



Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

NMR e EPR

Aula 13

Ressonância magnética nuclear. Ressonância paramagnética eletrônica

**Jiří Borecký
CCNH
2014**



Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

NMR e EPR

Ressonância magnética nuclear

**Jiří Borecký
CCNH
2014**



➤ Ressonância magnética nuclear (NMR)

- Um efeito, onde os **núcleos com spin magnético** em um campo magnético absorvem e re-emitem energia eletromagnética.
- Esta energia emitida ocorre em **frequências de ressonância específicas** que dependem da força do campo magnético, entre outros fatores.
- O efeito permite a observação das propriedades mecânicas e magnéticas quânticas dos núcleos de átomos.
- O fenômeno de NMR pode ser usado nos estudos da física molecular, nos cristais e materiais não cristalinos pela espectroscopia de NMR
- Técnicas médicas de *imaging* também usam NMR em imagens por ressonância magnética (*magnetic resonance imaging* - MRI).



NMR - introdução

- **Ressonância magnética nuclear tem várias categorias:**
 - Modo de alta resolução em soluções homogêneas
 - Modo de alta potência em núcleos com alto relaxamento (polímeros)
 - Estudo de sólidos usando técnicas de rotação em Ângulo Mágico
 - NMR 3D *imaging* com resoluções de $\sim 1 \mu\text{m}$.
- Único método espectroscópico, em que é possível análise e interpretação total de espectro
- NMR é não destrutiva
- Amostras com quantidade (enorme) de miligramas são necessárias
- Usa-se um campo magnético enorme de 1 a 20 T (tesla). Para comparação, o campo magnético na superfície da Terra é $\sim 10^{-4}$ T
- Usam-se ondas de rádio com frequências de dezenas a centenas de MHz



NMR - princípio

- **Núcleos de muitos isótopos de átomos tem um **spin** característico (**I**) que pode ser**
 - **Fracional (número de prótons ou nêutrons ímpar):**
 - $I = 1/2$ (^1H , ^3H , ^{13}C , ^{17}N , ^{19}F e ^{31}P)
 - $I = 3/2$ (^{11}B)
 - $I = 5/2$ (^{17}O)
 - **Integral (número de prótons e nêutrons ímpar):** $I = 1$ (^2H ou D , ^{14}N , fóton), $I = 2$ (graviton)
 - **Nulo (número de prótons ou nêutrons par):** $I = 0$ (^{12}C , ^{16}O , ^{32}S ,)
- **Número quântico de spin (**s**) pode ser igual a $n/2$, ($n = \text{integer}$). Assim, os valores permitidos do s são 0, $1/2$, 1, $3/2$, 2, etc. O valor do s depende somente do tipo da partícula e não pode ser mudado por nenhuma maneira conhecida (contrário à direção do spin).**
- **Momento angular intrínseco de spin (**S**) de cada sistema físico é quantizado. Os valores permitido do S são:**

$$S = \hbar \sqrt{s(s + 1)}$$

- **Onde \hbar é constante de Planck reduzida ($\hbar = h/2\pi$)**



Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

Spin de isótopos

NMR e EPR

Isótopo	Abundance Natural (%)	Spin (I)	Momento Magnético (μ)*	Razão Giromagnético (γ)†
^1H	99,9844	$\frac{1}{2}$	2,7927	26,753
^2H	0,0156	1	0,8574	4,107
^{11}B	81,1700	$\frac{3}{2}$	2,6880	--
^{13}C	1,1080	$\frac{1}{2}$	0,7022	6,728
^{17}O	0,0370	$\frac{5}{2}$	-1,8930	-3,628
^{19}F	100,0000	$\frac{1}{2}$	2,6273	25,179
^{29}Si	4,7000	$\frac{1}{2}$	-0,5555	-5,319
^{31}P	100,0000	$\frac{1}{2}$	1,1305	10,840

* μ em unidades de magnetons nucleares = $5.05078 \cdot 10^{-27} \text{ JT}^{-1}$

† γ em unidades de $10^7 \text{ rad T}^{-1} \text{ s}^{-1}$



Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

NMR - princípio

NMR e EPR

- Uma carga girando gera um campo magnético
- O spin resultante tem um momento magnético (μ) proporcional ao spin.
- Na presença de campo magnético externo (B_0), existem dois estados do spin,
 - estado com menor energia $+1/2$ alinhado com o campo externo
 - estado com maior energia $-1/2$ que é oposto ao campo.
- A diferença da energia entre os dois estados do spin é dependente na força do campo magnético externo e sempre é bastante pequena.
- Os dois estados do spin têm a mesma energia quando o campo externo é zero mas diverge quando o campo aumenta.

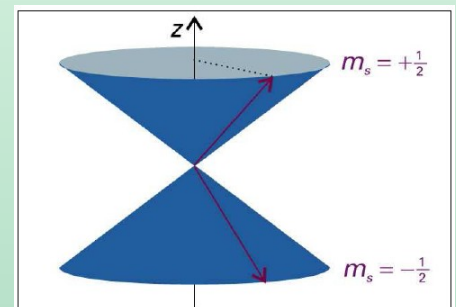
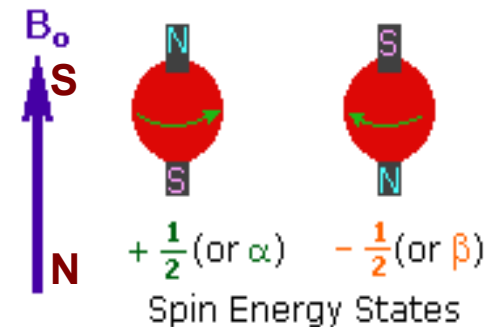
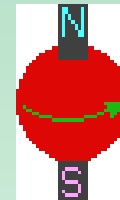
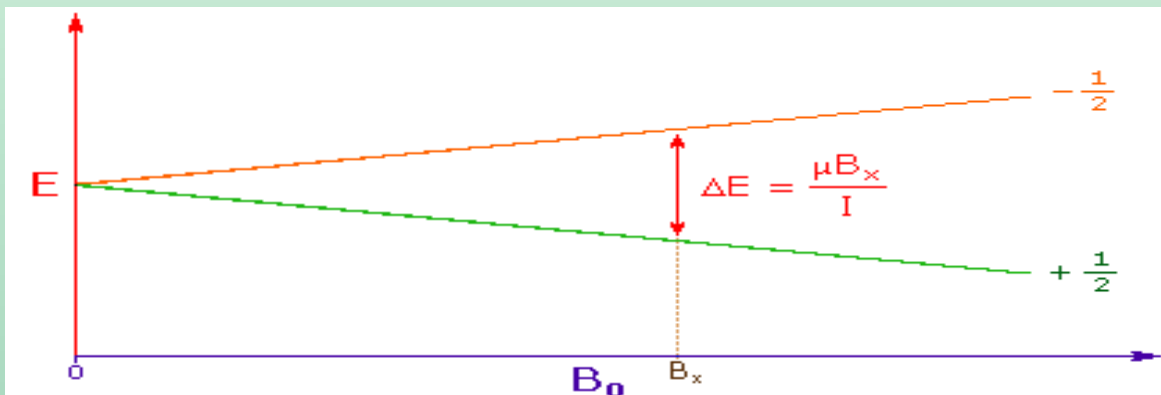


Fig. 15.1 The interactions between the m_s states of an electron and an external magnetic field may be visualized as the precession of the vectors representing the angular momentum.



Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

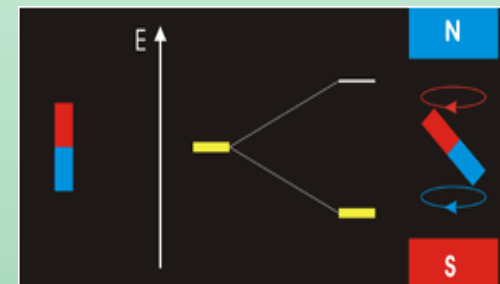
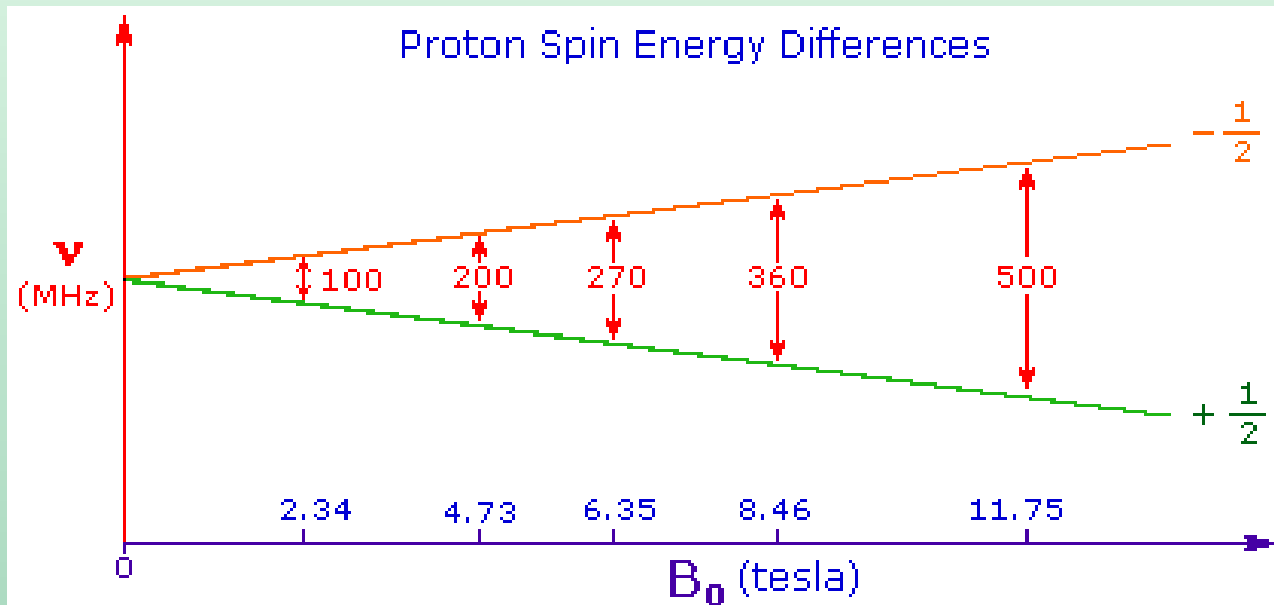
NMR - princípio

NMR e EPR

- A amostra pode ser exposta a radiação de frequência ω
- A absorção de energia correspondente a transição entre os níveis de spin $1/2$ e $-1/2$ ocorre quando se satisfaz a condição de ressonância
- A diferença de energia se expressa como frequência de Larmor ν
- O núcleo do átomo de hidrogênio (o próton) que foi mais estudado até agora tem momento magnético $\mu = 2.7927$ magnetons nucleares $= 1.410531331 \times 10^{-26} \text{ JT}^{-1}$

$$\omega = 2\pi\nu = \mu B_0$$

$$\nu = \frac{\mu B_0}{2\pi}$$





Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

NMR - princípio

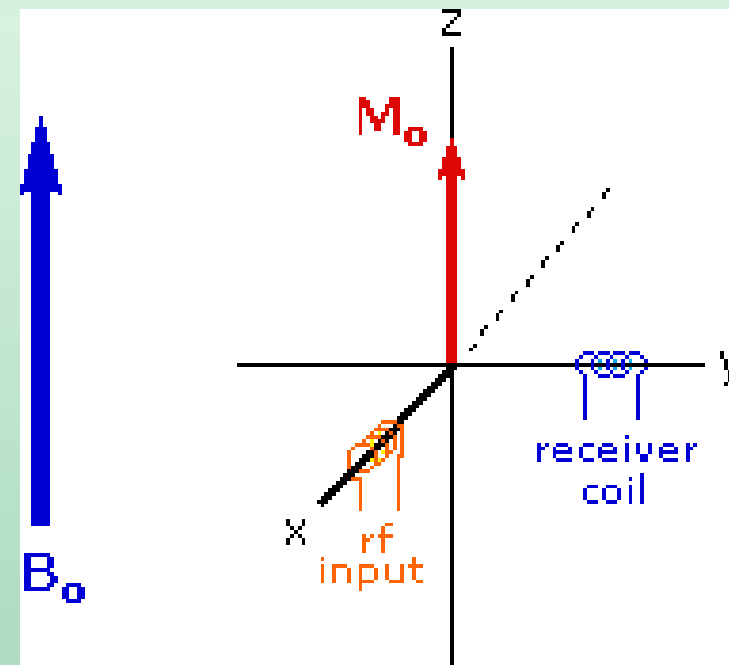
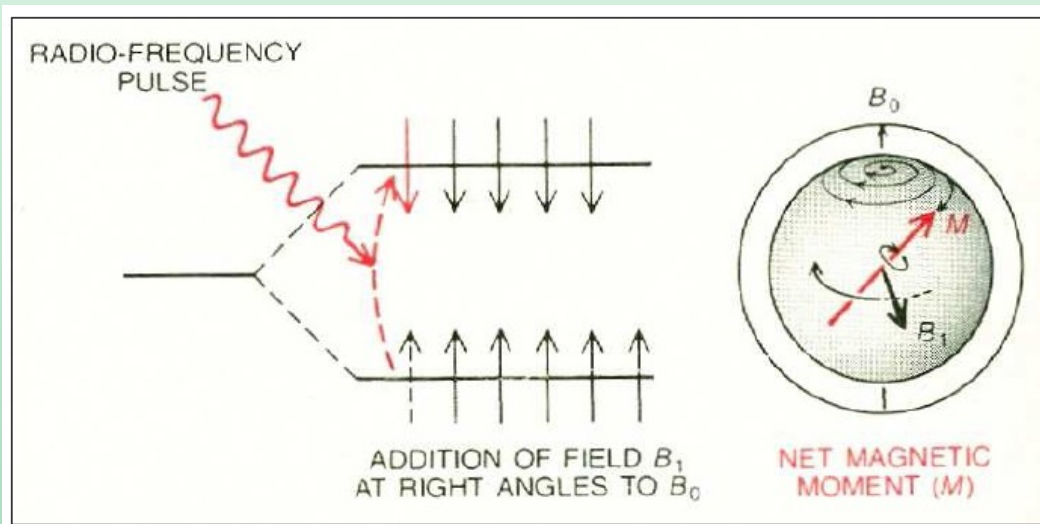
NMR e EPR

- O pulso de radiofrequência gera um campo rotante (B_1) com frequência ω_0 . A interação entre B_1 e o momento magnético total M desloca este vetor da direção z de um pequeno ângulo θ . Dado que B_1 roda em torno de B_0 com frequência ω_0 na condição de ressonância, M terá um movimento de precessão em torno de B_0 .

$$\omega = 2\pi\nu = \mu B_0$$
$$\nu = \frac{\mu B_0}{2\pi}$$

30F5542Ed01.swf

AAC30134d01.swf





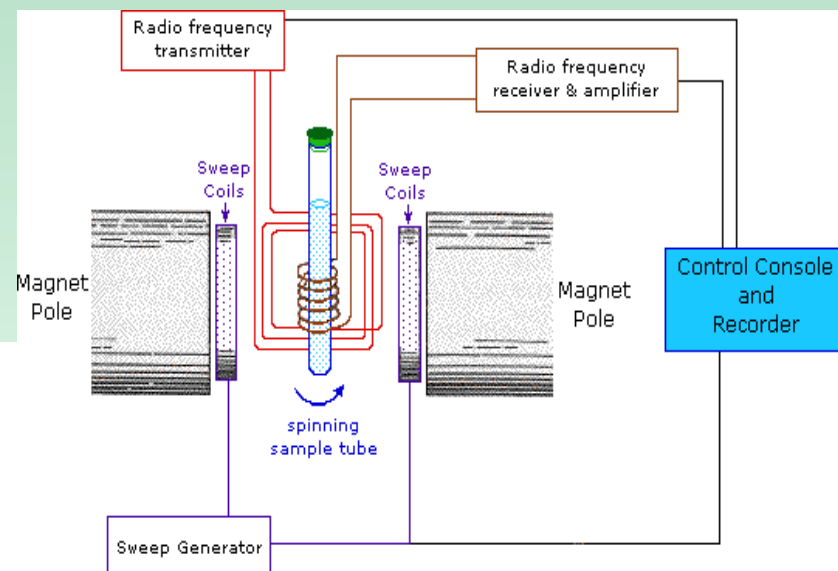
Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

NMR - espectrômetro

NMR e EPR

- Esquema de um espectrômetro de onda contínua
- Hoje são usados ímãs de supracondutores que geram campos magnéticos maiores de 21 T





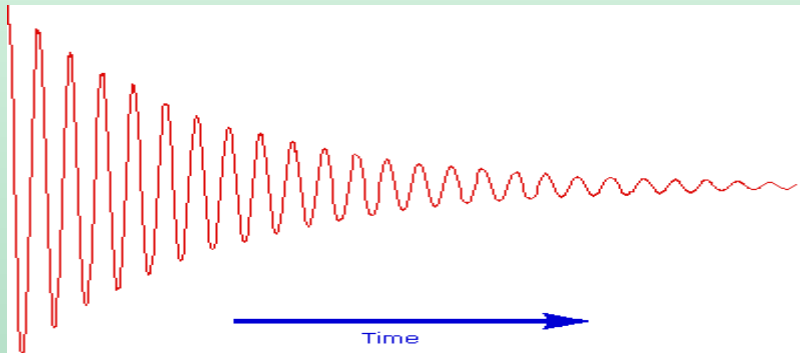
Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

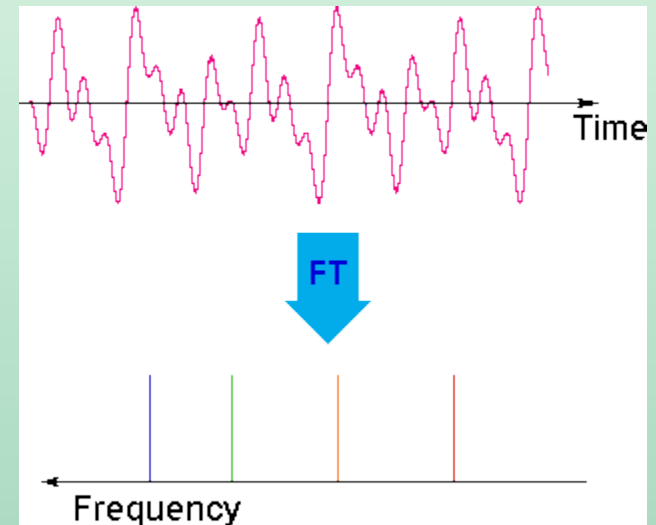
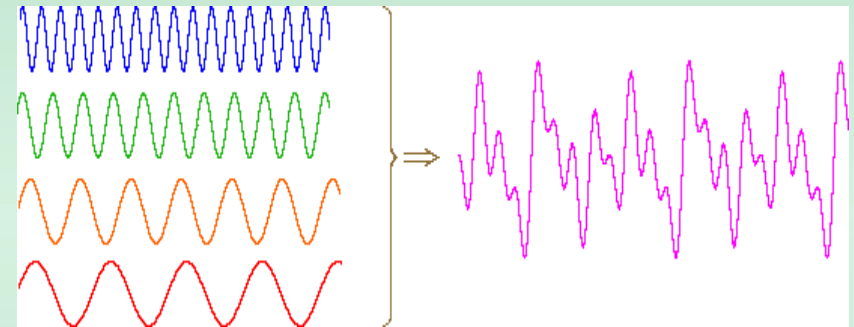
NMR - espectrômetro

NMR e EPR

- espectrômetro de onda contínua precisa muito tempo para excitar cada conjunto de núcleos separadamente aumentando devagar a frequência para atingir a alta resolução
- espectrômetro de transformação de Fourier do pulso excita todos os átomos de vez por um pulso de 10 a 100 μs com força 10.000 vezes maior que espectrômetro de onda contínua
- Ondas de todas frequências emitidas por ressonância se mesclam num padrão de relaxamento



- A onda complexa é transformada por transformação de Fourier em um espectro de frequências separadas





Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

NMR - sinal

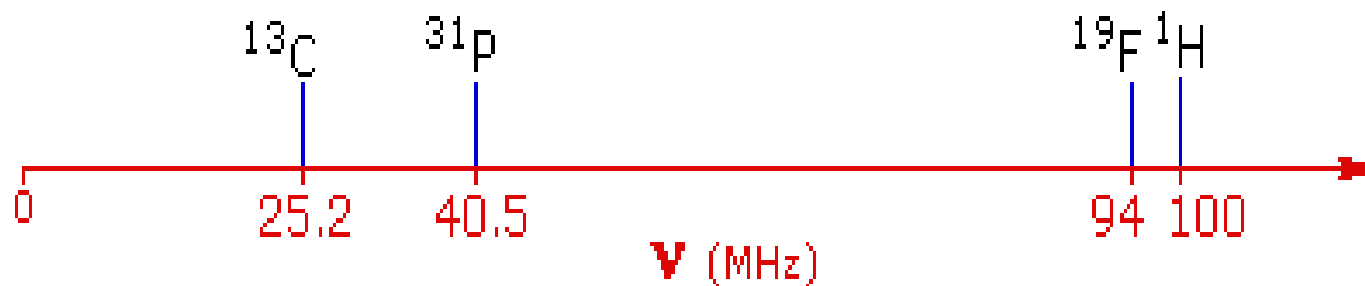
NMR e EPR

- Para o spin de 1/2, a diferença entre os estados de spin no dado campo magnético (2,35 T) será proporcional a seus momentos magnéticos.

$$\nu = \frac{\mu B_0}{h I}$$

$$B_0 = 2.35 \text{ T}$$

$$\nu = \frac{\mu B_0}{h I} = \frac{4.68 \mu}{h}$$





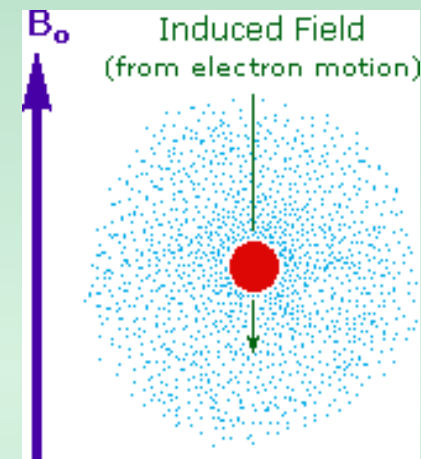
Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

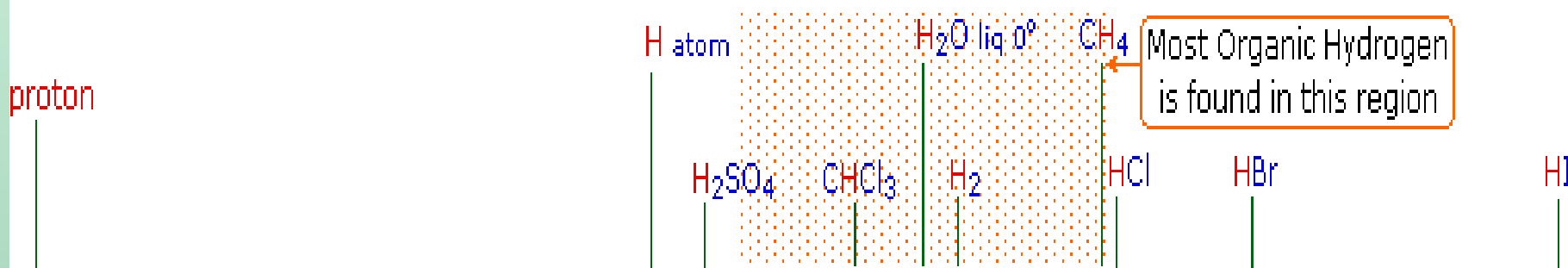
NMR - sinal

NMR e EPR

- Todos os prótons tem o mesmo momento magnético – seria esperado que tem o mesmo sinal
- Felizmente, não é o caso. O sinal de núcleo de hidrogênio ligado a outros átomos difere por causa de campo magnético secundário gerado por elétrons que o circundam em moléculas com ligações covalentes ou em íons
- Elétrons vão criar um campo oposto ao nuclear, “protegendo-o”
- O escudo magnético depende da densidade eletrônica em volta do núcleo, que depende da presença de grupos eletropositivos ou eletronegativos



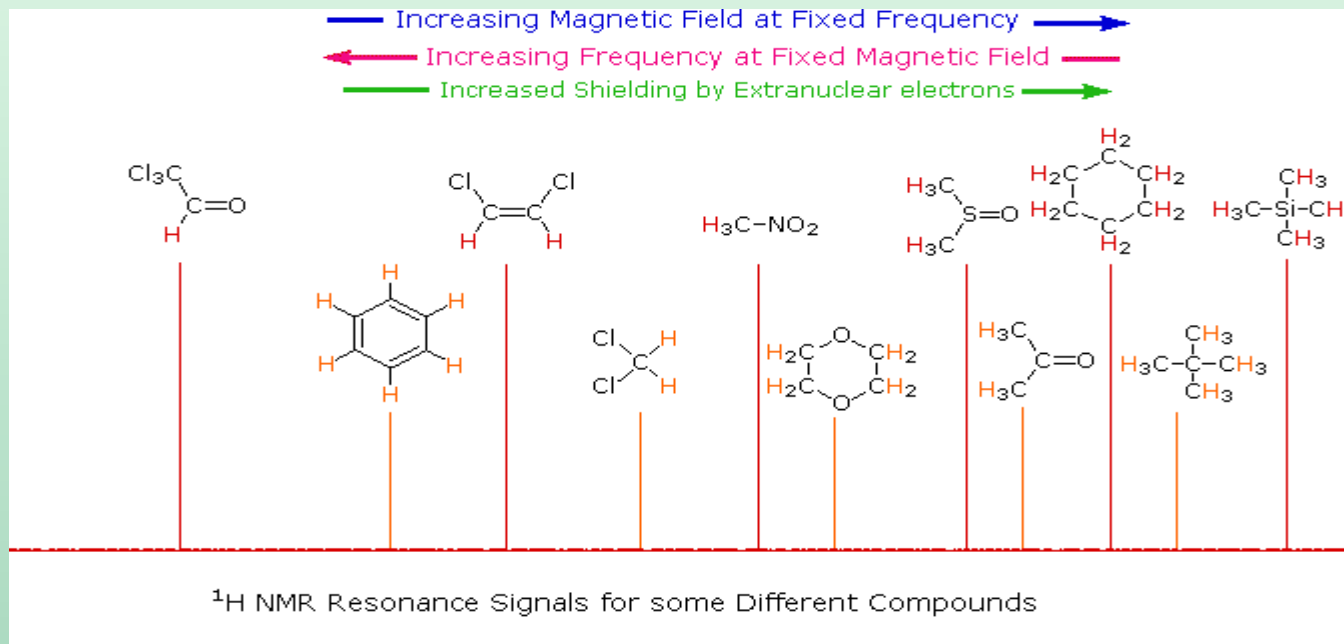
- Increasing Magnetic Field at Fixed Frequency —→
- ←— Increasing Frequency at Fixed Magnetic Field —
- Increased Shielding by Extranuclear electrons —→





NMR - sinal

- Diferentemente da IV ou UV/VIS espectroscopia, onde os picos de absorção são localizados unicamente por frequência ou comprimento de onda, a localização dos sinais da ressonância NMR depende:
- na força do campo magnético externo
 - na frequência do rádio
- Por causa que nenhum dos dois ímãs terá exatamente o mesmo campo, as frequências da ressonância vão variar entre aparelhos → precisa-se um método alternativo para caracterizar os picos

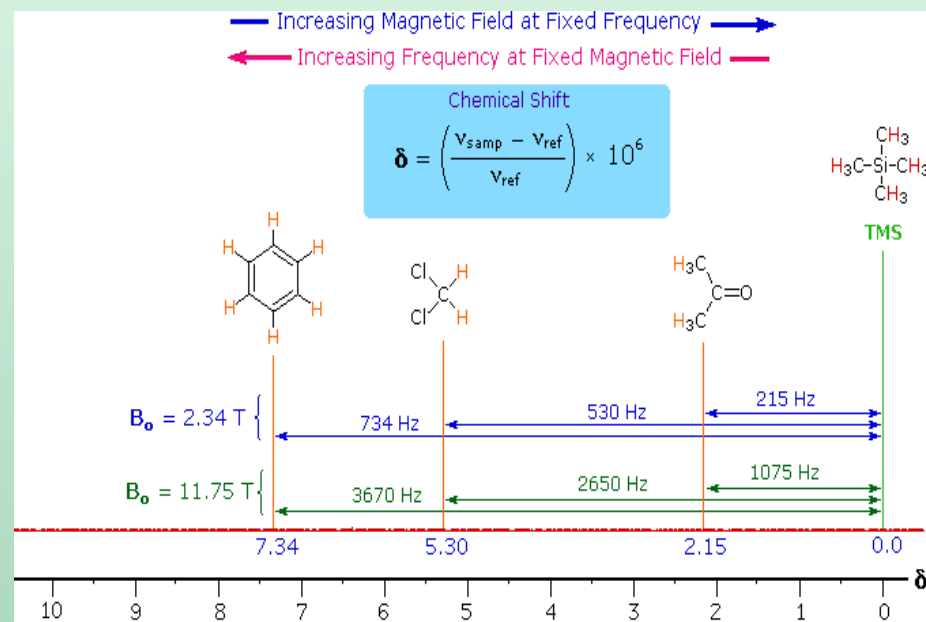
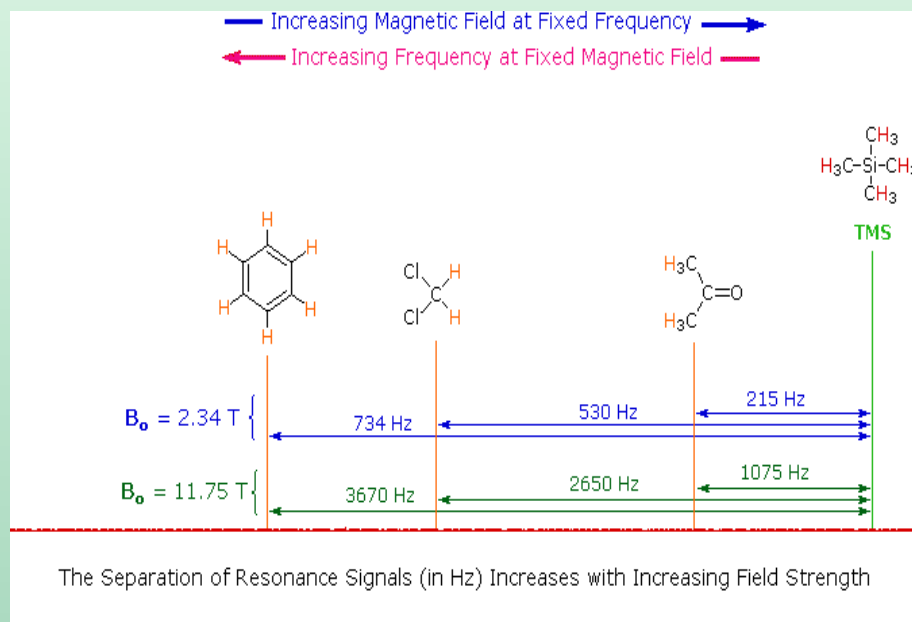




shift químico δ

➤ Método do padrão como referência:

- Padrão tem que ser não reativo, fácil de remover da amostra e tem que ter sinal agudo que não interfere com ressonâncias normalmente observadas para compostos orgânicos
- Tetrametilsilano, $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$, abreviado como TMS, tem estas características e ficou como o composto referente para NMR de hidrogênio e carbono
- Para evitar a dependência do sinal ao campo magnético, a diferença dos sinais (amostra – referência) é dividida pela frequência da referência correspondente ao campo resultando em um *shift* (deslocamento) químico δ





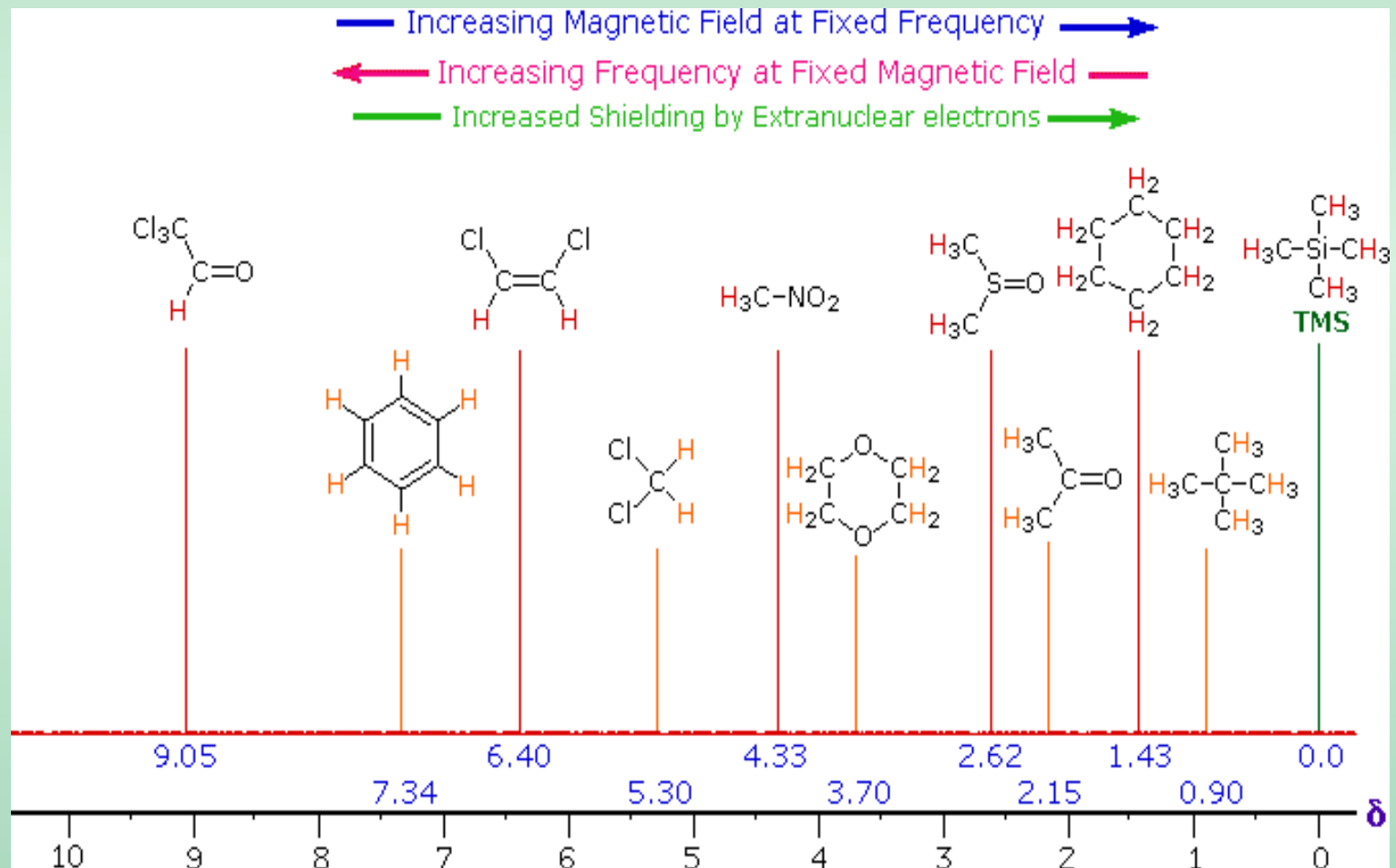
Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

shift químico δ

NMR e EPR

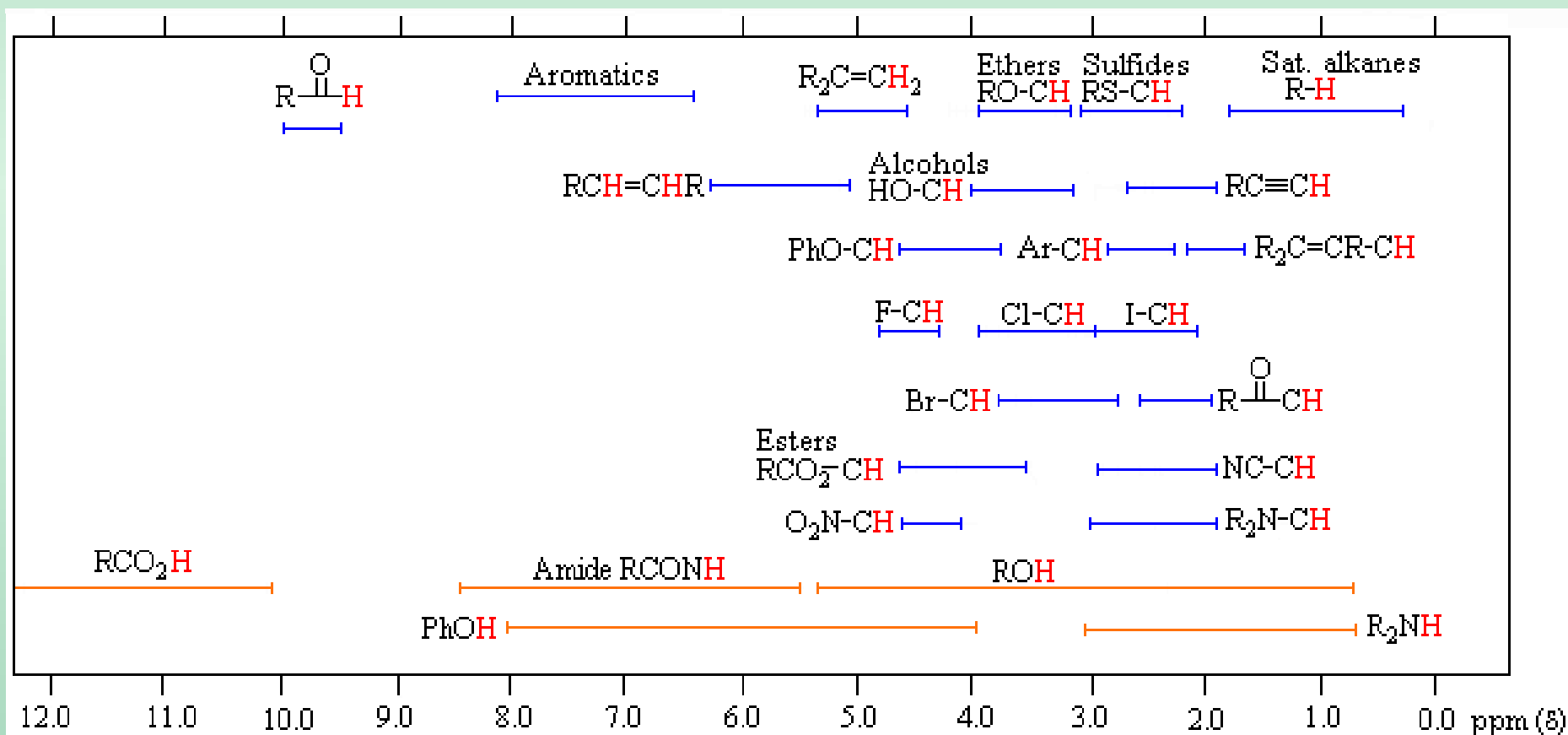
➤ Assim cada composto terá seu sinal único e característico





shift químico δ

- Para cada grupo funcional, é possível determinar as faixas do *shift* químico que refletem as mudanças do ambiente estrutural do grupo





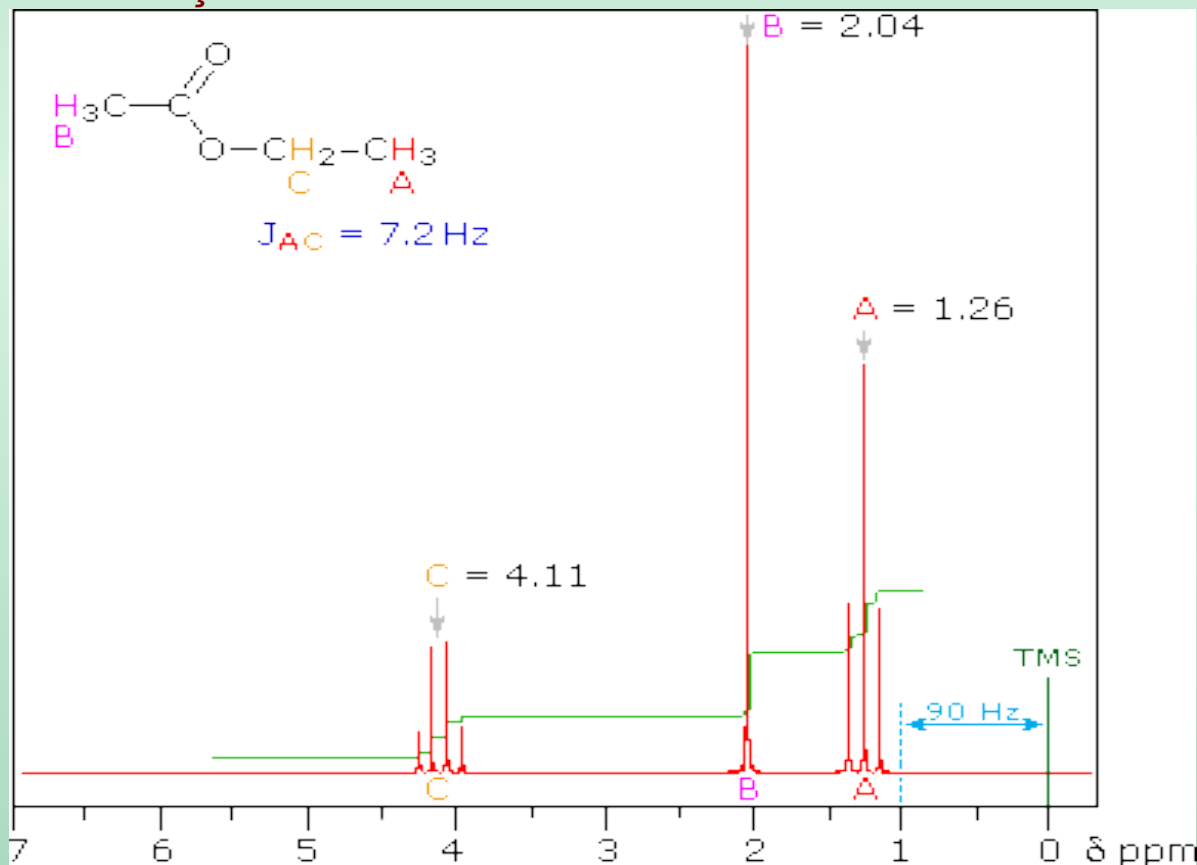
Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

Interação spin-spin

NMR e EPR

- O sinal pode apresentar divisões em dublete, triplete, quartete, etc. A divisão é pequena (0,1 a 20 Hz) e é denominada como constante de *coupling* (J).
- O fenômeno é baseado na interação se spins de núcleos de hidrogênio adjacentes e fornece informação detalhada sobre conectividade de átomos da molécula



➤ Triplete de $\text{CH}_3(\text{A})$

- 2 núcleos de $\text{H}(\text{C})$ equivalentes (spin 1/2) – Pelo Triângulo de Pascal, $2MI + 1 = 2(2)$ $(1/2) + 1 = 3$ linhas com razão 1:2:1

➤ Quartete de $\text{CH}_2(\text{C})$

- 3 núcleos de $\text{H}(\text{A})$ equivalentes (spin 1/2) – Pelo Triângulo de Pascal, $2MI + 1 = 2(3)$ $(1/2) + 1 = 4$ linhas



NMR de proteínas

➤ Amostras:

- Solução aquosa de proteína altamente purificada
- 300-600 µl de proteína com concentração de 0,1–3 mM.
 - 300 µl de fibrina (200 kDa) 0,1 mM → 6 mg
 - 600 µl de BSA (60 kDa) 3 mM → 108 mg
- Proteína pode ser natural ou recombinante
- Proteínas recombinantes são mais fáceis de preparar em quantidades grandes e permitem marcação isotópica, porém o enovelamento pode ser comprometido (expressão bacteriana de proteína de eucarionte)

➤ Os isótopos abundantes de carbono e oxigênio, ^{12}C e ^{16}O , não têm o spin nuclear

➤ O isótopo abundante de nitrogênio, ^{14}N , tem o spin nuclear $I=1$ com um grande momento quadrupolar – isso previne obtenção de informação de alta resolução

➤ Raros isótopos, ^{13}C e ^{15}N , tem o spin nuclear $I=1/2$

➤ Marcação isotópica pode ser feita através de crescimento da cultura recombinante em meios mínimos contendo somente uma fonte de carbono ^{13}C (glicose, glicerol ou metanol) e uma fonte de ^{15}N [NH_4Cl ou $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$].

➤ Organismos usados: bactéria *Escherichia coli* e levedura *Pichia pastoris*.



➤ Metodologia:

- Grandes moléculas de proteínas – o número de ressonâncias pode ser tipicamente milhares e assim, o espectro uni-dimensional terá inevitavelmente sobreposições acidentais
- espectros multi-dimensionais diminuem perigo de sobreposições
- Magnetização é feita em sequências de pulsos
 - Transferência da magnetização pelas ligações covalentes (*shift* químico)
 - Transferência da magnetização espacial sem respeito da estrutura
- Arranjo de experimentos:
 - *Heteronuclear single quantum correlation* HSQC
 - *bi-dimensional homonuclear NMR* com espectroscopia correlacional (COSY)
 - *Nuclear Overhauser effect* NOE
 - ^{13}C NMR
 - ^{17}N NMR



Universidade Federal do ABC

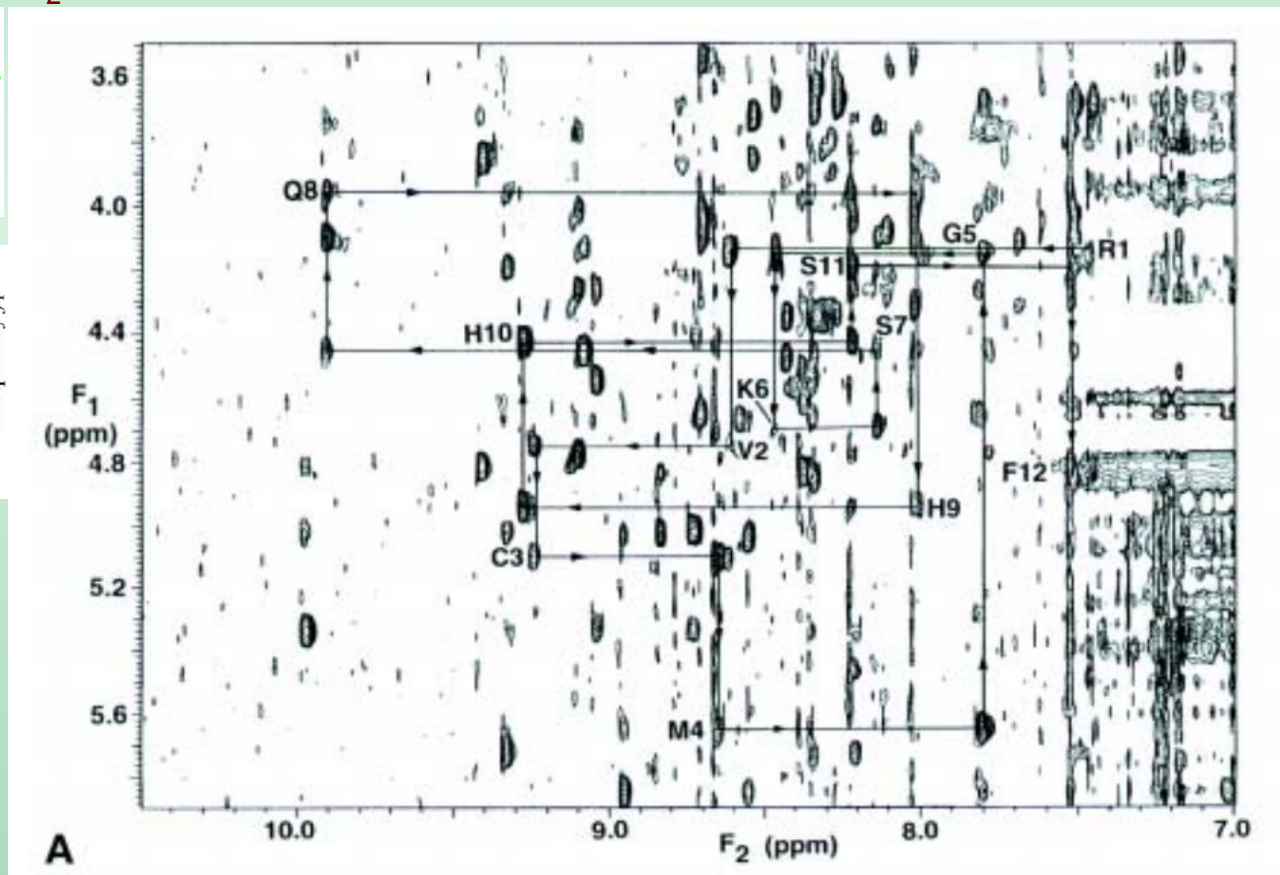
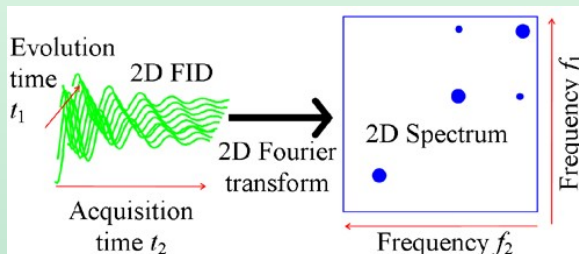
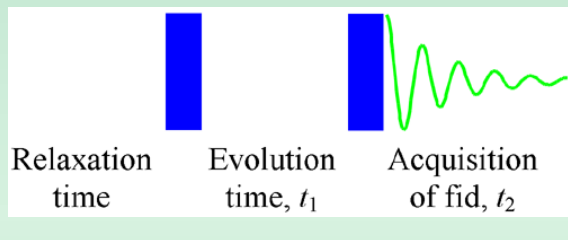
BC-1308 Biofísica

NMR de proteínas

NMR e EPR

➤ Espectros bi-dimensionais:

- varia-se tempo de evolução (t_1 , $t_1 + \Delta t$, $t_1 + 2 \cdot \Delta t$, ...)
- tempo de aquisição t_2 também pode ser variado





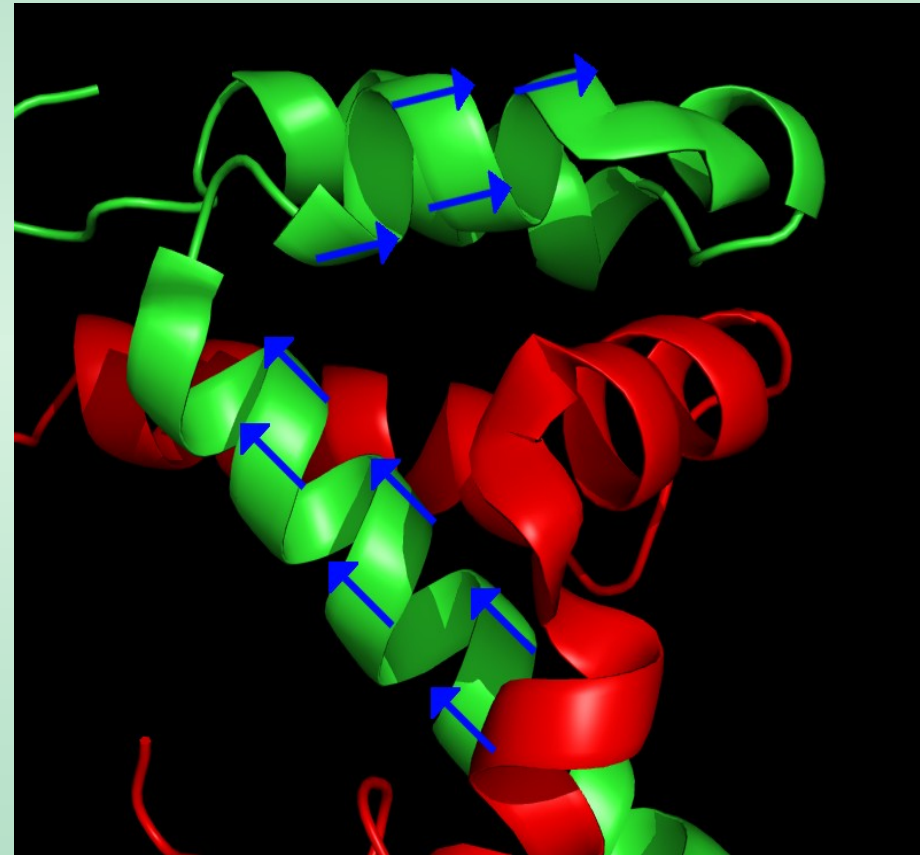
Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

NMR de proteínas

NMR e EPR

- Cetas azuis representam orientação de ligação N – H peptídica. Com a determinação de orientação de quantidade suficiente de ligações relativas ao campo magnético externo, a estrutura de proteína pode ser determinada.





Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

NMR e EPR

Aula 14

Ressonância paramagnética eletrônica

Jiří Borecký
CCNH
2014



EPR – introdução

- A espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica ou de ressonância de spin eletrônico (EPR, do inglês *electron paramagnetic resonance* ou ainda ESR, do inglês *electron spin resonance*):
 - detecta espécies contendo elétrons desemparelhados
 - espécies paramagnéticas.
- Em geral, esta condição verifica-se quando a espécie é:
 - um radical livre, se é uma molécula orgânica
 - metais de transição em complexos inorgânicos ou metaloproteínas.
- A teoria subjacente à técnica é análoga à de NMR, havendo lugar à excitação dos spins dos elétrons, ao invés dos spins dos núcleos atômicos.
- Campos magnéticos menos intensos e frequências mais elevadas são usadas em EPR que em NMR devido à diferença de massa entre núcleos e elétrons. Para elétrons em um campo magnético de 0,3 T, a ressonância de spin ocorre cerca de 10 GHz.



Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

EPR – introdução

NMR e EPR

- Esta técnica é menos usada nas medições diretas que a espectroscopia de ressonância magnética nuclear porque a maioria das moléculas possui uma configuração eletrônica de valência completa, sem elétrons desemparelhados.
- Maior uso da espectroscopia da ressonância paramagnética de elétrons é através das sondas de spin.



Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

EPR – espectrômetro

NMR e EPR





Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

EPR – princípio

NMR e EPR

➤ Origem do sinal da EPR:

- Elétrons desaparelhados têm spin $I=1/2$
- Na presença do campo magnético externo o momento magnético dos elétrons se alinha paralelamente com o campo ($m_s = -1/2$) ou antiparalelamente ($m_s = +1/2$) e cada estado tem energia diferente. A diferença de energia é dada

$$\Delta E = g_e \mu_B B_0$$

$$\epsilon = h \nu$$

$$\epsilon = \Delta E$$

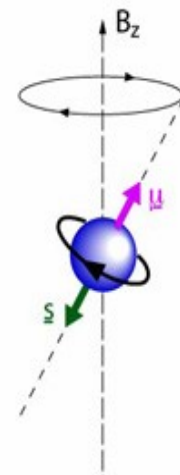
$$h \nu = g_e \mu_B B_0$$

Onde g_e é g-fator do elétron e μ_B é magneton de Bohr e ϵ é energia da radiação eletromagnética.

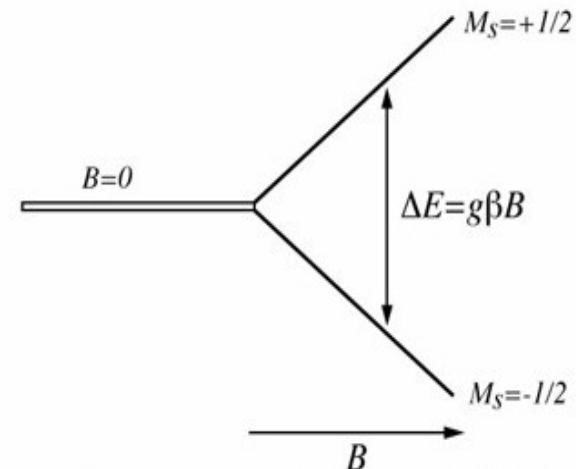
População: depende basicamente do campo aplicado **B** e da temperatura.

Distribuição de Maxwell / Boltzmann

$$\frac{N_{+1/2}}{N_{-1/2}} = e^{-\frac{\Delta E}{kT}}$$



precessing spin



electron energy levels in an applied field



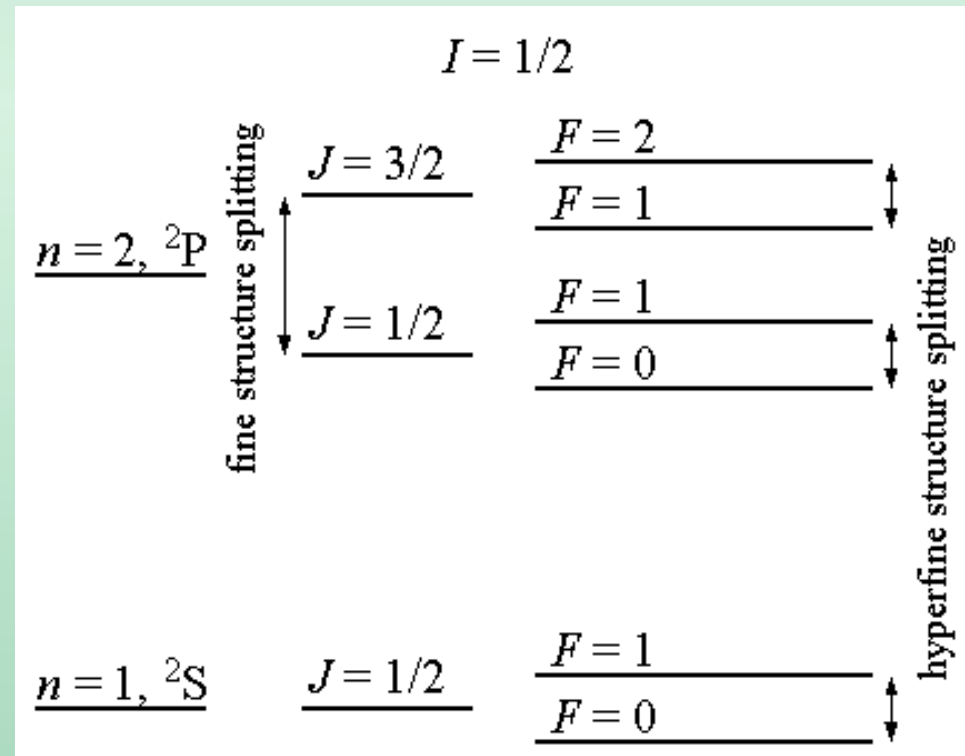
Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

EPR – estrutura fina/superfina

NMR e EPR

- estrutura fina - ocorre por causa de:
 - Interação entre momentos magnéticos associados ao spin de elétron e momento orbital angular de elétron
- estrutura superfina - ocorre por causa de:
 - Energia do momento de dipolo nuclear magnético em campo magnético gerado por elétrons
 - Energia do momento de quadrupolo nuclear elétrico em gradiente do campo elétrico por causa de distribuição da carga dentro do átomo





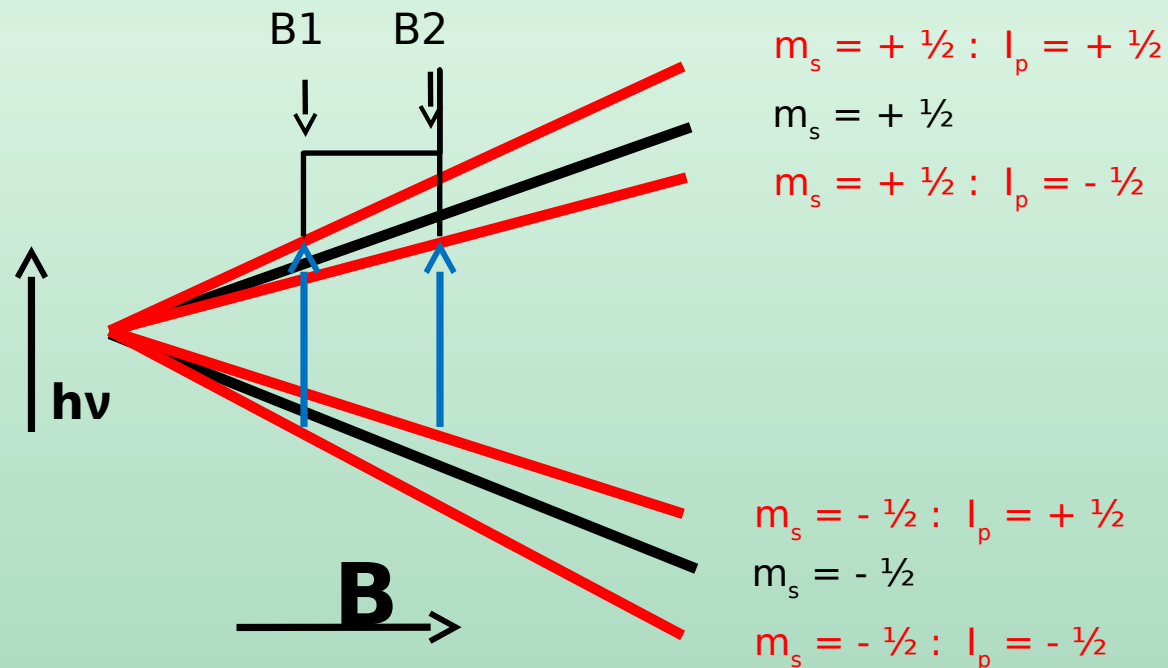
Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

EPR – estrutura superfina - acoplamento

NMR e EPR

- Alguns núcleos tem spin (I) que também perdem degenerescência na presença de um campo magnético B
- Spin eletrônico e nuclear e se acoplam (se somam e subtraem) gerando diferentes níveis de energia.



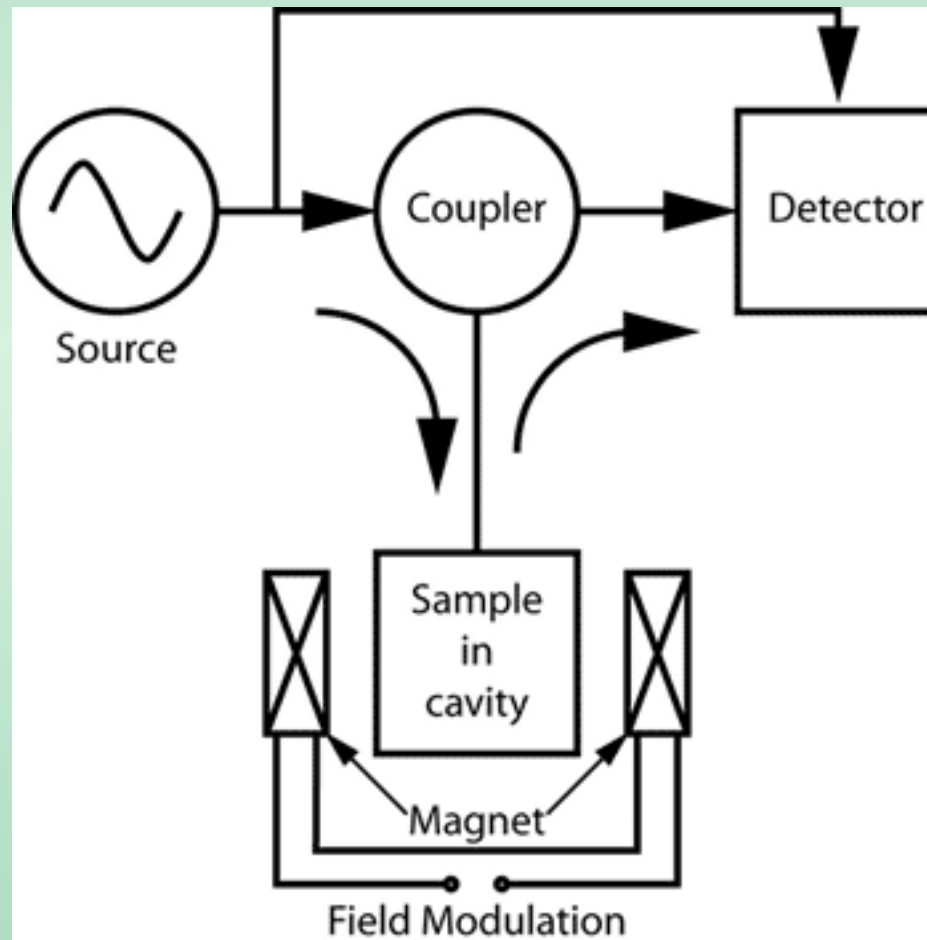


Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

EPR – espectrômetro de onda contínua

NMR e EPR





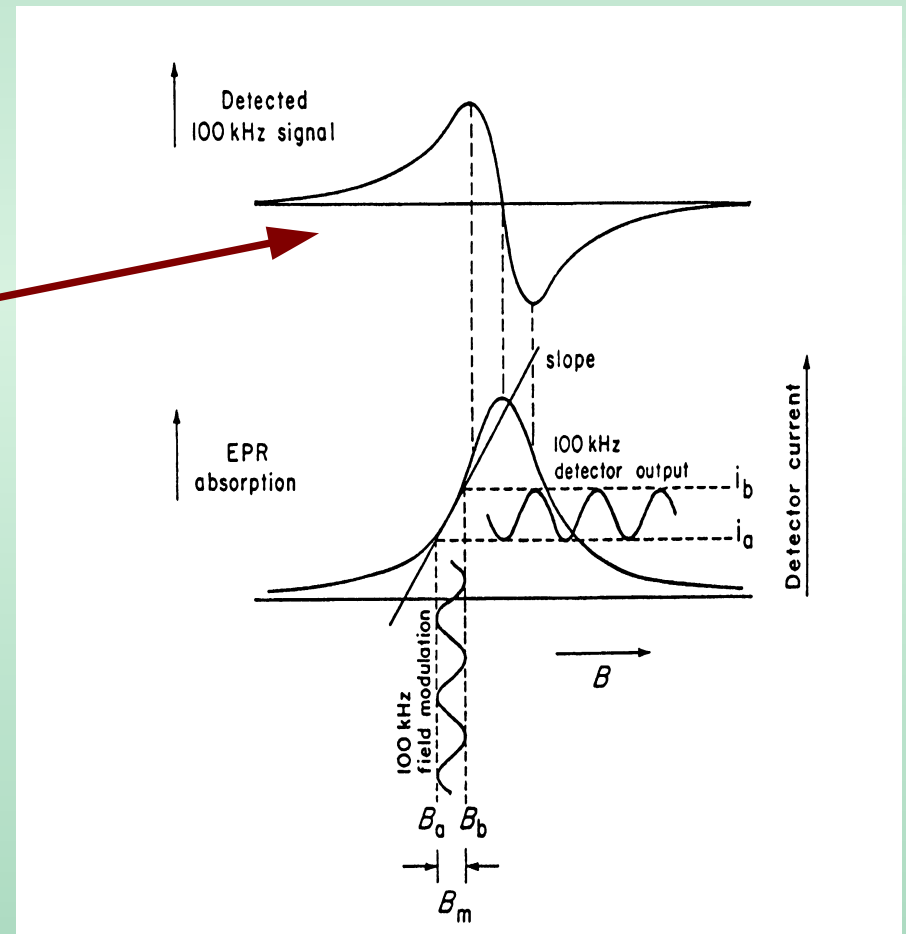
Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

EPR – detecção

NMR e EPR

- Na espectroscopia de EPR se usa mais a frequência de radiação constante com mudança de campo magnético
- Quanto o B_0 é mais próximo da transição maior sinal é emitido
- Na prática se usa 1ª derivada do sinal para que é possível registrar picos bastante próximos que ficariam ocultos no espectro bruto





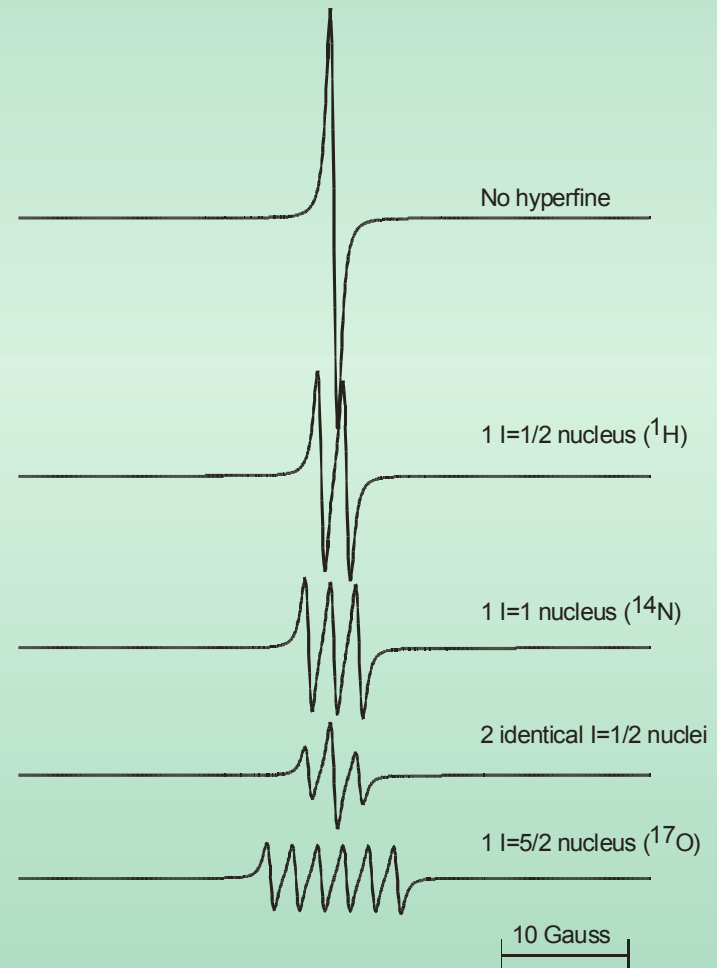
Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

EPR – detecção

NMR e EPR

- Estrutura hiperfina divide os picos em um conjunto de picos que depende em:
 - Spin do núcleo adjacente
 - Presença de um ou vários elétrons idênticos
 - Nas moléculas, o sinal pode ser afetado por proximidade de outros núcleos
- Diferentes núcleos tem diferentes spins
 - $I = \frac{1}{2} \rightarrow m_I = \frac{1}{2}; -\frac{1}{2}$ (H, P, ^{13}C)
 - $I = 1 \rightarrow m_I = 1; 0; -1$ (^{14}N)



Um gauss é igual a 10^{-4} tesla



Universidade Federal do ABC

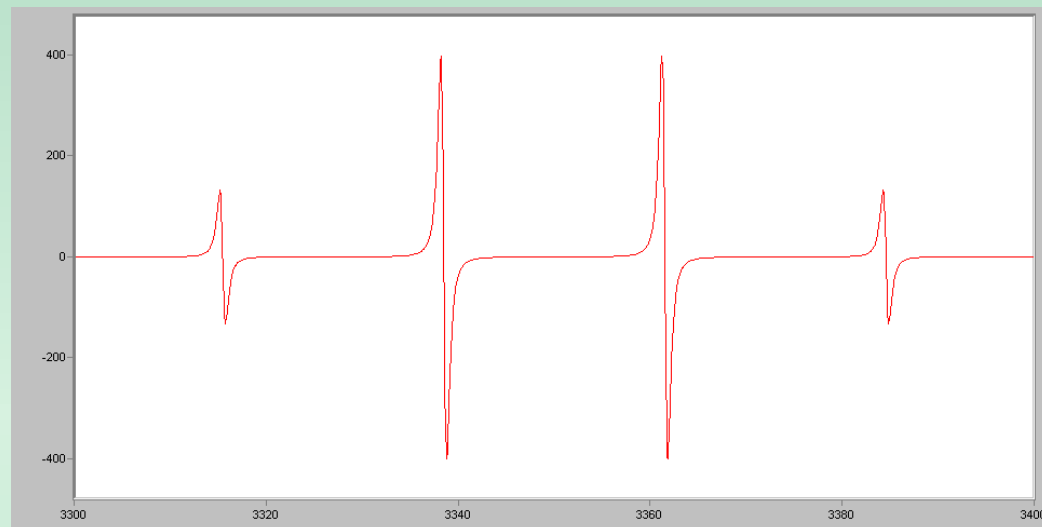
BC-1308 Biofísica

EPR – detecção

NMR e EPR

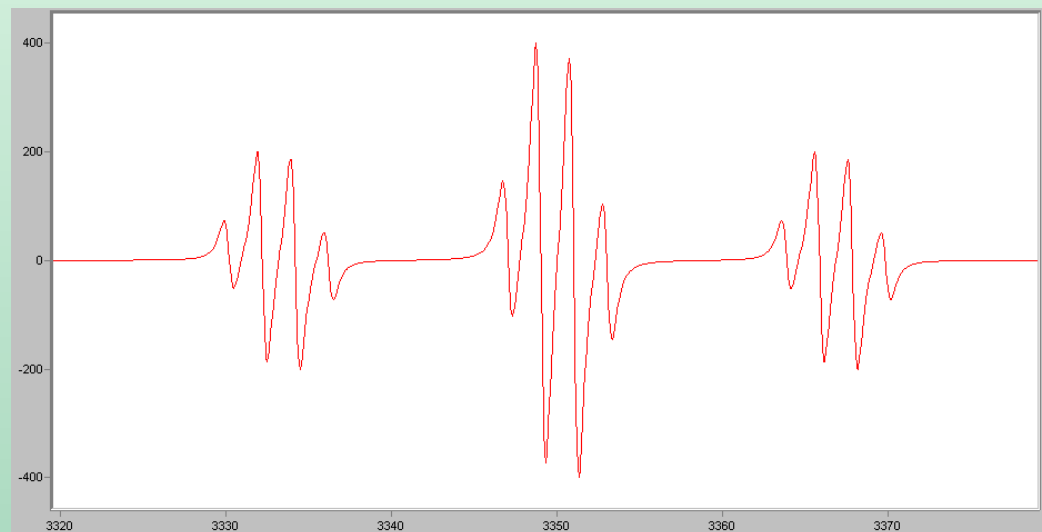
➤ Sinal de $\text{CH}_3\bullet$ radical:

- 3 núcleos de H equivalentes (spin $1/2$) – Pelo Triângulo de Pascal, $2MI + 1 = 2(3)(1/2) + 1 = 4$ linhas com razão 1:3:3:1



➤ Sinal de $\bullet\text{H}_2\text{C-O-CH}_3$ radical:

- 2 núcleos de H equivalentes (spin $1/2$) – Pelo Triângulo de Pascal, $2MI + 1 = 2(2)(1/2) + 1 = 3$ linhas com razão 1:2:1
- 3 núcleos de H equivalentes (spin $1/2$) – Pelo Triângulo de Pascal, $2MI + 1 = 2(3)(1/2) + 1 = 4$ linhas com razão 1:3:3:1
- O total será $3 \times 4 \Rightarrow 12$ linhas, um triplete de quartetos





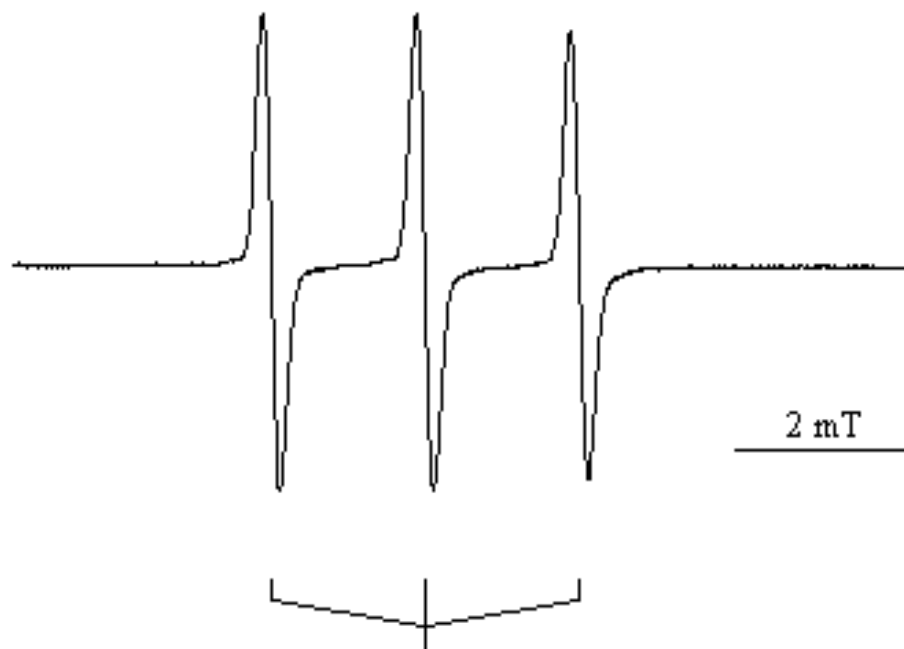
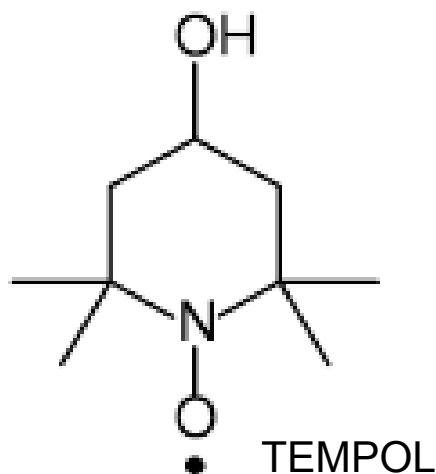
Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

EPR – detecção

NMR e EPR

- Sinal de TEMPOL (4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil) – um radical estável





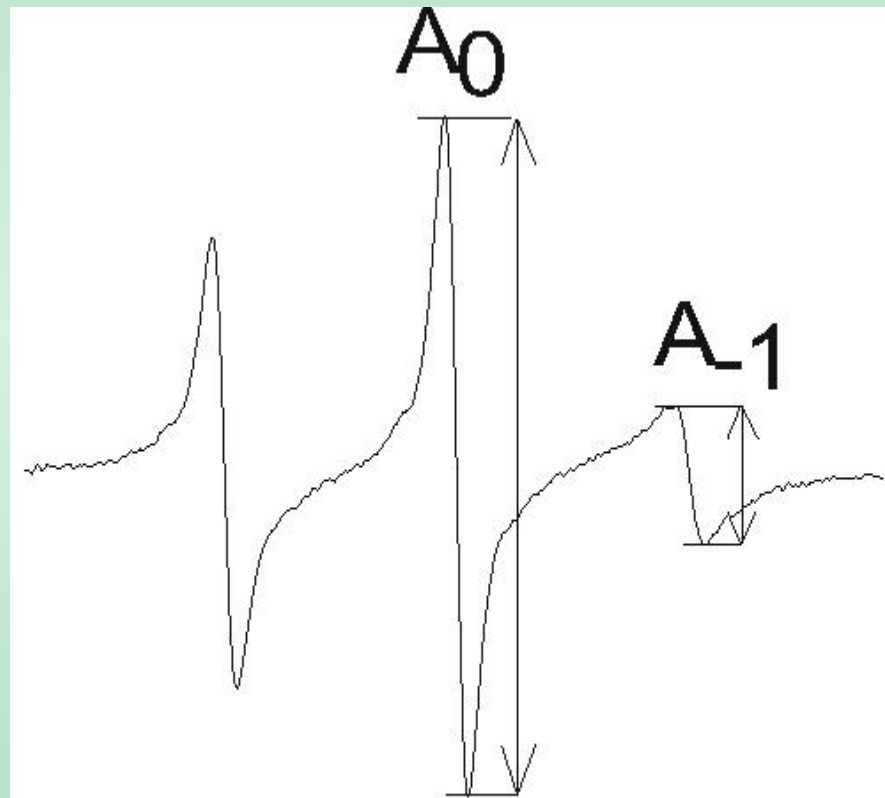
Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

EPR – uso

NMR e EPR

- A espectroscopia de EPR é usada:
- na física do estado sólido
 - em química na identificação e quantificação de radicais e na identificação de vias de reação química
 - em biologia e medicina na marcação de moléculas com sondas de spin
 - em bioquímica na identificação e caracterização estrutural de centros metálicos em metaloproteínas.



Typical EPR spectrum of nitroxyl spin label



Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

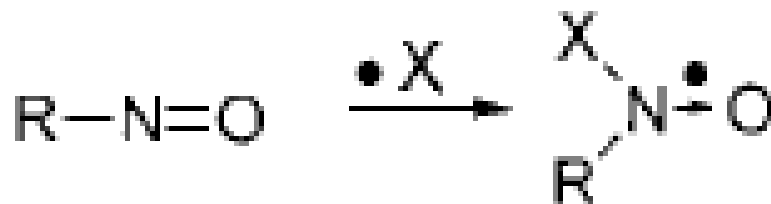
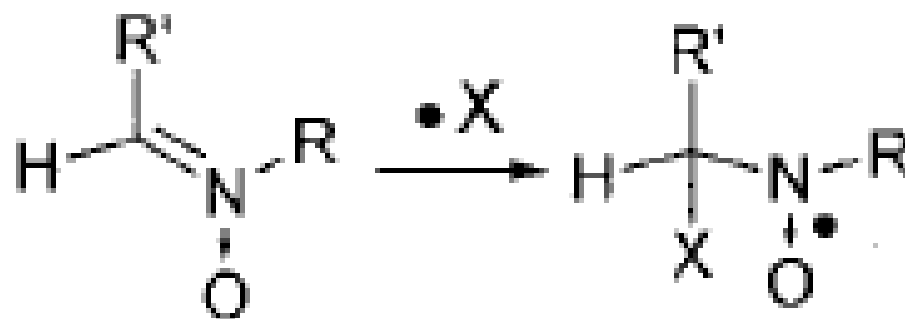
EPR – *spin-trap* (armadilha de spin)

NMR e EPR

➤ Técnica de *spin trapping*

➤ Classes de *spin trappings* mais comuns:

- Nitronas: radical se adiciona no C α
- Nitroso: radical se adiciona no N



(X = OR, OH, SR, CR₃, ROO, O₂⁻)



Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

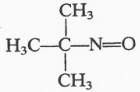
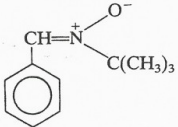
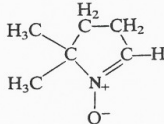
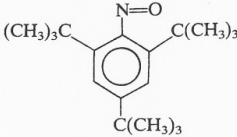
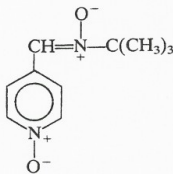
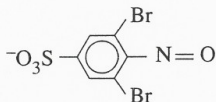
EPR – *spin-trap* (armadilha de spin)

NMR e EPR

➤ Escolha do *spin trapping*

➤ Critérios:

- cinética com o radical de interesse;
- estabilidade do radical derivado (tempo de vida);
- facilidade para interpretar o espectro de EPR do radical derivado;
- solubilidade do *spin trapping* em meio aquoso e meio hidrofóbico.

Name	Abbreviation	Structure
<i>tert</i> -Nitrosobutane (nitroso- <i>tert</i> -butane)	tNB (NBtB)	
α -Phenyl- <i>tert</i> -butylnitrone	PBN	
5,5-Dimethylpyrroline- <i>N</i> -oxide	DMPO	
<i>tert</i> -Butylnitrosobenzene	BNB	
α -(4-Pyridyl-1-oxide)- <i>N</i> - <i>tert</i> -butylnitrone	4-POBN	
3,5-Dibromo-4-nitroso-benzenesulphonic acid	DBNBS	

Spin traps also vary in their hydrophobicity; for example, DMPO (octanol: water partition coefficient 0.08) or POBN (0.09) will be much less useful in trapping radicals within membranes or lipoproteins than such species as PBN (partition coefficient 10.4).



EPR – *spin-trap* (armadilha de spin)

➤ *Spin trapping* de superóxido e radical hidroxil

TABLE 2. APPARENT SECOND ORDER RATE CONSTANTS (K_{APP}) FOR THE TRAPPING OF SUPEROXIDE OR HYDROXYL RADICALS, PARTITION COEFFICIENTS (K_p), AND TOXICITY OF COMMONLY USED NITRONE SPIN TRAPS, AND HALF-LIVES ($T_{1/2}$) OF THEIR CORRESPONDING SPIN ADDUCTS

Spin traps	$O_2^{\cdot-}$ trapping*		$\cdot OH$ trapping†		Partition coefficient (K_p)‡	Toxicity	
	k_{app} ($M^{-1} s^{-1}$)	$t_{1/2}$ (min)	k_{app} ($/10^{-9} M^{-1} s^{-1}$)	$t_{1/2}$ (min)		Cells [IC_{50} (mM)]	Animals (mg/100 g)§
DMPO	50 ⁽⁸⁶⁾ –60 ⁽¹⁸⁾	1 ⁽⁸⁶⁾	1.9 ⁽⁸⁷⁾ –3.4 ⁽¹⁸⁾	55 ⁽⁸⁷⁾	0.1 ⁽³⁴⁾	138 ⁽²⁹⁾	<200 ⁽⁷¹⁾
EMPO	—	8.6 ^(77, 98)	5.0 ⁽⁸⁷⁾	127 ⁽⁸⁷⁾	0.15 ⁽⁷⁷⁾	—	—
DEPMPO	60 ⁽⁸⁶⁾ –90 ⁽¹⁹⁾	14 ⁽⁸⁶⁾	4.8 ⁽⁸⁷⁾ –7.8 ⁽¹⁹⁾	132 ⁽⁸⁷⁾	0.06 ⁽¹⁾	<25 ⁽⁴⁵⁾	—
DIPPMPO	—	~23 ⁽⁷⁾	4.6 ⁽⁸⁷⁾	158 ⁽⁸⁷⁾	2.1 ⁽⁷⁾	—	—
PBN	N/A	N/A	6.1–8.5 ⁽⁶⁵⁾	0.8 ⁽³³⁾	15 ⁽³⁴⁾	9.4 ⁽²⁹⁾	<100 ⁽⁷¹⁾
4-PyOBN	N/A	N/A	4.0 ⁽⁶⁵⁾	0.2 ⁽³³⁾	0.15 ⁽³⁴⁾	5.4 ⁽²⁹⁾	<100 ⁽⁷¹⁾

References are given as superscripts. A dash indicates data not reported. N/A, not applicable.

*Using a riboflavin-light radical generating system in phosphate buffer, pH 7.0.

†Radical sources: Janzen *et al.* (33) and Villamena *et al.* (87) with UV photolysis of H_2O_2 ; Rosen *et al.* (65) with ionizing radiation- N_2O ; Finkelstein *et al.* (18) and Frejavi *et al.* (19) with Fe^{2+} - H_2O_2 .

‡In 1-octanol/phosphate buffer system, pH 7.4.

§On Sprague-Dawley rats as lethal doses.



Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

EPR – *spin-trap* (armadilha de spin)

NMR e EPR

- A espectroscopia de EPR de proteína marcada por armadilha de spin (3,5-dibromo-4-nitroso-benzenosulfonato – DBNBS)
- DBNBS se liga a tirosina formando um radical estável

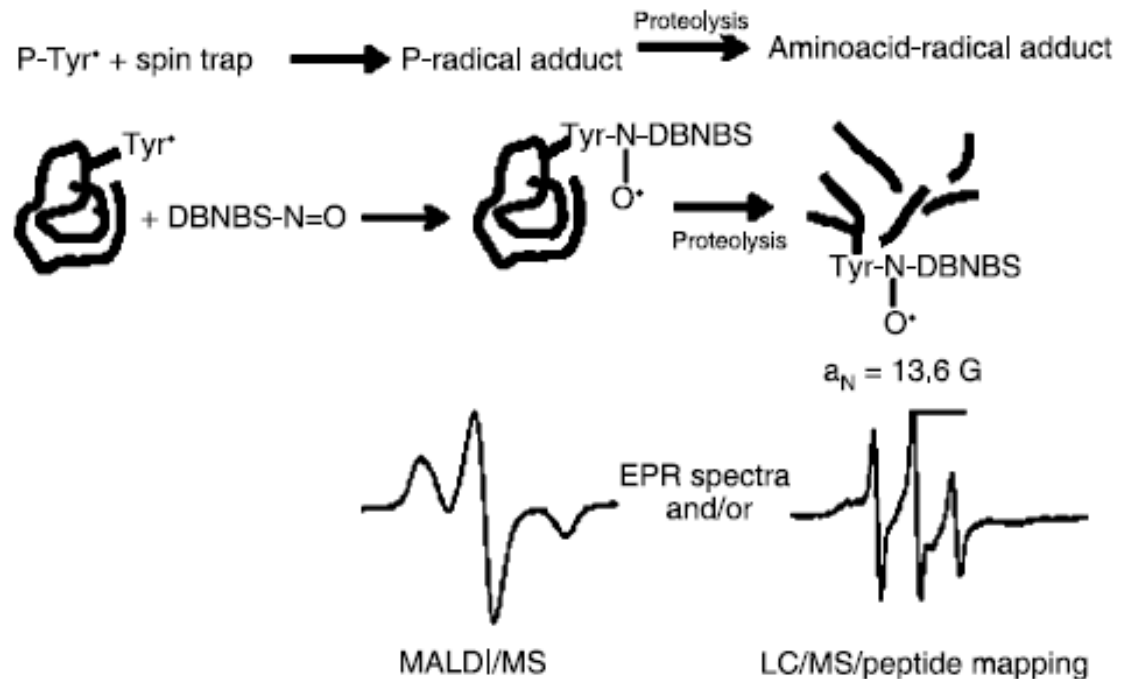


Fig. 2. Schematic representation of the spin-trapping of a protein radical and of analytical techniques employed to characterize the trapped radical. In the example, a protein-tyrosyl radical is trapped with the spin-trap DBNBS (DBNBS-N=O). The resulting P-radical adduct can be detected by EPR and/or MS spectra. To identify the trapped amino acid residue(s), the P-radical adduct is submitted to proteolysis and further EPR and LC/MS/peptide mapping analysis



Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

EPR – *spin labelling* (marcação pelo spin)

NMR e EPR

- A proteína pode ser marcada por uma sonda de spin de derivado de metanotiosulfato
- Diferentes sondas têm tamanhos e flexibilidades diferentes
- Enovelamento da proteína vai definir espaço de movimentos restritos da marcação

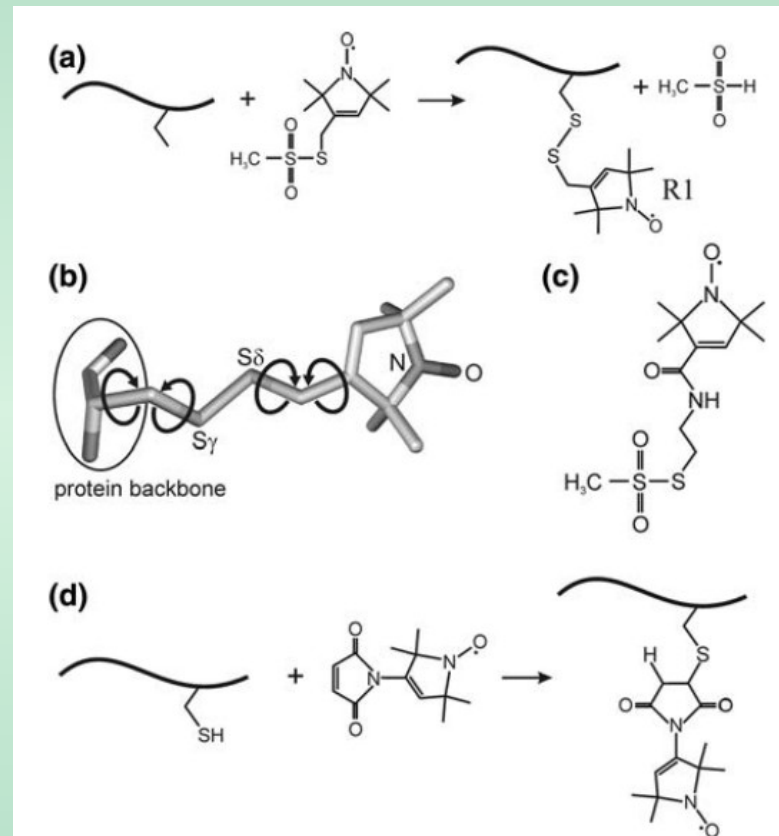


Fig. 1 **a** Reaction of the methanethiosulfonate spin label (MTSSL) with the sulfhydryl group of a cysteine side chain, generating the spin label side chain R1. **b** Flexible bonds within the R1 side chain are indicated. **c** Chemical structure of the MTS-4-oxyl spin label. **d** Reaction of a maleimide spin label *N*-(1-oxyl-2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidinyl)maleimide with the sulfhydryl group of a cysteine side chain



Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

EPR – *spin labelling* (marcação pelo spin)

NMR e EPR

- A proteína pode ser marcada por uma sonda de spin TOAC “dentro” da α -hélice
- A TOAC tem movimentos bastante restritos pela posição – para cima e para baixo, ao longo da hélice

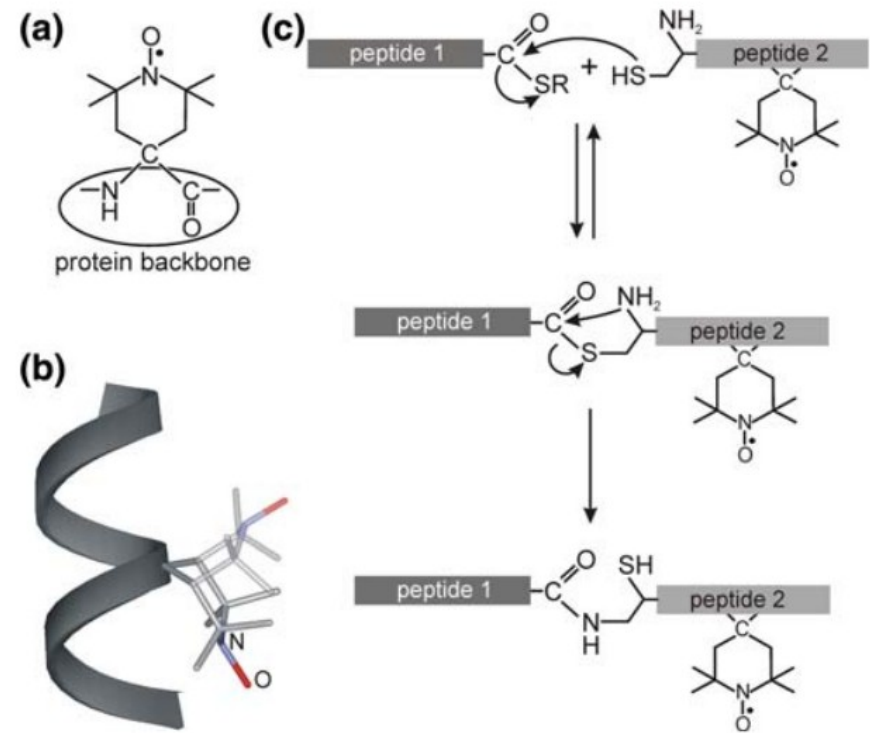


Fig. 2 **a** TOAC amino acid spin label. *Upper panel:* chemical structure. *Bottom panel:* three-dimensional structure of the spin label incorporated into an α -helix. **b** The flip of the six-membered ring as the only possible degree of freedom is shown in *shaded representation*. **c** Native and expressed protein ligation (IPL, EPL). The chemical ligation occurs between a C-terminal thioester (peptide 1) and a sulfhydryl group of an N-terminal Cysteine (peptide 2). After rearrangement through an N \rightarrow S acyl shift, a peptide bond is formed



Universidade Federal do ABC

EPR – *spin labelling* (marcação pelo spin)

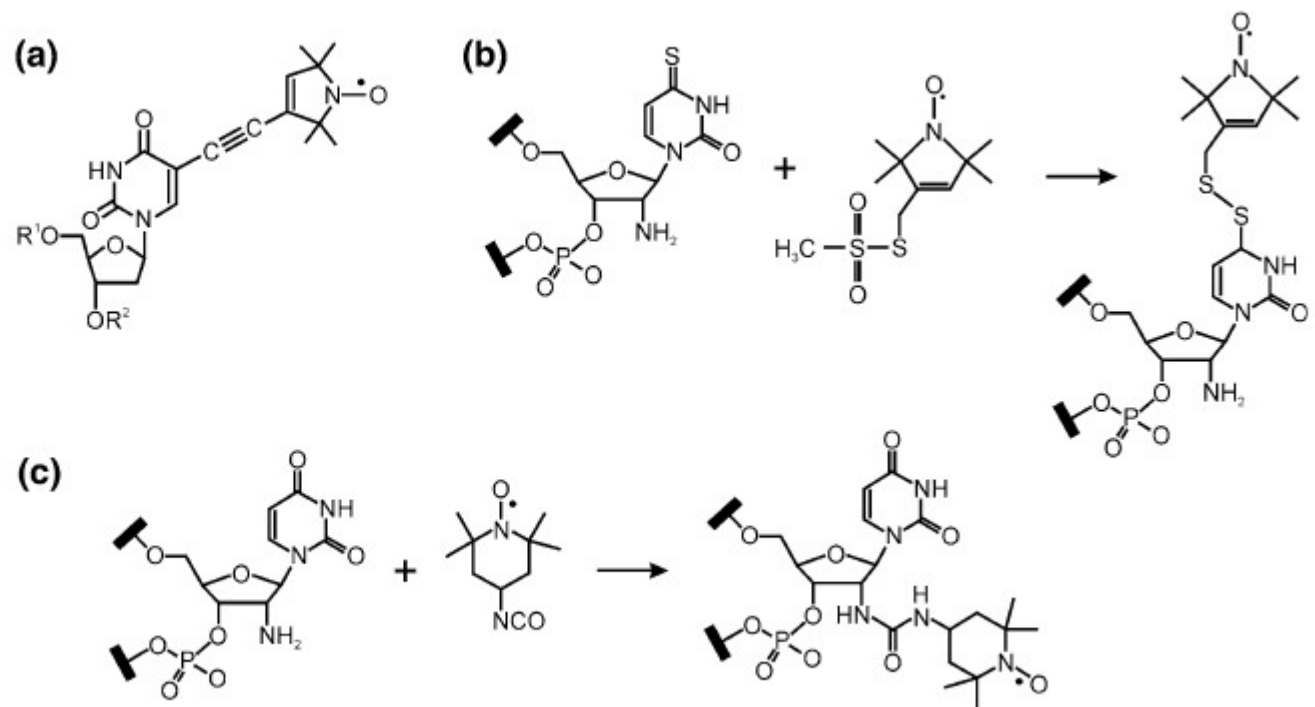
BC-1308 Biofísica

NMR e EPR

- Marcação de ácidos nucleicos pode ser feita pela modificação das bases ou do açúcar

Fig. 3 Spin labeling of nucleic acids. **a** Nitroxide spin-labeled thymidine analog. **b**

Modification of 4-thiouridine with MTSSL. **c** Modification of the sugar moiety of nucleotides; postsynthetic derivatization of a 2'-amino group introduced into oligonucleotides with the chemically reactive isocyanate derivative of a TEMPO-like moiety (figure modified according to Edwards et al. 2001)





Universidade Federal do ABC

BC-1308 Biofísica

EPR – *spin labelling* (marcação pelo spin)

NMR e EPR

- Análise da mobilidade de proteínas marcadas por spin
 - Medição da largura da linha central
 - Determinação do 2º momento central (variância)
- Marcação menos restrita tem sinal com a largura da linha central mais estreita e menos divisões por estrutura hiperfina

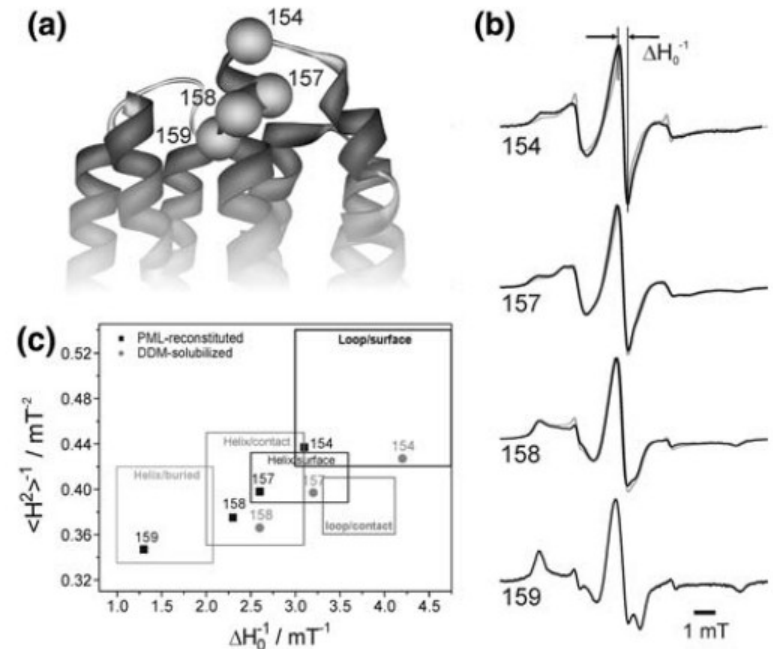


Fig. 4 Mobility analysis of spin labeled proteins. **a** *Ribbon representation* of the NpSR II X-ray structure (Luecke et al. 2001). C α atoms of spin-labeled sites are depicted as balls (S154R1, K157R1, S158R1, L159R1). **b** X-band EPR spectra of NpSR II solubilized in DDM (gray) or reconstituted in purple membrane lipids (black). **c** Mobility map. The values of the inverse second moment, $\langle H^2 \rangle^{-1}$, and of the inverse of the central linewidth, ΔH_0^{-1} , of solubilized (gray circles) and reconstituted NpSR II (black squares) were determined from the spectra shown in panel b. The topological regions of a protein are indicated by boxes according to Isas et al. (2002) and McHaourab et al. (1996)



EPR – sondas de spin

➤ A espectroscopia de EPR de ligação de ácido DOXYL-esteárico (sonda de spin) com proteína desacopladora na mitocôndria de tecido adiposo marrom de hamster. A esquerda: efeito do ATP, à direita efeito do substrato competidor

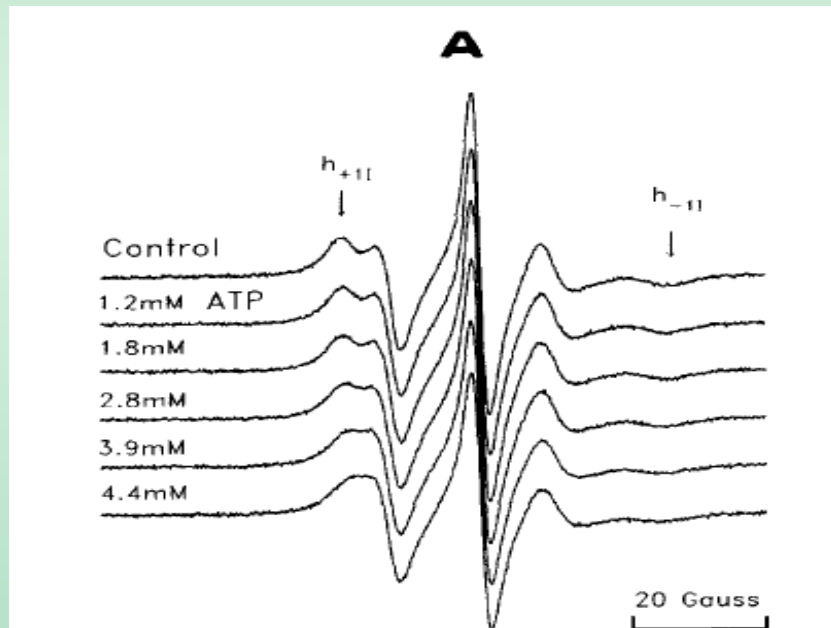


Fig. 4. EPR spectra of 5-DOXYL-stearic acid bound to the uncoupling protein after addition of ATP. (A) Series of subsequent ATP additions; ATP was added after 5-SASL to the UcP sample at concentrations indicated at each trace. The ATP stock solution contained 2% octylpenta-oxyethylene. (B) Re-binding of the 5-SASL in the presence of ATP

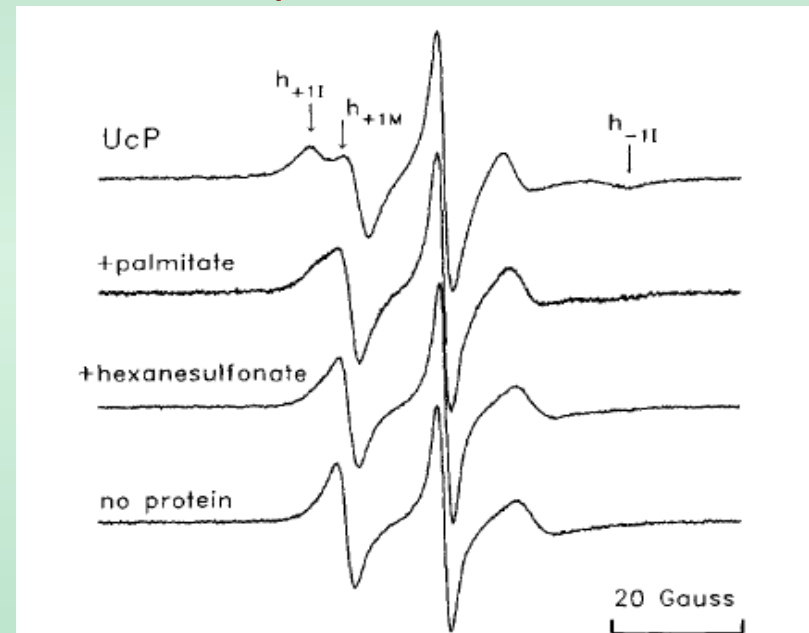


Fig. 1. EPR spectra of 5-DOXYL-stearic acid bound to the uncoupling protein and their changes after addition of palmitic acid and hexanesulfonate. Traces from the top: (1) control; (2) 2 mM palmitic acid; (3) 27 mM hexanesulfonate; (4) 2% octylpenta-oxyethylene, no protein. 124 μ M 5-SASL and 30 μ M (2 mg/ml) uncoupling protein were present in 5 mM TEA-TES, 30 mM TEA₂SO₄, 0.2 mM TEA-EDTA, pH 7.2. Palmitic acid and hexanesulfonate stock solutions contained 2% octylpenta-oxyethylene in order to keep a constant viscosity. The arrows indicate peaks of the immobilized (h_{+11} and h_{-11}) and mobile probe (h_{+1M}).