

3. Técnicas Experimentais

3.1

Espectroscopia por absorção óptica

A absorção de radiação eletromagnética por átomos, moléculas e materiais em geral é uma propriedade que ajuda a caracterizá-los. Trataremos aqui de absorção na faixa do ultravioleta e visível, isto é, absorção de luz com comprimento de onda (λ) que varia de 180 a 800 nm. Esta é uma técnica muito utilizada em bioquímica e biofísica, seja para simples determinações de concentração, seja para investigação de mudanças estruturais mais complexas (Neubacher, 1982; Cantor 1980).

Ondas eletromagnéticas são caracterizadas por comprimento de onda (λ) e frequência (ν), relacionadas com a velocidade da luz por: $\lambda \nu = c$.

A energia do fóton da radiação incidente é dada por

$$E = h\nu = hc / \lambda , \text{ onde } h \text{ é a constante de Planck.}$$

A Espectroscopia por absorção óptica dá-se quando ocorrem transições entre níveis eletrônicos de uma molécula por mudança da energia quando esta é atingida por fótons. Para ocorrerem tais transições a energia do fóton $h\nu$ deve corresponder à diferença de energia entre dois estados eletrônicos da molécula, que é da ordem de 1 eV. Cada estado eletrônico é composto por um grande número de estados vibracionais, separados por energias da ordem de 0,1 eV. Por sua vez, os estados vibracionais são separados em estados rotacionais, espaçados por aproximadamente 0,01 eV (Fig. 3.1).

O espectro de absorção eletrônica é caracterizado pela intensidade de luz absorvida, densidade óptica ou absorbância, e também pela posição de banda, energia.

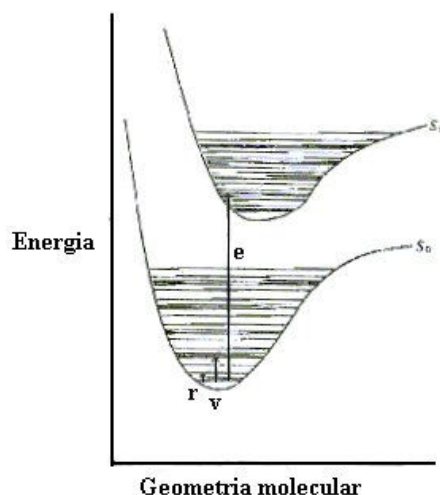


Figura 3.1

Níveis de energia para uma molécula pequena. São indicadas transições eletrônicas (e), vibracionais (v) e rotacionais (r). (Cantor e Schimmel, 1980).

A diferença de energia entre estados eletrônicos encontra-se na faixa de energia dos fótons da radiação ultravioleta e visível. Desta forma a espectroscopia de absorção óptica nessa faixa é às vezes denominada absorção eletrônica. Em moléculas biológicas (moléculas de muitos átomos), cada estado eletrônico é desdobrado em um grande número de estados vibracionais, que se separam em estados rotacionais. Em conseqüência, os picos dos espectros de absorção podem ser bastante largos. As moléculas biológicas podem ser identificadas através de seu espectro de absorção.

3.1.1

Lei de Beer-Lambert

A equação que relaciona a quantidade de luz absorvida com a espessura e concentração de uma amostra diluída é descrita pela lei empírica de Beer-Lambert:

$$\log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \ell [X] \quad (3.1)$$

onde I_0 é a intensidade incidente e I é a intensidade transmitida, que decai exponencialmente na passagem pela amostra de comprimento ℓ (caminho óptico), $[X]$ é a concentração molar das espécies que absorvem radiação e ε é o coeficiente

de absorção molar, que depende do comprimento de onda. A absorbância, A , é definida como $\log(I_0/I)$, tendo-se então:

$$A = \varepsilon [X] \ell \quad (3.2)$$

Absorbância é, portanto, uma grandeza adimensional e é usada em medidas de absorção óptica por ser proporcional à concentração, na faixa de validade da Lei de Bier-Lambert, isto é, para concentrações baixas. Os espectros de absorção são gerados pela medida da atenuação que um feixe de radiação eletromagnética sofre ao atravessar a amostra de um material em função de sua frequência ou do comprimento de onda.

A aplicação de técnicas espectroscópicas, em geral, e a análise dos espectros de absorção óptica, em particular, têm muito a informar sobre modificações na estrutura e interação das moléculas (da Silva, 1999).

3.1.2

Tipos de transições eletrônicas

Numa transição eletrônica, uma molécula absorve um quantum de energia e um elétron é excitado do orbital que ocupa no estado fundamental para outro de maior energia. São os orbitais do estado fundamental e excitado que caracterizam o tipo de transição eletrônica observada .

Os orbitais moleculares geralmente encontrados no estado fundamental de moléculas orgânicas são os seguintes.

orbitais σ - constituem as ligações simples, os elétrons não são deslocalizados. A densidade eletrônica assume uma simetria cilíndrica em torno da ligação química.

orbitais π - são encontrados nas ligações múltiplas. Os elétrons estão deslocalizados e interagem facilmente com a vizinhança.

orbitais n - são os orbitais ocupados pelos pares livres dos heteroátomos, como o oxigênio e nitrogênio. Não estão envolvidos nas ligações químicas e retêm as características de orbital atômico.

Nos estados excitados das moléculas, dois tipos de orbitais são importantes.

orbitais σ^* - são antiligantes. Embora tenham simetria cilíndrica, possuem um plano nodal entre os átomos.

orbitais π^* - também são deslocalizados, como no estado fundamental, mas têm um plano nodal ao longo do eixo da ligação, são antiligantes.

O ordenamento dos orbitais em termos de energias relativas, e as transições possíveis estão apresentadas na Fig. 3.2. Efeitos de solvente podem alterar significativamente esses níveis de energia.

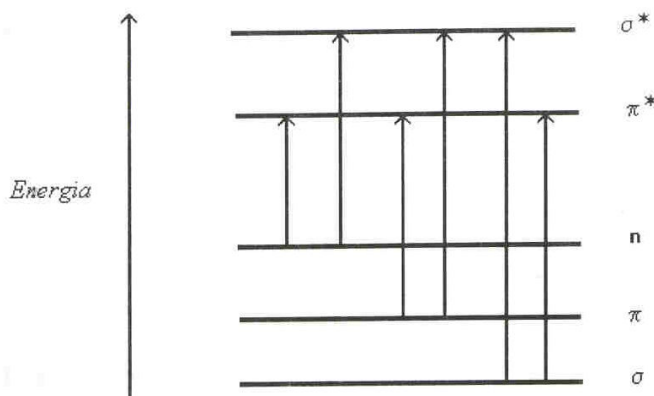


Figura 3.2

Diagrama esquemático de níveis de energia mostrando as energias relativas e as transições possíveis. Reproduzida em (Neubacher & Lohman, 1982).

Analisando a Fig. 3.2, vê-se que as duas transições eletrônicas de mais baixa energia resultam da promoção de um elétron do orbital n para o orbital π^* , chamada transição $n \rightarrow \pi^*$ e da promoção de um elétron do orbital π para o orbital π^* chamada transição $\pi \rightarrow \pi^*$. As transições $\pi \rightarrow \pi^*$ podem ser observados aparecendo na faixa do espectro com $\lambda > 200$ nm até o infravermelho próximo. Se não forem proibidas por regras de seleção de spin ou simetria, as transições $\pi \rightarrow \pi^*$ tem altos coeficientes de extinção molar, $E_{\text{máx.}} = 10^4\text{-}10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e as transições $n \rightarrow \pi^*$ tem coeficientes de absorção molar menores, cerca de $10^2 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ aparecendo como ombro na faixa de comprimentos de onda maiores dos espectros de absorção. Para medidas em solução, as transições $\pi \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \sigma^*$ e $\sigma \rightarrow \pi^*$ são geralmente escondidas pela absorção do solvente ($\lambda < 190$ nm). As energias requeridas para as transições $\sigma \rightarrow \sigma^*$ são muito altas, essas transições aparecem na região de UV no vácuo, (Neubacher, 1982; Cantor, 1980; Dörr, 1982).

3.1.3

Efeitos do solvente

Os espectros de absorção são sensíveis ao solvente utilizado. Essa sensibilidade pode ser manifestada por mudanças na intensidade, na largura das bandas ou no comprimento de onda de absorção. Aqui trataremos somente do efeito no comprimento de onda.

A mudança de um solvente polar para um solvente apolar tem grande efeito sobre as diferenças entre os estados eletrônicos levando a uma mudança nos comprimentos de onda de absorção. Geralmente, a mudança de um solvente apolar para um solvente polar leva à diminuição de separação entre os níveis π e π^* causando assim, um deslocamento para o vermelho do comprimento de onda de uma transição $\pi \rightarrow \pi^*$. Para explicar este efeito, pode-se levar em conta somente o efeito da polarizabilidade do solvente. Como os orbitais π são ligantes, um elétron neste orbital estará provavelmente localizado entre os núcleos dos átomos envolvidos na ligação, por isso tende a ser menos afetado pelo solvente que os orbitais π^* , que são mais expandidos. As transições $n \rightarrow \pi^*$ devem sofrer um deslocamento para o azul, já que um elétron no orbital n interage mais fortemente com o solvente do que um elétron no orbital π^* , aumentando a diferença de energia entre os orbitais n e π^* (Borges, 1994).

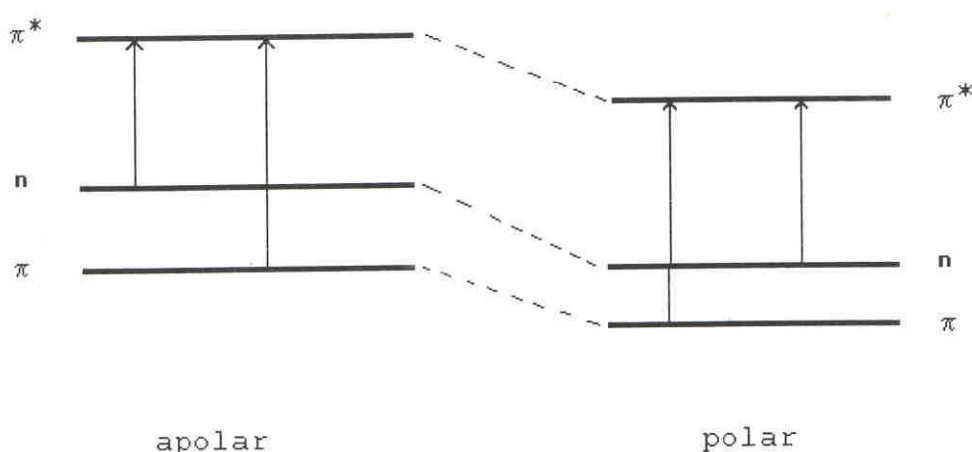


Figura 3.3

Efeitos típicos da polaridade do solvente nas energias de transição [para as transições $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$ (Cantor & Schimmel, 1980).

3.1.4

Descrição do equipamento

A espectrofotometria é uma técnica que consiste em obter dados de absorção óptica de uma amostra diluída por meio do feixe de luz que incide com o comprimento de onda variando do infravermelho até o ultravioleta .

Apresentamos abaixo (Fig. 3.4) uma breve descrição do espectrofotômetro com detecção por arranjo de diodos, utilizado por nós, para a obtenção dos espectros de absorção eletrônica. O espectrofotômetro é composto de um sistema óptico e da eletrônica acoplada ao computador por meio de uma placa GPIB para controle e aquisição de dados.

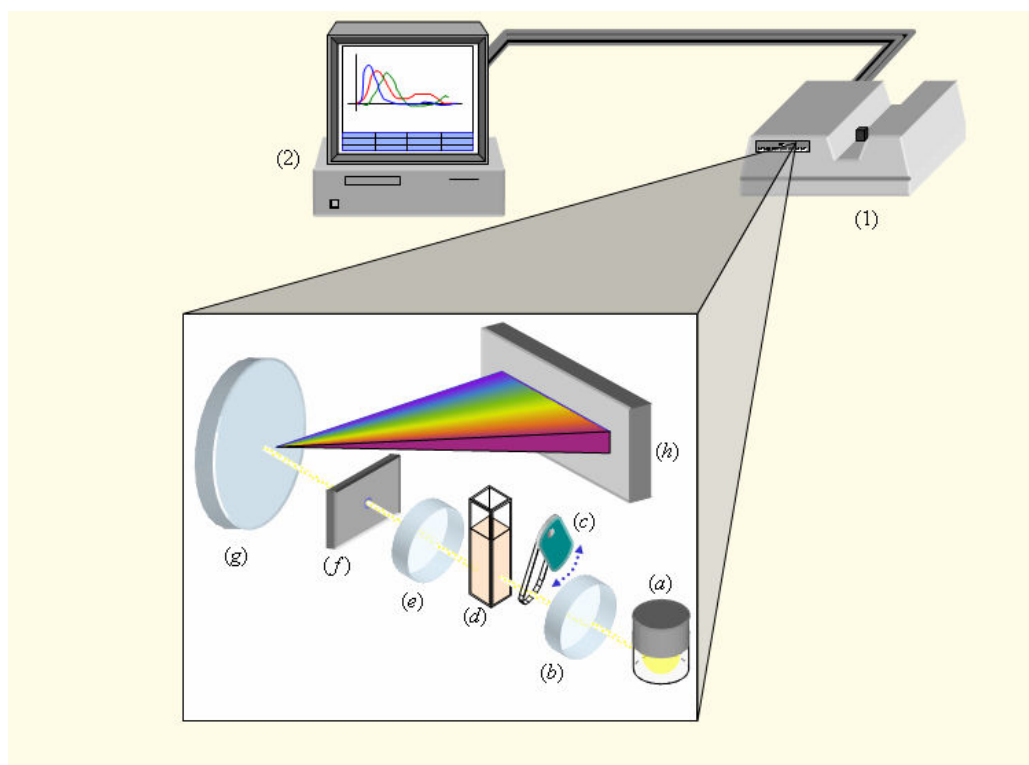


Figura 3.4

Esquema ilustrativo do funcionamento do espectrofotômetro HP 8452A diode array com detecção por arranjo de diodos (1), conectado a um computador (2). Esquema do espectrofotômetro: (a) lâmpada de deutério/tungstênio; (b) lente da fonte; (c) obturador; (d) amostra; (e) lente espectrográfica; (f) fenda; (g) rede de difração; (h) arranjo de diodos detectores (da Silva, 1999).

O espectrofotômetro HP 8452A com detecção por arranjo de diodos e detalhe do sistema óptico. Um feixe de luz com uma gama contínua de comprimentos de onda que vai de 190 nm a 820 nm emerge da lâmpada de deutério/tungstênio (a). Esta luz emitida é colimada num único feixe pela lente (b). O obturador (c) controla a passagem do feixe de luz para medições. O feixe atravessa a amostra (d). Depois, a lente espectrográfica (e) refocaliza a luz que atravessou a amostra e a fenda (f) limita o tamanho do feixe para o tamanho de uma unidade dos fotodiodos receptores. A (g) rede de difração, agindo tal como um prisma direciona o feixe, dispersando-o, sobre o (h) arranjo de diodos detectores. A parte eletrônica do sistema digitaliza os dados e os envia para o computador.

3.2

Ressonância paramagnética eletrônica (EPR): princípios básicos

Há vários textos descrevendo os princípios básicos da técnica, entre eles destacamos (Bolton et al., 1972; Weil et al., 1994). Baffa (1984) e Tominaga (1993) apresentam os princípios da técnica de forma resumida. Consultamos especialmente os textos de Bolton et al, 1972 e a tese de mestrado (Tominaga, 1993, p.8-16) para elaborar o resumo desses princípios descritos abaixo.

O campo de radiação consiste de campos elétricos e magnéticos oscilando perpendiculares um ao outro. Na maioria das formas de espectroscopia é a componente do campo elétrico que interage com os elétrons causando mudança na energia. Como visto anteriormente, o espectro obtido pela técnica espectroscópica de absorção óptica, por exemplo, resulta de transições eletrônicas do estado fundamental para estados excitados. Em EPR a frequência da radiação está compreendida na faixa de 10^9 - 10^{11} s⁻¹ ou 1-100 GHz e é o campo magnético da radiação que vai atuar sobre os dipolos magnéticos.

A energia necessária para haver transição entre estados de energia de uma molécula é absorvida na forma de fóton (energia $h\nu$, onde h é a constante de Planck e ν é a frequência do fóton). Para ocorrer absorção duas condições devem ser satisfeitas:

1. A energia do fóton, $h\nu$, deve corresponder à diferença de energia, ΔE , entre dois estados eletrônicos da molécula. Esta condição é conhecida como condição de ressonância.

2. A componente elétrica (ou magnética) da radiação eletromagnética deve ser capaz de estimular dipolos elétricos (ou magnéticos) em uma molécula. Se isso acontece podemos dizer que a transição é permitida.

Dipolos magnéticos são usualmente caracterizados pela grandeza conhecida como momento de dipolo magnético, $\vec{\mu}$, definido em termos de sua interação com um campo magnético externo conhecido. Efetivamente, podemos entender que $\vec{\mu}$ mede a intensidade do dipolo magnético. O momento de dipolo magnético é uma grandeza vetorial.

Os momentos magnéticos $\vec{\mu}$ tendem a se orientar em campos magnéticos \vec{B} que venham a ser aplicados externamente. A energia de interação entre $\vec{\mu}$ e \vec{B} é dada por:

$$\begin{aligned} U &= -\vec{\mu} \cdot \vec{B} \\ U &= -\mu \cdot B \cos \theta \\ U &= -\mu_z \cdot B \end{aligned} \quad (3.3)$$

onde μ é a intensidade de $\vec{\mu}$, μ_z é a projeção de $\vec{\mu}$ ao longo do eixo z, ou seja, da direção do campo magnético externo. O argumento θ representa o ângulo entre $\vec{\mu}$ e \vec{B} .

Da equação (3.3) podemos dizer que há um mínimo de energia quando $\theta = 0$ ou seja quando o dipolo é paralelo à direção de \vec{B} , ($U = -\mu B$), e o máximo ocorre quando $\theta = \pi$ ou na orientação antiparalela ($U = \mu B$).

Todos os elétrons possuem um spin intrínseco, caracterizado pelo momento angular de spin \vec{P} . \vec{P} e $\vec{\mu}$ são sempre proporcionais.

$$\vec{\mu} = \gamma \cdot \vec{P} \quad (3.4)$$

Onde γ é chamado fator giromagnético.

Supondo que a componente P_z do momento angular de spin está associada a relações de quantização.

$$\begin{aligned} P_z &= M_s \left(\frac{h}{2\pi} \right) \\ P_z &= M_s \cdot \hbar \end{aligned} \quad (3.5)$$

Os valores possíveis de M_s diferem de uma unidade e variam de $-s$ até $+s$. Se s tem um valor único, $s=1/2$. Então M_s assume os valores $\pm 1/2$, chamado de número quântico de spin.

Se \hat{H} é o operador Hamiltoniano para a energia do sistema e E_i é o auto valor de energia correspondente a auto função Ψ_i

$$\hat{H} \Psi_i = E_i \Psi_i \quad (3.6)$$

O Operador de spin para a componente z é definido por \hat{S}_z e as duas possíveis auto funções são $|\alpha\rangle$ e $|\beta\rangle$ ou seja:

$$\hat{S}_z |\alpha\rangle = +\frac{1}{2} |\alpha\rangle \quad (3.7)$$

$$\hat{S}_z |\beta\rangle = -\frac{1}{2} |\beta\rangle \quad (3.8)$$

Os auto valores de \hat{S}_z desta forma são $M_s = \pm 1/2$, podemos então reescrever a equação (3.4)

$$\hat{\mu} = \gamma \hat{S} \hbar \quad (3.9)$$

$$\text{para o elétron } \gamma = -\frac{g e}{2 m c} \quad (3.10)$$

Na equação (3.9)

$$\bar{\mu} = -\frac{g e}{2 m c} \hat{S} = -g \beta \hat{S}$$

$$\text{onde } \beta = \frac{e \hbar}{2 m c} \quad (3.11)$$

De acordo com a equação (3.3), podemos então reescrever o operador Hamiltoniano

$$\hat{H} = -\hat{m}_z B = g \beta \hat{S}_z B \quad (3.12)$$

Se $|\alpha\rangle$ e $|\beta\rangle$ são também auto funções da Hamiltoniana

$$\begin{aligned} \hat{H} |\alpha\rangle &= g \beta B \hat{S}_z |\alpha\rangle = +\frac{1}{2} g \beta B |\alpha\rangle \\ \hat{H} |\beta\rangle &= g \beta B \hat{S}_z |\beta\rangle = -\frac{1}{2} g \beta B |\beta\rangle \end{aligned} \quad (3.13)$$

ou

$$E = \pm \frac{1}{2} g \beta B \quad (3.14)$$

Aqui é então conveniente citar que somente espécies contendo elétrons desemparelhados irão exibir um espectro de EPR. Além disso a quantização do momento angular de spin leva a somente dois valores possíveis para μ_z (projeção do vetor dipolo magnético sobre o eixo de quantização z). Dessa forma os elétrons poderão ocupar um determinado orbital aos pares e só podem se acomodar se seus momentos magnéticos de spin forem opostos obedecendo ao princípio de exclusão de Pauli. Deste modo usamos o termo “elétrons emparelhados”. Pelo cancelamento do momento magnético eletrônico em um par de elétrons, somente moléculas contendo “elétrons desemparelhados” podem ter momento magnético total não nulo, que poderão ser detectados por EPR.

Como vimos, da condição de ressonância se a amostra é irradiada com radiação eletromagnética, haverá um certo campo magnético B_r , no qual a absorção irá ocorrer. Aplicando então a primeira condição para a absorção, em um certo B_r , a energia do fóton $h\nu$ deve ser igualada à separação do nível energético eletrônico deste modo a condição de ressonância torna-se :

$$h\nu = g \beta B_r \quad (3.15)$$

Então esta energia faz com que o momento magnético sofra uma transição de uma posição paralela ao campo magnético B_r , para uma posição antiparalela a este. A energia ΔE normalmente é fornecida através da exposição do sistema a um campo de microondas de frequência fixa perpendicular ao campo B_r , sendo B_r adiabaticamente variado até que ocorra a transição. Quando ocorre a transição o sistema absorve energia do campo de microondas e esta absorção, ou usualmente sua derivada, pode ser detectada por um sistema eletrônico apropriado que faz parte dos espectrômetros de EPR. A Fig. 3.5, abaixo, sintetiza estas informações .

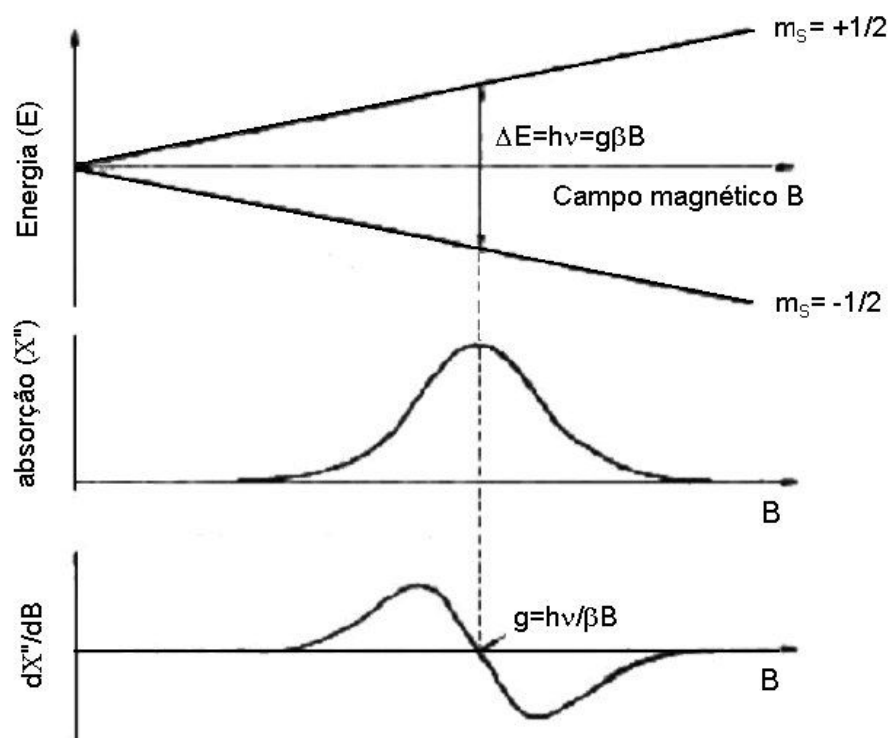


Figura 3.5

Desdobramento dos níveis de energia do spin eletrônico na presença de um campo magnético B , a forma da linha de absorção de energia do campo de microonda e sua derivada (Baffa, 1984, p. 20).

Nem todas as situações possuem esse nível de simplicidade. Normalmente o spin resultante é diferente de $1/2$, está cercado por cargas elétricas e momentos magnéticos dos núcleos. À interação do spin com o campo magnético externo deve também ser acrescentada, além de outras, a interação com núcleos vizinhos, o que origina a interação magnética hiperfina.

3.2.1

O fator g

O fator g na Eq. 3.15 é uma constante universal e característica do elétron ($g_e = 2.0023$), considerando que B_r é o campo magnético sobre o elétron.

A aplicação de um campo magnético externo, no entanto, pode gerar um campo magnético interno na amostra que irá ser subtraído ou adicionado ao

campo externo. Por conveniência, B_r na Eq. 3.15 será definido como o campo magnético externo de ressonância e o fator g efetivo será:

$$g = \frac{h\nu}{\beta B_r} \quad (3.16)$$

O fator g , deste modo, desloca-se em relação ao do elétron livre de acordo com as interações com a vizinhança e pode refletir as características da molécula na qual elétrons desemparelhados estão presentes. A medida do fator g para um sinal desconhecido pode ser valiosa para auxiliar na identificação da origem deste sinal. A tabela abaixo apresenta exemplos de algumas espécies de interesse biológico.

Tabela 3.1 Fatores g para algumas entidades representativas de interesse biológico (Bolton, 1972, p. 24).

Entity	Range of g
Magnesium and other porphyrin cations (e.g., the chlorophyll cation)	2.0024–2.0028
Flavosemiquinones (e.g., the lumiflavin semiquinone)	2.0030–2.0040
Benzosemiquinones (e.g., the plastosemiquinone)	2.0040–2.0050
Nitroxides (e.g., di- <i>t</i> -butyl nitroxide)	2.0050–2.0060
Peroxyl radicals	2.01–2.02
Sulfur-containing radicals	2.02–2.06
Cu ²⁺ complexes	2.0–2.4
Fe ³⁺ (low-spin) complexes	1.4–3.1
Fe ³⁺ (high-spin) complexes	2.0–9.7

A principal origem dos campos magnéticos locais, que causam um desvio de g em relação a g_e , é o momento magnético orbital, introduzido por uma mistura de estados excitados no estado fundamental.

Para a maioria das moléculas, a mistura de estados excitados é não-isotrópica (ou anisotrópica, que depende da orientação), ou seja, desvios do fator g em relação a g_e dependem da orientação da molécula em relação ao campo magnético externo. A anisotropia do fator g é geralmente reduzida à forma de tensor de segunda ordem. Se o tensor é simétrico (ou seja $g_{xy} = g_{yx}$ etc...), este deve conter seis elementos independentes. Porém, muitas vezes existe um sistema

de eixos principais X,Y,Z no qual o tensor g contém somente elementos diagonais.

$$g_{diagonal} = \begin{pmatrix} g_{XX} & 0 & 0 \\ 0 & g_{YY} & 0 \\ 0 & 0 & g_{ZZ} \end{pmatrix} \quad (3.17)$$

Os elementos de $g_{diagonal}$ são conhecidos como valores principais do tensor g . Se X,Y,Z são equivalentes como em um octaedro, tetraedro ou simplesmente em um cubo, então $g_{XX} = g_{YY} = g_{ZZ}$.

Se o sistema tem simetria axial ($g_{XX} = g_{YY} \neq g_{ZZ}$) é comum designar os fatores g como $g_{//}$, paralelo ao eixo de simetria, e g_{\perp} , para o fator g perpendicular ao eixo de simetria ($g_{//} = g_{ZZ}$ e $g_{\perp} = g_{YY} = g_{XX}$).

Na maioria das situações biológicas, em que as entidades paramagnéticas são orientadas aleatoriamente, o espectro observado representará a média de todos os valores possíveis de B_r (solução pouco viscosa, movimento rápido) ou a superposição de todos os valores possíveis de B_r , correspondentes a todas as orientações possíveis (espectro de pó ou de solução congelada).

3.2.2

O desdobramento hiperfino

O desdobramento hiperfino origina-se da interação do momento magnético eletrônico com o momento magnético dos núcleos vizinhos. Para íons dos metais de transição, o desdobramento hiperfino dominante vem do núcleo do íon paramagnético. A estrutura superhiperfina surge da interação com núcleos dos ligantes, sendo o mais comum o nitrogênio. Em geral, esses desdobramentos são menores.

O número de linhas hiperfinas de um dado núcleo depende de seu spin nuclear I , que pode assumir valores inteiros e semi-inteiros. A componente do spin nuclear no eixo de coordenadas z é quantizado e caracterizado pelo número quântico m_I . Desta maneira se o spin nuclear é I , existem $(2I+1)$ estados nucleares de spin possíveis. Para uma espécie com $I = 1$, por exemplo o nitrogênio, cada spin nuclear é quantizado e tem três orientações possíveis igualmente prováveis correspondentes às projeções do spin $I_z = -1, 0, +1$. Cada núcleo dá origem a três

linhas como indica a Fig. 3.6. Nesta figura o desdobramento hiperfino nos níveis de energia será dado por $(\frac{1}{2}) A$, onde A é a constante de desdobramento hiperfino, pois a energia de interação hiperfina é dada por $A \cdot I_z \cdot S_z$. Então, quando se tem a contribuição da interação hiperfina, a Eq. 3.15 torna-se

$$h\nu = g \beta H \pm \frac{1}{2} A m_I \quad (3.18)$$

onde m_I são os possíveis valores de I_z . A constante hiperfina A será dada em unidades de energia (cm^{-1}) ou em unidades de campo magnético $A/(g\beta)$ (Gauss).

As linhas hiperfinas podem ser utilizadas para identificar o núcleo que deu origem ao desdobramento hiperfino do espectro de EPR.

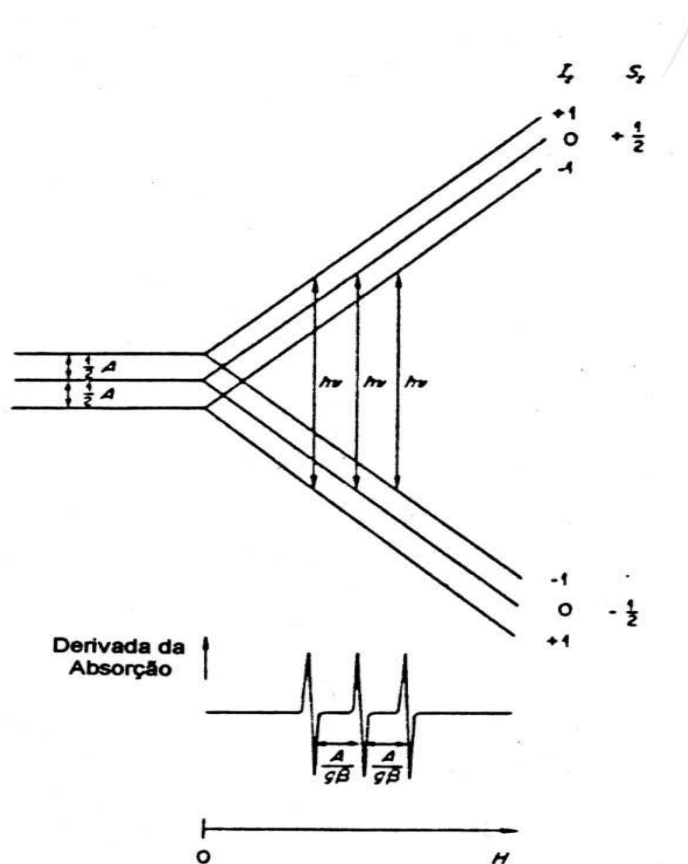


Figura 3.6

Desdobramento hiperfino para spin nuclear $I=1$ (Tominaga, 1993, p. 13).

As múltiplas linhas de um único núcleo ou múltiplas linhas de diversos núcleos equivalentes podem ser diferenciadas. Estas últimas, embora igualmente

espaçadas, possuem intensidades diferentes enquanto um único núcleo, com maior momento nuclear, dá origem a linhas de intensidades iguais.

3.2.3

Espectros de amostras em solução e espectros de pó

As moléculas em solução diluída e não viscosa possuem um movimento rápido e randômico, por isso, todos os efeitos da anisotropia de spin são anulados, isto é, os espectros de amostras em solução são independentes da orientação magnética. Conseqüentemente os valores de g e da constante hiperfina serão uma média dos valores principais dos tensores g e hiperfino, respectivamente (g_{XX} , g_{YY} , g_{ZZ} e A_{XX} , A_{YY} , A_{ZZ}). Esses valores são conhecidos como g isotrópico (g_0) e constante hiperfina isotrópica (A_0) e são dados por:

$$g_0 = \frac{1}{3}(g_{XX} + g_{YY} + g_{ZZ}) \quad (3.19)$$

$$A_0 = \frac{1}{3}(A_{XX} + A_{YY} + A_{ZZ})$$

Em caso de simetria axial, a expressão se simplifica:

$$g_0 = \frac{1}{3}(g_{//} + 2g_{\perp}) \quad (3.20)$$

pois, $g_{ZZ} = g_{//}$ e $g_{XX} = g_{YY} = g_{\perp}$; analogamente,

$$A_0 = \frac{1}{3}(A_{//} + 2A_{\perp}) \quad (3.21)$$

Geralmente estes espectros isotrópicos possuem linhas finas.

Quando se abaixa a temperatura as moléculas já não possuem mais movimentos rápidos nem randômicos, por isso os espectros registrados terão a contribuição de todas as possíveis orientações. Como os valores de g e os desdobramentos hiperfinos dependem da direção do campo magnético em relação aos eixos moleculares, um espectro com muito mais informações será obtido. Ao invés de linhas finas encontradas nos espectros isotrópicos, teremos agora espectros com linhas mais largas e formas de linhas distorcidas.

A princípio, todos os valores principais de A e g poderiam ser determinados nestes espectros. Entretanto, devido à superposição dos espectros devido às várias orientações, nem sempre isso é possível.

Para centros paramagnéticos com simetria axial, por exemplo, quando $g_{//}$ e g_{\perp} diferem significativamente, os valores individuais podem ser obtidos. Este fato é ilustrado para o sistema com $g_{//} > g_{\perp}$, na Fig. 3.7.

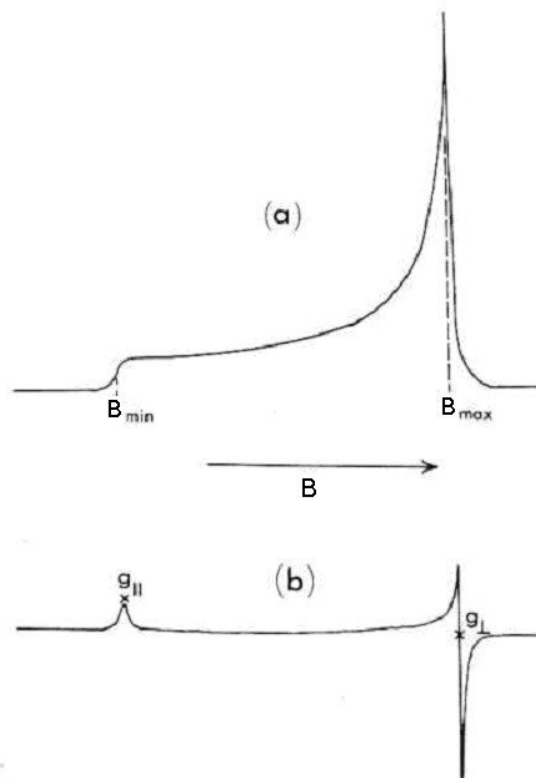


Figura 3.7

Espectro idealizado de EPR para um sistema casualmente orientado exibindo g anisotrópico característico de um sistema com simetria axial, desta maneira $g_{//} > g_{\perp}$.

(a) Espectro de absorção. Uma intensidade significativa de ressonância é possível somente entre B_{min} e $B_{máx}$. (b) primeira derivada do espectro de EPR. Os pontos marcam onde ocorrem $g_{//}$ e g_{\perp} (Bolton, 1972, p. 26).

Como observamos, a ressonância pode ocorrer somente numa faixa de campo entre $g_{//}$ e g_{\perp} . O campo mínimo no qual a ressonância irá ocorrer é dado

$$\text{por } B_{min} = \frac{h\nu}{g_{//} \beta} . \quad (3.22)$$

Abaixo de B_{min} não há ressonância. Essa começará a ocorrer em $B = B_{min}$ e somente moléculas com eixo de simetria (Z) praticamente paralelo a B irão contribuir para o sinal. O campo máximo no qual ocorrerá ressonância é

$B_{m\acute{a}x} = \frac{h\nu}{g_{\perp} \beta}$. À medida que B aproxima-se de $B_{m\acute{a}x}$, o sinal alcança seu valor

máximo. A razão para isso é que muito mais moléculas terão seus eixos de simetria praticamente em um plano perpendicular à B do que moléculas com eixos de simetria paralelos a B (Bolton et al., 1972).

A Fig. 3.8 mostra um espectro de amostra congelada de uma proteína de cobre com simetria axial. Nessa figura, a distância entre os picos em campo baixo corresponde ao desdobramento hiperfino $A_{//}$. O valor de $g_{//}$ é encontrado medindo-se o centro de gravidade da linha espectral de campo alto. Não se consegue determinar o valor de A_{\perp} através do espectro, pois ele deve ter um valor muito pequeno para ser resolvido (Tominaga, 1993).

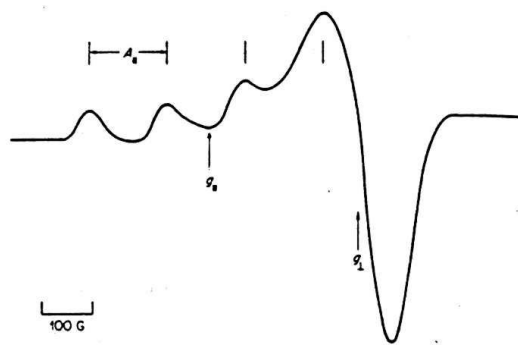


Figura 3.8

Espectro de pó de uma proteína de cobre típica a -150°C (Tominaga, 1993, p.16).

3.2.4

Instrumentação básica em EPR

Para entender o funcionamento básico do sistema de EPR, iniciamos com as informações disponibilizadas pela empresa Bruker, onde se apresenta um pouco de teoria e da prática em EPR com uma linguagem bem simples (www.bruker-biospin.com/brukerepr/continuouswavepractice.html). Uma descrição ainda simples, porém bem mais completa, dos aspectos técnicos de EPR é encontrada em Swartz, Bolton e Borg (1972).

EPR é uma técnica de ressonância em que se detectam transições entre níveis de elétrons desemparelhados desdobrados na presença de um campo magnético aplicado. A relação entre o campo aplicado e a frequência necessária para provocar transições é dada pela Eq. 3.15. Na instrumentação em EPR utiliza-se uma frequência fixa de microondas e faz-se uma varredura do campo magnético externo B_0 (Fig. 3.9), registrando-se a absorção de energia (na verdade, sua derivada) em função de B_0 . Um espectro de EPR é portanto o registro da derivada da absorção de energia da micro-onda em função do campo magnético.

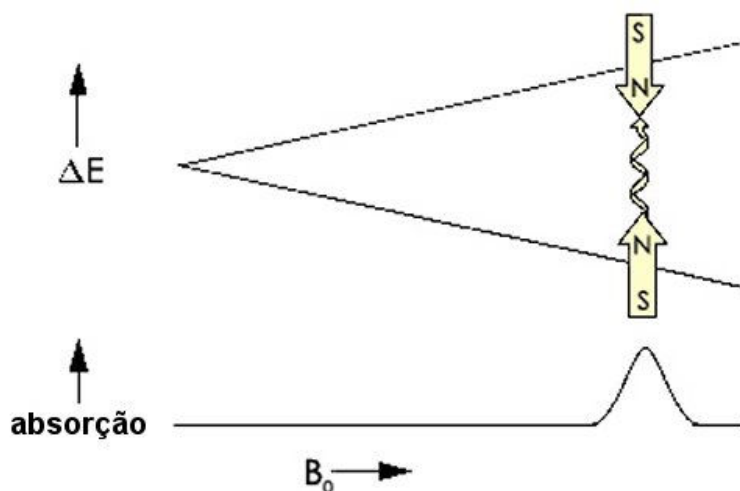


Figura 3.9

Variação dos estados de energia de spin como função de um campo magnético aplicado.

Nesta seção consideraremos alguns aspectos práticos da espectroscopia de EPR, onde teoria e prática são fortemente dependentes para o desenvolvimento e crescimento da técnica de EPR. Porém nem sempre teoria e prática estiveram intimamente associadas. O efeito Zeeman já era bem conhecido em espectroscopia óptica, muito antes da primeira detecção direta de EPR, que esperou até a segunda guerra mundial para que se desenvolvessem os componentes necessários para construir espectrômetros suficientemente sensíveis.

Introdução aos espectrômetros

Apesar da aparente complexidade dos espectrômetros de EPR, estes podem ser simplificados pelo diagrama da Fig. 3.10, como qualquer outro espectrômetro. Há três componentes essenciais: uma fonte de radiação eletromagnética, um porta-

amostra e um detector. Para obter o espectro, incidimos uma frequência da radiação eletromagnética e medimos com o detector a quantidade que passa através da amostra, de modo a observar a absorção para cada frequência (ou, no caso de EPR, para cada valor de campo magnético).

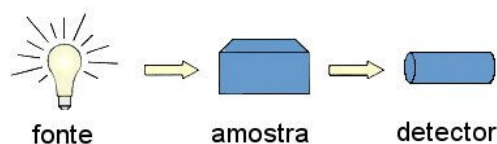


Figura 3.10
O espectrômetro mais simples.

A Fig. 3.11 mostra um esquema um pouco mais detalhado do espectrômetro de EPR Bruker. A fonte da radiação eletromagnética e o detector estão na caixa denominada ponte de microondas. A amostra localiza-se na cavidade de microondas, que é uma estrutura metálica amplificadora de sinais fracos vindos da amostra. O magneto é necessário para desdobrar os níveis eletrônicos. Existe também um console contendo o processador de sinais, os controles eletrônicos e o computador. O computador é usado para análise de dados e para controlar todas as unidades necessárias para adquirir os espectros.

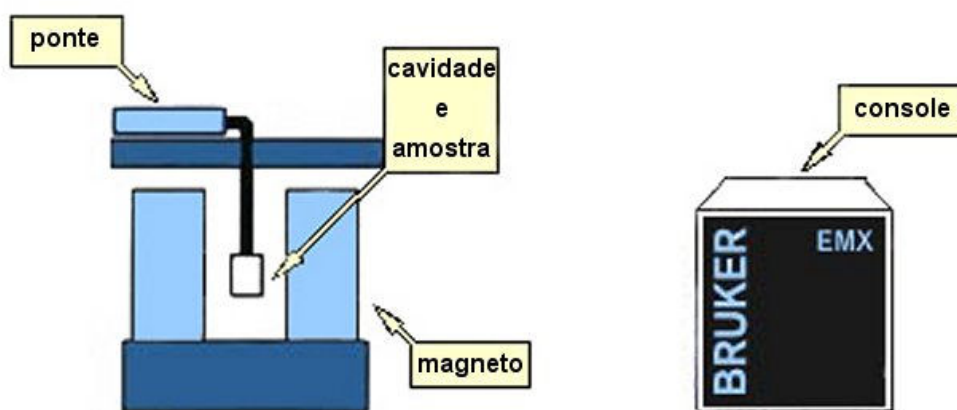


Figura 3.11
O esquema geral para o espectrômetro de EPR

A ponte de microondas

Na ponte de microondas residem a fonte de microondas e o detector. Existem mais componentes na ponte de microondas dos que os apresentados na

Fig. 3.12, como os suprimentos de energia e os componentes eletrônicos de segurança. Porém estes não são necessários para o entendimento básico de operação da ponte.

Nós devemos agora seguir o caminho das microondas desde a fonte até o detector.

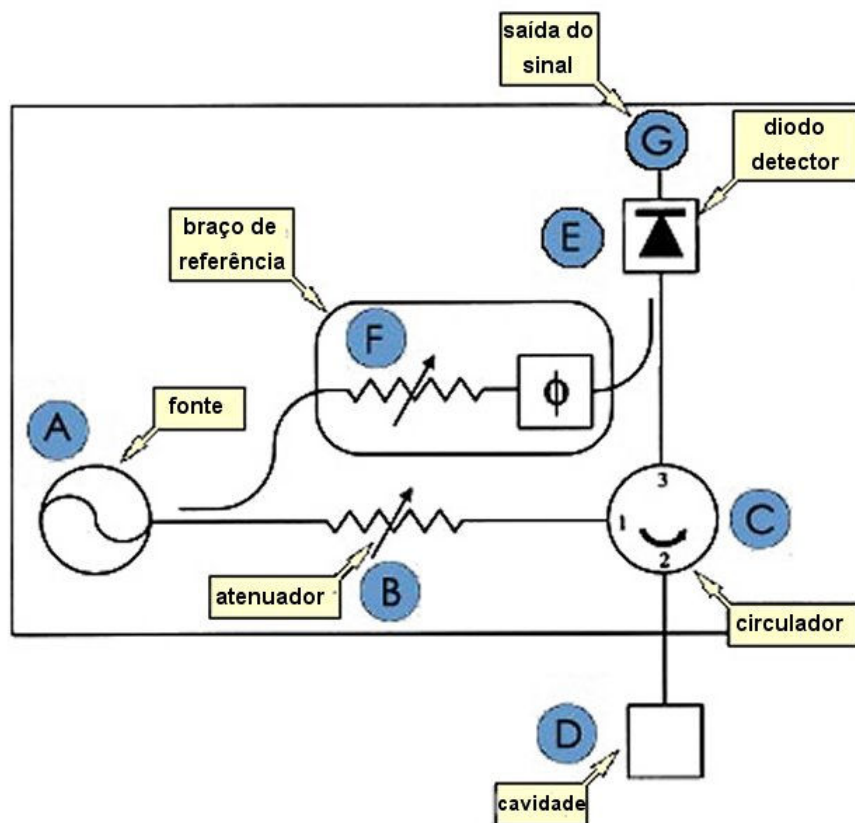


Figura 3.12
Diagrama em bloco da ponte de microondas

Nossa descrição inicia-se do ponto A, a fonte de microondas. A potência de produção desta fonte de microondas não pode ser variada facilmente, desta maneira, para que este nível de potência possa ser controlado, o próximo componente localizado no ponto B, é um atenuador variável. Este atenuador é um dispositivo que bloqueia o fluxo da radiação de microondas, permitindo controlar precisamente a potência que incidirá na amostra.

A maioria dos espectrômetros são espectrômetros de reflexão. Estes medem a quantidade de radiação refletida pela cavidade de microondas contendo a amostra (ponto D). Porém nosso interesse é detectar somente a radiação que vem

refletida da cavidade, então o circulador no ponto C funciona como um dispositivo que nos permite esta detecção.

Para converter a potência das microondas em sinal elétrico, o espectrômetro Bruker usa um diodo detector (ponto E da Fig. 3.12). Para operar com máxima sensibilidade, o detector deve ter corrente de aproximadamente 200 microampéres. Para assegurar que o detector opera neste nível, existe um braço de referência (ponto F da Fig. 3.12) que fornece ao detector alguma potência extra ou alguma polarização extra à microonda. Existe um deslocador da fase assegurando que as microondas do braço da referência estejam em fase com as refletidas, quando os dois sinais combinam-se no diodo detector.

O controlador de campo magnético

Para experiências em EPR, o controlador do campo magnético permite varrer o campo de uma maneira controlada e precisa (Fig. 3.13). Os valores do campo magnético e o sincronismo da varredura do campo magnético são controlados por um microprocessador no controlador.

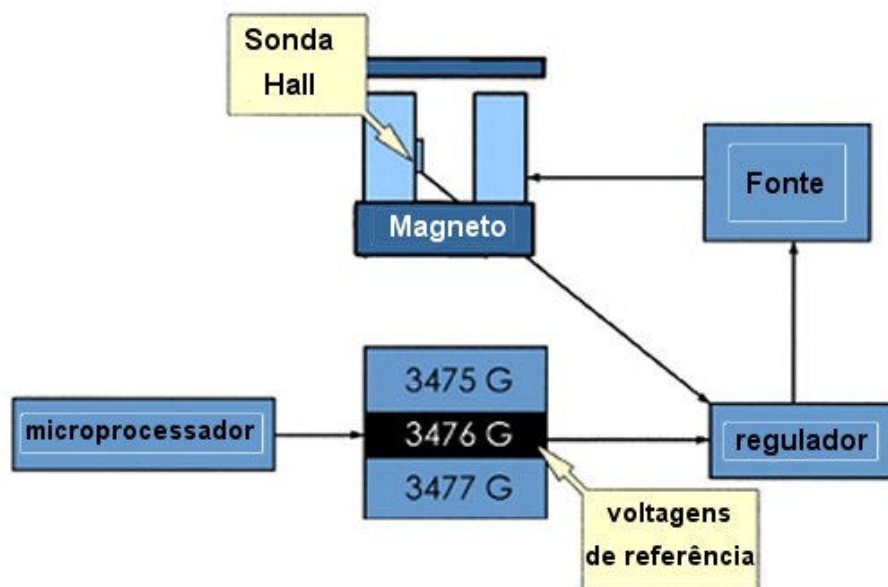


Figura 3.13

Diagrama em bloco do controlador de campo e componentes associados.

A regulação do campo magnético ocorre por meio de uma sonda Hall que é usada para medir o campo magnético. Localizada em uma abertura no ímã, produz

uma voltagem que é dependente do campo magnético perpendicular à sonda. Esta relação não é linear e a voltagem deve variar com a temperatura. No entanto, isto é facilmente compensado mantendo a sonda em uma temperatura constante ligeiramente acima da temperatura ambiente. Desta maneira o micro processador localizado no controlador pode fazer as correções apropriadas.

A regulação é realizada comparando-se a tensão da sonda com a tensão de referência aferida pelo controlador. Havendo uma diferença entre as duas tensões, uma tensão corretora é enviada para o suprimento de energia do imã mudando a intensidade de corrente através dos enrolamentos do imã e conseqüentemente o campo magnético.

A Fig. 3.14 mostra como todos os componentes trabalham juntos para produzir um espectro de EPR.

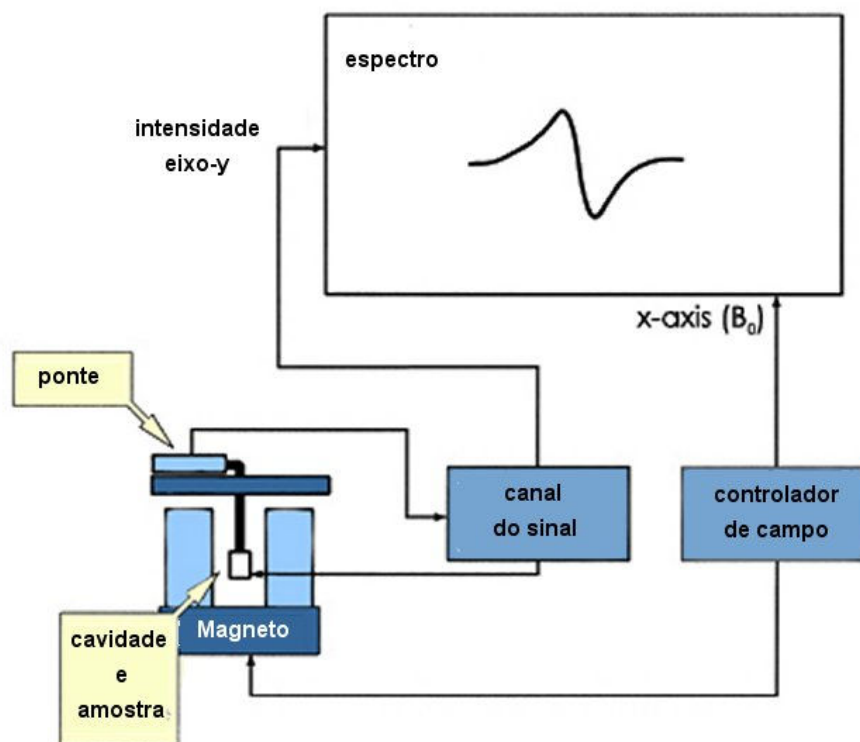


Figura 3.14

Diagrama em blocos do espectrofotômetro de EPR. <http://www.bruker-biospin.com/brukerepr/continuouswavepractice.html>