

LABINC
Laboratório de Química
Bioinorgânica e Cristalografia

Técnicas aplicadas al desarrollo de metalofármacos

"Técnicas espectroscópicas: UV-vis, Espectroeletróquímica, Mössbauer e Magnetoquímica Aplicadas em Química bioinorgânica "

Prof. Dr. Ademir Neves

Departamento de Química – UFSC
LABINC – Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia
e-mail: ademir@qmc.ufsc.br
phone: (55)48 – 3721-6852 r-219

LABINC
Laboratório de Química
Bioinorgânica e Cristalografia

Métodos Experimentais na Química Bioinorgânica

- Conhecer os princípios básicos dos diversos métodos experimentais utilizados na química bioinorgânica e utiliza-los na identificação de metaloproteínas e complexos modelos

LABINC
Laboratório de Química
Bioinorgânica e Cristalografia

Técnicas Espectroscópicas são de fundamental importância na Química Bioinorgânica e podem contribuir para:

- Qual átomo metálico compõe o sítio ativo das metaloenzimas;
- Qual tipo de ligante compõe o ambiente de coordenação;
- Estado de oxidação dos átomos metálicos;
- Transições eletrônicas e nucleares presentes no sítio ativo;
- Movimentos vibracionais e rotacionais.

LABINC
Laboratório de Química
Bioinorgânica e Cristalografia

Espectro Eletromagnético

transições nucleares transições das camadas eletrônicas transições eletrônicas da camada de valência vibração molecular rotação molecular spin nuclear

Raio-γ	Raio-x	uv	visível	iv	microondas	ondas de rádio
--------	--------	----	---------	----	------------	----------------

A soma de informações obtidas por diversas técnicas de investigação, aliado a um trabalho de comparação dos resultados com modelos sintéticos, vão gerar informações sobre o sítio ativo da enzima, possibilitando, assim, a proposta de modelos para o complicado "quebra-cabeças" que é o sítio ativo de uma metaloenzima.

LABINC
Laboratório de Química
Bioinorgânica e Cristalografia

Espectroscopia eletrônica

- luz visível, o ultravioleta próximo e o infravermelho próximo, é a região do espectro que fornece informações sobre transições eletrônicas presentes em moléculas.
- Duas importantes informações são supridas por esta técnica:
 - A energia necessária para que a transição ocorra (comprimento de onda); $\Delta E = h\nu = hc/\lambda$.
 - A facilidade (probabilidade) com que esta transição é realizada.

Pode-se obter dados acerca de:

- Tipo de ligantes coordenados ao átomo metálico
- A geometria de coordenação do mesmo.

lei de Lambert-Beer: $A = \log(I_0/I) = \epsilon cl$

LABINC
Laboratório de Química
Bioinorgânica e Cristalografia

Possíveis Transições Eletrônicas e as energias envolvidas

$\sigma \rightarrow \sigma^* \lambda \cong 125 \text{ nm ex. CH}_4$
 $n \rightarrow \sigma^* \lambda \cong 150 - 250 \text{ nm ex. H}_2\text{O}$, ($\epsilon = 10 - 100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
 $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^* \lambda \cong 200 - 800 \text{ nm}$ ($\epsilon = 1000 - 10.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

Efeito do solvente: ex. Bandas $n \rightarrow \pi^*$ são deslocadas para maiores energias com aumento da polaridade do solvente. Aumento a solvatação do lone-pair.

LABINC
Laboratório de Química
Bioinorgânica e Cristalografia

1) Transferência de carga;
2) Transições d-d
3) Intervalência.

O valor de ϵ é governado pelas chamadas regras de seleção:

1. Multiplicidade de spin.
2. Regras de La Porte

Representação das transições eletrônicas comumente observadas em complexos metálicos - Metaloproteínas.

LABINC
Laboratório de Química
Bioinorgânica e Cristalografia

Biological roles: Mammalian PAPs - iron transport during pregnancy and macrophage-specific generation of ROS, may be associated with metabolic bone diseases, such as osteoporosis, and cancers with bone metastases.
Plant PAPs - may play a crucial role in mobilizing organic phosphate esters in the soil during germination.
PAP enzymes are targets for the design of drugs for a wide variety of disorders

Uteroferrina - Fe^{III}Fe^{II}

Sítio Ativo Fe^{III}Fe^{II} animais
Fe^{III}M^{II} M^{II} = Zn, Mn plantas

LABINC
Laboratório de Química
Bioinorgânica e Cristalografia

$Fe^{III}Fe^{II} + 1e^- \leftrightarrow Fe^{III}Fe^{III}$

Forma ativa $E = 340mV$ (NHE) pH = 6 Forma inativa
Rosa $\lambda = 515$ nm $E = 307mV$ (NHE) pH = 6 Púrpura $\lambda = 560$ nm
($\epsilon = 4000$ M⁻¹cm⁻¹) ($\epsilon = 4000$ M⁻¹cm⁻¹)

Cor é resultante de: LMCT do tipo: $\pi(tirosina) \rightarrow d\pi Fe^{III}$

P. V. Bernhardt, G. Schenk, G. J. Wilson, Direct Electrochemistry of Porcine Purple Acid Phosphatase (Uteroferrin), *Biochemistry* 43 (2004) 10387-10392. *Biochemistry* 30 (1991) 8187-8194.

LABINC
Laboratório de Química
Bioinorgânica e Cristalografia

$Fe^{II}Fe^{II} + 1e^- \leftrightarrow Fe^{III}Fe^{II}$

Forma ativa $E = 340mV$ (NHE) Forma inativa
Rosa $\lambda = 515$ nm Púrpura $\lambda = 560$ nm
($\epsilon = 4000$ M⁻¹cm⁻¹) ($\epsilon = 4000$ M⁻¹cm⁻¹)

Conclusões: 1) Presença de tirosina coordenada a apenas um dos centros de ferro; 2) uma ou mais tirosinas coordenadas ao sítio de ferro responsável pelas propriedades do cromóforo. 3) Um dos átomos de ferro é passível de redução, o qual não deve possuir tirosina coordenada. 4) O átomo de Fe^{III} contém a tirosina

LABINC
Laboratório de Química
Bioinorgânica e Cristalografia

Propriedades UV-Vis de Biomiméticos para as Uf

Espectro eletrônico: $\lambda_{max} = 540$ nm ($\epsilon = 4560$ M⁻¹cm⁻¹)
LMCT do tipo: $\pi(\text{fenolato}) \rightarrow d\pi Fe^{III}$

$\lambda_{max} = 1050$ nm ($\epsilon = 60$ M⁻¹cm⁻¹) – Banda de intervalência
Classe II Robin and Day

LABINC
Laboratório de Química
Bioinorgânica e Cristalografia

O Complexo Creutz-Taube

J. Am. Chem. Soc. 1969, 91, 3988

$\lambda_{max} = 1560$ nm
 $\epsilon = 5500$ M⁻¹cm⁻¹

LABINC
Laboratório de Química
Bioinorgânica e Cristalografia

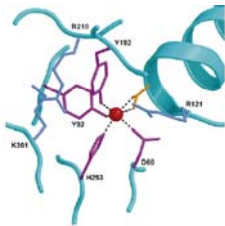
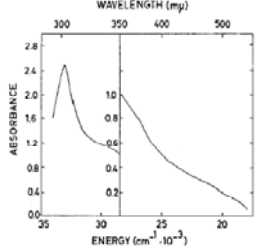
Transferrinas

Transferrina é a denominação genérica de uma classe de proteínas não-heme relacionadas com o transporte e a regulação dos níveis de ferro em vertebrados.

- sototransferrina (plasma sanguíneo)
- lactoferrina (leite, fluidos de secreção e leucócitos)
- ovotransferrina ou conalbumina (clara do ovo)
- melanotransferrina (melanomas)

LABINC
Laboratório de Química
Bioinorgânica e Cristalografia

"Ferro-Transferrina – Um excelente exemplo de aplicação da espectroscopia eletrônica na "Química Bioinorgânica"

The Amino Acids that bind and hold iron in a N-terminus Transferrin lobe.

$\text{d}\pi_{(\text{tyrosine})} \rightarrow \text{d}\pi^*$
 $\epsilon = 4000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
2000/tyr

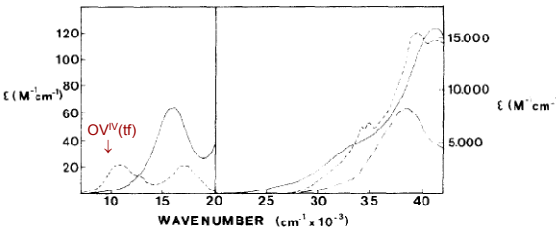
LABINC
Laboratório de Química
Bioinorgânica e Cristalografia

Além do ferro, as transferrinas podem coordenar-se a muitos outros íons metálicos, como, Mn, Cr, Co, V, alguns dos quais sugere-se que apresentem funções fisiológicas

A administração de sulfato de vanádio na dieta de ratos inibe carcinomas mamários induzidos quimicamente

Propõe-se:
liberação do grupo VO^{2+} para o tecido neoplásico, o qual é particularmente um rico receptor de transferrinas, represente a primeira etapa na inibição de carcinomas pelo vanádio.

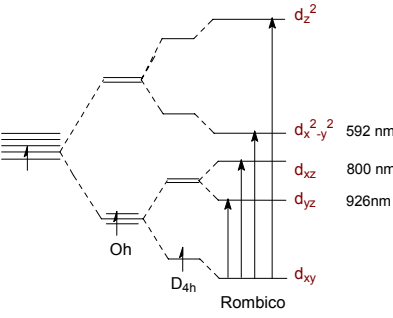
LABINC
Laboratório de Química
Bioinorgânica e Cristalografia



$[\text{OVIV}(\text{tf})]:$ 926 (25); 800 (15); 592 (25)
 $d_{xy} \rightarrow d_{yz}; d_{xy} \rightarrow d_{xz}; d_{xy} \rightarrow d_{x^2-y^2}$

I. Bertini, J. Inorg. Biochem. 25, 57-60 (1985)

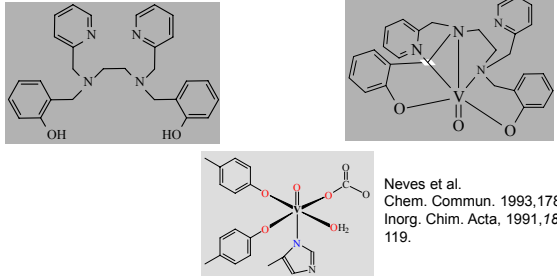
LABINC
Laboratório de Química
Bioinorgânica e Cristalografia



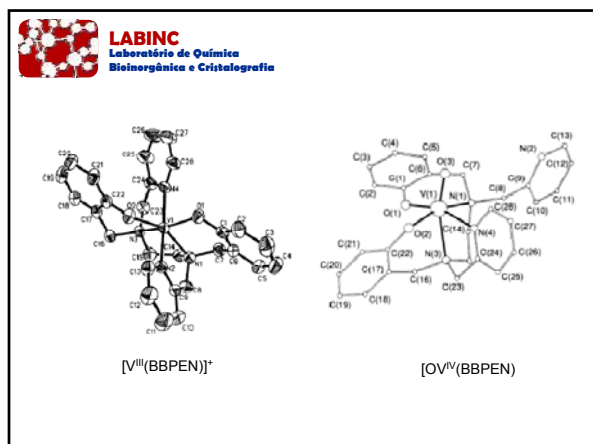
Esclarecimento para as transições observadas na $[\text{OVIV}(\text{tf})]$

LABINC
Laboratório de Química
Bioinorgânica e Cristalografia

Complexos Modelos para as V-transferrinas



Neves et al.
Chem. Commun. 1993,1782.
Inorg. Chim. Acta, 1991,187, 119.



LABINC
Laboratório de Química
Bioinorgânica e Cristalografia

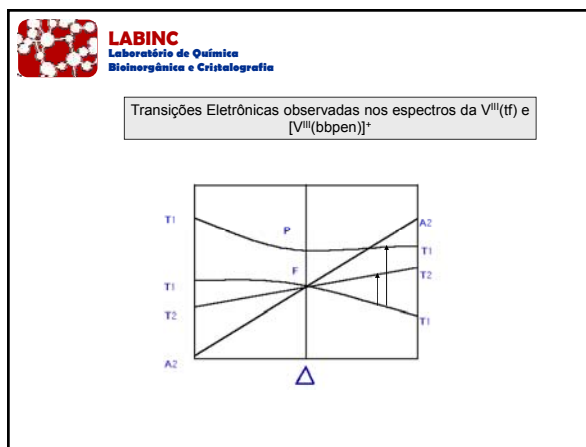
Dados espectrais UV-Vis para o modelo [OV^{IV}(BBPEN)] e [OV^{IV}(transferrina)].

Complexo	$\lambda_{\max, nm}$ ($\epsilon, M^{-1} cm^{-1}$)	transição
[OV ^{IV} (BBPEN)]	925 (75), 870 (70) 555 (125) 405 (940)	$d_{xy} \rightarrow d_{yz}$ e $d_{xy} \rightarrow d_{xz}$ $d_{xy} \rightarrow d_{x^2-y^2}$ $\pi_{\text{fenolato}} \rightarrow V^{IV}$
[OV ^{IV} (tf)]	926 (25), 800 (15) 592 (25)	$d_{xy} \rightarrow d_{yz}$ e $d_{xy} \rightarrow d_{xz}$ $d_{xy} \rightarrow d_{x^2-y^2}$

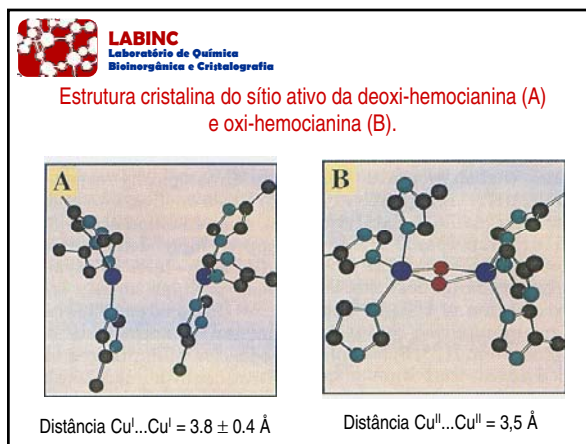
LABINC
Laboratório de Química
Bioinorgânica e Cristalografia

Comparação UV-Vis do Modelo com a [V^{III}(tf)]

Complexo	$\lambda_{\max, nm}$ ($\epsilon, M^{-1} cm^{-1}$)	transição
[V ^{III} (BBPEN)]	612 (75), 500 (70) 348 (2280)	${}^3T_{1g} \rightarrow {}^3T_{2g}$ ${}^3T_{1g} \rightarrow {}^3T_{1g} (P)$ $\pi_{\text{fenolato}} \rightarrow V^{III}$
[V ^{III} (tf)]	636 (25), 444 (15) 380 (2000)	${}^3T_{1g} \rightarrow {}^3T_{2g}$ ${}^3T_{1g} \rightarrow {}^3T_{1g} (P)$ $\pi_{\text{tirosina}} \rightarrow V^{III}$



- LABINC**
Laboratório de Química
Bioinorgânica e Cristalografia
- Metaloenzimas de Cobre
- Hemocianina**
Responsável pelo transporte de oxigênio em moluscos e artrópodes
 - Tirosinase**
Catalisa a hidroxilação de monofenóis a o-difenóis e a oxidação de catecóis a o-quinonas
 - Catecois Oxidases**
Catalisa a oxidação de catecóis às correspondentes o-quinonas, sem apresentar atividade sobre tirosinas.
- Todas essas metaloenzimas possuem um sítio dinuclear de cobre

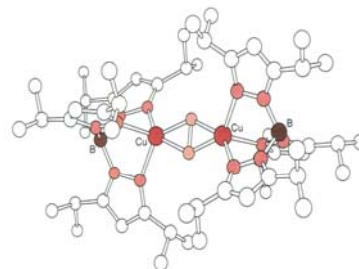




Normalmente, compostos de Cu(II): uma banda pouco intensa devido a **transições d-d na faixa de 600-700 nm**.
Espectro eletrônico da forma oxi-hemocianina é dominado por bandas intensas em torno de **345 nm ($\epsilon=20000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e 570 nm ($\epsilon=1000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)** atribuídas a transições de transferência de carga do tipo **ligante metal do ion peróxido para Cu(II)**.

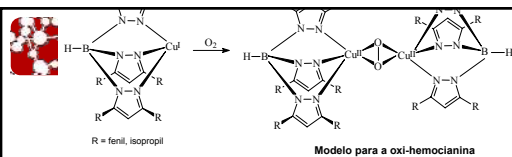
Raman ressonante apresenta uma banda na região de 750 cm^{-1} atribuída ao estiramento vibracional O-O do ion peróxido coordenado.

Diamagnetismo devido ao forte acoplamento antiferromagnético entre os dois íons Cu(II) ($-2J > 600 \text{ cm}^{-1}$), o que resulta em ausência no espectro de RPE.



[Cu^{II}HB(3,5-iPr₂C₃HN₂)₂(O₂)₂]

Estrutura de um modelo para a oxi-hemocianina;
[[Cu₂HB(3,5-iPr₂C₃HN₂)₂(O₂)₂]]



Oxi-hemocianina	[[Cu ₂ HB(3,5-Pr ₂ C ₃ HN ₂) ₂ (O ₂) ₂]]
Diamagnético	Diamagnético
580 nm(1000 M ⁻¹ cm ⁻¹), 340nm(20000 M ⁻¹ cm ⁻¹)	551 nm(790 M ⁻¹ cm ⁻¹), 349nm(21000 M ⁻¹ cm ⁻¹)
$\nu(\text{O-O}) = 744\text{-}752 \text{ cm}^{-1}$	$\nu(\text{O-O}) = 741 \text{ cm}^{-1}$
Cu...Cu = 3,5 – 3,7 Å	Cu...Cu = 3,56 Å

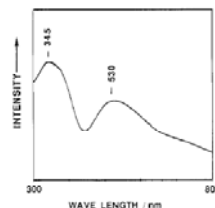
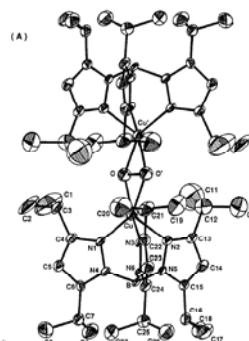


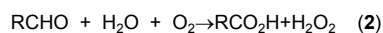
Figure 6. Reflectance spectrum of a solid sample of [Cu₂HB(Ph)₂(O₂)₂]₂(O₂)₂(CH₂Cl₂) (7-3)(CH₂Cl₂) at room temperature.



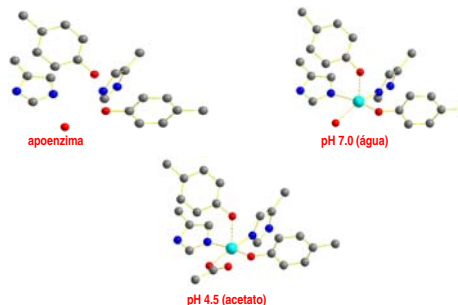
Galactose oxidase

(GAO) é uma metaloenzima mononuclear de cobre, secretada por alguns fungos, como o *Dactylium dendroids* e o *Polyporus circinatus*, que catalisa a oxidação de vários álcoois primários aos correspondentes aldeídos com a redução acoplada do oxigênio molecular a peróxido de hidrogênio

A função fisiológica precisa da GAO até o momento não é bem clara, porém tem sido sugerido que o H₂O₂ produzido é aparentemente usado no processo de degradação de lignina.



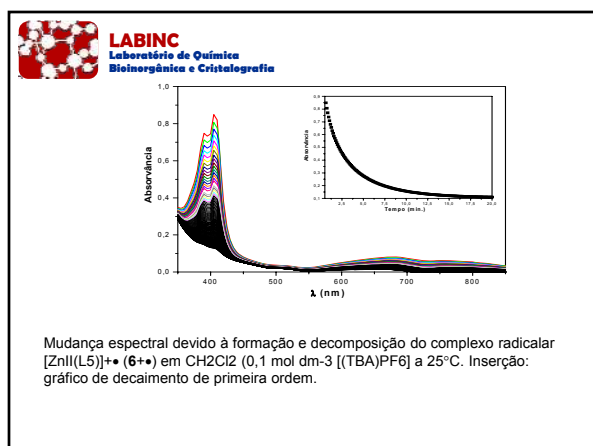
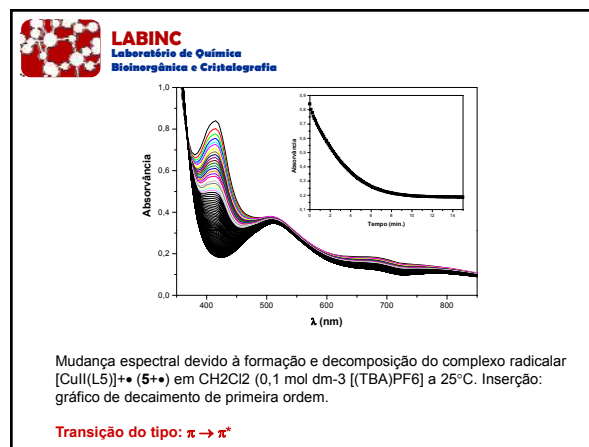
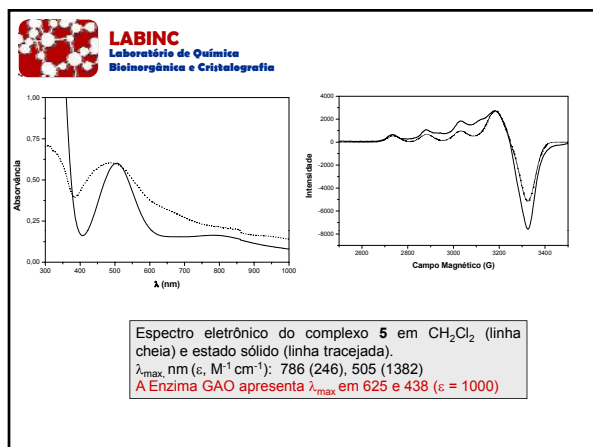
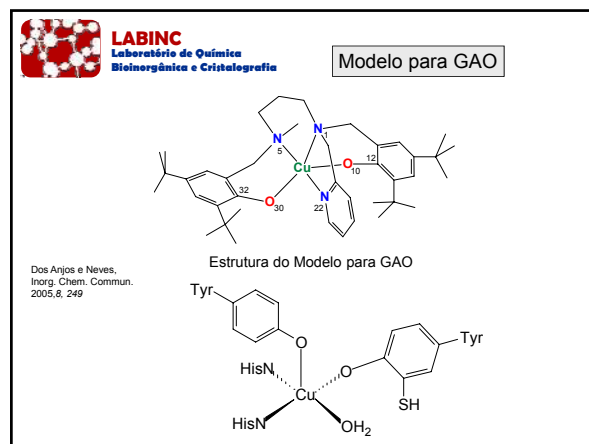
Galactose Oxidase



LABINC
Laboratório de Química
Bioinorgânica e Cristalografia

$\text{Cu}^{2+}\text{-Tir}^* (\text{GAO}_{\text{ox}}) \xrightleftharpoons{+e^-} \text{Cu}^{2+}\text{-Tir} (\text{GAO}_{\text{semi}}) \xrightleftharpoons{+e^-} \text{Cu}^+\text{-Tir} (\text{GAO}_{\text{red}})$ (3)

Formas	UV-vis, $\lambda, (\epsilon)$ nm, $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	RPE ^a $A_{\parallel} \times 10^{-4} \text{cm}^{-1}$
GAO ativa	444 (5194), 810 (3211) ^b	
GAO inativa	438 (1000), 625 (1167) ^b	$g_{\parallel} = 2,277,$ $g_{\perp} = 2,055,$ $A_{\parallel} = 175$
GAO reduzida ^d	450 (≤ 500), 650 (≤ 500) ^d	
Apo-GAO	450, 800 ^e	$g = 2,0055^f$



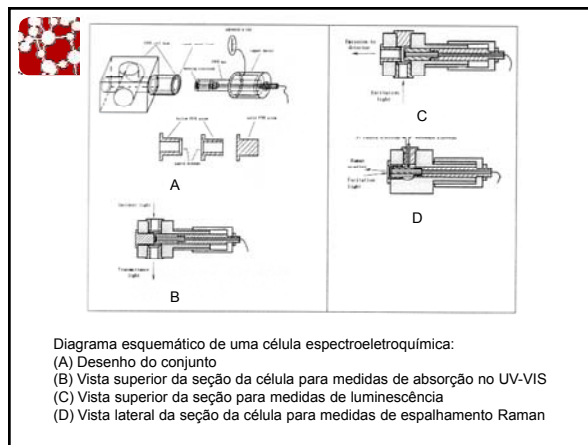
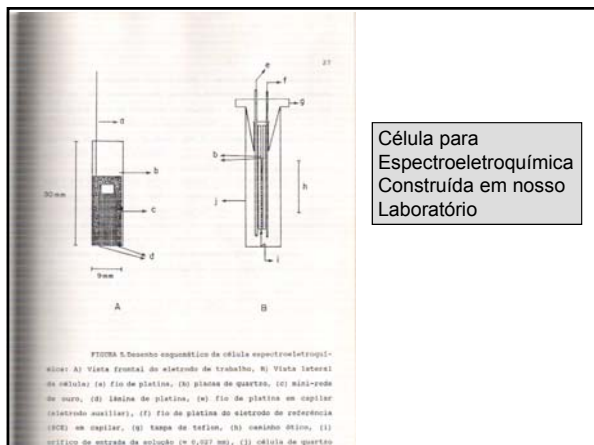
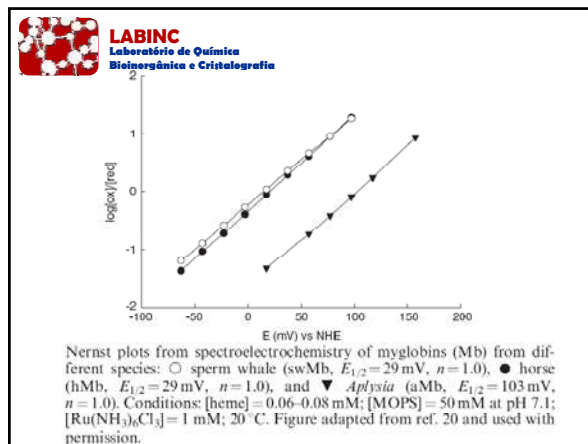
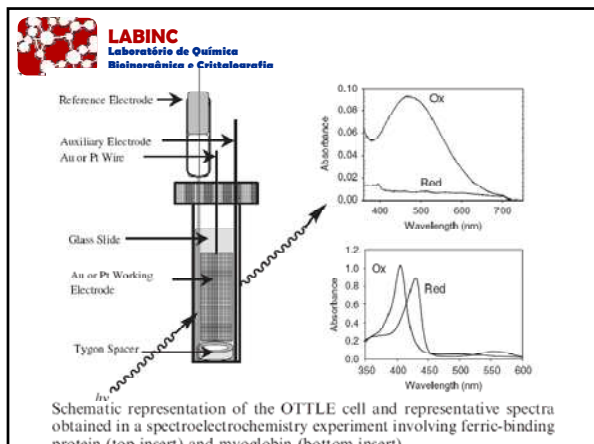
LABINC
Laboratório de Química
Bioinorgânica e Cristalografia

Espectroeletróquímica na Região UV-Vis

O desenvolvimento de eletrodos opticamente transparentes (EOT) permite a utilização de técnicas eletroquímicas e espectroscópicas combinadas.

EOT – Filmes de metais (Au, Pt, Ni, et.)
 - Semicondutores (óxidos de Sn, In)
 - Mini-redes metálicas delgadas (Au, Pt, Ni) as quais possuem minúsculos orifícios (6-40 μm) e 60-70% de transmitância

Ref. Spectroelectrochemistry, Wolfgang Kaim, ISBN: 978-0-85404-550-1
 Royal Society of Chemistry, 2008



LABINC
Laboratório de Química
Bioinorgânica e Cristalografia

Equação de Nernst e a Análise dos Dados Experimentais

$$E_{app} = E^0 + \frac{0,059}{n} \text{Log} \frac{[Oxi]}{[Red]}$$

E_{app} = Potencial aplicado
 E^0 = Potencial padrão redox
 n = No. de elétrons transferidos
[Oxi] e [Red] = Conc. das espécies oxidada e reduzida

LABINC
Laboratório de Química
Bioinorgânica e Cristalografia

Através da Lei de Beer as [Oxid] e [Red] podem ser calculadas:

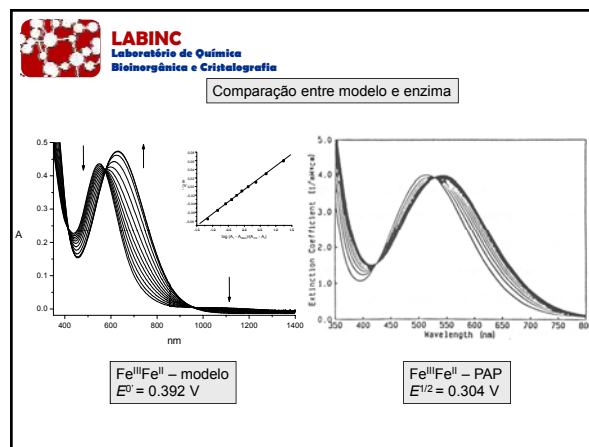
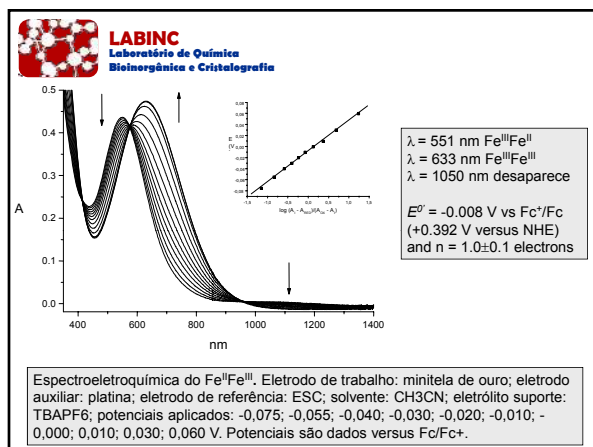
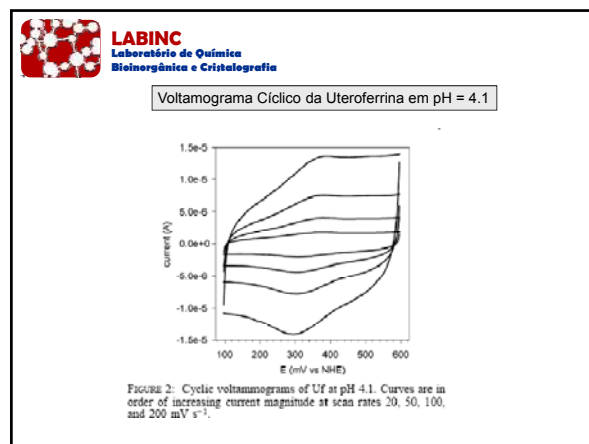
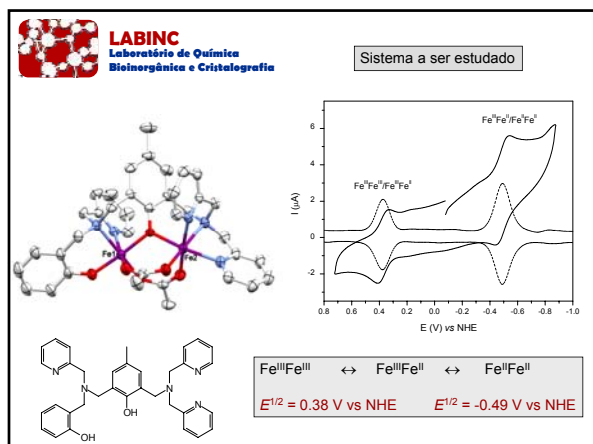
$$[Oxid] = A_1 - A_{Red}/\epsilon \cdot x \cdot b \quad (1) \quad [Red] = A_2 - A_{Oxid}/\epsilon \cdot x \cdot b \quad (2)$$

Dividindo 1 por 2 e rearranjando se obtém:

$$\frac{[Oxid]}{[Red]} = \frac{A_1 - A_{Red}/A_{Oxid} - A_2}{A_1 - A_{Red}/A_{Oxid} - A_2}$$

$$E_{app} = E^0 + 0,059/n \text{Log} A_1 - A_{Red}/A_{Oxid} - A_2$$

O gráfico de E_{app} vs. $\text{Log} A_1 - A_{Red}/A_{Oxid} - A_2$ deve fornecer uma reta de onde se obtém os valores de E^0 e n visto que E^0 corresponde ao seu coeficiente linear e $0,059/n$ a seu coeficiente angular.



LABINC
Laboratório de Química
Bioinorgânica e Cristalografia

Mediadores

A primary challenge in protein electrochemistry is to facilitate efficient heterogeneous electron transfer between the protein and the electrode. Heterogeneous electron transfer in most proteins is sluggish compared to small molecules and thus requires longer application of a specific potential, and may result in requiring a significant over potential. Long exposure times can often cause the protein to denature and aggregate at the surface of the electrode.

important characteristics of good mediators for spectroelectrochemistry experiments are as follows:

1. The mediator must be spectroscopically silent in the region of interest (both in oxidised and reduced state) so that it does not interfere with the UV-Vis absorbance profile of the protein in the region used to monitor the reaction.

LABINC
Laboratório de Química
Bioinorgânica e Cristalografia

2. The mediator should not interact with the protein and alter the redox profile. Charged mediators can bind to oppositely charged patches on the protein and can hinder efficient electron transfer, as well as change the redox behaviour of the protein. For example, an allosteric site with positively charged residues in hemoglobin can bind negatively charged mediators and alter any cooperative interactions associated with electron Transfer.
3. The redox potential of the mediator must be close to the expected redox potential of the protein under investigation. This reduction half-potential requirement for a mediator can be estimated by the following relationship:

$$E^{0m} - E^{0p} \leq 2RT/n_m F$$
 where E^{0m} is the redox potential of mediator, E^{0p} is the redox potential of the protein, and n_m is the number of electrons transferred for the mediator.

LABINC
Laboratório de Química
Bioinorgânica e Cristalografia

4. Kinetically, the mediator should be able to undergo rapid reversible electron transfer (heterogeneous and homogeneous) at the electrode surface and the redox-active site in the protein. At any given time a sufficient amount of the oxidised and reduced forms of mediator should be present in solution with the concentration of the mediator in excess over the concentration of the protein to facilitate favourable electron-transfer kinetics.

Typical mediators used for iron proteins include ferricyanide, methylviologen, substituted quinones, and hexammineruthenium(III)

LABINC
Laboratório de Química
Bioinorgânica e Cristalografia

Magnetoquímica

A análise da resposta de um dado material à presença de um campo magnético externo H é uma interessante ferramenta de pesquisa que pode nos fornecer informações químicas e físicas sobre a substância a ser analisada.

A princípio, todo material pode ser incluído em duas categorias, sendo classificado como:

1. Diamagnético.
2. Paramagnético.

Substâncias diamagnéticas são caracterizadas por não possuírem elétrons desemparelhados, o que resulta em um spin líquido total $S = 0$. Já as substâncias paramagnéticas são caracterizadas por possuírem elétrons desemparelhados, o que resulta em um spin líquido total $S \neq 0$.

Se um sólido apresentar átomos com $S \neq 0$, os spins líquidos de átomos adjacentes podem se orientar de diversas formas, conforme mostrado no Esquema a seguir.

LABINC
Laboratório de Química
Bioinorgânica e Cristalografia

(A) (B) (C) (D) (E)

Esquema ilustrativo mostrando como se dá a orientação do spin eletrônico de cada átomo em uma espécie (A) diamagnética, (B) paramagnética, (C) ferromagnética, (D) antiferromagnética, (E) ferrimagnética.

LABINC
Laboratório de Química
Bioinorgânica e Cristalografia

Substância sob efeito de um campo magnético H :

1. Repelida \Rightarrow Diamagnetismo
2. Atraída \Rightarrow Paramagnetismo

Sob os efeitos de um campo magnético, a indução magnética sofrida pela substância pode ser expressa pela equação abaixo:

$$B = H + 4\pi M$$

onde B é a indução magnética, M a magnetização e H o campo magnético aplicado.

Por outro lado, a facilidade com que uma substância é magnetizada é avaliada pela susceptibilidade magnética, que reflete a razão entre a magnetização e a magnitude do campo magnético aplicado:

$$\chi_M = M/H$$

χ_M é expresso em susceptibilidade magnética/mol (emu/mol)

LABINC
Laboratório de Química
Bioinorgânica e Cristalografia

Outra informação valiosa para a magnetoquímica, é o momento magnético efetivo (μ_{eff}), o qual pode ser expresso por:

$$\mu_{\text{eff}} = 2,828(\chi_M T)^{1/2} \text{ (T em K)}$$

Para o spin-only vale a expressão: $\mu_{\text{eff}} = 2.0 [S(S + 1)]^{1/2}$

Por ex. para um sistema d^1 : $\mu_{\text{eff}} = 1.73 \mu_B$

Para um sistema d^5 spin-alto $\mu_{\text{eff}} = 5.91 \mu_B$ e para spin-baixo $\mu_{\text{eff}} = 1.73 \mu_B$

Para compostos polinucleares a medida magnética em função da temperatura (300 – 4K) é muito importante.

Se entre os dados átomos metálicos houver interações eletrônicas, é provável que os spins líquidos de cada átomo metálico também interajam entre si, o que resultaria em um novo spin total. Se esta interação for construtiva, teremos $S_T = S_1 + S_2$ e se for destrutiva $S_T = S_1 - S_2$.

LABINC
Laboratório de Química
Bioinorgânica e Cristalografia

A interação entre 2 spins de átomos individuais é avaliada pela Constante de Acoplamento ($J \text{ cm}^{-1}$), definida pela equação:

$$H = -J.S_1.S_2$$

H = Operador Hamiltoniano.
 J = - Acoplamento antiferromagnético.
 J = + Acoplamento ferromagnético.

Precisa resolver a equação de Van Vleck para o Hamiltoniano

Normalmente sistemas binucleares do tipo:

- $\text{Fe}^{\text{II}}(\mu\text{-Oxo})\text{Fe}^{\text{III}}$ – Fortemente acoplados ($-50 > J > -200 \text{ cm}^{-1}$)
- $\text{Fe}^{\text{II}}(\mu\text{-OR})\text{Fe}^{\text{III}}$ ($R = \text{H, Alquil, aril}$) ($0 > J > -30 \text{ cm}^{-1}$), também vale para sistemas de valência mista $\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}$

LABINC
Laboratório de Química
Bioinorgânica e Cristalografia

Exemplo de Binuclear de Fe^{III} contendo [Fe^{III}(μ-CH₃O)₂(OAc)Fe^{III}]
Neves et al J. Chem. Soc., Dalton Trans., 2001, 2616–2623

HOHA

Fe(2)...Fe(1) = 3.1047(11)

A super-troca se dá através das pontes com $H = -J.S_1.S_2$ ($S_1 = S_2 = 5/2$)

LABINC
Laboratório de Química
Bioinorgânica e Cristalografia

Solução da Equação de Van Vleck

$$\chi = (1 - x_p) \frac{N_A \mu_B^2}{k(T - \Theta)} g^2 x \frac{2e^{2x} + 10e^{6x} + 28e^{12x} + 60e^{20x} + 110e^{30x}}{1 + 3e^{2x} + 5e^{6x} + 7e^{12x} + 9e^{20x} + 11e^{30x}} + 2x_p \frac{N_A \mu_B^2}{3k(T - \Theta)} g^2 S(S + 1) + 2TIP$$

with, $x = \frac{J}{kT}$

N_A : Avogadro constant; μ_B : Bohr magneton;
 x_p : paramagnetic fraction per monomer; g : spectroscopic splitting factor;
 k : Boltzmann constant;
 Θ : Weiss temperature;
TIP: temperature independent paramagnetism per monomer.

LABINC
Laboratório de Química
Bioinorgânica e Cristalografia

Fig. 3 Temperature dependence of the magnetic susceptibility (χ) and effective magnetic moment (μ_{eff}) per iron of complex 1.

O melhor ajuste dos parâmetros forneceu os seguintes dados:
 $J = -10.1 \pm 0.1 \text{ cm}^{-1}$, $g = 2.00$ (fixed),
TIP = $100 \times 10^{-6} \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ and paramagnetic fraction $x_p = 0.15\%$.

LABINC
Laboratório de Química
Bioinorgânica e Cristalografia

De acordo com Gorun and Lippard, a magnitude do acoplamento anti-ferromagnético é determinado pelo parâmetro estrutural P, o qual representa a metade do menor caminho de super-troca entre os dois átomos de ferro (1.923Å).

A relação entre o parâmetro P e J é dada por:

$$-J (\text{cm}^{-1}) = A \times \exp(BP(\text{Å})),$$

$A = 8.763 \times 10^{11}$ and $B = -12.663$.

$J = -10.1 \text{ cm}^{-1}$ (Experimental) e $J = -7.5 \text{ cm}^{-1}$ (Gorun)

LABINC
Laboratório de Química
Bioinorgânica e Cristalografia

Para o caso de complexos binucleares de Cobre(II) o acoplamento anti-ferro ou ferro-magnético depende essencialmente do ângulo Cu-(μ-OR)Cu e da orientação dos orbitais magnéticos.

[Cu₂(H₂bbppnol)(μ-CH₃COO)(H₂O)₂]Cl₂·2H₂O (1)

$J = -25 \text{ cm}^{-1}$
 $g = 2,1$
 $x_p = 5,7 \%$
Antiferromagnetismo

$d_{x^2-y^2}$ $d_{x^2-y^2}$

LABINC
Laboratório de Química
Bioinorgânica e Cristalografia

[Cu₂(Hbtppnol)(μ-CH₃COO)](ClO₄)₂

Propriedades Magnéticas

Acoplamento ferromagnético

$J = +18,4 \text{ cm}^{-1}$
 $J_{inter} = -2,3 \text{ cm}^{-1}$
 $g = 2,1$

Sobreposição dos orbitais magnéticos para o complexo mostrando a natureza não-complementar das interações.

Octaédrico, Octaédrico distorcido (alongado), Piramidal base quadrada, D_{3h}, Biplanar trigonal

LABINC
Laboratório de Química
Bioinorgânica e Cristalografia

Espectroscopia Mössbauer

- É uma técnica que fornece informações sobre transições nucleares. Ela está baseada na **absorção da radiação γ** emitida por uma fonte radioativa que contém um isótopo excitado do mesmo metal a ser analisado.
- De forma simples, a espectroscopia Mössbauer provém informações sobre a energia necessária para que ocorra transições entre spins nucleares de um dado elemento. Por isso, é uma técnica que reflete os efeitos exercidos diretamente sobre o núcleo atômico.

LABINC
Laboratório de Química
Bioinorgânica e Cristalografia

Espectroscopia Mössbauer

Decaimento radioativo do ^{57}Fe originado a partir do ^{57}Co . A radiação γ de 14,41 KeV é a energia usada na espectroscopia Mössbauer.

LABINC
Laboratório de Química
Bioinorgânica e Cristalografia

Espectroscopia Mössbauer

Os orbitais eletrônicos que mais influem sobre o núcleo são os orbitais s, exercendo um efeito de blindagem. Os orbitais p e d exercem um efeito significativamente menor, sendo o mesmo de desblindagem. Desta forma, **qualquer alteração da coroa eletrônica, deverá influenciar a energia dos spins nucleares.**

O que pode ser diferente é o orbital de valência, sendo estas diferenças decorrentes de vários fatores como número de oxidação, polaridade da ligação, hibridização, entre outros. Deste modo, diferenças no orbital de valência irão originar espectros diferentes, resultado da influência diferenciada sobre o núcleo atômico.

LABINC
Laboratório de Química
Bioinorgânica e Cristalografia

Duas Informações Básicas são tiradas de um Espectro Mössbauer

Deslocamento isomérico (δ):
Está relacionado com a influência da densidade eletrônica do orbital de valência sobre o núcleo atômico, sendo diretamente influenciado pelo estado de oxidação e pelos grupos ligantes coordenados.

Esquema mostrando o resultado observado quando a separação energética entre os níveis $I_{3/2}$ e $I_{1/2}$ da fonte e da amostra são iguais.

Se a amostra estudada absorver a mesma energia emitida pela fonte, significa que o ambiente eletrônico da camada de valência da amostra estudada e o da fonte são iguais. Isto leva a considerar que ambos possuem a mesma coordenação e estado de oxidação, resultando em um deslocamento isomérico igual a zero.

LABINC
Laboratório de Química
Bioinorgânica e Cristalografia

Esquema mostrando o resultado observado quando a separação energética entre os níveis $I_{3/2}$ e $I_{1/2}$ da fonte e da amostra são diferentes.

(14,41 KeV constante), logo essa energia maior ou menor é oriunda pelo movimento de aproximação e/ou afastamento da fonte em relação a amostra.
Deslocamento isomérico diferente de zero – Efeito Doppler

LABINC
Laboratório de Química
Bioinorgânica e Cristalografia

Dependendo do valor obtido para o deslocamento isomérico, o átomo de ferro pode ser facilmente classificado quanto ao seu estado de spin e valência

Faixa de deslocamento isomérico (δ) para íons $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ alto e baixo spin

LABINC
Laboratório de Química
Bioinorgânica e Cristalografia

Desdobramento Quadrupolar ΔE_q

- o desdobramento quadrupolar ΔE_q esta relacionado com a simetria de coordenação e com a ocupação eletrônica dos diversos orbitais da camada de valência, o que pode levar a uma distribuição não esférica de cargas sobre o núcleo. Isto acaba resultando em um gradiente de campo elétrico diferente de zero, fazendo com que o estado $I = 3/2$ se desdobre em $I = \pm 3/2$ e $\pm 1/2$

Fonte Amostra Resultado observado

LABINC
Laboratório de Química
Bioinorgânica e Cristalografia

O estudo do espectro Mössbauer da uPAP revelou:
A enzima pode apresentar-se tanto na forma de $Fe^{II}Fe^{III}$ como na forma Fe_2^{III} .
Presença de dois átomos de ferro com ambiente de coordenação distintos.

• **Parâmetros Mössbauer**

	δ (mm/s)	
$Fe^{II}Fe^{III}$	1.22	2.86
	0.52	1.83
$Fe^{III}Fe^{III}$	0.46	2.12
	0.55	1.65

Espectros Mössbauer da forma ativa a 185 K(A) e inativa a 10 K(B) da uPAP

LABINC
Laboratório de Química
Bioinorgânica e Cristalografia

Propriedades Mössbauer de Biomiméticos para as UF

Mössbauer properties of $[Fe^{II}Fe^{III}(BFBPMP)(OAc)_2]ClO_4 \cdot C$

Complex	T (K)	δ^a (mm s ⁻¹)	QS (mm s ⁻¹)
1-ClO ₄	298	0.423(1)	1.141(3)
	115	1.055(2)	1.751(4)
Reduced uteroferrin ^b	115	0.522(2)	1.096(4)
	100	1.132(1)	2.544(1)
		0.52	1.83
		1.22	2.66

LABINC
Laboratório de Química
Bioinorgânica e Cristalografia

Enzima **Modelo**

Mössbauer properties of $[Fe^{II}Fe^{III}(BFBPMP)(OAc)_2]ClO_4 \cdot C$

Complex	T (K)	δ^a (mm s ⁻¹)	QS (mm s ⁻¹)
1-ClO ₄	298	0.423(1)	1.141(3)
	115	1.055(2)	1.751(4)
Reduced uteroferrin ^b	115	0.522(2)	1.096(4)
	100	1.132(1)	2.544(1)
		0.52	1.83
		1.22	2.66

LABINC
Laboratório de Química
Bioinorgânica e Cristalografia

Referências Bibliográficas

- J. A. Cowan, "Inorganic Biochemistry, an Introduction" VCH Publishers, 1993.
- G. Schenk, et al. Direct Electrochemistry of Porcine Purple Acid Phosphatase (Uteroferrin). Biochem. 2004, 43, 10387.
- C. Creutz, H. Taube. A Direct Approach to Measuring the Franck-Condon Barrier to Electron Transfer between Metal Ions J. Am. Chem. Soc. 1969, 91, 3988.
- I. Bertini, C. Luchinat, L. Messori, Spectral Characterization of Vanadium- Transferrin Systems. J. Inorg. Biochem. 1985, 25, 57.
- N. Kitajima et al. J. Am. Chem. Soc. 1992, 114, 1277.
- A. Neves et al. Chem. Commun. 1993, 1782.
- A. Neves et al. Inorg. Chim. Acta, 1991, 187, 119.
- A. Neves et al Inorg. Chim. Acta, 1995, 237, 131.
- A. Neves et al Chem Rev. 2006, 106, 3338.
- W. Kaim, A. Klein, Ed. "Spectroelectrochemistry", RSC Publishing, 2008