

CRESCIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CRISTAIS DO AMINOÁCIDO L-ALANINA

Jhonatan Willian Berrar (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Francielle Sato (Orientadora), Mauro Luciano Baesso (Coorientador) e-mail: fsato@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Exatas e da Terra /Maringá, PR.

Física / Física da Matéria Condensada

Palavras-chave: L-Alanina, cristal de aminoácido, pH

Resumo:

Além das funções biológicas desempenhadas, os aminoácidos em sua forma cristalina apresentam propriedades ópticas que possibilitam seu uso em sensores e sistemas piezoelétricos, dentre outros, o que demonstra sua versatilidade. Se um cristal de determinado aminoácido crescer em soluções com diferentes valores de pH, pode-se induzir algumas mudanças em sua estrutura, pois devido ao caráter anfótero destas moléculas, seu comportamento se altera se solubilizado em tais meios. Diante disto, o objetivo deste trabalho foi de investigar possíveis mudanças estruturais e conformacionais em cristais de aminoácido L-Alanina, quando crescidos em meios ácido, básico e neutro. Para isto, duas técnicas amplamente conhecidas foram empregadas: a espectroscopia Raman e a difração de raios-X. As duas metodologias utilizadas mostraram mudanças significativas para os cristais crescidos em meio ácido, já para os demais não foi possível observar mudanças moleculares ou estruturais.

Introdução

A forma molecular da L-Alanina é $C_3H_7NO_2$, e sua cadeia principal é dada pela associação um hidrogênio H com três grupos funcionais: grupo amino $-NH_3$, grupo carboxílico $-COOH$ e por último o grupamento radical metil $-CH_3$, que dá ao aminoácido em questão suas principais propriedades, todos estes ligados a um carbono α (C_α) conhecido como centro quiral (Nelson e Cox, 2014).

Outra característica dos aminoácidos está em sua susceptibilidade à fatores externos como: temperatura, pressão e pH, que podem afetar diretamente suas propriedades, atenuando-as ou potencializando-as. Deste modo, se a molécula é solubilizada em meio ácido, ela assume uma forma protonada e o grupo carboxílico recebe um íon H^+ da solução. Agora, se a solução é básica, o NH_3^+ do aminoácido cede um íon H^+ para o meio e assume uma forma desprotonada. Por fim, se a solução é neutra, a molécula é dita *zwitterion* devido aos grupos amino e ácido carboxílico estarem em equilíbrio de cargas elétricas. O valor de pH para o qual se tem a máxima concentração de moléculas na forma *zwitterion* recebe o nome de

ponto isoelétrico (pI). Já o valor de pK representa a medida quantitativa da disposição de um determinado grupo doar prótons (Champe et. al., 2006).

Por meio das diferentes técnicas de crescimento de cristais é possível induzir o crescimento de cristais de aminoácidos ácidos, básicos ou neutros em diferentes condições de pH. Neste viés, o objetivo principal deste trabalho foi a utilização da técnica de crescimento de cristais, conhecida como “evaporação lenta de solventes”, em diferentes valores de pH: $\text{pH} = \text{pI}$ (neutro), $\text{pH} > \text{pKb}$ (básico) e $\text{pH} < \text{pKa}$ (ácido), a fim de se obter cristais de aminoácido L-Alanina, investigando as possíveis modificações induzidas pela variação de pH por meio das técnicas de espectroscopia Raman e difração de raios-X. A espectroscopia Raman proporciona espectros vibracionais os quais representam os modos de vibração moleculares, permitindo uma análise da conformação da molécula alvo (Sala, 2008). Já a difração de raios-X fornece informações acerca da estrutura cristalina de materiais, sendo possível a obtenção de seus parâmetros de rede (Morelhão, 2014).

Materiais e métodos

Para o crescimento dos cristais utilizou-se o L-Alanina comercial com 99,4% de pureza (*Zhejiang Chemicals*), diluído em água ultrapura (MilliQ Direct-Q). Cinco soluções foram preparadas no limite de solubilidade do aminoácido, ou seja, 16,7 g/100 mL a 25°C, sendo as soluções ácidas tituladas com Ácido Clorídrico (HCl), e as básicas com Hidróxido de Sódio (NaOH), ambas com concentração de 1,8 mol/L. Por último, os recipientes com as soluções foram tampados com papel alumínio, o qual foi perfurado, e condicionados numa sala com temperatura controlada em 21°C até a formação dos cristais. Foram obtidos cinco cristais: um em pH neutro (6,17), dois em pH ácido (2,19 e 2,34) e dois em pH básico (9,69 e 9,89), sendo o pKa e pKb do L-Alanina igual a 2,34 e 9,69, respectivamente. Os valores de pH foram aferidos com pHmetro (mPA-210) cuja precisão é de $\pm 0,01$.

Para a espectroscopia Raman foi utilizado um microscópio Raman confocal (SENTERRA, Bruker) com excitação em 532 nm (20 mW). Cada espectro foi uma média de 15 varreduras, com tempo de integração de 10 s, focado por uma lente objetiva de magnitude de 20x, com uma resolução espectral de $3\text{-}5\text{ cm}^{-1}$, obtidos no intervalo de 290 a 1740 cm^{-1} .

As medidas foram realizadas em um difratômetro de raios-X (D2 Phaser, Bruker), sendo a radiação incidente $\text{CuK}\alpha$. As mostras foram medidas em forma de pó. Para os cristais ácidos foi utilizada uma rotação de 30 RPM, com $0,02^\circ$ de passo, com 2θ de 5 a 50° e velocidade de varredura de 5s/passos. Já para as amostras neutras e básicas não foi possível rotacionar, sendo as demais configurações iguais as anteriores.

Resultados e Discussão

A Figura 1 mostra os cristais de aminoácido L-Alanina crescidos em soluções com diferentes valores de pH. Nota-se as diferentes formas adquiridas pelos cristais, sendo os com $\text{pH} < \text{pKa}$ e $\text{pH} > \text{pKb}$ os mais frágeis. O período final de crescimento foi de 28 dias para a solução neutra ($\text{pH} = \text{pI}$), 36 e 28 dias para as básicas, $\text{pH} =$

pK_b e $pH > pK_b$, respectivamente, e de 50 e 55 dias para as ácidas, $pH = pK_a$ e $pH < pK_a$, respectivamente.

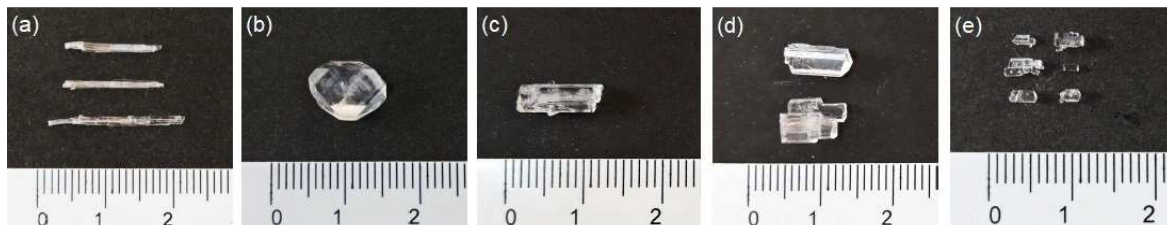


Figura 1: Cristais crescidos de aminoácido L-Alanina em soluções de pH: (a) 2,19 ($pH < pK_a$), (b) 2,34 ($pH = pK_a$), (c) 6,17 ($pH = pI$), (d) 9,69 ($pH = pK_b$) e (e) 9,89 ($pH > pK_b$).

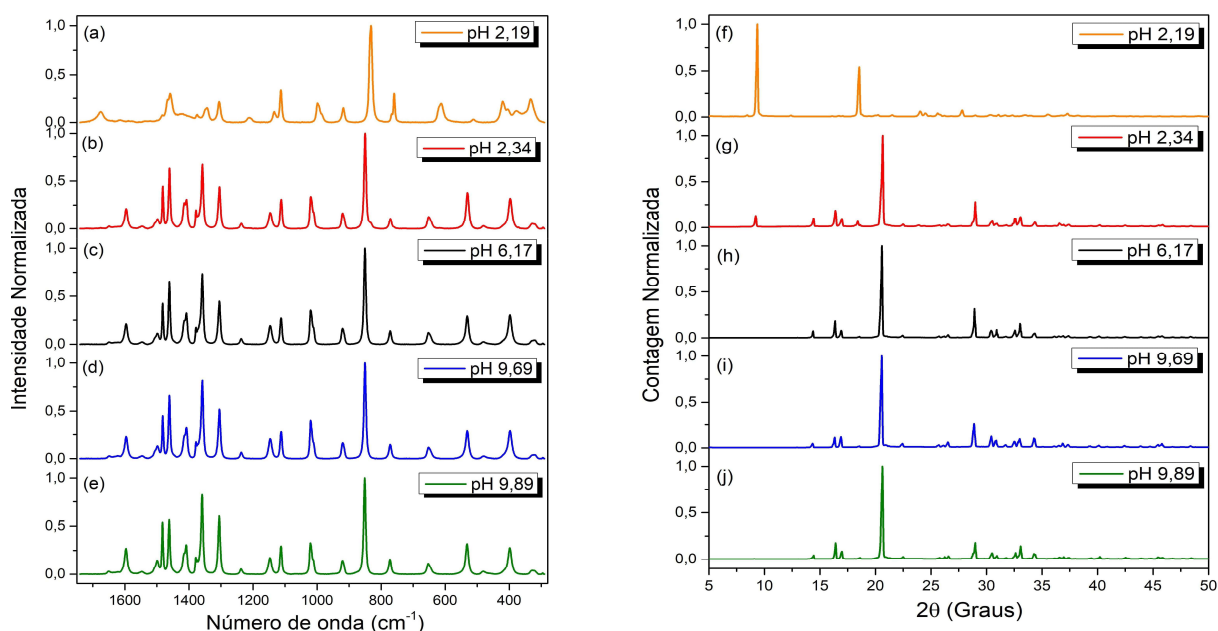


Figura 2: (a - e) Espectros Raman e (f - j) difratogramas de raios-X para os cristais crescidos em soluções de pH: (a, f) 2,19 ($pH < pK_a$), (b, g) 2,34 ($pH = pK_a$), (c, h) 6,17 ($pH = pI$), (d, i) 9,69 ($pH = pK_b$) e (e, j) 9,89 ($pH > pK_b$).

A Figura 2 (a - e) traz um comparativo dos espectros Raman para as cinco amostras. Todos os espectros estão normalizados em intensidade com relação à banda mais intensa no espectro. Nota-se que os espectros obtidos são semelhantes entre si, exceto para o cristal crescido em solução com $pH = 2,34$ ($pH < pK_a$). As características mais marcantes são o surgimento da banda em 1675 cm^{-1} responsável por alterar o grupo funcional de COO^- para COOH . A banda em 1212 cm^{-1} é atribuída a uma deformação assimétrica do tipo *rocking* do NH_3^+ . Ainda, um estiramento de cadeia principal acoplado com uma deformação entre carbono e oxigênio em 831 cm^{-1} , o que corrobora para o cristal ter crescido em uma forma protonada. Em 759 cm^{-1} refere-se a uma deformação do tipo abano para o CH, além de uma torção de C-C. Nos cristais básicos pode estar ocorrendo o surgimento de pontes salinas estáveis devido ao íon Na^+ , que forçam o aminoácido a se manter em sua forma *zwitterion*, assim não alterando os modos vibracionais na forma básica.

A Figura 1 (f - j) mostra o difratogramas dos cristais crescidos. Os resultados corroboram com a análise da espectroscopia Raman, levando a concluir que para os cristais básicos não ocorreram mudanças estruturais, uma vez que os difratogramas apresentam mesma posição do pico e intensidade. Já para os cristais ácidos os difratogramas se diferem do neutro e básicos. Em $\text{pH} = 2,34$ mostra dois pequenos picos em $2\theta \approx 8^\circ$ e 23° , o que indica o início de um possível processo de protonação. A difração de raios-X para o cristal com $\text{pH} 2,19$ mostra em $2\theta \approx 8^\circ$ e 18° que o cristal cresceu numa conformação estrutural distinta dos demais, que podem estar associados à formação de dímeros ácidos, que dá ao cristal uma orientação mais restrita reduzindo os picos de difração e gerando cristais no formato de agulhas, tal como pode ser observado na Fig. 1(d). Ainda, pode-se inferir que as amostras obtidas das soluções com pH ácido cristalizam-se como Cloreto de Alanínio (Garcia et. al., 2008), mas infelizmente não foram identificadas por meio de fichas cristalográficas nas bases de dados gratuitas.

Conclusões

As análises mostram que o cristal obtido de uma solução neutra permanece em sua forma *zwitterion*, e não apresenta qualquer mudança, seja molecular ou estrutural. O mesmo ocorre com o cristal básico, tanto para valores de $\text{pH} = \text{pKb}$ ou para $\text{pH} > \text{pKb}$. Com relação aos cristais ácidos, observou-se que quanto mais ácido o meio, mais expressivas são as alterações estruturais para o L-Alanina. Estas alterações são interessantes, pois podem contribuir com o estudo de materiais ópticos não-lineares orgânicos.

Agradecimentos

Agradeço a Prof^a.Dr^a. Francielle Sato pelo auxílio, ao CNPq pelo apoio financeiro, à Finep, ao COMCAP e a UEM.

Referências

- Cox, M. M. e Nelson, D. L. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6^a. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- Champe, P. C.; Ferrier, D. R. e Harvey, R. A. **Bioquímica Ilustrada**. Porto Alegre: Artmed, 2006.
- Sala, O. **Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho**. 2^a ed. São Paulo: Editora Unesp, 2008.
- Morelhão, S. L. **Fundamentos da Física de Raios X**. 1^a ed. São Paulo: Editora Blucher, 2014.
- Garcia, A. R. et. al. 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.