

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA

HENRIQUE FERNANDES VIEIRA VICTÓRIA

**Ressonância Paramagnética Eletrônica de Radicais Nitróxidos e
Nanobastões de Ouro Funcionalizados com Marcadores de Spin**

Belo Horizonte
2018

HENRIQUE FERNANDES VIEIRA VICTÓRIA

Ressonância Paramagnética Eletrônica de Radicais Nitróxidos e Nanobastões de Ouro Funcionalizados com Marcadores de Spin

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências

Orientador: Maurício Veloso Brant Pinheiro

Belo Horizonte
2018

AGRADECIMENTOS

A todos que de alguma forma contribuíram para minha formação humana e profissional, dentre eles destacarei alguns nomes que com certeza possuem uma importância significativa para este trabalho.

Aos meus pais Euler e Cristina, ao meu irmão Euler (irmão) e minha companheira Daniele Márcia agradeço pelo amor, paciência e educação em todos possíveis sentidos desta palavra. Aos demais membros da família como Elza, Zizi, Adriana e Homero agradeço o afeto e carinho.

Aos meus colegas de laboratório por tornar todos os dias de trabalho únicos e prazerosos, Bruno, Daniel, Soldado, Elias e Nina. Em especial agradeço minha co-orientadora Daniele Cristina que me ajudou em todas as etapas deste trabalho, tendo minha eterna gratidão. Aos amigos Geraldo e João pelo companheirismo e amizade de longa data.

Ao meu orientador Maurício por esses quatro anos sendo crucial na minha formação profissional e, ao professor Klaus pela prontidão em sanar e ajudar as dúvidas que surgiram ao longo dessa caminhada.

Pela parceria e fornecimento das amostras citadas nesse trabalho agradeço a professora Rossimiriam e suas alunas Fabíola e Ana. Ao professor Luiz Orlando pela colaboração, e aos professores Bob e Edmar que realizaram as medidas necessárias para a conclusão deste trabalho.

Do laboratório de Nanomateriais agradeço a Loudiana pela ajuda e infraestrutura proporcionada. Fico grato também ao Leandro da Criogenia pelo suporte e aos técnicos do Centro de Microscopia/UFMG.

E finalmente, aos órgãos de financiamento à pesquisa: CAPES, CNPQ e FAPEMIG, agradeço pelo suporte financeiro.

RESUMO

Para este trabalho, um novo marcador de spin, específico para nanoestruturas de ouro, foi sintetizado (ALTEMPOL). Tendo como grupo radicalar o nitróxido (-NO·), ele foi sintetizado a partir de uma reação de esterificação do radical TEMPOL (*1-Oxyl-2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine*) com o ácido lipóico (AL). O AL foi escolhido por conter em sua estrutura, dois átomos de enxofre disponíveis para formação de grupos tiol (-SH) com alta afinidade pelo ouro das nanoestruturas. Após a síntese do ALTEMPOL, sua estrutura molecular foi confirmada por Ressonância Magnética Nuclear (NMR) e Espectroscopia de Infravermelho. Em seguida foi realizada uma caracterização sistemática por Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR) tanto do TEMPOL, quanto do marcador de spin ALTEMPOL, ambos em solução. Dentre os vários resultados obtidos nesta etapa resalta-se: 1) a dependência com a potência de micro-ondas, que permitiu determinar o regime de saturação dos sinais de EPR dos dois radicais; 2) a influência da concentração da solução no espectro de EPR, refletida na forma de linha e consistente com o aparecimento da interação de troca entre moléculas próximas; 3) variando-se o solvente, os parâmetros do Hamiltoniano de spin para ambos foram relacionados com a polaridade e a viscosidade dos solventes, e se mostraram consistentes com resultados da literatura; e, 4) a energia de ativação para a difusão rotacional do TEMPOL foi calculada a partir da dependência tipo-Arrhenius do espectro de EPR com a temperatura.

Na segunda parte deste trabalho, nanobastões de ouro foram sintetizados pelo método *seedless*, com adição de resveratrol como agente redutor dos íons de ouro (Au^{3+} para Au^+), e posteriormente expostos ao ALTEMPOL para sua marcação por spin. Absorção Óptica (UV-VIS) e Microscopia de Transmissão Eletrônica (MET) foram usadas para uma caracterização preliminar dos AuNRs marcados por spin com ALTEMPOL. Na sequência, a investigação, por EPR, de três amostras diferentes de AuNRs marcados por ALTEMPOL revelou a ligação das moléculas dos radicais à superfície dos AuNRs.

PALAVRAS-CHAVE: Nitróxidos, marcadores de spin, Ressonância Paramagnética Eletrônica, tempo de correlação, nanobastões de ouro.

ABSTRACT

For this work, a novell spin label specific for gold nanostructures was synthesized (ALTEMPOL). Having a nitroxide radical group, it was synthesized by means of an esterification reaction of TEMPOL (*1-Oxyl-2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine*) coupled to lipoic acid (AL). AL was chosen because of two sulfur atoms in its structure, which can form thiol groups (-SH) that have high affinity to gold nanostructures. After its synthesis, the molecular structure of the ALTEMPOL was confirmed by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and Infrared Spectroscopy. Following that, a systematic characterization of the TEMPOL, as well as the spin label ALTEMPOL, both in solutions, was done with Electron Paramagnetic Resonance (EPR). Among the several results obtained in this part, the most important were: 1) the dependence on the microwave power that allowed to stablish the saturation behavior of EPR spectrum for these two radicals; 2) the influence of the concentration in EPR spectra, reflected in lineshape, is in accordance with the appearance of an exchange interaction among close molecules; 3) varying the solvent, the spin Hamiltonian parameters showed a correlation with the polarity and viscosity of the solvent and were consistent with the literature; and, 4) the activation energy for rotational diffusion for the TEMPOL radical was calculated from the Arrhenius plot of the temperature-dependent EPR spectra.

In the second part of this work, gold nanorods (AuNR) were synthesized via seedless method, with resveratrol acting as reducing agent for gold ions (Au^{3+} to Au^+), and later exposed to ALTEMPOL for the spin labelling. Optical Absorption UV-VIS and Transmission Electron Microscopy (TEM) were used for a preliminary characterization of the ALTEMPOL spin-labeled AuNRs. In the sequence, the EPR investigation of three different ALTEMPOL-labeled AuNR samples revealed the binding of the molecules of the radicals to the surface of the AuNRs.

Keywords: Nitroxides, spin label, Electron Paramagnetic Resonance, correlation time, gold nanorods.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Representação nanomáquinas	25
Figura 2.2: Representação ressonância dos estados da molécula de TEMPOL	29
Figura 2.3: Espectro EPR AuNPs marcadas com radicais nitróxidos em soluções congeladas, extraídos de [9]	33
Figura 3.1: Diagrama de energia efeito Zeeman para o elétron Livre	37
Figura 3.2: Diagrama de energia sistema $S = 1/2$ e $I = 1$	39
Figura 3.3: Distribuição eletrônica ligação N-O	42
Figura 3.4: Conformação molecular TEMPOL	43
Figura 3.5: Susceptibilidade magnética	53
Figura 3.6: Representação tensorial para a dinâmica rotacional	57
Figura 3.7: Alargamento de linha das transições de EPR TEMPOL em solução	58
Figura 3.8: Forma de linha dos espectros de EPR TEMPOL em solução para diferentes tempos de correlação	59
Figura 3.9: Componentes espectrômetro de EPR	60
Figura 3.10: Modulação 100kHz	62
Figura 3.11: Espectrômetro MS400	63
Figura 4.1: Reação de formação ALTEMPOL	66
Figura 4.2: Espectro NMR do ALTEMPOL	67
Figura 4.3: Espectro FTIR ALTEMPOL	68
Figura 4.4: Espectro Absorção Ótica (Visível-NIR) SR01, SR02 e SR03	72
Figura 4.5: Espectro Absorção Ótica (UV) SR01, SR02 e SR03	74
Figura 4.6: Imagens microscopia eletrônica de transmissão SR01, SR02 e SR03	76
Figura 5.1: Espectros EPR do TEMPOL para diversas atenuações	80

Figura 5.2: Curva de saturação TEMPOL e ALTEMPOL	81
Figura 5.3: Espectros EPR do TEMPOL para diversas concentrações radicalares	84
Figura 5.4: Espectros EPR do ALTEMPOL para diversas concentrações radicalares	85
Figura 5.5: Variação da intensidade absorção EPR em relação concentração radicalar TEMPOL e ALTEMPOL	86
Figura 5.6: Frequência da interação de troca em relação a distância média entre as moléculas TEMPOL	89
Figura 5.7: Espectros EPR variação da forma de linha TEMPOL em diferentes solventes	91
Figura 5.8: Espectros EPR variação do regime da dinâmica rotacional TEMPOL em diferentes solventes	93
Figura 5.9: Espectros EPR TEMPOL em diversos solventes	96
Figura 5.10: Espectros EPR TEMPOL transições satélites	98
Figura 5.11: Gráfico componente A_{zz} em função da polaridade relativa do solvente	98
Figura 5.12: Componente g_{xx} em função da polaridade relativa do solvente	99
Figura 5.13: Comparativos com resultados Lebedev	101
Figura 5.14: Tempo correlação em função da viscosidade do solvente	102
Figura 5.15: Espectros EPR TEMPOL e ALTEMPOL em solução etanólica	104
Figura 5.16: Espectros EPR TEMPOL variação temperatura	107
Figura 5.17: Lei de Arrhenius TEMPOL	109
Figura 5.18: Variação da contribuição Lorentziana em relação à temperatura	110
Figura 6.1: Intensidade sinal EPR das lavagens SR01, SR02 e SR03	114
Figura 6.2: Espectros EPR SR01, SR02 e SR03	116
Figura 6.3: Espectro EPR ALTEMPOL livre em solução aquosa com CTAB a 1 mmol/L	120

Figura 6.4: Modelo de distribuição ALTEMPOL para as amostras SR01, SR02 e SR03

125

Figura 6.5: Espectros EPR AuNP recobertos com PPh3 extraídos da [8]

126

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Componentes principais tensores g e A TEMPOL outros Autores	44
Tabela 4.1: Desvios químicos dos prótons ALTEMPOL	68
Tabela 4.2: Concentrações estimadas nanobastões de SR01, SR02 e SR03	75
Tabela 4.3: Dimensões e razões de aspecto SR01, SR02 e SR03	77
Tabela 5.1: Parâmetros EPR TEMPOL em diversos solventes	94
Tabela 5.2: Parâmetros EPR TEMPOL e ALTEMPOL em solução etanólica	105
Tabela 5.3: Raio hidrodinâmico estimado TEMPOL e ALTEMPOL	106
Tabela 6.1: Parâmetros EPR sinal A e ALTEMPOL livre em solução aquosa	117
Tabela 6.2: Parâmetros EPR sinal B	118
Tabela 6.3: Razão de intensidade dos sinais A e B	119
Tabela 6.4: Distância média intermolecular de ALTEMPOL a partir de J_0	122
Tabela 6.5: Distância média intermolecular de ALTEMPOL a partir de distribuição homogênea	123
Tabela 6.6: Comparação dos parâmetros do hamiltoniano entre AuNP e AuNR	129

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AL	Ácido Lipóico
ALTEMPOL	Ácido Lipóico+ 4-Hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil
AuNP	Nanopartícula de Ouro
AuNR	Nanobastão de ouro
CAF	Controle Automático de Frequência
CMC	Concentração Micelar Crítica
CTAB	Brometo de Cetrimônio
DLS	Espalhamento Dinâmico da Luz
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
DTBNO	[Bis(2-metil-2-propanil)amino]oxidanil
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDC	Cloridrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida
EPR	Ressonância Paramagnética Eletrônica
FS	Fotossensibilizador
GSH	Glutathiona
HER2	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico Humano
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
NIR	Infravermelho Próximo
NMR	Ressonância Magnética Nuclear
PDT	Terapia Fotodinâmica
pH	Potencial Hidrogeniônico
pK	Cologaritmo da Constante de Ionização
PTT	Terapia Fototérmica
RNA	Ácido Ribonucléico
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SR01	Amostra 01 de nanobastões de Ouro Funcionalizados com Marcadores de Spin ALTEMPOL
SR02	Amostra 02 de nanobastões de Ouro Funcionalizados com Marcadores de Spin ALTEMPOL
SR03	Amostra 03 de nanobastões de Ouro Funcionalizados com Marcadores de Spin ALTEMPOL

TEMPAMINA 4-Amino-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil
TEMPOL 4-Hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil
TEMPONE 4-Oxo-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil
TGA Termogravimetria
TGN Nanobastões de Ouro+Porfirina+Trastuzumab
UFMG Universidade Federal de Minas Gerais

LISTA DE SÍMBOLOS

$\vec{\mu}_S$	Momento de dipolo magnético do spin eletrônico
g_e	Constante adimensional dada pela razão giromagnética do elétron livre
μ_B	Magnéton de Bohr
\vec{S}	Spin eletrônico
\vec{B}_0	Campo magnético estático
\mathcal{H}	Hamiltoniano do sistema de spins
S_z	Componente z do operador de spin eletrônico
$ \alpha_e\rangle$	Autoestado associado ao autovalor de spin eletrônico -1/2
$ \beta_e\rangle$	Autoestado associado ao autovalor de spin eletrônico +1/2
E_α	Energia correspondente ao autovalor de spin -1/2
E_β	Energia correspondente ao autovalor de spin +1/2
μ_N	Magnéton nuclear
\vec{I}	Vetor do spin nuclear
I_z	Componente z do operador de spin nuclear
$ \alpha_N\rangle$	Autoestado associado ao autovalor de spin nuclear +1
$ \beta_N\rangle$	Autoestado associado ao autovalor de spin nuclear 0
$ \gamma_N\rangle$	Autoestado associado ao autovalor de spin nuclear -1
$ \varphi_N\rangle$	Autoestados dado pelo produto tensorial entre o estado de spin eletrônico e nuclear
g	Constante adimensional dada pela razão giromagnética do elétron efetivo
λ	Constante associada ao acoplamento spin-órbita
Δ	Constante associada ao campo cristalino
ψ_0	Função de onda do estado eletrônico fundamental
ψ_l	Função de onda do estado eletrônico excitado
\vec{g}	Tensor adimensional associado à razão giromagnética do elétron livre
\vec{A}	Tensor associado à interação hiperfina
a	Termo de contato de Fermi
\vec{B}	Tensor da parte anisotrópica da interação hiperfina
$\psi(0)$	Função de onda eletrônica para orbital tipo s

ν	Frequência da onda eletromagnética
h	Constante de Planck
$\wp_{\alpha\beta}$	Probabilidade de transição eletrônica entre os estados de spin
\hbar	Constante de Planck dividida por 2π
$\mathcal{H}_{MW}(t)$	Hamiltoniano dependente do tempo após a inserção de micro-ondas
$g(\nu)$	Função da forma de linha para a transição eletrônica
\vec{B}_1	Campo magnético oscilante
S_x	Componente x do operador de spin eletrônico
S_+	Operador de levantamento de spin
S_-	Operador de abaixamento de spin
γ_e	Fator giromagnético eletrônico
ΔN_0	Diferença de ocupação dos estados do spin eletrônico em equilíbrio térmico
$N_{\beta 0}$	Número de ocupação eletrônica no estado $ \beta_e\rangle$ em equilíbrio térmico
$N_{\alpha 0}$	Número de ocupação eletrônica no estado $ \alpha_e\rangle$ em equilíbrio térmico
k	Constante de Boltzmann
T	Temperatura do sistema
\wp_{EPR}	Probabilidade das transições induzidas entre os estados de spin
$W_{\alpha\beta}$	Probabilidade de absorção espontânea pelo sistema de spin
$W_{\beta\alpha}$	Probabilidade de emissão espontânea pelo sistema de spin
M_0	Magnetização do sistema de spins em equilíbrio térmico
χ	Susceptibilidade magnética
T_1	Tempo de relaxação spin-rede
P_{MW}	Potência de micro-ondas absorvida
M_z	Componente z da magnetização do sistema de spins
M_x	Componente x da magnetização do sistema de spins
M_y	Componente y da magnetização do sistema de spins
T_2	Tempo de Relaxação spin-spin
$M_{z'}$	Componente z da magnetização para referencial girante
$M_{x'}$	Componente x da magnetização para referencial girante
$M_{y'}$	Componente y da magnetização para referencial girante
χ'	Parte real da susceptibilidade

χ''	Parte imaginária da susceptibilidade
ω	Frequência angular da onda eletromagnética
ω_0	Frequência de Lamor, ou frequência de ressonância do sistema de spins
$\varphi_L(\nu)$	Forma de linha para a transição eletrônica dada pela função Lorentziana
$\varphi_G(\nu)$	Forma de linha para a transição eletrônica dada pela função Gaussiana
$\varphi_V(\nu)$	Forma de linha para a transição eletrônica dada pela função Voigtiana
τ_c	Tempo de correlação
η	Viscosidade do meio
a_{Hy}	Raio hidrodinâmico
$\vec{B}^i(t)$	Campo eletromagnético aleatório
$G(\tau)$	Função auto-correlação
$\Delta\omega_{1/2}$	Largura de linha
m_I	Termo referente à transição de EPR
L/\varnothing	Razão de aspecto
λ_{max}	Comprimento de onda referente à absorção ótica do modo longitudinal dos nanobastões
ϵ_m	Constante dielétrica do meio
A_{dB}	Valor da atenuação em decibéis
P_e	Potência de micro-ondas enviada ao atenuador
P_s	Potência de micro-ondas de saída do atenuador
\mathcal{H}_{Troca}	Hamiltoniano da interação de troca
J	Operador referente à interação de troca
J_0	Constante de acoplamento da interação de troca
ϵ_0	Permissividade do vácuo
e	Carga elementar
Δg_{xx}	Variação da componente x do tensor \vec{g}
ρ_0^π	Densidade de spin no átomo de oxigênio
$\Delta E_{n\pi^*}$	Energia da transição entre os orbitais $n-\pi^*$
D_{rot}	Difusão rotacional
E_a	Energia de ativação rotacional
R	Constante universal dos gases

r_{J_0} Distância estimada entre os marcadores de spin a partir da constante de acoplamento de interação de troca

$\langle r_{HOM} \rangle$ Distância estimada entre os marcadores de spin a partir de uma distribuição homogênea

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	18
2 – NANOESTRUTURAS DE OURO MARCADAS COM SPINS	21
2.1 – Nanoestruturas de Ouro – Histórico, aplicações e estado da arte	21
2.2 – Nanoestruturas de Ouro em Biomedicina – Desafios técnicos	24
2.3 – EPR e Radicais Nitróxidos – Histórico e estado da arte	27
2.4 – Marcação de Spins em Nanoestruturas de Ouro – Estado da arte	32
3 – RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA: TEORIA E EXPERIMENTO	36
3.1. – O Hamiltoniano de Spin – Interações magnéticas	36
3.2 – Ressonância Paramagnética – O Fenômeno	44
3.3 – EPR de um Ensemble de Spins – Amostras paramagnéticas diluídas	47
3.4 – A Forma da Linha em Um Espectro de EPR	50
3.5 – Relaxação de Spins em Líquidos – TEMPOL em solução	55
3.6 – O Espectrômetro de EPR – Aspectos técnicos	60
4 – NANORODS DE OURO E MARCADORES DE SPIN: ASPECTOS EXPERIMENTAIS	64
4.1 – O Radical TEMPOL – Escolha do marcador de Spin	64
4.2 – O Marcador de Spin ALTEMPOL – Síntese	65
4.3 – ALTEMPOL – Caracterização por NMR e Infravermelho	66
4.4 – Nanobastões de Ouro – Síntese e Marcação com ALTEMPOL	69
4.5 – Nanobastões de Ouro Marcados com ALTEMPOL – Caracterização por Absorção Óptica e Microscopia Eletrônica de Transmissão	71
5 – RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA DO TEMPOL E DO ALTEMPOL EM SOLUÇÃO	79
5.1 – Saturação do Sinal de EPR do TEMPOL e do ALTEMPOL em solução	79
5.2 – Dependência do Sinal de EPR com a concentração do TEMPOL e do ALTEMPOL	83

5.3. – Influência do Solvente nos Parâmetros do Hamiltoniano de Spin	90
5.4. – Influência da Temperatura no Espectro de EPR do TEMPOL	106
6 – MARCAÇÃO DE SPIN EM NANORODS DE OURO	112
6.1 – AuNRs marcados com ALTEMPOL – eliminação do excesso de ALTEMPOL livre	112
6.2 – EPR do ALTEMPOL ligado aos AuNRs - Resultados	115
6.3 – O sinal A – O ALTEMPOL ligado ao CTAB livre	120
6.4 – O sinal B – ALTEMPOL ligado aos AuNRs	121
6.5 – Marcação de spin em AuNR versus AuNP	126
7 – CONCLUSÕES	129
REFERÊNCIAS	134

1 – INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, as nanoestruturas de ouro, devido as suas propriedades únicas, vêm sendo utilizadas em diversas áreas como biologia e medicina [1]. De forma geral, elas têm dimensões entre 1 nm e 1 µm e são normalmente dispersas em meio fluido, formando suspensões coloidais cuja estabilidade está associada à monocamada que recobre a sua superfície (surfactante). A escolha do surfactante, e de outras moléculas que poderão vir a fixar-se à superfície, é de fundamental importância, pois, além de garantir a estabilidade da suspensão, atribui novas funcionalidades para aplicações específicas. Dentre as diversas estruturas que podem ser ligadas às nanoestruturas de ouro, conferindo a elas funcionalidades específicas, podemos citar moléculas de princípios ativos de fármacos [2-4], proteínas [5], biomoléculas especiais para ligações com substratos específicos (agentes direcionadores) [6, 7], e até marcadores, como os de spin, para se investigar a interação entre a nanoestrutura e o meio externo [8-11].

Marcadores de spin são famílias de moléculas contendo grupos radicalares que se ligam covalentemente a determinados substratos. Quando não há ligação covalente entre substrato e a molécula paramagnética, estas moléculas são denominadas de sondas de spin. Compostos radicalares são, em sua grande maioria, caracterizados por possuírem um ou mais elétrons desemparelhados, resultando em um sistema que possua paramagnetismo intrínseco e, portanto, visível pela técnica de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR). O uso de marcadores de spin em diversos sistemas possibilitou inúmeras aplicações, tais como estudos em proteínas e enzimas, DNA e RNA, aferição do pH e polaridade do meio, entre outras como será descrito mais adiante. Autores como Likhtenshtein e Berliner possuem um vasto trabalho para fundamentação e descrição de aplicações desses compostos entre as mais diversas áreas [12-18].

A funcionalização de nanoestruturas de ouro com marcadores de spin é de extrema importância para caracterização e viabilização de aplicações para estes sistemas. Dentre as motivações para a marcação com spin de nanoestruturas de ouro destacamos: 1) a possibilidade do estudo da interação dos ligantes com parâmetros do meio como pH, temperatura, polaridade e viscosidade do meio

externo; 2) definição de como ocorre a interação entre as moléculas dos ligantes e a que distância se encontram entre si e da superfície; e 3) o estudo da dinâmica rotacional das nanoestruturas e das moléculas de ligantes. Ressaltada a importância da marcação das nanoestruturas, destaca-se o grupo de Agneta Caragheorghopol e Chechik *et al.* [8-11], que desenvolveu um vasto trabalho para o estudo de marcadores de spin ligados as nanopartículas de ouro sintetizadas segundo o método de Brust [19].

Dentre as inúmeras nanoestruturas de ouro existentes, tais como nanocascas, nanojaulas, nanocubos e nanoesferas [20], foi dada ênfase neste trabalho a marcação de spins em nanobastões de ouro (AuNRs). Devido a sua forma característica os nanobastões de ouro possuem algumas vantagens específicas que os levam as aplicações incomuns em relação às nanopartículas [21]. Ao possuir duas bandas de absorções óticas devido aos modos de vibrações coletivas eletrônicas (transversal e longitudinal), existe a possibilidade do ajuste das bandas de absorção ótica desde a região do infravermelho próximo (NIR, do inglês *Near-infrared*) até o visível (500 nm – 1200 nm) ao se variar o comprimento e espessura dos nanobastões. Isso leva a um grande diferencial em relação às nanopartículas de ouro, que absorvem apenas na região visível [22].

Nesse sentido, um dos principais objetivos deste trabalho é o estudo da funcionalização de nanobastões de ouro com marcadores de spin. Vale ressaltar que uma das motivações da escolha desse sistema é a inexistência de um estudo, até o presente momento, previamente descrito na literatura. Com essa finalidade, a escolha, a preparação e a caracterização de um marcador de spin especial para nanobastões de ouro foi determinante ao sucesso deste trabalho.

Moléculas contendo radicais nitróxidos ($-\text{NO}\cdot$) estabilizados compõem a família de marcadores de spin mais amplamente investigada na literatura [14]. Isso porque a estabilidade desses radicais os torna imunes frente ao acoplamento de diferentes grupos funcionais, específicos para cada tipo de substrato. Com isso, o paramagnetismo, a principal propriedade dos marcadores de spin, é preservado.

Portanto, um dos pontos de partida deste trabalho consiste na síntese de um radical nitróxido que possua um grupo funcional que tenha afinidade pelo ouro. A síntese escolhida envolve o acoplamento da molécula do radical TEMPOL, obtido comercialmente, com a molécula do ácido lipóico AL, por uma reação de esterificação. Os átomos de enxofre presentes na estrutura do ácido lipóico servirão

de âncora no processo de ligação do marcador de spin à superfície dos nanobastões, denominado neste trabalho por ALTEMPOL, devido a sua grande afinidade por ouro [23].

A principal técnica para o estudo de compostos paramagnéticos, dos quais se destacam os marcadores de spin, será a EPR. Essa poderosa técnica se baseia na aplicação de um forte campo magnético estático para a quebra de degenerescência dos estados de spin eletrônicos do sistema paramagnético e na inserção de uma onda eletromagnética, normalmente micro-ondas, polarizada perpendicularmente ao campo estático, que será absorvida pelo sistema na condição de ressonância. Assim essa técnica espectroscópica permite a obtenção de diversas informações a respeito dos marcadores de spin, como os parâmetros do Hamiltoniano de spin relacionados à sua estrutura molecular, bem como sua mobilidade em solução.

Esta dissertação está estruturada da seguinte maneira. Após esta breve introdução, no Capítulo 2 são detalhados aspectos referentes às nanoestruturas de ouro e aos marcadores de spin escolhidos com histórico, aplicações e estado da arte da pesquisa relacionada ao tema deste trabalho. Em seguida, no capítulo 3, é apresentada a técnica de EPR com foco na sua aplicação de radicais em soluções, evidenciando as informações relevantes obtidas a partir do ajuste da forma de linha do radical nitróxido como parâmetros do Hamiltoniano de spin e grandezas dinâmicas relacionadas com a relaxação de spin. Já no capítulo 4 são descritos em detalhes, tanto a preparação do marcador de spin ALTEMPOL, sintetizado especificamente para este trabalho, quanto da síntese e caracterização dos AuNRs. No Capítulo 5, resultados do estudo por EPR do TEMPOL e do ALTEMPOL isolados em solução são descritos e analisados. Grande parte destes resultados são essenciais para a análise dos dados referentes ao ALTEMPOL ligado aos AuNRs, tema do Capítulo 6 e objetivo principal deste trabalho. Por fim um resumo dos resultados obtidos e perspectivas para continuidade desta linha de pesquisa são apresentados no Capítulo 7.

2 – NANOESTRUTURAS DE OURO MARCADAS COM SPINS

2.1 – Nanoestruturas de Ouro – Histórico, aplicações e estado da arte

Evidências da síntese de nanopartículas de ouro como um método para colorir vidros são conhecidas desde a antiguidade. Mais tarde, durante a idade média, sais de ouro, em suspensão coloidal¹, passaram a ganhar reputação como medicamentos milagrosos.

Nanopartículas de ouro foram investigadas sistematicamente, pela primeira vez, por Michael Faraday, em 1857 [24]². Nesse mesmo ano, Faraday sintetizou uma suspensão de ouro a partir da redução do ácido tetracloroáurico (HAuCl₄) por fosfato e foi o primeiro a fornecer uma descrição científica das propriedades óticas deste material.

Em meados do século XX, com os avanços da química inorgânica e o aparecimento da microscopia eletrônica, a síntese de ouro coloidal voltou à tona com o trabalho de Turkevich *et al.* [25]. Neste trabalho, os processos de nucleação, crescimento e coagulação de nanopartículas de ouro em suspensão coloidal, foram descritos cientificamente pela primeira vez. O controle do tamanho médio das nanopartículas se tornou possível e foi decisivo para tornar tal processo de síntese bastante popular. Além disso, o método de Turkevich veio sendo modificado de várias maneiras, como por exemplo pela substituição do citrato de sódio por outros agentes redutores como a glutathione (GSH), que age simultaneamente como redutor e estabilizador [26]. Isso permitiu que, ao longo das últimas décadas, se ampliasse a família de nanoestruturas de ouro, originalmente restrita às nanopartículas, para uma grande variedade de nanoestruturas mais exóticas como cascas, bastões, esferas, dentre outras [27, 28].

Em paralelo, uma grande corrida científica na busca de potenciais aplicações tecnológicas para as nanoestruturas de ouro se intensificou [29]. Hodiernamente, inúmeras aplicações são conhecidas, inclusive em biomedicina, o

¹ De acordo com a IUPAC, um sistema para ser considerado coloidal deve possuir estruturas com dimensões entre 1 nm e 1 μm (em ao menos uma direção) dispersas em um meio fluido.

² O termo “nano” só seria introduzido no meio científico para descrever estruturas com dimensões submicrométricas no final do século XX, em razão da descoberta de fullerenos e nanotubos de carbono.

que pode justificar em parte, a origem de mitos, difundidos durante a Idade Média, sobre o poder de cura do ouro. No entanto, essas aplicações não se restringem a fabricação de fármacos inovadores [2-4]. Outros exemplos são seu uso como catalisadores em reações químicas e bioquímicas [30], como contrastes em métodos de diagnóstico por imagem, e em foto e termo-terapias [31-35]. Algumas aplicações vão, inclusive, além da biomedicina, chegando até ao desenvolvimento de novas técnicas experimentais em Física e Química, como na modalidade de espectroscopia Raman amplificada por superfície (SERS, do inglês *Surface enhanced Raman spectroscopy*) para caracterização de novos nanomateriais [36].

Grande parte das aplicações das nanoestruturas de ouro em biomedicina se deve principalmente à sua biocompatibilidade e à baixa citotoxicidade, bem como à facilidade de controle das bandas de ressonância plasmônicas através do controle de suas dimensões [37]. Além disso, as nanoestruturas de ouro podem se ligar com facilidade a grupos funcionais, como tióis e aminas, permitindo mudanças na superfície do material e possibilitando que elas sejam usadas para carrear substâncias para células de forma eficiente e com especificidade [37, 38].

No entanto, muitas das aplicações em biomedicina requerem nanoestruturas solúveis em água que sejam livres de agregação [39, 40] e, para isso, a solução mais comumente utilizada é o recobrimento destas com surfactantes diversos [41]. A escolha do surfactante, por outro lado, é de extrema importância, já que ele influi diretamente nas propriedades da nanoestrutura. O surfactante também pode ter uma função secundária que é conferir às nanoestruturas de ouro uma funcionalidade particular por permitir a ancoragem de um ligante específico, em função da aplicação pretendida [42].

Em se tratando da funcionalização de nanoestruturas de ouro, os tióis são os mais utilizados devido à afinidade da ligação $-SH$ com o ouro, mas fosfinas e aminas são também amplamente utilizadas. Além de conferir funções específicas, por meio dos grupos orgânicos funcionais na sua extremidade livre, estes ligantes não deixam de realizar sua função primária que é a de uma cobertura estabilizadora [19]. Ao se utilizar moléculas com grupos funcionais que possuem afinidade pela superfície de ouro, concomitantemente aos surfactantes, as nanoestruturas de ouro podem ser ligadas a bioestruturas diversas como oligonucleotídeos, proteínas e anticorpos, conferindo assim uma funcionalidade ainda maior [1]. A realização dessas modificações ampliou ainda mais a gama de aplicações biomédicas para as

nanoestruturas, permitindo o carregamento de sequências de DNA [43], inibidores virais [44], e outras aplicações como biossensores [45].

Como ressaltado anteriormente, a possibilidade da variação das bandas de absorção ótica dos modos de vibrações coletivas eletrônicas (transversal e longitudinal) de acordo com as dimensões dos nanobastões de ouro (AuNRs), perfazem uma vantagem inerente dessa classe de nanoestrutura sobre as nanopartículas de ouro, que absorvem apenas na região visível [22]. Essa vantagem abre uma gama de aplicações para os AuNRs como a utilização dessas em terapias fotodinâmica (PDT, *Photodynamic Therapy* do inglês), que é uma promissora modalidade para o tratamento do câncer. Tal técnica está fundamentada na ligação de fotossensibilizadores à superfície dos AuNRs. Os fotossensibilizadores (FS) são em sua maioria moléculas orgânicas que, por excitação óptica, sofrem transições eletrônicas entre seu estado fundamental singlete ($^1FS^0$) para estados singletos excitados ($^1FS^*$) e, em seguida sofrem um processo de decaimento denominado de cruzamento intersistema (ISC do inglês *Inter-System Crossing*) chegando ao seu estado tripleto ($^3FS^0$). Devido a simetria, este estado não decai para o $^1FS^0$ opticamente e por isso tem um tempo de vida longo. Por meio de transferência de energia (ou elétrons) do $^3FS^0$ para o oxigênio molecular, ocorrerá a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS do inglês *Reactive Oxygen Species*), como o oxigênio singlete (1O_2) e radical superóxido (O_2^-). Estes ROS, quando em grande quantidade e localizados nos tecidos cancerígenos, atacarão por sua vez as células tumorais [46]. Dentre os fotossensibilizadores mais utilizados em PDT destacam-se a porfirina, clorinas, bacterioclorinas e ftalocianina [35, 46].

A busca de novos FSs tem crescido bastante nas últimas duas décadas. Ela tem sido motivada pelo aparecimento de nanomaterias e compostos híbridos que possibilitam conferir às novas gerações de FS novas funcionalidades. Um exemplo disso é a associação do FS AlPcS₄ (*Chloro[29H,31H-phthalocyanine-2,9,16,23-tetrasulfonato(2-)-κ2N,N']aluminium*) com AuNRs combinando as propriedades ópticas de ambos para PDT e terapia fototérmica (PTT, *Photothermal Therapy*), com o contraste fornecido pelo ouro para diagnóstico por imagem via fluorescência de Raios-X [35]. A PTT é baseada na absorção de fótons no infravermelho próximo (NIR) por ressonância plasmônica (oscilação longitudinal) na superfície dos nanobastões. Após a absorção, os nanobastões transferem calor para o sistema, produzindo hipertermia localizada, o que, por sua vez, leva à morte celular. Outro

exemplo é o uso de um sistema conjugado trastuzumab³-porfirina na superfície de nanobastões de ouro [6]. Este composto, além de apresentar elevado acúmulo tumoral, se mostrou também promissor ao diminuir a viabilidade celular das células cancerígenas.

O uso das nanoestruturas de ouro como carreadores de drogas é mais uma grande possibilidade para sua aplicação no diagnóstico e no tratamento do câncer. Isso se deve ao fato de que elas tendem a se acumular em tecidos tumorais [47, 48]. Além disso, por terem alta superfície específica, possibilitam a liberação controlada de vários fármacos em uma determinada região, minimizando sua toxicidade celular em tecidos sadios [49]. Um exemplo concreto é a ligação de moléculas do paclitaxel, um agente quimioterapêutico, à superfície de AuNP com 2 nm de diâmetro [50]. Contudo, em geral, as moléculas de droga mais comumente usadas em associação com AuNPs são os ácidos nucleicos, nas formas de DNA, DNA plasmodial e RNA [51-53].

2.2 – Nanoestruturas de Ouro em Biomedicina – Desafios técnicos

Dentre as muitas aplicações das nanoestruturas de ouro investigadas na última década, destacam-se aquelas em biologia e medicina. Geralmente, as nanoestruturas são nanopartículas (AuNPs) ou nanobastões de ouro (AuNRs) que se encontram em suspensão, seja em meio aquoso, biológico ou celular.

Para se entender, num contexto mais geral, os desafios técnicos para a viabilização de várias destas aplicações, considere-se o caso particular de AuNRs como agentes carreadores de drogas. Numa potencial aplicação como essa, a funcionalização simultânea da superfície de um nanobastão tanto com o agente direcionador, quanto com o fármaco propriamente dito, se torna um problema químico complexo [50, 54, 55]. Tendo em vista que a funcionalização de AuNRs como carreadores de droga requerem algumas propriedades tais como: 1) circulação prolongada no sangue; 2) capacidade de acumular especificamente, ou não, na zona patológica requerida; 3) responsividade a estímulos locais, como alterações de pH e/ou temperatura, resultando, por exemplo, na liberação acelerada

³ Anticorpo monoclonal, com alta afinidade ao Receptor do Fator de Crescimento Epidermal Humano 2, HER2.

de fármaco; 4) entrega intracelular eficaz do fármaco e direcionamento destes a organelas alvo; e, por fim, 5) a observação, por técnicas de imagem e em tempo real, de sua acumulação no alvo [54]. Não menos importantes, serão, para potenciais aplicações, outros desafios mais específicos, como a interação dos grupos funcionais superficiais (agente direcionador, fármaco, surfactante, etc.) entre si, e com o meio externo (solução aquosa, meio biológico, etc.) [54], bem como a influência de parâmetros do meio externo (ex. polaridade, viscosidade, pH, pK e temperatura) em propriedades como a difusividade, agregação [56], carga superficial [57] e biodistribuição [58].

A solução desse problema complexo passa por complicados testes *in vivo* e *in vitro* muitas vezes irreprodutíveis devido a pequenas, ou quase imperceptíveis, variações das condições iniciais [59]. Por isso, esses experimentos são repetidos, isto é, feitos em triplicatas, por exemplo, e a análise dos resultados baseada em estatísticas. Este problema se torna muito mais complexo e caro quando a fase de testes chega as cobaias vivas e testes em humanos [60]. Na figura 2.1 abaixo pode-se ter uma ideia da complexidade do problema ao se projetar uma nanomáquina baseada em AuNR com agentes carreadores de fármacos.

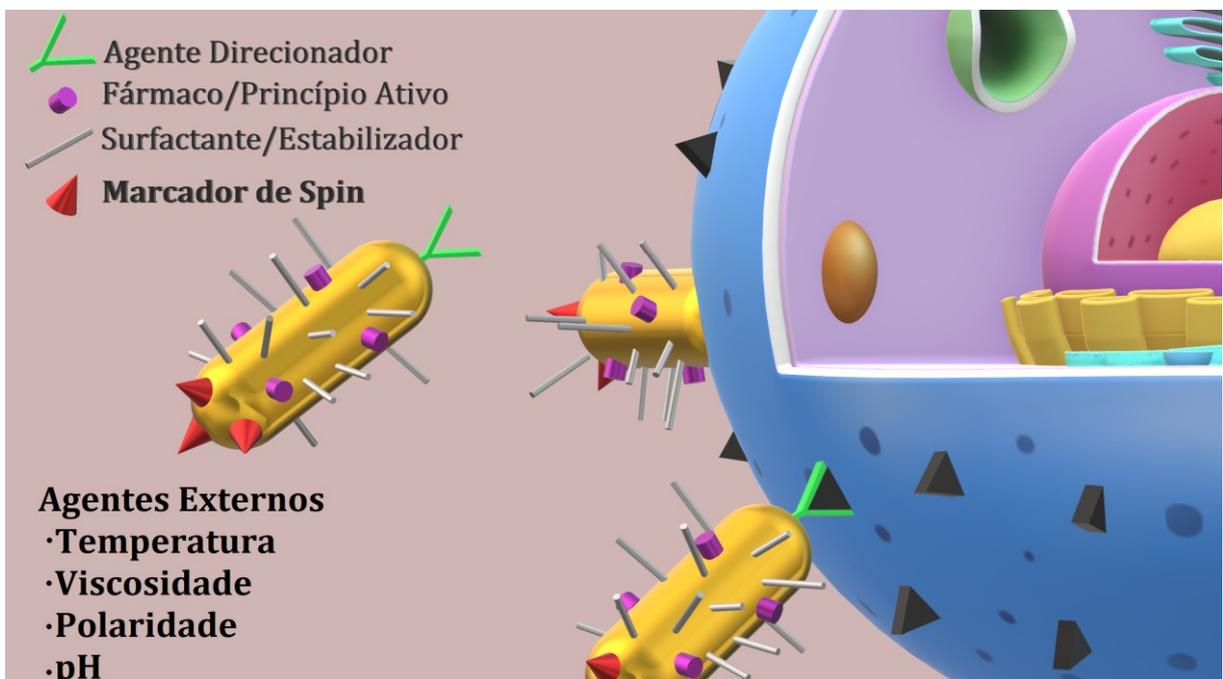


Figura 2.1: Esquema representativo da complexidade de uma nanomáquina, baseada em AuNR funcionalizados, projetada para carreamento de drogas.

O estudo das interações entre os grupos funcionais das nanoestruturas, entre si e com o meio, por uma técnica física capaz de isolá-las, pode ser uma saída elegante para parte desse problema complexo. A ligação de um marcador de spin à superfície do ouro é um exemplo disto. Como será visto em detalhes mais a frente, o marcador de spin é uma molécula contendo um radical estável paramagnético, projetada para se ligar a um substrato, neste caso ao AuNR. Além de se ligar ao substrato, o spin desemparelhado do radical funcionará como sonda paramagnética local, sendo facilmente detectado por EPR. Essa metodologia de marcadores de spin por EPR tem sido usada com bastante sucesso na bioquímica [13, 17, 61], e pode, por sua vez, fornecer informações únicas sobre a interação entre os marcadores, o substrato e o meio (solvente) [62]. Outras vantagens para o estudo destes sistemas são: a possibilidade de obter informação da dinâmica do sistema em intervalos de tempo muito curtos⁴ e a capacidade de estimar a distância entre os marcadores de spin via interações spin-spin e assim sondar sua distribuição em função da forma da nanoestrutura [63].

A partir dos parâmetros do Hamiltoniano de spin derivados do espectro de EPR, como a interação hiperfina, por exemplo, é possível também estimar a influência do meio nos grupos funcionais ligados às nanoestruturas. Ao se alterar parâmetros como pH ou polaridade do solvente, o marcador de spin funcionará, neste caso, como sensor químico, permitindo quantificar estas alterações externas [64].

A difusão rotacional do sistema (nanoestrutura + marcador de spin) será outra informação importante extraída do espectro de EPR, assim como sua dependência com, por exemplo, a viscosidade do solvente. No entanto, para se chegar a este nível de informação, é fundamental que marcadores de spin seletivos para nanoestruturas de ouro sejam preparados, ligados e caracterizados. Esse é um dos objetivos deste trabalho.

⁴ Usualmente EPR é feita com o uso de radiação eletromagnética na faixa de micro-ondas (~ 10 GHz). Isso permite que se investigue, indiretamente, a dinâmica de spins em uma escala de tempo até ~ 10⁻¹⁰ s. Enquanto em técnicas como NMR é limitada a tempos da ordem de 10⁻⁶s (MHz).

2.3 – EPR e Radicais Nitróxidos – Histórico e estado da arte

Marcadores de spin são moléculas orgânicas que possuem um grupo radicalar estável, ligado a outro grupo orgânico cuja funcionalidade é se ligar a um substrato específico. O grupo radicalar normalmente contém um elétron desemparelhado e, portanto, um momento de dipolo magnético eletrônico. A técnica experimental mais adequada para se investigar moléculas com estes grupos radicalares é, portanto a EPR. Como já dito anteriormente a funcionalização de um marcador de spin parte da escolha de uma classe de radicais estáveis, como será justificado brevemente. O radical escolhido neste trabalho e na grande maioria dos trabalhos apresentados na literatura é da classe dos nitróxidos. Portanto, inicialmente será apresentado um breve relato dos primeiros radicais nitróxidos sintetizados e, em seguida, apontados alguns dos pesquisadores que foram os pioneiros para ampliação da diversidade e aplicabilidade classe dos radicais nitróxidos.

O primeiro relato de um radical nitróxido ocorreu um século anterior ao desenvolvimento da técnica de EPR⁵. Através de uma reação com o bisulfito de potássio e nitrito de potássio seguido de oxidação, Fremy sintetizou o primeiro radical nitróxido, que ficou conhecido como sal de Fremy ($K_2NO_7S_2$, *Dipotassium (disulfonatoamino)oxidanyl*) [68]. Já o primeiro radical nitróxido orgânico foi preparado por Piloty e Schwerin em 1901 ($C_5H_9N_4O$, [(2E)-4-Amino-2-imino-5,5-dimethyl-2,5-dihydro-1H-imidazol-1-yl]oxidanyl) [69].

Anteriormente ao advento da técnica de EPR, a propriedade dos radicais mais discutida na literatura era sua alta capacidade de oxidação e sua estabilidade. Por exemplo, os autores G. Schwarzenbach e L. Michael estudaram radicais livres que são formados nas etapas intermediárias do processo reversível de redução/oxidação, para os grupos indamina e indofeno [70]. A presença do elétron desemparelhado dos radicais livres, apesar de proposto por alguns autores como Joseph Kenyon e Samuel Sugde [71], foi confirmada anos mais tarde com a técnica de EPR com o trabalho dos autores A. Holden *et al.* estudando o radical denominado

⁵ Em 1944, na URSS, a ressonância paramagnética foi observada pela primeira vez por Zavoisky[65-67].

por eles de *2-(phenyl nitrogen oxide)-2-methyl pentane-4-one-oxime-N-phenyl ether* [72].

A ampla produção dos radicais nitróxidos foi iniciada na década de 1960 na URSS, impulsionada pelo trabalho de Lebedev [73], e uma grande variedade de derivados do radical TEMPO (*2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi*) tem sido sintetizada, desde então. Isso porque a possibilidade de acoplamento e modificação estrutural dos nitróxidos sem a perda do paramagnetismo demonstra a grande estabilidade dessa classe de radicais [13], viabilizando as inúmeras aplicações. Estas vão além de seu uso como marcadores de spin, mas estendem-se também à possibilidade de se aferir, localmente, a polaridade [14], o pH [64, 74] e quantidade de oxigênio dissolvido [75], este último pelo seu paramagnetismo. Além disto, estas moléculas podem ser acopladas às moléculas de DNA e RNA, com a função de elucidar a dinâmica dos processos biológicos dependentes da sequência de DNA e RNA, incluindo o reconhecimento de proteínas e o empacotamento da cromatina [76-79]. Outro estudo relatado na literatura é o uso dos radicais livres como sonda de spin, com a finalidade de se investigar, *in situ*, propriedades antioxidantes [80]. Mais detalhes sobre aplicabilidade dessa classe de materiais podem ser encontrados em vários livros como os dos autores Likhtenshtein e Berliner [12-18].

Os primeiros autores a observar a estabilidade dos radicais nitróxidos⁶ foram Neiman e Rozantsev [83]. Nesse trabalho, os autores apresentaram o radical TEMPONE ($C_9H_{16}NO_2$, *2,2,6,6-Tetramethyl-4-oxo-1-piperidinyloxy*) e descreveram inúmeros acoplamentos de outras moléculas a ele, sem a perda do paramagnetismo. Assim como observado por Neiman e Rozantsev, além da grande

⁶ Em seus trabalhos Rozantsev et al. [81]. obtiveram resultados que corroboraram com a teoria de que o elétron desemparelhado estaria delocalizado entre os átomos de nitrogênio e oxigênio da molécula. O principal argumento do autor se baseou no cálculo da energia de ligação para a ligação N-O·, resultado obtido a partir do cálculo da entalpia de combustão e da média das energias de ligação termoquímicas. Segundo Rozantsev, a ligação N-O· possui uma energia de ligação de 101 kcal, enquanto para as ligações N-O e N=O são, respectivamente, 55 kcal e 145 kcal [82]. Com o objetivo de confirmar a estabilidade da ligação N-O·, Rozantsev et al. [81] obteve a energia de dissociação desta ligação radicalar e de seus compostos protonados, ou seja, para a ligação N-OH. O resultado obtido foi novamente próximo do anterior para a ligação N-O· (100,5 kcal) enquanto para a ligação N-OH o valor encontrado foi de 70,1 kcal. Isso comprovou que os radicais nitróxidos são também mais estáveis energeticamente que seus compostos protonados.

estabilidade dos radicais nitróxidos, o sinal de EPR dessa classe de radicais foi verificado como sendo bastante característico, isto é um tripleto de linhas, referentes às transições de spin causadas pela interação do elétron desemparelhado com o spin nuclear $I = 1$ do ^{14}N (abundância natural $\sim 100\%$).

Os radicais nitróxidos podem se ligar às outras estruturas ou mesmo sofrer modificações sem a alteração do grupo radicalar ($\text{NO}\cdot$). A estabilidade dos nitróxidos se deve à delocalização do elétron desemparelhado, podendo ser representado como uma superposição de estados de ressonância. Na Figura 2.2 está representada para a molécula do radical TEMPOL (*4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinyloxy*) esta ressonância dos estados da molécula dos nitróxidos:

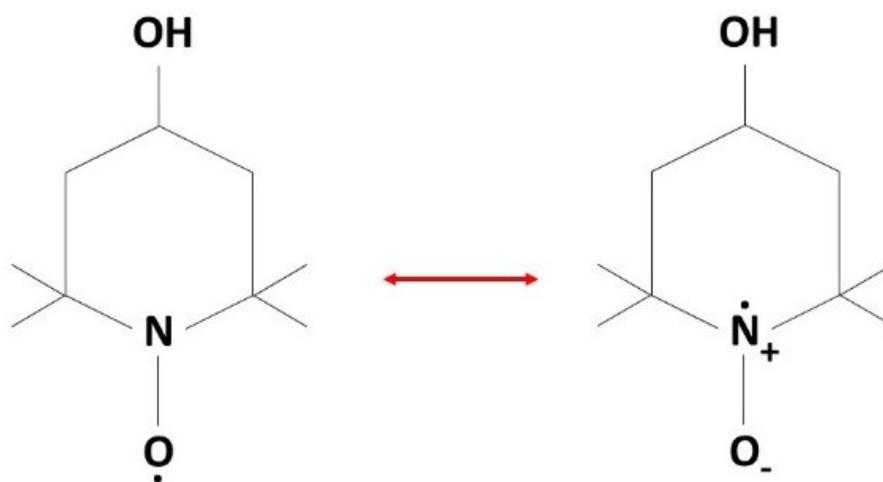


Figura 2.2: Representação da ressonância dos estados da molécula do radical TEMPOL.

Sendo a principal motivação deste trabalho o estudo da dinâmica local de AuNRs e de seus ligantes, a escolha de um marcador de spin para se ligar a eles é indispensável. Dada a estabilidade química dos radicais nitróxidos, a funcionalização destes para a marcação das nanoestruturas de ouro é uma grande possibilidade. Com o objetivo da formação de um sistema estável (marcador + nanoestrutura de ouro), tem-se a necessidade de um marcador de spin que possua um elemento com alta afinidade com o ouro. O acoplamento de um grupo tiol à estrutura molecular de um radical nitróxido estável comercial (ex. TEMPOL) é nossa proposta neste trabalho.

A partir de agora, serão apresentados os principais resultados relatados na literatura para os radicais do tipo nitróxido (em especial o radical TEMPOL)

extraídos da técnica de EPR. Em seguida será descrito os resultados obtidos também pela técnica de EPR para os marcadores de spin ligados às nanopartículas de ouro.

Inicia-se descrevendo os resultados denominados como fatores de calibração para o radical livre de TEMPOL. Dentre eles há a variação do sinal de EPR com a concentração do radical TEMPOL livre em solução, em termos da intensidade do sinal [84, 85]. Os gráficos obtidos por estes autores demonstram dependência linear da intensidade do sinal de EPR com a concentração do radical livre de TEMPOL, como era esperado. De fato o TEMPOL é usado exatamente como padrão para concentração em uma vasta gama de trabalhos, inclusive neste, segundo o protocolo em [86]. A mudança na forma de linha do espectro de EPR em relação a variação da concentração do radical livre também já foi discutido na literatura [13]. Em geral, o espectro esperado para o radical livre de TEMPOL em solução é definido por um tripleto, resultante de uma interação do elétron desemparelhado ($S = 1/2$) com o spin nuclear do nitrogênio ($I = 1$). Relatos da literatura mostram que a partir de uma certa concentração ($\sim 10mM$) a forma de linha do tripleto é deformada [13]. Em concentrações mais elevadas ($\sim 100mM$) a forma de linha do tripleto é substituído por uma linha (com forma *Voightiana*⁷) larga [13]. Esta variação da forma de linha do espectro é devido a interação de troca, resultante da interação entre os spins dos radicais quando em alta concentração. Likhtenshtein *et al.* apresenta alguns espectros de EPR para um radical nitróxido (*[Bis(2-methyl-2-propanyl)amino]oxidanyl, DTBNO*) que ilustram a variação da forma de linha com o aumento da concentração radicalar [13].

A contribuição da interação de troca ao espectro de EPR pode ser quantificada pela constante de acoplamento de troca isotrópica (J_0). A variação da forma de linha do espectro de um radical nitróxido em relação ao valor da constante de acoplamento de troca é ilustrada na ajuste obtida por Dobryakov [87].

No capítulo 3, são discutidos os conceitos básicos da técnica de EPR, fundamentada na absorção da onda eletromagnética com energia da faixa da micro-ondas pelo sistema de spins. Adiantando, em uma determinada potência de micro-ondas o sistema entra em regime de saturação da população dos estados de spin. O

⁷ Como veremos mais adiante, tal forma de linha é a convolução entre uma Lorentziana e uma Gaussiana.

valor da potência de micro-ondas que define a saturação do sistema é de extrema importância para cada amostra paramagnética em questão, essa medida pode ser denominada como curva de saturação. Em trabalhos como [84, 85] o sinal de absorção do espectro de EPR é apresentado em função da potência de micro-ondas para o radical TEMPOL. Contudo, outro elemento que definirá a curva de saturação para uma amostra paramagnética é a cavidade de ressonância utilizada. Tamski obteve diferentes curvas de saturação para a amostra de TEMPOL em solução aquosa para diferentes cavidades do espectrômetro de EPR [85].

A geometria da cavidade de ressonância, sendo ela retangular ou cilíndrica, influenciará nos modos dos campos elétricos e magnético em seu interior. Portanto, a escolha da geometria da cavidade deverá ser tomada com a finalidade do experimento. Por exemplo, as cavidades cilíndricas são indicadas para medidas que precisam ser iluminadas (foto-EPR) por conter uma janela ótica da ordem de $\lambda/2$. Já as cavidades retangulares são ideais para uso de flat-cells, devido a independência da largura da cavidade ao fator de qualidade (Q), que será o fator que indica quão eficientemente a cavidade armazena energia de micro-ondas. O uso do solvente será outro fator que irá influenciar o fator de qualidade Q, sendo a constante dielétrica um fator crucial para o acoplamento da cavidade. Para solventes polares, como a água, haverá uma perda considerável no fator de qualidade Q devido à absorção não ressonante da amostra através do campo elétrico. Para casos limites, pode acontecer a impossibilidade do acoplamento da cavidade decorrente da quantidade do solvente polar utilizado.

Como já discutido anteriormente, as aplicações dos marcadores de spin em sistemas biológicos se dão comumente em soluções, em que podem ser empregados tanto radicais livres quanto os marcadores de spins ligados a substratos. Assim, um fator importante a ser analisado é a influência dos solventes em soluções radicalares. Com a elevação da polaridade do solvente, haverá o deslocamento da densidade de spin do elétron desemparelhado em direção ao átomo de nitrogênio, aumentando assim a população eletrônica no orbital π_z^* [64]. A técnica de EPR é apropriada para aferir esta variação em relação à polaridade do solvente, uma vez que as componentes do tensor hiperfino estimam a distribuição de probabilidade do elétron desemparelhado. O aumento da componente z do tensor hiperfino com a variação do solvente indica o aumento da polaridade do meio, devido, ao deslocamento da densidade eletrônica em direção ao átomo de nitrogênio

[64]. A componente x do tensor \vec{g} também será sensível à mudança da polaridade do solvente, o valor dessa componente do radical irá diminuir em solventes polares se aproximando do valor do elétron livre ($g_e = 2,0023$) [64, 88]. Lebedev *et al.* retrata os valores das componentes dos tensores referentes ao Hamiltoniano para o sistema do radical TEMPOL em diversos solventes [88].

Outro parâmetro que terá importância fundamental para o estudo da dinâmica dos marcadores de spin em solução será a viscosidade do solvente que compõe o sistema. Este parâmetro reflete um frenamento do movimento rotacional das moléculas do marcador de spin, causado pela interação destas com as moléculas do solvente. A teoria que descreve a dinâmica dos marcadores de spin imersos em solventes com viscosidades baixas ($<9 \times 10^3$ cp), prevê o impedimento rotacional causado pela interação do marcador de spin com o solvente pela equação de difusão em fluidos de Stoke-Einstein [89] (vide capítulo 3). Dentre os diversos trabalhos que demonstram experimentalmente a correlação da viscosidade do solvente com a dinâmica molecular de radicais da classe dos nitróxidos, destaca-se um trabalho recente dos autores Joshua Biller *et al.* [90] que aferem a influência da viscosidade para os tempos de correlação do radical TEMPONE deuterado em cinco solventes (medidos com EPR em 34 GHz e a 295 K), resultando em uma queda de um fator ~ 2 no tempo de correlação para difusão rotacional, do solvente mais viscoso para o menos viscoso [90].

Um dos primeiros objetivos deste trabalho é caracterizar sistematicamente por EPR, o TEMPOL livre em solução. Além disso, e nestes mesmos moldes, caracterizaremos também o novo marcador de spin desenvolvido neste trabalho especificamente para nanobastões de ouro, o ALTEMPOL (TEMPOL-ácido lipóico). Após comparar os resultados experimentais desta caracterização entre si, e com a literatura, utilizaremos o ALTEMPOL para a marcação dos nanobastões de ouro.

2.4 – Marcação de Spins em Nanoestruturas de Ouro – Estado da arte

No que se diz respeito aos marcadores de spin ligados às nanoestruturas de ouro, a maioria dos resultados experimentais têm sido relatada pelos grupos de A. Carageorghopol e V. Chechik, e apenas para AuNP [8-10]. Estes autores publicaram, em 2003, dados comprovando o sucesso da ligação de marcadores de spin da classe dos nitróxidos em nanopartículas de ouro. Além disso, foi feita uma

análise preliminar da dinâmica rotacional destes marcadores através da técnica de EPR [8]. Com o intuito de se investigar a influência do comprimento das moléculas do marcador de spin em sua dinâmica rotacional, os autores sintetizaram três marcadores a partir da reação de acoplamento entre ácidos sulfonados e o radical livre TEMPAMINA ($C_9H_{19}N_2O$, *4-Amino-2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinyloxydanyl*). Além da variação da extensão de sua cadeia molecular, a presença dos átomos de enxofre nos marcadores, provenientes dos ácidos sulfonados, possibilitou a troca de moléculas do agente de recobertura por marcadores de spin a superfície da AuNP. A síntese das nanopartículas de ouro (~ 5nm) utilizada pelos autores seguiu o método de Brust, empregando diferentes moléculas tioladas como agentes de recobertura (butanotiol, hexanotiol, octanotiol e octadecanotiol). Nesse trabalho os autores chegaram à conclusão de que o menor impedimento rotacional para uma molécula do marcador de spin ligado a superfície de ouro ocorre, quando é utilizado o marcador de spin de cadeia molecular mais extensa e, moléculas do agente de recobertura de menor comprimento. Após análise da forma de linha do espectro de EPR dos marcadores de spin verificou-se que as nanopartículas com maior densidade superficial de marcadores de spin ($> 10/AuNP$) foram aquelas em que o agente de recobertura usado foi a trifenilfosfina por possibilitar maior eficiência na reação de troca entre radicais e agentes de recobertura. A maior afinidade do grupo tiol com a superfície de ouro das AuNPs, em relação a afinidade desta com o grupo fosfina, garantem a maior eficiência na reação de troca [8].

Em outro trabalho, publicado no ano de 2005, Agneta Caragheorghopol *et al.* estudaram a interação Dipolo-Dipolo a partir do espectro de pó (EPR) de amostras congeladas de AuNPs com dois marcadores de spin de comprimento distintos [9]. A interação Dipolo-Dipolo, segundo os autores, é predominante na interação entres spins eletrônicos em regimes rígidos, enquanto, que em soluções em temperatura ambiente a interação preeminente será a interação de troca. A quantificação da interação Dipolo-Dipolo entre marcadores de spins adsorvidos à superfície das AuNPs ($\varnothing \sim 1,5$ nm), recobertas com trifenilfosfina, foi feita através de um parâmetro empírico, a razão entre as alturas pico a pico (d_1/d) das transições do espectro de EPR (Figura 2.3).

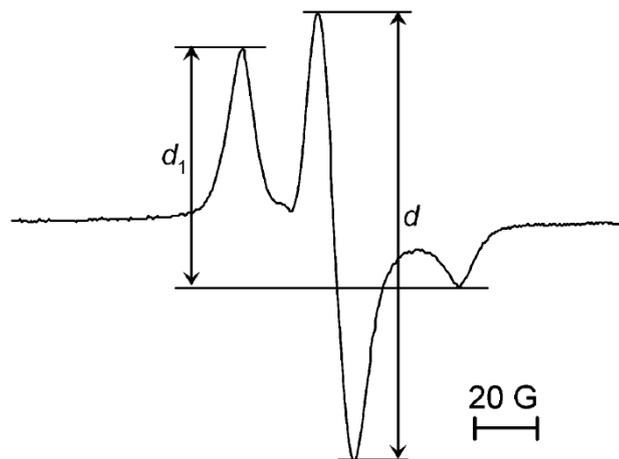


Figura 2.3: Espectros de EPR de AuNPs marcadas com radicais nitróxidos em solução congelada de toleuno/diclorometano, extraídos de [9]. Destacam-se as alturas pico a pico das transições que possibilitam a quantificação da interação Dipolo-Dipolo entre os spins dos marcadores.

Nesse trabalho, os autores obtiveram uma estimativa da distância entre as moléculas dos marcadores de spin adsorvidos na mesma AuNP. Ela foi determinada pela comparação com soluções do radical TEMPO ($C_9H_{18}NO$, (2,2,6,6-Tetramethyl-1-piperidinyloxy)) de concentrações conhecidas. Em seguida, os autores, modelaram o parâmetro d_1/d , sensível à interação Dipolo-Dipolo entre spins vizinhos, para uma distribuição gaussiana de tamanhos das AuNPs, com distribuição aleatória dos marcadores de spin na superfície do ouro, e, por fim, na ausência de interação de troca entre os spin. Os resultados obtidos são consistentes com os parâmetros encontrados experimentalmente para uma recobertura de até 3 marcadores de spin por nanopartículas.

Dois anos mais tarde (2007), esse mesmo grupo publicou um trabalho em que foi feita uma análise da difusão rotacional de diversos marcadores de spin ancorados à superfície de AuNPs ($\sim 5\text{nm}$) recobertas com uma variedade de composto (butanotiol, octanotiol, octadecanotiol e PEG) [10]. O ajuste dos espectros de EPR permitiram os autores encontrar os valores principais para os tensores \vec{g} e \vec{A} dos radicais nitróxidos dos marcadores. Com os valores da difusão rotacional, calculados a partir dos tempos de correlação, em função da variação da temperatura do sistema, os autores aferiram o valor da energia de ativação rotacional para cada marcador de spin utilizado para a marcação das AuNPs [10].

Dado os resultados encontrados pelo grupo Agneta Caragheorghopol *et al.* para a marcação das AuNPs, nanoestruturas de morfologia distintas podem

revelar outras propriedades. O uso de nanobastões para marcação acrescentaria ainda mais a respeito da distribuição dos marcadores na superfície do ouro. Em previsão, o espectro de EPR dos AuNRs marcados apresentaria duas contribuições distintas. A interação das moléculas do surfactante com os marcadores e a interação entre os spins ocorrerá da maneira distinta, dada à ligação do radical na face ou nas pontas. No entanto, não há na literatura, até a presente data, resultados para marcadores de spins ligados a outras nanoestruturas de ouro e, em especial aos nanobastões de ouro, tema deste trabalho. A seguir, no capítulo 3, são apresentados os conceitos básicos da principal técnica utilizada aqui, a Ressonância Paramagnética Eletrônica.

3 – RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA: TEORIA E EXPERIMENTO

A principal técnica experimental utilizada neste trabalho é a Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR, do inglês *Electron Paramagnetic Resonance*). Neste capítulo será feita uma breve introdução sobre ela, discutindo alguns de seus conceitos básicos. Dentre eles, destacam-se: o Hamiltoniano de spin com as interações Zeeman e Hiperfina; a forma de linha do espectro de EPR; e os mecanismos de relaxação de radicais em líquidos. Ênfase será dada à aplicação destes conceitos ao estudo de radicais nitróxidos ($-\text{NO}\cdot$), presentes nos marcadores de spin, foco deste trabalho. No final deste capítulo, o espectrômetro de EPR usado neste trabalho será apresentado.

3.1. – O Hamiltoniano de Spin – Interações magnéticas

O momento de dipolo magnético $\vec{\mu}_S$ associado ao spin do elétron pode ser escrito como:

$$\vec{\mu}_S = -g_e \mu_B \vec{S}, \quad (3.1)$$

onde g_e é uma constante adimensional denominada fator g do elétron livre⁸, e μ_B o magnéton de Bohr⁹. Na presença de um campo magnético estático \vec{B}_0 , haverá uma interação entre este, e o momento magnético. O Hamiltoniano de spin que descreve esta interação será:

$$\mathcal{H} = -\vec{\mu}_S \cdot \vec{B}_0 = g_e \mu_B B_0 S_z. \quad (3.2)$$

Por convenção, toma-se o eixo z como a direção do campo magnético aplicado, isto é, $\vec{B}_0 = B_0 \hat{k}$.

⁸ $g_e = 2,00231930436182(52)$ (<https://physics.nist.gov/> acessado em 16/02/2018).

⁹ $\mu_B = \frac{e\hbar}{2m_e} = 927,400\,9994(57) \times 10^{-26} \text{ J/T}$ (<https://physics.nist.gov/> acessado em 16/02/2018).

O spin de um elétron livre é $S = 1/2$. Logo, o momento de dipolo magnético associado a ele possui duas orientações possíveis, ou autoestados ($|\alpha_e\rangle$ e $|\beta_e\rangle$)¹⁰, cuja degenerescência é levantada na presença de \vec{B}_0 . Estes autoestados são associados, respectivamente, aos números quânticos $m_s = 1/2$ e $m_s = -1/2$:

$$\begin{aligned} \mathcal{H} |\alpha_e\rangle &= E_\alpha |\alpha_e\rangle \Rightarrow E_\alpha = \frac{1}{2} g_e \mu_B B_0 \\ \mathcal{H} |\beta_e\rangle &= E_\beta |\beta_e\rangle \Rightarrow E_\beta = -\frac{1}{2} g_e \mu_B B_0. \end{aligned} \quad (3.3)$$

Os dois níveis de energia (E_α e E_β) das equações acima, e representados na figura abaixo, variam linearmente com a intensidade do campo externo. A este efeito é dado o nome de efeito Zeeman eletrônico.

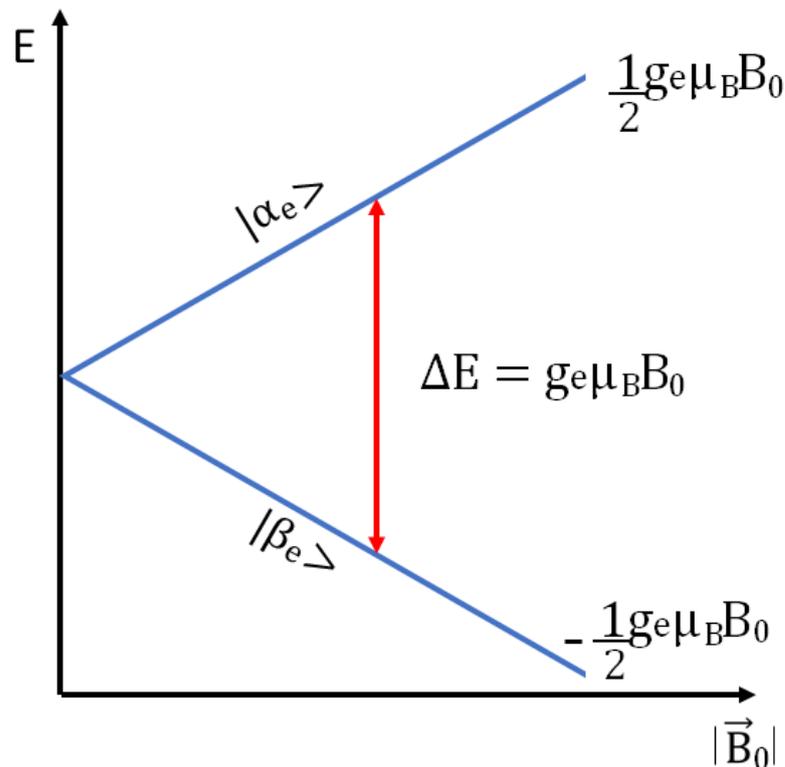


Figura 3.1: Diagrama energético do efeito Zeeman para o elétron livre.

Usualmente outras contribuições ao Hamiltoniano de spin serão também observadas. Dentre elas as mais importantes são aquelas causadas pela presença

¹⁰ Na notação de Dirac.

de um spin nuclear diferente de zero na vizinhança do spin eletrônico do radical. Assim como no efeito Zeeman eletrônico, um campo magnético externo também quebrará a degenerescência dos estados de spin nucleares. Esta interação é denominada de interação Zeeman nuclear, sendo esta três ordens de grandeza menor que a interação Zeeman eletrônica. Isso ocorre porque o magnéton nuclear μ_N (do próton)¹¹ é cerca de 1840 vezes menor que o magnéton de Bohr μ_B para o elétron¹². O desdobramento dos níveis para o efeito Zeeman nuclear é análogo ao descrito pelas equações (3.3). Diferenças existem na multiplicidade de autoestados e no ordenamento dos níveis. Estes dependem, respectivamente, do spin nuclear que produz $2I + 1$ níveis de energia, e do fator g nuclear de cada isótopo.

A outra contribuição ao Hamiltoniano de spin devido à presença de um spin nuclear não nulo na proximidade do elétron desemparelhado será a interação Hiperfina. Não menos importante que a interação Zeeman nuclear, ela é resultado da interação entre os momentos de dipolo magnético nuclear e eletrônico.

Para um elétron livre interagindo com um único núcleo, na presença de um campo externo, o Hamiltoniano de spin é dado por:

$$\mathcal{H} = g_e \mu_B B_0 S_z + a S_z I_z - g_N \mu_N B_0 I_z. \quad (3.4)$$

O primeiro termo de (3.4) é referente ao efeito Zeeman eletrônico, o segundo é devido à interação Hiperfina, e o último devido ao efeito Zeeman nuclear. A constante a é conhecida como constante de acoplamento hiperfino. Como a interação Zeeman eletrônica é muito maior do que a interação hiperfina (e Zeeman nuclear), a solução do Hamiltoniano acima é usualmente obtida, em primeira ordem, pela Teoria de Perturbação Independente do Tempo.

Para um sistema isolado com um elétron ($S = \frac{1}{2}$) e um núcleo de $I = 1$ ¹³ e, assumindo inicialmente interações isotrópicas, têm-se os seguintes autoestados e autovalores para os operadores de spin:

¹¹ $\mu_B = 5,050\,783\,699(31) \times 10^{-27} \text{ J/T}$ (<https://physics.nist.gov/> acessado em 16/02/2018).

¹² Devido à razão entre as massas de repouso do próton e do elétron.

¹³ Similar ao dos radicais nitróxidos em que o elétron desemparelhado interage com um núcleo de ^{14}N ($I = 1$).

$$\begin{aligned}
 S_z|\alpha_e\rangle &= \frac{1}{2}|\alpha_e\rangle & S_z|\beta_e\rangle &= -\frac{1}{2}|\beta_e\rangle \\
 I_z|\alpha_N\rangle &= 1|\alpha_N\rangle & I_z|\beta_N\rangle &= 0|\beta_N\rangle & I_z|\gamma_N\rangle &= -1|\gamma_N\rangle.
 \end{aligned}
 \tag{3.5}$$

Expandindo o espaço de spin eletrônico e nuclear via produto tensorial $|\varphi_e\rangle \otimes |\varphi_N\rangle = |\varphi_e\varphi_N\rangle$, pode-se definir os autoestados do sistema completo como:

$$\begin{aligned}
 |\phi_1\rangle &= |\alpha_e\alpha_N\rangle & ; & \quad |\phi_2\rangle = |\alpha_e\beta_N\rangle & ; & \quad |\phi_3\rangle = |\alpha_e\gamma_N\rangle \\
 |\phi_4\rangle &= |\beta_e\alpha_N\rangle & ; & \quad |\phi_5\rangle = |\beta_e\beta_N\rangle & ; & \quad |\phi_6\rangle = |\beta_e\gamma_N\rangle.
 \end{aligned}
 \tag{3.6}$$

Aplicando o Hamiltoniano (3.4) aos autoestados listados em (3.5) e (3.6), as energias deste sistema podem ser obtidas analiticamente. O resultado deste cálculo é representado no esquema da figura abaixo.

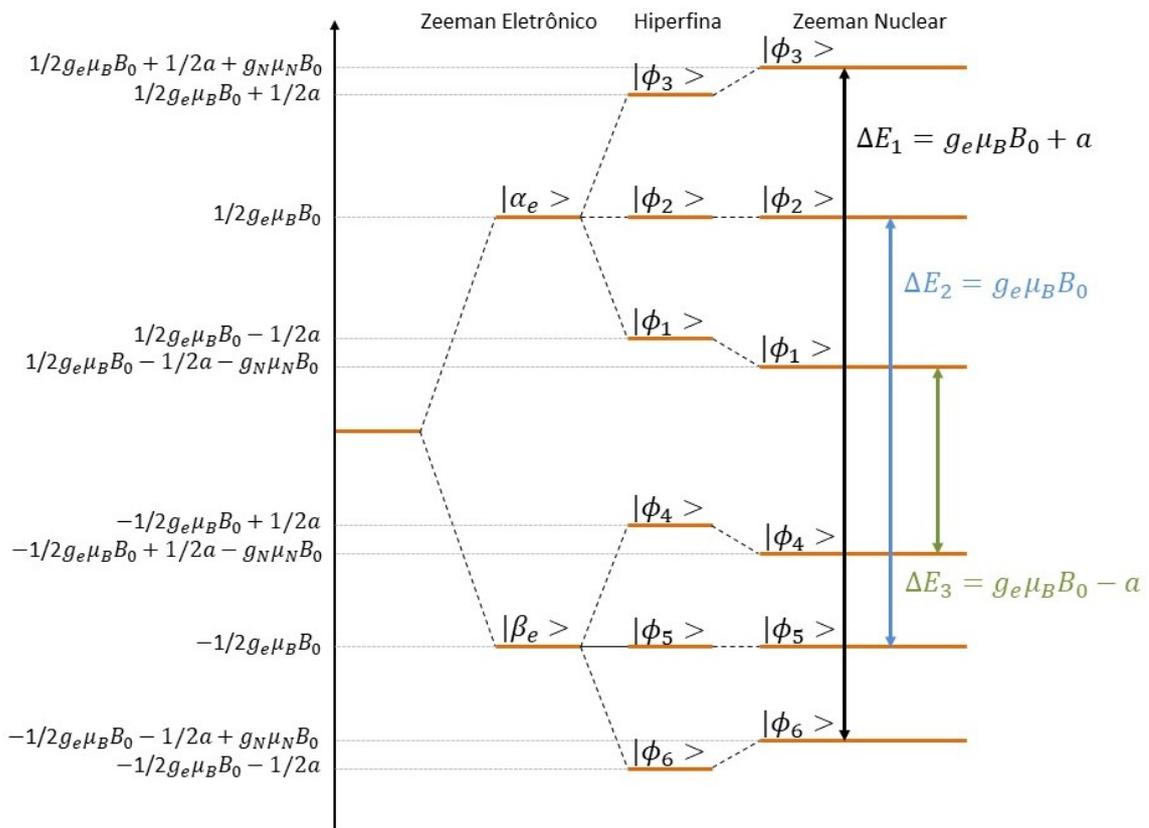


Figura 3.2: Diagrama de níveis de energia de um sistema com $S = 1/2$ e $I = 1$, na presença de um campo \vec{B}_0 . Também são mostradas as transições que dão origem ao espectro de EPR, isto é, para as regras de seleção $|\Delta m_s = 1|$ e $|\Delta m_l = 0|$ (a serem discutidas adiante).

No diagrama da figura 3.2, foi assumido no cálculo, que a interação Hiperfina é maior do que a interação Zeeman nuclear. Note que esta última contribuição não muda a energia das transições entre os níveis de spin eletrônico e, por isso, pode ser ignorada no Hamiltoniano quando formos tratar de espectros de EPR.

Em centros paramagnéticos reais, no entanto, o fator g do elétron livre (g_e) é substituído por um fator g que, na maioria dos casos, se afasta de g_e devido à contribuição orbital ao momento de dipolo magnético eletrônico. Esta perturbação pode ser escrita em termos da interação spin-órbita, como mostrado na equação:

$$g_{ij} = g_e \delta_{ij} - 2\lambda \sum_l \frac{\langle \psi_0 | L_i | \psi_l \rangle \langle \psi_l | L_j | \psi_0 \rangle}{E_l - E_0}, \quad (3.7)$$

onde δ_{ij} é o delta de Kronecker; λ o acoplamento spin-órbita; e ψ_0 e ψ_l as funções de onda do estado fundamental e do estado excitado do elétron, respectivamente, E_0 e E_l são as energias correspondentes.

Além da interação spin-órbita (λ), o campo cristalino (eletrostático) causado pelos íons vizinhos, cuja intensidade é Δ , também afeta o fator g . Este campo reflete a simetria local do centro paramagnético em moléculas e sólidos, modificando as funções de onda do elétron desemparelhado. Como consequência o fator g , inicialmente escalar, passa a ser substituído por um tensor \vec{g} .

A interação spin-órbita e o campo cristalino têm efeitos contrários. Por isso, cada uma das três componentes independentes de \vec{g} (g_{xx} , g_{yy} e g_{zz}), ao longo das direções principais, apresentará um desvio $\delta g_{ii} = g_e - g_{ii}$ ($i = x, y, z$). Este dependerá, por sua vez, da razão entre a constante de acoplamento spin-órbita e o valor da contribuição do campo cristalino (λ/Δ) [91].

Assim como o efeito Zeeman eletrônico, a interação hiperfina em sistemas anisotrópicos também reflete a simetria da vizinhança local do elétron desemparelhado e, por isso, também terá um caráter tensorial. A diferença entre as componentes principais do tensor hiperfino \vec{A} se dá pela mistura dos orbitais eletrônicos na vizinhança do núcleo em questão. Para um elétron num orbital puramente tipo "s", o tensor se reduz a uma constante de acoplamento isotrópica que é proporcional à densidade eletrônica no sítio do núcleo. Para elétrons em

orbitais tipo “p”, por exemplo, a interação hiperfina é anisotrópica e o acoplamento tensorial. Por conveniência, o tensor hiperfino pode ser decomposto em uma parte isotrópica e outra anisotrópica:

$$\vec{A} = (a\vec{I} + \vec{B}). \quad (3.8)$$

A constante a é uma grandeza escalar conhecida como Termo de Contato de Fermi [89]:

$$a = \frac{2}{3} \mu_0 g_e \mu_B g_N \mu_N |\psi^2(0)|. \quad (3.9)$$

Em (3.9) $\psi(0)$ será o valor assumido pela função de onda do elétron desemparelhado, tipo “s”, na posição nuclear [14].

O tensor hiperfino anisotrópico \vec{B} tem, por sua vez, traço nulo. Suas componentes podem ser decompostas em duas constantes: b e b' .

$$\vec{B} = \begin{pmatrix} -b + b' & & \\ & -b - b' & \\ & & 2b \end{pmatrix}. \quad (3.10)$$

Para uma simetria axial $b' = 0$ e:

$$\begin{aligned} A_{\parallel} &= a + 2b \\ A_{\perp} &= a - b. \end{aligned} \quad (3.11)$$

Havendo uma redução de simetria a partir da simetria axial, este desvio será representado pela constante $b' \neq 0$.

Os elementos do tensor \vec{B} ($B_{xx} = -b + b'$, $B_{yy} = -b - b'$ e $B_{zz} = 2b$) estão, por sua vez, relacionados à interação dipolo-dipolo entre o elétron desemparelhado (em orbitais tipo “p”, “d” ou “f”) e o núcleo em questão [92]. Eles são dados por:

$$B_{ij} = \frac{\mu_0}{4\pi} g_e \mu_B g_N \mu_N \int \left(\frac{3x_i x_j}{r^5} - \frac{\delta_{ij}}{r^3} \right) |\psi(r)|^2 dV, \quad (3.12)$$

onde x_i e x_j descrevem as componentes do vetor posição do spin eletrônico e do nuclear, respectivamente, e $\psi(r)$ é a função de onda eletrônica. Vale lembrar que, na maioria dos casos, a função de onda do elétron é composta de uma mistura de orbitais que faz com que haja na interação hiperfina, tanto uma contribuição isotrópica devido ao Termo de Contato de Fermi, quanto devido à interação dipolar.

O sistema a ser investigado neste trabalho, não é um sistema isolado $S = 1/2$ e $I = 1$ isotrópico. Ele é um radical nitróxido ($-\text{NO}\cdot$), ligado a uma molécula orgânica complexa e, portanto, apresentará anisotropia tanto na interação Zeeman, quanto na Hiperfina.

A distribuição eletrônica para o radical $\text{NO}\cdot$, dada pela teoria do orbital molecular é representada na Figura 3.3. Ela resulta em um elétron desemparelhado ocupando o orbital molecular antiligante π_z^* .

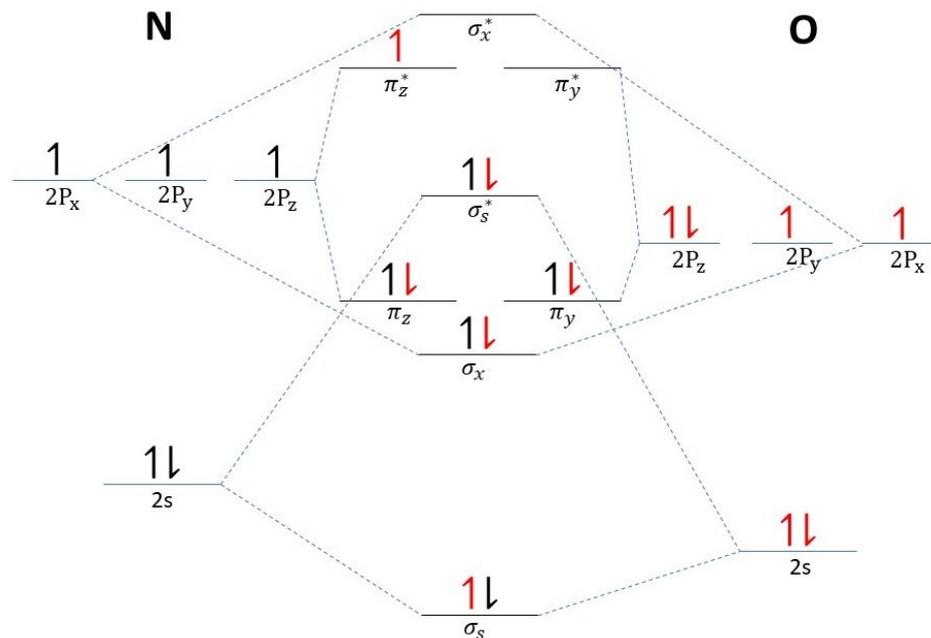


Figura 3.3: Distribuição eletrônica da ligação N-O de acordo com a teoria dos orbitais moleculares.

Por simplicidade, pode-se tratar este elétron do orbital molecular π_z^* como estando em um orbital predominantemente do tipo $2p_z$ centrado no átomo de nitrogênio, como mostrado na Figura 3.4 [64].

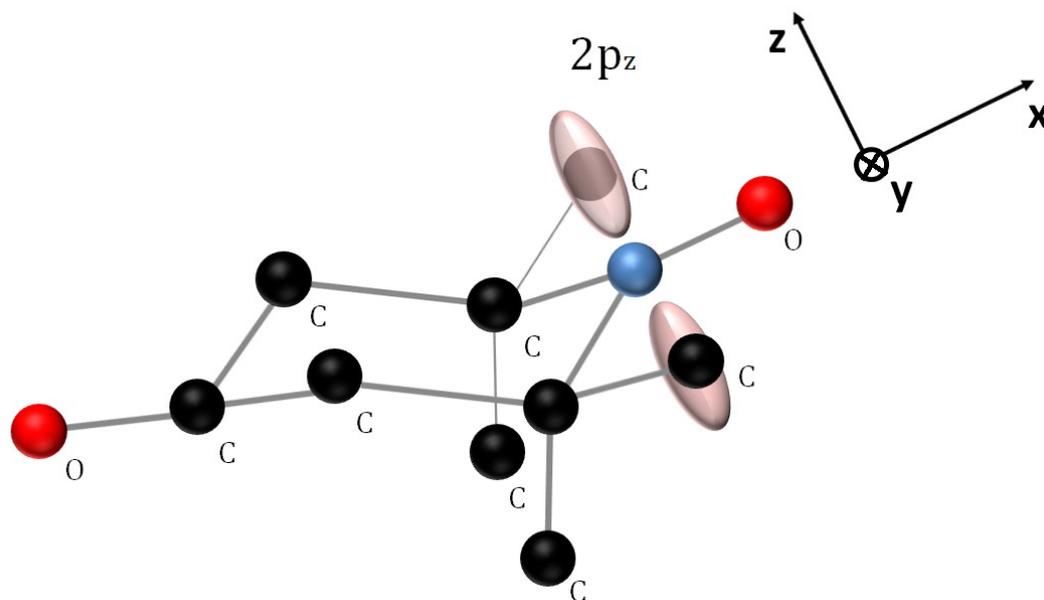


Figura 3.4: Representação da conformação molecular do radical (-NO·) na molécula de TEMPOL e do orbital $2p_z$ do átomo de nitrogênio (em azul) segundo os eixos moleculares. Adaptado de [93].

Na figura acima, o radical nítróxido está ligado à molécula orgânica complexa formando o radical TEMPOL, fundamental aos os estudos neste trabalho. Para este tipo de radical, em que apenas átomos leves estão envolvidos nas ligações, a interação spin órbita λ é muito pequena. Como consequência, as componentes do tensor \vec{g} estão muito próximas do fator g do elétron livre (g_e), com desvios δg_{ii} menores que 1% [1,4].

Além disso, o elétron desemparelhado num orbital predominantemente tipo $2p_z$ interage com núcleos do átomo vizinhos como o nitrogênio. Este tem como isótopo mais abundante o ^{14}N (abundância natural de 99,63%) de spin nuclear $I = 1$. Logo, haverá uma interação hiperfina \vec{A} entre um spin eletrônico $S = 1/2$ e um nuclear $I = 1$, descrita por um Hamiltoniano semelhante ao da equação (3.4) e com desdobramentos de níveis parecidos com os da Figura 3.2.

Enquanto que para o nítróxido a anisotropia do tensor g é pequena por razões expostas acima, a interação Hiperfina terá um caráter altamente anisotrópico devido à localização do elétron desemparelhado em um orbital tipo “p”. O tensor \vec{A} tem como direções principais: o eixo z paralelo ao orbital $2p_z$, o eixo x paralelo à ligação N-O e o eixo y ortogonal aos demais eixos como representado na Figura 3.4.

Por convenção, a componente A_{zz} do tensor hiperfino terá o maior valor ao longo de $2p_z$. A determinação da interação hiperfina será de grande importância ao estudo dos radicais nitróxidos, pois permitirá aferir o deslocamento da função de onda eletrônica centrada no núcleo de nitrogênio em função, por exemplo, da polaridade do solvente, caracterizando assim, o meio externo à molécula.

Ao longo deste trabalho, o Hamiltoniano de spin adotado para a análise do radical nitróxido será dado por:

$$\mathcal{H} = \mu_B \vec{B}_0 \vec{g} \vec{S} + \vec{S} \vec{A} \vec{I}. \quad (3.13)$$

Valores típicos para as componentes dos tensores \vec{g} e \vec{A} para o radical TEMPOL são mostrados abaixo:

Tabela 3.1: Valores para as componentes principais dos tensores \vec{g} e \vec{A} para o radical TEMPOL.

g_{xx}	g_{yy}	g_{zz}	$A_{xx}(mT)$	$A_{yy}(mT)$	$A_{zz}(mT)$	Ref.
2,0085	2,0059	2,0021	0,77	0,70	3,62	[94] ¹⁴
2,0098	2,0062	2,0021	0,73	0,50	3,35	[95]
2,0091	2,0055	2,0023	0,71	0,79	3,86	[96] ¹⁵
2,0109	2,0068	2,0033	0,71	0,90	3,50	[96] ¹⁶

A seguir, será discutido o fenômeno de ressonância paramagnética que permitirá, a partir do experimento de EPR, determinar os parâmetros do Hamiltoniano de spin.

3.2 – Ressonância Paramagnética – O Fenômeno

Para induzirmos transições entre os estados de spin como os representados pela Figura 3.1 e 3.2, aplica-se ao sistema uma radiação eletromagnética de frequência ν , de tal que a energia do fóton ($h\nu$) corresponda

¹⁴ Parâmetros extraídos de amostras cristalinas de TEMPOL.

¹⁵ Parâmetros extraídos de amostras de TEMPOL em solução de Água/Glicerol.

¹⁶ Parâmetros extraídos de amostras de TEMPOL em solução de Etanol deuterado/Etanol protonado.

exatamente à separação de energia entre os níveis. Esta é a condição de ressonância, que para o caso de um elétron livre¹⁷, é dada pela seguinte equação:

$$h\nu = \Delta E \Rightarrow h\nu = g_e\mu_B B_0. \quad (3.14)$$

Na equação acima, pode-se ver que para um sistema em que o campo magnético estático tem magnitude de cerca 0,34 T, a frequência ν será na faixa das micro-ondas, isto é, aproximadamente 9.5 GHz (banda X). Usualmente, por motivos técnicos, varia-se o campo magnético mantendo-se ν constante de modo a se determinar g_e .

Todavia, não basta que a condição de ressonância da equação (3.14) seja atendida para que haja a transição entre os estados de spin. É também fundamental que o campo magnético oscilante da radiação incidente (micro-ondas) seja perpendicular ao campo estático \vec{B}_0 . A seguir, será demonstrada esta segunda condição a partir do cálculo das regras de seleção para as transições de EPR.

Seja $\wp_{\alpha\beta}(\nu)$ a probabilidade, por unidade de tempo, de uma transição de dipolo magnético para um sistema com $S = 1/2$, da equação (3.2), induzida por um campo oscilante que segue a condição de ressonância exposta na equação (3.14). Após ser calculada pela Teoria da Perturbação Dependente do Tempo, $\wp_{\alpha\beta}(\nu)$ será descrita pela Regra de Ouro de Fermi [97]:

$$\wp_{\alpha\beta}(\nu) = \frac{1}{4\hbar^2} |\langle \alpha_e | \mathcal{H}_{MW}(t) | \beta_e \rangle|^2 \wp(\nu). \quad (3.15)$$

Na equação acima, $|\beta_e\rangle$ e $|\alpha_e\rangle$ são os estados iniciais e finais do sistema. $\mathcal{H}_{MW}(t)$ é um Hamiltoniano dependente do tempo que, por sua vez, está associado à interação Zeeman do campo magnético \vec{B}_1 oscilando na direção x (para micro-ondas linearmente polarizada). $\mathcal{H}_{MW}(t)$ é dado por:

$$\mathcal{H}_{MW}(t) = 2g_e\mu_B B_1 S_x \cos(2\pi\nu t). \quad (3.16)$$

¹⁷ Hamiltoniano de spin: $\mathcal{H} = g_e\mu_B B_0 S_z$ (3.2).

A função $\mathcal{G}(\nu)$ em (3.15) é uma função de forma para a transição, associada tanto à densidade de estados do nível excitado, quanto a uma possível dispersão do campo de micro-ondas. Ela é normalizada de tal modo que $\int_0^{+\infty} \mathcal{G}(\nu) = 1$, e está relacionada, como será discutido mais adiante, e como o próprio nome indica, à forma de linha de EPR.

Substituindo em $\mathcal{H}_{MW}(t)$ o operador S_x por sua combinação dos operadores levantamento e abaixamento, $S_x = \frac{S_+ + S_-}{2}$ ¹⁸, e atuando nos autoestados $|\alpha_e\rangle$ e $|\beta_e\rangle$, a probabilidade de transição induzida pelo campo oscilante, que é igual tanto para absorção quanto para emissão ($\mathcal{P}_{EPR} = \mathcal{P}_{\alpha\beta} = \mathcal{P}_{\beta\alpha}$), se reduz a:

$$\mathcal{P}_{EPR} = \frac{1}{4} \left(\frac{g_e \mu_B B_1}{\hbar} \right)^2 \mathcal{G}(\nu) = \left(\frac{\gamma_e B_1}{2} \right)^2 \mathcal{G}(\nu), \quad (3.17)$$

onde γ_e é o fator giromagnético eletrônico ($\gamma_e = -\frac{g_e \mu_B}{\hbar}$)¹⁹.

Note que ao aplicar o campo oscilante da micro-ondas na direção do campo estático, isto é $\vec{B}_1 || \vec{B}_0$ tem-se um Hamiltoniano $\mathcal{H}_{MW}(t)$ descrito por $\mathcal{H}_{MW}(t) = 2g_e \mu_B B_1 S_z \cos(2\pi\nu t)$ e, pela Regra de Ouro de Fermi, os elementos da matriz $\langle \alpha_e | \mathcal{H}_{MW} | \beta_e \rangle$ seriam nulos. Como consequência, não haveria transição de EPR e o campo oscilante apenas modularia o efeito Zeeman. Logo, a máxima probabilidade de transição ocorrerá com a aplicação de micro-ondas linearmente polarizada, tal que $\vec{B}_1 \perp \vec{B}_0$.

Para um Hamiltoniano de spin mais complexo, como é o caso da equação (3.4), as transições de dipolo magnético (transições de EPR), são encontradas após aplicarmos as devidas regras de seleção, também derivadas de (3.15), mas com os autoestados da equação (3.6). Neste caso as regras de seleção são $|\Delta m_s = 1|$ e $|\Delta m_l = 0|$. Elas se traduzem nas três transições de EPR (indicadas na Figura 3.2), cujas energias são:

¹⁸ $S_{\pm} = S_x \pm iS_y$.

¹⁹ $\gamma_e = 1.760\,859\,644(11) \times 10^{11} \text{ s}^{-1} \text{ T}^{-1}$ (<https://physics.nist.gov/> acessado em 16/02/2018).

$$\begin{aligned}
\Delta E_1(|\phi_4 \rangle \rightarrow |\phi_1 \rangle) &= g_e \mu_B B_0 + a \\
\Delta E_2(|\phi_5 \rangle \rightarrow |\phi_2 \rangle) &= g_e \mu_B B_0 \\
\Delta E_3(|\phi_6 \rangle \rightarrow |\phi_3 \rangle) &= g_e \mu_B B_0 - a.
\end{aligned}
\tag{3.18}$$

Até este ponto, o fenômeno de ressonância foi tratado para um hipotético sistema de spins únicos isolados. No entanto, na prática, trabalha-se com um ensemble de spins eletrônicos não interagentes (sistema paramagnético diluído). Para a compreensão de como o experimento de EPR se dá pela absorção de micro-ondas em casos mais realistas, necessita-se, portanto, lidar com as populações de spin e sua dinâmica. Isto será feito a seguir.

3.3 – EPR de um Ensemble de Spins – Amostras paramagnéticas diluídas

Tanto para um spin isolado, quanto para um ensemble de spins, a ressonância magnética se baseia nas transições de dipolo magnético entre os estados de spin cuja degenerescência foi quebrada pela presença de campo magnético estático externo (\vec{B}_0). Como visto na seção anterior, para haver transições de EPR, é necessário: 1) aplicar uma radiação eletromagnética (micro-ondas) tal que sua energia seja igual à diferença de energia entre os níveis de spin eletrônico; e 2) que o campo magnético oscilante desta radiação seja polarizado de tal forma que $\vec{B}_1 \perp \vec{B}_0$. Além disso, como será demonstrada a seguir, uma apreciável diferença de ocupação entre os estados do sistema de spins é também uma condição fundamental para que haja transição de EPR.

Seja um sistema de N elétrons desemparelhados que seguem individualmente o Hamiltoniano (3.2). No equilíbrio, seus spins podem se encontrar em qualquer um dos dois autoestados $|\alpha_e\rangle$ e $|\beta_e\rangle$. Se a diferença de população dos estados for $\Delta N_0 = N_{\beta 0} - N_{\alpha 0}$, para o ensemble de $N = N_{\alpha 0} + N_{\beta 0}$ spins, não interagentes, e em equilíbrio térmico, a razão das populações é dada pela distribuição de Boltzmann [89, 98]:

$$\frac{N_{\alpha 0}}{N_{\beta 0}} = e^{-g_e \mu_B B_0 / kT}.
\tag{3.19}$$

A diferença de ocupação relativa de spin, grandeza proporcional à polarização de spins, é, por sua vez, encontrada substituindo-se $N_{\alpha 0}$ e $N_{\beta 0}$, por ΔN_0 e N e, em seguida, tomando-se a razão destas últimas grandezas:

$$\frac{\Delta N_0}{N} = \frac{1 - e^{-g_e \mu_B B_0 / kT}}{1 + e^{-g_e \mu_B B_0 / kT}} = \tanh\left(\frac{g_e \mu_B B_0}{2kT}\right). \quad (3.20)$$

Logo, quanto mais baixa for a temperatura (ou mais alto o campo magnético externo), maior será a diferença de ocupação e, portanto, a polarização de spin. Isto implica em mais níveis excitados $|\alpha_e\rangle$ disponíveis para serem ocupados pelas transições de EPR.

Usualmente, em um experimento típico de EPR, $\Delta E = g_e \mu_B B_0 \ll kT$ ²⁰. Nesta aproximação, conhecida como *aproximação de alta temperatura*²¹, tem-se para a polarização de spin:

$$\Delta N_0 \cong N \frac{g_e \mu_B B_0}{2kT} \sim 10^{-3}. \quad (3.21)$$

Para se obter a taxa de absorção de energia pelo sistema de spins, relacionada com a diferença de ocupação entre os níveis, deve-se não só considerar as transições induzidas, mas também as transições espontâneas. Enquanto que para as transições induzidas a probabilidade de transição é \wp_{EPR} (3.17), para as transições espontâneas têm-se as probabilidades de absorção ($W_{\alpha\beta}$) e emissão ($W_{\beta\alpha}$) diferentes, isto é $W_{\alpha\beta} \neq W_{\beta\alpha}$. Considerando os dois tipos de processos, pode-se escrever o sistema completo de equações dinâmicas para as taxas de variação das duas populações:

$$\frac{dN_\alpha}{dt} = -(\wp_{EPR} + W_{\alpha\beta})N_\alpha + (\wp_{EPR} + W_{\beta\alpha})N_\beta \quad (3.22)$$

²⁰ Por exemplo, à temperatura ambiente, $kT = 25meV$, e para um campo típico de EPR Banda-X, da ordem de 0,35 T, tem-se $\Delta E = g_e \mu_B B_0 = 0,05meV$. Isso faz com que $\Delta N_0 \approx 2 \times 10^{-3}$.

²¹ Uma vez que a susceptibilidade paramagnética é $\chi = M_0 / B_0$, onde a magnetização no equilíbrio é $M_0 = g\mu_B \Delta N_0$, a partir da equação (3.21), com $g_e \cong 2$ para o elétron, pode-se chegar à Lei de Curie do paramagnetismo: $\chi = \frac{N\mu_B^2}{kT}$.

$$\frac{dN_\beta}{dt} = +(\wp_{EPR} + W_{\beta\alpha})N_\alpha - (\wp_{EPR} + W_{\alpha\beta})N_\beta.$$

Se definirmos um tempo de relaxação spin-rede (T_1), que mede a taxa de transferência de energia entre o sistema de spins e a rede:

$$T_1 = \frac{1}{W_{\alpha\beta} + W_{\beta\alpha}}. \quad (3.23)$$

Obtêm, em termos da diferença de ocupação $\Delta N = N_\beta - N_\alpha$ (ou polarização de spin), uma solução estacionária das equações (3.22) dada por:

$$\Delta N = \frac{\Delta N_0}{1 + 2 \left(\frac{\gamma_e B_1}{2} \right)^2 T_1 \wp(\nu)}, \quad (3.24)$$

onde ΔN_0 é a diferença de ocupação dos estados no equilíbrio térmico: $\Delta N_0 = N \frac{(W_{\alpha\beta} - W_{\beta\alpha})}{(W_{\alpha\beta} + W_{\beta\alpha})} = N \tanh \left(\frac{g_e \mu_B B_0}{2kT} \right)$ (equação (3.20)).

A potência de micro-ondas absorvida pelo ensemble de spins é:

$$P_{MW} = \frac{dE}{dt} = \Delta N \Delta E \wp_{EPR}. \quad (3.25)$$

Substituindo nesta equação o ΔN da equação (3.24) e o \wp_{EPR} da equação (3.16), além de ΔE da condição de ressonância, tem-se:

$$P_{MW} = \left[\frac{N \tanh \left(\frac{g_e \mu_B B_0}{2kT} \right)}{1 + 2 \left(\frac{\gamma_e B_1}{2} \right)^2 T_1 \wp(\nu)} \right] (g_e \mu_B B_0) \left[\left(\frac{\gamma_e B_1}{2} \right)^2 \wp(\nu) \right]. \quad (3.26)$$

Para regimes em que a $(\gamma_e B_1)^2 T_1 \gg 1$, ou seja, para altas potências de micro-ondas e/ou longos tempos de relaxação spin-rede, a diferença de ocupação ΔN tende a zero, como mostra a equação (3.24). Como consequência, o sinal EPR, proporcional à P_{MW} atinge um regime chamado de saturação. Neste limite, a potência máxima absorvida passa a ser $P_{MW}^{MAX} = \frac{N(g_e \mu_B B_0)^2}{4kT \cdot T_1}$. Portanto se T_1 é longo,

por exemplo, a baixas temperaturas, mas não tão baixas para que a aproximação dada pela equação (3.21) deixe de valer, esta saturação pode ser alcançada com níveis moderados de potência de micro-ondas (B_1^2).

Por outro lado, à temperatura ambiente, T_1 geralmente é tão curto que a saturação do sinal é muito difícil de ser alcançada. Neste limite fora da saturação, isto é em que $(\gamma_e B_1)^2 T_1 \ll 1$ (baixas potências de micro-ondas e/ou tempos de relaxação spin-rede curtos²²), o sinal de EPR terá um comportamento linear com B_1^2 [89, 99], e a potência de micro-ondas absorvida será:

$$P_{MW} = \Delta N_0 (g_e \mu_B B_0) \left(\frac{\gamma_e B_1}{2} \right)^2 \mathcal{G}(\nu) = M_0 B_0 \left(\frac{\gamma_e B_1}{2} \right)^2 \mathcal{G}(\nu). \quad (3.27)$$

É na condição expressa pela equação acima que os experimentos de EPR devem ser realizados. A partir de (3.27) é possível concluir que a potência de micro-ondas absorvida, e conseqüentemente, o sinal de EPR, dependem basicamente das seguintes grandezas: (i) a quantidade de spins no ensemble uma vez que $\Delta N_0 \propto N$ (equação (3.20)); (ii) a energia Zeeman ($g_e \mu_B B_0$); (iii) a temperatura ($\Delta N_0 \propto T^{-1}$); (iv) a potência do campo de micro-ondas ($\propto B_1^2$); e por fim, (v) a forma de linha da transição, isto é $\mathcal{G}(\nu)$. Nesta última, aparecerá juntamente com T_1 , outro tempo de relaxação conhecido spin-spin (T_2), relacionado à largura de linha de EPR derivada da função $\mathcal{G}(\nu)$. Como será discutido adiante, T_2 não envolve transferência de energia para a rede.

O próximo passo será, portanto, chegar a uma descrição geral para $\mathcal{G}(\nu)$. Isso será feito a seguir, comum tratamento clássico usando equações de Bloch e grandezas macroscópicas como magnetização e susceptibilidade paramagnética.

3.4 – A Forma da Linha em Um Espectro de EPR

Seja, inicialmente, um campo magnético \vec{B}_0 ao longo de z. Este campo induz uma magnetização (M_z) no ensemble de momentos de dipolo magnéticos eletrônicos, ou spins. Sua variação temporal é:

²²Para temperaturas ~300K.

$$\frac{dM_z}{dt} = -\frac{(M_z - M_0)}{T_1}. \quad (3.28)$$

O parâmetro T_1 aqui é o tempo de relaxação longitudinal. Ele é idêntico ao tempo de relaxação spin-rede definido pela equação (3.23) para transições espontâneas. Como pode ser visto em (3.28), ele quantifica o retorno da componente M_z da magnetização ao seu valor de equilíbrio térmico M_0 . Este retorno que se dá por flutuações de campo magnético locais, dependentes da temperatura, que por sua vez, tem origem nos diferentes mecanismos de troca de energia entre o sistema de spins e a rede como, por exemplo, processos diretos, Raman ou Orbach [99]. A esta relaxação se dá o nome de relaxação longitudinal ou spin-rede.

Para as componentes transversais, a taxa de variação da magnetização irá depender de outro tempo de relaxação, o tempo de relaxação T_2 , denominado spin-spin ou transversal. Ele é associado à redução, com o tempo, da magnetização no plano de polarização da radiação eletromagnética (micro-ondas). Essa perda de magnetização transversal, por sua vez, é associada à decoerência do pacote de spins interagindo entre si, e não envolve troca de energia com a rede. As equações que dão a variação temporal das componentes transversais, em função de T_2 , são:

$$\frac{dM_x}{dt} = -\frac{M_x}{T_2} \quad ; \quad \frac{dM_y}{dt} = -\frac{M_y}{T_2}. \quad (3.29)$$

O efeito imediato do mecanismo de relaxação transversal será a dispersão das frequências de Larmor para a precessão em torno do campo magnético estático que se traduz no alargamento homogêneo das linhas de EPR no espectro. A medição direta de T_1 e T_2 se faz de maneira eficiente pela técnica de EPR pulsada [100].

A variação temporal da magnetização total do sistema após aplicação do campo magnético oscilante (\vec{B}_1) será análoga à variação temporal do momento angular de spin de um elétron.

$$\frac{d\vec{M}}{dt} = \gamma_e (\vec{M} \times \vec{B}). \quad (3.30)$$

O campo \vec{B} agora contém o campo estático \vec{B}_0 ao longo de z e o campo magnético oscilante da micro-ondas (polarização circular), de frequência $\omega = 2\pi\nu$, no plano xy: $\vec{B} = B_1 \cos\omega t \hat{i} + B_1 \sin\omega t \hat{j} + B_0 \hat{k}$.

Com isso, pode-se montar as equações de movimento para cada componente da magnetização, conhecidas como equações de Bloch:

$$\begin{aligned} \frac{dM_x}{dt} &= \gamma_e(M_y B_0 - M_z B_1 \sin\omega t) - \frac{M_x}{T_2} \\ \frac{dM_y}{dt} &= \gamma_e(M_z B_1 \cos\omega t - M_x B_0) - \frac{M_y}{T_2} \\ \frac{dM_z}{dt} &= \gamma_e(M_x B_1 \sin\omega t - M_y B_1 \cos\omega t) - \frac{(M_z - M_0)}{T_1}. \end{aligned} \quad (3.31)$$

Transformando-se o sistema de coordenadas (xyz) para um referencial girante ($x'y'z'$) ao longo de z, de frequência angular igual à da micro-ondas (ω), e, além disto, definido-se a frequência de Larmor como $\omega_0 = -\gamma_e B_0$, a solução para os estados estacionários destas equações é dada por:

$$\begin{aligned} M_{x'} &= \frac{\gamma_e B_1 T_2^2 (\omega_0 - \omega)}{1 + T_2^2 (\omega_0 - \omega)^2 + (\gamma_e B_1)^2 T_1 T_2} M_0 \\ M_{y'} &= \frac{\gamma_e B_1 T_2}{1 + T_2^2 (\omega_0 - \omega)^2 + (\gamma_e B_1)^2 T_1 T_2} M_0 \\ M_{z'} &= M_0 \frac{1 + T_2^2 (\omega_0 - \omega)^2}{1 + T_2^2 (\omega_0 - \omega)^2 + (\gamma_e B_1)^2 T_1 T_2}. \end{aligned} \quad (3.32)$$

A magnetização transversal tem uma componente, $M_{x'}$, que gira em fase com \vec{B}_1 ao longo de z, e outra que gira defasada de 90° , $M_{y'}$. A primeira é responsável pela dispersão de micro-ondas e a segunda, pela absorção. Se $\chi(\omega) = \chi'(\omega) + i\chi''(\omega)$ for a susceptibilidade paramagnética complexa, a parte real, $\chi'(\omega)$, estará relacionada à $M_{x'}$ e a parte complexa, $\chi''(\omega)$, à $M_{y'}$, segundo:

$$\begin{aligned} \chi'(\omega) &= \frac{M_{x'}}{2B_1} = \frac{1}{2} \frac{\gamma_e T_2^2 (\omega_0 - \omega)}{1 + T_2^2 (\omega_0 - \omega)^2 + (\gamma_e B_1)^2 T_1 T_2} M_0 \\ \chi''(\omega) &= \frac{M_{y'}}{2B_1} = \frac{1}{2} \frac{\gamma_e T_2}{1 + T_2^2 (\omega_0 - \omega)^2 + (\gamma_e B_1)^2 T_1 T_2} M_0, \end{aligned} \quad (3.33)$$

onde M_0 é a magnetização do sistema em equilíbrio térmico.

Considerando o sistema longe da saturação, isto é, $(\gamma_e B_1)^2 T_1 \ll 1$, a magnetização ao longo de z , M_z , é igual à magnetização de equilíbrio, M_0 , e as equações acima se reduzem a:

$$\begin{aligned}\chi'(\omega) &= \frac{1}{2} \frac{\gamma_e T_2^2 (\omega_0 - \omega)}{1 + T_2^2 (\omega_0 - \omega)^2} M_0 \\ \chi''(\omega) &= \frac{1}{2} \frac{\gamma_e T_2}{1 + T_2^2 (\omega_0 - \omega)^2} M_0.\end{aligned}\tag{3.34}$$

Estas componentes $\chi'(\omega)$ e $\chi''(\omega)$ da susceptibilidade, dadas pelas equações (3.34), são mostradas na figura abaixo:

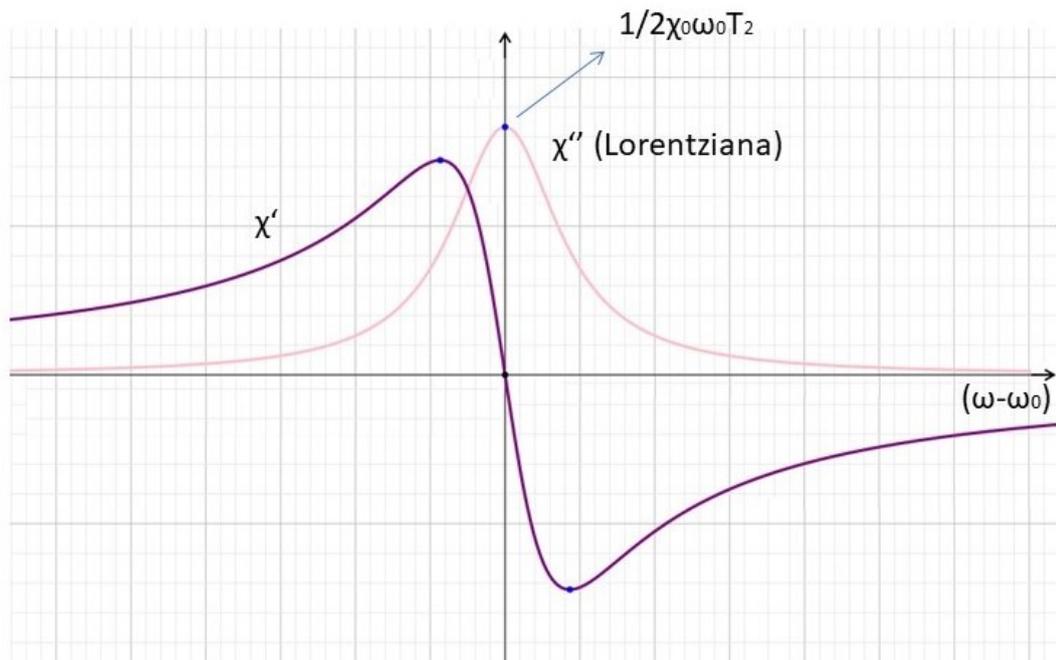


Figura 3.5: Variação das partes imaginária e real da susceptibilidade magnética em função frequência angular de micro-ondas.

A partir da segunda equação (3.34) pode-se verificar que χ'' é descrita por uma curva tipo Lorentziana de largura $\Delta\omega_{1/2} = \frac{2}{T_2}$, mostrada na figura 3.5 pelo traço claro. Pode-se ver também que o máximo de absorção ocorre na frequência de

ressonância $\omega = \omega_0$ onde a parte complexa da susceptibilidade paramagnética também é máxima: $\chi''_{MAX} = \frac{1}{2}\omega_0\chi_0T_2$.

A potência de micro-ondas absorvida pelos spins é uma função da componente imaginária da suscetibilidade: $P_{MW} = dE/dt = 2\omega_0B_1^2\chi''(\omega)$. Fora da saturação ela é:

$$P_{MW} \cong B_0M_0 \frac{(\gamma_e B_1)^2 T_2}{1 + T_2^2(\omega_0 - \omega)^2}. \quad (3.35)$$

Comparando esta equação com a equação (3.27) é possível finalmente dar uma interpretação da função de forma $\mathcal{g}(\nu)$, da seção anterior:

$$\mathcal{g}_L(\nu) = \frac{4T_2}{1 + 4\pi^2 T_2^2(\nu_0 - \nu)^2}. \quad (3.36)$$

Esta equação representa uma linha de absorção tipo Lorentziana, característica de um alargamento homogêneo natural (ou de tempo de vida²³) originado, por exemplo, na redução do tempo de vida do estado excitado por flutuações quânticas (via princípio da incerteza de Heisenberg).

Por outro lado, quando há uma distribuição de autoestados muito próximos, como é o caso de muitas interações hiperfinas não resolvidas, este alargamento é não-homogêneo e $\mathcal{g}(\nu)$ será uma função Gaussiana [89]:

$$\mathcal{g}_G(\nu) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} T_2 e^{-4\pi^2 T_2^2(\nu_0 - \nu)^2}. \quad (3.37)$$

Normalmente, no espectro de EPR, haverá linhas que podem ser ajustadas por curvas Lorentzianas ou Gaussianas. No entanto, em muitos casos a forma das linhas é uma convolução das duas contribuições resultando em uma curva do tipo Voigt [101].

²³*Lifetime broadening.*

$$g_V(\nu) = \int_{-\infty}^{+\infty} g_G(\nu') g_L(\nu - \nu') d\nu'. \quad (3.38)$$

A seguir, será dado um passo a mais na direção da interpretação das formas de linha de EPR para radicais nitróxidos em solução. Para isto, apresentam-se as flutuações dos campos magnéticos locais associados às anisotropias das interações Zeeman e Hiperfina, quando submetidos à dinâmica rotacional dos radicais em líquidos. Nosso objetivo é mostrar como estas flutuações afetam o tempo de relaxação spin-spin T_2 das linhas de EPR individuais no espectro do nitróxido.

3.5 – Relaxação de Spins em Líquidos – TEMPOL em solução

Haja vista a importância dos tempos de relaxação para a forma de linha do espectro de EPR, nesta seção será determinado o tempo de relaxação spin-spin de radicais nitróxidos em soluções.

A dinâmica de uma molécula em solução pode ser descrita pelo movimento Browniano, que é caracterizado por um tempo de correlação (τ_c), sendo este definido como o tempo médio entre as mudanças de orientações moleculares. Nessa dinâmica, as moléculas são tratadas como esferas de raio a_{Hy} (raio hidrodinâmico), submetidas à reorientação de Debye [89, 102] em um líquido de viscosidade η . Como resultado, τ_c varia inversamente com a temperatura de acordo com a equação de difusão em líquido de Einstein-Stokes[89]:

$$\tau_c = \frac{4\pi\eta a_{Hy}^3}{3kT}. \quad (3.39)$$

Um fator que será fundamental para a descrição da dinâmica molecular (e de spins) em solução são as flutuações de campo que determinam as diferentes contribuições aos tempos de relaxação (seção 3.4). A partir de agora essas flutuações serão consideradas como um campo eletromagnético aleatório $\vec{B}'(t)$.

Devido à sua natureza aleatória, este campo eletromagnético será definido como uma função dependente do tempo que oscila diversas vezes em um intervalo de tempo T , com uma média igual a zero. De forma analítica pode-se

associá-los a uma função auto-correlação²⁴ $G(\tau)$, que é o tempo médio de uma das componentes $B'_x(t), B'_y(t)$ ou $B'_z(t)$ do campo magnético local $\vec{B}'(t)$.

$$G_i(\tau) = \overline{B'_i(t+\tau)B'_i(t)} = \overline{B'^2_i} e^{-|\tau|/\tau_c}, \quad (3.40)$$

com $i = x, y$ ou z .

Para o caso em questão, e a partir das equações de Bloch modificadas pela inserção do campo magnético local $\vec{B}'_1(t)$, os tempos de relaxação spin-rede e spin-spin passam a ser iguais a:

$$\begin{aligned} \frac{1}{T_1} &= \gamma_e^2 \left[\overline{B'^2_x} + \overline{B'^2_y} \right] \frac{\tau_c}{\tau_c^2 \omega_0^2 + 1} \\ \frac{1}{T_2} &= \gamma_e^2 \left[\tau_c \overline{B'^2_z} + \frac{1}{2} \left[\overline{B'^2_x} + \overline{B'^2_y} \right] \frac{\tau_c}{\tau_c^2 \omega_0^2 + 1} \right]. \end{aligned} \quad (3.41)$$

Se o campo magnético local for isotrópico ($\overline{B'^2_x} = \overline{B'^2_y} = \overline{B'^2_z}$) e para regimes em que $\tau_c \omega_0 \ll 1$, ou seja, para tempos de correlação muito pequenos, o sistema terá tempos de relaxação iguais, $T_2 = T_1$. Neste regime, denominado de *motional narrowing*, as linhas de EPR, têm sua largura de linha extremamente reduzida uma vez que $\Delta\omega_{1/2} \propto 1/T_2$.

Todavia, devido à rotação constante das moléculas no líquido, as componentes dos tensores \vec{g} e \vec{A} irão depender da orientação molecular em relação a um referencial fixo do laboratório (x, y, z) em um instante t . Na Figura 3.6 está ilustrada a variação das componentes do tensor g após a rotação da molécula em um determinado tempo t_1 .

²⁴Função definida como a transformada de Fourier da densidade espectral ($J(\omega)$) de uma função estocástica ou determinística no tempo: $G(\tau) = \int_{-\infty}^{\infty} J(\omega) e^{-i\omega\tau} d\tau$ (teorema Wiener-Khintchine [103,104]).

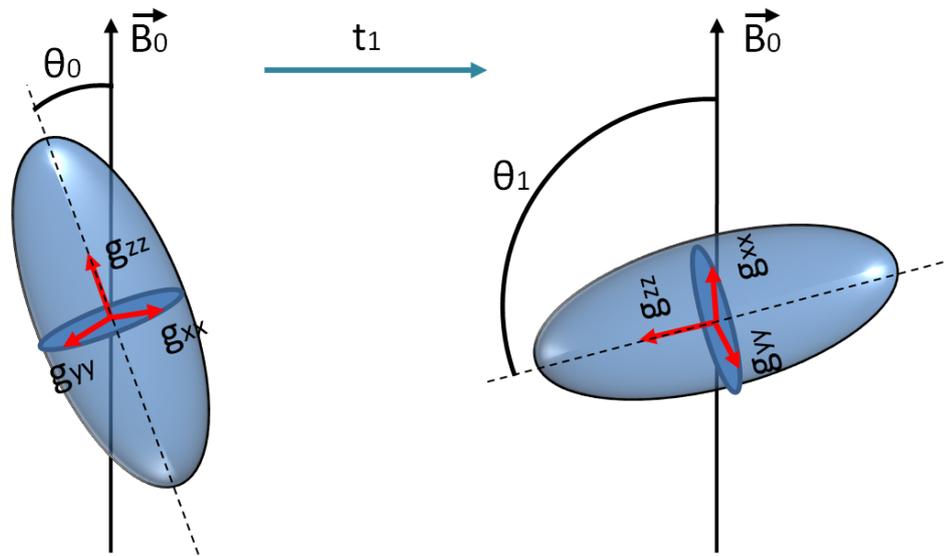


Figura 3.6: Esboço da rotação da molécula em solução após um tempo t_1 . Lembrando que o mesmo ocorre para o tensor \vec{A} mas em maior escala, devido a sua maior anisotropia.

Com a rotação dos radicais em solução, os tensores \vec{g} e \vec{A} passarão a depender do tempo ($\vec{g}(t)$ e $\vec{A}(t)$), logo, o Hamiltoniano do sistema tomará a seguinte forma:

$$\mathcal{H}(t) = \mu_B \vec{B}_0 \vec{g}(t) \vec{S} + \vec{S} \vec{A}(t) \vec{I}. \quad (3.42)$$

Considerando a variação temporal das componentes de $\vec{g}(t)$ e $\vec{A}(t)$ como sendo de caráter aleatório, o tempo de relaxação spin-spin (T_2) irá, por fim, depender apenas das médias quadráticas dos desvios das componentes principais $\overline{(g_u - g_0)^2}$ e $\overline{(A_{ii} - a)^2}$, com $i = x, y, z$ [89]:

$$\frac{1}{T_2} = A + B m_I + C m_I^2, \quad (3.43)$$

m_I é o termo referente à transição de EPR, para o caso do radical nítróxido seu valor pode variar entre -1, 0 ou 1. Os demais termos são dados por:

$$A = \frac{2}{15} (g : g) \left(\frac{\mu_B B_0}{\hbar} \right)^2 \tau_c + \frac{1}{20} (A : A) I(I + 1) \tau_c$$

$$B = \frac{4}{15}(g:A)\left(\frac{\mu_B B_0}{\hbar}\right)\tau_c \quad (3.44)$$

$$C = \frac{1}{12}(A:A)\tau_c,$$

onde os produtos tensoriais são definidos como:

$$(g:g) = (g_{xx} - g_0)^2 + (g_{yy} - g_0)^2 + (g_{zz} - g_0)^2$$

$$(g:A) = (A_{x'x'} - a)(g_{x'x'} - g_0) + (A_{y'y'} - a)(g_{y'y'} - g_0) + (A_{z'z'} - a)(g_{z'z'} - g_0). \quad (3.45)$$

Note que pela equação (3.43) cada transição do espectro (m_I) terá uma largura de linha distinta, dado que o tempo de relaxação spin-spin está associado a esta por $\Delta\omega_{1/2} = 2/T_2$. A Figura 3.7 apresenta um espectro típico para o radical nitróxido em solução destacando o alargamento de cada transição segundo os parâmetros do tempo de relaxação spin-spin (A, B e C).

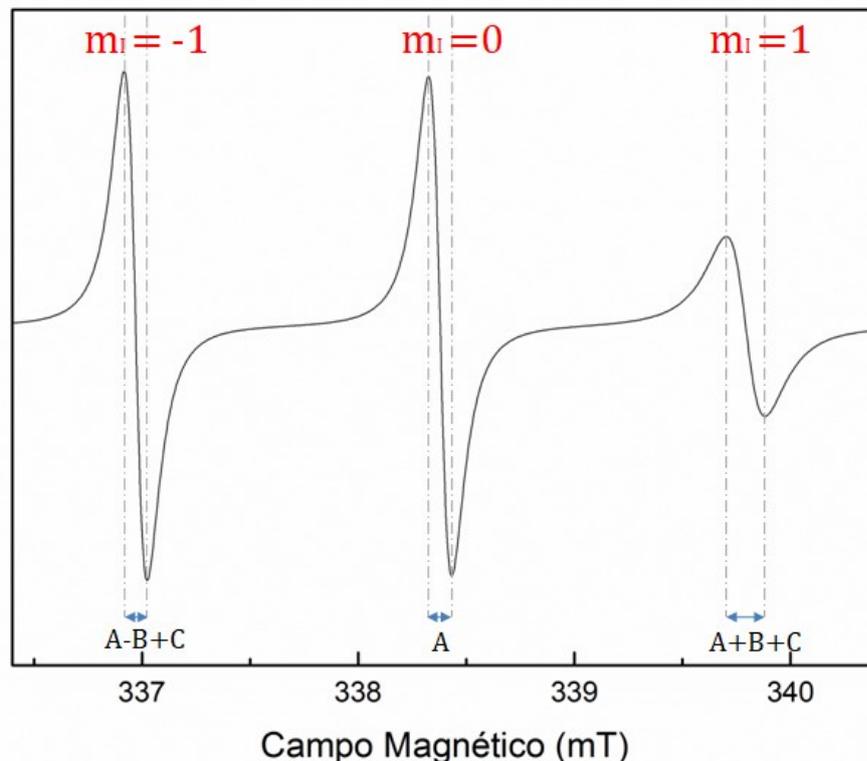


Figura 3.7: Representação do alargamento de linha das transições de EPR para o radical TEMPOL em solução, simulado com $\tau_c = 5 \times 10^{-10} s$, e a identificação no espectro, dos parâmetros de largura de linha A, B e C relacionados ao tempo de relaxação T_2 (espectro simulado pela rotina Easyspin/Matlab [105] utilizando o Hamiltoniano do radical TEMPOL com parâmetros da tabela 3.1).

Pelas equações (3.43) e (3.44) nota-se que quanto maior o tempo de correlação para difusão rotacional do radical em solução, mais alargada será a linha de EPR de alto campo ($m_l = 1$), e, conseqüentemente, menor será a amplitude da mesma. Esta dependência da largura de linha das transições de mais alto campo em relação ao tempo de correlação do radical é demonstrada na Figura 3.8:

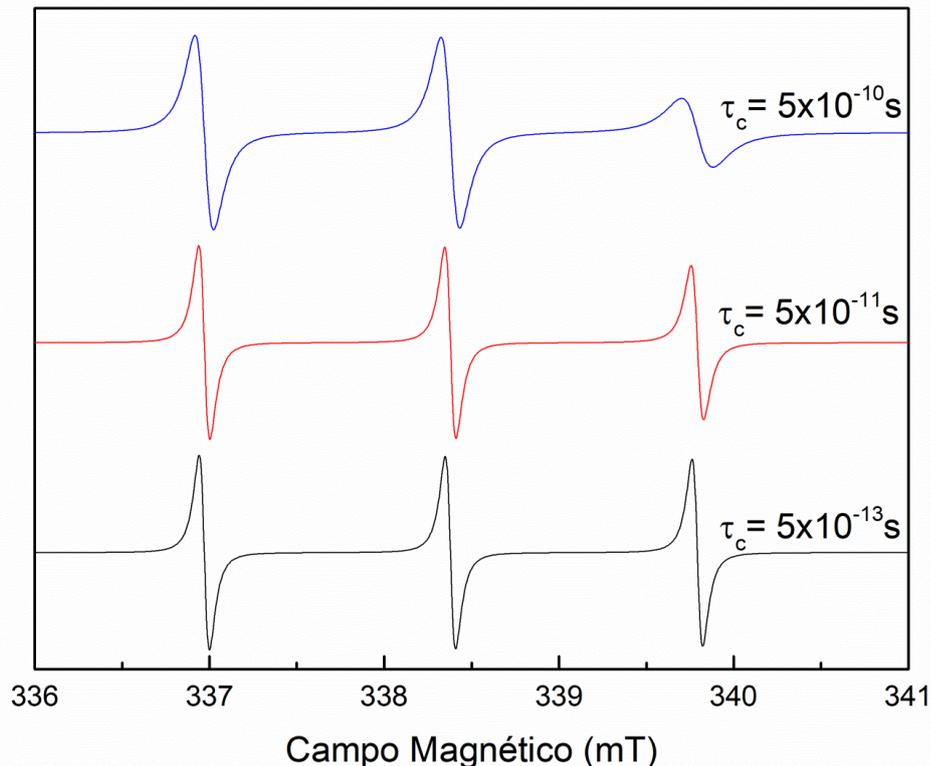


Figura 3.8: Variação da forma de linha para o espectro de EPR para o radical TEMPOL em solução em função de diferentes tempos de correlação (espectro simulado pela rotina Easyspin/Matlab [105] utilizando o Hamiltoniano com parâmetros da tabela 3.1).

Vale ressaltar que os valores encontrados são válidos para a dinâmica de radicais cujos tempo de correlação são inferiores a $\tau_c < 10^{-9}s$ (“regime rápido”). Este regime engloba radicais em soluções que é o objeto de estudo deste trabalho. Para uma descrição mais completa do espectro de EPR usa-se o modelo de Redfield [94], que decorre de aproximações da equação de movimento do operador densidade de estado ρ .

No regime em que o tempo de correlação do sistema corresponde ao intervalo $10^{-6}s > \tau_c > 10^{-9}s$, o chamado “regime lento”. Sua descrição mais precisa é contemplada pela teoria das equações estocásticas de Liouville, que desenvolve

a equação de movimento para o sistema de spins considerando o processo como Markoviano [14]. Este regime é característico de radicais em solventes com viscosidade similar ao do glicerol ($\eta = 934cp$) ou a radicais ligados a macromoléculas.

E finalmente, tem-se o "regime rígido" ($\tau_c > 10^{-6}s$) que será descrito pela dinâmica de elétrons desemparelhados em sólidos cristalinos, ou policristalinos, assim como soluções congeladas (vidros de spin).

3.6 – O Espectrômetro de EPR – Aspectos técnicos

A técnica de EPR está baseada na detecção de micro-ondas absorvida por um sistema de spins na presença de um campo magnético externo. Dado que os espectrômetros de EPR em geral operam em frequências fixas, conforme as dimensões da cavidade utilizada, o campo magnético é variado até que a condição de ressonância seja obtida, resultando na absorção de micro-ondas pelo sistema.

A seguir é mostrado um esquema simplificado de um espectrômetro de EPR.

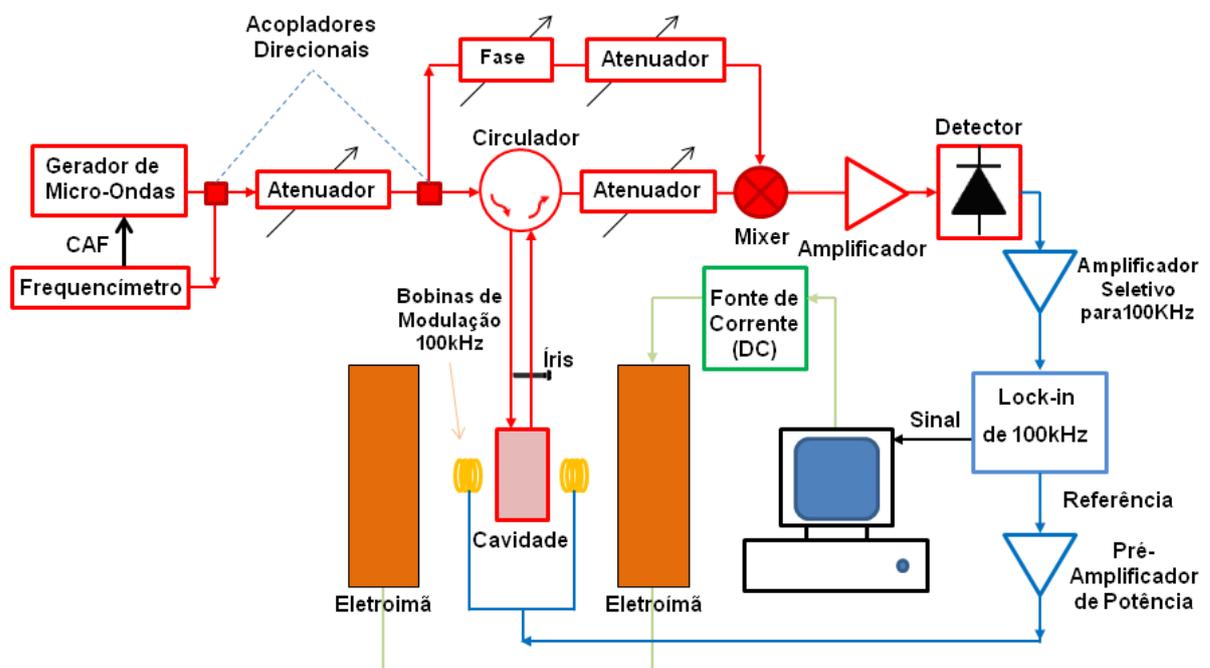


Figura 3.9: Diagrama dos componentes de um espectrômetro de EPR.

A variação do campo é feita através do controle da corrente elétrica em um eletroímã. A geração de micro-ondas, cuja ponte está em vermelho, pode ser via válvula Klystron ou por uma fonte de estado sólido como, por exemplo, um diodo *Gunn*. Sua distribuição é feita por guias de onda retangulares, cilíndricos ou cabos coaxiais. A detecção das micro-ondas também é feita por diodos (cristais) após amplificação das micro-ondas. Na detecção heterodina mostrada acima, antes do circulador, parte da micro-ondas é redirecionada para um ramo secundário com ajuste de fase e atenuação. Este ramo secundário garante, após o mixer, uma polarização mínima no diodo detector para colocá-lo no regime de trabalho em que seu sinal é linear.

Uma vez que o sinal de absorção é fraco, devido à pequena diferença de população entre os estados de spin eletrônico, um experimento de absorção contínua de micro-ondas é praticamente inviável. Esse problema é contornado com inserção da amostra numa cavidade onde a energia do campo de micro-ondas é concentrada. Um ajuste do acoplamento da cavidade garante que a reflexão para fora da cavidade seja mínima e praticamente o único sinal que chega ao diodo detector é um pequeno nível de micro-ondas decorrente do mixer.

Além disto, o campo magnético responsável pelo desdobramento dos níveis eletrônicos é modulado em 100 kHz por bobinas internas à cavidade. Essa modulação garante a detecção do sinal refletido pela cavidade e que chega ao cristal detector, após ser pré-amplificado e enviado para um Lock-In ajustado também em 100 kHz. Este sinal refletido só ocorre na ressonância, quando há absorção de micro-ondas e desacoplamento da cavidade. Se a linha de absorção de EPR for uma Lorentziana, o sinal em fase com a modulação de 100 kHz, depois de filtrado e amplificado, será proporcional à derivada da absorção (derivada da Lorentziana) como mostrado na figura abaixo 3.10.

Além dos componentes principais mencionados acima, existem também atenuadores, isoladores, dispositivos de ajuste da fase, acopladores direcionais, circuladores e amplificadores de micro-ondas, frequencímetros, dentre outros, cada qual com sua função específica [14].

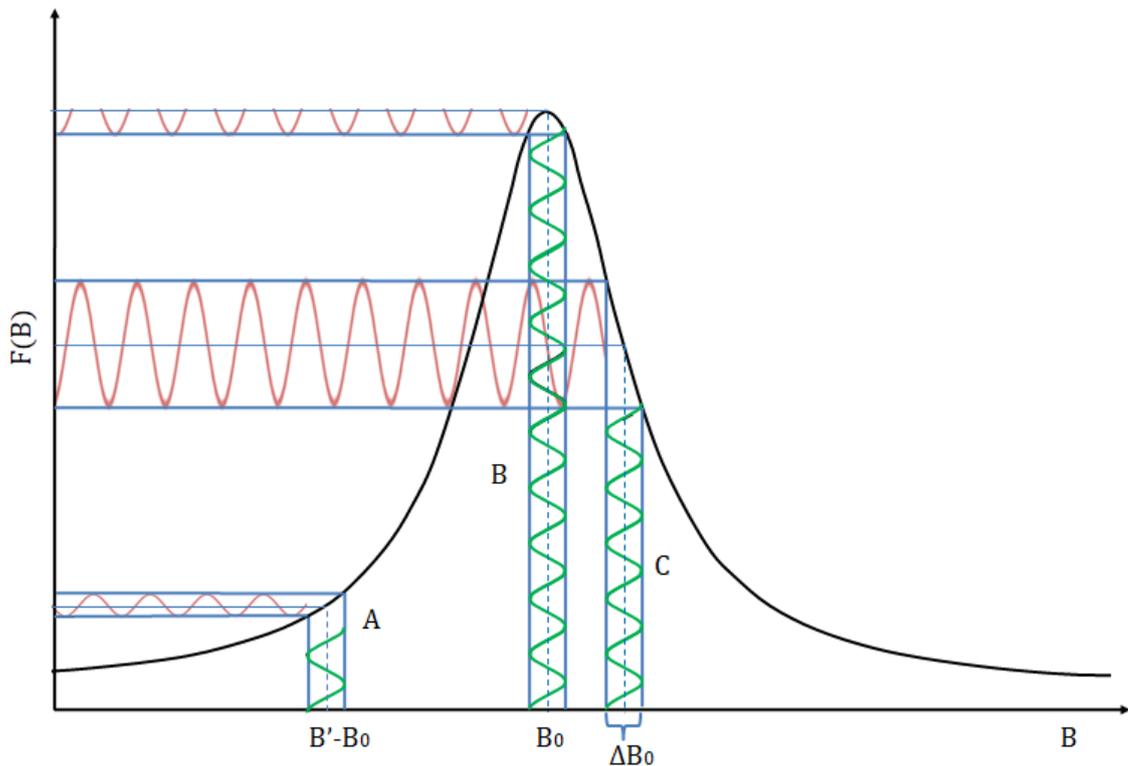


Figura 3.10: Representação gráfica da absorção de micro-ondas em função ao campo magnético para uma determinada transição de EPR (Linha em preto). As linhas em verde representam o campo magnético modulado em 100 kHz. A potência de micro-ondas absorvida em função do campo magnético é mostrada no eixo vertical. O sinal detectado após de modulação pelo Lock-in é a derivada da absorção ($dF(B)/dB$).

Um sistema importante de que vale a pena tratar é o controle automático de frequência ou CAF. Ele garante que a frequência da micro-ondas que chega à cavidade não varie com flutuações elétricas ou de temperatura nos outros componentes e dispositivos. O CAF é um sistema de realimentação que pode ser feito de várias maneiras, por exemplo, via modulação da micro-ondas em amplitude (8 kHz). A ideia fundamental é que após a amostragem da frequência, caso haja algum desvio da frequência desejada na cavidade, um sinal de correção gerado pelo CAF e proporcional ao desvio, seja redirecionado ao gerador de micro-ondas corrigindo assim a frequência gerada.

Neste trabalho, um espectrômetro de EPR comercial (Miniscope MS400), fabricado pela firma Magnettech (Alemanha) e apropriado a trabalhos em solução, foi empregado. Esse espectrômetro pode ser visto na figura 3.11:



Figura 3.11: Espectrômetro de EPR da empresa Magnettech.

O espectrômetro MS400 trabalha à temperatura ambiente com frequências entre 9,3 e 9,55 GHz (banda X), com campos variando de 100 a 600 mT. A modulação de 100 kHz varia de 0,005 a 0,7 mT. Sua cavidade é retangular (modo TE_{102}). Todo controle do espectrômetro, seja o ajuste da ponte de micro-ondas e a coleta de dados, é feito por um microcomputador. As amostras líquidas (soluções ou suspensões) são acondicionadas em capilares de capacidades de 50 μ L (Hirschmann, Alemanha) e seladas com massa especial (Critoseal, US). Os capilares são então inseridos em tubos de quartzo, próprios para EPR, de (comprimento 250 mm, diâmetro externo de 4 mm e interno de 3 mm) (Wilmad, US), e que por sua vez são colocados na cavidade. Os solventes utilizados para as soluções em TEMPOL foram obtidos comercialmente e serão descritos a seguir, Etanol (NEON, P.A – 95% pureza); Metanol (NEON, P.A – 99,8% pureza); Tolueno (ANIDROL, P.A – 99,5% pureza); Dimetilsulfóxido (NEON, P.A – 99,9% pureza); Etileno Glicol (NUCLEAR, P.A); Ciclohexano (CINÉTICA, P.A – 99,5% pureza); Glicerol (ISOFAR, P.A).

Por fim, os espectros de EPR em forma de arquivos são analisados utilizando-se os softwares Origin® e a rotina Easyspin [105] para o software Matlab®. Devido à ausência dos erros estimados dos parâmetros extraídos pelo ajuste da rotina Easyspin e, da indisponibilidade por parte do software da matriz de covariância dos parâmetros associados, o parâmetro utilizado para estimar o sucesso do ajuste foi o desvio quadrático médio (RMSD, do inglês *root mean square deviation*).

4 – NANORODS DE OURO E MARCADORES DE SPIN: ASPECTOS EXPERIMENTAIS

O principal objeto de estudo deste trabalho é a utilização de marcadores de spin em AuNRs. Neste capítulo, será descrito as características física e químicas de maneira breve o radical estável TEMPOL (4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl), que será a sonda paramagnética do marcador de spin utilizado neste trabalho. Em seguida, será apresentado o marcador propriamente dito: uma molécula de ácido lipóico ligada covalentemente ao radical TEMPOL (ALTEMPOL). Nessa parte, uma vez que este marcador não está disponível comercialmente, será dada ênfase à sua síntese e caracterização química. Na sequência, haverá a discussão a respeito da metodologia utilizada para se ligar os marcadores de spin aos nanobastões e também os resultados da caracterização preliminar.

4.1 – O Radical TEMPOL – Escolha do marcador de Spin

O radical primário utilizado neste trabalho é o nitróxido ($-\text{NO}\cdot$) estabilizado na molécula de TEMPOL²⁵. Sua fórmula empírica é $\text{C}_9\text{H}_{18}\text{NO}_2$, e seu peso molecular é 172,24 g/mol. O TEMPOL é um pó marrom com ponto de fusão da ordem de 70 °C. Sua temperatura de armazenamento deve ser < 8 °C. Neste trabalho foi utilizado o radical TEMPOL com 97 % de pureza da empresa MERCK S.A.

Com o objetivo de se estudar a dinâmica de spins dos marcadores contendo o radical TEMPOL ligados às nanoestruturas de ouro, é necessário que haja uma ligação covalente entre ambos. Para isso, necessita-se, no marcador de spin, além do radical TEMPOL, de outro grupo orgânico/inorgânico que possua um elemento com alta afinidade pelo ouro. O enxofre é a escolha mais lógica uma vez que a funcionalização de nanoestruturas de ouro por moléculas contendo grupos tióis (-SH) é muito bem conhecida [19, 106-109]. Um marcador de spin com tais características não existe comercialmente. Por isso decidimos sintetizá-lo em

²⁵ Veja no Capítulo 3 uma breve discussão sobre sua estrutura eletrônica e seu característico espectro de EPR.

colaboração com o grupo liderado pela professora Rossimiriam Pereira de Freitas, no Departamento de Química da UFMG.

O sistema escolhido, pela disponibilidade de reagentes e pela facilidade de síntese, é uma molécula de ácido lipóico ($C_8H_{14}O_2S_2$), contendo o radical TEMPOL. O ácido lipóico possui dois átomos de enxofre e numa reação de esterificação com o TEMPOL, o grupo radicalar ($-NO\cdot$) fica inalterado. Reações semelhantes com alguns ácidos carboxílicos, ao invés de ácido lipóico, são descritas na literatura [110]. A seguir serão resumidos os detalhes técnicos da síntese deste novo marcador de spin.

4.2 – O Marcador de Spin ALTEMPOL – Síntese

Em um balão de fundo redondo de 100 mL, são adicionados 22,0 mg de 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (NEON) a 0,18 mmol/L e 333,0 mg de cloridrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC.HCl) (Sigma Aldrich) a 1,74 mmol/L. Em seguida estes reagentes são dissolvidos em 15 mL de diclorometano (NEON).

Em atmosfera inerte de N_2 gasoso, adiciona-se ao sistema 200,0 mg de ácido lipóico (OakWood) a 1,16 mmol/L e 287,0 mg de 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil (TEMPOL, MERCK) a 1,39 mmol/L. A mistura dos reagentes é mantida sob agitação e atmosfera inerte por 48 horas. Após este tempo chega-se ao fim da reação, confirmado via cromatografia em camada delgada.

Em seguida, após adicionar água ao produto, realizaram-se três extrações líquido-líquido com diclorometano e água. A fase orgânica obtida foi secada com $NaSO_4$ anidro (Nuclear) e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna de sílica (eluentes: hexano (CRQ)/acetato de etila (Synth) 100/0 a 0/100), fornecendo um rendimento de 87%. O produto final possui uma fórmula molecular $C_{17}H_{30}NO_3S_2$ e massa molar 360,55 g/mol. Na figura 4.1 pode-se ver um esquema simplificado desta síntese, incluindo a estrutura dos reagentes e produtos. A reação de acoplamento do ácido lipóico com o radical livre TEMPOL leva ao produto TEMPOL+ácido lipóico, cuja estrutura é mostrada à direita (figura 4.1). O marcador de spin TEMPOL+ácido lipóico, foi denominado ALTEMPOL.

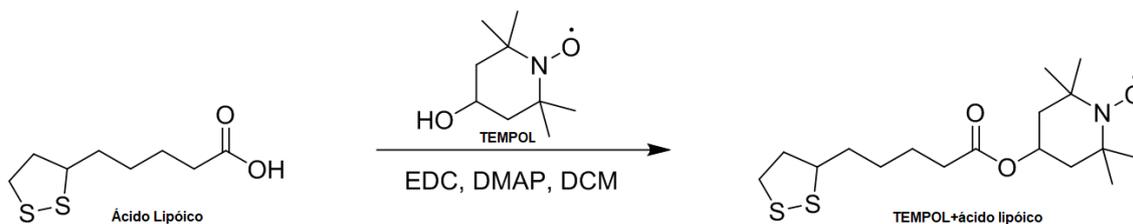


Figura 4.1: Reação de acoplamento entre o radical livre de TEMPOL e o ácido lipóico, formando o marcador de spin ALTEMPOL seletivo às nanoestruturas de ouro.

4.3 – ALTEMPOL – Caracterização por NMR e Infravermelho

O ALTEMPOL protonado foi inicialmente caracterizado por ressonância magnética nuclear (NMR, do inglês *Nuclear Magnetic Resonance*). A protonação, isto é a neutralização do radical paramagnético, foi feita com o composto Fenilidrazina (Merck). Ela é um procedimento indispensável para obtenção do espectro da molécula de ALTEMPOL, uma vez que qualquer momento de dipolo magnético eletrônico, como o do grupo $-\text{NO}\cdot$, interfere no acoplamento entre o spin nuclear e o campo magnético levando a artefatos no espectro de NMR. O espectro obtido do ALTEMPOL protonado solubilizado em clorofórmio deuterado (Aldrich, P.A – 99,8% pureza) , foi medido a 30°C e com uma frequência de 400 MHz, é apresentado na Figura 4.2²⁶.

²⁶ Espectrômetro Bruker Advance DRX 400.

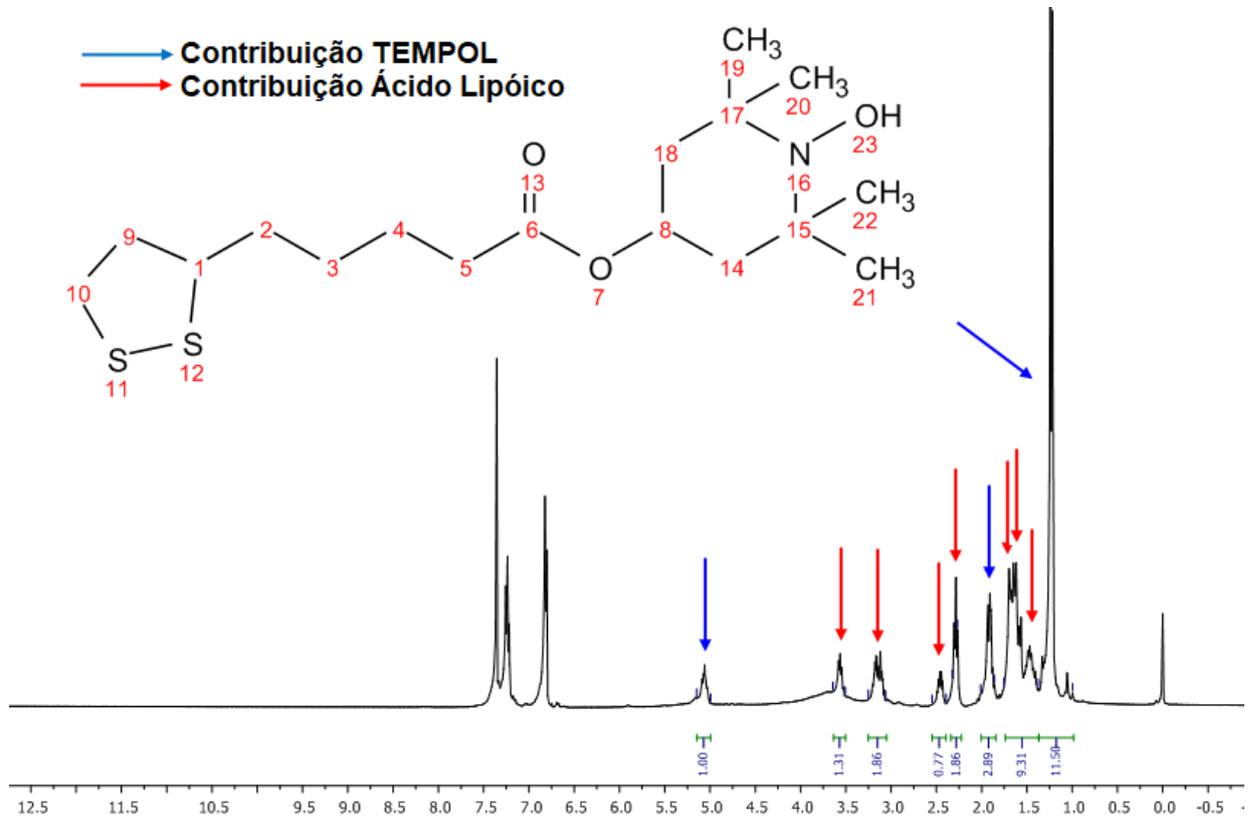


Figura 4.2: Acima a fórmula molecular do ALTEMPOL com enumeração do átomos da cadeia. Prótons estão ligados a todos os carbonos com exceção do 6, 15 e 17. Abaixo, espectro de NMR (^1H) realizado em um espectrômetro Bruker Advance DRX 400 (operando a uma frequência de 400 MHz). Amostra solubilizada em Clorofórmio deuterado e medida à 30°C.

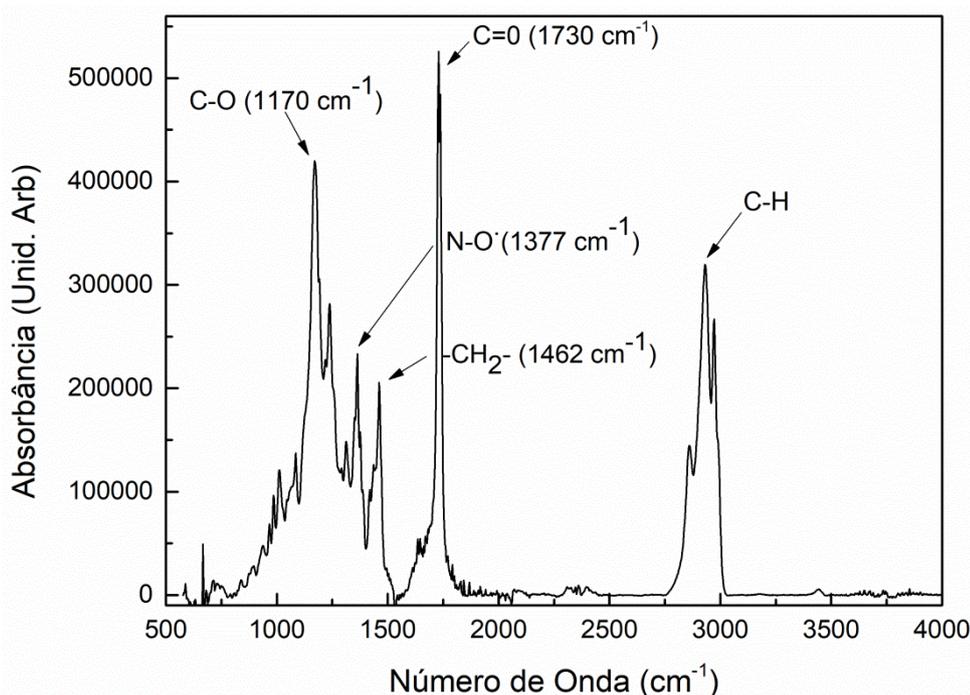
A partir do espectro de NMR acima, foi possível identificar as linhas de vários dos prótons, ligados a carbonos na molécula do marcador de spin. Esses resultados são apresentados na tabela 4.1.

Os picos de deslocamento químico acima de 6 ppm presentes no espectro de NMR da amostra de TEMPOL (figura 4.2) são dos spins nucleares presentes no composto de Fenilidrazina e, do composto resultante após protonação do radical TEMPOL (Fenadiazeno). Sendo a caracterização destes compostos irrelevantes para o objetivo deste trabalho, não foram discutidos quais núcleos equivalentes são responsáveis para as transições de deslocamento químico acima de 6 ppm.

Tabela 4.1: Desvios químicos (δ) dos prótons ligados aos carbonos do ALTEMPOL protonado.

$^1\text{H } \delta$ (ppm)	Grupos
5,00	C(8)H
3,60	C(1)H
3,20	C(10)H ₂
2,45	C(9)H ₂
2,29	C(5)H ₂
1,94 e 1,90	C(14)H ₂ e C(18)H ₂
1,67	C(4)H ₂
1,60	C(2)H ₂
1,48	C(3)H ₂
1,25 e 1,22	C(20,22)H ₃ e C(19,21)H ₃

A seguir procede-se a caracterização do ALTEMPOL por espectroscopia de infravermelho, entre 400 cm^{-1} e 4000 cm^{-1} . Nessa técnica, a energia do fóton absorvido corresponde à diferença de energia entre os estados vibracionais da molécula. A partir do espectro no Infravermelho é possível identificar grande parte dos grupos e ligações químicas presentes na molécula. Isto foi feito com auxílio de valores típicos para as energias de modos vibracionais característicos [111]. Na Figura 4.3 é exposto o espectro da absorção de Infravermelho para uma amostra de ALTEMPOL.

**Figura 4.3:** Espectro de Infravermelho do ALTEMPOL com resolução espectral de 4 cm^{-1} .

Esta medida da técnica de espectroscopia de infravermelho foi realizada no Departamento de Física da UFMG pelo professor Roberto Moreira. Os espectros de transmissão foram coletados em um espectrômetro FTIR Nicolet-Nexus470 (64 varreduras, resolução espectral de 4 cm^{-1}) convertidos para o espectro de absorção pelo software do próprio espectrômetro. As amostras, em solução, foram preparadas por meio de gotejamento das mesmas em um monocristal de ZnSe e, secas em estufa em atmosfera de O_2 , à temperatura de 50°C .

O pico de absorção em 1170 cm^{-1} é característico da vibração de estiramento da ligação C(6,8)-O(7). O pico de 1377 cm^{-1} é associado às vibrações de estiramento simétrico e antissimétrico da ligação N(16)-O(23), valor próximo ao encontrado em [112]. O pico em 1730 cm^{-1} é específico a vibração de estiramento da ligação C(6)=O(13) de um éster. Já as absorções devido às deformações angulares (dobramento) tanto para CH_3 e CH_2 absorvem em 1363 cm^{-1} e 1461 cm^{-1} , respectivamente. Os picos em torno de 2940 cm^{-1} são associados às vibrações de estiramento dos alcanos (C-H sp^3). Uma evidência do êxito da síntese é a ausência de uma banda de absorção intensa e alargada em torno de 3600 cm^{-1} específico da ligação O-H [111]. Caso essa linha tivesse sido observada, existiria uma evidência do não acoplamento da molécula de TEMPOL ao ácido lipóico. As bandas S-S e C-S não foram identificadas devido à sua menor intensidade em relação às demais bandas. Para observá-las a técnica de Espectroscopia Raman seria mais adequada, pois destacaria bandas em torno de 500 cm^{-1} referente à ligação S-S e dois picos em torno de 600 cm^{-1} referente às ligações C-S.

Uma vez sintetizado e caracterizado o marcador de spin ALTEMPOL, procede-se à abordagem experimental para sua ligação covalente aos nanobastões de ouro (AuNR do inglês *Rod*, bastão) bem como sua caracterização estrutural.

4.4 – Nanobastões de Ouro – Síntese e Marcação com ALTEMPOL

Nesta seção são descritos os procedimentos técnicos realizados para a produção das amostras dos nanobastões de ouro marcados com o ALTEMPOL. Destacando, que até o presente momento, não há na literatura nenhum resultado de AuNRs marcados com spins. Uma vantagem dos AuNRs com relação às AuNPs é a facilidade de sintetizá-los com diferentes razões de aspecto.

O método mais comum para síntese de nanobastões de ouro é conhecido como semente [113-115]. Este método faz uso de pequenas sementes de ouro (esferas de 3 - 4 nm) [116] obtidas pela redução do ácido tetracloroáurico por um agente redutor forte, NaBH_4 . Estas AuNPs servem como pontos de nucleação heterogênea para o crescimento dos nanobastões de ouro. Outras metodologias também podem ser empregadas para a síntese dos nanobastões como a redução eletroquímica [117] e o método sem semente [118, 119].

Neste trabalho, o método utilizado é uma variação do descrito em [120]. Dentre as vantagens da síntese tipo sem semente em relação ao método semente, destaca-se a redução da quantidade do reagente CTAB utilizada no processo, justificada pela sua citotoxicidade [57, 121, 122]. Outra vantagem deste método é a simplicidade dos procedimentos de síntese. O rendimento final dos métodos de semente e sem semente é equivalente, sendo da ordem de 10^{12} nanobastões por mL de solução.

As primeiras amostras, denominada SR01 e SR02 foram sintetizadas da seguinte maneira: em um banho térmico à 35°C preparou-se 10 mL de uma solução aquosa de CTAB, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{NBr}(\text{CH}_3)_3$ (Sigma-Aldrich) à 50 mmol/L, sob agitação lenta. Adicionou-se 50 μL de uma solução aquosa de ácido cloroáurico à 500 mmol/L (sintetizado no Laboratório de Nanomateriais do Departamento de Física da UFMG segundo a referência [123]). Em seguida, foram adicionados 275 μL de uma solução aquosa de nitrato de prata, AgNO_3 (Vetec), à 4 mmol/L, sendo este o agente direcionador de crescimento, e 400 μL de solução etanólica de resveratrol (manipulado pela empresa Araújo), $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_3$ à 5 mmol/L, o agente redutor. Em seguida ao adicionar 15 μL de uma solução aquosa de borohidreto de sódio, NaBH_4 (Sigma-Aldrich) à 10,8 mmol/L, percebe-se a mudança de coloração da solução passando de incolor a uma cor azul escuro. Para completa reação dos reagentes e formação de nanobastões a solução é deixada em banho térmico à 70°C por 6 horas. Após este intervalo de tempo, o excesso do resveratrol é removido por centrifugação à 8000 rpm por 15 minutos. Este processo é repetido até que o sobrenadante esteja límpido. O precipitado é ressuspensionado em 20 mL de solução aquosa de CTAB (1 mmol/L).

Após a síntese dos nanobastões (amostras SR01, SR02 e SR03), realiza-se o processo de ligação do marcador de spin às extremidades dos nanobastões.

Estas amostras foram produzidas da seguinte maneira; inicialmente adiciona-se 1,7 mg de ALTEMPOL à 7 mL da suspensão de nanobastões de ouro (em H_2O_{DI}). Esta mistura foi então deixada em banho térmico à 40 °C por um dia. Em seguida, centrifugou-se a amostra até o sobrenadante estar transparente. Apesar do aspecto, o sobrenadante foi reservado para posterior controle da quantidade pela quantificação do ALTEMPOL não ligado aos nanobastões de ouro. O precipitado foi então ressuspensionado em solução aquosa de CTAB à 1 mmol/L e o processo de centrifugação é repetido até completa purificação dos nanobastões de ouro. Esta purificação foi verificada através da redução do sinal de EPR do ALTEMPOL no sobrenadante (mais detalhes no Capítulo 6). O precipitado purificado é ressuspensionado em 2 mL de solução aquosa de CTAB à 1 mmol/L.

Na síntese da terceira amostra (SR03), foram utilizados 130 μ L de uma solução aquosa de nitrato de prata à 4 mmol/L, ao invés de 275 μ L. Além disso, a quantidade do agente redutor ($NaBH_4$) foi duplicada, passando para 30 μ L à mesma concentração de 5 mmol/L.

4.5 – Nanobastões de Ouro Marcados com ALTEMPOL – Caracterização por Absorção Óptica e Microscopia Eletrônica de Transmissão

Com o objetivo de obter uma estimativa da razão de aspecto das amostras de AuNRs marcadas com o radical ALTEMPOL, a caracterização por absorção óptica é realizada. Na Figura 4.7 são apresentados os espectros de absorção óptica das três amostras de AuNR sintetizadas. Pelo espectro de absorção óptica pode-se concluir o êxito da síntese da formação de nanobastões, uma vez que a presença de duas bandas de absorção é característica da formação dos nanobastões. Os espectros das amostras de absorção óptica das três amostras de AuNR sintetizadas seguem representados na figura 4.4.

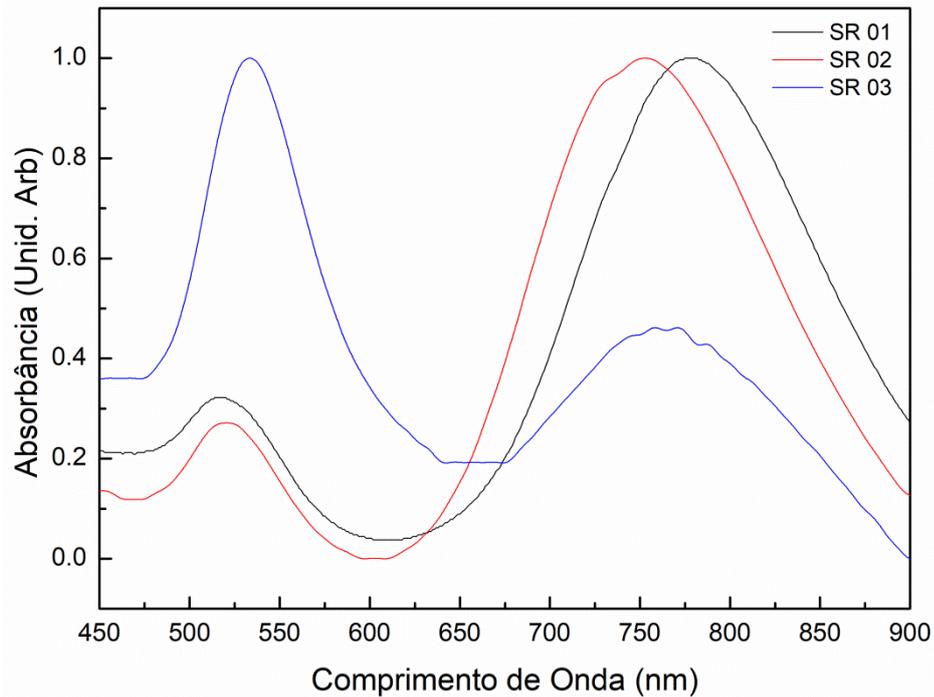


Figura 4.4: Espectro de absorção óptica para as três amostras de AuNRs recobertas pelo CTAB e ALTEMPOL (SR 01, SR02 e SR03). A ausência de bandas adicionais alargadas indica a não agregação dos AuNRs.

A inserção de radiação eletromagnética na faixa de energia do infravermelho até o ultravioleta pelo espectrômetro (200 nm a 900 nm) propicia a polarização dos elétrons da nanoestrutura metálica. A indução do dipolo elétrico dado pelo deslocamento eletrônico viabiliza o aparecimento de um campo elétrico na nanoestrutura que tende a restaurar o equilíbrio das cargas. A força restauradora e a indução do dipolo, quando acopladas, geram a ressonância plasmônica. O tamanho da nanoestrutura influencia na geração de induções eletromagnéticas não uniformes, provocando modos de excitação e relaxação diversos de forma que, quanto maior a dimensão, maior o deslocamento da frequência de excitação plasmônica para energias menores [21]. O deslocamento ocorre devido ao aumento da densidade de cargas nas nanoestruturas, já a largura de linha do espectro está associada à polidispersão das nanoestruturas. A presença desta única banda de absorção, associada à oscilação coletiva dos elétrons livres do ouro em AuNPs, é um fenômeno conhecido como ressonância de plasmons de superfície localizados. Sua posição dá um valor médio do tamanho das partículas [124].

A presença das bandas de absorção evidentes nos espectros de absorção óptica (figura 4.4) está, portanto, associada aos modos de ressonância de

plasmons e indica uma não agregação das nanoestruturas, uma vez que bandas extremamente alargadas estão ausentes. Sendo a banda de absorção na faixa de menor energia (pico mais a direita) associada à oscilação coletiva dos elétrons na direção longitudinal do bastão (modo longitudinal), e outra banda associada à oscilação dos elétrons na direção transversa (modo transverso). A amostra SR01 apresenta bandas em 518 nm (modo transverso) e 779 nm (modo longitudinal). A amostra SR02 possui bandas em 520 nm e 753 nm, caracterizando assim bastões com razões de aspectos um pouco menor, em relação aos de SR01. A amostra SR03 apresenta bandas em 528 nm e 779 nm, porém, devido à maior intensidade do modo transverso, é possível também verificar uma maior concentração de nanopartículas esféricas produzidas concomitantemente aos bastões.

Com o propósito de quantificar a concentração de nanobastões produzidos nas sínteses das amostras (SR 01, 02 e 03), foram obtidos espectros de absorção ótica na faixa de energia do ultravioleta. Este resultado permitirá, em outra etapa, que possa ser feita uma estimativa do número de moléculas do marcador de spin ALTEMPOL ligados a cada nanobastão de ouro. Portanto, será necessário que tenha-se a mesma quantidade de amostra tanto na realização dos espectros de absorção ótica para quantificação da concentração de nanobastões quanto para espectros de EPR afim de mensurar a concentração de moléculas de ALTEMPOL.

A concentração de nanobastões de ouro em suspensão é obtida pela comparação das intensidades do pico de absorção ótica referente à banda de absorção em 254 nm (transição ótica do átomo de ouro) das amostras aqui preparadas com um padrão comercial de nanobastões de ouro (NanoPartz™ A12-10-780-CTAB). Este padrão de AuNR tem uma concentração conhecida de $7,4 \times 10^{11}$ bastões por mL. Os espectros de absorção ótica foram obtidos a partir de um espectrofotômetro da companhia Shimadzu modelo 3600 que varre a faixa de comprimento de ondas desde o infravermelho (IR) até o ultravioleta (UV), usando duas lâmpadas de deutério e de tungstênio. Na figura 4.5 são apresentados os espectros de absorção ótica das amostras SR01, SR02, SR03 e para o padrão comercial. Também presente na figura 4.5 a relação encontrada para a absorbância da banda de absorção em 254 nm e a concentração de nanobastões da amostra padrão, a partir da regressão linear tem-se a equação da reta que definirá a concentração das amostras SR01, SR02 e SR03. A equação que descreve a relação

entre a absorbância e a concentração de uma determinada amostra para um dado comprimento de onda é conhecida como lei de Lambert-Beer²⁷.

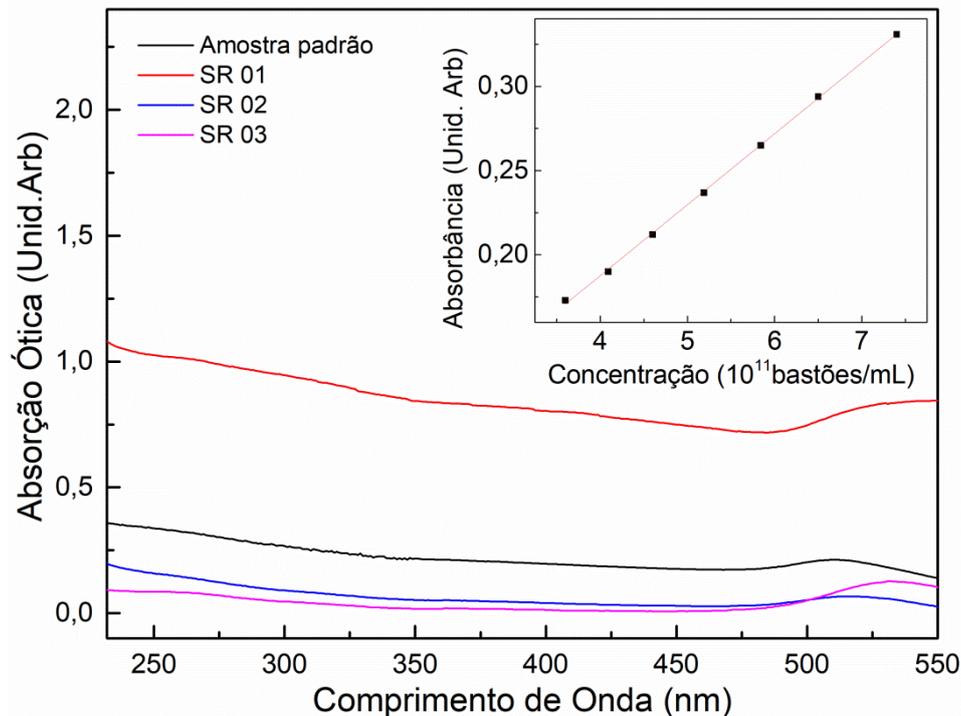


Figura 4.5: Espectro de absorção ótica para as três amostras de AuNRs recobertas pelo CTAB e ALTEMPOL (SR 01, SR02 e SR03) e, uma amostra padrão comercial de nanobastões de ouro (NanoPartz™ A12-10-780-CTAB). O gráfico do interior da figura é dado pela calibração realizada a partir da diluição da amostra padrão comercial. A regressão linear revela a equação da reta dada por:

$$A_b = 4,21(4) \times 10^{-13} \lambda/nm + 0,019(2).$$

Vale notar que a banda de absorção em torno de 254 nm presente para as amostras é bem discreta. Não foram avaliadas as bandas de absorção devido à polarização dos elétrons da superfície (ressonância plasmônica), ocasionada pela divergência nas posições dos picos e larguras de linha. Portanto, a banda utilizada para essa quantificação é mais apropriada por não depender da forma dos bastões e sim da quantidade de átomos de ouro presentes nas amostras.

A inclinação da reta encontrada pela regressão linear do gráfico inserido na figura 4.5, corresponde a constante definida como coeficiente de extinção molar multiplicado pelo caminho ótico ($\epsilon(\lambda) = 4,21(4) \times 10^{-13} \text{ mL/bastões}$). A partir deste

²⁷ Equação de Lambert-Beer: $A_b = \epsilon(\lambda)Cl$, donde A_b é absorbância, C a concentração da amostra, l o caminho ótico percorrido pela radiação eletromagnética e $\epsilon(\lambda)$ o coeficiente de extinção molar.

parâmetro foi possível a quantificação da concentração de nanobastões de ouros das amostras SR01, SR02 e SR03. Na tabela 4.2 é apresentado os valores das concentrações de nanobastões de ouro em suspensão para as três amostras preparadas neste trabalho (SR01, SR02 e SR03).

Tabela 4.2: Valores da concentração estimada de nanobastões em suspensão para as três amostras sintetizadas.

	SR 01	SR 02	SR 03
Concentração de AuNRs (10^{12} /mL)	35,72 ± 0,08	4,96 ± 0,08	5,4 ± 0,02
Quantidade de AuNRs na amostra de 50 µL (10^{11} bastões)²⁸	17,86 ± 0,04	2,48 ± 0,04	2,7 ± 0,1

Os erros estimados exibidos na tabela 4.2 foram obtidos a partir da propagação da incerteza dos parâmetros retirados da regressão linear utilizada no cálculo da concentração de nanobastões²⁹.

A partir do espectro de absorção ótica também é possível estimar a razão de aspecto dos nanobastões. Com os valores do comprimento de onda referente ao pico de absorção do modo longitudinal (λ_{max}) e da constante dielétrica do meio (ϵ_m) a equação empírica extraída de [125] nos fornece a razão de aspecto esperada.

$$R = \left(\frac{\lambda_{max} - 495,14nm}{53,71nm \times \epsilon_m} \right) + 0,79. \quad (4.1)$$

Com o objetivo de se confirmar a morfologia e as razões de aspectos media das amostras realiza-se a medida de microscopia eletrônica de transmissão (medidas executadas pelo Centro de Microscopia da UFMG) das amostras sintetizadas. Na Figura 4.6 são expostas as imagens obtidas para cada amostra.

²⁸ O erro estimado para a quantidade de nanobastões foi obtida pela propagação da incerteza. A equação que forneceu o erro estimado é dada por: $\Delta Q_{NR} = \sqrt{V^2(\Delta C_{NR})^2}$. Sendo V o volume do capilar e ΔC_{NR} o erro estimado para a concentração de nanobastões.

²⁹ $\Delta_{concentração} = \sqrt{\left(\frac{b-intensidade}{a^2}\right)(\Delta a)^2 + \left(-\frac{1}{a}\right)^2(\Delta b)^2}$; donde a e b são os parâmetros da equação da reta obtidos pela regressão linear da curva de diluição da amostra padrão; Δa e Δb são os erros estimados dos parâmetros da equação da reta obtidos na regressão linear.

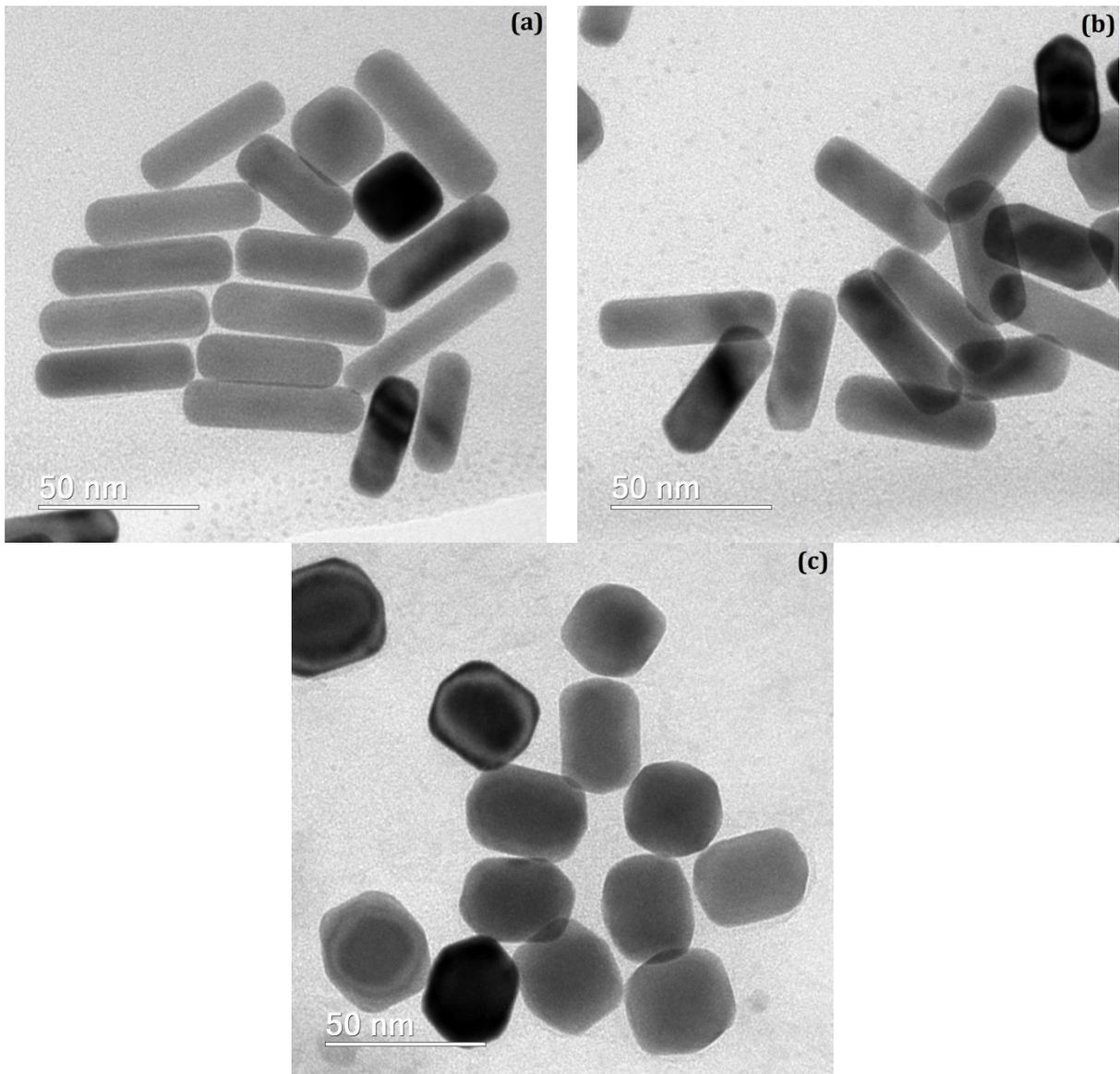


Figura 4.6: Imagens de TEM utilizando o microscópio Tecnai G2-20 - SuperTwin FEI - 200 kV das amostras (a) SR01, (b) SR02 e (c) SR03.

Por meio das imagens obtidas por TEM obtêm a morfologia (tamanho e forma) dos nanobastões de ouro sintetizados. Com auxílio do software ImageJ [126], estimou-se o tamanho médio das nanoestruturas a partir das imagens. Os resultados, juntamente com estimativas a partir do espectro de absorção, são mostrados na tabela 4.3 abaixo:

Tabela 4.3: Dimensões: comprimento (L) e diâmetro (\varnothing), e razões de aspecto (L/ \varnothing) das amostras de nanobastões estimadas pelos espectros de absorção óptica e pelas imagens de microscopia eletrônica de transmissão.

	Absorção Óptica		TEM		Valor médio
	L/ \varnothing ³⁰	L (nm)	\varnothing (nm)	L/ \varnothing ³¹	<L/ \varnothing >
SR01	3,7 ± 0,4	46 ± 10	17 ± 5	3 ± 1	3,4 ± 0,4
SR02	3,5 ± 0,4	47 ± 9	21 ± 4	2,2 ± 0,6	2,9 ± 0,7
SR03	1,2 ± 0,1	34 ± 3	27 ± 3	1,3 ± 0,2	1,25 ± 0,05

Pelos resultados apresentados na tabela 4.3 é possível notar a divergência entre os valores encontrados para a razão de aspecto pela equação empírica 4.1 e os valores mensurados pelas imagens obtidas via microscopia eletrônica. Devido à verificação direta das dimensões dos nanobastões é de se suspeitar da eficiência da equação 4.1 ou do valor do parâmetro do coeficiente de extinção utilizado. Lembrando que, o valor do coeficiente de extinção utilizado é extraído de [125] que emprega o mesmo tipo de sistema (nanobastões em solução de CTAB em água). Pode-se também argumentar a mudança na variação do coeficiente de extinção devido à presença dos marcadores de spin.

Como se pode observar nas Figuras 4.7 e 4.8, a síntese da amostra SR03 forneceu além de nanobastões, uma grande quantidade de AuNPs. Para as três amostras o surfactante foi CTAB e o marcador de spin foi o ALTEMPOL. Com o aumento da quantidade de Borohidreto (agente redutor forte) o equilíbrio químico da reação de redução do ouro iônico em ouro metálico é deslocado, favorecendo assim o crescimento isotrópico da nanoestrutura de ouro (amostra SR03) [118]. Já a redução da quantidade de AgNO₃ na síntese da amostra SR03, acarreta em um facetamento dos nanobastões. Uma das funções deste composto na síntese está relacionada à formação de um complexo que atua como agente de recobrimento das

³⁰ Erro estimado como 10% do valor encontrado.

³¹ Erro estimado pela propagação da incerteza dos parâmetros retirados das dimensões do bastão,

$\Delta_{\text{Razão de aspecto}} = \sqrt{\left(\frac{1}{l}\right)^2 (\Delta c)^2 + \left(-\frac{c}{l^2}\right)^2 (\Delta l)^2}$. Sendo l a largura média dos bastões e c o comprimento médio adquirido pelas imagens de microscopia eletrônica de transmissão.

facetas laterais das sementes de crescimento [127, 128]. Os íons Ag^+ na reação evitam o crescimento anisotrópico de nanobastões pentafacetados [129]. A seguir são apresentados os resultados da caracterização preliminar do TEMPOL e do ALTEMPOL, em solução, e por EPR.

5 – RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA DO TEMPOL E DO ALTEMPOL EM SOLUÇÃO

Neste capítulo são expostos e discutidos os resultados de uma caracterização inicial, por EPR, do radical TEMPOL comercial e do marcador de spin ALTEMPOL, sintetizado especificamente para este projeto. Tanto o TEMPOL, quanto o ALTEMPOL, foram investigados livres em solução (como únicos solutos). Parâmetros como potência de micro-ondas, concentração do radical, solvente (viscosidade e polaridade) e temperatura, foram variados de modo a se obter um conjunto de dados que permitisse escolher as condições ideais de medida para os ALTEMPOLs ligados aos AuNRs. Por exemplo, estudando a dependência do sinal do TEMPOL e do ALTEMPOL com a potência de micro-ondas e a concentração, foi possível determinar a faixa exata destes parâmetros para evitar que, respectivamente: 1) o sinal de EPR não saturasse; e 2) não houvesse, ou se houver, como se dá a interação de troca entre os radicais na solução. Em ambos os casos, a mudança da forma de linha do sinal com estes parâmetros poderia mascarar informações importantes a serem obtidas do sistema alvo deste estudo, o ALTEMPOL-AuNR. Além disto, este estudo permitiu um entendimento maior da física dos radicais paramagnéticos em líquidos, como o efeito da polaridade e da viscosidade do solvente na interação hiperfina e no aumento do tempo de correlação rotacional, respectivamente.

A seguir, após apresentação dos resultados desta caracterização por EPR do radical TEMPOL e do marcador de spin ALTEMPOL, os resultados são comparados entre si e com aqueles retratados na literatura (para o TEMPOL).

5.1 – Saturação do Sinal de EPR do TEMPOL e do ALTEMPOL em solução

A Figura 5.1 mostra a variação do espectro de EPR do TEMPOL em etanol (concentração de 0,1 mmol/L)³² com a atenuação (potência de micro-ondas). A forma de linha da transição de EPR, dada pela derivada de uma Lorentziana é característica de um regime não saturado. Para sistemas que se encontra em

³² O solvente inicialmente escolhido para esta etapa foi o etanol devido à maior solubilidade do ALTEMPOL neste, quando comparado à água.

saturação, uma deformação na forma de linha é esperada [102]. A partir dos espectros de EPR do TEMPOL, para as diversas atenuações, pôde-se constatar a ausência destas deformações, mesmo para baixas atenuações (altas potências)³³.

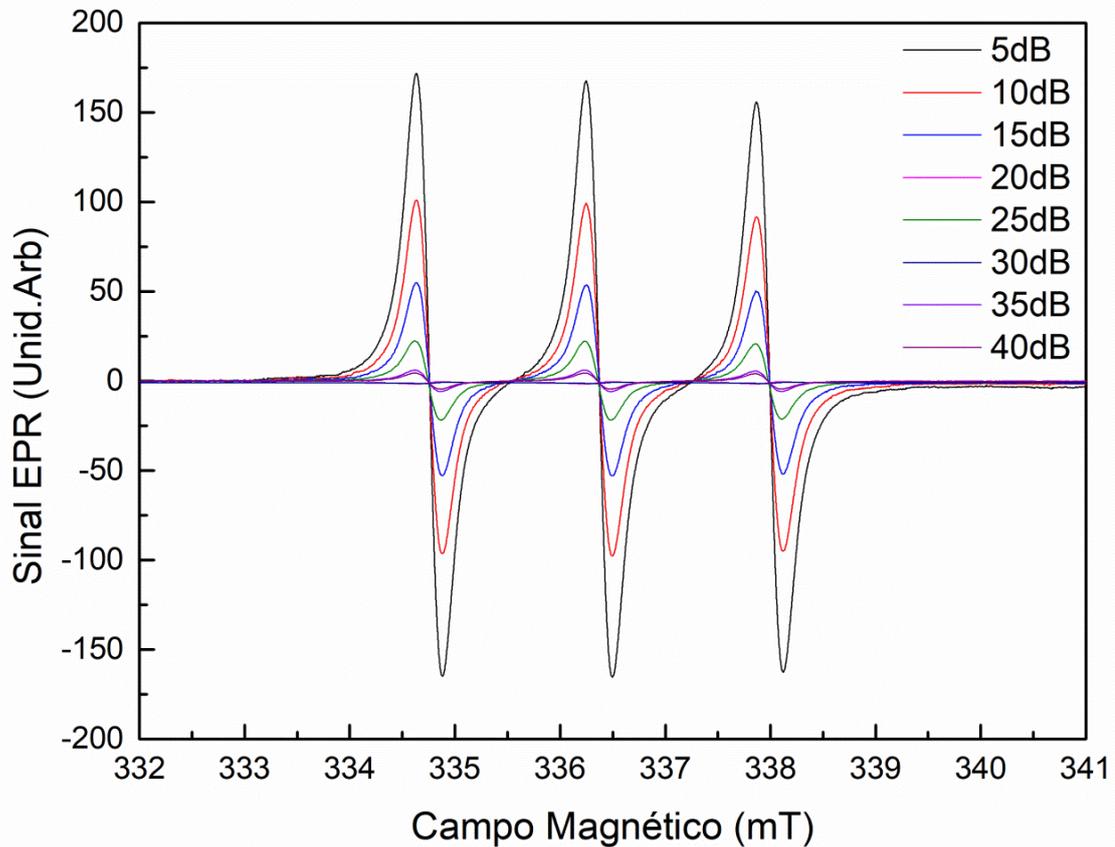


Figura 5.1: Espectros de EPR para o radical TEMPOL dados pela variação da atenuação de micro-ondas. Medidas de EPR realizadas no espectrômetro MS400 com uma cavidade retangular TE_{102} . Parâmetros de EPR utilizados: atenuação variável, amplitude de modulação a $0,1 \text{ mT}$ ³⁴, frequência de $9,4 \text{ GHz}$ e temperatura ambiente ($\sim 300 \text{ K}$) e potência de micro-ondas enviada pelo gerador $P_e = 100 \text{ mW}$. A concentração do TEMPOL na solução etanólica foi de $0,1 \text{ mmol/L}$.

O dispositivo que permite a variação da potência de micro-ondas no espectrômetro de EPR é o atenuador [102]. A relação da atenuação com a potência de micro-ondas enviada à cavidade pelas guias de onda é descrita pela equação 5.1:

³³ Isso pode ser verificado qualitativamente, por exemplo, normalizando todos os espectros.

³⁴ A escolha deste valor para a amplitude de modulação é justificado pela otimização na obtenção da medida, que será alcançada para valores de modulações em torno de um terço da largura de linha pico a pico das transições de EPR.

$$A_{dB} = 10 \log\left(\frac{P_e}{P_s}\right), \quad (5.1)$$

onde A_{dB} é o valor da atenuação em decibéis, P_e é denominada como potência de entrada, e P_s é a potência de saída no atenuador. Desprezando as atenuações e reflexões pelos outros componentes do ramo primário de micro-ondas (vide Figura 3.9), a potência de micro-ondas incidente na amostra será P_s e pode ser calculada a partir de A_{dB} utilizando-se como P_e , a potência de micro-ondas enviada pelo gerador. Para o espectrômetro MS400 utilizado neste trabalho, esta potência correspondente a $P_e = 100$ mW. Logo, se A_{dB} for igual à 10 dB, por exemplo, pela equação (5.1) a potência que chegaria na amostra dentro da cavidade seria de 10 mW.

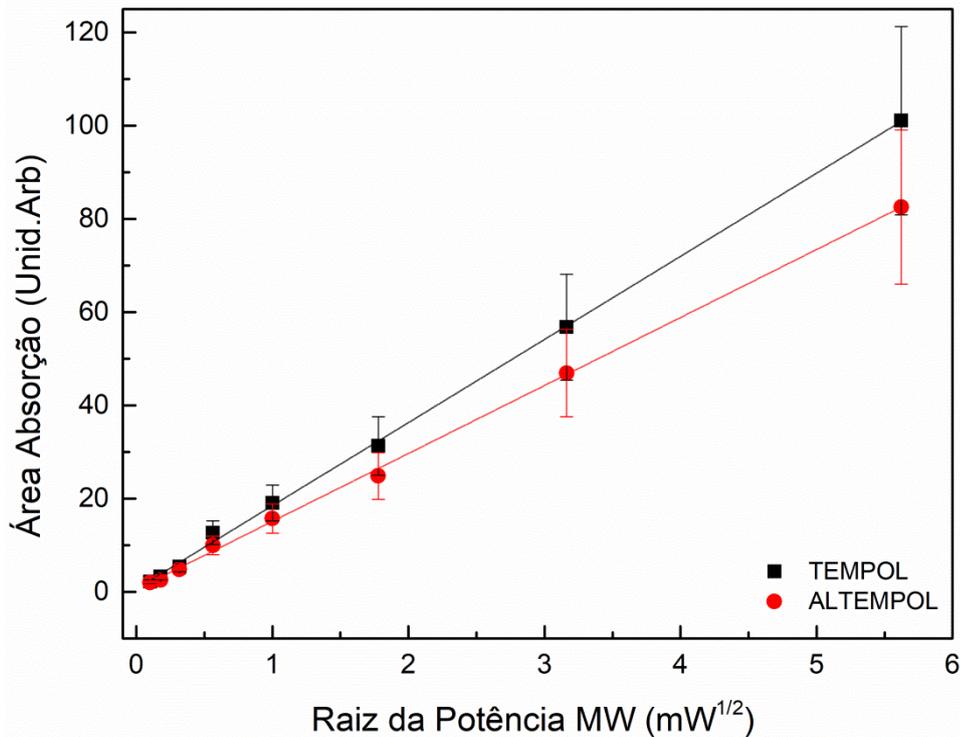


Figura 5.2: Curva de saturação para o radical TEMPOL e para o marcador de spin ALTEMPOL, ambos em solução etanólica a 0,1 mmol/L. Os sinais foram integrados duas vezes para se encontrar a área do espectro de absorção (AA). Os parâmetros de EPR utilizados para se medir o ALTEMPOL são os mesmos utilizados para o TEMPOL (ver Fig. 5.2). As regressões lineares são:

$$AA_{TEMPOL} = 0,6(5) + 17,8(2)mW^{-1/2} P^{1/2} \text{ e } AA_{ALTEMPOL} = 0,5(4) + 14,6(2)mW^{-1/2} P^{1/2} .$$

Na figura 5.2 estão representadas as intensidades dos sinais de EPR, para o TEMPOL e o ALTEMPOL, obtidos pela dupla integração dos espectros de EPR³⁵, em função da raiz da potência de micro-ondas aplicada ao sistema.

Estas curvas são conhecidas como curvas de saturação do espectro de EPR. É possível concluir a partir delas que a relação entre a intensidade total dos espectros de EPR e a raiz da potência da micro-ondas ($B_1 \sim \sqrt{P_{MW}}$), é linear. Como visto no capítulo 3, pelas equações 3.27 e 3.35, este comportamento caracteriza o regime não saturado da população dos estados de spin. Este regime é típico para tempos de relaxação spin-rede curtos à temperatura ambiente (~ 300 K).

Como demonstrado no capítulo 3 pela equação 3.35 a inclinação da reta obtida pela regressão linear para os radicais TEMPOL e ALTEMPOL definem a variação da potência de micro-ondas absorvida pelo sistema em relação ao acréscimo da potência de micro-ondas enviada à cavidade ressonante. O valor encontrado para cada radical representa o produto das grandezas físicas: a magnetização do sistema no equilíbrio térmico, o campo magnético na condição de ressonância e a função $g(\nu)$ que define a forma de linha da transição de EPR que está associada com o tempo de relaxação spin-spin (T_2).

A curva de saturação da Figura 5.2 para o TEMPOL, é semelhante à encontrada por Eaton *et al.* e Tamski para o mesmo radical em água [84, 85]. Nestes trabalhos os autores também obtiveram uma relação linear na curva de calibração, mas para uma faixa de potências mais ampla. A não linearidade a partir de certo valor da potência nestas curvas de saturação caracteriza o início do regime de saturação do sistema. Pequenas divergências para o início da saturação, isto é: 16 mW [40], 12 mW [41], > 36 mW (neste trabalho), se devem, ao solvente e às características individuais dos espectrômetros como, por exemplo, às diferentes cavidades de EPR usadas: ER 4103TM, cilíndrica TE₀₁₁ e retangular TE₁₀₂, respectivamente. Esta divergência para os valores da potência de saturação é justificada pela diferença no fator de qualidade da cavidade e no fator de

³⁵ A análise numérica denominada como a dupla integração é realizada pelos procedimentos descritos a seguir; a curva da absorção de micro-ondas pelo sistema é obtida pela integração do espectro de EPR pelo software Origin®; em seguida é subtraída do sinal de absorção uma linha de base retirando assim as contribuições que não sejam das transições de spin, e finalmente é integrada a curva resultante e obtida a área do sinal, este valor representa a quantificação de absorção de energia total pelo sistema. A incerteza dos valores encontrados pela dupla integração são tomadas como 20% do resultado encontrado segundo [87].

preenchimento da amostra, acarretando em valores distintos para a absorção de micro-ondas pelo sistema em cada cavidade.

Também na figura 5.2 pode-se ver a curva de saturação do marcador de spin ALTEMPOL solubilizado em etanol a uma concentração de 0,1 mmol/L, resultado ainda não relatado na literatura. Assim como o observado para o radical de TEMPOL, a curva de saturação do ALTEMPOL também apresenta uma dependência linear da raiz da potência de micro-ondas com a intensidade do sinal de EPR. Ambas as curvas são lineares até $P^{1/2} \sim 6 \text{ mW}^{1/2}$ mas suas inclinações são diferentes.

As inclinações distintas para as curvas de saturação das amostras de radicais livres de ALTEMPOL e TEMPOL indicam uma diferença nos tempos de relaxação associados. De acordo com as equações 3.27 e 3.35, a potência de absorção da micro-ondas está associada com a probabilidade de transição que é dada pela regra de ouro de Fermi [97]. Lembrando que, essa probabilidade de transição tem dependência com a função $g(\nu)$ que possui dependência intrínseca com o tempo de relaxação spin-spin. Outro fator que influenciará a potência de micro-ondas absorvida será a energia de separação entre os estados de spin (equações 3.27 e 3.35), a diferença desses termos entre os radicais será resumida a diferença nos fatores isotrópicos dos tensores \vec{g} e \vec{A} . Entretanto, novamente essa diferença não será tão acentuada como a apresentada nas inclinações das curvas de saturação.

Para evitar saturação conclui-se, portanto, que se deve usar, tanto para o TEMPOL, quanto para o ALTEMPOL, potências de micro-ondas abaixo de 36 mW. Neste regime a forma de linha dos espectros não será modificada pela saturação, garantindo resultados da análise da relaxação de spin mais confiáveis.

5.2 – Dependência do Sinal de EPR com a concentração do TEMPOL e do ALTEMPOL

A dependência da intensidade do sinal de EPR, em relação às variações das concentrações do radical livre TEMPOL e do marcador de spin ALTEMPOL, ambos em solução etanólica, é fundamental para a definição da concentração ideal para os experimentos com os marcadores ligados aos AuNR. Quanto mais alta a

concentração, menor a distância entre os spins e, portanto, maior a probabilidade de aparecer a interação de troca entre os spins eletrônicos de dois radicais diferentes, resultando na deformação das linhas de EPR do espectro.

Ao analisar os espectros de EPR obtidos em função da concentração tanto do TEMPOL quanto do ALTEMPOL, é visível a variação das formas de linha com o aumento da concentração (Figuras 5.3 e 5.4).

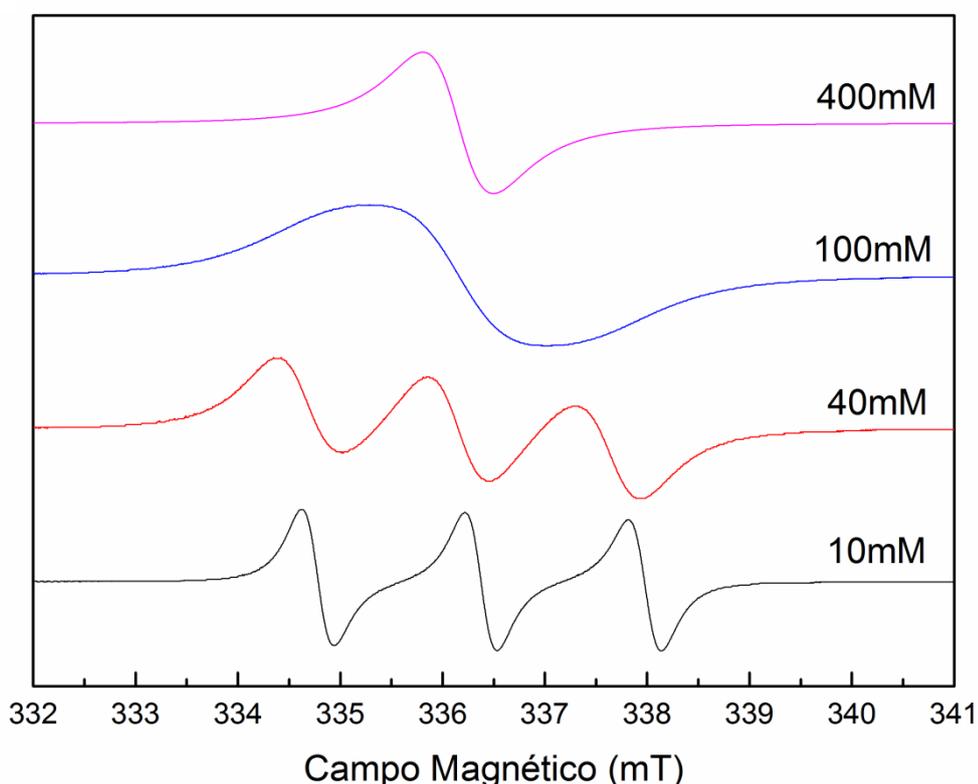


Figura 5.3: Espectros de EPR para o radical TEMPOL em solução etanólica, em função da concentração. Parâmetros de EPR utilizados: atenuação de 30dB (~0.1 mW de micro-ondas), amplitude de modulação a 0,1 mT, frequência de 9,4 GHz e temperatura ambiente.

Esta variação da forma de linha é devido ao surgimento de uma interação de troca entre os spins eletrônicos de radicais diferentes. Com a elevação da quantidade de spins na amostra (radicais), haverá um aumento cada vez maior desta interação devido à diminuição da distância entre os radicais. Este efeito já foi relatado antes para outros radicais nitróxidos. Por exemplo, Likhtenshtein *et al.* observaram uma variação da forma de linha devido à interação de troca nos espectros do radical DTBNO (di-*t*-butyl nitroxide) [13] muito similar à do TEMPOL.

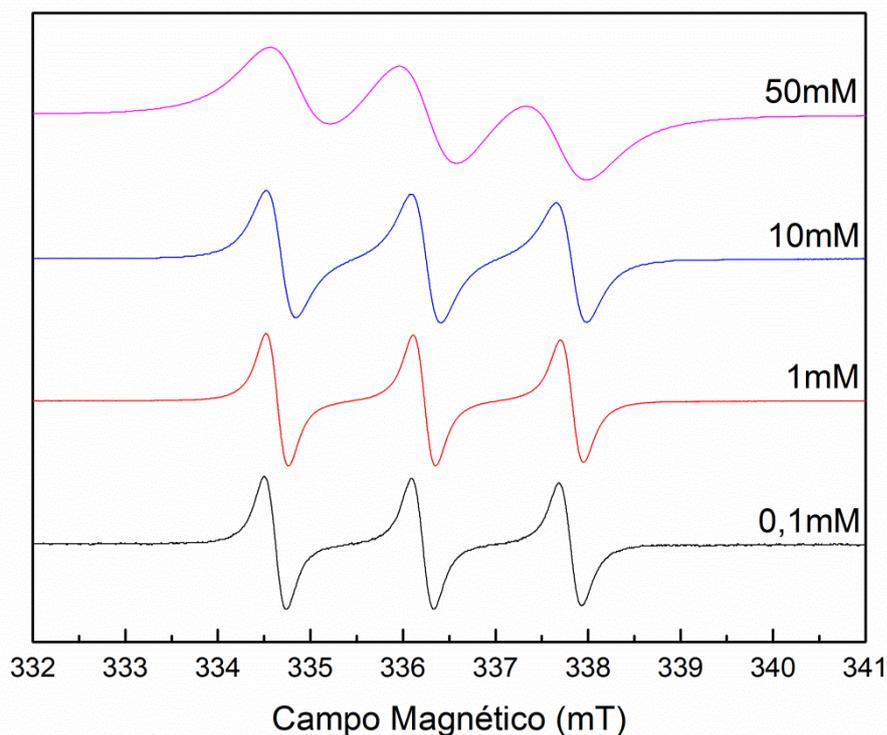


Figura 5.4: Espectros de EPR para o radical ALTEMPOL em solução etanólica, em função da concentração. Parâmetros de EPR utilizados: atenuação de 30 dB (~0.1 mW de micro-ondas), amplitude de modulação a 0,1 mT, frequência de 9,4 GHz e temperatura ambiente.

Assim como para o radical livre TEMPOL em solução etanólica o marcador de spin ALTEMPOL sob mesmas condições experimentais variou a sua forma de linha com o aumento da concentração radicalar. Novamente a mudança na forma de linha será respectiva à contribuição da interação de troca.

Após dupla integração dos espectros pode-se calcular a intensidade dos sinais de EPR em função da concentração. Esta dependência pode ser vista tanto para o TEMPOL quanto para o ALTEMPOL na figura 5.5.

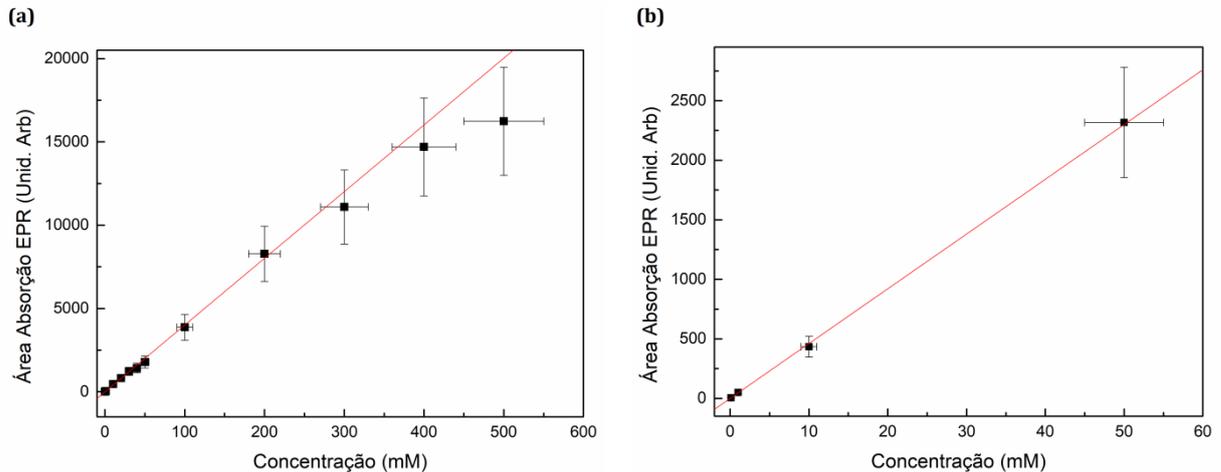


Figura 5.5: Variação da potência de micro-ondas absorvida em relação a concentração de **(a)** TEMPOL e **(b)** ALTEMPOL em etanol. Parâmetros de EPR utilizados: atenuação de 30 dB, amplitude de modulação a 0,1 mT, frequência de 9,4 GHz e temperatura ambiente. As regressões lineares resultaram nas seguintes dependências: $AA_{\text{TEMPOL}} = 0,49(9) + 40(1)\text{mM}^{-1}C$ e $AA_{\text{ALTEMPOL}} = -8(2) + 46,4(5)\text{mM}^{-1}C$.

A relação linear da intensidade do espectro de EPR com a variação da concentração até a concentração de 100 mmol/L para ambos os radicais está em conformidade com a equação 3.27. A inclinação da reta obtida pela relação empírica da regressão linear define a potência de micro-ondas absorvida pelo sistema dos radicais nitróxidos dado por uma potência fixa de micro-ondas enviada à cavidade de ressonância. Este comportamento demonstra a variação linear de espécies paramagnéticas com o aumento da concentração da amostra. Entretanto, esta dependência linear não é sensível às deformações da forma de linha devido à interação de troca, pelo menos em primeira ordem, portanto é notória a fuga da linearidade para concentrações mais elevadas (>100 mmol/L). A divergência entre as inclinações para os radicais TEMPOL e ALTEMPOL está dentro dos erros estimados para intensidade do sinal de EPR e concentração radicalar. Outro fator que influenciou na pequena divergência das inclinações da reta foi à diferença de pontos obtidos entre as amostras. A relação da intensidade do sinal de EPR com a concentração radicalar também está de acordo com a literatura [84, 85] para soluções de TEMPOL em água.

Para se entender melhor a interação de troca, responsável pela alteração da forma de linha dos espectros de EPR, para altas concentrações de radicais, devemos considerar o seguinte Hamiltoniano³⁶:

$$\mathcal{H}_{Troca} = \frac{1}{2}(\mathbf{S}_1^\dagger \cdot \mathbf{J} \cdot \mathbf{S}_2 + \mathbf{S}_2^\dagger \cdot \mathbf{J}^\dagger \cdot \mathbf{S}_1), \quad (5.2)$$

onde \mathbf{S}_1 é operador de spin referente a um elétron desemparelhado e \mathbf{S}_2 é também o operador de spin, entretanto, referente a outro elétron desemparelhado; \mathbf{J} é uma matriz 3x3 tomada pela interação elétrica (Coulombiana) entre dois elétrons desemparelhados.

Condizente com o sistema estudado em que é de interesse a interação intermolecular dos radicais, pode-se tomar a parte isotrópica do Hamiltoniano da interação de troca [91]:

$$(\mathcal{H}_{Troca})_{iso} = J_0 \mathbf{S}_1^\dagger \cdot \mathbf{S}_2, \quad (5.3)$$

onde $J_0 = tr(\mathbf{J}) / 3$, é a constante de acoplamento de troca, que em uma primeira aproximação, é dada pela integral de troca:

$$J_0 = -2 \langle \phi_a(1)\phi_b(2) | \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0 r} | \phi_a(2)\phi_b(1) \rangle, \quad (5.4)$$

ϕ_a e ϕ_b são funções de onda ortonormalizadas dos orbitais, considerando os elétrons não interagentes, ϵ_0 é a permissividade do vácuo e r a distância entre os elétrons. Logo a interação de troca é, a grosso modo, inversamente proporcional à distância entre os spins (e dos radicais).

Considerando apenas a sobreposição dos orbitais dos spins interagentes, sem a definição da influência da dinâmica molecular e dos tempos de relaxação, a relação da interação de troca com a distância entre os spins interagentes será dada pela equação 5.5 abaixo [130]:

³⁶ A ser tratado como outra perturbação ao Hamiltoniano de Spin da equação (3.13).

$$J_0 = A_0 e^{-\beta r}. \quad (5.5)$$

Em resumo, a interação de troca é dada pela sobreposição das funções de onda entre os elétrons, levando assim a dois possíveis estados de correlação entre os spins, (singleto e tripleto), a origem da interação de troca para sistemas radicalares em solução de baixa viscosidade serão as colisões intermoleculares. Além da interação de troca, existe outra contribuição à interação entre os spins eletrônicos do sistema, nomeada de Dipolo-Dipolo. Essa outra contribuição é devido à interação eletromagnética entre os dipolos magnéticos eletrônicos, entretanto, devido à rápida dinâmica rotacional molecular dos radicais em solução e pelo curto tempo entre as colisões ela será muito fraca quanto comparada com interação de troca [130].

A quantificação desta interação de troca a partir do espectro de EPR pôde ser obtida, em primeira ordem, através da constante de acoplamento de troca J_0 . Com auxílio da rotina Easyspin [105] os espectros de EPR do TEMPOL foram ajustados³⁷ para diferentes concentrações, fixando-se parâmetros do Hamiltoniano de spin, como os parâmetros do tensor g e da interação hiperfina³⁸, e variando-se os valores da frequência da interação de troca (J_0).

Já a distância média dos radicais pode ser estimada por uma distribuição homogênea dos radicais, dada à concentração da solução no volume do capilar utilizado (50 μ L). Na figura 5.6 se encontra um gráfico da variação dos valores da frequência da interação de troca (J_0)³⁹ em função da distância média entre dois radicais de TEMPOL ou ALTEMPOL nas soluções.

³⁷ Pelo método dos mínimos quadrados incluído na rotina Easyspin. Entretanto, o software não disponibiliza os erros estimados dos parâmetros dos ajustes.

³⁸ Tabela 3.1.

³⁹ Frequência da interação de troca está representada em unidades de campo magnético (mT) para melhor visualização, entretanto a unidade conceitualmente mais adequada seria MHz. O valor da frequência da interação de troca será equivalente quando comparado ao valor isotrópico da constante de interação hiperfina, A_0 , (~1,6 mT, ou 45 MHz) para a solução etanólica de TEMPOL à 100 mmol/L, já para a concentração de 500mmol/L será quase três vezes maior (~4,4 mT, ou 124 mT).

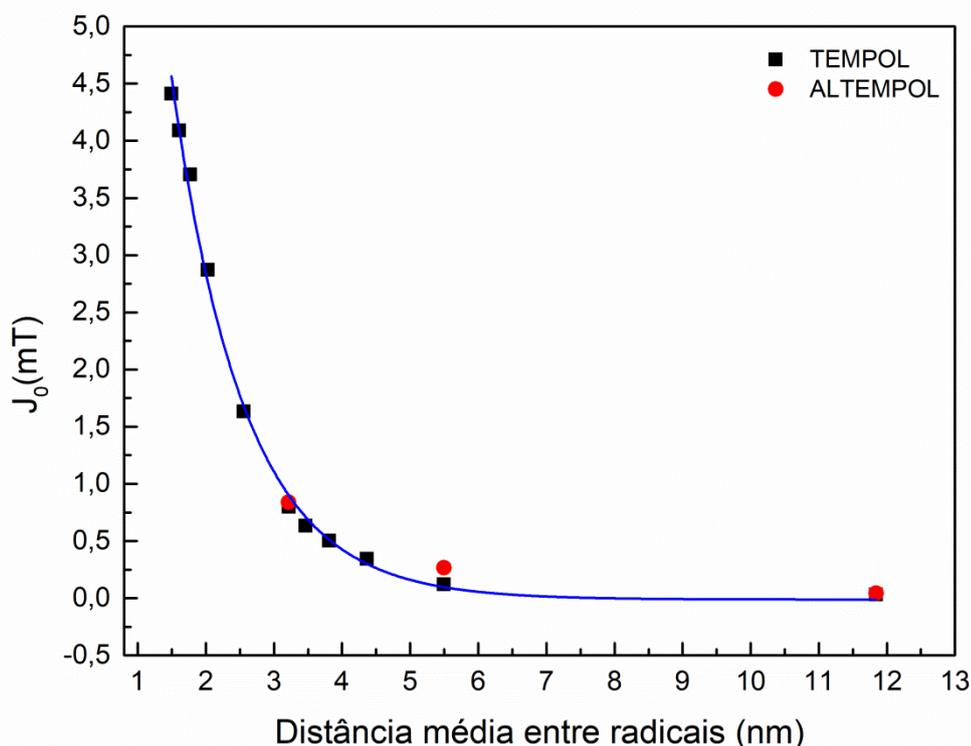


Figura 5.6: Relação da frequência da interação de troca com a distância média entre as moléculas de TEMPOL e do ALTEMPOL em etanol. Valores da frequência da interação de troca foram obtidos pelo ajuste via a rotina do Easyspin dos espectros de EPR. A curva representada pela linha azul é dada pelo ajuste realizado no programa Origin® para o radical TEMPOL que gerou a relação empírica:

$$AA_{TEMPOL} = 18(1)e^{\left(-\frac{r}{1,07(6)nm}\right)} - 0,01(7).$$

As curvas da figura 5.6 para os radicais TEMPOL e ALTEMPOL demonstram a relação exponencial da frequência da interação de troca (J_0) com a distância entre os spins desemparelhados, concordando com a previsão teórica da equação 5.5. A equação empírica obtida pelo ajuste define uma relação da frequência da interação de troca com a distância entre os spins para o radical TEMPOL. Os valores da frequência da interação de troca (J_0) obtidos para as diversas concentrações estão de acordo com o encontrado por Dobryakov em [87].

Até então foram discutidos os resultados de EPR para os radicais da classe dos nitróxidos, TEMPOL e ALTEMPOL, em função da potência de micro-ondas e da concentração dos radicais utilizados neste trabalho. Eles podem ser resumidos de duas maneiras.

Primeiro, ao aumentar a potência de micro-ondas incidente no sistema, uma maior absorção de energia pelos spins eletrônicos desemparelhados ocorre, evidenciados pelo aumento da intensidade do espectro de EPR. Entretanto, abaixo

da potência de 36 mW os espectros dos dois radicais não apresentaram deformações na forma de linha, caracterizando o regime de não saturação do sistema.

O outro fator testado foi à dependência do sinal de EPR com o aumento da concentração radicalar, para os dois radicais em solução etanólicas, foi observada a relação linear entre concentração e a energia absorvida pelo sistema. Também foi quantificada a contribuição da interação de troca para os dois radicais. A partir da concentração de 1 mmol/L os spins desemparelhados das moléculas do radical já interagem entre si alargando gradativamente as linhas de EPR no espectro. Por outro lado, a dependência da intensidade do sinal não varia com o alargamento das linhas de EPR causado pela interação de troca.

Levando-se em conta estes resultados, de agora em adiante, a concentração dos radicais TEMPOL e ALTEMPOL em soluções será mantida em 0,1 mmol/L, evitando assim que a interação de troca impeça a quantificação da influência do solvente e da temperatura no sistema de spins. A potência de micro-ondas também será mantida constante, em 0,1 mW (30 dB) para os próximos experimentos.

5.3. – Influência do Solvente nos Parâmetros do Hamiltoniano de Spin

Nesta seção são analisadas as variações dos parâmetros do Hamiltoniano de spin do TEMPOL e do ALTEMPOL para diferentes solventes. Estes parâmetros foram determinados pelo ajuste dos espectros de EPR com a rotina Easyspin/Matlab® [105]. Os solventes utilizados variam em polaridade e viscosidade. Os parâmetros de medida utilizados para todas as amostras nesta etapa foram: a atenuação do espectrômetro em 30 dB, que equivale à 0,1 mW, para se evitar saturação (ver seção 5.1); a concentração em 0,1 mmol/L (mM) para evitar o aparecimento da interação de troca (ver seção 5.2); a temperatura ambiente ($T \sim 300$ K); e a modulação de 100 kHz em 0,1 mT.

A Figura 5.7, ilustra dois exemplos extremos de solventes com formas de linha do espectro de EPR distintas: água deionizada (DI) e ciclohexano. Vale ressaltar que a grandeza física que em que os solventes possuem valores antagônicos será a polaridade. Este parâmetro é apresentado neste trabalho como

polaridade relativa, donde será dado por uma escala em que 0 será atribuído ao tetrametilsilano e 1 para a água [131].

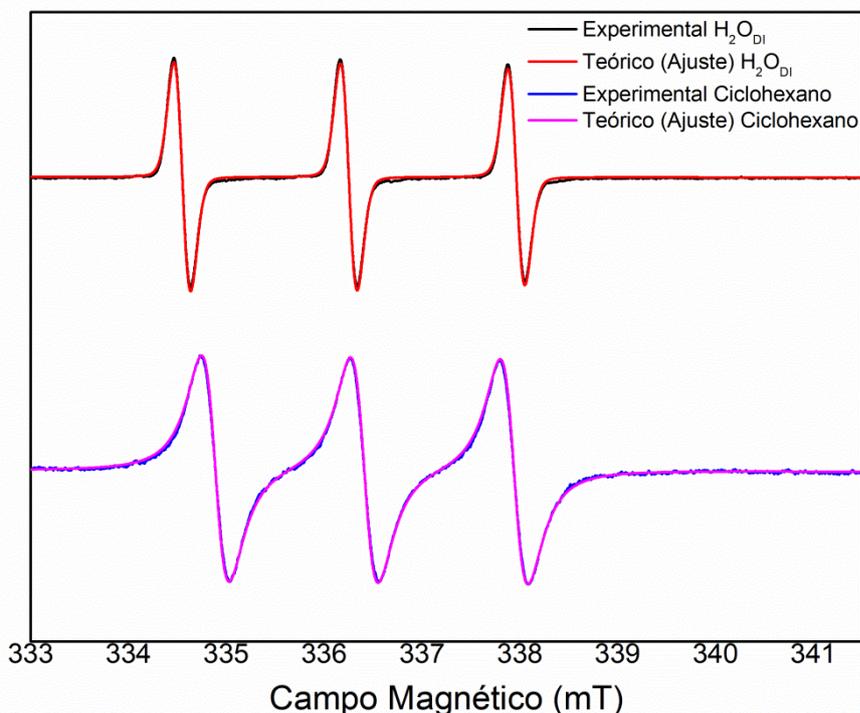


Figura 5.7: Espectros de EPR do radical TEMPOL solubilizado em água deionizada e ciclohexano.

As curvas de ajuste foram realizadas a partir da rotina do Easyspin. Parâmetros de EPR utilizados: atenuação de 30 dB (~0.1 mW de micro-ondas), amplitude de modulação a 0,1 mT, frequência de 9,4 GHz (banda X) e temperatura ambiente. Os parâmetros do Hamiltoniano de spin derivados do ajuste das formas de linha estão na tabela 5.1.

Também presentes na figura 5.7 estão os ajustes das formas de linha realizadas com auxílio da rotina Easyspin/Matlab® cujos parâmetros do Hamiltoniano de spin se encontram na tabela 5.1. Pelas funções que definem a forma de linha dos ajustes, observando os espectros de EPR da figura 5.7 é notória a maior contribuição da função derivada de gaussiana para o espectro de TEMPOL em água (polaridade relativa 1), enquanto que para o espectro de ciclohexano (polaridade relativa 0,06). Este resultado evidencia um alargamento não homogêneo para o espectro de EPR do TEMPOL em solução aquosa, caracterizando a presença de interação hiperfinas não resolvidas possivelmente causada pela presença de oxigênio molecular [91]. Uma possibilidade para o estudo da mudança na forma de linha do espectro de TEMPOL em soluções é a eliminação de moléculas de oxigênio molecular através de uma degasagem.

Outro parâmetro que será responsável pela variação na forma de linha do espectro de EPR é a viscosidade do solvente. Como descrito pela equação de difusão em líquido de Einstein-Stokes (equação 3.39), a difusão rotacional do radical no meio é dependente da viscosidade do solvente. A partir da forma de linha, principalmente a da transição de alto campo do espectro ($M_I = 1$), é possível estimar o tempo de correlação da molécula. Em alguns casos para viscosidade altas, o espectro de EPR não pode ser descrito pela teoria apresentada no capítulo 3 (ou pela teoria de Redfield [94]). As larguras de linha das transições presentes nos espectros dos radicais neste caso não obedecem à equação 3.43. A dinâmica desses radicais só poderá ser descrita pelas equações estocásticas de Liouville [14]. Ambos os regimes estão implementados na rotina de ajuste do Easyspin.

Na Figura 5.8, pode-se ver dois espectros representativos do radical TEMPOL para solventes de viscosidades distintas: glicerol (viscosidade 934cp) e ciclohexano (viscosidade 0,62cp). Nela, a mudança de regime de dinâmica rotacional, em função da viscosidade, para o TEMPOL em solução, é notável. Enquanto que para o regime rápido⁴⁰, para solventes de baixa viscosidade, as três linhas têm praticamente a mesma intensidade (tempos de relaxação spin-spin), o mesmo não ocorre para solventes “lentos”, de alta viscosidade.

Uma vez determinado os parâmetros experimentais ideais para se evitar a saturação e a interação de troca que introduziriam artefatos nos espectros de EPR, os experimentos acima com TEMPOL foram repetidos com outros solventes. Todos os espectros foram ajustados pelo Easyspin e os parâmetros do Hamiltoniano de spin foram determinados. Estes parâmetros são: as componentes do tensor \vec{g} e do tensor Hiperfino \vec{A} ; a largura de linha individual e as contribuições Gaussiana e Lorentziana; e o tempo correlação para difusão rotacional.

⁴⁰ Baixo tempo de correlação para difusão rotacional do spin do radical.

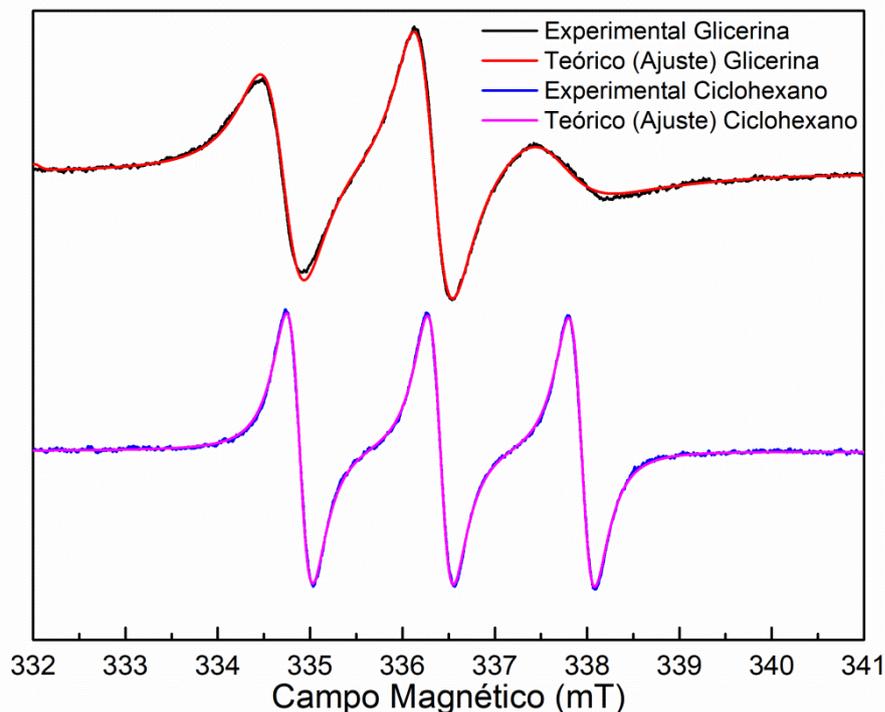


Figura 5.8: Espectros de EPR do radical TEMPOL solubilizado em glicerol e ciclohexano. As curvas de ajuste foram realizadas a partir da rotina do Easyspin. Parâmetros de EPR utilizados: atenuação de 30 dB (~ 0.1 mW de micro-ondas), amplitude de modulação a 0,1 mT, frequência de 9,4 GHz (banda X) e temperatura ambiente.

Na Tabela 5.1 se encontram os parâmetros extraídos dos ajustes para os diversos solventes. O desvio ou erro estimado dos parâmetros extraídos do ajuste não são disponibilizados pelo software. Portanto, o único parâmetro disponibilizado na ajuste que estimará o sucesso do ajuste será o desvio quadrático médio (RMSD, do inglês *root mean square deviation*). Estes valores são apresentados na tabela 5.1 abaixo e juntamente com todos os espectros realizados presentes na figura 5.9.

Tabela 5.1: Parâmetros de EPR do radical de TEMPOL, obtidos via a rotina do Easyspin, solubilizado em diversos solventes de polaridades e viscosidades diferentes.

	Água	Tolueno	Etanol	DMSO	Metanol	Etileno Glicol	Ciclo-hexano	Glicerol
g_x	2,0086	2,0098	2,0089	2,0093	2,0089	2,0090	2,0099	2,0090
g_y	2,0061	2,0063	2,0062	2,0061	2,0061	2,0061	2,0063	2,0061
g_z	2,0022	2,0022	2,0022	2,0021	2,0022	2,0020	2,0020	2,0023
A_x (mT)	0,60	0,65	0,61	0,62	0,61	0,62	0,62	0,65
A_y (mT)	0,71	0,71	0,71	0,72	0,68	0,70	0,68	0,71
A_z (mT) ⁴¹	3,82	3,30	3,55	3,49	3,59	3,61	3,29	3,61
τ_c (10 ⁻¹¹ s)	1,51	0,45	2,86	3,59	0,45	13,52	0,22	254,58
ΔL_{gauss} (mT)	0,16	0,06	0,14	0,16	0,13	0,16	0,06	0,13
$\Delta L_{Lorentz}$ (mT)	0,02	0,28	0,16	0,02	0,22	0,01	0,27	0,07
Polaridade relativa ⁴²	0,998	0,099	0,654	0,444	0,762	0,790	0,006	0,812
Viscosidade (cp) ⁴³	1	0,59	1,1	1,99	0,55	16,1	0,62	934
RMSD	155,9	59,4	45,8	134,9	36,5	86,3	54,9	82,4

⁴¹ Valores das componentes do tensor hiperfino dados em unidades de mT para melhor visualização, entretanto a unidade conceitualmente mais adequada seria MHz.

⁴² Valores da polaridade relativa extraídos de [131].

⁴³ Valores da viscosidade extraídos de uma tabela de propriedades físicas de solventes da empresa Sigma-Aldrich.

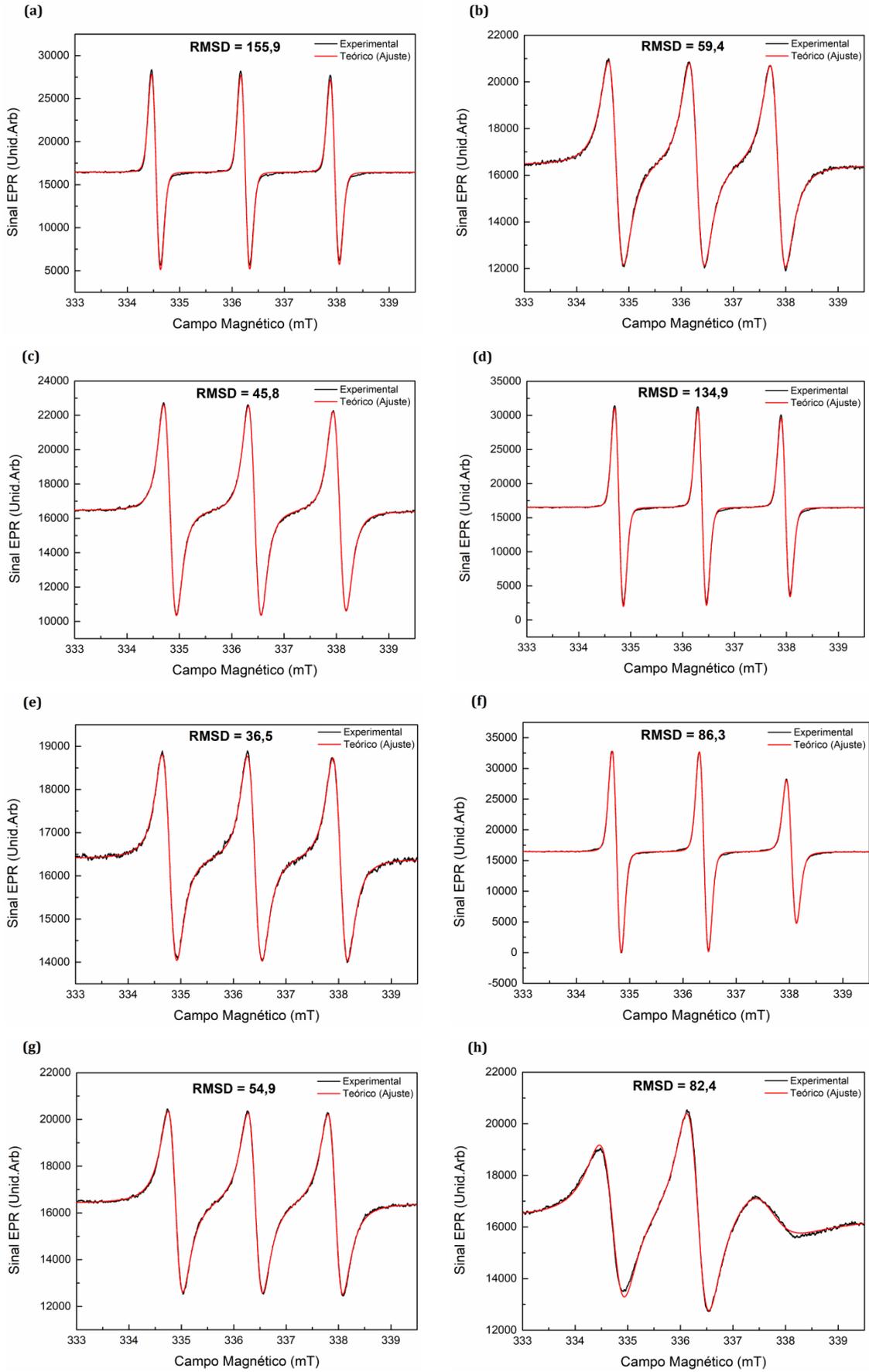


Figura 5.9: Espectros de EPR do radical TEMPOL solubilizado em: **(a)** água; **(b)** Tolueno; **(c)** Etanol; **(d)** DMSO; **(e)** Metanol; **(f)** Etileno Glicol; **(g)** Ciclohexano e **(h)** Glicerol. Destaca-se nos espectros a presença do parâmetro RMSD (desvio quadrático médio). As curvas de ajuste foram realizadas a partir da rotina do Easyspin. Parâmetros de EPR utilizados: atenuação de 30 dB (~0.1 mW de micro-ondas), amplitude de modulação a 0,1 mT, frequência de 9,4 GHz (banda X) e temperatura ambiente.

Os parâmetros do Hamiltoniano de spin do TEMPOL da tabela 5.1 podem ser comparados diretamente com os resultados obtidos por Lebedev em [88]. Enquanto que as componentes do tensor \vec{g} dos mesmos solventes não são muito diferentes. Para as componentes do tensor \vec{A} observa-se uma pequena variação entre os resultados deste trabalho e os da referência para os solventes comum aos dois [45].

Por outro lado, os valores das incertezas são maiores nos ajustes dos espectros em que a forma de linha é predominantemente gaussiana. São eles os espectros do radical solubilizado em água, DMSO e etileno glicol. Este comportamento é justificado pelo aparecimento de algumas transições satélites de menor intensidade nestes espectros, sendo estas não contempladas pelo Hamiltoniano descrito no algoritmo do ajuste. Essas transições são associadas por alguns autores à interação Hiperfina do elétron desemparelhado com o isótopo de ^{13}C (de abundância de 1,1%) de spin nuclear $I = 1/2$ [13, 132]. Na Figura 5.10 têm-se os espectros do radical TEMPOL solubilizado em água e metanol, onde é notória a presença de transições satélites no espectro de EPR para o TEMPOL solubilizado em água, enquanto, não se nota a presença destas no espectro em metanol.

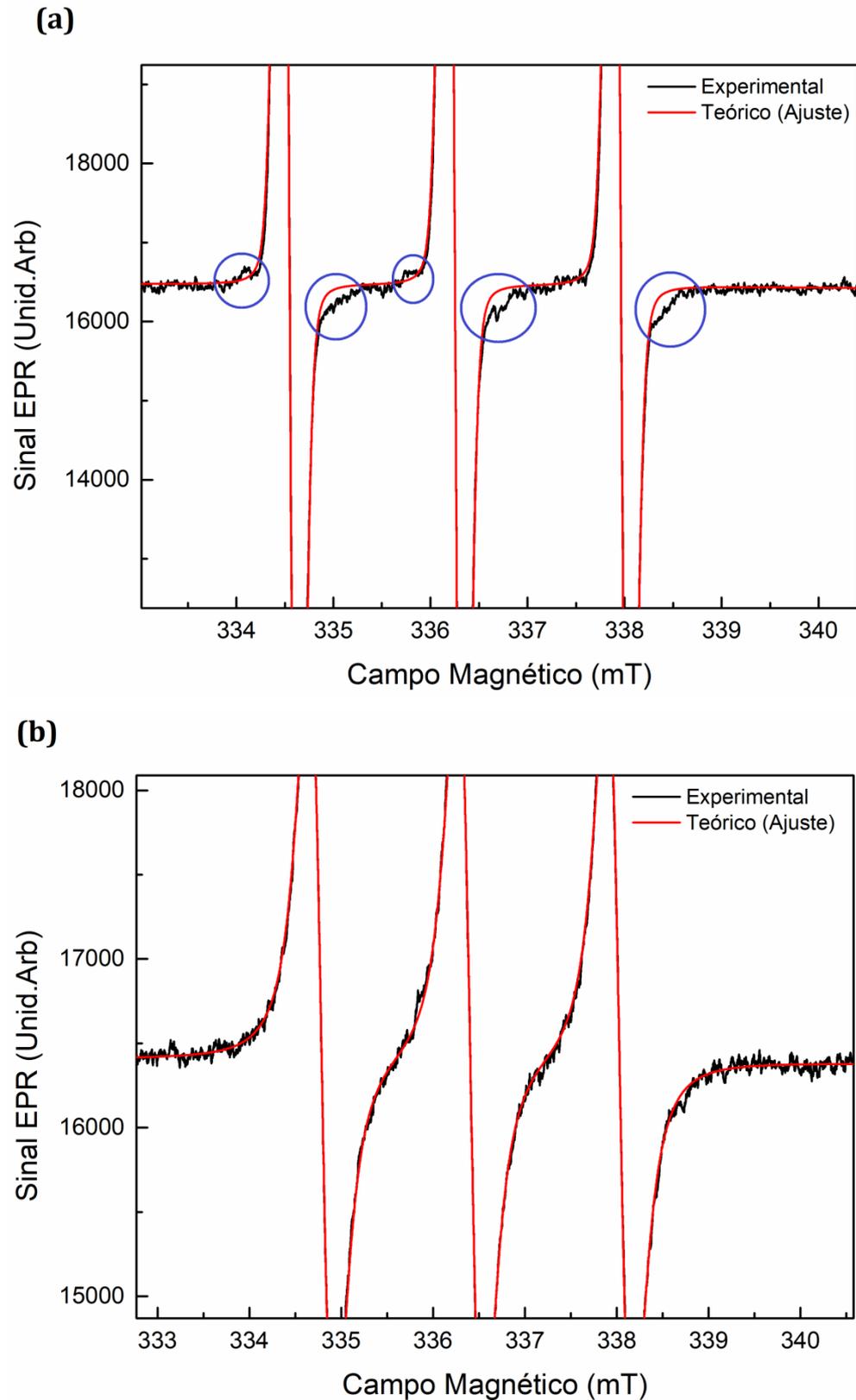


Figura 5.10: Espectros de EPR do radical TEMPOL solubilizado em: **(a)** água; e **(b)** ciclohexano. Destaca-se nos espectros a presença de transições satélites em **(a)**. As curvas de ajuste foram realizadas a partir da rotina do Easyspin. Parâmetros de EPR utilizados: atenuação de 30 dB (~0.1 mW de micro-ondas), amplitude de modulação a 0,1 mT, frequência de 9,4 GHz (banda X) e temperatura ambiente.

Com o objetivo de aferir a influência da polaridade do meio em relação às componentes z do tensor \vec{A} como relatado no capítulo 3, constrói-se o gráfico da variação da componente z do tensor em relação à polaridade relativa. A representação da correlação do valor componente z do tensor \vec{A} com a polaridade do solvente é representada pela figura 5.11.

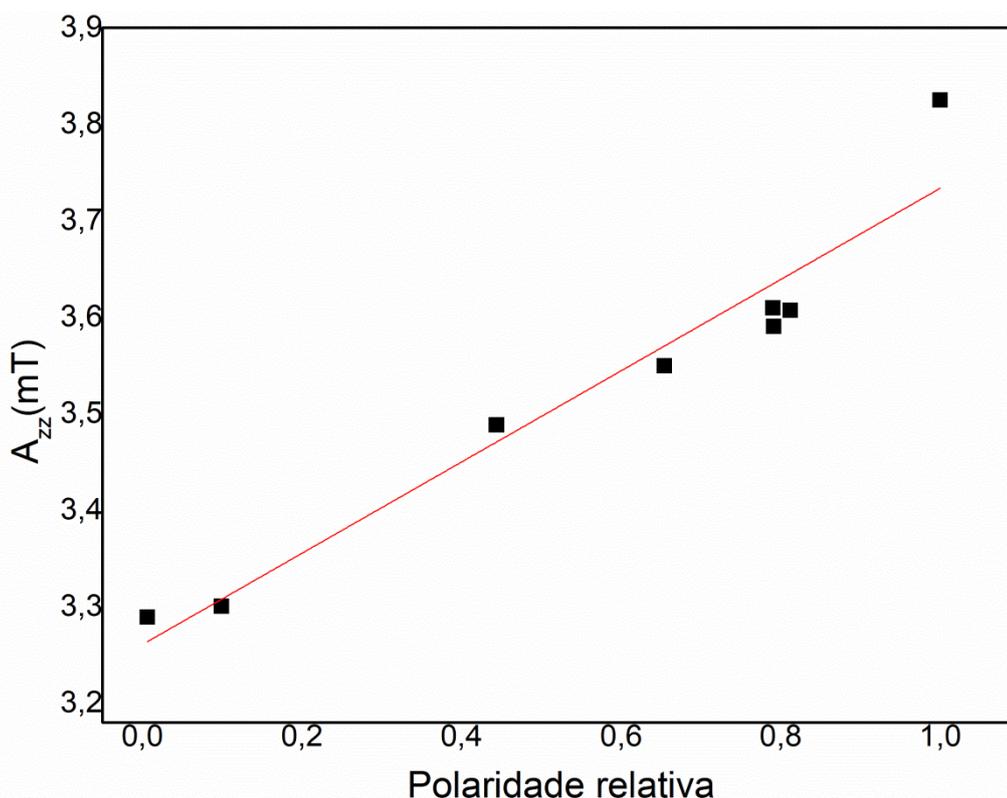


Figura 5.11: Componente z do tensor hiperfino \vec{A} do radical TEMPOL extraídos via ajuste do Easyspin versus polaridade relativa dos solventes utilizados [124]. A partir de uma regressão linear extraída do software Origin® obtêm-se $A_{zz} = 3,26(3)mT + 0,47(5) mT P_r$.

O comportamento apresentado pela figura acima se deve ao acréscimo da densidade eletrônica no orbital $2p_z$ centrado no átomo de nitrogênio. O aumento da polaridade do solvente leva, portanto, à maior localização da nuvem eletrônica no sítio do nitrogênio. A partir dos parâmetros obtidos pela regressão linear do gráfico da figura 5.11, é possível a construção de uma equação que forneça o valor da componente principal z do tensor hiperfino para o radical livre TEMPOL em função da polaridade relativa do solvente (P_r):

$$A_{zz} = 3,26(3)mT + 0,47(5) mT P_r. \quad (5.6)$$

Outra componente que será influenciada pela polaridade do solvente é a componente principal x do tensor \vec{g} . Na figura 5.12 pode-se ver esta dependência.

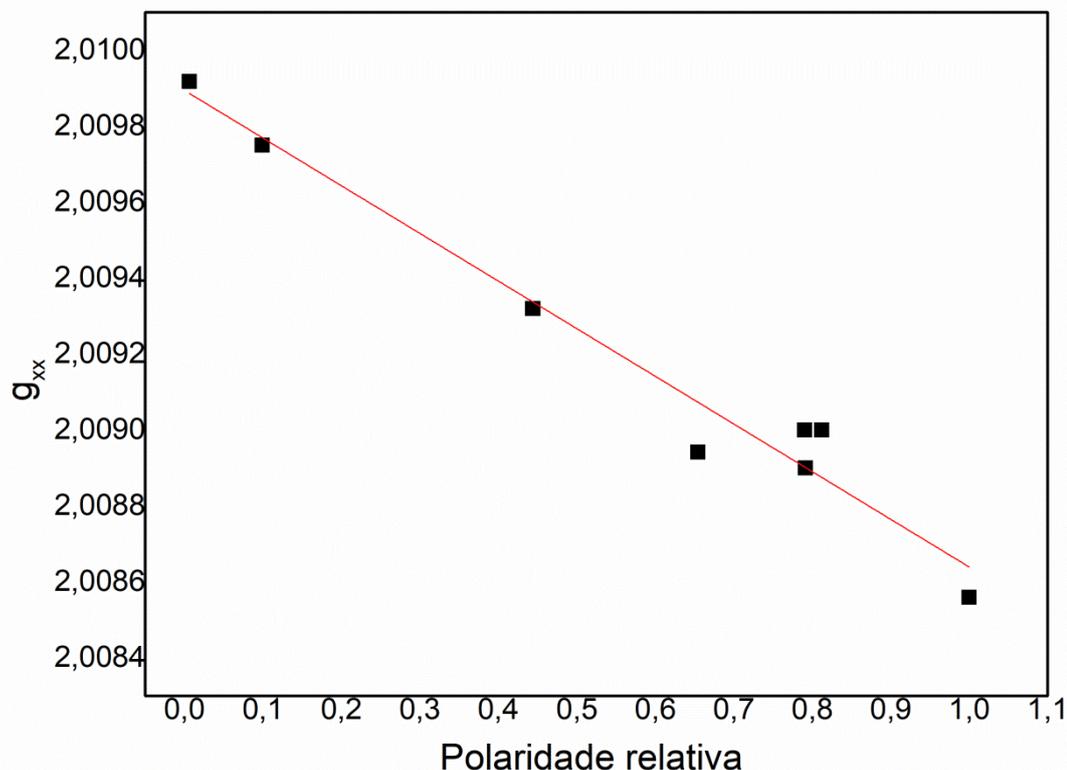


Figura 5.12: Componente g_{xx} do tensor \vec{g} do radical TEMPOL extraídos via ajuste do Easyspin versus polaridade relativa dos solventes utilizados [131]. As componentes g_{yy} e g_{zz} se mantêm praticamente constantes. A partir de uma regressão linear extraída do software Origin® obtêm-se os parâmetros da equação da reta ($g_{xx} = 2,00989(6) - 0,0013(1) P_r$).

Na figura 5.12, pode-se ver que o aumento da polaridade diminui a componente x do fator g aproximando-a do valor encontrado para o elétron livre ($g_e = 2,0023$). Essa diminuição pode ser explicada pela interação entre os orbitais π localizados na periferia do radical TEMPOL e o orbital antiligante π^* da ligação N-O. A interação entre os orbitais acarreta em uma variação na energia do orbital populado π^* . A equação 5.7 define a variação da componente principal x do tensor \vec{g} em relação à variação energética do orbital antiligante π^* [88]:

$$\Delta g_{xx} = \frac{\lambda \rho_0^\pi}{\Delta E_{n\pi^*}}, \quad (5.7)$$

λ é a interação spin-orbital constante para um átomo de oxigênio, ρ_0^π é a densidade de spin no átomo de oxigênio, e $\Delta E_{n\pi^*}$ é a energia da transição entre os orbitais $n - \pi^*$. O aumento da polaridade do meio leva, portanto, ao deslocamento da densidade de spin sobre o nitrogênio que, por sua vez, resulta em um crescimento de A_{zz} e diminuição de Δg_{xx} . A variação de $\Delta E_{n\pi^*}$ ocorre devido à solvatação dos orbitais n ou π^* do radical TEMPOL, por moléculas de solvente [88]. O aumento de $\Delta E_{n\pi^*}$ é correspondente ao da hidrofobicidade do solvente que associada ao fortalecimento da solvatação do oxigênio n -orbital.

Novamente através dos parâmetros obtidos pela regressão linear do gráfico da figura 5.12, é possível a construção de uma equação que forneça o valor da componente principal x do tensor \vec{g} para o radical livre TEMPOL em função da polaridade relativa do solvente (P_r):

$$g_{xx} = 2,00989(6) - 0,0013(1)P_r. \quad (5.8)$$

A seguir os valores das componentes A_{zz} e g_{xx} obtidos por Lebedev [88] são comparados com os resultados obtidos neste trabalho. A compatibilidade dos resultados obtidos neste trabalho com os obtidos por Lebedev [88] é visível.

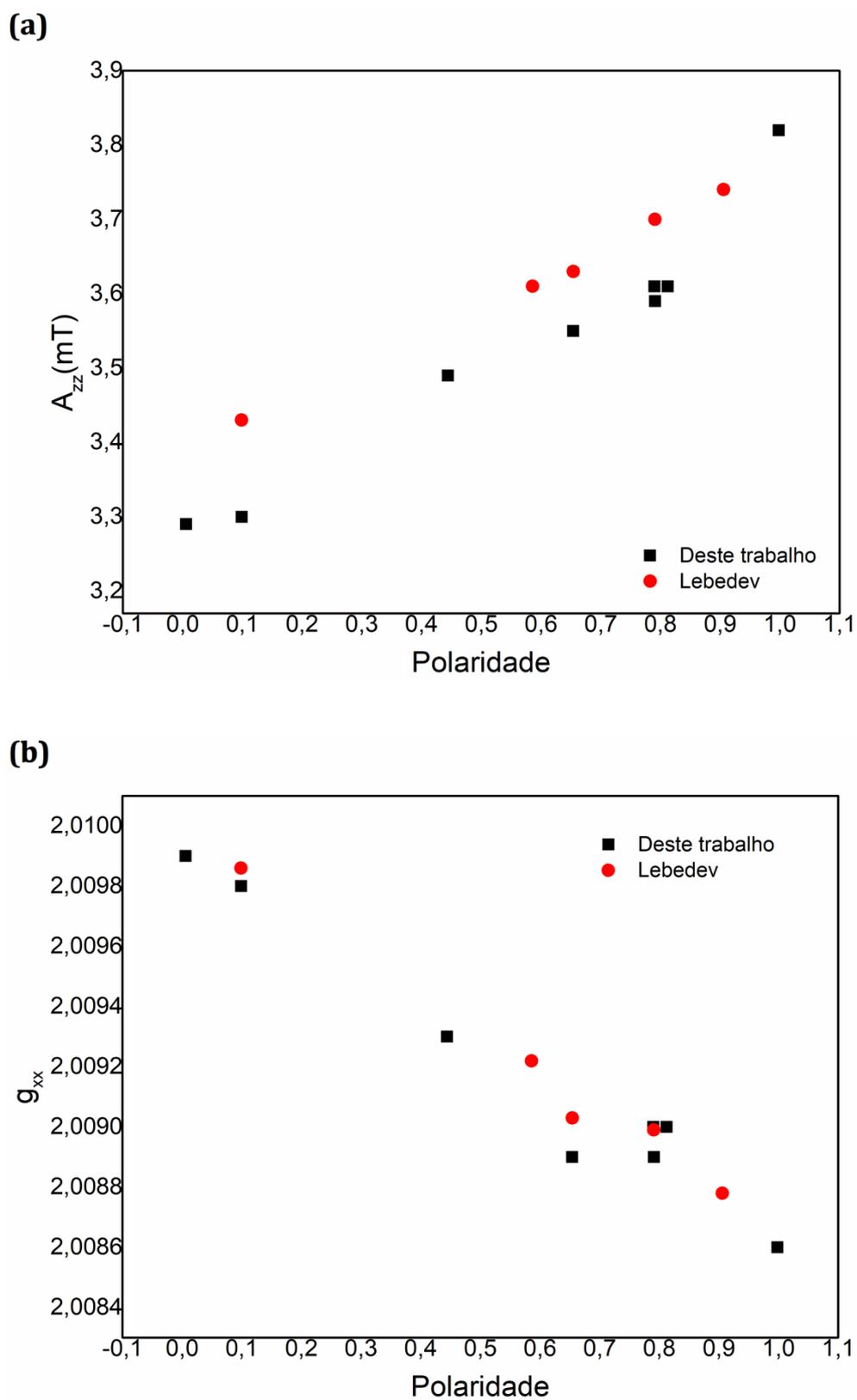


Figura 5.13: Comparativo dos resultados obtidos neste trabalho com adquiridos por Lebedev em [88].

Em **(a)** Componente z do tensor hiperfino \vec{A} versus polaridade dos solventes e em **(b)** Componente x do tensor \vec{g} versus polaridade dos solventes.

Outra influência do solvente nos parâmetros extraídos pelo espectro de EPR será o tempo de correlação que é uma grandeza associada à difusão rotacional do radical livre em solução. Na figura a 5.14, é exibido a relação do tempo de correlação extraído pelo ajuste, com a viscosidade associada para cada solvente utilizado.

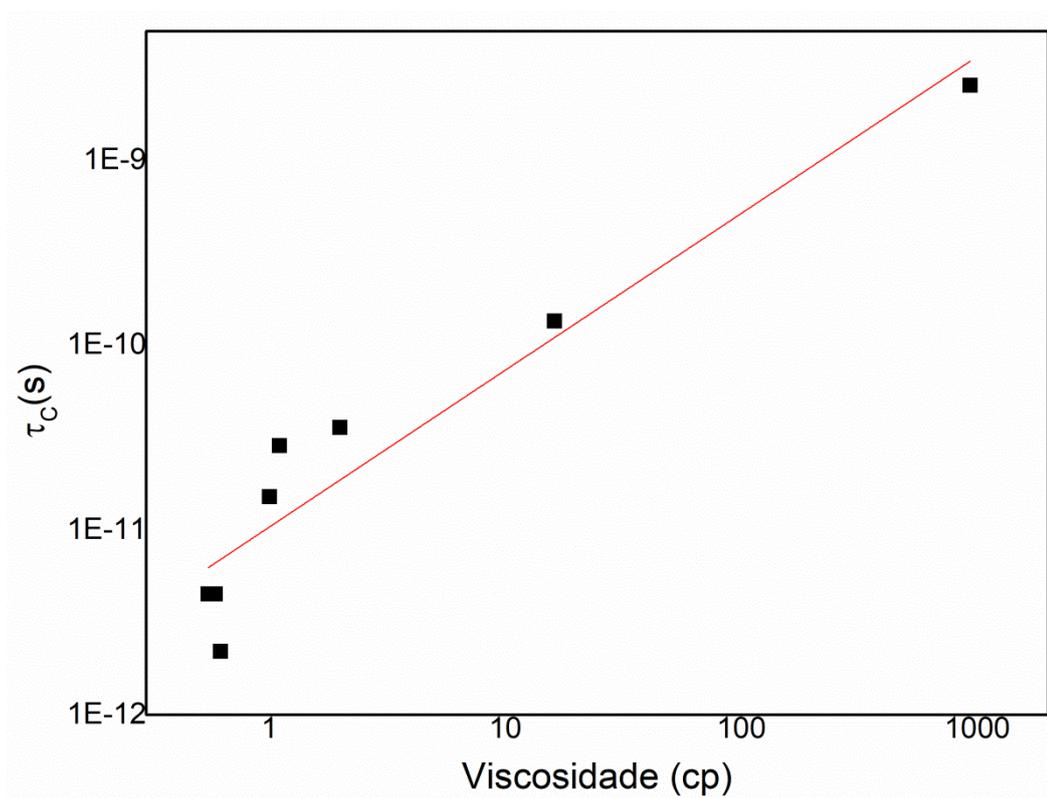


Figura 5.14: Gráfico dos tempos de correlação da molécula do radical TEMPOL extraídos via ajuste do Easyspin versus viscosidade dos solventes utilizados. O valor da inclinação extraído da regressão linear rendeu o valor de $2,70(4) \times 10^{-12}$ s/cp .

Ao observar o gráfico da figura 5.14 é possível notar o aumento do tempo de correlação das moléculas do radical TEMPOL em solventes mais viscosos. Este comportamento linear do aumento do tempo de correlação das moléculas com o aumento da viscosidade obtido experimentalmente está em conformidade com a equação 3.39 (difusão em líquido de Stokes-Einstein [89]). A inclinação da reta obtida pela regressão linear em associação com a equação 3.39 será dada pela relação: $inclinação = 4\pi a_{Hy}^3 / 3kT$ [89]. A partir deste resultado será possível estimar o raio hidrodinâmico das moléculas de TEMPOL em meio ao movimento

rotacional na solução. O valor encontrado para o raio hidrodinâmico para as moléculas do radical livre de TEMPOL é dado por⁴⁴:

$$a_{Hy} = (1,387 \pm 0,006) \times 10^{-11} \text{ m.}$$

Retornando aos resultados para o radical ALTEMPOL, a escassez e a solubilidade desconhecida desse composto nos solventes utilizados, impossibilitou o estudo da variação dos parâmetros deste marcador de spin na influência do meio. Entretanto, como exposto por outros autores, a influência do meio para os radicais nítróxidos se assemelham. Uma possibilidade explorada foi à comparação dos espectros de EPR dos radicais ALTEMPOL e TEMPOL ambos solubilizados em etanol. A figura 5.15 apresenta os espectros de EPR dos radicais solubilizados em etanol a uma mesma concentração de 0,1 mmol/L, com objetivo de comparação entre os espectros, os parâmetros de medida do espectrômetro foram os mesmos para as duas amostras. Sendo estes parâmetros: atenuação de 30 dB (~0.1 mW de micro-ondas), amplitude de modulação a 0,1 mT, frequência de 9,4 GHz (banda X) e temperatura ambiente.

⁴⁴ O erro estimado para o raio hidrodinâmico foi obtido pela propagação da incerteza. A equação que forneceu o erro estimado é dada por: $\Delta a_{Hy} = \sqrt{\left[\left(\sqrt{\frac{3kT}{4\pi}} \right) \left(\frac{1}{3b} \right)^{2/3} \right]^2 (\Delta b)^2}$. Sendo b a inclinação obtida pela regressão linear do gráfico exposto na figura 5.13.

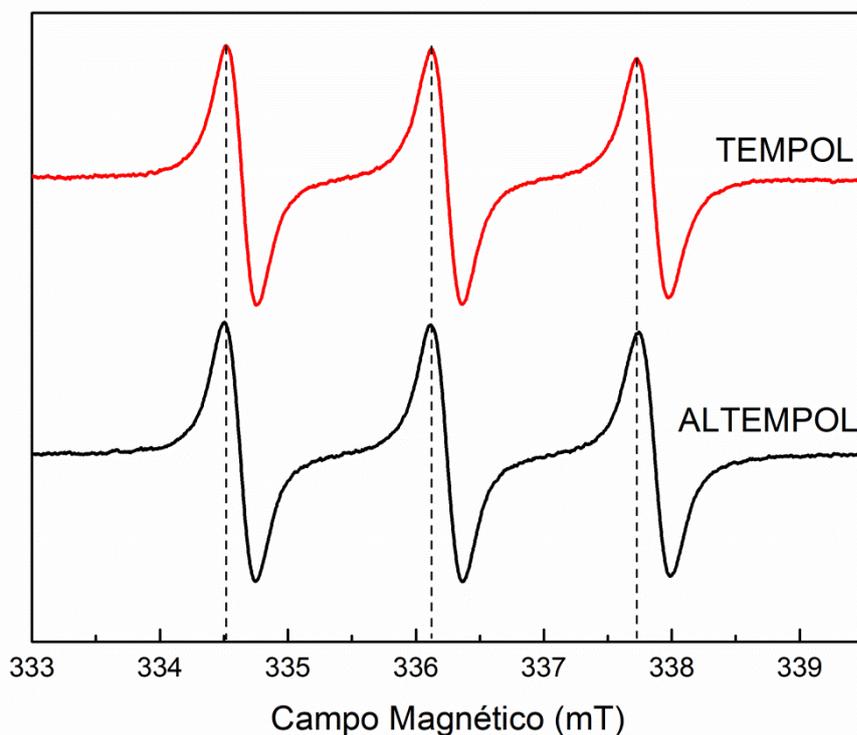


Figura 5.15: Espectros de EPR das amostras de ALTEMPOL e TEMPOL solubilizados em etanol a uma concentração de 0,1 mmol/L. As linhas tracejadas referem a posição dos picos das transições para o radical TEMPOL. Parâmetros de EPR utilizados: atenuação de 30 dB (~0.1 mW de micro-ondas), amplitude de modulação a 0,1 mT, frequência de 9,4 GHz (banda X) e temperatura ambiente.

Ao comparar os espectros da figura 5.15 é possível perceber um pequeno deslocamento entre as linhas de transições para o radical ALTEMPOL em relação do espectro do TEMPOL. Este resultado caracteriza uma contribuição isotrópica do tensor hiperfino maior para o radical ALTEMPOL em comparação com o TEMPOL. Para uma maior precisão dos valores das componentes do radical ALTEMPOL em solução etanólica é mais adequado a realização de um ajuste via a rotina do Easyspin do espectro. Na tabela 5.2 tem-se os valores das componentes dos tensores \vec{g} e \vec{A} que descrevem o Hamiltoniano do sistema adquirido pela ajuste dos espectros dos dois radicais.

Tabela 5.2: Parâmetros de EPR do radical de TEMPOL e ALTEMPOL, obtidos via a rotina do Easyspin, solubilizados em etanol a uma concentração de 0,1 mmol/L.

	TEMPOL	ALTEMPOL
g_{xx}	2,0089	2,0093
g_{yy}	2,0062	2,0060
g_{zz}	2,0022	2,0021
A_{xx} (mT)	0,61	0,64
A_{yy} (mT)	0,71	0,73
A_{zz} (mT)	3,55	3,63
τ_c (10^{-11} s)	2,86	3,81
ΔL_{gauss} (mT)	0,14	0,13
$\Delta L_{Lorentz}$ (mT)	0,16	0,17
RMSD	45,8	42,4

A partir dos dados apresentados na tabela 5.2 é possível concluir que a modificação da estrutura molecular do radical, mesmo não sendo na ligação em que o elétron esteja desemparelhado, irá acarretar em uma alteração das componentes dos tensores \vec{g} e \vec{A} . O aumento do valor da componente isotrópica do tensor hiperfino para o radical ALTEMPOL indica uma maior proximidade entre o spin eletrônico e nuclear envolvidos desta interação. Este fenômeno pode decorrer da mudança da conformidade da molécula, que altera a densidade de spin no núcleo de nitrogênio do radical e de uma mudança no momento dipolar da molécula, alterando assim o valor da componente isotrópica.

Outro parâmetro obtido do ajuste, que está exposto na tabela 5.2, é o tempo de correlação da molécula do radical ALTEMPOL. O resultado indica uma maior inércia na dinâmica rotacional do radical ALTEMPOL em relação ao TEMPOL. O aumento do valor do tempo de correlação é consequente do prolongamento da estrutura e acréscimo na massa molecular do radical ALTEMPOL.

Com auxílio da equação de difusão em líquidos de Stokes-Einstein (equação 3.39) é possível estimar o raio hidrodinâmico das moléculas dos dois radicais em etanol. Possuindo os valores da viscosidade do solvente, temperatura do sistema e tempo de correlação extraído via ajuste o raio hidrodinâmico é obtido

trivialmente. Na tabela 5.3 são apresentados os valores dos raios hidrodinâmicos encontrados com auxílio da equação 3.39 para os radicais em solução etanólica.

Tabela 5.3: Raios hidrodinâmicos das moléculas do radical de TEMPOL e ALTEMPOL em etanol, estimados a partir dos tempos de correlação obtidos pelo ajuste da forma de linha do espectro de EPR pela rotina do Easyspin.

	TEMPOL	ALTEMPOL
$a_{Hy}(10^{-11}m)$	2,95	3,25

Como esperado o valor do raio hidrodinâmico para a molécula do radical ALTEMPOL é maior em relação ao radical TEMPOL. Note, entretanto, que o valor do raio hidrodinâmico para o TEMPOL em solução etanólica é maior do que o encontrado pela inclinação da reta do gráfico da figura 5.14 ($a_{Hy} = 1,387(6) \times 10^{-11}m$), usando todos os solventes medidos. Este valor é também mais preciso, mas os valores obtidos para o TEMPOL e o ALTEMPOL em etanol servem para uma discussão qualitativa.

Como ressaltado nas seções anteriores, a dinâmica molecular dos radicais será influenciada pelo meio. Um parâmetro que definirá o impedimento da difusão rotacional das moléculas do radical, como já discutido, é a viscosidade. Na próxima seção são apresentados os resultados que demonstram a influência da temperatura para o sinal de EPR do radical livre TEMPOL.

5.4. – Influência da Temperatura no Espectro de EPR do TEMPOL

Uma das inúmeras vantagens da técnica de EPR é a possibilidade de variação da temperatura do sistema. A variação da temperatura é obtida com um criostato de fluxo de hélio (Oxford) junto à cavidade. A estabilização e leitura da temperatura foram auxiliadas pelo controlador de temperatura (ITC-4 Oxford) e por um fluxometro (Oxford). A amostra utilizada foi a solução de TEMPOL em etanol a uma concentração de 1 mmol/L. Os parâmetros do espectrômetro foram a atenuação mantida em 10 dB, frequência de 9,4 GHz (banda X) e modulação de 0,1 mT. A faixa de temperatura variada durante as medidas foi de 280 K a 130 K. Alguns espectros obtidos para a amostra estão expostos na figura 5.16.

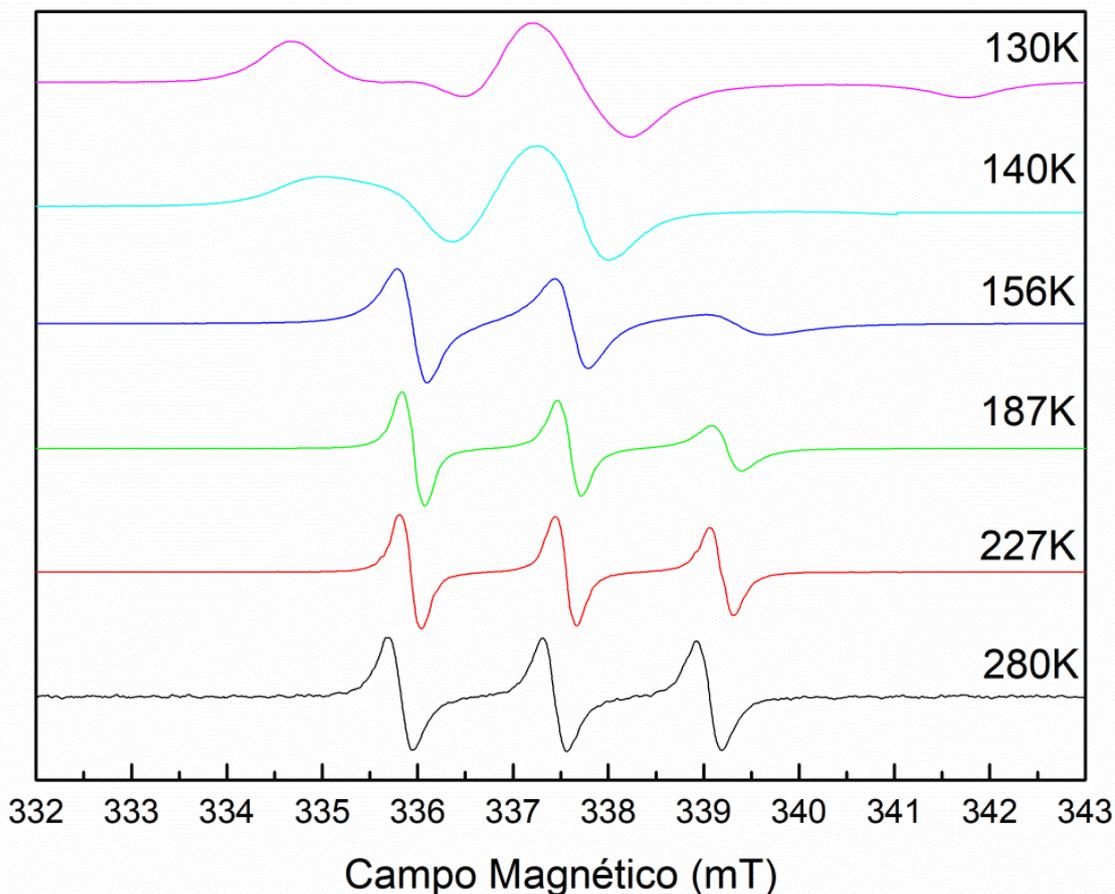


Figura 5.16: Espectros de EPR para o radical TEMPOL em solução etanólica a 1 mmol/L dados pela variação da temperatura do sistema na solução. Parâmetros de EPR utilizados: frequência de 9,4 GHz, atenuação de 10 dB (10 mW) e amplitude de modulação a 0,1 mT.

A mudança na forma de linha do espectro é nitidamente causada pela mudança de regime dinâmico do radical em solução. O aumento do tempo de correlação da molécula é característico da diminuição da intensidade da última linha de transição e pelo alargamento da mesma. Comportamento este notável até a temperatura de 156 K, a partir de 140 K observa-se uma mudança de regime. Este regime, já observado para soluções de radicais de TEMPOL em glicerol, tem sua dinâmica descrita pelas equações estocásticas de Liouville [14]. Já para a temperatura de 130 K, o espectro de EPR representa a forma de linha para o regime rígido, como num sistema paramagnético diluído policristalino. É adequado se obter os valores do tempo de correlação com a mudança deste em relação à temperatura

do sistema. Isto será possível com auxílio do ajuste dos espectros obtidos via rotina do Easyspin e será mostrado mais adiante.

No momento, vale lembrar que o aumento do tempo de correlação para difusão rotacional com a diminuição da temperatura é dado pela equação da difusão em líquidos (Stokes-Einstein), demonstrando a importância da interação do sistema de spins com o banho térmico. O comportamento desta dependência é característica de um processo termicamente ativado, caracterizado por um processo tipo Arrhenius. A partir do plot de Arrhenius pode-se extrair informações como a energia de ativação do movimento da molécula no meio. Entretanto, para a obtenção da energia de ativação, precisa-se anteriormente definir a difusão rotacional, sendo esta grandeza relacionada com o tempo de correlação pela equação [89]:

$$D_{rot} = \frac{1}{6\tau_c}. \quad (5.9)$$

Tomando o logaritmo da difusão rotacional teremos a equação de Arrhenius que apresentará uma relação linear com o inverso da temperatura. Utilizando a equação de Arrhenius tem-se:

$$\log(D_{rot}) = -\frac{E_a}{RT} + \log(A), \quad (5.10)$$

R é a constante universal dos gases, E_a é a energia de ativação rotacional e $\log(A)$ é uma constante associada ao valor da difusão rotacional para uma aproximação de um valor limite para a temperatura ($T \rightarrow \infty$).

O plot de Arrhenius para os valores da difusão rotacional para o radical de TEMPOL em etanol em relação à variação de temperatura está representado na figura 5.17.

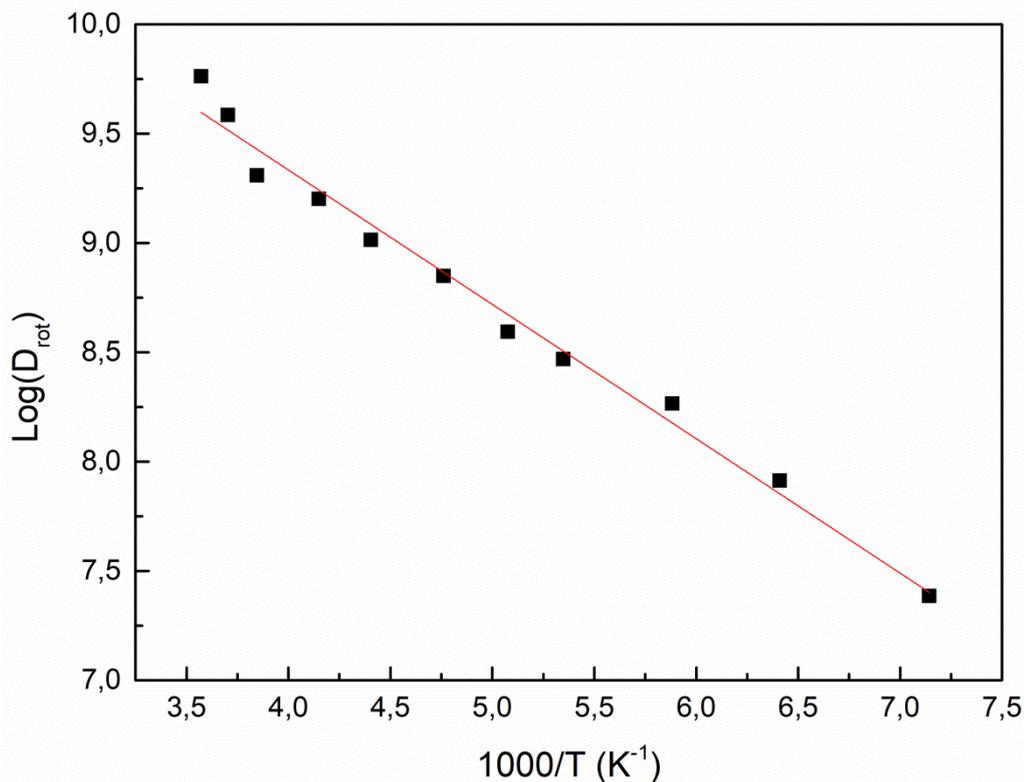


Figura 5.17: Lei de Arrhenius para a correlação entre a difusão rotacional das moléculas do radical TEMPOL em solução etanólica a uma concentração de 1 mmol/L com a temperatura do sistema. A difusão rotacional obtida através da equação 5.9 utilizando os valores dos tempos de correlação extraídos via ajuste dos espectros de EPR. A partir de uma regressão linear obtêm-se os parâmetros da equação da reta ($\log(D_{rot}) = b \frac{100}{T} + a$): $b = (0,61 \pm 0,02)K$ e $a = (11,8 \pm 0,1)$.

Através de uma regressão linear do gráfico da figura 5.17 é possível obter-se a energia de ativação rotacional. Esta energia para o radical de TEMPOL em etanol é de $(1,21 \pm 0,01)$ kcal/mol⁴⁵ ou $(52,5 \pm 0,04)$ meV/molécula, valor este muito menor ao obtido por Agneta Caragheorghopol *et al.* para um marcador de spin do tipo nitróxido ligado as nanopartículas de ouro [10]. O resultado encontrado era esperado, pois o movimento de um marcador de spin ligado a uma estrutura grande como uma nanopartícula é mais restrito que o de um radical livre. O ponto de interceptação da reta ao eixo das ordenadas do gráfico da figura 5.18, revela o valor

⁴⁵ O erro estimado para a energia de ativação rotacional foi obtido pela propagação da incerteza. A equação que forneceu o erro estimado é dada por: $\Delta E_a = \sqrt{\left(-\frac{1}{R}\right)^2 (\Delta b)^2}$. Sendo b a inclinação obtida pela regressão linear do gráfico exposto na figura 5.16.

do tempo de correlação limite para uma temperatura muito elevada, sendo este igual a $\tau_c = (2,7 \pm 0,6) \times 10^{-13} \text{ s}$.⁴⁶

Outro parâmetro extraído das simulações dos espectros de EPR para o radical TEMPOL em etanol em relação à variação de temperatura é a largura de linha das transições. O gráfico que exibe a contribuição lorentziana à largura de linha em relação a temperatura está presente na figura 5.18.

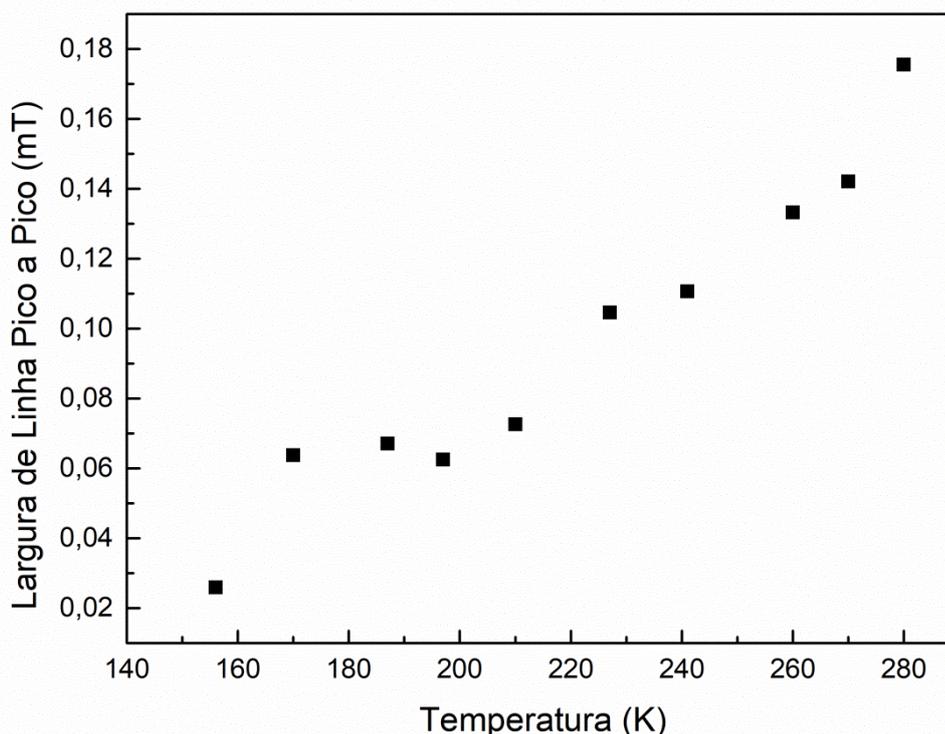


Figura 5.18: Contribuição lorentziana as larguras de linha dos espectros de EPR do radical TEMPOL extraídos via ajuste do Easyspin versus temperatura do sistema. A solução etanólica do radical se encontrava a uma concentração de 1 mmol/L. Parâmetros de EPR utilizados: atenuação de 10 dB e amplitude de modulação a 0,1 mT.

A contribuição lorentziana à largura de linha do espectro de EPR está correlacionada ao tempo de relaxação spin-spin (T_2), como já discutido no capítulo 3 ($\Delta B_{1/2} = 2/\sqrt{3}T_2$), e é também evidenciada na figura 5.18. A diminuição da contribuição Lorentziana à largura de linha com a temperatura (figura 5.18) confirma

⁴⁶ O erro estimado para o tempo de correlação limite foi obtido pela propagação da incerteza. A equação que forneceu o erro estimado é dada por: $\Delta\tau_c = \sqrt{\left(-\frac{\ln(10)}{6 \times 10^a}\right)^2 (\Delta a)^2}$. a será o parâmetro livre obtido pela regressão linear do gráfico exposto na figura 5.16.

a dependência da largura de linha com o tempo de relaxação spin-spin ($T_2 \propto 1/T$). Entretanto, a contribuição da gaussiana à largura variou pouco com a temperatura, não mostrando tendência.

No próximo capítulo são apresentados os resultados inéditos para os marcadores de spin ligados à superfície dos nanobastões de ouro. Resultados esses obtidos a partir da técnica de EPR para as amostras apresentadas no capítulo 4 (SR 01, SR 02 e SR 03). Os resultados apresentados no capítulo 5 para os radicais livres TEMPOL e ALTEMPOL, sendo eles: os fatores de calibração (variação do sinal de EPR com o aumento da potência de micro-ondas e da concentração radicalar), a influência do meio nos parâmetros do Hamiltoniano do sistema e na dinâmica molecular e a dependência da temperatura servirão como base para o estudo dos nanobastões de ouro funcionalizados com os marcadores de spin.

6 – MARCAÇÃO DE SPIN EM NANORODS DE OURO

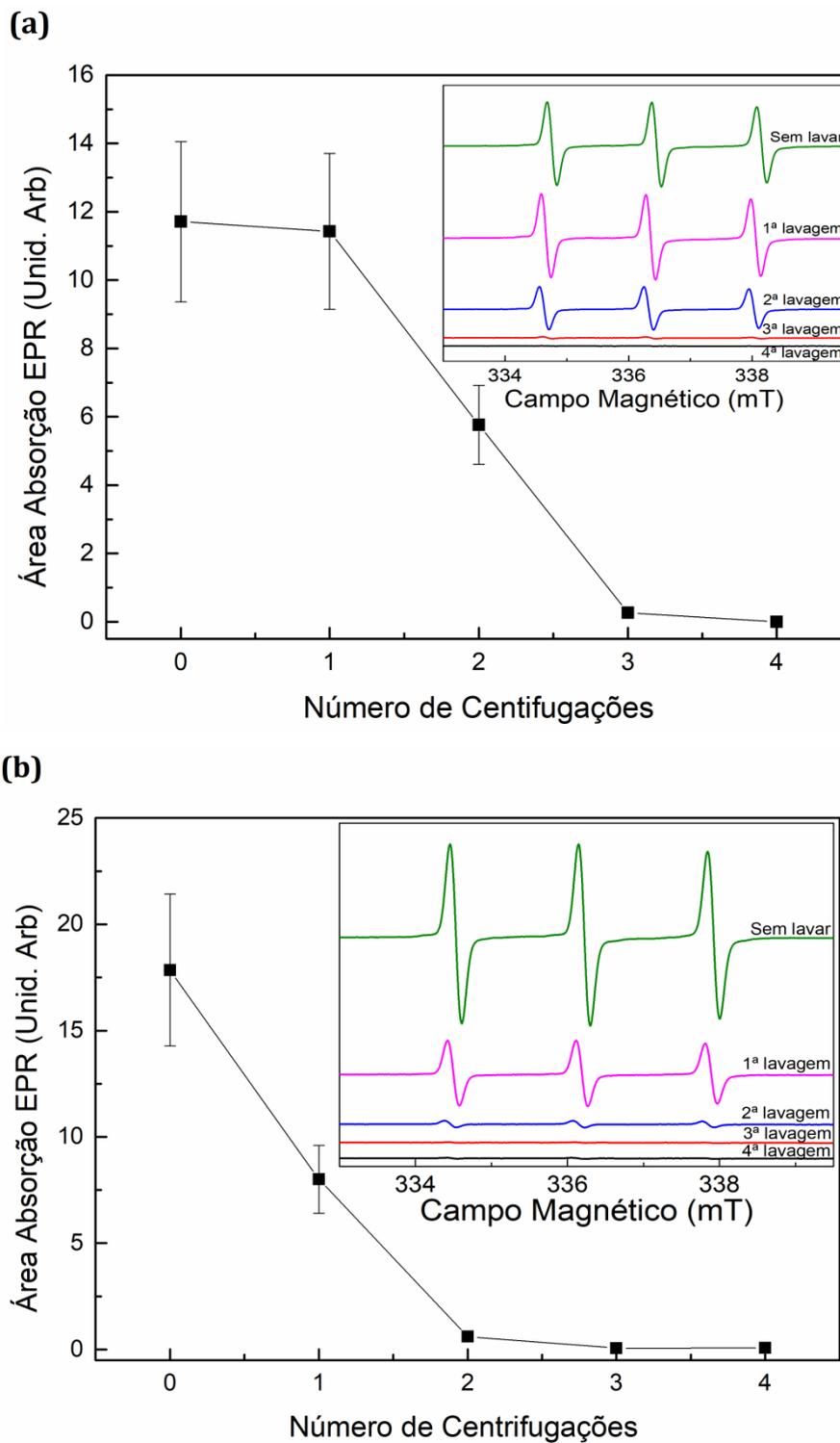
Neste capítulo, são apresentados e discutidos os resultados obtidos para as amostras de nanobastões de ouro (AuNRs) funcionalizados com o marcador de spin ALTEMPOL. Vale ressaltar que, até o presente momento, não há relatos na literatura sobre a funcionalização destas nanoestruturas com marcadores de spin. Dessa forma, a análise e a interpretação física dos resultados apresentados neste capítulo são fundamentadas nos conceitos teóricos e caracterizações realizadas nos capítulos anteriores e comparados com resultados disponíveis na literatura para marcação de spins em AuNPs. Este capítulo possui importância central, pois, além de utilizar o conteúdo discutido em capítulos anteriores, também apresenta os resultados do principal objeto de estudo deste trabalho: a ligação dos marcadores de spin à superfície dos bastões.

6.1 – AuNRs marcados com ALTEMPOL – eliminação do excesso de ALTEMPOL livre

Antes de apresentar os espectros de EPR das amostras dos nanobastões de ouro, são relatados brevemente alguns detalhes da preparação das amostras SR01, SR02 e SR03. A importância do processo de purificação das amostras, discutido no capítulo 4 deve ser aqui, novamente ressaltada. Ela é uma etapa fundamental na marcação dos AuNRs com ALTEMPOL e de eliminação do excesso ALTEMPOL livre. Ao eliminar todo excesso do radical ALTEMPOL não ligado, os espectros de EPR das amostras (SR01, SR02 e SR02) serão característicos dos marcadores ligados aos AuNRs, sem a sobreposição do sinal dos radicais livres em solução.

A seguir, são apresentados as intensidades do sinal de EPR do ALTEMPOL livre no sobrenadante, produto das centrifugações das amostras. As centrifugações foram efetuadas a 8000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante, de aparência transparente, é reservado para a quantificação do ALTEMPOL não ligado aos nanobastões de ouro. O precipitado é ressuspendido em solução aquosa de CTAB à 1 mmol/L. O processo de centrifugação é repetido até completa purificação dos nanobastões de ouro, ou seja, até o desaparecimento do sinal de EPR do

ALTEMPOL não ligado no sobrenadante. Os gráficos que ilustram a relação da intensidade do sinal EPR do sobrenadante com o número de centrifugações do sistema para as três amostras (SR01, SR02 e SR03) estão presentes na figura 6.1.



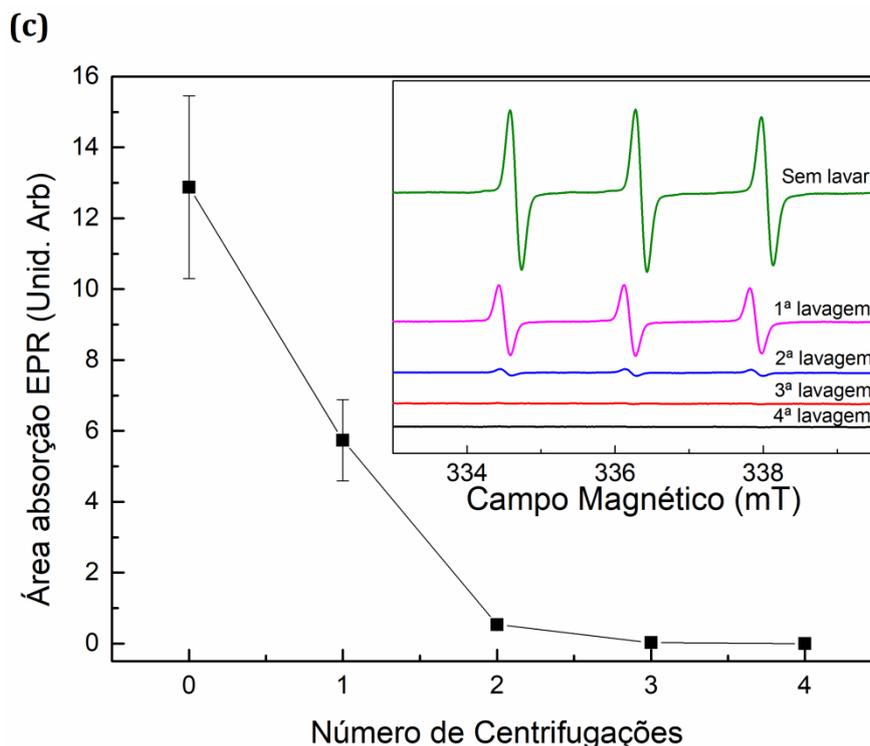


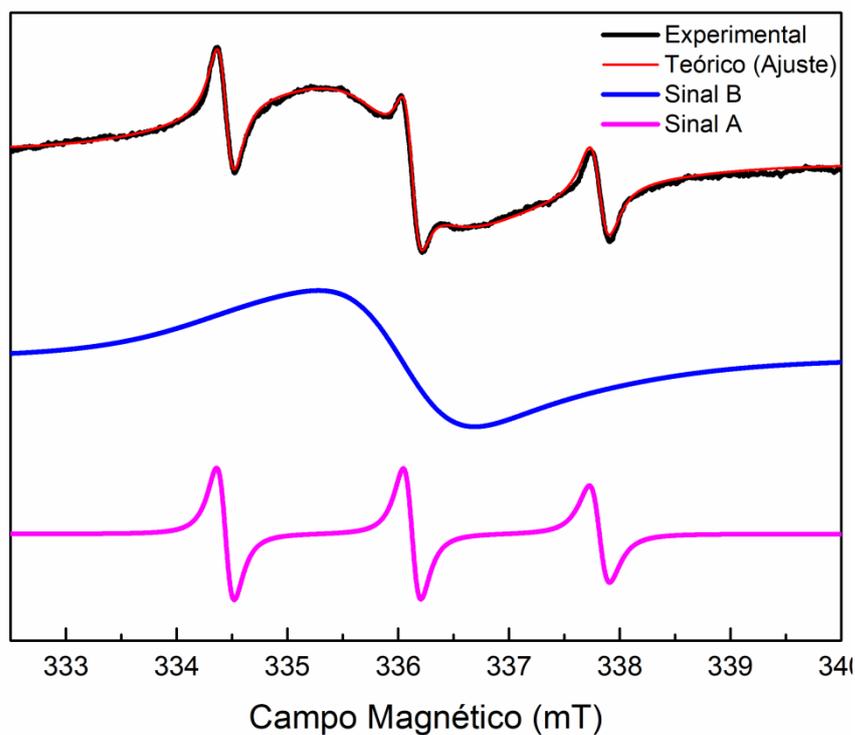
Figura 6.1: Relação da intensidade do sinal de EPR do ALTEMPOL livre nos sobrenadantes das amostras (a) SR01, (b) SR02 e (c) SR03, em função do número de centrifugações. A solução presente nos sobrenadantes além do ALTEMPOL não ligado, possui também CTAB em água deionizada a 1 mmol/L. Os parâmetros de EPR utilizados nas medidas foram: frequência de microondas de 9,4 GHz (Banda X), atenuação de 10 dB (10 mW), amplitude de modulação a 0,1 mT e $T \sim 300$ K. Os espectros de EPR correspondentes estão inseridos nas figuras. Cada lavagem corresponde a um processo de centrifugação seguido de ressuspensão do precipitado em solução aquosa de CTAB à 1 mmol/L.

A diminuição do valor da intensidade do espectro de EPR do ALTEMPOL com o número de centrifugações, caracteriza a eficiência do método de eliminação dos marcadores não ligados. A última centrifugação (4ª lavagem), para todas as amostras, não revelou as linhas de EPR do ALTEMPOL distinguível do ruído, e por isso, foi associado a uma intensidade zero. Este processo de purificação foi de grande importância para o estudo proposto, pois somente dessa maneira foi possível garantir que o sinal de EPR das amostras, após esta fase, são devidos exclusivamente aos marcadores ALTEMPOL ligados aos nanobastões de ouro.

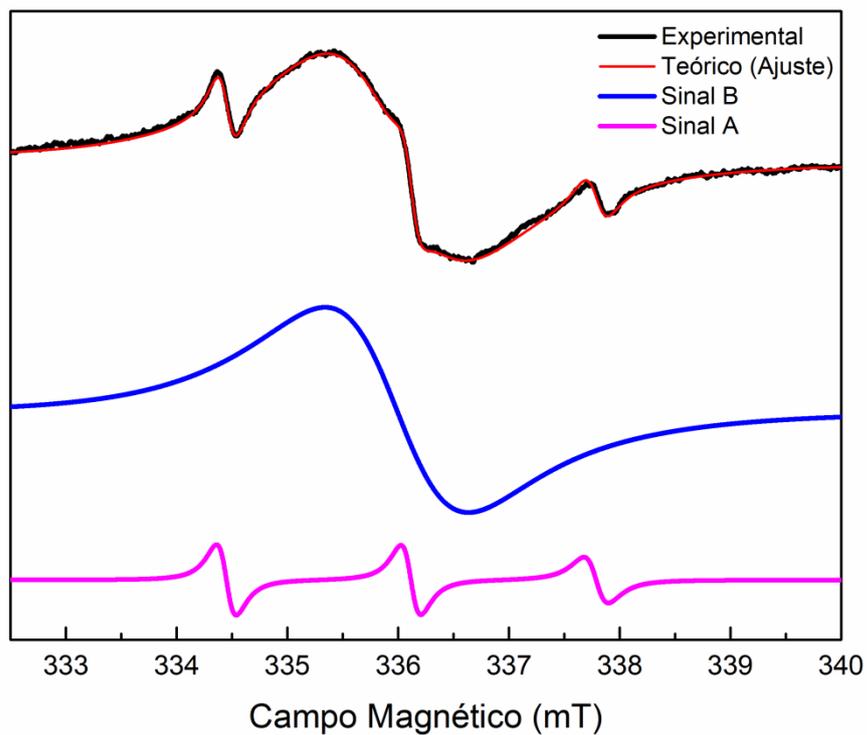
6.2 – EPR do ALTEMPOL ligado aos AuNRs - Resultados

Os espectros de EPR das três amostras (SR01, SR02 e SR03) estão apresentados nas figuras 6.2 (a)-(c), respectivamente, juntamente com os ajustes obtidos pela rotina Easyspin/Matlab®. Os espectros foram coletados com os mesmos parâmetros experimentais: frequência de 9,4 GHz; atenuação de 10 dB (10 mW); e amplitude de modulação a 0,1 mT. Nos três casos os espectros puderam ser decompostos em duas componentes, um tripleto devido ao ALTEMPOL isolado, cujas intensidades das linhas são desiguais (sinal A), e uma segunda linha larga sem interações resolvidas (sinal B).

(a)



(b)



(c)

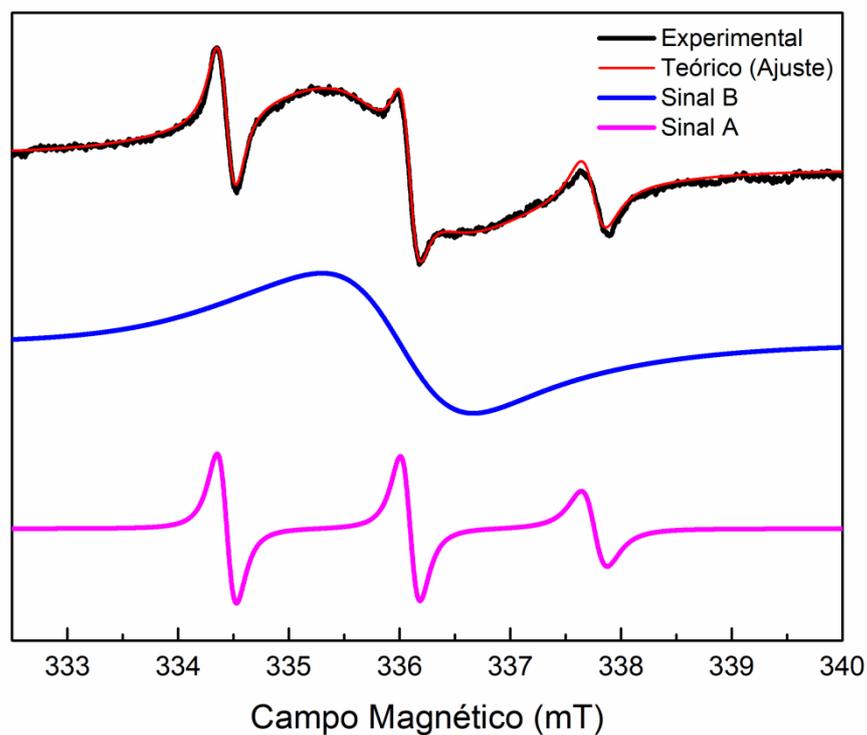


Figura 6.2: Espectro de EPR das amostras SR01 (a), SR02 (b) e SR03 (c), após quatro lavagens, resuspensos em uma solução de CTAB em água deionizada (ver detalhes no texto).

O sinal A é referente ao espectro de radical nitróxido em solução, caracterizado pelo tripleto associado às transições de spin envolvendo interação hiperfina com um núcleo de ^{14}N ($I = 1$). Entretanto, como esperado, este espectro difere do obtido para o radical livre ALTEMPOL em solução (p.ex. no sobrenadante da Figura 6.1), pois apresenta uma diminuição da intensidade e o alargamento da transição de alto campo (linha mais à direita). Esta primeira contribuição (sinal A) é típica de um radical nitróxido (o ALTEMPOL) com um tempo de correlação alto (regime lento). Os parâmetros de ajuste do Hamiltoniano de spin para esta linha são mostrados na tabela 6.1, juntamente com os parâmetros obtidos para o ALTEMPOL livre (espectros da Figura 6.1, sem lavagem), medido nas mesmas condições.

Tabela 6.1: Parâmetros de EPR do marcador de spin ALTEMPOL (*Sinal A*) ligado à superfície das amostras de nanobastões (SR01, SR02 e SR03) em suspensão em água deionizada comparados com os dos espectros do ALTEMPOL livre (*Livre*) no sobrenadante da solução aquosa de CTAB a 1 mmol/l (espectros da Figura 6.1, sem lavagem), obtidos via a rotina do Easyspin/Matlab®.

	SR01		SR02		SR03	
	Sinal A	Livre	Sinal A	Livre	Sinal A	Livre
g_{xx}	2,0090	2,0086	2,0093	2,0089	2,0094	2,0090
g_{yy}	2,0059	2,0061	2,0058	2,0058	2,0058	2,0057
g_{zz}	2,0020	2,0022	2,0019	2,0022	2,0019	2,0022
A_{xx} (mT)	0,68	0,69	0,64	0,68	0,64	0,67
A_{yy} (mT)	0,78	0,77	0,75	0,79	0,77	0,77
A_{zz} (mT)	3,62	3,64	3,63	3,63	3,58	3,67
$\tau_c (\times 10^{-10}\text{s})$	1,31	0,36	2,08	0,25	3,30	0,27
RMSD	248,17	199,72	204,18	162,47	216,42	106,76

O espectro referente à segunda contribuição (sinal B nas figuras 6.2 (a)-(c)) é semelhante aos das soluções de TEMPOL em altas concentrações (ver capítulo 5). Ele é característico de spins eletrônicos de moléculas de radicais diferentes, interagindo via interação de troca. Lembrando, que a contribuição da

interação dipolo-dipolo é desprezível para radicais em solução de baixa viscosidade que não estejam no regime rígido [130]. Estes sinais também foram ajustados e os parâmetros do ajuste são apresentados na tabela 6.2.

Tabela 6.2: Parâmetros de EPR do marcador de spin ALTEMPOL (linha B) ligados à superfície das amostras de nanobastões (SR01, SR02 e SR03) em suspensão.

	SR01	SR02	SR03
	Sinal B	Sinal B	Sinal B
g_{xx}	2,0086	2,0091	2,0086
g_{yy}	2,0059	2,0059	2,0059
g_{zz}	2,0024	2,0020	2,0020
A_{xx} (mT)	0,64	0,66	0,66
A_{yy} (mT)	0,77	0,78	0,78
A_{zz} (mT)	3,58	3,65	3,65
$\tau_c (\times 10^{-10} \text{s})$	19,89	17,62	18,71
J_0 (mT)	1,68	2,28	1,88
RMSD	248,17	204,18	216,42

Além de apresentar a interação de troca, representada pelo parâmetro J_0 , e responsável pelo alargamento das linhas de EPR, os tempos de correlação para difusão rotacional dos sinais B também aumentaram, em média uma ordem de grandeza, comparados aos dos sinais A. Esse resultado é esperado, caso venha este sinal a ser causado por moléculas de ALTEMPOL muito próximas umas das outras. Desta forma haverá além da restrição da dinâmica rotacional devido à ligação do marcador ALTEMPOL ao substrato, uma segunda restrição da dinâmica rotacional devido ao alinhamento das moléculas causado pela interação de troca.

Por fim, ao ajustar simultaneamente os espectros A e B, outro parâmetro foi incluído nos ajustes. Este parâmetro é o peso relativo de cada contribuição A e B ao espectro total e está relacionado às intensidades absolutas dos dois sinais. Uma vez que as intensidades absolutas são proporcionais às quantidades absolutas de cada espécie paramagnética, ao se calcular a concentração absoluta total de A+B, a quantidade absoluta dos dois tipos de radical ALTEMPOL (A e B) presentes nas

amostras pode ser obtida. O processo de calibração prévia da intensidade por área é feito a partir de uma solução aquosa de TEMPOL, em diferentes concentrações (para 50 μL) [86]. Estes resultados estão consolidados na tabela 6.3.

Tabela 6.3: Razão de intensidades dos sinais A e B (Peso)⁴⁷ para as três amostras SR01, SR02 e SR03. Concentração total das espécies paramagnéticas A + B na amostra⁴⁸, derivada da integração dupla do espectro de EPR total, e quantidade absolutas de cada espécie nas amostras (considerando um volume de $50 \pm 10 \mu\text{L}$ de solução)⁴⁹.

Amostra	SR01	SR02	SR03
Peso (i_B/i_A)	21 ± 6	30 ± 8	14 ± 4
Concentração Total de A+B ($\mu\text{mol/L}$)	31 ± 6	$3,1 \pm 0,6$	5 ± 1
Quantidade Absoluta da espécie B na amostra (10^{14} moléculas)	9 ± 2	$0,9 \pm 0,3$	$1,4 \pm 0,4$
Quantidade Absoluta da espécie A na amostra (10^{13} moléculas)	4 ± 2	$0,3 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,3$

A partir dos valores da tabela acima, o número médio de ALTEMPOL das duas espécies, por bastão, considerando a quantidade de bastões por amostra (Capítulo 4), pode ser estimado. Este número para ALTEMPOL B é de: 500 [B]/AuNR (SR01), 360 [B]/AuNR (SR02) e 520 [B]/AuNR (SR03). Para o ALTEMPOL A os valores são, pelo menos, uma ordem de grandeza menor, isto é, 22 [A]/AuNR (SR01), 12 [A]/AuNR (SR02) e 33 [A]/AuNR (SR03). Em outras palavras, o número médio de ALTEMPOL B por nanobastão de ouro é de aproximadamente 20 vezes maior do que o de ALTEMPOL A.

⁴⁷ A incerteza estimada para o peso foi obtido pela propagação da incerteza segundo a equação: $\Delta\text{Peso} = \sqrt{(1/i_A)^2(\Delta i_B)^2 + (-i_B/i_A^2)^2(\Delta i_A)^2}$. Sendo i_A a intensidade do sinal de EPR respectivo ao tripleto, e i_B respectivo à contribuição da linha larga.

⁴⁸ A incerteza estimada para a concentração absoluta foi de 20% de acordo com a referência [87].

⁴⁹ As incertezas estimadas para as quantidades da espécie A e B na amostra foram obtidas segundo a equação: $Q = \sqrt{V^2\{[P/(1+P)]^2(\Delta C_T)^2 + (C_T/(1+P)^2)^2(\Delta P)^2\}}$. Sendo V o volume do capilar, P o peso e C_T a concentração absoluta total.

6.3 – O sinal A – O ALTEMPOL ligado ao CTAB livre

Os parâmetros obtidos nos ajustes da seção anterior, para o Sinal A e para o ALTEMPOL livre (Tabela 6.1), são essencialmente idênticos, com exceção do tempo de correlação para difusão rotacional que, por ser de 4 a 10 vezes maior no primeiro caso, indica que o marcador certamente aderiu a uma molécula de maior extensão aumentando assim a sua inércia rotacional. Também sua concentração é cerca de uma ordem de grandeza menor do que o ALTEMPOL B.

Com o objetivo de se identificar a origem do sinal do ALTEMPOL A, foi executado um experimento que envolveu a preparação de uma amostra de ALTEMPOL em solução aquosa, sem AuNRs, mas com o CTAB à 1 mmol/L de concentração similar à do ALTEMPOL A nas três amostras SR01, SR02 e SR03. O espectro de EPR desta solução, juntamente com seu melhor ajuste a partir dos parâmetros do Hamiltoniano de spin derivados dos ajustes das formas de linha do sinal A, para as amostras SR01, SR02 e SR03 (Figura 6.2 e Tabela 6.1), é mostrado na figura 6.3:

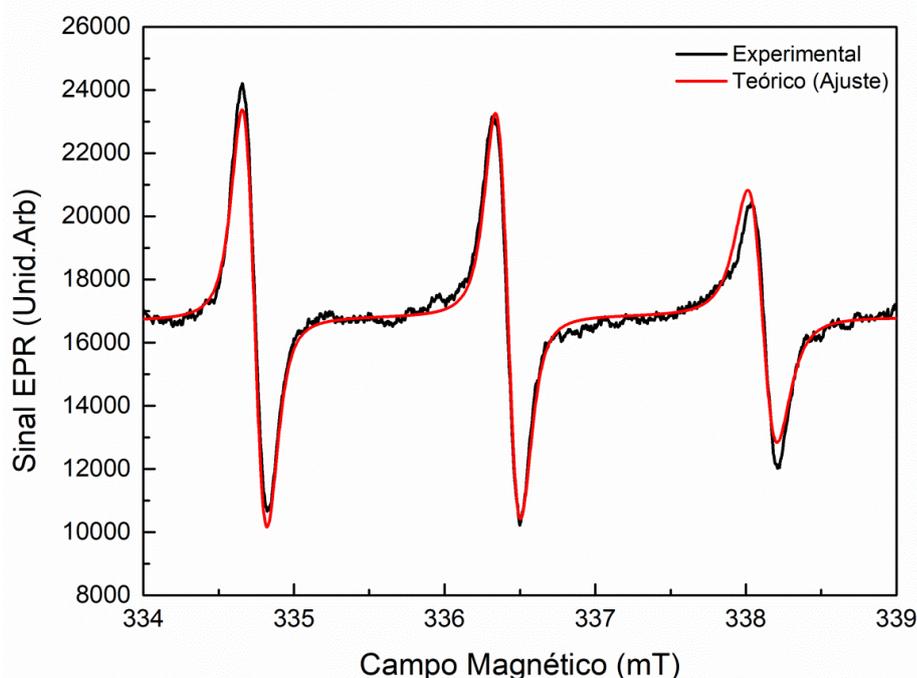


Figura 6.3: Espectro EPR ALTEMPOL livre em solução aquosa com CTAB a 1 mmol/L, juntamente com o espectro teórico calculado pelo EasySpin/Matlab® usando valores médios dos parâmetros do Hamiltoniano de spin do ALTEMPOL A (Tabela 6.1). Os parâmetros experimentais foram: frequência de micro-ondas de 9,4 GHz (Banda X), atenuação de 10 dB (10 mW), amplitude de modulação de 0,1 mT e $T \sim 300$ K.

Ao analisar o espectro da solução de ALTEMPOL em solução em água deionizada com CTAB à 1 mmol/L é notória a similaridade deste com o sinal A encontrado nas amostras SR01, SR02 e SR03. A dinâmica rotacional molecular do ALTEMPOL para a solução em água deionizada com CTAB à 1 mmol/L e, para o sinal A encontrado nas amostras SR01, SR02 e SR03 também são comparáveis. Enquanto que o tempo de correlação médio obtido pelo ajuste da forma de linha do espectro do ALTEMPOL A para as três amostras (SR01, SR02, SR03) é de $(2,2 \pm 0,7) \times 10^{-10}$ s (Tabela 6.1), para o sinal do ALTEMPOL da Figura 6.3 o valor é $\sim 2,12 \times 10^{-10}$ s. Logo, um possível modelo que descreva a origem do sinal A presente nas amostras de AuNRs marcados (SR01, SR02 e SR03), não envolveria o ALTEMPOL ligado aos AuNR. Em outras palavras, o sinal A seria originado pelo ALTEMPOL disperso no solvente, mas não livre, e mais especificamente, acoplado, de alguma forma, a resíduos de surfactante CTAB no solvente. Uma vez que a concentração de CTAB usada nas amostras SR01, SR02 e SR03 é ligeiramente maior que a concentração micelar crítica (CMC = 0,96 mmol/L) [133], é possível que as moléculas de ALTEMPOL estejam intercaladas entre as moléculas de CTAB em micelas. Esta hipótese acarretaria também em uma restrição do movimento rotacional das moléculas de ALTEMPOL como verificado pelo aumento do tempo de correlação. No entanto bastaria um aumento do raio hidrodinâmico do radical pela ligação ALTEMPOL-CTAB para que o tempo de correlação aumentasse. Para confirmar este modelo, no entanto seriam necessários mais experimentos como, por exemplo, medidas de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) para se avaliar a formação de micelas de CTAB, bem como experimentos de EPR com temperatura variável, esquentando-se a solução, para se verificar a dinâmica de intercalação dos marcadores nas micelas.

6.4 – O sinal B – ALTEMPOL ligado aos AuNRs

Para o Sinal B, o movimento rotacional das moléculas do marcador de spin ALTEMPOL é ainda mais suprimido, uma vez que o tempo de correlação para difusão rotacional é de cerca de 9 vezes maior do que para o ALTEMPOL (sinal A) e de 60 vezes maior do que para o ALTEMPOL livre (Tabelas 6.1 e 6.2). Estes resultados são consistente com a marcação dos AuNRs, e mais ainda, com o

aparecimento de uma interação de troca entre os spins eletrônicos do ALTEMPOL ligado.

Com auxílio dos resultados da seção 5.2, em se que obteve a relação da frequência de interação de troca isotrópica J_0 com a distância média entre os radicais livres TEMPOL em solução etanólica, foi possível estimar a distância entre as moléculas do marcador de spin referentes ao sinal B para cada amostra (SR01, SR02 e SR03). Os resultados seguem na tabela 6.4.

Tabela 6.4: Distância média entre as moléculas dos marcadores ALTEMPOL B (r_{J_0}) estimada a partir da dependência do J_0 (constante de interação de troca) com a concentração de TEMPOL em solução etanólica, determinada no capítulo 5 (ver Figura 5.6).

SR01		SR02		SR03	
J_0 (mT)	r_{J_0} (nm)	J_0 (mT)	r_{J_0} (nm)	J_0 (mT)	r_{J_0} (nm)
1,68	~2,5	2,28	~2,2	1,88	~2,4

Num primeiro modelo que elucide a distribuição dos marcadores de spin que ligam covalentemente a superfície dos AuNRs considera-se a geometria dos AuNRods com curvaturas acentuadas nas pontas. Neste caso a reatividade associada à curvatura da superfície nas extremidades dos nanobastões levaria a uma concentração maior de marcadores nestas posições e, ao se aumentar esta concentração, a distância entre os marcadores diminuiria. Portanto, se ela chegasse a ~ 3 nm, uma interação de troca entre os marcadores apareceria. Neste caso, haveria uma distribuição seletiva dos marcadores de spin nas pontas dos AuNRs. Sendo assim, a densidade de ALTEMPOL interagindo nas pontas seria entre 15 e 30 vezes maior do que a densidade de ALTEMPOL no corpo dos AuNRs, condizente com o aparecimento da interação de troca.

Outro argumento favorável a esta hipótese da distribuição seletiva seria a possível não ligação dos radicais à superfície lateral do bastão por bloqueio estérico. Segundo Wang [120] as moléculas de CTAB se ligam somente às faces laterais dos bastões (corpo), o que bloquearia estes sítios para a ligação dos marcadores de spin, forçando-os às pontas. A interação entre as moléculas de CTAB e a superfície do ouro ocorre via a formação de um complexo do tipo AuCl_2^- -CTAB [134], sendo assim improvável a troca destas por moléculas de marcadores de spin durante a

exposição dos AuNRs aos ALTEMPOL. Neste caso é plausível considerar que as pontas dos bastões seriam regiões preferenciais para ligação dos marcadores de spin.

Um teste para este modelo é a análise semi-quantitativa da distância média entre os marcadores ligados aos AuNRs, estimada a partir de uma distribuição homogênea, mas restrita às pontas dos AuNRs. Neste caso, deve-se levar em conta também a área superficial média dos AuNRs, derivada dos parâmetros geométricos (Tabela 4.3). Podendo assim, comparar com os resultados estimados diretamente a partir do valor de j_0 da interação de troca (tabela 6.5). Estes resultados podem ser resumidos na tabela seguinte.

Tabela 6.6: Distância média entre as moléculas dos marcadores ALTEMPOL ligados à superfície dos AuNRods, considerando uma distribuição homogênea ($\langle r_{HOM} \rangle$). Esta estimativa levou em conta as quantidades absolutas das espécies A e B (Tabela 6.3), a concentração dos AuNRods (Tabela 4.2) e a área superficial média dos AuNRods calculada a partir dos parâmetros geométricos (Tabela 4.3).

SR01	SR02	SR03
$\langle r_{HOM} \rangle$ (nm)	$\langle r_{HOM} \rangle$ (nm)	$\langle r_{HOM} \rangle$ (nm)
$2,5 \pm 0,7^{50}$	$3,4 \pm 0,8$	$2,8 \pm 0,5$

Com base nos resultados expostos nas tabelas 6.5 e 6.6, fica claro que, para o sinal B, a distância intermolecular encontrada pela distribuição homogênea restrita nas pontas dos AuNRs é da mesma ordem de grandeza da distância estimada pela interação de troca. Em outras palavras, dentro das incertezas, $r_{j_0} \sim \langle r_{HOM} \rangle$ o que suporta o modelo proposto para o sinal B.

⁵⁰ O erro estimado para a distância intermolecular de ALTEMPOL por AuNR foi obtido pela propagação da incerteza. A equação que forneceu o erro estimado é dada por:

$$\Delta d = \sqrt{\left[\cos^{-1} \left(\frac{l}{2} \frac{A_4}{\pi l} \right) \right]^2 (\Delta l)^2 + \left(\frac{l}{2} \right)^2 \left[\left(-\frac{\frac{A_4}{\pi l}}{\frac{l^2}{4} \sqrt{1 - \frac{(\frac{l}{2} \frac{A_4}{\pi l})^2}{\frac{l^2}{4}}}} \right)^2 (\Delta l)^2 + \left(-\frac{1}{\frac{l}{2} \sqrt{1 - \frac{(\frac{l}{2} \frac{A_4}{\pi l})^2}{\frac{l^2}{4}}}} \right)^2 \left[\left(\frac{1}{\pi l} \right)^2 (\Delta A_4)^2 + \left(-\frac{A_4}{\pi l^2} \right)^2 (\Delta l)^2 \right]} \right]} . \text{ Sendo } l \text{ a largura}$$

média dos nanobastões e A_4 a área superficial por unidade de molécula de ALTEMPOL.

Em trabalhos encontrados na literatura, como o dos autores Agneta Caragheorghopol *et al.* em [9], se prevê que para distâncias intermoleculares dos marcadores de spin superiores a 1,6 nm a interação entre spins eletrônicos é desprezível. Entretanto, os resultados aqui apresentados para o TEMPOL em solução etanólica e, para os AuNRs demonstram que há manifestação da interação de troca a partir de distância intermoleculares de radicais inferiores a 6 nm.

Um outro modelo para se explicar o sinal B, seria a possibilidade de agregações/alinhamentos dos AuNRs marcados com ALTEMPOL quando em suspensão. Considerando essa correção, a contribuição do sinal B seria devido a uma superposição da interação entre os marcadores de spin de um mesmo bastão e de marcadores presentes em outros nanobastões. Sendo verdadeira essa hipótese, o número de espécies B para um mesmo bastão seria menor, levando assim uma interação de troca da ordem daquela obtida pelo espectro de EPR. Em outras palavras isso levaria, num tratamento semi-quantitativo, a $r_{J_0} \cong \langle r_{HOM} \rangle$, e não apenas $r_{J_0} \sim \langle r_{HOM} \rangle$.

Apesar de não haver indícios de agregação/alinhamentos no espectro de absorção óptica das três amostras, esta possibilidade também é plausível, já que, a diminuição do volume da amostra para 50 μ L (volume do capilar) levaria a uma densidade muito alta dos nanobastões, podendo assim ocorrer agregações/alinhamentos mesmo utilizando uma concentração de 1 mmol/L de CTAB. Um experimento, que novamente poderia ajudar neste estudo e aqui, mais especificamente confirmar a hipótese da agregação/alinhamento é o Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS).

Logo, pode-se concluir, neste modelo, que o ALTEMPOL se comporta de duas maneiras distintas na suspensão coloidal: na primeira, respectivo à contribuição do tripleto (sinal A), o ALTEMPOL residual interage com moléculas livres de CTAB presente na solução; e no segundo caso, as moléculas do marcador de spin ALTEMPOL se ligam a uma distância média entre eles tal que a interação de troca seja relevante entre dois marcadores vizinhos, restringindo assim ainda mais o movimento rotacional da molécula. Para melhor visualização e entendimento deste modelo segue a figura 6.4 que ilustra a distribuição dos marcadores de spin no sistema ressaltando a origem dos sinais A e B no espectro de EPR.

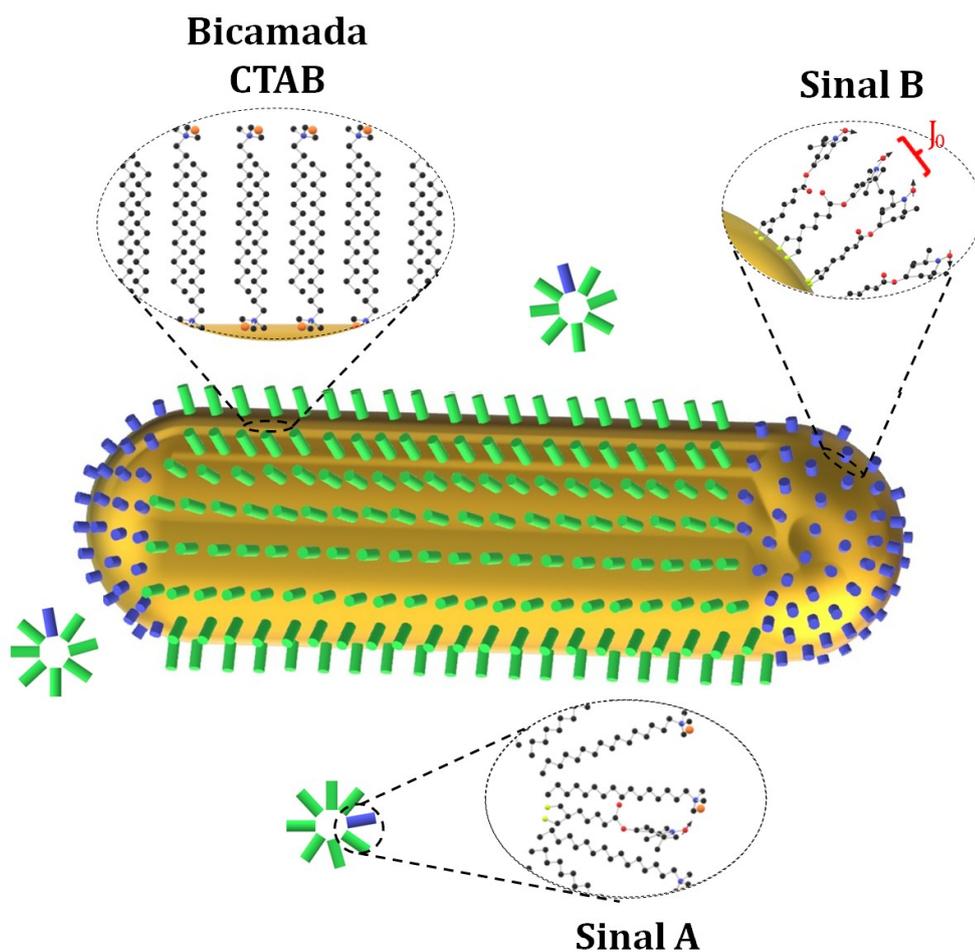


Figura 6.4: Representação do modelo de distribuição dos marcadores de spin com base nos sinais encontrados nos espectros de EPR para as amostras SR01, SR02 e SR03. Destaca-se a recobertura da bicamada de moléculas de CTAB nas faces dos AuNRs; a ligação dos marcadores de spin nas pontas dos AuNRs que são origem ao sinal B do espectro de EPR dado pela interação entre os spin eletrônicos (interação de troca); a formação de micelas de moléculas de CTAB e o alinhamento de moléculas de ALTEMPOL que são origem ao sinal A do espectro de EPR.

6.5 – Marcação de spin em AuNR versus AuNP

Nesta seção são comparados os resultados da marcação de spin nos AuNRs, obtidos neste trabalho, com aqueles apresentados na literatura para as AuNPs [8-10]. Inicialmente são comparados os espectros de EPR obtidos por Agneta Caragheorgheopol *et al.* para as AuNPs funcionalizadas com marcadores de spin da classe dos nitróxidos, denominado pelo autores de N4 (radical dado pelo acoplamento de TEMPAMINA com o ácido ditiodipropiônico) [8]. O uso da trifetilfosfina (PPh_3) pelos autores possibilitou uma maior recobertura de marcadores de spins (>10) por AuNP. Na figura 6.5 são apresentados os espectros adquiridos por Caragheorgheopol *et al.* em [8].

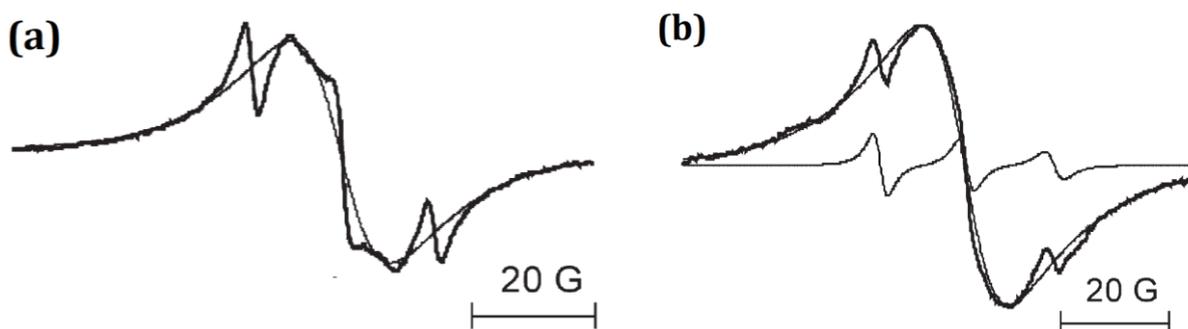


Figura 6.5: Espectros de EPR das AuNPs recobertos com PPh_3 funcionalizadas com marcadores de spin extraídos de [8]. A linha mais escura dada pelo espectro experimental e as linhas claras dadas pelas contribuições do tripleto e da linha larga. O espectro (a) corresponde a recobertura média de 30 marcadores de spin por AuNP e (b) recobertura média de 60 marcadores de spin por AuNP.

As formas de linha dos espectros de EPR encontrados pelos autores são muito similares às apresentadas aqui para os AuNRs marcados com ALTEMPOL. Entretanto, nota-se que o número de marcadores de spin do sinal B por nanoestrutura (tabela 6.3), para a amostra SR03⁵¹, é cerca de uma ordem de grandeza superior (~ 520 de marcadores por AuNR) do que a previsão apresentada por Agneta Caragheorgheopol *et al.* em [8]. Essa discrepância entre os valores encontrados aqui com os apresentados pelos autores em [8] se deve às dimensões das nanoestruturas utilizadas. Sendo o diâmetro das AuNPs utilizadas pelos autores

⁵¹ SR03 possui a morfologia próxima das AuNPs ($L/\varnothing \sim 1,3\text{nm}$).

de aproximadamente 5 nm, quando comparada com a amostra SR03⁵², nota-se que a área superficial destas é aproximadamente 36 vezes menor que as da amostra SR03. Portanto, ao se calcular a densidade superficial de marcadores de spin para a amostra SR03 e para as amostras de Agneta Caragheorgheopol *et al.* em [8], obtém-se um valor cerca de 3 vezes maior para as amostras dos autores. Essa diferença entre os resultados para a densidade superficial de marcadores de spin é justificada pela curvatura mais acentuada das AuNPs sintetizadas por Caragheorgheopol *et al.* Sendo assim, apesar da maior proximidade dos marcadores de spin na superfície das AuNPs, quando comparados aos dos AuNRs da amostra SR03, a distância entre os spins desemparelhados é compensada pela curvatura. Por outro lado, uma vez que a distribuição de agentes de recobertura em nanopartículas esféricas é mais homogênea do que em AuNR, a substituição destes por marcadores de spin pode ser prejudicada. Em outras palavras, em AuNRs as pontas não contêm agentes de recobertura e a ligação dos marcadores nestes sítios não envolve competição entre estas duas moléculas, justificando uma maior densidade de marcadores por partícula.

Agneta Caragheorgheopol *et al.* em [8] também obtiveram resultados para AuNPs marcados com apenas um marcador de spin da classe dos nitróxidos por partícula. Nesse trabalho os autores estudaram a dinâmica rotacional das amostras de AuNPs (~ 5 nm) marcadas com radicais nitróxidos e aferiram tempos de correlação, variando de $\tau_C = 1,3 \times 10^{-10}$ s até $\tau_C = 14,5 \times 10^{-10}$ s. Esta grande variabilidade nos valores de τ_C se deve aos diversos tipos marcadores de spin e os vários agentes de recobertura utilizados. Agneta Caragheorgheopol *et al.* concluíram que marcadores com cadeia curtas, apresentam uma maior restrição rotacional. Já para o agente de recobertura os autores concluíram que quanto maior a cadeia desse ligante mais restrita seria a dinâmica do marcador de spin.

Dentre os marcadores de spin utilizados por Agneta Caragheorgheopol *et al.* [8] destaca-se o radical denominado pelos autores de N7⁵³, de comprimento e massa molar similar ao ALTEMPOL. Nota-se que as AuNPs recobertas com octanotiol marcadas com o N7 apresentaram um tempo de correlação

⁵² SR03 possui a morfologia próxima das AuNPs ($L/\varnothing \sim 1,3$ nm).

⁵³ Radical nitróxido sintetizado pela reação de acoplamento entre o radical livre TEMPAMINA com o ácido lipóico.

($\tau_C = 3,3 \times 10^{-10}$ s) próximo ao do Sinal A ($\tau_C = 3,30 \times 10^{-10}$ s), para a amostra SR03 (mais próxima às AuNP na geometria). A semelhança entre os tempos de correlação indicam que a restrição de movimento de uma molécula de ALTEMPOL intercalada entre as moléculas de CTAB em micelas (modelo proposto para o Sinal A) é da mesma ordem da redução da mobilidade quando os marcadores N7 estão ligados à superfície de AuNPs (~ 5 nm), recobertas com moléculas de octanotiol [8]. Um indício a favor desta hipótese é de que as micelas formadas pelas moléculas de CTAB possuem um raio ≤ 5 nm. Em trabalhos futuros espera-se aferir de forma quantitativa as propriedades das micelas formadas pelas moléculas de CTAB via marcadores de spin.

Como discutido no capítulo 2 os autores Agneta Caragheorgheopol *et al.* em [9] estimaram a distância média os marcadores de spin da classe dos nitroxidos adsorvidos nas AuNPs recobertas com PPh₃. Os autores também partiram da interação entre spins para a quantificação da distância média entre os marcadores de spin. Entretanto, Agneta Caragheorgheopol *et al.* partiram da interação Dipolo-Dipolo, ao invés da interação de troca, das amostras congeladas das AuNPs [9]. Apesar dos autores justificarem os seus resultados considerando a inexistência da interação de troca para distância entre marcadores de spin menores que 1,6 nm, os resultados aqui apresentados demonstram o aparecimento dessa interação já para distâncias próximas de 6 nm. Dada a impossibilidade da linha larga do espectro dos AuNRs (SR01, SR02 e SR03) conterem contribuição da interação dipolo-dipolo. Outra linha que se espera explorar no futuro, assim como os autores realizaram para a interação Dipolo-Dipolo [9], será a realização de um modelo matemático que preveja a interação de troca. Este modelo deve considerar uma distribuição de tamanho dos AuNRs e uma distribuição aleatória dos marcadores de spin nas superfície do ouro.

Por fim, foram comparados os parâmetros do Hamiltoniano (\vec{g} e \vec{A}) encontrados para as amostras dos AuNRs marcados com moléculas do ALTEMPOL e os encontrados por Agneta Caragheorgheopol *et al.* em [10] para as AuNPs marcadas com os radicais nitroxidos N7. Estes resultados estão sintetizados na tabela 6.7:

Tabela 6.7: Comparação dos parâmetros do Hamiltoniano (\vec{g} e \vec{A}) encontrados por Agneta Caragheorgheopol *et al.* em [10] para as AuNPs marcadas com radicais nitróxidos e o adquirido para a amostra SR03.

	N7- AuNP	ALTEMPOL-AuNR
	A. Caragheorgheopol [10]	Sinal B (SR03)
g_{xx}	2,0097	2,0086
g_{yy}	2,0061	2,0059
g_{zz}	2,0020	2,0020
A_{xx} (mT)	0,68	0,66
A_{yy} (mT)	0,67	0,78
A_{zz} (mT)	3,34	3,65

Como pode ser visto acima, apesar das diferenças nos marcadores, agentes de recobertura e geometria das nanoestruturas, os valores para a maioria dos parâmetros são muito próximos. A comparação entre os resultados é válida mesmo que os marcadores de spin utilizados pelos autores foram outros radicais nitróxidos, pois esses radicais possuem a mesma composição do anel piperidina que o ALTEMPOL. Os autores sintetizaram radicais nitróxidos a partir de reações de acoplamento do radical TEMPAMINA, que se diferencia do radical TEMPOL por apenas um átomo. Voltando aos resultados expostos na tabela 6.7, nota-se pequenas divergências como, por exemplo, a componente z do tensor hiperfino, que são justificadas pelo uso de solventes diferentes. Como previsto pelos resultados expostos na seção 5.3, os valores da componente z do tensor hiperfino das amostras SR01, SR02 e SR03 são maiores que os encontrados por Caragheorgheopol *et al.* em [10], pois o solvente utilizado pelos autores é menos polar (diclorometano/tolueno) que o utilizado na suspensão das amostras (SR01, SR02 e SR03).

7 – CONCLUSÕES

O estudo da dinâmica para marcadores de spin (ALTEMPOL) e radicais livres (TEMPOL E ALTEMPOL) pode ser uma importante ferramenta para caracterização de sistemas onde há restrição de movimento devido à ligação química de radicais à nanoestruturas em geral, e em particular, nanoestruturas de ouro.

Neste trabalho foram apresentados os resultados referentes à dinâmica dos radicais livres TEMPOL e ALTEMPOL em solução e, em seguida, para os nanobastões de ouro funcionalizados com marcadores de spin. Por meio de uma reação de esterificação foi possível modificar a estrutura do TEMPOL, ligando-o à molécula do ácido lipóico. Desta forma, a ligação entre o radical e os nanobastões de ouro foi possível.

Além disso, um estudo detalhado sobre a dependência da intensidade do sinal de EPR com a variação da potência de micro-ondas, bem como a concentração dos radicais utilizados, forneceu resultados em concordância com os obtidos por outros autores [84, 85], para o radical TEMPOL. Entretanto, para o radical ALTEMPOL não foram encontrados trabalhos anteriores que descrevessem seus espectros de EPR uma vez que ele é um marcador de spin nunca antes estudado. Portanto, estes resultados foram comparados com aqueles encontrados para o TEMPOL. Como esperado, a variação da intensidade do sinal de EPR do radical ALTEMPOL é dependente linearmente com a quantidade de espécies paramagnéticas, bem como com a raiz da potência de micro-ondas inserida na cavidade. A diferença na inclinação da curva de saturação demonstra a importância do tempo de relaxação ao sistema de spin e, a peculiaridade de cada radical. O marcador de spin ALTEMPOL também possui a estrutura tetrametilpiperidina comum ao radical TEMPOL, entretanto, dispõe de diferenças intrínsecas para a absorção de energia eletromagnética na transição dos estados de spin.

A variação da forma de linha do radical TEMPOL com o aumento da concentração radicalar encontrada está de acordo com o apresentado por Likhtenshtein em [13] para o radical DBTNO, unificando assim essa correlação para os radicais nitróxidos em geral. A partir do ajuste dos espectros de EPR, foi estimada a distância média entre as moléculas do radical em função da frequência

de interação de troca. Este resultado pode vir a servir para trabalhos posteriores como estimativa para calibração da distância entre os radicais via interação de troca.

A influência do solvente nas transições de estado e na dinâmica rotacional molecular foi aferida para o radical TEMPOL. A variação das componentes principais dos tensores \vec{g} e \vec{A} , para vários solventes, segue a mesma tendência encontrada para os resultados relatados por Lebedev [88] e com toda a teoria acerca da solvatação das moléculas do radical. Também foi notório o impedimento da dinâmica rotacional molecular causada pela viscosidade do solvente.

O estudo da influência da temperatura na dinâmica molecular propiciou a obtenção da energia de ativação rotacional da molécula de TEMPOL. Este resultado representa uma propriedade primária da dinâmica rotacional do TEMPOL em solução etanólica, sendo coerente com o encontrado por Agneta Caragheorghopol *et al.* [10] para nanopartículas funcionalizadas com marcadores de spin. A partir dos espectros de EPR, percebe-se a mudança de regime dinâmico das moléculas do radical TEMPOL com a diminuição da temperatura do sistema. Em temperaturas abaixo de 140 K, $\tau_C \sim 6 \times 10^{-9}$ s e nota-se claramente a chegada ao regime lento descrito pelas equações estocásticas de Liouville [14], e para temperatura inferiores a 130 K o sistema se encontra no regime rígido com $\tau_C > 1 \times 10^{-6}$ s (congelamento do solvente). A partir da variação da contribuição Lorentziana a largura de linha com a temperatura ficou clara a dependência do tempo de relaxação spin-spin com a temperatura. Entretanto, a variação da contribuição Gaussiana requer mais estudos no alargamento não homogêneo e sua dependência com a temperatura.

O estudo da influência do solvente e da temperatura para o radical ALTEMPOL não foi realizado, devido à baixa quantidade obtida na síntese deste material. Em estudos futuros espera-se confirmar a sua similaridade com os resultados encontrados para o radical TEMPOL. Um resultado esperado será a energia de ativação rotacional para o ALTEMPOL, com o intuito de confirmar a dependência desta com a extensão da molécula do radical.

Por fim, os resultados da marcação de spin em AuNRs podem ser resumidos como exposto a seguir. Os espectros de EPR encontrados para as amostras de nanobastões de ouro (SR01, SR02 e SR03) marcados com ALTEMPOL são formados por duas contribuições distintas. A contribuição associada ao tripleto

(sinal A) é, provavelmente, devido à interação de moléculas residuais do radical ALTEMPOL com as moléculas de CTAB que formam micelas na suspensão coloidal. Essa hipótese baseia-se na similaridade do Sinal A com espectros de ALTEMPOL em solução aquosa com CTAB à 1 mmol/L.

A presença de uma linha larga (sinal B) nos espectros das três amostras (SR01, SR02 e SR03) é característica da interação entre spins (interação de troca) a uma distância muito curta (1 - 6 nm), só possível quando estes marcadores de spin estiverem ligados à superfície dos AuNRs. Essa linha larga (sinal B) é associada ao acúmulo de marcadores de spin a uma região restrita, pois, a quantidade de moléculas de radicais (3 - 30 μ mmol/L), é muito abaixo da necessária para o aparecimento de uma interação de troca da magnitude encontrada nas amostras (entre 100 e 200 mmol/L). O cálculo realizado a partir da análise semi-quantitativa da distância média entre os marcadores ligados aos AuNRs, estimada a partir de uma distribuição homogênea nas pontas dos AuNRs, teve equivalência quando comparada ao extraído pelo espectro de EPR para todas amostras (SR01, SR02 e SR03). Sendo assim, o modelo elaborado tem consistência com os resultados apresentados.

Outro modelo que explicaria a origem do sinal da linha larga (sinal B) se baseia na interação entre spins de marcadores ligados a bastões distintos, devido a agregações de AuNRs em suspensão. Essa hipótese se fundamenta na possível origem de agregações dos nanobastões devido à diminuição do volume da amostra para a realização dos espectros de EPR. Para eliminação desta hipótese, serão realizadas, posteriormente, medidas de DLS (Espalhamento Dinâmico de Luz) para as amostras SR01, SR02 e SR03.

Estudos futuros também devem ser realizados para confirmação das possíveis regiões de ligação dos marcadores de spin ao nanobastão, e ainda, estimar os sítios preferenciais de ligação dos marcadores de spin. Outra possibilidade de estudo envolve a variação da morfologia das nanoestruturas de ouro e a sua influência na quantidade e localidade dos marcadores de spin que recobrirão as superfícies. Dentre as diversas aplicações possíveis para o sistema estudado, ressalta-se a funcionalização dos nanobastões marcados como sondas.

Dentre as diversas aplicações biológicas possíveis para nanobastões de ouro funcionalizados com marcadores de spin, em trabalhos futuros espera-se explorar a funcionalização dos nanobastões como sondas. Este sistema composto

por radical e nanobastão de ouro pode ser utilizado como dosímetro de radiações para estimar o aumento da dose local na região próxima à superfície dos nanobastões, quando os mesmos são aplicados em terapias medicinais como a radioterapia [135].

REFERÊNCIA

- [1] D.A. Giljohann, D.S. Seferos, W.L. Daniel, M.D. Massich, P.C. Patel, C.A. Mirkin, Gold nanoparticles for biology and medicine, *Angewandte Chemie International Edition*, 49 (2010) 3280-3294.
- [2] J. Kim, Y. Piao, T. Hyeon, Multifunctional nanostructured materials for multimodal imaging, and simultaneous imaging and therapy, *Chemical Society Reviews*, 38 (2009) 372-390.
- [3] G.A. Hughes, Nanostructure-mediated drug delivery, *Disease-a-Month*, 51 (2005) 342-361.
- [4] M. Goldberg, R. Langer, X. Jia, Nanostructured materials for applications in drug delivery and tissue engineering, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 18 (2007) 241-268.
- [5] D.A. Giljohann, D.S. Seferos, P.C. Patel, J.E. Millstone, N.L. Rosi, C.A. Mirkin, Oligonucleotide loading determines cellular uptake of DNA-modified gold nanoparticles, *Nano Letters*, 7 (2007) 3818-3821.
- [6] X. Kang, X. Guo, X. Niu, W. An, S. Li, Z. Liu, Y. Yang, N. Wang, Q. Jiang, C. Yan, Photothermal therapeutic application of gold nanorods-porphyrin-trastuzumab complexes in HER2-positive breast cancer, *Scientific Reports*, 7 (2017) 42069.
- [7] T. Reuveni, M. Motiei, Z. Romman, A. Popovtzer, R. Popovtzer, Targeted gold nanoparticles enable molecular CT imaging of cancer: an in vivo study, *International Journal of Nanomedicine*, 6 (2011) 2859.
- [8] V. Chechik, H.J. Wellsted, A. Korte, B.C. Gilbert, H. Caldararu, P. Ionita, A. Caragheorgheopol, Spin-labelled Au nanoparticles, *Faraday Discussions*, 125 (2004) 279-291.
- [9] P. Ionita, A. Caragheorgheopol, B.C. Gilbert, V. Chechik, Dipole- Dipole Interactions in Spin-Labeled Au Nanoparticles as a Measure of Interspin Distances, *The Journal of Physical Chemistry B*, 109 (2005) 3734-3742.
- [10] P. Ionita, J. Wolowska, V. Chechik, A. Caragheorgheopol, Ligand dynamics in spin-labeled au nanoparticles, *Journal of Physical Chemistry C*, 111 (2007) 16717-16723.
- [11] M. Zachary, V. Chechik, Hopping of thiolate ligands between Au nanoparticles revealed by EPR spectroscopy, *Angewandte Chemie International Edition*, 46 (2007) 3304-3307.
- [12] G.I. Likhtenshtein, *BIOPHYSICAL LABELING METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY*, 1 ed., Cambridge University Press, New York, 1993.
- [13] G.I. Likhtenshtein, J. Yamauchi, S.i. Nakatsuji, A.I. Smirnov, R.X. Tamura, *Nitroxides: applications in chemistry, biomedicine, and materials science*, John Wiley & Sons 2008.
- [14] L.J. Berliner, *Spin Labeling Theory and Applications*, Academic Press, New York, 1976.
- [15] J.L. Berliner, H. Fujii, Magnetic resonance imaging of biological specimens by electron paramagnetic resonance of nitroxide spin labels, *Science*, 227 (1985) 517-519.
- [16] L.J. Berliner, *Spin labeling: the next millennium*, Springer Science & Business Media 2006.
- [17] L.J. Berliner, J. Reuben, *Spin labeling: theory and applications*, Springer Science & Business Media 2012.

- [18] L.J. Berliner, *Biological magnetic resonance*, Springer Science & Business Media 2012.
- [19] M. Brust, M. Walker, D. Bethell, D.J. Schiffrin, R. Whyman, Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase liquid–liquid system, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, (1994) 801-802.
- [20] E.C. Dreaden, A.M. Alkilany, X. Huang, C.J. Murphy, M.A. El-Sayed, The golden age: gold nanoparticles for biomedicine, *Chemical Society Reviews*, 41 (2012) 2740-2779.
- [21] X. Huang, S. Neretina, M.A. El-Sayed, Gold nanorods: from synthesis and properties to biological and biomedical applications, *Advanced Materials*, 21 (2009) 4880-4910.
- [22] A.M. Alkilany, L.B. Thompson, S.P. Boulos, P.N. Sisco, C.J. Murphy, Gold nanorods: their potential for photothermal therapeutics and drug delivery, tempered by the complexity of their biological interactions, *Advanced drug delivery reviews*, 64 (2012) 190-199.
- [23] J. Wang, G. Zhu, M. You, E. Song, M.I. Shukoor, K. Zhang, M.B. Altman, Y. Chen, Z. Zhu, C.Z. Huang, Assembly of aptamer switch probes and photosensitizer on gold nanorods for targeted photothermal and photodynamic cancer therapy, *ACS Nano*, 6 (2012) 5070-5077.
- [24] M. Faraday, X. The Bakerian Lecture.—Experimental relations of gold (and other metals) to light, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 147 (1857) 145-181.
- [25] J. Turkevich, P.C. Stevenson, J. Hillier, A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold, *Discussions of the Faraday Society*, 11 (1951) 55-75.
- [26] X. Mao, Z.P. Li, Z.Y. Tang, One pot synthesis of monodispersed L-glutathione stabilized gold nanoparticles for the detection of Pb²⁺ ions, *Frontiers of Materials Science*, 5 (2011) 322-328.
- [27] C.M. Copley, J. Chen, E.C. Cho, L.V. Wang, Y. Xia, Gold nanostructures: a class of multifunctional materials for biomedical applications, *Chemical Society Reviews*, 40 (2011) 44-56.
- [28] W. Cai, T. Gao, H. Hong, J. Sun, Applications of gold nanoparticles in cancer nanotechnology, *Nanotechnology, Science and Applications*, 1 (2008) 17.
- [29] G. Frens, Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions, *Nature Physical Science*, 241 (1973) 20.
- [30] R. Fenger, E. Fertitta, H. Kirmse, A.F. Thünemann, K. Rademann, Size dependent catalysis with CTAB-stabilized gold nanoparticles, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 14 (2012) 9343-9349.
- [31] J.-H. Wang, B. Wang, Q. Liu, Q. Li, H. Huang, L. Song, T.-Y. Sun, H. Wang, X.-F. Yu, C. Li, Bimodal optical diagnostics of oral cancer based on Rose Bengal conjugated gold nanorod platform, *Biomaterials*, 34 (2013) 4274-4283.
- [32] M.K. Khaing Oo, X. Yang, H. Du, H. Wang, 5-aminolevulinic acid-conjugated gold nanoparticles for photodynamic therapy of cancer, (2008).
- [33] T. Zhao, X. Shen, L. Li, Z. Guan, N. Gao, P. Yuan, S.Q. Yao, Q.-H. Xu, G.Q. Xu, Gold nanorods as dual photo-sensitizing and imaging agents for two-photon photodynamic therapy, *Nanoscale*, 4 (2012) 7712-7719.
- [34] R.A. Sperling, P.R. Gil, F. Zhang, M. Zanella, W.J. Parak, Biological applications of gold nanoparticles, *Chemical Society Reviews*, 37 (2008) 1896-1908.

- [35] B. Jang, J.-Y. Park, C.-H. Tung, I.-H. Kim, Y. Choi, Gold nanorod-photosensitizer complex for near-infrared fluorescence imaging and photodynamic/photothermal therapy in vivo, *ACS Nano*, 5 (2011) 1086-1094.
- [36] A.M. Gabudean, M. Focsan, S. Astilean, Gold nanorods performing as dual-modal nanoprobe via metal-enhanced fluorescence (MEF) and surface-enhanced Raman scattering (SERS), *The Journal of Physical Chemistry C*, 116 (2012) 12240-12249.
- [37] M. Eghtedari, A.V. Liopo, J.A. Copland, A.A. Oraevsky, M. Motamedi, Engineering of hetero-functional gold nanorods for the in vivo molecular targeting of breast cancer cells, *Nano Letters*, 9 (2008) 287-291.
- [38] J. Wang, G. Zhu, M. You, E. Song, M.I. Shukoor, K. Zhang, M.B. Altman, Y. Chen, Z. Zhu, C.Z. Huang, Assembly of aptamer switch probes and photosensitizer on gold nanorods for targeted photothermal and photodynamic cancer therapy, *ACS Nano*, 6 (2012) 5070-5077.
- [39] S. Leekumjorn, S. Gullapalli, M.S. Wong, Understanding the solvent polarity effects on surfactant-capped nanoparticles, *The Journal of Physical Chemistry B*, 116 (2012) 13063-13070.
- [40] L.L. Rouhana, J.A. Jaber, J.B. Schlenoff, Aggregation-resistant water-soluble gold nanoparticles, *Langmuir*, 23 (2007) 12799-12801.
- [41] L.L. Rouhana, J.A. Jaber, J.B. Schlenoff, Aggregation-resistant water-soluble gold nanoparticles, *Langmuir*, 23 (2007) 12799-12801.
- [42] D.A. Giljohann, D.S. Seferos, W.L. Daniel, M.D. Massich, P.C. Patel, C.A. Mirkin, Gold nanoparticles for biology and medicine, *Angewandte Chemie International Edition*, 49 (2010) 3280-3294.
- [43] A.P. Alivisatos, AP Alivisatos, KP Johnsson, X. Peng, TE Wilson, CJ Loweth, MP Bruchez, Jr., and PG Schultz, *Nature (London)* 382, 609 (1996), *Nature (London)*, 382 (1996) 609.
- [44] M.-C. Bowman, T.E. Ballard, C.J. Ackerson, D.L. Feldheim, D.M. Margolis, C. Melander, Inhibition of HIV fusion with multivalent gold nanoparticles, *Journal of the American Chemical Society*, 130 (2008) 6896-6897.
- [45] P.D. Howes, R. Chandrawati, M.M. Stevens, Colloidal nanoparticles as advanced biological sensors, *Science*, 346 (2014) 1247390.
- [46] A.P. Castano, T.N. Demidova, M.R. Hamblin, Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization, *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 1 (2004) 279-293.
- [47] N.L. Rosi, C.A. Mirkin, Nanostructures in biodiagnostics, *Chemical Reviews*, 105 (2005) 1547-1562.
- [48] R.G.F. Goncalves, A.H.d. Oliveira, A.P. Alves, B. Vilas, d.A.S. Fabricio, K. Krambrock, L.O. Ladeira, M.V.B. Pinheiro, M.A. Soares, P.R.O.d. Silva, Biodistribution and tumor uptake of radioactive gold-nanoparticles, *Journal of Metabolism and Nutrition*, 10 (2008) 29.
- [49] M. Eghtedari, A.V. Liopo, J.A. Copland, A.A. Oraevsky, M. Motamedi, Engineering of hetero-functional gold nanorods for the in vivo molecular targeting of breast cancer cells, *Nano Letters*, 9 (2008) 287-291.
- [50] J.D. Gibson, B.P. Khanal, E.R. Zubarev, Paclitaxel-functionalized gold nanoparticles, *Journal of the American Chemical Society*, 129 (2007) 11653-11661.
- [51] A. Wijaya, S.B. Schaffer, I.G. Pallares, K. Hamad-Schifferli, Selective release of multiple DNA oligonucleotides from gold nanorods, *ACS Nano*, 3 (2008) 80-86.

- [52] H.-C. Huang, S. Barua, D.B. Kay, K. Rege, Simultaneous enhancement of photothermal stability and gene delivery efficacy of gold nanorods using polyelectrolytes, *ACS Nano*, 3 (2009) 2941-2952.
- [53] K.V. Chakravarthy, A.C. Bonoiu, W.G. Davis, P. Ranjan, H. Ding, R. Hu, J.B. Bowzard, E.J. Bergey, J.M. Katz, P.R. Knight, Gold nanorod delivery of an ssRNA immune activator inhibits pandemic H1N1 influenza viral replication, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107 (2010) 10172-10177.
- [54] V.P. Torchilin, Multifunctional nanocarriers, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64 (2012) 302-315.
- [55] C.K. Kim, P. Ghosh, C. Pagliuca, Z.-J. Zhu, S. Menichetti, V.M. Rotello, Entrapment of hydrophobic drugs in nanoparticle monolayers with efficient release into cancer cells, *Journal of the American Chemical Society*, 131 (2009) 1360-1361.
- [56] S. Leekumjorn, S. Gullapalli, M.S. Wong, Understanding the solvent polarity effects on surfactant-capped nanoparticles, *The Journal of Physical Chemistry B*, 116 (2012) 13063-13070.
- [57] A.M. Alkilany, P.K. Nagaria, C.R. Hexel, T.J. Shaw, C.J. Murphy, M.D. Wyatt, Cellular uptake and cytotoxicity of gold nanorods: molecular origin of cytotoxicity and surface effects, *Small*, 5 (2009) 701-708.
- [58] N. Khlebtsov, L. Dykman, Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: a review of in vitro and in vivo studies, *Chemical Society Reviews*, 40 (2011) 1647-1671.
- [59] J.M. Anderson, Future challenges in the in vitro and in vivo evaluation of biomaterial biocompatibility, *Regenerative Biomaterials*, 3 (2016) 73-77.
- [60] S. Morgan, P. Grootendorst, J. Lexchin, C. Cunningham, D. Greyson, The cost of drug development: a systematic review, *Health policy*, 100 (2011) 4-17.
- [61] S.S. Eaton, G.R. Eaton, L.J. Berliner, *Biomedical EPR-part A: Free radicals, metals, medicine and physiology*, Springer Science & Business Media 2004.
- [62] G.I. Likhtenshtein, *Biophysical labeling methods in molecular biology*, Cambridge University Press 1993.
- [63] M. Lucarini, L. Pasquato, ESR spectroscopy as a tool to investigate the properties of self-assembled monolayers protecting gold nanoparticles, *Nanoscale*, 2 (2010) 668-676.
- [64] Y. Akdogan, J. Heller, H. Zimmermann, D. Hinderberger, The solvation of nitroxide radicals in ionic liquids studied by high-field EPR spectroscopy, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 12 (2010) 7874-7882.
- [65] E. Zavoisky, Paramagnetic relaxation of liquid solution for perpendicular fields, *J. Phys. USSR*, 9 (1945) 211p.
- [66] E. Zavoisky, Paramagnetic absorption in some salts in perpendicular magnetic fields, *Zhurnal Eksperimentalnoi I Teoreticheskoi Fiziki*, 16 (1946) 603-606.
- [67] E. Zavoisky, The Measurement of Paramagnetic Susceptibility With Decimetre Waves, *Zhurnal Eksperimentalnoi I Teoreticheskoi Fiziki*, 17 (1947) 155-161.
- [68] E. Fremy, SUR UN NOUVELLE SÉRIE D'ACIDES FORMÉS D'OXYGÈNE, DE SOUFRE, D'HYDROGÈNE ET DE D'AZOTE, *Annales de Chimie et de Physique*, 1845, pp. 408-488.
- [69] O. Piloty, B.G. Schwerin, Über das Nitril der Nitrosoisobuttersäure und seine Derivate, *European Journal of Inorganic Chemistry*, 34 (1901) 1863-1870.
- [70] G. Schwarzenbach, L. Michaelis, Semiquinone radicals in the indamine and indophenol groups, *Journal of The American Chemical Society*, 60 (1938) 1667-1678.

- [71] J. Kenyon, S. Sugden, 21. A paramagnetic organic compound, *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, (1932) 170-171.
- [72] A.N. Holden, C. Kittel, F.R. Merritt, W.A. Yager, Microwave resonance absorption in a paramagnetic organic compound, *Physical Review*, 75 (1949) 1614.
- [73] O.L. Lebedev, S.N. Kazarnovskii, Catalytic oxidation of aliphatic amines with hydrogen peroxide, *Trudy po Khimii i Khim Technologii (Gorkii)*, 8 (1959) 649-652.
- [74] B. Gallez, K. Mader, H.M. Swartz, Noninvasive measurement of the pH inside the gut by using pH-sensitive nitroxides. An in vivo EPR study, *Magnetic resonance in medicine*, 36 (1996) 694-697.
- [75] D.J. Schneider, J.H. Freed, Spin labeling: theory and applications, *Biological Magnetic Resonance*, 8 (1989) 1-76.
- [76] J.C. Macosko, M.S. Pio, I. Tinoco, Y.K. Shin, A novel 5' displacement spin-labeling technique for electron paramagnetic resonance spectroscopy of RNA, *Rna*, 5 (1999) 1158-1166.
- [77] T.M. Okonogi, A.W. Reese, S.C. Alley, P.B. Hopkins, B.H. Robinson, Flexibility of duplex DNA on the submicrosecond timescale, *Biophysical Journal*, 77 (1999) 3256-3276.
- [78] T.M. Okonogi, S.C. Alley, A.W. Reese, P.B. Hopkins, B.H. Robinson, Sequence-dependent dynamics of duplex DNA: the applicability of a dinucleotide model, *Biophysical Journal*, 83 (2002) 3446-3459.
- [79] N.-K. Kim, A. Murali, V.J. DeRose, A distance ruler for RNA using EPR and site-directed spin labeling, *Chemistry & Biology*, 11 (2004) 939-948.
- [80] N.P. Konovalova, R.F. Diatchkovskaya, G.V. Kukushkina, L.M. Volkova, V.N. Varfolomeev, L.S. Dombrovsky, A.B. Shapiro, Pharmacokinetics of a spin-labeled rubomycin analog, *Neoplasma*, 35 (1988) 185-190.
- [81] E.G. Rozantsev, *Free Nitroxyl Radicals*, Plenum Press, New York, 1970, pp. 119-126.
- [82] T.L. Cottrell, *The strengths of chemical bonds*, Academic Press 1958.
- [83] E.G. Rozantsev, M.B. Neiman, Organic radical reactions involving no free valence, *Tetrahedron*, 20 (1964) 131-137.
- [84] G.R. Eaton, S.S. Eaton, D.P. Barr, R.T. Weber, *Quantitative Epr*, Springer Science & Business Media 2010.
- [85] M. Tamski, *Quantitative electrochemical EPR*, University of Warwick, 2015.
- [86] D. Barr, J. Jiang, R.T. Weber, How to quantitate nitroxide spin adducts using TEMPOL, *Bruker Biospin Technical Note*, (2001).
- [87] S.N. Dobryakov, Spin Exchange Components in Nitroxyl Biradicals EPR Spectra, *Bioactive Spin Labels*, Springer 1992, pp. 215-225.
- [88] Y.S. Lebedev, O.Y. Grinberg, A.A. Dubinsky, O.G. Poluektov, Investigation of spin labels and probes by millimeter band EPR, *Bioactive Spin Labels*, Springer 1992, pp. 227-278.
- [89] A. Carrington, A.D. McLachlan, *Introduction to magnetic resonance: with applications to chemistry and chemical physics*, Harper & Row, New York, 1969.
- [90] J.R. Biller, H. Elajaili, V. Meyer, G.M. Rosen, S.S. Eaton, G.R. Eaton, Electron spin-lattice relaxation mechanisms of rapidly-tumbling nitroxide radicals, *Journal of Magnetic Resonance*, 236 (2013) 47-56.
- [91] J.A. Weil, J.R. Bolton, *Electron Paramagnetic Resonance, Elementary Theory and Practical Applications*, John Wiley & Sons, Inc, New Jersey, 2007.
- [92] J.M. Spaeth, J.R. Niklas, R.H. Bartram, *Structural Analysis of Point Defects in Solids*, 1 ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, 1992.

- [93] J. Lajz rowicz-Bonneteau, Structure du Radical Nitroxyde Tetram thyl-2,2,6, 6-piperidinol-4-oxyle-1, *Acta Crystallographica*, 1968, pp. 196-199.
- [94] N.M. Atherton, *Principles of Electron Spin Resonance*, Ellis Horwood, New York, 1993.
- [95] H. Kobayashi, Y. Furuhashi, H. Nakagawa, T. Asaji, ESR study of molecular orientation and dynamics of TEMPO derivatives in CLPOT 1D nanochannels, *Magnetic Resonance in Chemistry*, 54 (2016) 641-649.
- [96] E.M.M. Weber, H. Vezin, J.G. Kempf, G. Bodenhausen, D. Abergel, D. Kurzbach, Anisotropic longitudinal electronic relaxation affects DNP at cryogenic temperatures, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 19 (2017) 16087-16094.
- [97] C. Cohen-Tannoudji, B. Diu, F. Laloe, *Quantum Mechanics*, Wiley, New York, 1992.
- [98] J. C. P. Poole, H.A. Farach, *Relaxation in magnetic resonance : dielectric and Mossbauer applications*, Academic Press, New York, 1971.
- [99] J.M. Spaeth, H. Overhof, *Point Defects in Semiconductors and Insulators*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, 2003.
- [100] E.L. Hahn, SPIN ECHOES, *Physical Review*, 80 (1950) 580-594.
- [101] N.M. Temme, Voigt function, *NIST Handbook of Mathematical Functions*; Olver Frank, WJ, Lozier, DM, Boisvert, RF, Eds, (2010).
- [102] C.P. Poole, *Electron spin resonance: a comprehensive treatise on experimental techniques*, Courier Corporation 1996.
- [103] N. Wiener, Generalized harmonic analysis, *Acta Mathematica*, 55 (1930) 117-258.
- [104] A. Khintchine, Korrelationstheorie der station ren stochastischen Prozesse, *Mathematische Annalen*, 109 (1934) 604-615.
- [105] S. Stoll, A. Schweiger, EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR, *Journal of Magnetic Resonance*, 178 (2006) 42-55.
- [106] S. Chen, 4-Hydroxythiophenol-protected gold nanoclusters in aqueous media, *Langmuir*, 15 (1999) 7551-7557.
- [107] A.C. Templeton, W.P. Wuelfing, R.W. Murray, Monolayer-protected cluster molecules, *Accounts of Chemical Research*, 33 (2000) 27-36.
- [108] L.A. Porter, D. Ji, S.L. Westcott, M. Graupe, R.S. Czernuszewicz, N.J. Halas, T.R. Lee, Gold and silver nanoparticles functionalized by the adsorption of dialkyl disulfides, *Langmuir*, 14 (1998) 7378-7386.
- [109] N. Felidj, J. Aubard, G. Levi, J.R. Krenn, A. Hohenau, G. Schider, A. Leitner, F.R. Aussenegg, Optimized surface-enhanced Raman scattering on gold nanoparticle arrays, *Applied Physics Letters*, 82 (2003) 3095-3097.
- [110] S. Bahceci, B. Esat, A polyacetylene derivative with pendant TEMPO group as cathode material for rechargeable batteries, *Journal of Power Sources*, 242 (2013) 33-40.
- [111] T. Shimanouchi, Tables of Molecular Vibrational Frequencies: Part 6, *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 2 (1973) 121-162.
- [112] L. Rintoul, A.S. Micallef, S.E. Bottle, The vibrational group frequency of the N-O stretching band of nitroxide stable free radicals, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 70 (2008) 713-717.
- [113] X. Ye, Y. Gao, J. Chen, D.C. Reifsnnyder, C. Zheng, C.B. Murray, Seeded growth of monodisperse gold nanorods using bromide-free surfactant mixtures, *Nano Letters*, 13 (2013) 2163-2171.

- [114] B. Nikoobakht, M.A. El-Sayed, Preparation and growth mechanism of gold nanorods (NRs) using seed-mediated growth method, *Chemistry of Materials*, 15 (2003) 1957-1962.
- [115] N.R. Jana, L. Gearheart, C.J. Murphy, Wet chemical synthesis of high aspect ratio cylindrical gold nanorods, *The Journal of Physical Chemistry B*, 105 (2001) 4065-4067.
- [116] A. Gole, C.J. Murphy, Seed-mediated synthesis of gold nanorods: role of the size and nature of the seed, *Chemistry of Materials*, 16 (2004) 3633-3640.
- [117] Y.-Y. Yu, S.-S. Chang, C.-L. Lee, C.R.C. Wang, Gold nanorods: electrochemical synthesis and optical properties, *The Journal of Physical Chemistry B*, 101 (1997) 6661-6664.
- [118] M.R.K. Ali, B. Snyder, M.A. El-Sayed, Synthesis and optical properties of small Au nanorods using a seedless growth technique, *Langmuir*, 28 (2012) 9807-9815.
- [119] X. Xu, Y. Zhao, X. Xue, S. Huo, F. Chen, G. Zou, X.-J. Liang, Seedless synthesis of high aspect ratio gold nanorods with high yield, *Journal of Materials Chemistry A*, 2 (2014) 3528-3535.
- [120] W. Wang, J. Li, S. Lan, L. Rong, Y. Liu, Y. Sheng, H. Zhang, B. Yang, Seedless synthesis of gold nanorods using resveratrol as a reductant, *Nanotechnology*, 27 (2016) 165601.
- [121] C. Grabinski, N. Schaeublin, A. Wijaya, H. D' Couto, S.H. Baxamusa, K. Hamad-Schifferli, S.M. Hussain, Effect of gold nanorod surface chemistry on cellular response, *ACS Nano*, 5 (2011) 2870-2879.
- [122] L. Wang, X. Jiang, Y. Ji, R. Bai, Y. Zhao, X. Wu, C. Chen, Surface chemistry of gold nanorods: origin of cell membrane damage and cytotoxicity, *Nanoscale*, 5 (2013) 8384-8391.
- [123] A. Rohiman, I. Anshori, A. Surawijaya, I. Idris, Study of colloidal gold synthesis using Turkevich method, *AIP*, 2011, pp. 39-42.
- [124] M.K. Pereira, Ressonância de Plasmon de superfície localizado e espalhamento Raman em soluções coloidais de ouro, (2009).
- [125] S. Link, M.B. Mohamed, M.A. El-Sayed, Simulation of the optical absorption spectra of gold nanorods as a function of their aspect ratio and the effect of the medium dielectric constant, *The Journal of Physical Chemistry B*, 103 (1999) 3073-3077.
- [126] W.S. Rasband, ImageJ. US National Institutes of Health; Bethesda, Maryland, USA: 1997–2012, There is no corresponding record for this reference, (2014).
- [127] N.R. Jana, L. Gearheart, C.J. Murphy, Seed-mediated growth approach for shape-controlled synthesis of spheroidal and rod-like gold nanoparticles using a surfactant template, *Advanced Materials*, 13 (2001) 1389.
- [128] B. Nikoobakht, M.A. El-Sayed, Preparation and growth mechanism of gold nanorods (NRs) using seed-mediated growth method, *Chemistry of Materials*, 15 (2003) 1957-1962.
- [129] C.J. Orendorff, C.J. Murphy, Quantitation of metal content in the silver-assisted growth of gold nanorods, *The Journal of Physical Chemistry B*, 110 (2006) 3990-3994.
- [130] G. Likhtenshtein, *Electron Spin Interactions in Chemistry and Biology: Fundamentals, Methods, Reactions Mechanisms, Magnetic Phenomena, Structure Investigation*, Springer 2016.
- [131] C. Reichardt, T. Welton, *Solvents and solvent effects in organic chemistry*, John Wiley & Sons 2011.

- [132] E.G. Janzen, Electron spin resonance study of the hyperfine splitting constants of naturally abundant carbon-13 and nitrogen-15 in diphenylmethyl tert-butyl aminoxyl (nitroxide). Solvent and temperature effects, *Canadian Journal of Chemistry*, 62 (1984) 1653-1657.
- [133] W. Li, M. Zhang, J. Zhang, Y. Han, Self-assembly of cetyl trimethylammonium bromide in ethanol-water mixtures, *Frontiers of Chemistry in China*, 1 (2006) 438-442.
- [134] J. Pérez-Juste, L.M. Liz-Marzán, S. Carnie, D.Y.C. Chan, P. Mulvaney, Electric-field-directed growth of gold nanorods in aqueous surfactant solutions, *Advanced Functional Materials*, 14 (2004) 571-579.
- [135] E.J. Guidelli, O. Baffa, Influence of photon beam energy on the dose enhancement factor caused by gold and silver nanoparticles: An experimental approach, *Medical Physics*, 41 (2014).