

TEMA 6: Espectroscopía de Resonancia Paramagnética Electrónica.

El espín electrónico

- Evidencia experimental

1. Líneas espectrales del átomo de H poseen estructura fina.
2. Experimento de Stern-Gerlach.
3. Desdoblamiento Zeeman (*Zeeman splitting*)

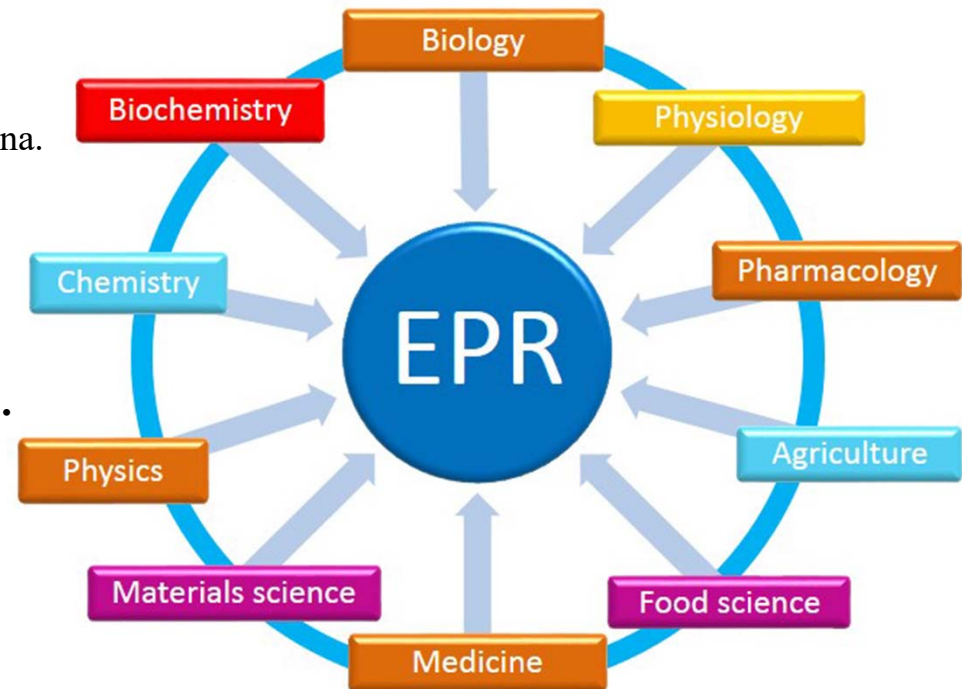
Resonancia Paramagnética Electrónica → RPE ...

en inglés ...

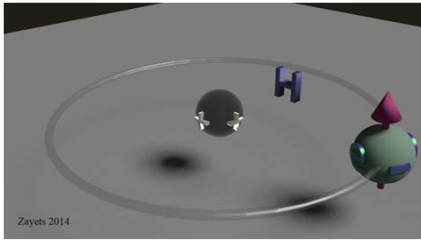
Electron Paramagnetic Resonance → EPR

...o...

Electron Spin Resonance → ESR



Técnica espectroscópica que permite obtener información sobre la estructura y dinámica de sistemas con electrones desapareados (*i.e.* sistemas paramagnéticos).



TEMA 6: Espectroscopía de Resonancia Paramagnética Electrónica.

Ejemplos de sistemas que se pueden investigar por EPR:

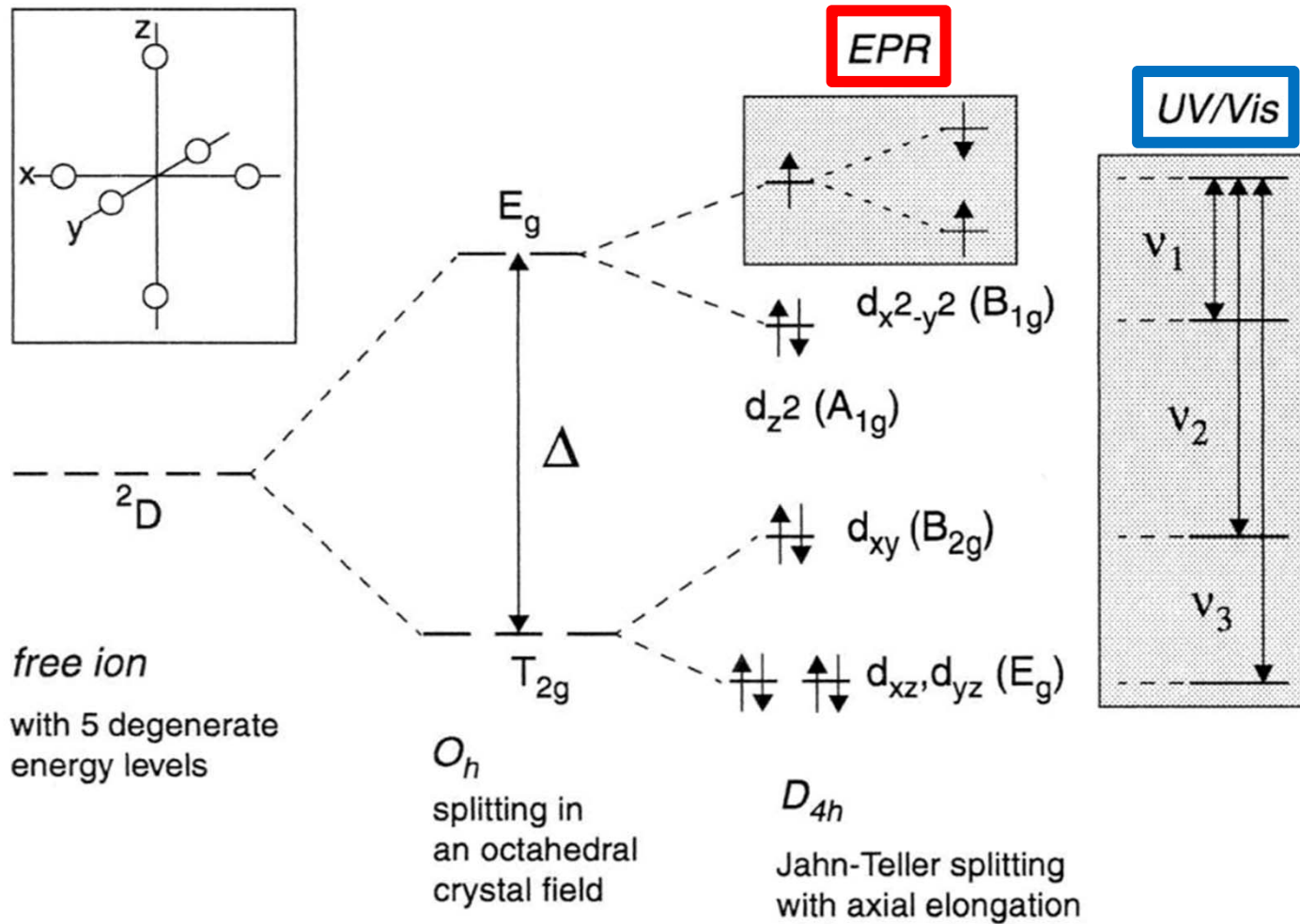
Centros paramagnéticos intrínsecos:

- 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 dano por irradiación (ADN, polímeros).
- Iones de metales de transición (Cu, Mn, V, Fe, Cr, Mo, Ti) presentes en catalizadores sintéticos y en metaloproteínas.
- Defectos en semiconductores.
- Fullerenos

Sistemas diamagnéticos con spin introducido artificialmente:

- Mn(II) reemplazando a Mg(II) en sistemas biológicos.
- Co(II) reemplazando a Zn(II).
- Sondas de spin nitroxido para estudiar:
 - 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

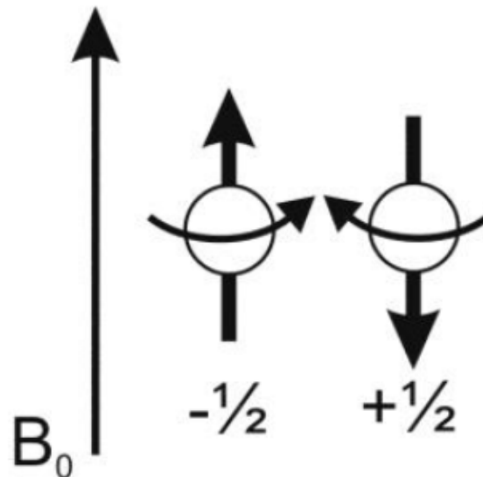
La espectroscopía de EPR es similar a cualquier otra técnica espectroscópica → depende de la absorción de radiación **electromagnética** → Una molécula o átomo tiene estados discretos (o separados) con una energía correspondiente...



Un electrón aislado, solo en el espacio sin fuerzas externas \rightarrow sin estar orbitando alrededor de un núcleo por ejemplo...todavía tiene un momento angular intrínseco llamado **espín** \rightarrow S.



Debido a que el electrón tiene carga, el movimiento angular de espín de esta partícula cargada genera un campo magnético \rightarrow En otras palabras, el electrón debido a su carga y momento angular de espín actúa como una pequeña barra de imán, o sea, un dipolo magnético \rightarrow con un momento magnético, μ .



- De manera simplificada: el electrón, al ser una partícula cargada (negativamente) que gira (espín) 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:

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

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

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

$g_e = 2.0023$, es el factor g del electrón libre

$\mu_B = 9.2740 \cdot 10^{-24} \text{ J} \cdot \text{T}^{-1}$, magnetón de Bohr.

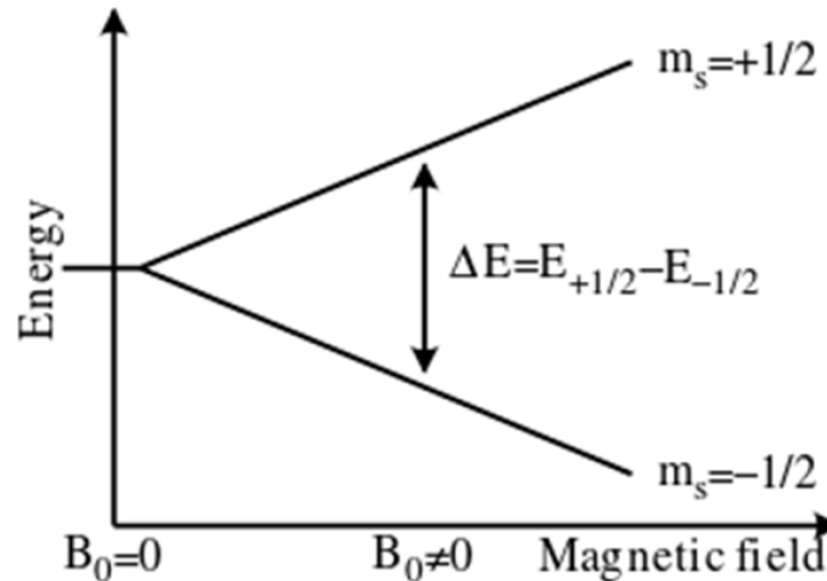
→ Notar que el signo menos en ecuación 2 indica que vector S y vector μ_s son antiparalelos!

En base a las ecuaciones 1 y 2: $E_{\text{dipolo}} = \vec{\mu}_s \cdot \vec{B} = g_e \mu_B \vec{S} \cdot \vec{B}$ ecuación (3)

Vectores S y B paralelos → vectores μ_s y B antiparalelos.

Vectores S y B antiparalelos → vectores μ_s y B paralelos.

La aplicación del campo magnético externo elimina la degeneración de los estados de spin electrónico:



Regla de selección:
 $\Delta m_s = \pm 1$

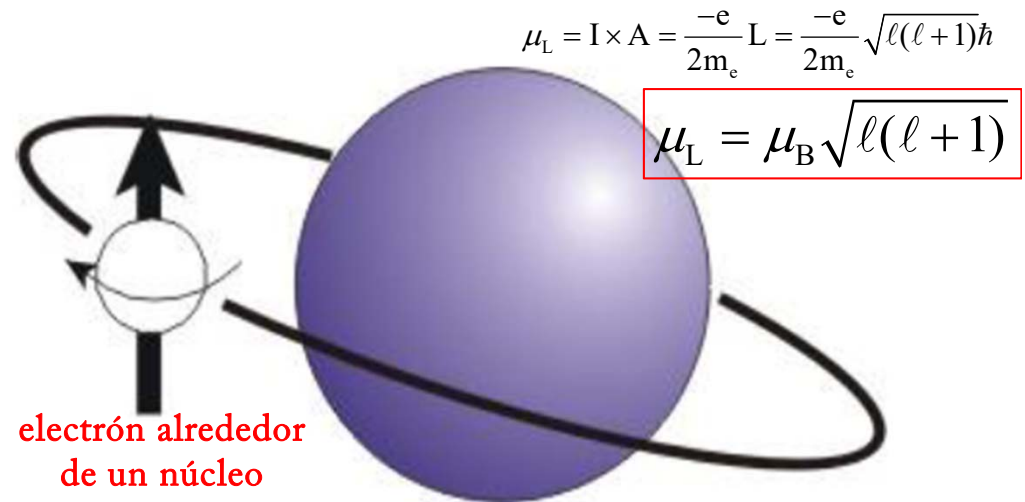
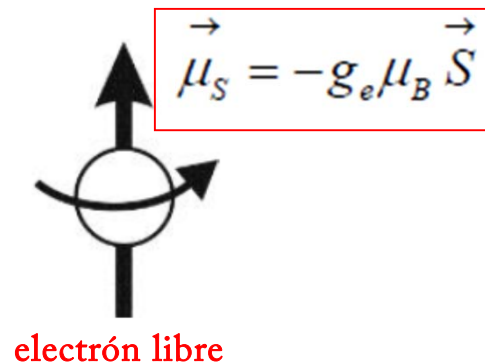
- En $B_0=0$, los estados de spin están degenerados (“juntos” en escala de energía).
- Cuando el $B_0 \neq 0$ estos niveles se separan (esto se conoce como efecto Zeeman).
- La separación energética entre estos dos estados de spin viene dada por:

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

Las transiciones entre los diferentes estados de espín son inducidas por radiaciones electromagnéticas a la frecuencia apropiada (*microondas*):

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

- Cuando tomamos un electrón que está libre en el espacio, sin fuerzas externas sobre él y lo colocamos en una molécula, su momento angular total cambia...
- Ahora, además del momento angular de de spin (S), también posee un momento angular orbital (L).



- Un electrón con momento angular orbital es una corriente circulante, por lo que también hay ahora dos momentos magnéticos.
- Estos dos momentos magnéticos \vec{S} y \vec{L} interactúan, y la energía de esta interacción spin-orbita depende de sus orientaciones relativas.
- Si los vectores \vec{S} y \vec{L} interactúan, el electrón desapareado responderá no sólo al campo magnético externo aplicado (B_0), sino que se verá afectado por el campo magnético generado por el momento magnético angular (\vec{L}).

El campo efectivo B_{eff} experimentado por un electrón es:

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

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 como...

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

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

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

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

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

- Debido a que los mecanismos de acoplamiento spin-orbita 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.
- Si el electrón libre se encuentra en un orbital con número cuántico orbital igual a cero, entonces el acoplamiento spin-orbita será nulo o muy pequeño, y el valor de $g \sim g_e$

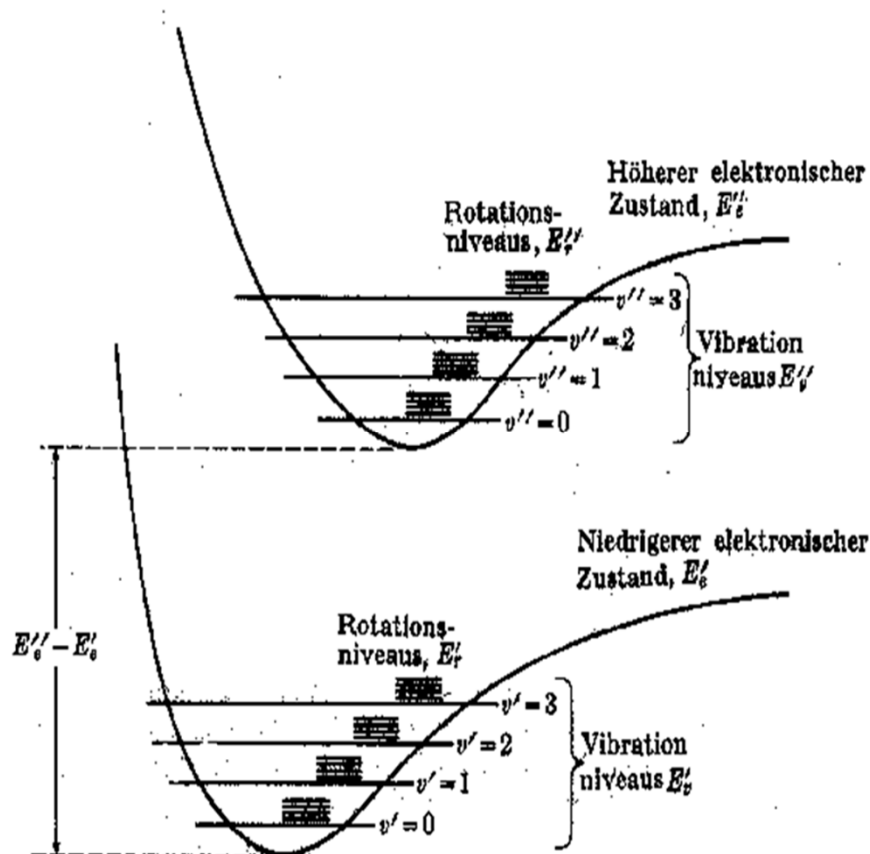
→ En sistemas reales los electrones normalmente no están aislados, sino que están asociados con uno o más átomos.

→ 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 ($I \neq 0$) 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 (eg. radical libre, metal, etc.) en cuestión, y por lo tanto puede proporcionar información sobre el orbital atómico o molecular que contiene el electrón desapareado.

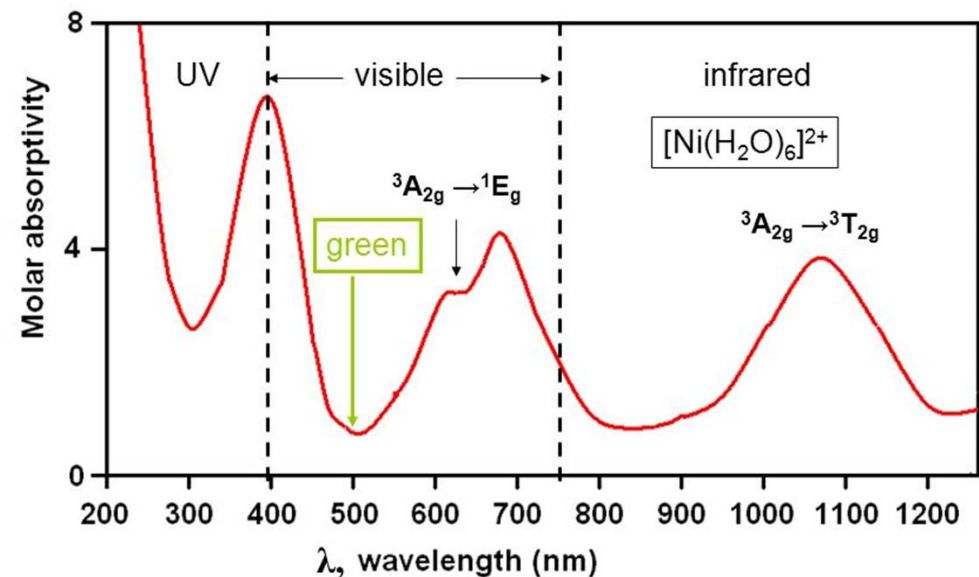
Obtención de un espectro de EPR

- En la mayoría de las espectroscopías (UV-Vis, IR, etc.) los niveles de energía (electrónicos, vibracionales, rotacionales) relevantes están "fijos" y presentes en la muestra.
- Se realiza un barrido de la longitud de onda / frecuencia de la radiación EM para detectar las absorciones correspondientes a saltos entre los niveles energéticos. En estos espectros se muestran los picos de absorción.

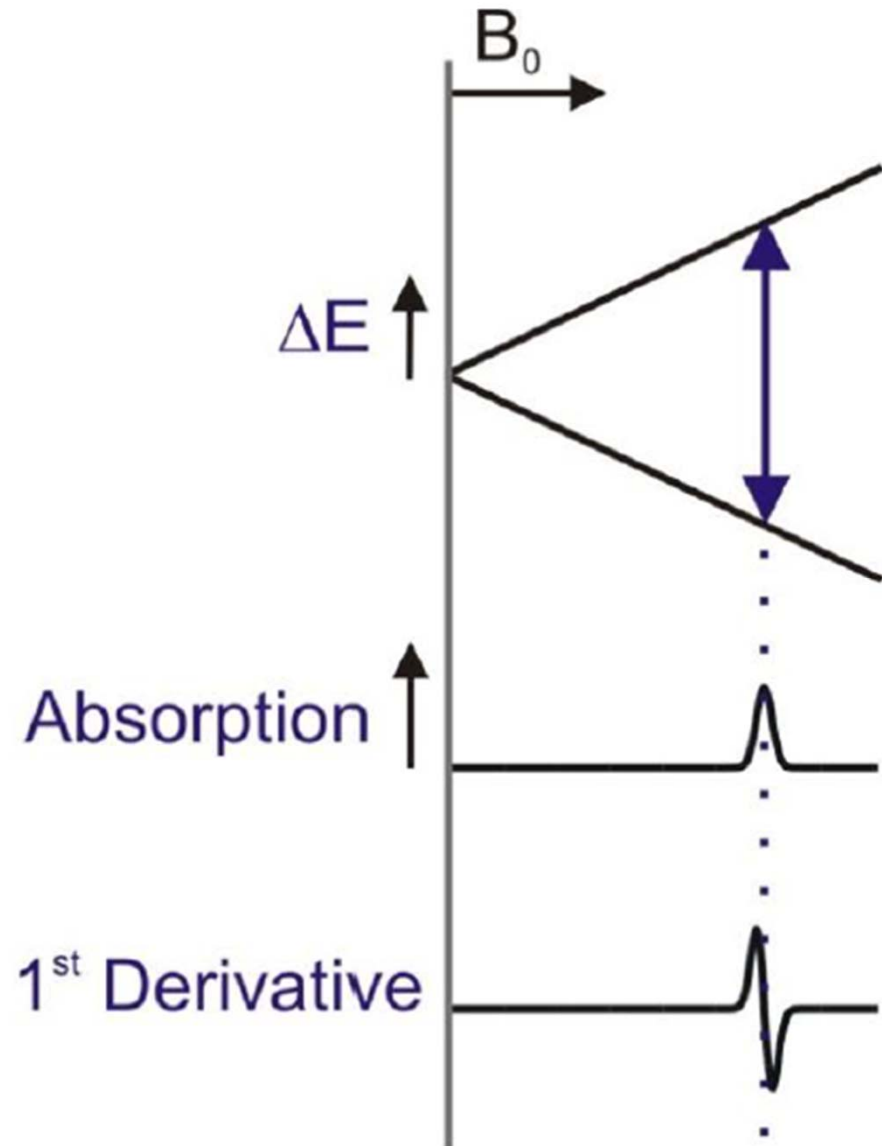


The electronic spectrum of $[\text{Ni}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$:

The complex looks green, because it absorbs only weakly at 500 nm, the wavelength of green light.



- En CW-EPR los niveles de energía responsables de la absorción del fotón de radiación EM 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

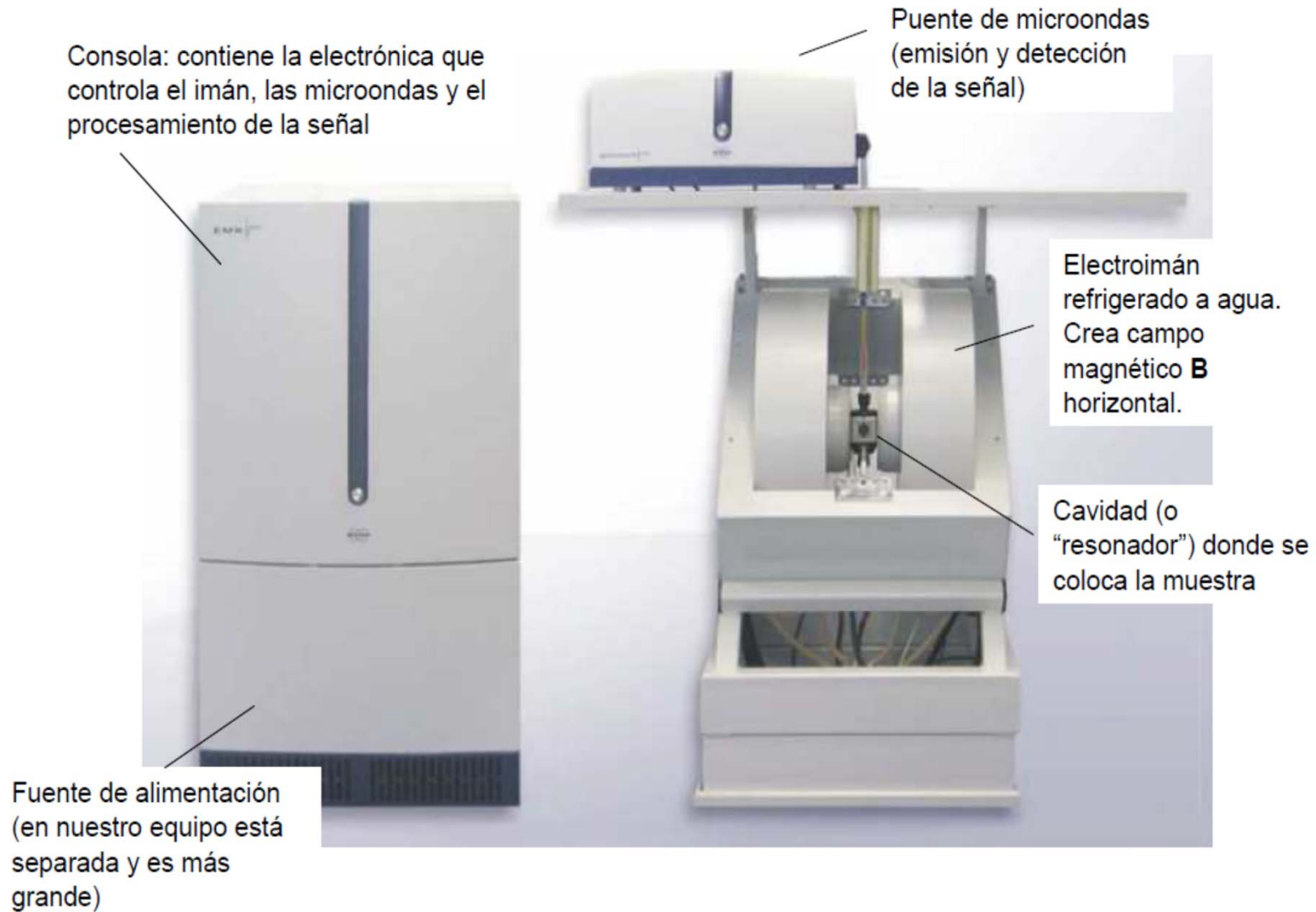
$$h\nu = g\mu_B B_0 \quad (9)$$

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

- Se mantiene la frecuencia constante ($h\nu = \text{constante}$) y se varía B_0 para detectar absorciones de energía:
- El espectro obtenido muestra la primera derivada de los picos de absorción (debido al sistema de detección de EPR es diferente al de las demás espectroscopías \rightarrow por modulación / sensible a fase).

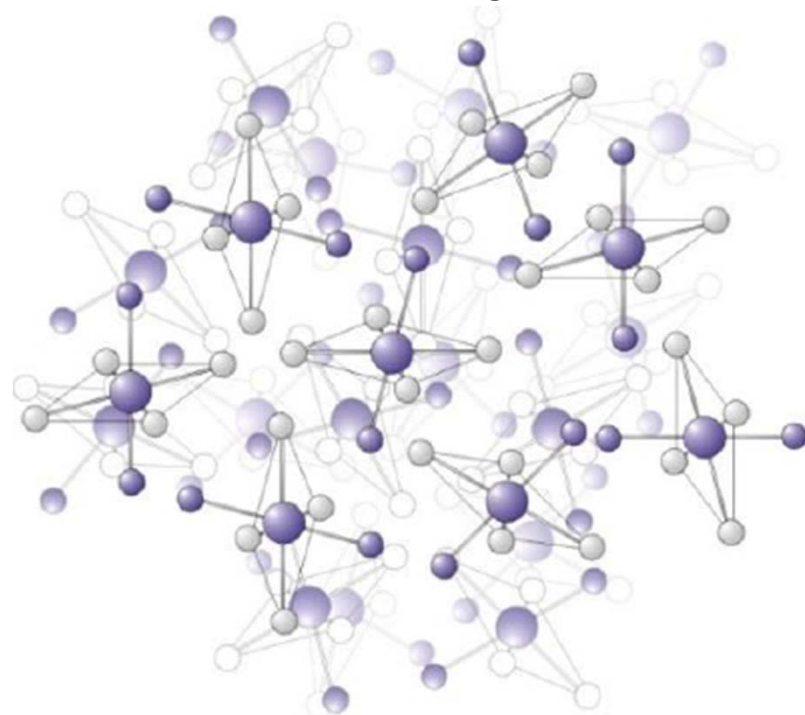
$$g = \frac{h\nu}{\beta B} \left[\frac{J s s^{-1}}{J T^{-1} T} \right] \rightarrow g = 0.714484 \frac{\nu [\text{MHz}]}{B [\text{G}]}$$

Espectrómetro de EPR

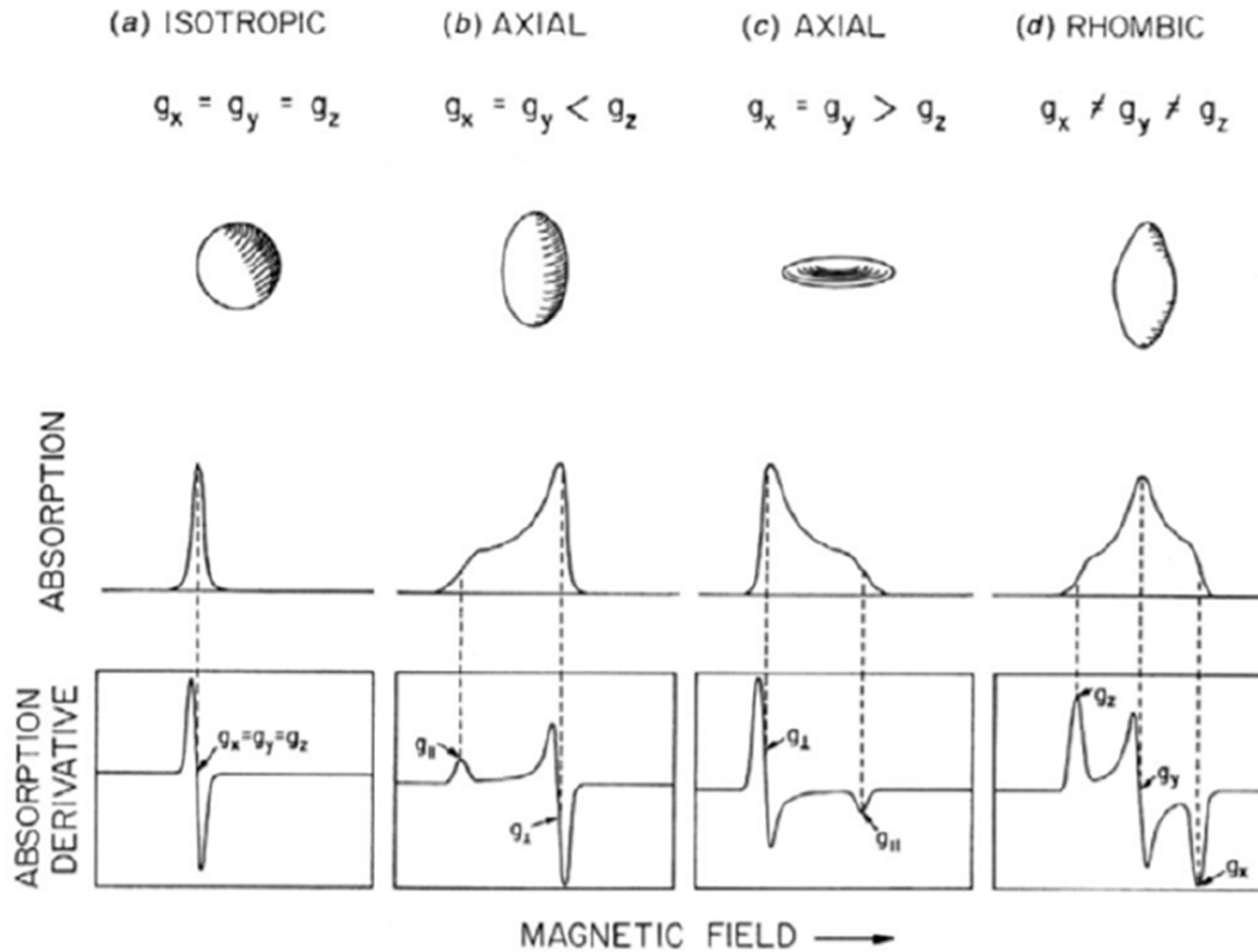


Formas de los espectros (forma de línea)

- 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, la magnitud de esta mezcla es dependiente de la dirección, o sea, es anisotrópico.
- Para cada molécula paramagnética, existe un sistema de ejes único llamado sistema del eje principal. Los factores g medidos a lo largo de estos ejes se llaman los factores g principales y se etiquetan 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.
- Los paramagnetos no están alineados en una dirección única como en un cristal orientado.
- Tampoco están girando rápidamente como en una solución.
- Las moléculas están en todas las orientaciones posibles → muestra congelada = “espectro de polvo”.

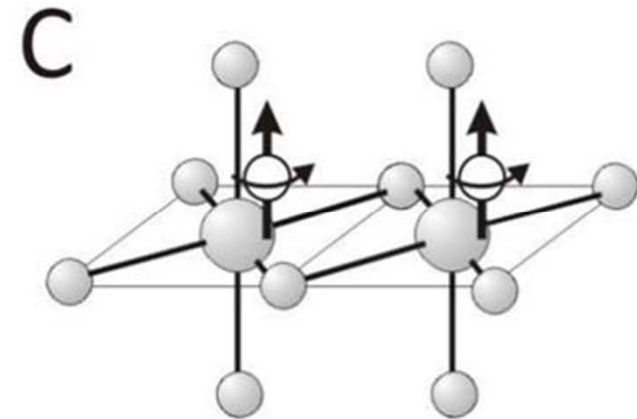
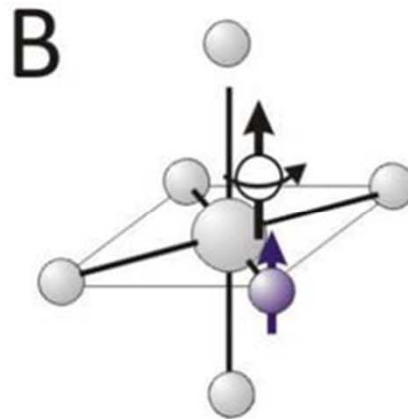
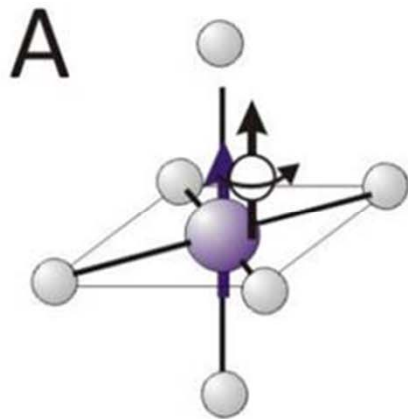


Espectros de absorción y primera derivada para tres clases diferentes de anisotropía.

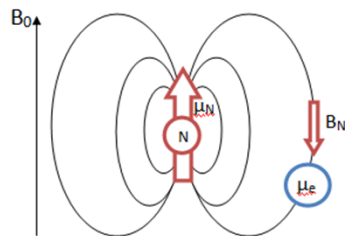
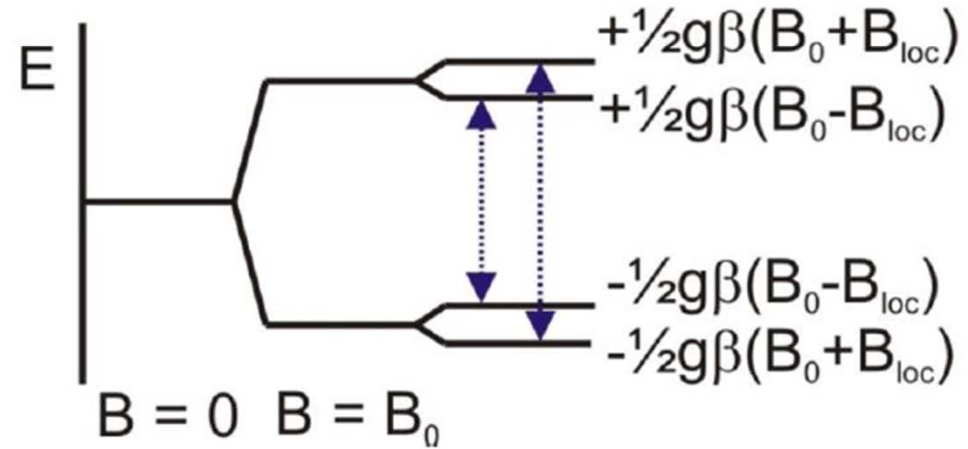
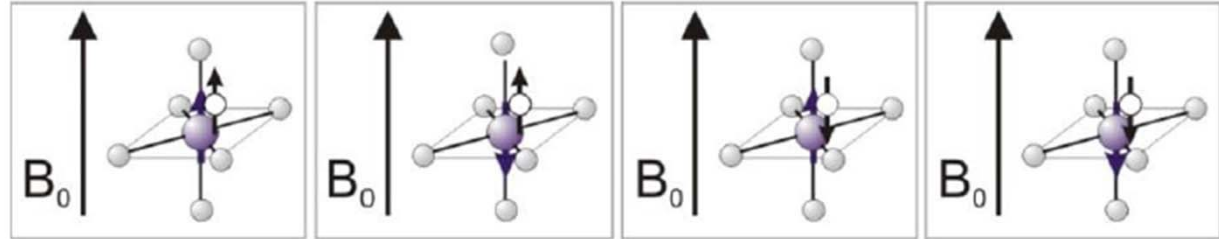
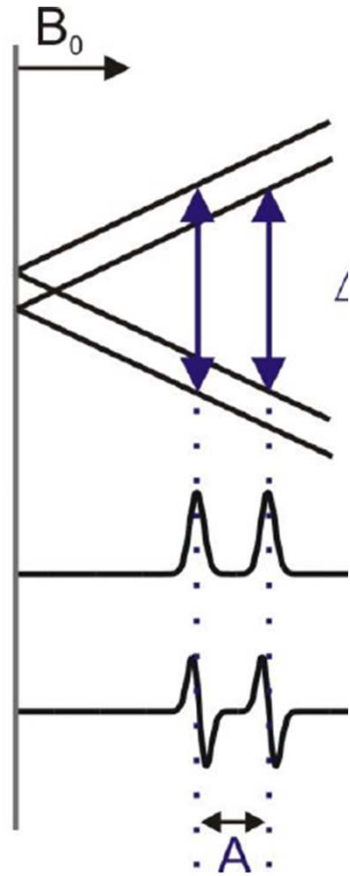


Estructura de multipletes en EPR: efecto de un spin nuclear (I) o de otro spin electrónico (S)

- En EPR, se pueden detectar tres tipos de interacciones:
 - Las dos primeras se deben a la interacción entre un electrón desapareado y un núcleo magnético, o sea, con spin nuclear $I \neq 0$.
 - La interacción del electrón no apareado con el momento magnético nuclear se denomina interacción hiperfina nuclear.
 - Se llama hiperfina si la interacción es con el núcleo (A) en el que está el electrón desapareado y superhiperfina (B) si es con un núcleo vecino.
 - El tercer tipo es la interacción entre dos electrones desapareados (C) que se encuentran en átomos diferentes, normalmente dentro de una molécula, y se denomina interacción spin-spin.



Interacción hiperfina y superhiperfina: efecto de un spin nuclear (I)

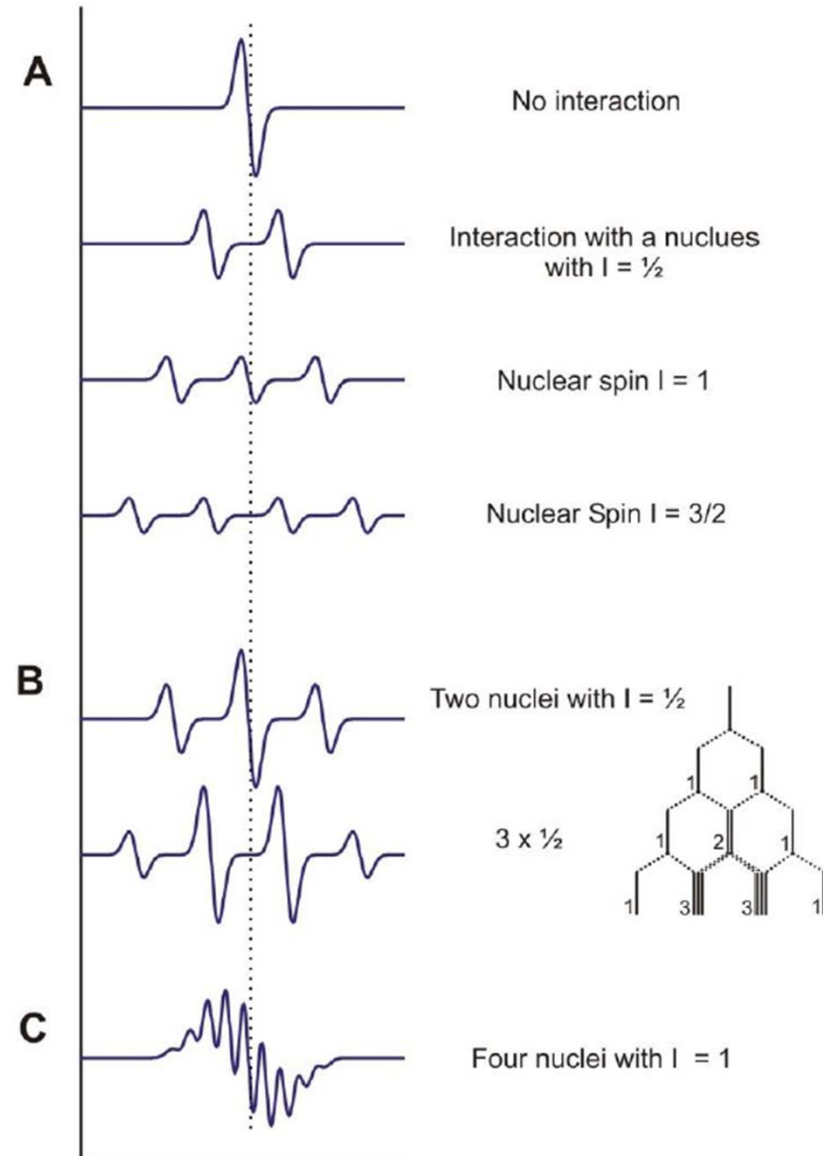


$$\Delta E = h\nu = g \cdot \mu_B \cdot B_0 + h \cdot A \cdot m_l$$

Interacción hiperfina y superhiperfina: efecto de un spin nuclear (I)

Efecto en una señal isotrópica

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)



Interacción hiperfina y superhiperfina: efecto de un spin nuclear (I)

Efecto del spin nuclear del Cu en una señal axial de Cu(II)

- Cu^{2+} generalmente produce un espectro de EPR axiales.
- Los dos principales isótopos del Cu, ^{63}Cu y ^{65}Cu , tienen espines nucleares de $3/2 \rightarrow$ la línea Zeeman se dividirá en cuatro líneas ($m_1 = +3/2, +1/2, -1/2, -3/2$).
- El acoplamiento hiperfino a lo largo de $g_{//}$ para Cu^{2+} siempre es mucho mayor que a lo largo de $g_{\perp} \rightarrow A_{//} \gg A_{\perp}$

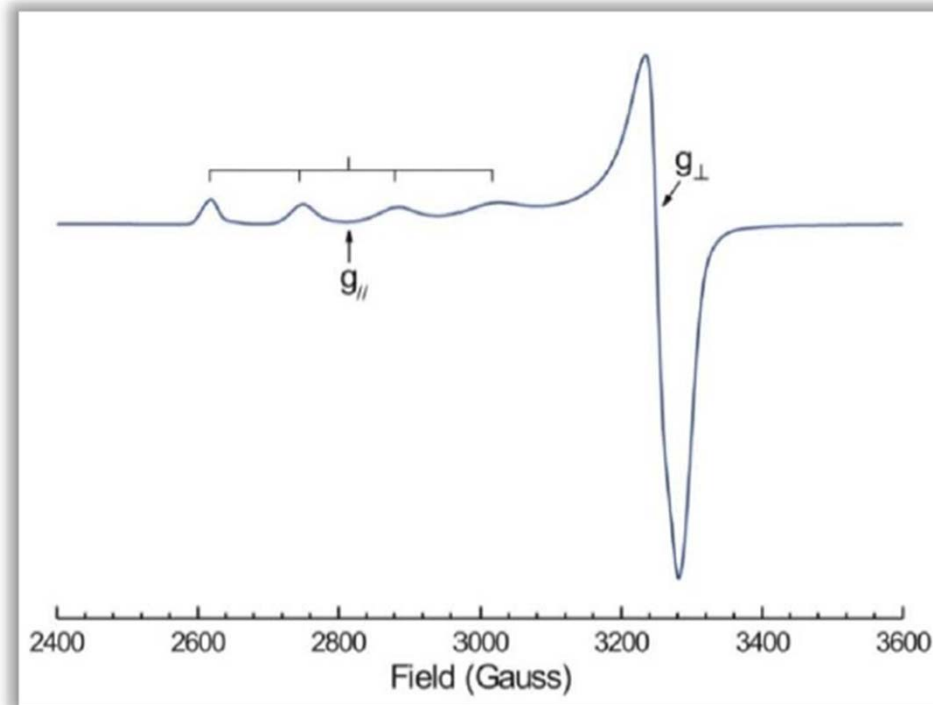


Fig. 15: EPR spectrum of $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$

Interacción hiperfina y superhiperfina: efecto de un spin nuclear (I)

Efecto del spin nuclear del V en una señal axial de V^{4+}

V^{4+} in chloroperoxidase

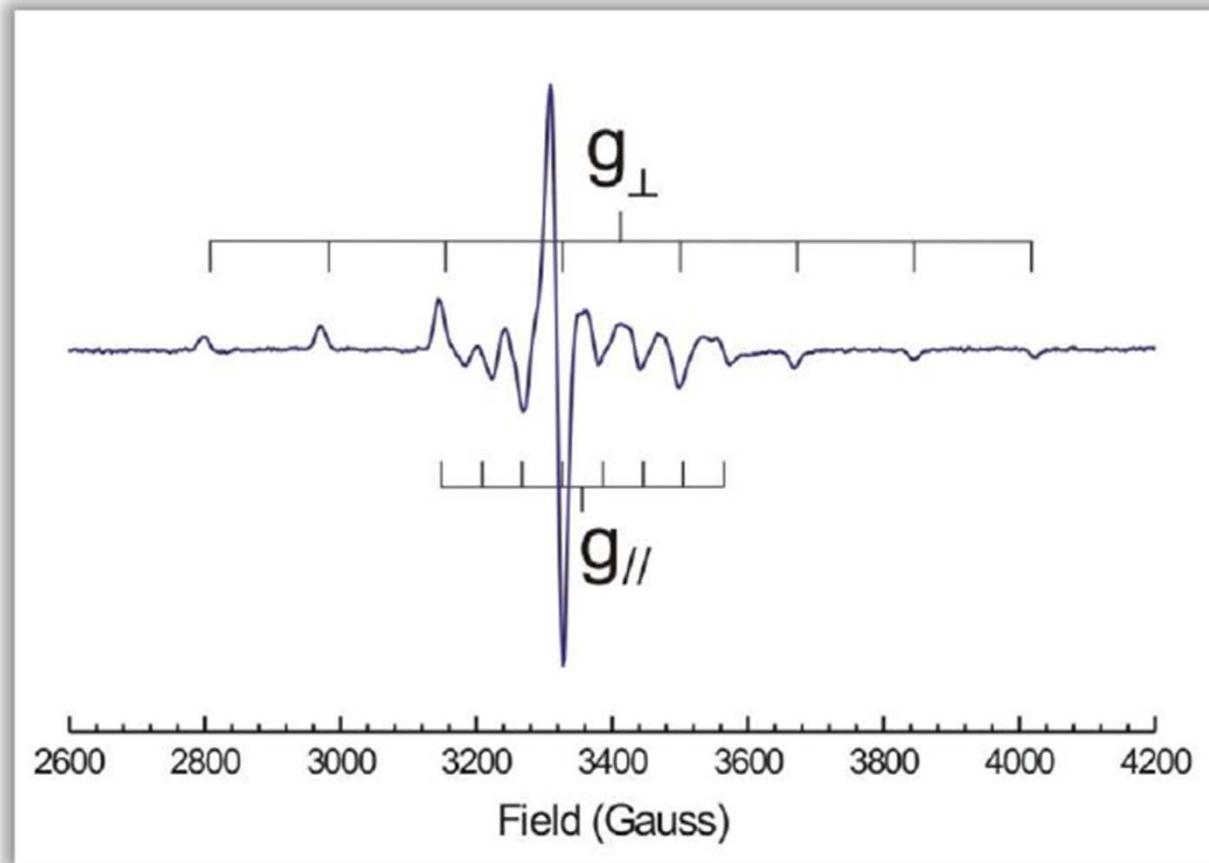


Fig. 17: Vanadium-containing chloroperoxidase from the fungus *Curvularia inaequalis*.

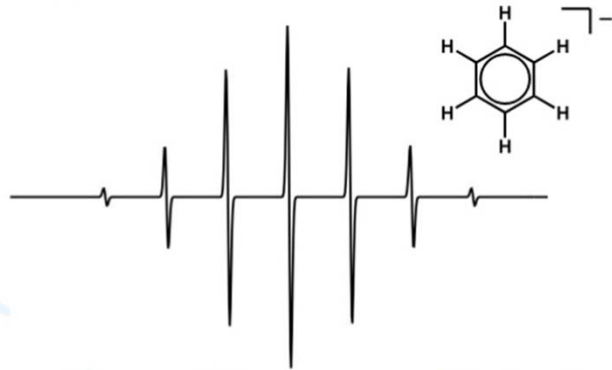
Interacción hiperfina y superhiperfina: efecto de varios espines nucleares (I)

Efecto del spin nuclear del ^1H ($I=1/2$) y ^{14}N ($I=1$) en una señal

$n^\circ \text{ de líneas} = (2nI+1)$

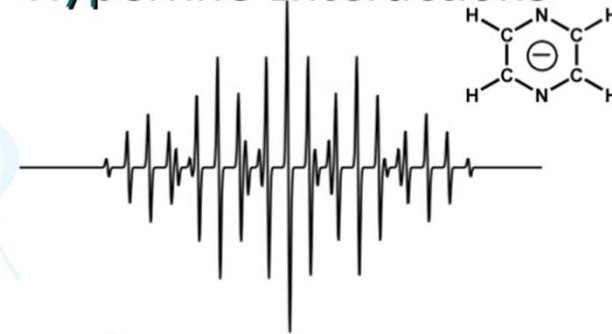
n : nro. de núcleos iguales

Hyperfine Interactions



EPR spectrum of benzene radical anion

Hyperfine Interactions



EPR spectrum of pyrazine radical anion

Relative Intensities for $I = 1/2$

N	Relative Intensities
0	1
1	1 : 1
2	1 : 2 : 1
3	1 : 3 : 3 : 1
4	1 : 4 : 6 : 4 : 1
5	1 : 5 : 10 : 10 : 5 : 1
6	1 : 6 : 15 : 20 : 15 : 6 : 1

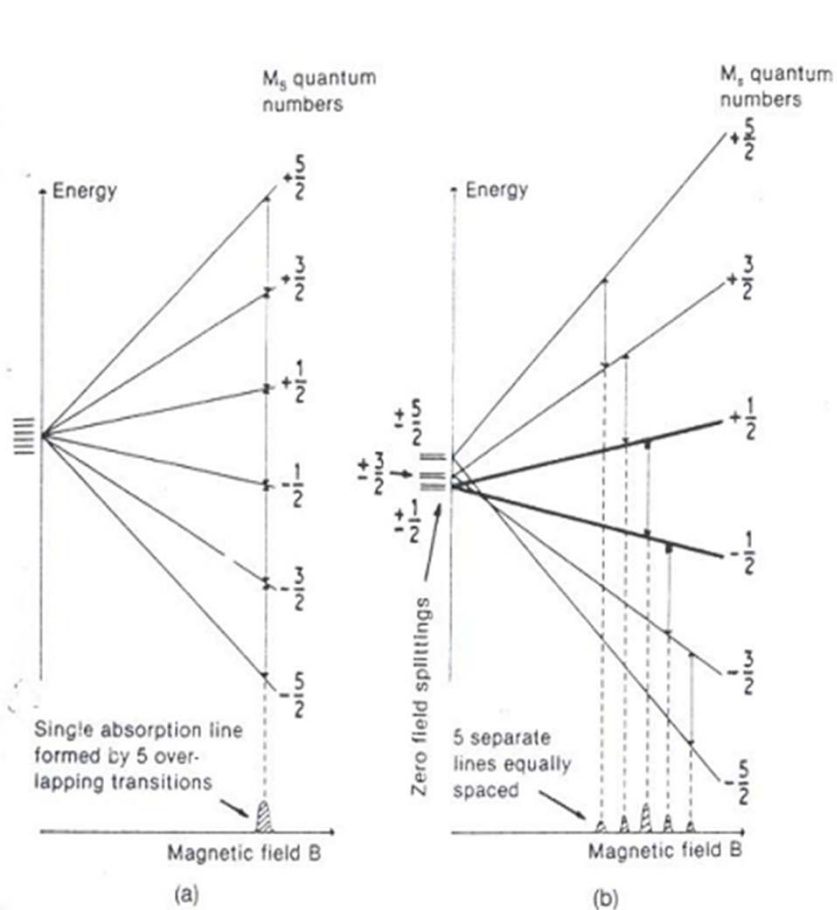
Relative Intensities for $I = 1$

N	Relative Intensities
0	1
1	1 : 1 : 1
2	1 : 2 : 3 : 2 : 1
3	1 : 3 : 6 : 7 : 6 : 3 : 1
4	1 : 4 : 10 : 16 : 19 : 16 : 10 : 4 : 1
5	1 : 5 : 15 : 20 : 45 : 51 : 45 : 20 : 15 : 5 : 1
6	1 : 6 : 21 : 40 : 80 : 116 : 141 : 116 : 80 : 40 : 21 : 6 : 1

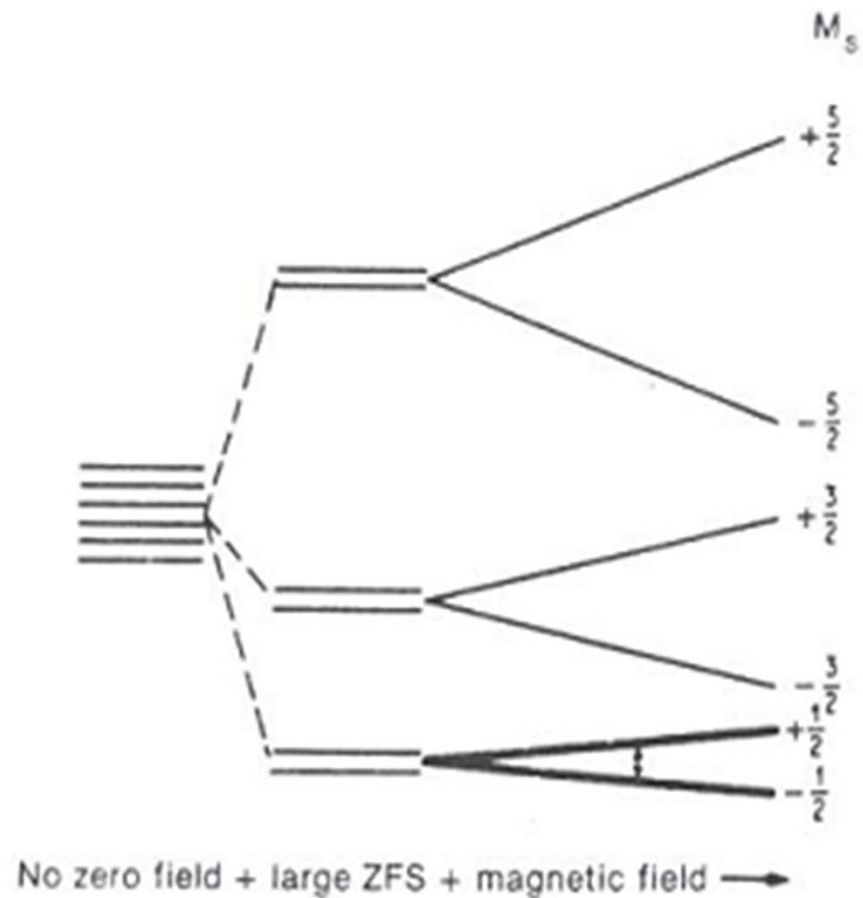
Estructura de multipletes en EPR: efecto de otro(s) espín(es) electrónico(s) en el mismo átomo

Desdoblamiento a campo cero (*zero field splitting, ZFS*)

El campo cristalino, la interacción dipolar entre espines, el acoplamiento LS pueden remover la degeneración de los niveles de energía del spin e^- , aún en ausencia de campo magnético externo (*zero field*) \Rightarrow aparición de “estructura fina” en el espectro.



d^5 : Mn(II), Fe(III) high spin, $S = 5/2$



Idem, pero con un gran ZFS
(Fe(III) en hemos)

Otros usos prácticos de EPR para estudio de metaloenzimas

Cuantificación de espines / cuantificación de centros paramagnéticos

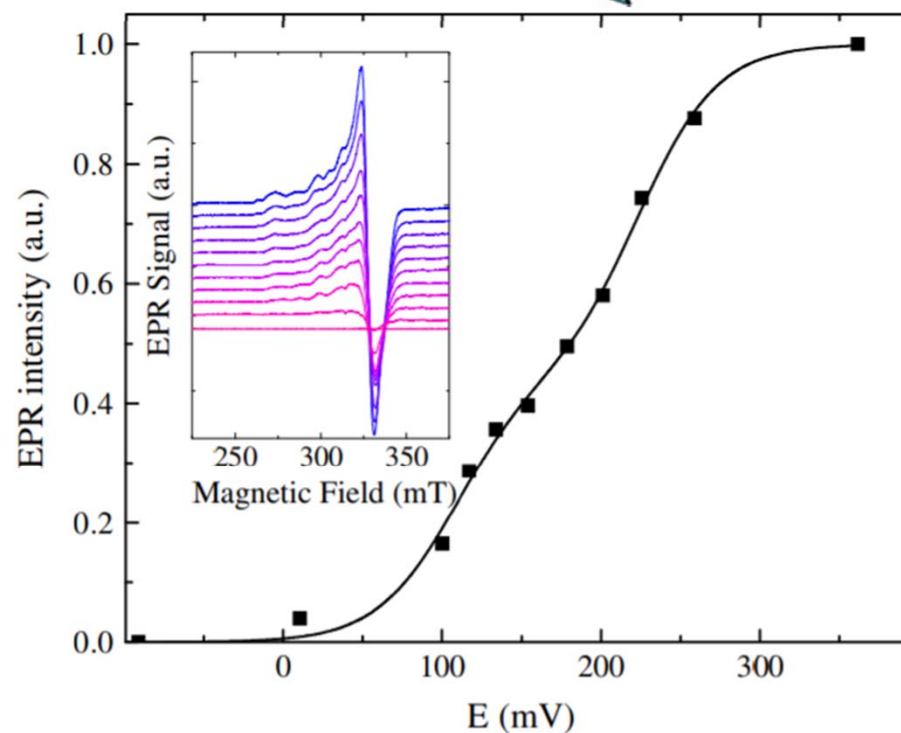
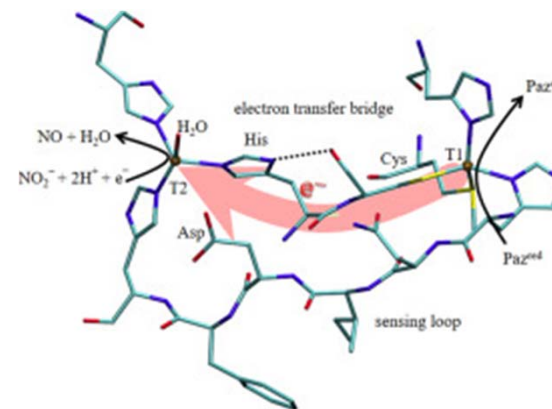
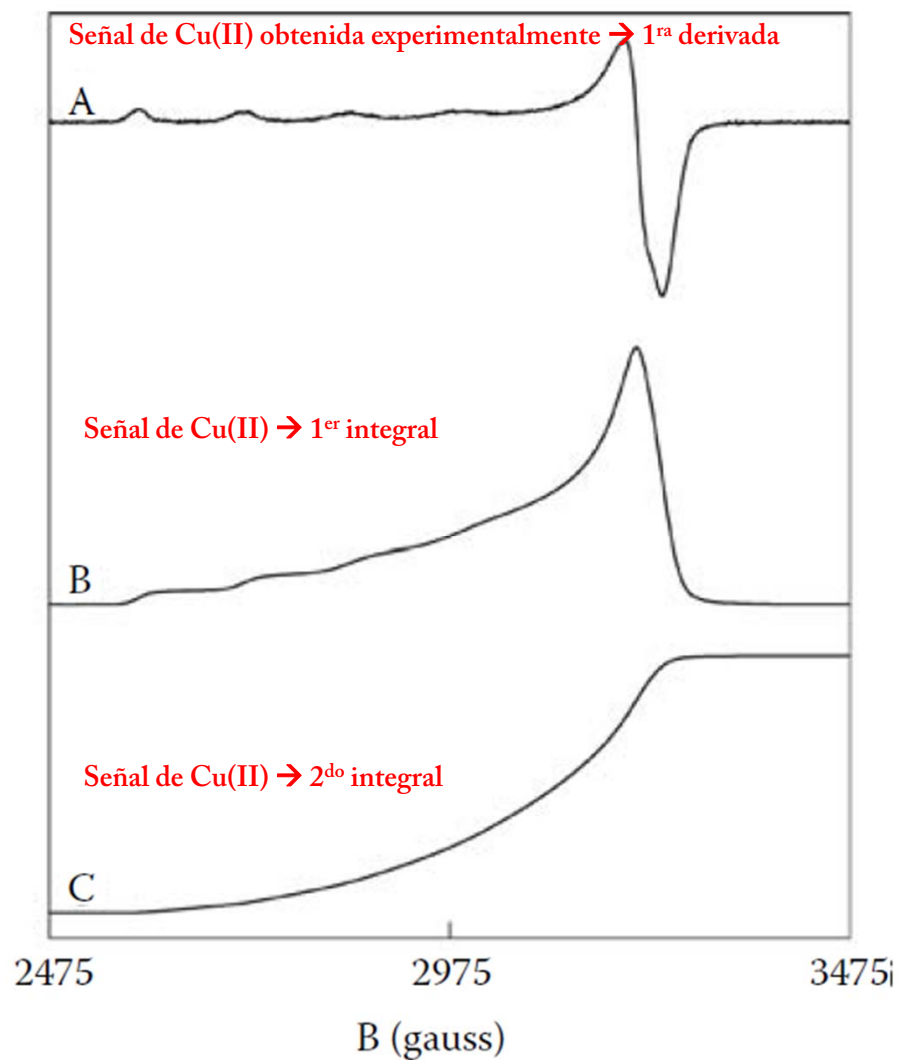


Fig. 5 Redox potentiometric titration of SmNir monitored by EPR spectroscopy. The *solid line* was obtained by least squares fitting a two-independent-component Nernst equation with $n = 1$ to the data. The EPR spectra as a function of the potential are shown in the *inset*

Otros usos prácticos de EPR para estudio de metaloenzimas

Titulaciones potenciométricas

J.J. Wright et al. / Journal of Inorganic Biochemistry 162 (2016) 201–206

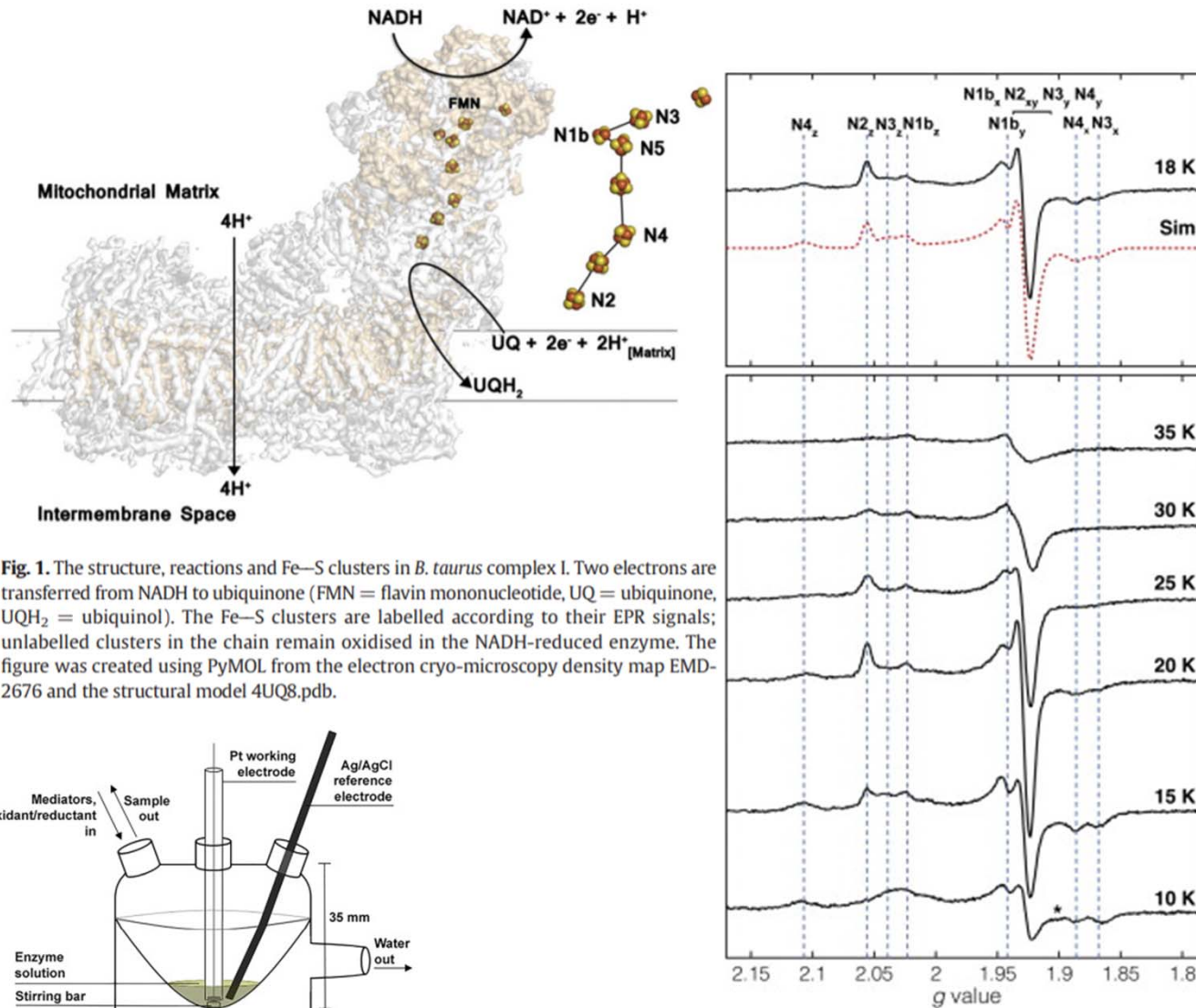


Fig. 1. The structure, reactions and Fe–S clusters in *B. taurus* complex I. Two electrons are transferred from NADH to ubiquinone (FMN = flavin mononucleotide, UQ = ubiquinone, UQH₂ = ubiquinol). The Fe–S clusters are labelled according to their EPR signals; unlabelled clusters in the chain remain oxidised in the NADH-reduced enzyme. The figure was created using PyMOL from the electron cryo-microscopy density map EMD-2676 and the structural model 4UQ8.pdb.

