

Biofísicoquímica de Metaloproteínas

Departamento de Física

Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL



Trabajo Practico n°3

Espectroscopía de Resonancia Paramagnética Electrónica (RPE).

Introducción

La Resonancia Paramagnética Electrónica (RPE, en inglés *EPR: Electron Paramagnetic Resonance*) es una técnica espectroscópica que permite obtener información sobre la estructura y dinámica de sistemas con electrones desapareados (*i.e.* sistemas paramagnéticos). En general, el concepto de EPR es similar al de la RMN (resonancia magnética nuclear), sólo que las señales observadas se deben a espines de electrones desapareados, en lugar de espines nucleares (e.g. ^1H , ^{15}N , ^{13}C , etc.).

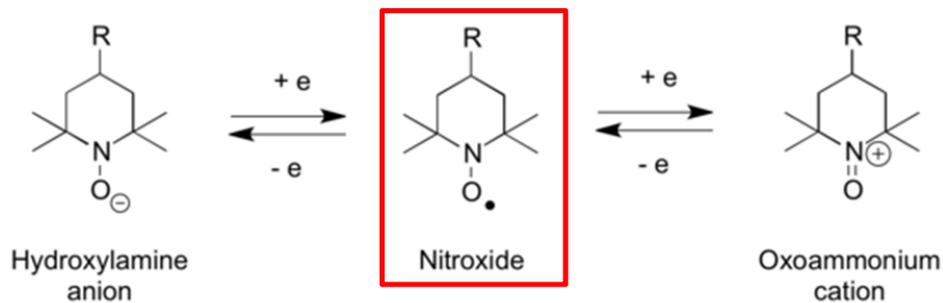
Ejemplos de sistemas que se pueden investigar por EPR:

- Centros paramagnéticos intrínsecos:
 - Radicales estables en química y biología.
 - Especies de corta vida, intermedios en reacciones químicas ($t_{1/2} \sim 100$ ns).
 - Pares radicales y estados triplete en fotosíntesis y sistemas relacionados.
 - Radicales generados por el daño por irradiación (ADN, polímeros).
 - Iones de metales de transición (Cu^{2+} , Mn^{2+} , V^{4+} , Fe^{3+} , Cr^{3+} , Cr^{5+} , Mo^{5+} , Ti^{1+} , Ti^{3+}) presentes en catalizadores sintéticos y en metalo-proteínas.
 - Defectos en semiconductores.
 - Fullerenos

- Sistemas diamagnéticos con spin introducido artificialmente: Debido a que la espectroscopia EPR es un excelente método para sondear estructura y dinámica en líquidos y sólidos, también se puede aplicar a sistemas diamagnéticos a través de la introducción de sondas de spin (en analogía a sondas de fluorescencia).

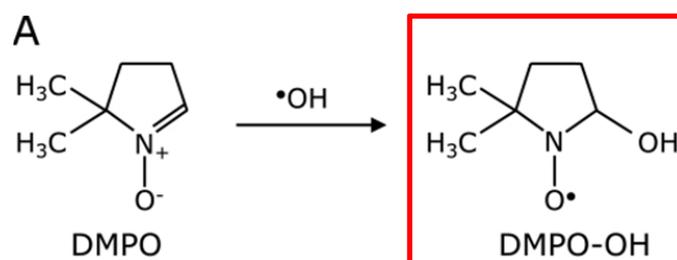
o Mn^{2+} reemplazando a Mg^{2+} en sistemas biológicos.

o Sondas de spin nitróxido para:



- Estructura y dinámica de proteínas
- Orden y dinámica de membranas biológicas
- Polímeros - Estructura, dinámica y degradación de polímeros
- Orden y dinámica de cristales líquidos
- Sensores de pH
- Procesos de autoensamblado
- Adsorción en superficies

Las especies de radicales reactivos como el radical $OH\cdot$, el radical anion O_2^- , O_2 singlete, etc., pueden ser detectados con trampas de espín, las cuales son moléculas que reaccionan con los radicales libres, convirtiéndose en radicales estables.



Fundamento del experimento de EPR

En el experimento EPR la muestra se coloca en el seno de un campo magnético homogéneo:

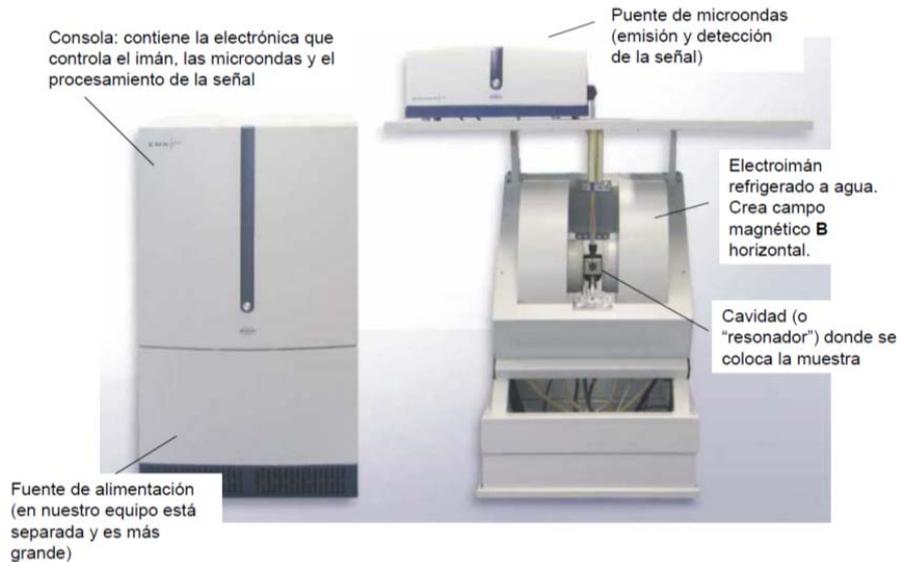


Figura 1: Espectrómetro de EPR onda continua (CW-EPR) de banda X (9.5 GHz).

El electrón, al ser una partícula cargada (negativamente) que gira (spin), genera un momento magnético. Este momento magnético (μ_S) generado por el spin electrónico en el seno de un campo magnético **B** posee una energía:

$$E_{dipolo} = -\vec{\mu}_S \cdot \vec{B} \quad \text{ecuación (1)}$$

Además se sabe que para el electrón, su momento magnético de spin es:

$$\vec{\mu}_S = -g_e \mu_B \vec{S} \quad \text{ecuación (2)}$$

Donde $g_e=2.0023$ es el factor g del electrón libre, y μ_B es el magnetón de Bohr. Notar que el signo menos en ecuación 2 indica que $\vec{\mu}_S$ y \vec{S} son antiparalelos!

En base a las ecuaciones 1 y 2:

$$E_{dipolo} = \vec{\mu}_S \cdot \vec{B} = g_e \mu_B \vec{S} \cdot \vec{B} \quad \text{ecuación (3)}$$

De acuerdo a la ecuación 3, cuando los vectores \vec{S} y \vec{B} sean paralelos (*i.e.* $\vec{\mu}_S$ y \vec{B} antiparalelos), la energía será máxima ($\cos 0^\circ$), mientras que será mínima cuando \vec{S} y \vec{B} sean antiparalelos ($\cos 180^\circ$).

La aplicación del campo magnético externo elimina la degeneración de los estados de spin electrónico desapareado localizado en el centro paramagnético (*e.g.* radical, metal de transición):

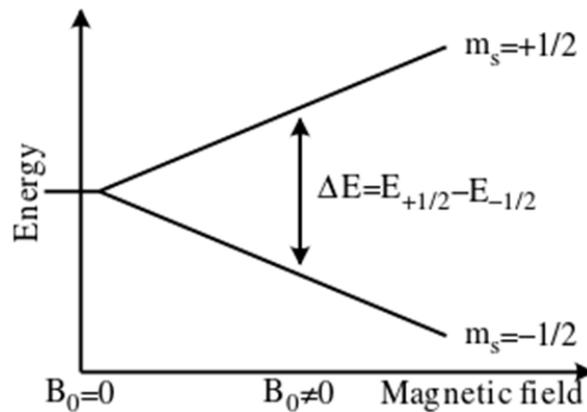


Figura 2: Dependencia del ΔE entre niveles de spin electrónico con B_0 .

En $B_0=0$, los estados de spin están degenerados (“juntos” en escala de energía), pero cuando el $B_0 \neq 0$ estos niveles se separan (esto se conoce como efecto Zeeman). La separación energética entre estos dos estados de spin viene dada por (*repasar producto escalar de vectores*):

$$\Delta E_{(superior)-(inferior)} = g_e \mu_B \frac{1}{2} B \cos(0^\circ) - g_e \mu_B \frac{1}{2} B \cos(180^\circ) = g_e \mu_B B \quad (4)$$

Las transiciones entre los diferentes estados de espín pueden entonces ser inducidas por irradiación de una onda electromagnética a la frecuencia (*de microondas*) apropiada:

$$\Delta E_{(+1/2)-(-1/2)} = E_{fotón} = h\nu = g_e \mu_B B \quad (5)$$

En sistemas reales los electrones normalmente no están aislados, sino que están asociados con uno o más átomos. Hay varias consecuencias importantes de esto:

- Un electrón desapareado puede ganar o perder momento angular, lo cual puede cambiar el valor de su factor g, haciendo que difiera del g_e. Esto es especialmente importante para los sistemas químicos con iones de metales de transición.
- El momento magnético de un núcleo con un spin nuclear distinto de cero (I≠0) afectará a cualquier electrón desapareado cercano a ese átomo. Esto conduce al fenómeno de acoplamiento hiperfino (A), análogo al acoplamiento J en RMN, el cual divide la señal de resonancia de EPR en dobletes, tripletes y así sucesivamente.
- Las interacciones de un electrón desapareado con su entorno influyen en la forma de una línea espectral de EPR. Las formas pueden proporcionar información estructural.
- El factor g y el A en un átomo o molécula pueden no ser los mismos para todas las orientaciones de un electrón desapareado en un campo magnético externo. Esta anisotropía depende de la estructura electrónica del átomo o molécula (por ejemplo, radical libre) en cuestión, y por lo tanto puede proporcionar información sobre el orbital atómico o molecular que contiene el electrón desapareado.

El factor g

El factor g puede proporcionar información sobre la estructura electrónica de un centro paramagnético. Un electrón desapareado responde no sólo al campo magnético externo aplicado por el espectrómetro B₀, sino también a cualquier campo magnético local de átomos o moléculas cercanas. El campo efectivo B_{eff} experimentado por un electrón es:

$$B_{eff} = B_0(1 - \sigma)$$

Donde σ es una constante de apantallamiento similar a la de RMN, y puede tomar valores positivos o negativos. En base a esto, la ecuación 5 se puede escribir:

$$h\nu = g_e \cdot \mu_B \cdot B_{eff} \quad (6)$$

$$h\nu = g_e \cdot \mu_B \cdot B_0(1 - \sigma) \quad (7)$$

...reagrupando...

$$g = g_e(1 - \sigma) \quad (8)$$

$$h\nu = g \mu_B B_0 \quad (9)$$

$$(h = 6.626 \cdot 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s}; \mu_B = 9.274 \cdot 10^{-28} \text{ J}\cdot\text{G}^{-1})$$

La ecuación 9 se utiliza para determinar el factor g en un experimento de EPR midiendo el B_0 al que se produce la resonancia (y conociendo ν). Si g no es igual g_e implica que la relación entre el momento magnético de spin electrónico (μ_S) y su momento magnético angular (μ_L) difiere del valor del electrón libre. Dado que el momento magnético de spin de un electrón es constante (aproximadamente el magnetón de Bohr), entonces el electrón debe haber ganado o perdido momento angular a través del acoplamiento spin-órbita. Debido a que los mecanismos de acoplamiento spin-órbita son bien comprendidos, la magnitud del cambio da información acerca de la naturaleza del orbital atómico (p, d, f) o molecular (σ , π) que contiene el electrón desapareado.

Obtención de un espectro de EPR

En la mayoría de las espectroscopías (UV-Vis, IR) los niveles de energía entre los cuales se producen las transiciones (electrónicas, vibracionales, rotacionales) que son detectadas están “fijos” y ya presentes en la muestra. En estas técnicas se realiza un barrido de la longitud de onda de la radiación EM para detectar las absorciones correspondientes a saltos entre los niveles energéticos. Así, en estos espectros se muestran picos de absorción. Sin embargo, en EPR los niveles de energía responsables de la absorción del fotón están “juntos”, pero se pueden “separar” colocando la muestra en el seno de un campo magnético exterior (B_0). En este caso, el ΔE depende de la magnitud del B_0 (Figura 2) así que se mantiene la frecuencia constante ($h\nu$ constante) y se barre B_0 para detectar absorciones de energía. El espectro muestra la primera

derivada de los picos de absorción (debido a que el sistema de detección de EPR es diferente al de las demás espectroscopías – sensible a fase).

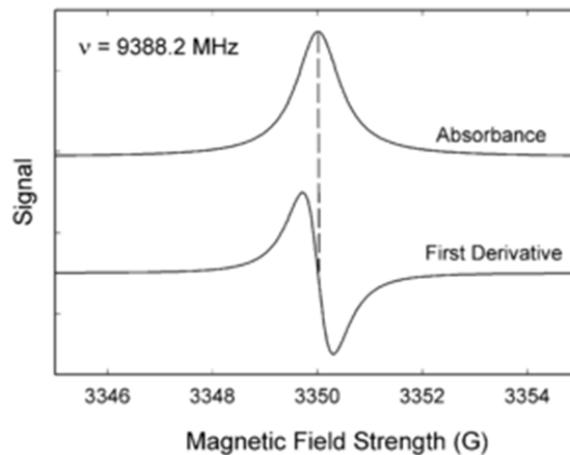


Figura 3: señal de absorción y primera derivada correspondiente.

El registro de la absorción de microondas por parte de la muestra da lugar al espectro de EPR. Este espectro es altamente sensible al medio físico y químico que rodea al centro donde se encuentra el electrón desapareado, y por lo tanto el EPR es muy útil para caracterizar centros paramagnéticos y obtener información estructural.

Formas de los espectros (forma de línea)

La desviación del **factor g** medido de la del electrón libre surge del acoplamiento spin-órbita entre el estado fundamental y estados excitados. Debido a que los orbitales están orientados en la molécula (p_x , p_y , p_z , d_{z^2} , etc.), la magnitud de esta mezcla es dependiente de la dirección, o sea es anisotrópico. En una solución de baja viscosidad, cuando las moléculas rotan libremente en todas las direcciones se anula (se promedia) toda esta anisotropía. Sin embargo, cuando todas las moléculas paramagnéticas están en una orientación fija, como en un cristal, el **factor g** del espectro de EPR cambia según su orientación con respecto al B_0 . Esto se debe a la anisotropía del factor g. Para cada molécula paramagnética, existe un sistema de ejes único

llamado sistema de ejes principal. Los factores g medidos a lo largo de estos ejes se llaman los factores g principales y se etiquetan como g_x , g_y y g_z .

La mayoría de los espectros de EPR de metales de transición en sistemas biológicos se obtienen en muestras de solución congelada. En estas muestras, los paramagnetos no están alineados en una dirección única como en un cristal orientado. Tampoco están girando rápidamente como en una solución de baja viscosidad. El acto de congelación fija a las moléculas en todas las orientaciones posibles. Por lo tanto, el espectro de una muestra congelada representa la suma de todas las orientaciones posibles y se denomina “espectro de polvo”.

La Figura 4 muestra los espectros de absorción y primera derivada para tres clases diferentes de anisotropía. En la primera clase, llamada isotrópica, todos los factores g principales son los mismos (Figura 4a). En la segunda clase, llamada axial, hay un eje único que difiere de los otros dos ($g_x = g_y \neq g_z$) (Fig. 4b y 4c). Se dice que el factor g a lo largo del eje Z es paralelo con B_0 , por lo tanto $g_z = g_{\parallel}$. Mientras que los dos ejes restantes son perpendiculares a B_0 , y por lo tanto $g_x = g_y = g_{\text{perp}}$. La última clase de anisotropía, llamada rómbica, ocurre cuando todos los factores g difieren (figura 8d).

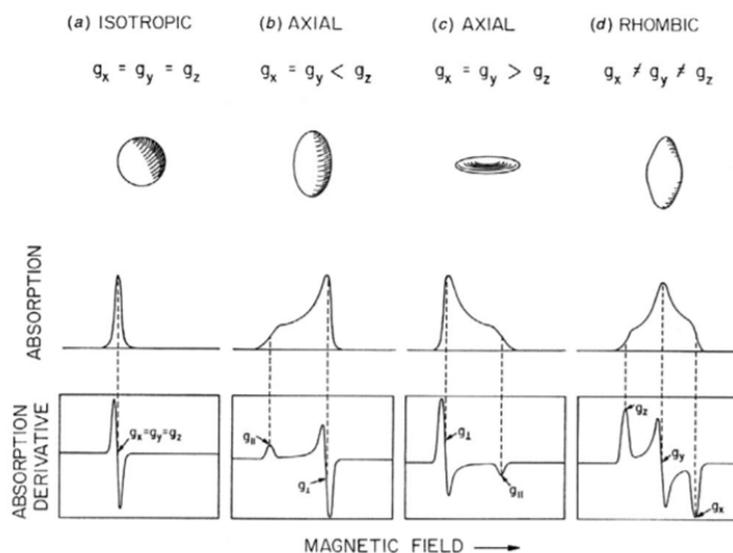


Figura 4: tipos de anisotropía y señal de EPR típica observada

Interacción hiperfina y superhiperfina: efecto de un spin nuclear cercano al e⁻ desapareado

El momento magnético del electrón (μ_s) puede representarse como una barra de imán. De la física básica, sabemos que un imán se alinearía en un campo magnético externo (interacción Zeeman). La física también nos dice que la energía de un imán de barra puede ser influenciada por la interacción con otro imán vecino. En este último caso, la magnitud de la interacción depende de la distancia de separación y de la alineación relativa de los dos imanes.

En EPR hay tres tipos de interacción que pueden ocurrir. Los dos primeros tipos se deben a la interacción entre un electrón desapareado y un núcleo magnético. La interacción del electrón no apareado con el momento magnético nuclear se denomina interacción hiperfina nuclear. Generalmente se llama hiperfina si resulta del núcleo en el cual se encuentra el electrón desapareado (Fig. 5A), y superhiperfina si es de un núcleo vecino (Fig. 5B). El tercer tipo es la interacción entre dos electrones no apareados en átomos diferentes, normalmente dentro de una molécula. Esta se denomina interacción spin-spin (Fig. 5C). En la Tabla 1, se enumeran los núcleos magnéticos importantes en biología. Se indican qué isótopos están presentes (abundancia natural), cuáles de estos tienen un spin nuclear, y el spin (I) respectivo.

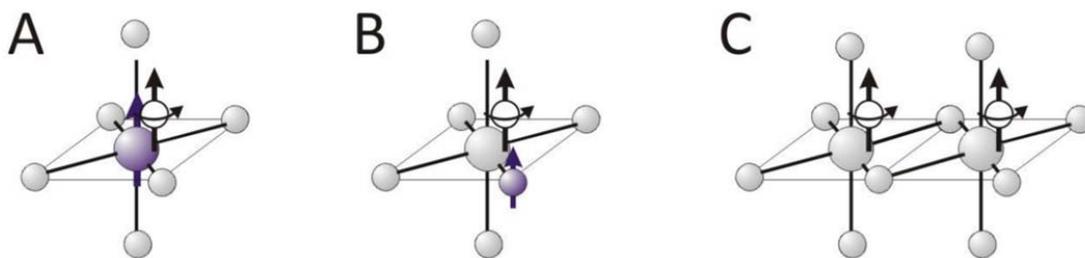


Figura 4: tipos de interacción magnética que pueden ocurrir en EPR: interacción hiperfina (A), interacción superhiperfina (B) e interacción spin-spin (C).

Por ejemplo, la interacción del electrón con un núcleo con $I=1/2$ (^1H) dará como resultado un espectro con dos líneas:

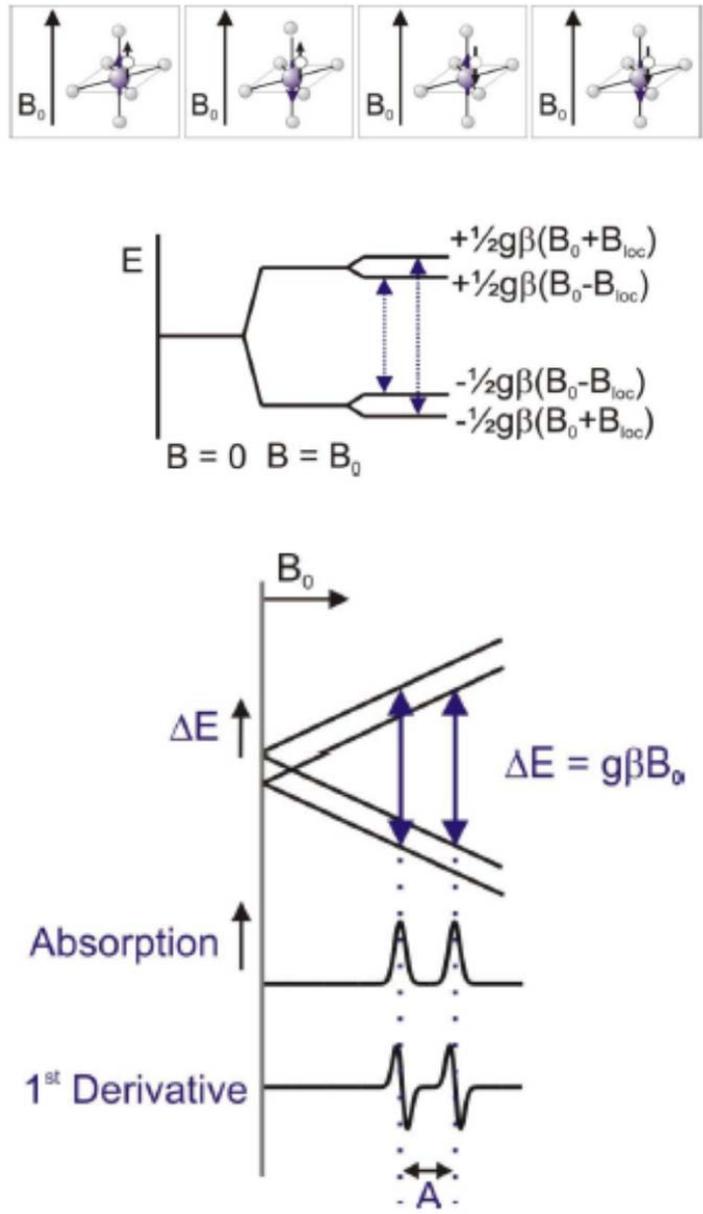


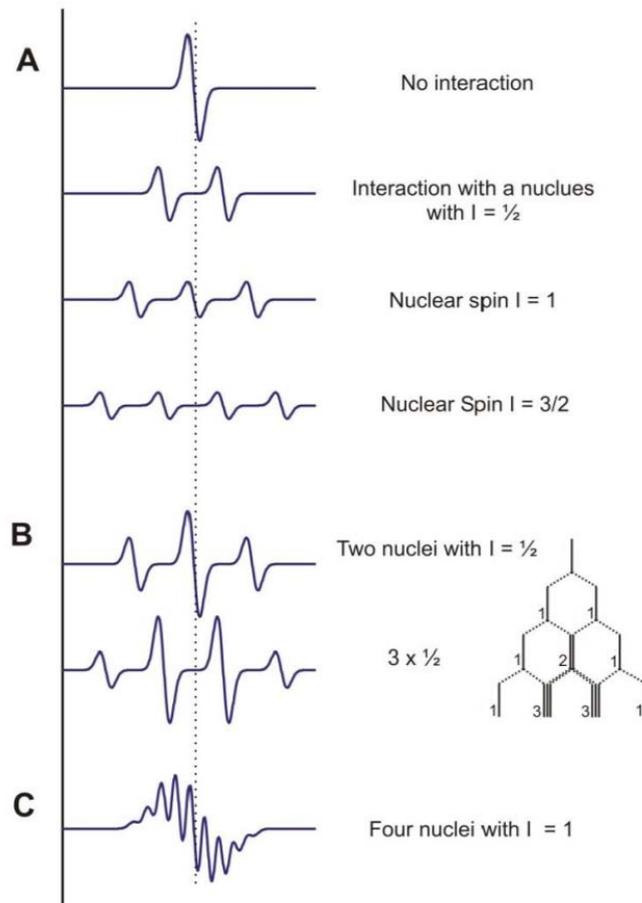
Figura 6: efecto de campos magnéticos locales generados por espines nucleares (arriba). EPR observado para un electrón que interactúa con un spin nuclear $I=1/2$

Atom	Isotope	Spin (abundance)
H	1, 2	^1H , $1/2$ (99.985); ^2H , 1 (0.015)
C	12, 13	$1/2$ (1.07)
N	14, 15	^{14}N , 1 (99.632); ^{15}N , $1/2$ (0.368)
O	16, 17, 18	$5/2$ (0.038)
F	19	$1/2$
P	31	$1/2$
S	32, 33, 34	$3/2$ (0.76)
Cl	35, 37	^{35}Cl , $3/2$ (75.78); ^{37}Cl , $3/2$ (24.22)
As	75	$3/2$
Se	76, 77, 78, 80, 82	$1/2$ (7.63)
Br	79, 81	^{79}Br , $3/2$ (50.69); ^{81}Br , $3/2$ (49.31)
I	127	$5/2$
V	50, 51	^{50}V , 6 (0.25); ^{51}V , $7/2$ (99.75)
Mn	55	$5/2$
Fe	54, 56, 57, 58	$1/2$ (2.119)
Co	59	$7/2$
Ni	58, 60, 61, 62	$3/2$ (1.14)
Cu	63, 65	^{63}Cu , $3/2$ (69.17); ^{65}Cu , $3/2$ (30.83)
Mo	92, 94, 95, 96, 97, 98, 100	^{95}Mo , $5/2$ (15.92); ^{97}Mo , $5/2$ (9.55)
W	180, 182, 183, 184, 186	$1/2$ (14.3)

Tabla 1: elementos e isótopos con sus espines nucleares correspondientes.

La interacción hiperfina (y superhiperfina) puede hacer lucir un espectro de EPR complejo. La figura de abajo, parte A, muestra la interacción del electrón desapareado con diferentes núcleos magnéticos. La señal original se divide en dos o más señales con igual intensidad. Observe que la intensidad total de la señal no cambia y por lo tanto la amplitud de la señal se hace cada vez menor. La parte B, muestra cómo la forma de la línea se ve afectada por la interacción con más de un núcleo magnético (sin corrección para la pérdida de intensidad). El pequeño "árbol" o diagrama de palo en el lado derecho muestra cómo se puede calcular la intensidad relativa de las diferentes bandas. La parte C, muestra cómo se ve un espectro de una especie que tiene interacción con cuatro núcleos con $I = 1$. En los ejemplos utilizados en las partes B y C las interacciones son con núcleos que son idénticos. Los patrones se harán mucho más complejos y, a primera vista, mucho menos informativos cuando el electrón desapareado esté interaccionando con núcleos con diferentes espines nucleares (I) y constantes de acoplamiento (A) de diferentes magnitudes. Independientemente del número de líneas hiperfinas, el espectro de EPR está siempre centrado alrededor de la transición de Zeeman (línea punteada en la figura). En otras palabras, el factor g puede determinarse a partir del valor del campo magnético en el centro del

espectro (línea de puntos). Sin embargo, en el caso de espines nucleares de $I = (n/2)$ no habrá un pico real en esta posición.



Objetivos:

- Entender el fundamento de la espectroscopía de EPR.
- Observar diferentes espectros de EPR de varias muestras.
- Entender qué es un espectro isotrópico, axial y rómbico.
- Determinar los valores de g en los espectros obtenidos.

Fundamento de la presencia de señales de Cu(II) en EPR

El ion Cu(II) tiene una configuración electrónica $[\text{Ar}]3d^9$, con un solo electrón desapareado cuyo espín efectivo es $S = 1/2$. En un campo cristalino octaédrico con distorsión axial, los orbitales d estaría ocupados de acuerdo a la figura:

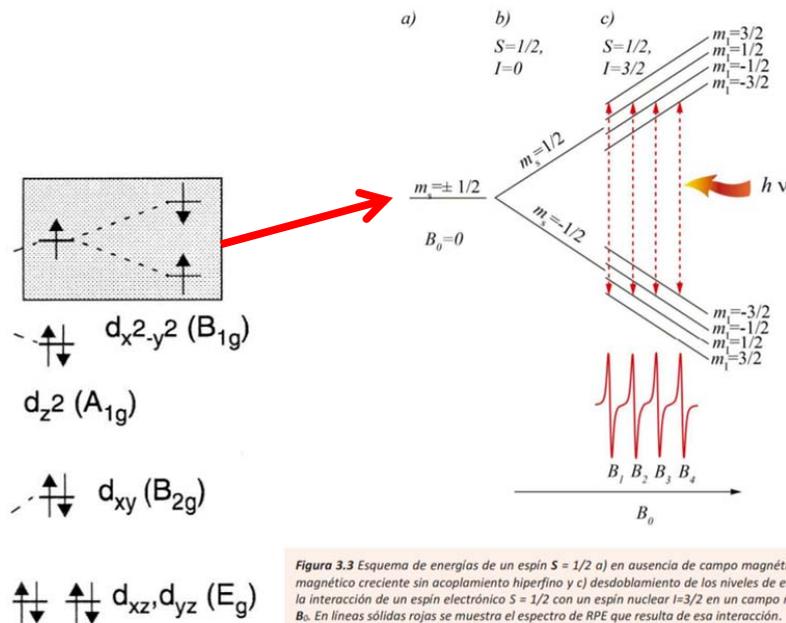


Figura 3.3 Esquema de energías de un espín $S = 1/2$ a) en ausencia de campo magnético, b) en un campo magnético creciente sin acoplamiento hiperfino y c) desdoblamiento de los niveles de energía que surge de la interacción de un espín electrónico $S = 1/2$ con un espín nuclear $I = 3/2$ en un campo magnético creciente B_0 . En líneas sólidas rojas se muestra el espectro de RPE que resulta de esa interacción.

El campo magnético B_0 aplicado separa (en escala de Energía) las orientaciones posibles del espín del e^- (que está en el orbital $d_{x^2-y^2}$) en dos niveles que corresponden a las proyecciones de espín $m_s = +1/2$ y $-1/2$, separados en energía por un valor ΔE . Una transición **dipolar magnética** entre esos dos estados de espín se produce cuando la energía de la microonda ($h\nu$) iguala ese ΔE , y es entonces absorbida.

Cuando el espín electrónico de un ion interactúa con los espines nucleares de N ligandos equivalentes se produce el desdoblamiento de cada línea de la estructura hiperfina en $(2NI+1)$ líneas ($I =$ espín nuclear de cada uno de los núcleos que interactúan con el e^-). En el caso del Cu ($I = 3/2$) cada línea del espectro se desdoblará en 4.