutivas [54], esquematizado na figura 2.16. A interferência destrutiva resulta em amplitude zero e ocorre quando a diferença das distâncias percorridas pelos feixes for de meio comprimento de onda. Enquanto que, a interferência construtiva ocorrerá se, para cada feixe, a diferença das distâncias percorridas for um múltiplo inteiro do comprimento de onda [45].

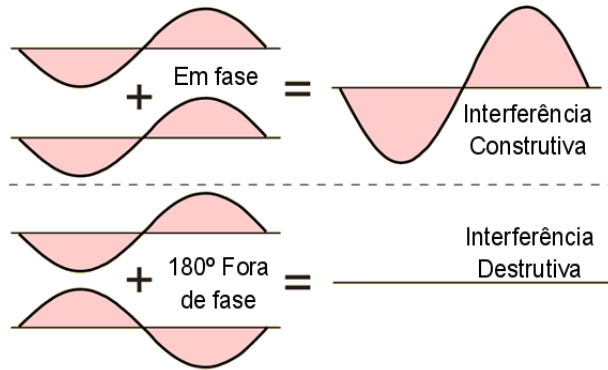


Figura 2.16: Fenômeno de interferência. Adaptado de [55].

A diferença das distâncias percorridas pelo feixe, pode ser analisada geometricamente. Observando a figura 2.15, tem-se que a distância entre \overline{JE} equivale a distância \overline{EK} e a soma dessas distâncias precisa ser múltiplo inteiro do comprimento de onda, para que a interferência seja construtiva. Logo:

$$\overline{JE} + \overline{EK} = 2\overline{JE} = n\lambda \quad (2.8)$$

Como $\sin \theta = \overline{JE}/\overline{BE}$. Ao substituir \overline{JE} na equação 2.8, obtem-se a Lei de Bragg em 2.9, já que \overline{BE} é a distância entre os planos atômicos, conhecida como d .

$$2d \sin \theta = n\lambda \quad (2.9)$$

θ é o ângulo da radiação incidente, λ o comprimento de onda incidente e n a ordem de difração.

Experimentalmente existem diferentes arranjos experimentais possíveis. O arranjo experimental utilizado neste trabalho consiste em uma fonte de raios X cujo espectro gerado não é monocromático, conforme já visto na figura 2.14. Esta radiação passa por uma fenda e atinge a amostra como um todo. Ao ser difratada, é direcionada para um filtro cuja função é remover a radiação contínua e a radiação referente a linha K_β , permitindo a passagem apenas da linha referente a K_α . Este feixe então é colimado e captado por um detector. Este detector pode ser movido ao longo de um goniômetro, para cobrir a faixa de ângulos medidos [45], segundo a figura esquemática 2.17.

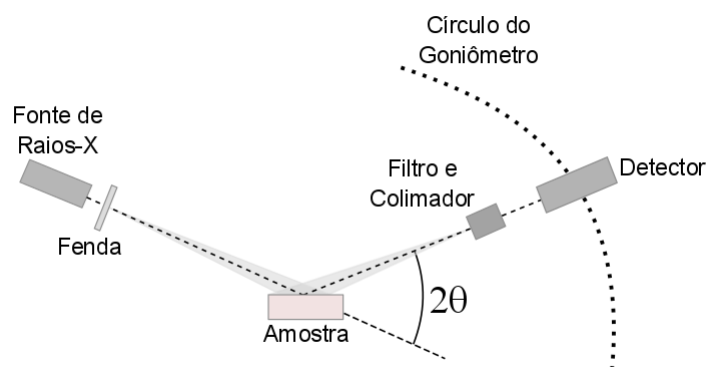


Figura 2.17: Esquema do funcionamento de um difratômetro de raios X.

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo será explanado a preparação das amostras de L-alanina: comercial, soluções aquosas em diferentes concentrações, solução aquosa com diferentes valores de pH e cristais de L-alanina crescidos em soluções aquosas com diferentes valores de pH. Bem como, as configurações utilizadas para as técnicas de espectroscopia Raman e difratometria de raios-X.

3.1 L-alanina policristalina:

Adquiriu-se o aminoácido comercial com 99,4% de pureza (*Zhejiang Chemicals*), o qual foi utilizado em todas as medidas.

3.1.1 Soluções aquosas do aminoácido L-alanina:

O aminoácido L-alanina possui limite de solubilidade em água de 16,7g/100mL à 25°C [19], valor este utilizado apenas para crescimentos de cristais. Para análise das soluções aquosas, realizou-se uma concentração máxima de 1 mol/L, correspondente à 8,9g/100mL, garantindo uma diluição completa do soluto baseado no modo de preparo adotado. Modo este que será descrito nas subseções correspondentes.

- à pH neutro:

Soluções aquosas de 1 mol/L foram preparadas pesando, primeiramente, $0,8909 \pm 0,0001$ g de L-alanina em uma balança analítica cuja precisão é de 0,01 mg (A&D Company, série 202) e adicionando em um béquer contendo 10mL de água ultra pura (Milli-Q, Direct-Q).

Em seguida, levou-se o béquer contendo a solução, para um agitador mecânico (Corning, PC 420) na velocidade 7 por 1h30min para garantir uma diluição total do material, minimizando o corpo de fundo. As medidas de espectroscopia Raman foram realizadas logo em seguida.

- com variação de pH:

Utilizando a solução aquosa de 1 mol/L, preparou-se 20 mL e aferiu-se o pH com o auxílio de um pHmetro (mPA-210) com precisão $\pm 0,01$ e temperatura (com precisão de $\pm 0,2^\circ\text{C}$), calibrado com solução tampão de pH 4, 7 e 10, respectivamente. Para a solução neutra, obteve-se um pH de $6,09 \pm 0,01$ à $25,0 \pm 0,2^\circ\text{C}$.

Separando em duas soluções de 10 mL (valor mínimo para a medida no pHmetro), foi possível adicionar os reagentes escolhidos com base na literatura [7,56], Ácido Clorídrico (HCl) e Hidróxido de Sódio (NaOH), ambos com uma concentração de 1 mol/L que foram adicionados com o auxílio de uma pipeta de $0,20 \pm 0,01$ mL.

As medidas de espectroscopia Raman foram realizadas em pontos característicos da curva de titulação do L-alanina: Ponto isoelétrico $\simeq 6,09$, $6,09 > \text{pH} > 2,34$, $pK_a = 2,34$, $\text{pH} < 2,34$, $6,09 < \text{pH} < 9,69$, $pK_b \simeq 9,69$ e $\text{pH} > 9,69$.

A solução foi agitada por aproximadamente 10 minutos, posteriormente, repousou mais 10 minutos. Desta forma, não notou-se variação do pH após um período de 24 horas.

3.1.2 Crescimento de cristais em diferentes pH:

A técnica de evaporação lenta do solvente foi utilizada para o crescimento dos cristais de L-alanina, sendo as soluções neutras, ácidas e básicas preparadas conforme descrito nas subseções acima. Utilizou-se a concentração máxima de solubilidade da L-alanina, equivalente à 16,7g/100mL, ou seja, 1,8 mol/L, concentração esta considerada saturada. Já que,

a medida que ocorre a evaporação do solvente, esta solução tende a ficar supersaturada, privilegiando o crescimento de cristais. Como os reagentes utilizados para as soluções com diferentes valores de pH possuíam a mesma concentração da solução aquosa, optou-se pelo Ácido Clorídrico (HCl) e o Hidróxido de Sódio (NaOH) também de 1,8 mol/L.

Após o preparo de 3 soluções de 10 mL, o pH dos béqueres foram aferidos em: pH = 6,17 (neutro), pH = pK_a = 2,34 (ácido) e pH = pK_b = 9,69 (básico). As soluções foram então tampadas com papel alumínio furado e condicionadas em uma sala com temperatura fixa de 21°C.

A solução neutra apresentou pequenos cristais após sete dias. Sendo retirado então, o cristal da figura 3.1 (b) após 28 dias. Porém, as soluções ácida e básica, não apresentaram nenhum precipitado. Sendo necessário a utilização do método de inserção de sementes após 14 dias, o qual consiste na adição de cristais comerciais de L-alanina nas soluções, com o intuito de torná-las mais saturadas.

Após 22 dias da inserção de sementes, o cristal da figura 3.1 (c) foi obtido da solução básica. Já para a solução ácida, somente após 36 dias para a formação do cristal da figura 3.1 (a).

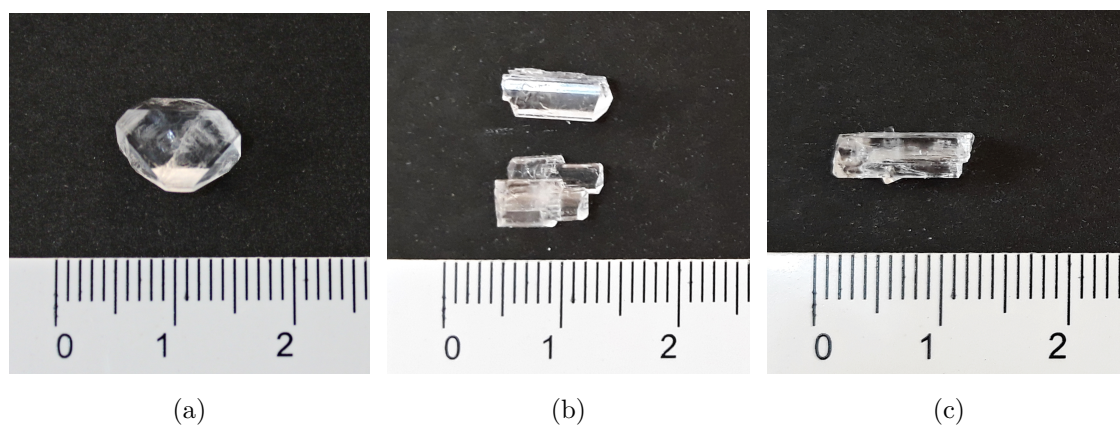


Figura 3.1: Cristais de L-alanina crescidos em: (a) pH 2,34, (b) pH neutro e (c) pH 9,69.

Desta maneira, o período final de crescimento foram de 28 dias para a solução neutra, 36 dias para a solução básica e 50 dias para solução ácida.

As análises por espectroscopia Raman foram realizadas tanto na amostra em cristal, como na macerada, as quais apresentaram um espectro semelhante. Como os cristais apresentam direção preferencial, já que crescem orientados, optou-se por trabalhar com o material macerado.

3.2 Espectroscopia Raman:

Todas as amostras foram medidas em um microscópio Raman confocal (SENTERRA, Bruker), conhecido como μ -Raman, pertencente ao Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP-UEM) equipado com três lasers de excitação (532, 633 e 785 nm).

Para a realização das medidas utilizou-se o laser de excitação 532 nm e potência nominal de 20 mW com o intuito de reduzir os efeitos de luminescência. Cada espectro Raman foi gerado por meio de uma média de 15 varreduras em um mesmo ponto na amostra com tempo de integração de 10 segundos, focado por uma lente objetiva de magnitude de 20x, com uma resolução espectral de 3-5 cm^{-1} , obtidos no intervalo de 290 à 1740 cm^{-1} . Ainda, a abertura confocal foi em formato de fenda retangular de 50x1000 μm , sendo o detector uma câmera CCD (*charged-coupled device*) refrigerada a $-85^{\circ}C$.

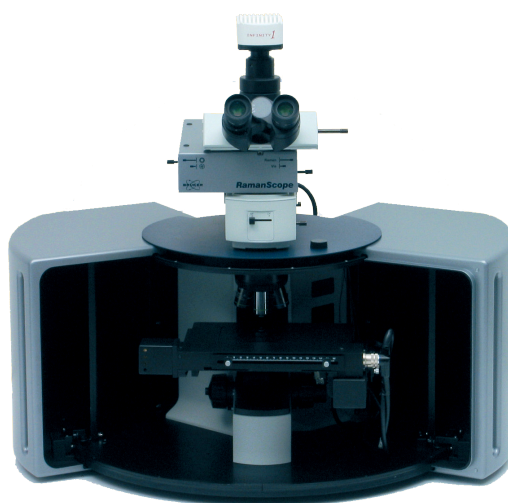


Figura 3.2: Espectrômetro confocal Raman similar ao utilizado para as medidas. Adaptado de [57].

3.3 Difração de raios-X (DRX):

As medidas foram realizadas em um difratômetro de raios-X (D2 Phaser, Bruker), semelhante ao da figura 3.3 pertencente à Universidade Estadual de Maringá (UEM) - Campus Goioerê, cujo responsável é o Prof^o. Dr. Ronaldo Celso Viscovini. A radiação incidida foi $CuK\alpha$ sobre a amostra em pó condicionada em um porta-amostra o qual será detalhado abaixo.



Figura 3.3: Difratorômetro de raios-X similar ao utilizado para as medidas [58].

A amostra comercial e o cristal macerado crescido em meio ácido foram condicionados em um porta-amostra padrão do equipamento e os difratogramas foram obtidos com a amostra em rotação a 30 RPM, com $0,02^\circ$ de passo, com 2θ de 5° a 50° e velocidade de varredura de 5s/passos.

Já as amostras neutras e básicas foram condicionadas em um porta-amostra de vidro, onde uma pequena quantidade amostra foi necessária para a obtenção do difratograma. Como consequência disto, não foi possível rotacionar a amostra. Os difratogramas foram coletados com $0,02^\circ$ de passo, com 2θ de 5° a 80° e velocidade de varredura de 5s/passos, assim como para as outras amostras.

Apesar de todas as amostras estarem sujeitas ao efeito de direção preferencial, e o fato de rotacionar a amostra durante a medida auxiliar na redução deste efeito, isto não foi possível para algumas amostras justamente devido a quantidade de material, o qual necessitou de outro porta-amostra, impossibilitando a rotação da mesma.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo é destinado à apresentação dos resultados obtidos para as amostras do aminoácido L-alanina e suas respectivas análises.

4.1 Caracterização do L-alanina comercial por espectroscopia Raman:

O espectro do aminoácido L-alanina comercial foi caracterizado por meio da técnica de μ -Raman, em temperatura ambiente, com o intuito de identificar os modos vibracionais e atribuí-los aos respectivos grupos funcionais do material. Este espectro está apresentado na figura 4.1 e foi normalizado utilizando como referência o pico de maior intensidade em 851 cm^{-1} . Isto foi necessário para uma melhor visualização e futuras comparações com os outros espectros.

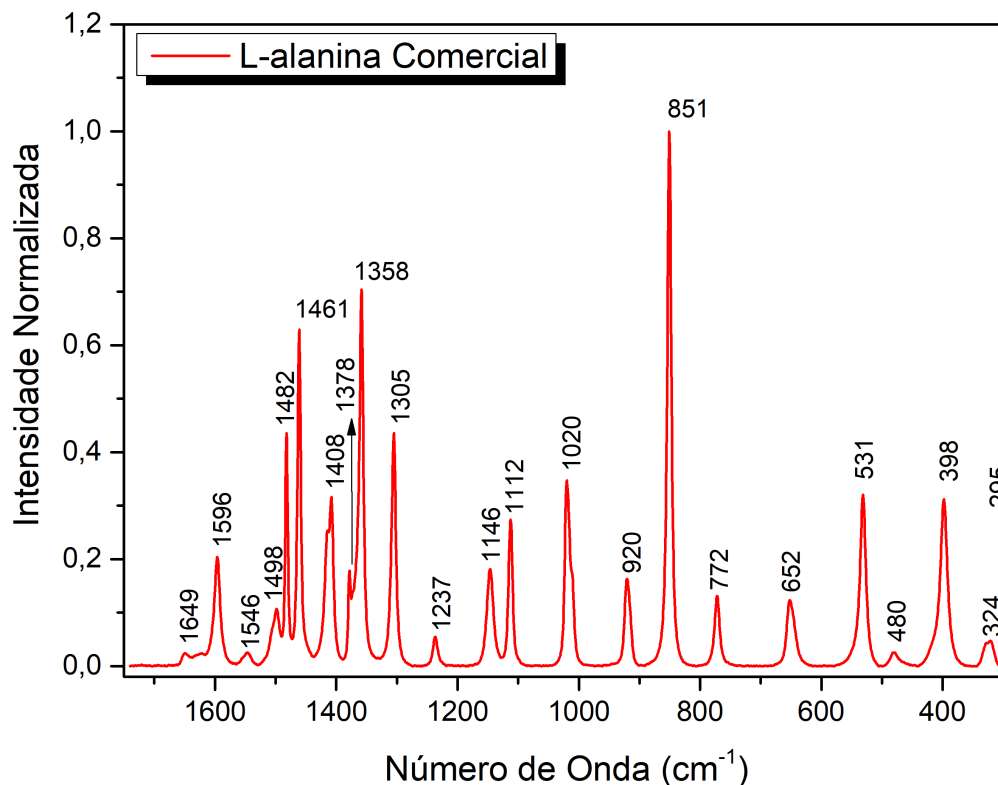


Figura 4.1: Espectro Raman do aminoácido L-alanina comercial.

É possível observar uma deformação assimétrica de NH_3^+ ($\delta_{as}NH_3^+$) em 1649 cm^{-1} [59], uma deformação simétrica em 1546 cm^{-1} [60] e em 1498 cm^{-1} [59], além de uma deformação do tipo balanço (rNH_3^+) em 1237 e 1146 cm^{-1} [61]. A banda em 1146 cm^{-1} ainda sofre contribuição de uma deformação do NH_3^+ (δNH_3^+) [59]. Por fim, atribui-se uma torção de NH_3^+ (τNH_3^+) em 480 cm^{-1} [61,62].

Em 1596 cm^{-1} a banda é associada ao estiramento assimétrico de CO_2^- ($\nu_{as}CO_2^-$) [61] enquanto que, em 1408 e em 1358 cm^{-1} ocorre o estiramento simétrico de CO_2^- ($\nu_sCO_2^-$) [56,61]. A banda em 920 cm^{-1} resulta em um estiramento entre o carbono e o grupo carboxílico (νCCO_2^-) [61,63]. À medida que em 772 , 652 e 531 cm^{-1} há a predominância de deformações de CO_2^- , como: deformação do tipo abano (wCO_2^-) [61], deformação (δCO_2^-) [61] e deformação do tipo rotação (rCO_2^-) [61,62], respectivamente.

No intervalo de 1305 a 1482 cm^{-1} ocorre a predominância de modos vibracionais relacionados ao CH . Para 1482 cm^{-1} tem-se uma a deformação do CH [60] enquanto que, em 1461 cm^{-1} há a deformação assimétrica do CH_3 ($\delta_{as}CH_3$) [59,61,63]. Os picos localizados em 1378 e 1358 cm^{-1} são caracterizados pela deformação simétrica do CH_3 (δ_sCH_3) [56,59,61,63]. Além de em 1305 cm^{-1} existir apenas a deformação do grupo CH

(δCH) [56, 59] e, adicionalmente, em 1020 cm^{-1} uma deformação do tipo rotação para o CH_3 (rCH_3) [61].

Para frequências mais baixas, aparecem os modos vibracionais característicos da estrutura molecular, como: estiramento assimétrico de CCN ($\nu_{as}CCN$) [59] combinado com estiramento de CN (νCN) em 1112 cm^{-1} [61]. Em 851 cm^{-1} o estiramento simétrico de CCN (ν_sCCN) [59], estiramento de CCH_3 (νCCH_3) [61] e estiramento de CC (νCC) [63]. Além da torção de CH_3 somado com uma vibração molecular do esqueleto [61], em 398 cm^{-1} , que ainda pode ser considerado como uma deformação [59]. Além de uma deformação de $CCNC$ ($\delta CCNC$) [62] em 324 e 295 cm^{-1} . Por fim, detectou-se também uma torção de CH_3 em 295 cm^{-1} [59, 62].

Os centros das bandas obtidos e suas atribuições encontradas na literatura estão exibidos na tabela 4.1 à seguir.

Tabela 4.1: Atribuição dos modos vibracionais do aminoácido L-alanina.

Nº de Onda (cm^{-1})	Atribuições
1649	$\delta_{as}NH_3^+$ [59]
1597	$\nu_{as}CO_2^-$ [61]
1546	$\delta_sNH_3^+$ [60]
1498	$\delta_sNH_3^+$ [59]
1482	δCH [60]
1461	$\delta_{as}CH_3$ [59, 61, 63]
1408	$\nu_sCO_2^-$ [61]
1378	δ_sCH_3 [59]
1358	δ_sCH_3 [61, 63] / $\nu_sCO_2^-$ [56]
1305	δCH [56, 59]
1237	rNH_3^+ [61]
1146	δNH_3^+ [59] / rNH_3^+ [61]
1112	$\nu_{as}CCN$ [59] / νCN [61]
1020	rCH_3 [61]
920	νCCO_2^- [61, 63]
851	ν_sCCN [59] / νCCH_3 [61] / νCC [63]
772	wCO_2^- [61]
652	δCO_2^- [61]

531	rCO_2^- [61,62]
480	τNH_3^+ [61,62]
398	$\tau CH_3 + Skel$ [61] / $\delta skel$ [59]
324	$\delta CCNC$ [62]
295	$\delta CCNC$ [62] / τCH_3 [59,62]

4.2 Soluções aquosas:

A solubilização total da amostra para uma análise futura com variação de pH é fundamental para que não haja contribuição do espalhamento oriundo das partículas não solubilizadas no espectro. Para isto, designou-se uma concentração máxima de 1 mol/L para a análise das soluções por espectroscopia Raman, cujo espectro encontra-se na figura 4.2 e foi normalizado em 1630 cm^{-1} .

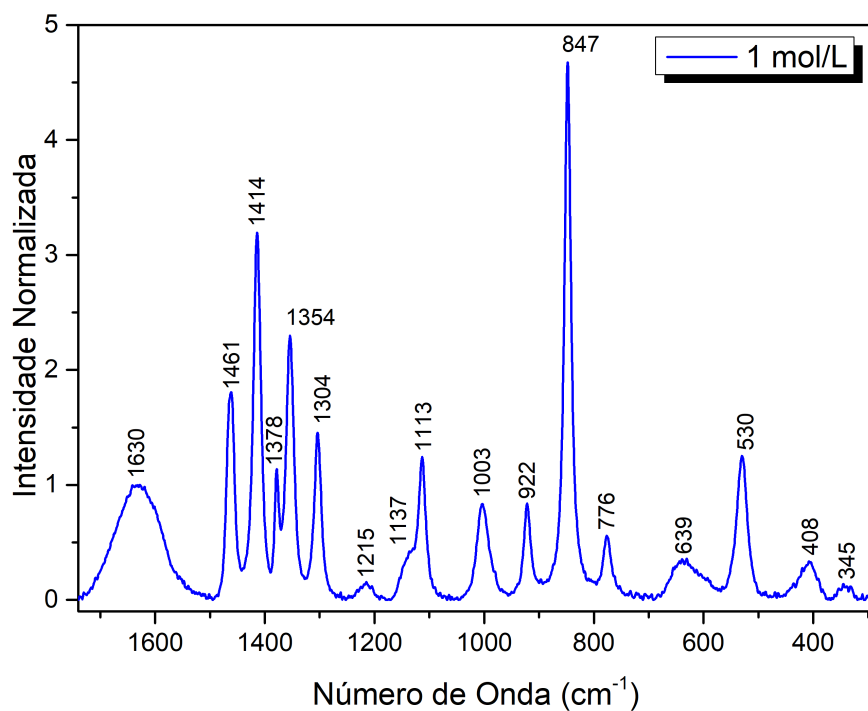


Figura 4.2: Espectro Raman da solução aquosa de L-alanina com concentração de 1 mol/L.

Esta solução apresentou um pH de 6,27, próximo ao ponto isoelétrico do aminoácido, no qual o L-alanina apresenta sua forma eletricamente neutra, chamada de *zwitterion*, com fórmula química dada: $CH_3CH(NH_3^+)COO^-$.

Na figura 4.3, foi apresentada a comparação entre o espectro do aminoácido diluído em água (b) com a água pura (a), ambos normalizados em 1630 cm^{-1} .

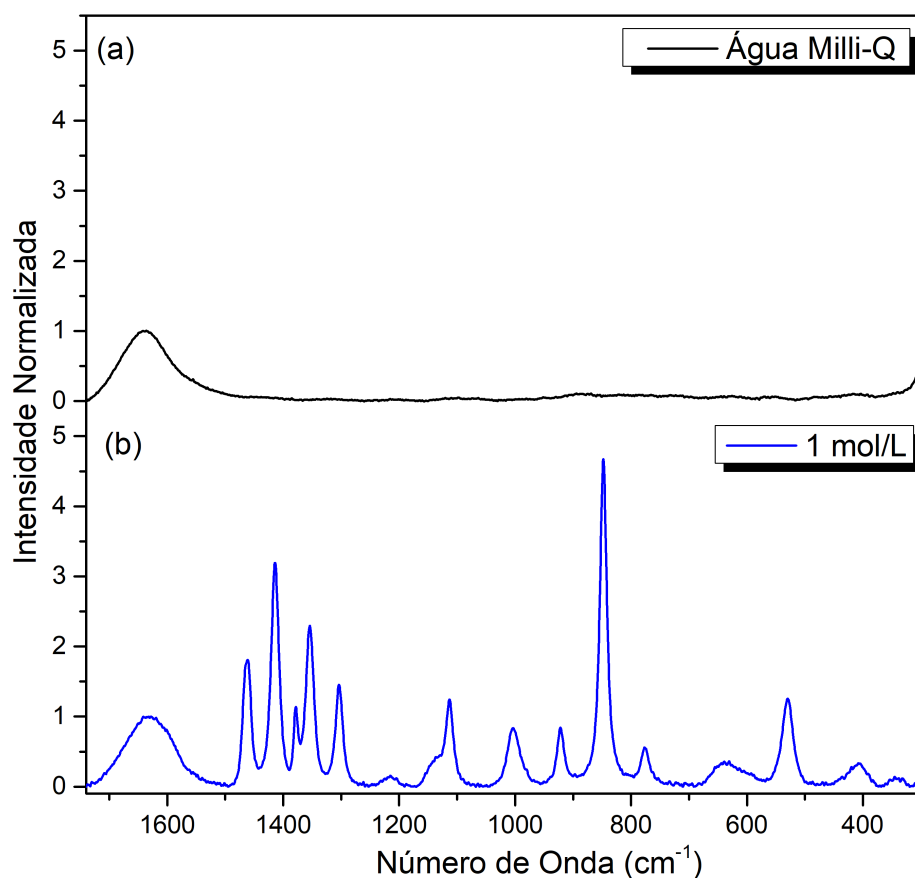


Figura 4.3: Espectros Raman: (a) da água pura e (b) da solução aquosa de L-alanina.

Como pode-se observar, na figura 4.3 (a), a água líquida gera uma banda larga de Raman, por volta de 1630 cm^{-1} . Esta banda está associada ao estiramento de OH (νOH) [64]. Logo, por ser uma banda característica da água, a qual não deve apresentar deslocamentos, todos espectros de soluções foram normalizados justamente neste número de onda.

Como a análise comparativa entre os espectros 4.1 e 4.2, se dá observando o centro do pico, um a um e analisando as suas respectivas posições, a figura 4.4 (a) apresenta o espectro normalizado em 851 cm^{-1} e a figura 4.4 (b) está normalizado em 1630 cm^{-1} .

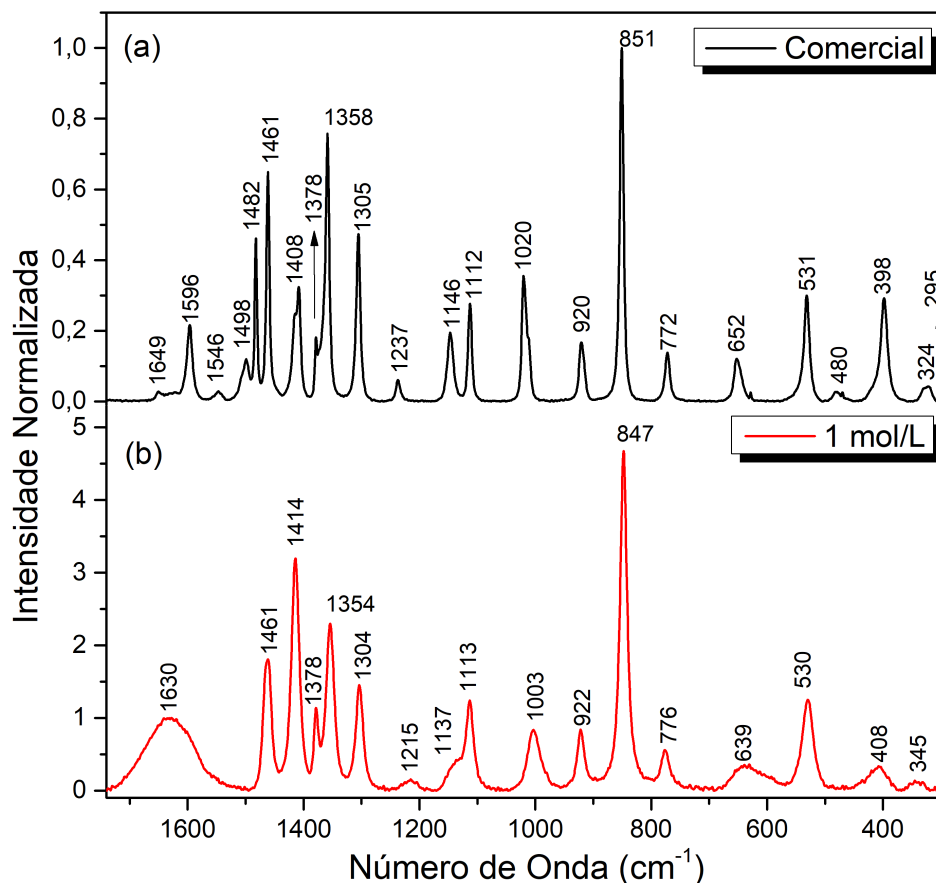


Figura 4.4: Comparação entre os espectros Raman (a) L-alanina comercial e (b) solução aquosa de L-alanina em 1 mol/L.

Algumas mudanças são perceptíveis no espectro, como a ausência de alguns modos vibracionais devido à vizinhança aquosa, tornando alguns picos quase imperceptíveis, como é o caso dos picos 295 e 480 cm^{-1} [65]. A não observação destes picos podem ser consequência do espalhamento Raman causado pelas moléculas de água, as quais podem deixar alguns modos menos Raman ativos, sem que haja extinção destes modos vibracionais. Além disto, este espalhamento resulta em uma sobreposição aos picos do aminoácido nas suas regiões de vibração, como em aproximadamente 1630 cm^{-1} .

Ainda, quando a água é adicionada, pode intensificar alguns outros modos vibracionais que eram pouco Raman ativo, como é o caso do pico 1378 cm^{-1} . Moléculas de água vizinhas ao aminoácido podem influenciar na frequência de vibração também, ocasionando deslocamentos no espectro, tanto para números de onda maiores, quanto menores, podendo ou não alterar os modos vibracionais. Como é o caso do pico em 1358 cm^{-1} que foi deslocado para 1354 cm^{-1} , mantendo o mesmo modo de vibração: $\nu_s \text{CO}_2^-$ [65]. Já, o pico em 1237 que deslocou-se para 1215 cm^{-1} alterando apenas a simetria do modo vibracional,

de forma simétrica para assimétrica, $r_{as}NH_3^+$, acoplado a uma deformação assimétrica do carbono do radical [65]. Apesar de alguns deslocamentos estarem dentro do limite de resolução do equipamento, pode-se garantir tal variação por meio da reprodutibilidade, ou seja, a repetição de uma medida para uma mesma amostra.

Para o pico em 1137 cm^{-1} , Hernández et al. concluíram que o modo vibracional rNH_3^+ permanece, mas de forma assimétrica, assim como em 1215 cm^{-1} . Enquanto que, para 1003 cm^{-1} , o modo existente é acoplado as seguintes vibrações: ν_sCOO^- e νCCH [65].

Em 847 cm^{-1} os modos vibracionais do pico em 851 cm^{-1} foram mantidos, acoplando apenas o modo vibracional de deformação do COO^- no plano [7].

Por fim, podemos inferir que a solubilização em água não ocasionou em quebras de ligações químicas, mantendo características vibracionais semelhantes ao espectro do L-Alanina cristalino.

4.3 Variação do pH nas soluções aquosas:

Primeiramente, realizou-se uma curva de titulação, semelhante à figura 1.6, utilizando o procedimento descrito na seção materiais e métodos. Esta curva pode ser visualizada na figura 4.5.

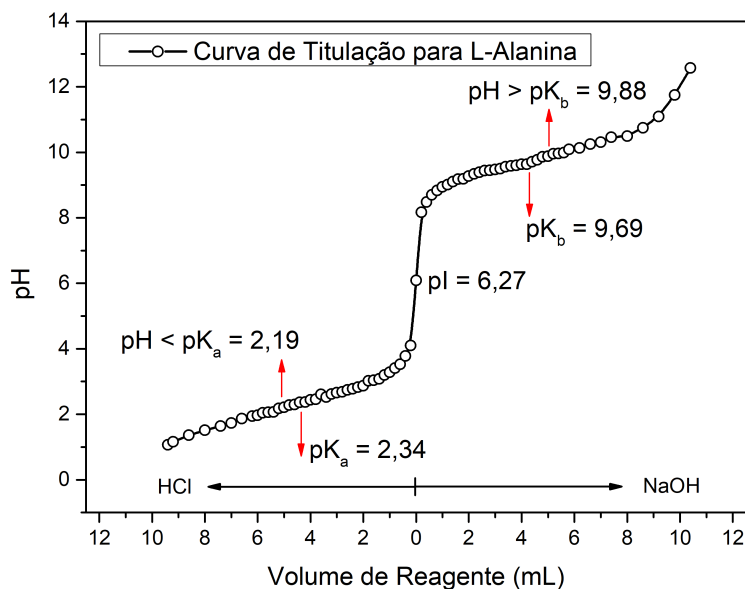


Figura 4.5: Curva de titulação do aminoácido L-Alanina, valor do pH em função da quantidade de reagente adicionado.

Desta forma, para soluções ácidas cujo $pH < pI$, a medida que a solução aquosa é

titulada com o reagente ácido, este reagente se dissocia no meio. Como neste caso, o reagente trabalhado é o ácido clorídrico (HCl) com concentração de 1 mol/L, a sua dissociação será completa, por ser um ácido de caráter forte e resultará em íons H^+ e Cl^- livre na solução.

Quando o ácido dissociado entra em contato com o aminoácido, o íon H^+ tende a ligar-se ao oxigênio que está conectado com a carbonila, de forma a gerar o grupo carboxílico, $COOH$ (ver figura 1.4). Esta transferência pode ser expressa pela reação 4.1.



Desta maneira, a molécula de L-alanina torna-se protonada e a molécula de Cl^- continua dissociada na solução, de forma a posicionar-se muito próxima das moléculas de NH^+ em razão da sua eletroafinidade com íons positivos [66].

A figura 4.6 apresenta os espectros em função do pH, normalizados em 1630 cm^{-1} , desde a forma neutra com $pH=6,27$ (figura 4.6 (a)) até a forma catiônica $pH=1,87$ (figura 4.6 (d)).

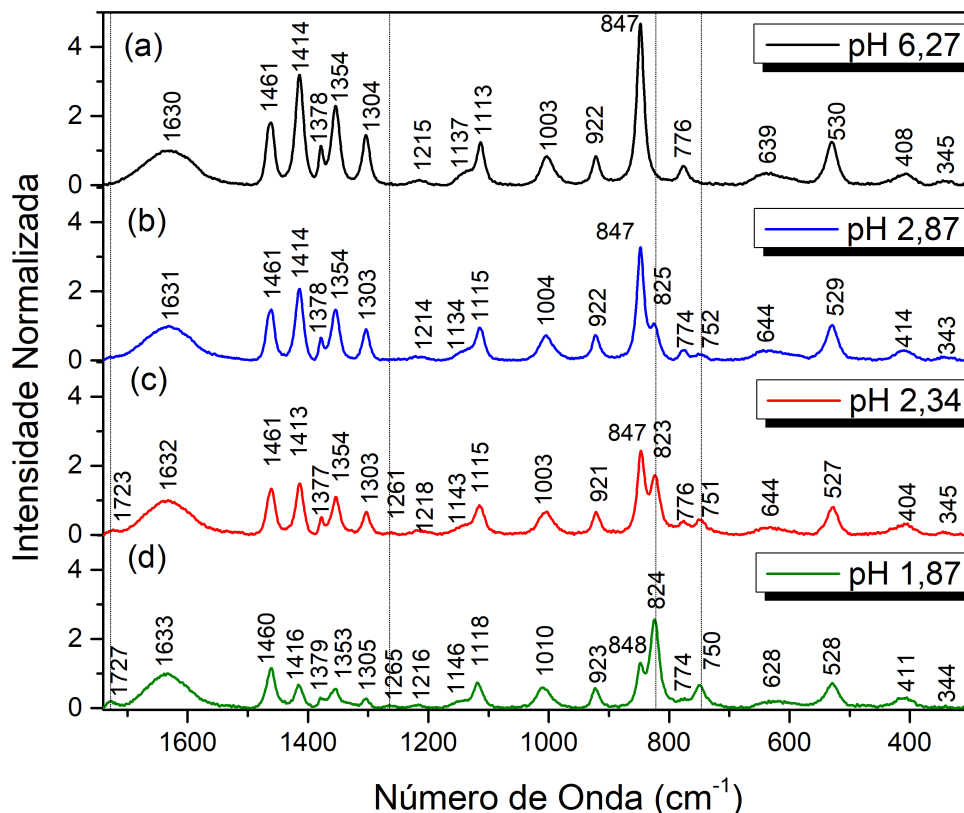


Figura 4.6: Espectros Raman das soluções aquosas do L-alanina: (a) $pH \simeq pI = 6,27$ (b) $pH > pK_a$ (c) $pH = pK_a$ (d) $pH < pK_a$.

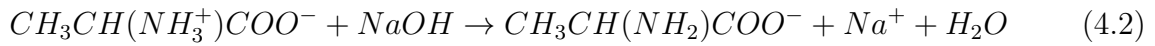
Como na região do pK há um equilíbrio entre as espécies doadoras e receptoras, o pH torna-se mais resistente a variação quando comparado com as outras regiões da curva de titulação. Esta região é conhecida como tamponante e, para o L-alanina não é tão evidente pois não possui resistência em se manter no valor de pK , quanto para outros aminoácidos, como a glicina, que pode ser usada como solução tampão [66]. A partir deste valor, pK , as formas catiônicas e aniônicas tornam-se predominantes na solução.

As mudanças ocorridas para valores próximos do pK_a são facilmente observáveis no espectro. A primeira delas foi o surgimento de uma banda em 1723 cm^{-1} na figura 4.6 (c). Esta banda é atribuída ao estiramento da dupla ligação entre carbono e oxigênio ($\nu C = O$) que tornam-se Raman ativa devido ao íon H^+ agregado a este grupo funcional, no caso, o ácido carboxílico [7,56]. Uma nova banda surge em 1261 cm^{-1} referente à um estiramento de carbono e oxigênio ($\nu C - O$) [7], corroborando o processo de protonação do aminoácido.

Além disto, outra mudança ocorre na banda em 847 cm^{-1} , a medida que o pH diminui, sua intensidade tende a reduzir também. E, ocorre surgimento de uma banda adjacente, em 823 cm^{-1} , que apresenta um comportamento contrário: aumento da intensidade conforme a redução do pH. Isto se deve ao fato de que, ao diluir o aminoácido em solução aquosa, juntamente com os modos vibracionais já existentes, foi notado uma deformação no plano do COO^- . Então, conforme ocorre a titulação da solução, menos modos vibracionais deste tipo são detectados e um novo modo vibracional agrega-se ao espectro. A nova banda apresenta uma deformação no plano entre o carbono e duas moléculas de oxigênio ($\delta O - CO$) além de uma interação entre os átomos COH [7]. Ainda, o mesmo comportamento para o pico em 847 cm^{-1} foi notado em 776 cm^{-1} . Conforme o pH decai, este modo tende a reduzir produzindo o surgimento de um novo pico em 751 cm^{-1} que aumenta sua intensidade devido à redução do pH. O primeiro está relacionado com uma deformação do tipo abano (wCO_2^-), enquanto o segundo, associa-se uma deformação do tipo abano para o CH (wCH) e uma torção de CC (τCC) [7].

Para valores de $pH > pI$, a medida que a solução aquosa é titulada com o reagente básico, este reagente se dissocia completamente no meio, por ser uma base de caráter forte, assim como o HCl . A base utilizada para tal titulação foi o Hidróxido de Sódio ($NaOH$) com concentração de 1 mol/L . Em sua dissociação libera um íon Na^+ e OH^- para a solução.

Quando esta base entra em contato com o L-alanina, o íon H^+ pertencente ao grupo NH_3^+ é liberado e conecta-se com o OH^- da solução, gerando uma molécula de água (H_2O), conforme a reação expressa em 4.2 apresenta e indicada na figura 1.4.



Desta maneira, a molécula do aminoácido torna-se desprotonada, devido a perda de um próton e a molécula de Na^+ continua dissociada na solução, posicionando-se ao redor das moléculas de CO_2^- por causa da atração entre seus íons.

A figura 4.7 apresenta os espectros em função do pH, normalizados em 1630 cm^{-1} , desde a forma neutra com $pH=6,27$ (figura 4.7 (a)) até a forma aniônica $pH=9,88$ (figura 4.7 (d)).

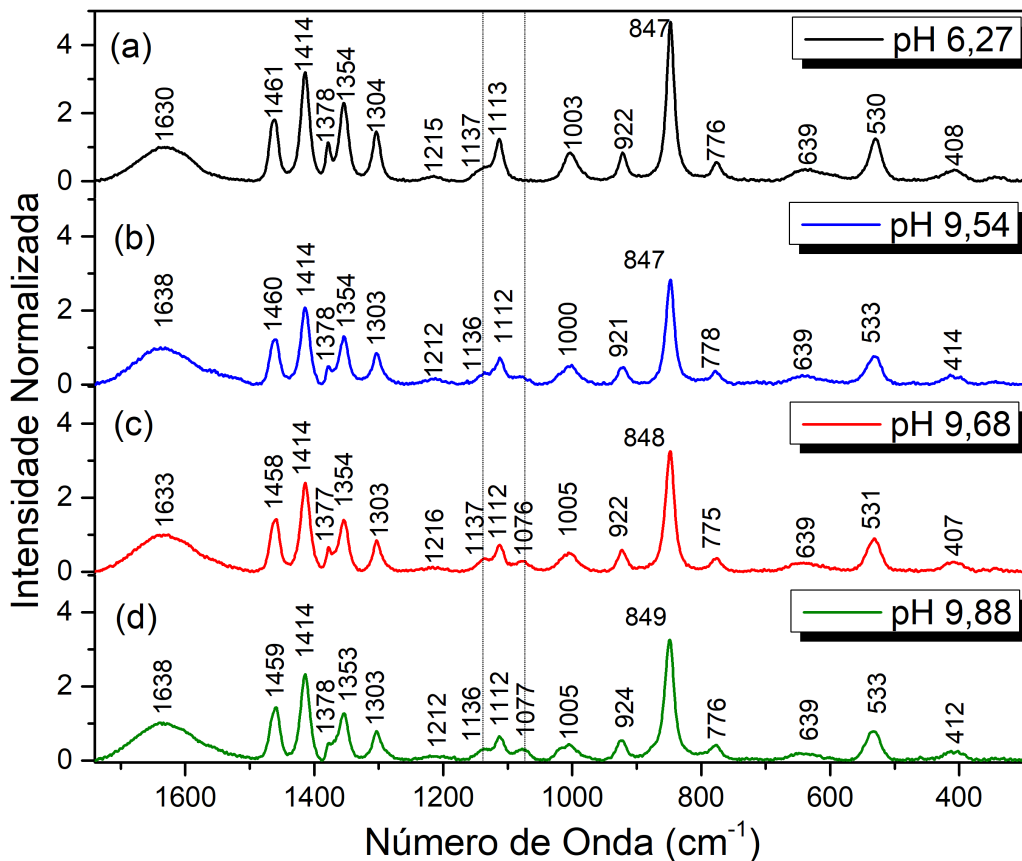


Figura 4.7: Espectros Raman das soluções aquosas do L-alanina: (a) $pH \simeq pI = 6,27$ (b) $pH < pK_b$ (c) $pH = pK_b$ (d) $pH > pK_b$.

Para as soluções básicas, ocorreram mudanças diferentes nos modos vibracionais quando

comparada à solução ácida (figura 4.6). Isto porque, agora, o grupo envolvido é a amina (NH_2). Em aminoácidos zwitteriônico ou aniônico ocorrem fortes interações eletroestáticas entre o grupo carboxilato e um cátion metálico, como o Na^+ , podendo levar à formação de pontes salinas estáveis que tem o poder até de transitar o aminoácido neutro para o zwitteriônico quando em fase gasosa [7].

Acredita-se que em razão desta estabilidade no aminoácido quando em forma aniônica, espera-se notar menores alterações espectrais quando comparado as soluções ácidas. As duas principais mudanças estão relacionadas ao surgimento de duas bandas muito próximas ao pico em 1112 cm^{-1} . A primeira em 1137 cm^{-1} , no espectro da figura 4.4, era um ombro atribuído a uma deformação do tipo *rocking* do grupo NH_3^+ . Este ombro deu origem a uma banda, a qual foi atribuída a uma deformação do tipo abano do grupo NH_2 (wNH_2) [7]. Já para a banda em 1076 cm^{-1} , ela foi atribuída a uma deformação do radical (δCH_3) acoplada a um estiramento entre as moléculas de carbono e nitrogênio (νCN) [7].

Por fim, para ambos os espectros, figura 4.6 e 4.7, o deslocamento de algumas bandas foi notório. Em espectros vibracionais estes deslocamentos podem estar associados a diversos fatores, como: mudança do comprimento de ligação, mudança da frequência de vibração sendo um dos principais motivos para isto, a mudança da massa efetiva da molécula devido à acoplamento de íons ou moléculas aos grupos funcionais. E, até mesmo por variação dos ângulos de ligações.

Conhecendo agora o comportamento das soluções diante a variação de pH, é possível a realização do crescimento de cristais de L-alanina, pela técnica de evaporação lenta, nos mesmos meios utilizados e em valores de pH muito próximos ao pK_a e ao pK_b .

4.4 Crescimento de cristais:

Devido a alta aplicabilidade de cristais orgânicos em diferentes áreas, conforme já foi abordado na seção 1.4. Estes materiais são promissores no desenvolvimento tecnológico e afins. Logo, é de extrema importância o seu estudo, bem como, a sua caracterização. Para isto, as técnicas de espectroscopia Raman e difratometria de Raios-X (DRX) foram utilizadas. A primeira, com o intuito de analisar possíveis mudanças moleculares diante a variação de pH e, a segunda, com o objetivo de estudar possíveis mudanças estruturais.

Primeiramente, é necessário o conhecimento prévio do material trabalhado. Sendo assim, a caracterização do aminoácido, à temperatura ambiente (24°C) via espectroscopia Raman, pode ser encontrada na seção 4.1. Também, o difratograma do L-alanina e seus respectivos planos cristalográficos podem ser visualizados na figura 4.8, normalizado em 20,6°.

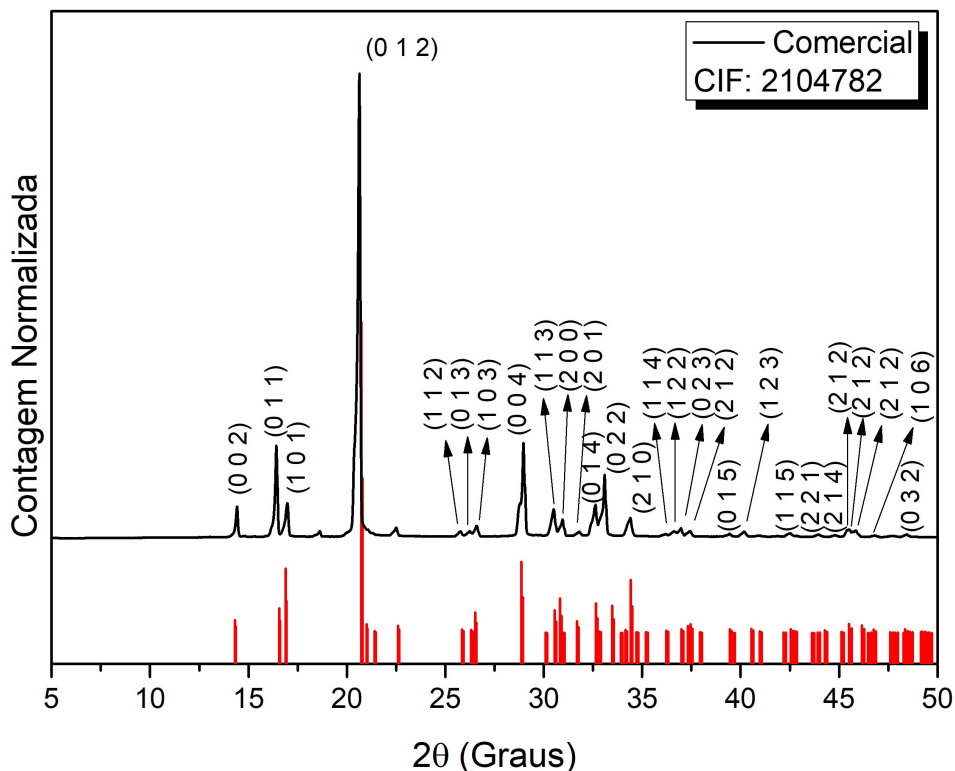


Figura 4.8: Difratograma de Raios-X do aminoácido L-Alanina em comparação com a CIF n°. 2104782.

Os índices de Miller (hkl) deste difratograma foram obtidos por meio da ficha padrão, *Crystallographic Information File* (CIF) n° 2104782 adquirida em *Crystallography Open Database* (COD), cujo acesso é online e gratuito.

Esta ficha foi utilizada para comparar e identificar a fase do L-alanina obtido por meio do equipamento, que indica, assim como as referências, que o L-alanina pertence ao sistema cristalino ortorrômbico com 4 moléculas por célula unitária e de grupo espacial $P2_12_12_1$ [67].

De posse dos resultados do material comercial realizou-se então a diluição do mesmo em meio aquoso, titulou-se esta solução utilizando os mesmos reagentes (HCl e $NaOH$) da solução com variação de pH e, esperou o crescimento dos cristais, figura 3.1 (a), (b) e (c), seguindo detalhadamente os passos descritos na seção 3, por meio da técnica de

evaporação lenta de solvente.

Para que as medidas fossem realizadas nestes cristais, foi necessário macerá-los. Desta forma, o espalhamento do feixe torna-se uniforme, evitando que algum modo vibracional desapareça ou que algum plano cristalográfico não fique evidente.

Na figura 4.9 (a) é apresentada a comparação entre o espectro Raman do L-alanina comercial, encontrado na figura 4.1 e, na figura 4.9 (b), o espectro do cristal macerado crescido em pH neutro e igual a 6,17, ambos normalizados em 851 cm^{-1} .

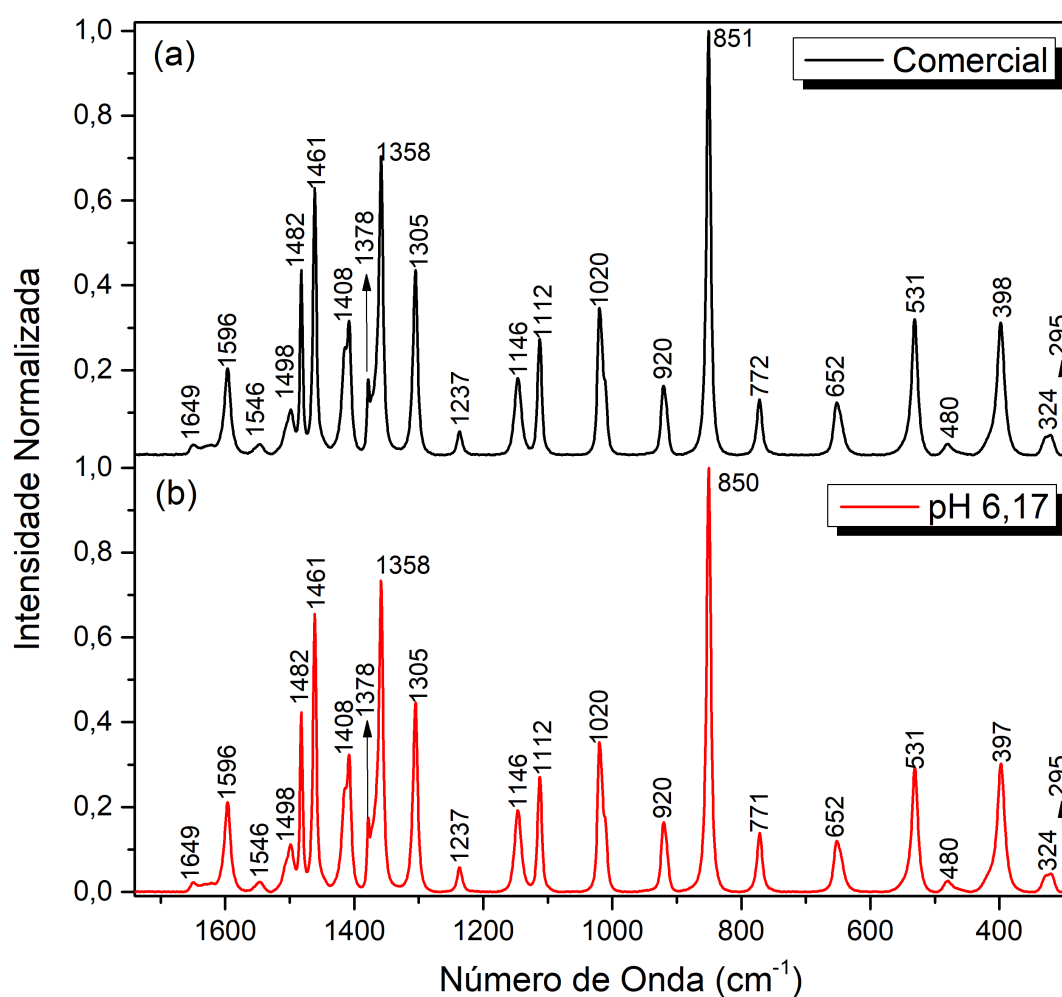


Figura 4.9: Espectros Raman: (a) L-alanina comercial e (b) cristal crescido em pH 6,17.

Comparando ambos os espectros pode-se notar que não houve alterações significativas nos modos vibracionais do aminoácido comercial para o cristal crescido em solução aquosa. Porém, é necessário a análise estrutural deste composto, a qual pode ser visualizada por meio da técnica de DRX, cujo difratograma encontra-se na figura 4.10 e que também, compara a amostra comercial (figura 4.10 (a)) e o cristal obtido à pH neutro (figura 4.10

(b)), normalizados em $20,6^\circ$.

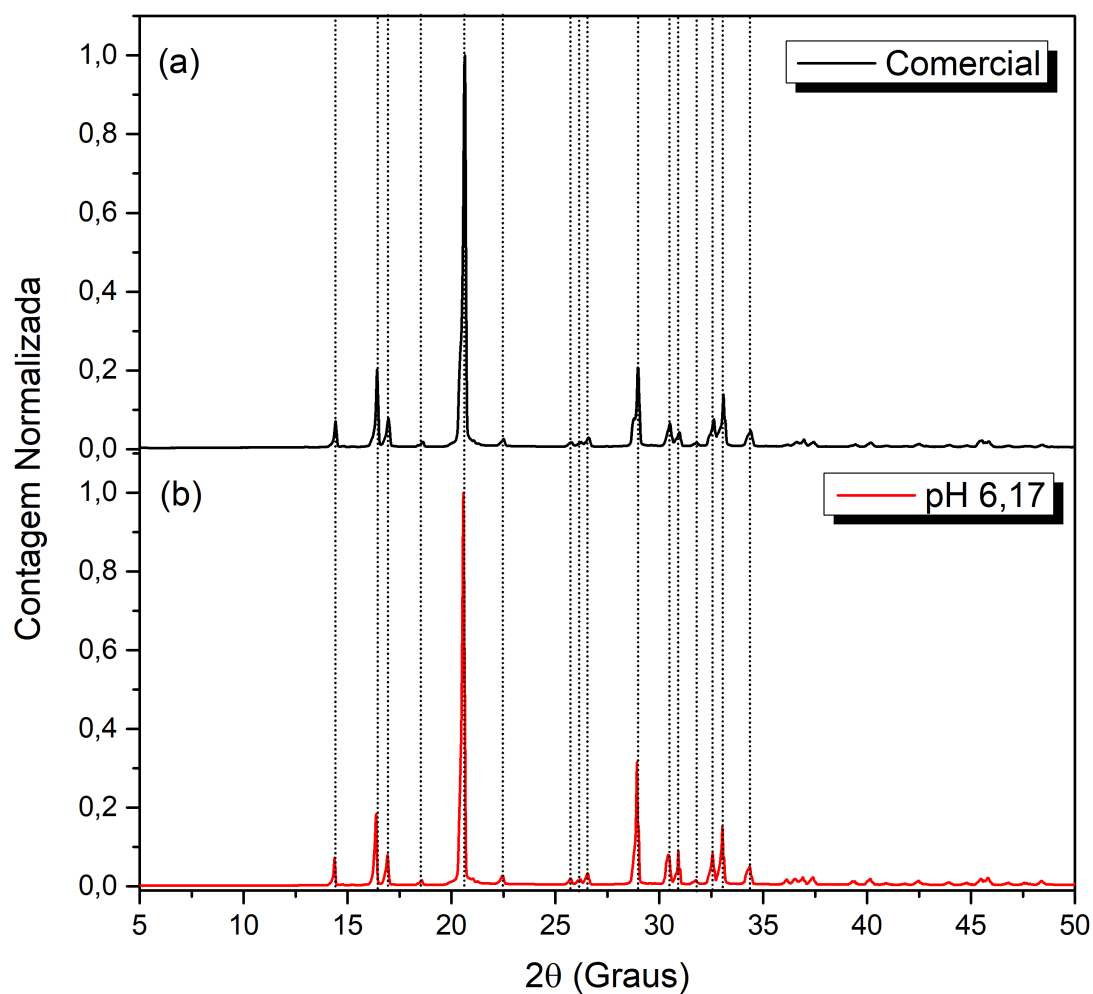


Figura 4.10: Difratoograma comparando (a) L-alanina comercial e (b) cristal obtido em pH 6,17.

Comparando os difratogramas das figuras 4.10 (a) e (b) nota-se que são similares, mostrando que o grupo espacial as características estruturais se mantiveram para o cristal crescido. Este resultado corrobora com o obtido pela espectroscopia Raman.

Na figura 4.11 (a-c) encontram-se os espectros Raman para os cristais crescidos em diferentes pH: 2,34, 6,17 e 9,69, ácido, neutro e básico, respectivamente.

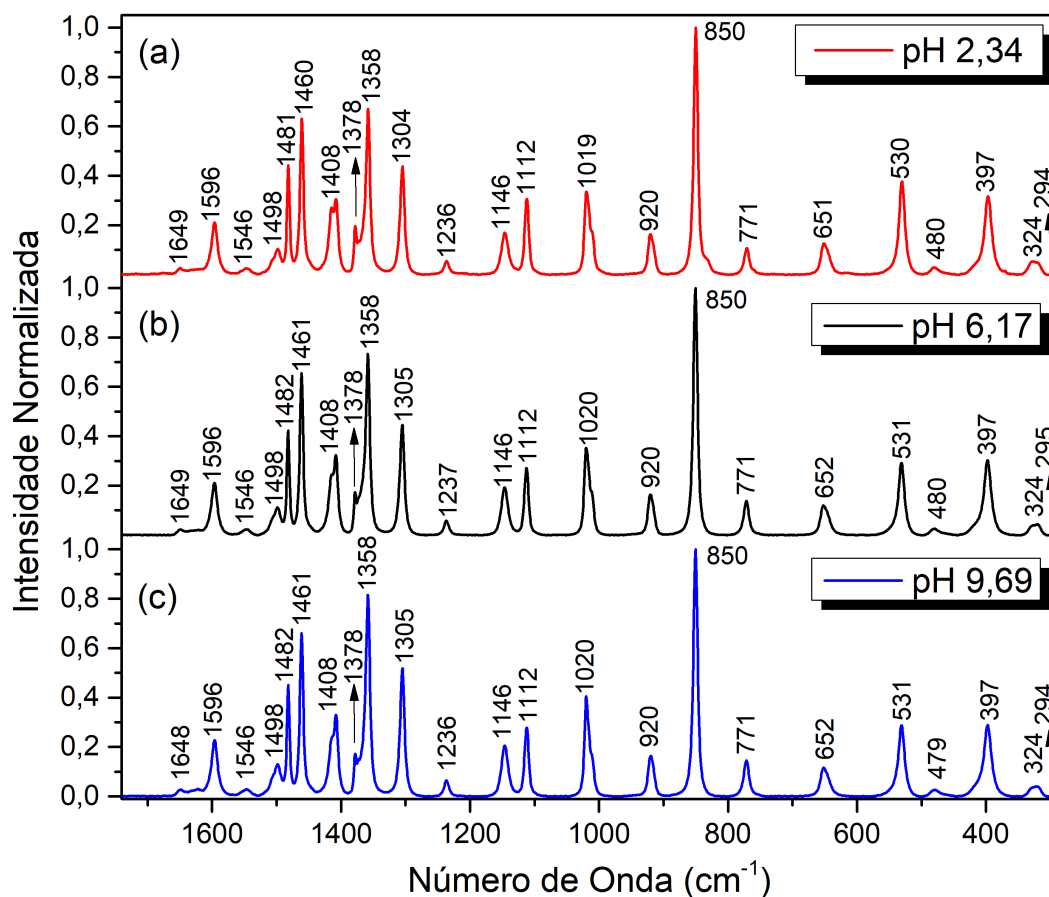


Figura 4.11: Espectros Raman para os cristais crescidos em soluções de: (a) pH ácido e igual a 2,34, (b) pH neutro e igual a 6,17 e (c) pH básico e igual a 9,69.

Como é possível observar a maioria dos picos permanecem com os mesmos centros, mantendo a mesma configuração vibracional do L-alanina comercial. Com excessão do "ombro" que manifesta-se ao lado do pico em 850 cm^{-1} , podendo ser equivalente ao pico que apareceu em 825 cm^{-1} na figura 4.6 (b) para a solução ácida.

Como já visto, o ponto de pK em uma curva de titulação corresponde ao ponto o qual ocorre uma disposição do material em doar ou receber prótons. Assim, considerando o pH em 2,34, a solução ácida do L-alanina estaria entre as espécies neutras e ácidas. Segundo o princípio de Le Chatelier, o qual diz que em um sistema em equilíbrio, ao sofrer uma perturbação, responde de forma a minimizar o efeito da mesma [68], pode existir uma preferência do cristal em crescer da forma *zwitteriônica*, com uma pequena porção estando protonada.

A figura 4.12 (a-c) mostra os difratogramas para os cristais crescidos em soluções ácida, neutra e básica, respectivamente. Comparando os cristais crescidos em solução ácida (figura 4.12(a)) e básica (figura 4.12(c)) com o crescido em solução neutra (figura

4.12(b)) nota-se um pico em aproximadamente $2\theta \simeq 10^\circ$ e 23° no cristal ácido, o que pode estar associado a uma mudança na estrutura do aminoácido cristalino.

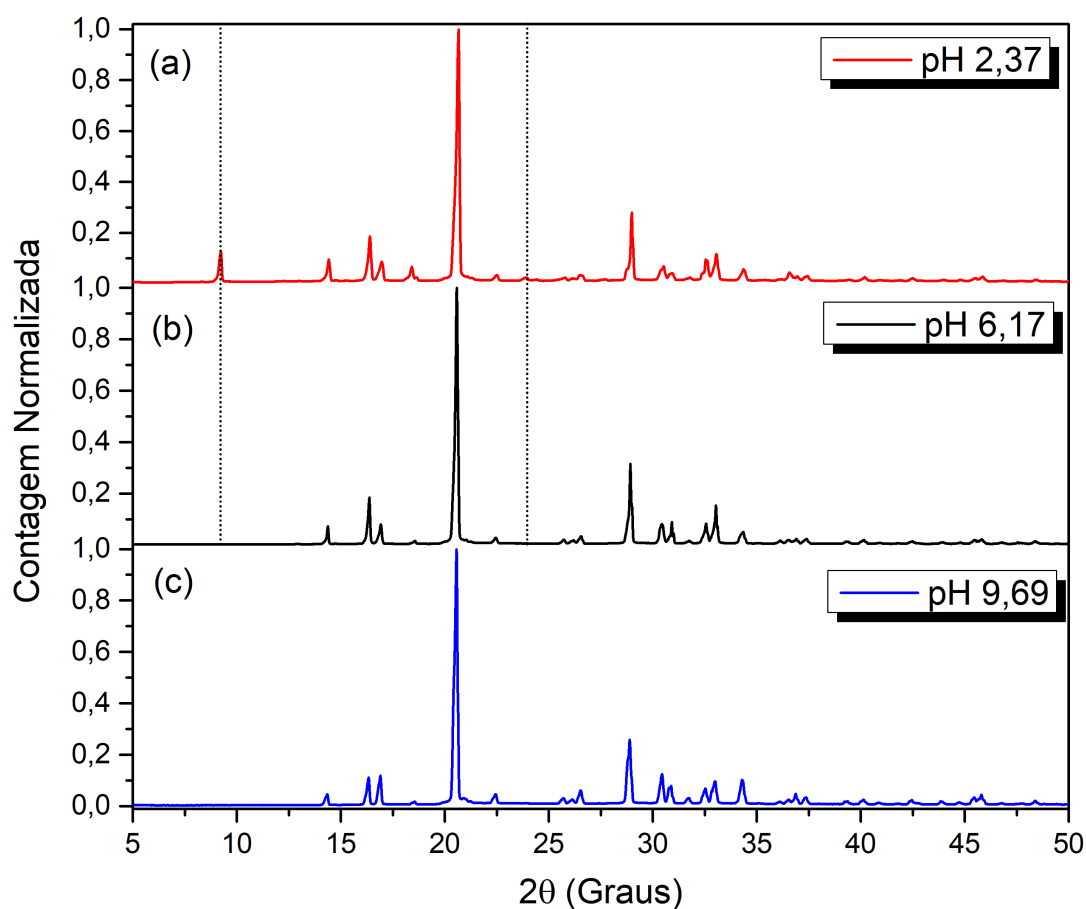


Figura 4.12: Difratomogramas de raios-X obtidos para cristais obtidos de soluções de (a) pH ácido e igual a 2,34, (b) pH neutro e igual a 6,17 e (c) pH básico e igual a 9,69.

Para melhor entendimento das modificações estruturais foram crescidos cristais em valores de pH que ultrapassassem os valores pK , tanto em ácido quanto em base, sendo $pH = 2,19$ (ácido) e $pH = 9,87$ (básico). O procedimento foi semelhante ao descrito no capítulo 3 deste trabalho e os cristais podem ser visualizados na figura 4.13 (a) e (b), pH ácido e pH básico, respectivamente. O cristal ácido precisou de 55 dias para atingir a forma da foto enquanto que o cristal básico, precisou apenas de apenas 28 dias.

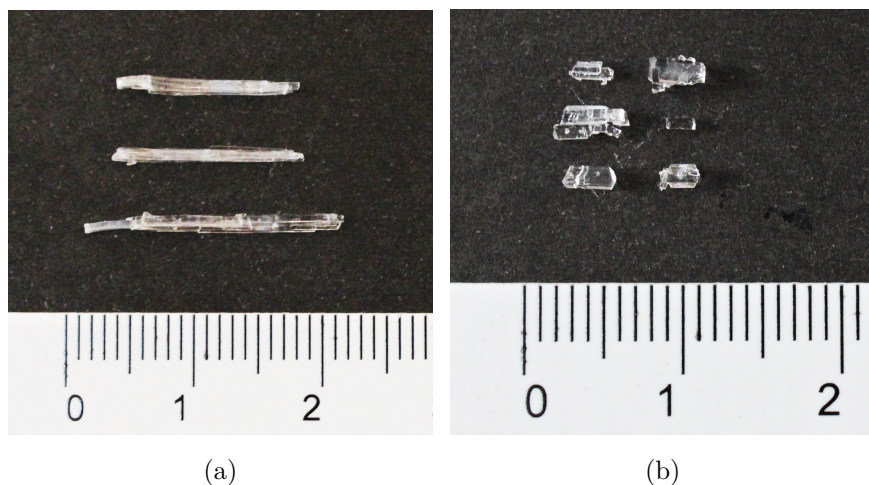


Figura 4.13: Cristais de L-alanina crescidos em: (a) pH 2,19 e (b) pH 9,87.

Os espectros Raman obtidos para o pH ácido e básico podem ser vistos na figura 4.14 (a) e (c), respectivamente, os espectros também são de cristais macerados. Na figura 4.14 (b) encontra-se o espectro do cristal neutro macerado para comparação. Todos normalizados na banda de maior intensidade: 831 cm^{-1} , 850 cm^{-1} e 851 cm^{-1} .

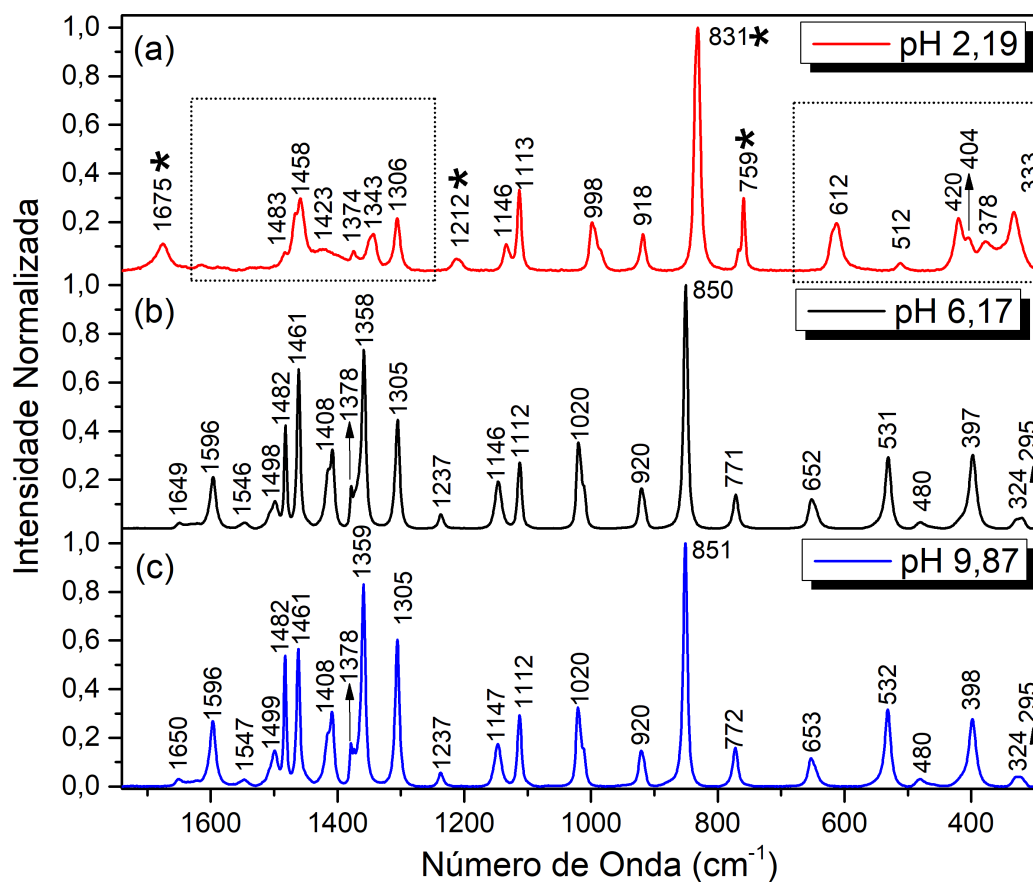


Figura 4.14: Espectros Raman para os cristais crescidos em (a) pH ácido e igual a 2,19, (b) pH neutro e igual a 6,17 e (c) pH básico e igual a 9,87.

Observando o espectro do cristal obtido em solução ácida, os picos com (*) quando comparado com a figura 4.6 (referente as soluções aquosas com pH ácido), tiveram um comportamento muito parecido, com pequenos deslocamentos, possivelmente devido a interação aminoácido - solução. O surgimento de uma banda referente a $C = O$ em 1675 cm^{-1} [7], o pico em 1212 cm^{-1} referente a uma deformação assimétrica do tipo *rocking* do NH_3^+ [65]. Além do pico em 831 que foi atribuído ao estiramento da cadeia principal (assim como no aminoácido comercial, tabela 4.1) acoplado a uma deformação entre carbono e o oxigênio ($\delta O - CO$) [7]. Ainda, em 759 cm^{-1} , o modo vibracional pode ser atribuído ao acoplamento de uma torção de carbono com carbono (τCC) e uma deformação do tipo abano para o CH (wCH) [7]. Porém, as mudanças na região de 1250 à 1640 cm^{-1} e, entre 290 e 700 cm^{-1} ainda não foram explanadas na literatura.

Já para a parte básica, não foram observadas alterações vibracionais significativas, como no espectro da solução aquosa com pH básico, figura 4.7. Isto pode estar relacionado com as pontes salinas estáveis, como dito anteriormente, formadas devido ao íon Na^+ que forçam o aminoácido manter-se na forma *zwitterion* [7]. Sendo assim, espera-se que sua estrutura seja equivalente.

Portanto, pode-se analisar o difratograma destes cristais que está na figura 4.15. O difratograma (a), normalizado no pico de maior intensidade $9,3^\circ$, é referente ao cristal crescido no $pH = 2,19$, o difratograma (b), normalizado em $20,6^\circ$, é do cristal crescido em pH neutro ($pH = 6,17$) e por fim, em (c) tem-se o difratograma do cristal crescido à $pH = 9,87$, normalizado em $20,6^\circ$.

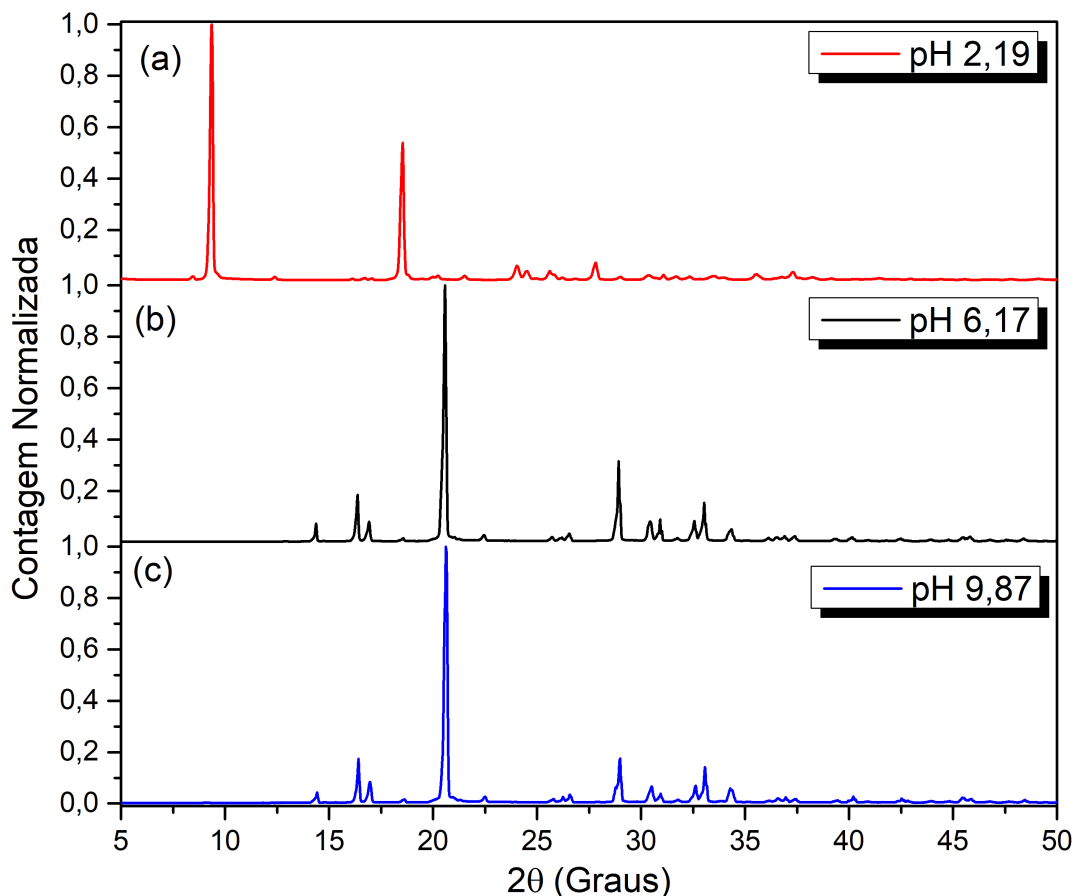


Figura 4.15: Difratogramas de raios-X obtidos para cristais crescidos em soluções de (a) pH ácido e igual a 2,19, (b) pH neutro e igual a 6,17 e (c) pH básico e igual a 9,87.

Como é perceptível, o cristal ácido tem seu difratograma diferente quando comparado ao cristal neutro. Esta mudança, segundo Garcia *et al.* está relacionado com a formação de dímeros¹ ácidos. Estes dímeros podem acarretar em uma redução do número de picos de difração devido à uma orientação mais restrita do cristal de L-alanina [7]. Esta orientação pode ser responsável por gerar cristais no formato de agulhas [7], como na figura 4.13 (a) e, ao comparar com os resultados obtidos para outros aminoácidos, como a Glicina, pode-se inferir que o L-alanina precipitado a partir de soluções aquosas com pH ácido, cristaliza-se como cloreto de alanínio [7]. Fase esta ainda não identificada por meio de fichas cristalográficas nas bases de dados gratuitas.

Conforme observado anteriormente, tanto os modos vibracionais como a estrutura do cristal básico de L-alanina não mudou mediante a variação de pH. Mas, Garcia *et al.* descrevem mudanças típicas da desprotonação do aminoácido, assim como foi examinado

¹Dímero é um nome dado a uma molécula que surge devido a interação intermolecular de duas moléculas idênticas que estão próximas e mais juntas quando comparado as outras [69].

na solução aquosa com pH básico, para espectros de infravermelho e para os difratogramas de raios-X. Em seus difratogramas, os autores observaram formação de sódio alaninato com carbonato de sódio residual com $\text{pH} = 13$ [7]. Desta maneira, acredita-se que seja necessário uma nova tentativa de crescer cristais com um valor de $\text{pH} > 9,87$.

Apontando apenas para o fato de que, o modo de preparo dos materiais do artigo [7] e deste trabalho foram diferentes. Garcia *et al.* por meio de uma incubadora com agitação orbital contínua evaporaram completamente o solvente da solução, adquirindo o material já em pó. E, neste trabalho houve o crescimento dos cristais por meio da evaporação lenta de solventes e posteriormente a sua maceração.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Neste trabalho abordamos a interação do pH com o aminoácido L-alanina, por meio da espectroscopia Raman, cuja região espectral abordada esteve entre 290 à 1800 cm^{-1} , com o objetivo de analisar as alterações nos modos vibracionais ocasionados por este fator externo.

Conforme a solução aquosa do aminoácido foi titulada, as mudanças nos modos vibracionais foram notórios. Para $pH < pI$ ocorreu o processo de protonação do L-alanina, o qual um íon H^+ da solução interagiu com o aminoácido formando o grupo carboxílico. Também, para $pH > pI$ ocorreu o processo de desprotonação, o qual um íon H^+ pertencente ao grupo NH_3^+ foi liberado para a solução, interagindo com o OH^- do reagente básico para formar H_2O . Processos estes que foram detectados por meio da técnica utilizada. Além das mudanças espectrais observadas para estes grupos funcionais, foram também observadas outras alterações, como mudanças na cadeia lateral e na cadeia principal, isto devido a modificação na configuração molecular.

Paralelamente ao estudo das soluções com variação de pH, foram crescidos cristais em diferentes valores de pH ($pH \simeq pK_a$, $pH \simeq pK_b$, $pH < pK_a$ e $pH > pK_b$), por meio da técnica de evaporação lenta de solvente. Estes cristais foram também analisados por espectroscopia Raman, os quais não apresentam mudanças significativas na região próximo ao pK . Enquanto que, para os valores extremos de pH , foram observados apenas mudanças relacionadas à protonação do aminoácido, já que para a desprotonação, segundo a litera-

tura, ocorre a formação de pontes salinas estáveis com o íon Na^+ , o qual pode impedir o aminoácido de transitar para forma desprotonada, mantendo a estrutura *zwitterion*.

Complementarmente as análises por espectroscopia Raman, por tratar-se de cristais, optou-se pela realização de medidas de difração de Raios-X (DRX), com o intuito de analisar possíveis mudanças estruturais ocasionadas pela variação do pH. Assim como para a espectroscopia Raman, as mudanças estruturais foram detectadas apenas para os cristais crescidos em soluções ácidas, os quais possivelmente cristalizam-se como cloreto de alanínio. Para os cristais crescidos em soluções básicas, mantem-se a estrutura *zwitterion*.

Desta forma, a espectroscopia Raman demonstrou-se eficaz em fornecer informações à respeito das alterações moleculares tanto para as soluções aquosas com variação de pH quanto para os cristais crescidos. Bem como, a técnica de DRX demonstrou-se útil na identificação de mudanças em nível estrutural para as amostras cristalinas.

Entre as perspectivas de trabalhos futuros, pretendemos realizar um crescimento com $pH > 9,87$ para tentar identificar mudanças geradas por meio do pH básico na conformação molecular e estrutural do aminoácido L-alanina. Também, pretende-se orientar e caracterizar estes cristais por meio do DRX, difração de Laue e técnicas de imagem.

Por fim, pretende-se conduzir análises a cerca do comportamento óptico destes cristais, de forma que estes cristais possam contribuir de forma positiva no estudo de materiais ópticos não-lineares orgânicos. Além disto, espera-se que o estudo da solubilização do aminoácido em diferentes valores de pH possa auxiliar na investigação e caracterização destes cristais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] P. C. Champe, R. A. Harvey, and D. R. Ferrier, *Bioquímica Ilustrada*. Porto Alegre: Artmed, 2006.
- [2] D. L. Nelson, A. L. Lehninger, and M. M. Cox, *Principles of biochemistry*. Macmillan, 2008.
- [3] L. Misoguti, *Estudo das Propriedades Ópticas Lineares e Não-Lineares de Cristais de L-alanina, L-treonina e L-lisina*. PhD thesis, Universidade de São Paulo, 1999.
- [4] K. M. Lima, I. M. Raimundo Jr, A. M. S. Silva, M. F. Pimentel, *et al.*, “Sensores ópticos com detecção no infravermelho próximo e médio,” *Química Nova*, 2009.
- [5] L. Misoguti, A. Varela, F. Nunes, V. Bagnato, F. Melo, J. Mendes Filho, and S. Zilio, “Optical properties of L-alanine organic crystals,” *Optical Materials*, vol. 6, no. 3, pp. 147–152, 1996.
- [6] N. Nithya, R. Mahalakshmi, and S. Sagadevan, “Growth, optical, thermal and electrical properties of nonlinear optical γ glycine single crystal,” *Scientific Research and Essays*, vol. 10, no. 13, pp. 421–429, 2015.
- [7] A. R. Garcia, R. B. de Barros, J. P. Lourenço, and L. M. Ilharco, “The infrared spectrum of solid l-alanine influence of pH induced structural changes,” *The Journal of Physical Chemistry A*, vol. 112, no. 36, pp. 8280–8287, 2008.
- [8] A. Quintas, A. Freire, and M. Halpern, *Bioquímica: Organização molecular da vida*. Lisboa: Lidel, 2008.

- [9] “Wikipédia.” Disponível em: https://pt.wikipedia.org/wiki/Aminoácido_proteinogénico. Acesso em: 05/04/2018.
- [10] C. S. Moraes, F. O. R. Oliveira Junior, G. Masson, *et al.*, *Série em Biologia Celular e Molecular: Métodos experimentais no estudo de proteínas*. FIOCRUZ - RJ, 2013.
- [11] “Aurélio, dicionário.” Disponível em: <http://www.dicionariodoaurelio.com>. Acesso em: 02/04/2018.
- [12] “Wikipédia.” Disponível em: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Aminoácido>. Acesso em: 05/04/2018.
- [13] “Wikipédia.” Disponível em: https://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Chirality_with_hands.svg. Acesso em: 05/04/2018.
- [14] “F. ciências.” Disponível em: <http://www.fciencias.com/2013/11/07/aminoacidos-uma-abordagem-teorica-laboratorio-online/>. Acesso em: 05/04/2018.
- [15] C. L. Wloch, G. Schneider, P. C. de Souza, and R. L. Fiamoncini, “Suplementação de aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) e seu efeito sobre o balanço protéico muscular e a fadiga central em exercícios de endurance,” *Revista Brasileira de Nutrição Esportiva*, vol. 2, no. 10, p. 8, 2008.
- [16] J. R. Hoffman, N. A. Ratamess, J. Kang, G. Mangine, A. D. Faigenbaum, and J. R. Stout, “Effect of creatine and β -alanine supplementation on performance and endocrine responses in strength/power athletes,” *Medicine & Science in Sports & Exercise*, vol. 38, no. 5, p. S126, 2006.
- [17] P. R. d. C. e. Castro and M. E. A. C. Carvalho, *Aminoácidos e suas aplicações na agricultura: Série produtor rural n° 57*. Universidade de São Paulo, 2013.
- [18] Z. Tylczyński, A. Sterczyńska, and M. Wiesner, “Temperature dependences of piezoelectric, elastic and dielectric constants of l-alanine crystal,” *Journal of Physics: Condensed Matter*, vol. 23, no. 35, p. 355901, 2011.
- [19] G. Zhu, X. Zhu, Q. Fan, and X. Wan, “Raman spectra of amino acids and their aqueous solutions,” *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 78, no. 3, pp. 1187–1195, 2011.

- [20] “Fine art america.” Disponível em: <https://fineartamerica.com/featured/alanine-amino-acid-moleculle-laguna-design.html>. Acesso em: 07/04/2018.
- [21] “Wikiwand.” Disponível em: <http://www.wikiwand.com/en/Alanine>. Acesso em: 07/04/2018.
- [22] “Prolab.” Disponível em: <http://www.prolab.com.br/blog/o-que-e-uma-solucao-tampao/>. Acesso em: 08/04/2018.
- [23] “Wikipédia.” Disponível em: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Alanina>. Acesso em: 07/04/2018.
- [24] “Engenharia química - Santos, sp.” Disponível em: <http://www.engquimicasantosp.com.br/2014/03/alanina-aminoacido.html>. Acesso em: 07/04/2018.
- [25] T. E. Creighton, *The encyclopedia of molecular biology*. Blackwell Science Ltd, 2016.
- [26] “Metabolismo do azoto dos aminoácidos e ciclo da uréia - Rui Fontes.” Disponível em: https://users.med.up.pt/~ruifonte/PDFs/PDFs_arquivados_anos_anteriores/2005-2006/G20_ciclo_da_ureia.pdf. Acesso em: 07/04/2018.
- [27] C. Hill, R. C. Harris, H. Kim, B. Harris, C. Sale, L. Boobis, C. Kim, and J. A. Wise, “Influence of β -alanine supplementation on skeletal muscle carnosine concentrations and high intensity cycling capacity,” *Amino acids*, vol. 32, no. 2, pp. 225–233, 2007.
- [28] J. Hoffman, N. Ratamess, J. Kang, G. Mangine, A. Faigenbaum, and J. Stout, “Effect of creatine and β -alanine supplementation on performance and endocrine responses in strength/power athletes,” *International journal of sport nutrition and exercise metabolism*, vol. 16, no. 4, pp. 430–446, 2006.
- [29] “Florien fito ativo.” Disponível em: <http://florien.com.br/wp-content/uploads/2017/06/L-ALANINA.pdf>. Acesso em: 08/04/2018.
- [30] “Infinity pharma.” Disponível em: <https://infinitypharma.com.br/uploads/insumos/pdf/1/1-alanina.pdf>. Acesso em: 08/04/2018.

- [31] M. F. Desrosiers, M. Peters, and J. M. Puhl, “A study of the alanine dosimeter irradiation temperature coefficient from 25 to 80c,” *Radiation Physics and Chemistry*, vol. 78, no. 7-8, pp. 465–467, 2009.
- [32] L. B. O. A. d. Moraes, *Crescimento de cristais orgânicos e a avaliação de suas qualidades para aplicações em óptica não linear*. PhD thesis, Universidade de São Paulo, 1998.
- [33] C. B. B. Costa and M. Giulietti, *Introdução à cristalização: princípios e aplicações*. UAB-UFSCar, 2011.
- [34] J. W. Mullin, *Crystallization*. Elsevier, 2001.
- [35] A. G. Jones, *Crystallization process systems*. Elsevier, 2002.
- [36] O. Sala, *Fundamentos da espectroscopia Raman e no infravermelho*. Unesp, 1996.
- [37] K. Nakamoto *et al.*, *Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds*. Wiley, 1977.
- [38] L. V. de Castro, “Estudo de lesão de cárie experimental via espectroscopia fotoacústica e Raman,” dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Maringá, 2015.
- [39] E. P. Marin, “Espectroscopia de infravermelho e suas aplicações,” trabalho de conclusão de curso, Universidade Estadual Paulista (UNESP), 2013.
- [40] B. Stuart, *Infrared spectroscopy*. Wiley Online Library, 2005.
- [41] “Unesp.” Disponível em: http://www.sorocaba.unesp.br/?_escaped_fragment_=/pesquisa/laptec/linhas-de-pesquisa/caracterizacao-de-materiais/ftir/. Acesso em: 19/03/2018.
- [42] P. Larkin, *Infrared and Raman spectroscopy: principles and spectral interpretation*. Elsevier, 2017.
- [43] E. Smith and G. Dent, *Modern Raman spectroscopy: a practical approach*. John Wiley & Sons, 2013.
- [44] “Fundamentos e tecnologia do espectroscopia Raman.” Disponível em: <http://www.raman.de>. Acesso em: 20/03/2018.

- [45] A. F. Padilha, *Materiais de engenharia*. Hemus, 1997.
- [46] C. Kittel, *Introduction to solid state physics*, vol. 8. Wiley New York, 1996.
- [47] A. do Nascimento, “Estudo de transição de fase no aminoácido l-leucina por espectroscopia Raman,” dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Maringá, 2016.
- [48] N. W. Ashcroft and N. D. Mermin, *Física do estado sólido*. Cengage Learning, 2011.
- [49] V. G. Ferreira, “Índices cristalográficos de Miller: uma proposta em educação à distância,” *Revista Aprendizagem em EAD*, vol. 4, no. 1, 2015.
- [50] “Wikipédia.” Disponível em: https://pt.wikipedia.org/wiki/Índice_de_Miller. Acesso em: 26/03/2018.
- [51] B. D. Cullity, *Elements of X-ray diffraction*. Addison-Wesley Publishing Company Inc., 2001.
- [52] “Raio-x.” Disponível em: <https://sites.google.com/site/atcompbr/home/produo>. Acesso em: 27/03/2018.
- [53] “Equipe de suporte dos laboratórios do DAINF-UTFPR.” Disponível em: <http://rle.dainf.ct.utfpr.edu.br/hipermidia/index.php/radiologia-convencional/tecnologia-e-funcionamento-dos-equipamentosrx/tubo-de-raios-x/interacoes-no-anodo#raios-x-característicos>. Acesso em: 27/03/2018.
- [54] A. Clearfield, J. H. Reibenspies, and N. Bhuvanesh, *Principles and applications of powder diffraction*. John Wiley and Sons, Ltd., 2008.
- [55] “Blog mateeria harutus.” Disponível em: <http://mateeriaharutus.blogspot.com.br/2011/08/hologrammid.html>. Acesso em: 27/03/2018.
- [56] A. R. Garcia, R. Brito de Barros, A. Fidalgo, and L. M. Ilharco, “Interactions of l-alanine with alumina as studied by vibrational spectroscopy,” *Langmuir*, vol. 23, no. 20, pp. 10164–10175, 2007.

- [57] “Syntech innovation.” Disponível em: <http://www.syntechinnovation.com/index.php/knowledge/151-depth-profiling-of-complex-samples.html>. Acesso em: 02/04/2018.
- [58] “Melytecl.” Disponível em: <https://www.melytec.ru/production/reng/porosh-difract/d2-phaser/>. Acesso em: 07/08/2018.
- [59] B. B. Lal and L. A. Nafie, “Vibrational circular dichroism in amino acids and peptides. VII. amide stretching vibrations in polypeptides,” *Biopolymers*, vol. 21, no. 11, pp. 2161–2183, 1982.
- [60] J. A. de Lima Júnior, *Espectroscopia Raman dos Aminoácidos L-metionina e DL-alanina e de Nanotubos de carbono*. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Ceará, 2008.
- [61] K. Machida, A. Kagayama, Y. Saito, and T. Uno, “Polarized Raman spectra and intermolecular potential of l-alanine crystal,” *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy*, vol. 34, no. 9, pp. 909–914, 1978.
- [62] A. Teixeira, P. Freire, A. Moreno, J. Sasaki, A. Ayala, J. Mendes Filho, and F. Melo, “High-pressure Raman study of l-alanine crystal,” *Solid State Communications*, vol. 116, no. 7, pp. 405–409, 2000.
- [63] J. Suh and M. Moskovits, “Surface-enhanced Raman spectroscopy of amino acids and nucleotide bases adsorbed on silver,” *Journal of the American Chemical Society*, vol. 108, no. 16, pp. 4711–4718, 1986.
- [64] D. M. Carey and G. M. Korenowski, “Measurement of the Raman spectrum of liquid water,” *The Journal of chemical physics*, vol. 108, no. 7, pp. 2669–2675, 1998.
- [65] B. Hernandez, F. Pfluger, M. Nsangou, and M. Ghomi, “Vibrational analysis of amino acids and short peptides in hydrated media. IV. amino acids with hydrophobic side chains l-alanine, l-valine, and l-isoleucine,” *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 113, no. 10, pp. 3169–3178, 2009.
- [66] R. d. S. Palácios, “Estudo do aminoácido gly em função do pH por espectroscopia Raman,” dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Maringá, 2017.

- [67] S. Forss, “A Raman spectroscopic temperature study of NH_3^+ torsional motion as related to hydrogen bonding in the l-alanine crystal,” *Journal of Raman Spectroscopy*, vol. 12, no. 3, pp. 266–273, 1982.
- [68] P. Atkins and J. de Paula, *Físico-Química, vol. 1*. LTC: Rio de Janeiro, 2008.
- [69] “Wikipedia.” Disponível em: <https://pt.wikipedia.org/wiki/D%C3%ADmero>. Acesso em: 20/08/2018.