

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE FÍSICA

FERNANDO COSTA BASÍLIO

ESPECTROSCOPIA RAMAN POR ELIPSOMETRIA APLICADA A MOLÉCULAS
ORGÂNICAS

UBERLÂNDIA

2020

FERNANDO COSTA BASÍLIO

**ESPECTROSCOPIA RAMAN POR ELIPSOMETRIA APLICADA A MOLÉCULAS
ORGÂNICAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Física.

Área de Concentração: Física da Matéria Condensada.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Marletta.

Coorientadora: Prof^a. Dra. Patrícia Targon Campana.

UBERLÂNDIA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

B315e Basílio, Fernando Costa, 1989-
2020 Espectroscopia Raman por elipsometria aplicada a moléculas
orgânicas [recurso eletrônico] / Fernando Costa Basílio. - 2020.

Orientador: Alexandre Marletta.

Coorientadora: Patrícia Targon Campana.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
de Pós-Graduação em Física.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2021.5502>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

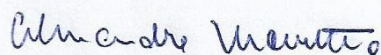
1. Física. I. Marletta, Alexandre, 1970-, (Orient.). II. Campana,
Patrícia Targon, 1972-, (Coorient.). III. Universidade Federal de
Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Física. III. Título.

CDU:53

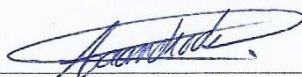
Dedico esta tese a mulher da minha vida
Letícia e ao meu filho que está a caminho, o Gabriel.

Estendo esta dedicatória à memória do meu
eterno e querido “vovô do Guigui” (Air da Costa).

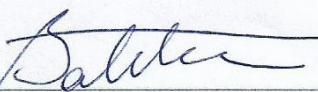
BANCA EXAMINADORA



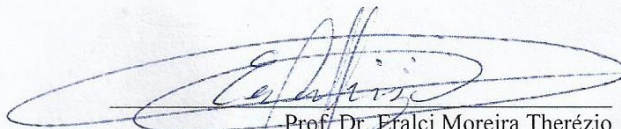
Prof. Dr. Alexandre Marletta
Universidade Federal de Uberlândia – UFU



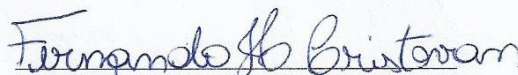
Prof. Dr. Acácio Aparecido de Castro Andrade
Universidade Federal de Uberlândia – UFU



Prof. Dr. George Balster Martins
Universidade Federal de Uberlândia - UFU



Prof. Dr. Eralci Moreira Therézio
Universidade Federal do Mato Grosso - UFMT



Prof. Dr. Fernando Henrique Cristovan
Universidade Federal do Goiás - UFG

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

o grande precursor deste caminho, Deus, por ter me guiado nessa jornada que não foi nada fácil, mas que com sua sabedoria sempre me mostrou o melhor caminho e me orientou nas melhores decisões.

o amor da minha vida Letícia, que enfrentou ao meu lado todas as peripécias deste longo caminho que vai se encerrando. Você é muito dedicada, amorosa, companheira, carinhosa, uma parceira de verdade. Obrigado por ser mais do que eu sempre sonhei e me dar o bem mais precioso da minha vida o meu filho Gabriel. Te amo, te amo, te amo ...

o meu orientador Alexandre Marletta, por ser um pai para mim, dentro e fora da universidade. Muito obrigado de coração por tudo o que o senhor fez e faz, pela paciência, dedicação e orientação. Hoje sou professor e o sr. é minha referência de pessoa e profissional.

a minha coorientadora professora Patrícia pela imensa contribuição no trabalho, principalmente na parte biológica, com várias discussões e dicas de como trabalhar com proteínas, além de fornecer os materiais para a pesquisa da BSA.

aos meus pais Umberto e Adriana por desde cedo mostrar que o conhecimento é a nossa maior riqueza e é essencial para o sucesso. Muito obrigado por me incentivarem e me proporcionarem meios para adquirir uma educação de qualidade. Amo vocês.

aos meus irmãos Thiago, João Paulo e Maria Julia, que me ensinaram que por mais que não estejamos morando na mesma casa mais, não nos falando como antes, o amor ainda está presente e sempre estaremos juntos e ajudando uns aos outros.

aos meus pais “adotivos” Helvio e Rejane e ao meu “irmão” Lucas, por me acolherem e me darem uma outra família. Muito obrigado pelo amor e carinho demonstrado em cada gesto e espero um dia poder retribuir todo esse amor.

a toda minha família pelo apoio e incentivo em especial meus avós maternos e paternos por serem os precursores da família, sem eles esse sonho não seria possível.

a todos os meus companheiros e ex-companheiros de laboratório, Adriano, Paulão, Gustavo, Roberto (Siri), Pedro, Danilo, Estácio, Sir Therézio, Francisco, Márcia, Bruno, Hugo,

Jackson, Julio Cesar (Perdizes), Marcelinha e a Marcela Cogo por cada momento compartilhado comigo nos laboratórios do GEM.

a minha amiga Silésia pelas conversas e desabafos quase nunca relacionados à pesquisa, mas sim a nossa vida pessoal. Você é uma pessoa a qual eu tenho muito carinho, obrigado por tudo.

o meu amigo Augusto, pela sua ajuda e amizade por toda a jornada, desde março de 2007, são treze anos convivendo com uma pessoa ímpar, muito inteligente e muito solícito, obrigado por ser meu amigo.

a professora Raigna, por ser mais do que uma orientadora, mas sim uma amiga que levarei por toda minha vida.

a todos os funcionários do INFIS, em especial o Carlão, a Rosália e o Eusébio por sempre serem muito solícitos em tudo.

a todos os professores do INFIS por terem me capacitado para a escrita desta tese.

o meu amigo Gustavo Delfino, que apesar de ter nos deixado a alguns anos está presente diariamente no meu pensamento e em minhas orações, sempre me dando conselhos e me orientando nas melhores escolhas. Muito obrigado meu amigo, por de alguma maneira estar sempre ao meu lado.

e por fim gostaria de agradecer a todos os órgãos de fomento, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de S. Paulo (FAPESP) e principalmente a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por ter fornecido a bolsa de pesquisa durante toda a minha pós graduação.

“O resultado lá na frente será diferente em função de suas escolhas. E suas escolhas são pautadas em função do seu conhecimento. E conhecimento é construído com base em estudos. Não há atalhos.”

Tiago Reis

RESUMO

Neste trabalho mostramos o potencial da técnica espectroscopia Raman por elipsometria (ERS - abreviação do inglês *ellipsometric Raman spectroscopy*) em obter informações adicionais sobre as estruturas de diversos materiais orgânicos, complementares à outras técnicas de espectroscopia óptica, através do estudo da polarização da luz espalhada. A técnica ERS foi desenvolvida no grupo de espectroscopia de materiais e apresentada pela primeira vez para a comunidade científica no artigo de minha autoria e colaboradores intitulado “Ellipsometric Raman Spectroscopy” publicado em 2016. O ERS relaciona a polarização da luz espalhada, através do cálculo dos parâmetros de Stokes, com a estrutura das moléculas. Através dos parâmetros de Stokes calcula-se diversos parâmetros físicos, por exemplo, grau de polarização (P) e fator de assimetria (g), este último pode ser relacionado ao sinal de atividade óptica Raman (ROA – abreviação do inglês *Raman optical activity*) que é utilizado para caracterizar estruturas secundárias de proteínas. No poli (metil metacrilato) (PMMA) foi analisado a interação polímero-solvente em clorofórmio, tetrahidrofurano (THF) e tolueno. O ERS demonstrou que os solventes clorofórmio e THF interagem com a matriz polimérica de forma anisotrópica, principalmente com o ramo metil e o tolueno de forma isotrópica nas regiões analisadas. Além disso, ela foi capaz de identificar as temperaturas relaxações térmicas γ e β do PMMA. Na albumina do soro bovino (BSA – abreviação do inglês *bovine serum albumin*) foi estudada sua conformação estrutural na mudança de ambiente químico de pH 2 a 12. Para analisar esta mudança foram realizadas medidas de absorção óptica, dicroísmo circular, fotoluminescência, espalhamento Raman e verificou-se a total concordância destes resultados com a literatura. Através da técnica ERS, por ser uma técnica capaz de observar mudanças localizadas, foi observada de que os aminoácidos aromáticos rotacionam em relação a cadeia principal de uma forma que em pH mais ácidos eles se desmascaram de dentro da estrutura da BSA e para meios mais básicos eles se incrustam mais na proteína. Essa é somente uma das informações adicionais retiradas pelo ERS, no texto será abordado outras informações muito relevantes. O polímero conjugado quiral (1R, 2R) diaminociclohexano, que é um material novo na literatura e foi estudado na sua forma polimérica (nomeada neste trabalho de SW254) e na forma de oligômero (nomeada neste trabalho de SW203). Para a caracterização óptica utilizou-se as mais variadas técnicas espectroscópicas, entre elas, o dicroísmo circular de excitação e o ERS. Dentre vários resultados relevantes, destacam-se a capacidade de controlar a polarização da luz através do comprimento de excitação e a assimetria causada pelo acoplamento éxciton entre os grupos benzenos e estilbenzenos. Essas duas características fazem do (1R, 2R) diaminociclohexano um material promissor, podendo ser utilizado para a fabricação de metamateriais.

Palavras chave: Fotofísica. Polímeros. Proteínas. PMMA. BSA. ERS.

ABSTRACT

In this work we show the potencial of the ellipsometric Raman spectroscopy technique (ERS) in obtaining additional information about the structures of various organic materials, complementary to other optical spectroscopy techniques, through the study of polarization of the scattered light. The ERS technique was developed in the material spectroscopy group and presented for the first time to the scientific community in an article by me and collaborators entitled "ellipsometric Raman spectroscopy" published in 2016. The ERS relates the polarization of scattered light by calculating Stokes parameters, with the structure of molecules. Through the Stokes parameters, several physical parameters are calculated, for example, degree of polarization (P) and asymmetry factor (g), the latter can be related to the Raman optical activity signal (ROA - short for Raman optical activity) which is used to characterize secondary protein structures. In the poly (methyl methacrylate) (PMMA), the polymer-solvent interaction in chloroform, tetrahydrofuran (THF) and toluene was analyzed. The ERS demonstrated that the solvents chloroform and THF interact with the polymeric matrix in an anisotropic manner, mainly with the methyl branch and toluene in an isotropic manner in the analyzed regions. In addition, she was able to identify the temperature relaxations γ and β of the PMMA. In bovine serum albumin (BSA - short for bovine serum albumin), its structural conformation in changing the chemical environment from pH 2 to 12 was studied. In order to analyze this change, optical absorption, circular dichroism, photoluminescence, Raman scattering measurements were performed and a total agreement of these results with the literature was verified. Through the ERS technique, as it is a technique capable of observing localized changes, it was observed that the aromatic amino acids rotate in relation to the main chain in a way that at more acidic pH they are unmasked from within the BSA structure and for more basic means they get more embedded in the protein. This is just one of the additional information removed by the ERS, in the text other surprising information will be addressed. The chiral conjugated polymer (1R, 2R) diaminocyclohexane, which is a new material in the literature and was studied in its polymeric form (named in this work by SW254) and in the form of oligomer (named in this job by SW203). For the optical characterization the most varied spectroscopic technique were used, among them, the circular excitation dichroism and the ERS. Among several relevant results, we highlight the ability to control the polarization of light through the excitation length and the asymmetry caused by exciton coupling between the benzene and styrene groups. These characteristics make (1R, 2R) diaminocyclohexane a promising material and can be used for the manufacture of metamaterials.

Key words: Photophysics; Polymers; Proteins; PMMA; BSA; ERS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama de energias de um material semicondutor. De forma análoga aos semicondutores inorgânicos, os polímeros conjugados apresentam um “gap” de energia E_g que separa a banda de valência (originadas de orbitais π) da banda de condução (originadas de orbitais π^*). Os limites dessas bandas correspondem respectivamente aos orbitais HOMO e LUMO.	37
Figura 2 - Diagrama de interação da radiação com a matéria. Posição de fluorescência e fosforescência no quadro de interações de luz-matéria.	39
Figura 3 - Diagrama de Jablonski o qual ilustra os estados energéticos de uma molécula e as transições entre eles. Figura adaptada da referência [27].....	40
Figura 4 - Espectros de absorção, fluorescência e fosforescência. Figura adaptada da referência [28].	41
Figura 5 - Processo de absorção e emissão entre estados com acoplamento elétron-fônon. Adaptada da referência [35].....	42
Figura 6 - Dinâmica da migração de segmentos conjugados ao longo de uma cadeia polimérica conjugada.....	44
Figura 7 – Espaço paramétrico que relaciona os sinais de permissividade elétrica (ϵ) e a permeabilidade magnética (μ) nos materiais.	46
Figura 8 - a) Imagem de uma mão esquerda e sua imagem especular. b) A mão esquerda e sua imagem especular não são superponíveis, portanto a mão é quiral.....	49
Figura 9 - Esquema explicativo das subdivisões e significado dos isômeros.	50
Figura 10 - Ilustração do processo de rotação do eixo de polarização da luz. Um feixe despolarizado atravessa um polarizador, polarizando-se em uma certa direção. Ao incidir na amostra ela interage com este feixe girando o plano de polarização à esquerda (levogiro ou à direita (dextrogiro)).....	51

Figura 11 - Estrutura dos α -aminoácidos, exceto a glicina que no lugar do grupo R possui um hidrogênio e a prolina que é um aminoácido cíclico. O grupo R ou cadeia lateral (roxo), ligado ao carbono α (amarelo) é diferente em cada aminoácido.	54
Figura 12 - Representação do aminoácido Alanina, na primeira ilustração a L-alanina, denominada assim pois seu grupo α -amino está a esquerda e na segunda ilustração o grupo α -amino se encontra a direita do carbono quiral, portanto é denominado D-alanina.....	56
Figura 13 - Fórmulas estruturais dos 20 aminoácidos comuns de proteínas. Sombreado de roxo estão as cadeias laterais (Grupos R) que diferencia cada um dos 20 aminoácidos. Estão separados em 5 grupos quanto a sua polaridade.....	57
Figura 14 - O grupo α -amino do aminoácido com grupo R1, atua como um nucleófito, "roubando" o hidrogênio do grupo α -carboxila do aminoácido com grupo R2, formando assim uma ligação peptídica e gerando um dipeptídeo.	58
Figura 15 - Representação de uma estrutura primária, definindo para cada peptídeo um plano "rígido", o qual a cadeia polipeptídica só pode torcer nas suas extremidades. Adaptada da referência [53].....	60
Figura 16 - a) Estrutura da cadeia polipeptídica em formato de hélice. Adaptada da referência [53]. b) Estrutura refinada da troponina do frango (PDB ID: 4TNC).....	60
Figura 17 – a) Esqueleto de uma conformação folha β ; b) Conformação folha β antiparalela; c) Conformação folha β paralela. Adaptada da referência [53] e d) estrutura da microglobina bovina beta 2 (PDB ID: 1BMG).....	61
Figura 18 - Espectro de dicroísmo circular (CD) de proteínas e polipeptídios com suas estruturas secundárias representadas. Espectros CD da poli-L-lisina em pH 11.1 em 1 (preto) na conformação α -hélice e 2 (vermelho) na conformação folhas- β antiparalelas, em pH 5.7 na 3 (verde) se encontra com conformações estendidas (desordenadas), colágeno placentário em 4 (azul) na conformação hélice tripla e em 5 (ciano) formas desnaturadas. Adaptada da referência [61].	62
Figura 19 - Espectro ROA da BSA. Amostra em pH 7 e na temperatura ambiente. Medida realizada no laboratório do GEM.....	64
Figura 20 - Estrutura da mioglobina de cachalote (PDB ID: 1MBO).	65

Figura 21 - Estrutura da desóxi-hemoglobina (PDB ID: 2HHB).	66
Figura 22 - Proteína Albumina do Soro Bovino (BSA - PDB: 3v03). Proteína organizada majoritariamente em hélices (em azul), em formato de coração representada em dímico.	67
Figura 23 - Relação das formas isoméricas da BSA baseada no trabalho de Foster (1977).	68
Figura 24 - Estruturas em três dimensões dos 20 aminoácidos comuns. Cada elemento na cadeia estrutural é representado por uma cor, os carbonos quirais estão em amarelo, os oxigênios em vermelho, os hidrogênios na cor branca, o enxofre na cor verde, os carbonos não quirais na cor cinza e os nitrogênios na cor azul.	69
Figura 25 - Estruturas químicas do monômero MMA e do polímero PMMA.	75
Figura 26 - Taticidade do PMMA: isotático, sindiotático e atático. O grupo éster do PMMA foi simplificado para o melhor entendimento da configuração.	77
Figura 27 - Modelo de uma molécula diatômica, constituída por duas massas pontuais m_1 e m_2 , ligadas por uma mola de constante de força elástica k	83
Figura 28 - Diagrama dos mecanismos de espalhamento Raman e Rayleigh, onde ν_0 é a frequência do fóton incidente e ν é o valor da diferença de energia entre o estado fundamental e o excitado.	89
Figura 29 - Ilustração de uma molécula de hidróxido de carbono e de uma molécula de dióxido de carbono, representando moléculas a) não lineares e b) lineares, respectivamente.	90
Figura 30 - Modos de vibração, a) estiramento simétrico, b) assimétrico e c) flexão.	91
Figura 31 - Modos de vibração, a) deformação no plano e b) fora dele.	91
Figura 32 Modelo de duas massas pontuais ligadas rigidamente, em linhas tracejadas têm-se as duas massas girando em torno do seu centro de massa.	92
Figura 33 - Representação das funções de ondas rotacionais.	95
Figura 34 - Representação (a) dos níveis de energia e (b) do espectro no infravermelho.	96
Figura 35 - Rotação completa da molécula, identificando onde há variação da polarizabilidade.	97

Figura 36 - Representação (a) dos níveis de energia e (b) do espectro no Raman.	98
Figura 37 - Representação de uma luz elipticamente polarizada.	101
Figura 38 - Configuração experimental da técnica de elipsometria.	103
Figura 39 - Gráficos das funções $\sin 2\theta$, $\cos 4\theta$ e $\sin 4\theta$, as linhas pontilhadas do eixo dos radianos indicam os ângulos múltiplos de 40°	106
Figura 40 - Esquema básico do experimento ROA, onde se incide luz circularmente polarizada à direita e à esquerda em uma molécula quiral, e o feixe sai espalhado com frequência angular $\nu - \nu\nu$	107
Figura 41 - Representação esquemática de uma amostra quiral sendo irradiada com luz polarizada. 1 – Elemento óptico, 2 - vetor de Stokes associado a intensidade de radiação incidente, 3 - amostra quiral e 4 - vetor de Stokes associado ao estado de polarização da radiação espalhada.	117
Figura 42 - Diagrama esquemático do aparato experimental da Espectroscopia Raman por Elipsometria (ERS): (1) laser, (2) polarizador linear acromático, (3) lente para focar o laser, (4) porta amostra, (5) espelho, (6) conjunto de lentes para focar o feixe de luz espalhado pela amostra, (7)) placa um quarto de onda acromática, (8) polarizador linear acromático, (9) filtro notch, (10) espectrômetro e (11) detector CCD.	118
Figura 43 - Estrutura química e formula molecular dos sais a) acetato de sódio, b) fosfato de sódio e c) tetraborato de sódio.	121
Figura 44 - Ilustração da técnica de casting na preparação de filmes de BSA sobre o substrato de quartzo.	123
Figura 45 - Estrutura química do SW254.	123
Figura 46 - Diagrama esquemático do aparato experimental da Elipsometria de Emissão (EE): (1) fonte de luz, (2) monocromador, (3) polarizador linear acromático, (4) conjunto de lentes para focar a luz, (5) porta amostra, (6) conjunto de lentes para focar o feixe de luz emitido pela amostra, (7)) placa um quarto de onda acromática, (8) polarizador linear acromático, (9) detector.	128
Figura 47 - Reflexão espacial.	129

Figura 48 - Espectro de absorção do PMMA em diferentes solventes, com e sem o tratamento térmico, a) clorofórmio, b) tolueno e c) THF.	132
Figura 49 - Modelo de empacotamento de materiais em monocamada backbone, onde d1 é o comprimento do ramo lateral, d2 está associado a distância entre três cadeias sucessivas e d3 é a distância entre duas cadeias subsequentes. Figura adaptada da referência [112].	132
Figura 50 - Medidas normalizadas de raios X do PMMA puro e em vários solventes [a) clorofórmio, b) tolueno e c) THF] com e sem tratamento térmico.	134
Figura 51 - Unidade estrutural do PMMA, com os átomos numerados.	134
Figura 52 - Espectro Raman do PMMA.	135
Figura 53 - Espectro Raman dos solventes: a) clorofórmio, b) tolueno e c) THF. Erro! Indicador não definido.	
Figura 54 - Espectros Raman das amostras a) PMMA_CLO_STT e do PMMA_CLO_CTT, b) PMMA_TOL_STT e do PMMA_TOL_CTT e c) PMMA_THF_STT e do PMMA_THF_CTT.....	137
Figura 55 - Espectros dos parâmetros a) p, b) g, c) r e d) S0, extraídos pela técnica ERS em função da temperatura do PMMA_PURO.	138
Figura 56 - Espectros dos parâmetros a) p, b) g, c) r e d) S0, extraídos pela técnica ERS em função da temperatura do PMMA_CLO_STT.	139
Figura 57 - Espectros dos parâmetros a) p, b) g, c) r e d) S0, extraídos pela técnica ERS em função da temperatura do PMMA_CLO_CTT.....	140
Figura 58 - Espectros dos parâmetros a) p, b) g, c) r e d) S0, extraídos pela técnica ERS em função da temperatura do PMMA_THF_STT.	141
Figura 59 - Espectros dos parâmetros a) p, b) g, c) r e d) S0, extraídos pela técnica ERS em função da temperatura do PMMA_THF_CTT.	141
Figura 60 - Espectros dos parâmetros a) p, b) g, c) r e d) S0, extraídos pela técnica ERS em função da temperatura do PMMA_TOL_STT.	142

Figura 61 - Espectros dos parâmetros a) p, b) g, c) r e d) S0, extraídos pela técnica ERS em função da temperatura do PMMA_TOL_CTT.....	143
Figura 62 - Espectros dos parâmetros p, r e g em função dos picos Raman estudados no PMMA. Estes foram medidos utilizando a técnica ERS nos solventes (a) clorofórmio, (b) THF e (c) tolueno.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 63 - Espectro Raman a) da solução tampão no pH 7 e b) Da amostra BSA7.	145
Figura 64 - Espectro do parâmetro g da solução tampão no pH 7.....	145
Figura 65 - Espectro de absorção da proteína BSA em diferentes pH.	147
Figura 66 – Espectro CD na região UV- distante das amostras de BSA em pH 2, pH 5, pH 7 e pH 9.	148
Figura 67 - Espectro CD na região do UV-próximo da BSA em pH 2, pH 5 e pH 7.....	150
Figura 68 - Espectros de PLE corrigidos pela potência absorvida dos aminoácidos aromáticos da BSA, pH 2 a 12, com excitação em 280nm.....	151
Figura 69 - Eficiência quântica de emissão relativa o BSA em solução, com excitação em 280nm, pH 2 a 12.	152
Figura 70 - Espectros de PLE corrigidos pela potência absorvida para a solução de BSA, pH 2 a 12, com excitação em 295 nm.	153
Figura 71 - Eficiência quântica de emissão relativa o BSA em solução, com excitação em 295nm, pH 2 a 12.	154
Figura 72 - Espectro do parâmetro g da proteína BSA em pH fisiológico.....	155
Figura 73 - Espectros do parâmetro g dos aminoácidos a) fenilalanina, b) tirosina e c) triptofano em pH fisiológico.	156
Figura 74 - Espectro do parâmetro g extraído pela técnica ERS em função do pH da proteína BSA no pico 893 cm^{-1}	158
Figura 75 - Espectro do parâmetro g extraído pela técnica ERS em função do pH da proteína BSA nos picos 1100 cm^{-1} e o 1125 cm^{-1}	159

Figura 76 - Espectro do parâmetro g extraído pela técnica ERS em função do pH da proteína BSA nos picos 1240 cm^{-1} , 1268 cm^{-1} e 1303 cm^{-1}	160
Figura 77 - Espectro do parâmetro g extraído pela técnica ERS em função do pH da proteína BSA no pico 1672 cm^{-1}	161
Figura 78 - Espectro do parâmetro g extraído pela técnica ERS em função do pH da proteína BSA nos picos 1438 cm^{-1} , 1568 cm^{-1} e 1619 cm^{-1}	162
Figura 79 - Ilustração do modelo proposto da interação da luz circular polarizada com uma molécula que possui um carbono quiral. a) Uma luz circularmente polarizada à direita interage com a molécula formando um padrão de sequência de interação azul, amarelo, vermelho e verde. Esta mesma molécula b) ao interagir com luz circularmente polarizada a esquerda observa o padrão azul, verde, vermelho e amarelo. c) interação da luz circularmente polarizada a direita depois que a molécula sofreu uma rotação produz um padrão igual a da molécula antes da rotação, mas quando era incidido luz polarizada circular à esquerda. d) A interação da luz circularmente polarizada `esquerda depois que a molécula sofreu uma rotação produz um padrão igual à da molécula antes da rotação, mas quando era incidido luz polarizada circular à direita.	163
Figura 80 - Espectros do parâmetro p extraído pela técnica ERS em função do pH da proteína BSA nos picos a) 893 cm^{-1} , b) 1100 cm^{-1} e o 1125 cm^{-1} , c) 1240 cm^{-1} , 1268 cm^{-1} e 1303 cm^{-1} e d) 1438 cm^{-1} , 1568 cm^{-1} e 1619 cm^{-1}	164
Figura 81 - Nova relação das formas isoméricas da BSA proposta neste trabalho.	165
Figura 82 - Espectro Raman do sal acetato de sódio com ácido clorídrico (HCl).....	197
Figura 83 - Espectro Raman do sal acetato de sódio.	197
Figura 84 - Espectro Raman do sal fosfato de sódio	198
Figura 85 - Espectro Raman do sal acetato de sódio com hidróxido de sódio (NaOH).	198
Figura 86 - Espectro Raman do sal fosfato de sódio com hidróxido de sódio (NaOH).	199
Figura 87 - Espectro Raman do sal fosfato de sódio com ácido clorídrico (HCl).....	199
Figura 88 - Espectro Raman do sal tetraborato de sódio com ácido clorídrico (HCl).	200

Figura 89 - Espectro Raman do sal tetraborato de sódio.	200
Figura 90 - Espectro Raman da solução tampão no pH 2.....	201
Figura 91 - Espectro Raman do sal tetraborato de sódio com peróxido de hidrogênio (NaOH)....	201
Figura 92 - Espectro Raman da solução tampão no pH 12.....	202

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estruturas químicas de alguns polímeros conjugados. _____	35
Tabela 3 – Lista dos 20 aminoácidos comuns encontrado em proteínas com suas respectivas abreviações e símbolos. _____	55
Tabela 4 - Posição das bandas Raman, sinal da variação ROA e as assinaturas da BSA em solução tampão pH7. _____	64
Tabela 5 - Poder de diluição dos solventes no PMMA. _____	79
Tabela 6 - Região de alguns modos vibracionais Raman. _____	92
Tabela 7 - Quadro explicativo sobre os sinais de ΨT . _____	99
Tabela 8 - Parâmetros de Stokes. _____	99
Tabela 9 - Parâmetros de Stokes na forma vetorial. _____	102
Tabela 10 - Relações de conversão _____	111
Tabela 11 - Lista das amostras de aminoácidos com suas respectivas propriedades e nomenclaturas. _____	Erro! Indicador não definido.
Tabela 12 - Massa utilizada de cada aminoácido e o solvente usado para a preparação da solução. _____	Erro! Indicador não definido.
Tabela 13 - : Nomenclatura dada as amostras de sais e suas respectivas composições. _____	122
Tabela 14 - Nomenclatura dada as amostras de sais com solução ácida e básica. _____	122
Tabela 15 - Nomenclatura das amostras dos tampões e suas respectivas composições e quantidades de HCl e NaOH. _____	123
Tabela 16 - Nomenclatura adotada para as amostras de PMMA. _____	120
Tabela 17 - Nomenclatura das amostras dos SW203 e SW254 e suas respectivas concentrações. _____	124
Tabela 18 - Modos vibracionais do PMMA. _____	135

Tabela 19 - Assinaturas dos picos Raman da proteína BSA em solução. _____	145
Tabela 20 - Assinaturas dos picos Raman da solução tampão. _____	146
Tabela 21 - Quantidades em porcentagem calculadas a partir do CD das estruturas secundárias em cada pH. _____	149
Tabela 22 - Posição das bandas Raman, sinal da variação ROA e as assinaturas da BSA em solução tampão pH7. _____	157

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

1-PhEtOH	(S)-(-)-1-feniletanol
A	Aceitador
BC	Banda de condução
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (albumina de soro bovino)
BV	Banda de valência
CD	<i>Circular dichroism</i> (dicroísmo circular)
CDE	Dicroísmo circular de emissão
CI	Conversão interna
CIS	Cruzamento intersistema
D	Doador
DA	Doador-aceitador
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EE	Elipsometria de emissão
ERS	<i>Ellipsometry Raman spectroscopy</i> (espectroscopia Raman por elipsometria)
GEM	Grupo de espectroscopia de materiais
HOMO	<i>Highest Occupied Molecular Orbital</i> (orbital de mais alta energia ocupado)
HSA	Albumina de soro humano
INFIS	Instituto de Física
LUMO	<i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i> (orbital de menor energia desocupado)
MMA	Metacrilatos
ORD	Dispersão óptica rotatória
PA	<i>Trans</i> -poliacetileno
Pani	Poli(para-fenileno)
PDB	<i>Protein Data Bank</i> (Banco de dados de proteínas)
pH	Potencial hidrogeniônico
PL	<i>Photoluminescence</i> (fotoluminescência)
PMMA	Poli (metil metacrilato)
PPV	Poli(<i>para</i> -fenileno vinileno)
PT	Politiofeno
PTV	Poli(2,5-tiofenovinileno)
RNA	Ácido ribonucleico
ROA	Raman optical activity (atividade óptica Raman)
THF	Tetrahidrofurano
UFU	Universidade federal de Uberlândia
UV-vis	Ultravioleta-visível
VCD	Dicroísmo circular vibracional

LISTA DE SÍMBOLOS

E_{ele}	Energia eletrônica
E_g	Energia de gap
E_{rot}	Energia rotacional
E_{vib}	Energia vibracional
S_0, S_1, S_2 e S_3	Parâmetros de Stokes
T_g	Transição vítrea
λ_{exc}	Comprimento de onda de excitação
J	Número quântico rotacional
N	Concentração de moléculas quirais
S	Estado singleto
T	Estado tripleto
c	Velocidade da luz no vácuo
g	Fator de assimetria
p	Grau de polarização
r	Fator de anisotropia
β	Parâmetro óptico rotacional
ε	Permissividade elétrica
κ	Parâmetro de quiralidade
μ	Permeabilidade magnética
χ	Elipticidade
ψ	Ângulo de orientação

SUMÁRIO

Capítulo 1 - Introdução	26
1. Introdução	27
Capítulo 2 – Polímeros	34
2. Polímeros	35
2.1. Polímeros conjugados	35
2.1.1. Estrutura Eletrônica dos Polímeros Conjugados	36
2.1.2. Fotofísica em Polímeros Conjugados	38
2.2. Polímeros conjugados quirais	45
Capítulo 3 - Quiralidade e Atividade óptica	48
3. Quiralidade e Atividade óptica	49
Capítulo 4 - Proteínas	53
4. Proteínas	54
4.1. Aminoácidos	54
4.1.1. Alifáticos	57
4.1.2. Aromáticos	57
4.1.3. Não carregados	57
4.1.4. Carregados positivamente	58
4.1.5. Carregados negativamente	58
4.2. Estrutura das Proteínas	58
4.2.1. Estrutura Primária	59
4.2.2. Estrutura Secundária	60
4.2.3. Estrutura Terciária	65
4.2.4. Estrutura Quaternária	66
4.2.5. Biblioteca de Proteínas	66
4.3. Relevância da BSA e dos aminoácidos	67
4.3.1. Albumina do Soro Bovino (BSA)	67
4.3.1.1. Forma isoméricas da Albumina	68
4.3.2. Aminoácidos	68
Capítulo 5 - Poli (Metil Metacrilato) – PMMA	74
5. Poli (Metil Metacrilato) – PMMA	75
5.1. Propriedades	75
5.1.1. Propriedades físicas	76
5.1.2. Propriedades químicas	78

Capítulo 6 - Espectroscopia Raman por Elipsometria	80
6. Espectroscopia Raman por Elipsometria	81
6.1. Espectroscopia Raman	81
6.1.1. Introdução	81
6.1.2. Vibração de Moléculas	82
6.2. Elipsometria	99
6.2.1. Como determinar experimentalmente os parâmetros de Stokes	102
6.3. Atividade Óptica Raman (ROA)	107
6.3.1. Os tensores de Atividade Óptica	107
6.4. Espectroscopia Raman por Elipsometria (ERS)	117
Capítulo 7 - Materiais e Métodos	119
7. Materiais e Métodos	120
7.1. Materiais	120
7.1.1. Aminoácidos	Erro! Indicador não definido.
7.1.2. Albumina de Soro Bovino (BSA)	121
7.1.3. Poli (Metil metacrilato) (PMMA)	120
7.1.4. SW203 e SW254	123
7.2. Métodos	125
7.2.1. Espectroscopia Raman por Elipsometria (ERS)	125
7.2.2. Absorção	126
7.2.3. Fotoluminescência (PL) e Fotoluminescência de Excitação (PLE)	126
7.2.4. Elipsometria de Emissão (EE)	127
7.2.5. Difração de Raio-X	128
Capítulo 8 - Resultados e discussões	130
8. Resultados e discussões	131
8.1. PMMA	131
8.1.1. Medidas de Absorção	131
8.1.2. Medida de Difração de Raio X	132
8.1.3. Medidas de espalhamento Raman	134
8.1.4. Medidas de espectroscopia Raman por elipsometria	138
8.2. BSA	144
8.2.1. Absorção	146
8.2.2. Dicroísmo Circular (CD)	147
8.2.3. Espectroscopia Raman por Elipsometria (ERS)	154
8.3. (1R, 2R) diaminociclohexano	165
8.3.1. SW203	165
Capítulo 9 – Conclusões	180
9. Conclusões	181

Capítulo 10 - Referências bibliográficas	184
10. Referências bibliográficas	185
Capítulo 11 – Anexo I	196
11. Anexo I	197
11.1. Espalhamento Raman solução tampão	197
11.2. SW203	202
EE	202
ERS	204
11.3. SW254	205
EE	205
ERS	207
Capítulo 12 – Anexo II - Publicações	208
12. Anexo II – Publicações	209
12.1. Artigos publicados	209
12.2. Capítulo de livro	209
12.3. Apresentações de trabalhos	209

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Atividade óptica Raman

No começo da década de 70 surgiram as primeiras observações de atividade óptica Raman (ROA - abreviação do inglês *Raman optical activity*), feitas pelo químico inglês Laurence Barron e colaboradores, que constataram a atividade óptica vibracional em moléculas quirais na fase líquida. A primeira publicação logo surgiu em 1973 no artigo “*Raman scattering of circularly polarized light by optically active molecules*”¹ e a ROA foi definido como sendo a pequena diferença na intensidade do espalhamento Raman para moléculas quirais na incidência de luz laser polarizada circularmente à direita e à esquerda.²

A ROA apresenta uma vasta superioridade à espectroscopia Raman convencional na investigação de moléculas quirais, no caso de moléculas biológicas, fica mais evidente as suas vantagens devido à sua homoquiralidade. Por ser uma manifestação da atividade óptica vibracional³, a ROA é mais sensível às estruturas tridimensionais das moléculas quirais por depender de sua conformação absoluta, o que levou ao seu desenvolvimento como uma sonda incisiva da estrutura e comportamento das biomoléculas em solução aquosa. Por exemplo, os espectros de ROA obtidos a partir de proteínas podem fornecer informações detalhadas sobre as estruturas secundária e terciária adotadas pelos esqueletos polipeptídicos. Em comum com outras espectroscopias vibracionais, não há restrições quanto ao tamanho das moléculas, ou em seu tipo, que possam ser investigadas pelo ROA, ampliando sua aplicação a proteínas, vírus e carboidratos desdobrados.²

As moléculas quirais são relevantes para diversas aplicações tecnológicas, e sua descoberta foi central no estudo de moléculas biológicas relacionadas à manutenção da vida, o que despertou interesse em cientistas de várias áreas no último século.⁴ Os detalhes estruturais dos sistemas quirais podem ser obtidos por Dispersão Rotatória Óptica (ORD – abreviação do inglês *optical rotatory dispersion*) e Dicroísmo Circular (CD – abreviação do inglês *circular dichroism*) para transições eletrônicas e para modos vibracionais tem-se o espalhamento Raman, ROA e o dicroísmo circular vibracional (VCD – abreviação para *vibrational circular dichroism*). Os primeiros resultados experimentais sobre a diferença nas intensidades de Raman para as luzes polarizadas circularmente esquerda e direita foram relatados em 1973, confirmados no mesmo ano com as moléculas quirais 1-feniletilamina- (C_6H_5) CH (CH_3) (NH_2) e 1-feniletanol -

(C₆H₅)CH(CH₃)(OH).¹ Até o momento, nenhum efeito da atividade óptica foi observado no espalhamento Rayleigh. A teoria básica da atividade óptica Raman (ROA) foi desenvolvida em 1971,² com o efeito sendo atribuído à interferência entre ondas dispersas pelos centros quirais de uma molécula. Tanto a atividade óptica quanto os tensores de polarizabilidade dos centros quirais dependem da polarização da luz de excitação e dos componentes circulares da luz dispersa. A teoria completa será explanada na seção 6.3.

Espectroscopia Raman por Elipsometria

Em 2016, foi publicada e mostrada pela primeira vez a comunidade acadêmica uma nova técnica a qual através do estudo da polarização da luz espalhada é capaz de caracterizar a estrutura química de diversos materiais. A técnica recebeu o nome de espectroscopia Raman por elipsometria, abreviada por ERS.⁵ A sigla vem do nome em inglês “*ellipsometric Raman spectroscopy*”, o qual é o título do artigo. Neste artigo em especial foi mostrado que através de um dos parâmetros medidos através da técnica ERS, o parâmetro de assimetria (g), consegue-se informações similares as medidas de ROA.

A técnica ERS leva uma vantagem sobre a técnica ROA do professor Barron. Na ROA a intensidade de luz circularmente espalhada a direita é subtraída da esquerda restando somente o sinal ROA, perdendo todas as outras informações da amostra contidas na luz polarizada espalhada. No ERS isso não ocorre, o parâmetro g é calculado através dos parâmetros de Stokes, o qual carrega todas as informações sobre os estados de polarização da luz espalhada, dessa maneira além do sinal similar ao ROA é possível calcular outros fatores como, por exemplo, como anisotropia (r) e grau de polarização (p). Todos os detalhes da técnica ERS está explanado no capítulo 6.

Neste trabalho vamos expandir as fronteiras da técnica aplicando-a em diversos tipos de materiais orgânicos como o poli (Metil metacrilato) (PMMA), os aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e o triptofano, a albumina do soro bovino (BSA – abreviação do inglês *bovine serum albumin*) e o polímero conjugado quiral (1R, 2R) diaminociclohexano.

Materiais estudados

BSA

As últimas três décadas de estudos sobre interações proteína-proteína têm sido essenciais para o surgimento de novas ideias para vários mecanismos moleculares, como danos no DNA e reparo, compreensão da compartimentação intracelular e evolução celular eucariota. Particularmente, o entendimento das células vivas foi apontado para um citoplasma celular cheio de solutos, lipídios, membranas, ácidos nucleicos e proteínas; conhecido como apinhamento molecular.

Foi proposto que, no caso das proteínas, a sua concentração excepcionalmente alta pode ser responsável pela viscosidade celular, difusão e não homogeneidade, e favorecer também interações proteína-proteína específicas. Nesse sentido, os experimentos *in vitro* de Ross e Minton, em 1977,⁶ já mostraram uma relação direta entre o aumento da concentração de hemoglobina e sua atividade, sugerindo a relevância da alta concentração protéica no ambiente fisiológico. Em relação à concentração plasmática de hemoglobina, pode ultrapassar 300 g/L, evidenciando esses resultados.⁶ Além disso, os estudos de interações proteína-proteína em ambientes de aglomeração podem fornecer *insights* na compreensão de distúrbios conformacionais de proteínas como Alzheimer, Parkinson, Huntington e doenças priônicas.⁷ Além disso, esses estudos podem aprimorar técnicas de biologia molecular no caso de proteínas recombinantes expressas como corpos de inclusão. Em referência às proteínas recombinantes como agentes terapêuticos, pode-se encontrar uma relação ótima entre a eficiência do tratamento com a concentração de proteína recombinante.

Outras proteínas também podem ser encontradas em alta concentração no meio extracelular, como as albuminas séricas. As proteínas mais abundantes no plasma sanguíneo, de 35 a 55 mg / ml, acredita-se que as albuminas estejam associadas à ligação e ao transporte de várias moléculas pequenas, como ácidos graxos, corantes, metais, aminoácidos e vários compostos farmacêuticos.⁸

A albumina do soro bovino (BSA – abreviação do inglês *bovine serum albumin*), uma das albuminas mais estudadas, é uma proteína globular, em pH neutro, com 585 resíduos de aminoácidos que formam principalmente a estrutura secundária da hélice alfa, conectada por 17 pontes dissulfídicas, conferindo uma relativa estabilidade a proteína. Embora sua estrutura cristalográfica não tenha sido resolvida, pode-se observar uma alta homologia estrutural à albumina sérica humana (HSA), cuja estrutura cristalográfica é conhecida, pelo alinhamento das duas sequências.

Tanto a BSA como a HSA sofrem diferentes arranjos espaciais em solução ácida de pH, a transição N-F entre pH 5,0 e 3,5, e as formas expandidas (transição E) abaixo deste valor (estas transições citadas são descritas no modelo de Foster e serão explanadas na seção 4.3.1.1).⁹ Além disso, em condições de pH alcalino, essas proteínas podem adquirir outra conformação diferente, conhecida como transição N-B. Foi proposto que, semelhante à induzida por ácido, a transformação induzida por alcalina tem um papel biológico, provavelmente relacionado à liberação de fármacos, íons e ligantes.⁹ Todas essas informações e conceitos estão explanados no capítulo 4.

Devido a essa grande importância das albuminas para a manutenção da vida, existem vários trabalhos reportados na literatura, fazendo dela uma excelente molécula para demonstrar que a técnica ERS é capaz de capturar informações conformacionais nunca vistas por nenhuma outra técnica. E isto se comprovou, com o auxílio da técnica ERS propomos neste trabalho um novo modelo de transição de formas isoméricas com a mudança de ambiente químico, além disso, provamos de forma inédita de que maneira os aminoácidos aromáticos se mascaram e desmascaram da estrutura da BSA com a mudança de pH. Mais informações sobre a conformação estrutural da BSA com a mudança de pH são adquiridas através da técnica e isso pode ser conferido no capítulo 8.

PMMA

O poli (metil metacrilato) ou como é conhecido mundialmente PMMA é um polímero sintético do monômero metil metacrilato (MMA). Foi descoberto no século passado, nos anos 30 pelos químicos britânicos Rowland Hill e John Crawford e sendo aplicado pela primeira vez em 1934 pelo químico alemão Otto Rohm.¹⁰ O PMMA é um polímero opticamente transparente na região do visível e é amplamente utilizado como substituto do vidro, pois apresenta alta resistência ao impacto, é leve, resistente à quebra e possui condições de processamentos favoráveis.¹¹ Tudo isso resulta em um material muito resistente as intempéries e arranhões. A presença do grupo metil (CH₃) no ramo lateral da estrutura do polímero evita que este se reorganize na forma cristalina e que gire livremente em torno das ligações C – C.¹² O PMMA é um polímero amorfo. A sua primeira grande aplicação foi durante a Segunda Guerra Mundial, quando o PMMA era utilizado como janelas das aeronaves.¹² O PMMA é um polímero já consolidado para aplicações em diversas áreas como, óptica, pneumática, sensores, separação analítica, dispositivos condutores, entre outras inúmeras funcionalidades.^{13–17}

Difícilmente o PMMA será aplicado na sua forma pura, na maioria das vezes estará ou em algum momento esteve diluído em um solvente. O solvente ao entrar em contato com o polimetacrilato altera suas propriedades químicas e físicas. Saber de que forma a interação polímero-solvente modifica essas propriedades é de suma importância para a sua posterior aplicação. Mais detalhes sobre suas propriedades físicas e químicas pode ser consultado no capítulo 5.

A popularidade e vários trabalhos acerca do PMMA o qualificaram como um excelente material para a aplicação da técnica ERS. A interação polímero-solvente foi investigada através de vários parâmetros calculados pela análise da polarização da luz espalhada e foi identificado uma diferença na interação do PMMA com diferentes solventes, por exemplo, para o clorofórmio interage de forma anisotrópica com a matriz polimérica e de forma única verificou-se que essa interação ocorre mais fortemente no ramo metil, mostrando a grande capacidade da técnica em observar mudanças conformacionais de maneira mais localizada. Muitas outras observações também foram feitas para os solventes tetrahydrofurano e tolueno e podem ser conferidas no capítulo 8.

(1R, 2R) diaminociclohexano

Nas últimas décadas outra classe de polímero começou a se destacar nas linhas de pesquisas por todo o mundo, a dos polímeros quirais, a principal razão para isso é a natureza quiral dos sistemas vivos. A maioria das moléculas sintetizadas por organismos vivos são quirais. Portanto, a síntese e estudo de polímeros quirais que possam reproduzir as funções destes tipos de moléculas e até substituí-las é relevante no cenário científico atualmente.^{18,19}

Uma outra área que se abre para a aplicação de polímeros quirais é a aplicação de polímeros para se produzir os chamados metamateriais. Surgiram em meados do século XX, mas rapidamente foi perdendo o interesse por não conseguirem reproduzir experimentalmente esses materiais que teoricamente apresentariam efeitos nunca imaginados em materiais convencionais. Finalmente, no começo deste século conseguiram produzir os primeiros metamateriais que apresentavam efeitos nada comuns aos materiais estudados até aquele momento, como por exemplo, índice de refração negativo, a qual uma das suas aplicações tecnológicas é a invisibilidade.^{20,21} Os metamateriais eletromagnéticos são estruturas artificiais ou não, arranjadas periodicamente em nano estruturas em comprimentos menores que o comprimento de

onda da luz.²² Estes apresentam propriedades peculiares que não são vistas em materiais naturais. A teoria sobre polímeros está explanada no capítulo 2.

Devido à grande relevância deste tipo de material nas pesquisas atuais o polímero conjugado quiral (1R, 2R) diaminociclohexano foi selecionado para ser caracterizado neste trabalho. Ele foi sintetizado no laboratório “*Hétérochimie moléculaire et macromoléculaire*” do professor Jean-Pierre Lère-Porte, situado na cidade de Montpellier na França. Tal polímero apresentou características ímpares e que podem ser de grande aplicação a novas tecnologias.

O polímero conjugado quiral completa a gama de materiais que iremos analisar neste trabalho, como a técnica ERS já provou ser uma ferramenta poderosa na caracterização do PMMA e da BSA a utilizaremos para estudar o (1R, 2R) diaminociclohexano. Veja os resultados no capítulo 8.

Outras técnicas utilizadas

Além do ERS foram utilizadas diversas técnicas espectroscópicas com a finalidade de dar suporte aos resultados expostos pelo ERS, são elas:

- Absorção óptica
- Dicroísmo circular
- Elipsometria de Emissão
- Espalhamento Raman
- Fotoluminescência
- Fotoluminescência de excitação
- Raio-X

As técnicas, os equipamentos e em quais materiais cada uma foi utilizada pode ser verificado no capítulo 7.

A seguir no capítulo 2 está descrita a teoria sobre os polímeros conjugados. A seção 2.1 descreve a estrutura eletrônica desses polímeros e a fotofísica relacionada a eles. A seção 2.2 é dedicada aos polímeros conjugados quirais, demonstrando suas principais características.

O capítulo 3 faz uma breve síntese do conceito de quiralidade e explana sobre a propriedade física atividade óptica, presente em todos os materiais quirais e em moléculas que de alguma forma quebram a simetria local do sistema.

O capítulo 4 é dedicado aos aminoácidos e as proteínas. A seção 4.1 explana sobre todos os 20 aminoácidos comuns e suas características estruturais e eletrônicas. A seção 4.2 elucida todos os conceitos que envolvem estruturas de proteínas. A seção 4.3 é dedicada a relevância da proteína albumina de soro bovina e dos aminoácidos.

No capítulo 5 é possível compreender todas as propriedades do polímero de engenharia PMMA, na seção 5.1.1 suas propriedades físicas e na seção 5.1.2 suas propriedades químicas.

Um dos principais capítulos deste trabalho é o capítulo 6, pois ele é dedicado a técnica ERS. A seção 6.1 explica o espalhamento Raman e a seção 6.2 a elipsometria. A seção 6.3 descreve a atividade óptica Raman. Finalmente a seção 6.4 reuni todos os conceitos vistos anteriormente e explica a técnica ERS.

No capítulo 7 são expostos todos os materiais e explicadas as técnicas espectroscópicas utilizadas.

O capítulo 8 contempla os resultados e discussões sobre as moléculas orgânicas estudadas.

O capítulo 9 conclui todos as discussões realizadas e sintetiza os principais resultados obtidos, além de informar quais são as perspectivas deste trabalho.

Nos capítulos 10, 11 e 12 estão as referências bibliográficas, anexo I e anexo II, respectivamente.

CAPÍTULO 2 – POLÍMEROS

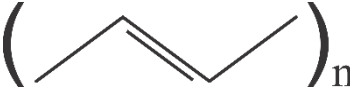
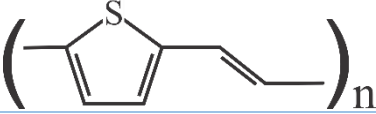
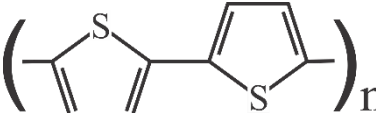
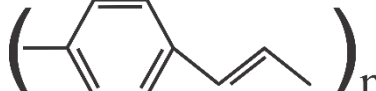
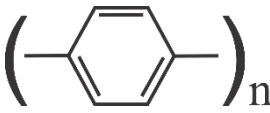
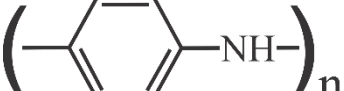
2. POLÍMEROS

Polímero é uma classe de material caracterizado pela presença de uma variedade de estruturas químicas formadoras.²³ Sua nomenclatura, proveniente do grego, poli (muitos, vários) e meros (unidade), exprime precisamente este fato.²⁴ O monômero é a matéria prima para a produção de um polímero. Dependendo do tipo de ligação covalente, da estrutura química e do número médio de meros por cadeia polimérica, lhe surgem características diferenciadas do ponto de vista químico e físico, como a habilidade de transferir energia de um sítio a outro, induzindo vários processos como, por exemplo, a luminescência, o transporte de portadores, as reações fotoquímicas, entre outros.

2.1. Polímeros conjugados

Dentre as diversas classes de polímeros, temos a dos *polímeros conjugados*, que é objeto de interesse neste trabalho devido às suas propriedades ópticas e elétricas similares aos semicondutores inorgânicos.²⁵ Geralmente estes compostos orgânicos são formados por uma cadeia principal de átomos de carbono com átomos de hidrogênio ligados a ela. Diz-se que um polímero é conjugado quando sua cadeia principal possui alternância entre ligações simples e duplas. A Tabela 1 apresenta alguns desses polímeros.

Tabela 1 - Estruturas químicas de alguns polímeros conjugados.

PA	<i>Trans</i> -poliacetileno	
PTV	Poli(2,5-tiofenovinileno)	
PT	Politiofeno	
PPV	Poli(<i>para</i> -fenileno vinileno)	
PPP	Poli(<i>para</i> -fenileno)	
Pani	Polianilina	

Polímeros conjugados com elétrons π não localizados, conhecidos também como polímeros semicondutores, formam uma classe de materiais com um grande potencial de aplicação em dispositivos eletroluminescentes.²⁵ Estes são conhecidos desde meados do século XIX. O grande avanço nessa área começou a partir de maio de 1977 quando Shirakawa e colaboradores publicaram um artigo intitulado “*Synthesis of Electrically Conducting Organic Polymers: Halogen Derivatives of Polyacetylene, (CH)_x*”, no qual mostraram que filmes do poliacetileno quando oxidados com vapor de cloro, bromo ou iodo eram 109 vezes mais condutores que o poliacetileno em sua forma original.²⁴ O tratamento com halogênios foi chamado de dopagem em analogia aos semicondutores inorgânicos. Estes estudos renderam aos pesquisadores o Prêmio Nobel de Química no ano 2000.²⁶

Estudos aprofundados dos processos radiativos e não radiativos nos polímeros emissores de luz, bem como a habilidade de se fazer previsões e estimativas, são importantíssimos para esclarecer a natureza e os mecanismos das transições ópticas nesses materiais.

2.1.1. Estrutura Eletrônica dos Polímeros Conjugados

Os polímeros conjugados apresentam alternância de ligações químicas simples (σ) e duplas (σ e π) ao longo de sua cadeia, sendo a ligação π a grande responsável pelas propriedades que tornam esses materiais potenciais candidatos para aplicações como camada ativa de dispositivos opto-eletrônicos.²³ Quando um polímero conjugado apresenta uma cadeia bastante longa, os orbitais π (ligante) e π^* (antiligante) dão origem as bandas de energia, sendo que a primeira delas possui todos os estados eletrônicos ocupados e a segunda todos os estados eletrônicos desocupados.²³ Na linguagem física, bandas são chamadas respectivamente de banda de valência e de banda de condução, onde HOMO (*highest occupied molecular orbital*) e LUMO (*lowest unoccupied molecular orbital*) são os limites das bandas de valência e de condução (figura 2) respectivamente, de forma muito semelhante ao observado em um semicondutor inorgânico. A diferença entre a energia de nível LUMO e a energia do nível HOMO é chamada de lacuna de energia, ou “gap”, do semicondutor (E_g). A Figura 1 mostra esquematicamente esta denominação.

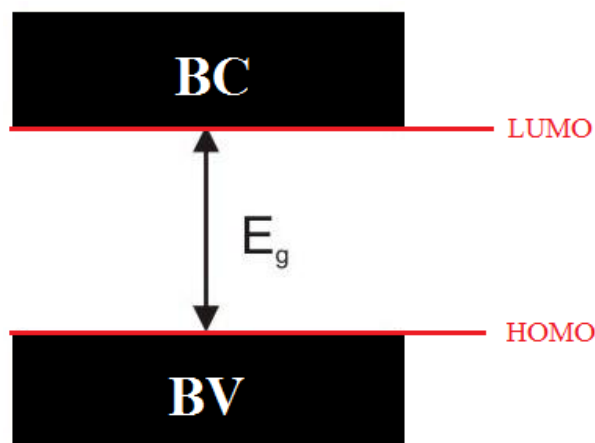


Figura 1 - Diagrama de energias de um material semiconductor. De forma análoga aos semicondutores inorgânicos, os polímeros conjugados apresentam um “gap” de energia E_g que separa a banda de valência (originadas de orbitais π) da banda de condução (originadas de orbitais π^*). Os limites dessas bandas correspondem respectivamente aos orbitais HOMO e LUMO.

Quando fótons de energia maior ou igual a E_g incidem sobre um material semiconductor, elétrons podem migrar da banda de valência para banda de condução, deixando um buraco na banda de valência, gerando um estado excitado no sistema. O elétron e o buraco podem se mover livremente ou podem interagir de forma coulombiana, formando os éxcitons. Na recombinação desses portadores de carga, eles emitem um fóton com energia menor ou igual a E_g . No caso da maioria dos polímeros conjugados, essa energia E_g é tal que corresponde a fótons na região de luz visível, ou seja, esses polímeros têm a capacidade de absorver ou emitir luz visível, despertando assim grande interesse para aplicações em optoeletrônica, principalmente no ramo de células fotovoltaicas.²⁶

O comportamento de polímeros conjugados é, entretanto, em alguns pontos bastante diferente daquele observado em semicondutores inorgânicos. Em polímeros conjugados a absorção de um fóton transfere um elétron da banda de valência para a banda de condução e na sequência, como isso implica numa redistribuição da densidade eletrônica, ocorre uma relaxação elástica da cadeia (ou segmento de cadeia) polimérica, que corresponde a um forte acoplamento elétron-fônon. Como consequência, se o elétron retornar à banda de valência, o fará de um nível energeticamente mais baixo e emitirá um fóton de energia menor que a daquele absorvido. Por essa razão, picos do espectro de fotoluminescência de polímeros conjugados normalmente são deslocados para maiores comprimentos de onda (menores energias), quando comparados aos do espectro de absorbância. Essa peculiaridade tem feito com que se investigue a aplicação desses materiais na construção de lasers, pois implica que um fóton emitido na cavidade do laser

não seja reabsorvido, viabilizando assim a chamada inversão de população, que é responsável pelo fenômeno de emissão estimulada.²⁷

2.1.2. Fotofísica em Polímeros Conjugados

Nessa subdivisão do capítulo será discutido os processos fotofísicos conseguintes da excitação dos polímeros conjugados.

2.1.2.1. Transferência de energia

Subsequente ao fenômeno da absorção óptica, o processo de relaxação energética, onde o elétron perde energia e volta à banda de valência pode ser radioativo com a emissão de um fóton. Como as densidades eletrônicas mudam nos estados excitados, durante a relaxação de energia ocorrem também processos nos quais a energia é perdida de forma não radioativa, competindo com os processos radioativos, isso faz com que a eficiência quântica de emissão do polímero seja minimizada. A transferência de energia desempenha um papel importantíssimo na física dos polímeros conjugados, corresponde a um processo não radioativo extremamente rápido e pode ser intra ou intermolecular.

2.1.2.1.1. Fotoluminescência

Fotoluminescência (PL – abreviação vem do inglês *photoluminescence*) é a emissão de radiação eletromagnética resultante de excitação não térmica, ou seja, absorção de luz, dos níveis de energia de átomos, moléculas, polímeros e cristais. A PL inclui a fluorescência, se a transição radioativa é permitida por regra de seleção de spin entre dois estados de igual multiplicidade e fosforescência se a transição é proibida por regra de seleção de spin entre dois estados com diferentes multiplicidades. Em geral, o tempo de vida da fluorescência (0.1 – 10 ns) é muito menor do que os tempos de vida da fosforescência (1 ms a 10 s).²⁸ Desta maneira, a fluorescência pode ser definida como a fotoluminescência que ocorre imediatamente após a excitação, enquanto a fosforescência ocorre com um atraso. Na Figura 2 podemos ver a posição da fluorescência e da fosforescência na interação luz-matéria.

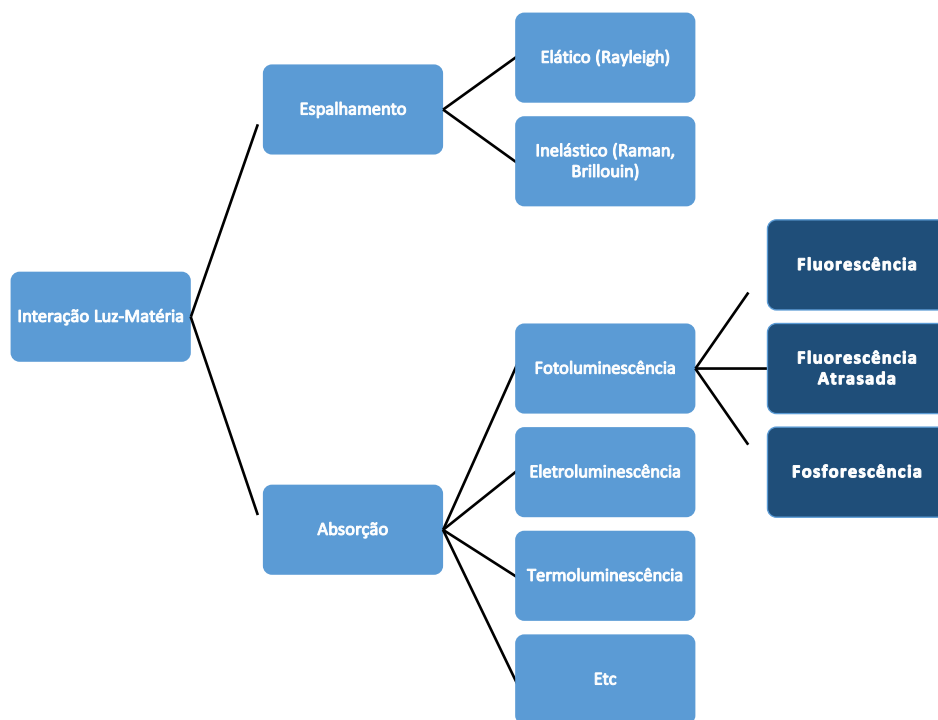


Figura 2 - Diagrama de interação da radiação com a matéria. Posição de fluorescência e fosforescência no quadro de interações de luz-matéria.

O termo fluorescência foi inventado por Stokes em 1852, derivado da palavra fluoride. Stokes foi o primeiro a estabelecer claramente que a fluorescência era um processo de emissão e propôs o princípio que hoje conhecemos como “Lei de Stokes” que estabelece que o comprimento de onda de uma emissão fluorescente é sempre maior que o da excitação.²⁹ Outros termos como fotoluminescência, catodo luminescência, anodo luminescência, radio luminescência e luminescência de raio X estão relacionados com o tipo de excitação e são todos fenômenos de fluorescência. O uso da fluorescência para fins analíticos foi sugerido pela primeira vez em 1867 por Goppelsröder que propôs a análise do Alumínio (Al) por meio da fluorescência de uma de suas ligas.²⁹

Antes de analisar o diagrama de Jablonski, representado na Figura 3, é importante relembrar alguns conceitos, como o de estados singletos (S_n) e tripletos (T_n). Imagina-se dois elétrons de spins opostos pertencentes a um orbital molecular de uma molécula no estado fundamental, um destes elétrons é promovido a um estado excitado (mais alta energia que o fundamental) sem alteração do seu spin, mantendo o número quântico S ($S = \sum s_i$, com $s_i = +\frac{1}{2}$ ou $s_i = -\frac{1}{2}$) igual a zero. Como a multiplicidade dos estados fundamentais e excitados ($M = 2S + 1$) é igual a 1, ambos são chamados de estados singletos (normalmente se denota S_0 para o estado fundamental, e $S_1, S_2, \dots$ para estados excitados). Usando o mesmo exemplo anterior, mas agora o spin é alterado na mudança do estado fundamental para excitado, resultando em spins iguais, com isso o

número quântico $S = 1$ e a multiplicidade é $M = 3$. Este estado é chamado de tripleto ($T_1, T_2, \dots$).²⁹

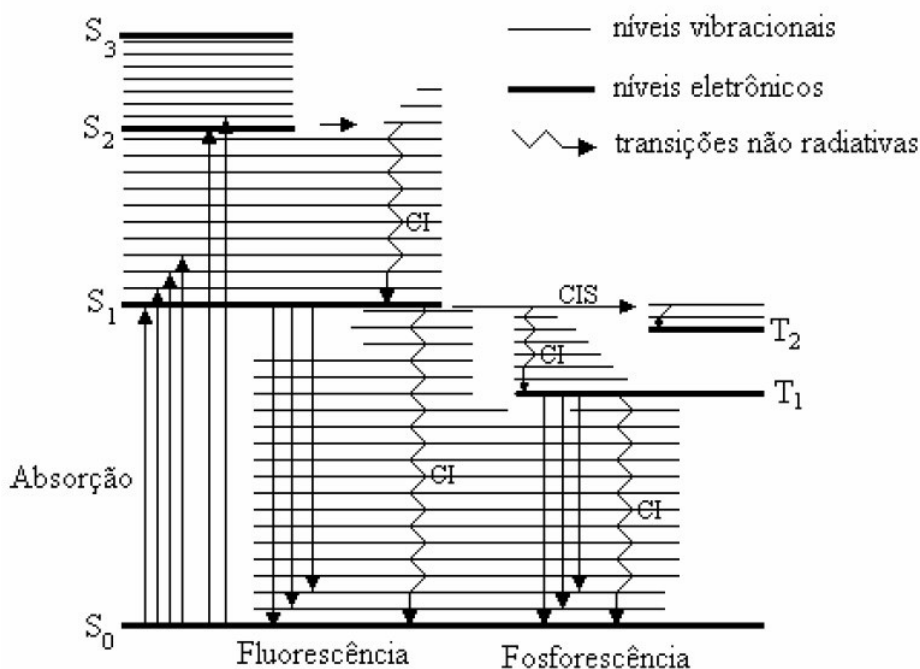


Figura 3 - Diagrama de Jablonski o qual ilustra os estados energéticos de uma molécula e as transições entre eles. Figura adaptada da referência [27]

Através da Figura 3 pode-se notar que a emissão de fóton do estado S_1 para o estado S_0 é chamada de fluorescência. O espectro de fluorescência apresenta comprimentos de onda maiores do que o espectro de absorção. Isto é devido à perda de energia no estado excitado por relaxação vibracional.²⁷ De acordo com a Regra de Stokes (um método empírico que pré-data o diagrama de Jablonski), o comprimento de onda de emissão sempre deveria ser maior ou igual que da absorção. Contudo, na maioria dos casos o espectro de absorção sobrepõe, em parte, o espectro de fluorescência. Tal observação parece estar, à primeira vista, em contradição com o princípio de conservação de energia. Porém, esta observação é explicada pelo fato de que à temperatura ambiente uma pequena fração de moléculas está em um nível vibracional mais alto que o nível S_0 , tanto no estado fundamental como no estado excitado. Em geral, as diferenças entre os níveis vibrônicos são semelhantes nos estados S_0 e S_1 , de forma que o espectro de fluorescência se assemelha a primeira banda do espectro de absorção (Figura 4). A diferença entre o máximo da primeira banda de absorção e o máximo de fluorescência é chamado deslocamento de Stokes.³⁰

Para que ocorra a fosforescência (transição do estado T_1 para o estado S_0) é essencial que haja a relaxação vibracional dos portadores para o estado tripleto T_1 . Porém, essa recombinação a temperatura ambiente tem pouca probabilidade de ocorrer. Já à baixa temperatura a fosforescência é mais facilmente observada. O tempo de vida do estado tripleto, nessas condições, pode ser maior e se observa a fosforescência em uma escala de tempo de segundos, minutos ou por mais tempo. O espectro de fosforescência apresenta o seu máximo com comprimento de onda maior do que o espectro de luminescência (Figura 4), porque o nível vibracional mais baixo do estado tripleto T_1 é inferior ao do estado singleto S_1 .

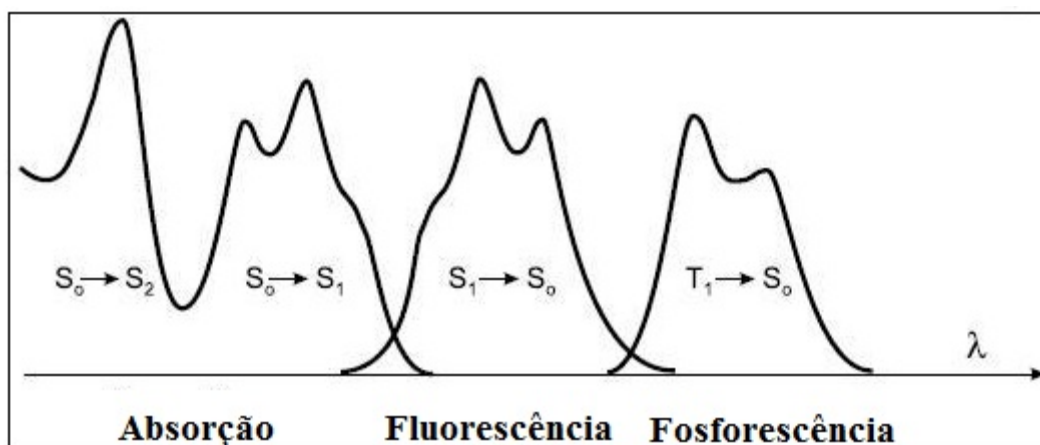


Figura 4 - Espectros de absorção, fluorescência e fosforescência. Figura adaptada da referência [28].

Os processos intramoleculares de conversão interna (CI) e cruzamento intersistema (CIS), esquematizados no diagrama de Jablonski (Figura 3) envolvem o acoplamento entre os estados eletrônicos e os estados vibracionais da cadeia. Um elétron no estado fundamental, ao absorver um fóton, é promovido a um dos estados vibracionais no estado eletrônico singleto excitado, de onde relaxa não radioativamente até o nível vibracional mais baixo por meio da ativação de fônons (relaxação vibracional). O processo CI produz um estado de mais baixa energia de mesma multiplicidade de spin.

A começar do nível mais baixo do estado singleto excitado, podem ocorrer três processos: i) radiativo, no qual o elétron emite um fóton (fluorescência) ii) não radioativo, o CIS, no qual o elétron é transferido (geralmente via interação spin-órbita) para um estado excitado tripleto, de onde decai não radiativamente até o nível vibracional mais baixo deste estado e iii) um decaimento não radioativo para o estado fundamental. A partir do nível mais baixo do estado excitado tripleto, o elétron pode também decair por um processo não radiativo (CI) ou por um processo radiativo (fosforescência).

2.1.2.1.2. Transições eletrônicas

No espectro de PL observam-se as estruturas vibrônicas, bandas devidas ao acoplamento entre os estados eletrônicos e os níveis vibracionais. As estruturas devem-se aos níveis de energia vibracionais individuais do estado fundamental e dos estados excitados conforme é visto na Figura 5.³¹

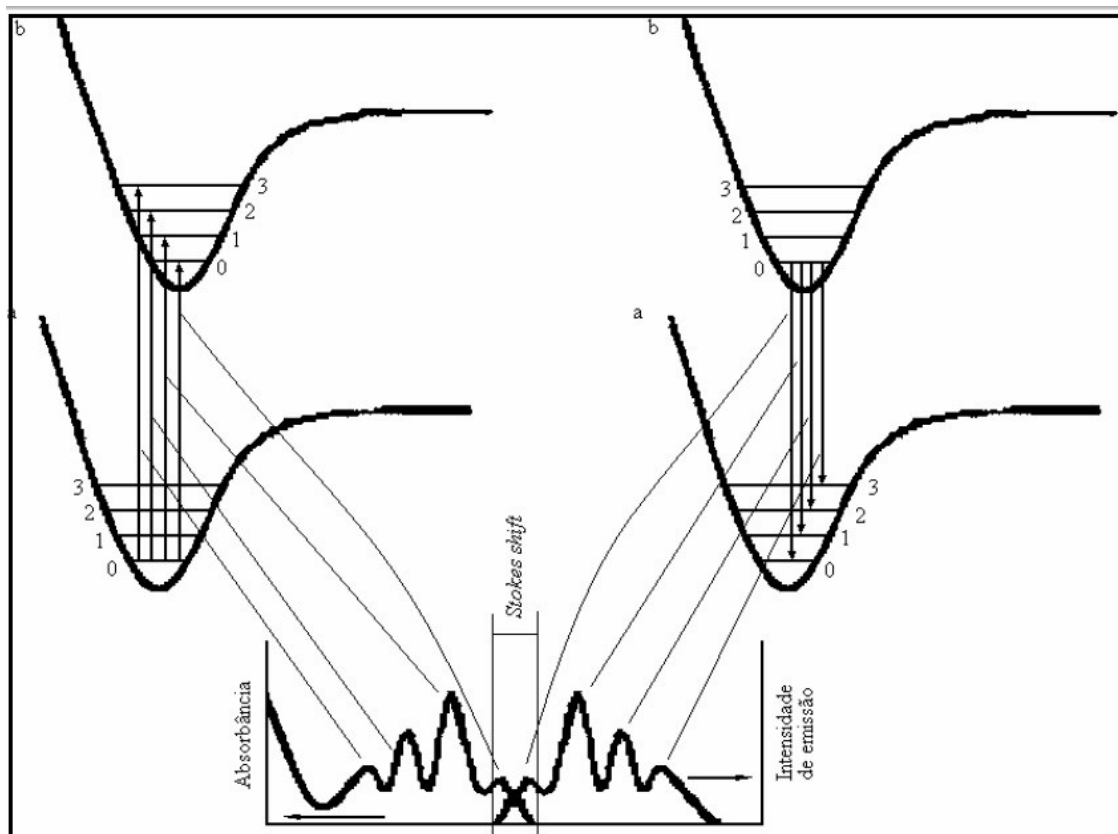


Figura 5 - Processo de absorção e emissão entre estados com acoplamento elétron-fônon. Adaptada da referência [35].

Como, em geral, no espectro de absorção de polímeros conjugados as bandas vibrônicas se apresentam como uma banda larga, elas não são resolvidas. Isto se deve à distribuição não homogênea de segmentos poliméricos conjugados fazendo com que o estado fundamental e o estado excitado tenham uma distribuição de energia. Na fotoluminescência as transições ocorrem sempre do nível eletrônico mais baixo do estado excitado para níveis eletrônicos e vibracionais do estado fundamental, devido à transferência de energia no estado excitado entre diferentes segmentos conjugados. Com isso, as bandas vibrônicas são bem mais definidas no espectro de emissão do que no espectro de absorção.

2.1.2.1.3. Processos intermoleculares

Nos processos intramoleculares, adota-se que os processos decorrentes acontecem somente em uma molécula isolada. Esta aproximação foi realizada para

facilitar a compreensão, pois em um sistema polimérico as interações intermoleculares são muito intensas. Neste caso, às vezes, acontecem processos intermoleculares que competem eficientemente com processos radioativos.³⁰

Sugere-se o mecanismo Förster para explicar o fenômeno de migração de energia não radiativa,³² ele trata a transferência de energia de segmentos de menor conjugação (maior *gap*) para segmentos de maior conjugação (menor *gap*) não radiativamente. Mas é importante salientar que existem outros mecanismos como, por exemplo, a migração por difusão ou tunelamento.

O mecanismo Förster, denominado como migração ou transferência Förster de energia em polímeros conjugados é um processo que ocorre nas interações intermoleculares. A migração de energia é definida como a doação da energia de uma molécula (cromóforo) doadora excitada para outra molécula aceitadora no estado fundamental. Uma forma geral da energia do mecanismo Förster é representar pela equação (1).



onde “D*” representa uma molécula doadora inicialmente excitada e “A” representa uma molécula aceitadora no estado fundamental. Após a excitação óptica de uma molécula “D”, uma opção desta, que agora está excitada é transferir sua energia para um grupo equivalente “A” no estado fundamental vizinho, conforme ilustra a Figura 6. Esta segunda espécie pode então transferir sua energia para outro grupo. Isto provoca uma reação em cadeia, o estado excitado de um cromóforo transfere energia para o próximo, resultando em uma migração de energia sobre uma grande quantidade de grupos equivalentes. Haverá uma determinada molécula na qual a probabilidade de ocorrer transferência de energia para outra será menor que a probabilidade de recombinação radioativa ou não-radioativa, podendo então ocorrer emissão de luz.²⁸

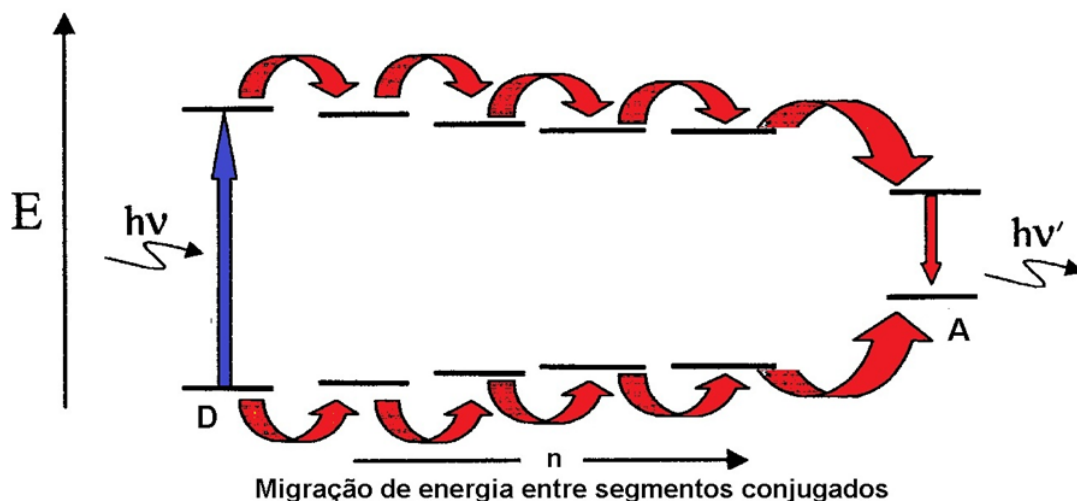


Figura 6 - Dinâmica da migração de segmentos conjugados ao longo de uma cadeia polimérica conjugada. Adaptada da referência [28].

O fenômeno de migração de energia se origina da interação dipolo-dipolo (raio de interação < 10 nm) entre doador e aceitador, não exigindo a superposição das funções de onda dos estados inicial e final, nem a emissão de um fóton, este fenômeno tem sido comparado ao efeito antena.³³ No entanto, é necessária a ocorrência da superposição (condição de ressonância) dos espectros de absorção do aceitador e de emissão do doador. O mecanismo Förster vem sendo usado para estudar a difusão de éxciton em sistemas orgânicos, por exemplo, como trata o artigo, *Luminescence enhancement by the introduction of disorder into PPV*.³⁴ Nos materiais poliméricos a direção de propagação da energia de excitação tende para moléculas com comprimento de conjugação maiores, menor energia de “gap”. A chance de uma transferência ocorrer depende da sua proximidade com um vizinho equivalente no estado fundamental.

A migração de energia por “*hopping*” consiste no tunelamento entre sítios e neste caso exige-se superposição das funções de onda dos estados inicial e final e a ressonância dos estados energéticos dos mesmos. Também a transferência radiativa ou “trivial” pode ocorrer e envolve a reabsorção de energia por outra molécula, um processo que pode ser representado por:



2.2. Polímeros conjugados quirais

Nas últimas décadas polímeros quirais começaram a se destacar nas linhas de pesquisas por todo o mundo, a principal razão para isso é a natureza quiral dos sistemas vivos. Como já descrito anteriormente no texto, na introdução, a maioria das moléculas sintetizadas por organismos vivos são quirais. Portanto, a síntese e estudo de polímeros quirais que possam reproduzir as funções destes tipos de moléculas e até substituí-las é relevante no cenário científico atualmente.^{18,19}

Polímeros conjugados opticamente ativos são potencialmente úteis em áreas como eletrossíntese, dispositivos eletro-ópticos sensíveis a polarização, óptica não linear, fotoeletroluminescência polarizada, sensoriamento e enantiosseletivo.³⁵

Uma outra área que se abre para a aplicação de polímeros quirais é a aplicação de polímeros para se produzir os chamados metamateriais. Surgiram em meados do século XX, mas rapidamente foi perdendo o interesse por não conseguirem reproduzir experimentalmente esses materiais que teoricamente apresentariam efeitos nunca imaginados em materiais convencionais. Finalmente, no começo deste século conseguiram produzir os primeiros metamateriais que apresentavam efeitos nada comuns aos materiais estudados até aquele momento, como por exemplo, índice de refração negativo, a qual uma das suas aplicações tecnológicas é a invisibilidade.^{20,21} Os metamateriais eletromagnéticos são estruturas artificiais ou não, arranjadas periodicamente em nano estruturas em comprimentos menores que o comprimento de onda da luz.²² Estes apresentam propriedades peculiares que não são vistas em materiais naturais.

Um metamaterial é composto por “meta-átomos” organizados periodicamente, que interagem com as ondas eletromagnéticas de tal forma, que de acordo com a sua estrutura pode alterar as características magnéticas e elétricas desta onda. Surgindo um novo ramo para a pesquisa em óptica, onde antes era limitada a lentes e espelhos convencionais, agora trabalha em uma tecnologia capaz de fazer coisas imprevisíveis com a luz.³⁶

Para se ter uma noção do quanto os metamateriais são especiais, no eletromagnetismo tem-se dois parâmetros fundamentais para a caracterização das suas propriedades em um meio, a permissividade elétrica (ϵ) e a permeabilidade magnética (μ). A maioria dos materiais dielétricos apresentam esses dois parâmetros com sinais positivos. Os metais e semicondutores já apresentam a permissividade elétrica negativa, os materiais ferromagnéticos possuem permissividade elétrica positiva e permeabilidade magnética negativa, como pode ser visto na Figura 7. Somente materiais não naturais, como os metamateriais, podem apresentar tanto ϵ quanto μ negativos.

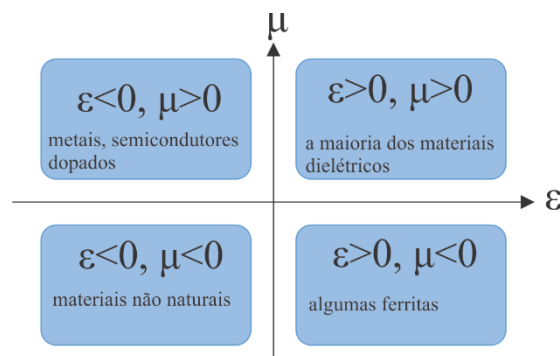


Figura 7 – Espaço paramétrico que relaciona os sinais de permissividade elétrica (ϵ) e a permeabilidade magnética (μ) nos materiais.

Um metamaterial convencional é a combinação de fios finos e longos com anéis metálicos, essa associação gera dois conjuntos de estruturas ressonantes um para a parte elétrica outra para a resposta magnética. Essas estruturas devem ser cuidadosamente projetadas e executadas, mas na melhor das hipóteses a razão comprimento de onda e comprimento da estrutura não é menor do que 10 para 1,³⁷ ou seja, se conseguir uma unidade com 100 nm de comprimento, o menor comprimento de onda que ela será capaz de interagir é 1000 nm. Por causa desses problemas, os metamateriais convencionais só conseguiram uma refração negativa nas frequências de micro-ondas.²⁰

Dentre os possíveis metamateriais surgiu uma nova classe, os metamateriais quirais, com o objetivo de ser uma alternativa simplificada para se chegar ao índice de refração negativo.³⁷ Um desafio enorme para a classe científica nesta área é projetar novas estruturas capazes de satisfazer as aplicações e ainda assim manter as propriedades eletromagnéticas dos metamateriais e os materiais quirais são uma alternativa.³⁸ Quando se fala de metamateriais quirais, não é importante mais apresentar ϵ e μ negativos, o que vai ser importante agora é o parâmetro de quiralidade (κ), quanto maior for a quiralidade apresentada pelo metamaterial, maior será sua capacidade de modificar os parâmetros eletromagnéticos da luz.³⁷

$$k = N\mu_0\beta\omega c \quad (5)$$

sendo β o parâmetro óptico rotacional (diferença média entre a polarizabilidade da luz circular à esquerda e direita), N é a concentração das moléculas quirais, μ_0 é a permeabilidade magnética no vácuo, ω é a frequência da luz e c é a velocidade da luz no vácuo.³⁹

Assim, os polímeros conjugados quirais surgem como uma alternativa viável para os metamateriais. Estudar e conhecer novos tipos de polímeros é de suma importância para a aplicação em metamateriais quirais.

Um exemplo desta nova gama de materiais que estão surgindo é o polímero conjugado quiral (1R,2R) - diaminociclohexano, que será estudado neste trabalho. Por ser um material novo, a sua aplicação ainda está em aberto, a priori, pode ser aplicado a sensores, catalisadores enantiosseletivos, metamateriais quirais, entre outros.^{35,40} Espera-se que este trabalho ajude a nortear futuras aplicações.

*CAPÍTULO 3 - QUIRALIDADE E
ATIVIDADE ÓPTICA*

3. QUIRALIDADE E ATIVIDADE ÓPTICA

Um objeto é denominado quiral quando ele e sua imagem especular não se superpõem, por exemplo, ao colocar a mão esquerda à frente do espelho, sua imagem é a mão direita, a qual não se superpõe à mão esquerda (observe a Figura 8 abaixo). Desta forma, um objeto aquiral sua imagem especular é idêntica e se superpõe.⁴¹

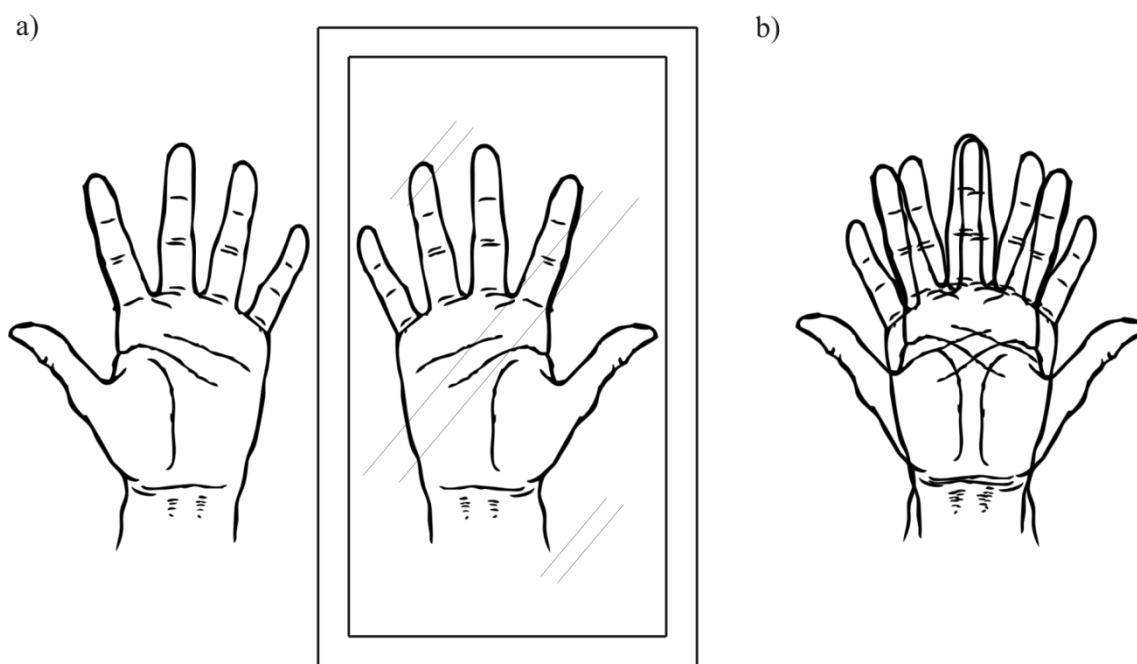


Figura 8 - a) Imagem de uma mão esquerda e sua imagem especular. b) A mão esquerda e sua imagem especular não são superponíveis, portanto a mão é quiral.

A quiralidade é de fundamental importância para os humanos, pois seus corpos são estruturalmente quirais, o DNA (ácido desoxirribonucleico) é uma molécula quiral. Uma grande quantidade de medicamentos são quirais e podem ter seu princípio ativo alterado se forem levogiras (substâncias que desviam a luz polarizada para a esquerda) ou dextrogiras (substâncias que desviam a luz polarizada para a direita), em alguns casos a imagem especular da molécula é responsável pelo efeito colateral da droga e a molécula em si é o princípio ativo.

Um conceito muito importante é a isomeria, que são compostos que apresentam a mesma fórmula molecular.⁴¹ A Figura 9 abaixo é um resumo explicativo das subdivisões e significados dos isômeros.

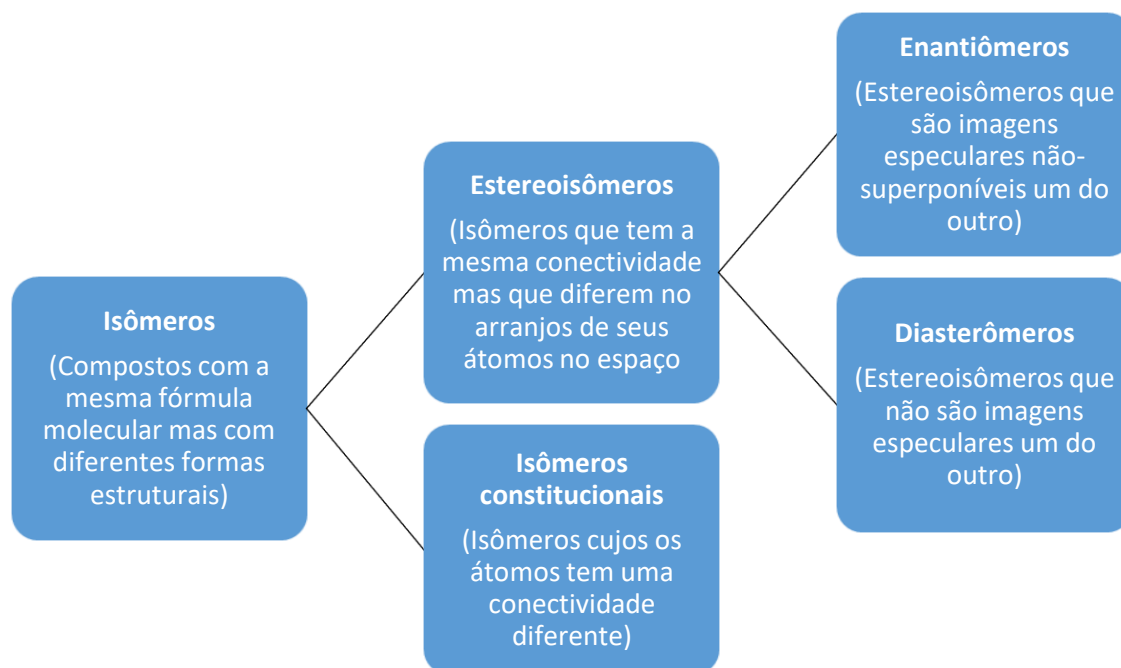


Figura 9 - Esquema explicativo das subdivisões e significado dos isômeros.

Há uma relação bastante relevante entre quiralidade e atividade óptica. Todas as moléculas quirais são moléculas de compostos opticamente ativos e todos compostos opticamente ativos são quirais.⁴²

Define-se atividade óptica como sendo a propriedade que certos materiais possuem de rodar o plano de polarização da luz polarizada incidente.⁴¹ A Figura 10 ilustra a definição anterior, um feixe incidente atravessa um polarizador e adquire uma polarização, ao passar pela amostra esse feixe sofre uma mudança no plano de polarização, sendo assim essa amostra é composta por uma substância que apresenta atividade óptica.

No último século, cientistas de várias áreas do conhecimento, principalmente, físicos, químicos e biólogos, se fascinaram com a descoberta da atividade óptica de sistemas quirais devido aos novos fenômenos físicos que poderiam ser explorados em diversas aplicações. Atribui-se a evolução desta área do conhecimento aos trabalhos iniciados por Fresnel sobre óptica clássica, por Pasteur por descobrir pares de moléculas enantioméricas e, finalmente, a Faraday por demonstrar a conexão entre luz e o eletromagnetismo, descobrindo a atividade óptica magnética.⁴³ As moléculas denominadas opticamente ativas possuem a propriedade de rodar o plano de polarização de uma luz linearmente polarizada.⁴⁴ Um exemplo bastante simples é uma solução aquosa de glicose usada em experimentos de ensino de física no laboratório de óptica. De forma

geral, a chamada atividade óptica abrange um maior número de fenômenos que estão relacionados com a diferença de respostas de dois campos eletromagnéticos circularmente polarizados à direita e à esquerda. Quando uma substância apresenta atividade óptica sem influência externa é denominada de atividade óptica natural, por exemplo, proteínas.⁴⁴

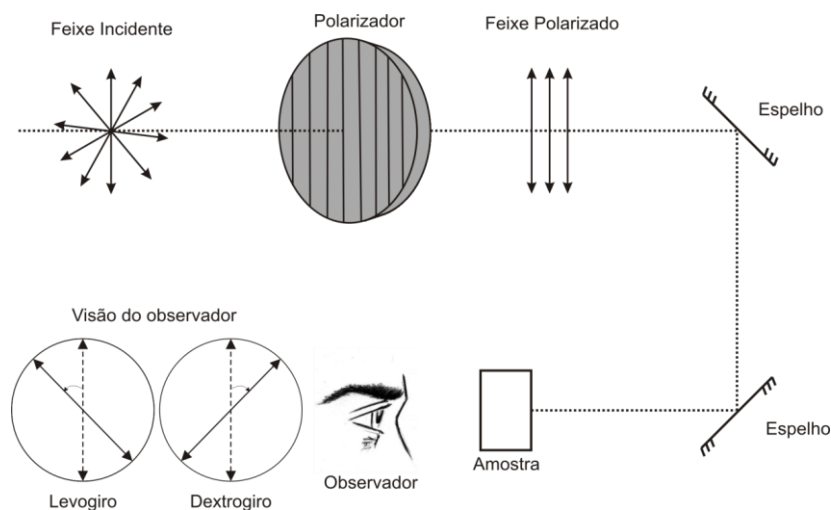


Figura 10 - Ilustração do processo de rotação do eixo de polarização da luz. Um feixe despolarizado atravessa um polarizador, polarizando-se em uma certa direção. Ao incidir na amostra ela interage com este feixe girando o plano de polarização à esquerda (levogiro ou à direita (dextrogiro)).

A grande maioria das moléculas sintetizadas nos organismos vivos possui atividade óptica. Desta maneira, é um elemento importante da vida que traz um critério usado, por exemplo, para descobrir se há evidência de vida em outros mundos analisando os elementos constituintes de meteoros. Em pequenas moléculas ela surge devido à ausência de simetria. Na prática, podemos observar atividade óptica em amostras através da dispersão óptica rotatória (ORD) ou dicroísmo circular (CD).⁴⁴ Os avanços recentes tecnológicos e desenvolvimento de novos componentes ópticos mais eficientes aumentaram muito a sensibilidade dos experimentos tradicionais de atividade óptica (razão sinal-ruído) permitindo sua observação. Em geral, a observação da atividade óptica se dá na região do UV-Vis por transição eletrônica, experimentos de ORD ou CD. Entretanto, na última década, significantes avanços experimentais foram obtidos na investigação da atividade óptica vibracional, espectroscopia no infravermelho ou Raman que possibilitou novos estudos fundamentais de moléculas quirais em comparação a atividade óptica puramente eletrônica.⁴⁵

A importância no aumento da capacidade de caracterização de sistemas para determinação de sua atividade óptica está em sua importância na área da química e bioquímica. Isto se deve ao fato de que a técnica convencional não é capaz de determinar estrutura molecular tridimensional em meio biológico. Usando cristalografia por difração

de Raios-X temos a dependência da obtenção de cristais orgânicos que, em geral, apresentam estrutura molecular específica às condições de crescimento dos cristais e não condizem com a conformação molecular observada *in vivo*.

CAPÍTULO 4 - PROTEÍNAS

4. PROTEÍNAS

As proteínas são as macromoléculas mais numerosas existentes nos seres vivos, pois estão em todas as células e em todas as partes dela.⁴⁶ As proteínas governam de fato quase todos os processos que ocorrem em uma célula, possuindo uma infinidade de funções, uma delas é ser o dispositivo molecular pelo qual a informação genética é expressa.⁴⁶ Todas as proteínas são polímeros e suas unidades monoméricas são os aminoácidos. Estas unidades monoméricas teoricamente simples são a chave da estrutura de milhares de proteínas diferentes. Todas são compostas por um conjunto de 20 aminoácidos (ver Tabela 2), cada um com uma cadeia lateral diferente e propriedades químicas características e denominadas por letras do alfabeto no qual pode-se escrever a estrutura proteica.⁴⁷

Para produzir uma proteína, esses 20 aminoácidos vão se combinando através de ligações covalentes formando uma sequência linear de aminoácidos. Cada tipo de sequência gera uma proteína, se a ordem desses aminoácidos é alterada, gera outra proteína com propriedades e atividades biológicas totalmente diferentes.⁴⁸

Este capítulo abordará como é estruturada uma proteína. Primeiro será definido o que é um aminoácido e depois será estudado as estruturas primárias, secundárias, terciárias e quaternárias das proteínas.

4.1. Aminoácidos

Todos os 20 tipos de aminoácidos comuns (há muitos outros menos comuns, mas não serão abordados neste trabalho) listados na Tabela 2 são α -aminoácidos, ou seja, possuem um grupo carboxila (COO^-) e um grupo amina (H_3N^+) ligados ao mesmo átomo de carbono (carbono α) como pode ser observado na Figura 11.⁴⁹

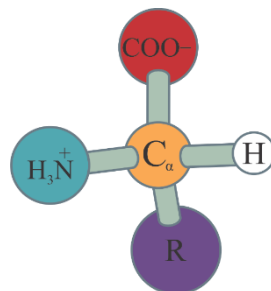


Figura 11 - Estrutura dos α -aminoácidos, exceto a glicina que no lugar do grupo R possui um hidrogênio e a prolina que é um aminoácido cíclico. O grupo R ou cadeia lateral (roxo), ligado ao carbono α (amarelo) é diferente em cada aminoácido.

Com o intuito de universalizar as nomenclaturas dos aminoácidos comuns, foram atribuídas a eles dois tipos de abreviações, uma de três letras e outra de uma letra. A segunda tinha como objetivo diminuir o tamanho dos dados (no início da computação, na década de 60, os dados eram gravados em cartões perfurados) quando se analisava cadeias de aminoácidos. A Tabela 2 lista todos os 20 aminoácidos comuns das proteínas, com suas respectivas abreviações, além de mostrar a porcentagem de ocorrência de cada aminoácido nas proteínas.⁴⁶

Tabela 2 – Lista dos 20 aminoácidos comuns encontrado em proteínas com suas respectivas abreviações e símbolos.

Aminoácido	Abreviação	Símbolo	Ocorrência em proteínas (%) ⁵⁰
Grupos R alifáticos, apolares			
Glicina	Gly	G	7,2
Alanina	Ala	A	7,8
Prolina	Pro	P	5,2
Valina	Val	V	6,6
Leucina	Leu	L	9,1
Isoleucina	Ile	I	5,3
Metionina	Met	M	2,3
Grupos R aromáticos			
Fenilalanina	Phe	F	3,9
Tirosina	Tyr	Y	3,2
Triptofano	Trp	W	1,4
Grupos R polares, não carregados			
Serina	Ser	S	6,8
Treonina	Thr	T	5,9
Cisteína	Cys	C	1,9
Asparagina	Asn	N	4,3
Glutamina	Gln	Q	4,2
Grupos R carregados positivamente			
Lisina	Lys	K	5,9
Histidina	His	H	2,3
Arginina	Arg	R	5,1
Grupos R carregados negativamente			
Aspartato	Asp	D	5,3
Glutamato	Glu	E	6,3

Os aminoácidos são diferenciados por suas cadeias laterais ou grupos R, que variam sua estrutura, tamanho e carga elétrica. O átomo de carbono α é o centro quiral

para todos os aminoácidos comuns, pois está ligado a quatro grupos diferentes: um grupo carboxila, um grupo amino, um grupo R e um átomo de hidrogênio.⁴⁹ O único aminoácido que não segue esse padrão é a glicina, na qual o grupo R é substituído por um hidrogênio. Quando o carbono α se liga aos quatro grupos, gera-se um arranjo tetraédrico dos orbitais, gerando dois arranjos espaciais possíveis e, portanto, os aminoácidos possuem dois estereoisômeros possíveis.⁴⁷ Todas essas moléculas com um centro quiral são opticamente ativas, ou seja, giram o plano de polarização da luz. Uma das possíveis formas de classificar os aminoácidos é quanto à configuração absoluta pelo sistema D e L, mas não confunda com L de levogiro (rotação do plano de luz polarizada para a esquerda) e D de dextrogiro (rotação do plano de polarização da luz para a direita), pois nem todos os L-aminoácidos são levogiros e se faz necessário uma nova convenção para evitar confusões sobre a configuração absoluta.⁴⁸ Essa nova convenção se refere apenas a conformação absoluta dos quatro substituintes em torno do carbono quiral e foi proposta por Emil Fischer em 1891,⁴⁹ que considerou o gliceraldeído, um açúcar de três carbonos, como sua molécula referência para todos os compostos quirais. Para fazer a classificação escreveu-se a fórmula do gliceraldeído em perspectiva, alinhando os carbonos na vertical com o carbono quiral ao centro, com o carbono do aldeído ou carboxila acima. Desta maneira sempre o grupo R do aminoácido ficará abaixo do carbono α . Ao escrever em perspectiva os aminoácidos nessas condições pode-se classificá-los em L-aminoácidos aqueles com o grupo α -amino a sua esquerda e os D-aminoácidos com esse grupo a sua direita, como demonstra a Figura 12 abaixo.⁴⁹

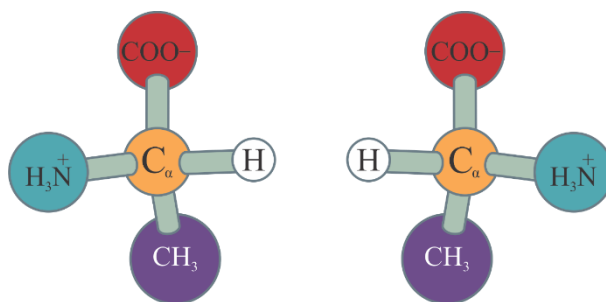


Figura 12 - Representação do aminoácido Alanina, na primeira ilustração a L-alanina, denominada assim pois seu grupo α -amino está a esquerda e na segunda ilustração o grupo α -amino se encontra a direita do carbono quiral, portanto é denominado D-alanina.

Além da classificação quanto à configuração absoluta, podemos classificar os aminoácidos pelas propriedades do grupo R (Figura 13), especificamente pela sua polaridade e carga ou tendência de interagir com a água em seu pH biológico (pH 7.4). Esta propriedade é importantíssima para a compreensão da bioquímica. Basicamente pode-se agrupar os 20 aminoácidos de acordo com sua polaridade em 5 grupos distintos:

4.1.1. Alifáticos

Classe de aminoácidos apolares e hidrofóbicos. Fazem parte desse grupo a glicina, a alanina, a prolina, a valina, a leucina, a isoleucina e a metionina.

4.1.2. Aromáticos

Classe de aminoácidos relativamente apolares e hidrofóbicos. São representantes desse grupo a fenilalanina, a tirosina e o triptofano. Uma característica importante é a absorção de luz ultravioleta, quando necessita caracterizar qualquer proteína se utiliza muito desta propriedade.

4.1.3. Não carregados

Classe de aminoácidos mais hidrofílicos que as duas classes anteriores. Integram esse grupo a serina, a treonina, a cisteína, a asparagina e a glutamina.

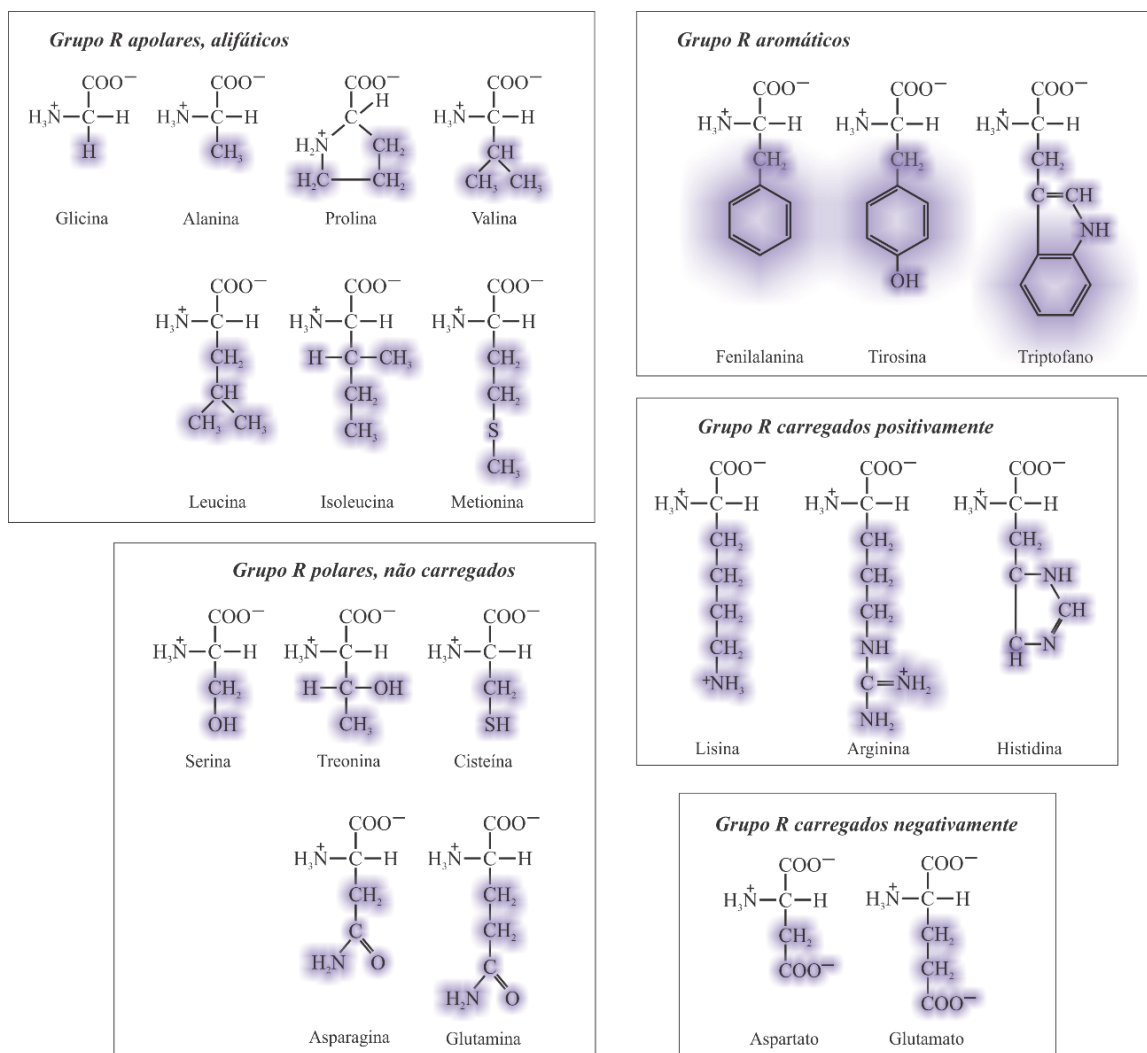


Figura 13 - Fórmulas estruturais dos 20 aminoácidos comuns de proteínas. Sombreado de roxo estão as cadeias laterais (Grupos R) que diferencia cada um dos 20 aminoácidos. Estão separados em 5 grupos quanto a sua polaridade.

4.1.4. Carregados positivamente

Classe de aminoácidos básicos e mais hidrofílicos que os outros grupos anteriores. Participam deste grupo a lisina, a arginina e a histidina.

4.1.5. Carregados negativamente

Classe de aminoácidos ácidos e muito hidrofílicos. Pertencem a esse grupo o aspartato e o glutamato.

4.2. Estrutura das Proteínas

A ligação de dois aminoácidos através de uma ligação peptídica forma um dipeptídeo. Essa ligação é feita por meio da desidratação dos dois aminoácidos ligantes, em um o grupo α -amino perde um elemento de água e no outro quem perde é o grupo α -carboxila, como pode ser visto na Figura 14.⁴⁸ Os aminoácidos podem continuar se ligando, sempre por uma ligação peptídica, formando tripeptídeos (três aminoácidos ligados), tetrapeptídeos (quatro aminoácidos ligados) e assim sucessivamente. Um termo muito utilizado no meio físico-químico é o “resíduo de aminoácido”, o aminoácido perde elementos de água ao fazer a ligação covalente, após a perda este aminoácido passa a ser chamado de resíduo. Quando se tem um número muito elevado de resíduos ligados, a molécula recebe o nome de polipeptídeo. Quando é superior a 100, ele passa a ser chamado de proteína.⁴⁶

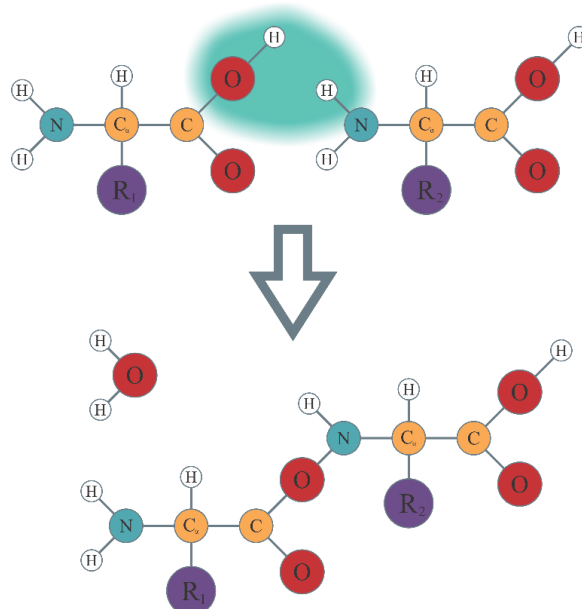


Figura 14 - O grupo α -amino do aminoácido com grupo R₁, atua como um nucleófito, "roubando" o hidrogênio do grupo α -carboxila do aminoácido com grupo R₂, formando assim uma ligação peptídica e gerando um dipeptídeo.

Para compreender a estrutura das proteínas, tem-se que conhecer seu arranjo estrutural, ou seja, sua conformação (qualquer estado natural que ela assume sem quebra de ligação covalente). Uma proteína possui várias conformações possíveis, dependendo de qual estado estrutural esteja, ela desempenha papéis bem distintos. Este estado natural é estabilizado na maioria das vezes por interações fracas, elas também são responsáveis pelo enovelamento (ou dobramento) das cadeias polipeptídicas em suas estruturas de maiores graus de liberdade.⁴⁶ Uma observação importante a se fazer é que as proteínas passam a realizar suas funções biológicas somente após dobrarem e/ou se enrolarem em uma forma tridimensional específica.

Portanto, para diferenciar se é uma enzima ou uma proteína estrutural, se é um anticorpo ou um hormônio, se faz necessário estudar a sua estrutura. Essa estrutura pode ser separada em quatro grupos, estrutura primária, secundária, terciária e quaternária.

4.2.1. Estrutura Primária

A estrutura mais simples de uma proteína é uma sequência de resíduos de aminoácidos. O que diferencia uma estrutura primária da outra é o número de aminoácidos que ela possui e a ordem que estes estão ligados.⁴⁸ Pode-se pensar que o número de proteínas seja limitado, pois a única coisa que as diferenciam na sua estrutura primária é o número de aminoácidos e a sua sequência nas ligações covalente, mas não se deixe enganar, ao considerar uma proteína pequena, que tenha cerca de 100 resíduos, é possível ter cerca de 10^{130} sequências de aminoácidos diferentes. Isto é maior que o número total de partículas que se acredita ter no universo.⁵¹

A sequência dos aminoácidos em uma proteína é de suma importância, a alteração desta gera proteínas com funções completamente diferentes dentro do organismo, proteínas com sequências diferentes tem estruturas tridimensionais distintas.⁴⁷ Por outro lado, observa-se que proteínas com que possuem funcionalidades similares possuem sequências bem semelhantes.

Pode-se definir a estrutura de uma cadeia de peptídeos, como sendo uma sucessão de planos rígidos, o C_α é o ponto de ligação e rotação destes planos, como visto na Figura 15. As ligações covalentes limitam essa torção em dois ângulos possíveis, o ϕ (phi) e ψ (psi). O ângulo ϕ é a rotação que ocorre na ligação $N - C_\alpha$ e o ângulo ψ é a torção que sucede na ligação $C_\alpha - C$, esses valores variam de 180° quando os peptídeos estão todos no mesmo plano, a -180° quando esses planos estão invertidos.⁴⁹

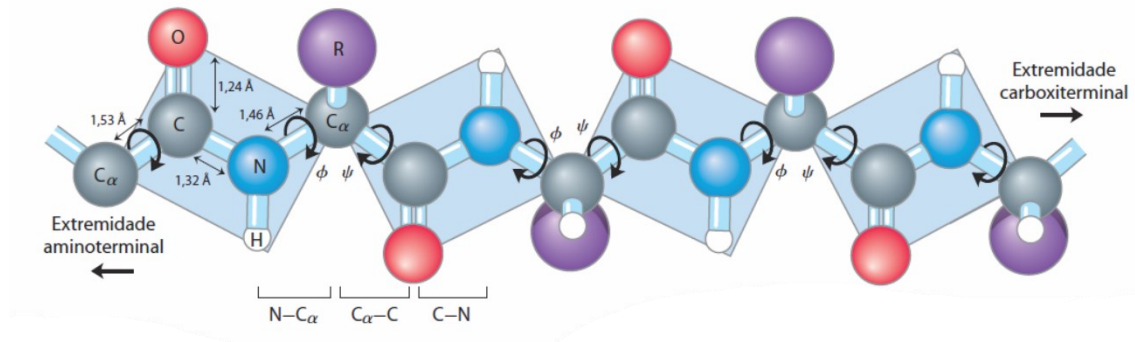


Figura 15 - Representação de uma estrutura primária, definindo para cada peptídeo um plano "rígido", o qual a cadeia polipeptídica só pode torcer nas suas extremidades. Adaptada da referência [53].

4.2.2. Estrutura Secundária

Uma estrutura regular e repetitiva de um polipeptídeo é chamada de estrutura secundária, ela retrata o arranjo espacial dos seus átomos da cadeia principal, não levando em consideração a posição das cadeias laterais e a sua dependência com os outros elementos. Existem vários tipos de estruturas secundárias, as mais conhecidas são as estruturas secundárias comuns, ou seja, estruturas cujos os ângulos dos diedros ϕ e ψ permaneçam constante ou variem muito pouco durante toda a proteína. Exemplos dessas estruturas são a hélice α (em inglês " α -helix") e a folha β (em inglês " β -sheet").⁴⁷

4.2.2.1. Hélice α

Como o próprio nome já revela a hélice α é uma estrutura helicoidal, é o arranjo mais simples que uma sequência de aminoácidos pode assumir que maximize o uso de ligações de hidrogênio internas⁵². Nesse tipo de estrutura a cadeia polipeptídica vai se enrolando em torno de um cilindro fictício, por exemplo, um cano de PVC, os grupos R dos aminoácidos ficam para o lado de fora da espiral, como visto na Figura 16.a. Os

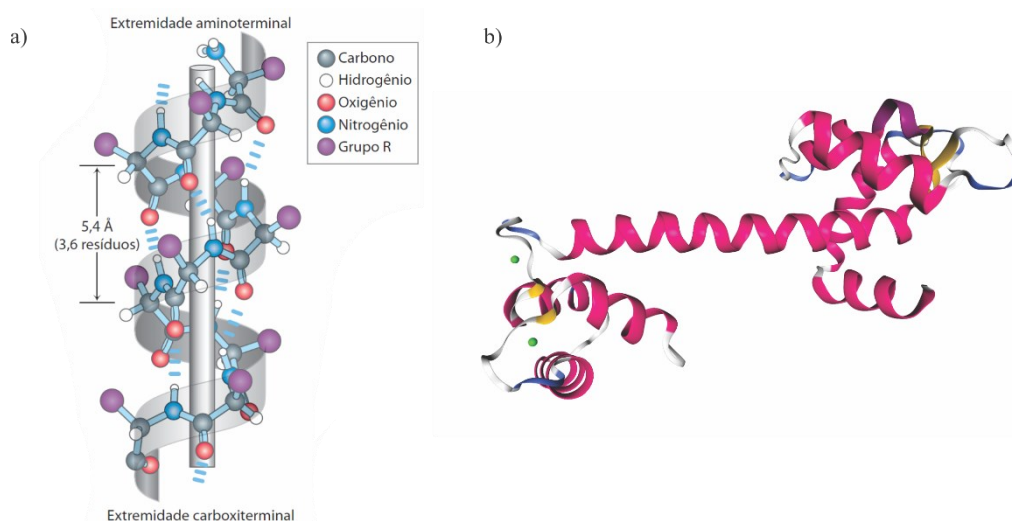


Figura 16 - a) Estrutura da cadeia polipeptídica em formato de hélice. Adaptada da referência [53]. b) Estrutura refinada da troponina do frango (PDB ID: 4TNC).

valores dos ângulos dos diedros ϕ e ψ para este tipo de estrutura são -57° e -47° , respectivamente. As hélices podem ser formadas torcendo para a direita ou para a esquerda, estudos mostraram que a forma mais comum entre as proteínas é a voltada para a direita, para a esquerda são teoricamente menos estáveis e não foram observadas em proteínas.⁵³ Cada volta desta torção tem cerca de 3,6 resíduos de aminoácidos e um comprimento de $5,4 \times 10^{-10}m$ ao longo do eixo. Podemos observar a estrutura da troponina de frango, na Figura 16.b, que possuiu uma estrutura helicoidal.⁵⁴

4.2.2.2. **Folha β**

A estrutura em folha β é bem comum nas proteínas⁵⁵ e diferentemente da hélice α , na conformação β os esqueletos dos átomos estão estendidos em forma de ziguezague, ou seja, em um resíduo de aminoácido a sua cadeia lateral está pra cima e no subsequente a cadeia lateral está pra baixo, como se observa na Figura 17.a. As folhas betas podem se separar em dois grupos, as que possuem a conformação antiparalela (Figura 17.b) na qual os ângulos dos diedros ϕ e ψ são -139° e $+135^\circ$, respectivamente e as que possuem a conformação paralela (Figura 17.c), para qual o valor do ângulo ϕ é -119° e ψ é $+113^\circ$. Essas duas estruturas são bem semelhantes, apesar de verificarmos que os ângulos dos diedros e o seu comprimento de repetição sejam levemente diferentes (no caso da antiparalela é $7 \times 10^{-10}m$ e da paralela $6,5 \times 10^{-10}m$).

Na Figura 17.d está representada uma proteína predominantemente folha β , é a microglobulina bovina beta 2,⁵⁴ para exemplificar a importância de se estudar este tipo de estrutura tão comumente encontrada nas proteínas.

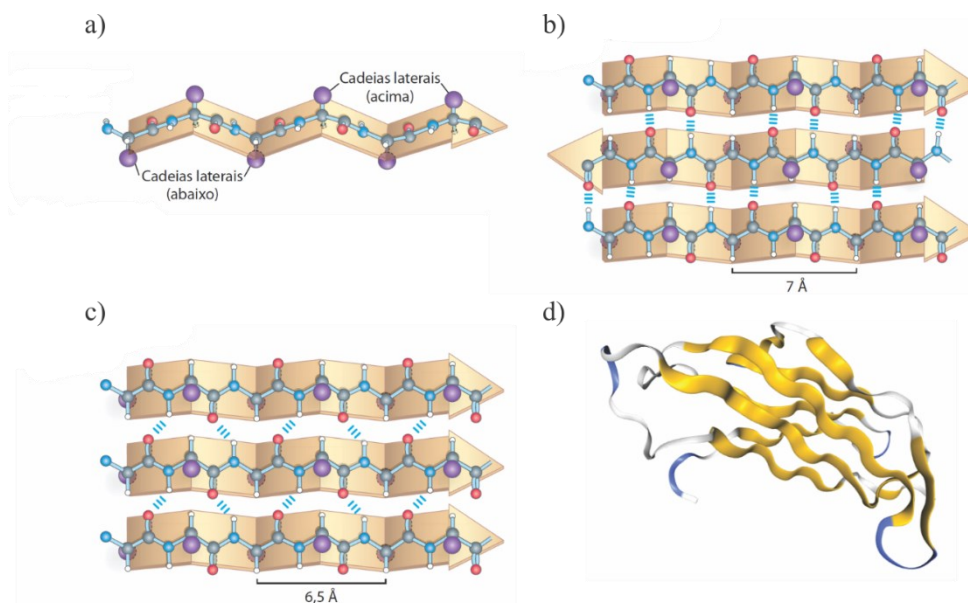


Figura 17 – a) Esqueleto de uma conformação folha β ; b) Conformação folha β antiparalela; c) Conformação folha β paralela. Adaptada da referência [53] e d) estrutura da microglobulina bovina beta 2 (PDB ID: 1BMG).

Se o ambiente em que a proteína se encontra é alterado, por exemplo variando o pH que a rodeia, estas estruturas sofrem variações e tem-se na literatura algumas técnicas capazes de estudar essas estruturas secundárias entre as quais o dicroísmo circular (CD) e a atividade óptica Raman (ROA).

4.2.2.3. Dicroísmo circular no estudo de estruturas secundárias de proteínas

Diferenças entre as absorções de luz circularmente a esquerda e à direita vem da falta de simetria estrutural das moléculas, essa diferença pode ser medida e é chamada de dicroísmo circular (CD).⁵⁶ Nas proteínas o cromóforo é a ligação peptídica e a sua região de absorção é no ultravioleta (190 a 250 nm). Um espectro de absorção de uma proteína pode apresentar picos negativos e positivos, devido a sua estrutura ordenada, observe a Figura 18 a qual é plotada um espectro de absorção das principais conformações das proteínas. As hélices α e as folhas β tem espectros de CD característicos.⁵⁷ Com o espectro de CD, pode-se determinar se as proteínas estão dobradas corretamente, estimar a fração da proteína que assume qualquer uma das duas estruturas secundárias comuns e monitorar as transições entre estados dobrados e não dobrados.

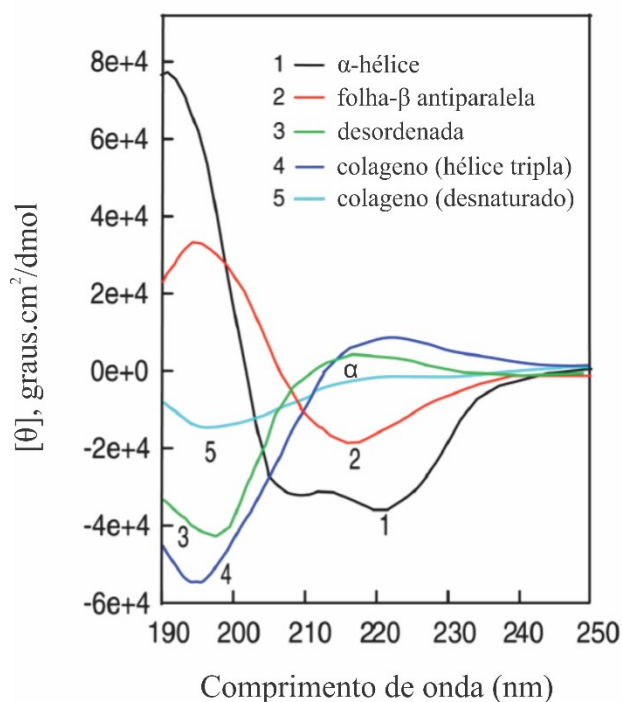


Figura 18 - Espectro de dicroísmo circular (CD) de proteínas e polipeptídeos com suas estruturas secundárias representadas. Espectros CD da poli-L-lisina em pH 11.1 em 1 (preto) na conformação α -hélice e 2 (vermelho) na conformação folhas- β antiparalelas, em pH 5.7 na 3 (verde) se encontra com conformações estendidas (desordenadas), colágeno placentário em 4 (azul) na conformação hélice tripla e em 5 (ciano) formas desnaturadas. Adaptada da referência [61].

Através da análise dos espectros de dicroísmo circular é possível fazer a predição quantitativa da estrutura secundária das proteínas. É sabido que um espectro CD pode ser expresso como a combinação de espectros individuais das estruturas secundárias.⁵⁸ Através de *softwares* computacionais, o espectro CD é fragmentado em vários espectros individuais de estruturas secundárias, estes são comparados com um conjunto (set) de modelos, já caracterizados. Em 1994 Sreerama e Woody, comparam três métodos computacionais para determinar as frações de estruturas secundárias, o SELCON, CONTIN e o VARSLC, que se tornaram os principais métodos para este tipo de análise.⁵⁹ Em 2014 Campana e colaboradores reestruturaram e atualizaram o pacote de softwares de deconvolução⁶⁰ proposto por Sreerana e Woody, sendo agora possível utiliza-los em computadores com plataforma Windows. Este pacote recebe o nome de CD-ProWin7 e está disponível para baixar de forma gratuita no Portal Aprender Ciência, do grupo BMESpec no endereço: <http://www.each.usp.br/aprender-ciencia/formulario.php>. Acessado 13 de janeiro de 2020.

O CD-ProWin7 é composto por três *softwares*, SELCONWin7, CDSSTRWin7 e CONTINLLWin7. O SELCON (em tradução livre, Método Auto Consistente) baseia-se no método do valor singular da decomposição do CD, o espectro experimental é transformado em uma matriz que é adicionada como novas linhas à matriz que contém as estruturas secundárias de referência (base). O CDSSTR é uma modificação do método VARSLC (*Variable Selection*), sendo assim, ele utiliza todas as possíveis combinações de um número fixo de proteínas definido. Por este motivo ele é o mais preciso dos métodos, mas é o que utiliza mais tempo de máquina para ser executado. O CONTIN/LL tem a proposta de resolver equações integrais e sistemas lineares algébricos.

4.2.2.4. Atividade Óptica Raman

Outra técnica que tem um potencial enorme para a determinação de estruturas proteicas é a atividade óptica raman⁴⁵. Está é a única técnica capaz de distinguir entre hélice α hidratadas e desidratadas⁶¹. Derivada da espectroscopia Raman, que estuda o fenômeno físico de espalhamento da luz, a ROA analisa a diferença da luz espalhada pela amostra ao excitá-la com luz circularmente polarizada à esquerda depois circularmente polarizada a à direita.² Como todos os aminoácidos possuem um centro quiral essa diferença apresenta um sinal. Um espectro ROA é plotado por variação da intensidade Raman pela energia, que está em centímetros a menos um (cm^{-1}), como pode ser

observado na Figura 19. Analogamente a um espectro Raman, cada pico do espectro ROA é relacionado a um modo de vibração de uma região da amostra.

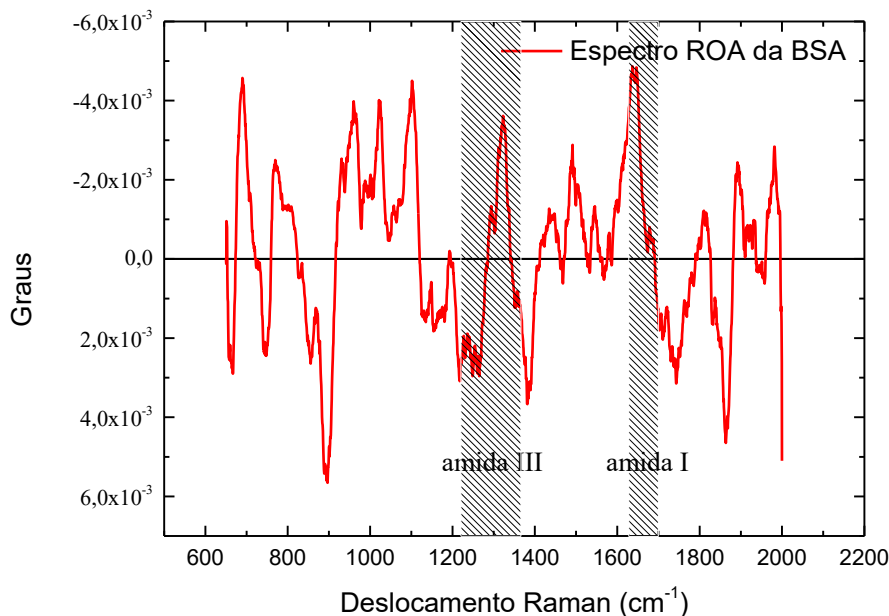


Figura 19 - Espectro ROA da BSA. Amostra em pH 7 e na temperatura ambiente. Medida realizada no laboratório do GEM.

As maiores características associadas à estruturas secundárias das proteínas aparecem na região amida I $\sim 1630 - 1700 \text{ cm}^{-1}$ atribuída principalmente ao estiramento $C = O$ e na extensa região amida III $\sim 1230 - 1350 \text{ cm}^{-1}$ onde os picos são relacionados as combinações em fase da deformação no plano $N - H$ com o estiramento $C - H$ junto com das deformações $C_{\alpha} - H$. E todas essas características da estrutura tridimensional das proteínas, incluindo as fracas banda relacionadas as cadeias laterais, podem ser vistas pelo espectro ROA.⁶² A Tabela 3 abaixo mostras a posição das bandas Raman, sinal da variação ROA e as assinaturas da BSA em pH7.

Tabela 3 - Posição das bandas Raman, sinal da variação ROA e as assinaturas da BSA em solução tampão pH7.⁴

Comprimento de onda (cm^{-1})	Sinal	Assinatura (probabilidade)
870-950	+	Hélice α
1000-1050	+	Folha β -(Em formato hélice)
1080-1130	-/+	Hélice α
1215-1225	-	Folha β
1238-1250	-	Folha β
1265-1295	+	Loops e voltas

1295-1312	+	Hélice α hidrofóbica
1338-1346	+	Hélice α hidratada
1340-1380	-	Folha β
1400-1480	Padrões complexos	Cadeias laterais (aromáticos em baixa, alifáticos em alta cm^{-1})
1530-1580	+/-	Cadeias laterais de triptofano
1600-1630	Vários padrões	Cadeias laterais aromáticas
1630-1665	-/+	Hélice α
1645-1680	-/+	β - folha
1670-1685	+	Desordenado (PPII)

4.2.3. Estrutura Terciária

Quando a estrutura proteica é muito grande, estruturas secundárias começam a se dobrarem e interagirem uma com as outras, gerando assim uma estrutura tridimensional.⁴⁶ A estrutura terciária é a estrutura tridimensional da cadeia polipeptídica. As estruturas terciárias se desdobram em dois grupos, a fibrosa e a globular.⁴⁶

As proteínas fibrosas, utilizadas principalmente para funções estruturais, são formadas por elementos de estrutura secundária que se repetem. As proteínas globulares têm estruturas terciárias mais complicadas, geralmente contendo diversos tipos de estruturas secundárias na mesma cadeia polipeptídica.⁴⁷ A primeira estrutura de proteína globular a ser determinada foi a estrutura da mioglobina⁴⁹ exemplificada na Figura 20.⁵⁴

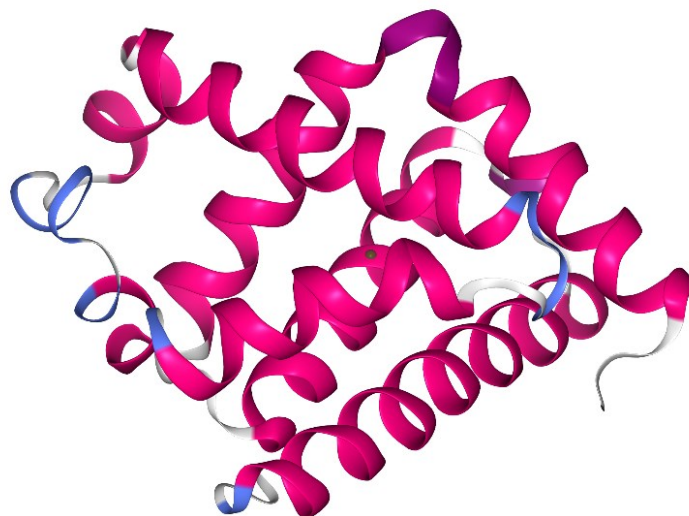


Figura 20 - Estrutura da mioglobina de cachalote (PDB ID: 1MBO).

4.2.4. Estrutura Quaternária

Algumas proteínas passam a apresentar repetição das suas unidades, essa unidade é chamada de protômero. Estruturas quaternárias são formadas por multicamadas de protômeros, algumas dessas proteínas apresentam segmentos desordenados, necessitando de estruturas definidas.⁴⁸ Essas proteínas têm composições distintas de aminoácidos que permitem uma estrutura mais flexível. Proteínas com este tipo de estrutura tem aplicações distintas no organismo, as desordenadas tem a finalidade estrutural, outras com alguma organização podem interagir com algumas proteínas e servir como inibidores de alguma reação ou como componentes centrais de redes de interação de proteínas.⁴⁸ Um exemplo deste tipo de estrutura é a desóxi-hemoglobina, como pode ser observado na Figura 21,⁵⁴ abaixo.

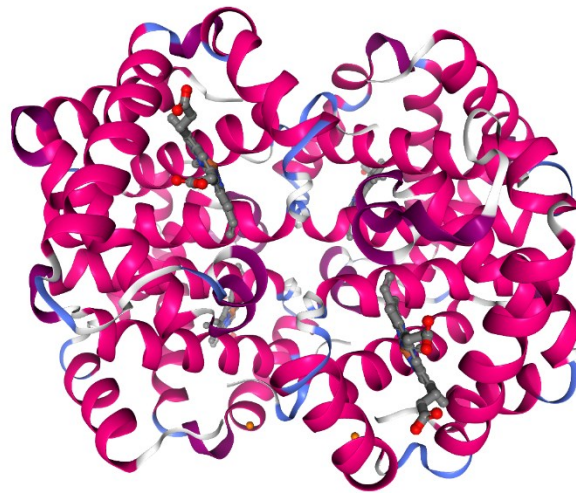


Figura 21 - Estrutura da desóxi-hemoglobina (PDB ID: 2HHB).

4.2.5. Biblioteca de Proteínas

Em um intervalo de dois anos, as quantidades de estruturas tridimensionais proteicas dobraram, hoje em dia são dezenas de milhares. Para organizar esse volume gigantesco de informações, um banco de dados de proteínas foi criado, o “*Protein Data Bank*” (PDB; www.pdb.org).

O PDB é uma biblioteca virtual que reuni todas as estruturas tridimensionais de proteínas (na verdade qualquer macromolécula descoberta está presente neste banco de dados, por exemplo, RNA e DNA). Para organização deste banco de dados todas as proteínas recebem um código de quatro letras (PBD ID), esta sequência de letras é a carteira de identidade da estrutura, sendo único para cada uma. Por ele os pesquisadores podem investigar e analisar uma estrutura descoberta por um outro cientista.

O banco de dados é aberto ao público, necessitando apenas de um computador e de um acesso à internet, qualquer pessoa é capaz de explorar uma proteína, tanto na parte de coordenadas atômicas quanto na visualização da estrutura em uma imagem em três dimensões (3D).

4.3. Relevância da BSA e dos aminoácidos

Como já discutido anteriormente os aminoácidos e as proteínas desempenham papéis essenciais para a manutenção da vida, será explanado agora mais detalhadamente algumas das características das quais levaram ao estudo destas moléculas.

4.3.1. Albumina do Soro Bovino (BSA)

A albumina soro bovina (BSA) faz parte de uma numerosa família de proteínas, as albuminas, que são responsáveis pelo transporte de moléculas insolúveis nos mamíferos, com isso, desempenha o papel de reguladora da pressão osmótica do sangue.⁶³ Por ser muito abundante no organismo, constitui 60% do plasma sanguíneo,⁶⁴ e ter uma inquestionável importância as albuminas são exaustivamente estudadas. A BSA apresenta características muito parecidas à albumina do soro humano (HSA), sendo considerada uma proteína modelo da HSA por serem da mesma família ambas apresentam uma estrutura predominantemente hélice e tem uma um formato bem característico que lembra um coração (*heart shape*) como pode ser visto na Figura 22.^{54,65}

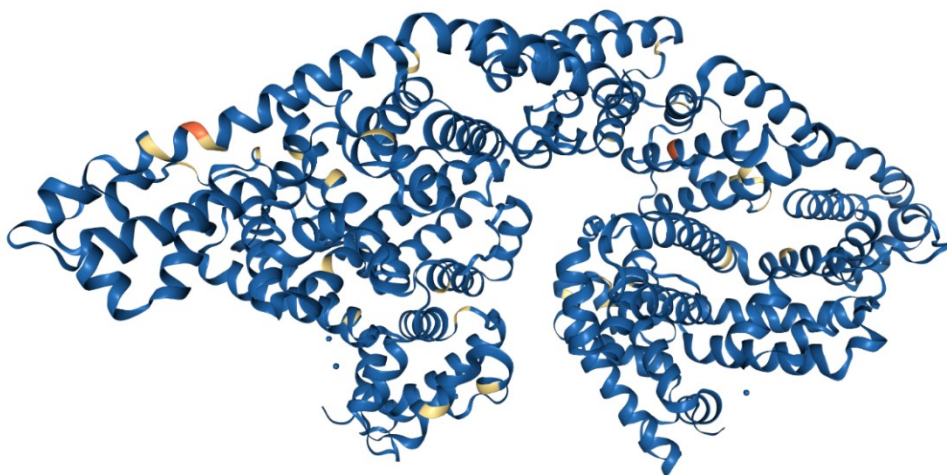


Figura 22 - Proteína Albumina do Soro Bovino (BSA - PDB: 3v03). Proteína organizada majoritariamente em hélices (em azul), em formato de coração representada em dímero.

Por ser alvo de muitas pesquisas, suas características estão bem fundamentadas, se tornando uma excelente amostra modelo para a técnica ERS. O próprio Prof. Dr.

Laurence Barron, descobridor do fenômeno ROA, já publicou vários artigos sobre ela.⁶² Outro fator predominante é o seu valor comparado com outras proteínas, por exemplo, a BSA é cerca de cinquenta vezes mais barata do que a HSA (preços pesquisados no site da Sigma-Algrich® em 21/05/2019).

4.3.1.1. Forma isoméricas da Albumina

Um estudo feito por Foster em 1977 revelou uma relação entre as formas isoméricas da proteína BSA com a variação do pH.⁶⁶ Em resumo, ele definiu cinco formas que a proteína albumina de soro bovino poderia se encontrar de acordo com o pH do meio em que ela estaria inserido. Quando ela se encontra em pH fisiológico é chamada de normal (N), quando o pH fica ácido abaixo de pH 4,3, a BSA passa para uma forma rápida (F, do inglês *fast*), pois neste ambiente as moléculas de BSA se move mais rapidamente na eletroforese em gel.⁶⁶ Abaixo de pH 2,7 ela passa a sua forma expandida (E), pois a molécula de albumina fica totalmente desenrolada dentro dos limites de suas ligações dissulfeto.⁶⁶ No lado básico ocorrem mais duas isomerizações sutis, a primeira é denominada de transição neutra para gerar a forma básica (B), essa transformação ocorre em pH 8. A última forma é a idosa (A vem do inglês *aged*), recebe este nome pois depois da mudança de forma que ocorre em pH 10, a molécula de BSA tem uma taxa lenta de migração na eletroforese em gel. O resumo das relações das formas isoméricas da albumina está resumido na Figura 23 abaixo.

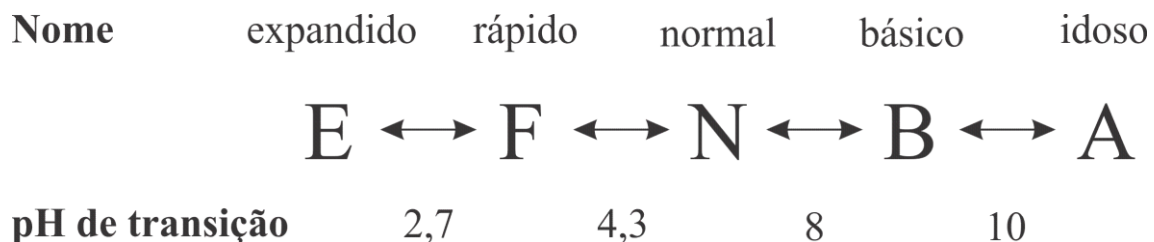


Figura 23 - Relação das formas isoméricas da BSA baseada no trabalho de Foster (1977).

4.3.2. Aminoácidos

Como descrito no texto anteriormente, os aminoácidos são a base para todas as proteínas, são essenciais para a existência da vida na Terra. Por tal importância são amplamente estudados na literatura.⁶⁷ Em todos os aminoácidos comuns, salvo a glicina, o carbono α está ligado a quatro grupos distintos, com isso, é um centro quiral. Toda molécula quiral apresenta atividade óptica e atividade óptica Raman, portanto, os aminoácidos são ótimas moléculas modelos para a técnica ERS. A seguir tem-se um resumo de cada aminoácido quanto as suas principais funções no corpo humano (limita-se a falar de algumas funções somente, pois cada aminoácido é capaz de desempenhar e

contribuir para inúmeras funcionalidades do corpo humano) e na Figura 24 pode se observar suas disposições estruturais em 3 dimensões com destaque para o carbono quiral (na figura é o elemento da cor amarela). Uma separação muito usual utilizada para os aminoácidos é sobre a capacidade do corpo humano sintetizá-lo ou não, quando o corpo humano é capaz de produzir o aminoácido ele é classificado como não essencial e caso o ser humano não seja capaz de sintetizá-lo é classificado como essencial.⁶⁸

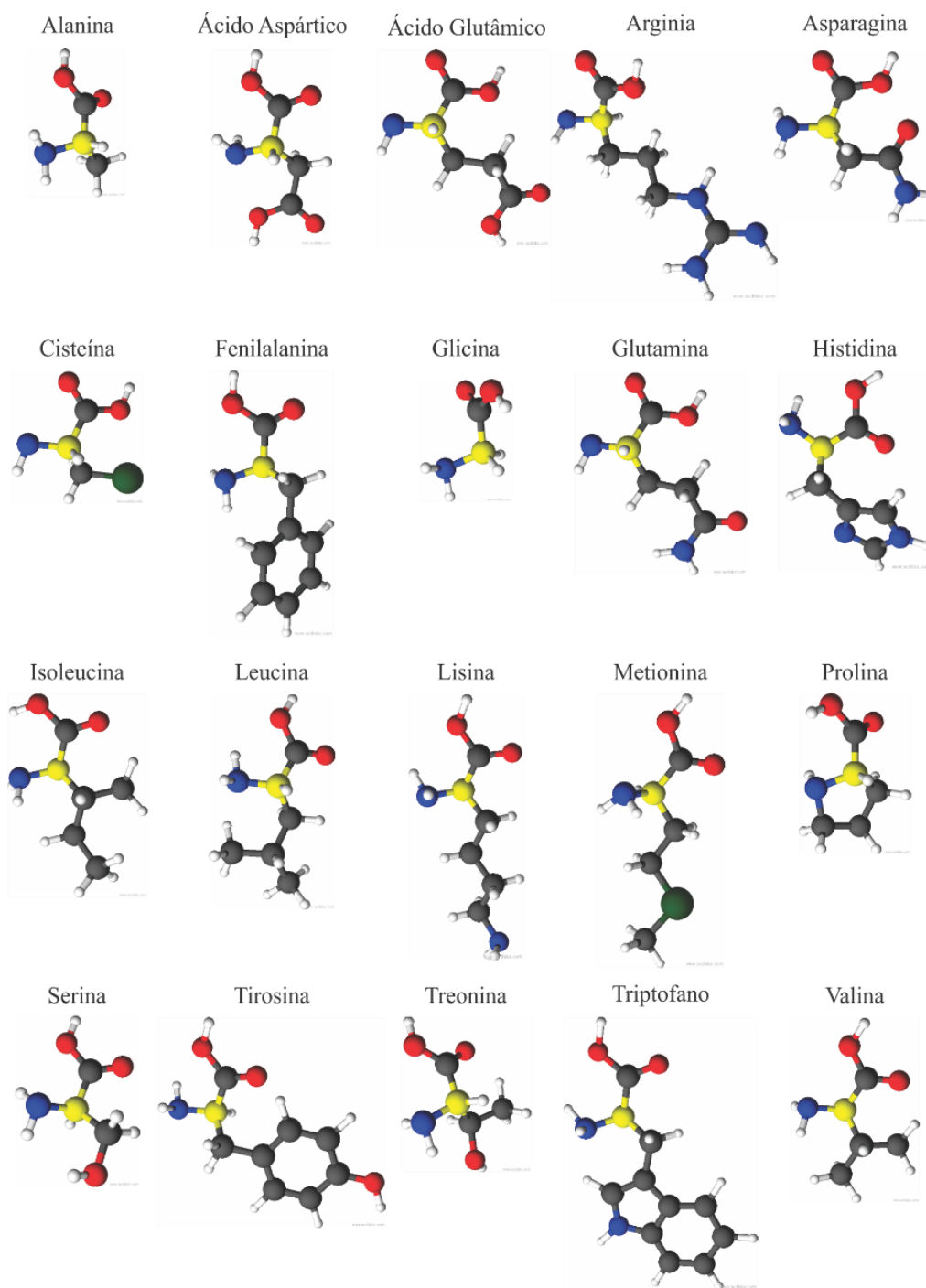


Figura 24 - Estruturas em três dimensões dos 20 aminoácidos comuns. Cada elemento na cadeia estrutural é representado por uma cor, os carbonos quirais estão em amarelo, os oxigênios em vermelho, os hidrogênios na cor branca, o enxofre na cor verde, os carbonos não quirais na cor cinza e os nitrogênios na cor azul.

4.3.2.1. Alanina

A alanina foi sintetizada em 1850 por Adolph Strecker, antes mesmo de ser descoberta sua existência nas proteínas, isso ocorreu mais de 25 anos depois. Em resumo, seu principal papel no corpo humano é converter açúcar simples (glicose) em energia e eliminar toxinas do fígado.⁶⁹

4.3.2.2. Ácido Aspártico

O ácido aspártico foi descoberto em 1868 e é considerado um aminoácido não essencial, mas desempenha um papel importante na síntese de outros aminoácidos e nos ciclos do ácido cítrico e da ureia. Asparagina, arginina e metionina isoleucina são sintetizados a partir dele.⁷⁰

4.3.2.3. Ácido Glutâmico

O ácido glutâmico é um dos aminoácidos essenciais mais comuns. Foi isolado primeiramente pelo químico alemão Karl Ritthausen. Ele é um neurotransmissor excitatório que aumenta o disparo de neurônios no sistema nervoso central.⁷⁰

4.3.2.4. Arginina

A arginina foi descoberta pelo químico suíço Ernst Schulze em 1886 e é classificado como um aminoácido semi-essencial, ou seja, o corpo humano pode sintetizá-lo em algumas condições de saúde, mas em outras não. Ela desempenha um papel essencial no sistema imunológico, ajudando a curar feridas e na liberação de hormônios.⁷¹

4.3.2.5. Asparagina

A asparagina foi o primeiro aminoácido isolado de sua fonte natural. Os responsáveis foram os dois químicos franceses, o Louis-Nicolas Vauquelin e o Pierre Jean Rabiquet. A asparagina é responsável pela síntese de várias proteínas, mais especificamente as do sistema nervoso.⁷⁰

4.3.2.6. Cisteína

A cisteína também é considerada como um aminoácido não essencial para os humanos e junto com a metionina são os únicos aminoácidos a apresentarem enxofre na sua composição. Ela desempenha um papel importantíssimo na síntese proteica, desintoxicação e diversas funções metabólicas.⁷⁰

4.3.2.7. Fenilalanina

A fenilalanina foi encontrada em 1879 por Schulze e Barbieri. É um aminoácido essencial e é o precursor da tirosina, a qual é precursora da adrenalina. A adrenalina pode ser convertida em noradrenalina, responsável por promover o alerta mental e a memória.^{70,72}

4.3.2.8. Glicina

Foi descoberta em 1820 pelo botânico francês Henri Braconnot. É um aminoácido não essencial e é indispensável para um sistema digestivo saudável, pois ajuda a regular a síntese ácido biliar utilizado para digerir as gorduras.⁷⁰

4.3.2.9. Glutamina

Os químicos alemães Ernest Schulze e E. Bosshard foram os primeiros a isolar a glutamina, em 1883. É o aminoácido mais comum no sangue humano e uma componente chave das proteínas. É classificada como aminoácido semi-essencial, ou seja, o corpo humano pode sintetizá-lo em algumas condições de saúde, mas em outras não.⁷⁰

4.3.2.10. Histidina

Um fato curioso ocorreu na descoberta da histidina em 1896, dois alemães, o Albrecht Kossel e o Sven Hedin, a descobriram ao mesmo tempo e de forma independente. Ela é um aminoácido semi-essencial, pois gestantes e indivíduos com uremia (distúrbio renal) produzem este aminoácido. A histidina é fundamental para a regulação de elementos essenciais para o corpo humano, como o ferro, cobre, molibdênio, zinco e manganês.⁷⁰

4.3.2.11. Isoleucina

A isoleucina foi descoberta em 1904 pelo químico alemão Felix Ehrlich. Ela é um aminoácido essencial que é encontrado em várias proteínas. Sua principal função no corpo humano é aumentar os níveis de energia e ajudar o corpo a se recuperar de atividades físicas extenuantes.⁷⁰

4.3.2.12. Leucina

A leucina foi descoberta em 1819 em sua forma impura no queijo e somente dois anos depois na sua forma cristalina. É um aminoácido essencial e é considerado vital para as sínteses proteicas e desempenha diversas funções metabólicas.⁷⁰

4.3.2.13. Lisina

O químico alemão Heinrich Drechsel descobriu a lisina em 1889. Ela é um aminoácido essencial e desempenha um papel importante na absorção de cálcio e na construção das proteínas musculares.⁷⁰

4.3.2.14. Metionina

Foi descoberta por J. H. Muller, um pesquisador da Universidade de Columbia em Nova York, em 1922. É um aminoácido essencial com a função de intermediário na biossíntese de diferentes fotolipídeos.⁷⁰

4.3.2.15. Prolina

Foi descoberta por Richard Willstatter, um químico orgânico alemão, em 1900. A prolina é considerada um aminoácido não essencial, ela é essencial para o funcionamento das articulações e tendões, pois é um componente essencial do colágeno.⁷³

4.3.2.16. Serina

A serina foi um dos primeiros aminoácidos a serem descobertos por Cramer em 1865 em contradição a isso ela é um dos mais difíceis de se obter a partir de proteínas. Ela é obtida a partir de outro aminoácido, a glicina, com isso ela é um aminoácido não essencial. A serina desempenha um papel importante em várias vias biosintéticas, portanto, é essencial para o funcionamento do cérebro e do sistema nervoso central.⁷⁰

4.3.2.17. Tirosina

Foi encontrada pela primeira vez pelo químico alemão Justus von Liebig em 1846. É um aminoácido não essencial que auxilia os neurotransmissores no cérebro.⁷⁰

4.3.2.18. Treonina

Foi o último aminoácido a ser descoberto, foi encontrado em 1935 por William Cumming Rose. Este aminoácido ajuda o sistema imunológico humano na produção de anticorpos. É um aminoácido essencial.⁷⁰

4.3.2.19. Triptofano

É um aminoácido aromático e foi descoberto em 1901 por Frederick Hopkins. Está classificado como essencial e é crucial para a composição dos “blocos de construção” de inúmeras biomoléculas, como enzimas, proteínas estruturais, serotonina, melatonina e neurotransmissores.⁷⁰

4.3.2.20. Valina

Emil Fisher foi o primeiro a isolar a valina em 1901. É um aminoácido essencial importante para o sistema nervoso e o funcionamento cognitivo, além de prevenir a ruptura do músculo em uma atividade física, pois fornece glicose extra para a produção de energia.⁷⁰

*CAPÍTULO 5 - POLI (METIL
METACRILATO) – PMMA*

5. *POLI (METIL METACRILATO) – PMMA*

O poli (metil metacrilato) ou como é conhecido mundialmente PMMA é um polímero sintético do monômero metil metacrilato (MMA), conforme ilustrado na Figura 25. Foi descoberto no século passado, nos anos 30 pelos químicos britânicos Rowland Hill e John Crawford e sendo aplicado pela primeira vez em 1934 pelo químico alemão Otto Rohm.¹⁰ O PMMA é um polímero opticamente transparente na região do visível e é amplamente utilizado como substituto do vidro, pois apresenta alta resistência ao impacto, é leve, mais resistente à quebra e possui condições de processamentos favoráveis.¹¹ Tudo isso resulta em um material muito resistente as intempéries e arranhões. A presença do grupo metil (CH_3) no ramo lateral da estrutura do polímero evita que este se rearranje na forma cristalina e que gire livremente em torno das ligações C-C.¹² O PMMA é um polímero amorfo. A sua primeira grande aplicação foi durante a Segunda Guerra Mundial, quando o PMMA era utilizado como janelas das aeronaves.

O PMMA é um polímero consolidado para aplicações em diversas áreas como, óptica, pneumática, sensores, separação analítica, dispositivos condutores, entre outras inúmeras funcionalidades.¹³⁻¹⁷ A Figura 25 mostra a estrutura química do monômero (esquerda) e do polímero (direita).

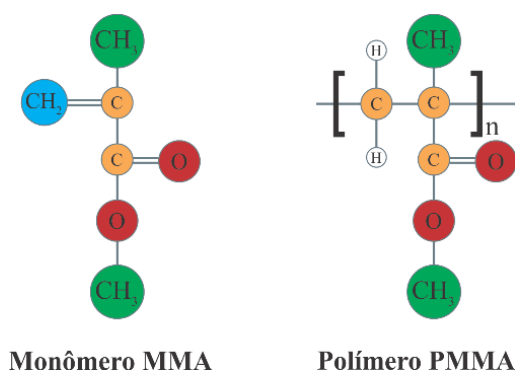


Figura 25 - Estruturas químicas do monômero MMA e do polímero PMMA.

5.1. Propriedades

Do ponto de vista da química, elementos, compostos, moléculas e macromoléculas possuem algumas qualidades que comprovam sua existência como entidades para cientistas. Exemplos de tais qualidades são cor, odor, textura, ponto de ebulição, ponto de fusão, densidade, cristalinidade, elasticidade entre outras, dependendo da substância em questão. Isto é o que os cientistas chamam de propriedades físicas de

uma substância ou material. No entanto, algumas características físicas e químicas dessas substâncias podem ser alteradas, modificadas ou permanentemente alteradas para outra forma, com a intenção de produzir uma nova substância com novas qualidades. Com o PMMA não é diferente, abaixo será explanada sucintamente suas propriedades físicas e químicas.

5.1.1. Propriedades físicas

O PMMA é um polímero amorfo que pertence à família dos acrilatos. É um polímero límpido e incolor com uma faixa de temperatura de transição vítrea (T_g) que varia de 100°C a 130°C e uma densidade de 1,2 g/cm³ a temperatura ambiente. Este polímero funde à 130°C e possui um padrão de retração linear de 0,003 a 0,0065 cm².⁷⁴⁻

76

O PMMA está entre os polímeros que possuem alta resistência à exposição solar, pois possui uma pequena variação sob o efeito da radiação UV. Tem uma ótima estabilidade térmica suportando temperaturas tão altas quanto 100°C e baixíssimas como -70°C. Ele também possui excelentes propriedades ópticas como índice de refração de 1,490 e um bom grau de compatibilidade com o tecido humano.^{74,75}

No campo da resistência mecânica, o PMMA possui um alto módulo de Young – um parâmetro mecânico que proporciona uma medida da rigidez de um material sólido – e um baixo alongamento à ruptura – está relacionado com a capacidade que uma amostra de plástico tem de resistir a mudanças de forma sem rachar, por isso é um dos polímeros de engenharia mais duros e com alta resistência a arranhões. Ele possui uma resistência aceitável a produtos químicos, entretanto, tem baixa resistência a hidrocarbonetos clorados e aromáticos, ésteres ou cetonas.^{74,75}

A taticidade é a estereoquímica relativa dos centros quirais adjacentes dentro de um polímero, especialmente polímeros vinílicos. As propriedades físicas de um polímero, como temperatura de transição vítrea (T_g), solubilidade, cristalinidade e hidrólise, dependem não apenas do tipo de monômero que o contém, mas também das estruturas secundárias e terciárias, ou seja, da estereoquímica da ligação.⁷⁷⁻⁸¹ Baseado nesses fatos o PMMA pode ser isotático, sindiotático ou atático, como pode ser observado na Figura 26, abaixo.

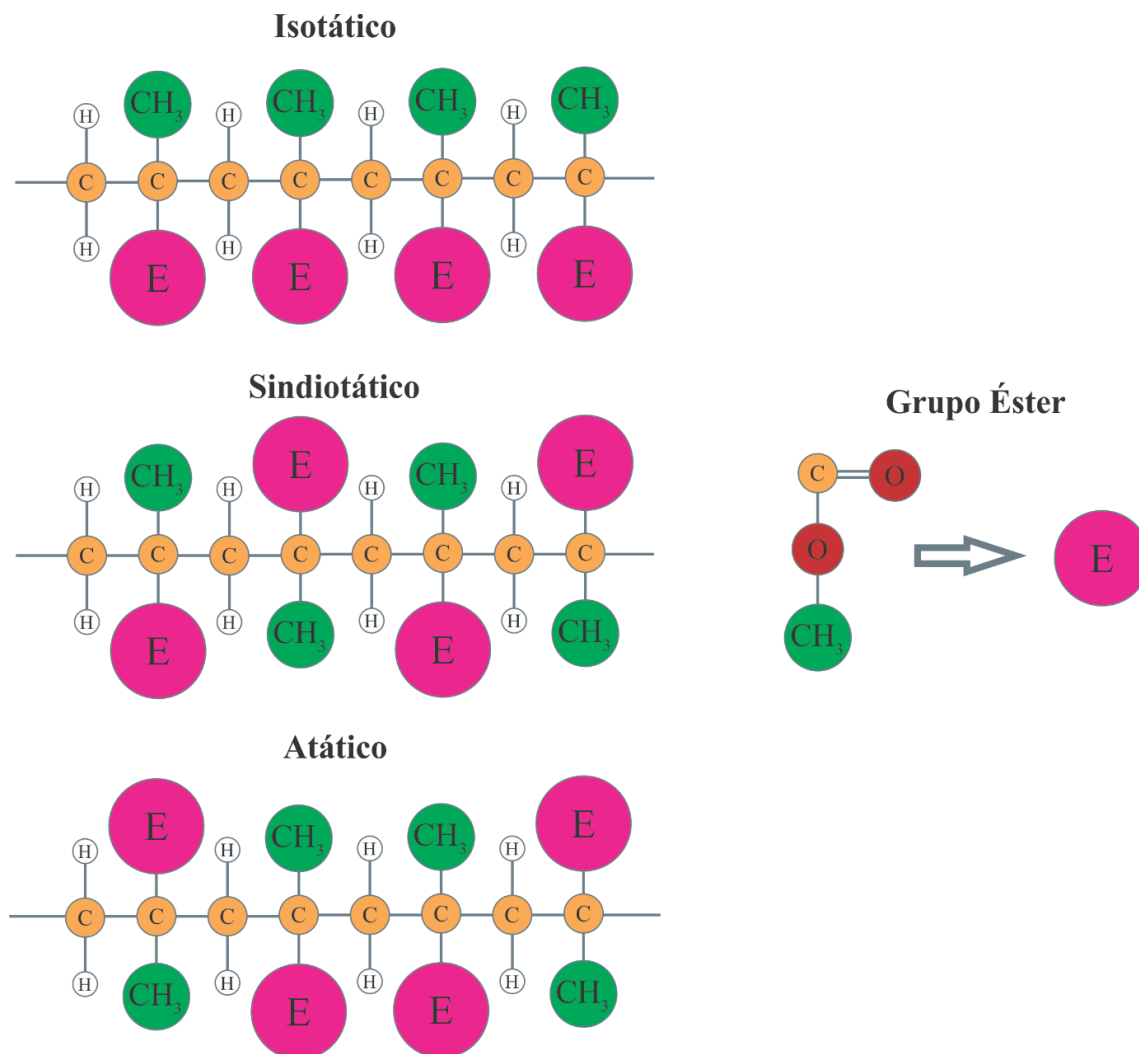


Figura 26 - Taticidade do PMMA: isotático, sindiotático e atático. O grupo éster do PMMA foi simplificado para o melhor entendimento da configuração.

5.1.1.1. Isotático

Isotático é quando os grupos laterais dos monômeros se distribuem igualmente de um lado só da cadeia principal, veja a Figura 26.⁸⁰

5.1.1.2. Sindiotático

Sindiotático é quando os grupos laterais dos monômeros estão dispostos de forma alternada, um para um lado o outro para o outro, observe a Figura 26.⁸⁰

5.1.1.3. Atático

Atático é quando os grupos laterais dos monômeros estão dispostos de forma randômica, como pode ser visto na Figura 26.⁸¹

A natureza amorfa do PMMA é governada por sua taticidade na seguinte ordem: sindiotática > atática > isotática. A T_g vai em ordem decrescente: $130^{\circ}\text{C} > 120^{\circ}\text{C} > 55^{\circ}\text{C}$, respectivamente.⁷⁸

Portanto, as propriedades físicas de qualquer substância são um guia simples que revela os potenciais das substâncias para suas aplicações, devido as propriedades do PMMA ele pode ser utilizado na área da ciência e tecnologia, tais como síntese, medicina, óptica, nanotecnologia e muitas outras.

5.1.2. Propriedades químicas

Em geral, a solubilidade é a capacidade de um soluto (sólido, líquido ou gás) se dissolver em um solvente (líquido ou gás) para formar uma solução homogênea (mistura) do soluto com o solvente. Basicamente, a solubilidade de uma substância depende das propriedades físicas e químicas do soluto e do solvente, bem como da temperatura.

Considerando moléculas inorgânicas simples, por exemplo, os sais, sua solubilidade é mais rápida devido a reação de solvólise pelo solvente nos íons do soluto, porque eles são principalmente de natureza iônica. Por outro lado, em compostos orgânicos o soluto se dissolverá melhor em solventes que tenham uma estrutura química semelhante a ele. Nesta situação, a capacidade de solvatação do solvente depende principalmente da sua polaridade.⁸²

O PMMA é um polímero sintético orgânico, portanto, espera-se que a polaridade exerça um papel fundamental na sua solubilidade. Realmente a polarização do solvente é essencial para a solubilização do PMMA por completo, mas ela ocorre um pouco diferente do que é comumente visto, primeiramente o PMMA incha com o solvente, depois há a formação de uma camada fina sobre a superfície de contato entre ele e o solvente, então em seguida ocorre a difusão do solvente no polímero, formando assim uma solução homogênea. Isto é a explicação do porquê o PMMA leva alguns minutos para solubilizar por completo mesmo no seu melhor solvente. Observe a Tabela 4 abaixo a qual está listada alguns solventes e a sua capacidade de solubilizar o PMMA.

Os dados da Tabela 4 foram retirados de um estudo realizado por Evchuk e colaboradores sobre a solubilidade do PMMA em solventes orgânicos, no qual ele correlaciona as características físico químicas dos solventes orgânicos com a taxa de dissolução do PMMA. Com isso, diferentemente de estudos anteriores, pode-se agora afirmar que não há correlação direta entre a capacidade de dissolução do PMMA de acordo com a estrutura ou polaridade do solvente. O melhor solvente para o PMMA a temperatura ambiente é o tetrahidrofurano (THF).⁸³

Tabela 4 - Poder de diluição dos solventes no PMMA.

PMMA	
Solvente	20°C, 30 dias
Acetona	Alta diluição
Clorofórmio	Alta diluição
Glicerina	Não dilui
Tetrahidrofurano (THF)	Alta diluição
Terebintina	Baixa diluição
Tolueno	Alta diluição

CAPÍTULO 6 - ESPECTROSCOPIA
RAMAN POR ELIPSOMETRIA

6. *ESPECTROSCOPIA RAMAN POR ELIPSOMETRIA*

Foi desenvolvida no laboratório do Grupo de Espectroscopia de Materiais, uma nova técnica experimental denominada espectroscopia Raman por elipsometria (ERS)⁵, que é a união de duas técnicas já consolidadas, a espectroscopia Raman⁸⁴ e a elipsometria de emissão (EE)^{85,86}. O objetivo é o de estudar a atividade óptica Raman (ROA) de materiais quirais, como visto no artigo “*Ellipsometric Raman Spectroscopy*”, de minha co-autoria sobre a técnica e sua aplicação ao álcool quiral (S)-(-)-1-feniletanol (1-PhEtOH) já bem conhecido na literatura e de um polímero quiral π -conjugado baseado na unidade quiral (1R,2R)-diaminociclohexano, nomeado no artigo e neste texto por SW254.

Neste trabalho, a abrangência da técnica será expandida, ela será aplicada no estudo de diversas moléculas orgânicas. É muito importante frisar a unicidade da nossa técnica em conseguir medir atividade óptica Raman (ROA) na região abaixo dos 600 cm⁻¹, dificuldade citada exaustivamente na literatura⁶² e em uma publicação recente o maior nome da área prof. Dr. Laurence Baron que cita a técnica ERS como uma inovação para se medir o efeito ROA, demonstrando assim a grande aplicabilidade da técnica.⁸⁷

Para a melhor compreensão da técnica ERS este capítulo se dividiu em duas grandes partes, a primeira é um embasamento teórico sobre as técnicas bases para o ERS, a espectroscopia Raman e a elipsometria de emissão (EE), e a segunda uma explanação matemática e física da técnica ERS.

6.1. Espectroscopia Raman

6.1.1. Introdução

A espectroscopia é o ramo da ciência que estuda a interação da radiação eletromagnética com a matéria, sendo um dos seus principais objetivos a determinação dos níveis de energia eletrônica, vibracional e/ou rotacional de moléculas orgânica, inorgânicas e sólidos. Diretamente obtêm-se as diferenças (transições permitidas) entre os estados de energia. No caso de moléculas, a região espectral onde estas transições são observadas depende do tipo de níveis envolvidos: eletrônicos, vibracionais ou rotacionais. Normalmente as transições eletrônicas estão situadas na região do ultravioleta ou visível,

onde as vibracionais estão na região do infravermelho e as rotacionais na região de micro-ondas. As diferentes regiões espectrais exigem espectrômetros com elementos dispersivos e detectores apropriados. Assim, cada tipo de espectroscopia tem uma tecnologia própria.⁸⁸

Desconsiderando a energia devido aos movimentos translacionais, a soma das energias eletrônica (E_{ele}), vibracional (E_{vib}) e rotacional (E_{rot}) é a energia total de uma molécula, por exemplo, sendo a rotacional só existente geralmente na fase gasosa: $E_{tot} = E_{ele} + E_{vib} + E_{rot}$. Como $E_{ele} \gg E_{vib} \gg E_{rot}$ pode-se utilizar a aproximação na qual estes níveis podem ser tratados separadamente, assim cada espectro pode ser analisado independentemente das interações entre eles.⁸⁸

As principais espectroscopias empregadas para detectar vibrações em moléculas são baseadas nos processos de absorção no infravermelho e espalhamento Raman. Elas são amplamente usadas para fornecer informações sobre a estrutura química e a forma física, identificar substâncias a partir dos padrões de espectros característicos, tal como uma impressão digital, e para determinar, quantitativamente ou semi quantitativamente, a quantidade de uma substância numa amostra. Amostras podem ser analisadas em diversos estados físicos da matéria: sólido, líquido ou gasoso, na forma de um corpo maciço, como partículas microscópicas, ou como camadas superficiais.⁸⁹

O espalhamento Raman é um modo indireto de obter os espectros vibracionais, transportando para a região do visível, informações que seriam costumeiramente obtidas no infravermelho. O espalhamento Raman nada mais é que, um espalhamento inelástico de uma radiação eletromagnética monocromática que interage com o alvo. As diferenças entre as frequências das radiações espalhadas e da radiação incidente definem as frequências vibracionais⁸⁸. Como estudaremos ao longo deste capítulo, para um modo vibracional ser ativo é necessário que haja uma variação do momento de dipolo durante essa vibração, no Raman consideramos o momento de dipolo induzido pela radiação eletromagnética, ou seja, deve haver variação da polarizabilidade da molécula durante a vibração.

6.1.2. Vibração de Moléculas

Costuma-se tratar as vibrações moleculares com base na mecânica quântica, mas Edgar Bright Wilson Jr. (1908 – 1992) desenvolveu um método clássico para resolver o problema vibracional para moléculas poliatômicas. Neste capítulo será feita uma revisão dos espectros vibracionais de moléculas diatômicas e poliatômicas. Para uma molécula

não linear com N átomos há $3N-6$ graus de liberdade vibracionais e as equações de movimento teriam $3N-6$ modos vibracionais, tornando a solução do problema extremamente laboriosa para moléculas com número razoavelmente grande de átomos. A situação pode ser contornada utilizando-se propriedades de simetria e teoria de grupo, de modo a simplificar o problema com equações de menor grau, mais fáceis de serem resolvidas em princípio.

6.1.2.1. Moléculas Diatômicas

6.1.2.1.1. Modelo Clássico

Considere que os átomos são massas pontuais ligados por molas com massa desprezível (onde as molas correspondem às ligações químicas) conforme é mostrado na Figura 27.

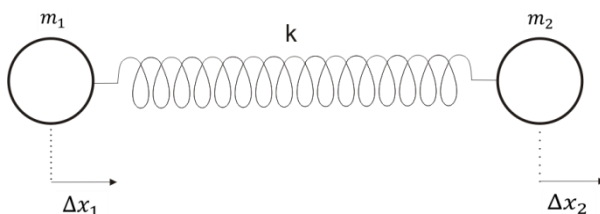


Figura 27 - Modelo de uma molécula diatômica, constituída por duas massas pontuais m_1 e m_2 , ligadas por uma mola de constante de força elástica k .

De acordo com a Figura 27 o modelo é composto por duas massas pontuais m_1 e m_2 , ligadas por uma mola de constante de força elástica k . Observe o pequeno deslocamento dos núcleos (Δx), por isso será utilizado as coordenadas cartesianas de deslocamento, que correspondem as variações das coordenadas cartesianas com o movimento, ou seja, $\Delta x, \Delta y$ e Δz . Desconsiderando o movimento translacional e rotacional, a energia cinética para a molécula diatômica (Figura 27) é:

$$T = \frac{1}{2} m \Delta \dot{x}^2 \quad (6)$$

e a energia potencial:

$$V = \frac{1}{2} k \Delta x^2. \quad (7)$$

A função lagrangeana (L) pode, então, ser calculada como:

$$L = L(x, \dot{x}, t) \rightarrow \frac{d}{dt} \left[\frac{\partial L}{\partial \dot{x}} \right] = \frac{\partial L}{\partial x} \rightarrow \frac{d}{dt} \left[\frac{\partial T}{\partial \Delta \dot{x}} \right] + \frac{\partial V}{\partial \Delta x} = 0 \quad (8)$$

e atribuindo Δx_1 e Δx_2 as coordenadas cartesianas de deslocamento para m_1 e m_2 , respectivamente, tem-se:

$$T = \frac{1}{2} (m_1 \Delta \dot{x}_1^2 + m_2 \Delta \dot{x}_2^2)$$

e

$$V = \frac{1}{2} k (\Delta x_2 - \Delta x_1)^2. \quad (9)$$

Escrevendo a equação de Lagrange (8) para cada partícula:

$$\frac{d}{dt} \left[\frac{\partial T}{\partial \Delta \dot{x}_1} \right] + \frac{\partial V}{\partial \Delta x_1} = 0 \quad (10)$$

e

$$\frac{d}{dt} \left[\frac{\partial T}{\partial \Delta \dot{x}_2} \right] + \frac{\partial V}{\partial \Delta x_2} = 0 \quad (11)$$

Derivando as equações (9) e (10) e substituindo nas equações (11) e (12), respectivamente, obtém-se:

$$m_1 \Delta \ddot{x}_1 - k (\Delta x_2 - \Delta x_1) = 0 \quad (12)$$

e

$$m_2 \Delta \ddot{x}_2 + k (\Delta x_2 - \Delta x_1) = 0 \quad (13)$$

Agora, suponha que as soluções deste sistema de equações diferenciais são:

$$\Delta x_1 = A_1 \cos(2\pi \nu t + \phi) \quad (14)$$

e

$$\Delta x_2 = A_2 \cos(2\pi \nu t + \phi). \quad (15)$$

Derivando as equações (15) e (16), tal que:

$$\Delta \dot{x}_1 = -2\pi\nu A_1 \text{sen}(2\pi\nu t + \phi), \quad (17)$$

$$\Delta \ddot{x}_1 = -4\pi^2\nu^2 A_1 \cos(2\pi\nu t + \phi), \quad (18)$$

$$\Delta \dot{x}_2 = -2\pi\nu A_2 \text{sen}(2\pi\nu t + \phi), \quad (19)$$

$$\Delta \ddot{x}_2 = -4\pi^2\nu^2 A_2 \cos(2\pi\nu t + \phi) \quad (20)$$

e as substituindo nas equações (13) e (14), temos:

$$-4\pi^2\nu^2 m_1 A_1 - k(A_2 - A_1) = 0 \quad (21)$$

e

$$-4\pi^2\nu^2 m_2 A_2 - k(A_2 - A_1) = 0 \quad (22)$$

ou ainda,

$$(-4\pi^2\nu^2 m_1 + k)A_1 - kA_2 = 0 \quad (23)$$

e

$$(-4\pi^2\nu^2 m_2 + k)A_2 - kA_1 = 0 \quad (24)$$

As equações acima são um sistema de equações lineares e homogêneas, pois os termos independentes de todas as equações são nulos. Todo sistema linear e homogêneo admite pelo menos a solução trivial, que é a solução identicamente nula, $A_1 = A_2 = 0$. Usando a regra de Cramer para resolver sistemas de equações lineares, deve-se resolver o seguinte determinante:

$$\begin{vmatrix} -4\pi^2\nu^2 m_1 + k & -k \\ -k & -4\pi^2\nu^2 m_2 + k \end{vmatrix} = 0 \quad (25)$$

tal que:

$$(4\pi^2\nu^2)[4\pi^2\nu^2 m_1 m_2 - (m_1 + m_2)k] = 0. \quad (26)$$

Cujas raízes são:

$$\nu = 0 \quad \text{e} \quad \nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (27)$$

onde $\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}$ é a massa reduzida.

Substituindo os valores de ν [eq. (27)] nas equações (23) e (24), tem-se:

(i) Para $\nu = 0$

$$(-4\pi^2 0^2 m_1 + k)A_1 - kA_2 = 0 \quad (28)$$

$$kA_1 - kA_2 = 0 \quad (29)$$

e, portanto, $A_1 = A_2$. As amplitudes são iguais, considerando as equações (15) e (16) observa-se que $\Delta x_1 = \Delta x_2$, o que significa um movimento de translação.

(ii) Para $\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$

$$\left(-4\pi^2 \left(\frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \right)^2 m_1 + k \right) A_1 - kA_2 = 0 \quad (30)$$

$$-\left(\frac{k}{\mu} \right) (m_1 A_1 + m_2 A_2) = 0 \quad (31)$$

e, portanto, $m_1 A_1 = -m_2 A_2$. Lembrando que as coordenadas cartesianas de deslocamento representam o deslocamento em relação à posição de equilíbrio de cada átomo, isto significa que as partículas se deslocam em direções opostas e com amplitudes inversamente proporcionais às suas massas, ou seja, executam movimento vibracional.

6.1.2.1.2. Espectro Raman para Moléculas Diatômicas

O espectro Raman se deve ao espalhamento inelástico de uma radiação eletromagnética monocromática que interage com uma molécula. No efeito Raman a atividade está ligada ao momento de dipolo induzido na molécula pelo campo elétrico da radiação. Considerando o modelo clássico, pode-se escrever o vetor do momento de dipolo induzido como $\mathbf{P} = \alpha \mathbf{E}$, pois ele oscila com sobreposição de frequências, onde α é a polarizabilidade da molécula e $\mathbf{E}$ o vetor campo elétrico da radiação incidente.

Escrevendo α como uma série da coordenada interna q (única coordenada normal do sistema em estudo):

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{d\alpha}{dq} \right)_0 q + \dots \quad (32)$$

Pressupondo que a coordenada q e o campo $\mathbf{E}$ sejam dados por:

$$q = q_0 \cos(2\pi\nu_V t) \quad e \quad \mathbf{E} = \mathbf{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \quad (33)$$

na qual a frequência vibracional e a da radiação incidente são, respectivamente, ν_V e ν_0 . Assim, o momento de dipolo induzido resulta em:

$$\mathbf{P} = \alpha_0 \mathbf{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \left(\frac{d\alpha}{dq} \right)_0 q_0 \mathbf{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \cos(2\pi\nu_V t) \quad (34)$$

Observe que os termos de ordem mais alta foram desprezados, pois será considerado pequenas variações da coordenada q . Utilizando a identidade trigonométrica $\cos(a) \cdot \cos(b) = \frac{1}{2} [\cos(a+b) + \cos(a-b)]$ e a equação (34) temos:

$$\begin{aligned} \mathbf{P} = & \alpha_0 \mathbf{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \\ & + \frac{1}{2} \left(\frac{d\alpha}{dq} \right)_0 q_0 \mathbf{E}_0 \{ \cos[2\pi(\nu_0 + \nu_V)t] + \cos[2\pi(\nu_0 - \nu_V)t] \} \end{aligned} \quad (35)$$

Agora pode-se analisar a equação (35). O primeiro termo corresponde ao espalhamento Rayleigh, como é um espalhamento elástico não há variação da frequência incidente. No segundo termo têm-se duas radiações espalhadas, uma sendo $\nu_0 - \nu_V$ (espalhamento Raman Stokes) e a outra $\nu_0 + \nu_V$ (espalhamento Raman anti-Stokes). Outro fator importante a ser observado é que para que haja o espalhamento Raman é necessário que $(d\alpha/dq)_0 \neq 0$, ou seja, tem que haver uma variação da polarizabilidade com o pequeno deslocamento da coordenada q em torno da posição de equilíbrio.

Portanto, pode-se imaginar o espectro com os três espalhamentos simetricamente relacionados, em escala de energia em cm^{-1} , a banda do espalhamento Rayleigh no centro, à sua esquerda (frequências mais baixas) a banda do espalhamento Stokes e à direita (frequências mais altas) a banda de espalhamento anti-Stokes. Numa análise clássica, as bandas de espalhamento Stokes e anti-Stokes teriam a mesma intensidade, mas experimentalmente verificou-se que isso não ocorre, onde deve-se considerar o modelo quântico para explicar este comportamento.

Definido a polarizabilidade como:

$$\alpha_{mn} = \int \Psi_m \alpha \Psi_n d\tau \quad (36)$$

onde Ψ_m e Ψ_n são a função de onda final e inicial, respectivamente.

Relacionando as componentes do momento de dipolo induzido e as componentes do campo elétrico:

$$P_x = \alpha_{xx}E_x + \alpha_{xy}E_y + \alpha_{xz}E_z \quad (37)$$

$$P_y = \alpha_{yx}E_x + \alpha_{yy}E_y + \alpha_{yz}E_z \quad (38)$$

$$P_z = \alpha_{zx}E_x + \alpha_{zy}E_y + \alpha_{zz}E_z \quad (39)$$

$\alpha_{xy} = \alpha_{yx}$, $\alpha_{xz} = \alpha_{zx}$ e $\alpha_{yz} = \alpha_{zy}$, pois as componentes α_{ij} , que relaciona os dois vetores, formam um vetor simétrico (pois α é um observável) no efeito Raman.

Devem-se considerar componentes $(\alpha_{ij})_{mn}$ para cada transição entre os estados m e n , onde i e j são as coordenadas x , y ou z . Reescrevendo a equação (36), tem-se:

$$(\alpha_{ij})_{mn} = \int \Psi_m \alpha_{ij} \Psi_n d\tau \quad (40)$$

Se uma das seis integrais acima for diferente de zero, haverá atividade Raman. Substituindo a equação (32) em α_{mn} pode-se escrever

$$\alpha_{mn} = \alpha_0 \int \Psi_m \Psi_n d\tau + \left(\frac{d\alpha}{dq} \right)_0 \int \Psi_m q \Psi_n d\tau \quad (41)$$

A primeira integral do segundo membro é sempre igual à zero, pois os estados Ψ_m e Ψ_n são ortogonais. No espalhamento Raman os estados vibracionais m e n são diferentes, pois se $m = n$ não ocorrerá transição, configurando um dipolo permanente, como visto anteriormente para espalhamento Raman tem que ter um dipolo induzido. Para o segundo termo ser diferente de zero é necessário que sejam satisfeitas duas condições, a primeira é que haja variação da polarizabilidade com a pequena vibração em torno da posição de equilíbrio, ou seja, $(d\alpha/dq)_0 \neq 0$ e a segunda é $\int \Psi_m q \Psi_n d\tau \neq 0$. A integral do produto de duas funções de mesma paridade é não nula e a integral de duas funções de paridades diferentes é nula, como q tem paridade ímpar o produto $\Psi_m \cdot \Psi_n$ deve resultar numa função ímpar, logo Ψ_m e Ψ_n devem ter paridades diferentes.

A intensidade Raman depende do quadrado do momento de transição (probabilidade de transição) e da quarta potência da frequência da radiação espalhada⁸⁸:

$$I_{mn} = \left(\frac{16\pi^2}{9c^2} \right) I_0 \nu^4 \sum_i \sum_j |(\alpha_{ij})_{mn}|^2 \quad (42)$$

sendo ν é a frequência da radiação espalhada e I_0 é a intensidade da radiação incidente. O esquema a seguir representa os mecanismos de espalhamentos.

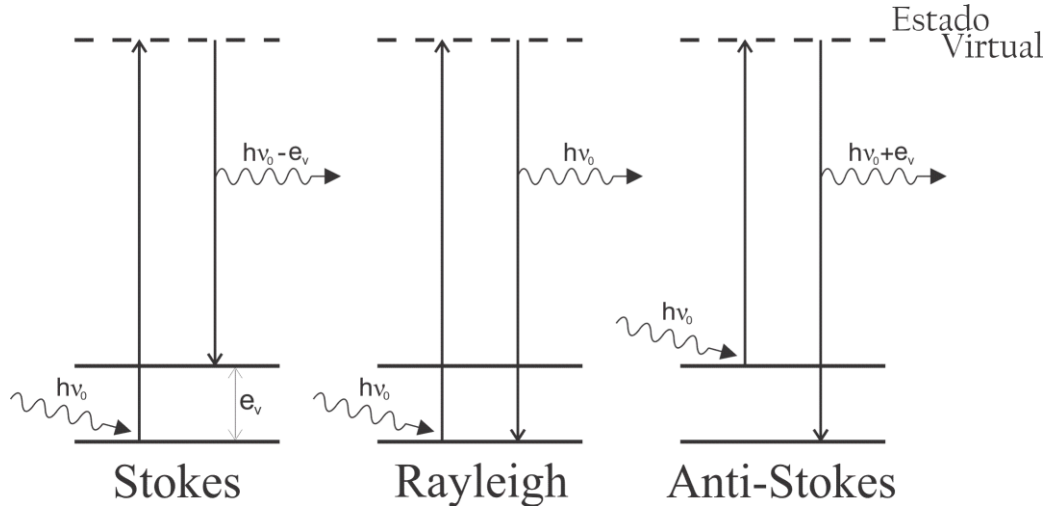


Figura 28 - Diagrama dos mecanismos de espalhamento Raman e Rayleigh, onde ν_0 é a frequência do fóton incidente e e_v é o valor da diferença de energia entre o estado fundamental e o excitado.

Como pode-se visualizar na Figura 28, no espalhamento Raman Stokes um fóton de energia $h\nu_0$ excita uma molécula no estado fundamental e essa passa para um estado intermediário (ou virtual) e em seguida decai para um estado vibracionalmente excitado de energia e_v , emitindo um fóton com energia $h\nu_0 - e_v$. No espalhamento Rayleigh, a molécula, depois de excitada, decai emitindo um fóton idêntico ao incidente, portanto não há alteração na frequência, espalhamento elástico. No espalhamento Raman anti-Stokes, a molécula já se encontra em um estado excitado, após a sua interação com o fóton ela passa para um estado virtual e decai até seu estado fundamental emitindo um fóton com energia $h\nu_0 + e_v$. As bandas Stokes devem ter maior intensidade que as bandas anti-Stokes, pois a população dos estados excitados segue a distribuição de Boltzmann. Isso é verificado experimentalmente e a relação entre as intensidades anti-Stokes (I_A) e Stokes (I_S) pode ser obtida como:

$$\frac{I_A}{I_S} = \left(\frac{\nu_0 + \nu_v}{\nu_0 - \nu_v} \right)^4 \exp\left(-\frac{e_v}{kT}\right) \quad (43)$$

Observe que para frequências vibracionais muito altas torna-se difícil observar as bandas anti-Stokes, as intensidades só são comparáveis às frequências mais baixas.

6.1.2.1.3. Modos normais de vibração

Os átomos podem se movimentar de diferentes formas dentro de uma molécula, entretanto formulações matemáticas das vibrações mostram que há um padrão para determinar as mudanças nas coordenadas, de modo que, pode se classificar os movimentos possíveis dos átomos em $3N - 5$ (para moléculas lineares) e $3N - 6$ (para moléculas não lineares). Tais mudanças de coordenadas são chamadas de modos normais de vibração.⁹⁰

Na espectroscopia Raman vibracional, o fóton incidente transfere parte da sua energia nos modos vibracionais da molécula que o atinge, ou absorve energia de uma vibração que já havia sido excitada, ou simplesmente, a interação da radiação com a matéria induz um dipolo eletromagnético na molécula.⁹¹

O caso mais simples são as moléculas diatômicas (Figura 27), como $N = 2$, onde tais moléculas possuem somente um grau de liberdade vibracional. Considere agora as moléculas poliatômicas, ao analisar o caso de moléculas contendo três átomos, como $N = 3$, estas possuem três graus de liberdade. Além disso, pode-se dividir as moléculas triatômicas em dois grupos, as lineares e as não lineares, que são representadas nesta seção por CO_2 e H_2O , respectivamente, estão ilustradas na Figura 29.⁹¹

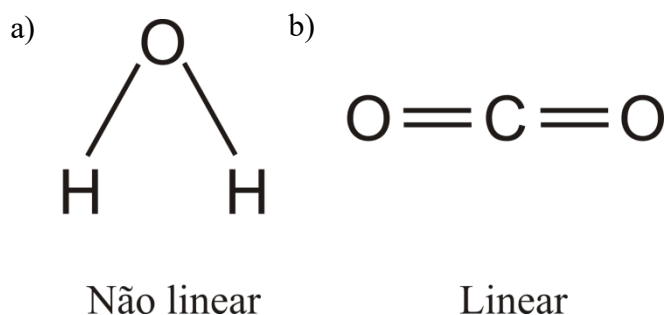


Figura 29 - Ilustração de uma molécula de hidróxido de carbono e de uma molécula de dióxido de carbono, representando moléculas a) não lineares e b) lineares, respectivamente.

A molécula triatômica linear possui somente um modo de vibração o que corresponde a um movimento de estiramento, já a molécula triatômica não linear possui três modos de vibração, dos quais dois condizem a movimentos de estiramento (um simétrico e outro assimétrico) e o outro corresponde ao movimento de flexão. A Figura 30 ilustra os modos de vibração, estiramento simétrico e assimétrico e flexão.

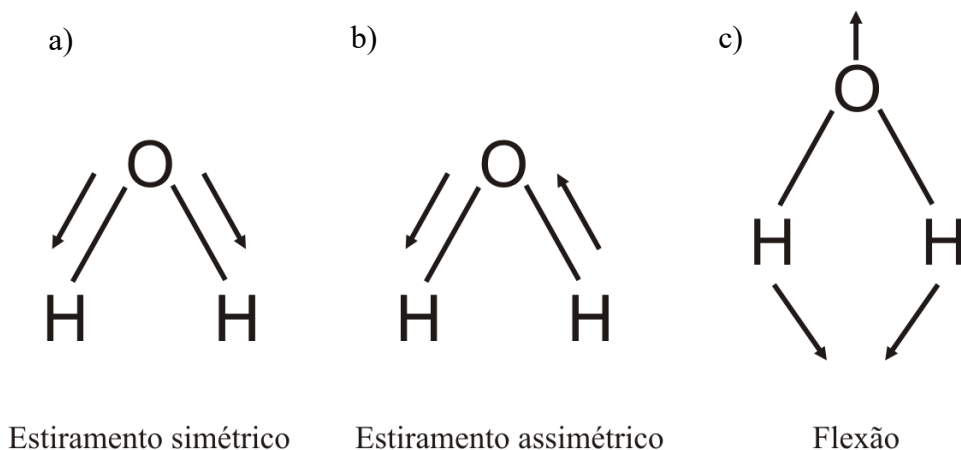


Figura 30 - Modos de vibração, a) estiramento simétrico, b) assimétrico e c) flexão.

Em moléculas poliatômicas com mais de três átomos não se observa mais a molécula como um todo, mas sim os seus grupos funcionais. Além dos modos vibracionais vistos anteriormente, os grupos funcionais podem ter deformações no plano e para fora do plano, como mostrado na Figura 31.⁹¹

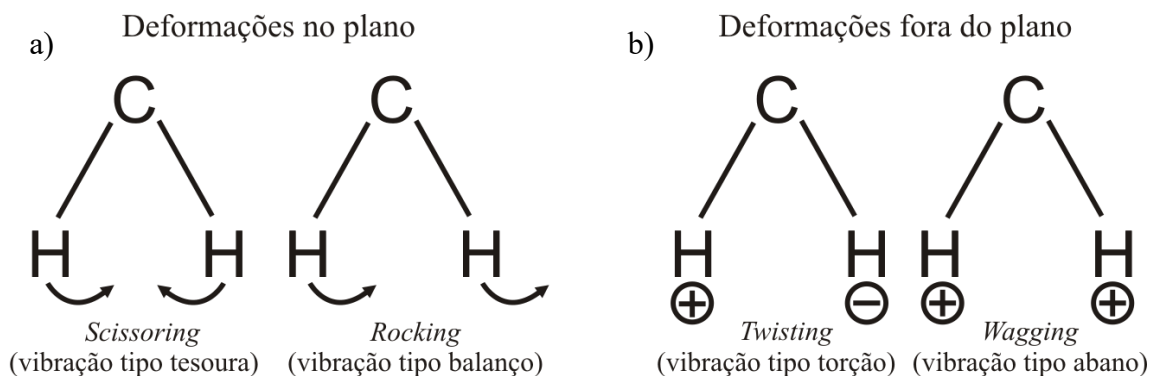


Figura 31 - Modos de vibração, a) deformação no plano e b) fora dele.

Um espectro Raman é uma "impressão digital" da molécula pois cada modo vibracional espalha a luz em um comprimento de onda diferente, formando-se grupos de frequências para cada um deles, sendo assim, cada molécula possui um espectro único característico. Deste modo, a coincidência dos picos do espectro analisado com o de uma substância já conhecida na literatura, permite confirmar a presença de tal substância, por

exemplo. A Tabela 5 mostra os números de onda (ou energia) típicos de alguns tipos de vibrações.⁹²

Tabela 5 - Região de alguns modos vibracionais Raman.

Grupo Funcional	Região (cm ⁻¹)	Modo Vibracional
OH livre	3660 - 3580	Estiramento
-(CH ₂) _n -	1350 - 1275	Deformação fora do plano - Torção
=CHOH	500-440	Deformação CO
-CH ₂ OH	555 - 395	Deformação CO no plano

6.1.2.2. Rotação de moléculas diatômicas

6.1.2.2.1. Modelo do rotor rígido

Suponha um modelo de duas massas pontuais m_i e m_{i+1} unidas rigidamente a uma distância do centro de massa (CM) r_i e r_{i+1} , respectivamente. Considere que o sistema gira ao redor do CM com velocidade angular $\omega = 2\pi\nu_{rot}$.

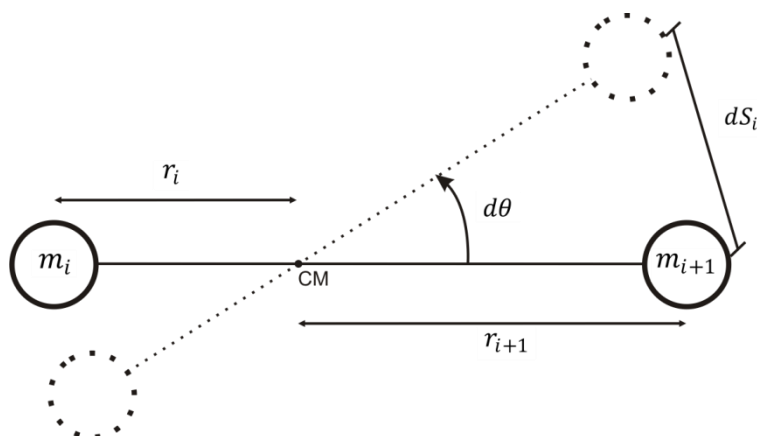


Figura 32 Modelo de duas massas pontuais ligadas rigidamente, em linhas tracejadas têm-se as duas massas girando em torno do seu centro de massa.

Como não há variação da energia potencial, a energia total do sistema é dada somente pela energia cinética, ou seja,

$$E = T = \frac{1}{2}(m_i v_i^2 + m_{i+1} v_{i+1}^2) = \frac{1}{2} \omega^2 (m_i r_i^2 + m_{i+1} r_{i+1}^2) \quad (44)$$

na qual $v_i = \dot{s}_i = r_i \dot{\theta} = r_i \omega$ e $v_{i+1} = r_{i+1} \omega$.

Se o momento de inércia é definido como:

$$I = \sum_i m_i r_i^2 \quad (45)$$

pode-se reescrever a equação (44) como:

$$E = \frac{1}{2} I \omega^2. \quad (46)$$

A origem está no centro de massa, então $m_i r_i = m_{i+1} r_{i+1}$ e como $r = r_i + r_{i+1}$, o que resulta em:

$$r_i = \frac{m_{i+1}}{m_i + m_{i+1}} \cdot r \quad e \quad r_{i+1} = \frac{m_i}{m_i + m_{i+1}} \cdot r \quad (47)$$

Substituindo na expressão do momento de inércia, equação (45):

$$\begin{aligned} I &= m_i r_i^2 + m_{i+1} r_{i+1}^2 = m_i \left(\frac{m_{i+1}}{(m_i + m_{i+1})} \cdot r \right)^2 + m_{i+1} \left(\frac{m_i}{(m_i + m_{i+1})} \cdot r \right)^2 \\ &= \frac{m_i m_{i+1}}{(m_i + m_{i+1})} \cdot r^2 = \mu r^2 \end{aligned} \quad (48)$$

na qual $\mu = m_i m_{i+1} / (m_i + m_{i+1})$ é a massa reduzida do sistema. Portanto, o sistema de duas massas ligadas por um eixo rígido girando em torno do seu centro de massa se resume agora a um sistema de uma massa reduzida (μ) girando a uma distância r do eixo de rotação.

Como classicamente qualquer energia rotacional e qualquer velocidade angular são possíveis e experimentalmente isso não é observado, utilizamos a mecânica quântica para determinar os autovalores da equação de Schrödinger:

$$\nabla^2 \Psi + \frac{2\mu}{\hbar^2} \cdot E \Psi = 0 \quad (49)$$

Entretanto, utiliza-se o modelo clássico da condição de quantização do momento angular, a mesma utilizada por Bohr, com uma pequena correção. Tem-se que a quantização do momento angular é:

$$l = J\hbar, \quad (50)$$

na qual l é o momento angular quantizado, J é um numero quântico rotacional ($J = 0, 1, 2 \dots$) e $\hbar$ é a constante de Planck ($h \approx 6,62 \times 10^{-34} \text{Joule.s}$) dividido por 2π . A correção que será feita difere da quantização do momento angular igual da equação (50), tal que:

$$l = \sqrt{J(J+1)}\hbar, \quad (51)$$

Sendo o momento angular:

$$l = I\omega \quad (52)$$

Igualando as equações (51) e (52) conclui-se que:

$$I\omega = J\hbar = \sqrt{J(J+1)} \frac{h}{2\pi} \quad (53)$$

Voltando a equação (46)

$$E_J = \frac{1}{2} I \omega^2 = \frac{1}{2I} (I\omega)^2 = \frac{\hbar^2}{2I} \cdot \sqrt{J(J+1)}^2 = \frac{h^2}{8\pi^2 I} \cdot J(J+1) \quad (54)$$

que pode ser escrita em unidades de cm^{-1} como:

$$F_J(\text{cm}^{-1}) = \frac{h}{8\pi^2 c I} \cdot J(J+1) = B J(J+1), \quad (55)$$

onde $B = h/8\pi^2 c I$ é chamada de constante rotacional.

Com o valor dos níveis de energia, analisam-se agora as regras de seleção para os espectros no infravermelho e Raman.

6.1.2.3. Espectro no Infravermelho

As funções de onda normalizadas, solução da equação estão escritas abaixo, pode-se perceber que as funções de ondas rotacionais contém o número quântico M (componentes do momento angular na direção do eixo z), além do número quântico rotacional J ; onde $M = J, (J-1), (J-2), \dots, -J$.

Funções de ondas normalizadas, para $J = 0, 1$ e 2 :

$$\begin{aligned} J = 0, \quad M = 0; \quad \Psi_{00} &= \frac{1}{2} \sqrt{\pi} \\ J = 1, \quad M = 0; \quad \Psi_{10} &= \frac{1}{2} \sqrt{\frac{3}{\pi}} \cdot \cos \theta \\ J = 1, \quad M = \pm 1; \quad \Psi_{1\pm 1} &= \frac{1}{2} \sqrt{\frac{3}{2\pi}} \cdot \sin \theta \cdot \exp(\pm i\varphi) \end{aligned} \quad (56)$$

$$J = 2, \quad M = 0; \quad \Psi_{20} = \frac{1}{4} \sqrt{\frac{5}{\pi}} \cdot (3 \cos^2 \theta - 1)$$

$$J = 2, \quad M = \pm 1; \quad \Psi_{2\pm 1} = \frac{1}{2} \sqrt{\frac{15}{2\pi}} \cdot \sin \theta \cos \theta \cdot \exp(\pm i\varphi)$$

$$J = 2, \quad M = \pm 2; \quad \Psi_{2\pm 2} = \frac{1}{4} \sqrt{\frac{15}{2\pi}} \cdot \sin^2 \theta \cdot \exp(\pm 2i\varphi)$$

e estão representadas no diagrama da Figura 33 abaixo.

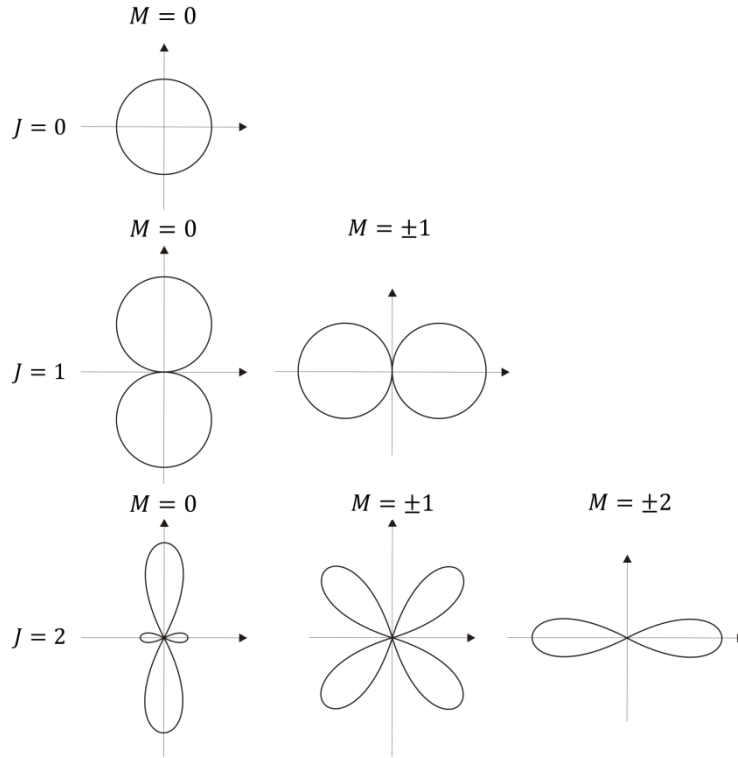


Figura 33 - Representação das funções de ondas rotacionais.

Considere agora os elementos de matriz do momento de transição para determinar as regras de seleção do infravermelho, cujas componentes podem ser escritas como:

$$\begin{aligned} (R_x)_{J'M',J''M''} &= \int \Psi_{J'M'} \mu_{ox} \Psi_{J''M''} d\tau \\ (R_y)_{J'M',J''M''} &= \int \Psi_{J'M'} \mu_{oy} \Psi_{J''M''} d\tau \\ (R_z)_{J'M',J''M''} &= \int \Psi_{J'M'} \mu_{oz} \Psi_{J''M''} d\tau \end{aligned} \quad (57)$$

Define-se μ_{ox} , μ_{oy} e μ_{oz} como as componentes do momento de dipolo permanente. A molécula deve possuir momento de dipolo permanente para que haja atividade no infravermelho, ou seja, μ_o tem que ser diferente de zero.

Analisando as equações (56) e (57) chega-se a regra de seleção para o infravermelho, $\Delta J = \pm 1$, se for diferente a equação (57) zera em qualquer transição permitida. Essa regra de seleção é aplicável a todos os modos normais de vibração. Quando houver campo magnético ou elétrico considere-se também uma regra de seleção para o $\Delta M (= 0, \pm 1)$. Iremos agora apresentar os níveis de energia rotacional e prever os espectros no infravermelho, obviamente para molécula heteronuclear, pois uma molécula diatômica homonuclear não absorve ou emite radiação por causa das transições dos estados vibracionais, por definição elas não apresentam momento de dipolo permanente.

Agora com a regra de seleção para o infravermelho pode-se calcular os níveis de energia utilizando a equação (55)

$$F_{J+1} - F_J = B(J + 1)[(J + 1) + 1] - BJ(J + 1) = 2B(J + 1), \quad (58)$$

Observe que as transições permitidas envolvem diferenças de energia (cm^{-1}) de $2B$ em $2B$, conforme pode ser observado na Figura 34a. Observa-se que de acordo com a Figura 34b o espectro consiste de linhas igualmente espaçadas de $2B$, estando a primeira linha situada em $2B \text{ cm}^{-1}$.

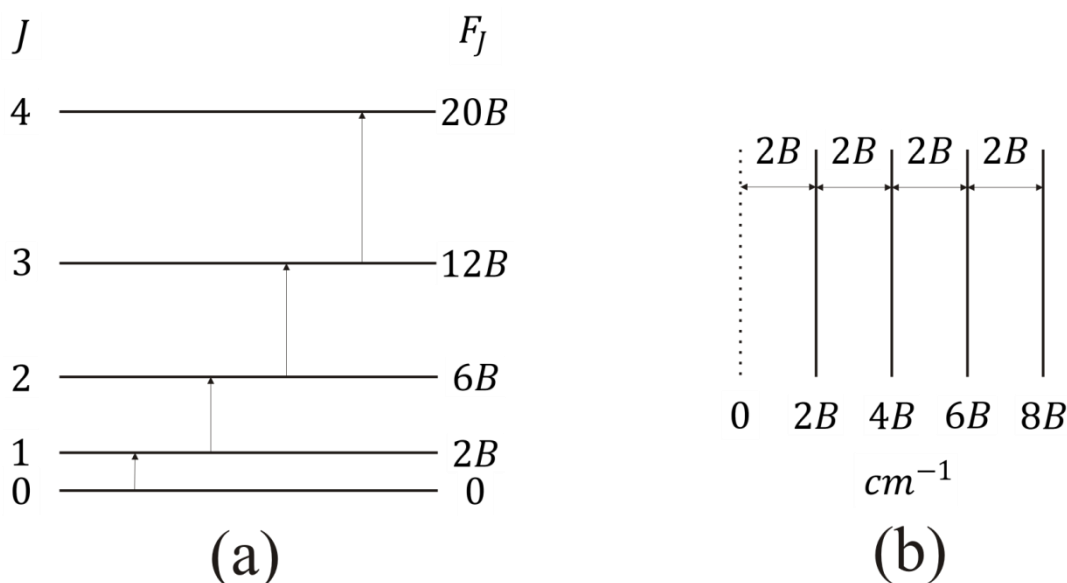


Figura 34 - Representação (a) dos níveis de energia e (b) do espectro no infravermelho.

6.1.2.4. Espectro Raman

O momento dipolo induzido em uma molécula diatômica é dependente da direção do campo elétrico. Durante a vibração da molécula é observada uma variação da polarizabilidade de acordo com a orientação da molécula no campo. Ao se completar uma rotação o dipolo induzido sofre variação duas vezes, pois a polarizabilidade é idêntica nas

direções opostas do campo, ou seja, a frequência de variação da polarizabilidade é o dobro da frequência rotacional, todo este processo pode ser observado na Figura 35, abaixo.

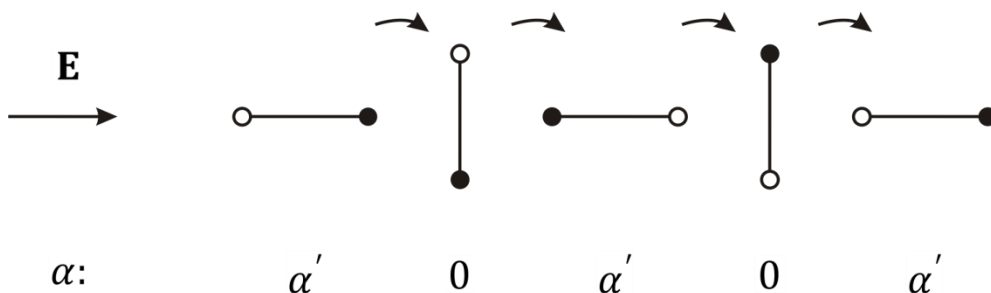


Figura 35 - Rotação completa da molécula, identificando onde há variação da polarizabilidade.

Escrevendo:

$$\alpha = \alpha_0 + \alpha_1 \cos[2\pi(2\nu_r)t] \quad \text{e} \quad \mathbf{E} = \mathbf{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \quad (59)$$

substituindo a equação (59) no momento vetor dipolo induzido, teremos:

$$\begin{aligned} \mathbf{P} = & \alpha_0 \mathbf{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \\ & + \frac{1}{2} \alpha_1 \mathbf{E}_0 \{ \cos[2\pi(\nu_0 + 2\nu_r)t] + \cos[2\pi(\nu_0 - 2\nu_r)t] \} \end{aligned} \quad (60)$$

na qual o primeiro termo corresponde à linha Rayleigh e os outros dois às linhas Stokes e anti-Stokes. Outro fator a ser observado é que o deslocamento da linha Raman, em relação à linha excitante, é o dobro da frequência rotacional.

No Raman as moléculas apresentam momento de dipolo induzido, com isso, podemos observar o espectro rotacional de moléculas diatômicas. A regra de seleção é $\Delta J = 0, \pm 2$ onde $\Delta J = 0$ condiz à radiação Rayleigh, o sinal “+” às linhas Stokes e o sinal “-” às linhas anti-Stokes.

Agora com a regra de seleção para o Raman pode-se calcular os níveis de energia utilizando a equação (55):

$$F_{J+2} - F_J = B(J+2)[(J+2)+1] - BJ(J+1) = 4B(J + \frac{3}{2}), \quad (61)$$

Aplicando os valores de J à equação (61) se obtém, em relação à linha Rayleigh que a primeira transição Raman se encontrará a uma distância $6B \text{ cm}^{-1}$ e as outras linhas estarão igualmente espaçadas, uma da outra, de $4B \text{ cm}^{-1}$; observe a Figura 36 abaixo.

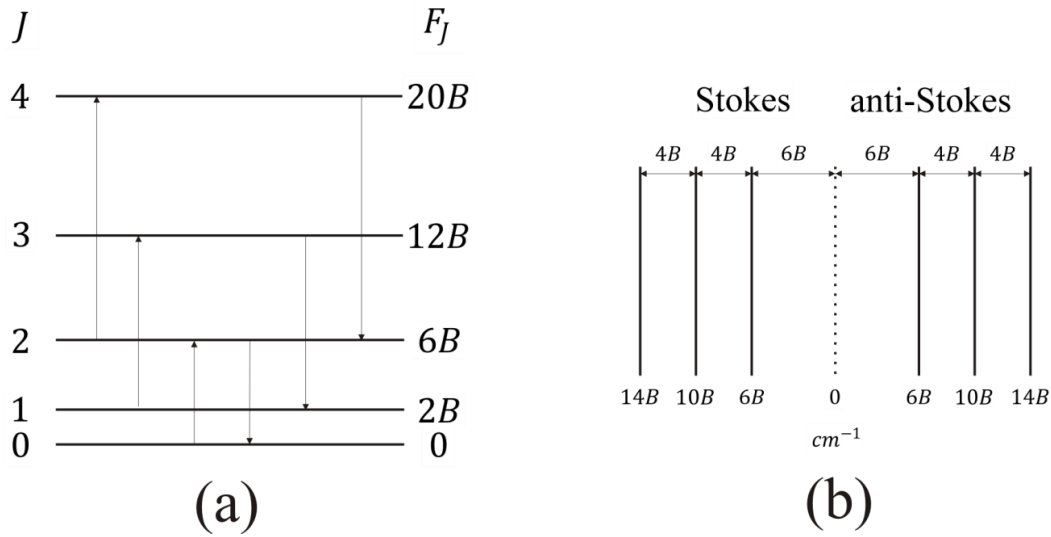


Figura 36 - Representação (a) dos níveis de energia e (b) do espectro no Raman.

Para interpretar corretamente os espectros determinam-se os níveis de energia e transições permitidas, considerando as propriedades de simetria das funções de onda envolvidas. Dada as funções de onda total, na aproximação de Born-Oppenheimer

$$\Psi_T = \Psi_e \cdot \Psi_v \cdot \Psi_r \cdot \Psi_s \quad (62)$$

na qual os índices e, v, r e s caracterizam, respectivamente, as funções de onda eletrônica, vibracional, rotacional e de spin nuclear. Para moléculas diatômicas heteronucleares, podemos desprezar a Ψ_s por ser irrelevante considerar o princípio de Pauli, como consequência todos os níveis rotacionais serão permitidos.

Invertendo-se as coordenadas cartesianas de todas as partículas o hamiltoniano da molécula deve permanecer inalterado e, como a função de onda vibracional (Ψ_v) depende somente do quadrado da distância entre os núcleos, ela pode ser desconsiderada. Para a Ψ_e a rotação só inverte a coordenada na direção do eixo de rotação, podendo ser função par (se Ψ_e permanecer inalterada) ou função ímpar (se Ψ_e trocar de sinal). Portanto, o produto das funções de onda rotacional (Ψ_r) e eletrônica (Ψ_e) determinará o sinal da função de onda total (Ψ_T). Para estados eletrônicos pares, Ψ_T será positiva para J par e negativa para J ímpar. Para estados eletrônicos ímpares, Ψ_T será positiva para J ímpar e negativa para J par, como está resumido na Tabela 6.

Tabela 6 - Quadro explicativo sobre os sinais de Ψ_T .

Ψ_T	Ψ_e		J	
	Par	Ímpar	Par	Ímpar
+	X		X	
		X		X
-	X			X
		X	X	

Com isso pode-se observar que para o infravermelho só serão permitidas as transições entre os níveis positivo e negativo, o que está de acordo com a regra $\Delta J = \pm 1$. No Raman só serão permitidas as transições entre os níveis positivo com positivo e negativo com negativo, que esta de acordo com a regra $\Delta J = 0, \pm 2$.

6.2. Elipsometria

Elipsometria é um método capaz de mensurar os parâmetros de Stokes para uma onda eletromagnética. Os parâmetros de Stokes descrevem o estado de polarização da radiação eletromagnética. Eles foram definidos por Sir George Gabriel Stokes em 1852, que apresentou cálculos que foram capazes de caracterizar qualquer estado de polarização de uma onda eletromagnética através de quatro observáveis descritos na Tabela 7. Abaixo será mostrado de forma simplificada como obter os parâmetros de Stokes experimentalmente.⁹³

Tabela 7 - Parâmetros de Stokes.

Parâmetros de Stokes	O que representam
S_0	Intensidade total da luz
S_1	Quantidade de luz polarizada linearmente na direção horizontal ou vertical
S_2	Quantidade de luz polarizada linearmente rotacionada de $+45^\circ$ ou -45°
S_3	Quantidade de luz polarizada circularmente à direita ou à esquerda

Considere um par de ondas planas e, sem perder generalidade, propagando no eixo z tal que em $z = 0$ são dadas por:

$$E_x(t) = E_{0x}(t) \cos(\omega t + \delta_x(t)) \quad (63)$$

$$E_y(t) = E_{0y}(t) \cos(\omega t + \delta_y(t)) \quad (64)$$

nas quais $E_{0x}(t)$ e $E_{0y}(t)$ são as amplitudes, $\delta_x(t)$ e $\delta_y(t)$ são as diferenças de fase, ω é a frequência angular, t o tempo e os índices x e y representam as direções nos eixos x e y , respectivamente. Considerando as equações (63) e (64) calcula-se:

$$(E_{0x}^2 + E_{0y}^2)^2 - (E_{0x}^2 - E_{0y}^2)^2 - (2E_{0x}^2 E_{0y}^2 \cos \delta)^2 = (2E_{0x}^2 E_{0y}^2 \sin \delta)^2 \quad (65)$$

sendo que $\delta = \delta_y - \delta_x$. A partir da equação (65), Stokes definiu os parâmetros:⁹³

$$S_0 = (E_{0x}^2 + E_{0y}^2) \quad (66)$$

$$S_1 = (E_{0x}^2 - E_{0y}^2) \quad (67)$$

$$S_2 = (2E_{0x}^2 E_{0y}^2 \cos \delta) \quad (68)$$

$$S_3 = (2E_{0x}^2 E_{0y}^2 \sin \delta) \quad (69)$$

Portanto, substituindo estes valores na equação (65), tem-se:

$$S_0^2 \geq S_1^2 + S_2^2 + S_3^2 \quad (70)$$

O sinal de igualdade aplica-se para o caso em que a luz é completamente polarizada e o sinal de desigualdade quando a luz é parcialmente polarizada ou não polarizada.

Considerando a Figura 37, onde é mostrada uma elipse rotacionada representando o caso mais geral de polarização, ou seja, uma luz elipticamente polarizada, pode-se relacionar os parâmetros de Stokes com os parâmetros geométricos da elipse pelas seguintes equações:

$$\tan(2\psi) = \frac{S_2}{S_1} \quad (71)$$

$$\sin(2\chi) = \frac{S_3}{S_0} \quad (72)$$

$$\tan \chi = \pm \frac{b}{a} \quad (73)$$

na qual ψ é o ângulo de orientação e χ é a *elipicidade* da elipse representados na Figura 37, os parâmetros a e b são os eixos da elipse. Adicionalmente, a obtenção dos parâmetros de Stokes permite descrever o grau de polarização P , da luz analisada, que por definição, é dado por

$$P = \frac{I_{pol}}{I_{tot}} = \frac{(S_1^2 + S_2^2 + S_3^2)^{1/2}}{S_0} \quad (74)$$

onde I_{pol} é relacionada às componentes da luz polarizada e I_{tot} é a intensidade total do feixe. O valor $P = 1$ corresponde à luz completamente polarizada, $P = 0$ corresponde à luz não polarizada, e se $0 < P < 1$ corresponde à luz parcialmente polarizada. O grau de polarização P não indica se polarização da luz é linear ou circular, apenas nos mostra o quanto à luz é polarizada.

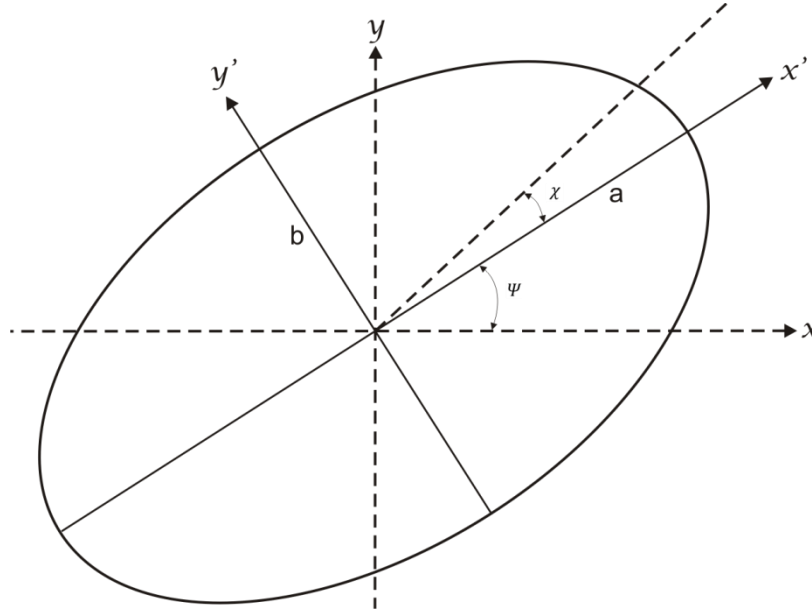


Figura 37 - Representação de uma luz elipticamente polarizada.

Definindo as condições de contorno adequadas para as variáveis δ , E_{0x} e E_{0y} , pode-se encontrar os significados físicos para cada parâmetro de Stokes que estão

descritos na Tabela 7. Eles estão representados na forma matricial, chamada de vetor de Stokes, na Tabela 8.⁹⁴

Tabela 8 - Parâmetros de Stokes na forma vetorial.

Vetor de Stokes	Luz polarizada horizontal ou vertical	Luz polarizada +45° e -45°	Luz circularmente polarizada à direita ou à esquerda
$S = \begin{pmatrix} S_0 \\ S_1 \\ S_2 \\ S_3 \end{pmatrix}$	$S = I_0 \begin{pmatrix} 1 \\ \pm 1 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix}$	$S = I_0 \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \\ \pm 1 \\ 0 \end{pmatrix}$	$S = I_0 \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \\ \pm 1 \end{pmatrix}$

Para a luz linearmente polarizada na horizontal ou vertical, I_0 vale: E_{0x} para luz polarizada horizontalmente e E_{0y} para luz polarizada verticalmente. Nas condições em que a intensidade das componentes é igual e a diferença de fase entre elas vale: $\delta = 0$ ou $\delta = 180^\circ$; gera-se luz polarizada +45° e -45°, respectivamente. No último caso, se as intensidades das componentes são iguais, mas a diferença de fase é de +90° ou -90°, a luz é polarizada circularmente à direita ou à esquerda, respectivamente.

6.2.1. Como determinar experimentalmente os parâmetros de Stokes

A Elipsometria fundamenta-se no fato de que um defasador quarto de onda pode ser utilizado para controlar a elipsidade e a orientação de um feixe de luz. Abaixo segue a configuração experimental para determinar os parâmetros de Stokes por série de Fourier. A Figura 38 ilustra a montagem experimental da técnica de elipsometria.

Com isso é possível, então, modular a intensidade da luz em máximos e mínimos utilizando um quarto de onda e um analisador (polarizador de análise com eixo óptico fixo em uma direção).

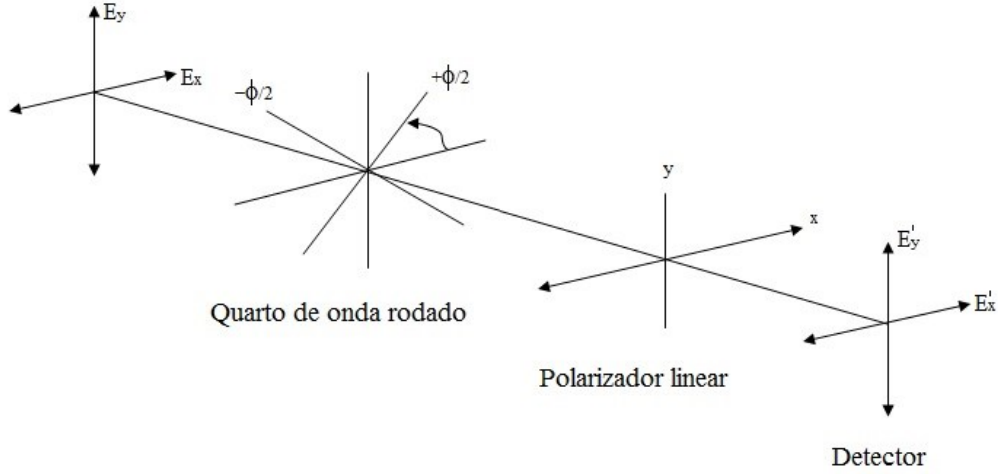


Figura 38 - Configuração experimental da técnica de elipsometria.

Segue abaixo a matriz de Mueller de um quarto de onda:

$$M_c(90^\circ, 2\theta) = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \cos^2 2\theta & \sin 2\theta \cos 2\theta - \sin 2\theta \\ 0 & \sin 2\theta \cos 2\theta & \sin^2 2\theta & \cos 2\theta \\ 0 & \sin 2\theta & -\cos 2\theta & 0 \end{pmatrix} \quad (75)$$

Sendo o vetor de Stokes S do feixe incidente dado por:

$$S = \begin{pmatrix} S_0 \\ S_1 \\ S_2 \\ S_3 \end{pmatrix} \quad (76)$$

Fazendo o produto das equações (75) e (76), tem-se:

$$S' = \begin{pmatrix} S_0 \\ S_1 \cos^2 2\theta + S_2 \sin 2\theta \cos 2\theta - S_3 \sin 2\theta \\ S_1 \sin 2\theta \cos 2\theta + S_2 \sin^2 2\theta + S_3 \cos 2\theta \\ S_1 \sin 2\theta - S_2 \cos 2\theta \end{pmatrix} \quad (77)$$

Considerando a equação (77) e multiplicando pela matriz de Mueller de um polarizador horizontal (não revisada neste trabalho) resulta na seguinte equação:⁹⁴

$$S' = \frac{1}{2} (S_0 + S_1 \cos^2 2\theta + S_2 \sin 2\theta \cos 2\theta - S_3 \sin 2\theta) \begin{pmatrix} 1 \\ 1 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} \quad (78)$$

da equação acima pode-se obter o valor da intensidade em função do ângulo θ :

$$I(\theta) = \frac{1}{2} (S_0 + S_1 \cos^2 2\theta + S_2 \sin 2\theta \cos 2\theta - S_3 \sin 2\theta) \quad (79)$$

com algumas manipulações trigonométricas pode-se reescrever a equação (79) da seguinte forma:

$$I(\theta) = \frac{1}{2} \left(\left(S_0 + \frac{S_1}{2} \right) + \frac{S_1}{2} \cos(4\theta) + \frac{S_2}{2} \sin(4\theta) - S_3 \sin(2\theta) \right) \quad (80)$$

definindo os parâmetros A, B, C e D como:

$$A = \left(S_0 + \frac{S_1}{2} \right) \quad (81)$$

$$B = \frac{S_1}{2} \quad (82)$$

$$C = \frac{S_2}{2} \quad (83)$$

$$D = S_3 \quad (84)$$

Obtém-se a equação fundamental da elipsometria:

$$I(\theta) = \frac{1}{2} (A - B \sin(2\theta) + C \cos(4\theta) + D \sin(4\theta)) \quad (85)$$

é importante ressaltar que os parâmetros A, B, C e D serão calculados de forma única, por se tratar a equação (85) de uma série de Fourier truncada.⁹⁴ Após o cálculo desses parâmetros, é possível determinar os parâmetros de Stokes para o feixe de luz a ser analisado, com o auxílio do conjunto de equações (81), (82), (83) e (84).

6.2.1.1. Propriedades adicionais dos Parâmetros de Stokes

A partir dos parâmetros de Stokes, do ângulo de orientação ψ – equação (71), a *elipcidade* χ – equação (72), razão entre os eixos da elipse a e b – equação (73) e o grau de polarização P – equação (74) da luz analisada, é possível obter o fator de anisotropia linear r e o fator de assimetria g .

6.2.1.1.1. Anisotropia - r

O fator de anisotropia r , convencionalmente, é calculado por:

$$r = \frac{I_{\parallel,\parallel} - GI_{\parallel,\perp}}{I_{\parallel,\parallel} + 2GI_{\parallel,\perp}} \quad (86)$$

onde $I_{\parallel,\parallel}$ é a luz analisada devido a excitação paralela e detectada com o polarizador paralelo à direção paralela e $I_{\parallel,\perp}$ é a luz analisada devido a excitação paralela e detectada com o polarizador perpendicular. Foi adotado o sistema de referência do laboratório onde a direção vertical é a paralela e a direção horizontal é a perpendicular. O fator

$$G = \frac{I_{\perp,\parallel}}{I_{\perp,\perp}} \quad (87)$$

da equação (86), onde $I_{\perp,\parallel}$ é a luz analisada devido a excitação paralela e detectada com o polarizador perpendicular e $I_{\perp,\perp}$ é a luz analisada devido a excitação perpendicular e detectada com o polarizador perpendicular, é o termo de correção devido aos elementos ópticos constituintes na análise das intensidades de luz. Como no caso do ERS o analisador é fixo, não haverá esta necessidade, o que é uma vantagem diminuindo o número de medidas, além de ser obtido diretamente dos parâmetros de Stokes, como segue. Considere então uma luz incidente na amostra linearmente polarizada, a intensidade total será S_0 e a diferença entre as intensidades de luz na vertical e horizontal será dada por S_1 .⁹⁵ Após alguma manipulação algébrica, é facilmente mostrado que:

$$r = \frac{-2 S_1/S_0}{3 + S_1/S_0} \quad (88)$$

Observe que, diferentemente da expressão convencional – equação (86) - que varia de -1 a 1, a nova formulação na equação (88) tem valores de r_{EE} entre -1/2 a 1.

6.2.1.1.2. Assimetria - g

O fator de assimetria g é definido por:

$$g = -2 \frac{I^D - I^E}{I^D + I^E} \quad (89)$$

onde I^D e I^E são as intensidades de luz analisada com excitação de luz circularmente polarizadas à direita (D) e à esquerda (E), que se relaciona com o parâmetro Δ , diferença de luz circular, como $\Delta = -(g/2)$. Entretanto, na nova formulação, este parâmetro será obtido a partir da determinação dos parâmetros de Stokes, equação (79), da luz analisada com excitação polarizada linearmente. Uma vez que podemos decompor uma luz linearmente polarizada como a soma de duas luzes com polarização circular à direita e à esquerda. Assim, o parâmetro de Stokes S_3 representa exatamente a diferença $I^D - I^E$ e

o parâmetro S_0 a soma das intensidades $I^D + I^E$. E, portanto, o parâmetro g será dado por:⁹⁶

$$g = 2 \frac{S_3}{S_0} \quad (90)$$

6.2.1.2. Medida de 9 pontos

Observando a equação fundamental da elipsometria (equação (85)) notamos que ela é constituída de funções senos e cossenos e uma parte constante, como queremos descobrir qual o número mínimo de pontos a serem medidos no experimento de elipsometria, construímos os gráficos das funções $\sin(2\theta)$, $\cos(4\theta)$ e $\sin(4\theta)$ que são os termos presentes na equação fundamental.^{5,97} A Figura 39 apresenta o gráfico dessas funções.

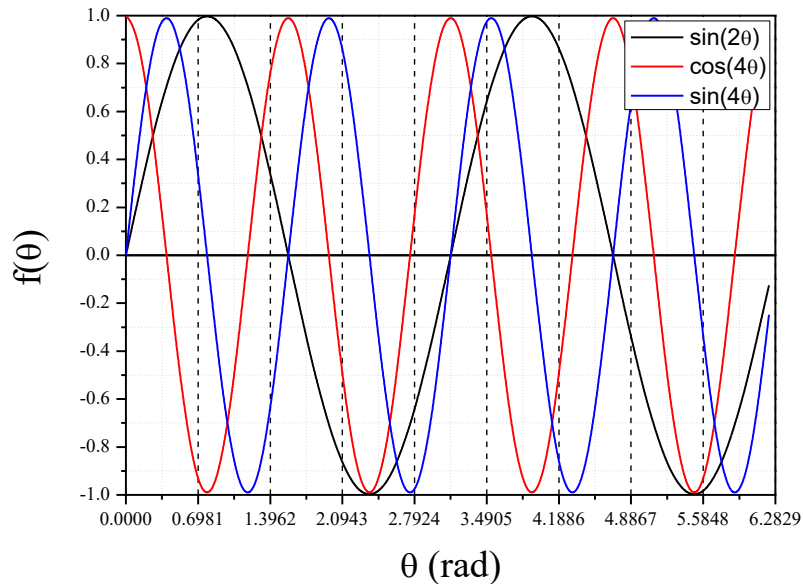


Figura 39 - Gráficos das funções $\sin(2\theta)$, $\cos(4\theta)$ e $\sin(4\theta)$, as linhas pontilhadas do eixo dos radianos indicam os ângulos múltiplos de 40° .

As funções podem se combinar de 8 maneiras diferentes, devido a periodicidade das funções senos e cossenos. Com isso, a função $I(\theta)$ deverá ser calculada com os resultados das medidas em pontos que representam essas combinações possíveis. Analisando a Figura 39 observamos que se fizermos medidas com passos de 40° , ou seja, medir a 0° , 40° , 80° , ..., 320° conseguiremos reproduzir todas as combinações possíveis entre as funções $\sin(2\theta)$, $\cos(4\theta)$ e $\sin(4\theta)$. Portanto as medidas de elipsometria podem ser realizadas utilizando 9 pontos.

6.3. Atividade Óptica Raman (ROA)

O químico inglês Laurence Barron (1944-) em 1973 foi o primeiro a observar atividade óptica vibracional em moléculas quirais na fase líquida usando a técnica ROA. A técnica ROA quantifica a atividade óptica vibracional através da medida de uma pequena diferença na intensidade do espalhamento Raman para moléculas quirais na incidência de luz laser polarizada circularmente à direita e à esquerda, como pode ser visto na Figura 40.⁹⁸ O espectro ROA de uma vasta gama de biomoléculas em solução aquosa agora pode ser medido rotineiramente. Por causa da sua sensibilidade aos elementos quirais da estrutura biomolecular, ROA fornece novas informações sobre a solução da estrutura e da dinâmica, complementares às fornecidas pelas técnicas espectroscópicas convencionais.⁹⁸ Este capítulo fornece uma breve introdução à teoria da espectroscopia ROA e suas aplicações.

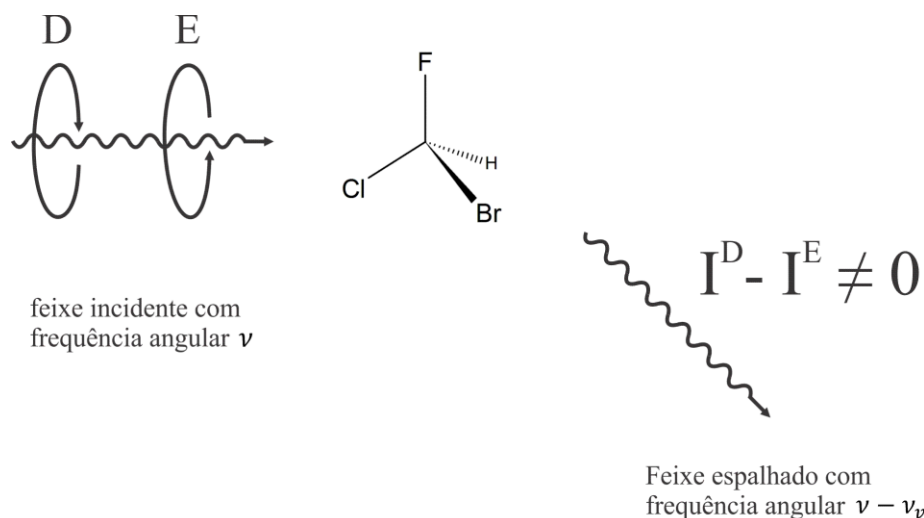


Figura 40 - Esquema básico do experimento ROA, onde se incide luz circularmente polarizada à direita e à esquerda em uma molécula quiral, e o feixe sai espalhado com frequência angular $\nu - \nu_v$.

6.3.1. Os tensores de Atividade Óptica

Os efeitos de polarização surgem nas interferências das ondas eletromagnéticas cujas amplitudes são proporcionais ao tensor polarizabilidade dipolo elétrico $\tilde{\alpha}$ e aos tensores polarizabilidade $\tilde{G}$ e $\tilde{A}$, onde o sinal gráfico “til” em cima das letras significa que são quantidades complexas. O tensor $\tilde{\alpha}$ contém dois momentos de transição dipolo elétrico ($\vec{\mu}$), $\tilde{G}$ contém um momento de transição dipolo elétrico e um dipolo magnético ($\vec{m}$) e $\tilde{A}$ contém um momento de transição dipolo elétrico e um de quadrupolo elétrico ($\vec{\Theta}$)⁹⁹.

6.3.1.1. A polarizabilidade de transição Raman

Um campo eletromagnético induz a oscilação dos momentos de multipolos elétricos e magnéticos de uma molécula, esses momentos se relacionam com as componentes deste campo eletromagnético através das propriedades dos tensores moleculares que são funções da frequência. Como é um campo dinâmico não podemos utilizar os autovalores de energia para obter o momento estático induzido e, conseqüentemente, a polarizabilidade estática. Como alternativa usa-se os valores esperados, estes sim ainda são definidos num campo dinâmico. Para encontrar estes valores esperados dos operadores momento de multipolo, utiliza-se as funções de onda perturbadas pelo campo eletromagnético, essas funções são obtidas resolvendo a equação de Schrodinger dependente do tempo

$$\left(i\hbar \frac{\partial}{\partial t} - H\right)\psi = V\psi \quad (91)$$

onde H é a Hamiltoniana molecular não perturbada e V é um potencial de interação dinâmica.

Assumindo que a solução, quando a autofunção não degenerada estacionária pode ser escrita como:

$$\psi_n = \psi_n^{(0)} e^{-i\omega_n t} \quad (92)$$

de um sistema não perturbado é exposto a uma pequena perturbação harmônica de frequência angular ω para um campo eletromagnético, a correspondente autofunção perturbada pode ser escrita, na forma, utilizando a notação de Einstein,²

$$\begin{aligned} \psi'_n = & \left\{ \psi_n^{(0)} + \sum_{j \neq n} \left[\frac{\langle j | \hat{\mu}_\beta | n \rangle}{2\hbar(\omega_{jn} - \omega)} (\tilde{E}_\beta)_0 + \frac{\langle j | \hat{\mu}_\beta | n \rangle}{2\hbar(\omega_{jn} + \omega)} (\tilde{E}_\beta^*)_0 \right. \right. \\ & + \frac{\langle j | \hat{m}_\beta | n \rangle}{2\hbar(\omega_{jn} - \omega)} (\tilde{B}_\beta)_0 + \frac{\langle j | \hat{m}_\beta | n \rangle}{2\hbar(\omega_{jn} + \omega)} (\tilde{B}_\beta^*)_0 \\ & + \frac{\langle j | \hat{\Theta}_{\beta\gamma} | n \rangle}{6\hbar(\omega_{jn} - \omega)} (\tilde{E}_{\beta\gamma})_0 + \frac{\langle j | \hat{\Theta}_{\beta\gamma} | n \rangle}{6\hbar(\omega_{jn} + \omega)} (\tilde{E}_{\beta\gamma}^*)_0 \\ & \left. + \dots \right] \psi_j^{(0)} \Big\} e^{-i\omega_n t} \end{aligned} \quad (93)$$

na qual o til ($\sim$) representa uma quantidade complexa, um circunflexo ($\wedge$) indica um operador da mecânica quântica, $|j\rangle$ representa um estado molecular excitado intermediário, ω é a frequência angular da onda eletromagnética incidente, ω_{jn} são

frequências de transição natural entre os estados moleculares j e n , μ_β , m_β e $\Theta_{\beta\gamma}$ são respectivamente o momento dipolo elétrico, o momento dipolo magnético e o momento quadrupolo elétrico (e serão definidos mais à frente no capítulo) e os subíndices gregos são usados para referenciar a direção da molécula no plano cartesiano. Na equação (93) o primeiro termo satisfaz a equação (91) na ausência de V e os outros termos são relacionados a perturbação harmônica de primeira ordem.

O momento de transição do dipolo elétrico é:^{100,101}

$$(\mu_\alpha)_{mn} = \langle m' | \hat{\mu}_\alpha | n' \rangle + \langle m' | \hat{\mu}_\alpha | n' \rangle^* \quad (94)$$

Utiliza-se as funções de onda perturbadas na forma da equação (93) para escrever o momento de transição do dipolo elétrico como:

$$\begin{aligned} (\mu_\alpha)_{mn} = & \langle m | \hat{\mu}_\alpha | n \rangle e^{i\omega_{mn}t} \\ & + \frac{1}{2\hbar} \sum_{j \neq n} \left[\frac{\langle m | \hat{\mu}_\alpha | j \rangle \langle j | \hat{\mu}_\beta | n \rangle}{\omega_{jn} - \omega} \tilde{E}_\beta^{(0)} e^{-i(\omega - \omega_{mn})t} \right. \\ & + \left. \frac{\langle m | \hat{\mu}_\alpha | j \rangle \langle j | \hat{\mu}_\beta | n \rangle}{\omega_{jn} + \omega} \tilde{E}_\beta^{(0)*} e^{i(\omega + \omega_{mn})t} \right] \\ & + \frac{1}{2\hbar} \sum_{j \neq m} \left[\frac{\langle m | \hat{\mu}_\beta | j \rangle \langle j | \hat{\mu}_\alpha | n \rangle}{\omega_{jm} - \omega} \tilde{E}_\beta^{(0)*} e^{i(\omega + \omega_{mn})t} \right. \\ & + \left. \frac{\langle m | \hat{\mu}_\beta | j \rangle \langle j | \hat{\mu}_\alpha | n \rangle}{\omega_{jm} + \omega} \tilde{E}_\beta^{(0)} e^{-i(\omega - \omega_{mn})t} \right] \\ & + \text{complexo conjugado} \end{aligned} \quad (95)$$

na qual ω_n é a frequência do estado inicial da molécula, ω_m é a frequência do estado final da molécula. $|n\rangle$ e $|m\rangle$ são os estados iniciais e finais da molécula, respectivamente.

O primeiro termo é o momento de transição que descreve a geração espontânea de frequência ω_{nm} quando a molécula se encontra inicialmente em um estado excitado com $\omega_n > \omega_m$ e pode ser reescrito como:

$$\begin{aligned} & \langle m | \hat{\mu}_\alpha | n \rangle e^{i\omega_{mn}t} + \text{complexo conjugado} \\ & = \langle m | \hat{\mu}_\alpha | n \rangle e^{-i\omega_{nm}t} + \langle m | \hat{\mu}_\alpha | n \rangle^* e^{i\omega_{nm}t} \end{aligned} \quad (96)$$

pois $\omega_{mn} = \omega_m - \omega_n$.

Os termos restantes dividem-se em dois tipos, um que descreve a emissão induzida ($\omega_n - \omega < \omega_m$ que não será discutido neste trabalho. O outro termo é o $(\omega + \omega_n) > \omega_m$, que descreve o espalhamento Raman convencional. Como o espalhamento Stokes trata de uma transição de um nível menor para um maior nível de energia molecular, tem-

se que $(\omega - \omega_{mn}) < \omega$, ou seja, $\omega_m > \omega_n$. Para o espalhamento anti-Stokes que trata uma transição de um nível mais alto para um nível mais baixo de energia molecular, de modo que $(\omega - \omega_{mn}) > \omega$, então $\omega_n > \omega_m$. Consequentemente os termos na equação (95) que correspondem ao espalhamento Raman Stokes e anti-Stokes são:

$$(\mu_\alpha)_{mn} = \frac{1}{2\hbar} \sum_{j \neq m, n} \left[\frac{\langle m | \hat{\mu}_\alpha | j \rangle \langle j | \hat{\mu}_\beta | n \rangle}{\omega_{jn} - \omega} + \frac{\langle m | \hat{\mu}_\beta | j \rangle \langle j | \hat{\mu}_\alpha | n \rangle}{\omega_{jm} + \omega} \right] \tilde{E}_\beta^{(0)} e^{-i(\omega - \omega_{mn})t} \quad (97)$$

+ complexo conjugado

Para simplificar a matemática, utiliza-se $j \neq m$ e n e usando a relação:

$$\begin{aligned} \omega_{jm} \langle m | \hat{\mu}_\alpha | j \rangle \langle j | \hat{\mu}_\beta | n \rangle + \omega_{jn} \langle m | \hat{\mu}_\beta | j \rangle \langle j | \hat{\mu}_\alpha | n \rangle \\ = \frac{1}{2} (\omega_{jm} + \omega_{jn}) (\langle m | \hat{\mu}_\alpha | j \rangle \langle j | \hat{\mu}_\beta | n \rangle + \langle m | \hat{\mu}_\beta | j \rangle \langle j | \hat{\mu}_\alpha | n \rangle) \quad (98) \\ + \frac{1}{2} (\omega_{mn}) (\langle m | \hat{\mu}_\alpha | j \rangle \langle j | \hat{\mu}_\beta | n \rangle - \langle m | \hat{\mu}_\beta | j \rangle \langle j | \hat{\mu}_\alpha | n \rangle), \end{aligned}$$

Reescreve-se a equação (97):

$$\begin{aligned} (\mu_\alpha)_{mn} \\ = \frac{1}{2\hbar} \sum_{j \neq m, n} \left[\frac{(\omega_{jm} + \omega) \langle m | \hat{\mu}_\alpha | j \rangle \langle j | \hat{\mu}_\beta | n \rangle + (\omega_{jn} - \omega) \langle m | \hat{\mu}_\beta | j \rangle \langle j | \hat{\mu}_\alpha | n \rangle}{(\omega_{jn} - \omega)(\omega_{jm} + \omega)} \right] \quad (99) \\ \times \tilde{E}_\beta^{(0)} e^{-i(\omega - \omega_{mn})t} + \text{complexo conjugado} \end{aligned}$$

Aplicando a distributiva no numerador, substitui-se a equação (98), o que resulta em:

$$\begin{aligned} (\mu_\alpha)_{mn} = \frac{1}{2\hbar} \sum_{j \neq m, n} \frac{1/2}{(\omega_{jn} - \omega)(\omega_{jm} + \omega)} [(\omega_{jm} + \omega_{jn}) (\langle m | \hat{\mu}_\alpha | j \rangle \langle j | \hat{\mu}_\beta | n \rangle \\ + \langle m | \hat{\mu}_\beta | j \rangle \langle j | \hat{\mu}_\alpha | n \rangle) \quad (100) \\ + (2\omega + \omega_{mn}) (\langle m | \hat{\mu}_\alpha | j \rangle \langle j | \hat{\mu}_\beta | n \rangle - \langle m | \hat{\mu}_\beta | j \rangle \langle j | \hat{\mu}_\alpha | n \rangle)] \\ \times \tilde{E}_\beta^{(0)} e^{-i(\omega - \omega_{mn})t} + \text{complexo conjugado} . \end{aligned}$$

Introduzindo a versão complexa do momento do dipolo elétrico de transição: ²

$$(\tilde{\mu}_\alpha)_{mn} = (\tilde{\alpha}_{\alpha\beta})_{mn} \tilde{E}_\beta^{(0)} e^{-i(\omega - \omega_{mn})t}, \quad (101)$$

e lembrando as propriedades de números complexos:

$$\begin{aligned} \tilde{A} + A^* &= 2\text{Re}(A) \\ \tilde{A} - A^* &= 2\text{Im}(A) \end{aligned} \quad (102)$$

onde $\tilde{A}$ é um numero complexo qualquer e A^* é seu conjugado complexo.

Aplica-se a propriedade (102) na equação (100) e substitui o resultando na equação (101). Pode-se agora escrever a polarizabilidade de transição complexa:²

$$(\tilde{\alpha}_{\alpha\beta})_{mn} = \frac{1}{\hbar} \sum_{j \neq m,n} \left[\frac{\langle m|\hat{\mu}_\alpha|j\rangle\langle j|\hat{\mu}_\beta|n\rangle}{\omega_{jn} - \omega} + \frac{\langle m|\hat{\mu}_\beta|j\rangle\langle j|\hat{\mu}_\alpha|n\rangle}{\omega_{jm} + \omega} \right] \quad (103)$$

Tem-se também que considerar fenômenos de ressonância, para isso incorpora-se a equação (103) o termo $i\Gamma_j$, na qual Γ_j é a largura de banda do j-ésimo estado excitado, este termo é complexo para permitir que os estados excitados possuam largura de energia finitas, portanto a polarizabilidade de transição complexa pode ser reescrita como: ¹⁰²

$$(\tilde{\alpha}_{\alpha\beta})_{mn} = \frac{1}{\hbar} \sum_{j \neq m,n} \left[\frac{\langle m|\hat{\mu}_\alpha|j\rangle\langle j|\hat{\mu}_\beta|n\rangle}{\omega_{jn} - \omega + i\Gamma_j} + \frac{\langle m|\hat{\mu}_\beta|j\rangle\langle j|\hat{\mu}_\alpha|n\rangle}{\omega_{jm} + \omega + i\Gamma_j} \right] \quad (104)$$

Fisicamente o termo Γ_j pode ser relacionado aos processos de relaxação homogênea do sistema devido as variações do ambiente químico em termo do modo vibracional j . Em analogia a um oscilador harmônico se trata do termo de atrito, ou seja, do amortecimento do sistema real.

6.3.1.2. Definindo os Tensores

Pode-se substituir o operador dipolo elétrico pelos operadores dipolo magnético e quadrupolo elétrico de forma que se pode definir o tensor de transição ROA correspondente. ^{103,104} A Tabela 9 abaixo resume estas substituições e explica as conversões.

Tabela 9 - Relações de conversão

Se substituir	$(\tilde{\alpha}_{\alpha\beta})_{mn}$ Torna-se
$\hat{\mu}_\beta \rightarrow \hat{m}_\beta$	$(\tilde{G}_{\alpha\beta})_{mn}$
$\hat{\mu}_\alpha \rightarrow \hat{m}_\alpha$	$(\tilde{G}_{\alpha\beta})_{mn}$
$\hat{\mu}_\beta \rightarrow \hat{\Theta}_{\beta\gamma}$	$(\tilde{A}_{\alpha,\beta\gamma})_{mn}$
$\hat{\mu}_\alpha \rightarrow \hat{\Theta}_{\alpha\beta}$	$(\tilde{A}_{\gamma,\alpha\beta})_{mn}$
$\hat{\mu}_\beta \rightarrow \hat{\mu}_\gamma$	$(\tilde{A}_{\gamma,\alpha\beta})_{mn}$

Portanto, tem-se as seguintes definições:

$$(\tilde{G}_{\alpha\beta})_{mn} = \frac{1}{\hbar} \sum_{j \neq m,n} \left[\frac{\langle m|\hat{\mu}_\alpha|j\rangle\langle j|\hat{m}_\beta|n\rangle}{\omega_{jn} - \omega + i\Gamma_j} + \frac{\langle m|\hat{m}_\beta|j\rangle\langle j|\hat{\mu}_\alpha|n\rangle}{\omega_{jm} + \omega + i\Gamma_j} \right] \quad (105)$$

$$(\tilde{G}_{\alpha\beta})_{mn} = \frac{1}{\hbar} \sum_{j \neq m, n} \left[\frac{\langle m | \hat{m}_\alpha | j \rangle \langle j | \hat{\mu}_\beta | n \rangle}{\omega_{jn} - \omega + i\Gamma_j} + \frac{\langle m | \hat{\mu}_\beta | j \rangle \langle j | \hat{m}_\alpha | n \rangle}{\omega_{jm} + \omega + i\Gamma_j} \right] \quad (106)$$

$$(\tilde{A}_{\alpha\beta})_{mn} = \frac{1}{\hbar} \sum_{j \neq m, n} \left[\frac{\langle m | \hat{\mu}_\alpha | j \rangle \langle j | \hat{\Theta}_{\beta\gamma} | n \rangle}{\omega_{jn} - \omega + i\Gamma_j} + \frac{\langle m | \hat{\Theta}_{\beta\gamma} | j \rangle \langle j | \hat{\mu}_\alpha | n \rangle}{\omega_{jm} + \omega + i\Gamma_j} \right] \quad (107)$$

$$(\tilde{\mathcal{A}}_{\alpha\beta})_{mn} = \frac{1}{\hbar} \sum_{j \neq m, n} \left[\frac{\langle m | \hat{\Theta}_{\alpha\beta} | j \rangle \langle j | \hat{\mu}_\gamma | n \rangle}{\omega_{jn} - \omega + i\Gamma_j} + \frac{\langle m | \hat{\mu}_\gamma | j \rangle \langle j | \hat{\Theta}_{\alpha\beta} | n \rangle}{\omega_{jm} + \omega + i\Gamma_j} \right] \quad (108)$$

na qual $(\tilde{\alpha}_{\alpha\beta})_{mn}$ é o componente cartesiano correspondente a transição dipolo-elétrico-dipolo-elétrico do tensor polarizabilidade Raman, $(\tilde{G}_{\alpha\beta})_{mn}$ e $(\tilde{\mathcal{G}}_{\alpha\beta})_{mn}$ são os correspondentes cartesianos da transição dipolo-elétrico-dipolo-magnético dos tensores atividade óptica e $(\tilde{A}_{\alpha\beta})_{mn}$ e $(\tilde{\mathcal{A}}_{\alpha\beta})_{mn}$ são os correspondentes cartesianos da transição dipolo-elétrico-quadrupolo-elétrico dos tensores atividade óptica. Os tensores $(\tilde{G}_{\alpha\beta})_{mn}$ e $(\tilde{A}_{\alpha\beta})_{mn}$ simbolizam as oscilações do momento de dipolo elétrico induzido proveniente das transições dipolo-magnético e quadrupolo-elétrico das moléculas. Os tensores $(\tilde{\mathcal{G}}_{\alpha\beta})_{mn}$ e $(\tilde{\mathcal{A}}_{\alpha\beta})_{mn}$ se referem às oscilações do momento de dipolo-magnético induzido e quadrupolo-elétrico respectivamente, decorrentes das transições iniciais do dipolo-elétrico da molécula.

Define-se agora os operadores $\hat{\mu}_\alpha$, $\hat{m}_\alpha$ e $\hat{\Theta}_{\alpha\beta}$, que são uma somatória em todas as partículas k com massa m_k e unidade de carga e_k :^{2,99,105}

$$\text{Dipolo elétrico} \quad \hat{\mu}_\alpha = \sum_k e_k r_{k\alpha}, \quad (109)$$

$$\text{Dipolo magnético} \quad \hat{m}_\alpha = \frac{1}{2} \sum_k \frac{e_k}{m_k} \epsilon_{\alpha\beta\gamma} r_{k\beta} p_{k\gamma}, \quad (110)$$

$$\text{Quadrupolo elétrico} \quad \hat{\Theta}_{\alpha\beta} = \sum_k e_k (3r_{k\alpha} r_{k\beta} - r_k^2 \delta_{\alpha\beta}) \quad (111)$$

na qual r_k e p_k são respectivamente, os vetores posição e momento linear da k -ésima partícula. $\epsilon_{\alpha\beta\gamma}$ é um símbolo de permutação, também conhecido como Levi-Civita e representa um tensor de terceira ordem de unidade antissimétrica e $\delta_{\alpha\beta}$ é um delta de Kronecker e caracteriza um tensor de segunda ordem de unidade simétrica.

As intensidades Raman e ROA dependem de certas combinações de produtos de tensores. Estes tensores já foram definidos nas equações (104) a (108) e seus produtos estão definidos abaixo:^{2,103,104}

$$\alpha_0 = (\tilde{\alpha}_{\alpha\alpha})_{mn}(\tilde{\alpha}_{\beta\beta}^*)_{mn}, \quad (112)$$

$$\alpha_1 = (\tilde{\alpha}_{\alpha\beta})_{mn}(\tilde{\alpha}_{\alpha\beta}^*)_{mn}, \quad (113)$$

$$\alpha_2 = (\tilde{\alpha}_{\alpha\beta})_{mn}(\tilde{\alpha}_{\beta\alpha}^*)_{mn}, \quad (114)$$

$$\tilde{G}_0 = (\tilde{\alpha}_{\alpha\alpha})_{mn}(\tilde{G}_{\beta\beta}^*)_{mn}, \quad (115)$$

$$\tilde{G}_1 = (\tilde{\alpha}_{\alpha\beta})_{mn}(\tilde{G}_{\alpha\beta}^*)_{mn}, \quad (116)$$

$$\tilde{G}_2 = (\tilde{\alpha}_{\alpha\beta})_{mn}(\tilde{G}_{\beta\alpha}^*)_{mn}, \quad (117)$$

$$\tilde{G}_0 = (\tilde{\alpha}_{\alpha\alpha})_{mn}(\tilde{G}_{\beta\beta}^*)_{mn}, \quad (118)$$

$$\tilde{G}_1 = (\tilde{\alpha}_{\alpha\beta})_{mn}(\tilde{G}_{\alpha\beta}^*)_{mn}, \quad (119)$$

$$\tilde{G}_2 = (\tilde{\alpha}_{\alpha\beta})_{mn}(\tilde{G}_{\beta\alpha}^*)_{mn}, \quad (120)$$

$$\tilde{A}_1 = \frac{1}{3}i\omega\epsilon_{\alpha\gamma\delta}(\tilde{\alpha}_{\alpha\beta})_{mn}(\tilde{A}_{\gamma,\delta\beta}^*)_{mn}, \quad (121)$$

$$\tilde{A}_2 = \frac{1}{3}i\omega\epsilon_{\alpha\gamma\delta}(\tilde{\alpha}_{\beta\alpha})_{mn}(\tilde{A}_{\gamma,\delta\beta}^*)_{mn}, \quad (122)$$

$$\tilde{A}_3 = \frac{1}{3}i\omega\epsilon_{\alpha\beta\gamma}(\tilde{\alpha}_{\alpha\beta})_{mn}(\tilde{A}_{\delta,\gamma\delta}^*)_{mn}, \quad (123)$$

$$\tilde{\mathcal{A}}_1 = \frac{1}{3}i\omega\epsilon_{\alpha\beta\delta}(\tilde{\alpha}_{\alpha\beta})_{mn}(\tilde{\mathcal{A}}_{\gamma,\delta\beta}^*)_{mn}, \quad (124)$$

$$\tilde{\mathcal{A}}_2 = \frac{1}{3}i\omega\epsilon_{\alpha\gamma\delta}(\tilde{\alpha}_{\beta\alpha})_{mn}(\tilde{\mathcal{A}}_{\gamma,\delta\beta}^*)_{mn}, \quad (125)$$

$$\tilde{\mathcal{A}}_3 = \frac{1}{3}i\omega\epsilon_{\alpha\beta\gamma}(\tilde{\alpha}_{\alpha\beta})_{mn}(\tilde{\mathcal{A}}_{\delta,\gamma\delta}^*)_{mn}, \quad (126)$$

Define-se também os tensores isotrópicos e anisotrópicos invariantes^{1, 2,102,105}

$$\alpha^2 = \frac{1}{9}Re \left[(\tilde{\alpha}_{\alpha\alpha})_{mn}^s (\tilde{\alpha}_{\beta\beta})_{mn}^{s*} \right], \quad (127)$$

$$\beta_s(\tilde{\alpha})^2 = \frac{1}{2}Re \left[3(\tilde{\alpha}_{\alpha\beta})_{mn}^s (\tilde{\alpha}_{\alpha\beta})_{mn}^{s*} - (\tilde{\alpha}_{\alpha\alpha})_{mn}^s (\tilde{\alpha}_{\beta\beta})_{mn}^{s*} \right], \quad (128)$$

$$\beta_a(\tilde{\alpha})^2 = \frac{3}{2}Re \left[3(\tilde{\alpha}_{\alpha\beta})_{mn}^a (\tilde{\alpha}_{\alpha\beta})_{mn}^{a*} \right], \quad (129)$$

$$(\alpha G)' = \frac{1}{9}Re \left[3(\tilde{\alpha}_{\alpha\alpha})_{mn}^s (\tilde{G}_{\beta\beta})_{mn}^{s*} \right], \quad (130)$$

$$\beta_s'(\tilde{G})^2 = \frac{1}{2}Re \left[3(\tilde{\alpha}_{\alpha\beta})_{mn}^s (\tilde{G}_{\alpha\beta})_{mn}^{s*} - (\tilde{\alpha}_{\alpha\alpha})_{mn}^s (\tilde{G}_{\beta\beta})_{mn}^{s*} \right], \quad (131)$$

¹ Foram definidos somente os tensores necessários para o cálculo das intensidades, para consultar o restante dos tensores pode-se verificar a referência [5].

$$\beta'_a(\tilde{G})^2 = \frac{3}{2} Re \left[3(\tilde{\alpha}_{\alpha\beta})_{mn}^a (\tilde{G}_{\alpha\beta})_{mn}^{a*} \right], \quad (132)$$

$$\beta'_s(\tilde{A})^2 = \frac{1}{2} \omega Re \left\{ i(\tilde{\alpha}_{\alpha\beta})_{mn}^s \left[\epsilon_{\alpha\gamma\delta} (\tilde{A}_{\gamma,\delta\beta})_{mn}^* \right]^s \right\}, \quad (133)$$

$$\beta'_a(\tilde{A})^2 = \frac{1}{2} \omega Re \left(i(\tilde{\alpha}_{\alpha\beta})_{mn}^a \left\{ \left[\epsilon_{\alpha\gamma\delta} (\tilde{A}_{\gamma,\delta\beta})_{mn}^* \right]^a + \left[\epsilon_{\alpha\gamma\delta} (\tilde{A}_{\delta,\gamma\beta})_{mn}^* \right]^a \right\} \right), \quad (134)$$

6.3.1.3. Espalhamento molecular da radiação polarizada

Considere um campo elétrico de espalhamento ($\tilde{E}_\alpha^d$), ou seja, o campo elétrico detectado. A distância entre o ponto de detecção e a sua origem é R e este é muito maior do que o comprimento de onda da radiação incidente, e ele é escrito como: ²

$$E_\alpha^d = \frac{\omega^2 \mu_0}{4\pi R} \exp \left[i\omega \left(\frac{R}{c} - t \right) \right] \tilde{\alpha}_{\alpha\beta} \tilde{E}_\beta^i, \quad (135)$$

na qual $\tilde{E}_\beta^i$ é o campo elétrico incidente complexo, μ_0 é a permeabilidade magnética e c é a velocidade da luz.

Sabe-se que a intensidade é o quadrado do módulo do campo magnético, portanto a intensidade de radiação espalhada dependente da radiação incidente e da espalhada é:

105

$$\mathcal{I}(\tilde{e}^{d*}, \tilde{e}^i) = |\tilde{e}_\alpha^{d*} \tilde{E}_\alpha^d|^2, \quad (136)$$

substituindo a equação (135) em (136) e usando a relação $\tilde{E}_\beta^i = \tilde{E}^{(0)} \tilde{e}_\beta^i$, tem-se:

$$I(\tilde{e}^{d*}, \tilde{e}^i) = 90K |\tilde{e}_\alpha^{d*} \tilde{\alpha}_{\alpha\beta} \tilde{e}_\beta^i|^2, \quad (137)$$

na qual k é uma equação vetorial da propagação de polarização² para todas as medidas de ROA e seu valor é:

$$k = \frac{1}{90} \left(\frac{\omega^2 \mu_0 E^{(0)}}{4\pi R} \right)^2, \quad (138)$$

e $\tilde{\alpha}$ é o tensor espalhamento: ¹⁰⁵

$$\tilde{\alpha}_{\alpha\beta} = \tilde{\alpha}_{\alpha\beta} + \frac{1}{c} \left[\epsilon_{\gamma\delta\beta} n_\delta^i \tilde{G}_{\alpha\gamma} + \epsilon_{\gamma\delta\alpha} n_\delta^d \tilde{G}_{\gamma\beta} + \frac{1}{3} i\omega (n_\gamma^i \tilde{A}_{\alpha,\gamma\beta} - n_\gamma^d \tilde{A}_{\beta,\gamma\alpha}) \right], \quad (139)$$

onde $\mathbf{n}^i$ e $\mathbf{n}^d$ são vetores unitários da radiação incidente e espalhada, respectivamente. Substituindo (139) em (137) temos:

² Foi definida e calculada previamente no SI da referência [12]

$$\begin{aligned}
 I(\tilde{e}^{d*}, \tilde{e}^i) = 90K \Big\{ & \tilde{e}_A^{d*} \tilde{e}_B^i \tilde{e}_C^d \tilde{e}_D^{i*} l_{A\alpha} l_{B\beta} l_{C\gamma} l_{D\delta} \tilde{\alpha}_{\alpha\beta} \tilde{\alpha}_{\gamma\delta}^* \\
 & + \frac{2}{c} \text{Im} \left\{ \tilde{e}_A^{d*} \tilde{e}_B^i \tilde{e}_C^d \tilde{e}_E^{i*} \tilde{\alpha}_{\alpha\beta} \left[n_D^i \left(i\epsilon_{\rho\delta\epsilon} \tilde{G}_{\gamma\rho}^* + \frac{1}{3} \omega \tilde{A}_{\gamma,\delta\epsilon}^* \right) \right. \right. \\
 & \left. \left. + n_D^d \left(i\epsilon_{\rho\delta\gamma} \tilde{G}_{\rho\epsilon}^* + \frac{1}{3} \omega \tilde{A}_{\epsilon,\delta\gamma}^* \right) \right] \right\} l_{A\alpha} l_{B\beta} l_{C\gamma} l_{D\delta} l_{E\epsilon} \Big\}, \quad (140)
 \end{aligned}$$

onde os subíndices A, B, C, D e E são usados para representar os eixos fixos no espaço e os subíndices $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ e ϵ são usados para representar os eixos fixos da molécula. $l_{A\alpha}, l_{B\beta}, l_{C\gamma}, l_{D\delta}$ e $l_{E\epsilon}$ são os cossenos diretores dos eixos fixos do espaço para os eixos fixos da molécula. Esta equação descreve a intensidade dispersa por um conjunto de moléculas, todas com uma orientação particular em relação ao eixo fixo do espaço definido nas coordenadas cartesianas.

6.3.1.4. Intensidade ROA

A variação da intensidade entre dois estados de polarização rotulados 1 e 2 de uma molécula quiral pode ser escrito como: ¹⁰²

$$\Delta I = I^{(1)} - I^{(2)} = \frac{6k}{c} \sum_{k=1}^{14} \text{Im} \left[\left(\tilde{P}_k^{(1)} - \tilde{P}_k^{(2)} \right) (-i\tilde{S}_k) \right], \quad (141)$$

$\tilde{P}_k$ são os produtos de vetores de propagação da polarização definidos como: ^{2,102}

$$\tilde{P}_1 = n^i \cdot (\tilde{e}^i \times \tilde{e}^{i*}), \quad \tilde{P}_8 = n^d \cdot (\tilde{e}^d \times \tilde{e}^{d*}), \quad (142)$$

$$\tilde{P}_2 = n^i \cdot (\tilde{e}^d \times \tilde{e}^{d*}), \quad \tilde{P}_9 = n^d \cdot (\tilde{e}^i \times \tilde{e}^{i*}), \quad (143)$$

$$\tilde{P}_3 = \tilde{e}^d \cdot (\tilde{e}^i \times \tilde{e}^{i*})(n^i \cdot \tilde{e}^{d*}), \quad \tilde{P}_{10} = \tilde{e}^i \cdot (\tilde{e}^d \times \tilde{e}^{d*})(n^d \cdot \tilde{e}^{i*}), \quad (144)$$

$$\tilde{P}_4 = \tilde{e}^d \cdot (n^i \times \tilde{e}^i)(\tilde{e}^{i*} \cdot \tilde{e}^{d*}), \quad \tilde{P}_{11} = \tilde{e}^{i*} \cdot (n^d \times \tilde{e}^{d*})(\tilde{e}^d \cdot \tilde{e}^i), \quad (145)$$

$$\tilde{P}_5 = \tilde{e}^d \cdot (n^i \times \tilde{e}^{i*})(\tilde{e}^i \cdot \tilde{e}^{d*}), \quad \tilde{P}_{12} = \tilde{e}^{i*} \cdot (n^d \times \tilde{e}^d)(\tilde{e}^{d*} \cdot \tilde{e}^i), \quad (146)$$

$$\tilde{P}_6 = \tilde{e}^{d*} \cdot (n^i \times \tilde{e}^i)(\tilde{e}^{i*} \cdot \tilde{e}^d), \quad \tilde{P}_{13} = \tilde{e}^i \cdot (n^d \times \tilde{e}^{d*})(\tilde{e}^d \cdot \tilde{e}^{i*}), \quad (147)$$

$$\tilde{P}_7 = \tilde{e}^{d*} \cdot (n^i \times \tilde{e}^{i*})(\tilde{e}^i \cdot \tilde{e}^d), \quad \tilde{P}_{14} = \tilde{e}^i \cdot (n^d \times \tilde{e}^d)(\tilde{e}^{d*} \cdot \tilde{e}^{i*}), \quad (148)$$

$$\tilde{P}_{15} = |\tilde{e}^d \cdot \tilde{e}^i|^2, \quad \tilde{P}_{16} = |\tilde{e}^{d*} \cdot \tilde{e}^i|^2. \quad (149)$$

na qual n^i e n^d são os vetores de propagação incidente e espalhado, e $\tilde{e}^i$ e $\tilde{e}^d$ são os vetores de polarização complexos correspondentes.

Os $\tilde{S}_k$ são as combinações primitivas dos produtos entre os tensores complexos da atividade óptica e polarizabilidade, e são definidos como: ^{2,102}

$$\tilde{S}_1 = 2\tilde{G}_1, \quad \tilde{S}_8 = -2\tilde{G}_1, \quad (150)$$

$$\tilde{S}_2 = \tilde{G}_0 - \tilde{G}_2 - \tilde{A}_1, \quad \tilde{S}_9 = -\tilde{G}_0 + \tilde{G}_2 - \tilde{A}_2, \quad (151)$$

$$\tilde{S}_3 = -\tilde{G}_0 + \tilde{G}_1 - \tilde{G}_2 - \tilde{A}_2 + \tilde{A}_3, \quad \tilde{S}_{10} = \tilde{G}_0 - 2\tilde{G}_1 + \tilde{G}_2 - \tilde{A}_1 - \tilde{A}_3, \quad (152)$$

$$\tilde{S}_4 = -\tilde{G}_0 + \tilde{G}_1 + \tilde{A}_2, \quad \tilde{S}_{11} = -\tilde{G}_0 + \tilde{G}_1 - \tilde{A}_1, \quad (153)$$

$$\tilde{S}_5 = -2\tilde{G}_0, \quad \tilde{S}_{12} = -2\tilde{G}_0, \quad (154)$$

$$\tilde{S}_6 = \tilde{G}_1 - \tilde{G}_2 - \tilde{A}_3, \quad \tilde{S}_{13} = \tilde{G}_1 - \tilde{G}_2 - \tilde{A}_3, \quad (155)$$

$$\tilde{S}_7 = -2\tilde{G}_2, \quad \tilde{S}_{14} = -2\tilde{G}_2, \quad (156)$$

Pode-se dividir a equação (141) em duas, uma quando a luz incidente é circularmente polarizada (ΔI_{CP}) e a outra quando a luz é linearmente polarizada (ΔI_{LP}):

102

$$\Delta I_{CP} = \frac{12k}{c} \sum_{k=1}^{14} \text{Im}(\tilde{P}_k) \text{Im}(\tilde{S}_k), \quad (157)$$

$$\Delta I_{LP} = \frac{6k}{c} \sum_{k=1}^{14} \text{Im}(P_k^{(1)} - P_k^{(2)}) \text{Re}(-\tilde{S}_k). \quad (158)$$

Um aspecto interessante para se observar é que o ΔI_{LP} tem uma completa dependência da parte real do produto entre os tensores polarizabilidade de transição e atividade óptica, em oposição ao ΔI_{CP} que é dependente da parte imaginária.

Uma abordagem diferente do que a vista acima é a teoria das matrizes de Mueller utilizando os parâmetros de Stokes (ela está descrita nos capítulos anteriores). A Figura 41 abaixo mostra uma amostra quiral sendo irradiada com luz polarizada:

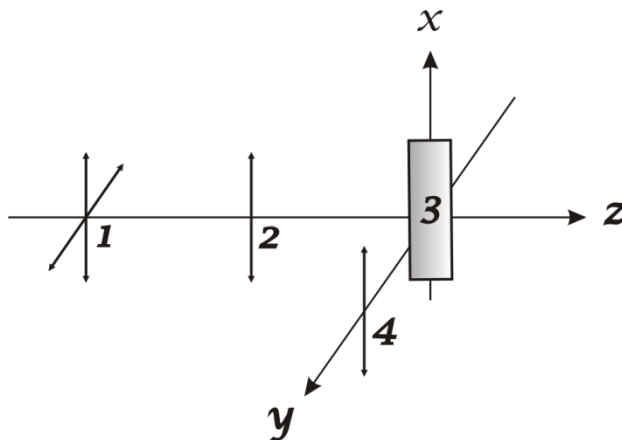


Figura 41 - Representação esquemática de uma amostra quiral sendo irradiada com luz polarizada. 1 – Elemento óptico, 2 - vetor de Stokes associado a intensidade de radiação incidente, 3 - amostra quiral e 4 - vetor de Stokes associado ao estado de polarização da radiação espalhada.

onde o feixe incidente possui um vetor estado de polarização s_j^i e o feixe espalhado um vetor estado de polarização s_j^d . O elemento óptico pode ser representado por uma matriz de Mueller 4×4 que é representada pelo símbolo M_{IJ} .² Assim a intensidade ROA para um conjunto de moléculas quirais e isotrópicas é dada por:

$$I = \frac{45}{2} K \sum_{i,j=0}^3 s_i^d \langle M_{IJ} \rangle s_j^i . \quad (159)$$

na qual os *brackets* indicam uma média espacial isotrópica. A Tabela 7 pode ser consultada para a definição dos parâmetros de Stokes.

6.4. Espectroscopia Raman por Elipsometria (ERS)

A Espectroscopia Raman por Elipsometria é a junção das duas técnicas apresentadas acima, a elipsometria com o espalhamento Raman. O arranjo experimental ERS utilizado, de certo modo, é trivial de montar como pode ser observado na Figura 42.

A técnica ERS acessa modos vibracionais que outras técnicas de caracterização óptica mais difundidas como a absorção no infravermelho e espectroscopia Raman não podem acessar. Acessando modos vibracionais ainda não conhecidos a níveis atômicos, ela se torna uma ferramenta poderosa para caracterização de moléculas quirais, essas de grande importância para a indústria farmacêutica. A maioria das moléculas do corpo humano são quirais, portanto um remédio tem que possuir uma estrutura bem definida de tal modo a ser absorvida pelo organismo. O grande desafio das indústrias farmacêuticas é que, em muitos casos, o enantiômero do princípio ativo são os responsáveis pelos efeitos colaterais. Mas o ERS não se limita só a este caso, os parâmetros S_1 e S_2 nos fornecem informações valiosas que serão aplicadas e estudadas de forma inédita neste trabalho.

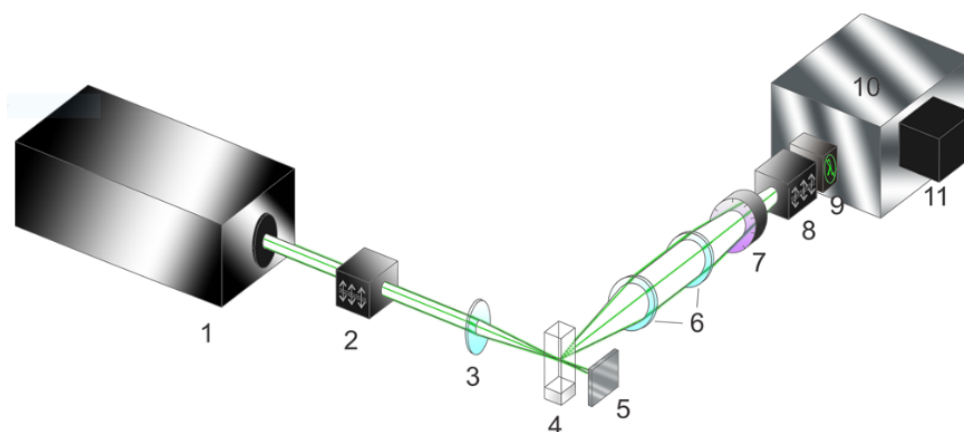


Figura 42 - Diagrama esquemático do aparato experimental da Espectroscopia Raman por Elipsometria (ERS): (1) laser, (2) polarizador linear acromático, (3) lente para focar o laser, (4) porta amostra, (5) espelho, (6) conjunto de lentes para focar o feixe de luz espalhado pela amostra, (7) placa um quarto de onda acromática, (8) polarizador linear acromático, (9) filtro notch, (10) espectrômetro e (11) detector CCD.

A medida de ERS é realizada da seguinte maneira: incide-se luz linearmente polarizada na amostra e obtêm-se a intensidade do espalhamento Raman espalhada. Pela técnica de elipsometria é necessário medir a variação da intensidade em função do ângulo, faz-se isso girando o goniômetro em passos de 40° (0° , 40° , ..., 280° e 320°). Após as nove medidas substitui-se os valores na equação (85), obtêm-se os parâmetros de Stokes, estes parâmetros fornecem todos os dados sobre os estados de polarização da luz. O parâmetro S_1 normalizado está relacionado com a intensidade de luz linearmente polarizada espalhada e pode ser utilizado para analisar a despolarização da luz incidente, devido a interação da molécula com a luz. Os parâmetros S_2 e S_3 normalizados estão relacionados com o modo vibracional da molécula que tem polarização linear ($\pm 45^\circ$) e circular (direita ou esquerda), respectivamente. Em particular, o parâmetro S_3 normalizado contém as informações do sinal ROA.

CAPÍTULO 7 - MATERIAIS E MÉTODOS

7. *MATERIAIS E MÉTODOS*

7.1. Materiais

Uma parte crucial na pesquisa é o desenvolvimento e a manipulação das amostras. Neste capítulo serão apresentados os métodos de preparação das amostras e suas respectivas nomenclaturas.

7.1.1. Poli (Metil metacrilato) (PMMA)

O PMMA (MW 75000) foi adquirido junto a companhia Sigma-Aldrich® num kit de polimetacrilatos CAT# 2053 e utilizou-se sem manipulação prévia.

Na preparação das amostras de PMMA foi pesado 300 *mg* de PMMA numa balança da SHIMADZU® modelo AY220 e adicionou a ele 20 *mL* de solvente, para melhor dissolução do PMMA a solução foi colocada por 5 minutos em um sonicador a 60°C e agitadas por igual período em um agitador magnético também a 60°C. Este processo foi executado para três solventes diferentes: clorofórmio, tolueno e THF. A amostra pura de PMMA foi preparada numa prensa térmica a uma temperatura de 130°C, onde 300 *mg* PMMA foi prensado formando um filme uniforme e fino. As três soluções PMMA/Clorofórmio, PMMA/Tolueno e PMMA/THF foram despejadas cada uma em uma placa Petri e foram levadas a uma estufa abrigadas da luz, à temperatura e à pressão ambiente para evaporação do solvente. Após a evaporação do solvente os PMMA's foram retirados da placa Petri e recortados para realização das medidas experimentais.

Para a retirada o solvente das amostras foi realizado um tratamento térmico, no qual as amostras foram aquecidas a uma temperatura de 130°C por um período de 24 horas. Na Tabela 10 abaixo pode-se observar o nome dado a todas as sete amostras estudadas.

Tabela 10 - Nomenclatura adotada para as amostras de PMMA.

Nomenclatura adotada	Tratamento Térmico	Solvente
PMMA_PURO	Não	Sem solvente
PMMA_CLO_STT	Não	Clorofórmio
PMMA_CLO_CTT	Sim	Clorofórmio
PMMA_TOL_STT	Não	Tolueno
PMMA_TOL_CTT	Sim	Tolueno

PMMA_THF_STT	Não	THF
PMMA_THF_CTT	Sim	THF

7.1.2. Albumina de Soro Bovino (BSA)

Como uma das vertentes do trabalho é estudar como a proteína BSA se comporta em meios com diferentes pH, necessitamos de soluções que sejam capazes de garantir que estes pH fiquem constantes durante a realização das medidas. Este tipo de solução já é bem conhecido na literatura¹⁰⁶ e são chamadas de soluções tampões. Uma solução tamponada tem variação de pH desprezível quando comparada a uma solução que não esteja tamponada. A solução tampão utilizada é composta por três tipos de sais: acetato de sódio, fosfato de sódio e tetraborato de sódio. Pode observar suas estruturas químicas na Figura 43 abaixo.

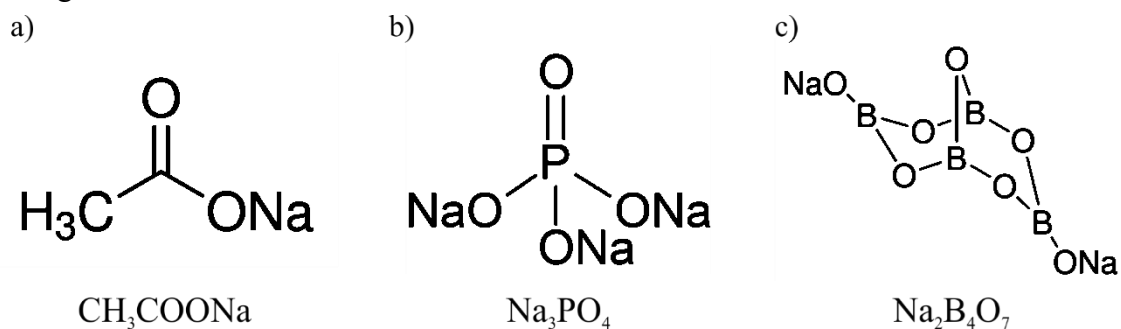


Figura 43 - Estrutura química e formula molecular dos sais a) acetato de sódio, b) fosfato de sódio e c) tetraborato de sódio.

O acetato de sódio e o tetraborato de sódio foram adquiridos da companhia Sigma-Aldrich® e seus pesos moleculares eram $82,03 \text{ g/mol}$ e $381,37 \text{ g/mol}$, respectivamente. As suas estruturas químicas e fórmulas moleculares estão ilustradas na Figura 43.a, no caso do acetato de sódio e Figura 43.c para o tetraborato de sódio. O fosfato de sódio foi obtido através da empresa Vetec Química Fina®. Seu peso molecular era $141,96 \text{ g/mol}$ e sua fórmula e estrutura molecular estão ilustradas na Figura 43.b. Estes sais foram utilizados sem nenhuma manipulação prévia.

Através de alguns testes iniciais verificou que a melhor concentração da solução tampão para o sistema de amostras era 20 mmol.L^{-1} em água ultrapura. Preparou primeiramente três soluções, uma para cada sal. O procedimento para a preparação das três amostras foi idêntico: pesou o sal, o depositou em um tubo *falcon* e completou com água ultrapura até o volume desejado (neste caso 10 mL). O tubo foi agitado até a completa dissolução do soluto. Na Tabela 11 pode-se verificar a quantidade de soluto, composição e nomenclatura adotada para cada amostra.

Tabela 11 - : Nomenclatura dada as amostras de sais e suas respectivas composições.

Nomenclatura Adotada	Composição	Massa (g)
Ac	Acetato de sódio + água	0,016406
Ph	Fosfato de sódio + água	0,027598
Br	Tetraborato de sódio + água	0,076227

Foi retirado 5 *mL* de cada solução de sal puro e foram divididas novamente em duas partes iguais (2,5 *mL* cada). Foi adicionado 100 μL de ácido clorídrico (HCl) em uma das partes de solução de sal puro e na outra adicionou-se 100 μL hidróxido de sódio (NaOH) a 3 *mol. L*⁻¹. O resumo das soluções se encontra na Tabela 12, abaixo.

Tabela 12 - Nomenclatura dada as amostras de sais com solução ácida e básica.

Nomenclatura Adotada	Composição
Ac_HCl	Acetato de sódio + água + HCl
Ph_HCl	Fosfato de sódio + água + HCl
Br_HCl	Tetraborato de sódio + água + HCl
Ac_NaOH	Acetato de sódio + água + NaOH
Ph_NaOH	Fosfato de sódio + água + NaOH
Br_NaOH	Tetraborato de sódio + água + NaOH

Para a solução tampão foi utilizado a quantidade de cada sal descrito na Tabela 11, todos foram misturados e adicionou água ultrapura para completar o volume de 30 *mL*. Dividiu-se essa amostra em 11 frascos e foram gotejados em cada frasco uma quantidade HCl ou NaOH (2 *mol. L*⁻¹) regulando os pH das soluções.

A albumina de soro bovino foi adquirida da companhia Sigma-Aldrich® (BSA, B691 – CAS 9048-46-8) e utilizada sem nenhuma manipulação.

Foi pesado 20 *mg* de BSA dentro de um frasco e completou o volume com solução tamponada até 1 *mL*. Esse procedimento foi repetido para todos os tampões com seus respectivos pH, fazendo-se assim onze soluções de BSA em pH variando de 2 a 12. Após solubilização da BSA, foi depositado por *casting*, como representado na Figura 44, um volume de aproximadamente 1 *mL* de solução no substrato de quartzo. Uma observação importante que estes filmes não secaram totalmente, a medidas foram realizadas com os filmes úmidos. A nomenclatura das amostras está representada na Tabela 13

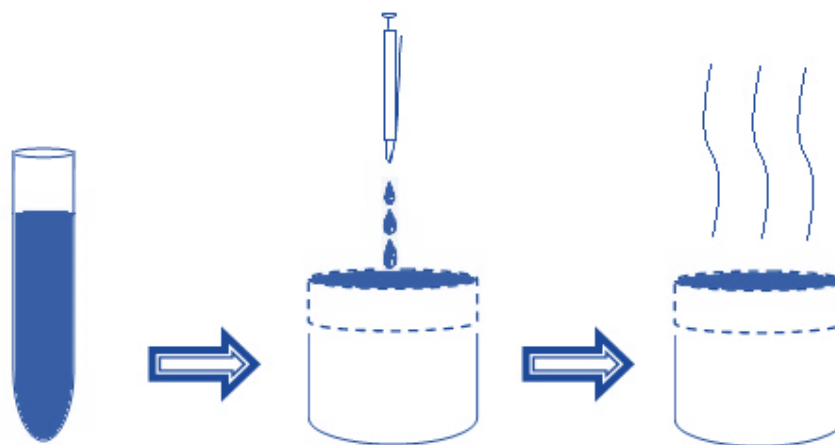


Figura 44 - Ilustração da técnica de *casting* na preparação de filmes de BSA sobre o substrato de quartzo.

Tabela 13 - Nomenclatura das amostras dos tampões e suas respectivas composições e quantidades de HCl e NaOH.

Rótulo das amostras	Composição	pH	Quantidade de HCl/NaOH em μL
BSA2	Acetato de sódio + Fosfato de sódio + Tetraborato de sódio + HCl	2	50
BSA3		3	48
BSA4		4	36
BSA5		5	35
BSA6		6	31
BSA7		6,7	20
BSA8		8	14
BSA9	Acetato de sódio + Fosfato de sódio + Tetraborato de sódio + NaOH	9	30
BSA10		10	270
BSA11		11	290
BSA12		12	340

7.1.3. SW203 e SW254

SW203 e SW254 foram os nomes dados ao oligômero e polímero, respectivamente, do monômero quiral (1R,2R)-diaminociclohexano de fórmula

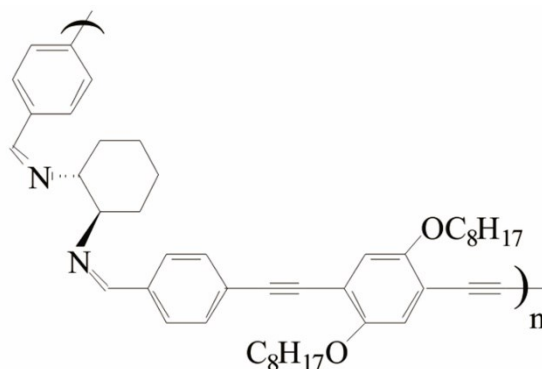


Figura 45 - Estrutura química do SW254.

molecular $C_{40}N_2O_2H_{54}$, sua estrutura química foi ilustrada na Figura 45.¹⁰⁷ As amostras foram sintetizadas no laboratório “*Hétérochimie moléculaire et macromoléculaire*” do professor Jean-Pierre Lère-Porte, situado na cidade de Montpellier na França e cedidas ao GEM (Grupo de Espectroscopia de Materiais).

Polímeros quirais estão em evidência por diversas razões, como discutido no capítulo teórico, os SW203 e SW254 são novos materiais que se enquadram na categoria de metamateriais e necessitam de um estudo completo das suas propriedades fotofísicas. Portanto iremos testar como estes se alteram variando a sua concentração no solvente, por exemplo. Essas moléculas são solúveis em tolueno, THF e clorofórmio e neste trabalho vamos utilizar o clorofórmio, mas em trabalhos futuros estão programadas as análises da influência do solvente no polímero.

Utilizou-se uma balança da SHIMADZU® modelo AY220, foram pesados 12 mg de SW203 e 7 mg de SW254 e adicionou a cada um deles clorofórmio, tendo ao final, 2 soluções bases com um volume de 1 mL cada. De cada solução base foi retirado 30 μL e colocado em outro recipiente e acrescentou mais clorofórmio até completar o volume de 3 mL, diluindo assim cada solução base em cem vezes. Destas soluções 100 vezes menos concentradas, foi retirado 150 μL e foi colocado em outro recipiente, no qual acrescentou-se mais 2850 μL , resultando em outras duas soluções, uma de SW203 e outra de SW254 agora duas mil vezes menos concentrada em relação a solução base. Para a última solução que é vinte mil vezes menos concentrada, retirou-se 300 μL , da solução anterior e acrescentou-se 2700 μL de clorofórmio. Foram produzidas por *casting* duas amostras em filme das soluções base, depositou-se 30 μL de cada solução sobre um substrato de quartzo e deixou-se as amostras no vácuo, à temperatura ambiente. A Tabela 14 abaixo resume a concentração e nomenclatura das amostras.

Tabela 14 - Nomenclatura das amostras dos SW203 e SW254 e suas respectivas concentrações.

Solução	Nome da amostra		Concentração (mg/mL)		Volume (mL)
	SW203	SW254	SW203	SW254	
Solução Base	SW203/0	SW254/0	12×10^0	7×10^0	1
1ª Solução	SW203/-2	SW254/-2	12×10^{-2}	7×10^{-2}	3
2ª Solução	SW203/-3	SW254/-3	6×10^{-3}	$3,5 \times 10^{-3}$	3
3ª Solução	SW203/-4	SW254/-4	6×10^{-4}	$3,5 \times 10^{-4}$	3

Filme	SW203F	SW254F	-	-	-
-------	--------	--------	---	---	---

7.2. Métodos

Grande parte dos equipamentos utilizados para realização deste trabalho são do grupo de espectroscopia de materiais (GEM), salvo algumas exceções, as quais são citadas no texto.

7.2.1. Espectroscopia Raman por Elipsometria (ERS)

A Figura 42 (Seção 6.4) apresenta um diagrama esquemático do aparato experimental da Espectroscopia Raman por Elipsometria (ERS), onde foram utilizados lentes, filtros, polarizador linear, monocromador e um detector CCD. Como fonte de excitação foi utilizado um laser de íons de Argônio Innova 70C da Coherent de 5 *watts* de potência no modo multilinha. No caminho óptico foi inserido um filtro de interferência em 514.5 *nm* para eliminar as linhas de plasma do laser. O porta amostra foi colocado a uma distância equivalente à distância focal da primeira lente biconvexa ($f = 20\text{ cm}$) diâmetro de 50 *mm*, a segunda lente foi alinhada a primeira e foi colocada uma distância de 20 *cm* do obturador do monocromador. Entre a lente e a CDD foram colocados uma placa quarto de onda acromática (C) montada em um goniômetro que pode girar de 0° a 360°, um polaróide acromático (P) foi fixado com seu eixo de polarização na direção vertical em relação à bancada e um filtro *notch* (514,5 *nm*) foi inserido antes da entrada do monocromador (IHR550 – Horiba) para cortar o espalhamento Rayleigh, o que nos permite fazer medidas do deslocamento Raman acima de 200 cm^{-1} . A luz espalhada pela amostra foi detectada por uma câmara CCD e analisado por um microcomputador que também controlava o sistema. A intensidade foi obtida para cada passo angular do goniômetro foi gravada através do sistema de aquisição de dados acoplado ao equipamento.

A medida do sinal equivalente ao ROA foi realizada da seguinte maneira: incidiu na amostra uma luz linearmente polarizada e através de todo o sistema que foi descrito anteriormente foi capturada intensidade do espalhamento Raman espalhado. Pela técnica de elipsometria foi necessário medir a variação da intensidade do espalhamento Raman em função do ângulo entre o quarto de onda e o polaróide (que permanece fixo), isso foi feito girando o goniômetro em passos de 40° (0°, 40°, ..., 280° e 320°). Após as nove medidas, com os dados adquiridos foram colocados e a equação (85) determina-se

univocamente os parâmetros de Stokes, estes parâmetros fornecem todos os dados sobre os estados de polarização da luz analisada. O parâmetro S_1 normalizado está relacionado com a intensidade de luz linearmente polarizada e pode ser utilizado para analisar a despolarização da luz incidente, devido ao espalhamento de luz. Os parâmetros S_2 e S_3 normalizados estão relacionados com o modo vibracional da molécula que tem polarização linear $\pm 45^\circ$ e circular a direita ou esquerda, respectivamente. Em particular, o parâmetro S_3 normalizado contém as informações do sinal ROA.

7.2.2. Absorção

Todos os espectros de absorção apresentados nesta tese foram medidos utilizando o espectrômetro UV-VIS 800 XI Femto. O espectrofotômetro capta a luz transmitida pela amostra e essa intensidade é gravada em um microcomputador através de um sistema de aquisição de dados. Antes de fazer a medida de absorção foi realizada uma varredura do espectro da lâmpada e obteve um espectro de intensidade total, o $I_0(\lambda)$. Repetiu o procedimento com a amostra e obteve o uma curva de intensidade $I(\lambda)$. De acordo com a lei de *Beer-Lambert*, essas intensidade apresentam uma relação linear com a concentração molar de acordo com a seguinte equação:⁴³

$$A(\lambda) = \log \left[\frac{I_0(\lambda)}{I(\lambda)} \right] \approx \epsilon(\lambda)Lc \quad (160)$$

onde $\epsilon(\lambda)$ é o coeficiente de absorção molar, c é a concentração molar da espécie absorvente e L é a espessura da amostra (comprimento percorrido pela luz). Se houver formação de agregados em altas concentrações ou a presença de alguma espécie eletroativa, a relação entre absorbância e concentração deixa de ser linear, invalidando a lei de *Beer-Lambert*.

7.2.3. Fotoluminescência (PL) e Fotoluminescência de Excitação (PLE)

A fotoluminescência (PL) é um fenômeno físico da interação da luz com a matéria, o qual um elétron pertencente a uma cadeia polimérica absorve um fóton de energia igual ou superior à energia que separa o máximo e o mínimo das superfícies de energia potencial das bandas π e π^* , respectivamente. Esta absorção faz surgir um buraco na banda π e um elétron na banda π^* . Via processos não radioativos, o elétron e o buraco

relaxam para o fundo da banda π^* e para o topo da banda π , respectivamente. Eles podem se recombinarem e emitir um fóton de energia igual ou inferior à do fóton absorvido inicialmente.²⁹

Fotoluminescência de excitação (PLE) é um caso particular da PL e é utilizada para investigar a estrutura eletrônica de materiais com baixa absorção, pois apresenta relação sinal-ruído superior comparado às medidas de absorção. Nas medidas de PLE a amostra foi excitada com frequência de luz variadas e a luminescência foi monitorada no comprimento de onda de emissão típicas do material investigado (λ_d). Picos nos espectros de PLE frequentemente representam linhas de absorção do material. Os espectros de PLE analisados neste trabalho foram obtidos em um espectrofluorímetro Shimadzu RF-5301PC, pertencente ao Laboratório de Novos Materiais Isolantes e Semicondutores (LNMIS), no Instituto de Física na Universidade Federal de Uberlândia.

7.2.3.1. Rendimento quântico de luminescência

O rendimento quântico de luminescência (η) é um parâmetro espectroscópico muito importante para o entendimento dos conceitos físicos intrínsecos dos materiais, no qual pode-se relacionar os processos de excitação com este rendimento.¹⁰⁸ O rendimento quântico de luminescência (η) é a razão entre o número de fótons emitidos (N_E) e o número de fótons absorvidos (N_A) por um material sob excitação óptica, como esta descrito na equação (161), abaixo.

$$\eta = \frac{N_E}{N_A} \quad (161)$$

7.2.4. Elipsometria de Emissão (EE)

A elipsometria de emissão (EE) é todo o estudo mostrado no capítulo de elipsometria analisando o fenômeno de emissão. Para realizar essas medidas foi montado um *setup* como pode ser visto na Figura 46. Ele é composto por uma fonte de luz FL-1039/40 de 450 W da *Horiba Jobin Yvon*®, um monocromador iHR320 *Horiba Jobin Yvon*®, quatro lentes biconvexas, dois polarizadores lineares acromáticos, uma placa um quarto de onda acromática, um porta amostra e um espectrofotômetro USB2000 *Ocean Optics*®. A luz proveniente do conjunto fonte de luz/monocromador atravessou um polarizador linear acromático, ficando polarizada em uma determinada direção, e foi guiada por um conjunto de lentes até a amostra. A luz emitida pela amostra foi guiada por outro conjunto de lente até o espectrofotômetro. Entre a última lente e o

espectrofotômetro a luz emitida passou por uma placa um quarto de onda acromática, para realizar a variação do ângulo de polarização e por um outro polarizador linear acromático, como pode ser observado na figura abaixo.

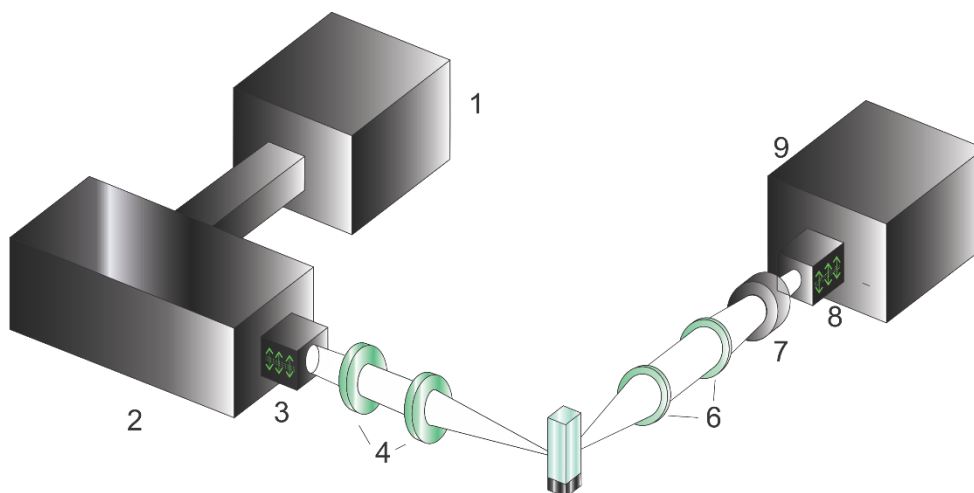


Figura 46 - Diagrama esquemático do aparato experimental da Elipsometria de Emissão (EE): (1) fonte de luz, (2) monocromador, (3) polarizador linear acromático, (4) conjunto de lentes para focar a luz, (5) porta amostra, (6) conjunto de lentes para focar o feixe de luz emitido pela amostra, (7) placa um quarto de onda acromática, (8) polarizador linear acromático, (9) detector.

7.2.5. Dicroísmo Circular de Emissão (CDE)

A técnica de dicroísmo circular de emissão (CDE) foi uma alternativa criada para se medir o dicroísmo circular sem um espectrômetro para CD. Realiza-se a EE de emissão e analisa-se o parâmetro g , que está relacionado a diferença de luz circularmente espalhada a direita e a esquerda, em função do comprimento de onda de excitação no pico máximo da PL. Este sinal é proporcional ao sinal de CD.

7.2.6. Difração de Raio-X

A difração de raio X é uma das técnicas mais utilizadas para o estudo de estruturas poliméricas.¹⁰⁹ Um feixe de raios X é incidido em um material, uma parte deste feixe é absorvido pela amostra, outra é espalhada e o restante é transmitido sem nenhuma alteração. Os raios X interagem com os elétrons do material, estes elétrons espalham esse feixe em um padrão de difração que varia com o ângulo de espalhamento. A variação da intensidade espalhada e difratada com o ângulo dá informações sobre a distribuição de densidade eletrônica e, portanto, das posições atômicas dentro do material.¹⁰⁹

Os raios X foram descobertos por Wilhelm Rontgen em 1895 e em 1912 Max Von Laue efetuou estudos sobre a difração de raios X em cristais comprovando o caráter ondulatório dos raios X, podendo ser definidos agora como ondas eletromagnéticas com comprimento de onda que variam de 0,1 a 100 Å. Todo este estudo despertou interesse de dois físicos ingleses, W. H. Bragg e W. L. Bragg, pai e filho respectivamente, que empregaram a radiação X monocromática, variando os ângulos de incidência até obter máximos principais. Eles imaginaram que cada plano paralelo e equidistante da rede atômica pudesse refletir os raios X incidentes, ou seja, que a luz incidida em um átomo desse plano como um ângulo θ seja refletida com o mesmo ângulo, como mostrado na Figura 47. Para que haja interferência construtiva das reflexões dos planos, que distam entre si um valor d , é preciso que a diferença de caminho $2d\sin\theta$ seja múltiplo inteiro de λ , como pode ser visto na equação (162).¹¹⁰

$$n\lambda = 2d\sin\theta \quad (162)$$

No cálculo da intensidade da difração, cada átomo pode ser considerado como um centro espalhador, considerando os elétrons simetricamente distribuídos em torno do núcleo. O fator de espalhamento de um átomo depende do seu número atômico Z e varia com $\sin(2\theta)/\lambda$, onde 2θ é o ângulo entre os feixes transmitidos e difratados e λ é o comprimento de onda da fonte de radiação, possibilitando assim a técnica de difração de raios X resolver problemas envolvidos na determinação de estruturas cristalinas.¹¹⁰

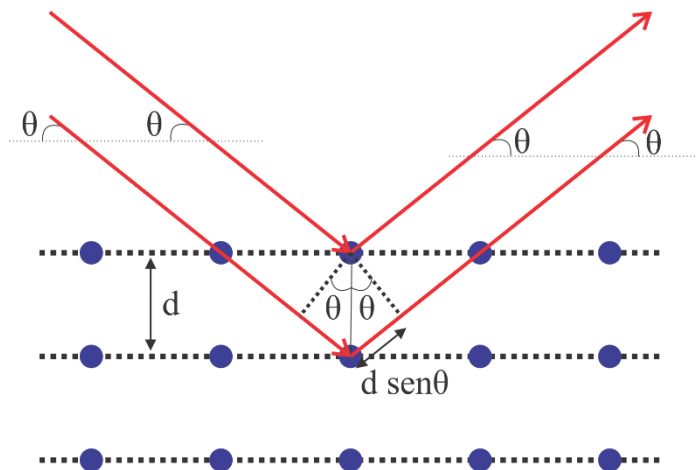


Figura 47 - Reflexão espacial.

*CAPÍTULO 8 - RESULTADOS E
DISCUSSÕES*

8. *RESULTADOS E DISCUSSÕES*

O estudo das propriedades fotofísicas é de suma importância para diversas áreas de pesquisa, fornecendo informações desde a sua estrutura eletrônica até mudanças estruturais na sua cadeia molecular. Devido a essa vasta gama de informações, neste capítulo será apresentado o estudo fotofísico de três materiais totalmente distintos, o PMMA, os polímeros quirais e a BSA. Para realização desse estudo, foram utilizadas técnicas já conhecidas da literatura, como espectroscopia de raio X, fotoluminescência, entre outras. Mas também foi utilizada uma técnica inovadora e que demonstra um grande poder de caracterização das amostras, o ERS, desenvolvida pelo autor deste trabalho com a ajuda de colaboradores.

8.1. PMMA

8.1.1. Medidas de Absorção

A Figura 48 mostra os espectros de absorção dos filmes de PMMA, em todos eles aparecem a absorção do PMMA, para comparação. A Figura 48.a é referente as amostras de PMMA com clorofórmio, a Figura 48.b com tolueno e a Figura 48.c com THF.

Observamos que em relação ao PMMA puro, ou seja, na forma recebida do fornecedor, a mistura e formação dos filmes não altera significativamente os espectros para a região acima dos 300 *nm*. O que mostra que os solventes, apesar de estarem presentes nos filmes seu tratamento térmico não altera a suas estruturas. Além disso, após o tratamento térmico mais comum encontrado na literatura, as bandas dos solventes ainda são observadas. Veja as bandas entre 250 e 375 *nm*. Podemos então afirmar que o tratamento térmico proposto é incapaz de remover efetivamente o solvente residual durante a secagem dos filmes. A questão relevante é entender, então, qual a interação do solvente-polímero.

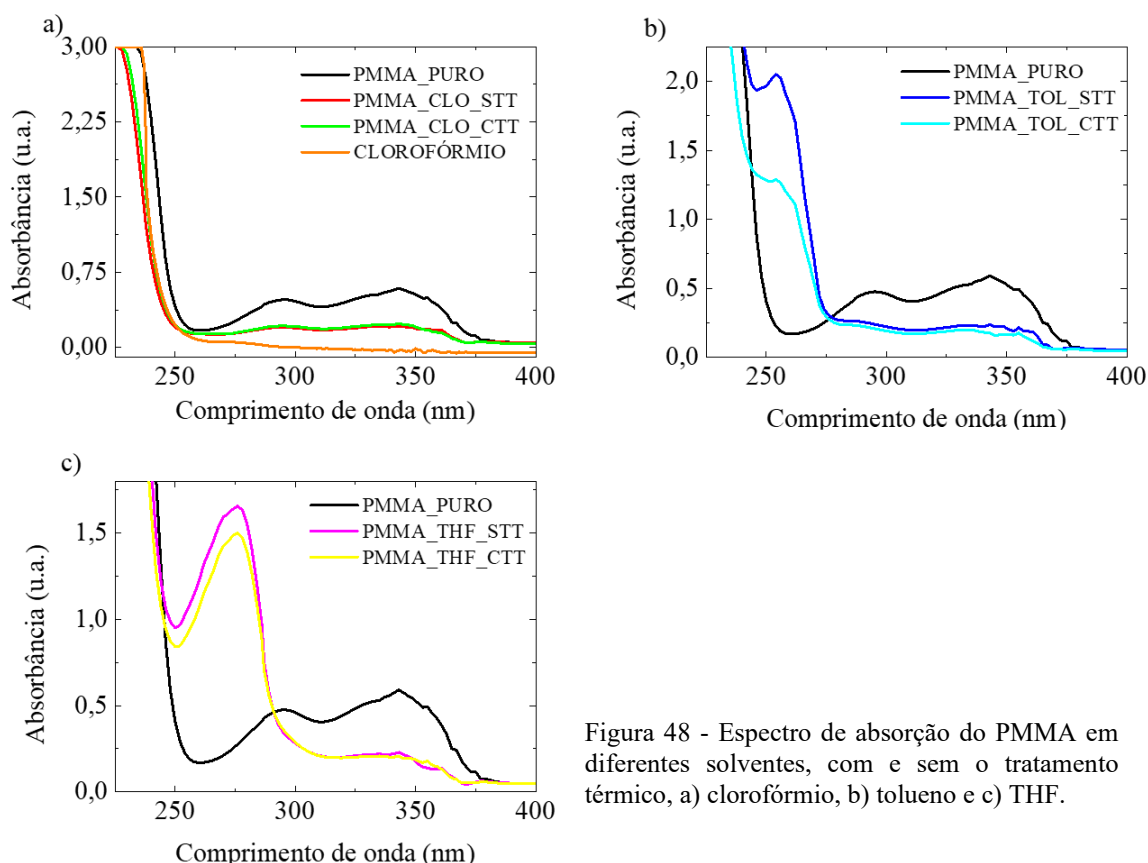


Figura 48 - Espectro de absorção do PMMA em diferentes solventes, com e sem o tratamento térmico, a) clorofórmio, b) tolueno e c) THF.

8.1.2. Medida de Difração de Raio X

Uma das áreas com maior interesse nos materiais amorfos é a inhomogeneidades locais, ou seja, o quanto esses materiais são diferentes em uma pequena região da amostra. Entender essas pequenas regiões é o segredo para compreender as propriedades macroscópicas deles. No caso deste trabalho, pode definir se há mudanças estruturais nas matrizes poliméricas do PMMA devido a uma alteração físico-química. Um modelo teórico já bem estabelecido são os dos polímeros com uma espinha dorsal e cadeias

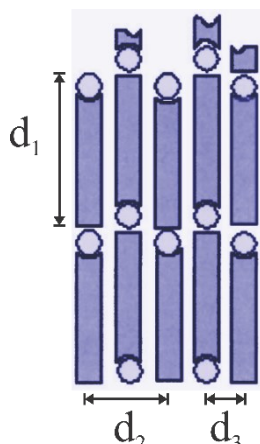


Figura 49 - Modelo de empacotamento de materiais em monocamada *backbone*, onde d_1 é o comprimento do ramo lateral, d_2 está associado a distância entre três cadeias sucessivas e d_3 é a distância entre duas cadeias subsequentes. Figura adaptada da referência [112].

laterais flexíveis em monocamada *backbone*, conhecidos como polímeros *hairy roads*. Abaixo está ilustrado, na Figura 49, o modelo de empacotamento em monocamadas *backbone*.¹¹¹

A Figura 50 mostra os difratogramas de raios-x obtidos de filmes do polímero PMMA em diversos solventes, antes e após o tratamento térmico. Como pode-se observar o comprimento do ramo lateral é semelhante à distância entre duas cadeias consecutivas, indicado por d_1/d_2 , e a distância d_3 , distância entre duas cadeias sucessivas, não tem o pico muito definido, todos estes dados estão de acordo com a literatura.¹¹¹ Na Figura 50.a, Figura 50.b e Figura 50.c pode-se observar um deslocamento para a direita de todos os picos relacionados aos comprimentos d_1/d_2 e d_3 , para as respectivas amostras, PMMA_CLO_STT, PMMA_TOL_STT e PMMA_THF_STT o que era esperado, pois elas não passaram por tratamento térmico, comprovando a interação ou presença do solvente com a matriz polimérica aumentando todas as suas dimensões. Ao realizar o tratamento térmico (PMMA_CLO_CTT, PMMA_TOL_CTT e PMMA_THF_CTT) observa-se que o pico d_1/d_2 , retorna ao mesmo lugar de origem, mas o pico relacionado ao comprimento d_3 , continua deslocado para a direita, comprovando que ainda há moléculas de solventes próximos aos ramos laterais do PMMA. Mas é interessante analisar que cada solvente, de acordo com a Figura 50, deve possuir um grau diferente de interação. Os picos nas amostras diluídas em clorofórmio (Figura 50.a) têm um deslocamento para direita mais evidente que no tolueno (Figura 50.b) e no THF (Figura 50.c), conseqüentemente após o tratamento térmico a amostra que apresenta maiores distâncias d_1 , d_2 e d_3 é a dissolvida em clorofórmio.

Concluimos deste estudo que apesar dos três solventes serem ótimos solventes para o PMMA, de acordo com a Tabela 4 (Seção 5.1.2), o clorofórmio apresentou a maior interação com a matriz polimérica.

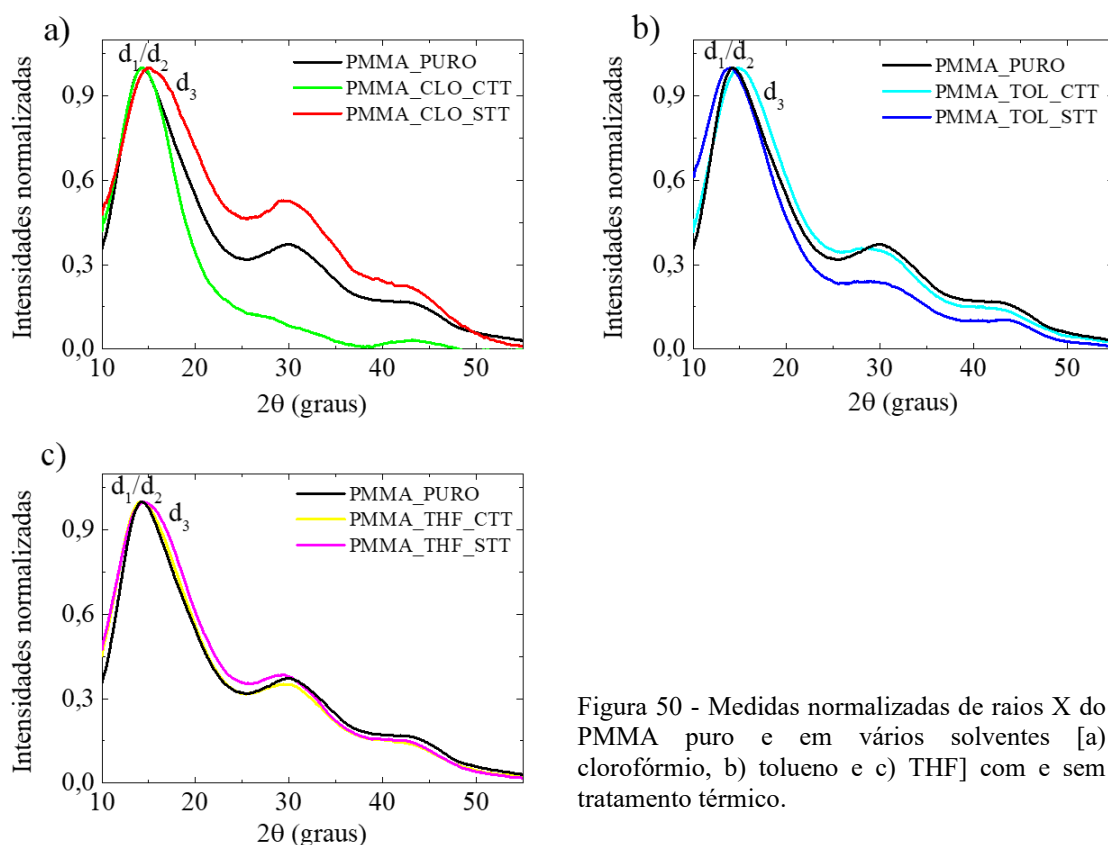


Figura 50 - Medidas normalizadas de raios X do PMMA puro e em vários solventes [a) clorofórmio, b) tolueno e c) THF] com e sem tratamento térmico.

8.1.3. Medidas de espalhamento Raman

Como visto anteriormente o espalhamento Raman é uma medida para caracterização estrutural de materiais.¹¹² A estrutura química do PMMA pode ser vista na Figura 51, abaixo.

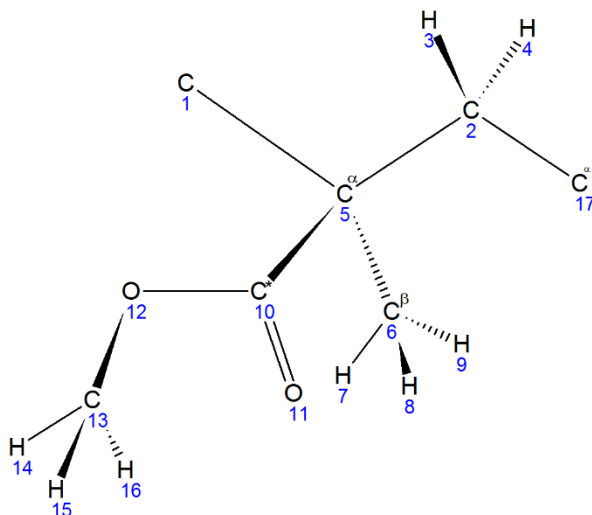


Figura 51 - Unidade estrutural do PMMA, com os átomos numerados.

Cada frequência de vibração da molécula está relacionada a uma ligação, ou a um conjunto delas, e tem seu respectivo pico em um espectro Raman². A Figura 52 mostra o

espectro Raman do PMMA puro. Nós observamos que os picos na faixa de 2800 – 3100 cm^{-1} são referentes as vibrações $C - H$ associadas aos ramos CH_2 e CH_3 . O pico associado ao estiramento $C = O$ aparece por volta de 1720 cm^{-1} ; flexão $C - H$ em 1460 cm^{-1} ; estiramento $C - O$ na faixa de 990 – 1270 cm^{-1} e balanço do CH_3 em 816 cm^{-1} . O primeiro pico em 597 cm^{-1} é referente ao estiramento $C - C$. A Tabela 15 resume os modos vibracionais com seus respectivos picos.

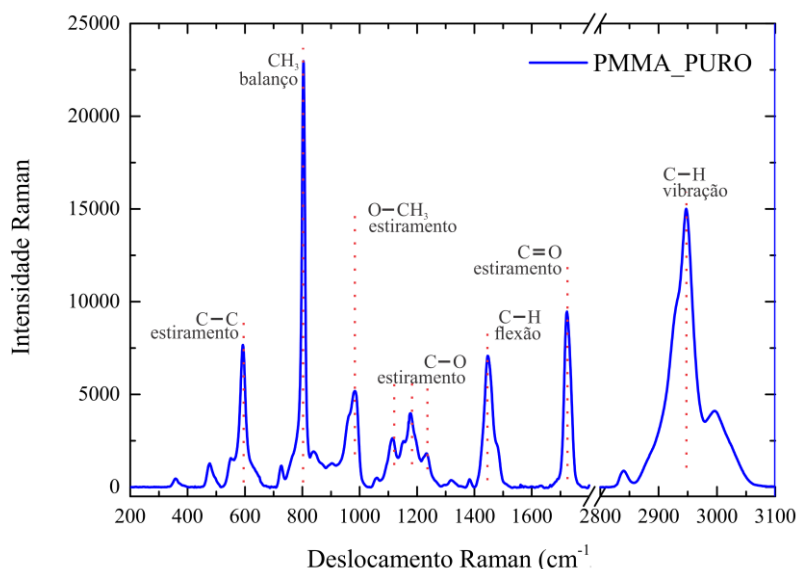


Figura 52 - Espectro Raman do PMMA.

Tabela 15 - Modos vibracionais do PMMA.

Deslocamento Raman (cm-1)	Modos Vibracionais
597	Estiramento $C - C$
816	Balanço do CH_3
990	Estiramento $C - O$
1177	Estiramento $C - O$
1460	flexão $C - H$
1720	estiramento $C = O$
2946	vibrações $C - H$

Como pode ser observado na **Erro! Fonte de referência não encontrada.**, os p icos Raman dos solventes coincidem com alguns picos Raman do PMMA, por exemplo, os picos da região entre 2800 – 3100 cm^{-1} , que são referentes as vibrações $C - H$ associadas aos ramos CH_2 e CH_3 , pois todos os solventes apresentam picos correspondentes nessa região. Outra região que sofre muita influência é $\sim 1000 \text{ cm}^{-1}$,

onde o THF apresenta um pico muito acentuado relacionado a vibração $C - O$ e a região em torno do pico 1200 cm^{-1} , corresponde a vibração CH_3 do tolueno.

Os espectros Raman de todas as amostras foram medidos a temperatura ambiente e mostram pequenas variações em suas intensidades, comparando com as amostras sem e com tratamento térmico, isso ocorre por causa da presença do solvente nas amostras sem tratamento térmico, induzindo um efeito plastificante no polímero¹¹³, aumentando assim a intensidade do espalhamento Raman. No espectro Raman de todas as amostras observa-se a mudança de intensidade dos picos na região $900\text{ a }1600\text{ cm}^{-1}$, como pode ser visualizado na Figura 54, provando a presença de todos os solventes e a interação com o grupo acrilato¹¹³ do PMMA. No caso da região $2800 - 3100\text{ cm}^{-1}$, devido a forte presença de picos do solvente, o que podemos afirmar é que o decréscimo da intensidade é devido ao tratamento térmico realizado nas amostras, eliminando quase a totalidade do solvente.

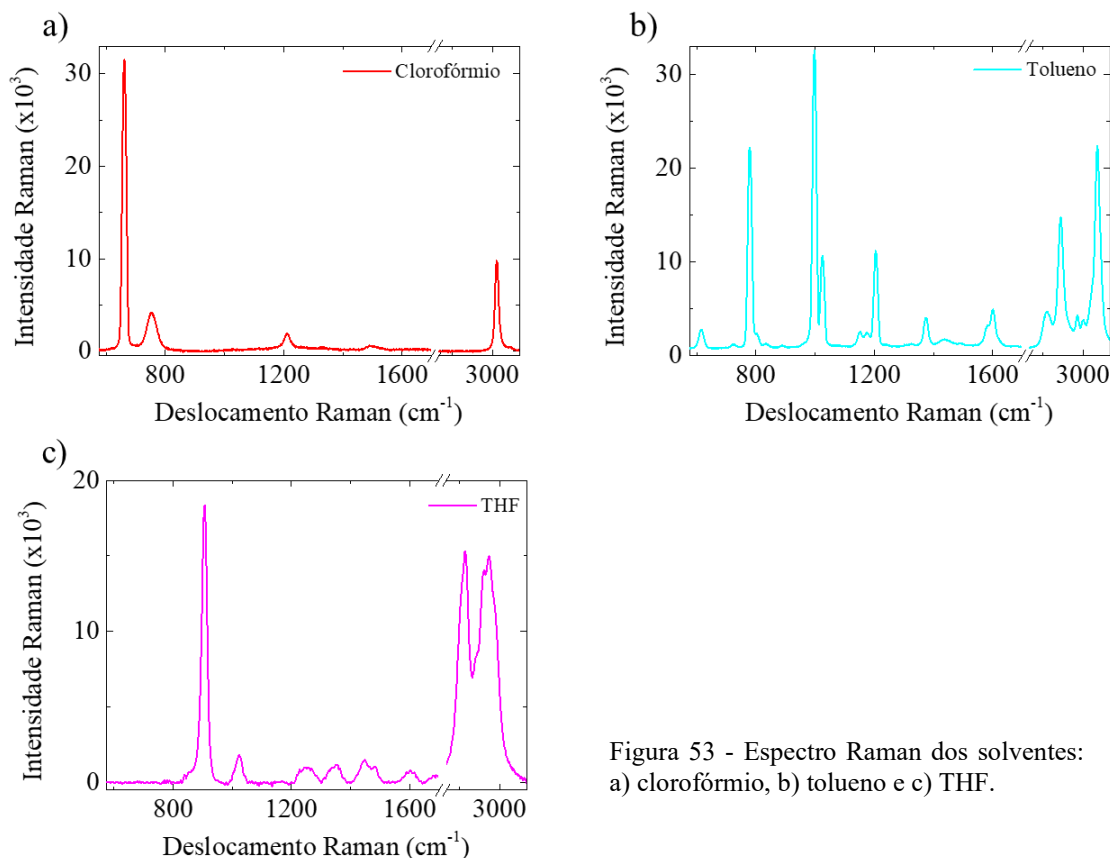


Figura 53 - Espectro Raman dos solventes: a) clorofórmio, b) tolueno e c) THF.

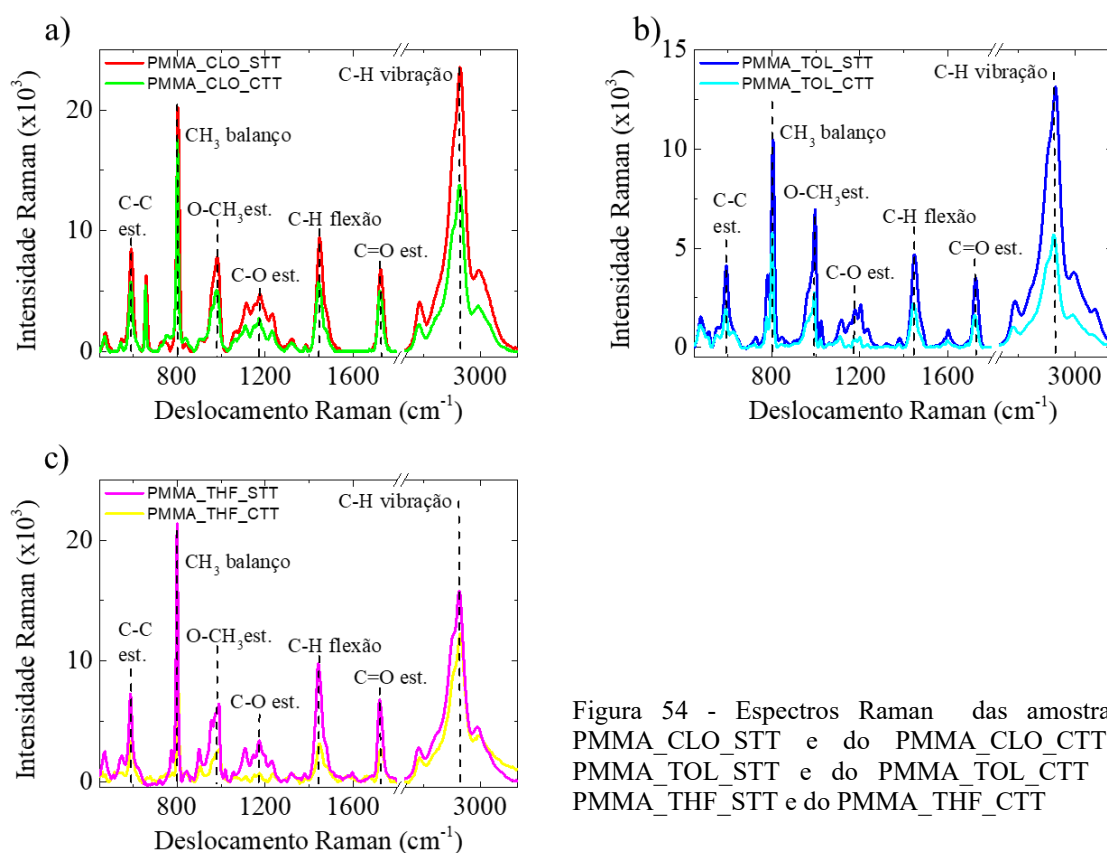


Figura 54 - Espectros Raman das amostras a) PMMA_CLO_STT e do PMMA_CLO_CTT, b) PMMA_TOL_STT e do PMMA_TOL_CTT e c) PMMA_THF_STT e do PMMA_THF_CTT

8.1.4. Medidas de espectroscopia Raman por elipsometria

Como já apresentado no capítulo 7, na seção métodos, a técnica ERS é realizada através de nove medidas da $I(\theta, \lambda)$ [equação (79) - $\theta = 0, 40, \dots, 320^\circ$] do sinal Raman da amostra. Através destas medidas calcula-se os parâmetros de Stokes [eq. (81), (82), (83), e (84)] não normalizados e normalizados pela intensidade total (S_0). Através da manipulação dos parâmetros de Stokes, pode se calcular o grau de polarização, P - equação (74), anisotropia, r - equação (88) e assimetria, g - equação (89). Tais parâmetros serão de suma importância para elucidação dos resultados. As medidas com a técnica ERS foram realizadas variando a temperatura em um passo de 30K em todas as amostras. Na amostra PMMA_PURO pode-se observar (Figura 55) que os parâmetros p , g , r e S_0 são aproximadamente constantes em todas as medidas em função da temperatura. Quando se adiciona um solvente no PMMA estas propriedades não se mantêm constantes, variando de solvente para solvente, devido a interação do mesmo com o polímero.

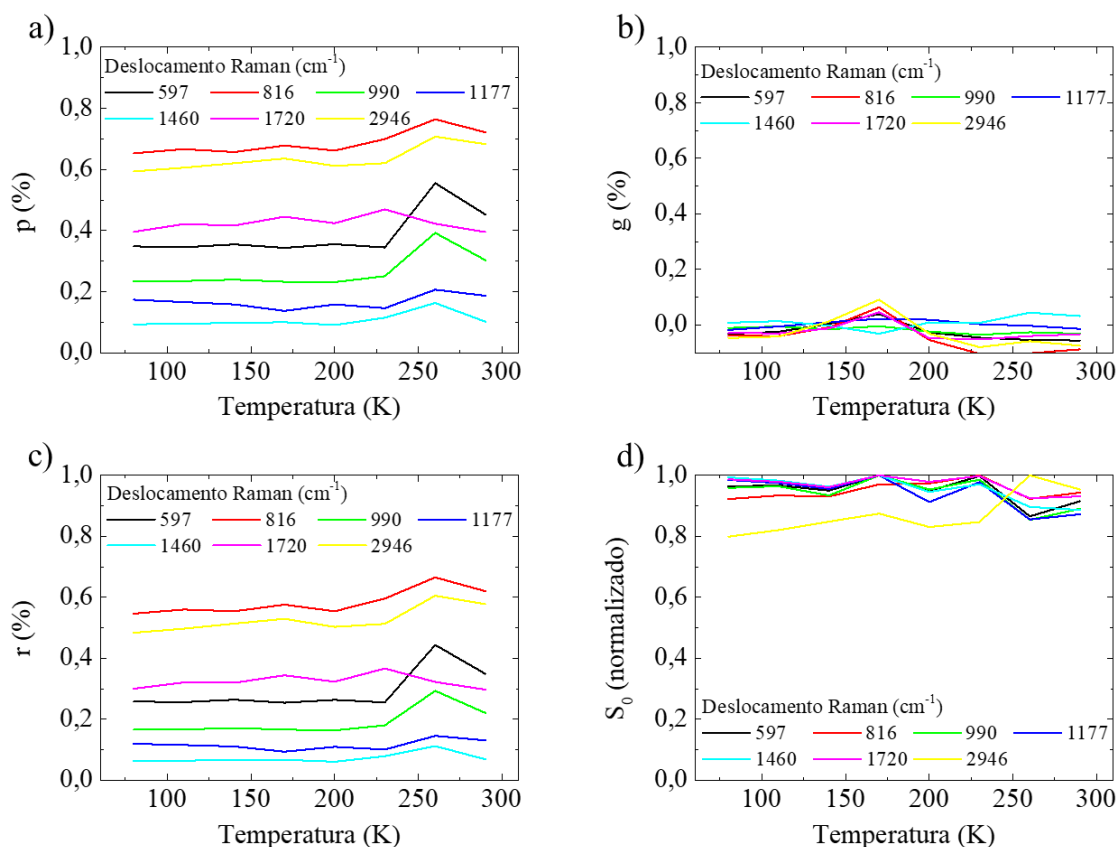


Figura 55 - Espectros dos parâmetros a) p , b) g , c) r e d) S_0 , extraídos pela técnica ERS em função da temperatura do PMMA_PURO.

Na amostra PMMA_CLO_STT, como pode ser observado na Figura 56, já não seguem o resultado do polímero puro, observa-se um ponto de inflexão na região próxima a 140K, podemos então afirmar que deve estar ocorrendo uma mudança estrutural em

toda a cadeia polimérica, pois todos os picos vibracionais foram alterados, mudando, assim, as características físicas do PMMA. Como pode ser observado na Figura 56.a, o grau de polarização p foi reduzido em quase todos os picos de deslocamento Raman, principalmente os picos referentes aos ramos laterais, como o 816 cm^{-1} e o 2946 cm^{-1} , isto se deve pois por volta de 140K é a temperatura de relaxação γ , a estrutura do PMMA se movimenta, mas como o solvente está interagindo com as cadeias laterais, há uma quebra de simetria local, provocando a queda da polarização. Como a simetria é quebrada, pode-se observar na Figura 56.b, o surgimento de um pico, na região dos 140K , indicando um ponto de assimetria, uma desordem apresentada pela interação do clorofórmio com o ramo lateral do PMMA. A anisotropia do PMMA também se altera na temperatura de 140K , como demonstrado na Figura 56.c, portanto o clorofórmio interage com o PMMA anisotropicamente. A Figura 56.d, mostra a intensidade total de luz polarizada espalhada pela amostra, podemos observar um aumento em 140K , temperatura de relaxação γ e outra em 240K , relacionada a relaxação β . Elas só são evidenciadas pela interação do clorofórmio com o PMMA, todos esses efeitos são causados pela ligação do clorofórmio as cadeias laterais.

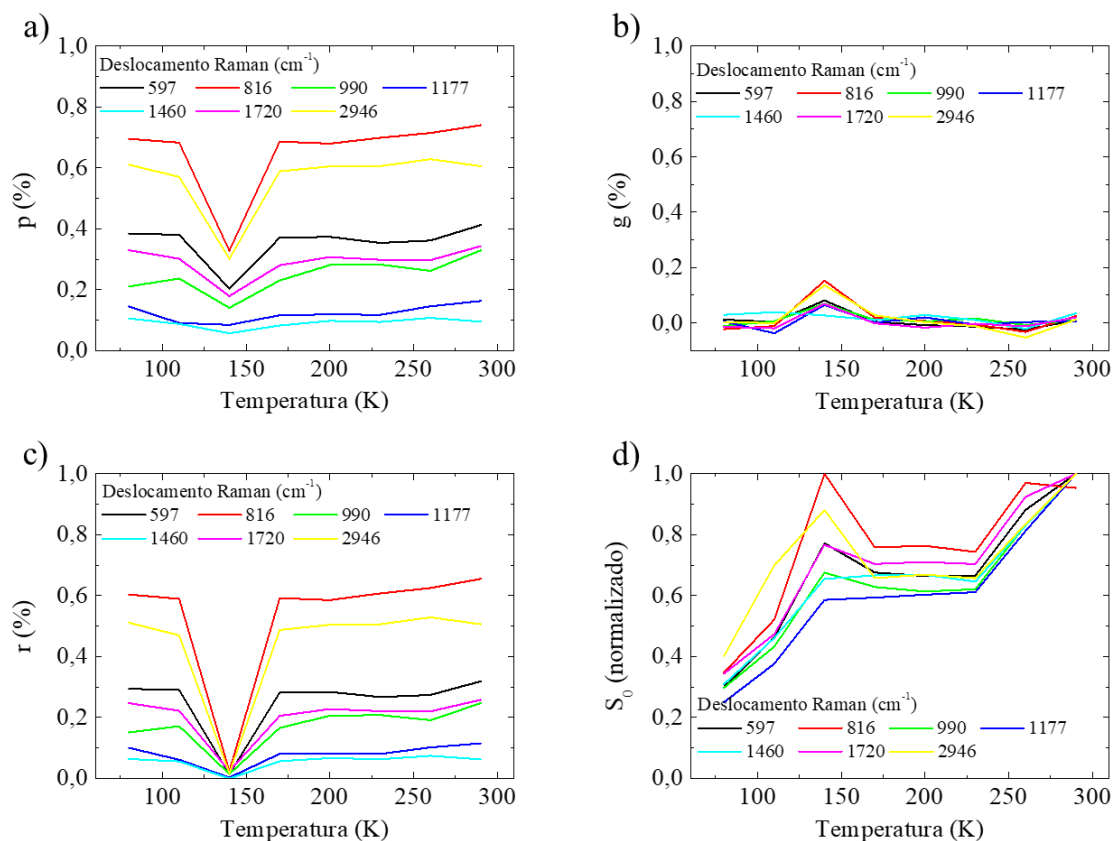


Figura 56 - Espectros dos parâmetros a) p , b) g , c) r e d) S_0 , extraídos pela técnica ERS em função da temperatura do PMMA_CLO_STT.

Na amostra PMMA_CLO_CTT, a qual passou por um tratamento térmico, não apresenta os efeitos da amostra sem tratamento térmico, como pode ser observado na Figura 57. Podemos assim afirmar que a quantidade de clorofórmio residual observado e nos espectros de absorção no filme de PMMA_PURO, não é significativo, compare a dependência com a temperatura dos parâmetros de Stokes entre as Figura 55 e Figura 57.

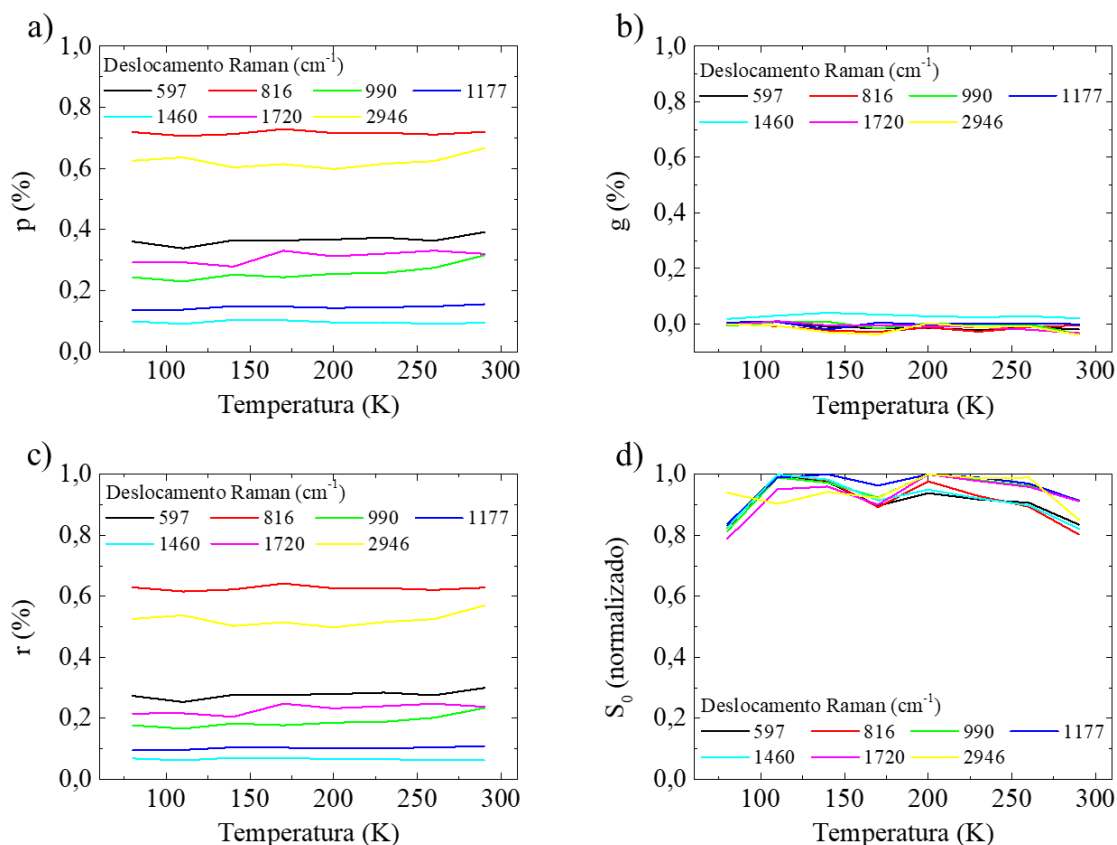


Figura 57 - Espectros dos parâmetros a) p, b) g, c) r e d) S_0 , extraídos pela técnica ERS em função da temperatura do PMMA_CLO_CTT

Pode-se observar nas medidas de ERS realizadas na amostra PMMA_THF_STT, que o THF interage tanto nas cadeias laterais do PMMA (picos 816 cm^{-1} , 2946 cm^{-1} e 1720 cm^{-1}) quanto na deia principal (pico 597 cm^{-1}). Podemos verificar essa interação na Figura 58. A análise do porque os parâmetros apresentam essas características são idênticas a da amostra que apresenta característica parecida com a amostra PMMA_CLO_STT. Pode-se concluir que as alterações nas propriedades do PMMA são causadas pela sua interação com o THF, tal como os mesmos efeitos causados pelo clorofórmio, isso se deve pois ambos solventes interagem com o polímero de forma anisotrópica, como pode ser observado na Figura 58.c.

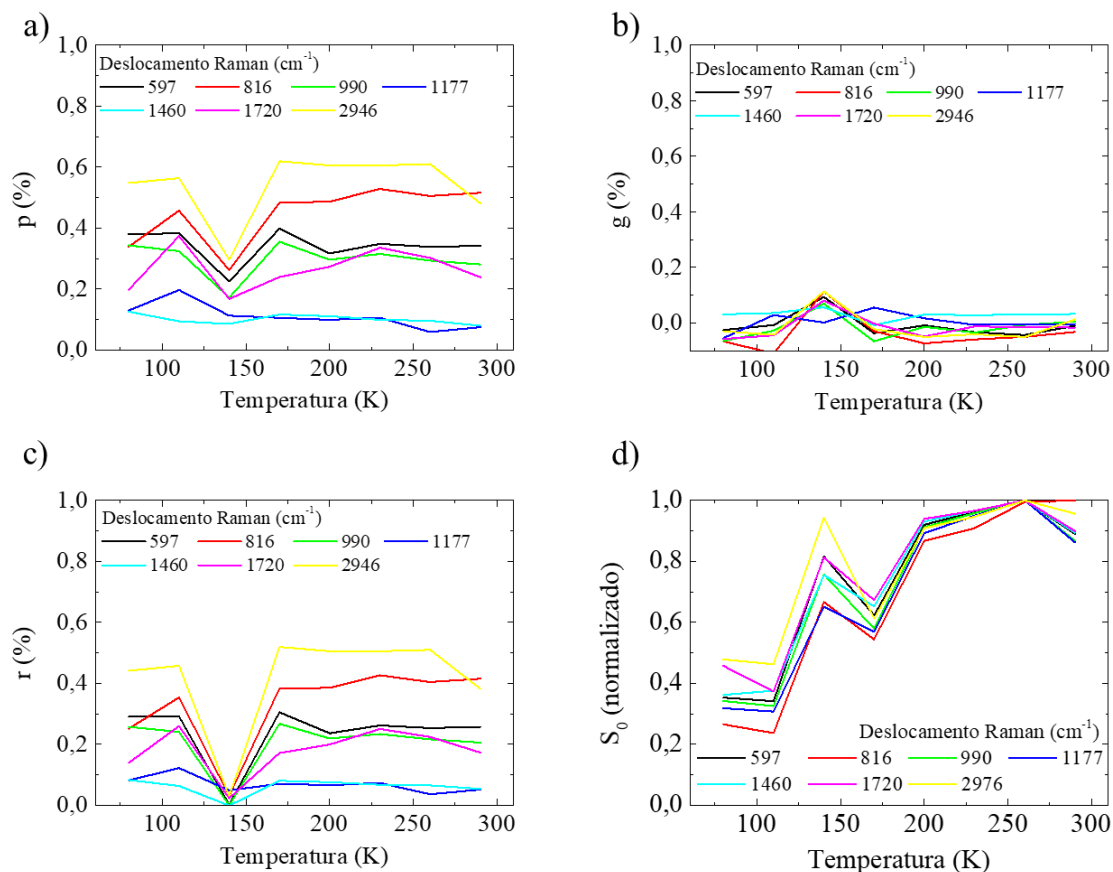


Figura 58 - Espectros dos parâmetros a) p, b) g, c) r e d) S_0 , extraídos pela técnica ERS em função da temperatura do PMMA_THF_STT.

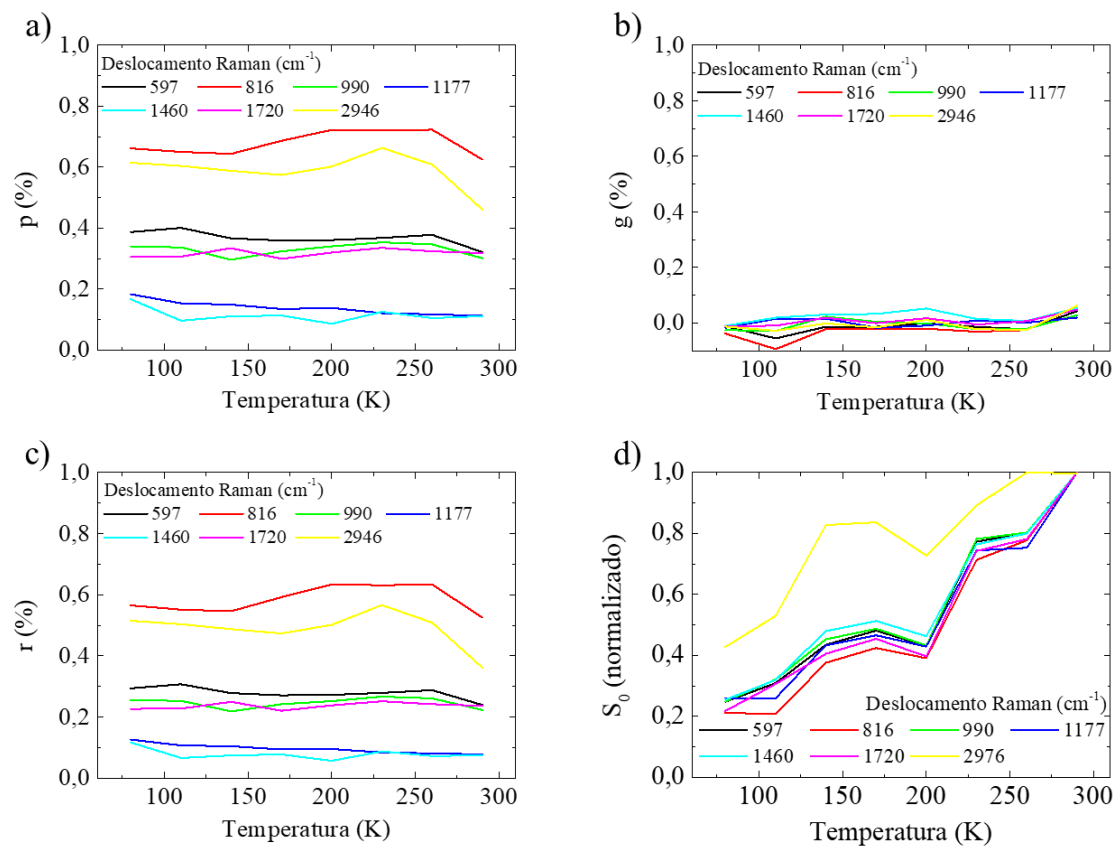


Figura 59 - Espectros dos parâmetros a) p, b) g, c) r e d) S_0 , extraídos pela técnica ERS em função da temperatura do PMMA_THF_CTT.

Ao realizar o tratamento térmico verificamos que a amostra PMMA_THF_CTT, retornou novamente as características do PMMA_PURO, como foi o caso da amostra PMMA_CLO_CTT. Isso se deve à ausência de solvente, ou seja, baixa concentração, na amostra após o tratamento térmico. Pode-se verificar na Figura 59, que todos os parâmetros do ERS retornaram para o padrão do polímero puro, exceto o S0, Figura 59.d, isso ocorreu devido a interação do THF nas cadeias laterais e principal, mudando possivelmente a conformação do PMMA.

O último conjunto de amostras a ser analisado são os PMMA_TOL_STT e PMMA_TOL_CTT. Apesar do tolueno ser um excelente solvente para o PMMA, como já estudado na literatura e ser um solvente polar como o THF, ele diferentemente dos solventes anteriores interage com o PMMA de forma isotrópica. O tolueno não quebra a simetria local da molécula e não altera sua conformação. Isso pode ser comprovado comparando as figuras Figura 60 e Figura 61 com a Figura 55, observando-se nenhuma mudança do padrão entre os parâmetros de Stokes das amostra contendo a mistura PMMA com tolueno da amostra que contém somente PMMA.

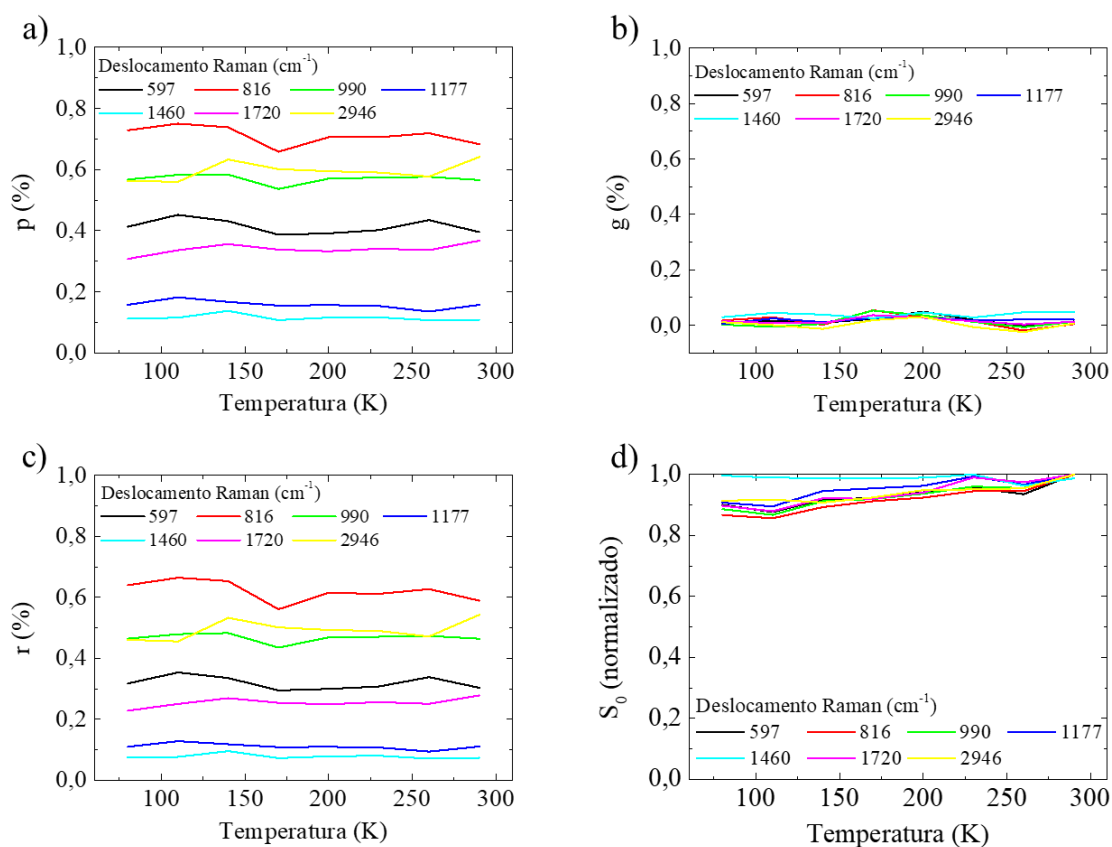


Figura 60 - Espectros dos parâmetros a) p, b) g, c) r e d) S0, extraídos pela técnica ERS em função da temperatura do PMMA_TOL_STT.

Com o intuito de corroborar com os resultados apresentados, foi realizado um ERS dos solventes comprovando que eles puros não possuem nenhuma influência nas medidas, como podemos observar na Figura 62.

Pode-se observar a capacidade da técnica ERS de identificar a anisotropia local no PMMA, outro ponto é a precisão para a identificação da presença ou não de solvente na amostra.

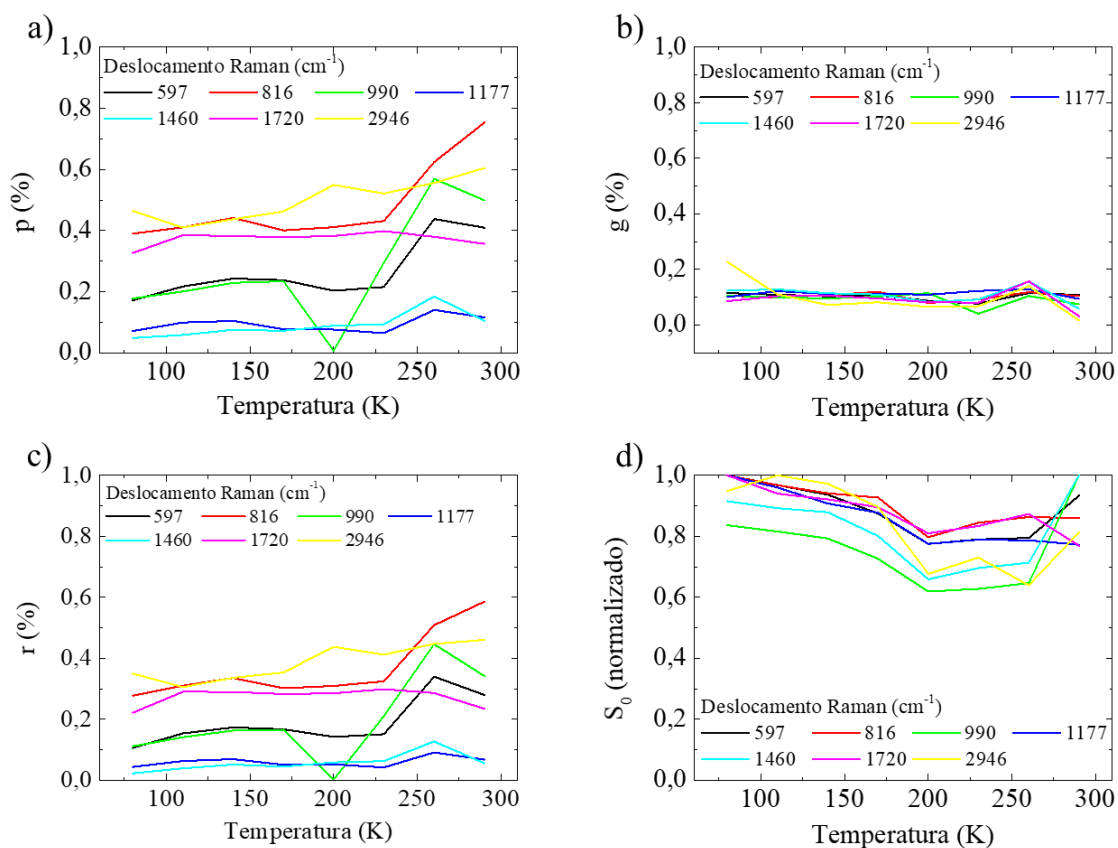


Figura 61 - Espectros dos parâmetros a) p , b) g , c) r e d) S_0 , extraídos pela técnica ERS em função da temperatura do PMMA_TOL_CTT.

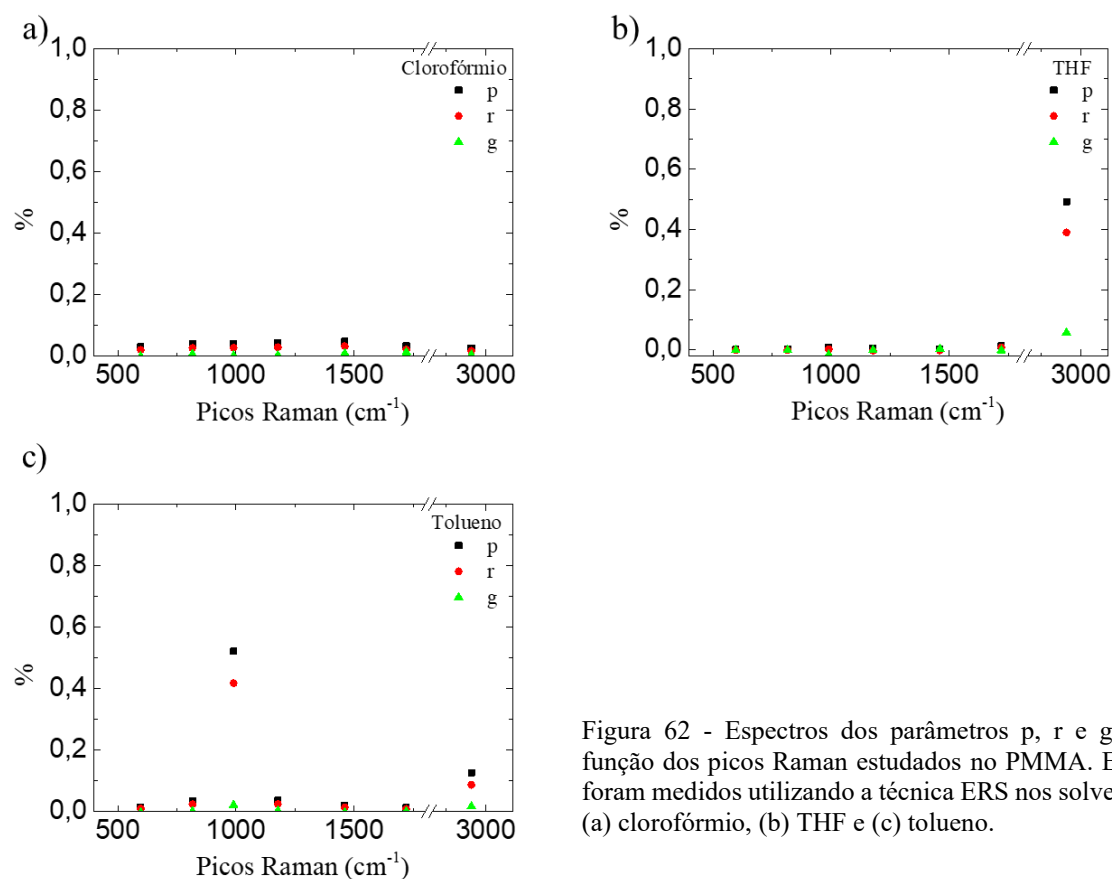


Figura 62 - Espectros dos parâmetros p, r e g em função dos picos Raman estudados no PMMA. Estes foram medidos utilizando a técnica ERS nos solventes (a) clorofórmio, (b) THF e (c) tolueno.

8.2. BSA

Antes de começar qualquer análise é importante analisar como a solução tampão irá interferir na análise das medidas. Para tal objetivo foi realizado medidas Raman da solução tampão (Figura 64.a) e da amostra BSA7 (Figura 64.b). Também foi realizado as medidas de espalhamento Raman para cada sal em separado, estas estão no anexo I. Ao comparar as duas figuras observa-se que os picos Raman da solução tampão estão presentes no espectro Raman da proteína BSA tamponada em pH 7, como era de se esperar. Cada pico tem uma assinatura como pode ser observado na Tabela 16 para a proteína BSA e na Tabela 17 para a solução tampão.

A análise do espectro Raman nos picos sobrepostos de BSA e solução tampão fica prejudicada, para contornar este problema, as medidas realizadas abaixo serão sensíveis, na maioria dos casos, as moléculas que apresentam atividade óptica, como são os aminoácidos que estão presentes na BSA devido seu carbono quiral (C_α). A solução tampão é composta por três sais, o acetato de sódio, fosfato de sódio e o tetraborato de sódio os quais não são quirais, portanto são invisíveis para o CD e para o parâmetro g da técnica ERS, como pode ser observado na Figura 63, o sinal do parâmetro g é praticamente zero em todos os deslocamentos Raman. Assim podemos afirmar que as

contribuições para o sinal ERS da BSA será apenas da contribuição advinda do C_{α} que a compõem.

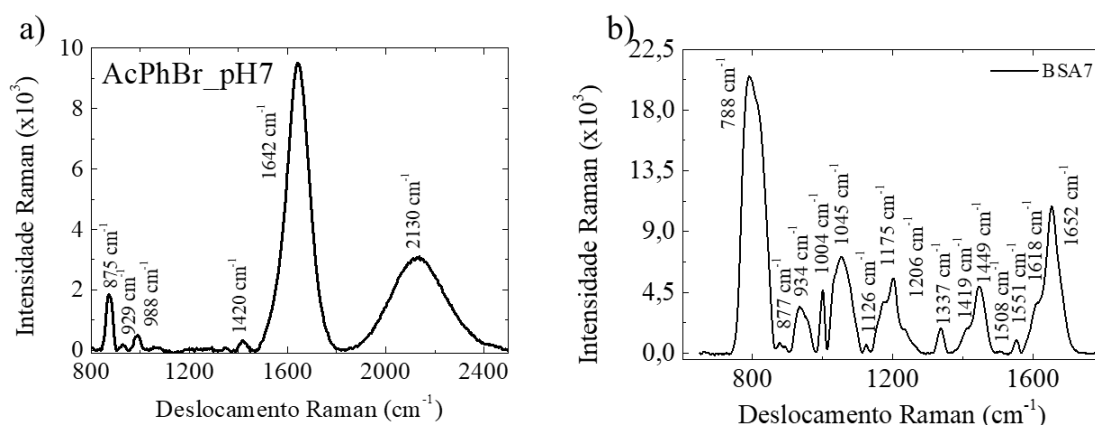


Figura 64 - Espectro Raman a) da solução tampão no pH 7 e b) Da amostra BSA7.

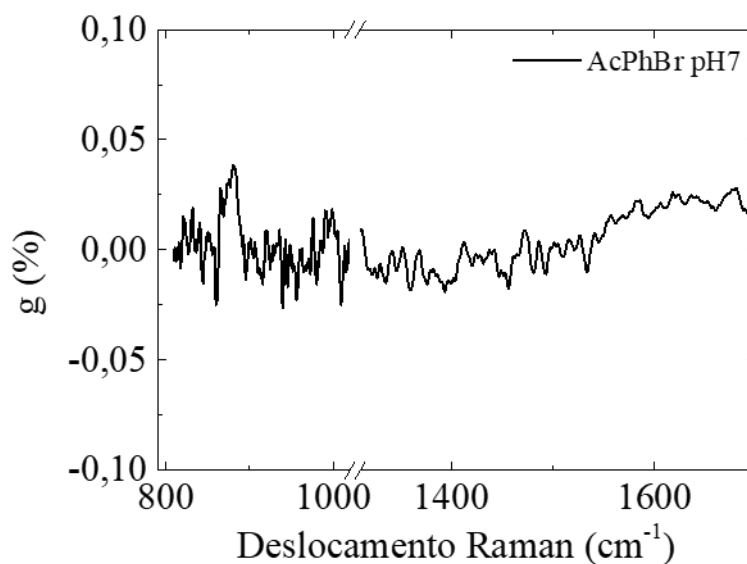


Figura 63 - Espectro do parâmetro g da solução tampão no pH 7.

Tabela 16 - Assinaturas dos picos Raman da proteína BSA em solução.

Deslocamento Raman (cm-1)	Assinatura Raman
788	Tirosina
877	Tirosina
934	(C – C – N) simétrico, esqueleto hélice α
1004	Fenilalanina + Triptofano
1045	(C – N)
1126	(C – N)
1175	Tirosina

1206	Tirosina + Fenilalanina
1337	Deformação (CH)
1419	Deformação (CH_2) e (CH_3)
1449	Deformação (CH_2) e (CH_3)
1508	Fenilalanina
1551	Triptofano
1618	Tirosina
1652	Amida I

Tabela 17 - Assinaturas dos picos Raman da solução tampão.

Deslocamento Raman (cm ⁻¹)	Assinatura Raman
875	Estiramento $B - O$
930	Estiramento $C - C$
988	Estiramento $P - O$
1420	Estiramento $C - O$
1642	Estiramento $C = O$

8.2.1. Absorção

A absorção ótica linear de proteínas no ultravioleta é na região de 250 a 300 nm e está comumente relacionado a presença de tirosinas (tyr), triptofanos (trp) e fenilalaninas (phe), que são aminoácidos aromáticos.¹¹⁴ Como pode ser observado na Figura 65, o único pH que altera significativamente a forma de linha da absorção é o pH 12 devido a mudanças estruturais e, portanto, da estrutura eletrônica dos grupos fenólicos da tirosina, do triptofano e da fenilalanina. Por outro lado, estes têm seu espectro de absorção inalterados durante a alteração dos pH do meio, o que os tornam pouco interessantes de serem estudados ou suas variações quando utilizada a espectroscopia de absorção ótica linear no UV-Vis do ponto de vista da análise da estrutura de proteínas como mostrado na literatura.¹¹⁵ Portanto as medidas de absorção ótica são inconclusivas para compreender as mudanças estruturais que ocorrem na proteína BSA quando se varia o pH do meio onde ela se encontra.

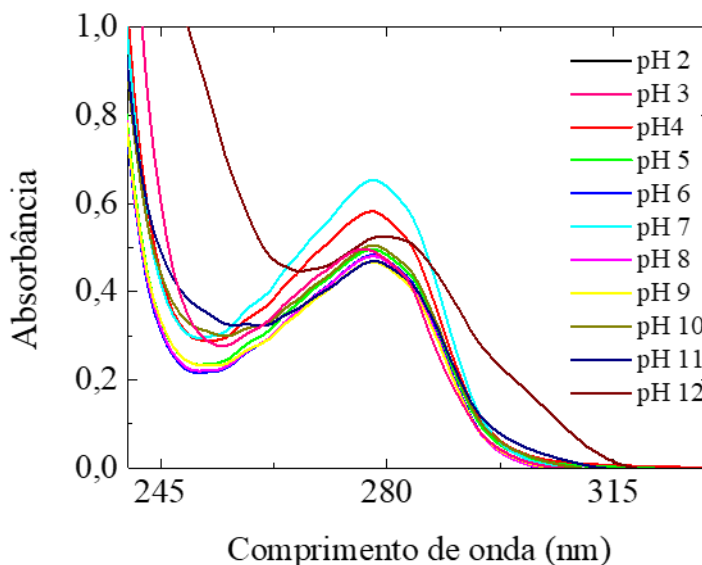


Figura 65 - Espectro de absorção da proteína BSA em diferentes pH.

8.2.2. Dicroísmo Circular (CD)

Por outro lado, em comparação aos espectros de absorção ótica linear, a espectroscopia de dicroísmo circular na região do UV pode nos informar a respeito de alterações de estruturas secundárias em proteínas devido sua peculiaridade de cada tipo apresentar um espectro distinto. No presente estudo os espectros de CD na região UV (190 – 250nm), para BSA em pH 7 apresenta maior porcentagem de conformação hélice α (61%), provavelmente devido a banda de mais intensa em 220 nm em comparação aos espectros em pH 2, 5 e 9, veja esta variação na Figura 66. Apresenta ainda o espectro da BSA em pH7 uma porcentagem menor de conformação folhas β e (12%) voltas β (12%) e formas randômicas (11%) também foi encontrado. Estes dados foram obtidos através da simulação, ou deconvolução espectral, utilizando o compilado de *softwares* CDProWin7. Além disso, as medidas realizadas em pH 5 de CD apontaram para estrutura secundária muito semelhante (hélice α : 68%, folhas β : 17%, voltas β : 7% e randômicas: 8%), mostrando que as interações eletrostáticas, que podem ocorrer próximas ao ponto isoelétrico, não são capazes de induzir mudanças drásticas na estrutura secundária da BSA detectáveis por espectroscopia eletrônica pela técnica de dicroísmo circular. Para o pH 9, a deconvolução do espectro CD apresenta resultados semelhantes aos dos pH 7 e 5, tendo 51% das formas hélice α , 3% folhas β , 18% de voltas β e 27% formas desordenadas. Note que esta proteína apresenta uma estrutura secundária dobrada um pouco diferente daquela em pH neutro, pois, ao compararmos as duas formas de linha, a de pH 9 está perdendo intensidade em relação ao pH 7.¹¹⁶ Esse resultado sugere que a BSA passa por outra

transição conformacional quando vai para um meio alcalino da mesma forma que a HSA (albumina de soro humano)¹¹⁷, preservando sua forma geral.

Além disso, a Figura 66 mostra que, mesmo em pH menores, tal como 2, a BSA preservou uma estrutura secundária parcialmente dobrada, como pode-se observar, a forma de linha não é modificada, como esperado para proteínas com alto conteúdo de pontes dissulfeto.¹¹⁸ A deconvolução do espectro de CD em pH 2 confirmou um conteúdo

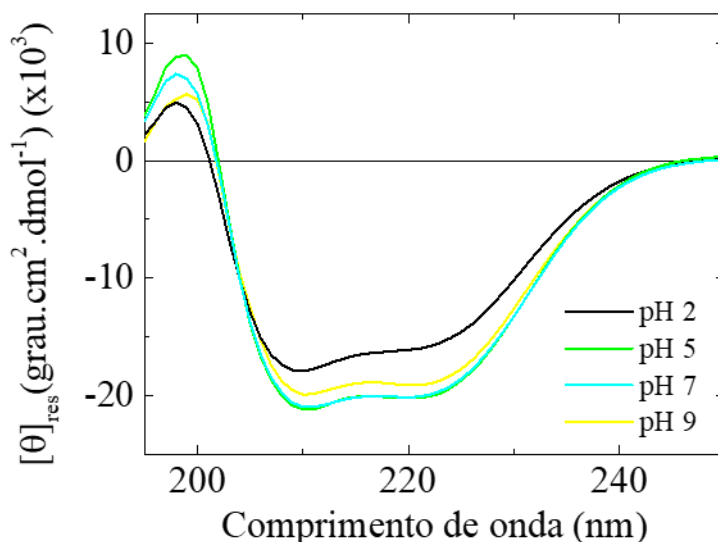


Figura 66 – Espectro CD na região UV- distante das amostras de BSA em pH 2, pH 5, pH 7 e pH 9.

da estrutura hélice α (48%) consistente com os dois mínimos no espectro de CD na figura 17, um em 210 nm e outro em 220 nm, e um máximo em 198 nm, principalmente associado às transições encontradas nas estruturas hélice α . Também foi calculado uma porcentagem menor de estruturas folha β (3%), voltas β (20%) e formas não ordenadas (29%), em comparação com o pH 7. A diferença considerável nas frações de estrutura não ordenadas neste pH, comparadas às porcentagens quando a BSA está em pH neutro, sugere que em pH 7 a estrutura secundária da BSA deve ser otimizada do ponto de vista de ter a menor energia ou configuração estrutural, consistente com a forma natural do enovelamento da proteína em condições fisiológicas. Além disso, essa conformação diferente ilustra outra transição conformacional para a região ácida, como já foi indicado em vários trabalhos.¹¹⁶

Tabela 18 - Quantidades em porcentagem calculadas a partir do CD das estruturas secundárias em cada pH.

Estruturas secundárias				
	hélice α	folha β	voltas β	randômicas
pH 2	48%	3%	20%	29%
pH 5	68%	17%	7%	8%
pH 7	65%	12%	12%	11%
pH 9	52%	3%	18%	27%

Para analisar as vizinhanças aromáticas dos triptofanos (trp), tirosinas (tyr) e fenilalaninas (phe) da BSA em uma faixa de pH diferente, utiliza-se CD na região UV-próximo ou fluorescência intrínseca do triptofano. Os espectros de CD na região UV-próximo da BSA (Figura 67) apresentam as contribuições dos resíduos tyr e trp na região entre 270 e 305 nm e dos resíduos de phe com uma banda grande na região 255–270 nm.^{119,120} Os espectros em pH 7 e pH 5 são bastante semelhantes. A diferença (inferior a 1%) não é suficiente para afirmar que houve mudanças estruturais significativas. Por outro lado, no pH ácido, ocorrem mudanças significativas na região 255–270 nm e os picos e ombros no espectro de CD da Figura 66 ficam menos intensos, sugerindo uma transição conformacional que leva os resíduos aromáticos, principalmente phe, a um ambiente mais flexível. Na região 270–300 nm, o tyr e o trp também parecem ser afetados por diferentes ambientes, sugeridos pelas pequenas mudanças no espectro. Estes resultados podem fornecer alguma evidência para a existência de formas de BSA semelhantes a “*molten globule*” (glóbulos fundidos) em pH ácido. Devido às limitações dessa técnica, que requer maior concentração de proteínas e medidas em regiões espectrais de no UV abaixo de 190 nm, obtidos apenas em ciclotrons por exemplo, o estudo das alterações estruturais das proteínas, por exemplo, quando afetadas por algum parâmetro físico ou químico só podem ser detectáveis através dos aminoácidos que possuem grupos aromáticos. Este resultado não diminui sua importância e suas aplicações

no estudo de biomoléculas, o que muitas vezes não podem ser feitas por técnicas espectroscópicas mais tradicionais como absorção ótica linear.

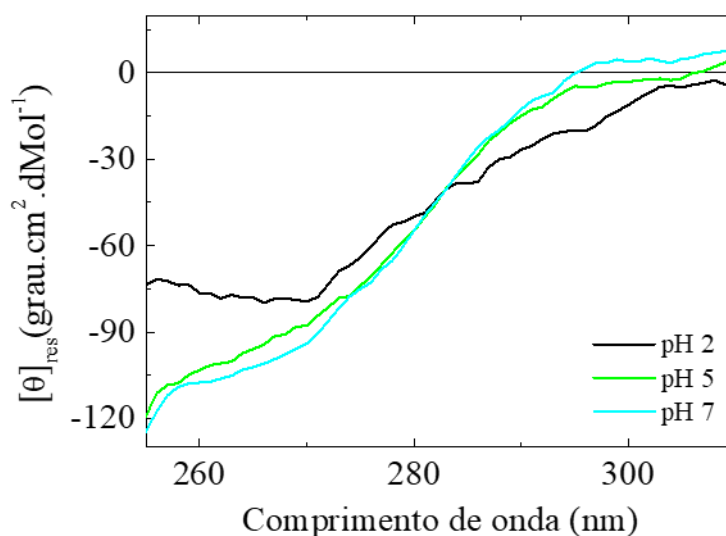


Figura 67 - Espectro CD na região do UV-próximo da BSA em pH 2, pH 5 e pH 7.

Os espectros de fotoluminescência de emissão (PLE) da BSA devido ao pH podem ser observados na Figura 68 e Figura 70. Foram excitados em dois comprimentos de ondas, 280 nm e 295 nm, este primeiro está relacionado a emissão dos aminoácidos aromáticos (tyr e trp) e o segundo a emissão somente do triptofano. Esta proteína possui dois triptofanos em sequência nas posições 134 e 212.¹²¹ O comprimento de onda do máximo de intensidade de emissão (λ_{emi}) do triptofano (trp) em pH 7 é 344 nm, o que é consistente com a exposição parcial de resíduos de triptofanos no meio aquoso.¹²²

Na Figura 68 pode-se observar na região de pH básico (pH 9 a 12) o máximo do espectro desloca para o azul, aproximadamente para 341 nm. Nesta condição de pH os aminoácidos aromáticos da BSA (tyr e trp) se encontram na estrutura da BSA entre uma exposição parcial (pH 7) e totalmente incrustado na estrutura da proteína, sugerindo assim que a BSA poderia apresentar outro ambiente químico para a tirosina e o triptofano com pH básico, embora preservando a estrutura secundária, como mostrado pelo CD (52% de hélice α).

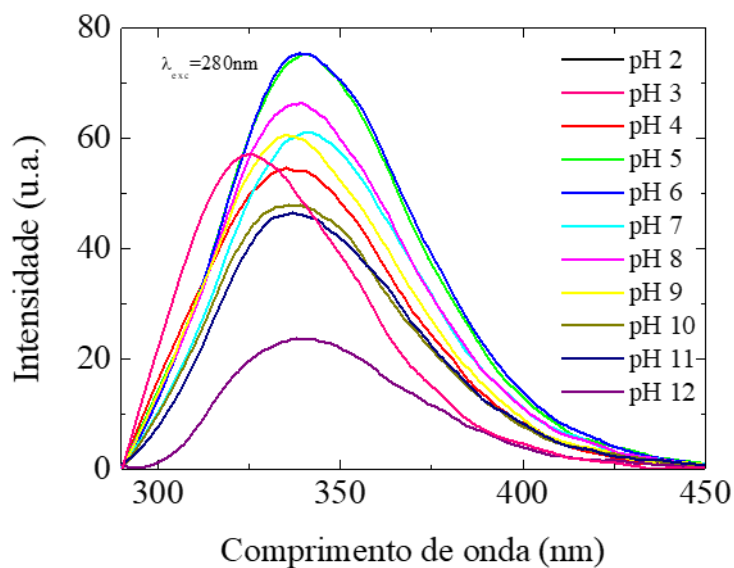


Figura 68 - Espectros de PLE corrigidos pela potência absorvida dos aminoácidos aromáticos da BSA, pH 2 a 12, com excitação em 280nm.

Nos pH 4 a 6 há um pequeno desvio para vermelho para 347 nm, indicando uma transferência de resíduos dos aminoácidos aromáticos (tyr e trp) para um ambiente mais flexível. Este resultado corrobora a descrição da literatura para transições de N-F (caso tenha dúvidas, retornar ao tópico 4.3.1.1), ou seja, quando a proteína sai de uma região próxima ao pH fisiológico e entra em uma região ácida ela sofre mudanças conformacionais, a transição N-F ocorre quando o pH decai para pH 4,3, neste momento de acordo com a teoria, há uma redução na forma helicoidal da proteína e como no espectro de absorção UV há um deslocamento para o azul, isto indica que as tirosinas e os triptofanos estão sendo “desmascarados”, as cadeias laterais estão ficando expostas ao ambiente químico provocando uma abertura parcial da estrutura da proteína.¹²¹ No entanto, quando o pH vai para a região de transição F-E, ou seja, para regiões extremamente ácidas ($\text{pH} < 2,7$) há um deslocamento dos espectros para azul indicando uma transferência da porção de aminoácidos aromáticos (tyr e trp) de um ambiente parcialmente exposto (347 nm) para um ambiente parcialmente incrustado, tal como no pH 4 cujo máximo de emissão se encontra por volta de 338 nm. Abaixo do pH 4, os desvios para o azul em 333 nm para pH 3 e 331 nm para o pH 2 do pico de emissão, veja Figura 68, indicam um ambiente mais incrustado para os resíduos de trp.

Para o cálculo do rendimento quântico dos triptofanos e das tirosinas da BSA (equação 161 na seção 7.2.3.1) foram utilizados os valores dos máximos de absorção em 280 nm e 295 nm nos diferentes pH. A figura a seguir (Figura 69) mostra o rendimento quântico das tirosinas e dos triptofanos nos diferentes pH, agrupados nas seguintes regiões: extremo ácido (de pH 2,0 a 4,0); neutro-ácido (de pH 5,0 a pH 6,0); neutro (pH 7,0); neutro-básico (de pH 8,0 a pH 9,0) e básico (de pH 10,0 a pH 12,0). Em pH 7,0 (fisiológico) o rendimento quântico de emissão relativo da proteína foi máximo 100%. Observa-se que este rendimento quântico se mantém na região ácido-neutro, decrescendo ~30% e ~50% na região extremo ácido. Constatar-se que para pH na região básica, ou seja, neutro básico depois básico, o rendimento decai de forma continua em relação ao fisiológico, atingindo o mínimo ~10% em pH 12.

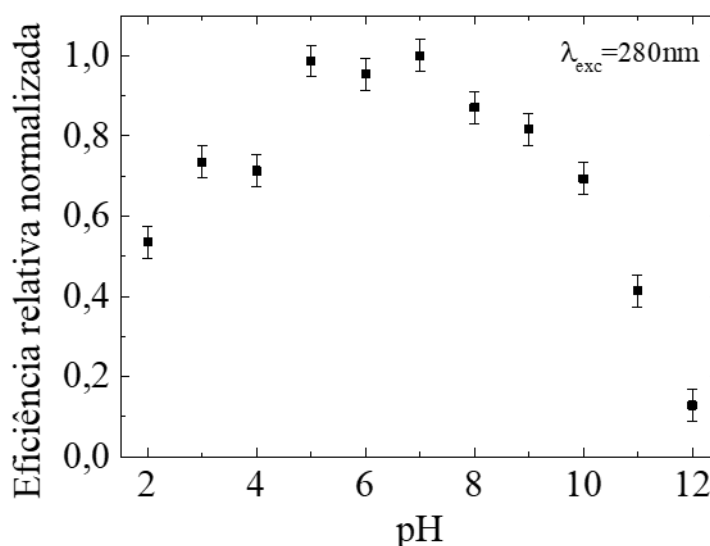


Figura 69 - Eficiência quântica de emissão relativa o BSA em solução, com excitação em 280nm, pH 2 a 12.

Na Figura 70 pode-se observar em pH 7 que a excitação dos triptofanos em 295 nm está em um pico máximo em torno dos 340 nm, isto mostra que os triptofanos ficam parcialmente expostos ao meio químico. Quando se vai para meios ácidos pode-se perceber um deslocamento dos máximos de emissão para comprimento de ondas menores de forma suave. Mas para meios extremamente ácidos a queda na intensidade luminosa relativa é brusca, tendo um mínimo de emissão para pH 2 em torno de 330 nm, isto revela que os triptofanos vão sendo expostos da estrutura da proteína quanto mais ácido o meio vai se tornando, corroborando como o modelo N-F-E apresentado no tópico 4.3.1.1. Este mesmo efeito, ocorre para pH básicos, mas de uma forma mais suave, pode-se observar que para o pH 8 há um deslocando do máximo do espectro para 340 nm, pH 9 para 339

nm e vai se deslocando até um mínimo de 335 nm em pH 12. É interessante notar que apesar da estrutura da BSA migrar para as formas N-B-A (tópico 4.3.1.1), ou seja, os triptofanos ficam inalterados na estrutura secundária da proteína, a intensidade da fotoluminescência decai significativamente. Isso demonstra que sutilmente a posição relativa destes cromóforos são alteradas e os processos de relaxação não radiativa aumentam.

A Figura 71 mostra o rendimento quântico somente das tirosinas, por causa da

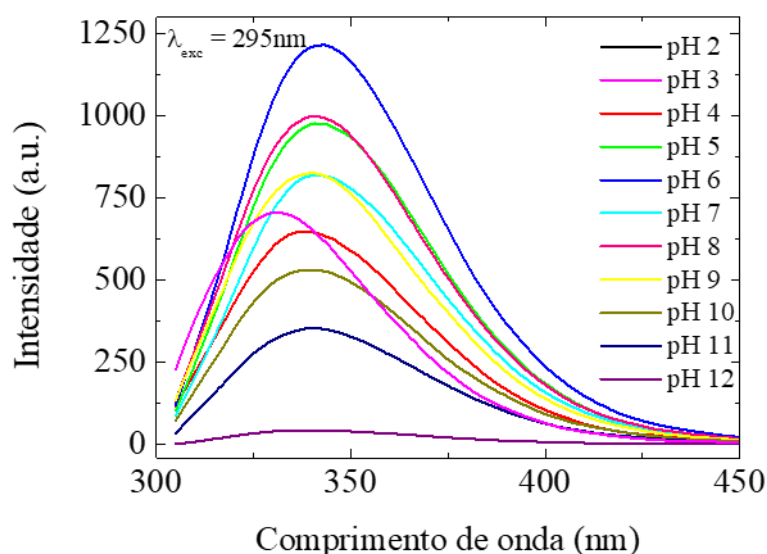


Figura 70 - Espectros de PLE corrigidos pela potência absorvida para a solução de BSA, pH 2 a 12, com excitação em 295 nm.

excitação em 295 nm. Em pH 7,0 (fisiológico) o rendimento quântico da proteína foi mediano, perto de 70%, um pouco abaixo do que vimos anteriormente para a excitação em 280 nm. Mas para regiões neutro ácida e neutro básica tem-se um rendimento maior, sendo em pH 6 de quase 100%. Esperava-se esse rendimento maior para o pH fisiológico, mas não foi obtido, o que mostra que para tirosina sua exposição a meios diferentes (transição N-F) devido sua localização ao longo das estruturas da proteína privilegia a menor transferência de energia em pH um pouco mais básicos. Quando começa a se afastar do pH fisiológico, para pH mais extremos, observa-se que o rendimento quântico cai vertiginosamente, principalmente para meios alcalinos, confirmando o que foi proposto anteriormente, que a proteína sofre uma mudança conformacional de alguma maneira que esconde os aminoácidos aromáticos, neste caso o triptofano. No caso mais

extremo, em pH 12, o rendimento quântico de emissão da proteína chega praticamente a zero.

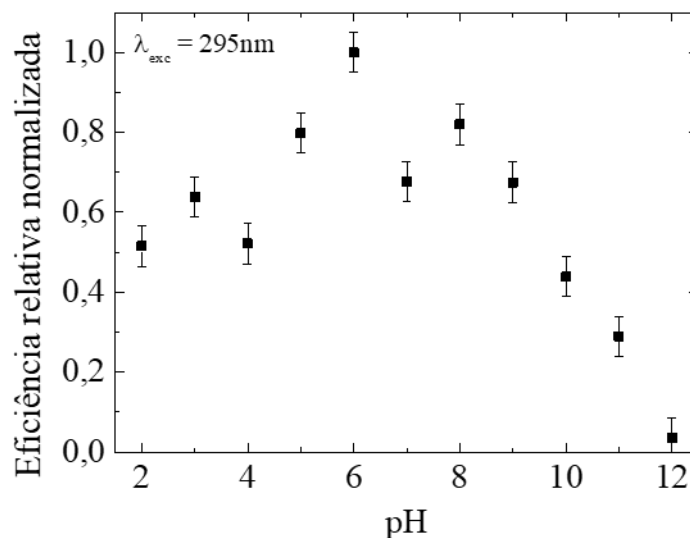


Figura 71 - Eficiência quântica de emissão relativa o BSA em solução, com excitação em 295nm, pH 2 a 12.

8.2.3. Espectroscopia Raman por Elipsometria (ERS)

A Figura 72 mostra um espectro do parâmetro g da BSA em pH fisiológico, adquirido pela técnica ERS desenvolvida nos laboratórios do GEM/InFIS/UFU. Este espectro é similar a um espectro de atividade óptica Raman (ROA), este efeito foi descoberto por Barron em 1973.¹ Quando é aplicada a técnica ERS através da análise da luz espalhada pela amostra, como já discutido no capítulo 6, através elipsometria adquire-se diversas informações sobre a amostra, uma dessas informações é o espectro ERS relacionado ao parâmetro de assimetria (g), este espectro é similar ao espectro ROA. Entretanto, ambos podem ser diferentes por terem contribuições do tensor atividade óptica de componentes distintos. Por exemplo, não apresentado aqui, o parâmetro g obtido pela técnica ERS é mais sensível na região abaixo de 600 cm^{-1} do que os espectros ROA, veja a referência [5].

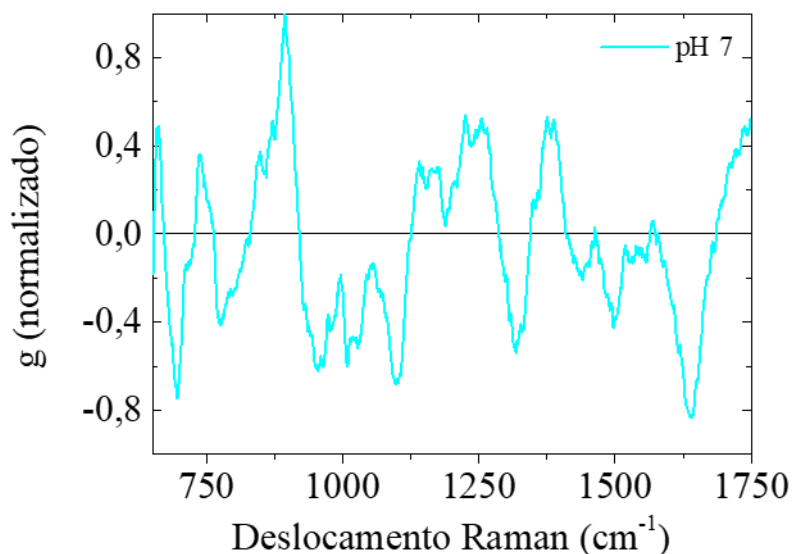


Figura 72 - Espectro do parâmetro g da proteína BSA em pH fisiológico.

A Figura 72 mostra uma banda positiva na região de $\sim 870 - 950 \text{ cm}^{-1}$ e $\sim 1600 - 1690 \text{ cm}^{-1}$ e outra negativa de $1020 - 1150 \text{ cm}^{-1}$ que são devida ao alongamento $C_{\alpha} - C$, estiramento $C = O$ e ao alongamento $C_{\alpha} - N$, respectivamente. Ao comparar com o espectro ROA da proteína BSA na referência [62], a banda $\sim 870 - 950 \text{ cm}^{-1}$ e $1020 - 1150 \text{ cm}^{-1}$ são idênticas, mas a banda $\sim 1600 - 1690 \text{ cm}^{-1}$ está invertida. Além disso, todas as bandas tem intensidades diferentes comparando os dois espectros, essas diferenças já são esperadas devido ao próprio cálculo do efeito, a ERS possui tensores eletromagnéticos diferentes da ROA, ocasionando esta diferença no sinal capturado. De acordo com a Tabela 19, ambas as regiões são características à estrutura hélice α , o que corrobora com estudos já bem fundamentados para a BSA em pH fisiológico no qual observa-se estrutura secundária predominantemente hélice α .¹²³ Talvez a característica mais marcante seja a intensa banda ERS negativa em $\sim 1300 \text{ cm}^{-1}$, essa região foi identificada como aquela em que pode ser observados os modos amida III característicos das voltas (ou curvas). Lembrando que a albumina sérica bovina contém muitas voltas devido ao grande número (17) de pontes dissulfeto.¹²¹ Por outro lado, vibrações de torção de CH_2 nas cadeias laterais alifáticas também foram atribuídas a essa região.¹²⁴ O pico negativo em $\sim 1450 \text{ cm}^{-1}$ está relacionado a vibração CH_2 na cadeia lateral da BSA. Como as medidas foram realizadas para cada pH, tem-se um conjunto enorme de espectros ERS, como a intensidade Raman em função do ângulo, os parâmetros S_3 , S_2 e S_1 normalizados pela intensidade total S_0 , os fatores p , g (similar

ao parâmetro ROA) e r , além dos parâmetros ψ e χ . Todos estes espectros da técnica ERS estão no anexo I organizados por pH.

A Figura 72 mostra que o espectro do parâmetro g da proteína BSA que pode ser visto como uma combinação dos espectros dos aminoácidos. A título de comparação dos espectros de AO, CD e PL, a Figura 73.a exibe o espectro ERS do aminoácido fenilalanina, pode-se verificar que ele possui dois picos negativos, um acentuado $\sim 1000\text{ cm}^{-1}$ e outro mais largo na região $\sim 1550 - 1700\text{ cm}^{-1}$, estes também pode ser observado no espectro do parâmetro g da BSA (Figura 72). A Figura 73.b mostra um espectro do parâmetro g do aminoácido tirosina, observa-se que o pico negativo em $\sim 800\text{ cm}^{-1}$ e o positivo em $\sim 1200\text{ cm}^{-1}$, ajudam a compor a Figura 72. Observa-se na Figura 73.c, que é o espectro do parâmetro g do aminoácido triptofano, que os picos negativos em $\sim 1000\text{ cm}^{-1}$ e $\sim 1350\text{ cm}^{-1}$ que aparecem no espectro do parâmetro g da BSA (Figura 72) tem influência dos triptofanos. Entretanto, o espectro ERS da BS é mais complexo que apenas a superposição de cada aminoácido que a compõe, além de ter que considerar sua estrutura secundária. Entretanto, os espectros ERS da Figura 73 mostram que a técnica espectroscópica aqui apresentada é capaz de detectar a presença de modos vibracionais devido a ligações químicas com carbono quiral.

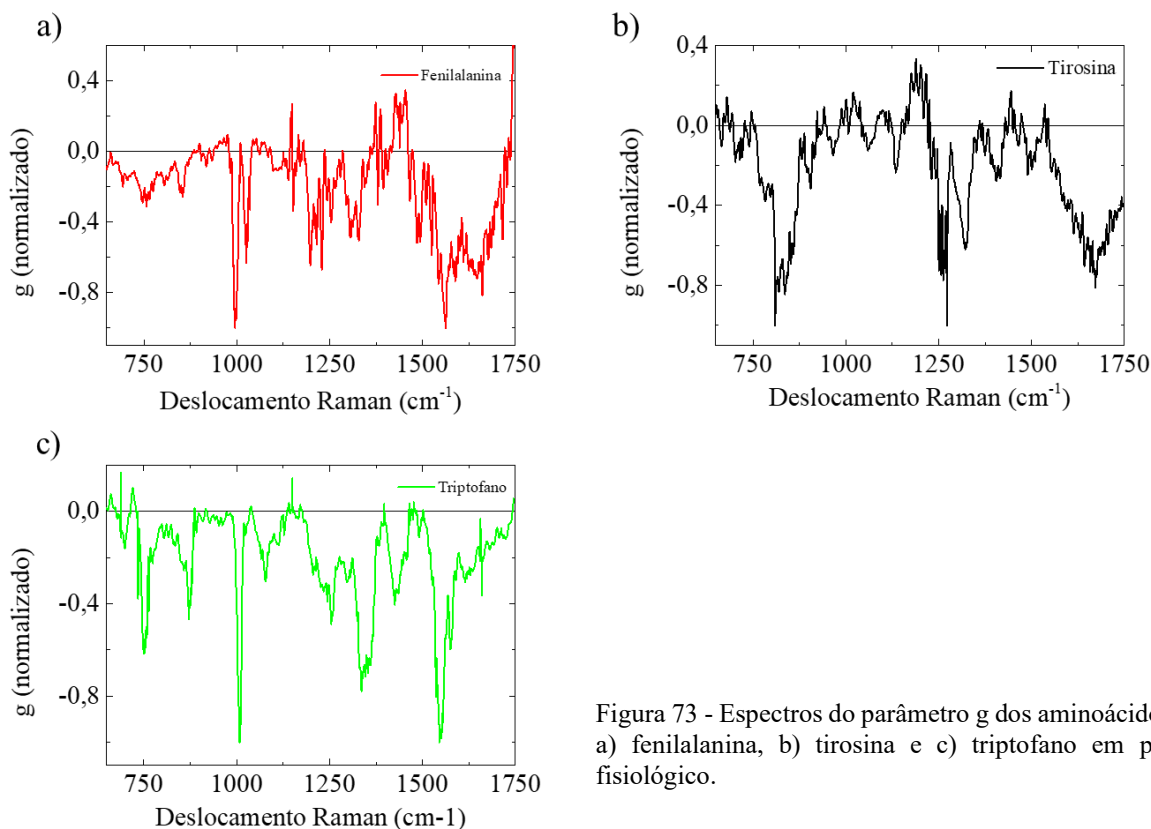


Figura 73 - Espectros do parâmetro g dos aminoácidos a) fenilalanina, b) tirosina e c) triptofano em pH fisiológico.

Tabela 19 - Posição das bandas Raman, sinal da variação ROA e as assinaturas da BSA em solução tampão pH7.

Comprimento de onda (cm^{-1})	Sinal	Assinatura (probabilidade)
870-950	+	Hélice α
1080-1130	-/+	Hélice α
1265-1295	+	Loops e voltas
1295-1312	+	Hélice α hidrofóbica
1338-1346	+	Hélice α hidratada
1400-1480	Padrões complexos	Cadeias laterais (aromáticos em baixa, alifáticos em alta cm^{-1})
1530-1580	+/-	Cadeias laterais de triptofano
1600-1630	Vários padrões	Cadeias laterais aromáticas
1630-1665	-/+	Hélice α

Agora que já está correlacionado os picos vibracionais do espectro ERS da BSA e sua estrutura secundária, passa-se a entender como ela é alterada com a mudança do meio em que ela se encontra, em nosso caso o pH, analisando a mudança estrutural agora de forma mais localizada.

A Figura 74 mostra o parâmetro g obtido utilizando a técnica ERS plotados em função do pH. O primeiro pico a ser analisado é o 893 cm^{-1} que está entre a região $\sim 870 - 950 \text{ cm}^{-1}$ e, como vistos anteriormente, está relacionado ao alongamento da ligação do carbono quiral com outro carbono da estrutura hélice α . Observa-se que em pH fisiológico o sinal do parâmetro g é positivo, adota-se para este pico então o sinal positivo como uma referência de conformação para esta ligação $C_{\alpha} - C$. Neste pH a estrutura principal em uma condição de mínimo de energia para sua conformação. Quando se vai para pH mais ácidos a literatura mostra que a proteína BSA sofre uma desnaturação de sua estrutura secundária.¹²⁵ E de fato pode-se observar isto com o sinal do parâmetro g para pHs 5 e 6, o sinal é invertido em relação ao pH 7. Alterando ainda mais para pHs mais baixos. Por estes dados podemos sim definir as regiões de transição N-F com o detalhe de duas estruturas parciais entre os pHs 6 e 5 e outro entre 4 e 3, cujos sinais ERS são iguais em cada faixa aproximadamente. No pH mais ácido como é esperado uma estrutura mais desordenada, veja espectro de CD, o sinal ERS se aproxima mais de zero por ter contribuições aleatórias. Seguindo este novo modelo, para os pHs alcalinos 8 e 9 temos a transição N-B e pH 10 sobre uma nova alteração definindo a

estrutura B passando então para a estrutura B-A. Era esperado que em pHs alcalinos-básico a estrutura secundária da BSA fosse preservada como estudado por CD (Figura 66), mas evidenciado por PL ou rendimento quântico (Figura 68-Figura 71) existem mudanças. Mas esta técnica não é capaz de prever quais seriam. Considerando agora os dados ERS podemos afirmar as faixas de transições estruturais da BSA definindo exatamente a posição da fase F e B. Ainda, como já bem estabelecido no modelo N-F-E, se consideramos que o sinal negativo ERS negativo para este pico vibracional representa a abertura da estrutura da BSA, ou desestruturação da hélice α , entre pHs 7 e 12, observa-se também este efeito de forma mais moderada. Isso está de acordo com os estudos de CD vistos anteriormente (Figura 66). Concluímos que cada fase de transição da BSA pode ser mapeada pelo sinal ERS e ainda verificado seus detalhes, mostrando que, por exemplo que em pHs 4 e 3 temos uma fase intermediária entre a fase F e E e no pH 10 é que há mudança da fase B para A.

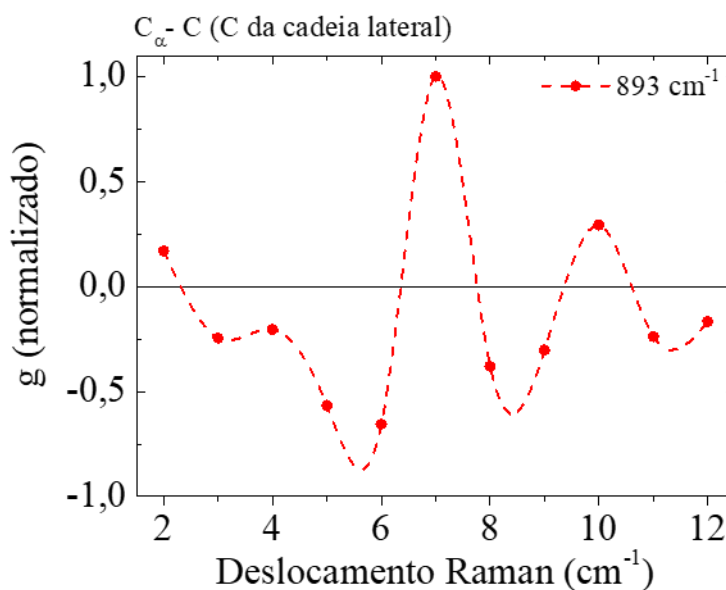


Figura 74 - Espectro do parâmetro g extraído pela técnica ERS em função do pH da proteína BSA no pico 893 cm^{-1} .

A próxima região espectral a ser analisada está entre $\sim 1020 - 1150\text{ cm}^{-1}$. Nesta região tem-se dois picos ERS em 1100 cm^{-1} e em 1125 cm^{-1} , que estão relacionados a cadeia principal da BSA na ligação $C_{\alpha} - N$. Na Figura 75, para pH fisiológico o sinal do parâmetro g é negativo. Para os pHs ácidos o parâmetro ERS tem a mesma dependência para ambos os modos vibracionais mostrando diferenças conformacionais da cadeia principal. Apesar, da dependência similar em resultados de eletroforese,¹²¹ uma vez que esta está relacionado apenas as cargas induzidas na estrutura da proteína devido ao meio químico. Para os meios alcalino-básico os sinais diferem em sinal em toda a faixa

estudada neste trabalho. Isso novamente mostra que as definições de mudança estrutural considerando o carbono quiral da cadeia principal ocorrem diferentemente em cada pH. O que se pode afirmar é que nessa região da proteína a mudança de estrutura é bem sutil e interna quando o meio se torna alcalino, o que pode ser justificado pela menor movimentação da cadeia principal, por ela estar em um ambiente químico que a deixa mais “rígida”. Em outras palavras, estaria os grupos químicos estudados menos susceptíveis ao meio, expondo os aminoácidos aromáticos, mas alterando sutilmente a estrutura secundária da BSA.

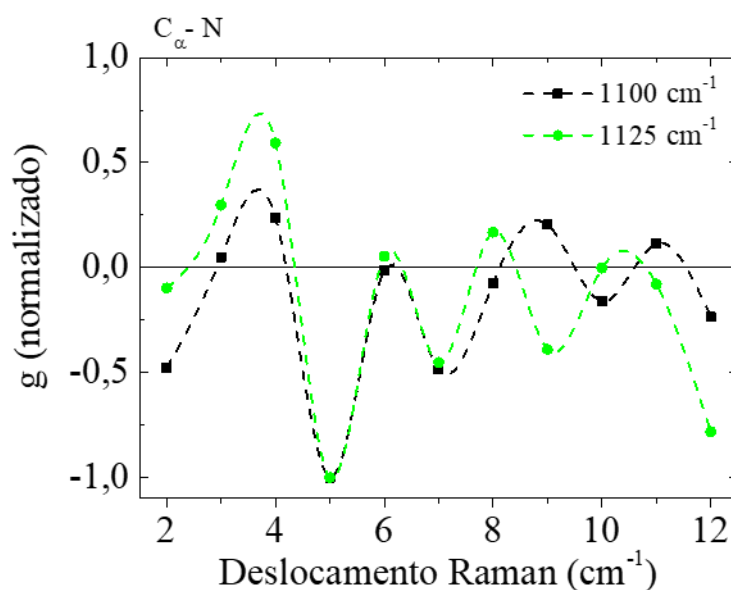


Figura 75 - Espectro do parâmetro g extraído pela técnica ERS em função do pH da proteína BSA nos picos 1100 cm^{-1} e 1125 cm^{-1} .

A região amida III $\sim 1230 - 1350\text{ cm}^{-1}$ está relacionada as combinações em fase da deformação no plano $N - H$ com o estiramento $C - H$ junto com das deformações $C_{\alpha} - H$ da proteína, essa região é muito sensível a mudança de estrutura da cadeia principal.⁶¹ Como pode-se observar na Figura 76, para cada pico tem-se que determinar um referência inicial, o 1240 cm^{-1} e o 1303 cm^{-1} não possuem sinal do parâmetro g em pH fisiológico e o 1268 cm^{-1} tem um sinal positivo. Nos picos 1240 cm^{-1} e 1303 cm^{-1} podemos observar o mesmo padrão visto anteriormente na Figura 75, o sinal do parâmetro g oscila em torno do mínimo para pH mais básicos por causa de uma mudança branda da estrutura da BSA e para pH ácido a estrutura está se modificando de maneira mais abrupta, portanto o sinal do parâmetro g oscila mais, por causa que os tensores polarização da técnica ERS tem maior sinal por causa da abertura da estrutura da proteína BSA. No caso do pico 1268 cm^{-1} , ele está relacionado a estrutura de loops

e voltas da proteína BSA, em pH ácidos estes loops e voltas vão se transformando em estruturas não ordenadas, ocasionando a diminuição do sinal do parâmetro g . Em pH básicos, como a estrutura sofre uma mudança conformacional mais suave, o sinal do parâmetro g se mantém elevado, por casa dos loops e voltas ainda presentes na BSA apesar da mudança do ambiente químico.

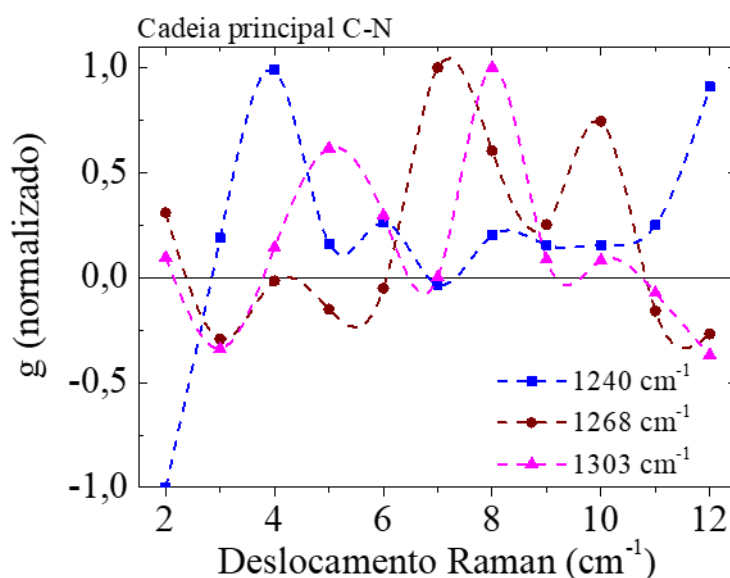


Figura 76 - Espectro do parâmetro g extraído pela técnica ERS em função do pH da proteína BSA nos picos 1240 cm^{-1} , 1268 cm^{-1} e 1303 cm^{-1} .

A região amida I $\sim 1630 - 1700 \text{ cm}^{-1}$ é atribuída principalmente ao estiramento $C = O$ na cadeia principal da proteína BSA, na Figura 77 analisamos o fator g para o pico em 1672 cm^{-1} . Em pH fisiológico a proteína BSA se encontra em um ambiente energeticamente mais estável com um sinal do parâmetro g positivo e pequeno, como é esperado para este estado da molécula (na região amida I). Quando o ambiente químico muda, neste caso, tanto para pH ácidos e básicos, os radicais do carbono quiral sofrem uma rotação, trocam de lugar, de acordo com o modelo do parâmetro g . Como esta região está associada a ligação $C = O$, pode-se supor que este radical sofreu tal rotação. Isto nunca foi relatado na literatura e é uma prova da capacidade fina de caracterização da técnica ERS. Sendo assim, é possível perceber que a proteína não se modifica como um todo, tem regiões que são mais ou menos sensíveis a estas mudanças de ambiente

químico. O interessante em todos os resultados apresentados até o momento, dadas as devidas diferenças, há uma simetria no sinal do parâmetro g em torno do pH fisiológico, isto é evidenciado quando analisados os modos vibracionais mais simples, tal como 893 cm^{-1} na Figura 74 e 1672 cm^{-1} na Figura 77. Este resultado pode sim demonstrar que próximo as transições da fase N (pH 7) para as fases F (pHs 6 e 5) e B (pHs 8 e 9) as exposições ou inclusões, respectivamente, dos grupos químicos na alteração da estrutura secundária da BSA, principalmente a hélice α , são semelhantes. Nos pHs mais extremos, nos quais as condições fisiológicas são muito agressivas, com quebras de pontes de hidrogênio ou blindagem das pontes de enxofre responsáveis pela estrutura secundária e terciária da proteína, por exemplo, devem ser as responsáveis por alterações estruturais

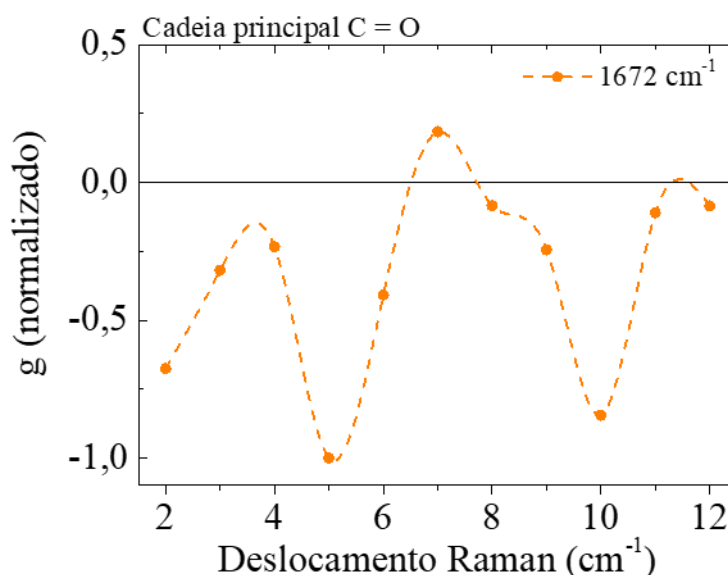


Figura 77 - Espectro do parâmetro g extraído pela técnica ERS em função do pH da proteína BSA no pico 1672 cm^{-1} .

distintas.

A região a ser analisada $\sim 1400 - 1630\text{ cm}^{-1}$ corresponde as cadeias laterais da BSA, mais precisamente, $\sim 1400 - 1480\text{ cm}^{-1}$ e $\sim 1600 - 1630\text{ cm}^{-1}$ são referente as cadeias aromáticas e $\sim 1530 - 1580\text{ cm}^{-1}$ corresponde as cadeias laterais dos triptofanos.⁴⁹ Na Figura 78, diferentemente dos picos anteriores onde a região analisada era a cadeia principal, pode-se observar essas mudanças por uma outra visão, as cadeias laterais aromáticas da proteína BSA. Observa-se que tanto os triptofanos, as tirosinas e as fenilalaninas se comportam de maneiras semelhantes, portanto sofrem de forma equivalente a influência quando se muda o ambiente químico. Em relação ao pH fisiológico o sinal do parâmetro g é negativo para pH entre 6 e 5 e positivo entre os pHs

8 e 9. O que mostra que a posição destes grupos aromáticos é oposta com a mudança de pH. Neste caso, em pleno acordo ao já exposto nos resultados de CD e PL acima. Em pH fisiológico nas cadeias laterais os aminoácidos aromáticos estão condicionados dentro da proteína de forma organizada. Com a mudança do ambiente químico, tanto para meios ácidos ou alcalinos que provoca uma alteração desta condição, cadeias laterais ficam mais expostas ou não, respectivamente, a este ambiente químico.

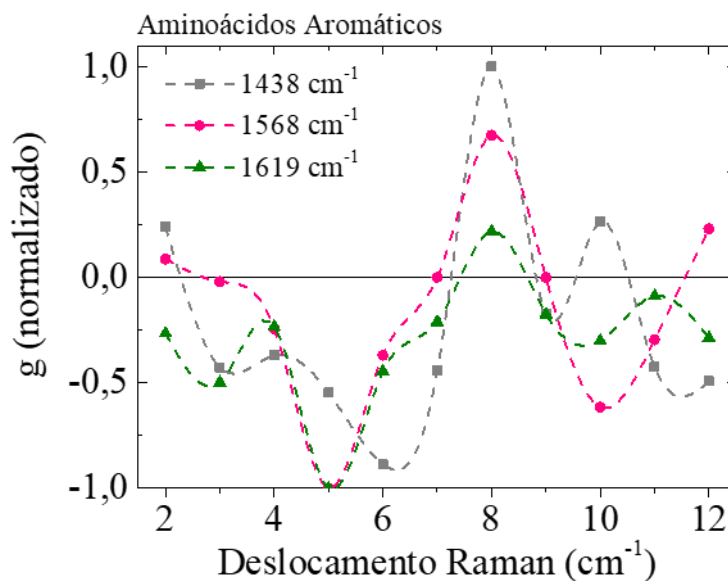


Figura 78 - Espectro do parâmetro g extraído pela técnica ERS em função do pH da proteína BSA nos picos 1438 cm^{-1} , 1568 cm^{-1} e 1619 cm^{-1} .

Como foi discutido na seção 6.3 o sinal ROA surge da diferença entre o sinal de espalhamento Raman quando se incide uma luz circularmente polarizada à direita da esquerda, ou similarmente na técnica ERS, tendo como responsável o tensor polarizabilidade (seção 6.3.1.2). A Figura 79.a ilustra uma molécula que possui um carbono quiral (C_α) ligado a quatro radicais diferentes, representados pelos círculos coloridos. Ao incidir luz circularmente polarizada à direita, essa luz vai interagir com os radicais na sequência azul, amarelo, vermelho e verde. Na Figura 79.b a mesma molécula é incidida por uma luz circularmente polarizada à esquerda, sendo a nova sequência de interação azul, verde, vermelho e amarelo, a diferença de interação é responsável pelo sinal ROA ou o sinal do parâmetro g na técnica ERS, dependendo da técnica experimental utilizada. Caso a molécula sofra uma rotação em relação ao eixo x , observe a Figura 79.c, o radical representado pela cor vermelha estava acima do carbono quiral, agora ele rotaciona e foi parar abaixo e o radical representado pela cor azul, por consequência, está acima do carbono quiral. Repetindo o processo anterior, incide-se luz circularmente

polarizada à direita na molécula já rotacionada (Figura 79c.) e obtém-se um novo padrão de interação, azul, verde, vermelho e amarelo o qual é idêntico ao padrão da Figura 79.b. Ao incidir luz circularmente polarizada à esquerda na molécula, Figura 79.d, já rotacionada observa-se um padrão de cor azul, amarelo, vermelho e verde, que é idêntico ao da Figura 79.a. Considerando então que para a luz espalhada há uma inversão dos elementos do tensor polarizabilidade para as coordenadas $x_i \rightarrow -x_i$ e, portanto, o sentido e o sinal do parâmetro g é invertido, a molécula inverte a posição dos seus radicais livres. Desta maneira, a inversão de g para a BSA apresentada demonstra, principalmente, para os aminoácidos aromáticos sua exposição em pHs mais ácido e sua inclusão para pHs mais básicos.

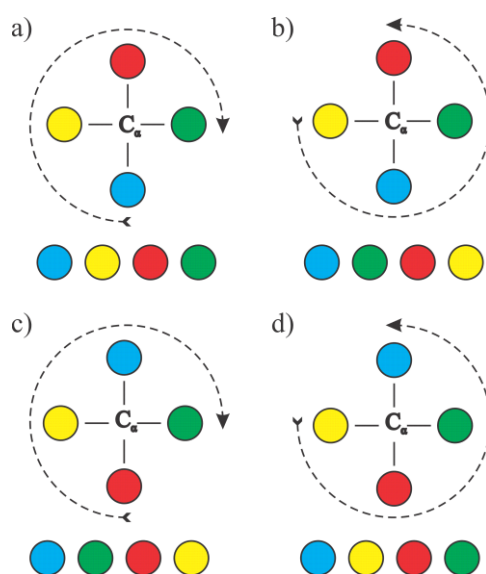


Figura 79 - Ilustração do modelo proposto da interação da luz circular polarizada com uma molécula que possui um carbono quiral. a) Uma luz circularmente polarizada à direita interage com a molécula formando um padrão de sequência de interação azul, amarelo, vermelho e verde. Esta mesma molécula b) ao interagir com luz circularmente polarizada a esquerda observa o padrão azul, verde, vermelho e amarelo. c) interação da luz circularmente polarizada a direita depois que a molécula sofreu uma rotação produz um padrão igual a da molécula antes da rotação, mas quando era incidido luz polarizada circular à esquerda. d) A interação da luz circularmente polarizada `esquerda depois que a molécula sofreu uma rotação produz um padrão igual à da molécula antes da rotação, mas quando era incidido luz polarizada circular à direita.

A Figura 80 mostra que o espalhamento Raman é parcialmente polarizado para os vários pHs e os modos vibracionais estudados. No caso do pico em 893 cm^{-1} , Figura 80.a, Este resultado o parâmetro g é nulo abaixo do pH 5, o que indica que meios mais ácidos promovem menos restrições conformacionais na estrutura principal da BSA. Tais mudanças já foram observadas pela técnica de RMN,¹²⁵ mas não de forma tão específica e inédita quanto o resultado obtido neste trabalho, indicando quais partes da cadeia principal estão sendo afetadas pela mudança do ambiente químico. Na Figura 80.b, observa-se que para estes pH maiores que o fisiológico a polarização da ligação $C_{\alpha} - N$

aumenta até um máximo em pH 10 e depois decai novamente no pH extremamente básico, isto nos mostra que o ambiente químico tem uma influência na cadeia principal, como já foi visto anteriormente, mas mais do que isso, pode-se observar que em pH básicos a proteína está em um arranjo conformacional mais “travado” do que em pH ácidos. A Figura 80.c está evidenciando que em pH fisiológico a proteína BSA se encontra na sua fase estável, pois consegue interagir livremente com toda a luz incidente, já para os outros pH isto não ocorre, pois há um aumento na polarização. E nos pH extremos, 2 e 12, a despolarização é máxima, mas este estado não é o mais eficiente energeticamente como provado anteriormente com a medida de eficiência quântica de emissão. Na Figura 80.d, observa-se o pico 1568 cm^{-1} , verificamos a simetria em torno do pH 7, mostrando que próximo as fases N e B este grupo tem comportamento similar em relação a estrutura da proteína. Mas, novamente, considerando os resultados acima, simetricamente opostos espacialmente.

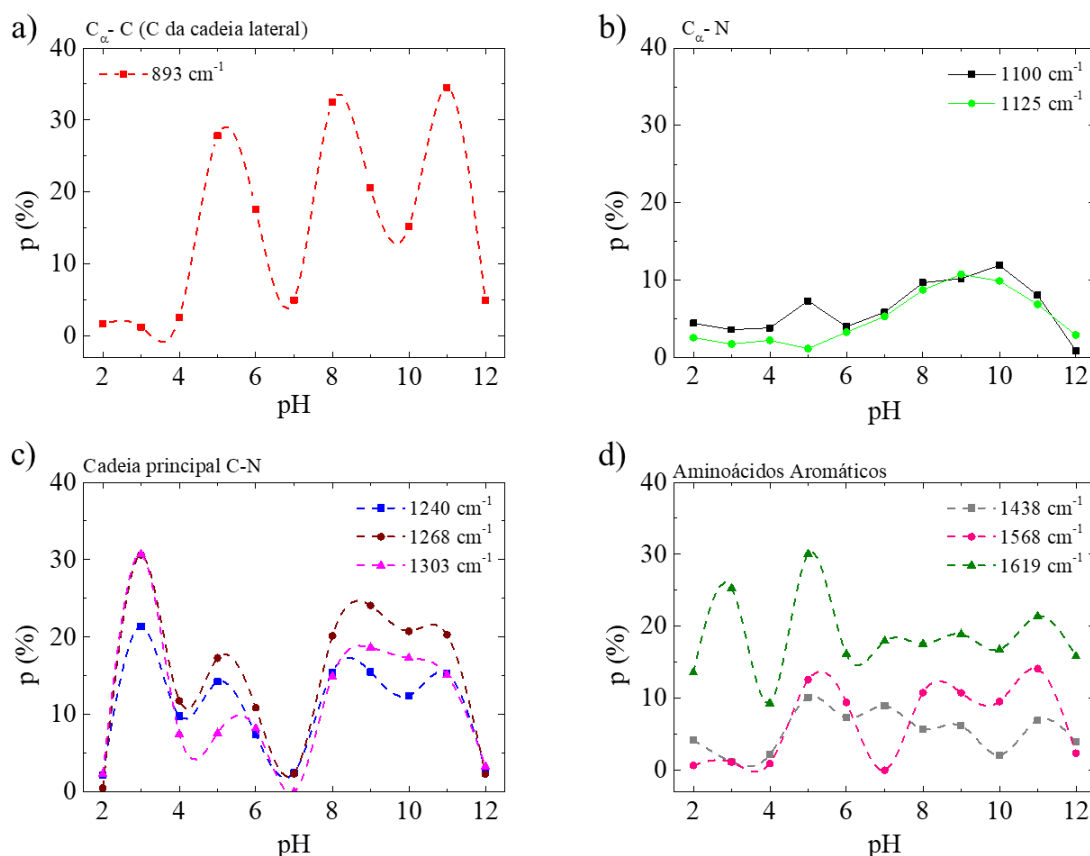


Figura 80 - Espectros do parâmetro p extraído pela técnica ERS em função do pH da proteína BSA nos picos a) 893 cm^{-1} , b) 1100 cm^{-1} e o 1125 cm^{-1} , c) 1240 cm^{-1} , 1268 cm^{-1} e 1303 cm^{-1} e d) 1438 cm^{-1} , 1568 cm^{-1} e 1619 cm^{-1} .

Portanto, as medidas de absorção, CD e ERS foram reveladoras para a determinação de como a mudança de ambiente químico, de um meio muito ácido (pH 2)

para um meio extremamente básico (pH 12), alteram a conformação da BSA. Em pH 7 (fisiológico) a proteína BSA se encontra em uma forma de menor energia estrutural,¹²¹ provando que a natureza evoluiu para conformações nas quais se tem o menor custo energético. Isso se reflete em um arranjo conformacional tal que, para a BSA, tenha maior porcentagem de estrutura do tipo hélice α e consequentemente maior eficiência de emissão pelos aminoácidos aromáticos. Há realmente uma mudança estrutural, tanto na cadeia principal quanto nos ramos laterais quando se vai para pH adjacentes ao fisiológico, a BSA sofre uma mudança estrutural maior em pH ácidos do que básicos. Prova-se então a eficácia da técnica ERS para estudos de estruturas de proteína, sendo ela mais precisa e local que as técnicas já utilizadas para tais estudos. Assim no modelo macroscópico a partir de dados de eletroforese deve E-F-N-B-A deve ser reconsiderado incluindo subfaces e identificado os pHs de transição. Como segue a nossa nova proposição:

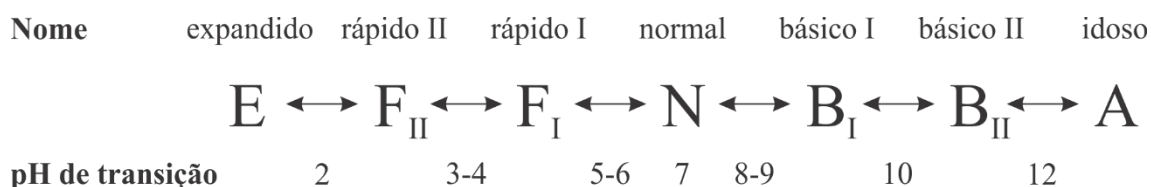


Figura 81 - Nova relação das formas isoméricas da BSA proposta neste trabalho.

8.3. (1R, 2R) diaminociclohexano

8.3.1. SW203

8.3.1.1. Absorção

O monômero do polímero (1R, 2R) diaminociclohexano, nomeado neste trabalho de SW203 possui um espectro de absorção com uma ampla banda de 300 a 475 nm. A transição na região de 300 a 350 nm pode estar relacionada a grupos estilbenzenos e as de 350 a 475 nm podem estar relacionadas as transições conjugadas $\pi \rightarrow \pi^*$. As medidas foram realizadas em todas as amostras, mas somente as SW203/-3 e SW203/-4 não extrapolaram o limite da escala do equipamento e estão representadas na Figura 82. Nesta figura pode-se observar a forma de linha e a intensidade se alteraram com a mudança de concentração, a amostra SW203/-3 apresenta todos os picos característicos do grupo benzeno e estilbenzeno, já a amostra SW203/-4, uma ordem de grandeza menos concentrada, tem sua forma de linha modificada, ficando evidente somente a região relacionada as transições conjugadas $\pi \rightarrow \pi^*$

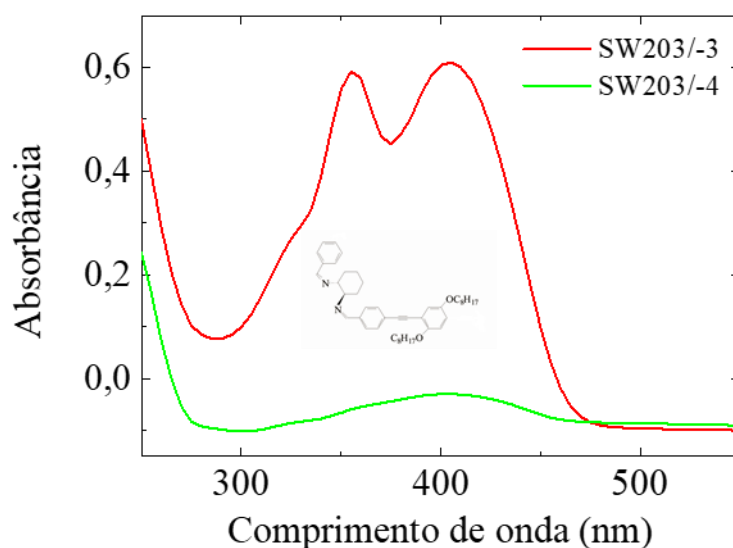


Figura 82 - Espectro de absorção do SW203 em duas concentrações.

8.3.1.2. PL e PLE

A Figura 83 mostra os espectros de PL e PLE das amostras do SW203. Observa-se na Figura 83.a, o espectro de PLE da amostra SW203/F mostra o alargamento de linha na região de 350nm quando comparado com o espectro de absorção da Figura 82, o que deve estar relacionado a interação polímero/polímero em estado sólido. Este resultado é acompanhado pelo deslocamento proeminente para o vermelho da PL, com pico em 475 nm. Em solução, as amostras SW203/-2, SW203/-3 e SW203/-4 espectros nas Figura 83.b, Figura 83.c e Figura 83.d, respectivamente, mostram um deslocamento para o azul, máximo em 450nm. A PLE para as amostras SW203/-3 e SW203/-4 apresentam forma de linha diferente das absorções óticas apresentadas na Figura 82. Este resultado demonstra a presença de mais de um processo radiativo, provavelmente devido a agregados moleculares. Além disso, observe os espectros de PL para a amostra SW203/F, na Figura 83.a, sua forma de linha é alterada significativamente em relação as soluções, ou seja, alargada e deslocada para o vermelho.

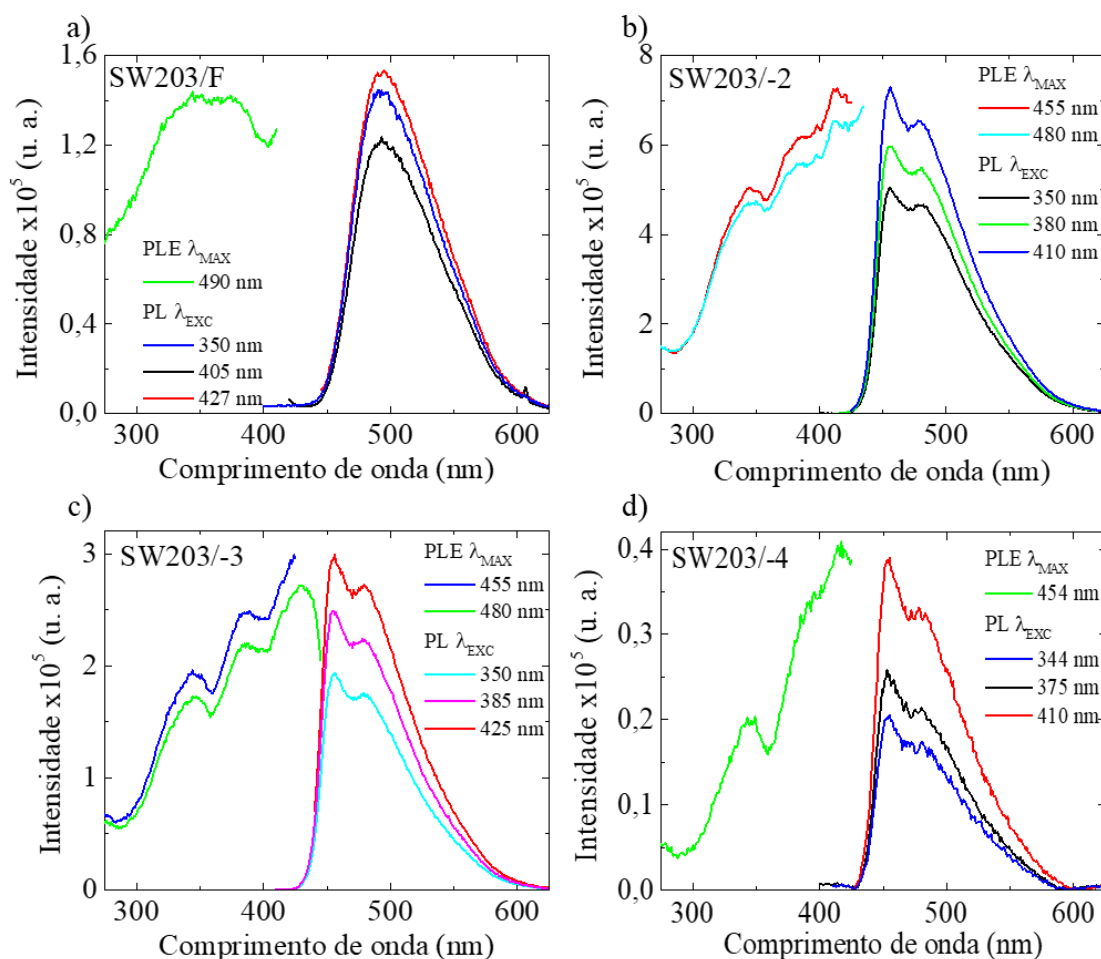


Figura 83 - Espectros de PL e PLE do SW203. a) amostra SW203/F, b) amostra SW203/-2, c) amostra SW203/-3 e d) SW203/-4.

8.3.1.3. EE e CDE

Como foi visto anteriormente a técnica de elipsometria de emissão (EE) fornece diversos parâmetros relacionados a polarização da luz emitida. As medidas de EE foram realizadas com quatro comprimentos de excitação diferentes, 350, 380, 400 e 425 nm. A Figura 84 é um exemplo dos parâmetros adquiridos através de uma medida de EE com o comprimento de onda de excitação de 350 nm na amostra SW203/-3. Na Figura 84.a pode-se observar a intensidade da fotoluminescência em função do grau de polarização da luz emitida. A Figura 84.b demonstra os parâmetros p , r e g e a Figura 84.c apresenta os parâmetros de Stokes normalizados pela intensidade total. As medidas realizadas com os outros comprimentos de ondas podem ser consultadas no anexo I.

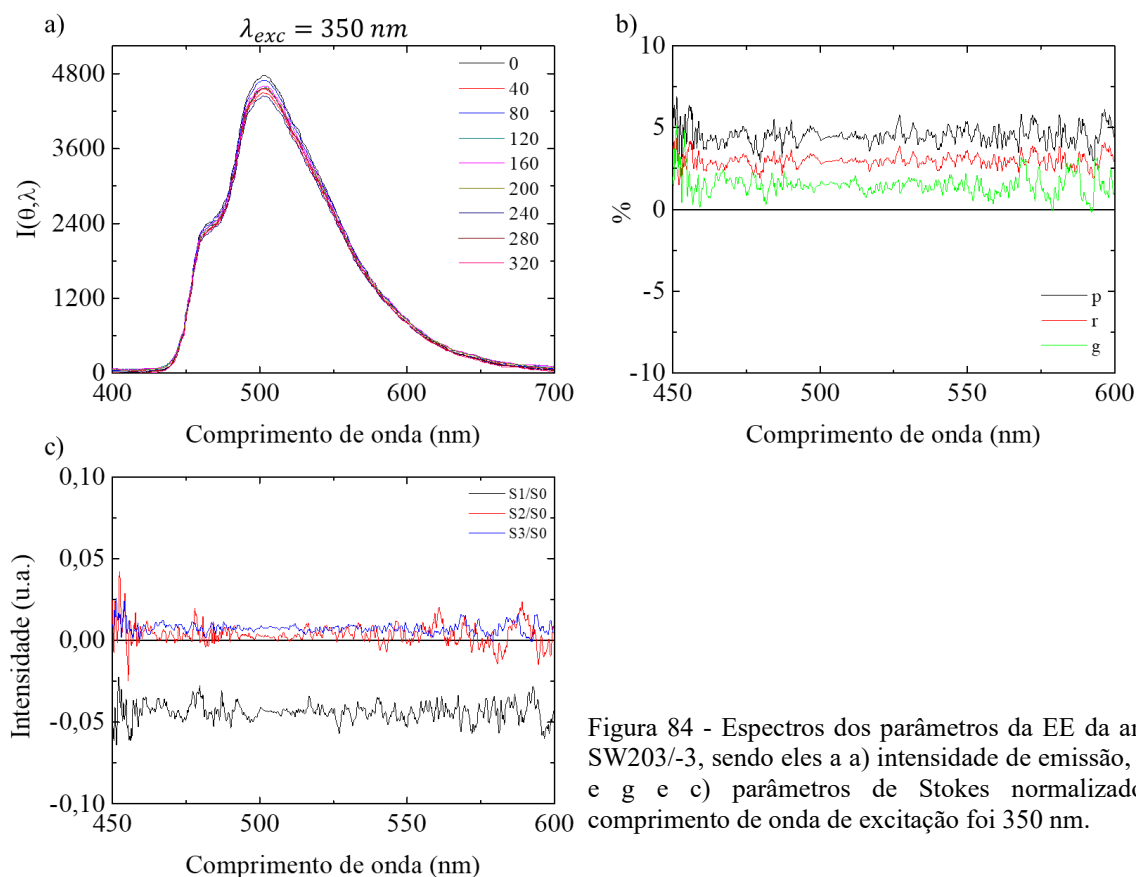


Figura 84 - Espectros dos parâmetros da EE da amostra SW203/-3, sendo eles a) intensidade de emissão, b) p , r e g e c) parâmetros de Stokes normalizados. O comprimento de onda de excitação foi 350 nm.

A Figura 85 mostra o parâmetro g para quatro diferentes comprimentos de ondas de excitação, 350, 380, 400 e 425 nm da amostra SW203/-3. Estes comprimentos de onda são nos picos do espectro de PLE. Pode-se observar que o fator de assimetria g para a excitação em 350 nm se mantém por volta de $\sim 0,15\%$, quanto o comprimento de onda aumenta para 380 nm ele decai para aproximadamente $\sim 0,05\%$ atingindo o seu menor valor, para a excitação em 400 nm o g retorna ao patamar de $\sim 0,15\%$ e na excitação em 425 nm ele atinge o seu maior valor, $\sim 0,25\%$.

A partir dos valores de g em função do comprimento de onda de excitação é possível fazer um gráfico de dicroísmo circular de excitação, ou CDE. Estas curvas são similares ao de PLE para a fotoluminescência. Na Figura 86 abaixo mostramos a variação destes parâmetros para as amostras de SW203/-2 (Figura 86.a), SW203/-3 (Figura 86.b) e SW203/F (Figura 86.c). De forma geral as curvas apresentam as mesmas formas de linha independentemente da concentração, no caso das soluções, ou na forma de filme. A diferença se dá nas intensidades relativas. O que se tem de interessante é que se pode controlar a polarização de emissão circular em função do comprimento de onda de excitação. Além disso, este resultado está de acordo com o esperado para esta molécula quiral baseada em anéis aromáticos, a interação entre anéis adjacentes mediados pelo

carbono quiral é capaz de deslocar os espectros de dicroísmo circular para a região do visível e, ainda, somado ao segmento conjugado linear. O espectro de CDE para a amostra SW203/F tem seu sinal invertido em relação a amostra em solução. Isso se deve a assimetria da molécula e a geometria da medida de EE na configuração de 90°, veja Figura 46. Se inverter a direção de excitação o sinal de CDE (não mostrado) também inverte. Esta é outra característica interessante destes novos materiais que a polarização de emissão não é isotrópica, mas depende da posição relativa do observador em relação a fonte de excitação.

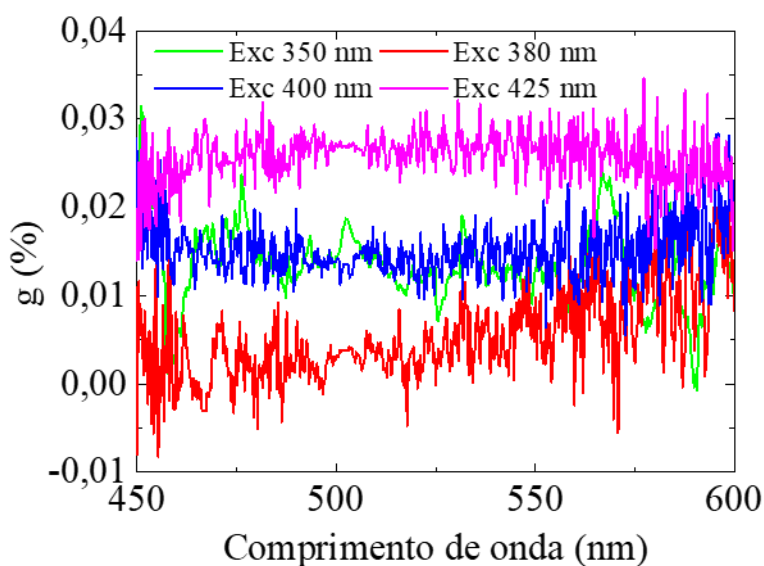


Figura 85 - Espectros do parâmetro g da EE para quatro diferentes comprimentos de ondas de excitação.

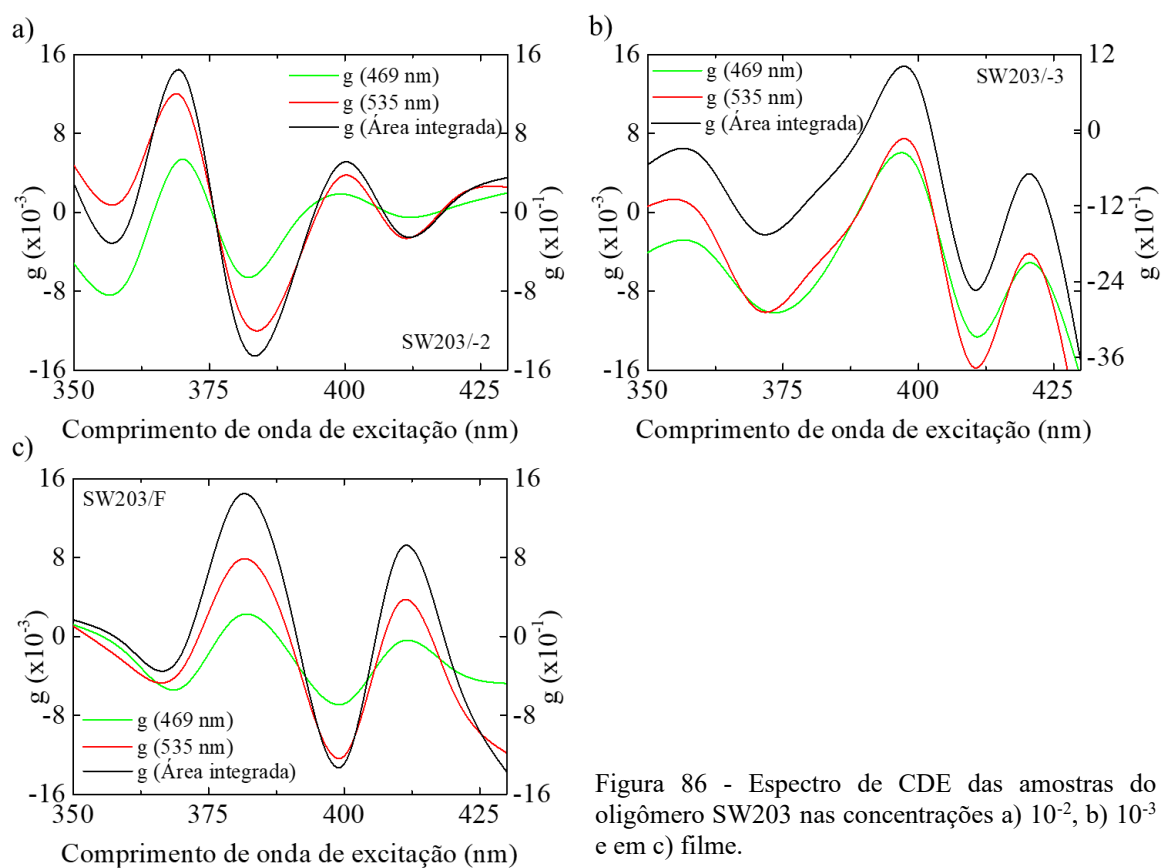


Figura 86 - Espectro de CDE das amostras do oligômero SW203 nas concentrações a) 10^{-2} , b) 10^{-3} e em c) filme.

8.3.1.4. ERS

A Figura 87 mostra o espectro Raman com picos vibracionais para SW203 atribuído como na Tabela 20 para grupos quirais e não quirais. Os picos em 651 , 1202 e 1496 cm^{-1} estão relacionados aos grupos benzeno e estilbenzeno, e o pico em 3009 cm^{-1} está relacionado aos modos vibracionais dos carbonos quirais.^{102,126}

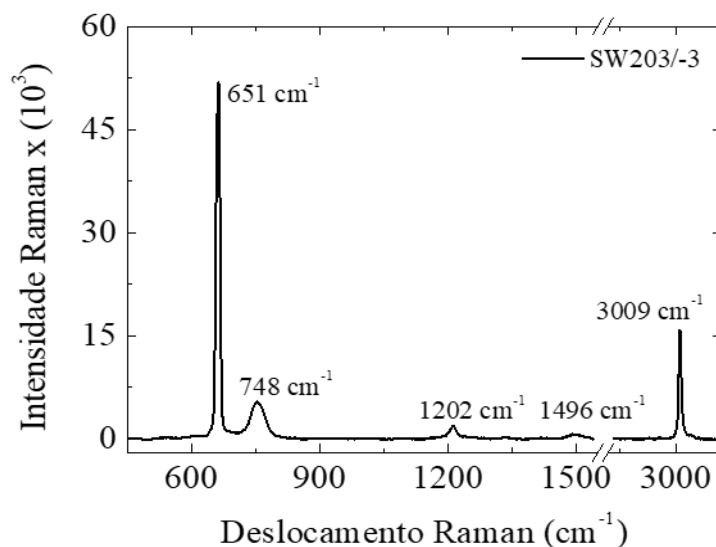


Figura 87 - Espectro Raman do oligômero SW203 retirado das medidas de ERS da amostra SW203/-3.

Tabela 20 - Assinaturas dos picos Raman do SW203 e do SW254.

Deslocamento Raman (cm-1)	Assinatura Raman
651	Deformação no plano 1 – 4- ϕ
748	Balanço do CH_3
1202	Alongamento ($\phi-O$) – C
1496	Alongamento semicircular em anel $C - C$
3009	Alongamentos $\phi-C - H$ e $C_\alpha - H$

A Figura 88a mostra as nove medições de $I(\theta, \lambda)$ (eq 2, $\theta_i = 0, 40, \dots, 320^\circ$) para o sinal Raman do SW203, com os parâmetros de Stokes normalizados mostrados na Figura 88c. A intensidade do parâmetro S_1/S_0 se mostra negativa devido a polarização do feixe incidente ser vertical, com isso verifica-se que o espalhamento ocorre na mesma direção que o feixe incidente. Os parâmetros S_2/S_0 e S_3/S_0 dependem essencialmente do modo vibracional do carbono quiral; para o SW203, está associado ao modo de alongamento – $C_\alpha - H$ (acerca de 3000 cm^{-1}). Na Figura 88c, há mais uma banda associada a S_2/S_0 e S_3/S_0 , a 650 cm^{-1} , principalmente relacionada aos modos vibracionais dos anéis de benzeno no SW203. Novamente, como as próprias estruturas de benzeno e estilbenzeno não devem apresentar quiralidade, esse sinal de ROA a 650 cm^{-1} não era esperado. A Figura 88b mostra valores semelhantes para r e p , sugerindo que a maior parte da contribuição com polarização linear tem a mesma direção que a luz que incide, tanto para os carbonos quirais (em torno de 3000 cm^{-1}) quanto para as contribuições de benzenos e estilbenzenos acoplados (em torno de 650 cm^{-1}). A assimetria g , também na Figura 88b, é semelhante ao parâmetro χ (Figura 88d).

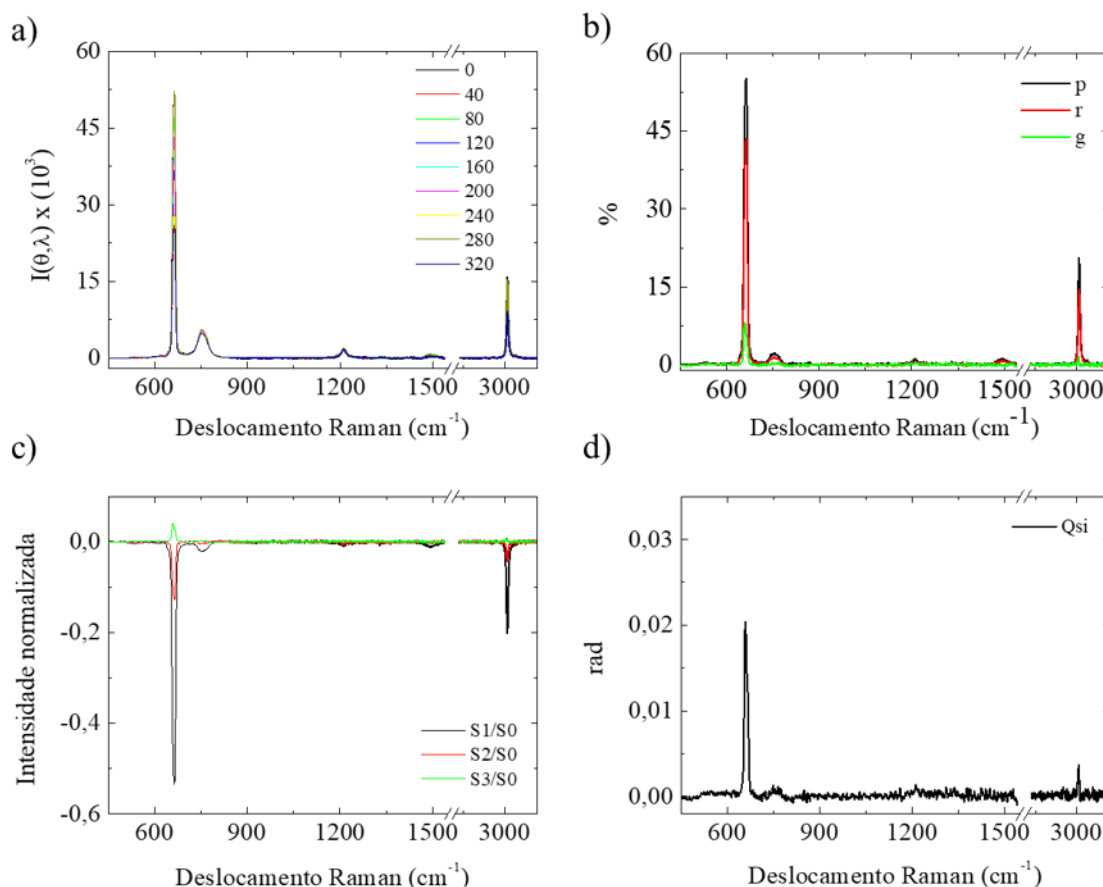


Figura 88 - Espectros dos parâmetros do ERS da amostra SW203/-3, sendo eles a a) intensidade de emissão, b) p, r e g, c) parâmetros de Stokes normalizados e d) χ .

8.3.1.5. Absorção

O polímero (1R, 2R) diaminociclohexano, nomeado neste trabalho de SW254 possui um espectro de absorção com uma ampla banda de 250 a 475 nm. As transições na região 250 a 300 nm podem estar relacionados ao grupo benzeno, as de 300 a 350 nm podem estar relacionadas a grupos estilbenzenos e as de 350 a 475 nm podem estar relacionadas as transições conjugadas $\pi \rightarrow \pi^*$. Para o espectro SW254, a banda a 340 nm é ampla porque contém a sobreposição da contribuição dos derivados de estilbenzeno ($\lambda_{max} = 320$ nm) e estilbenzeno agregado ($\lambda_{max} = 360$ nm). As medidas foram realizadas em todas as amostras, mas a amostra SW254/-2 extrapolou a escala e não está representado na Figura 89, nesta figura pode-se observar que a forma de linha não alterou-se com a mudança de concentração entre as duas amostras em solução, a SW254/-3 e SW254/-4, demonstrando que possivelmente com o aumento da concentração não há uma mudança conformacional no polímero. Não há nenhum pico característico do clorofórmio, pois o mesmo tem a região de absorção abaixo de 250 nm,

fora da região analisada. A mostra SW254/F apresenta o espectro do polímero característico,⁵ com todos os picos bem definidos, diferentemente das amostras em solução que apresenta apenas uma banda larga, isto se deve ao fato de que a amostra em filme possui uma concentração maior de cromóforos, com isso a absorção é maior do que em solução.

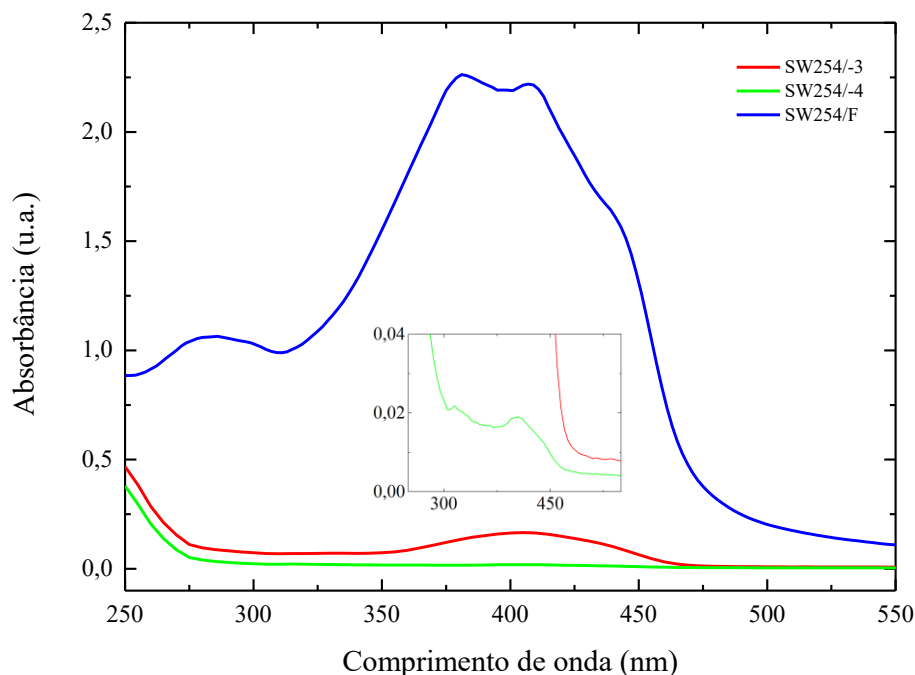


Figura 89 - Espectro de absorção do SW254 em várias concentrações e em filme.

8.3.1.6. PL e PLE

A Figura 90 mostra os espectros de PL e PLE das amostras do SW254 eles possuem uma banda larga de 250 a 475 nm. Observa-se na Figura 90.a, o espectro de PLE da amostra SW254/F está em total concordância com o espectro absorção visto anteriormente na Figura 89. Figura 90.b, Figura 90.c e Figura 90.d, apresentam uma PLE de acordo com o espectro de absorção visto anteriormente mas uma resolução melhor em relação aos de absorção como pode ser observado com as bandas relacionadas as transições conjugadas $\pi \rightarrow \pi^*$ (350 a 475 nm), elas agora elas ficam evidentes.

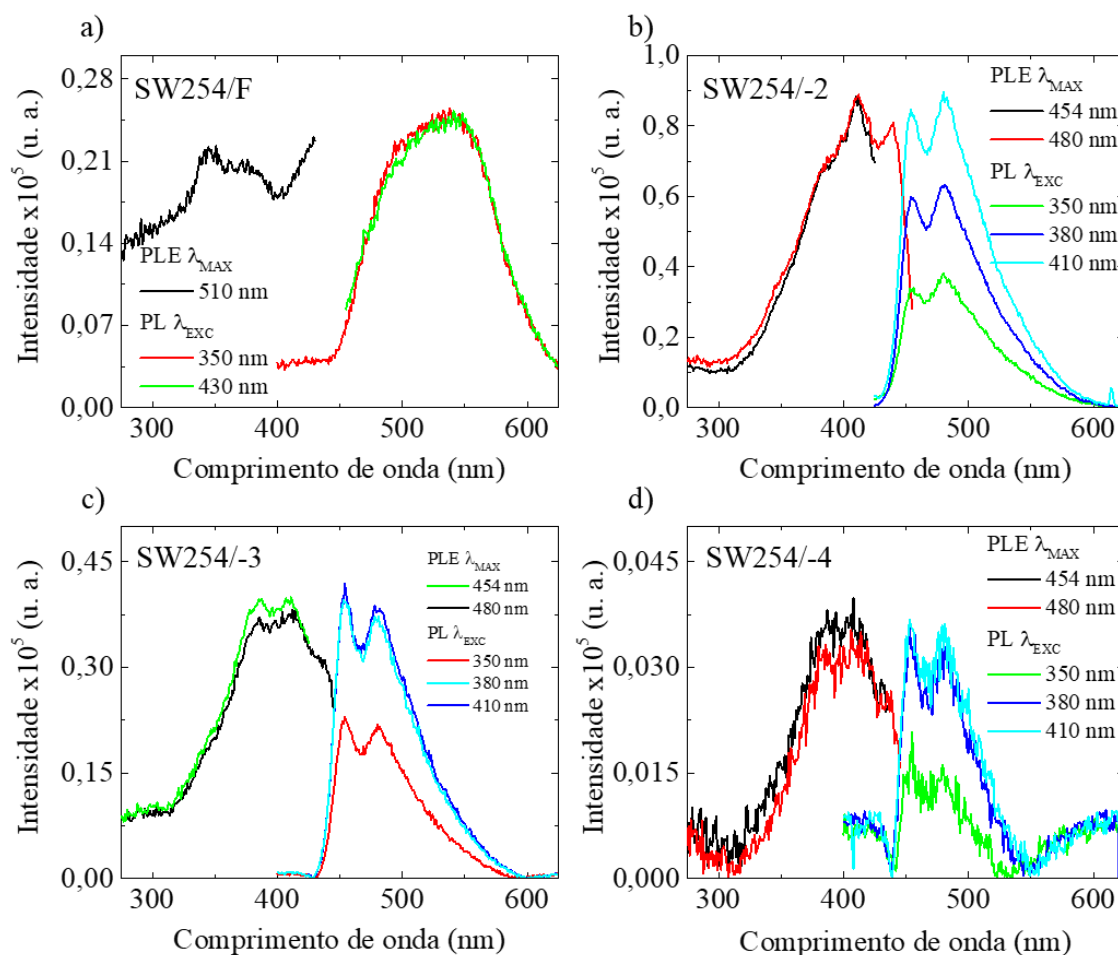


Figura 90 - Espectros de PL e PLE do SW203. a) amostra SW254/F, b) amostra SW254/-2, c) amostra SW254/-3 e d) SW254/-4.

8.3.1.7. EE e CDE

As medidas de EE foram realizadas com quatro comprimentos de excitação diferentes, 350, 380, 400 e 410 nm. A Figura 91 é um exemplo dos parâmetros adquiridos através de uma medida de EE com o comprimento de onda de excitação de 350 nm na amostra SW254/-3. Esta concentração foi escolhida por apresentar sinal em todas as técnicas espectroscópicas, podendo assim comparar os resultados das mesmas. Na Figura 91.a pode-se observar a intensidade da fotoluminescência em função do grau de polarização da luz emitida, o comprimento de onda de emissão esta de acordo com a literatura e é devido aos grupos benzeno.¹²⁷ A Figura 91.b demonstra os parâmetros p , r e g e a Figura 84.c apresenta os parâmetros de Stokes normalizados pela intensidade total. As medidas realizadas com os outros comprimentos de ondas podem ser consultadas no anexo I.

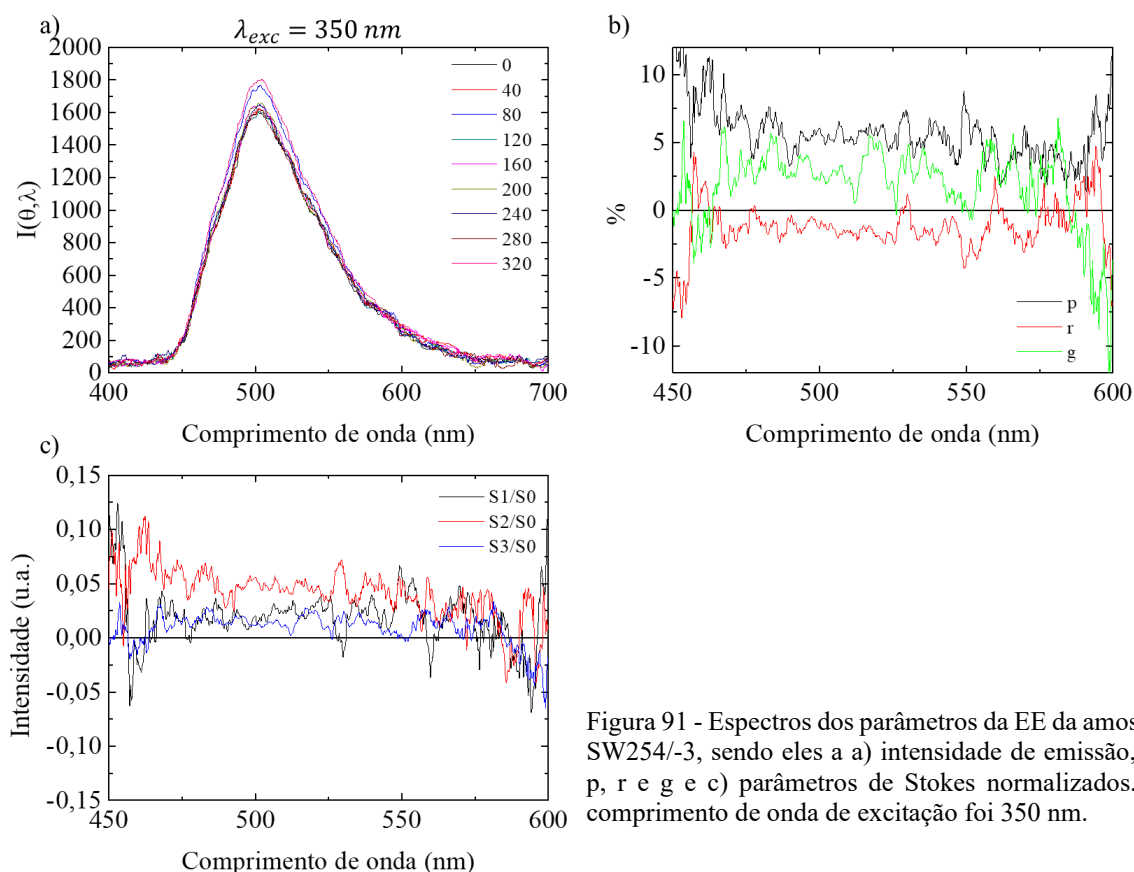


Figura 91 - Espectros dos parâmetros da EE da amostra SW254/-3, sendo eles a a) intensidade de emissão, b) p, r e g e c) parâmetros de Stokes normalizados. O comprimento de onda de excitação foi 350 nm.

A Figura 92 mostra o parâmetro g para quatro diferentes comprimentos de ondas de excitação, 350, 380, 400 e 410 nm da amostra SW254/-3. Estes comprimentos de onda são nos picos do espectro de PLE. Pode-se observar que o fator de assimetria g para a excitação em 350 nm sem mantém por volta de $\sim 0,02\%$, enquanto o comprimento de onda aumenta para 380 nm ele decai para aproximadamente $\sim -0,01\%$ atingindo o seu menor valor já para a excitação em 400 nm o g retorna ao patamar de $\sim 0,01\%$ e na excitação em 410 nm ele atinge o seu maior valor, $\sim 0,06\%$

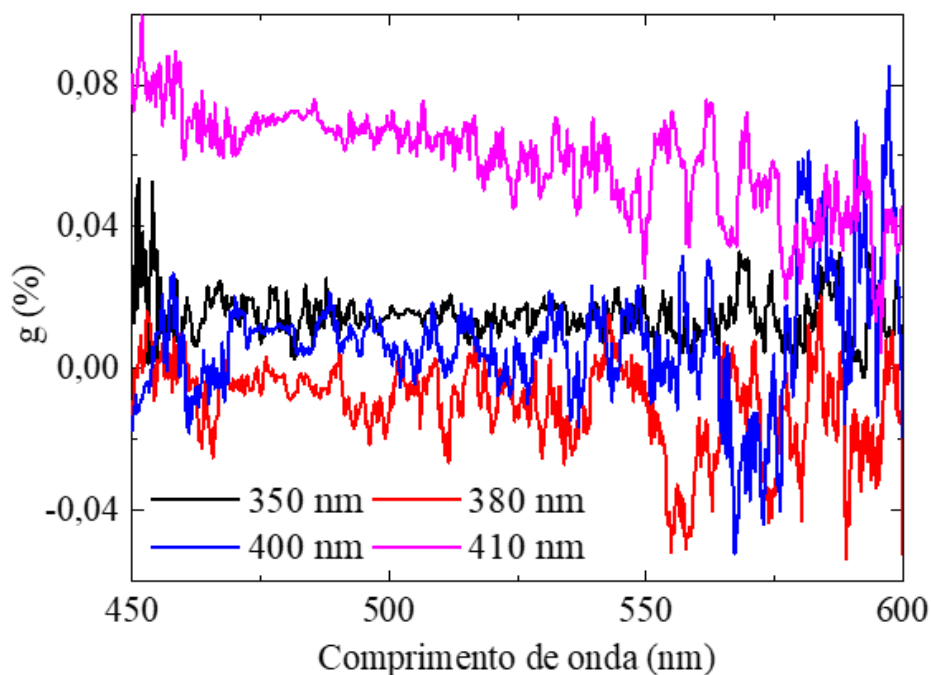


Figura 92 - Espectros do parâmetro g da EE para quatro diferentes comprimentos de ondas de excitação.

Analogamente ao analisado para o oligômero, na Figura 93, tem-se os espectros de CDE para o polímero SW254. A Figura 93.a, Figura 93.b e Figura 93.c estão relacionadas as amostras SW254/-2, SW254/-3 e SW254/F, respectivamente. As amostras em solução não alteraram a forma de linha, independentemente do comprimento de onda de excitação e da concentração da solução, o que foi alterado foi a intensidade relativa, como ocorreu no oligômero SW203, demonstrando assim que se pode controlar a polarização de emissão circular em função do comprimento de onda de excitação. A amostra SW254/F possui o seu sinal invertido em relação as amostras em solução devido a assimetria da molécula e da geometria da EE, como falado anteriormente. Comprovando de fato, que estes novos tipos de materiais possuem uma característica de interação com a luz de forma não isotrópica, ou seja, dependendo da posição do observador em relação a fonte de excitação ela pode apresentar características diferentes.

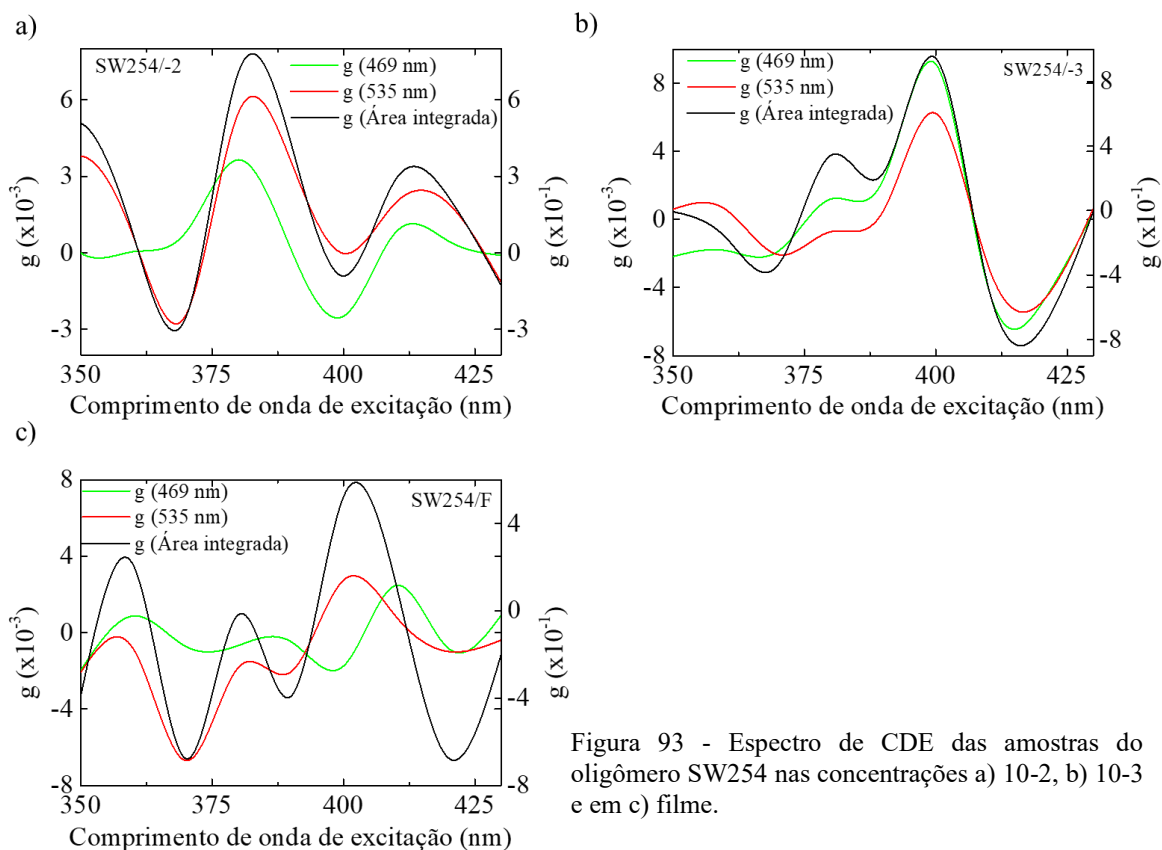


Figura 93 - Espectro de CDE das amostras do oligômero SW254 nas concentrações a) 10-2, b) 10-3 e em c) filme.

8.3.1.8. ERS

A Figura 94 mostra o espectro Raman com picos vibracionais para SW254 atribuído como na Tabela 20 para grupos quirais e não quirais. Analogamente ao oligômero os picos em 651 , 1202 e 1496 cm^{-1} estão relacionados aos grupos benzeno e estilbenzeno, e o pico em 3009 cm^{-1} está relacionado aos modos vibracionais dos carbonos quirais.

A Figura 95a mostra as nove medições de $I(\theta, \lambda)$ ($\theta_i = 0, 40, \dots, 320^\circ$) para o sinal Raman do SW254, com os parâmetros de Stokes normalizados mostrados na Figura 95c. Da mesma forma que o SW203, o espalhamento linear normalizado (S_1/S_0) é negativo demonstrando que o polímero não altera radicalmente a direção do feixe incidente que é vertical. Os parâmetros S_2/S_0 e S_3/S_0 , analogamente ao oligômero, dependem essencialmente da modo vibracional do carbono quiral; para SW254, está associado ao modo de alongamento $-C_\alpha - H$ (acerca de 3000 cm^{-1}). Na Figura 95c, há mais uma banda associada a S_2/S_0 e S_3/S_0 , a 650 cm^{-1} , principalmente relacionada aos modos vibracionais dos anéis de benzeno no SW254. Novamente, como as próprias estruturas de benzeno e estilbenzeno não devem apresentar quiralidade, esse sinal de ROA a 650

cm^{-1} não era esperado. No entanto, como já visto na literatura,⁵ há acoplamento de exciton entre os grupos estilbenzeno e benzeno nas moléculas SW254, formando um sistema quiral no nível eletrônico. Pode-se supor que esse acoplamento também ocorra para os níveis vibracionais, levando a um sinal ROA para o SW254 relacionado aos modos vibracionais dos anéis de benzeno e grupos de estilbenzeno. Figura 95b mostra valores semelhantes para r e p , sugerindo que a maior parte da contribuição com polarização linear tem a mesma direção que a luz que incide, tanto para os carbonos quirais (em torno de 3000 cm^{-1}) quanto para as contribuições de benzenos e estilbenzenos acoplados (em torno de 650 cm^{-1}). A assimetria g , também na Figura 95b, é semelhante ao parâmetro χ (Figura 95d), mostrando não apenas a assimetria dos carbonos quirais SW254, mas também a assimetria resultante do acoplamento do exciton entre os grupos estilbenzeno e benzeno. Tomados em conjunto, esses resultados apontam para uma metodologia que permite estudar não apenas as vizinhanças dos carbonos quirais, mas também espécies moleculares acopladas para formar sistemas quirais. Além disso, a metodologia permitiu medições na região de baixo número de onda ($700 \text{ a } 500 \text{ cm}^{-1}$).

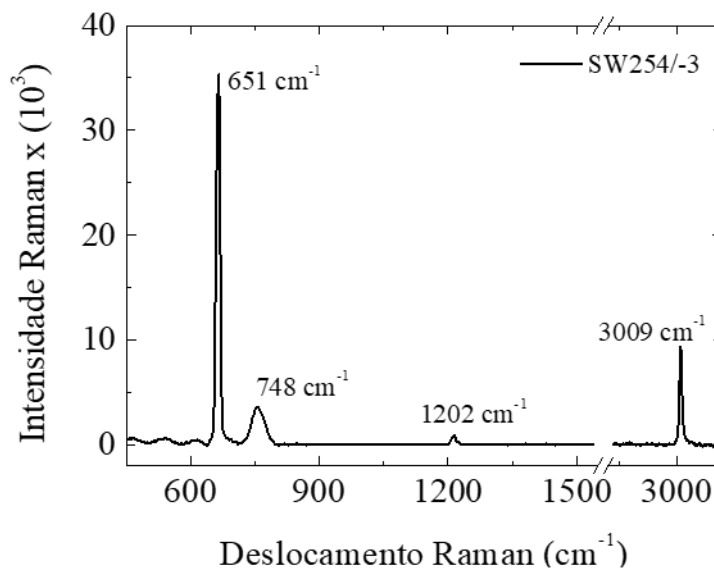


Figura 94 - Espectro Raman do polímero SW254 retirado das medidas de ERS da amostra SW254/-3.

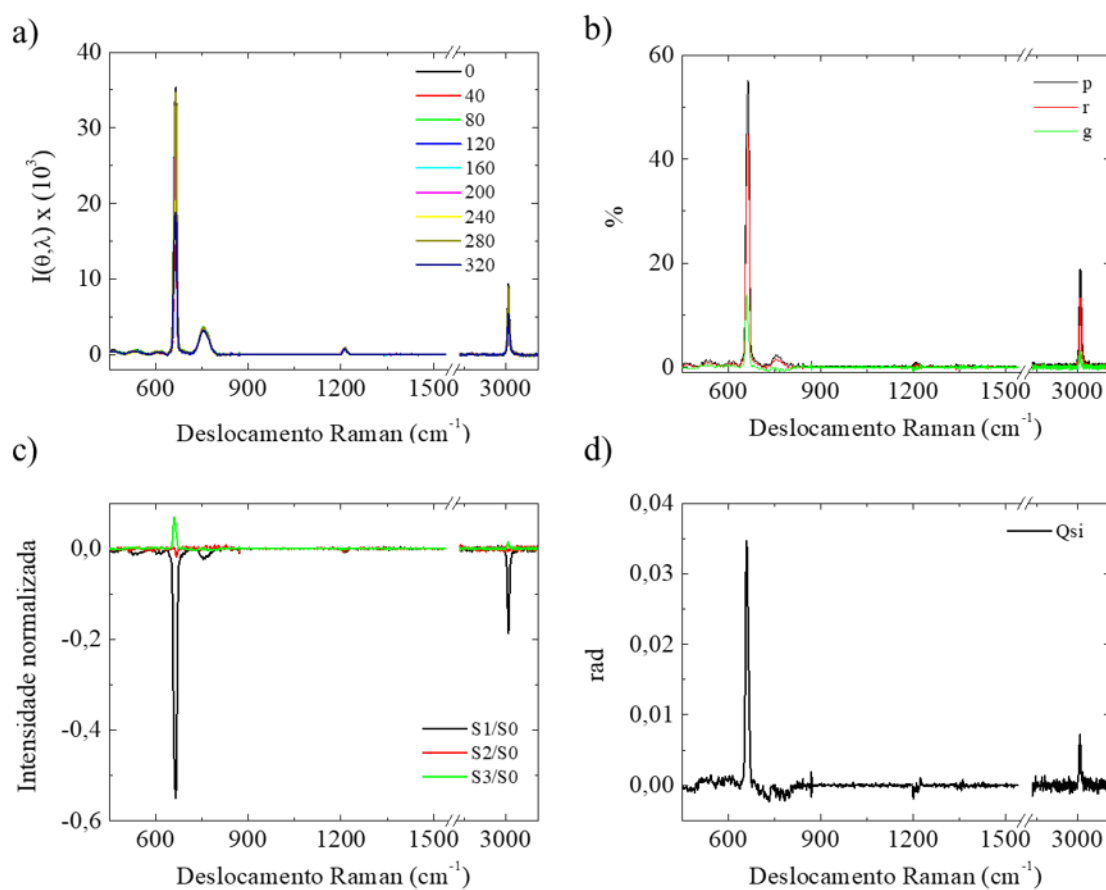


Figura 95 - Espectros dos parâmetros do ERS da amostra SW254/-3, sendo eles a) intensidade de emissão, b) p , r e g , c) parâmetros de Stokes normalizados e d) χ .

CAPÍTULO 9 – CONCLUSÕES

9. CONCLUSÕES

O objetivo deste trabalho foi investigar as propriedades fotofísicas de diferentes moléculas orgânicas. As propriedades fotofísicas do poli (Metil metacrilato) (PMMA) foram investigadas em três diferentes solventes, clorofórmio, tetrahidrofurano (THF) e tolueno. As amostras foram preparadas com a técnica casting e realizou-se o tratamento térmico em algumas amostras. As propriedades do PMMA foram investigadas pelas técnicas de espectroscopia de raio-x, absorção óptica, espalhamento Raman e espectroscopia Raman por elipsometria (ERS). Conseguimos chegar as seguintes conclusões depois deste estudo. Ao realizar o tratamento térmico, esperava-se que seria suficiente para retirar todo o solvente da amostra polimérica, através das medidas de absorção ficou claro que ainda há moléculas de solventes na amostra. As medidas de raio-x mostraram que os três solventes analisados são excelentes solventes para o PMMA, mas dentre os três o clorofórmio foi o que apresentou maior interação com a matriz polimérica. A técnica ERS foi capaz de exibir duas temperaturas de relaxação do polímero a β e a γ , que acontecem em 240 K e 140 K, respectivamente. Outra informação fornecida pela ERS foi a interação do solvente de forma localizada, o clorofórmio e o THF interagem com o solvente na forma anisotrópica, a simetria da molécula de PMMA é quebrada, já no caso do tolueno, esta interação é isotrópica, o tolueno não altera a conformação do PMMA.

A albumina soro bovino (BSA) foi estudada em relação a sua conformação estrutural na mudança de ambiente químico. Foram 11 amostra de BSA variando de pH 2 a 12. Para analisar esta mudança foi realizada medidas de absorção óptica, dicroísmo circular (CD), fotoluminescência de excitação, espalhamento Raman e ERS. As medidas de absorção óptica já davam indícios de uma mudança conformacional com a alteração do ambiente químico, mas isto só foi confirmado pelas medidas de CD. Essas revelaram que em pH fisiológico a BSA estava em seu estado de menor gasto energético, quando esse ambiente variava para pH vizinhos o número de estruturas hélice α , predominante na BSA (65%), iam caindo e o valor de formas randômicas iam crescendo, mostrando claramente que a BSA, com a mudança do ambiente químico, sofre mudanças conformacionais. As medidas de PLE elucidaram que esta mudança é mais abrupta quando se vai para pH mais ácidos e mais suave para pH básicos, percebendo que o grande precursor dessa mudança eram os aminoácidos aromáticos que estavam condicionados dentro da estrutura da BSA. As medidas de ERS foram a parte crucial para elucidar todo

o processo de mudanças conformacionais que estavam ocorrendo. Como a técnica ERS permite caracterizar mudanças estruturais mais localmente, percebeu-se que ao sair para pH adjacentes ao fisiológico a cadeia principal começava a se modificar, essa mudança é causada pelo aparecimento dos aminoácidos aromáticos, como observado na PLE, ao começarem a aparecerem, o ambiente químico provoca uma inversão dos radicais livres deste carbono quiral. Concluímos, que, em pH fisiológico as cadeias laterais estão condicionadas dentro da proteína de forma organizada. Com a mudança do ambiente químico, tanto para meios ácidos ou alcalinos, esta condição é alterada e as cadeias laterais ficam mais expostas a este ambiente químico.

O polímero conjugado quiral (1R, 2R) diaminociclohexano foi estudado na sua forma polimérica, nomeada neste trabalho de SW254 e na forma de oligômero, chamado de SW203. Para ambos foram realizadas medidas de absorção, PL, PLE, EE, CDE e ERS, em amostras com diferentes concentrações e em filme. Pôde-se perceber que para o SW203 que houve um alargamento de linha no espectro de PL para amostras em solução em relação a da amostra em filme, este fato está relacionado a interação polímero-polímero em estado sólido. Além disso, os espectros de PLE para as amostras em solução apresentaram uma forma de linha diferente dos da absorção óptica demonstrando a presença de mais de um processo radioativo, provavelmente devido a agregados moleculares.

Dentre todas as medidas o resultado do CDE e do ERS se destacaram. Pode se observar para ambas as amostras, SW203 e SW254, que a diferença das intensidades relativas apresentadas no espectro de CDE dá a capacidade de controlar a polarização da luz de emissão circular em função do comprimento de onda de excitação. Outra característica importante observada através do CDE foi provar que a interação da luz não é isotrópica, mas depende da posição relativa do observador em relação a fonte de excitação. O ERS demonstrou que pode haver um acoplamento de éxciton entre os grupos estilbeno e benzeno nas moléculas SW254, formando um sistema quiral no nível vibracional. A assimetria g mostra não apenas a assimetria dos carbonos quirais SW254, mas também a assimetria resultante do acoplamento do éxciton entre os grupos estilbeno e benzeno.

Portanto, pode-se concluir depois de todos os resultados apresentados acima, que a técnica ERS fornece informações adicionais sobre estruturas de materiais ainda não observadas por outras técnicas.

Trabalhos futuros

Este trabalho demonstra a enorme capacidade da técnica ERS em caracterizar materiais orgânicos. Nossa perspectiva é expandir a utilização do ERS para diversos tipos de materiais como, por exemplo, os inorgânicos. Além disso as medidas do polímero conjugado quiral (1R, 2R) diaminociclohexano foram reveladoras e traz opções para novos trabalhos.

CAPÍTULO 10 - REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Barron LD, Bogaard MP, Buckingham AD. Raman scattering of circularly polarized light by optically active molecules. *J Am Chem Soc.* 1973;95(2):603-605. doi:10.1021/ja00783a058
2. Barron LD. *Molecular Light Scattering and Optical Activity*. 2nd ed. (Cambridge University Press, ed.). New York: October 2009; 2009.
3. Syme CD, Blanch EW, Holt C, et al. A Raman optical activity study of rheomorphism in caseins, synucleins and tau. *Eur J Biochem.* 2002;269(1):148-156. doi:10.1046/j.0014-2956.2001.02633.x
4. Barron LD, Hecht L, Blanch EW, Bell AF. Solution structure and dynamics of biomolecules from Raman optical activity. *Prog Biophys Mol Biol.* 2000;73(1):1-49. doi:10.1016/S0079-6107(99)00017-6
5. Basilio FC, Campana PT, Therézio EM, et al. Ellipsometric Raman Spectroscopy. *J Phys Chem C.* 2016;120(43):25101-25109. doi:10.1021/acs.jpcc.6b08809
6. Ross PD, Minton AP. Analysis of non-ideal behavior in concentrated hemoglobin solutions. *J Mol Biol.* 1977;112(3):437-452. doi:10.1016/S0022-2836(77)80191-5
7. Bhattacharya A, Kim YC, Mittal J. Protein–protein interactions in a crowded environment. *Biophys Rev.* 2013;5(2):99-108. doi:10.1007/s12551-013-0111-5
8. Strengers PFW, Twuijver E van. Blood, blood components, plasma, and plasma products. In: ; 2009:527-546. doi:10.1016/S0378-6080(09)03133-X
9. Barbosa LRS, Ortore MG, Spinozzi F, Mariani P, Bernstorff S, Itri R. The Importance of Protein-Protein Interactions on the pH-Induced Conformational Changes of Bovine Serum Albumin: A Small-Angle X-Ray Scattering Study. *Biophys J.* 2010;98(1):147-157. doi:10.1016/j.bpj.2009.09.056
10. Lacroix H. *Thermohygroelastic Properties of Polymethylmethacrylate*. Netherlands; 2007.
11. Demir MM, Memesa M, Castignolles P, Wegner G. PMMA/Zinc Oxide Nanocomposites Prepared by In-Situ Bulk Polymerization. *Macromol Rapid Commun.* 2006;27(10):763-770. doi:10.1002/marc.200500870

12. Ali U, Karim KJBA, Buang NA. A Review of the Properties and Applications of Poly (Methyl Methacrylate) (PMMA). *Polym Rev.* 2015;55(4):678-705. doi:10.1080/15583724.2015.1031377
13. Hashim H, Adam NI, Zaki NHM, et al. Natural rubber-grafted with 30% poly(methylmethacrylate) characterization for application in lithium polymer battery. In: *2010 International Conference on Science and Social Research (CSSR 2010)*. IEEE; 2010:485-488. doi:10.1109/CSSR.2010.5773825
14. Henry AC, Tutt TJ, Galloway M, et al. Surface Modification of Poly(methyl methacrylate) Used in the Fabrication of Microanalytical Devices. *Anal Chem.* 2000;72(21):5331-5337. doi:10.1021/ac000685l
15. Lee L-H, Chen W-C. High-Refractive-Index Thin Films Prepared from Trialkoxysilane-Capped Poly(methyl methacrylate)-Titania Materials. *Chem Mater.* 2001;13(3):1137-1142. doi:10.1021/cm000937z
16. Shah JJ, Geist J, Locascio LE, Gaitan M, Rao M V., Vreeland WN. Surface modification of poly(methyl methacrylate) for improved adsorption of wall coating polymers for microchip electrophoresis. *Electrophoresis.* 2006;27(19):3788-3796. doi:10.1002/elps.200600118
17. Adhikari B, Majumdar S. Polymers in sensor applications. *Prog Polym Sci.* 2004;29(7):699-766. doi:10.1016/j.progpolymsci.2004.03.002
18. Akelah A, Sherrington DC. Application of functionalized polymers in organic synthesis. *Chem Rev.* 1981;81(6):557-587. doi:10.1021/cr00046a003
19. Yamamoto C, Okamoto Y. Optically Active Polymers for Chiral Separation. *Bull Chem Soc Jpn.* 2004;77(2):227-257. doi:10.1246/bcsj.77.227
20. Cui TJ, Smith D, Liu R. *Metamaterials*. (Cui TJ, Smith D, Liu R, eds.). Boston, MA: Springer US; 2010. doi:10.1007/978-1-4419-0573-4
21. Pendry JB. Negative Refraction Makes a Perfect Lens. *Phys Rev Lett.* 2000;85(18):3966-3969. doi:10.1103/PhysRevLett.85.3966
22. Vignolini S, Yufa NA, Cunha PS, et al. A 3D Optical Metamaterial Made by Self-Assembly. *Adv Mater.* 2012;24(10):OP23-OP27. doi:10.1002/adma.201103610
23. Mano EB, Mendes LC. *Introducao a Polimeros*. Edgard Blucher; 1999.

24. Akcelrud L. *Fundamentos Da Ciência Dos Polímeros*. Manole; 2007.
25. Marletta A. Propriedades ópticas de semicondutores orgânicos à base de polímeros emissores de luz. 2001.
26. Faez R, Reis C, Freitas PS de, Kosima OK, Ruggeri G, Paoli M-A De. Polímeros condutores. *Química Nov na Esc*. 2000;(11):13-18.
27. Dias IFL, Silva MAT. *Polímeros Semicondutores*. Livraria da Física; 2012.
28. Valeur B. *Molecular Fluorescence*. Vol 8. Weinheim, FRG: Wiley-VCH Verlag GmbH; 2001. doi:10.1002/3527600248
29. Valeur B. Molecular Fluorescence. In: *Digital Encyclopedia of Applied Physics*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2009:477-531. doi:10.1002/3527600434.eap684
30. Therézio EM. Síntese eletroquímica, caracterização e análise das propriedades ópticas do poli (3-octiltiofeno) (P3OT). 2009.
31. Greenham NC, Friend RH. Semiconductor Device Physics of Conjugated Polymers. *Solid State Phys - Adv Res Appl*. 1996;49(C):1-149. doi:10.1016/S0081-1947(08)60297-0
32. Allen NS, ed. *Photochemistry and Photophysics of Polymeric Materials*. New Jersey: WILEY; 2010.
33. Borges CAM. Processos radioativos e não radioativos em polímeros conjugados emissores de luz. 2001.
34. Son S, Dodabalapur A, Lovinger AJ, Galvin ME. Luminescence Enhancement by the Introduction of Disorder into Poly(p-phenylene vinylene). *Science* (80-). 1995;269(5222):376-378. doi:10.1126/science.269.5222.376
35. Pu L. The study of chiral conjugated polymers. *Acta Polym*. 1997;48(4):116-141. doi:10.1002/actp.1997.010480402
36. Liu Y, Zhang X. Metamaterials: a new frontier of science and technology. *Chem Soc Rev*. 2011;40(5):2494. doi:10.1039/c0cs00184h
37. Pendry JB. A Chiral Route to Negative Refraction. *Science* (80-). 2004;306(5700):1353-1355. doi:10.1126/science.1104467

38. Wang B, Zhou J, Koschny T, Kafesaki M, Soukoulis CM. Chiral metamaterials: simulations and experiments. *J Opt A Pure Appl Opt.* 2009;11(11):114003. doi:10.1088/1464-4258/11/11/114003
39. Baev A, Samoc M, Prasad PN, Krykunov M, Autschbach J. A quantum chemical approach to the design of chiral negative index materials. *Opt Express.* 2007;15(9):5730. doi:10.1364/OE.15.005730
40. McQuade DT, Pullen AE, Swager TM. Conjugated Polymer-Based Chemical Sensors. *Chem Rev.* 2000;100(7):2537-2574. doi:10.1021/cr9801014
41. Solomons TGG. *Química Orgânica*. 8th ed. Rio de Janeiro: John Wiley & Sons, Inc.; 2004.
42. IUPAC-IUB Comm. on Biochem. Nomencl . IUPAC tentative rules for the nomenclature of organic chemistry. Section E. Fundamental stereochemistry. *J Org Chem.* 1970;35(9):2849-2867. doi:10.1021/jo00834a001
43. Zilio SC. *Óptica Moderna - Fundamentos e Aplicações*. São Carlos: IFSC-USP
44. Gottarelli G, Lena S, Masiero S, Pieraccini S, Spada GP. The use of circular dichroism spectroscopy for studying the chiral molecular self-assembly: An overview. *Chirality.* 2008;20(3-4):471-485. doi:10.1002/chir.20459
45. Barron LD, Hecht L, Bell AF, Wilson G. Recent developments in raman optical activity of biopolymers. *Appl Spectrosc.* 1996;50(5):619-629.
46. Whitford D. *Proteins: Structure and Function*. Chichester, West Sussex - England: John Wiley & Sons Ltd; 2013.
47. Simpson RJ, Grego B, Rubira MR, Sparrow LG, Nice EC. *Proteins*. (L'Italien JJ, ed.). Boston, MA: Springer US; 1987. doi:10.1007/978-1-4613-1787-6
48. Tompa P, Fersht A. *Structure and Function of Intrinsically Disordered Proteins*. New York: Chapman and Hall/CRC; 2009. doi:10.1201/9781420078930
49. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Principles of Biochemistry*. W. H. Free. New York: W. H. Freeman and Company; 2017. doi:https://doi.org/10.1002/bmb.2005.494033010419
50. Doolittle RF. Redundancies in Protein Sequences. In: *Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation*. Boston, MA: Springer US;

- 1989;599-623. doi:10.1007/978-1-4613-1571-1_14
51. Clery D. Astronomers have spotted the universe's first molecule. *Science* (80-). April 2019. doi:10.1126/science.aax7353
52. McColl IH, Blanch EW, Hecht L, Barron LD. A study of ??-helix hydration in polypeptides, proteins, and viruses using vibrational Raman optical activity. *J Am Chem Soc.* 2004;126(26):8181-8188. doi:10.1021/ja048991u
53. Shepherd NE, Hoang HN, Abbenante G, Fairlie DP. Left- and Right-Handed Alpha-Helical Turns in Homo- and Hetero-Chiral Helical Scaffolds. *J Am Chem Soc.* 2009;131(43):15877-15886. doi:10.1021/ja9065283
54. Rose AS, Bradley AR, Valasatava Y, Duarte JM, Prlić A, Rose PW. NGL viewer: web-based molecular graphics for large complexes. Valencia A, ed. *Bioinformatics.* 2018;34(21):3755-3758. doi:10.1093/bioinformatics/bty419
55. McColl IH, Blanch EW, Gill AC, et al. A new perspective on ??-sheet structures using vibrational raman optical activity: From poly(L-lysine) to the prion protein. *J Am Chem Soc.* 2003;125(33):10019-10026. doi:10.1021/ja021464v
56. Macleod NA, Butz P, Simons JP, GrantPresent address: University Ch GH, Baker CM, Tranter GE. Structure, electronic circular dichroism and Raman optical activity in the gas phase and in solution: a computational and experimental investigation. *Phys Chem Chem Phys.* 2005;7(7):1432. doi:10.1039/b501098e
57. Greenfield NJ. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat Protoc.* 2006;1(6):2876-2890. doi:10.1038/nprot.2006.202
58. Sreerama N, Woody RW. A Self-Consistent Method for the Analysis of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism. *Anal Biochem.* 1993;209(1):32-44. doi:10.1006/abio.1993.1079
59. Sreerama N, Woody RW. Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectroscopy. *J Mol Biol.* 1994;242(4):497-507. doi:10.1006/jmbi.1994.1597
60. Pastor J, Bísaro HH, Campana PT. CDProWin7. 2014. http://www.each.usp.br/aprender-ciencia/cdpro_win7.php#.
61. Zhu F, Isaacs NW, Hecht L, Barron LD. Raman optical activity: A tool for protein structure analysis. *Structure.* 2005;13(10):1409-1419.

- doi:10.1016/j.str.2005.07.009
62. Barron LD, Wen ZQ, Hecht L. Vibrational Raman Optical Activity of Proteins. *J Am Chem Soc.* 1992;114(2):784-786. doi:10.1021/ja00028a069
 63. Majorek KA, Porebski PJ, Dayal A, et al. Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. *Mol Immunol.* 2012;52(3-4):174-182. doi:10.1016/j.molimm.2012.05.011
 64. Alvarez C, Bertorello H, Strumla M, Sánchez EI. Preparation and characterization of new biospecific adsorbents with fatty acids as ligands, usable to retain bovine serum albumin. *Polymer (Guildf).* 1996;37(16):3715-3719. doi:10.1016/0032-3861(96)00182-6
 65. Malarkani K, Sarkar I, Selvam S. Denaturation studies on bovine serum albumin–bile salt system: Bile salt stabilizes bovine serum albumin through hydrophobicity. *J Pharm Anal.* 2018;8(1):27-36. doi:10.1016/j.jpha.2017.06.007
 66. Rosenoer VM, Oratz M, Rothschild MA. *Albumin: Structure, Function and Uses.* 1st ed. Pergamon; 1977.
 67. Amino Acids - structure, advantages, properties, classification. <https://aminoacidsguide.com/>. Accessed May 21, 2019.
 68. Reeds PJ. Dispensable and Indispensable Amino Acids for Humans. *J Nutr.* 2000;130(7):1835S-1840S. doi:10.1093/jn/130.7.1835S
 69. Chibata I, Yamada S, Yamamoto M, Wada M. Resolution of DL-amino acids by preferential crystallization procedure, I. Preparation of optically active alanines. *Experientia.* 1968;24(6):638-639. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5697764>. Accessed May 21, 2019.
 70. Ryadnov M, Hudecz F, eds. *Amino Acids, Peptides and Proteins.* Vol 43. Cambridge: Royal Society of Chemistry; 2019. doi:10.1039/9781788013857
 71. Rossa BAS, Viswanatha T. Synthesis and properties of γ -hydroxyarginine. *Can J Biochem.* 1968;46(8):725-729. doi:10.1139/o68-111
 72. Chaudhary H. Natural Memory Boosters. *Pharmacogn Rev.* 2008;2(4):249-256. <https://www.researchgate.net/publication/233894039>. Accessed May 21, 2019.
 73. Wu G, Bazer FW, Burghardt RC, et al. Proline and hydroxyproline metabolism:

- implications for animal and human nutrition. *Amino Acids*. 2011;40(4):1053-1063. doi:10.1007/s00726-010-0715-z
74. Harper CA, Petrie EM. *Plastics Materials and Processes: A Concise Encyclopedia*. Wiley; 2003.
75. Van Krevelen DW, Nijenhuis K te. *Properties of Polymers*. Elsevier; 2009.
76. Harper CA. *Handbook of Plastic Processes*. Wiley; 2006.
77. Mark JE, ed. *Physical Properties of Polymers Handbook*. New York, NY: Springer New York; 2007. doi:10.1007/978-0-387-69002-5
78. Chang L, Woo EM. Tacticity effects on glass transition and phase behavior in binary blends of poly(methyl methacrylate)s of three different configurations. *Polym Chem*. 2010;1(2):198-202. doi:10.1039/B9PY00237E
79. Ishitake K, Satoh K, Kamigaito M, Okamoto Y. From-syndiotactic-to-isotactic stereogradient methacrylic polymers by RAFT copolymerization of methacrylic acid and its bulky esters. *Polym Chem*. 2012;3(7):1750-1757. doi:10.1039/C1PY00401H
80. Semen J, Lando JB. The Acid Hydrolysis of Isotactic and Syndiotactic Poly(methyl methacrylate). *Macromolecules*. 1969;2(6):570-575. doi:10.1021/ma60012a003
81. Li L, Li B, Chen J, Zhou D, Xue G, Liu X. Glass transition and structural relaxation of nano-particle aggregates of atactic poly(methyl methacrylate) formed in microemulsions. *Polymer (Guildf)*. 2004;45(8):2813-2816. doi:10.1016/j.polymer.2004.02.021
82. Kotz JC, Treichel PM, Townsend J. *Chemistry and Chemical Reactivity*. 8th ed. Cengage Learning; 2011.
83. Evchuk IY, Musii RI, Makitra RG, Pristanskii RE. Solubility of Polymethyl Methacrylate in Organic Solvents. *Russ J Appl Chem*. 2005;78(10):1576-1580. doi:10.1007/s11167-005-0564-9
84. Coates J. Vibrational Spectroscopy: Instrumentation for Infrared and Raman Spectroscopy*. *Appl Spectrosc Rev*. 1998;33(4):267-425. doi:10.1080/05704929808002060

85. Alliprandini-Filho P, Silva RA, da Silva GB, et al. Measurement of the Emitted Light Polarization State in Oriented and Non-Oriented PPV Films. *Macromol Symp.* 2006;245-246(1):406-409. doi:10.1002/masy.200651357
86. Alliprandini Filho P, Dalkiranis GG, Armond RASZ, et al. Emission ellipsometry used to probe aggregation of the luminescent 2,1,3-benzothiadiazole dyes and ordering in an E7 liquid crystal matrix. *Phys Chem Chem Phys.* 2014;16(7):2892. doi:10.1039/c3cp53803f
87. Pour SO, Barron LD, Mutter ST, Blanch EW. *Raman Optical Activity*. Second Edi. Elsevier B.V.; 2018. doi:10.1016/B978-0-444-64027-7.00006-9
88. Sala O. *FUNDAMENTOS DA ESPECTROSCOPIA RAMAN E NO INFRAVERMELHO*. 2ª ED. (UNESP, ed.). São Paulo; 1996.
89. Edwards HGM. Modern Raman Spectroscopy—A Practical Approach. *J Raman Spectrosc.* 2005;36(8):835-835. doi:10.1002/jrs.1320
90. Lewis IR, Edwards H. *Handbook of Raman Spectroscopy: From the Research Laboratory to the Process Line (Practical Spectroscopy)*. 1st editio. CRC Press; 2001.
91. Chalmers JM, Griffiths PR. *Handbook of Vibrational Spectroscopy*. John Wiley & Sons, Inc.; 2002.
92. Socrates G. *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts*. 3rd ed. WILEY; 2004.
93. Collett E. *Polarized Light—Fundamentals and Applications*. Vol 20. New York: Marcel Dekker Inc; 1993.
94. Goldstein D. *Polarized Light*. 2nd ed. New York: Marcel Dekker Inc; 2003.
95. Therézio EM, Piovesan E, Vega ML, Silva RA, Oliveira ON, Marletta A. Thickness and annealing temperature effects on the optical properties and surface morphology of layer-by-layer poly(p-phenylene vinylene)+dodecylbenzenesulfonate films. *J Polym Sci Part B Polym Phys.* 2011;49(3):206-213. doi:10.1002/polb.22180
96. Alliprandini PF. *Aplicação da Técnica de Elipsometria de Emissão para Caracterização de Materiais Luminescentes*. 2012.

97. Dalkiranis GGP. Estudo das mesofases líquido-cristalinas através da técnica de elipsometria de emissão. 2013.
98. Barron LD, Hecht L, Blanch EW, Bell AF. Solution structure and dynamics of biomolecules from Raman optical activity. *Prog Biophys Mol Biol.* 2000;73(1):1-49. doi:10.1016/S0079-6107(99)00017-6
99. Barron LD, Buckingham AD. Rayleigh and Raman Optical Activity. *Annu Rev Phys Chem.* 1975;26(1):381-396. doi:10.1146/annurev.pc.26.100175.002121
100. Placzek G. *Handbuch Der Radiologie.* E. Marx. Leipzig; 1934.
101. Born, M. and Huang K. *Dynamical Theory of Crystal Lattices.* London: Oxford: Clarendon Press; 1954.
102. Hecht L, Nafie LA. Linear polarization Raman optical activity: a new form of natural optical activity. *Chem Phys Lett.* 1990;174(6):575-582. doi:10.1016/0009-2614(90)85489-Y
103. Barron LD, Escribano JR. Stokes—antiStokes asymmetry in natural Raman optical activity. *Chem Phys.* 1985;98(3):437-446. doi:10.1016/0301-0104(85)87100-7
104. Nafie LA, Freedman TB. Dual circular polarization raman optical activity. *Chem Phys Lett.* 1989;154(3):260-266. doi:10.1016/0009-2614(89)87460-3
105. Hecht L, Nafie LA. Theory of natural Raman optical activity. *Mol Phys.* 1991;72(2):441-469. doi:10.1080/00268979100100351
106. Kilpatrick M, Kilpatrick M. The teaching of the theory of the dissociation of electrolytes. II. The definition of pH. *J Chem Educ.* 1932;9(6):1010-1016. doi:10.1021/ed009p1010
107. Lère-Porte J-P, Moreau JJE, Serein-Spirau F, Wakim S. New chiral p-conjugated polymers based on a (1R,2R)-diiminocyclohexane chiral unit with weak interchain p stacking. *Chem Commun.* 2002;33(24):3020-3021. doi:10.1039/b208869j
108. de Mello JC, Wittmann HF, Friend RH. An improved experimental determination of external photoluminescence quantum efficiency. *Adv Mater.* 1997;9(3):230-232. doi:10.1002/adma.19970090308
109. Roe R-J. X-Ray Diffraction by Polymers. *Encycl Polym Sci Technol.* 2015:1-47. doi:10.1002/0471440264.pst635

110. Nussenzveig HM. *Curso de Física Básica: Ótica, Relatividade, Física Quântica*. 2ª. Blucher; 2014.
111. Wind M, Graf R, Renker S, Spiess HW, Steffen W. Structure of amorphous poly-(ethylmethacrylate): A wide-angle x-ray scattering study. *J Chem Phys*. 2005;122(1):014906. doi:10.1063/1.1826031
112. Rygula A, Majzner K, Marzec KM, Kaczor A, Pilarczyk M, Baranska M. Raman spectroscopy of proteins: a review. *J Raman Spectrosc*. 2013;44(8):1061-1076. doi:10.1002/jrs.4335
113. Bistac S, Schultz J. Study of solution-cast films of PMMA by dielectric spectroscopy: Influence of the nature of the solvent on α and β relaxations. *Int J Adhes Adhes*. 1997;17(3):197-201. doi:10.1016/S0143-7496(97)00001-8
114. Anslow GA, Lyman ER. A Spectrophotometric Study of Glutathione. *J Opt Soc Am*. 1941;31(2):114. doi:10.1364/JOSA.31.000114
115. Sizer IW, Peacock AC. The ultraviolet absorption of serum albumin and of its constituent amino acids as a function of pH. *J Biol Chem*. 1947;171(2):767-777.
116. Ahmad B, Kamal M, Khan R. Alkali-Induced Conformational Transition in Different Domains of Bovine Serum Albumin. *Protein Pept Lett*. 2004;11(4):307-315. doi:10.2174/0929866043406887
117. Dockal M, Carter DC, Rüker F. Conformational Transitions of the Three Recombinant Domains of Human Serum Albumin Depending on pH. *J Biol Chem*. 2000;275(5):3042-3050. doi:10.1074/jbc.275.5.3042
118. Celej MS, Dassie SA, Freire E, Bianconi ML, Fidelio GD. Ligand-induced thermostability in proteins: Thermodynamic analysis of ANS–albumin interaction. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics*. 2005;1750(2):122-133. doi:10.1016/j.bbapap.2005.05.003
119. Kelly SM, Jess TJ, Price NC. How to study proteins by circular dichroism. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics*. 2005;1751(2):119-139. doi:10.1016/j.bbapap.2005.06.005
120. Woody RW, Dunker AK. Aromatic and Cystine Side-Chain Circular Dichroism in Proteins. In: *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*. Boston, MA: Springer US; 1996:109-157. doi:10.1007/978-1-4757-

2508-7_4

121. Peters T. Serum Albumin. In: ; 1985:161-245. doi:10.1016/S0065-3233(08)60065-0
122. Fujimori E. On the emission of tryptophan. *Biochim Biophys Acta*. 1960;40:251-256. doi:10.1016/0006-3002(60)91349-4
123. Carey PR. Chapter 2 Raman and Resonance Raman Spectroscopy. In: ; 1985:27-64. doi:10.1016/S0167-7306(08)60571-2
124. Chen MC, Lord RC. Laser-excited Raman spectroscopy of biomolecules. VIII. Conformational study of bovine serum albumin. *J Am Chem Soc*. 1976;98(4):990-992. doi:10.1021/ja00420a021
125. SADLER PJ, TUCKER A. pH-induced structural transitions of bovine serum albumin. Histidine pKa values and unfolding of the N-terminus during the N to F transition. *Eur J Biochem*. 1993;212(3):811-817. doi:10.1111/j.1432-1033.1993.tb17722.x
126. Shin-ya K, Sugeta H, Shin S, Hamada Y, Katsumoto Y, Ohno K. Absolute configuration and conformation analysis of 1-phenylethanol by matrix-isolation infrared and vibrational circular dichroism spectroscopy combined with density functional theory calculation. *J Phys Chem A*. 2007;111(35):8598-8605. doi:10.1021/jp068448v
127. Marletta A, Akcelrud L. Interchain interactions effects on emission efficiency of poly(p-phenylene vinylene) films. *J Lumin*. 2009;129(7):672-678. doi:10.1016/j.jlumin.2009.01.012

CAPÍTULO 11 – ANEXO I

11. ANEXO I

11.1. Espalhamento Raman solução tampão

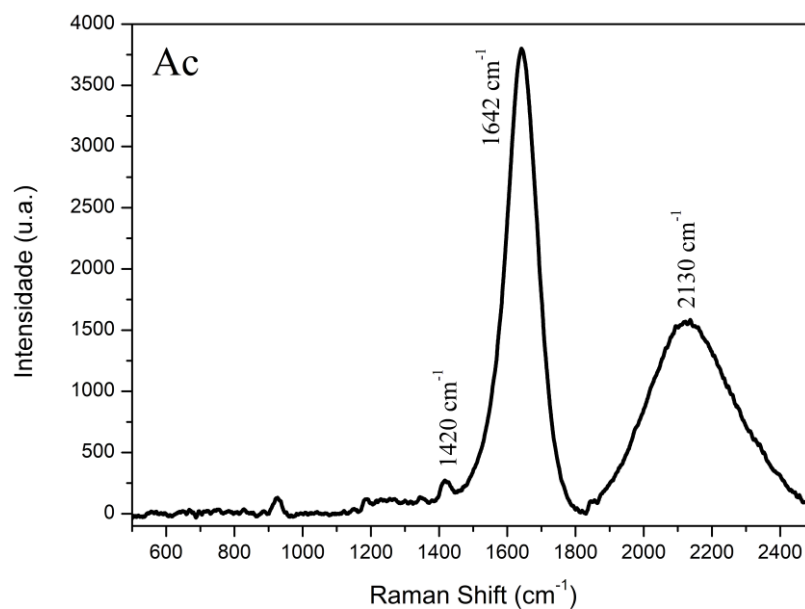


Figura 96 - Espectro Raman do sal acetato de sódio.

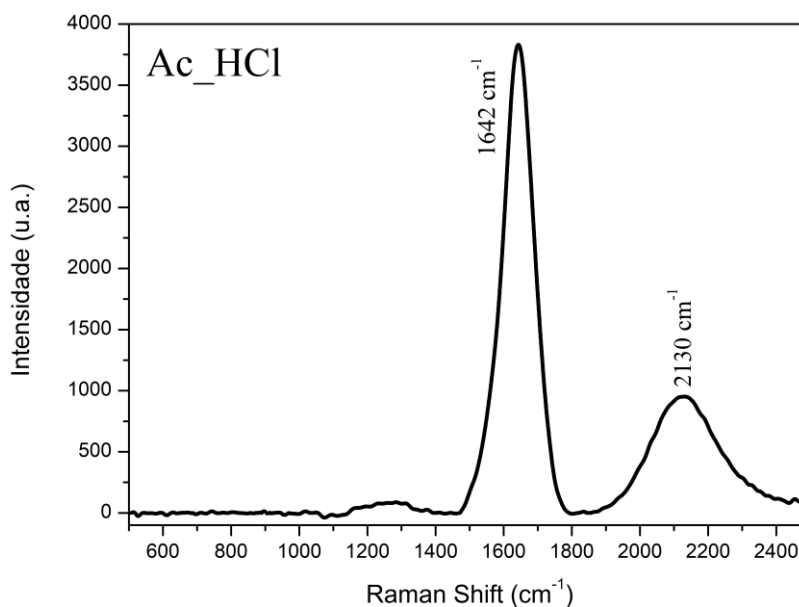


Figura 97 - Espectro Raman do sal acetato de sódio com ácido clorídrico (HCl).

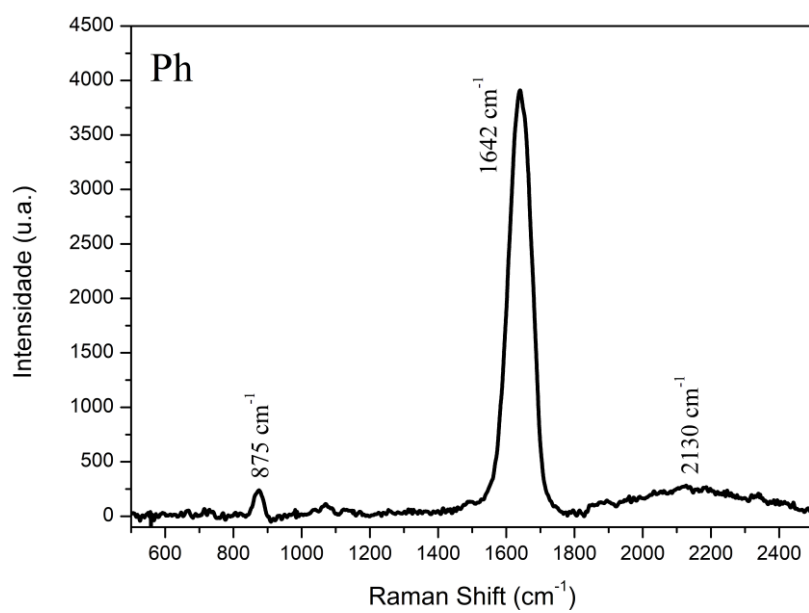


Figura 99 - Espectro Raman do sal fosfato de sódio

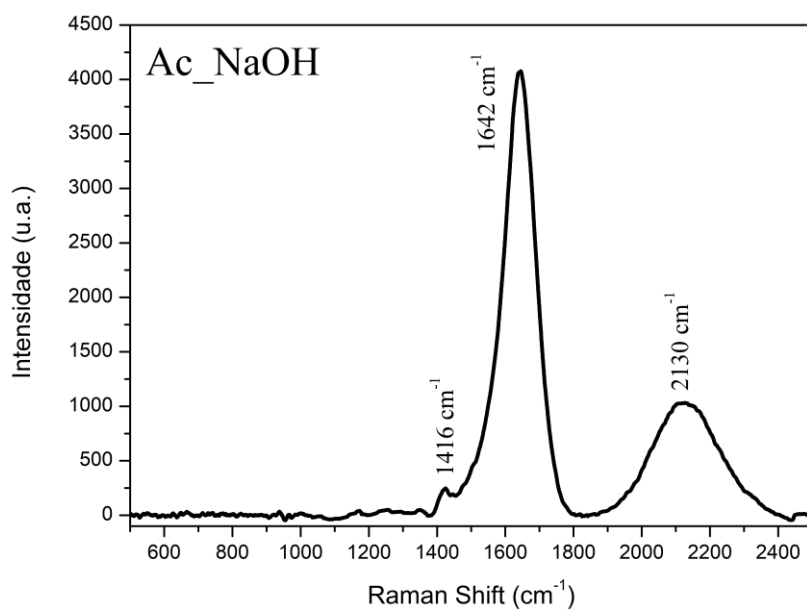


Figura 98 - Espectro Raman do sal acetato de sódio com hidróxido de sódio (NaOH).

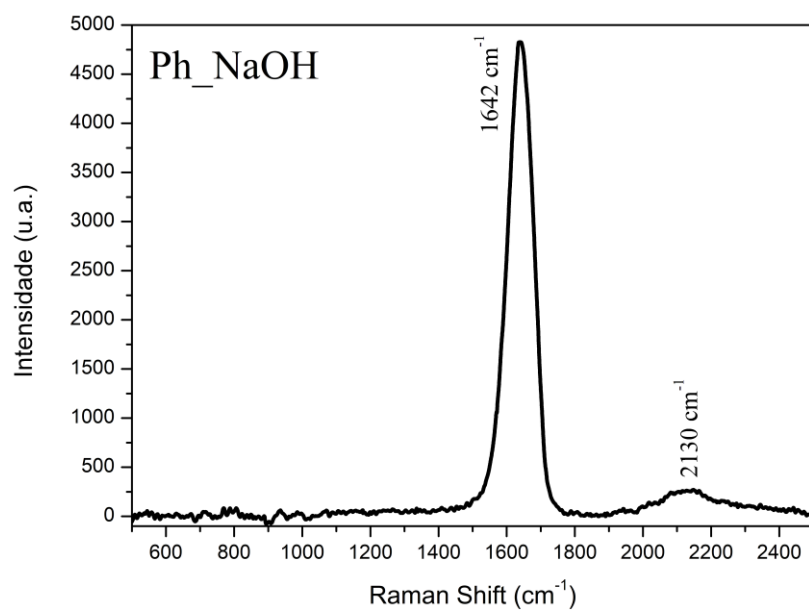


Figura 100 - Espectro Raman do sal fosfato de sódio com hidróxido de sódio (NaOH).

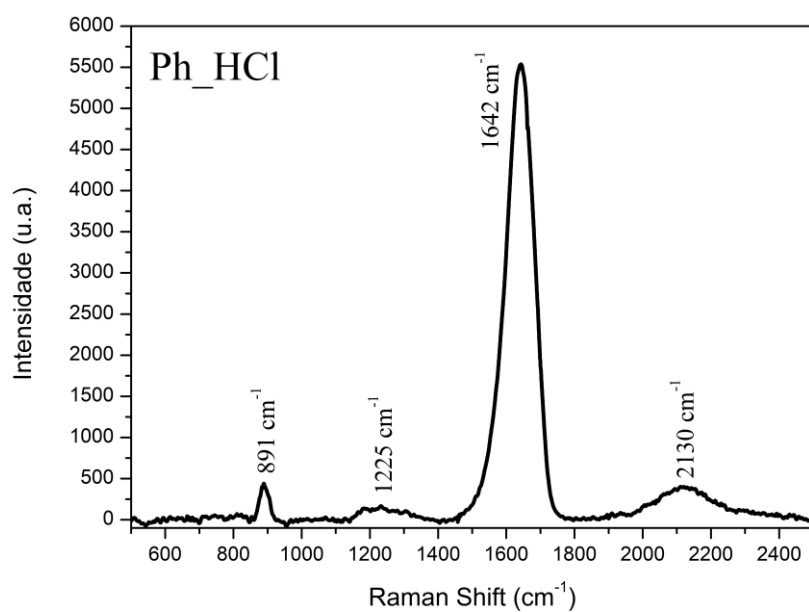


Figura 101 - Espectro Raman do sal fosfato de sódio com ácido clorídrico (HCl).

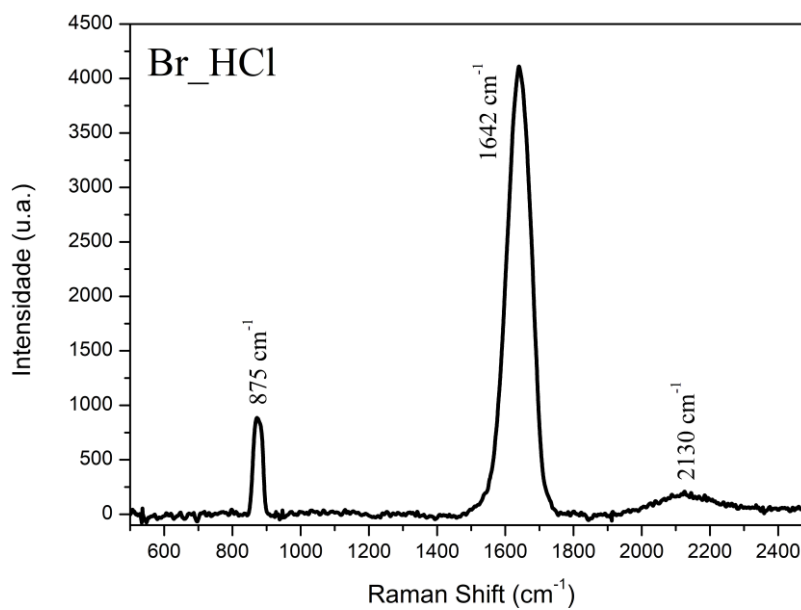


Figura 102 - Espectro Raman do sal tetraborato de sódio com ácido clorídrico (HCl).

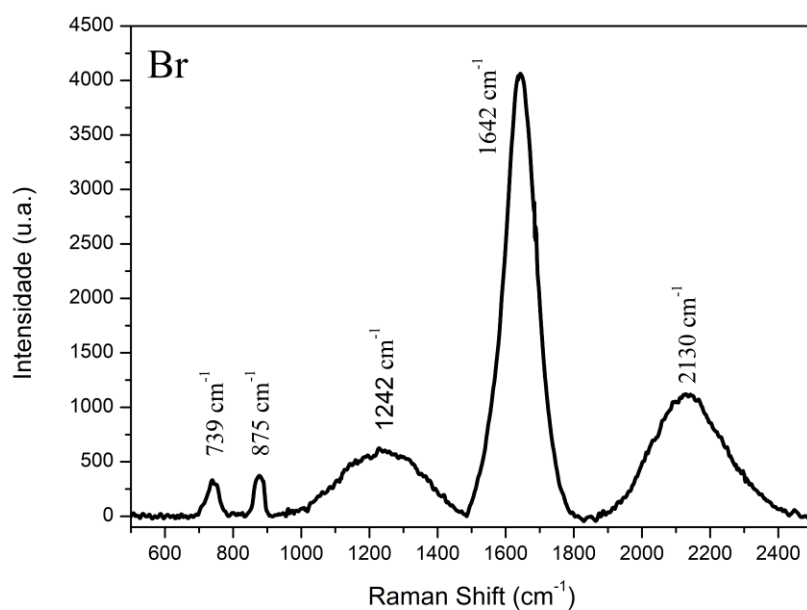


Figura 103 - Espectro Raman do sal tetraborato de sódio.

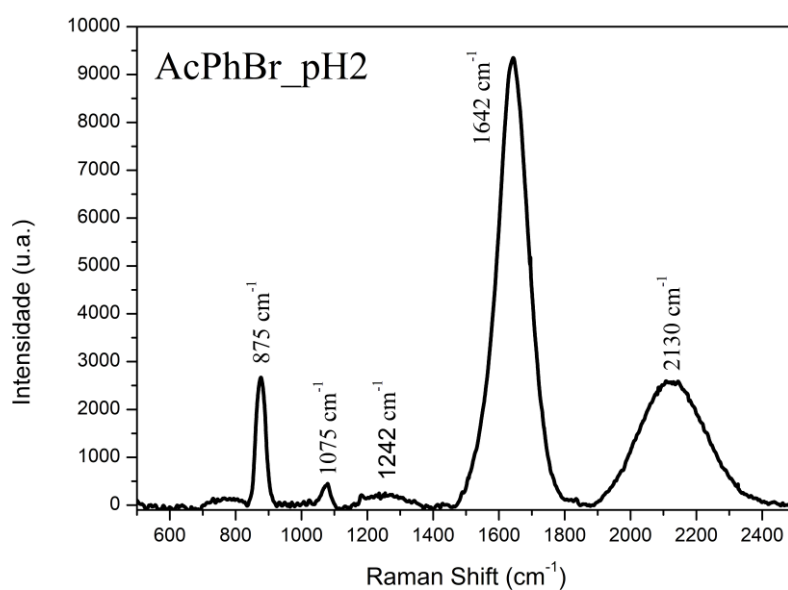


Figura 104 - Espectro Raman da solução tampão no pH 2.

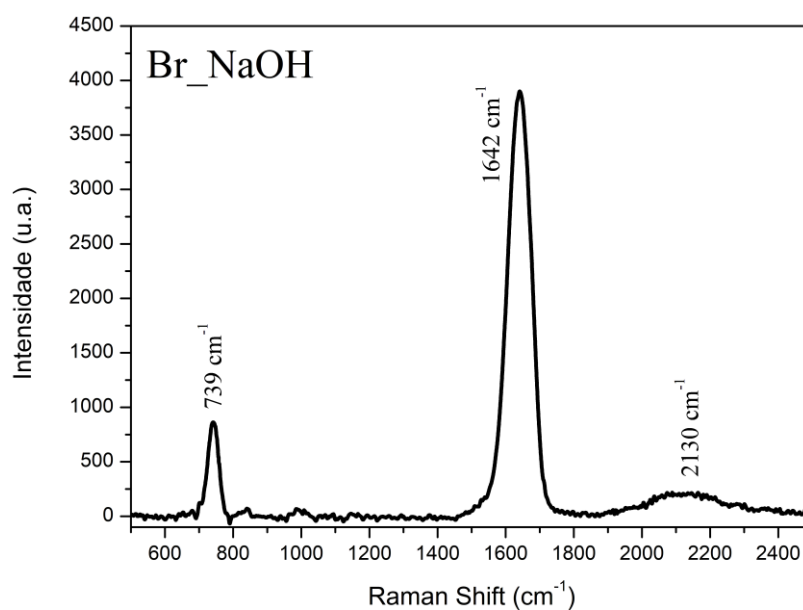


Figura 105 - Espectro Raman do sal tetraborato de sódio com peróxido de hidrogênio (NaOH).

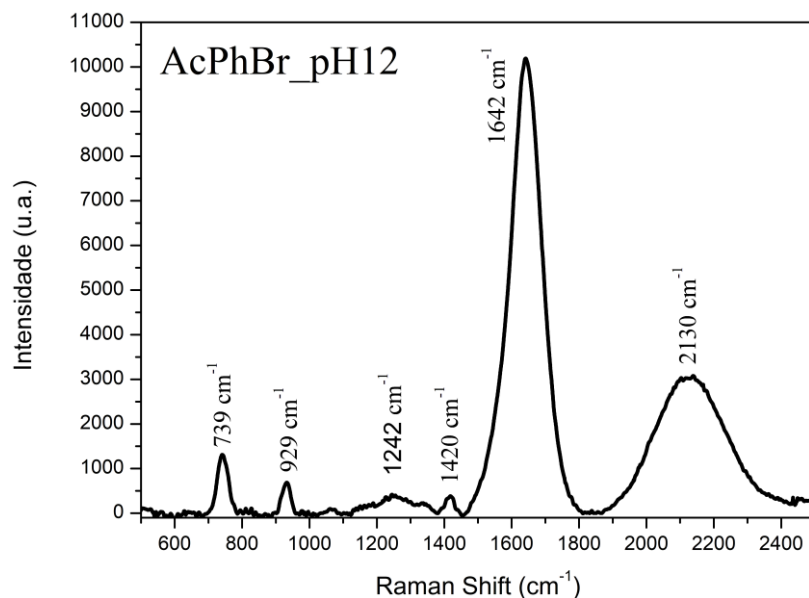


Figura 106 - Espectro Raman da solução tampão no pH 12.

11.2. SW203

EE

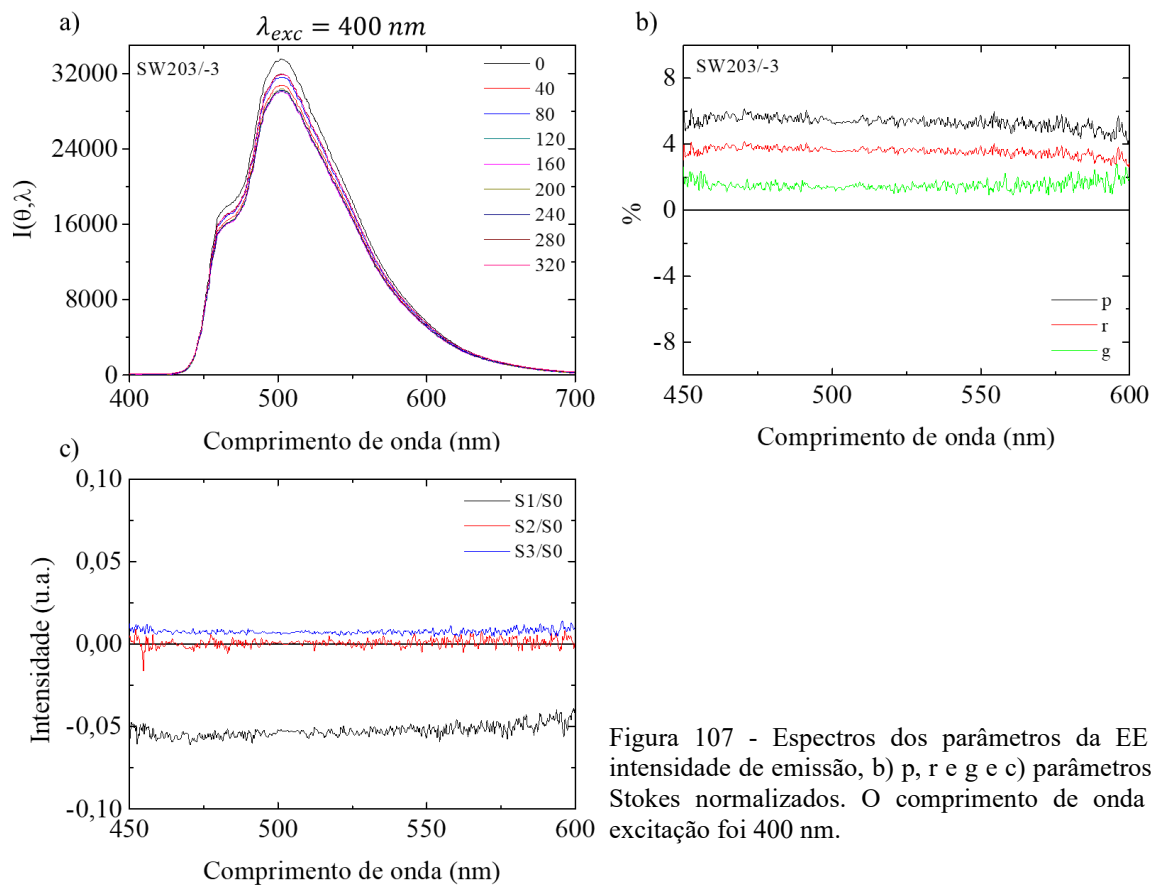
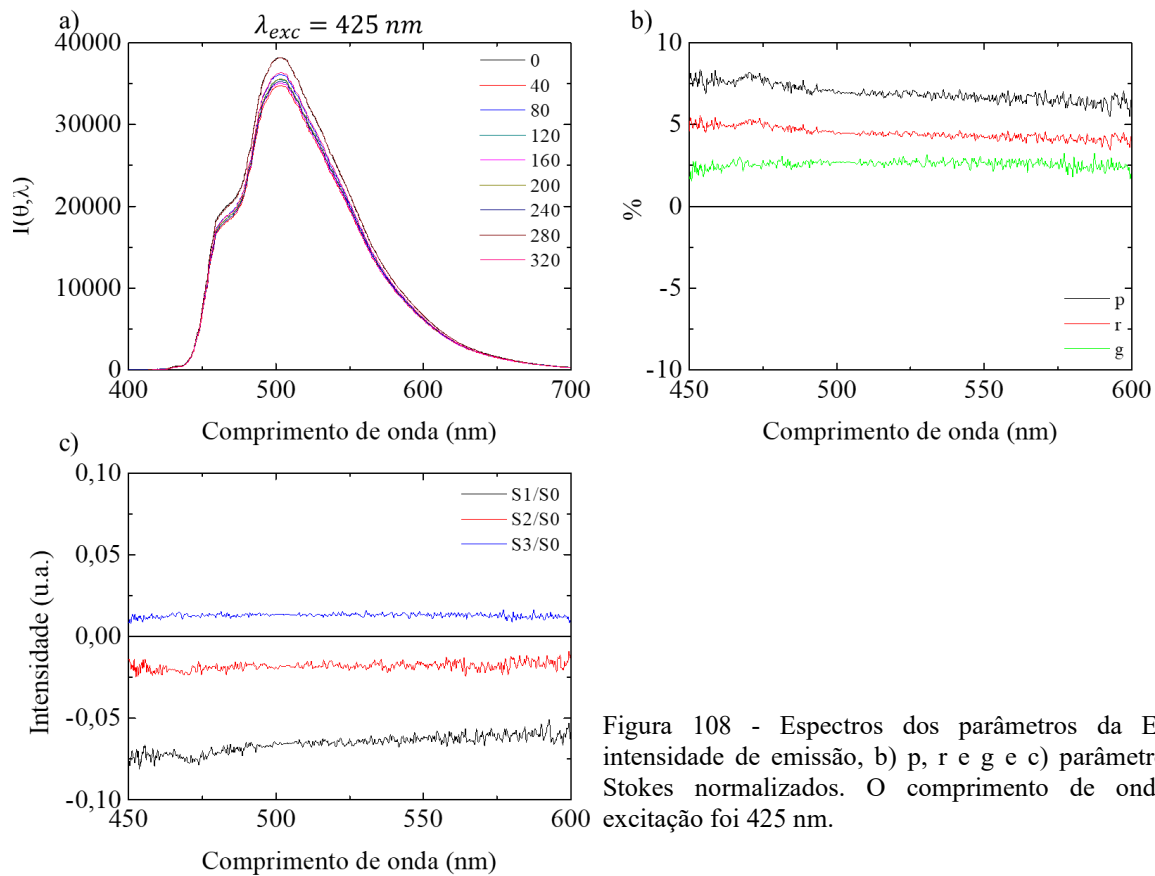
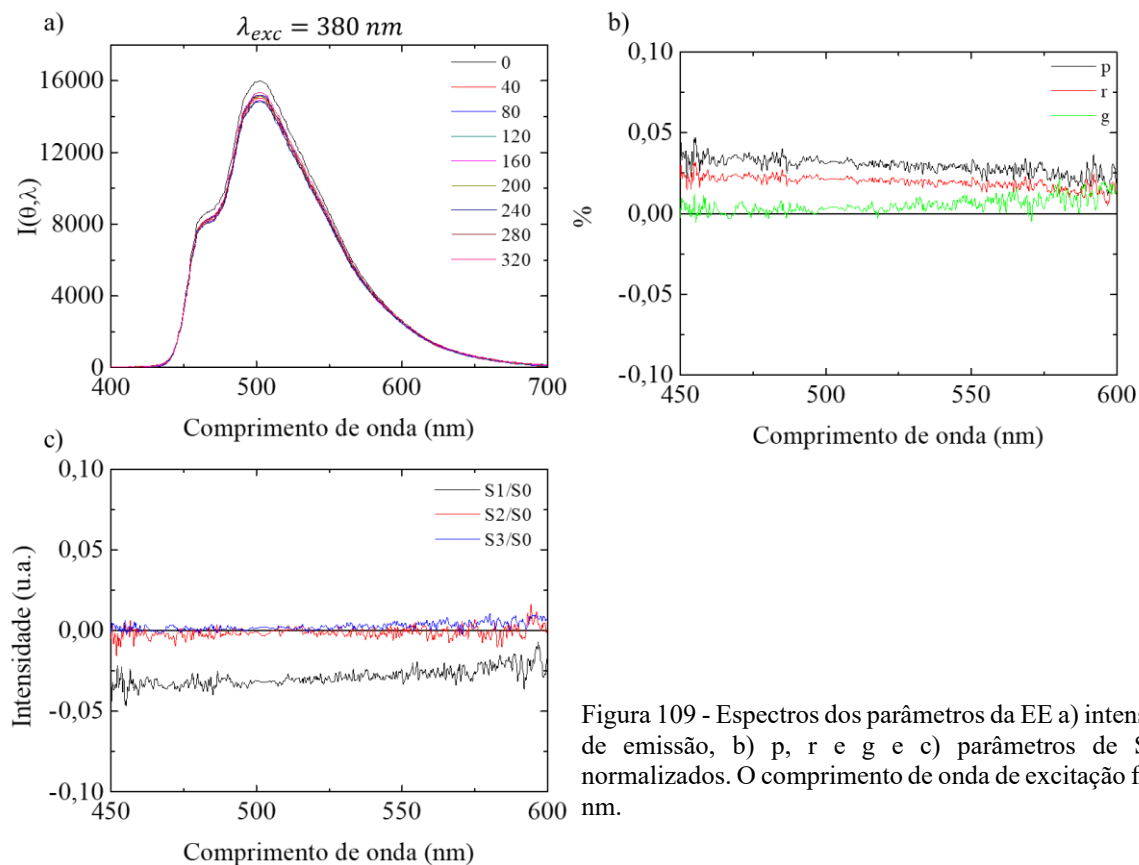


Figura 107 - Espectros dos parâmetros da EE a) intensidade de emissão, b) p, r e g e c) parâmetros de Stokes normalizados. O comprimento de onda de excitação foi 400 nm.



ERS

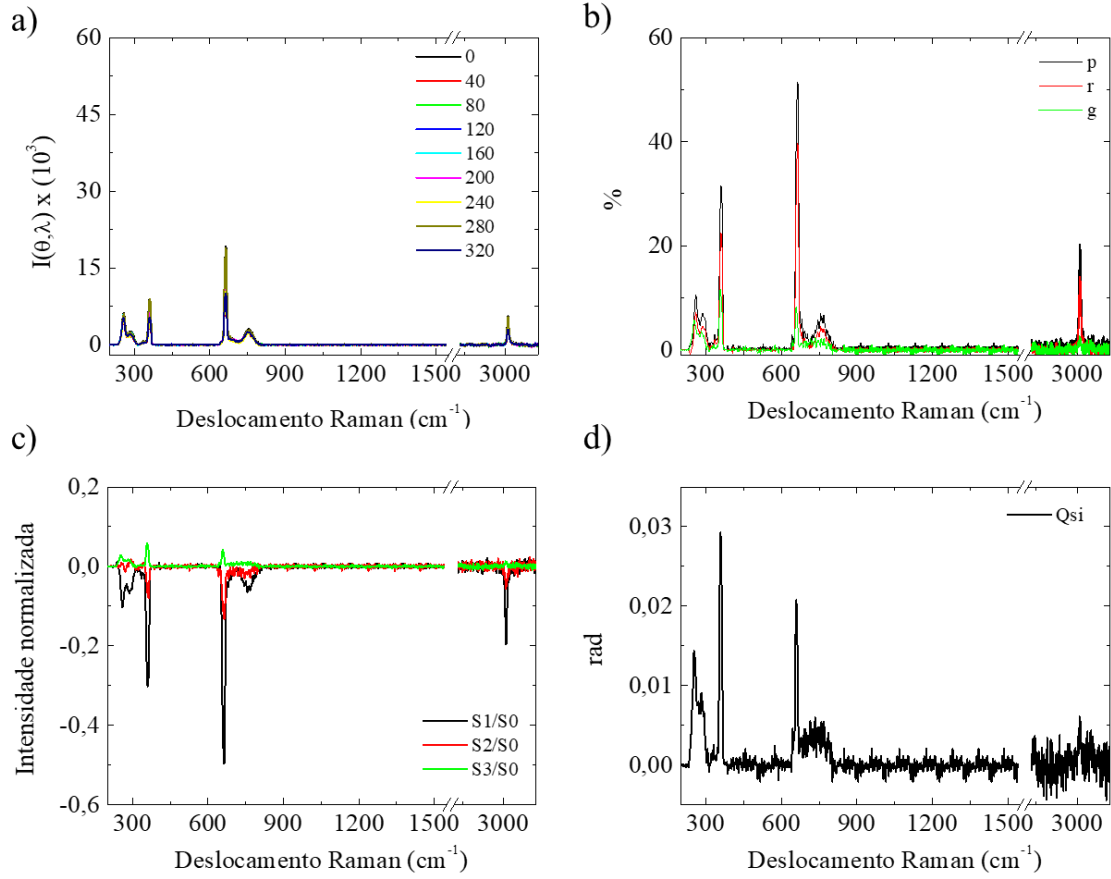


Figura 111 - Espectros dos parâmetros do ERS da amostra SW203/-2, sendo eles a a) intensidade de emissão, b) p, r e g, c) parâmetros de Stokes normalizados e d) χ .

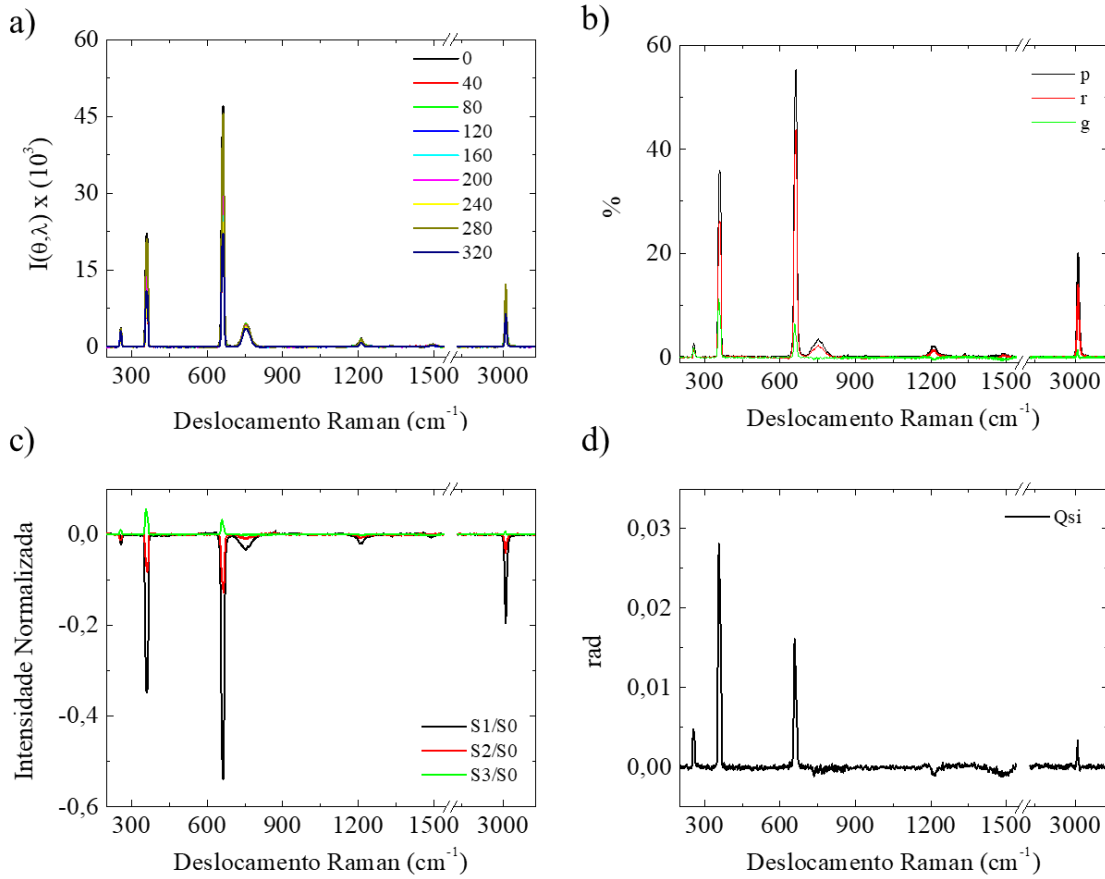


Figura 110 - Espectros dos parâmetros do ERS da amostra SW203/-4, sendo eles a a) intensidade de emissão, b) p, r e g, c) parâmetros de Stokes normalizados e d) χ .

11.3. SW254

EE

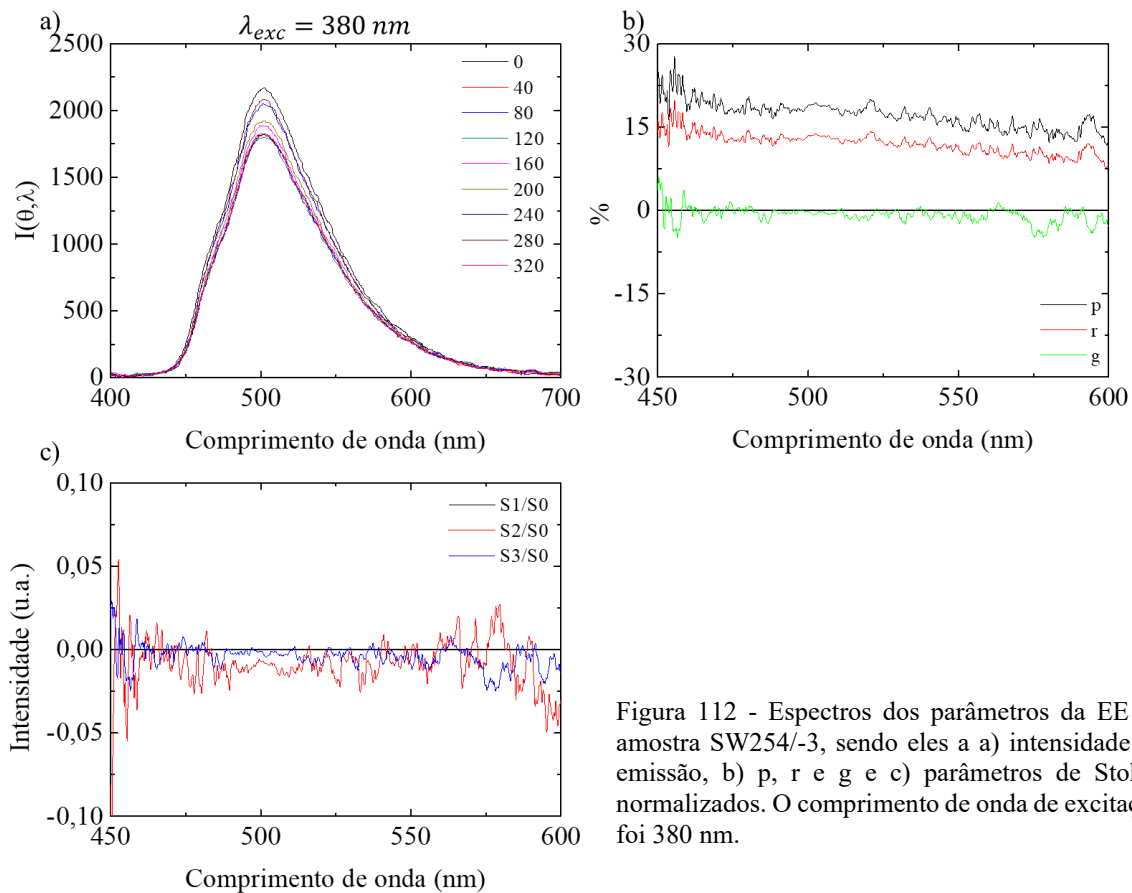


Figura 112 - Espectros dos parâmetros da EE da amostra SW254/-3, sendo eles a a) intensidade de emissão, b) p, r e g e c) parâmetros de Stokes normalizados. O comprimento de onda de excitação foi 380 nm.

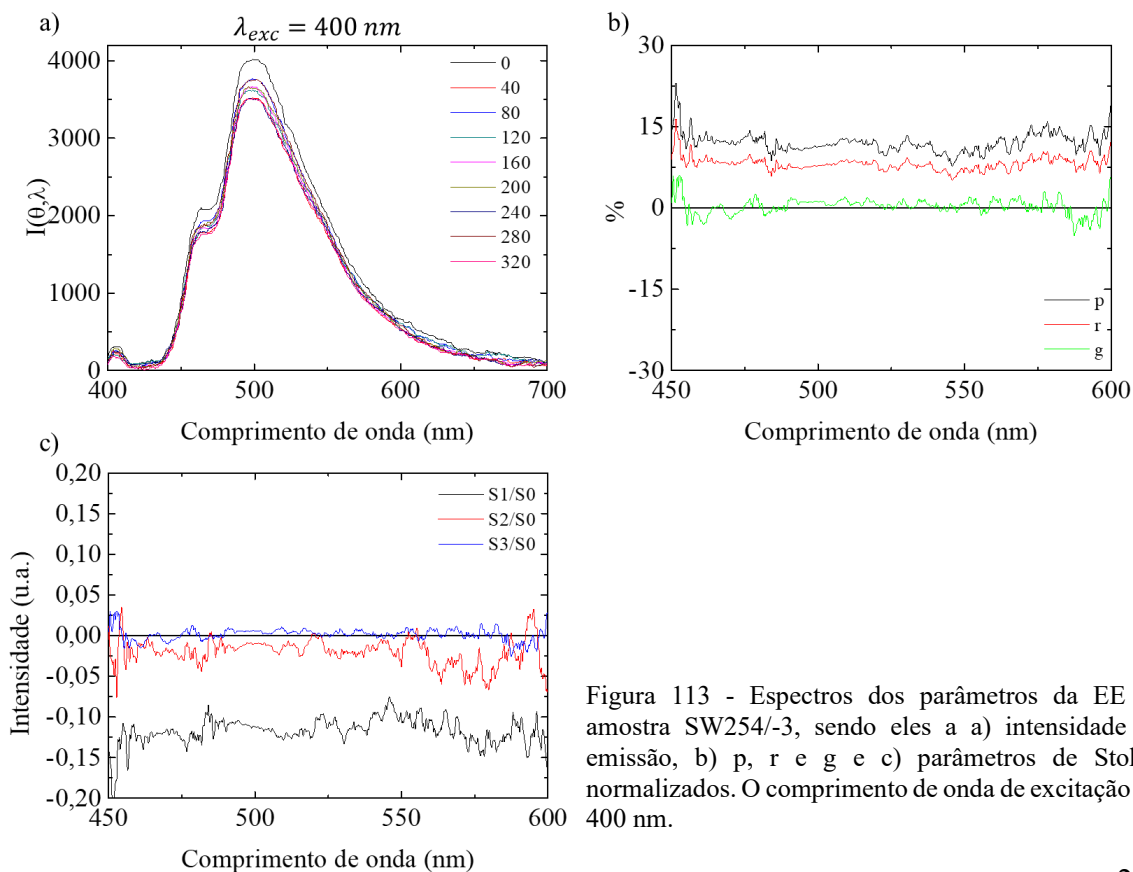


Figura 113 - Espectros dos parâmetros da EE da amostra SW254/-3, sendo eles a a) intensidade de emissão, b) p, r e g e c) parâmetros de Stokes normalizados. O comprimento de onda de excitação foi 400 nm.

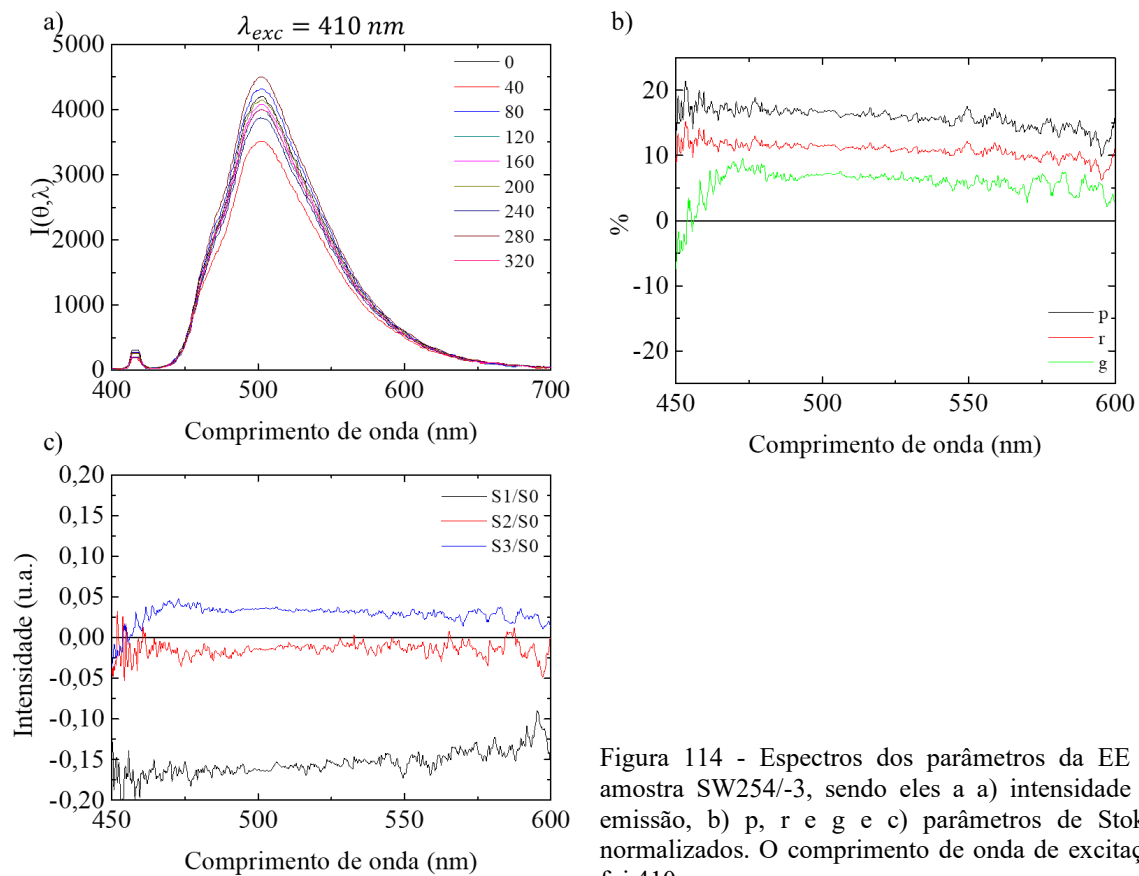


Figura 114 - Espectros dos parâmetros da EE da amostra SW254/-3, sendo eles a a) intensidade de emissão, b) p , r e g e c) parâmetros de Stokes normalizados. O comprimento de onda de excitação foi 410 nm.

ERS

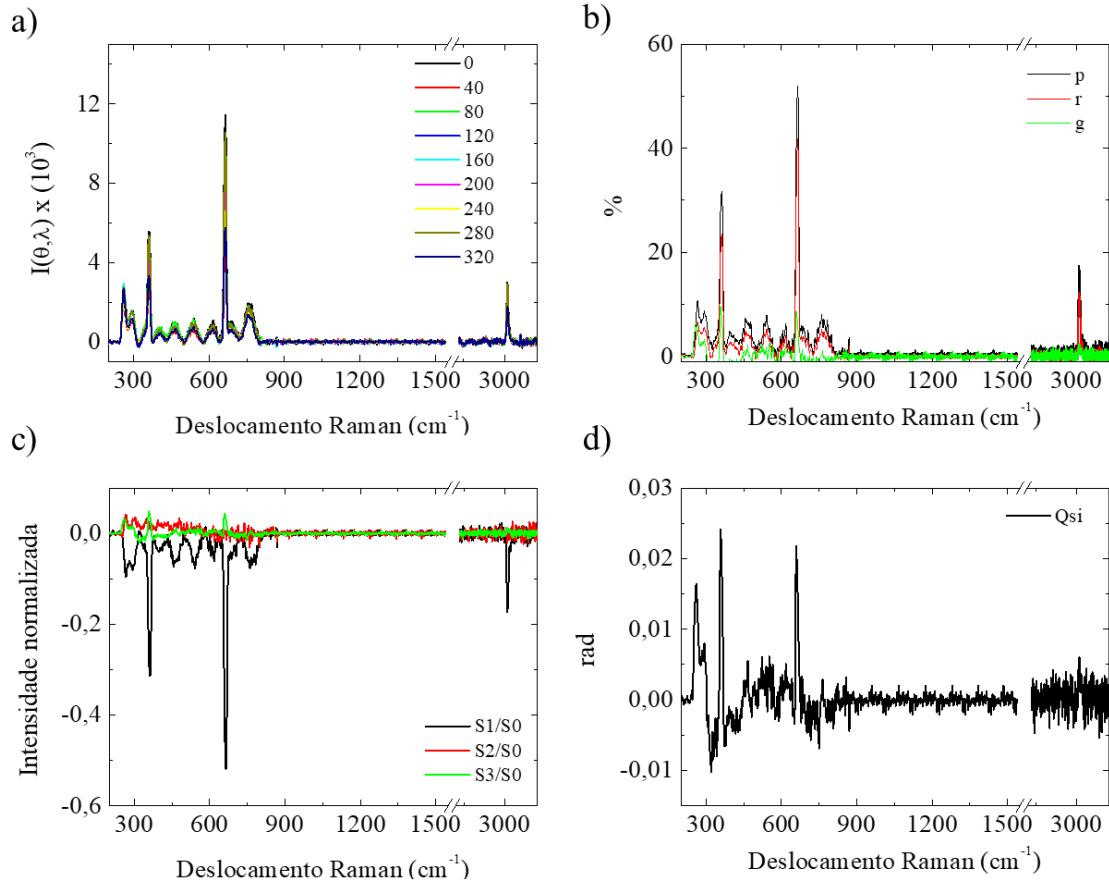


Figura 116 - Espectros dos parâmetros do ERS da amostra SW254/-2, sendo eles a a) intensidade de emissão, b) p, r e g, c) parâmetros de Stokes normalizados e d) χ .

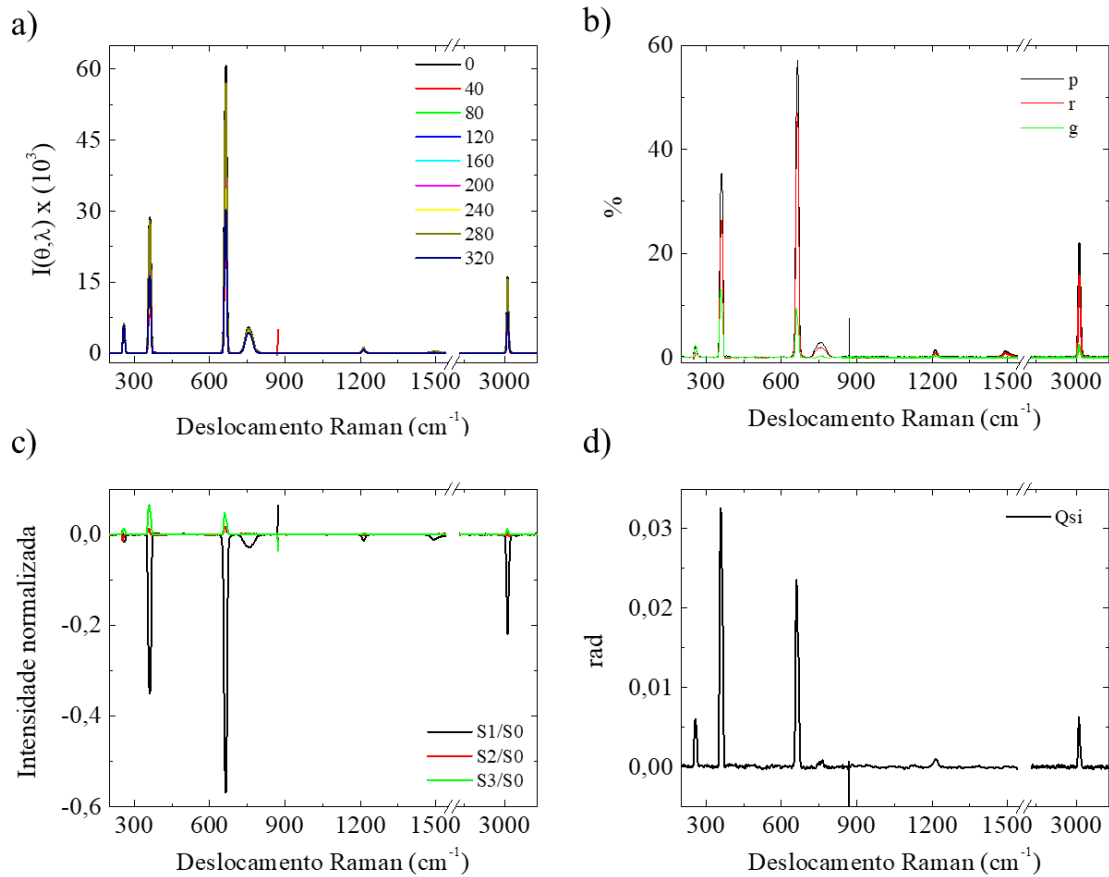


Figura 115 - Espectros dos parâmetros do ERS da amostra SW254/-4, sendo eles a a) intensidade de emissão, b) p, r e g, c) parâmetros de Stokes normalizados e d) χ .

*CAPÍTULO 12 – ANEXO II -
PUBLICAÇÕES*

12. ANEXO II – PUBLICAÇÕES

12.1. Artigos publicados

CARDOSO, I. O. ; MACHADO, A. C. ; TEIXEIRA, D. ; BASÍLIO, F. C. ; MARLETTA, A. . Influence of Different Cordless Light-emitting-diode Units and Battery Levels on Chemical, Mechanical, and Physical Properties of Composite Resin. Operative Dentistry, Posted online on December 2019.

BASILIO, FERNANDO C.; CAMPANA, PATRICIA T. ; THERÉZIO, ERALCI M. ; BARBOSA NETO, NEWTON M. ; SEREIN-SPIRAU, FRANÇOISE ; SILVA, RAINA A. ; OLIVEIRA, OSVALDO N. ; MARLETTA, ALEXANDRE . Ellipsometric Raman Spectroscopy. Journal of Physical Chemistry. C, v. 120, p. 25101-25109, 2016.

12.2. Capítulo de livro

de Sá, Sankler Soares ; Basílio, Fernando Costa ; de Santana, Henrique ; MARLETTA, ALEXANDRE ; Therézio, Eralci Moreira . Electrochemical Deposition of P3AT Films Used as a Probe of Optical Properties in Polymeric System. Modern Technologies for Creating the Thin-film Systems and Coatings. 1ªed.: InTech, 2017, v. , p. 101-119. [HTTPS://DOI.ORG/ http://dx.doi.org/10.5772/66921](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/66921)

12.3. Apresentações de trabalhos

CARDOSO, I. O.; MACHADO, A. C.; TEIXEIRA, D. N. R.; BASÍLIO, F. C.; MARLETTA, A. ; SOARES, P. V. . Influência de diferentes aparelhos fotoativadores LED sem fio e o nível de bateria nas propriedades da resina. 2018. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

BASÍLIO, F. C.; CAMPANA, PATRICIA T.; TOZONI, J. R.; ARMOND, R. A. S. Z.; MARLETTA, ALEXANDRE. Aplicação da Espectroscopia Raman por Elipsometria (Ellipsometric Raman Spectroscopy, ERS) no estudo do polímero PMMA. 2017. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

MENEZES, D. B. ; REYER, A. ; BASÍLIO, F. C. ; MARLETTA, ALEXANDRE ; MUSSO, M. . Determining temperatures of relaxation processes γ , β and α of the

polypropylene and polyethylene by Raman Spectroscopy. 2016. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

SANTOS, D. M. ; QUEIROZ, A. L. ; MUNIZ, M. C. ; BASÍLIO, F. C. ; SILVA, S. M. ; PAULA, R. C. ; DALKIRANIS, G. G. ; MARLETTA, A. ; ARMOND, R. A. S. Z. . Raman Optical Activity Applied to Biological Systems. 2016. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

BASÍLIO, F. C.; SILVA, RAIGNA A. ; OLIVEIRA, OSVALDO N. ; MARLETTA, ALEXANDRE . Implementation of new Raman spectroscopy technique using ellipsometry to study chiral molecules. 2015. (Apresentação de Trabalho/Congresso).