

# Ressonância Magnética Eletrônica

## Ressonância Magnética de Spin

## Ressonância Paramagnética Eletrônica

Principles of Magnetic Resonance - Slichter

Electron Paramagnetic Resonance - Weil, Bolton, Wertz

Principles of Electron Spin Resonance - Atherton

Magnetic Resonance of Biomolecules - Knowles, Marsh, Rattle

Spin Labeling, Theory and Applications - Berliner (Ed.)

Biological Magnetic Resonance, Vol8 - Spin Labeling, Theory and Applications - Berliner, Reuben (Eds.)

A RMN monitora todos os núcleos com spin  $\neq 0$

Por ex., "enxerga" todos os prótons da molécula

A RPE é mais específica, pois "enxerga" somente **centros paramagnéticos**, que são poucos nas biomoléculas:

### Metal centers

In proteins:

- Fe(II or III) in heme proteins
- Mn(II or III) in superoxide dismutase
- Mo(V or VI) in xanthine oxidase or sulphite oxidase
- etc.....

### Free radicals

- Intermediates in biological redox reactions
- Radiation induced
- Stable radicals  
(Melanin, cereals, etc...)

Spin labels

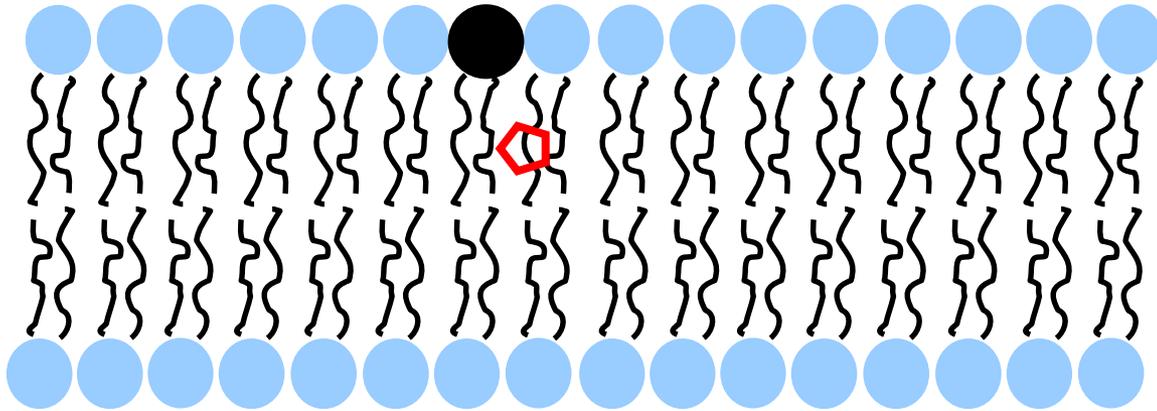
# "Spin labels"

## Marcadores de spin

Moléculas exógenas, paramagnéticas, incorporadas ao sítio a ser estudado

- ligadas covalentemente à molécula
- incorporadas a agregados de moléculas

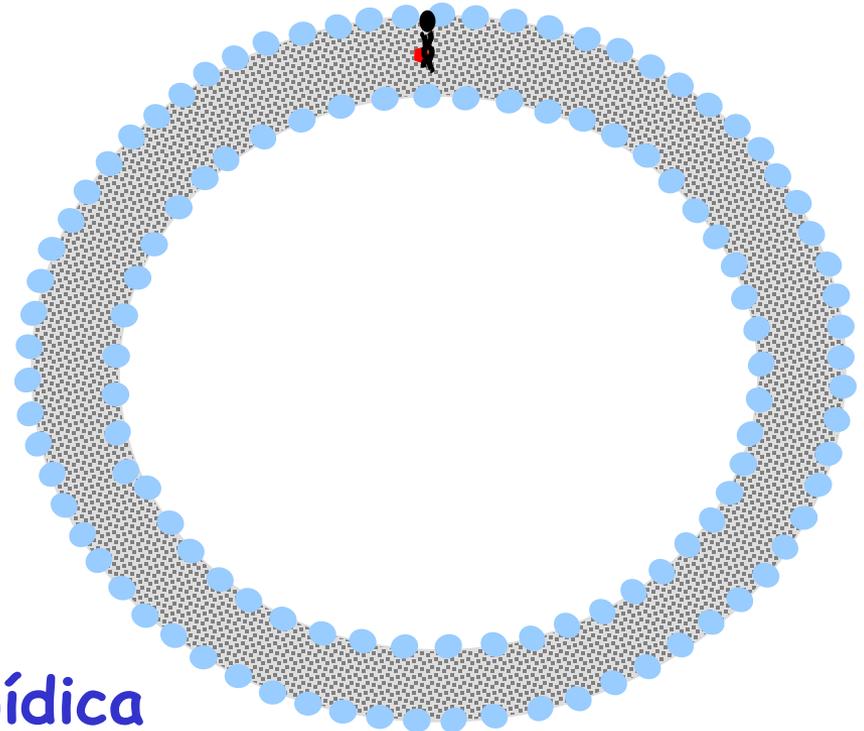
**Incorporadas a agregados anfifílicos em solução aquosa**



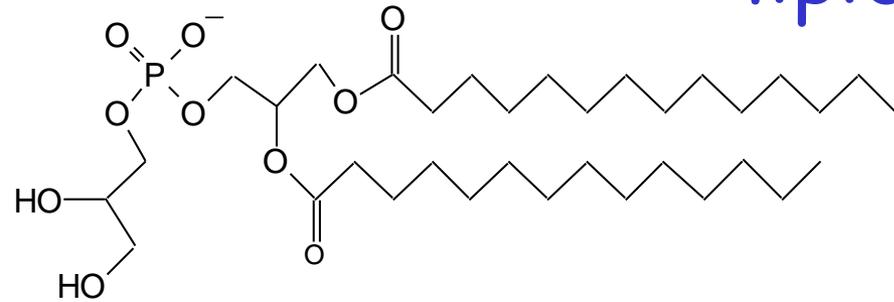
Marcadores de spin  
anfifílicos,  
derivados de:

- fosfolipídios
- ácidos esteáricos
- colesterol

Incorporam-se à bicamada lipídica

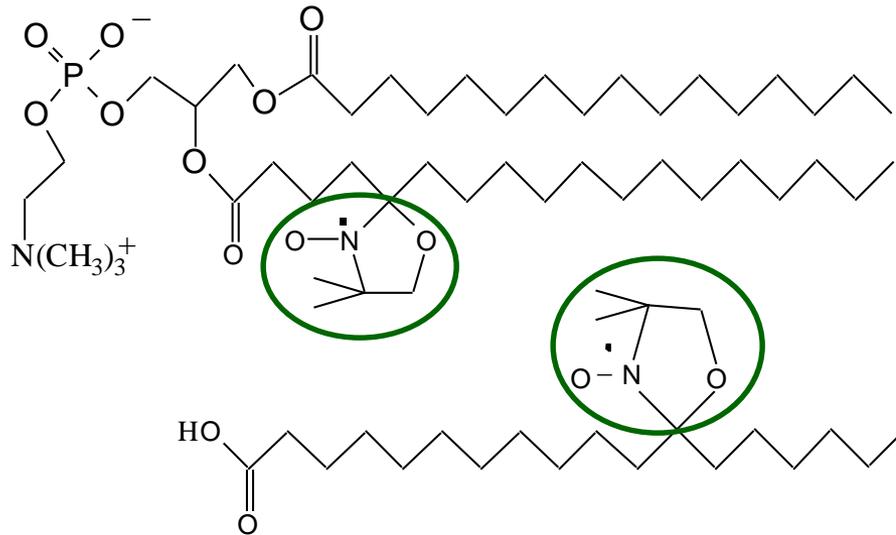


# lipídios e marcadores de spin

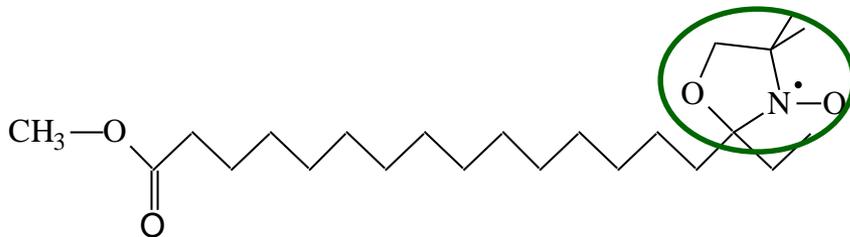


DMPG

dimiristoil fosfatidil glicerol

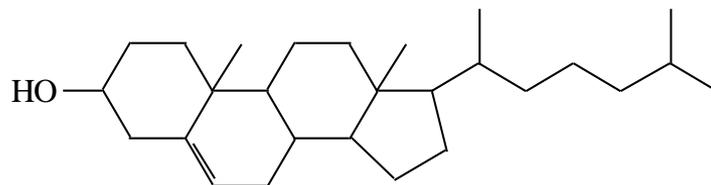


5-PCSL, fosfolipídio



12-SASL, ácido esteárico

16-MESL, metil éster do ácido esteárico



colesterol

# O que podemos avaliar com medidas de RPE ?

- Estrutura do sítio onde se encontra a sonda paramagnética: ordem, fluidez e "polaridade" do sítio

# Na Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)

$$\vec{\mu} = \gamma_e \vec{J}$$

fator giromagnético para o elétron

$$|\gamma_e| \approx 10^3 |\gamma_p| \begin{cases} \omega_e \approx \text{GHz} \\ \omega_p \approx \text{MHz} \end{cases}$$

Mas, em geral, usamos outra expressão:

$$\vec{\mu} = -g \frac{e\hbar}{2m} \frac{\vec{J}}{\hbar}$$

$\beta \equiv$  magneton de Bohr

$$\vec{\mu} = \gamma_e \vec{J} = -g\beta \frac{\vec{J}}{\hbar} \quad (\text{para o "elétron livre" } g = 2,00232)$$

$$\mathcal{H}_{spin} = -\vec{\mu} \cdot \vec{H}$$

sendo  $\vec{\mu} = -g\beta \frac{\vec{J}}{\hbar}$  e  $\vec{J} \equiv \vec{S} \implies \mathcal{H}_{spin} = g\beta \frac{\vec{S}}{\hbar} \cdot \vec{H}$

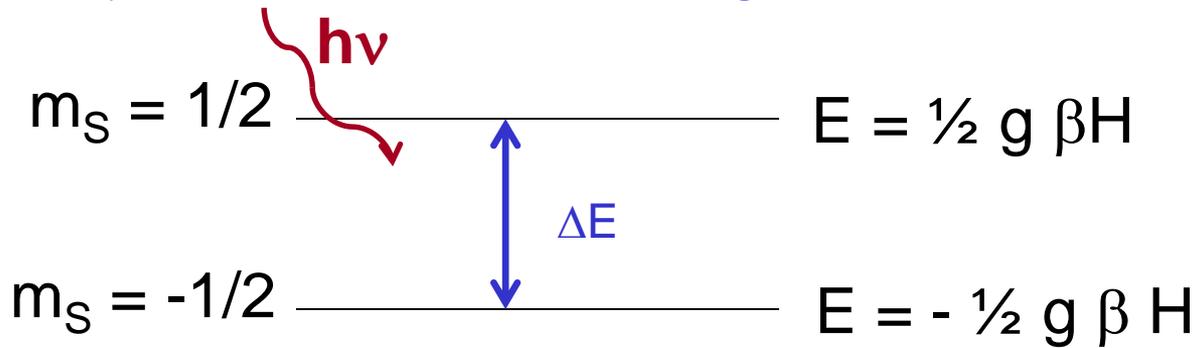
fazendo  $\vec{H} // \hat{z}$   $\mathcal{H}_{spin} = g\beta H \frac{S_z}{\hbar}$

$S_z \rightarrow$  auto valores  $\rightarrow m_s \hbar$

autoestados dessa Hamiltoniana:

$$E_{m_s} = g\beta H m_s$$

p. ex.  $S = 1/2, m_S = +1/2, -1/2$



$$E_{m_S} = g\beta H m_S$$

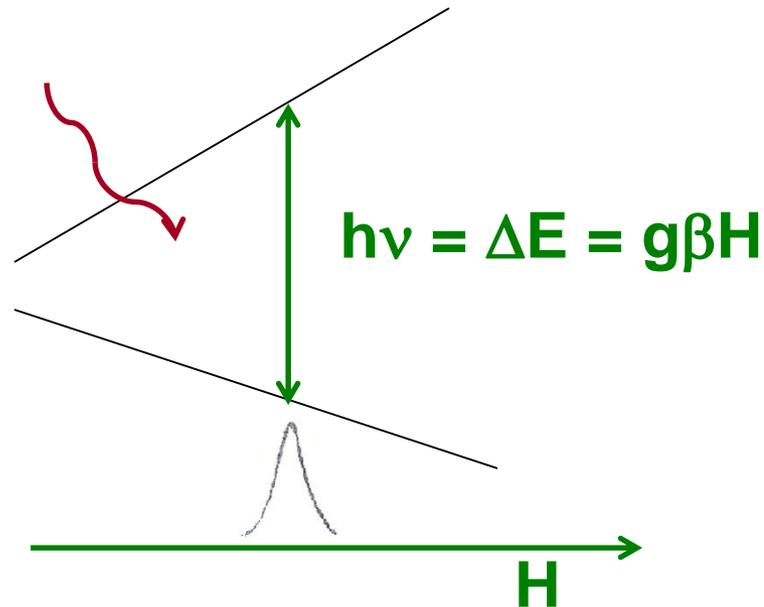
$$\Delta E = g\beta H$$

$$\Delta m_S = \pm 1$$

Na absorção de radiação:

$$h\nu = \Delta E = g\beta H$$

Como é feito o experimento de RPE:  
 $\nu$  fixa, varia-se  $H$  até se obter a ressonância

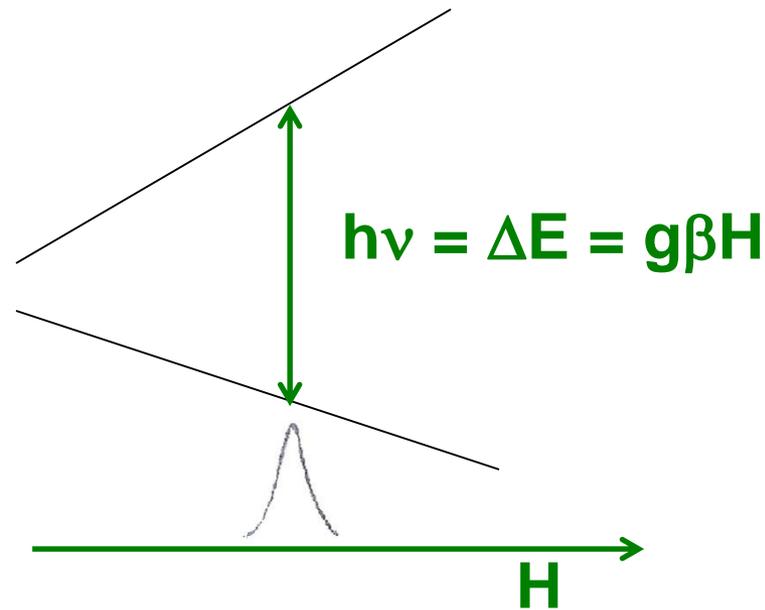


# fator $g$

$$h\nu = g\beta H$$

Quando o experimento é feito, você **mede** o  $H$  onde acontece a absorção, portanto você **calcula** o fator  $g$ , dado que  $\nu$  é conhecido.

para o "elétron livre"  $g = 2,00232$   
o  $H$  que ele "sente" é  $\sim H$  aplicado



Em geral, o elétron desemparelhado está em um orbital, e temos o acoplamento spin-órbita, anisotrópico. Portanto, para cada direção de aplicação de  $H$ , a interação Zeeman varia: interação de  $H$  com o momento angular orbital e momento angular de spin do sistema.

De uma maneira geral, escrevemos:

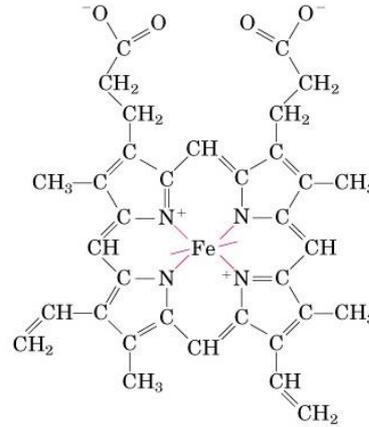
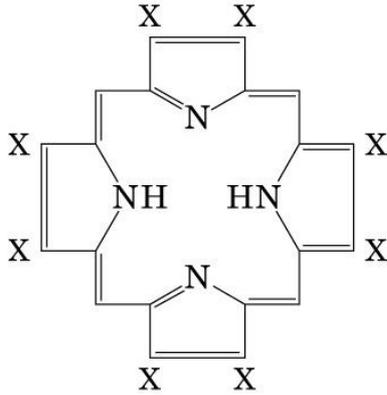
$$\mathcal{H}_{\text{spin}} = \frac{\beta}{\hbar} \vec{H} \cdot \vec{g} \cdot \vec{S} \quad \left[ \begin{array}{l} \text{no lugar de:} \\ \mathcal{H}_{\text{spin}} = g\beta H \frac{S_z}{\hbar} \end{array} \right]$$

Sendo que é colocado no "tensor g", todo o desconhecimento que temos das interações do sistema, sendo H o campo externo, e este tensor g é medido experimentalmente, variando-se o ângulo de aplicação de H, com respeito à estrutura da molécula

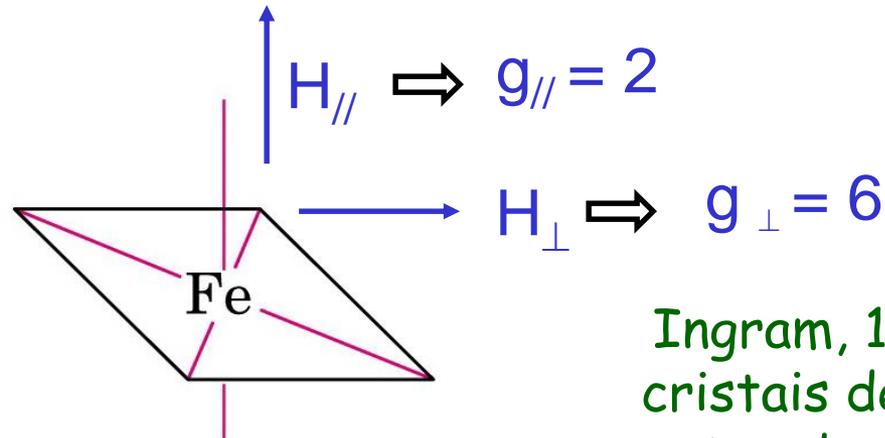
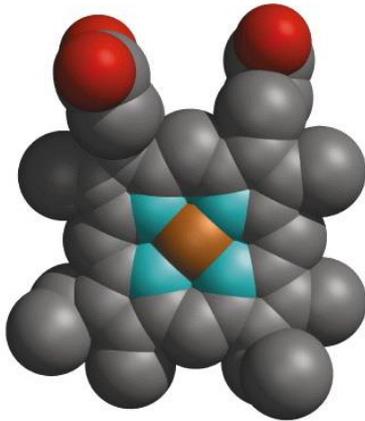
$$h\nu = \beta g(\theta, \phi) H(\theta, \phi)$$

Para várias moléculas com centros paramagnéticos, principalmente metais, o trabalho do físico será o cálculo deste tensor g, dado que nele está embutido o acoplamento spin-órbita. Com ele, será, então, possível fazer estimativas dos orbitais do centro paramagnético, e comparar com parâmetros vindos, por ex., de modelagem.

# grupo heme

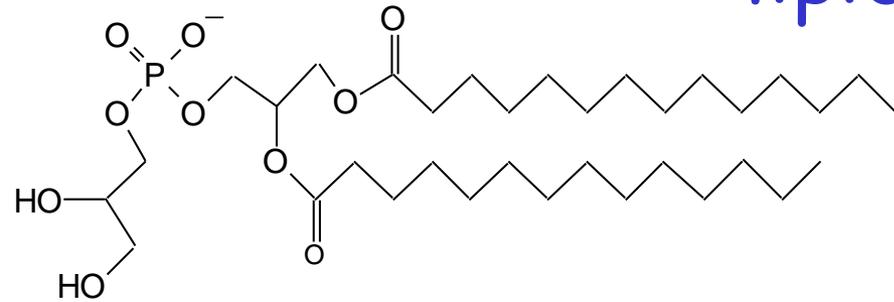


spin alto  $\Rightarrow S = 5/2$



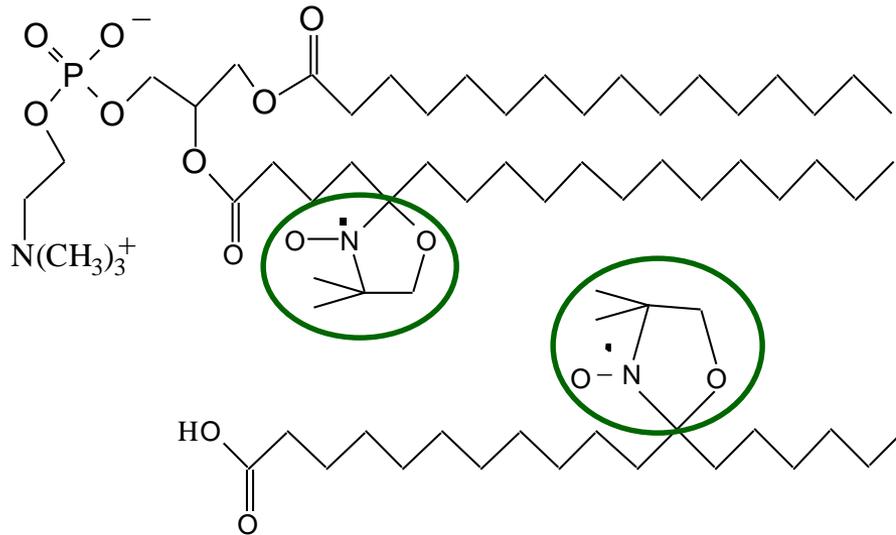
Ingram, 1957, estuda cristais de mioglobina, antes dos cálculos por raios-X: duas moléculas por célula unitária e estrutura do centro ativo

# lipídios e marcadores de spin

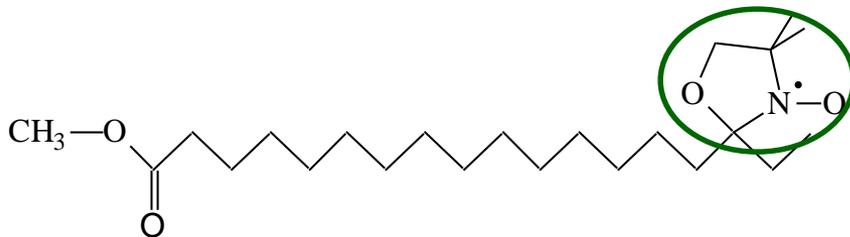


DMPG

dimiristoil fosfatidil glicerol

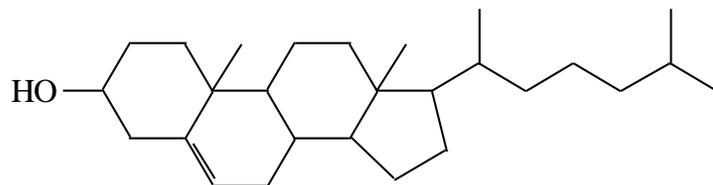


5-PCSL, fosfolipídio



12-SASL, ácido esteárico

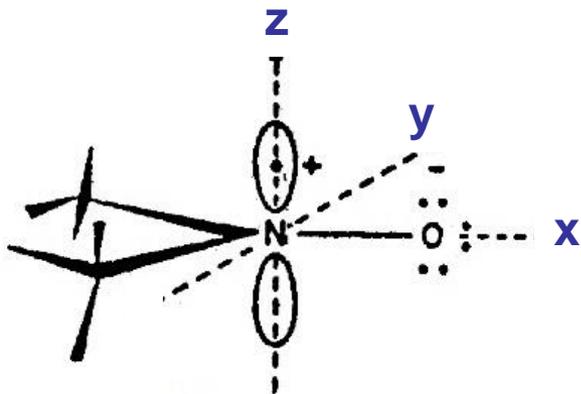
16-MESL, metil éster do ácido esteárico



colesterol

nitróxido: usado como "marcador de spin"  
radical livre, extremamente estável!

$$S = 1/2$$



$$\begin{aligned} H_z &\Rightarrow g_z = 2,0027 \\ H_x &\Rightarrow g_x = 2,0089 \\ H_y &\Rightarrow g_y = 2,0061 \end{aligned}$$

(elétron livre  $g = 2,0023$ )

Fator  $g$ , nas 3 direções, não são muito distintos.

Elétron desemparelhado localizado principalmente no orbital p do nitrogênio.

# Interação hiperfina

Interação do elétron desemparelhado com os núcleos vizinhos

Interação clássica entre dois dipolos magnéticos: do elétron e do núcleo

$$\vec{\mu}_e = -g\beta \frac{\vec{S}}{\hbar} \quad \vec{\mu}_N = \gamma \vec{I}$$

$$\mathcal{H}_{anisot} = \frac{\mu_o}{4\pi\hbar} g\beta\gamma \left\{ \frac{3(\vec{S} \cdot \vec{r})(\vec{I} \cdot \vec{r})}{r^5} - \frac{\vec{S} \cdot \vec{I}}{r^3} \right\}$$

Interação de contato (de Fermi)

$$\mathcal{H}_{isot} = \frac{8\pi}{3\hbar} g\beta\gamma |\Psi(0)|^2 \vec{S} \cdot \vec{I}$$

$$\mathcal{H}^{hiperfina} = \mathcal{H}_{anisot} + \mathcal{H}_{isot}$$

$$\mathcal{H}^{\text{hiperfina}} = \vec{S} \cdot \vec{A} \cdot \vec{I}$$

Sendo que no tensor  $A$ , que pode ser medido, é colocada toda a interação hiperfina desconhecida, que será, portanto, medida experimentalmente.

$$\mathcal{H}_{\text{spin}} = \frac{\beta}{\hbar} \vec{H} \cdot \vec{g} \cdot \vec{S} + \frac{1}{\hbar^2} \vec{S} \cdot \vec{A} \cdot \vec{I}$$

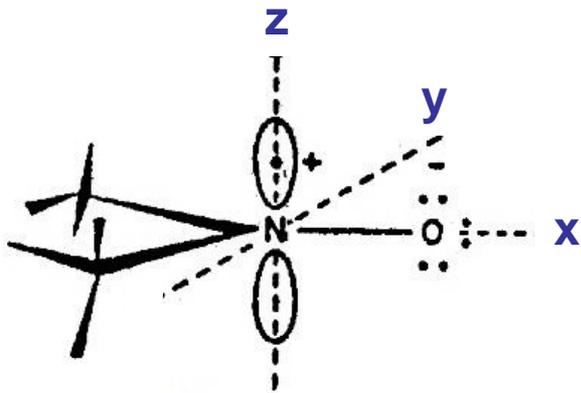
↔

Interação Zeeman

Interação hiperfina

Para o nitróxido:

$S = \frac{1}{2}$  e  $I = 1$  (interação com o spin nuclear do  $^{14}\text{N}$ )



$$\begin{aligned} H_z &\Rightarrow g_z = 2,0027, \quad A_z = 32 \text{ G} \\ H_x &\Rightarrow g_x = 2,0089 \\ &\quad A_x = 6 \text{ G} \\ H_y &\Rightarrow g_y = 2,0061, \quad A_x = 6 \text{ G} \end{aligned}$$

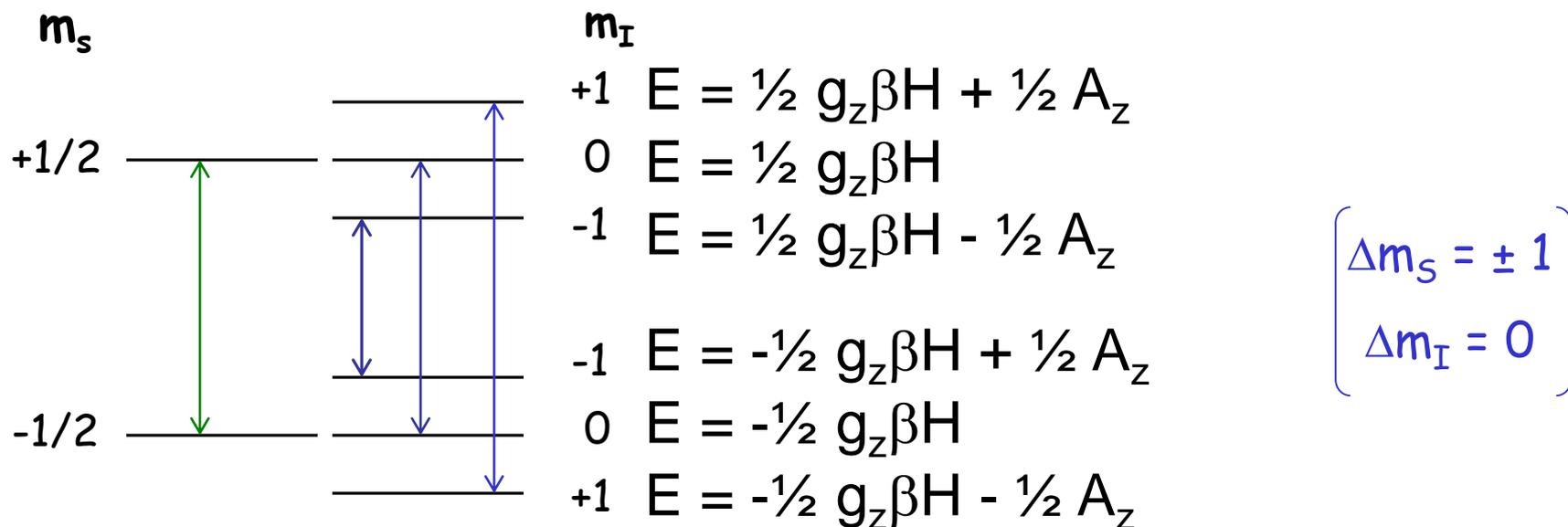
Como estes valores são medidos?

Por ex.,  $\vec{H} // \hat{z}$  e todas as moléculas ordenadas

$$\mathcal{H}_{\text{spin}} = \frac{\beta}{\hbar} \vec{H} \cdot \vec{g} \cdot \vec{S} + \frac{1}{\hbar^2} \vec{S} \cdot \vec{A} \cdot \vec{I} \quad \mathcal{H}_{\text{spin}} = g_z \frac{\beta}{\hbar} H S_z + \frac{A_z}{\hbar^2} I_z S_z$$

$$S = \frac{1}{2} \quad e \quad I = 1$$

$$E = g_z \beta H m_s + A_z m_s m_I$$



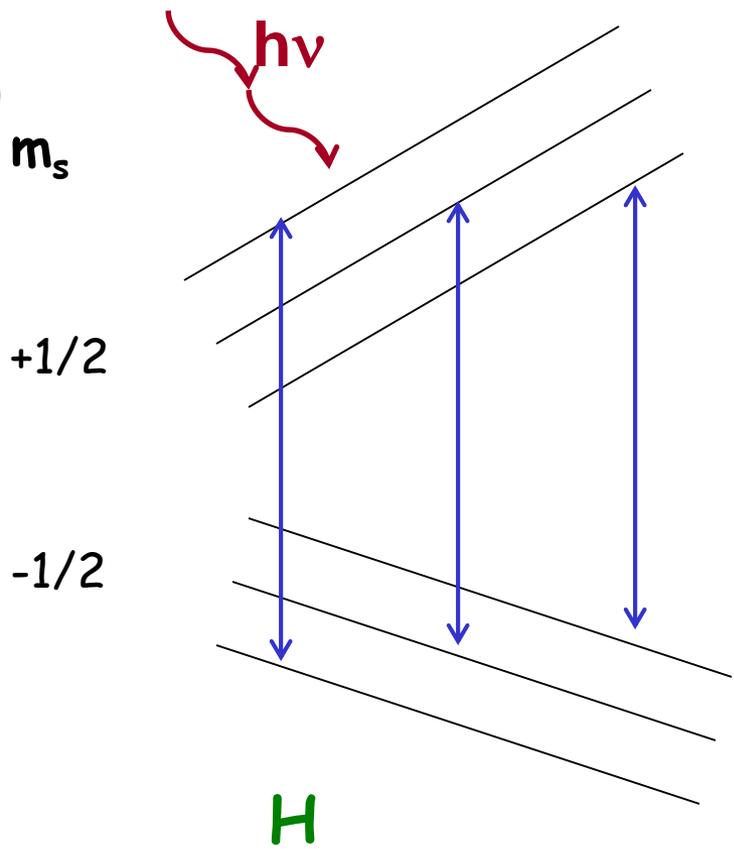
# Como o experimento é feito

$h\nu$  fixa  
(micro-onda)

Varia-se o campo magnético aplicado

$$\begin{cases} \Delta m_s = \pm 1 \\ \Delta m_I = 0 \end{cases}$$

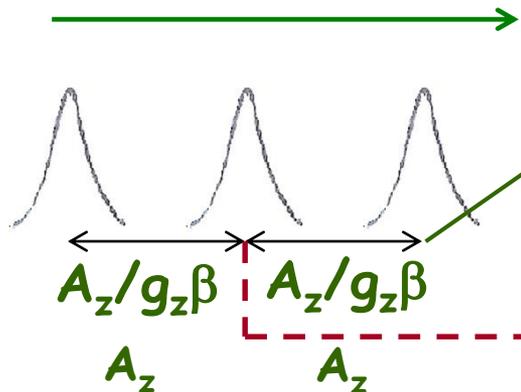
Mede-se os valores de  $g$  e  $A$



$m_I$

- +1  $E = \frac{1}{2} g_z \beta H + \frac{1}{2} A_z$
- 0  $E = \frac{1}{2} g_z \beta H$
- 1  $E = \frac{1}{2} g_z \beta H - \frac{1}{2} A_z$

- 1  $E = -\frac{1}{2} g_z \beta H + \frac{1}{2} A_z$
- 0  $E = -\frac{1}{2} g_z \beta H$
- +1  $E = -\frac{1}{2} g_z \beta H - \frac{1}{2} A_z$

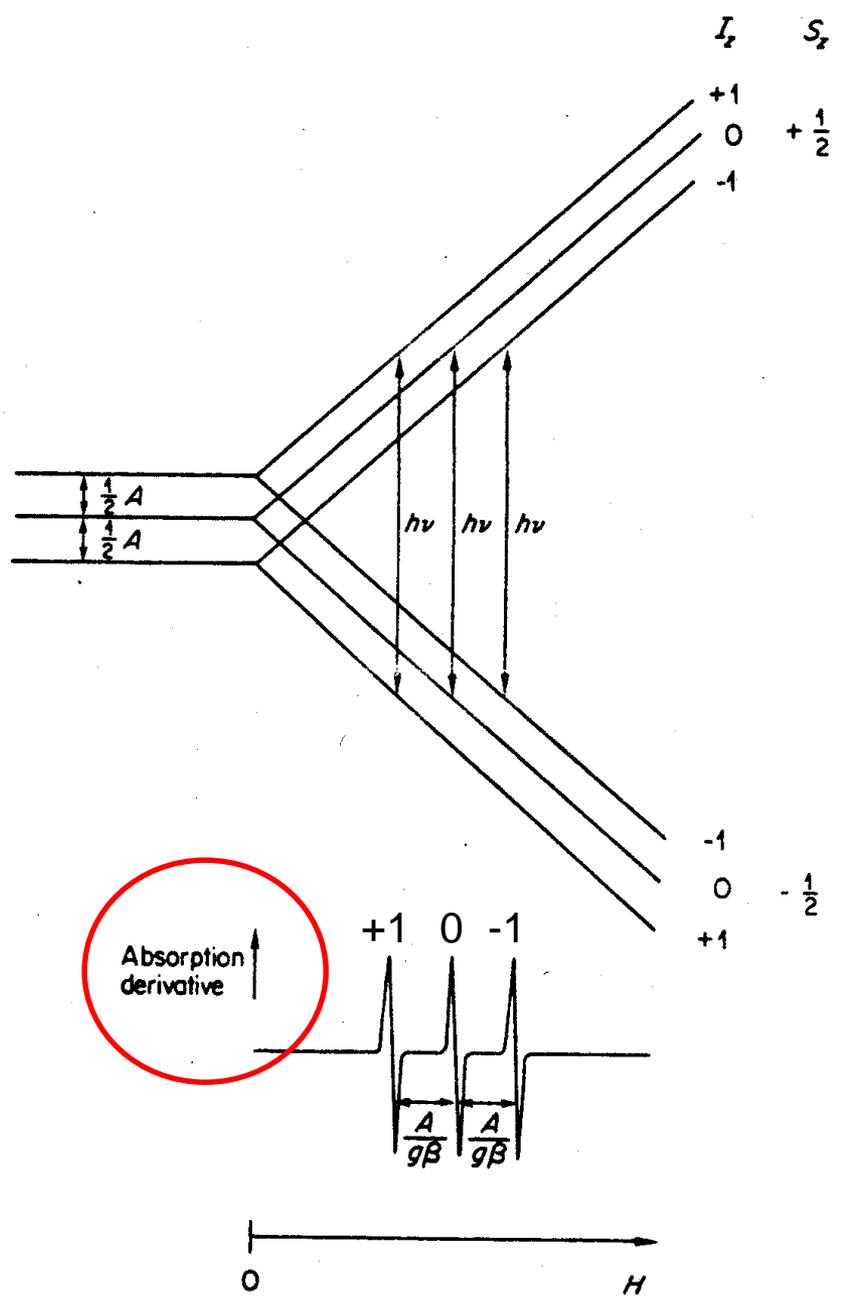


$$\Delta E = h\nu = g_z \beta H - A_z$$

$$H = (h\nu/g_z \beta) + (A_z/g_z \beta)$$

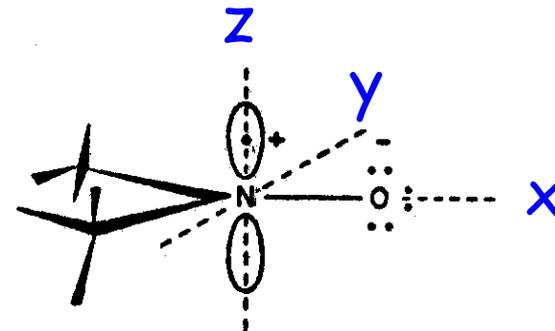
$$\Delta E = h\nu = g_z \beta H$$

$$H = h\nu/g_z \beta$$



## Lembrando a simetria do grupo nitróxido

Em caso de um cristal, onde o nitróxido foi incorporado como impureza, mas está ordenado

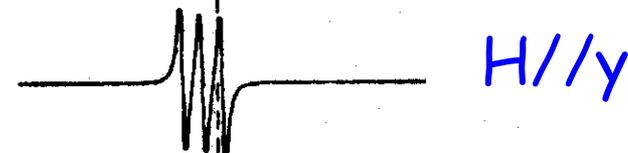


$$A_{xx} = 6 \text{ G}$$



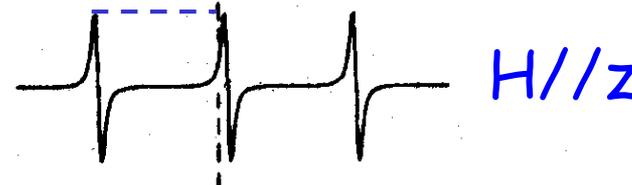
H//x

$$A_{yy} = 6 \text{ G}$$



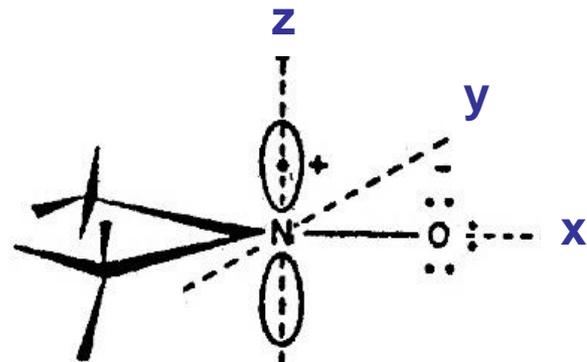
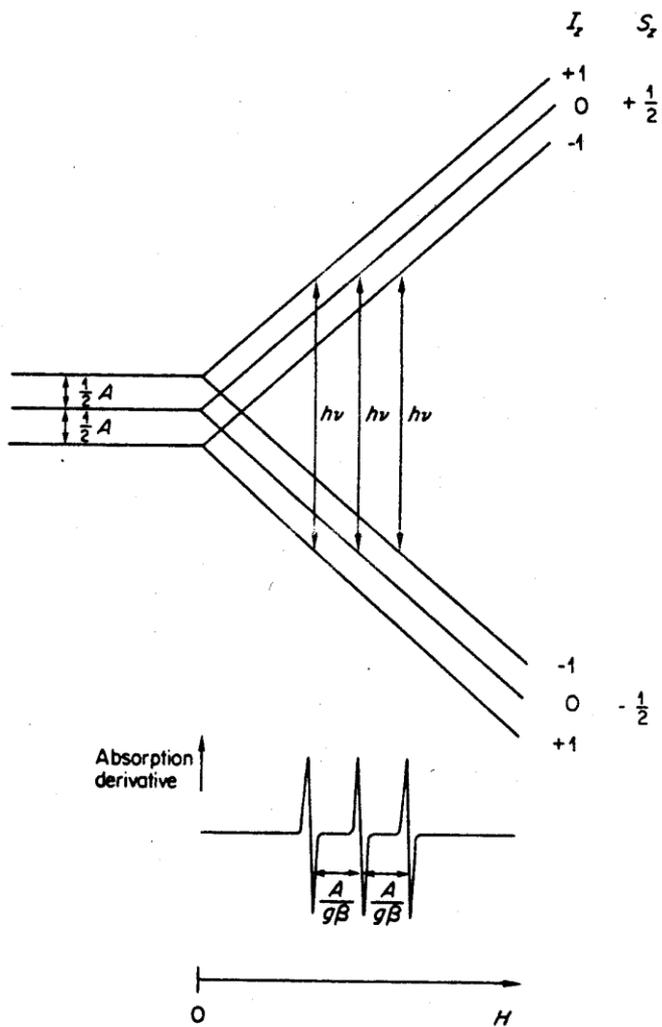
H//y

$$A_{zz} = 32 \text{ G}$$



H//z

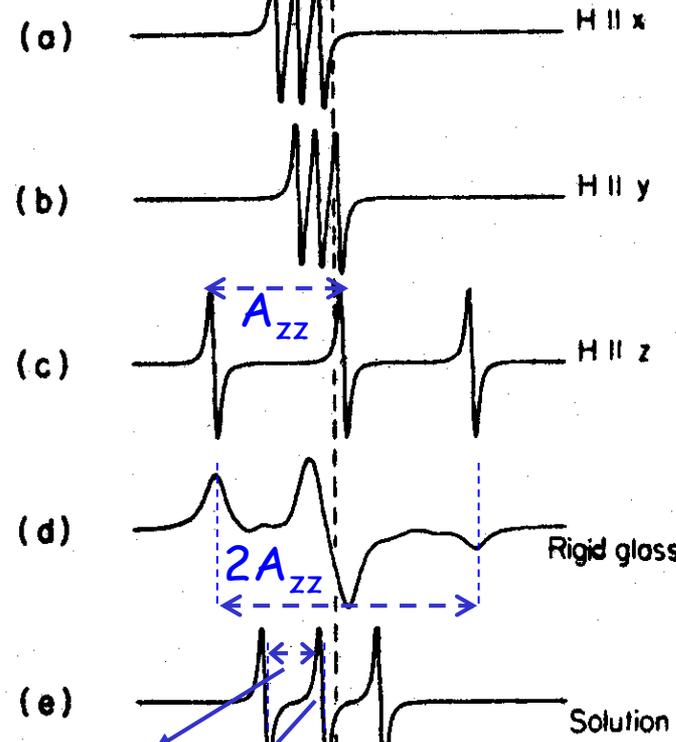
Portanto, os valores do desdobramento hiperfino,  $A(\theta, \varphi)$ , ou  $A(\theta)$ , dado que existe uma simetria axial, variam entre 6 e 32 G



$g_{xx}, A_{xx}$

$g_{yy}, A_{yy}$

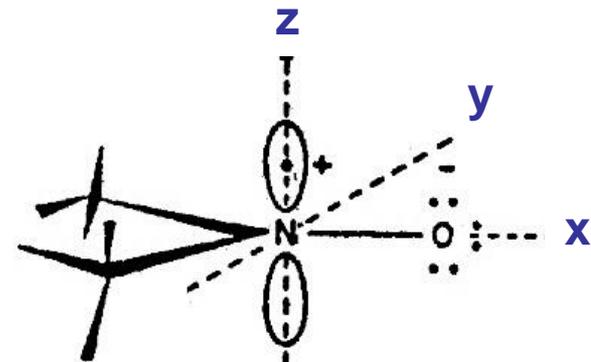
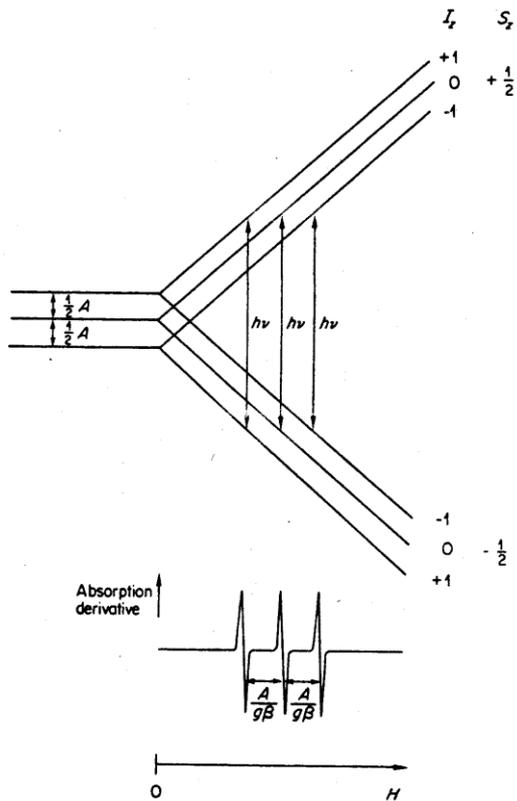
$g_{zz}, A_{zz}$



$$a_0 = (A_{xx} + A_{yy} + A_{zz})/3$$

$$g_0 = (g_{xx} + g_{yy} + g_{zz})/3$$

50 G



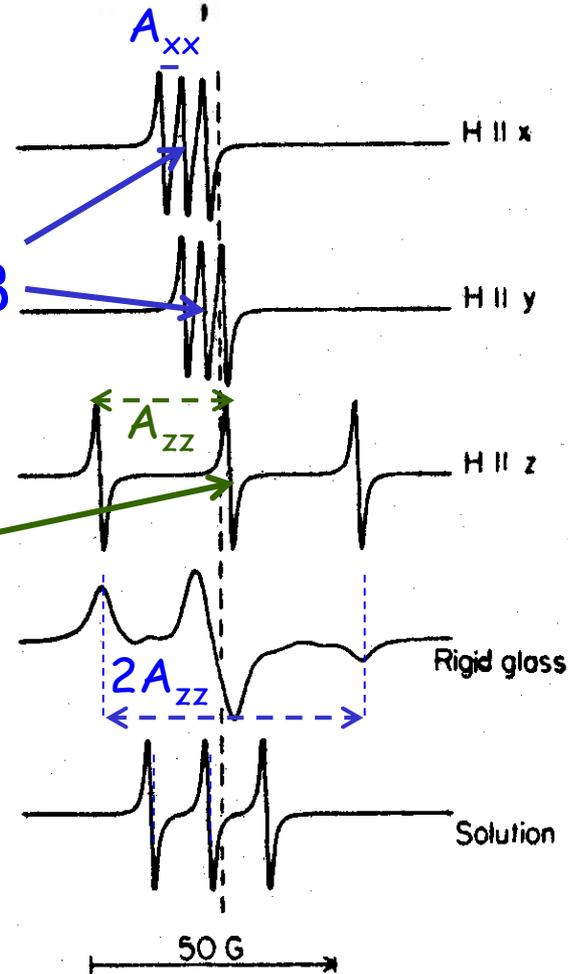
crystal

$$A_{xx} \sim A_{yy} \sim 6 \text{ G}$$

$$g_{xx} \sim g_{yy} \sim 2.008$$

$$A_{zz} \sim 32 \text{ G}$$

$$g_{zz} \sim 2.003$$

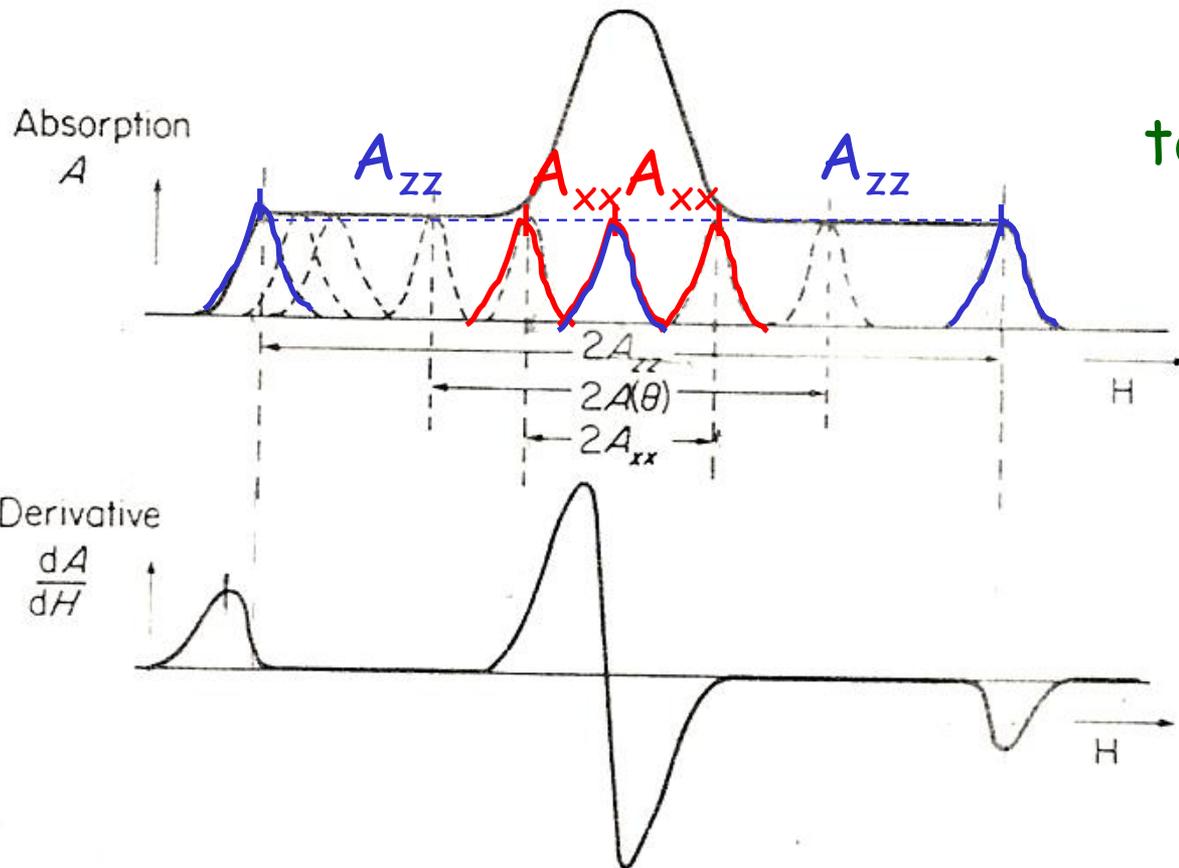


movimento rápido



# "espectro de pó"

Soma dos espectros obtidos com o marcador de spin em todas as direções em todas as direções



Marcador de spin totalmente imobilizado

Deste tipo de espectro, mede-se somente o  $2A_{zz}$

Forma e posição das linhas do sinal de RPE informam sobre o microambiente onde se encontra o nitróxido:

- fluidez
- polaridade

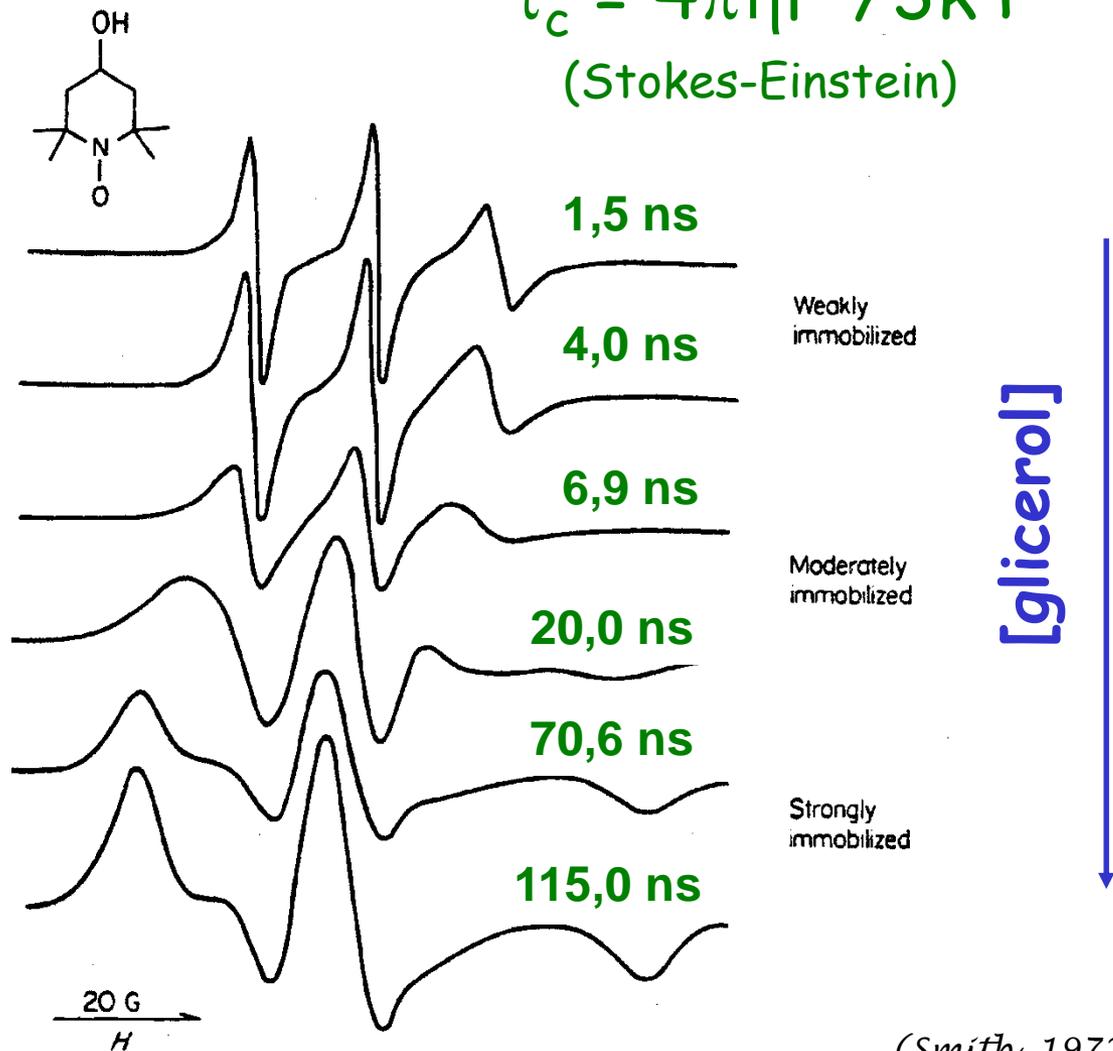
Processos de relaxação do sistema estão relacionados ao movimento dos centros paramagnéticos

## Tempo em meios de diferentes viscosidades

tempo de correlação rotacional

$$\tau_c = 4\pi\eta r^3 / 3kT$$

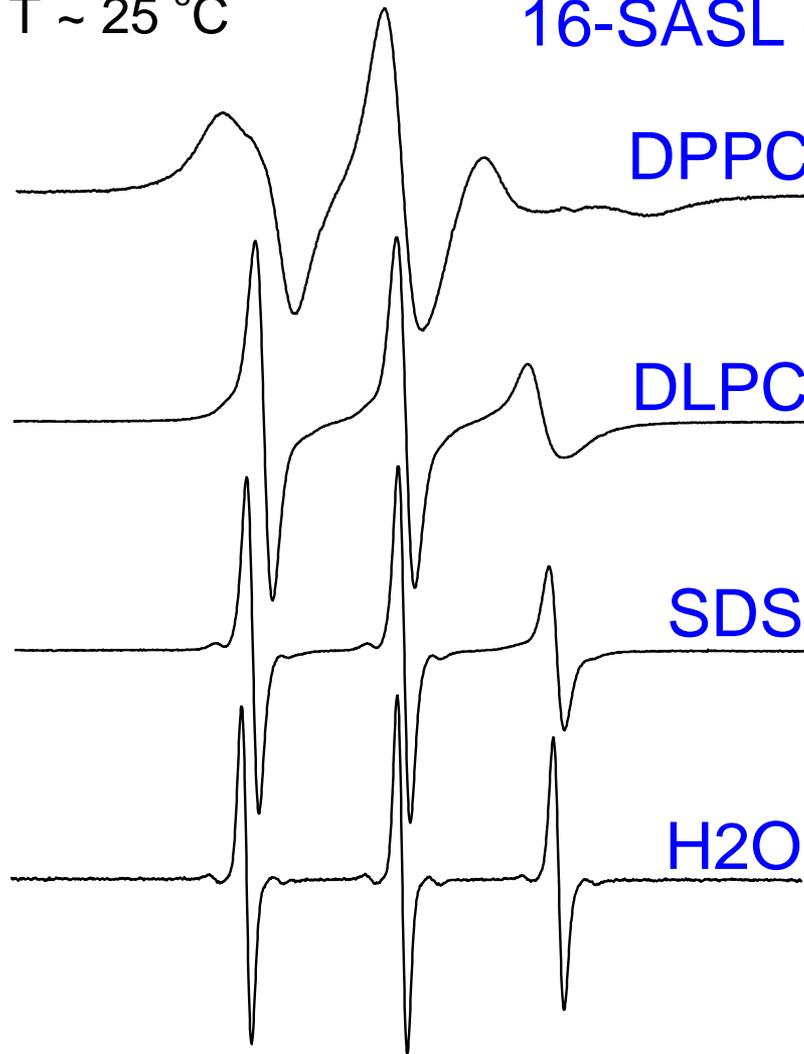
(Stokes-Einstein)



(Smith, 1972)

T ~ 25 °C

16-SASL em



DPPC

Em bicamada, abaixo da  $T_m$   
do fosfolipídio

DLPC

Em bicamada, acima da  
 $T_m$  do fosfolipídio

SDS

Em micelas

H2O

Livre, em solução

