UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA E QUÍMICA DE SÃO CARLOS.

"INTERAÇÃO DE PEQUENAS MOLÉCULAS
COM PROTEÍNAS: UM ESTUDO USANDO
MÉTODOS CONVENCIONAIS E TRANSFERÊNCIA DE SATURAÇÃO DE R.P.E."

JOÃO RUGGIERO NETO

Tese apresentada ao Instituto
de Física e Química de São
Carlos, para obtenção do título de Doutor em Física Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Marcel Tabak

São Carlos
1984

BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE FÍSICA E QUÍMICA DE SÃO CARLOS - USP
FÍSICA

MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA TESE DE DOUTORADO DE _____

JOÃO RUGGIERO NETO

APRESENTADA AO INSTITUTO DE FÍSICA E QUÍMICA DE SÃO CARLOS, DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, EM 20 DE junho DE 1984.

COMISSÃO JULGADORA:

Dr. MARCEL TABAK

- Orientador

Dr. OTACIRO RANGEL NASCIMENTO

Dr. Rosemary Sanches

Dr. SÔNIA R. WANDERLEY LOURO

Dr. MARIA TERESA LAMY FREUND

DEDICO À:

minha esposa Marta, e a meus
filhos Milena e Giovanni.

AGRADECIMENTOS

Durante a realização desse trabalho, várias pessoas, com as quais convivemos, estiveram envolvidas com as minhas angustias e alegrias, frutos dos êrros e acertos a que estamos sujeitos durante o trabalho científico. Essas pessoas souberam dar apoio na hora exata para que êsse trabalho chegasse a um bom têrmo.

Particularmente, a convivência com o pessoal do Laboratório de Biofísica Molecular e Dosimetria, foi uma experiência altamente benéfica e gratificante, que sempre me trará lembranças agradáveis. A êles os meus agradecimentos.

Devo agradecer a algumas pessoas que tiveram maior envolvimento na realização desse trabalho:

Ao Prof. Marcel Tabak, pela orientação constante e segura, amizade e apoio nos momentos mais difíceis.

Ao Prof. Otaciro R. Nascimento, co-orientador e amigo, que deu todo apoio possível na realização do trabalho, cujas discussões foram muito importantes.

À Prof.^a Rosemary Sanches, pelas discussões, e incentivo, auxílio na preparação das amostras e amizade demonstrada.

Aos amigos Oswaldo Baffa e Marcio Colombo pelas discussões e incentivo, amizade.

Aos amigos da Biofísica: Ana, Laura, Ladislau, Washington, Crestana e Cidão pelo apoio e amizade demonstrados.

Aos amigos de Rio Preto: José Roberto, Luiz Carlos, Marcio, Eikite, Ceron, Laerte e Espada pelo apoio, amizade e incentivo.

Ao Sanches e à Isabel, do Laboratório de Biofísica pelo apoio técnico e pelo tratamento muito humano que me deram.

Ao Valdecir e Valdir, técnicos do computador, sem o auxílio dos quais a parte de computação desse trabalho teria ficado

muito difícil.

A Marta por ter transformado meus manuscritos ilegíveis,
nesse excelente trabalho de datilografia.

Ao Augusto pela confecção dos desenhos.

INDICE

LISTA DE ABREVIACÕES	i
RESUMO	ii
ABSTRACT	iii
INTRODUÇÃO	iv
 CAPÍTULO I - FUNDAMENTOS TEÓRICOS	1
1. Química dos Radicais Nitroxido	1
2. Propriedades Físicas de Radicais Nitroxidos e Sondas de Spin	2
3. Interações Magnéticas	6
3.1. Interação de Zeeman	6
3.2. Interação com o Campo Eletromagnético	10
3.3. Interação Hiperfina	11
3.4. Outras Interações	13
4. Análise dos Espectros de RPE	14
4.1. Espectros em solução	14
4.2. Espectro em Cristais Orientados	16
5. Reorientação de Radicais em Soluções Viscosas	17
 CAPÍTULO II - MATERIAIS E MÉTODOS	36
1. Preparaco dos Marcadores de spin	36
2. Preparaco das amostras	36
3. Medidas de RPE	39
4. Análise dos Espectros	41
4.1. Ajuste das Curvas de variação angular	41
4.2. Análise de Espectros Rígidos	42
4.3. Análise dos Espectros na rgio de estreitamento devido ao movimento	43
4.3.1. Análise através da largura de linhas	43
4.3.2. Medida da largura de linha	45
4.3.3. Simulação dos espectros	45
5. Análise dos Espectros de ST-RPE	45

CAPÍTULO III - RESULTADOS EXPERIMENTAIS	47
1. Variação Angular em monocristais à Tem <u>p</u> eratura ambiente	47
2. Variação Angular à Temperatura de N ₂ líquido	59
2.1. Variação Térmica no Monocristal	67
3. Simulação dos Espectros de TEMPO em Mo <u>n</u> ocristais de Hb à Temperatura ambien <u>te</u>	68
4. Amostras de Hb Policristalinas e liofi <u>l</u> izadas	72
4.1. RPE convencional	72
4.2. ST-RPE	78
5. Solução Aquosa	80
5.1. Temperaturas menores que -22°C	80
5.2. Temperaturas maiores que -3,5°C	82
6. Estudos de Hidratação de Proteínas	86
 CAPÍTULO IV - DISCUSSÕES E CONCLUSÕES	 92
 CONCLUSÕES	 108
 APÊNDICE I	 110
APÊNDICE II	120
APÊNDICE III	125
 BIBLIOGRAFIA	 147

LISTA DE ABREVIACÕES

- RPE - Ressonância Paramagnética de Elétrons.
- ST-RPE - Ressonância Paramagnética de Elétrons - Transferência de Saturação.
- Hb - Hemoglobina.
- HbA - Hemoglobina Normal.
- HbS - Hemoglobina Siclemica.
- Mb - Mioglobina.
- Xg/g - Xgramas de água/grama de proteína.
- Sol - Solução.
- TEMPO-N-1-oxil-2,2,6,6 - tetrametilpiperidino.
- PD-TEMPOL-N-1-oxil-2,2,6,6 - tetrametilpiperidino - perdeuterado.
- NEM*-2,2,6,6 - tetrametilpiperidinoxil-4-maleimido.

RESUMO

Neste trabalho, analisamos a interação de pequenas moléculas, marcadores hidrofóbicos, com hemoglobina, em diferentes estados: monocristal, pó e solução aquosa. Os métodos de análise empregados, são baseados nas teorias de relaxação em líquidos e técnicas não lineares de ressonância ST-RPE (transferência de saturação), fornecendo informações sobre mudanças locais nas vizinhanças desses marcadores.

Um dos marcadores hidrofóbicos, o TEMPO, mostrou uma anisotropia considerável nos espectros de RPE do monocristal de hemoglobina que está relacionado com o empacotamento molecular da proteína no cristal.

A associação desses métodos de análise conduziu a importantes informações sobre mudanças na camada de hidratação em várias proteínas: hemoglobina, mioglobina e lisozima, monitoradas pelo marcador covalente derivado da maleimida, e induzidas pela temperatura, sob diferentes condições de hidratação. Desta forma o uso da espectroscopia de RPE especialmente com simulação espectral e ST-RPE mostrou ser um método potente e ainda não explorado no estado de hidratação de proteínas.

ABSTRACT

In this work, the interactions of small molecules, hydrophobic spin labels, with hemoglobin, under different states was analysed: single crystal, powder and aqueous solution. The methods of analysis employed, are based in relaxation theory in liquids and non-linear techniques, saturation transfer (ST-EPR), giving informations on the local changes in the neighbourhood of the labels.

One of the hydrophobic labels, TEMPO, showed a considerable anisotropy in the hemoglobin single crystal spectra, a result related to the molecular packing in the protein single crystal.

The association of the techniques of analysis all together lead to important informations on temperature induced changes in the hydration layer in several proteins: hemoglobin, myoglobin and lysozyme, displayed by the covalent spin label, NEM*, a maleimide derivated, in different conditions of hydration.

In this way the use of EPR spectroscopy and particularly with spectral simulations and ST-EPR, proved to be a powerful and not yet very much explored method to study the problem of protein hydration.

INTRODUÇÃO

O método de marcadores de spin, tem sido usado intensivamente em Biofísica e Bioquímica, com o objetivo de obter informações sobre o estado de movimento e propriedades locais, no ambiente vizinho ao marcador nos sistemas biológicos estudados, particularmente proteínas e membranas.

Essas informações, são detalhadas através de mudanças na forma das linhas espectrais, que são bastante sensíveis ao movimento do marcador.

Seu uso teve início a partir de meados da década de 60 e, embora com aplicações imediatas em uma ampla gama de problemas de Bioquímica e Biofísica, seu sucesso foi relativamente pequeno pois somente informações qualitativas eram obtidas dos espectros, o que conduzia à interpretações ambíguas e imprecisas sobre o sistema em estudo.

Métodos mais acurados de análise da forma das linhas , utilizando as teorias de relaxação magnética em líquidos, desenvolvidos no fim da década de 60, possibilitaram que as informações obtidas com o método de marcadores de spin fosse também quantitativas, tornando assim mais precisas as interpretações.

Esses métodos de análise, inicialmente limitaram à região de movimento rápido dos marcadores, onde a análise quantitativa é mais simples e parâmetros dos espectros experimentais fornecem diretamente informação sobre o tempo de correlação rotacional. A partir de meados da década de 70, um esforço muito grande foi dirigido no sentido de interpretar, de maneira mais precisa, os espectros na região de movimento lento. Nessa região, é muito difícil, e até mesmo impreciso, obter informações sobre o estado de movimento do marcador através de parâmetros medidos diretamente dos espectros experimentais, como na região de movimento rápido.

Com esse intuito, os trabalhos desenvolvidos pelo grupo do Dr. J.H. Freed (Universidade de Cornell), deram uma contribuição decisiva no estudo de movimento de marcadores na região de movimento lento.

Esses métodos têm sido aplicados com bastante sucesso no estudo de transição de fase em cristais líquidos, e em alguns sistemas especiais de membranas artificiais.

Esse método de análise tem como recurso principal a simulação matemática dos espectros de marcadores em sistemas viscosos, o que permite uma interpretação mais precisa sobre o fenômeno estudado.

Mais recentemente um grande desenvolvimento no método de marcação de spin foi obtido através de técnicas não lineares de ressonância paramagnética eletrônica (ST-RPE). Essa técnica não convencional fornece informações sobre o movimento do marcador, quando esse movimento é muito lento, para o qual, o RPE convencional não permite interpretações precisas devido a insensibilidade da forma de linha espectral a pequenas variações no movimento molecular. Essa técnica tem sido usada com sucesso no estudo de propriedades hidrodinâmicas de macromoléculas e membranas biológicas.

O objetivo do presente trabalho é utilizar esses métodos modernos de análise espectral tanto de RPE convencional quanto de transferência de saturação (ST-RPE) para estudar a interação de marcadores pequenos com proteínas em diferentes estados físicos: monocristais, pó e solução.

Em particular a interação do marcador TEMPO com a hemoglobina em diferentes estados físicos é estudada. Este marcador embora não se ligue covalentemente a proteína apresenta anisotropia considerável nos espectros de RPE em monocristais de Hb. O uso dos métodos de relaxação através da simulação espectral permite uma interpretação mais segura dos fenômenos estudados.

Esses estudos possibilitaram obter informações sobre as mudanças que ocorrem na vizinhança do marcador, principalmente no que concerne a hidratação das proteínas estudadas. Verificou-se que de modo geral as propriedades relacionadas com a hidratação são bastante comuns às várias proteínas tais como a lisozima, mioglobina e hemoglobina.

Para esses estudos foi importante a implantação dos programas desenvolvidos pelo grupo de Cornell para simular espectros do marcador com movimento, e também o programa para simular espectros rígidos.

O Capítulo I apresenta um resumo dos fundamentos teóricos do método de marcação de spin e dos métodos de análise de espectros. No Capítulo II são apresentados os métodos de preparação de amostras, técnicas experimentais utilizadas na obtenção dos espectros e aproximações causadas na análise espectral. No Capítulo III são apresentados os resultados experimentais obtidos, e no Capítulo IV esses resultados são discutidos e as conclusões são apresentadas. No Apêndice I o programa para simular espectros rígidos é apresentado, no Apêndice II uma breve explicação sobre o programa utilizado para simular os espectros com movimento é oferecida sendo este programa apresentado no Apêndice III.

CAPÍTULO I

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

1. Química dos Radicais Nitróxido

A estrutura química de um radical estável NO é dada pela fórmula geral:

De acordo com a teoria dos orbitais moleculares, a estrutura eletrônica do NO é dada por:

portanto, tendo o elétron desemparelhado no orbital π_z^* do grupo NO.

Esses radicais podem se ligar à molécula que se quer estudar através dos fragmentos A_1 e A_2 .

Radicaís com essa estrutura podem ser armazenados por meses, sob condições ordinárias. Esta estabilidade caracterizada por uma energia de ligações de 100 kcal é devido parcialmente à proteção estérica da ligação NO pelos quatro grupos metil adjacentes⁽¹⁾.

Estericamente protegido, o grupo NO é tão inerte que as outras partes da mesma molécula (isto é, os substituintes A_1 e A_2)

podem ser facilmente modificados sem o envolvimento do elétron de semparelhado.

Devido aos trabalhos pioneiros dos grupos do Prof. Rozantsev na URSS⁽²⁾, e do Prof. Rassatt na França⁽³⁾, um grande número de mono a polirradicais nitróxidos são conhecidos, inclusive comercializados. Esses radicais são usados como sondas paramagnéticas de duas maneiras:

A primeira possibilidade é ligar o NO ao sistema de interesse por meio de uma reação química, um exemplo típico é do radical iodoacetamida que se liga ao grupo -SH de proteínas⁽⁴⁾, esta reação é chamada marcagem de spin.

A segunda possibilidade é simplesmente difundir o marcador no sistema que se deseja estudar. Neste caso a molécula pode ser chamada "sonda de spin" desde que não é ligada covalentemente ao sistema hospedeiro, por exemplo: o uso de marcadores hidrofóbicos em membranas.

Os nitróxidos são muito sensíveis a valores extremos de pH, e decompostos a temperaturas superiores que 80°C⁽²⁾, ou quando irradiado por poucas horas⁽²⁾, e facilmente reduzidos por ácido ascórbico⁽⁶⁾. Esta propriedade importante foi aplicada na investigação de difusão transversal de fosfolipídeos

2. Propriedades Físicas de Radicais Nitróxidos e Sondas de Spin

O espectro de absorção da radicais nitróxidos possui duas bandas de absorção ~ 240 nm a ~ 460 nm⁽²⁾. No espectro de infra-vermelho, absorção $\tilde{\nu} \sim 1350$ cm⁻¹ é produzida por vibração do grupo NO⁽²⁾. A geometria molecular de um número de radicais nitróxido, foi investigada por meio de difração de raios X em seu estado cristalino⁽⁷⁾. O comprimento da ligação NO é 1.25 a 1.30 Å e das ligações adjacentes N-C é ~ 1.5 Å. Os átomos de nitrogênio e oxigênio e os dois carbonos terciários vizinhos são coplanares. Desvios dessa coplanaridade foram observados⁽⁸⁾. O orbital $2p\pi$

do nitrogênio contém o elétron desemparelhado e é perpendicular ao plano dos quatro átomos, como pode ser visto na figura abaixo

Fig. 1 - Espectro de um radical nitroxila livre em solução. As linhas externas são simétricas à linha central.

Um sistema de coordenadas cartesianas (x,y,z) é então usualmente fixo no radical NO, sendo que o eixo x é escolhido na direção da ligação NO; o eixo z na direção do orbital $2p\pi$ e o eixo y perpendicular a x,z .

Nos experimentos de RPE o momento magnético dos elétrons interagem com o campo magnético $\vec{H}_0$ e também o campo magnético local $\vec{H}_l$ criado no elétron pelo núcleo próximo no caso do radical NO, pelo núcleo de nitrogênio (número quântico de spin nuclear do N^{14} $I=1$).

O espectro básico de um radical NO livre em solução diluída, consta de três linhas, de igual altura e igual separação como mostrado na fig. (1).

A separação entre duas linhas adjacentes é chamada constante de desdobramento hiperfino isotrópico, a_N ($a_N=13-17,5G$, para muitos marcadores), enquanto o chamado fator g determina o valor do campo magnético correspondendo ao centro do espectro. Esses parâmetros serão melhor definidos nas próximas seções.

Resultados experimentais⁽⁹⁾, mostram que a constante hiperfina isotrópica tem seu valor aumentado em mais de 10% ao passar de um solvente hidrofóbico para um hidrofílico correspondentemente o fator g isotrópico decresce. Esses efeitos podem ser compreendidos qualitativamente em termos de interações específicas de solventes polares com os pares de elétrons do oxigênio.

Como visto, com base na teoria de orbitais moleculares, o elétron desemparelhado do radical nitróxido está em um orbital π^* (anti-ligado) e o par de elétron compartilhado está no orbital π (ligado).

Esses orbitais podem ser descritos por uma combinação linear de orbitais p do nitrogênio e do oxigênio:

$$\Psi_{\pi} = ap_N + bp_O$$

$$\Psi_{\pi}^* = ap_N - bp_O$$

a e b são constantes.

Na presença de um meio polar, a afinidade eletrônica do oxigênio é aumentada, acarretando um aumento no caráter O do orbital ligado, e um aumento no caráter N do orbital anti-ligado⁽¹⁰⁾, ou em outras palavras, os elétrons desemparelhados não só se deslocam para o átomo de N , o que pode ser medido pelo aumento de a_N , como ficam mais simétricos em relação ao núcleo de N , o que é medido pela diminuição no fator g .

Assim, os radicais nitróxido são bastante sensíveis a polaridade do meio e à sua hidrofobicidade.

Experimentos em sistemas hidrofóbicos tais como membranas, vesículas, etc., objetivando as medidas das variações do tempo de correlação de radicais nitróxido em função da temperatura dão importantes informações sobre transição de fase nesses sistemas, sendo que um gráfico tipo Arrhenius dará a medida da energia de ativação para o processo ⁽¹¹⁾.

No caso de marcadores pequenos em solução aquosa com substâncias hidrofóbicas, devido às diferenças de polaridades entre os dois solventes temos um desdobramento na linha de campo alto, como pode ser visto na figura (2).

Fig. 2 - Espectro de um radical nitróxido hidrofóbico cuja população está dividida entre um meio polar e outro apolar. Na região de campo alto há uma separação das linhas correspondentes no ambiente polar (P) e apolar (H).

A linha mais interna é devido aos marcadores presentes no meio hidrofóbico e a mais externa é devido aos marcadores no meio polar (água), pois devido ao fato de radicais em meio polar ter $|\psi(0)|^2$ grande no núcleo, $a_{iso \text{ polar}} > a_{iso \text{ apolar}}$.

McConnel e colaboradores ⁽¹¹⁾ definiram uma função de partição:

$$f = H/H+P$$

Esta função nos dá a porcentagem de marcador no meio hidrofóbico.

As interações hidrofóbicas são fortemente dependentes de temperatura além de apresentarem uma anomalia em relação à capacidade calorífica e entropia. Dessa maneira as medidas da função partição com a temperatura, podem trazer importantes informações sobre esses aspectos, que são complementados pela medida da "liberdade" do marcador girar (tempo de correlação) com o aumento da temperatura, isto é, quando a interação hidrofóbica está mais forte.

O uso dessa função pode ser extremamente útil para a obtenção de diagramas de fase em misturas de espécies hidrofóbicas.

3. Interações Magnéticas.

3.1. Interação de Zeeman

Devido ao fato de possuir um elétron desemparelhado, os radicais nítróxido possuem um momento angular de spin diferente de zero e assim um momento magnético eletrônico, dado por

$$\vec{\mu} = -\gamma_e \vec{S} = -g_e \beta_e \vec{S} \quad (1)$$

onde g_e é o fator de desdobramento espectroscópico eletrônico e β_e é o magneton de Bohr eletrônico e é dado por:

$$\beta_e = \frac{|e|\hbar}{2mc} \quad (2)$$

A energia de interação entre o momento magnético e o campo magnético externo $\vec{H} = H_0 \vec{k}$ é dada por um operador, que opera somente nas variáveis de spin. Tal operador é chamado Hamiltoniano de spin, e nesse caso de interação de Zeeman é dado por:

$$\hat{H}_z = g_e \beta_e \vec{H} \cdot \vec{S} = g_e \beta_e H_0 S_z \quad (3)$$

Os valores dos componentes do momento angular de spin $\vec{S}$ ao longo da direção do campo magnético são denotados por M_s , e os outros estados do operador $\hat{H}_z$ são:

$$E_{M_S} = g_e \beta_e H_0 m_S \quad (4)$$

Para um sistema de somente um elétron desemparelhado, $S=1/2$ e m_S pode assumir dois valores $\pm 1/2$. A diferença em energia entre os dois níveis produzida pelo campo magnético é:

$$\Delta E = g_e \beta_e H_0 \quad (5)$$

Fig. 3 - Efeito da aplicação do campo magnético externo a um sistema de spin.

Como visto na figura 3, o efeito do campo magnético externo é separar os elétrons em dois níveis de energia cuja separação é dada pela expressão acima. Como veremos com mais clareza a seguir, em experimentos de RPE, transições entre essas duas populações de elétrons são obtidas, devido a absorção de um quantum de radiação eletromagnética incidente; assim podemos escrever:

$$h\nu = g_e \beta_e H_0 \quad (5a)$$

esta relação é conhecida como condição de ressonância e, define um parâmetro extremamente importante; o fator g , como segue:

$$g_e = \frac{h\nu}{\beta_e H_0} = 0.7144 \frac{\nu}{H_0} .$$

No caso de radicais nitróxidos, esse fator dá a posição da linha central de ressonância.

Quando a molécula está sujeita a um campo magnético externo, o efeito combinado do campo e do acoplamento spin órbita leva a uma pequena contribuição do momento angular orbital ao estado fundamental do sistema. Desta maneira, as propriedades magnéticas do sistema não são devidas somente ao momento angular de spin. Isto causa um desvio no fator g sendo definido assim um fator g efetivo para o sistema. Desvios do fator g do valor para o elétron livre são pequenos ($\sim 1\%$) para radicais aromáticos, mas podem ser grandes em moléculas que contêm metais de transição.

A magnitude dessa correção depende da orientação do campo magnético em relação ao sistema de eixos moleculares. Isto implica que o fator g da molécula não pode ser representado por uma grandeza escalar, mas por um tensor de segunda ordem.

As componentes desse tensor podem ser escritas como⁽¹²⁾

$$g_{ij} = g_e \delta_{ij} = 2\lambda \sum \frac{\langle \psi_0 | L_i | \psi_e \rangle \langle \psi_e | L_j | \psi_0 \rangle}{E_e - E_0} \quad (6)$$

onde δ_{ij} é o delta de Kronecker, que é igual a 1 se $i=j$ e zero em caso contrário, λ é a constante de acoplamento spin órbita e ψ_0 e ψ_e são funções de onda que representam os estados fundamental e excitado, respectivamente, e E_0 e E_e são as correspondentes energias.

Usando notação tensorial, temos:

$$\hat{H}_z = \beta_e \vec{H} \vec{g} \vec{S} .$$

A observável física correspondendo ao operador Hamiltoniano, é a energia que não depende do sistema de referência. Se-

que a escolha do sistema de referência é completamente arbitrária. Entretanto existem duas possibilidades convenientes a serem consideradas:

a) Os eixos do laboratório (x,y,z) com z coincidindo com a direção do campo. Neste sistema $\vec{H} = H_0 \vec{k}$, e os operadores de spin são bem definidos, visto que a direção de $\vec{H}$ corresponde ao eixo da quantização. No sistema de laboratório a Hamiltoniana de Zeeman fica:

$$\hat{H}_z = \beta_e H_0 (g_{zx} S_x + g_{zy} S_y + g_{zz} S_z) \quad (7)$$

b) Sistema de eixos moleculares (p,q,r) no qual o tensor g é diagonal. Neste caso obtêm-se:

$$\hat{H}_z = \beta_e (g_{pp} H_p S_p + g_{qq} H_q S_q + g_{rr} H_r S_r) \quad (8)$$

Para o caso em que a molécula está orientada com um de seus eixos principais paralelo à direção do campo a condição de ressonância se dá para os seguintes valores de campo:

$$\frac{h\nu_0}{\beta_e g_{pp}}, \quad \frac{h\nu_0}{\beta_e g_{qq}}, \quad \frac{h\nu_0}{\beta_e g_{rr}}$$

Para uma orientação arbitrária da molécula, o campo ressonante será dado pela relação:

$$H = h\nu_0 / g_{\text{eff}} \beta_e$$

onde o fator g efetivo é dado por:

$$g_{\text{eff}} = |g_{pp}^2 l^2 + g_{qq}^2 m^2 + g_{rr}^2 n^2|^{1/2} \quad (9)$$

(l,m,n) são cossenos diretores de $\vec{H}$ no sistema de eixos moleculares.

Sejam (α, β, γ) ângulos de Euler que levam o sistema de eixos do laboratório (x, y, z) ao sistema de eixos moleculares (p, q, r) . Estes ângulos são definidos por três rotações sucessivas:

a) rotação de α ao redor do eixo z levando à (x', y', z) ; b) rotação de β ao redor de y' levando à (x'', y', z') ; c) rotação de γ ao redor de x'' levando à (x'', y'', z'') .

De acordo com essas convenções, encontra-se:

$$g_{ef}^2 = g_{pp}^2 \sin^2 \beta \cos^2 \gamma + g_{qq}^2 \sin^2 \beta \sin^2 \gamma + g_{rr}^2 \cos^2 \beta \quad (10)$$

A análise da dependência angular do fator g para radicais em cristais, conduz à determinação dos valores principais do tensor $\bar{g}$ e a disposição espacial da molécula paramagnética em relação aos eixos do cristal.

3.2. Interação com o Campo Eletromagnético

O campo magnético externo, separa os elétrons em dois níveis de energia dada por (4), sendo que as populações dos níveis é dada pela Lei de Boltzman:

$$\frac{N_\alpha}{N_\beta} = e^{g_e \beta_e H_0 / kT} \quad (11)$$

onde N_α e N_β são os números de elétrons nos estados α e β .

O campo eletromagnético de microonda é responsável pelas transições de RPE.

O campo magnético associado à radiação oscila ao longo do eixo x perpendicular à direção do campo estático, de modo que suas componentes são:

$$H_{1x} = H_1 \cos \omega t, \quad H_{1y} = H_{1z} = 0 \quad (12)$$

O hamiltoniano da interação com o momento magnético do spin desprezando a anisotropia do fator g é:

$$\hat{H}' = g_e \beta_e H_1 \hat{S}_x \cos \omega t \quad (13)$$

Como geralmente H_1 é muito menor que o campo estático H_0 , $\hat{H}'$ pode ser tratado como perturbação dependente do tempo atuando sobre estados próprios de $\hat{H}_z$. Podemos verificar então que o efeito de $\hat{H}'$ é o de induzir transições entre os estados $\langle \alpha |$ e $| \alpha' \rangle$, autoestados de $\hat{H}_z$ (com autovalores E_α e $E_{\alpha'}$). A probabilidade de transição é dada por:

$$w_{\alpha\alpha'} = \frac{2\pi}{h} g_e^2 \beta_e^2 H_1^2 | \langle \alpha | \hat{S}_x | \alpha' \rangle |^2 \delta(E_\alpha - E_{\alpha'} - h\omega) \quad (14)$$

onde δ é a função delta de Dirac que impõe a condição: $E_\alpha - E_{\alpha'} = h\omega$.

A condição para que $\langle \alpha | \hat{S}_x | \alpha' \rangle$ não seja zero pode ser obtida se usarmos os operadores $S_\pm = S_x \pm iS_y$.

As transições devem obedecer à regra de seleção: $\Delta M_S = \pm 1$.

3.3. Interação Hiperfina

O valor de g discutido anteriormente não é um bom parâmetro para caracterizar espécies de radicais livres individuais já que eles diferem muito pouco do valor para o spin livre. Muito mais importante para a investigação de moléculas paramagnéticas é a estrutura de multipletes, ou estrutura hiperfina frequentemente presente no espectro de RPE.

A estrutura hiperfina é causada pela interação do momento magnético do spin eletrônico, com os momentos magnéticos de núcleos que possuem momento de spin nuclear, tais como o hidrogênio ($I_H = 1/2$), o nitrogênio ($I_N = 1$), e o fluor ($I_F = 1/2$). O carbono e o oxigênio nos seus isótopos comuns ^{12}C e ^{16}O têm momento de spin nuclear zero, porém os isótopos ^{13}C (é de abundância natural 1%)

e ^{17}O (abundância de 0.04%) tem spins nucleares 1/2 e 5/2, respectivamente.

A estrutura de multipletto do espectro de RPE se deve ao fato que o momento magnético eletrônico interagindo com o núcleo "sente" um campo total diferente dependendo de qual das $2I+1$ possíveis orientações do momento de spin nuclear tem lugar no campo magnético estático.

As interações magnéticas entre os spins eletrônico e nuclear são representadas pela hamiltoniana:

$$\hat{H}_{hf} = -g_e \beta_e g_n \beta_n \frac{(\vec{I} \cdot \vec{S}) r^2 - 3(\vec{I} \cdot \vec{r})(\vec{S} \cdot \vec{r})}{r^5} - \frac{8\pi}{3} (\vec{I} \cdot \vec{S}) \delta(\vec{r}) \quad (15)$$

onde r é a distância elétron-núcleo e $\delta(\vec{r})$ é a função delta de Dirac. O primeiro termo na expressão descreve a interação elétron-núcleo dipolar e o segundo termo, a interação de contato de Fermi.

Nota-se que o primeiro termo depende da orientação relativa no espaço. O hamiltoniano pode ser apresentado de uma forma mais compacta, como segue:

$$\hat{H}_{hf} = \vec{I} \cdot \bar{\bar{A}} \cdot \vec{S} \quad (16)$$

onde $\bar{\bar{A}}$ é um tensor de segunda ordem, que pode ser decomposto em duas partes:

$$\bar{\bar{A}} = \bar{\bar{A}}' + a \quad (17)$$

onde os elementos de $\bar{\bar{A}}'$ são dados por:

$$A'_{ij} = g_e \beta_e g_n \beta_n \langle (r^2 \delta_{ij} - 3x_i x_j) r^{-5} \rangle \quad (18)$$

e o símbolo $\langle \rangle$ denota integração pela distribuição eletrônica. Este termo é simétrico, e tem traço nulo.

O segundo termo da expressão (17) é devido ao termo de

contato, e não depende da orientação da molécula em relação ao campo magnético, sendo um termo isotrópico e é dado por:

$$a = \frac{8\pi}{3} g_e \beta_e g_n \beta_n |\psi(0)|^2 \quad (19)$$

onde $\psi(0)$ é o valor da função de onda do elétron desemparelhado na posição do núcleo. O termo a é a média aritmética dos valores principais do tensor A .

Se a distribuição eletrônica tem simetria esférica, isto é, é representada por uma onda do estado S , então a integração do operador dipolar em relação às coordenadas eletrônicas é zero.

Portanto, somente se o elétron desemparelhado estiver num estado $p, d, f, \dots$, a interação dipolar estará presente.

O termo isotrópico de contato requer densidade eletrônica finita na posição do núcleo o que só pode ser oferecido pela função de onda do tipo S .

3.4. Outras Interações

Duas outras interações, importantes na interpretação dos resultados com radicais nitróxidos são: interação elétron-elétron dipolar e interação de troca, causadas pelas interações magnéticas entre os nitróxidos.

A interação dipolar é análoga ao acoplamento dipolar spin-núcleo. O hamiltoniano neste caso, desprezando anisotropia do tensor g é:

$$\hat{H}_d = g_e^2 \beta_e^2 [(\vec{S}_1 \cdot \vec{S}_2) r^2 - 3(\vec{S}_1 \cdot \vec{r})(\vec{S}_2 \cdot \vec{r})] r^{-5} \quad (20)$$

onde r é a distância intereletrônica. Para essa expressão é possível derivar um hamiltoniano de spin dipolar $\hat{H}_d$, através de um procedimento similar à interação dipolar hiperfino

$$\hat{H}_d = \vec{S} \overline{D} \vec{S} \quad (21)$$

onde $\vec{S} = \vec{S}_1 + \vec{S}_2$ e os elementos do tensor D são dados por:

$$D_{ij} = \frac{1}{2} g_e^2 \beta_e^2 \langle (r^2 \delta_{ij} - 3x_i x_j) / r^5 \rangle \quad (22)$$

o símbolo $\langle \rangle$ indica média sobre funções de onda eletrônicas.

A interação de troca ocorre quando as funções de onda eletrônicas se misturam. Pode ser descrita pelo operador:

$$\hat{H}_e = J \cdot \vec{S}_1 \cdot \vec{S}_2 \quad (23)$$

Os efeitos destes termos são importantes para birradicais⁽¹³⁾.

4. Análise dos Espectros de RPE

4.1. Espectros em solução

Para um radical livre para o qual o spin eletrônico interage através do acoplamento hiperfino com N núcleos de spin I_k . O hamiltoniano magnético é:

$$\hat{H} = \beta_e \vec{H} \vec{g} \vec{S} + \sum_{k=1}^N \vec{S} \cdot \vec{A}(k) \cdot \vec{I} \quad (24)$$

Se as espécies paramagnéticas são diluídas em um solvente de baixa viscosidade, então as reorientações moleculares rápidas devido ao movimento térmico fazem uma média nos termos anisotrópicos da hamiltoniana de spin.

A posição do espectro no campo e a grandeza dos desdobramentos hiperfinos são então determinados por valores médios dos elementos diagonais dos tensores $\vec{g}$ e $\vec{A}$.

Os níveis de energia do sistema podem ser obtidos em termos do hamiltoniano isotrópico:

$$\hat{H}_0 = g\beta_e H_0 S_z + \sum_{k=1}^N a_k (S_x I_{kx} + S_y I_{ky} + S_z I_{kz}) \quad (25)$$

Para o caso particular de um marcador de spin, em que o elétron interage com apenas um núcleo, que é o nosso caso, temos:

$$\hat{H}_0 = g\beta_e H_0 S_z + a(S_x I_x + S_y I_y + S_z I_z) \quad (26)$$

onde $g = \frac{1}{3} (g_{xx} + g_{yy} + g_{zz})$; $a = \frac{1}{3} (A_{xx} + A_{yy} + A_{zz})$

Como as interações hiperfinas são sempre muito menores que a energia da interação Zeeman, podemos usar teoria da perturbação para calcular os níveis de energia, sendo que o termo de interação hiperfina é usado como perturbação. As energias em primeira ordem são:

$$E = g\beta_e H_0 M_s + a M_s M_I \quad (27)$$

com $M_s = \pm 1/2$ e $M_I = -I, \dots, +I$

O campo de microondas induz transições de RPE, entre esses níveis obedecendo às regras de seleção: $\Delta M_s = \pm 1$, $\Delta M_I = 0$.

As diferenças entre os níveis de energia entre os quais ocorre transição é:

$$\Delta E(M_I) = g\beta_e H_0 + a M_I$$

Os espectros consistem de $2I + 1$ linhas igualmente espaçadas por uma distância a/h (em unidade de frequência ou $a/g\beta_e$ em unidades de campo).

A figura (4a) mostra os diagramas de níveis de energia no caso de um elétron interagindo com um núcleo de spin $I=1$ como é o caso do núcleo de ^{14}N em radicais nitróxido. Na parte b é mostrado o espectro de RPE correspondente.

Fig. 4 - a) Diagrama dos níveis de energia para um elétron interagindo com um núcleo de ^{14}N , com spin nuclear $I=1$.

b) Espectro da derivada da absorção para esse sistema.

4.2. Espectro em cristais orientados

Para obter a dependência angular do espectro dos radicais livres orientados em monocristais temos que calcular os níveis de energia do hamiltoniano completo⁽¹⁴⁾. Novamente consideraremos o caso particular de radicais nitróxidos para os quais $k=1$.

A aproximação $|A_{ij}| \ll g\beta_e H_0$ permite o uso da teoria de perturbação de primeira ordem para calcular os níveis de energia, e o valor encontrado para a diferença entre os níveis de energia:

$$\Delta E(M_I) = g_{ef} \beta_e H_0 + A_{ef} M_I \quad (28)$$

onde g_{ef} e A_{ef} são dados em relação aos eixos moleculares, usando os ângulos de Euler como anteriormente⁽¹⁵⁾.

$$g_{ef}^2 = g_{pp}^2 \sin^2 \beta \cos^2 \gamma + g_{gg}^2 \sin^2 \beta \sin^2 \gamma + g_{rr}^2 \cos^2 \beta \quad (29)$$

$$A_{ef}^2 = A_{pp}^2 \sin^2 \beta \cos^2 \gamma + A_{qq}^2 \sin^2 \beta \sin^2 \gamma + A_{rr}^2 \cos^2 \beta \quad (30)$$

Utilizando microonda de frequência fixa ν_0 , ocorrerão absorções em valores de campo dados por:

$$h\nu_0 = g_{ef}(\beta, \gamma) \beta_e H_0 + A_{ef}(\beta, \gamma) M_I \quad (31)$$

O espectro consiste de $2I+1$ linhas, igualmente espaçadas com separação $A_{ef}/g_{ef}\beta_e$, e distribuídas simetricamente em relação ao centro do espectro definido por g_{ef} .

A medida experimental de ΔE ⁽¹⁵⁾ pode determinar apenas os valores absolutos dos componentes principais do tensor hiperfino. Eles estão ligados à constante isotrópica pela relação:

$$a = \frac{1}{3}(A_{pp} + A_{qq} + A_{rr}) \quad (32)$$

A comparação entre o valor de a medido em solução e os valores principais do tensor permite-nos determinar o sinal relativo da parte isotrópica e da parte puramente anisotrópica. Esses dados conduzem a cálculos teóricos que permitem avaliar as densidades de carga nos eixos do radical nitróxido⁽¹⁶⁾.

5. Reorientação de Radicais em Soluções Viscosas

Quando radicais paramagnéticos são diluídos em uma solução viscosa, e imersos em um campo magnético externo, devido às flutuações térmicas do meio, esses radicais estão sujeitos a colisões com moléculas do solvente, e dessa forma, estão se reorientando constantemente.

Suponhamos que a orientação de um spin, quando o campo magnético externo é ligado, seja paralelo a ele. Devido às colisões sofridas com moléculas do meio, depois de um intervalo de tempo o spin não está mais paralelo ao campo externo.

Essa reorientação, no tempo, é feita de maneira aleatória. Depois desse mesmo intervalo de tempo a distribuição de spins em relação ao campo externo aplicado, é dada, como mostra a figura (5).

Fig. 5 - a) Trajetória seguida pela magnetização t seg depois que o campo foi desligado.

b) Distribuição de spin ao redor do campo magnético externo, t seg depois que o campo foi ligado.

O elétron desemparelhado do radical livre está sujeito a um campo externo constante, e a um campo, originado na interação dipolar com os núcleos, que depende da orientação do radical.

Pode-se portanto escrever a hamiltoniana de spin, como composta por duas partes:

$$\hat{H} = \hat{H}_0 + \hat{H}_1(t) \quad (33)$$

onde $\hat{H}_0$ parte constante, que é composta pelo termo de Zeeman e interação hiperfina isotrópica, e é responsável por linhas espectrais

finas, e o termo $\hat{H}_1(t)$ é a parte dependente do tempo, que é composta pelo termo dipolar anisotrópico. Este termo é responsável pela relaxação, e alargamento das linhas.

Como a intensidade da interação dipolar é muito menor que a do termo estático, pode-se tratá-la como perturbação.

Em medidas de ressonância magnética, a magnetização transversal, M_x , induz uma voltagem no detetor.

Para uma amostra, na qual existe número grande de spins, a voltagem no detetor será induzida pelo valor médio da magnetização transversal, $\langle M_x \rangle$, sendo que essa média é sobre todo o sistema de spins.

A magnetização transversal, pode ser dada por meio das equações de Bloch^(12,17), ou através do uso de matriz densidade, o que é mostrado de maneira bastante didática em⁽¹⁸⁾.

Usando as definições e argumentos desse livro⁽¹⁸⁾, a magnetização transversal média é dada por

$$\langle M_x \rangle = \text{Tr} \{ \rho M_x \} \quad (34)$$

onde ρ é a matriz densidade e é dada por:

$$\rho = \frac{e^{-E_i/kT}}{\sum_i e^{-E_i/kT}} \quad (35)$$

no estado de equilíbrio, os elementos da diagonal da matriz densidade dão as populações para os diferentes auto-estados da hamiltoniana $\hat{H}_0$ na equação (33).

No sistema de referência giratório, a variação da população dos autoestados no tempo é dado pela equação:

$$\frac{d\rho^*}{dt} = i \frac{1}{\hbar} \left[\hat{H}^*(t), \rho^* \right] \quad (36)$$

onde $\hat{H}^*(t)$ é a parte anisotrópica da hamiltoniana (33), no sistema giratório e varia aleatoriamente no tempo; essa variação aleatória obedece às leis da probabilidade, e ρ^* é a matriz densidade nesse sistema.

Essa variação aleatória, no tempo, faz com que a componente transversal da magnetização $\langle M_x \rangle$ decaia no tempo, devido à relaxação.

Pode-se correlacionar os valores médios da magnetização transversal no instante $t=\tau$ e no instante $t=0$, através da função de correlação:

$$G(\tau) = \overline{(\langle M_x(0) \rangle \langle M_x(\tau) \rangle)} = \overline{\text{tr} [M_x(0) M_x(\tau)]} \quad (37)$$

onde a barra significa média em todo conjunto de spin.

É oportuno definir a densidade espectral, como a transformada de Fourier da função de correlação:

$$j(\omega) = 2 \int_0^{\infty} G(\tau) \cos(\omega\tau) d\tau = \int_{-\infty}^{\infty} G(\tau) e^{-i\omega\tau} d\tau \quad (38)$$

Substituindo (37) em (38), obtêm-se a densidade espectral para o sistema estudado.

O sinal detetado em experimentos de RPE é a absorção, que é a parte imaginária da susceptibilidade magnética.

$$\chi'' = \frac{\bar{N} \chi_0 \omega}{2} j(\omega) \quad (39)$$

Dessa maneira, pode-se simular matematicamente os espectros de absorção magnética, conhecendo-se as funções de correlação para o sistema e fazendo a transformada de Fourier representada na eq. (38). A função de autocorrelação é fortemente dependente do modelo adotado para a reorientação dos radicais.

Os modelos mais usados para explicar reorientação de

radicais em um meio viscoso são:

a) Difusão rotacional browniana, no qual a molécula se reorienta continuamente no tempo.

b) Difusão livre, no qual a molécula gira livremente no tempo τ e depois reorienta instantaneamente. Este modelo leva em conta que $\tau \propto I/B$ onde I é o momento de inércia da molécula e B é o coeficiente de fricção do meio⁽¹⁹⁾.

c) Difusão por saltos no qual as moléculas têm uma orientação fixa por um tempo τ e então salta instantaneamente para uma nova orientação⁽²⁰⁾.

Para reorientação isotrópica, os tempos de correlação nos respectivos modelos são dados por⁽²⁸⁾:

$$a) \quad \tau_C^{-1} = \ell(\ell+1)D$$

$$b) \quad \tau_C^{-1} = \tau^{-1} \{ 1 - (2\ell+1)^{-1} \int_0^\pi d\theta \omega(\theta) | \sin(\ell+1/2)\theta / \sin\theta/2 | \}$$

onde $\omega(\theta)$ é uma função distribuição para passos difusivos por ângulos θ e é normalizada para $\int_0^\pi \omega(\theta) d\theta = 1$.

$$c) \quad \tau_C^{-1} = \ell(\ell+1)D / | 1 + \ell(\ell+1)D\tau |^{1/2}$$

D é a constante de difusão e no caso de movimento Browniano é dada pela relação de Stokes-Einstein.

Como foi dito anteriormente, os marcadores de spin podem ser usados como sondas paramagnéticas quando são difundidos no sistema que se deseja estudar, ou são usados como marcadores propriamente ditos quando são ligados ao sistema através de reação química. O movimento do anel paramagnético para esse segundo tipo de marcador, depende entre outras coisas da flexibilidade e tamanho da ligação entre o anel e a macromolécula⁽²¹⁾. Quando o marcador está ligado à macromolécula através de uma ligação lon

ga e flexível, ele possui bastante liberdade de movimento em condições de baixa viscosidade, assim como quando o marcador é usado como sonda, pode-se dizer que seu movimento é rápido e seu tempo de correlação é menor que 10^{-9} seg. O espectro desses marcadores consiste de linhas finas quando em solução como mostra a figura (6a):

Fig. 6 a e b) Espectros de RPE de um radical nitróxido:

- a) fracamente imobilizado
- b) fortemente imobilizado

O marcador cujo anel que contém o nitróxido está ligado à macromolécula por ligações rígidas, possuem movimento mais lento que os anteriores quando nas mesmas condições de viscosidade como pode ser mostrado na figura (6b). O espectro mostrado na figura (6a) é dito fracamente imobilizado ou "livre" e o da figura

(6b) é fortemente imobilizado. Como mostrado anteriormente, o movimento do marcador depende não só da ligação entre o marcador e a macromolécula, mas também da viscosidade e temperatura.

De maneira geral, o estado de movimento do marcador de spin, pode ser estudado em três regiões de movimento.

A definição dessas regiões é feita em função da magnitude das interações magnéticas $|\hat{H}_1(t)|$, como segue:

a) $|\hat{H}_1(t) \tau| \ll 1$ - Região de movimento rápido

Nessa região, o campo magnético local "sentido" pelo elétron flutuará rapidamente no tempo, e somente seu valor médio tomado em um intervalo de tempo longo comparado com as durações das flutuações será observado, e esta média é muito menor que o valor instantâneo do campo local, causando um estreitamento das linhas do espectro. Por esta razão, essa região é chamada de região de estreitamento devido ao movimento.

Quando o sistema é observado em um intervalo de tempo $t \sim \tau$, as variações na matriz densidade (36) são muito pequenas pois $T_1, T_2 \gg \tau$.

Nessa região, de movimento, são importantes as contribuições de transições que ocorrem em diferentes frequências:

- i - termos seculares, comutam com $\hat{H}_0$ (33) na aproximação de alto campo. São originados de termos I_z e S_z e seus produtos, e a frequência dessas transições é $\omega = 0$.
- ii - termos pseudo seculares, tem origem em termos de $\hat{H}_1(t)$ que comutam com $\hat{H}_0$, embora $\hat{H}_1(t)$ não comute com $\hat{H}_0$. São termos em $I_{\pm}$, e as transições obedecem regras de seleção $\Delta m_I = \pm 1$ e ± 2 . As frequências para essas transições são dadas por:

$$\omega_{\pm} = |\gamma_n H_0 \pm \frac{1}{2} \gamma_e \bar{a}|$$

onde γ_n e γ_e são razões giromagnéticas nuclear e eletrônica e $\bar{a}$, é a constante de acoplamento hiperfino isotrópico

iii - termos não seculares, resultam de termos que possuem $S_{\pm}$ e diferentes combinações $S_{\pm} I_{\mp}^{\pm}$, $S_{\pm} I_{\pm}^{\pm}$ e $S_{\pm} I_{\mp}^{\mp}$ e as transições obedecem a regras de seleção $\Delta m_S = \pm 1$, $\Delta m_I = 0, \pm 1, \mp 1$ e as frequências de transição são dadas por:

$$\omega_0 \text{ e } \omega_0 \pm \omega_{\pm}$$

e transições referentes a esses três termos podem ser vistas na fig. (7).

Redfield (22), Fraenkel e Freed (23), equacionaram essas contribuições em termos de largura de linha (15):

$$T_2^{-1}(m_I) = A + B m_I + C m_I^2 \quad (40)$$

onde m_I é o número quântico de spin nuclear, e A, B, C são dados por:

$$A = R_e \left\{ \frac{I(I+1)}{3} \gamma_e^2 (\Delta a + \delta a) (j(\omega_0) + 3j(\omega_{\pm}) + 6j(\omega_0)) + \right. \\ \left. + \frac{h \gamma_e^2}{16 \beta_e^2} H_O^2 (\Delta g + \delta g) (4j(0) + 3j(\omega_e)) \right\} \quad (41a)$$

$$B = R_e \left\{ \frac{h \gamma_e^2}{\beta_e^2} H_O^2 \Delta g (4j(0) + 3j(\omega_e)) + \Delta g (4j(0) + 3j(\omega_0)) \right\} \quad (41b)$$

$$C = R_e \left\{ \frac{h \gamma_e^2}{\beta_e^2} H_O^2 \Delta g (4j(0) + 3j(\omega_0)) + \delta g (4j(0) + 3j(\omega_0)) \right\} \quad (41c)$$

onde γ_e , β_e , H_O tem significado usual, $\Delta a = A_{zz} - \frac{1}{2} (A_{xx} + A_{yy})$, $\delta a = \frac{1}{2} (A_{xx} - A_{yy})$, Δg e δg são dados por expressões similares, e $j(\omega)$ é a densidade espectral (38) e é dada por:

$$\omega_1 = \omega_{a'a} = \omega_e - \gamma_e \bar{a} = \omega_e - 2b$$

$$\omega_2 = \omega_{b'b} = \omega_e$$

$$\omega_3 = \omega_{c'c} = \omega_e + \gamma_e \bar{a} = \omega_e + 2b$$

$$\omega_4 = \omega_{a'b} = \omega_e - \frac{1}{2} \gamma_e \bar{a} + \omega_n = \omega_e - b + \omega_n$$

$$\omega_5 = \omega_{b'a} = \omega_e - \frac{1}{2} \gamma_e \bar{a} - \omega_n = \omega_e - b - \omega_n$$

$$\omega_6 = \omega_{b'c} = \omega_e + \frac{1}{2} \gamma_e \bar{a} + \omega_n = \omega_e + b + \omega_n$$

$$\omega_7 = \omega_{c'b} = \omega_e + \frac{1}{2} \gamma_e \bar{a} - \omega_n = \omega_e + b - \omega_n$$

$$\omega_8 = \omega_{a'c} = \omega_e + 2\omega_n$$

$$\omega_9 = \omega_{c'a} = \omega_e - 2\omega_n$$

onde $\omega_e = |\gamma_e| H_0$ - frequência de Larmor do spin eletrônico

$\omega_n = |\gamma_n| H_0$ - frequência de Larmor do spin nuclear

$\bar{a}$ - constante de desdobramento isotrópico

FIG. 7 - Níveis de energia para $S = 1/2$, $I = 1$. A notação dos níveis é $|M_S, M_I\rangle$, com as 9 transições possíveis. As frequências ω_i para as i transições possíveis.

$$j(\omega) = \left(\frac{\tau}{1 + \omega^2 \tau^2} \right)$$

Os termos pseudo seculares e não seculares, causam alargamento nas linhas espectrais e, dependendo da precisão com que os espectros são obtidos, suas contribuições tornam-se muito importantes.

É importante notar ainda, que nessa região de movimento, os tempos de correlação são independentes do modelo de reorientação escolhido.

b) $|\hat{H}_1(t)| \tau \sim 1$ - Região de movimento intermediário:

Nessa região, as observações são realizadas em intervalo de tempo praticamente igual a duração das flutuações do campo magnético local "sentido" pelo elétron. ($\tau \sim T_2$)

Dessa forma, o campo local é grande, e seu efeito é significativo não só na largura da linha, mas também na posição das linhas hiperfinas externas ($m_I = \pm 1$) em relação à linha central. ($m_I = 0$).

Nos espectros característicos dessa região as linhas hiperfinas externas não são simétricas à linha central.

A solução proposta por Redfield, Fraenkel e Freed, não é mais válida, pois, $\hat{H}_1(t)$ não pode ser usado como perturbação.

Para essa região de movimento, Freed e col.^(24,25,26,27,28) propuseram um tratamento estocástico para equação de Liouville (36), no sentido de simular os espectros para determinação dos tempos de correlação⁽²⁹⁾. No apêndice II é apresentado um resumo desse procedimento e no apêndice III o programa desenvolvido pelo Dr. C.F. Polnaszeck, para simular espectros na região de tempo de correlação de $10^{-11} < \tau < 10^{-7}$ seg. A necessidade de simular os espectros nessa região de movimento deve-se a que não é possível obter-se o tempo de correlação com precisão, através da medida

de parâmetros diretamente dos espectros experimentais e a simulação permite além da obtenção de τ_c uma avaliação do modelo de reorientação do marcador.

Neste caso os espectros são sensíveis ao modelo de reorientação escolhido. Na verdade a reorientação molecular depende não somente de τ_c , mas do tamanho relativo e forma das moléculas de soluto e solvente.

A difusão browniana descreve satisfatoriamente os espectros de uma macromolécula em solução aquosa (até mesmo para $\tau_c > 10^{-7}$ seg.) enquanto que a difusão por saltos é favorecida quando os tamanhos do soluto e solvente são comparáveis.

Um método bastante interessante para medir tempo de correlação, é proposto por Goldman e colab.⁽³⁰⁾. Este método utiliza uma calibração empírica onde se usa a função:

$$S = A_z / A'_z$$

onde A_z é a metade distância entre as linhas hiperfinas externas dos espectros na condição estudada e A'_z é a mesma medida para uma situação de imobilização completa do marcador.

O tempo de correlação é obtido através da relação:

$$\tau_c = a(1 - S)^b \quad (42)$$

onde a e b são constantes cujos valores serão obtidos do ajuste da curva experimental $(1-S) \times \tau_c$ com a equação acima.

Um método semelhante é baseado na calibração usando a relação⁽³¹⁾:

$$\omega = \frac{\Delta h_i}{\Delta h'_i}$$

onde Δh_i são as larguras das linhas hiperfinas externas, medidas na meia altura em relação à linha de base, para os espectros na

condição estudada, e $\Delta h_i'$ são as larguras das mesmas linhas para o espectro totalmente imobilizado. Os índices i se referem às linhas de campo baixo e alto.

O tempo de correlação é dado por:

$$\tau_c = a(1 - \omega)^b \quad (43)$$

as constantes a e b são obtidas do ajuste da curva experimental $(1 - \omega) \times \tau_c$, com a equação acima.

c) $|\hat{H}_1(t) \tau| \gg 1$ - Região de movimento lento^(32,33)

Em medidas de tempo de correlação no intervalo de $10^{-11} \leq \tau_c \leq 10^{-7}$ são usados métodos lineares, isto é, a intensidade do sinal é proporcional ao campo da microonda, e a perda de coerência de fase do sistema de spin, isto é, a relaxação spin spin, é o processo de relaxação mais importante.

Para medir tempos de correlação maiores que 10^{-7} seg, o processo de relaxação spin rede torna-se muito importante. Os espectros obtidos com métodos convencionais para tempos de correlação dessa ordem, são tipicamente rígidos. As técnicas propostas usam efeitos não lineares, e a população dos níveis de energia não são mais dados pela lei de distribuição de Boltzmann, isto é, o sistema de spin está parcialmente ou totalmente saturado. Para que o sistema de spin retorne ao seu estado de equilíbrio, é necessário entregar energia para as moléculas do meio (rede) e, essa taxa de troca de energia é modulada pelo movimento das moléculas, ou então trocar a posição entre diferentes pacotes de spin no espectro de ressonância, que é conhecido como difusão espectral e é devida a mudanças no número quântico de spin nuclear, e às interações magnéticas anisotrópicas.

Um fato importante a ser levado em conta, é que sob con-

dições saturantes, o sistema é sensível à taxa na qual a varredura passa pela posição de ressonância. A taxa de varredura é determinada pela condição de passagem adiabática:

$$\frac{dH}{dt} \ll \gamma H_1^2$$

onde H é o campo magnético externo, γ razão giromagnética do elétron e H_1 é campo magnético da microonda.

Experimentalmente, a passagem rápida pela ressonância, foi resolvida com o emprego do campo de modulação, que além da função de detecção do sinal, passou a ser responsável pela criação de uma taxa própria de passagem de H pela ressonância, satisfazendo assim a condição de passagem rápida adiabática que pode agora ser escrita como:

$$\frac{dH}{dt} \propto \omega_m H_m$$

onde ω_m e H_m frequência e intensidade do campo de modulação.

Para radicais cujo movimento é muito lento, e o tempo de correlação é da ordem do tempo de relaxação spin rede, torna-se interessante usar frequência de modulação da ordem de T_1 , satisfazendo $\omega_m T_1 \sim 1$.

Vamos considerar o sistema de spin na base giratória. Nessa base, $\vec{H}_1$, campo da microonda é paralelo a X e $\vec{H}_0$ campo estático é paralelo a Z .

Além de $\vec{H}_0$, na direção Z , o observador vê um campo na direção oposta a $\vec{H}_0$, cujo valor é ω/γ , onde ω é a frequência de Larmor. Na ressonância no sistema giratório o campo estático $\vec{H}_0$ é compensado pelo campo ω/γ , ficando na direção do eixo Z apenas o campo de modulação H_m . A direção do campo H_m num ciclo de modulação muda da direção $+Z$ para a direção $-Z$.

No sistema giratório, a magnetização precessa em torno

do campo efetivo e a condição de passagem adiabática requer que o ângulo formado entre os vetores $\vec{M}$ e $\vec{H}_{ef}$ seja muito pequeno⁽¹⁴⁾.

Dessa forma, se a varredura do campo dc for suficientemente lenta para satisfazer a condição de passagem rápida adiabática ($\frac{dH}{dt} \ll \gamma H_1^2$), mas, for rápida em comparação com T_1 ($\frac{dH}{dt} \sim \frac{H_m}{T_1}$), então, na base giratória, a magnetização resultante cai ao longo do campo efetivo num tempo correspondente ao ciclo de varredura.

Se a condição $\omega_m T_1 \ll 1$ é válida, o sistema de spin relaxa, isto é, volta ao equilíbrio, no fim da varredura, a magnetização $\vec{M}$ volta a apontar para +Z, e será antiparalela ao campo efetivo, como mostra a fig. (8)⁽³⁴⁾:

Fig. 8-Representação esquemática do sistema de referência giratório, o campo de microonda H_1 , campo de modulação H_m e campo efetivo H_{ef} . Durante a varredura, sob condições adiabáticas, a magnetização $\vec{M}$ segue o campo efetivo.

O sinal detetado, será a projeção de M sobre $-X$. Assim, o sinal do pacote de spin estará 90° fora de fase em relação ao campo de modulação. Os pacotes de spin, com movimento muito lento, e que por causa disso, não acompanham o campo de modulação, deveriam ser detetados fora de fase. Esses pacotes de spin estão entre os pontos de retorno, e são os mais sensíveis à difusão espectral, e à transferência de saturação.

Para se compreender melhor o que sejam esses pontos de retorno, vamos supor que o marcador de spin fará um ângulo θ com a direção do campo magnético.

Fig. 9 - a) na parte superior, é mostrado um espectro de RPE convencional, para um marcador com tempo de correlação $\tau_c \ll 10^{-7}$ seg. e, b) a variação do campo de ressonância em relação ao ângulo molecular, em relação ao campo magnético externo. As posições $\theta=0$ e $\pi/2$ definem os pontos de retorno.

Consideremos, como visto acima que as interações anisotrópicas sejam dadas pela parte dipolar do termo hiperfino. Os valores do campo de ressonância H_{res} são dados por:

$$H_{\text{res}} = H_0 - n\bar{a} \left(-\frac{3}{2} \cos^2 \theta - \frac{1}{2} \right) \quad (44)$$

onde H_0 , campo central, n número quântico de spin-nuclear, $\bar{a}$ constante hiperfina e θ é o ângulo de orientação da molécula com o campo magnético externo. A posição do campo de ressonância varia com o ângulo de orientação (θ) sendo que os valores máximo e mínimo de variação do campo de ressonância com θ são dados por:

$$\frac{\partial H_{\text{res}}}{\partial \theta} = -3 \bar{a} \cos \theta \sin \theta \quad (45)$$

quando $\theta = 0$ $\partial H_{\text{res}} / \partial \theta = 0$

quando $\theta = \pi/2$ $\partial H_{\text{res}} / \partial \theta = 0$

Nesses dois pontos, a variação do campo de ressonância com o ângulo de orientação da molécula é nulo. Isso ocorre quando a molécula é paralela ao campo externo e quando a molécula é perpendicular a ele.

O espectro de um marcador com tempo de correlação $\tau < 10^{-7}$ seg é tipicamente um espectro rígido, como mostra a fig. (9 a). A variação do campo de ressonância em função do ângulo de orientação da molécula ($\partial H_{\text{res}} / \partial \theta$) é dada na fig. (9 b).

Na fig. (9 b) é mostrada a variação do campo de ressonância ($dH^{\text{res}}/d\theta$) em função do campo de ressonância H_{res} . Os pontos onde $(dH^{\text{res}}/d\theta) = 0$ são chamados pontos de retorno e que são vistos na figura quando $\theta = 0$ e $\pi/2$. É interessante notar que entre os pontos de retorno, onde $dH^{\text{res}}/d\theta$ é máximo, um pequeno acréscimo no ângulo θ causa grandes variações nos campos de ressonância. Essas regiões são melhores indicadores de difusão rotacional,

se existe substancial intensidade do sinal de EPR, nessa região, Dalton e col.⁽³⁵⁾ mostram que o movimento do marcador é lento, e à medida que o movimento do marcador aumenta, a intensidade nessas regiões diminui.

Esses pesquisadores mostraram que os melhores modos de detecção são dispersão primeiro harmônico fora de fase e absorção segundo harmônico fora de fase. Esses espectros mostram mudanças dramáticas entre os pontos de retorno.

Em geral os espectros de ST-RPE são obtidos para um sistema modelo no qual o tempo de correlação é obtido por exemplo usando a relação de Debye

$$\tau_c = \frac{4\pi a^3 \eta}{3kT} \quad (46)$$

e variando a viscosidade e/ou temperatura e obtendo-se então o valor de τ_c naquela condição. Thomas et al⁽³⁵⁾ fizeram esse estudo para o caso de hemoglobina marcada com NEM*. Desta maneira obtém-se uma calibração dos parâmetros de ST-EPR em função de τ_c para o sistema modelo e comparando esses parâmetros com os obtidos para o sistema que se quer investigar, pode-se obter uma estimativa de τ_c nesse sistema.

Espectro rígido - caracterizado por não apresentar movimento. Consideramos um sistema de spin, ao qual é aplicado um campo magnético estático H.

Suponhamos que a distribuição de spins em relação ao campo magnético seja dado pela fig. (10 a):

Fig. 10 - a) mostra uma semi esfera, representando esta distribuição. A faixa escura corresponde a pacotes de spin, cujas orientações são θ_1 e θ_2 com o campo magnético.
b) mostra a distribuição de spin em relação ao campo magnético externo.

um pacote de spins que se oriente formando um ângulo θ_1 com o campo estático, ressona em H_1 , bem como o pacote de spins formando ângulo θ_2 com H ressona em H_2 .

A distribuição de spin pode ser dada sobre uma esfera, como mostra a fig. (10b). Os pacotes de spins são representados pelas faixas escuras da figura.

De maneira semelhante, o espectro de pó pode ser pensado como originado de uma coleção de monocristais muito pequenos, cada um ressonando em um valor de campo magnético. A distribuição dos monocristais pode ser feita sobre a superfície de uma esfera, sendo que cada monocristal contribui para o sinal total. A componente de cada monocristal pode ser dada por:

$$F_k(H, \theta_0, \phi_0) \sim \frac{1}{\lambda} \left(\frac{2}{\pi} \right)^{1/2} \exp \{ -2 (H - H_k(\theta_0, \phi_0))^2 / \lambda^2 \} \quad (47)$$

sendo θ_0 e ϕ_0 as coordenadas polares que descrevem um setor da esfera, H_k é o valor do campo de ressonância para o k -ésimo monocristal, λ é a largura da distribuição entre os pontos de máximo e mínimo da derivada.

Os spins "sentem" não só o campo magnético externo, mas também o campo devido a núcleos próximos.

A superposição, poderada, das componentes, sobre todos os núcleos no monocristal é dada por.

$$F(H, \theta_o, \phi_o) = \frac{1}{N_k} \sum_{k=1}^{M_2} F_k(H, \theta_o, \phi_o) I_k(\theta_o, \phi_o) \quad , \quad (48)$$

sendo N_k o fator de normalização, e I_k é o valor da intensidade da linha devido ao k -ésimo núcleo.

Para uma amostra policristalina, a soma de todas as superposições, sobre uma esfera conduz ao espectro de absorção:

$$F(H) = \frac{1}{4\pi} \int_0^{2\pi} d\phi_o \int_0^{\pi} d\theta_o \sin \theta_o F(H, \theta_o, \phi_o) \quad (49)$$

No programa para simular o espectro de pó, desenvolvido por Lefebvre e Maruani⁽³⁶⁾, a forma de F_k pode ser gaussiana ou lorentiana (Apêndice I).

CAPITULO II

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Preparação dos Marcadores de spin

O marcador de spin 2,2,6,6-tetrametil-piperidina-1 oxil (TEMPO) foi obtido utilizando o método descrito por Rozantrev⁽⁵⁾, que consiste na oxidação do precursor 2,2,6,6-tetrametil-piperidina obtido da Aldrich Chem. Co.

Os marcadores 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametil-piperidina-1 oxil-per-deterado (PD-TEMPOL) e 4-maleimido-2,2,6,6-tetrametil-piperidina-1 oxil (NEM*) foram obtidos da Merck Co. e Aldrich Chem. Co. respectivamente.

Solução estoque desses marcadores foram preparadas diluindo-se o NEM* em acetona e os outros marcadores em metanol. Essa solução foi usada em amostras líquidas. Solução estoque de TEMPO diluída em sulfato de amônia 4M foi usada para marcação das monocristais. Na fig. 11 as estruturas dos marcadores são mostradas.

2. Preparação das amostras

Solução de Hemoglobinas (Hb) A e S, foram obtidos de sangue de portadores homozigotos dessas espécies de hemoglobinas. O plasma foi retirado e em seguida centrifugou-se as hemáceas várias vezes em solução salina isotônica (0,9% de NaCl), aspirando o sobrenadante e desprezando-o. Os eritrocitos assim obtidos, foram lizados por congelamento, e as membranas separadas da solução de hemoglobina, por centrifugação à 20.000 rpm por 40 minutos. Após essa etapa, o sobrenadante (solução de hemoglobina) é aspirado e utilizado, sendo desprezadas as membranas.

Fig. 11 - Marcador de spin usadas nesse trabalho: I - TEMPO; II - PD-TEMPOL ;
III - TEMPO-MALEIMIDA (NEM*)

Soluções de mioglobina de baleia (Mb) e lisozima foram preparadas dissolvendo essas proteínas, adquiridas da Sigma Chem. Co. em tampão fosfato 0,05M pH 7.0 de modo que as concentrações das soluções ficaram em torno de 10%.

A marcação das soluções de hemoglobina com TEMPO e PD-TEMPOL, foram realizadas de acordo com o seguinte procedimento : uma alíquota da solução estoque do marcador em metanol, foi seca, sob fluxo de N_2 , e posteriormente diluída por adição da solução de proteína. A concentração final de marcador foi de $2 \times 10^{-4} M$ no caso de PD-TEMPOL e $8 \times 10^{-4} M$ no caso do TEMPO.

A marcagem das soluções de hemoglobina, mioglobina e lisozima com NEM*, foram realizadas como segue: uma alíquota do marcador em acetona, foi seca em fluxo de N_2 , e diluída posteriormente, adicionando a solução de proteína. A reação do marcador com a proteína foi feita à temperatura de $4^\circ C$, por 48 horas, sob agitação constante. O excesso de marcador foi retirado, passando a solução de proteína com marcador em uma pequena coluna da Sephadex G-25, que é centrifugada, como descrito em^(37,38). Desta maneira a

concentração da proteína marcada praticamente não se altera.

Monocristais de Hb - Cristais de Hb foram crescidos à temperatura ambiente, pelo método de Perutz⁽³⁹⁾, utilizando solução preparada com 2 volumes de K_2HPO_4 (4M) e 1 volume de NaH_2PO_4 (4M). Os monocristais assim obtidos são tetragonais e têm a forma externa de bipirâmides, e pertencem ao grupo cristalográfico $P_{4,2,1}$ (40, 41), com quatro moléculas por cela unitária, e eixo C coincidente com o eixo maior da bipirâmide.

Os monocristais foram marcados por difusão, incubando-os em solução concentrada de sulfato de amônio, contendo o marcador à 40°C, por um tempo suficiente para que os monocristais apresentassem final tratável.

Depois do período de incubação, os monocristais foram lavados em solução de sulfato de amônio, para remover os marcadores na superfície do cristal.

Amostras policristalinas de Hb foram obtidas secando os monocristais, previamente marcados com TEMPO, sob fluxo de nitrogênio seco, e então triturando-os e secando novamente. Devido à baixa pressão de vapor do marcador, a secagem a vácuo não foi realizada.

Amostras liofilizadas de mioglobina e lisozima marcadas previamente com NEM*, e Hb marcado com TEMPO e PD-TEMPOL foram obtidas em liofilizador construído juntamente com o Prof. Márcio Francisco Colombo no Campus da UNESP em São José do Rio Preto, cujo diagrama é mostrado na fig. (12), e cujo fundamento físico é a sublimação da água de microcristais da proteína, que ocorrem abaixo do ponto eutético da solução.

Amostras de lisozima e mioglobina em diferentes graus de hidratação foram obtidos através da secagem completa das proteínas liofilizadas, seguida da hidratação gradual

em soluções salinas concentradas, de unidades conhecidas. A quantidade de água absorvida é determinada gravimetricamente^(61,62).

Fig. 12 - Esquema representando as partes principais do liofilizador construído. A é uma câmara onde é colocada a amostra, B é um "trap" para água. Este "trap" é refrigerado por um compressor de geladeira. O sistema é ligado a uma bomba de vácuo (mecânica).

3. Medidas de RPE

Os espectros de RPE convencional foram obtidos em um espectrômetro Varian modelo E-109. Para medidas de variação angular dos monocristais foi utilizada cavidade cilíndrica Varian E-233. Nessas medidas, utilizou-se potência de 10 mW e campo de modulação de 1,6G., e frequência de modulação de 100 KHz. Espectros de variação angular foram obtidos também, com ponte de microondas em banda Q. Para essas medidas, os monocristais foram colocados na extremidade de uma haste de cobre, encapsulada com uma luva de te

flon, com uma gota do líquido mãe, para evitar que os cristais se cassem e sofressem danos. A extremidade dessa haste metálica, é inclinada 15° com a horizontal. Esse ângulo é idêntico ao formado entre as faces do cristal e seu eixo maior, permitindo dessa maneira, mesmo sem usar goniometro, que o erro na orientação dos monocristais seja pequeno.

Espectros de variação angular à temperatura de N_2 líquido, foram obtidas utilizando criostato, cuja construção está descrita em ⁽⁴²⁾. Nessas medidas, foi muito importante congelar primeiro a amostra, e só depois então fazer vácuo no sistema. Este procedimento evita que os cristais sejam desidratados e danificados.

As medidas de variação térmica de monocristais, solução e amostras policristalinas e liofilizadas, foram obtidas com cavidade retangular Varian E-248, munido de acessório controlador de temperatura Varian E-257. A temperatura foi monitorada com Termopar cobre-constantan, conectado a um potenciômetro Fluck. A precisão das medidas foi de $\pm 0,5^{\circ}C$. A potência usada nessas medidas foi de 2 mW, e campo de modulação de 1,0 G.

Os espectros de transferência de saturação foram obtidos, primeiro ajustando a fase do sinal do 2º harmônico obtido com campo de modulação de 5,0 G, modulação de 50 KHz e detecção de 100 KHz e 180° defasado em relação ao sinal de RPE convencional e 1 mW de potência. Esse ajuste de fase é realizado, minimizando o sinal da própria amostra (self-null) ⁽³⁵⁾, isto é, usando potência baixa, 1 mW, onde não ocorre saturação do sinal. Os espectros são obtidos com os mesmos parâmetros, do espectrômetro, utilizados no ajuste de fase, mas com potência de 63 mW.

Para os espectros de ST-RPE de Hb liofilizada marcada com TEMPO e PD-TEMPOL, os espectros foram obtidos também na potência de 30 mW, e o ajuste da fase foi feito com potência de 0.1 mW

uma vez que a baixa temperatura a amostra satura mais facilmente (T_1 é mais longo).

4. Análise dos Espectros

4.1. Ajuste das curvas de variação angular

O ajuste das curvas de variação angular dos marcadores em monocristais de Hb, foram feitas através do método descrito por Farach e Poole⁽¹⁷⁾.

Este usa as funções descritas nas equações (44) e (45) para gerar as curvas da dependência angular:

$$g(\theta)^2 = P_i^2 \cos^2 \theta + Q_i^2 \sin^2 \theta + 2 N_i \sin \theta \cos \theta \quad (44)$$

$$K(\theta)^2 = P'_i{}^2 \cos^2 \theta + Q'_i{}^2 \sin^2 \theta + 2 N'_i \sin \theta \cos \theta \quad (45)$$

onde: $i = 1, 2, 3$, corresponde aos 3 planos gerados pela rotação de Euler para o cristal, P_i são os valores de g^2 em $\theta = 0$. Q_i são os valores de g^2 para $\theta = 90^\circ$ ambos medidos dos gráficos de $H \times \theta$. N_i é um valor tentativa, e corresponde àquele que dá o melhor ajuste entre as curvas teórica, gerados com equações (44) e a experimental. De maneira similar são obtidos os valores para P'_i , Q'_i e N'_i .

Esses valores nos três planos, determinam uma matriz que corresponde ao tensor g^2 não diagonal, mas simétrica.

A diagonalização da matriz g^2 , conduz aos valores dos três componentes principais do tensor g^2 .

$$g_{\text{diag}}^2 = \begin{pmatrix} g_{xx}^2 & 0 & 0 \\ 0 & g_{xx}^2 & 0 \\ 0 & 0 & g_{xx}^2 \end{pmatrix} = R g^2 R^{-1} =$$

$$= R \begin{pmatrix} [P_2 \equiv Q_3] & N_3 & N_2 \\ N_3 & [P_3 \equiv Q_1] & N_1 \\ N_2 & N_1 & [P_1 \equiv Q_2] \end{pmatrix} R^{-1} \quad (46)$$

onde: R é a matriz dos cossenos diretores do sistema de coordenadas cristalográfico abc, em relação ao sistema de eixos principais xyz fixo na molécula de marcador.

De modo similar, a matriz K^2 , construída com os valores P'_i , Q'_i e N'_i da equação (45), fornece a matriz na diagonal A^2 , quando operado à esquerda e a direita com a inversa da diagonal, como segue:

$$A^2 = g_{\text{diag}}^{-1} K^2 g_{\text{diag}}^{-1} = g_{\text{diag}}^{-1} \begin{pmatrix} |P'_2 \equiv Q'_3| & N'_3 & N'_2 \\ N'_3 & |P'_3 \equiv Q'_1| & N'_1 \\ N'_2 & N'_1 & |P'_1 \equiv Q'_2| \end{pmatrix} g_{\text{diag}}^{-1} \quad (47)$$

e a matriz A^2 pode ser diagonalizada por um processo idêntico ao descrito acima

$$A^2_{\text{diag}} = R' A^2 R'^{-1} \quad (48)$$

onde R' é a matriz dos cossenos diretores do sistema cristalográfico abc, em relação ao sistema de eixos principais xyz, fixo na molécula do marcador.

4.2. Análise de Espectros Rígidos

A análise dos espectros rígidos foi realizada através de simulação dos espectros de radicais paramagnéticos diluídos em matriz rígida. Essa simulação é necessária para se obter as com-

ponentes dos termos magnéticos do marcador em diversas soluções, e compará-los com os valores obtidos da variação angular. O método usado nessas simulações é o proposto por Lefebvre e Maruani⁽³⁶⁾ que consiste basicamente da suposição de uma distribuição gaussiana ou lorentzianas de spins ressonantes sobre uma esfera ou parte dela. O sinal de RPE neste caso corresponde à soma de todas as possíveis orientações obtida através da integração que é feita usando a regra de Simpson. Os limites desta integração dependem da orientação dos tensores g e A .

No apêndice I o programa usado neste modelo está apresentado. Como pode-se notar neste caso não existe nenhum movimento dos radicais nitróxidos.

4.3. Análise dos Espectros na região de estreitamento devido ao movimento.

Essa região de movimento é caracterizada pela simetria das linhas hiperfinas externas em relação à linha central⁽⁴⁴⁾. De acordo com Carrington e McLachlan⁽¹²⁾, as linhas individuais nessa região, são lorentzianas. As análises dos espectros nessa região do movimento foram realizadas baseada na teoria de estreitamento devido ao movimento desenvolvida por Redfield⁽²²⁾ e Freed e Fraenkel⁽²³⁾. Nesse caso, dos espectros de RPE é possível obter-se diretamente parâmetros que determinam o tempo de correlação.

4.3.1. Análise através da largura de linhas.

A largura das linhas hiperfinas para um radical em solução está relacionado com as densidades espectrais para frequência seculares, não seculares e pseudo seculares, como mostrado em^(23,15) e para o movimento isotrópico, é dada por:

$$\Delta H(m) = A + Bm + Cm^2 \quad (49)$$

onde os m são as projeções do momento magnético nuclear na direção z , ié, $m = 0, \pm 1$, e ΔH as larguras de linha pico a pico, medidas dos espectros. Os termos B e C , são definidos em relação à largura central e das amplitudes da m -ésima linha hiperfina, como segue:

$$B = \frac{1}{2} \Delta H_0 \left(\sqrt{\frac{I_0}{I_1}} - \sqrt{\frac{I_0}{I_{-1}}} \right) \quad (50)$$

$$C = \frac{1}{2} \Delta H_0 \left(\sqrt{\frac{I_0}{I_1}} + \sqrt{\frac{I_0}{I_{-1}}} - 2 \right) \quad (51)$$

Uma outra maneira de se definir os parâmetros B e C é através das densidades espectrais como nas equações (40-b,c). O uso das equações 50 e 51 contém um erro na determinação de ΔH_0 devido ao alargamento não homogêneo de protons. As equações (41-b e c) também contém um erro uma vez que os tensores g e A são determinados com imprecisão especialmente devido a pouca resolução na região central do espectro rígido. Devido a esses erros as constantes B e C são aproximadas por (45):

$$B = 0,103 \omega_e \left[\Delta g \Delta a + 3(\delta g)(\delta a) \right] \left(j(0) + \frac{3}{4} j(\omega_e) \right) \quad (52)$$

$$C = 0,18 \times 10^6 \left[(\Delta a)^2 + 3(\Delta a)^2 \right] \left(j(0) - \frac{3}{8} j(\omega_a) - \frac{1}{8} j(\omega_e) \right) \quad (53)$$

onde Δa , δa , Δg , $\delta(g)$ e $j(\omega)$ foram definidos no capítulo anterior para as equações (40-a,b,c).

As componentes do tensor hiperfino, medidas em Gauss, e as do tensor g são determinadas da simulação do espectro rígido, $\omega_a = 8,8 \times 10^6 a_N$ e a_N é a constante de desdobramento isotrópico, medido diretamente do espectro e $\omega_e = 2\pi \nu_e$, sendo que ν_e é a frequência da microonda.

Dessa maneira, obtêm-se um valor de tempo de correlação para o parâmetro B (τ_B) e um tempo de correlação para o parâmetro C (τ_C) que podem ou não serem iguais.

4.3.2. Medida da largura de linha

A linha central do espectro de RPE, foi registrada com varredura de 10 G.

O erro na medida é de 3 centésimos de Gauss. A modulação usada foi menor ou igual à um décimo da largura de linha pico à pico. Esse campo de modulação, não deve introduzir alargamento devido à sobre modulação⁽⁴⁶⁾. A potência utilizada foi de 1mW, bem abaixo da potência necessária para maximizar o sinal.

O estudo da forma da linha foi feito por simulação, usando um programa que gera linha de forma lorentziana e/ou gaussiana.

4.3.3. Simulação dos espectros

Simulação dos espectros com tempos de correlação nas regiões de movimento rápido e intermediário foram realizados através do método proposto por Freed e cols⁽²⁹⁾ para o qual foi desenvolvido programa pelo Dr. C.F. Polnaszeck, (Apêndices II. III).

5. Análise dos Espectros de ST-RPE

A análise dos espectros de RPE, usando a técnica de transferência de saturação, foram realizadas, através de medidas dos parâmetros definidos nos pontos de retorno e nas regiões entre os pontos de retorno, como definidos por Thomas e cols⁽³⁵⁾.

Na região de campo baixo e central, os parâmetros usados são: L''/L e C'/C respectivamente, sendo L'' , L , C' e C são definidos na figura (13) a seguir:

Fig. 13 - Curvas de calibração dos parâmetros medidos nos espectros de ST-RPE⁽³⁵⁾ e tempos de correlação correspondentes. Extraído de Thomas e cols⁽³⁵⁾

A posição de L'' é definida arbitrariamente, e neste trabalho foi usada definição de Robinson e Dalton⁽⁴⁷⁾. L'' está há 1/3 da distância entre L e a região média dos pontos de intercâmbio entre componentes x e y dos tensores $\bar{g}$ e $\bar{A}$ na região central do espectro. Usando as curvas de calibração de Thomas e cols⁽³⁵⁾ apresentadas na figura abaixo, podemos ver como os parâmetros medidos experimentalmente mudam em função do tempo de correlação τ_c .

CAPÍTULO III

RESULTADOS EXPERIMENTAIS

1. Variação Angular em monocristais à Temperatura ambiente

Os espectros de variação angular do monocristal de hemoglobina S, marcado com TEMPO, em algumas orientações, nos planos ac e bc, são mostrados nas figs. (14a,b). Nota-se, dos espectros, a existência de três populações de marcadores, com estrutura bem resolvida na região de baixo campo, mas com má resolução na região de campo alto.

Da análise dos espectros de RPE e da variação angular $H \times \theta$, não foram observadas diferenças entre monocristais de HbS e HbA marcados com TEMPO. Por isso a análise dos parâmetros foi feita em detalhe para cristal de HbS.

Dessas três populações, duas são anisotrópicas, ao passo que uma terceira, apresenta comportamento isotrópico. A relação entre as intensidades do sinal isotrópico e dos anisotrópicos é de 3:1 em boa parte das orientações. Em algumas orientações, está presente uma quarta população, mas sua intensidade é muito pequena em relação às demais e além disso devido as linhas serem largas a resolução não é suficiente para acompanhar o seu comportamento angular. Esse sinal não foi analisado em detalhe.

A constante de acoplamento hiperfino para o sinal isotrópico, medida nos espectros é de 16,5G e $g_{iso} = 2,004$.

As figs. (15a,b,c) mostram os pontos experimentais e ajustes teóricos das dependências angulares de $H \times \theta$ nos três planos cristalográficos. As curvas, cheias, das figuras foram obtidas através de ajustes das equações (50) e (51), para os tensores $\bar{g}$ e $\bar{A}$, usando o método dos mínimos quadrados.

Esses ajustes fornecem os valores das componentes dos

Fig. 14a

Fig. 14b

Fig. 14 ab) - Espectros de Monocristal de HbS. (TEMPO, banda X, para algumas orientações: a, no plano ac, e b, no plano bc.

Fig. 15a

Fig 15b

Fig. 15c

Fig. 15 abc) - Pontos experimentais e ajustes de $H \times \theta$, (linha cheia), obtidos para monocristal de HbS-TEMPO, a, plano ca , b, plano ab e c, plano bc .

tensores g^2 e A^2 no sistema de coordenadas cristalográfico abc.

Nesse sistema são montadas as matrizes (52), que diagonalizadas pelo método de Jacobi, fornecem os valores diagonais para o tensor g .

A matriz do tensor g^2 no sistema abc obtida desta forma é a seguinte:

$$g_{abc}^2 = \begin{pmatrix} 4.0127 & -0.004 & 0.004 \\ -0.004 & 4.0148 & 0.008 \\ 0.004 & 0.008 & 4.0149 \end{pmatrix}$$

Diagonalizando esta matriz obtemos a matriz do tensor g^2 diagonal no sistema principal xyz:

$$g_{xyz}^2 = \begin{pmatrix} 4.0120 & 0 & 0 \\ 0 & 4.0240 & 0 \\ 0 & 0 & 4.0320 \end{pmatrix}$$

e também as matrizes dos cosseno diretores utilizados para diagonalizar a matriz g^2 :

$$\begin{matrix} & z & y & x \\ \begin{matrix} a \\ b \\ c \end{matrix} & \begin{pmatrix} 0.520 & -0.854 & 0.002 \\ 0.605 & 0.370 & 0.704 \\ -0.602 & -0.365 & 0.710 \end{pmatrix} \end{matrix} = R_g$$

A matriz que diagonaliza os tensores g^2 e g é a mesma. Por isso os valores principais do tensor g são as raízes quadradas dos valores de g_{xyz}^2 , ou seja:

$$g_{xx} = 2,008 \pm 0,001$$

$$g_{yy} = 2,006 \pm 0,001$$

$$g_{zz} = 2,003 \pm 0,001$$

$$g_{iso} = \frac{1}{3} (g_{xx} + g_{yy} + g_{zz}) = 2,0056$$

Através da matriz diagonal g e da matriz K^2 , obtida dos ajustes usando (51) obtêm-se os valores principais de A . A matriz do tensor A^2 no sistema abc obtida foi a seguinte:

$$A_{abc}^2 = \begin{pmatrix} 21.197 & 15.241 & -16.984 \\ 15.241 & 18.623 & -13.257 \\ -16.984 & -13.257 & 21.204 \end{pmatrix}$$

Diagonalizando essa matriz obtêm-se A^2 diagonal:

$$A_{xzy}^2 = \begin{pmatrix} 50.815 & 0 & 0 \\ 0 & 3.612 & 0 \\ 0 & 0 & 6.597 \end{pmatrix}$$

A matriz dos cossenos diretores que diagonaliza a matriz A^2 , é:

$$\begin{matrix} & z & y & x \\ \begin{matrix} a \\ b \\ c \end{matrix} & \begin{pmatrix} 0.610 & 0.792 & -0.025 \\ 0.531 & -0.385 & 0.755 \\ -0.588 & 0.474 & 0.655 \end{pmatrix} \end{matrix} = R_A$$

Os valores principais do tensor A obtidos de forma análoga ao g são:

$$A_{xx} = 7,6 \text{ G} \pm 1,0 \text{ G}$$

$$A_{yy} = 10,4 \text{ G} \pm 1,0 \text{ G}$$

$$A_{zz} = 28,5 \text{ G} \pm 1,0 \text{ G}$$

$$A_{iso} = a = \frac{1}{3} (A_{xx} + A_{yy} + A_{zz}) = 15,4 \text{ G}$$

Os eixos principais do tensor g são: z na direção do orbital $2p\pi$, x paralelo à ligação $N-O$, e y perpendicular à x e z .

Os ângulos formados entre as componentes de g e A são dados pelo produto escalar entre os componentes dos eixos principais obtidos das matrizes R_g e R_A . No nosso caso temos:

$$\angle g_{xx} - A_{xx} = 86,4^\circ$$

$$\angle g_{yy} - A_{yy} = 88,2^\circ$$

$$\angle g_{zz} - A_{zz} = 10,5^\circ$$

e são mostrados na figura (16)

Fig. 16 - Orientação relativa entre os eixos principais dos tensores g e A.

A fim de melhorar a resolução na região espectral do campo alto foram realizadas medidas em banda Q. Na fig. (17) são mostrados os espectros de RPE para algumas orientações no plano ac. Esses espectros mostram uma maior separação das linhas correspondentes a $M_I = -1$ em relação ao resto do espectro e também uma melhor resolução na região central ($M_I = 0$) em relação aos espec-

Fig. 17 - Espectros de monocristal de HbS.-TEMPO, bandaX para algumas orientações do plano ac.

tros em banda X. De uma maneira mais clara as diferenças em relação a banda X podem ser observadas nos gráficos da variação angular nos três planos cristalográficos (figs. 18 a,b,c). Nessas figuras nota-se claramente que o sinal isotrópico deslocou-se para campo baixo, isto é, para valores de g maiores. Isso faz com que os sinais anisotrópicos em campo alto fiquem bem separados do sinal isotrópico. Esse efeito deve-se ao fato de que em banda Q a separação em g é maior enquanto que a separação hiperfina não deve mudar (em comparação com o valor em banda X). Desta forma pode-se ver claramente que $g_{iso} - g_{aniso} > 0$. Por outro lado a passagem de banda X para banda Q produz um alargamento nas linhas de RPE que no nosso caso já são bastante largas em banda X. Devido a esse efeito a resolução dos sinais anisotrópicos em alto campo é pior do que em banda X. No caso de linha central ($M_I = 0$) a separação do sinal isotrópico dos anisotrópicos também fica bem evidente. Por outro lado a variação angular nessa região espectral dos sinais anisotrópicos é relativamente pequena sugerindo que a anisotropia do g é muito pequena e/ou que o alargamento das linhas é comparável com essa anisotropia impedindo uma maior resolução. Finalmente a componente de campo baixo ($M_I = +1$) praticamente não muda passando de banda X a banda Q.

A constante de acoplamento hiperfino para o sinal isotrópico neste caso é 15,75 gauss e $g_{iso} = 2,010$.

As variações angulares em banda Q foram ajustadas de maneira análoga ao caso de banda X. Os valores principais para os tensores g e A obtidos são:

$$\begin{array}{ll}
 g_{xx} = 2,005 \pm 0,001 & A_{xx} = 10,6 \pm 2 \text{ gauss} \\
 g_{yy} = 2,004 \pm 0,001 & A_{yy} = 13,7 \pm 2 \text{ gauss} \\
 g_{zz} = 2,004 \pm 0,001 & A_{zz} = 30,6 \pm 2 \text{ gauss} \\
 g_{iso} = \frac{1}{3} (g_{xx} + g_{yy} + g_{zz}) = 2,004 & A_{iso} = \frac{1}{3} (A_{xx} + A_{yy} + A_{zz}) = 18,3 \text{ gauss}
 \end{array}$$

Fig. 18a

Fig. 18b

Fig. 18c

Fig. 18 abc) - Pontos experimentais, obtidos das variações angulares, para o monocristal de HbS.TEMPO, banda Q, em algumas orientações. As linhas cheias representam o marcador isotrópico (a), plano ab, (b), plano bc e (c), plano ac.

Como pode-se notar a anisotropia em g é muito pequena e isto pode-se dever a má resolução sendo que os valores do desdobramento hiperfino são maiores do que os valores obtidos em banda X.

Considerando a imprecisão no valor medido de a_{iso} cerca de 1 gauss obtemos que a passagem de banda X a banda Q não afeta esse valor que é igual a $a_{iso} = 16,1$ gauss. Por outro lado g_{iso} aumenta de 2,004 para 2,010 ao passar de banda X para banda Q. No caso do sinal anisotrópico temos que o desdobramento hiperfino médio aumenta ao passar de banda X para banda Q enquanto que o valor de g médio praticamente mantém-se ao mesmo.

Embora não tivéssemos encontrado diferença no comportamento dos monocristais de HbA e HbS marcados com TEMPO, um fato muito interessante foi a constatação de anisotropia na dependência angular para duas populações de marcadores. Considerando que o marcador usado foi difundido no cristal, e não está ligado covalentemente.

2. Variação Angular à temperatura de N_2 líquido

No sentido de estudar essa anisotropia na dependência angular de TEMPO em monocristais, espectros foram obtidos à 77°K.

Na fig. (19), são mostrados espectros em algumas orientações no plano bc. É possível observar a presença de dois sinais: um isotropico, intenso e que dá um espectro de pó, misturado a um sinal ligeiramente anisotrópico, a resolução é prejudicada porque a largura da linha do espectro isotrópico é muito maior que o deslocamento das linhas devido à diferença em g para os dois marcadores. Essa resolução pobre, impede que se faça o ajuste dos pontos experimentais $H \times \theta$.

Enquanto os espectros monocristal à temperatura ambiente tem largura de linha que varia de 3,0 à 5,0 G, os espectros à

Fig. 19 - Espectros do monocristal de HbS(TEMPO), em banda X, à 77°K , para algumas orientações do plano bc.

Fig. 20 - Gráfico da área sob a região de baixo campo, em função de θ , dos espectros de monocristal de HbS-TEMPO, 77°K.

77°K mostram que a largura da linha para a mesma orientação aumenta para 10,0 à 12,0 G, sendo essa mudança reversível, evidenciando um processo de estreitamento devido ao movimento.

A variação angular da área aproximada, sob a linha na região de baixo campo, para o plano bc é mostrada na fig. (20).

A área sob o sinal foi calculada através do produto da intensidade da linha em relação à linha de base pelo quadrado da largura tomada na meia altura. Esse gráfico mostra um máximo próximo de C, indicando um maior número de marcadores nessa orientação, sendo que a distribuição é do tipo $\cos 2\theta$.

O espectro para o monocristal à 77°K , na orientação onde os sinais se sobrepõem, foi simulado pelo método de Lefebvre e Maruani⁽³⁶⁾.

Apesar da má resolução na região central do espectro, devido ao alargamento não homogêneo, e superposição nessa região foi possível, usando forma de linha gaussiana, simular os espectros, e determinar os componentes dos tensores g e A:

$$g_{xx} = 2,008$$

$$g_{yy} = 2,006$$

$$g_{zz} = 2,001$$

$$g_{iso} = 2,005$$

$$A_{xx} = 6,0 \text{ G}$$

$$A_{yy} = 7,3 \text{ G}$$

$$A_{zz} = 36,5 \text{ G}$$

$$A_{iso} = 16,6 \text{ G}$$

Na fig. (21a) é mostrado o espectro simulado pelo método de Lefebvre-Maruani, usando forma de linha gaussiana, e os componentes de g e A acima, e na fig. (21b) o espectro simulado com o mesmo procedimento mas usando componentes g e A obtidos da

FIG. 21a - Espectro rígido simulado⁽¹⁶⁾ com parâmetros: $g_{xx} = 2,009$, $g_{yy} = 2,006$, $g_{zz} = 2,001$, $A_{xx} = 6,3(G)$, $A_{yy} = 7,3(G)$, $A_{zz} = 36,5(G)$ e forma de linha gaussiana.

FIG. 21b - Espectro rígido simulado⁽¹⁶⁾ usando
mesmos parâmetros obtidos da varia-
ção angular do monocristal à tempe-
ratura ambiente - forma de linha
gaussiana.

Fig. 22 - Espectros monocristal de HbS à várias temperaturas em uma orientação qualquer.

Fig. 23 - Gráfico da variação da área sob cada um dos três sinais na região de campo baixo, dividido pela área total à temperatura inicial. Círculos cheios representam os marcadores anisotrópicos (1) e (3) e círculos vazios marcadores isotrópicos (2).

variação angular do monocristal à temperatura ambiente. É nítido que, esse último espectro é bastante diferente do espectro experimental.

Os valores das componentes dos tensores g são muito próximos, mas as componentes do tensor A mudam consideravelmente. O valor médio da constante hiperfina para os espectros congelados ($A_{iso} = 16,6$ gauss) aumenta em relação ao valor médio da constante hiperfina para o sinal anisotrópico do monocristal à temperatura ambiente ($A_{iso} = 15,4$ gauss).

2.1. Variação Térmica no Monocristal

Espectros do monocristal marcado, em uma orientação desconhecida, e para temperaturas entre 10°C e 40°C , são mostrados na fig. (22). Pode ser visto que o aumento de temperatura aumenta a intensidade das quatro linhas, até a temperatura de aproximadamente 30°C . Para temperaturas maiores que 30°C a intensidade da linha que possui desdobramento hiperfino de $16,5$ G, portanto correspondente ao sinal isotrópico, aumenta, ao passo que as intensidades das demais linhas diminuem, e para temperaturas maiores que 36°C somente o sinal isotrópico é bem resolvido, sendo que as outras linhas praticamente somem.

O gráfico da área medida sob cada um dos sinais, é proporcional à população de spins que dá origem ao sinal. A fim de minimizar o erro causado pela variação do fator Q da cavidade, devido à variação na temperatura⁽⁴⁶⁾ a área da curva, para cada sinal, na região de baixo campo, em cada temperatura, foi dividida pela área total em cada temperatura, e esse valor é mostrado em gráfico em função de T (fig. 23). Para temperaturas maiores que 30°C , a população relativa dos sinais anisotrópicos caem, igualmente, enquanto que a população relativa do sinal isotrópico aumenta.

3. Simulação dos espectros de TEMPO em monocristais de Hb à temperatura ambiente

Na tentativa de entender a diferença entre os valores dos tensores g e A para o monocristal, obtidos nas duas variações angulares (temperatura ambiente e 77°K) os espectros à temperatura ambiente, foram simulados utilizando o método de Freed e colaboradores^(28,29). Para essas simulações, foi escolhido o espectro na orientação em que os três marcadores devem estar superpostos obtido das curvas de variação angular ($H \times \theta$).

Nessas simulações, foram usados os parâmetros do marcador anisotrópico, obtidos dos ajustes da variação angular à temperatura ambiente.

O tempo de correlação utilizado foi de 2×10^{-9} seg. O número de termos na expansão em funções ortogonais (Apêndice II), foi $L=14$, e o valor de corte $K=6$. Não houve diferença entre esses espectros e os obtidos com os mesmos parâmetros e $L=16$ e $K=6$. Devido ao tempo de computação envolvido foram usados $L=14$ e $K=6$ para todos os espectros.

Para introduzir uma correção na largura de linha, devido ao alargamento não homogêneo, causado por estrutura hiperfina de protons não resolvidos, foi introduzido uma componente de largura de linha, invariante com a rotação, de 1,8G. Outros valores foram tentados, mas o que forneceu o melhor ajuste foi esse.

A anisotropia nos espectros de RPE do TEMPO no monocristal de Hb sugere que o sítio de ligação do marcador no cristal ou a região que o marcador "vê" deve ser anisotrópica. Esse fato, é levado em consideração, supondo que o marcador de spin tem um tensor difusão rotacional anisotrópico. Na fig. (24) são mostrados os espectros simulados para vários valores de $N = R_{//}/R_{\perp}$ ($R_{//}$ e $R_{\perp}$ são as componentes paralela e perpendicular do tensor de difusão rotacional).

FIG. 24 - (-) Espectro experimental no plano ab , e Espectros simulados⁽²⁸⁾ com parâmetros obtidos da variação angular, temperatura ambiente, com modelo de difusão por saltos $\tau=2 \times 10^{-9}$ s. e (x) $\hat{N}=1,0$; (Δ) $\hat{N}=3,0$; (o) $\hat{N}=6,0$

FIG. 25 - Espectros simulados⁽²⁸⁾ com os parâmetros obtidos na variação angular temperatura ambiente, $\tau = 2 \times 10^{-9}$ s., $\hat{N} = 6,0$ (o) movimento browniano, Δ - difusão livre (*) difusão por saltos.

Fig. 26 - Espectros da amostra policristalina, marcada com TEMPO, em várias temperaturas.

Como pode ser visto dessa fig. 24 , o aumento na anisotropia do movimento (aumento de $\hat{N}$) faz com que apareça uma ligeira inflexão na região de baixo campo, ao passo que na região de alto campo, entre as duas linhas bem resolvidas começa a surgir uma terceira linha mais fraca. Em relação à linha de baixo campo, quando se aumenta o valor de $\hat{N}$ de 1 para 15, a inflexão aparece quando $\hat{N} = 6$ e para valores maiores que $\hat{N} = 9,0$, essa inflexão não aumenta, mas os espectros ficam muito distorcidos.

Como os tempos de correlação nessa faixa de movimento são fortemente dependentes do modelo de reorientação adotado, foram simulados espectros para três tipos de reorientação: a) reorientação browniana; b) reorientação por difusão livre e; c) reorientação por saltos fortes. Na fig. (25) são mostrados espectros obtidos com $\hat{N} = 6$ e para os três modelos usados. Em relação à região de campo baixo não há diferença sensível entre os modelos mas na região de campo alto existe uma pequena diferença especialmente nas regiões indicadas pelas setas nas figuras. Para o modelo de reorientação browniana, não aparece uma terceira linha, de intensidade muito pequena, como ocorre com os dois modelos de difusão por saltos; esses modelos fornecem espectros que se assemelham muito aos espectros experimentais.

4. Amostras de Hb policristalinas e liofilizadas

4.1. RPE convencional

Na fig. (26) são mostrados espectros de amostras policristalinas de Hb, em várias temperaturas, de 19°C à -120°C .

Os espectros à 19°C não são similares aos obtidos para amostras congeladas, mas, se assemelham à espectros de marcadores que possuem movimento.

Para temperaturas de 19 à -40°C , notam-se mudanças na forma da linha, mas para temperaturas menores que -40°C , essas mudan

ças são muito pequenas, ou até mesmo ineperceptíveis.

Embora não haja mudança na forma de linha, para temperaturas menores que -40°C , há um aumento na constante de desdobramento hiperfino observado, $2A_{zz}$. Um gráfico de $2A_{zz} \times T$ é mostrado na fig. (27). A variação total em $2A_{zz}$ é de 8.0 G. O espectro à -120°C é característico de amostra congelada (espectro de pó).

Para temperaturas menores que -40°C , não há variação na largura da linha, medida na meia altura, em relação à linha de base em ambas as regiões de baixo e alto campo. A medida da largura de linha para a região de baixo campo tem maior precisão e por esse motivo, nos outros experimentos, foram consideradas essas medidas.

A medida da largura de linha em função da temperatura mostra que o RPE convencional não dá informação sobre o movimento na região de -120°C a -55°C (figura 26).

No gráfico de Arrhenius de $2A_{zz} \times 1/T$, mostrado na figura (28) nota-se um ponto de inflexão em -23.0°C . No segmento de reta, correspondente à temperaturas maiores que -23.0°C , o marcador apresenta mudança significativa na forma da linha, e portanto movimento de difusão rotacional, enquanto que para o segmento correspondente à temperaturas menores que -23.0°C , o marcador não apresenta movimento detectável pelos métodos convencionais de RPE. Nessa região portanto, deve apresentar movimento residual.

O espectro à -150°C foi simulado pelo método de Lefebvre e Maruani. Embora a resolução na região central do espectro fosse pobre devido ao alargamento não homogêneo e à superposição nessa região, o uso de forma de linha Gaussiana, simulou relativamente bem o espectro experimental (fig. 29). Para essa simulação, foram usadas as seguintes componentes de g e A :

Fig. 27 - Gráfico do desdobramento hiperfino $2A_{zz} \times T$, para X solução aquosa de Hb e amostra policristalina.

Fig. 28 - Gráfico de Arrhenius de $2A_{zz} \times 1/T$ para X-solução aquosa e amostra policristalina.

FIG. 29 - Espectro rígido simulado⁽¹⁶⁾ com:
 $g_{xx}=2,009$, $g_{yy}=2,006$ e $g_{zz}=2,001$,
 $A_{xx}=6,0G$, $A_{yy}=7,4G$ e $A_{zz}=35,5G$.
 Forma de linha gaussiana.

$$g_{xx} = 2,0088$$

$$g_{yy} = 2,0060$$

$$g_{zz} = 2,0018$$

$$A_{xx} = 6,0 \text{ G}$$

$$A_{yy} = 7,4 \text{ G}$$

$$A_{zz} = 35,5 \text{ G}$$

$$A_{iso} = 16,6 \text{ G}$$

Os mesmos valores que foram utilizados na simulação do espectro do monocristal à 77°K. O valor da constante hiperfina é praticamente a mesma que para o sinal isotrópico.

No sentido de saber se a variação na constante de desdobramento hiperfino em função da temperatura ($2A_{zz} \times T$), é devida à polaridade do meio, foram realizadas medidas de amostras liofilizadas de Hb marcada com TEMPO. Na fig. (30) é mostrado o gráfico de $2A_{zz} \times T$ para essas amostras, no mesmo intervalo de temperatura que para a amostra policristalina. O comportamento das curvas é parecido, embora, para a amostra policristalina, o valor de $2A_{zz}$ cai mais rapidamente com a temperatura, do que para a amostra liofilizada.

Os espectros de RPE convencional para a amostra liofilizada, são muito semelhantes em forma de linha ao obtido para o policristal, embora os valores de $2A_{zz}$ sejam maiores que para o policristal.

O gráfico da largura de linha, medido na meia altura, para região de campo baixo, é mostrado na fig. (31).

A forma dos espectros em função da temperatura praticamente não varia, embora a largura de linha apresente uma pequena variação térmica.

Para se saber se a contribuição para a variação na largura da linha de baixo campo é devido ao alargamento não homogêneo, medidas foram realizadas com amostra liofilizada de Hb marca

Fig. 30 - Gráfico de $2A_{zz}$ x T , para (o) Hb-PD TEMPOL 0,12 g/g (Δ) Hb-TEMPO 0,12 g/g (●) amostra policristalina de Hb-TEMPO.

Fig. 31 - Gráfico da largura de linha na região de campo baixo Δh x T .

(Δ) amostras policristalina. (●) Hb-TEMPO 0,12 g/g. (o) Hb-PD-TEMPOL 0,12 g/g.

da com marcador deuterado (PD-TEMPOL). Esse marcador possui deuteronos substituindo os protonos do anel de piperidina e devido ao momento magnético nuclear dos deuteronos ser menor que o momento dos protonos, é de se esperar que as interações super hiperfinas com protonos diminua, causando assim menor alargamento não homogêneo.

De fato isso pode ser observado da fig. (31). A largura de linha para essa amostra é 2,5 G menor que a amostra liofilizada marcada com TEMPO, na mesma temperatura.

O comportamento do gráfico $2A_{zz} \times T$, para Hb liofilizada marcado com PD-TEMPOL, é mostrado na fig. (30) e é muito semelhante à Hb-TEMPO liofilizada.

Para avaliar a ordem de grandeza do movimento do marcador, espectros foram obtidos através de técnica não linear de transferência de saturação.

4.2. ST-RPE

Os espectros de ST-RPE foram obtidos à duas potências de 63.mW e 30.mW sendo esta última potência usada para evitar excesso de saturação, a baixa temperatura. O ajuste da fase foi realizado com potências de 1 mW e 0.1mW, respectivamente.

Observou-se que a fase do sinal do 2º harmônico 180° com o campo de modulação é fortemente dependente da temperatura. A cada temperatura é realizado o ajuste de fase (pelo método de "self-null" descrito no Capítulo II). Um pequeno erro no ângulo de fase, pode ocasionar grande erro nos espectros⁽⁴⁸⁾.

Comparando os espectros obtidos para Hb TEMPO liofilizada, à várias temperaturas com o espectro à -150°C , totalmente imobilizado, pode-se concluir que com o aumento na temperatura, o movimento do marcador aumenta (Tabela I), mas mesmo assim o tempo de correlação não é menor que 10^{-4} seg. Isto pode ser constatado através de medidas do parâmetro L''/L (Capítulo II). O valor de

TABELA I

VALORES DOS PARÂMETROS EXTRAÍDOS DOS ESPECTROS DE ST-RPE

Hb-PD-TEMPOL (0,12 g/g)

T (°C)	L"/L* (63,0mW)	L"/L (30mW)	C'/C* (63,0mW)	C'/C (30,0mW)
- 156	1,64	1,82	0,67	1,12
- 115	1,60	1,70	0,53	1,13
- 85	1,48	1,75	0,47	1,14
- 66,1	1,48	1,63	0,50	0,86
- 45,0	1,36	1,61	0,47	0,91
- 8,2	1,60	1,28	0,59	0,81
+ 22,9	1,55	1,20	0,29	0,69

Hb TEMPO (0,12 g/g)

T (°C)	L"/L (63,0mW)	L"/L (30,0mW)	C'/C (63,0mW)	C'/C (30,0mW)
- 81,3	1,60	2,20	0,60	0,86
- 50,8	1,57	1,94	0,58	0,84
- 23,5	1,32	-	0,35	-
- 1,8	1,10	1,35	0,23	0,71

Mb NEM SOL			Mb NEM Liof		
T (°C)	L"/L	C'/C	T (°C)	L"/L	C'/C
-132	1,43	0,35	-154,0	1,29	0,32
-113	1,31	0,34	-99,5	1,22	0,23
-90,7	1,31	0,33	-83,5	1,32	0,21
-71,1	1,10	0,15	-69,3	1,45	0,43
-63,0	0,96	0,07	-52,2	1,45	0,43
-54,2	0,93	0,04	-32,2	1,35	0,38
-39,0	0,88	0,12	- 8,1	1,20	0,28
-33,0	0,79	0,14	23,7	1,04	0,22
-27,2	0,79	0,10			
- 21,4	0,74	0,06			
-17,5	0,73	0,02			
-12,2	0,69	-0,07			

(*) L"/L é mais sensível à região de movimento lento enquanto a sensibilidade de C'/C é maior para movimento mais rápido.

L'' mantêm-se sempre maior que L , sendo que o valor de L''/L a temperatura indicando taxa de movimento muito mais alta (23°C) é de cerca de 1,2. Comparando esse valor com a curva de calibração (figura 13) vemos que praticamente não há movimento.

Resultados semelhantes foram obtidos para amostra de Hb PD-TEMPOL liofilizada.

Na Tabela I os dados obtidos para L''/L em função da temperatura são apresentados para Hb liofilizada-TEMPO e Hb liofilizada-PD-TEMPOL.

5. Solução Aquosa

5.1. Temperaturas menores que -22°C

Para avaliar a importância da polaridade do meio na variação de $2A_{zz}$ com a temperatura, experimentos foram realizados com solução aquosa de Hb, marcada com TEMPO.

Na fig. (32) são mostrados espectros de solução aquosa de Hb à várias temperaturas, desde 20°C à -120°C . Notam-se três regiões de movimentos: a) região de movimento rápido no intervalo de temperatura de 30°C à -5°C ; b) região de movimento intermediário; c) região de movimento lento, a temperaturas menores que -22°C .

A análise das formas de linha mostram que da mesma maneira que para as amostras policristalina e liofilizada, a forma da linha muda até uma determinada temperatura (-39°C), a partir da qual, não há mudança perceptível. Da mesma maneira que para as outras amostras, há variação na constante de desdobramento hiperfino, com a temperatura, o que pode ser visto da fig. (27) que compara os comportamentos com as amostras policristalina e solução.

O comportamento das curvas é muito parecido embora o valor de $2A_{zz}$ caia mais rapidamente com a temperatura, para solução

Fig. 32 - Espectros de Hb-TEMPO, solução aquosa, em várias temperaturas de +20 à -120°C.

aquosa do que para a amostra policristalina.

Os gráficos de $2A_{zz} \times 1/T$ em escala logarítmica, para amostra policristalina e solução aquosa, são mostrados na figura (28). A amostra policristalina mostra ponto de inflexão em -23°C e a solução aquosa em -40°C .

5.2. Temperaturas maiores que $-3,5^{\circ}\text{C}$

Nessa região de temperatura, os espectros de ressonância são constituídos por linhas finas, simétricas em relação à linha central e são caracterizadas pelo estreitamento devido ao movimento. O estudo do tempo de correlação nessa região, permite concluir com precisão, se o movimento do marcador é isotrópico ou anisotrópico.

Para determinar os tempos de correlação das eqs.(50,51) é necessário conhecer os parâmetros do marcador. Isto foi obtido, simulando o espectro da solução aquosa à -150°C . Da mesma maneira que para a amostra policristalina congelada há um alargamento na região central do espectro. Apesar disso, foi possível com o uso de uma forma de linha gaussiana, simular os espectros, obtendo-se um bom ajuste do espectro experimental, fig. (33). O método usado foi o de Lefebvre-Maruani⁽³⁶⁾.

Os parâmetros g e A usados na simulação foram:

$$g_{xx} = 2,008$$

$$g_{yy} = 2,006$$

$$g_{zz} = 2,001$$

$$A_{xx} = 6,2\text{G}$$

$$A_{yy} = 8,0\text{G}$$

$$A_{zz} = 37,2\text{G}$$

$$A_{iso} = 17,1\text{G}$$

O valor da constante isotrópica está muito próximo ao valor do marcador na água.

FIG. 33 - Espectro rígido simulado⁽³⁶⁾ com:
 $g_{xx}=2,008$, $g_{yy}=2,006$ e $g_{zz}=2,001$,
 $A_{xx}=8,0G$, $A_{yy}=6,2G$ e $A_{zz}=37,2G$ u-
 sando forma de linha gaussiana.

Fig. 34 - Gráfico de $B \times C$, medidos diretamente dos espectros experimentais (x) e, calculados através das equações (52,53) (•), a pequena diferença entre os valores de B e C calculado e experimental, se deve a que no valor calculado não foi levado em conta $\hat{N} = 1,5$.

FIG. 35 - Espectro na região de movimento rápido simulado com os parâmetros: $g_{xx} = 2,008$, $g_{yy} = 2,006$ e $g_{zz} = 2,001$, $A_{xx} = 6,2G$, $A_{yy} = 8,0G$ e $A_{zz} = 37,2G$, $\hat{N} = 4,0$, $\tau = 3,0 \times 10^{-11}$ seg (o) difusão por saltos, Δ - difusão livre, (*) browniano.

Numa tentativa de melhorar a resolução na região central do espectro, foi usada numa amostra de Hb liofilizada, dissolvida em água deuterado, mas isso não melhorou a resolução. Outra tentativa sem sucesso aparente foi de abaixar a temperatura com o campo magnético desligado.

Os espectros à temperatura acima de $-3,5^{\circ}\text{C}$ mostram linhas finas, (1,2G de largura) que não são lorentzianas perfeitas. O erro na determinação da largura ou linha foi de 0,5% e na intensidade foi de 1%.

Os cálculos de valores de B e C, através da largura intrínseca das linhas, são mostrados em gráficos de B x C ambos em escala logarítmica (fig.34). O tempo de correlação, determinado de (60,61) variou de 6×10^{-11} seg à 2×10^{-10} seg.

A relação entre B e C obtida ficou no intervalo $1,2 \leq B / C \leq 1,6$.

O valor dos tempos de correlação, dos parâmetros g e A , foram usados, para simular os espectros nessa região de movimento. Para diminuir o erro devido à interação hiperfina de protons não resolvida, usou-se uma largura de linha residual de 0,2G. Os melhores ajustes aos resultados experimentais foram obtidos com $\hat{N}(R_{//}/R_{\perp}) = 1,5$. Esse valor não é suficientemente grande para que a anisotropia do movimento seja significativa. Nessas simulações, observam-se que para tempos de correlação dessa ordem, os espectros independem do modelo de reorientação escolhido (fig. 35).

6. Estudos de Hidratação de Proteínas

A fim de verificar com mais cuidado o efeito da polaridade na variação de $2A_{zz}$ com a temperatura foram realizadas medidas experimentais de amostras liofilizadas e em vários graus de hidratação.

A fig. (36) mostra as curvas de $2A_{zz} \times T$ para lisozima

Fig. 36 - Gráfico de $2A_{zz}$ x T , para lisozima marcada com NEM*.

(⊙) solução aquosa. (●) hidratação 0,45 g/g. (x) 0,07 g/g.

Fig. 37 - Gráfico da largura de linha na região de campo baixo $\Delta H \times T$ para lisozima - NEM*.

(●) solução aquosa. (Δ) 0,45 g/g e (⊙) 0,07 g/g.

marcada com NEM*, nas umidades $0,07\text{gH}_2\text{O/g}$ proteína; $0,45\text{gH}_2\text{O/g}$ proteína e solução aquosa.

A forma das linhas de RPE, convencional para as amostras liofilizadas, são muito semelhantes à solução aquosa. Para essas amostras as variações na forma de linha com a temperatura são muito pequenas, e nota-se que para temperaturas maiores que -50°C , há uma melhor resolução nas componentes paralela e perpendicular do tensor g (região central dos espectros).

O comportamento das curvas $2A_{zz} \times T$ são diferentes para as três amostras. A mais seca, tem comportamento linear com a temperatura, e sua variação total é de $1,0\text{G}$. A amostra em solução, mostra comportamento semelhante à solução aquosa de Hb-TEMPO, e a variação total em $2A_{zz}$ é de $6,0\text{G}$ na mesma faixa de temperatura que a amostra mais seca.

O comportamento da amostra com hidratação intermediária $0,45\text{gH}_2\text{O/g}$ proteína, é intermediário entre as duas amostras (seca e aquosa). Sua variação em $2A_{zz}$, é de aproximadamente $2,0\text{G}$, e a forma de curva $2A_{zz} \times T$ é mais semelhante à da solução.

As medidas de largura de linha, na região de baixo campo, para as três amostras, são mostradas em gráfico contra a temperatura fig. (37). Como pode ser visto, para temperaturas menores que -80°C , o aumento no grau de hidratação causa um aumento na largura da linha. Para temperaturas maiores que -80°C , um aumento no grau de hidratação, faz com que as larguras das linhas se tornem cada vez menores.

Experimentos de ST-RPE realizados para essas amostras indicam da comparação com o espectro totalmente imobilizado, e também de comparação das formas das linhas, que não há aumento no movimento com a temperatura. Na fig. (38) e (39) os espectros de ST-RPE para amostra de lisozima-NEM* totalmente hidratada (solução) são mostrados em função da temperatura. As relações L''/L e

Fig. 38 - Espectro de RPE convencional de lisozima - NEM* solução aquosa - à várias temperaturas

Fig. 39 - Espectro de ST-RPE de lisozima - NEM* solução aquosa à várias temperaturas. Para temperaturas menores que -9,8°C o marcador possui tempo de correlação maior que 10^{-5} seg.

Fig. 40 - Gráfico de $2A_{zz}$ x T para Mioglobina marcada com NEM*.

(Δ) solução aquosa e (●) 0,12 g/g.

Fig. 41 - Gráfico de largura de linha ΔH x T para Mioglobina marcada

com NEM*. (Δ) solução aquosa. (●) 0,12 g/g.

C'/C quando comparadas com as curvas de calibração (Capítulo II), não mostram movimento com tempo de correlação maior que 10^{-4} seg., com excessão da amostra líquida para temperaturas maiores que -20°C .

Resultados semelhantes para o gráfico $2A_{zz} \times T$ foram obtidos para Mb-NEM* liofilizada ($0,12\text{gH}_2\text{O/g}$ proteína) e solução aquosa, bem como para solução aquosa de Hb-NEM* e são mostrados na fig. (40).

O comportamento de Mb-NEM* liofilizada é linear tal como da lisozima ($0,07\text{gH}_2\text{O/g}$). A variação total de $2A_{zz}$ foi de $1,5\text{G}$ e da Mb-NEM* solução foi de $4,0\text{G}$. A curva de $2A_{zz} \times T$ para Hb-NEM* (sol.) é do mesmo tipo que Mb-NEM* (sol.), e a variação total foi de $3,5\text{G}$ na mesma faixa de temperatura. O comportamento da curva de largura da linha com a temperatura é semelhante ao da lisozima: à temperaturas abaixo de -70°C , a largura de linha aumenta e é maior para a amostra mais hidratada, enquanto que para temperaturas maiores que -70°C a amostra menos hidratada tem largura de linha maior que a amostra líquida (fig. 41).

Apesar das variações nas larguras das linhas, a análise dos espectros de ST-RPE não mostrou mudança no estado de movimento sendo os tempos de correlação maiores que 10^{-5} seg. exceto para soluções aquosas à temperaturas maiores que -20°C .

CAPÍTULO IV

DISCUSSÕES E CONCLUSÕES

O processo de marcagem de monocristais de HbA e HbS, por difusão do marcador, mostrou um aspecto bastante interessante que é a existência de sinais bastante anisotrópicos, em relação ao campo magnético externo.

Outros pesquisadores⁽⁴⁹⁾, tem encontrado espectros bastante anisotrópicos de monocristais de Hb, ligando um marcador covalentemente à proteína^(4,50,51). Essa anisotropia foi observada também com marcadores hidrofóbicos em monocristais de α -quimotri-pina⁽⁴²⁾.

A anisotropia observada da constante hiperfina é de aproximadamente 22,0G $[A_{zz} - \frac{1}{2}(A_{xx} + A_{yy})]$. O erro na determinação dos tensores g e A é relativamente grande e se deve principalmente pouca resolução dos espectros e ao erro na orientação do monocristal no campo magnético devido ao tamanho e fragilidade do mesmo.

O fator responsável pela pouca resolução é o alargamento das linhas, que é devido à: a) alargamento não homogêneo causado por interação hiperfina, não resolvida, de protons intra e inter moleculares; b) ao possível não alinhamento dos tensores g e A ; c) anisotropia dos parâmetros magnéticos e d) um grau considerável de movimento dos marcadores.

Os parâmetros magnéticos dos dois sítios anisotrópicos são iguais, o que pode ser explicado pelo fato de existirem quatro moléculas de Hb por cela unitária nesse sistema cristalográfico⁽⁴¹⁾, com a unidade assimétrica constituída de duas moléculas. Assim deve existir um marcador de spin por molécula de Hb, e como existem duas unidades assimétricas na cela, dois sítios anisotrô-

picos são observados.

A dependência angular dos espectros, para o monocristal marcado, obtidos à 77°K deveriam mostrar três linhas, razoavelmente bem resolvidas, se o marcador estivesse rigidamente ligado à proteína. Isso não foi observado experimentalmente e somente duas linhas estão presentes, uma mais intensa, bastante larga, e isotrópica, e uma outra, bem menos intensa e anisotrópica; o alargamento adicional nesta temperatura torna a resolução ainda pior que a temperatura ambiente.

Alguns fatores contribuem para essa pouca resolução. O fenômeno de alargamento devido ao movimento é bastante importante aqui.

Quando a temperatura da amostra é abaixada os marcadores têm seu movimento restrito ao redor de uma direção. Esse movimento é muito lento em relação à escala de tempo de RPE, e o sistema de spins é observado em um intervalo de tempo muito curto em relação ao tempo necessário para que haja mudança na distribuição de spins no sistema.

Esse sistema, no tempo de observação, se comporta como se estivesse distribuído em um cone de ângulo sólido Ω , sendo que dentro deste cone, os diferentes pacotes de spin estão distribuídos em orientações preferenciais, e à cada orientação corresponde um valor do campo de ressonância. O espectro de ressonância, seria portanto a soma das linhas de ressonância correspondente à cada pacote de spin, sobre o ângulo Ω . O efeito de abaixamento de temperatura seria um aumento em Ω e portanto a um alargamento das linhas de ressonância.

Quando a temperatura aumenta, o ângulo sólido Ω diminui, e as interações magnéticas são promediadas pelo movimento. Os pacotes de spin ressonam em valores muito próximos de campo, e, o espectro observado é constituído, assim, de linhas mais finas. Es

se fenômeno deve ser responsável pelo alargamento das linhas, e portanto, a pouca resolução espectral, quando a temperatura é abaixada.

No nôsso caso, os três marcadores apresentam alargamento devido ao congelamento. Os marcadores isotrópicos, quando congelados se distribuem sobre uma esfera, ocasionando assim alargamento das linhas da ressonância. Os marcadores anisotrópicos, embora não estejam ligados covalentemente à proteína, provavelmente estão em um sítio que restringe o seu movimento anisotropicamente. Nesse sítio, eles já possuem liberdade de movimento ao redor de uma direção. Quando são congelados se distribuem ao redor de um cone, causando também alargamento das linhas, embora menor que no caso do sinal isotrópico. Em adição a esses efeitos de alargamento, as intensidades dos sinais anisotrópicos são menores que a intensidade do sinal isotrópico, contribuindo assim para que a resolução seja diminuída.

O espectro obtido à 77°K , na orientação em que os sinais se superpoem, é praticamente o espectro do marcador isotrópico. Esse espectro foi simulado pelo método de Lefebvre e Maruani⁽³⁶⁾, e os resultados indicam que as componentes do tensor $\bar{A}$ do marcador isotrópico são diferentes das componentes, de $\bar{A}$, para o marcador anisotrópico, obtidos da variação angular. Os valores médios, das componentes de A , nos dois casos são diferentes, mas isso não é conclusivo devido ao erro na determinação das componentes de $\bar{A}$ em ambos os casos, especialmente para o sinal anisotrópico.

A análise dos tensores hiperfinos mostra que a componente maior do tensor $\bar{A}$, do marcador isotrópico (medido a 77 K) cujo valor é $36,5\text{ G}$ é maior que a mesma componente para o marcador anisotrópico ($28,5\text{ G}$). Ao mesmo tempo as componentes perpendiculares dos marcadores isotrópicos ($6,0\text{ G}$ e $7,3\text{ G}$) são menores do que dos anisotrópicos ($7,6\text{ G}$ e $10,3\text{ G}$). Isto pode ser explicado pelo fato

de que no caso do marcador anisotrópico ocorre um movimento axial e por isso $2A_{\parallel} < 2A_{zz}$ enquanto que $2A_{\perp} > 2A_{xx,yy}$.

O elétron desemparelhado do radical nitróxido está no orbital π^* (antiligante), formado pelos orbitais 2pz do nitrogênio e 2pz do oxigênio. Essa diferença nas componentes paralela, e perpendicular de A, para os dois marcadores, indica que a densidade eletrônica do orbital π^* para o marcador isotrópico é maior que para o marcador anisotrópico, que pode ser explicado de duas maneiras: a) pela diferença de polaridade entre os ambientes nos quais se encontram os marcadores, ou b) porque o sítio onde se encontra o marcador anisotrópico tem simetria tal que distorce a nuvem eletrônica do orbital π^* do radical nitróxido definindo por exemplo um eixo de simetria aproximadamente axial.

Isto fornece uma explicação razoável para as mudanças nas populações dos sítios anisotrópico e isotrópico, observadas nos experimentos de variação térmica do monocristal.

A diminuição da população dos sítios anisotrópicos, e consequente aumento da população do sítio isotrópico, para temperaturas maiores que 30°C, pode ser explicada levando em conta o fato que o marcador no sítio anisotrópico sente uma simetria que faz com que o orbital π^* esteja distorcido.

Estudos sobre a acessibilidade de solvente em hemoglobina e mioglobina^(52,53) mostraram que os sítios disponíveis, para solvente tem dimensões menores que a molécula de marcador (TEMPO). É mais provável então que o marcador esteja na região de contato intermolecular, que tem espaço suficiente^(54,55). Quando a temperatura aumenta, deve haver uma intensificação de interações hidrofóbicas, o que faz com que o sítio onde se encontra o marcador, se torne maior, e o marcador deixe de "sentir" a simetria que distorce a distribuição eletrônica no orbital π^* do radical e o sinal detectado seja idêntico ao isotrópico. Além disso deve ser fa-

cilitada a migração do bolso onde ele se encontra.

Isto explica também o processo de marcagem. À 40°C, o marcador é difundido no monocristal. Os marcadores que estão na região dos contatos intermoleculares são aprisionados nessas regiões, quando a temperatura abaixa. Devido à simetria própria do empacotamento molecular, nesse sistema cristalográfico, o resultado é o sinal anisotrópico observado.

O espectro simulado, usando os parâmetros do marcador anisotrópico, obtidos da variação angular do monocristal, são bastante semelhantes aos espectros experimentais da variação angular, na orientação em que os sinais estão bastante superpostos.

Apesar dessa semelhança, esses dados não são conclusivos pois existem várias fontes de incerteza nessas simulações.

Dentre as fontes de incerteza que existem nas simulações, certamente a mais importante, provém da impossibilidade de obtenção de dados experimentais na região de movimento rápido. Vejamos de que maneira, os espectros nessa região auxiliam na simulação.

Os dados de entrada para o programa que gera espectros com movimento são (Apêndices II e III): as componentes dos tensores $\bar{g}$ e $\bar{A}$, número de termos da expansão em funções ortogonais (L), valor de corte para essas expansões (K), modelo de reorientação do marcador, tempo de correlação, largura de linha, largura de linha residual, anisotropia do tensor de difusão rotacional ($\hat{N} = R_{//} / R_{\perp}$) já definido no texto. Desses parâmetros, as componentes dos tensores $\bar{g}$ e $\bar{A}$ são determinadas da orientação do marcador no monocristal (nosso caso), ou de simulação do espectro rígido, L e K , são definidos de maneira empírica (veja Apêndice II), largura de linha é obtida de espectros experimentais. Tempo de correlação, largura de linha residual, e tensor de difusão rotacional são valores tentativos, mas que podem ser obtidos de maneir

ra satisfatória se existirem dados espectrais na região de movimento rápido.

Nessa região, o gráfico em escala logarítmica de $B \times C$, obtidos das equações (56,57), fornece o tempo de correlação⁽⁵⁶⁾, e, a relação C/B fornece a anisotropia do tensor de difusão rotacional. Além disso, pode-se medir com precisão a largura da linha, e por simulação uma das linhas dos espectros, pode-se determinar a contribuição do alargamento não homogêneo devido às interações hiperfinas não resolvidas de prótons⁽⁵⁶⁾ (largura residual).

Dessa forma para se simular um espectro na região intermediária, pode-se usar a mesma relação para $\hat{N}$ que foi obtida do espectro na região de movimento rápido, diminuindo assim a incerteza na simulação do espectro.

O possível não paralelismo entre os tensores $\bar{g}$ e $\bar{A}$ contribui para um erro de interpretação pois o programa utilizado (Apêndice III) é desenvolvido na suposição que esses tensores sejam paralelos.

Essas fontes de erro, não permitem que a comparação entre os espectros simulados e experimentais sejam conclusivas.

Os espectros da amostra policristalina seca deveriam, quando simulados, conduzir a melhores parâmetros do marcador anisotrópico.

A temperatura ambiente os espectros dessas amostras têm linhas largas. Com a diminuição da temperatura as linhas se tornam mais estreitas (efeito produzido pela variação do tempo de relaxação T_1) e a separação hiperfina ($2A_{zz}$) aumenta.

Essa variação em $2A_{zz}$ pode ser devido a dois fatores principais: a) diminuição do movimento do marcador; b) formação de ponte de hidrogênio entre o radical e sua vizinhança.

A diminuição do movimento faz com que maior número de marcadores tenham seu orbital $2p\pi$ orientado paralelamente em rela

ção ao campo magnético externo, acarretando com isso um aumento gradativo em $2A_{zz}$ com a diminuição de temperatura.

A formação de ponte de hidrogênio, ou a polaridade do meio, podem deslocar os elétrons emparelhados do orbital (ligante) para o átomo de oxigênio do radical N-O, enquanto o elétron desemparelhado no orbital π^* (antiligante) é deslocado para o átomo de nitrogênio^(10,57,58), aumentando assim a densidade eletrônica sobre o átomo de nitrogênio e portanto o valor de $2A_{zz}$ observado.

A amostra de solução aquosa de Hb marcada com TEMPO, mostrou o mesmo tipo de comportamento de $2A_{zz} \times T$ obtido para a amostra policristalina, embora $2A_{zz}(\text{solução}) > 2A_{zz}(\text{amostra policristalina})$ evidenciando assim a importância do efeito da polaridade induzida pela temperatura (vide fig. 28).

As amostras liofilizadas de Hb marcada com TEMPO, cuja hidratação foi determinada em $0,12\text{gH}_2\text{O/gHb}$ ($0,12\text{g/g}$) não apresentam comportamento nitidamente semelhantes às amostras policristalina e aquosa. Para temperaturas bem menores que -100°C , a amostra policristalina apresenta menor valor de $2A_{zz}$ do que para amostra liofilizada o que certamente deve ser porque na preparação da amostra policristalina devem estar presente uma quantidade razoável de sulfato de amônio, que imobiliza o marcador de spin e diminui efeitos de polaridade sobre o marcador⁽⁵⁹⁾.

Embora a variação de $2A_{zz}$ com a temperatura seja pequena para a amostra liofilizada quando comparado com as amostras policristalina e solução aquosa, a largura de linha da amostra liofilizada varia bastante com a temperatura, mesmo para temperaturas menores que -50°C , o que não é observado para amostra policristalina, pois a largura de linha se mantém constante para temperaturas menores que -50°C , certamente devido ao fato que na amostra policristalina o marcador já esteja imobilizado pelo sulfato de

TABELA II

VALORES DE g e A PARA AMOSTRAS DE Hb					
	monocristal Banda X (a)	monocristal Banda Q (a)	monocristal 77K Banda X (b)	amostra policris- talina 120K (b)	solução aquosa 120K (b)
g_{xx}	$2,008 \pm 0,001$	$2,005 \pm 0,001$	2,008	2,009	2,008
g_{yy}	$2,006 \pm 0,001$	$2,004 \pm 0,001$	2,006	2,006	2,006
g_{zz}	$2,003 \pm 0,001$	$2,004 \pm 0,001$	2,001	2,001	2,001
$g = \frac{g_{xx} + g_{yy} + g_{zz}}{3}$	2,006	2,0043	2,005	2,005	2,005
A_{xx} (G)	$7,6 \pm 1,0$	$10,6 \pm 2,0$	6,0	6,0	6,2
A_{yy} (G)	$10,3 \pm 1,0$	$13,7 \pm 2,0$	7,3	7,4	8,0
A_{zz} (G)	$28,5 \pm 1,0$	$30,6 \pm 2,0$	36,5	35,5	37,2
$\tilde{A} = \frac{A_{xx} + A_{yy} + A_{zz}}{3}$ (G)	$15,4 \pm 1,0$	$18,3 \pm 2,0$	16,6	16,3	17,1
Caracter p do orbital NO (c)	48% 0,47		60% 0,602	60% 0,602	65% 0,647

(a) Obtidos através do ajuste das curvas de dependência angular $H \times \theta$, com uso das equações (44,45) do Capítulo II.

(b) Obtidos por simulação dos espectros através do método de Lefebvre e Maruani⁽⁴⁰⁾.

(c) Calculado pelo método proposto por Goodman e Raynor⁽¹⁶⁾.

amônio.

A variação na largura de linha da amostra liofilizada, deve ser devido a pelo menos três mecanismos: a) alargamento não homogêneo de prótons intra e intermoleculares; b) anisotropia das interações magnéticas, sendo que essas interações são mediadas pelo movimento causando redução na largura de linha; c) interação dipolar entre os marcadores.

Espectros da amostra de Hb liofilizada e marcada com marcador deuterado (PD-TEMPOL), e cuja hidratação foi 0,12g/g, mostraram que a contribuição de alargamento não homogêneo é importante mas não é responsável pelo comportamento da curva $\Delta h \times T$ (fig. 31).

Embora haja variação na largura de linha e na separação hiperfina, não há mudança na forma das linhas e não foi possível detectar movimento com tempo de correlação interior à 10^{-4} seg, através do método de ST-RPE, o que mostra que deve-se usar com cautela o método empírico proposto por Goldman e colaboradores⁽³⁰⁾, para medir tempo de correlação.

Os espectros congelados da amostra policristalina e solução aquosa são muito semelhantes. Em ambos, não há resolução na região central do espectro. Esta resolução pobre, se deve ao alargamento não homogêneo e à superposição dos pacotes de spin que tem orbital $2p\pi$ paralelos e perpendiculares ao campo magnético externo. Apesar dessa má resolução, foi possível simular os espectros através do método de Lefebvre e Maruani⁽³⁶⁾, obtendo-se parâmetros muito semelhantes (ver Tabela II).

É esperado que os parâmetros obtidos da simulação do espectro congelado de amostra policristalina seca, sejam os mesmos que os obtidos para o marcador anisotrópico no monocristal. Esses dados (Tabela II) mostram que esses parâmetros não são iguais. O processo de secagem da camada de hidratação da proteína, pode ser muito drástico para a proteína, danificando sua estrutura terciária.

Nota-se que mesmo na amostra policristalina, os parâmetros são diferentes dos obtidos da variação angular do monocristal sendo próximos dos tensores utilizados para simular o espectro isotrópico.

Isto reforça a hipótese de que o marcador anisotrópico deve estar em um sítio intermolecular, e sente a simetria desse sítio. Quando o monocristal é triturado, essa simetria é perdida resultando no espectro de pó.

Os resultados dessas simulações mostram ainda que o marcador isotrópico deve estar na camada de hidratação da proteína.

A simulação dos espectros de TEMPO em solução aquosa de Hb, confirmam a importância da existência de dados espectrais na região de movimento rápido para fornecer alguns parâmetros de entrada para o programa utilizado⁽²⁸⁾, (apêndice II e III).

A relação entre as larguras intrínsecas de linha B/C e também entre os tempos de correlação τ_B/τ_C varia entre 1,2 e 1,5. Estas variações são muito pequenas para se tirar conclusões sobre a anisotropia do movimento do marcador ou a anisotropia da viscosidade da solução.

Como mostrado por Hwang e colaboradores⁽⁶⁰⁾ e Polnazeck⁽⁴⁴⁾, para pequenas faixas de variação de τ_B/τ_C a relação $|C|/C$ não é suficiente para definir se o movimento é ou não anisotrópico.

Embora os valores de C e B fornecessem tempos de correlação em uma faixa relativamente pequena, isto não representou problema, pois o maior interesse está na anisotropia do movimento, e simulação espectral é suficiente para estudar esse problema.

Na simulação dos espectros, o melhor ajuste aos resultados experimentais foi obtido com valores de $\bar{N}=1,5$; o que implica que o movimento do marcador é praticamente isotrópico. Dessa forma, a anisotropia detectada no monocristal deve ser devido ao empacotamento molecular que não existe na solução aquosa.

Os valores de g e A usados nessas simulações foram obtidos da simulação do espectro da solução aquosa congelada.

Os estudos de hidratação de lisozima e mioglobina marcados com NEM* vem mostrar a importância da quantidade de água na amostra, no comportamento da curva $2A_{zz} \times T$.

A lisozima com hidratação de $0,07 \text{ gH}_2\text{O/g}$ lisozima ($0,07\text{g/g}$), apresentou um comportamento linear de $2A_{zz}$ em relação à temperatura, sendo que esse comportamento é bem diferente daquele para solução aquosa. Nessa umidade há hidratação de grupos carregados de proteínas, e ainda não dos grupos polares, pois de acordo com Yu e Jo⁽⁶¹⁾, a partir de $0,08 \text{ g/g}$ começa a haver hidratação desses grupos. O valor de $2A_{zz}$ obtido para a amostra liofilizada ($0,07 \text{ g/g}$) é bem menor que $2A_{zz}$ para solução aquosa.

Em uma hidratação intermediária, $0,45 \text{ g/g}$, o comportamento é mais semelhante ao da amostra em solução aquosa. Nessa umidade os grupos aromáticos da superfície da molécula de lisozima são hidratados⁽⁶²⁾.

Apesar de não haver mudança na forma das linhas dos espectros para temperaturas menores que -50°C , e de não ser constatado, em experimentos de ST-RPE movimento com tempo de correlação menor de 10^{-5} seg, a largura de linha varia com a temperatura.

É interessante notar que a forma da curva de $\Delta h \times T$ para a amostra seca ($0,07 \text{ g/g}$) é bem diferente quando comparada com a curva da solução aquosa fig. (36).

Nesta mesma figura, pode-se estudar o comportamento de $\Delta h \times T$ em cada umidade, para temperaturas menores e maiores que -80°C .

Para temperaturas menores que -80°C , ao aumentar a hidratação há um aumento na largura de linha de campo baixo.

Como mencionado acima, há vários fatores que contribuem para o alargamento da linha, e nesse caso, além do alargamento não homogêneo de prótons, a que todas as amostras estão sujeitas,

as contribuições da interação dipolar spin-spin, e da anisotropia dos parâmetros magnéticos são muito importantes.

A lisozima liofilizada (0,07 g/g), não apresenta atividade enzimática⁽⁶²⁾.

Aumentando a hidratação da amostra para valores de hidratação acima de 0,20 g/g, a proteína retorna à sua forma nativa⁽⁶³⁾, e quando a hidratação for de 0,45 g/g os grupos aromáticos expostos estão cobertos por água⁽⁶²⁾.

Embora a diferença entre os valores da largura das linhas nas diferentes amostras seja pequena, e para algumas temperaturas essa diferença seja pouco maior que o erro cometido na medida, pode-se constatar a diferença de comportamento entre a amostra com hidratação 0,07 g/g e as amostras com umidade suficiente para fazer com que a proteína retorne à forma ativa.

Em cada uma das três amostras com hidratação diferente, quando a temperatura varia de -150°C para -60°C , os espectros de ST-RPE mostram que não há movimento com tempo de correlação menor que 10^{-4} seg.

Na região de temperaturas maiores que -60°C , o comportamento das larguras de linha com a temperatura são opostas, isto é, quanto maior a umidade menor a largura de linha.

Observações similares à lisozima foram obtidas para mioglobina (Mb) liofilizada, e cuja umidade foi de (0,12 g/g), e solução aquosa. O comportamento das curvas $\Delta h \times T$ fig. (41), é o mesmo que para lisozima, refletindo um estado não ativo da mioglobina (0,12 g/g) e um estado ativo (solução).

Esse tipo de comportamento de $\Delta h \times T$, observado para lisozima e mioglobina é semelhante ao comportamento da curva de tempo de relaxação spin-rede T_1 , para prótons, medidas em amostra de lisozima⁽⁶⁴⁾.

Os estudos da dependência térmica de $2A_{zz}$ e de Δh , con-

duzem a uma observação importante, a de que as mudanças nesses dois parâmetros com a temperatura, são sensíveis à mudanças na camada de hidratação de proteínas que por sua vez é responsável pela estrutura terciária da proteína⁽⁶²⁾. Para um determinado grau de hidratação, quando a temperatura aumenta, o gelo estruturado ao redor da proteína se funde, permitindo que a proteína tenha maior mobilidade, e também o marcador, acarretando uma diminuição na largura de linha e uma diminuição na separação hiperfina.

Portanto o abaixamento da temperatura induz no marcador um efeito de polaridade. Esse efeito é detetado inclusive nos experimentos realizados com TEMPO em Hb liofilizada, solução aquosa e policristal.

Conforme mencionada acima nas dependências de $2A_{zz}$ e Δh com a temperatura pode-se notar duas regiões com um comportamento bem definido. Para temperaturas abaixo de -80°C as amostras úmidas tem $2A_{zz}$ e Δh maiores do que as amostras secas. Como nessa região de temperatura o movimento do marcador é bem restrito ($\tau_c \geq 10^{-5}$ seg) esta observação pode ser explicada pelo fato de que através do efeito de polaridade a anisotropia em $\bar{A}$ da amostra úmida é maior do que na amostra seca sendo a determinante tanto para o valor de $2A_{zz}$ quanto Δh . No caso da relaxação de prótons, nessas temperaturas o movimento dos prótons está congelado e apenas o efeito de polaridade sobre o tensor $\bar{A}$ é observado. Na região acima de -80°C o aumento do grau de hidratação contribui, além da polaridade, para o efeito de facilitar o movimento do marcador. Neste caso o tensor $\bar{A}$ é mediado de forma mais efetiva do que na amostra seca e por isso Δh torna-se menor na amostra úmida nessa faixa de temperatura. Desta maneira estas duas regiões de temperatura observadas nas experiências de medida de T_1 dos prótons⁽⁶⁴⁾ também são observadas em nossas experiências nas medidas de $\Delta h \times T$ (fig. 41).

Como a maleimida (NEM*) está covalentemente ligada à proteína, um possível mecanismo de movimento libracional é a torção

ao redor da ligação entre o anel paramagnético, e a maleimida.

Este modelo foi proposto por Gellin e Karplus⁽⁶⁵⁾, para calcular barreiras de energia torsional em peptídeos, e foi usado por Johnson⁽⁶⁶⁾ para estudar o movimento libracional dos marcadores.

Esse efeito de torsão, bem como de flutuação na orientação da ligação N-O em relação ao plano da ligação C-N-C, podem ser estudados quantitativamente através do modelo de Gellin e Karplus.

De acordo com esse modelo, as variações da constante hiperfina $2A_{zz}$ com a temperatura são dados por⁽⁶⁵⁾:

$$2A_{zz}(T) = A_{zz}^0 (1 + \cos \theta)$$

onde

$$\theta = \left(\frac{RT}{E_A} \right)^{1/2} .$$

θ é metade do ângulo de oscilação, E_A é um parâmetro caracterizando a barreira de energia torsional e $2A_{zz}^0$ é a separação hiperfina na ausência de movimento.

A expressão ainda mostra que $2A_{zz}(T)$ varia linearmente com a temperatura, podendo ser usado para ajustar matematicamente os resultados experimentais obtidos com amostra liofilizada com umidade bem inferior à necessária para obter o estado nativo.

Através dessa expressão calculamos o meio ângulo de rotação para amostra de lisozima (0,07 g/g) e mioglobina (0,12 g/g). Os ângulos obtidos e as energias de ativação calculadas são mostrados na Tabela III

Os dados da Tabela III, mostram que os ângulos de rotação calculados para lisozima e mioglobina são diferentes, indicando que o método é sensível à molécula. Além disso, o ângulo de rotação para NEM* na mioglobina, cresce em uma taxa ligeiramente maior que na lisozima quando a temperatura passa de -100°C à 20°C .

TABELA III

VALOR DA METADE DO ÂNGULO DE ROTAÇÃO PARA AMOSTRAS
LIOFILIZADAS, E ENERGIA DE ATIVAÇÃO

T(°C)	Lisozima θ	E_A (Kcal/mol)	Mioglobina θ	E_A (Kcal/mol)
-100	6,8	1,86	11,3	2,69
- 50	9,7	1,17	14,9	1,99
0	12,6	0,85	18,5	1,58
+ 20	13,6	0,83	19,7	1,50

Os resultados obtidos com amostras em vários graus de hidratação, para $2A_{zz}$ e Δh , com a temperatura, mostram que a aplicação dos métodos de calibração empírica de Goldman e col. (30, 31) e mesmo os métodos de Freed e cols. (24, 26, 27, 28), precisam ser aplicados com cuidado na análise de espectros de marcador em proteína, pois enquanto $\Delta h \times T$ e $2A_{zz} \times T$ variam, os experimentos de ST-RPE não indicam um grau considerável de movimento.

Os resultados ainda mostram que o uso do método de marcador de spin, associando técnicas de RPE convencional e ST-RPE, oferecem um importante método, e ainda não explorado, não só para estudar hidratação, mas também mudanças dinâmicas que ocorrem induzidas pela temperatura e sob diferentes graus de hidratação, e estudar mudanças na polaridade induzidas pela temperatura na camada de hidratação da proteína.

CONCLUSÕES

- 1) O método de marcação de spin para difusão mostrou-se sensível ao empacotamento molecular no monocristal de Hb, e às mudanças termo-induzidas que ocorrem nesse sistema.
- 2) Das duas possíveis explicações para as mudanças nas componentes dos tensores $\bar{A}$ para o marcador TEMPO em monocristais de Hb, (isotrópico e anisotrópico), a hipótese de movimento é mais plausível, pois uma distorção no orbital π^* do radical NO, implicaria em um campo cristalino intenso, o que acarretaria mudança significativa no tensor g.
- 3) A camada de hidratação de Hb, desempenha função importante no empacotamento molecular no monocristal, e seu rearranjo ao redor da proteína, é importante nas mudanças induzidas pela temperatura.
- 4) O método de análise espectral, baseado nas variações de forma e largura de linha, indicam mudanças locais nas vizinhanças do marcador.
- 5) Para o uso dos métodos de simulação na região de $10^{-9} < \tau_c \leq 10^{-7}$ seg. é importante que se obtenha espectros na região de movimento rápido para que os parâmetros de simulação sejam mais precisos.
- 6) Cuidados especiais devem ser tomados ao se usar os métodos de Goldman⁽³⁰⁾ e Mason⁽³¹⁾ na determinação dos tempos de correlação para movimento lento na região de temperatura de $+10^\circ\text{C}$ a -150°C .

- 7) Os métodos de estudo de forma de linha associados com técnicas não lineares (SF-RPE) formam uma ferramenta potente, ainda muito pouco explorada, para estudar hidratação de proteínas.
- 8) Esses métodos são bastante sensíveis ao congelamento da camada de hidratação, e mudanças que aí ocorrem com a temperatura.

APÊNDICE I

Programa para simular espectros
rígidos. Método de Lefebvre e
Maruani⁽³⁶⁾.

9-MAY-1984 08:36:50
8-MAR-1983 10:18:31

RIGID LIMIT PROGRAM

THIS IS ESSENTIALLY THE LEFEBVRE - MARUANI PROGRAM MODIFIED BY C.F

NUMERICAL INTEGRATION DONE BY SIMPSON'S RULE

FORMULA FOR AXIAL SYMMETRY FROM PAKE EQUATION (3-55)

FORMULA FOR ORTHORHOMBIC SYMMETRY FROM MARUANI ET AL
HDL. PHYS. 1

DOES NOT INCLUDE OMEGA(N) TERMS

FORMULAS FOR OMEGA(NUCLEAR) VALID ONLY FOR I=1

NEGLECT PSEUDO-SECULAR TERMS FOR AXIAL SYMMETRY ONLY

DIMENSION FIELD(401),EM(9),EM2(9),EM1(9),EMP(9),XINS(3
*,3),BISO(6),EINT(401,-),WID(6),WID1(6),WID2(6),TITOT2(
*,6),B1(6),FY(401)

DIMENSION EINTN(401,6),HN(401)

DIMENSION IISYZ(4),SAT(6),XPE(1420),YPE(1420)

LOGICAL*1 TEXT0(40)

INTEGER*2 JFORA,NFORA

INTEGER*2 NPTS

REAL*4 XPE,YPE,XAD,YAD

EQUIVALENCE (APAR,A35X),(APERP,A35Y),(GPAR,GX),(GPERP,
*,GY),(GPA2,GX2),(GPE2,GY2),(GPA2,GZ2),(GAPE2,GX2Z2),(G
*,4APA,A35X2),(G4APE,A35Y2),(COEF1,A35Z2),(GPAAP,GXAX),(
*,GPEAE,GYAY),(GPER4,GZAZ),(GPAR4,GEHN),(APEHN1,GEHN2),(
*,APAHN1,HMAX1),(APEHN2,HMAX1),(APAHN2,HMAX1,GX4AX2),(G
*,AS,GPE4SH,HMAX2,GY4AY2,ZMIN),(A,A35,GPA4CS,HMAX2,WIDS
*,DM,ZMAX),(CF1,AMP1,AAL2,COSEPS,GAUSIN),(AMP2,A35S,HMAX
*,Y1,YE),(GZ,Y)

EQUIVALENCE (H2ORD,ALPHA1,YMAX),(WAR,ALPHA2,YMIN),(A35
*,Z,Z,Z2)

EQUIVALENCE (GAL2,CF2),(AWT1,Y2,ASINS),(XMIN,HMAXY2,GP
*,ERR),(FT,GA,EI),(HMAN,GXAXAY,SPSP1)

DATA IISYZ(1),IISYZ(2),IISYZ(3),IISYZ(4) // ' ',' ','E',' ' //

TYPE 4998

4998 FORMAT('6 DADOS EXPER. [Y/N]')

ACCEPT 4999,YESNO

4999 FORMAT(1A4)

IF(YESNO.NE.'Y') GO TO 5001

READ(7)TEXT0

READ(7)XAD,YAD,NFORA

DO 5000 JF = 1,NFORA

5000 READ(7,END=5001)JFORA,XPE(JF),YPE(JF)

5001 CONTINUE

READ(5,7/7) YMINEX,DXDH

777 FORMAT(2E12,5)

READ(5,960) NSETS

960 FORMAT(12)

DO 2000 NX=1,NSETS

READ IN A TITLE

READ(5,999)

9-MAY-1984 08:36:50

8-MAR-1983 10:18:31

WRITE(6,999)
999 FORMAT(1X,'

*)
READ(5,1010) HSTD,SWP,B0

HSTD IS THE CENTER OF THE FIELD SWEEP, IT MAY BE DIFFERENT THAN B0
IS THE FIELD AT WHICH RESONANCE OCCURS FOR $G = GSTD$

GSTD IS THE AVERAGE G-VALUE, $GSTD = 1/3(G1 + G2 + G3)$
READ(5,1120) NPT

1120 FORMAT(3I3)

DELB = SWP/FLUAT(NPT-1)
HMIN = HSTD - 0.5*SWP - B0

DO 110 I=1,NPT

110 FIELD(I) = HMIN + DELB*FLUAT(I-1)

READ(5,1140) SPIN,ISYM,IABOFD,INUCL,NGPH,NPS,ISHAPE,

*NLW,ILW,ILC,ISAT,IPUNCH

1140 FORMAT(F4,1,15I2)

IF ISYM = 1, AXIAL SYMMETRY; IF ISYM = 2, ORTHORHOMBIC SYMMETRY.

IF IABOFD = 1, GET ABSORPTION PLOTS

IF IABOFD = 2 GET FIRST DERIVATIVE PLOTS

IF INUCL = 1 NEGLECT OMEGA(NUCLEAR)

IF NGPH = 1 GET PLOT WITH PRINTOUT ; #2 GET PLOT ON PLAIN WHITE PAPER

IF NPS = 1 NEGLECT PSEUDOSECTAR TERMS IN HAMILTONIAN

IF ISHAPE = 1, LORENTZIAN LINESHAPE; IF = 2, GAUSSIAN LINESHAPE
SPECTRA TRUNCATED AT + AND - 5 TIMES THE LINEWIDTH FOR GAUSSIAN SHAPE

NLW IS THE NUMBER OF LINEWIDTHS PER SET OF DATA. NUMBER OF PLOTS EQUALS THE SUM OF THE NLW FOR EACH SET OF DATA

IF ILW = 1 HAVE A CONSTANT LINE WIDTH

IF ILW = 2 HAVE AN ORIENTATIONALY DEPENDENT LINEWIDTH

IF ILC = 0 NORMAL DISTRIBUTION OF ANGLES

IF ILC = 1 LIQUID CRYSTAL DISTRIBUTION OF ANGLES

IF ISAT = 0 NO SATURATION; IF ISAT .NE. 0, HAVE A SATURATED LORENTZIAN LINE SHAPE

IF IPUNCH.NE.0 GET PUNCHED POINTS AS OUTPUT

NSPINS = INT(2.0*SPIN) + 1

NSPINS = 1

SPSP1 = SPIN*(SPIN + 1.0)

DO 5 I=1,NSPINS

E1 = 1

EM(I) = - SPIN + E1 - 1.0

EM1(I) = EM(I)

9-MAY-1984 08:36:50

8-MAR-1983 10:18:31

```

      EM2(I) = EM(I)*EM(I)
5      EMP(I) = SPSP1 - EM2(I)
      WRITE(6,1150) SPIN
1150  FORMAT(8HSPIN = ,F4.1)
      IF (ISYM.EQ.2) GO TO 7
      READ(5,1010) APAR,APERP,GPAR,GPERP
1010  FORMAT(6E12.5)
      GSTD = (GPAR + 2.*GPERP)/3.
      WRITE(6,1170) GPAR,GPERP,APAR,APERP
1170  FORMAT(15H0G(PARALLEL) = ,F7.5,10X,19HG(PERPENDICULAR) = ,F7.5/15H
      A(PARALLEL) = ,F6.2,29H GAUSS      A(PERPENDICULAR) = ,F6.2,6H GAUS
      S/)
      IF (INUCL.EQ.1) GO TO 898
      READ(5,1010) HNUCL
      MSPINS = MSPINS
      WRITE(6,900) HNUCL
900   FORMAT(31H00MEGA(NUCLEAR) CORRESPONDS TO ,F6.2,6H GAUSS)
898   IF (ILC.EQ.0) GO TO 8
      READ(5,1010) XLAMS2,XLAM4
      WRITE(6,899) XLAMS2,XLAM4
899   FORMAT(1X,' LIQUID CRYSTAL PROBABILITY PARAMETERS, LAMBDA2 = ',E12
      .5,10X,' LAMBDA4 = ',E12.5//)
      GO TO 8
7      READ(5,1010) GX,GY,GZ,A35X,A35Y,A35Z
      GSTD = (GX + GY + GZ)/3.
      WRITE(6,1180) GX,GY,GZ,A35X,A35Y,A35Z
1180  FORMAT(8H0G(X) = ,F7.5,10X,7HG(Y) = ,F7.5,10X,7HG(Z) = ,F7.5/8H0A(
      1X) = ,F6.2,17H GAUSS      A(Y) = ,F6.2,17H GAUSS      A(Z) = ,F6.2,6H
      GAUSS/)
      IF (INUCL.EQ.2) GO TO 9
      IF (ILC.EQ.1) GO TO 898
8      DO 10 I=1,NLW
      IF (ILW.EQ.1) GO TO 10
      READ(5,1010) WID1(I),WID2(I)
      WIDSUM = WID1(I) + WID2(I)
      WRITE(6,20) WID1(I),WIDSUM,I
20    FORMAT(/1X,' LINEWIDTH VARIES FROM ',F8.4,' GAUSS TO ',F8.4,' GAUS
      1S IN SPECTRUM NUMBER ',I2//)
      GO TO 18
12    READ(5,1010) WID(I)
      IF (ISHAPE.EQ.2) GO TO 13
12    WRITE(6,1050) I,WID(I)
1050  FORMAT(1X,' SPECTRUM NUMBER ',I2,' SIMULATED WITH LORENTZIAN LINES
      1 OF WIDH ',F8.4/)
      WID(I) = .5*SQRT(3.)*WID(I)
      GO TO 14
13    WRITE(6,1051) I,WID(I)
1051  FORMAT(1X,' SPECTRUM NUMBER ',I2,' SIMULATED WITH GAUSSIAN LINES 0
      IF WIDTH ',F8.4/)
      WID(I) = .5*WID(I)
14    WID(I) = WID(I)*WID(I)
18    CONTINUE
      IF (ISAT.EQ.0) GO TO 30
      IF (ISHAPE.EQ.2) GO TO 2200
      READ(5,1010) (B1SQ(I),T1TOT2(I),I=1,NLW)
      DO 39 I=1,NLW
      WRITE(6,256) I,B1SQ(I),T1TOT2(I)

```

9-MAY-1984 08:36:50

8-MAR-1983 10:18:31

```

256 FORMAT(1X,' SPECTRUM NUMBER ',I2,' HAS A VALUE OF ',E12.5,' GAUSS S
    1QUARED FOR B1-SQUARED AND A T1/T2 RATIO OF ',F10.5/)
    B1(I) = SQRT(B1SQ(I))
34  SAI(I) = 3.098E+14*B1SQ(I)*T1TOT2(I)
36  GTD = B0*GSTD
    WRITE(6,1040) SWP,HSTD,B0,GTG
1040 FORMAT(1H0,F9.2,24H GAUSS SWEEP CENTERED AT,F9.1,' GAUSS '/' B0 =
    1',F9.1,' GAUSS WHICH CORRESPONDS TO A G-VALUE OF ',F7.5)
    READ(5,1100) NGS,NPHI
1100 FORMAT(5I5)
    NGSP = NGS + 1
    DE = 1./FLOAT(NGS)
    NPF = NPHI + 1
    DF = 1./FLOAT(NPHI)
    WRITE(6,1110) NGS,NPHI
1110 FORMAT(1H0,I4,52H INTERVALS FOR SIMPSON'S RULE NUMERICAL INTEGRATI
    1ON ', OVER COS(THETA) '/'I4,' INTERVALS OVER PHI')
    WRITE(6,1130) NPT
1130 FORMAT(1X,' FIELD SCAN OVER ',I3,' POINTS'//)
    IF (IGPH.EQ.2) READ(5,1010) XLEN,YLEN
    DO 2 N=1,NPT
    DO 2 I=1,NLW
    F1T(N,I) = 0.0
    IF (ISYS.EQ.2) GO TO 40
32  GPAR2 = GPAR*GPAR
    GPER2 = GPERP*GPERP
    GAPA2 = GPAR2*APAR*APAR
    GAPE2 = GPER2*APERP*APERP
    GAAPA = GPAR2*GAPA2
    GAPE2 = GPER2*GAPE2
    GEH1 = 0.5*GPAR2*GPER2*(GAPA2-GAPE2)*(GAPA2-GAPE2)
    GPAAP = GPAR*APAR
    GPEAP = GPERP*APERP
    IF (INUCL.EQ.1) GO TO 50
35  GPER4 = GPER2*GPER2
    GPAR4 = GPAR2*GPAR2
    APEHN1 = (0.5*APERP - HNUCL)*(0.5*APERP - HNUCL)
    APEHN2 = (0.5*APERP + HNUCL)*(0.5*APERP + HNUCL)
    APAHN1 = (0.5*APAR - HNUCL)*(0.5*APAR - HNUCL)
    APAHN2 = (0.5*APAR + HNUCL)*(0.5*APAR + HNUCL)
    GO TO 50
42  GX2 = GX*GX
    GY2 = GY*GY
    GZ2 = GZ*GZ
    GXZ2 = GX2*GZ2
    A35X2 = A35X*A35X
    A35Y2 = A35Y*A35Y
    A35Z2 = A35Z*A35Z
    GXAX = GX2*A35X2
    GYAY = GY2*A35Y2
    GZAZ = GZ2*A35Z2
    IF (INUCL.EQ.1) GO TO 52
51  GEHN = 2.002322*HNUCL
    GEHN2 = GEHN*GEHN
    GNAX1 = (GEHN - 0.5*GX*A35X)**2
    GNAY1 = (GEHN - 0.5*GY*A35Y)**2
    GNZ1 = (GEHN - 0.5*GZ*A35Z)**2

```

9-MAY-1984 08:36:50

8-MAR-1983 10:18:31

```

HNAx2 = (GEHN + 0.5*GX*A35X)**2
HNAy2 = (GEHN + 0.5*GY*A35Y)**2
HNAz2 = (GEHN + 0.5*GZ*A35Z)**2
GO TO 50
52 GX4x2 = GXAX*GX2
GY4y2 = GYAY*GY2
GZ4z2 = GZAZ*GZ2
GXAXAY = GXAX + GYAY + GZAZ
54 IF (ISYM.EQ.2) GO TO 88
62 RK = 1.0
LUP = 1
DO 70 J = 1,NGSP
COSTHS = FLOAT(J-1)*DE
COSTHS = COSTHS*COSTHS
SINTHS = 1.0 - COSTHS
IF (ILC.EQ.1) RK = RK*EXP(>LAMS2*COSTHS + XLAM4*COSTHS*COSTHS)
IF (ILW.EQ.1) GO TO 92
95 DO 91 I=1,NLW
IF (ISHAPE.EQ.2) GO TO 95
XID(I) = 0.75*(WID1(I) + WID2(I)*COSTHS)**2
GO TO 91
95 XID(I) = 0.25*(WID1(I) + WID2(I)*COSTHS)**2
91 CONTINUE
92 GS = GPA2*COSTHS + GPE2*SINTHS
IRM = RK*GPE2*(GPA2 + GS)/GS
IF (IRPS.EQ.2) GO TO 4
3 G = GPA2*COSTHS + GPERP*SINTHS
A = GPAAP*COSTHS + GPEAP*SINTHS
G10 = G10/G - B0
GO TO 19
4 B2 = G10/SQRT(GS)
B40 = B2 - B0
IF (INUCL.EQ.2) GO TO 99
98 AS = G4APA*COSTHS + G4APE*SINTHS
AS5 = SQRT(AS)/GS
CF1 = (CDEF1*SINTHS*COSTHS)/(GS*GS*AS)
CF2 = G4PE2*(AS + GPA2*GS)/(4.0*GS*AS)
GO TO 19
99 GPE4SN = GPER4*SINTHS
GPA4CS = GPA4*COSTHS
AHP1 = GPE4SN*APEHN1 + GPA4CS*APAHN1
AHP2 = GPE4SN*APEHN2 + GPA4CS*APAHN2
ALPHA1 = SQRT(AHP1)
ALPHA2 = SQRT(AHP2)
ASINS = GPA2*COSTHS + G4PE2*SINTHS
COSEPS = GS*(4.0092053*HNUCL*HNUCL-0.25*ASINS)/(ALPHA1*ALPHA2)
XINS(1,1) = 0.25*(1.0 + COSEPS)*(1.0 + COSEPS)
XINS(3,3) = XINS(1,1)
XINS(1,2) = 0.5*(1.0 - COSEPS*COSEPS)
XINS(2,1) = XINS(1,2)
XINS(2,3) = XINS(1,2)
XINS(3,2) = XINS(1,2)
XINS(3,1) = 0.25*(1.0 - COSEPS)*(1.0 - COSEPS)
XINS(1,3) = XINS(3,1)
XINS(2,2) = COSEPS*COSEPS
IRX = IRM
19 DO 68 M=1,NSPINS

```


9-MAY-1984 08:36:50
8-MAR-1983 10:18:31

```

      DO 68 L=1,MSPINS
      IF (NPS.EQ.2) GO TO 22
21  HN3SN = HWOV - EM(M)*A/G
      GO TO 61
22  IF (INUCL.EQ.2) GO TO 17
      WAR = HZ - A35*EM(M)
      HN3SN = HWOV - (CF1*EM2(M) + CF2*EMP(M))/WAR - A35*EM(M)
      GO TO 61
17  HN3SN = HWOV - (EM(L)*ALPHA1 - EM1(M)*ALPHA2)/GS
      TRM = TRX*XINS(L,M)
61  DO 68 N = 1,NPT
      HA = HN3SN - FIELD(N)
      DO 68 IA = 1,NLW
      DH = SQRT(WID(IA))
      IF (ISAT.EQ.0) GO TO 37
      IF (IABOFD.EQ.2) GO TO 29
      EINT(N,IA) = DH*B1(IA)*TRM/(HA*HA + WID(IA) + SAT(IA)) + EINT(N,IA)
      GO TO 68
29  EINT(N,IA) = EINT(N,IA) + TRM*HA*DH*B1(IA)/(HA*HA + WID(IA) + SAT(
      *IA))*2
      GO TO 68
37  IF (ISHAPE.EQ.2) GO TO 32
      IF (IABOFD.EQ.2) GO TO 72
71  EINT(N,IA) = EINT(N,IA) + TRM/(HA*HA + WID(IA))*DH
      GO TO 68
72  EINT(N,IA) = EINT(N,IA) + TRM*HA/(HA*HA + WID(IA))*2*DH
      GO TO 68
32  H = .5*HA*HA/WID(IA)
      IF (H.GT.50.0) GO TO 68
      IF (IABOFD.EQ.2) GO TO 34
33  EINT(N,IA) = EINT(N,IA) + TRM*EXP(-H)/DH
      GO TO 68
34  EINT(N,IA) = EINT(N,IA) + TRM*EXP(-H)*HA/(DH*DH*DH)
68  CONTINUE
      IF (LOP.EQ.2) GO TO 64
63  RK = 4.0
      LOP = 2
      GO TO 65
64  RK = 2.0
      LOP = 1
65  IF (J.EQ.NGS) RK = 1.0
70  CONTINUE
      GO TO 141
80  CONTINUE
      LIP = 1
      RJ = 1.0
      DO 140 K = 1,NA
      PAULS = 1.5707963*FLOAT(K-1)*DF
      COSPHS = COS(PAULS)
      COSPHS = COSPHS*COSPHS
      SINPHS = 1.0 - COSPHS
      GAL2 = GX2*COSPHS + GY2*SINPHS
      IF (INUCL.EQ.2) GO TO 43
44  AAL2 = GX4AX2*COSPHS + GY4AY2*SINPHS
      GO TO 53
45  GA = GXAX * COSPHS + GYAY * SINPHS
      HMAXY1 = HMAX1*COSPHS + HMAX1*SINPHS

```

9-MAY-1984 08:36:50

8-MAR-1983 10:18:31

```

      HX2Y2 = HMAX2*COSPHS + HMAX2*SINPHS
55  RK = RJ
      LIP = 1
      DO 135 J = 1,NGSP
      COSTHS = FLOAT(J-1)*D-
      COSTHS = COSTHS*COSTHS
      SINTHS = 1.0 - COSTHS
      IF (ILC.EQ.1) RK = RK*EXP(COSTHS*(XLAMS2 + XLAM4*COSTHS))
      IF (ILW.EQ.1) GO TO 25
27  DO 25 I=1,NLW
      IF (ISHAPE.EQ.2) GO TO 97
      WJ(I) = 0.75*(WID1(I) + WID2(I)*COSTHS)**2
      GO TO 25
27  WJ(I) = 0.25*(WID1(I) + WID2(I)*COSTHS)**2
25  CONTINUE
25  GS = GA12*SINTHS + GZ12*COSTHS
      APT1 = SQRT(GS)
      TR = RK*(GX2Z2 + GY2*GS)/GS
      BZ = GZ1/APT1
      GZ = GZ - BZ
      IF (INUCL.EQ.2) GO TO 46
25  A35S = AAL2*SINTHS + AZ4A22*COSTHS
      A35 = SQRT(A35S)/GS
      H2ORD = AAL2*(A35S + AZ4A22)/(8.*A35S*GS*GS)
      GO TO 120
25  AHP1 = HMAXY1*SINTHS + HMAXY1*COSTHS
      AHP2 = HMAXY2*SINTHS + HMAXY2*COSTHS
      ALPHA1 = SQRT(AHP1)
      ALPHA2 = SQRT(AHP2)
      COSEPS = (GEHN2 - .25*(GA*SINTHS + GZAZ*COSTHS))/(ALPHA1*ALPHA2)
      XINS(1,1) = 0.25*(1.0 + COSEPS)*(1.0 + COSEPS)
      XINS(3,1) = XINS(1,1)
      XINS(1,2) = 0.5*(1.0 - COSEPS*COSEPS)
      XINS(2,1) = XINS(1,2)
      XINS(2,3) = XINS(1,2)
      XINS(3,2) = XINS(1,2)
      XINS(3,1) = 0.25*(1.0 - COSEPS)*(1.0 - COSEPS)
      XINS(1,3) = XINS(3,1)
      XINS(2,2) = COSEPS*COSEPS
      TRX = TRM
120  DO 47 L = 1,NSPINS
      DO 47 LA = 1,MSPINS
      IF (INUCL.EQ.2) GO TO 24
23  WAR = BZ1 - EM(L)*A35
      HN35N = HWOW - H2ORD*EMP(L)/WAR - EM(L)*A35
      GO TO 55
24  HN35N = HWOW - (EM(LA)*ALPHA1 - EM1(L)*ALPHA2)/AWT1
      TR1 = TRX*XINS(LA,L)
66  DO 47 N = 1,NPT
      HA = HN35N - FIELO(N)
      DO 47 IA = 1,NLW
      DH = SQRT(WID(IA))
      IF (ISAT.EQ.0) GO TO 77
      IF (LABORD.EQ.2) GO TO 79
      FIELO(N,IA) = DH*B1(IA)*TRM/(HA*HA + WID(IA) + SAT(IA))+EINT(N,IA)
      GO TO 47
79  FIELO(N,IA) = EINT(N,IA) + TRM*HA*DH*B1(IA)/(HA*HA + WID(IA) + SAT(

```

9-MAY-1984 08:36:50
8-MAR-1983 10:18:31

```

      *IA)**2
      GO TO 47
77 IF (ISHAPE.EQ.2) GO TO 56
      IF (IABDFD.EQ.2) GO TO 49
48 EINT(N,IA) = EINT(N,IA) + TRM/(HA*HA + WID(IA))*DH
      GO TO 47
49 EINT(N,IA) = EINT(N,IA) + TRM*HA/(HA*HA + WID(IA))**2*Dh
      GO TO 47
50 H = .5*HA*HA/WID(IA)
      IF (H.GT.50,0) GO TO 47
      IF (IABDFD.EQ.2) GO TO 69
51 EINT(N,IA) = EINT(N,IA) + TRM*EXP(-H)/DH
      GO TO 47
69 EINT(N,IA) = EINT(N,IA) + TRM*EXP(-H)*HA/(DH*WID(IA))
47 CONTINUE
      IF (LOP.EQ.2) GO TO 132
131 RK = RJ*4.0
      LOP = 2
      GO TO 133
132 RK = RJ*2.0
      LOP = 1
133 IF (J.EQ.NGS) RK = RJ
133 CONTINUE
      IF (LIP.EQ.2) GO TO 137
135 RJ = 4.0
      LIP = 2
      GO TO 138
137 RJ = 2.0
      LIP = 1
138 IF (K.EQ.NGS) RJ = 1.0
140 CONTINUE
141 DO 1900 K=1,NLW
      YMIN = 0.
      YMAX = 0.
      DO 180 I = 1,NPT
      YE = EINT(I,K)
      IF (YE.GE.YMIN) GO TO 160
150 YMIN = YE
160 IF (YE.LE.YMAX) GO TO 180
170 YMAX = YE
180 CONTINUE
      WRITE(6,191) YMAX,YMIN
191 FORMAT(10H MAXIMUM =,E13.6,10H MINIMUM =,E13.6,/)
      DO 181 I=1,NPT
      EINTN(I,K) = EINT(I,K)*YMINEX/YMIN
      HN(I) = FIELD(I)*DXDH
181 CONTINUE
      WRITE(6,800) (FIELD(I),EINT(I,K),HN(I),EINTN(I,K),I=1,NPT)
800 FORMAT(1X,35X,' COORDINATES FOR SPECTRUM ',1X,' FIELD
      *',5X,' 1ST DERIV ',10X,' NORM, FIELD ',5X,' NORM 1ST DERIV '
      */, (1X,E13.6,7X,E13.6,12X,E13.6,7X,E13.6))
      IF (IPUNCH.NE.0) WRITE(7,801) (FIELD(I),EINT(I,K),I=1,NPT)
801 FORMAT(6E13.6)
      IF (NGPH.EQ.2) GO TO 230
      GAUSSIN = DELB*6.
      WRITE(6,990) GAUSSIN
990 FORMAT(1H0,F9.4,24H GAUSS PER INCH ON PLOT.)

```

9-MAY-1984 08:36:50

8-MAR-1983 10:18:31

```

YS = YMAX
YMAX = - YMIN
YMIN = -YS
ZMAX = FIELD(NPT)
ZMIN = FIELD(1)
NS = NPT/10
C CALL INPLOT(YMIN,YMAX,ZMIN,ZMAX,NS)
DO 500 I=1,NPT
  FY(I) = EINT(I,K)
C   Y = - EINT(1,K)
C   Z = FIELD(I)
C 300 CALL POINT(Y,Z,4)
  300 CONTINUE
C CALL DOPLLOT(IISYZ)
  IF (YESNO.NE.'Y') GO TO 5002
  CALL PLOT(1,1,NFORA,XPE,YPE,0,1)
  TYPE 3000
5000 FORMAT(' SAVE FOR CALCOMP (Y/N) ? ')
  ACCEPT 3001,IANSW
3001 FORMAT(A4)
  IF (IANSW.NE.'Y') GO TO 5002
  WRITE(4,*) NFORA
  DO 7000 JZ = 1,NFORA
    WRITE(4,*) XPE(JZ),YPE(JZ)
7000 CONTINUE
5002 CALL PLOT(1,1,NPT,FIELD,FY,0,1)
  TYPE 3000
  ACCEPT 3001,IANSW
  IF (IANSW.NE.'Y') GO TO 5003
  NPTS = NPT
  WRITE(4,*) NPTS
  DO 5002 JW = 1,NPT
    WRITE(4,*) FIELD(JW),FY(JW)
5002 CONTINUE
5005 GO TO 1900
250 WRITE(6,251)
251 FORMAT(/1X,' WE DONT HAVE PLOT ON PLAIN WHITE PAPER - JOB TERMINAT
      *ED ')
1900 WRITE(6,802)
802 FORMAT(1H1)
2000 CONTINUE
2200 STOP
      END

```

APÊNDICE II

Como exposto no Capítulo II, é possível simular matematicamente o espectro de RPE de um radical nitróxido em um líquido. Os trabalhos desenvolvidos pelo grupo do Dr. J.H. Freed^(24,25,29) são importantes para melhor compreensão da simulação espectral.

Esse espectro é dado pela equação (39), sendo que a evolução temporal da magnetização transversal, entre dois estados, inicial (i) e final (f), é dada pela equação de Liouville:

$$\left(\frac{d}{dt} M_x \right)_{if} = - \frac{i}{h} \langle i | [H_1(t), M_x] | f \rangle \quad (\text{A.1})$$

As diferenças de energia envolvidas nas transições de spin eletrônico e nuclear, são muito menores (1 cm^{-1}) que a energia de translação e rotação molecular (200 cm^{-1}). Isto permite separar o movimento molecular das interações de spin, tratando as transições de spin isoladamente. Devido ao decaimento aleatório, a magnetização transversal em um instante t qualquer pode ser escrita em função da orientação da molécula do radical:

$$\left(M_x(t) \right)_{if} = (M_x(\Omega, t))_{if} \cdot P(\Omega, t) \quad (\text{A.2})$$

onde $P(\Omega, t)$ é a probabilidade de encontrar a molécula na orientação Ω , no instante t e $M_x(\Omega, t)$ é a magnetização quando a molécula tem orientação Ω . A evolução temporal de $P(\Omega, t)$ é dada pela equação de difusão.

$$\frac{\partial P(\Omega, t)}{\partial t} = D \nabla^2_\Omega P(\Omega, t)$$

onde D é a constante de difusão rotacional e $\nabla^2 \Omega$ é o Laplaciano .
O efeito da orientação molecular no espectro é dado pela equação de Liouville, que na forma matricial é:

$$\frac{\partial}{\partial t} \left[\tilde{M}_x P(\Omega, t) \right] = i \tilde{L}(\Omega) \tilde{M}_x P(\Omega, t) + \tilde{M}_x D \nabla^2 \Omega P(\Omega, t) \quad (A.3)$$

onde o símbolo $(\sim)$ é usado para representar matriz e $\tilde{L}(\Omega)$ é o operador de Liouville:

$$\left[\hat{H}_1(\Omega, t), M_x(\Omega, t) \right]$$

A transformada de Fourier de $\tilde{M}_x(\Omega, t) \cdot P(\Omega, t)$ conduz a uma função que depende das frequências espectrais e da orientação molecular: $f(\omega, \Omega)$, e o espectro é dado por:

$$I(\omega) = \frac{1}{\pi} I_m \langle \tilde{M}_x(0) f(\omega, \Omega) \rangle .$$

O programa apresentado no Apêndice III, e elaborado pelo Dr. C.F. Polnaszeck, utiliza para solução do sistema (A.3) a expansão de $f(\omega, \Omega)$ em funções ortogonais:

$$f(\omega, \Omega) = \sum_m [C_m^n(\omega)] \cdot \phi_m(\Omega); \quad \phi_m(\Omega) \sim \phi_{kM}^2(\Omega)$$

sendo que $\phi_{kM}^L(\Omega)$ são autofunções de $\nabla^2 \Omega$: harmônicos esféricos generalizados ou matrizes de Wigner^(28,68).

O sistema (A.3) é um conjunto de equações acopladas pelos termos pseudo similares, e tem dimensões r :

Esse sistema pode ser escrito de maneira compacta por:

$$(\tilde{A} + \tilde{L}k) \tilde{C} = \tilde{U} \quad (A.4)$$

onde $\tilde{A}$ é a matriz $r \times r$, formada pelos coeficientes de $C_m^n(\omega) = (\tilde{A} = \tilde{L}(\Omega) + D \nabla^2 \Omega)$, $\tilde{C}$ é uma matriz coluna de dimensão r , formada pe

los $C_m^n(\omega)$ e $\tilde{U}$ é uma matriz coluna cujos termos são dados por:
 $U_L = \delta(L, 0)$ sendo δ , o delta de Kroenecker. A solução do sistema envolve portanto a diagonalização de $\tilde{A}$.

A dimensão da matriz $\tilde{A}$, isto é, o número de equações acopladas é dada pelo número de termos L e K da expansão em funções ortogonais:

$$r = 3 + [3L(L+6) - (L-K) \cdot (L+K+2)] / 4 \quad .$$

Os valores de L e K são determinados pelo valor do tempo de correlação, através da relação $|\hat{H}_1(t)\tau| \sim 1$, sendo que $|\hat{H}_1(t)| \sim |A_{zz} - A_{xx}|$ (anisotropia de $\tilde{A}$), sendo A_{zz} e A_{xx} medidos em rd/s.

Polnaszeck⁽⁴⁴⁾, propôs um método empírico para determinar L , para o movimento browniano, através da relação:

$$|\hat{H}_1(t)| < L(L+1)D$$

sendo D a constante de difusão, dada pela relação de Stokes-Einstein, para uma partícula de raio a sofrendo difusão browniana em um líquido de viscosidade η , à temperatura T :

$$D = \frac{kT}{8\pi a \eta}$$

De uma maneira geral, para movimento rápido ($\tau \lesssim 10^{-10}$ seg) $L \sim 2$, para movimento intermediário $10^{-9} \leq \tau \leq 10^{-8}$ seg $L \sim 10$, e para movimento lento $\tau \geq 10^{-7}$ seg, $L \sim 20$. A expansão em K é truncada para valores bem menores que L ($K \ll L$).

O programa (Apêndice III) é composto de três partes:

- a) construção da matriz coluna $\tilde{C}$;
- b) construção da matriz de coeficientes de $\tilde{C} = (\tilde{A} + \tilde{I}k)$, nessa parte é necessário construir as matrizes de Wigner, para a expansão. A relação de recorrência é encontrada no livro de Edmonds⁽⁶⁸⁾.

Nessa parte também é calculado o espectro;

c) Subrotina para diagonalizar $\tilde{A}$.

Essa subrotina, usa o algoritmo QR de Rutishauser⁽³²⁾, e foi desenvolvida por Gordon e Messenger⁽³³⁾, e o principal objetivo é transformar a matriz banda $\tilde{A}$, em uma matriz tridiagonal, através da aplicação de rotações de Jacobi:

$$\tilde{J}^j(\phi) = \begin{pmatrix} \cos\phi & \sin\phi \\ -\sin\phi & \cos\phi \end{pmatrix}$$

todo elemento $A_{j\ell}$ de $\tilde{A}$ com $\ell = j+1$ é reduzido a zero por meio das rotações de Jacobi $\tilde{J}^{(j+1)}(\phi)$, que satisfazem a equação

$$A_{j\ell} \cos\phi + A_{j\ell+1} \sin\phi = 0 \quad .$$

O algoritmo usa a eliminação sequencial da subdiagonal, iniciando pela que contém elementos diferentes de zero e que é mais distante da diagonal principal, e o faz através de três passos:

- a) É introduzida, em uma subdiagonal, a matriz de Jacobi, que elimina o primeiro elemento diferente de zero;
- b) a matriz transformada é calculada. Esta operação pode gerar elementos diferentes de zero fora da matriz banda;
- c) uma nova rotação de Jacobi é introduzida para eliminar os elementos, diferentes de zero, fora da banda. O algoritmo retorna à (b), até o último elemento da matriz, fora da tridiagonal, diferente de zero.

O programa inclui uma expansão em valores pares e ímpares. Os termos ímpares são importantes para tempo de correlação maior que 5×10^{-8} seg, sendo que seu efeito é o de diminuir a intensidade na região de campo baixo.

Além dos parâmetros L e K, os outros parâmetros de en-

trada são: componentes de $\bar{g}$ e $\bar{A}$, obtidos por simulação do espectro rígido, ou variação angular do monocristal, largura de linha, largura de linha residual, modelo de reorientação, e anisotropia do tensor difusão rotacional ($\hat{N} = R_{//} / R_{\perp}$).

O modelo de reorientação, depende da relação entre tamanhos de molécula de solvente e soluto. Quando a molécula de soluto for muito maior que a molécula do solvente, o modelo de reorientação será browniano⁽¹⁾.

A largura de linha, e largura de linha residual podem ser bem determinadas se houver a possibilidade de obter espectros na região de movimento rápido.

Dessa forma, se $L, K, \bar{g}, \bar{A}$, largura de linha, e contribuição de alargamento não homogêneo para a largura de linha forem determinados de maneira adequada, obtém-se maior precisão na determinação dos espectros simulados.

Convém notar ainda, que é muito importante para a simulação espectral obter-se espectros experimentais com parâmetros adequados do espectrômetro a fim de evitar distorções das linhas causadas pelo instrumento.

APÊNDICE III

Programa para simular espectros
de RPE com movimento⁽²⁹⁾.

9-MAY-1984 08:37:36

27-JUL-1983 09:52:14

```

      IMPLICIT REAL*8(A-H,O-Z)
      LOGICAL*1 TEXTO(80)
      COMPLEX*16 CSYM,CSYM1,CSYM2,VALUE,AMP,DER,F0
      INTEGER*2 JFORA,NFORA
      REAL*4 XPE,YPE,XAD,YAD
      REAL BFLD,DERAB,TITLE ,XP,YP
      REAL DMAX,DMIN,DS,ZMAX,ZMIN,Y,Z
      INTEGER*2 NPTS
      LOGICAL XPLOT,PAMPEV,WANPEV,LODD,YESNO
      COMMON /VAR/ F0,CSYM,AL,R,B,XRZ,F2,D,D2,OPR,D2PR,SFLL,SFLL1,SFLL2,
      *SFLL1L1,SFLL1L2,SFLL1L3,DROT,J1,J2,J3,J4,J5,LL1,LL2,LL3,LL12,LL13,LL2
      *1,LL22,LL23,L1L12,L1L22,L1L32,KTERM,JCOUNT,IEND,LODD
      DIMENSION IISYZ(4)
      DIMENSION SY(63,8),SY2(363,3),CSYM(357,52),VALUE(357),AMP(357),CSY
      1M1(357),CSYM2(357),C(401),BFLD(401),TITLE(20),DROT(2),DERAB(1401),
      2XP(1401),YP(1401),XPE(1401),YPE(1401)
      EQUIVALENCE (CSYM1(1),CSYM(1,1)),(CSYM2(1),CSYM(1,2))
      DATA IISYZ(1),IISYZ(2),IISYZ(3),IISYZ(4)/' ',' ','E',' '
      TYPE 4998
4998  FORMAT(3X,'$ DESEJA DADO EXPERIMENTAL, [Y/N] ? ')
      ACCEPT 4999,YESNO
4999  FORMAT(1A4)
      IF(YESNO.NE.'Y')GO TO 5001
      READ(7)TEXTO
      READ(7)XAD,YAD,NFORA
      DO 5000 JF = 1,NFORA
5000  READ(7,END=5001)JFORA,XPE(JF),YPE(JF)
      GO TO 5000
5001  CONTINUE
      READ(5,1) NPT,LMAX,NBIM,JDIM,NSY,NSY2
      1  FORMAT(5IS)
      LMAX1 = LMAX + 1
      LMAX2 = (3*LMAX) + 1
      LMAX3 = 1 + LMAX
      LMAX4 = 3*(LMAX + 1)
      LMAX5 = 3*((LMAX + 2)*(LMAX + 4))/4 - 3*(LMAX/2 + 1)
      IF((LMAX4.GT.NSY).OR.(LMAX5.GT.NSY2)) GO TO 300
      SY(1,1) = 0.00
      SY(1,2) = 0.00
      SY(2,1) = 1.00/DSQRT(5.00)
      SY(2,2) = 2.0-1
      DO 201 I=3,LMAX1,2
      XI = DFLOAT(I) - 1.00
      XXI = 2.00*XI
      SY(1,1) = -DSQRT((XI*(XI + 1.00))/((XXI + 3.00)*(XXI + 1.00)*(XXI
      1- 1.00)))
      SY(1,2) = SY(1,1)*SY(1,1)
      SY(1+1,1) = DSQRT((3.00*(XI + 2.00)*(XI + 1.00))/(2.00*(XXI + 5.00
      1)*(XXI + 3.00)*(XXI + 1.00)))
201  SY(1+1,2) = SY(1+1,1)*SY(1+1,1)
      DO 2 1=3,8
      DO 2 J=1,3
      2  SY(J,1) = 0.00
      SY(3,3) = -1.00/DSQRT(5.00)
      X000 = -1.00
      DO 3 1=4,LMAX2,3
      XI = (DFLOAT(I) - 1.00)/3.00

```

9-MAY-1984 08:37:36
27-JUL-1983 09:52:14

```

XXI = 2.00*XI
SY(1,3) = X000*DSQRT(3.00/(2.00*(XXI + 3.00)*(XXI + 1.00)*(XXI - 1.00)))
SY(1+1,3) = -X000*DSQRT(XI/((XXI + 3.00)*(XXI + 1.00)*2.00))
SY(1+2,3) = -X000*DSQRT(((XI + 1.00)*(XI + 3.00))/((XXI + 5.00)*(XI + 3.00)*(XXI + 1.00)))
SY(1,4) = X000*(((XI*(XI + 1.00)) - 3.00)/DSQRT((XXI + 3.00)*(XI + 1.00)*(XXI + 1.00)*XI*(XXI - 1.00)))
SY(1+1,4) = X000*DSQRT(3.00/((XXI + 3.00)*(XI + 1.00)*(XXI + 1.00)))
SY(1+2,4) = -X000*DSQRT(((5.00*(XI + 3.00)*XI)/(2.00*(XXI + 5.00)*(XI + 3.00)*(XXI + 1.00))))
SY(1,5) = SY(1,3)
SY(1+1,5) = -X000*DSQRT((XI + 2.00)/(2.00*(XXI + 3.00)*(XXI + 1.00)))
SY(1+2,5) = X000*DSQRT(((XI + 2.00)*XI)/(XXI + 5.00)*(XXI + 3.00)*(XXI + 1.00)))
SY(1,6) = -X000*3.00*DSQRT((3.00*(XI + 2.00)*(XI - 1.00))/((XXI + 5.00)*(XI + 1.00)*(XXI + 1.00)*XXI*(XXI - 1.00)))
SY(1+1,6) = X000*(XI - 2.00)*DSQRT((XI + 3.00)/((XXI + 3.00)*(XI + 1.00)*(XXI + 1.00)*XI))
SY(1+2,6) = X000*DSQRT((XI*(XI + 4.00)*(XI + 3.00))/((XXI + 5.00)*(XI + 1.00)*(XXI + 1.00)*(XXI + 3.00)))
SY(1,7) = X000*((12.0 - (XI*(XI + 1.00)))/DSQRT((XXI + 5.00)*(XI + 1.00)*(XXI + 1.00)*XI*(XXI - 1.00)))
SY(1+1,7) = -X000*2.00*DSQRT((3.00*(XI + 3.00)*(XI - 1.00))/((XI + 2.00)*(XXI + 3.00)*(XXI + 1.00)*XI*(XI + 1.00)))
SY(1+2,7) = X000*DSQRT(((XI + 4.00)*(XI + 3.00)*XI*(XI - 1.00)*3.00)/(XXI + 5.00)*(XI + 2.00)*(XXI + 3.00)*(XXI + 2.00)*(XXI + 1.00)))
SY(1,8) = SY(1,6)
SY(1+1,8) = X000*(XI + 4.00)*DSQRT((XI - 1.00)/((XI + 2.00)*(XXI + 1.00)*(XXI + 3.00)*(XXI + 2.00)*(XXI + 1.00)))
SY(1+2,8) = -X000*DSQRT((XI*(XI + 3.00)*(XI - 1.00))/((XXI + 5.00)*(XI + 2.00)*(XXI + 3.00)*(XXI + 1.00)))
5 X000 = -X000
SY(4,7) = 0.00
6 = 1
X000 = 1.00
DO 5 I=1,LMAX3
XI = DFLOAT(I) - 1.00
XXI = 2.00*XI
JK = (I+1)/2
DO 6 J=1,JK
XJ = (2.00*DFLOAT(J)) - 2.00
IF((I+J).EQ.2) GO TO 7
SY2(K,1) = X000*(((3.00*XJ*XJ) - (XI*(XI + 1.00)))/DSQRT((XXI + 3.00)*(XI + 1.00)*(XXI + 1.00)*XI*(XXI - 1.00)))
SY2(K+1,1) = -X000*XJ*DSQRT((3.00*(XI + XJ + 1.00)*(XI - XJ + 1.00))/((XI + 2.00)*(XXI + 3.00)*(XI + 1.00)*(XXI + 1.00)*XI))
SY2(K,2) = X000*DSQRT((6.00*(XI - XJ - 1.00)*(XI - XJ)*(XI + XJ + 1.00)*(XI + XJ + 2.00))/((XXI + 3.00)*(XXI + 2.00)*(XXI + 1.00)*2*XI*(XXI - 1.00)))
SY2(K+1,2) = X000*DSQRT(((XI + XJ + 1.00)*(XI + XJ + 2.00)*(XI + XJ + 3.00)*(XI - XJ))/((XI + 2.00)*(XXI + 3.00)*(XI + 1.00)*(XXI + 2.00)*XXI))
SY2(K,3) = X000*DSQRT((6.00*(XI + XJ - 1.00)*(XI + XJ)*(XI - XJ +

```

9-MAY-1984 08:37:36
27-JUL-1983 09:52:14

```

11.00)*(XI - XJ + 2.00))/((XXI + 3.00)*(XXI + 2.00)*(XXI + 1.00)*XX
21*(XXI - 1.00)))
  SY2(K+1,3) = -X000*DSQRT(((XI - XJ + 1.00)*(XI - XJ + 2.00)*(XI -
1XJ + 3.00)*(XI + XJ))/((XI + 2.00)*(XXI + 3.00)*(XI + 1.00)*(XXI +
2 1.00)*XXI)))
/ SY2(K+2,1) = X000*DSQRT((6.00*(XI + XJ + 2.00)*(XI + XJ + 1.00)*(X
11 - XJ + 2.00)*(XI - XJ + 1.00))/((XXI + 5.00)*(XXI + 4.00)*(XXI +
2 3.00)*(XXI + 2.00)*(XXI + 1.00)))
  SY2(K+2,2) = X000*DSQRT(((XI + XJ + 1.00)*(XI + XJ + 2.00)*(XI + X
1J + 3.00)*(XI + XJ + 4.00))/((XXI + 5.00)*(XXI + 4.00)*(XXI + 3.00
2)*(XXI + 2.00)*(XXI + 1.00)))
  SY2(K+2,3) = X000*DSQRT(((XI - XJ + 1.00)*(XI - XJ + 2.00)*(XI - X
1J + 3.00)*(XI - XJ + 4.00))/((XXI + 5.00)*(XXI + 4.00)*(XXI + 3.00
2)*(XXI + 2.00)*(XXI + 1.00)))
2 K = K + 3
3 X000 = -X000
  DO 301 I=1,2
  DO 301 J=1,3
501 SY2(1,J) = 0.00
  DO 8 LPT=1,NPT
  READ(5,9) TITLE
9 FORMAT(20A4)
  READ(5,10) AX,AY,AZ,GX,GY,GZ
10 FORMAT(8010,3)
  READ(5,10) CORR1,XRZ,THETA,T2IN2,BCEN
  READ(5,13) L,KTERM,1ROT,NSET,LODD,PAMPEV,WAMPEV,XPLOT
13 FORMAT(4I5,4L5)
  DELG0 = GZ = ((GX + GY)/2.00)
  DELG2 = GX - GY
  G = (GX + GY + GZ)/3.00
  GAMMA = (G*9.27310+6)/1.0544300
  F0AB = GAMMA
  F0 = (DELG0*BCEN*2.00*9.27310+6)/(1.0544300*3.00)
  G0 = F0
  F2 = (DELG2*BCEN*9.27310+6)/(DSQRT(6.00)*1.0544300)
  D = (AX + AY - (2.00*AZ))/(2.00*DSQRT(6.00))
  D2 = ((AY - AX)/4.00)
  B = -((AX + AY + AZ)/6.00)
  THSQ = THETA*THETA
  WRITE(6,14)TITLE,AX,AY,AZ,D,D2,B,GX,GY,GZ,G0,F2,L,KTERM,BCEN,T2IN2
14 FORMAT(1H1,20A4,///,' A(X), A-TENSOR COMPONENT ALONG X PRINCIPAL
1 AXIS ',D12.5,' GAUSS',/, ' A(Y), A-TENSOR COMPONENT ALONG Y PRI
2NCIPAL AXIS ',D12.5,' GAUSS',/, ' A(Z), A-TENSOR COMPONENT ALONG
3Z PRINCIPAL AXIS ',D12.5,' GAUSS',/,9X,' CALCULATED VALUE OF D(
40) ',D12.5,' GAUSS',/, ' CALCULATED VALUE OF D(2) ',D12
5.5,' GAUSS',/, ' CALCULATED VALUE OF B ',D12.5,' GAUSS',
6///, ' G(X), G-TENSOR COMPONENT ALONG X PRINCIPAL AXIS ',F8.5,/, '
7 G(Y), G-TENSOR COMPONENT ALONG Y PRINCIPAL AXIS ',F8.5,/, ' G(Z
7), G-TENSOR COMPONENT ALONG Z PRINCIPAL AXIS ',F8.5,/,9X,' CALC
8ULATED VALUE OF F(0) ',D12.5,' RADIANS PER SECOND',/,9X,' CALCUL
9ATED VALUE OF F(2) ',D12.5,' RADIANS PER SECOND',/, ' THE TERMIN
*ATING L VALUE IS ',13,/, ' THE TERMINATING K VALUE IS ',13,/,
*, ' THE CENTER OF THE SPECTRUM ',D12.5,' GAUSS',/, ' THE ORIENTATI
*ON DEPENDENT PART OF THE LINEWIDTH IS ',E12.5,' GAUSS',/)
  IF(LODD) WRITE(6,57)
57 FORMAT(//1X,' 000 L VALUES ARE INCLUDED IN THE CALCULATION',///)
  GO TO (15,16,17,18,19,20), 1ROT

```

IN

9-MAY-1984 08:37:36
27-JUL-1983 09:52:14

```

15 R = 1.00/(6.00*DSQRT(XRZ)*CORRT*F0AB)
   WRITE(6,21)
   GO TO 27
16 R = DSQRT(7.00)/(6.00*DSQRT(XRZ)*CORRT*F0AB)
   WRITE(6,22)
   GO TO 27
17 R = 1.00/(DSQRT(XRZ)*CORRT*F0AB)
   WRITE(6,23)
   GO TO 27
18 R = DSQRT(1.00 + THSQ)/(6.00*DSQRT(XRZ)*CORRT*F0AB)
   WRITE(6,24) THETA
   GO TO 27
19 R = 5.00/(6.00*DSQRT(XRZ)*CORRT*F0AB*(1.00/(1.00 + 0.2500*THSQ*THSQ
   1))*(4.00/(1.00 + THSQ*THSQ)))
   WRITE(6,25) THETA
   GO TO 27
20 WRITE(6,26) THETA
   R = (5.00*THSQ)/((12.00*DSQRT(XRZ)*CORRT*F0AB)*(2.00 - (DEXP(-(0.5
   100*THSQ)) + DEXP(-(2.00*THSQ)))))
21 FORMAT(1H , ' BROWNIAN ROTATIONAL DIFFUSION',/)
22 FORMAT(1H , ' SIMPLE "FREE" ROTATIONAL DIFFUSION',/)
23 FORMAT(1H , ' RANDOM JUMP ROTATIONAL DIFFUSION',/)
24 FORMAT(1H , ' EGELSTAFF JUMP ROTATIONAL DIFFUSION',/, ' THE JUMP ANG
   1LE IS ',D12.5,/)
25 FORMAT(1H , ' JUMP ROTATIONAL DIFFUSION WITH AN EXPONENTIAL DISTRIB
   1UTION OF JUMP ANGLES ',/, ' THE MEAN JUMP ANGLE IS ',D12.5,/)
26 FORMAT(1H , ' JUMP ROTATIONAL DIFFUSION WITH A GAUSSIAN DISTRIBUTIO
   1N OF JUMP ANGLES ',/, ' THE MEAN JUMP ANGLE IS ',D12.5,/)
27 WRITE(6,28) CORRT,XRZ
28 FORMAT(1H ,/, ' THE CALCULATED ROTATIONAL CORRELATION TIME IS ',D1
   12.5, ' SECONDS PER RADIAN',/, ' THE ANISOTROPY OF THE ROTATION IS ',
   2D12.5,/)
   DPR = -(0*DSQRT(8.00/3.00))
   D2PR = -(02*DSQRT(8.00/3.00))
   T2IN2 = T2IN2*DSQRT(3.00)*0.500
   F0 = (F0/F0AB)*(1.00,0.00) + (0.00,1.00)*T2IN2
   F2 = F2/F0AB
   IF(.NOT.L0DD) GO TO 29
   M = 3 + (3*L) + (((18*L*KTERM) - (9*KTERM*KTERM) + (6*KTERM))/8)
   M = ((9*KTERM)/2) + 16
   IF(L.EQ.KTERM) M = ((9*KTERM)/2) + 7
   GO TO 30
29 M = 3 + (3*L) + (((12*L*KTERM) - (6*KTERM*KTERM) + (12*KTERM))/8)
   M = (3*KTERM) + 16
   IF(L.EQ.KTERM) M = (3*L) + 10
30 IF(KTERM.EQ.0) M = 10
   IF((L.EQ.2).AND.(KTERM.EQ.2)) M = 13
   IF((L.EQ.2).AND.(KTERM.EQ.0)) M = 7
   IF((N.GT.NDIM).OR.(M.GT.JDIM)) GO TO 302
   DO 31 I=1,N
   DO 31 J=1,M
31 CSYM(1,J) = (0.00,0.00)
   CSYM(1,4) = (-1.00,0.00)*((F0 + DPR)*SY(2,2)*DSQRT(5.00))
   CSYM(1,7) = (1.00,0.00)*(0*SY(2,1)*SY(3,3)*DSQRT(5.00))
   CSYM(2,4) = (-1.00,0.00)*(F0*SY(2,2)*DSQRT(5.00))
   CSYM(2,6) = CSYM(1,7)
   CSYM(2,7) = CSYM(2,6)

```

9-MAY-1984 08:37:36
27-JUL-1983 09:52:14

```

CSYM(3,4) = (-1.00,0.00)*((F0 - DPR)*SY(2,2)*DSQRT(5.00))
CSYM(3,6) = CSYM(1,7)
CSYM(1,1) = (1.00,0.00)*(2.00*B)
CSYM(3,1) = (-1.00,0.00)*(2.00*B)
IF(KTERM.EQ.0) GO TO 32
CSYM(1,10) = (-1.00,0.00)*((F2 + D2PR)*SY(2,1)*SY2(3,2)*DSQRT(1.0+
1))
CSYM(1,13) = (1.00,0.00)*(D2*SY(3,3)*SY2(3,2)*DSQRT(1.0+1))
CSYM(2,10) = (-1.00,0.00)*(F2*SY(2,1)*SY2(3,2)*DSQRT(1.0+1))
CSYM(2,12) = CSYM(1,13)
CSYM(2,15) = CSYM(2,12)
CSYM(3,10) = (-1.00,0.00)*((F2 - D2PR)*SY(2,1)*SY2(3,2)*DSQRT(1.0+
1))
CSYM(3,12) = CSYM(2,15)
32 AL = 2.00
IEND = (L/2)
J = 4
DO 33 I=1,IEND
IF(.NOT.LODD) GO TO 34
K = (9*I) + 7
IF((KTERM/2).LT.I) K = (9*(KTERM/2)) + 7
GO TO 35
34 K = (6*I) + 7
IF((KTERM/2).LT.I) K = (3*KTERM) + 7
35 LL1 = (2*I) + 1
LL21 = LL1 + 1
LL2 = (6*I) + 1
LL12 = LL2 + 1
LL22 = LL2 + 2
LL112 = LL2 + 3
LL122 = LL2 + 4
LL132 = LL2 + 5
LL3 = (3*I*(I + 1)) + 1
LL13 = LL3 + 1
LL23 = LL3 + 2
J1 = J + 1
J2 = J + 2
J3 = J + 3
J4 = J + 4
J5 = J + 5
JCOUNT = 0
SFL1 = (2.00*AL) + 1.00
SFL1L1 = (2.00*AL) + 3.00
SFL1L2 = DSQRT((4.00*AL*AL) + (1.20+1*AL) + 5.00)
SFL1L3 = DSQRT((4.00*AL*AL) + (8.00*AL) + 3.00)
SFL1L2 = DSQRT((4.00*AL*AL) + (1.60+1*AL) + 1.50+1)
SFL1L3 = DSQRT((4.00*AL*AL) + (2.00+1*AL) + 2.10+1)
ALL = AL
LJUMP = 2*I
DO 36 IR=1,2
GO TO (37,38,39,40,41,42),IRUT
37 DR0T(IR) = R*ALL*(ALL + 1.00)
GO TO 36
38 DR0T(IR) = R*((ALL*(ALL + 1.00))/DSQRT(1.00 + (ALL*(ALL + 1.00))))
GO TO 36
39 DR0T(IR) = R
GO TO 36

```

1. THE FOLLOWING INFORMATION IS FOR THE USE OF THE USER ONLY.
 2. THE FOLLOWING INFORMATION IS FOR THE USE OF THE USER ONLY.
 3. THE FOLLOWING INFORMATION IS FOR THE USE OF THE USER ONLY.

9-MAY-1984 08:37:36
27-JUL-1983 09:52:14

```

40 DROT(IR) = (R*ALL*(ALL + 1.00))/(1.00+THSQ/6.00*ALL*(ALL+1.00))
   GO TO 36
41 DROT(IR) = 0.00
   DO 43 IJUMP=1,LJUMP
45 DROT(IR) = DROT(IR) + ((DFLOAT(IJUMP)**2)/(1.00 + ((.500*THSQ*DFLO
   LAT(IJUMP))**2)))
   DROT(IR) = DROT(IR)*((6.00*R)/((2.00*ALL) + 1.00))
   GO TO 45
42 DROT(IR) = 0.00
   DO 44 IJUMP=1,LJUMP
44 DROT(IR) = DROT(IR) + DEXP(-(500*THSQ*DFLOAT(IJUMP)*DFLOAT(IJUMP)
   1))
   DROT(IR) = ((2.00*R)/((2.00*ALL+1.00)*THSQ/6.00))*(DFLOAT(LJUMP)-
   1)*DROT(IR)
45 LJUMP = LJUMP + 1
36 ALL = ALL + 1.00
   IF(1END.EQ.1) GO TO 46
   CSYM(J,K) = (-1.00,0.00)*(F0 + DPR)*SY(LL21,2)*SFLL2)
   CSYM(J,K+3) = (1.00,0.00)*(D*SY(LL21,1)*SY(LL22,3)*SFLL2)
   CSYM(J1,K) = (-1.00,0.00)*(F0*SY(LL21,2)*SFLL2)
   CSYM(J1,K+2) = CSYM(J,K+3)
   CSYM(J1,K+3) = CSYM(J1,K+2)
   CSYM(J2,K) = (-1.00,0.00)*((F0 - DPR)*SY(LL21,2)*SFLL2)
   CSYM(J2,K+2) = CSYM(J1,K+3)
   CSYM(J3,K) = (1.00,0.00)*((F0 + (DPR/2.00))*SY(LL21,1)*SY(LL22,4)*
   1*SFLL2)
   CSYM(J3,K+3) = (1.00,0.00)*(D*SY(LL21,1)*SY(LL22,5)*SFLL2)
   CSYM(J3,K+2) = CSYM(J3,K+3)
   CSYM(J3,K+2) = (-1.00,0.00)*((D/DSQRT(2.00))*SY(LL21,1)*SY(LL22,6)
   1*SFLL2)
   CSYM(J4,K) = (1.00,0.00)*((F0 - (DPR/2.00))*SY(LL21,1)*SY(LL22,4)*
   1*SFLL2)
   CSYM(J4,K+3) = CSYM(J3,K+3)
   CSYM(J4,K+2) = CSYM(J4,K+3)
   CSYM(J4,K+1) = CSYM(J3,K+2)
   CSYM(J5,K) = (-1.00,0.00)*(F0*SY(LL21,1)*SY(LL22,7)*SFLL2)
   CSYM(J5,K+2) = (-1.00,0.00)*((D/DSQRT(2.00))*SY(LL21,1)*SY(LL22,8)
   1*SFLL2)
   CSYM(J5,K+1) = CSYM(J5,K+2)
   IF(KTERM.EQ.0) GO TO 47
   CSYM(J,K+6) = (-1.00,0.00)*((F2 + D2PR)*SY(LL21,1)*SY2(LL23,2)*
   1*SFLL2*DSQRT(2.00))
   CSYM(J,K+9) = (1.00,0.00)*(D2*SY(LL22,3)*SY2(LL23,2)*SFLL2*DSQR
   1(2.00))
   CSYM(J1,K+6) = (-1.00,0.00)*(F2*SY(LL21,1)*SY2(LL23,2)*SFLL2*DS
   1QRT(2.00))
   CSYM(J1,K+8) = CSYM(J,K+9)
   CSYM(J1,K+9) = CSYM(J1,K+8)
   CSYM(J2,K+6) = (-1.00,0.00)*((F2 - D2PR)*SY(LL21,1)*SY2(LL23,2)
   1*SFLL2*DSQRT(2.00))
   CSYM(J2,K+8) = CSYM(J1,K+9)
   CSYM(J3,K+6) = (1.00,0.00)*((F2 + (D2PR/2.00))*SY(LL22,4)*SY2(L
   1L23,2)*SFLL2*DSQRT(2.00))
   CSYM(J3,K+3) = (1.00,0.00)*(D2*SY(LL22,5)*SY2(LL23,2)*SFLL2*DSQ
   1RT(2.00))
   CSYM(J3,K+4) = CSYM(J3,K+3)
   CSYM(J3,K+5) = (-1.00,0.00)*(D2*SY(LL22,6)*SY2(LL23,2)*SFLL2)

```


9-MAY-1984 08:37:36
27-JUL-1983 09:52:14

```

CSYM(J4,K+6) = (1.00,0.00)*((F2 - (D2PR/2.00))*SY(LL22,4)*SY2(L
1L23,2)*SFLL2*DSQRT(2.00))
CSYM(J4,K+3) = CSYM(J3,K+3)
CSYM(J4,K+4) = CSYM(J4,K+3)
CSYM(J4,K+7) = CSYM(J3,K+8)
CSYM(J5,K+6) = (-1.00,0.00)*(F2*SY(LL22,7)*SY2(LL23,2)*SFLL2*DSQRT
1(2.00))
CSYM(J5,K+4) = (-1.00,0.00)*(D2*SY(LL22,8)*SY2(LL23,2)*SFLL2)
CSYM(J5,K+5) = CSYM(J5,K+4)
IF(.NOT.L000) GO TO 46
KI = K - (3*I)
IF(I.GT.(KTERM/2)) KI = K - (3*(KTERM/2))
CSYM(J,KI) = (1.00,0.00)*(D2*SY(LL12,3)*SY2(LL13,2)*SFLL1*DSQRT(2
1.00))
CSYM(J1,KI-1) = CSYM(J,KI)
CSYM(J1,KI) = CSYM(J,KI)
CSYM(J2,KI-1) = CSYM(J,KI)
CSYM(J3,KI-3) = (1.00,0.00)*((F2 + (D2PR/2.00))*SY(LL12,4)*SY2(LL1
13,2)*SFLL1*DSQRT(2.00))
CSYM(J3,KI-1) = (-1.00,0.00)*(D2*SY(LL12,6)*SY2(LL13,2)*SFLL1)
CSYM(J4,KI-3) = (1.00,0.00)*((F2 - (D2PR/2.00))*SY(LL12,4)*SY2(LL1
13,2)*SFLL1*DSQRT(2.00))
CSYM(J4,KI-2) = CSYM(J3,KI-1)
CSYM(J5,KI-3) = (-1.00,0.00)*(F2*SY(LL12,7)*SY2(LL13,2)*SFLL1*DSQR
1T(2.00))
CSYM(J5,KI-5) = (-1.00,0.00)*(D2*SY(LL12,8)*SY2(LL13,2)*SFLL1)
CSYM(J5,KI-4) = CSYM(J5,KI-5)
46 IF(KTERM.EQ.0) GO TO 47
CSYM(J,7) = (-1.00,0.00)*((F2 + D2PR)*SY(LL1,1)*SY2(LL3,2)*SFLL
1*DSQRT(2.00))
CSYM(J,10) = (1.00,0.00)*(D2*SY(LL2,3)*SY2(LL3,2)*SFLL*DSQRT(2.
100))
CSYM(J1,7) = (-1.00,0.00)*(F2*SY(LL1,1)*SY2(LL3,2)*SFLL*DSQRT(2
1.00))
CSYM(J1,9) = CSYM(J,10)
CSYM(J1,10) = CSYM(J1,9)
CSYM(J2,7) = (-1.00,0.00)*((F2 - D2PR)*SY(LL1,1)*SY2(LL3,2)*SFL
1L*DSQRT(2.00))
CSYM(J2,9) = CSYM(J1,10)
CSYM(J3,7) = (1.00,0.00)*((F2 + (D2PR/2.00))*SY(LL2,4)*SY2(LL3,
12)*SFLL*DSQRT(2.00))
CSYM(J3,4) = (1.00,0.00)*(D2*SY(LL2,5)*SY2(LL3,2)*DSQRT(2.00)*S
1FLL)
CSYM(J3,5) = CSYM(J3,4)
CSYM(J3,9) = (-1.00,0.00)*(D2*SY(LL2,6)*SY2(LL3,2)*SFLL)
CSYM(J4,7) = (1.00,0.00)*((F2 - (D2PR/2.00))*SY(LL2,4)*SY2(LL3,
12)*SFLL*DSQRT(2.00))
CSYM(J4,4) = CSYM(J3,4)
CSYM(J4,5) = CSYM(J4,4)
CSYM(J4,8) = CSYM(J3,9)
CSYM(J5,7) = (-1.00,0.00)*(F2*SY(LL2,7)*SY2(LL3,2)*SFLL*DSQRT(2.00
1))
CSYM(J5,5) = (-1.00,0.00)*(D2*SY(LL2,8)*SY2(LL3,2)*SFLL)
CSYM(J5,6) = CSYM(J5,5)
47 CSYM(J,4) = (1.00,0.00)*(D*SY(LL1,1)*SY(LL2,3)*SFLL)
CSYM(J1,3) = CSYM(J,4)
CSYM(J1,4) = CSYM(J,4)

```

9-MAY-1984 08:37:36
27-JUL-1983 09:52:14

```

CSYM(J2,3) = CSYM(J,4)
CSYM(J3,3) = (-1.00,0.00)*((D/DSQRT(2.00))*SY(LL2,6)*SY(LL1,1)*SFL
1L)
CSYM(J4,2) = CSYM(J3,5)
CSYM(J,1) = ((1.00,0.00)*((2.00*B) - (SFLL*(F0 + DPR)*SY(LL1,2))))
1 + ((0.00,-1.00)*DROT(1))
CSYM(J1,1) = ((-1.00,0.00)*(SFLL*F0*SY(LL1,2))) + ((0.00,-1.00)*DR
1OT(1))
CSYM(J2,1) = ((1.00,0.00)*(-2.00*B) - (SFLL*(F0 - DPR)*SY(LL1,2))
1)) + ((0.00,-1.00)*DROT(1))
CSYM(J3,1) = ((1.00,0.00)*(B + (SFLL*(F0 + (DPR/2.00))*SY(LL1,1)*S
1Y(LL2,4)))) + ((0.00,-1.00)*DROT(1))
CSYM(J4,1) = ((1.00,0.00)*(-B + (SFLL*(F0 - (DPR/2.00))*SY(LL1,1)
1*SY(LL2,4)))) + ((0.00,-1.00)*DROT(1))
CSYM(J5,1) = ((-1.00,0.00)*(SFLL*F0*SY(LL2,7)*SY(LL1,1))) + ((0.00
1,-1.00)*DROT(1))
J = J + 6
CALL INIER(I,J,K,SY,S/2,NSY,NSY2)
J = J + JCOUNT
25 AL = AL + 2.00
DO 60 I=1,N
AMP(I) = (0.00,0.00)
VALUE(I) = (0.00,1.00)
AMP(1) = (1.00,0.00)
AMP(2) = (1.00,0.00)
AMP(3) = (1.00,0.00)
CALL CSQZ(CSYM,AMP,NDIM,JDIM,N,M,SQTOL)
CALL CQRT(CSYM1,CSYM2,AMP,NDIM,N,20,TOL,VALUE)
DO 588 I=1,N
800 AMP(I) = AMP(I)*AMP(I)
IF (WAMPEV) WRITE (6,61) (CSYM1(I),AMP(I),I=1,N)
IF (PAMPEV) WRITE (7,62) GAMMA,F0AB,N,(CSYM1(I),AMP(I),I=1,N)
820 FORMAT(020,13,5X,020,13,5X,13/(6D13,6))
61 FORMAT(1H ,//,8X,' EIGENVALUE',26X,'AMP',26X,'EIGENVALUE',26X,'AMP
1',//,(1X,2014,5,4X,2014,5,4X,2014,5,4X,2014,5))
READ(5,62) T2IN,B1,BF,NB
62 FORMAT(010,3,010,3,010,3,13)
WRITE(6,63) T2IN,B1,BF,NB
63 FORMAT(1H ,//,' ROTATIONALLY INVARIANT P-P FIRST DERIVATIVE LINEWI
10TH ',012,5,' GAUSS',//,' INITIAL FIELD SWEEP VALUE RELATIVE TO CE
2NTER ',012,5,' GAUSS',//,' FINAL FIELD VALUE RELATIVE TO CENTER ',
3012,5,' GAUSS',//,' NUMBER OF POINTS FOR SPECTRUM ',I3,/)
T2IN = T2IN*(DSQRT(3.00)/2.00)*(GAMMA/F0AB)
B1 = B1*(GAMMA/F0AB)
BF = BF*(GAMMA/F0AB)
DEL = (BF - B1)/DFLOAT(NB-1)
RES = B1
DO 64 I=1,NB
DER = (0.00,0.00)
DO 65 I=1,N
65 DER = DER + (AMP(I)/((CSYM1(1) + ((-1.00,0.00)*RES) + ((0.00,-1.00
1)*T2IN))*2))
DERAB(I) = (0.00,-1.00)*DER
BFLD(I) = RES*(F0AB/GAMMA)
64 RES = RES + DEL
WRITE(6,67) (DERAB(I),BFLD(I),I=1,NB)
67 FORMAT(1H ,///,41X,'COORDINATES FOR FIRST DERIVATIVE SPECTRUM',//,

```

IN

9-MAY-1984 08:37:36
27-JUL-1983 09:52:14

```

14X,'1ST DERIV',7X,'FIELD',11X,'1ST DERIV',7X,'FIELD',11X,'1ST DERI
2V',7X,'FIELD',11X,'1ST DERIV',7X,'FIELD',//,(1X,2E14.5,4X,2E14.5,4
5X,2E14.5,4X,2E14.5))
  IF(.NOT.XPLOT) GO TO 8
  DMAX = DERAB(1)
  DO 251 I=1,NB
  IF(DMAX.LT.DERAB(I)) DMAX = DERAB(I)
251 CONTINUE
  DMIN = DERAB(1)
  DO 252 I=1,NB
  IF(DMIN.GT.DERAB(I)) DMIN = DERAB(I)
252 CONTINUE
  DS = DMAX
  DMAX = -DMIN
  DMIN = -DS
  ZMAX = BFLD(NB)
  ZMIN = BFLD(1)
  NS = NB/10
C   CALL INPLOT(DMIN,DMAX,ZMIN,ZMAX,NS)
  DO 3001 I=1,NB
  XP(I) = BFLD(I)
  YP(I) = DERAB(I)
3001 CONTINUE
C   Y = DERAB(I)
C   Z = BFLD(I)
C3001 CALL POINT(Y,Z,4)
C   CALL DOPLOT(IISYZ)
  IF(YLSNO.NE.'Y') GO TO 5002
  CALL PLOT(1,1,NFORA,XPE,YPE,0,1)
5002 CALL PLOT(1,1,NB,XP,YP,1,1)
  TYPE 3333
3333 FORMAT('S SALVA DADOS PARA CALCOMP [Y/N] ? ')
  ACCEPT 3334,IY
3334 FORMAT(1A4)
  IF(IY.EQ.1MY) THEN
    NPTS = NB
    WRITE(4,*)NPTS
    DO 3335 I=1,NB
    WRITE(4,*)XP(I),YP(I)
3335 CONTINUE
  ENDIF
  8 CONTINUE
  GO TO 305
300 WRITE(6,303) LMAX4,NSY,LMAX5,NSY2
303 FORMAT(9X,'DIMENSIONING ERROR, NSY SHOULD BE ',I5,' IT WAS ',I5,/,
19X,'NSY2 SHOULD BE ',I5,' IT WAS ',I5,///)
  GO TO 305
302 WRITE(6,304) N,NDIM,M,JOIM
304 FORMAT(1H1,' JOB TERMINATED BECAUSE BANDWIDTH OR ORDER OF MATRIX
1CSYM IS GREATER THAN SPECIFIED ',//,' VALUE FOR THE ORDER N FOR
2 THE MATRIX CSYM(N,M) SHOULD BE ',I3,/, ' VALUE SPECIFIED IS ',I3
3,/, ' VALUE FOR THE DIMENSION(BANDWIDTH) M OF MATRIX CSYM(N,M)
4 SHOULD BE ',I3,/, ' VALUE SPECIFIED IS ',I3)
305 STOP
  END

```

9-MAY-1964 08:37:36
27-JUL-1983 09:52:14

```

SUBROUTINE INTER(I,J,K,SY,SY2,NSY,NSY2)
  IMPLICIT REAL*8(A-H,O-Z)
  COMPLEX*16 CSYM,F0
  LOGICAL L000
  COMMON /VAR/ F0,CSYM,AL,R,H,XRZ,F2,D,D2,DPR,D2PR,SFLL,SFLL1,SFLL2,
  *SFLL11,SFLL12,SFLL13,DROT,J1,J2,J3,J4,J5,LL1,LL2,LL3,LL12,LL13,LL2
  *1,LL22,LL23,L1L12,L1L22,L1L32,KTERM,JCOUNT,IEND,L000
  DIMENSION CSYM(357,52),DROT(2),SY(NSY,8),SY2(NSY2,3)
  CONTINUE
  DO 48 I1=1,I
    IF(I1.GT.(KTERM/2)) GO TO 48
    J1 = J + 1
    J2 = J + 2
    J3 = J + 3
    J4 = J + 4
    J5 = J + 5
    J000 = J + (6*I) - (3*(I1 - 1))
    IF(I1.GT.(KTERM/2)) J000 = J + (3*KTERM) - (3*(I1-1))
    LL3 = (3*I*(I + 1)) + (3*I1) + 1
    LL13 = LL3 + 1
    LL23 = LL3 + 2
    L1L13 = LL3 + (3*I1) + 5
    L1L23 = L1L13 + 1
    L1L33 = L1L13 + 2
    XK = DFL0AT(2*I1)
    DROT(K1) = DROT(1) + ((DROT(1)/(R*AL*(AL + 1.00)))*(XRZ-1.00)*R*XK*
  1XA)
    DROT(K2) = DROT(2) + ((DROT(2)/(R*(AL + 1.00)*(AL + 2.00)))*(XRZ-1.0
  10)*R*XK*XK)
    IF(IEND.EQ.1) GO TO 49
    IF(I1.EQ.(KTERM/2)) GO TO 50
    CSYM(J,K+6) = (-1.00,0.00)*((F2 + D2PR)*SY(LL21,1)*SY2(LL23,2)*S
  1FLL2)
    CSYM(J,K+9) = (1.00,0.00)*(D2*SY(LL22,3)*SY2(LL23,2)*SFLL2)
    CSYM(J1,K+6) = (-1.00,0.00)*(F2*SY(LL21,1)*SY2(LL23,2)*SFLL2)
    CSYM(J1,K+8) = CSYM(J,K+9)
    CSYM(J1,K+9) = CSYM(J,K+9)
    CSYM(J2,K+6) = (-1.00,0.00)*((F2 - D2PR)*SY(LL21,1)*SY2(LL23,2)*
  1SFLL2)
    CSYM(J2,K+8) = CSYM(J,K+9)
    CSYM(J3,K+6) = (1.00,0.00)*((F2 + (D2PR/2.00))*SY(LL22,4)*SY2(LL
  123,2)*SFLL2)
    CSYM(J3,K+3) = (1.00,0.00)*(D2*SY(LL22,5)*SY2(LL23,2)*SFLL2)
    CSYM(J3,K+4) = CSYM(J3,K+3)
    CSYM(J3,K+8) = (-1.00,0.00)*((D2/DSQRT(2.00))*SY(LL22,6)*SY2(L
  1L23,2)*SFLL2)
    CSYM(J4,K+6) = (1.00,0.00)*((F2 - (D2PR/2.00))*SY(LL22,4)*SY2(LL
  123,2)*SFLL2)
    CSYM(J4,K+3) = CSYM(J3,K+3)
    CSYM(J4,K+4) = CSYM(J4,K+3)
    CSYM(J4,K+7) = CSYM(J3,K+8)
    CSYM(J5,K+6) = (-1.00,0.00)*(F2*SY(LL22,7)*SY2(LL23,2)*SFLL2)
    CSYM(J5,K+4) = (-1.00,0.00)*((D2/DSQRT(2.00))*SY(LL22,8)*SY2(L
  1L23,2)*SFLL2)
    CSYM(J5,K+5) = CSYM(J5,K+4)
    IF(.NOT.L000) GO TO 50
    IF(I1.EQ.1) GO TO 51

```

9-MAY-1984 08:37:36

27-JUL-1983 09:52:14

```

K000 = K - (6*I1) - (3*(I-I1))
IF(1.GT.(KTERM/2)) K000 = K - (6*I1) - (3*((KTERM/2) - I1))
CSYM(J,K000) = (1.00,0.00)*(D2*SY(LL12,3)*SY2(LL13,2)*SFL11)
CSYM(J1,K000-1) = CSYM(J,K000)
CSYM(J1,K000) = CSYM(J,K000)
CSYM(J2,K000-1) = CSYM(J,K000)
CSYM(J3,K000-3) = (1.00,0.00)*((F2 + (D2PR/2,00))*SY(LL12,4)*SY2(
LL13,2)*SFL11)
CSYM(J3,K000-1) = (-1.00,0.00)*((D2/DSQRT(2,00))*SY(LL12,6)*SY2(L
LL13,2)*SFL11)
CSYM(J4,K000-3) = (1.00,0.00)*((F2 + (D2PR/2,00))*SY(LL12,4)*SY2(
LL13,2)*SFL11)
CSYM(J4,K000-2) = CSYM(J3,K000-1)
CSYM(J5,K000-3) = (-1.00,0.00)*(F2*SY(LL12,7)*SY2(LL13,2)*SFL11)
CSYM(J5,K000-5) = (-1.00,0.00)*((D2/DSQRT(2,00))*SY(LL12,8)*SY2(L
LL13,2)*SFL11)
CSYM(J5,K000-4) = CSYM(J5,K000-5)
S1 K000 = (6*(I1 + 1)) + 7 + (3*(I - I1))
IF(1.GT.(KTERM/2)) K000 = (6*(I1 + 1)) + 7 + (3*((KTERM/2) - I1))
CSYM(J000,K000) = (1.00,0.00)*((F2 + (D2PR/2,00))*SY(L1L22,4)*SY
2(L1L23,2)*SFL1L2)
CSYM(J000,K000-3) = (1.00,0.00)*(D2*SY(L1L22,5)*SY2(L1L23,2)*SFL
1L2)
CSYM(J000,K000-2) = CSYM(J000,K000-3)
CSYM(J000+1,K000) = (1.00,0.00)*((F2 + (D2PR/2,00))*SY(L1L22,4)*
SY2(L1L23,2)*SFL1L2)
CSYM(J000+1,K000-3) = CSYM(J000,K000-3)
CSYM(J000+1,K000-2) = CSYM(J000,K000-3)
CSYM(J000,K000+2) = (-1.00,0.00)*((D2/DSQRT(2,00))*SY(L1L22,6)*S
Y2(L1L23,2)*SFL1L2)
CSYM(J000+1,K000+1) = CSYM(J000,K000+2)
CSYM(J000+2,K000) = (-1.00,0.00)*(F2*SY(L1L22,7)*SY2(L1L23,2)*SF
1L1L2)
CSYM(J000+2,K000-2) = (-1.00,0.00)*((D2/DSQRT(2,00))*SY(L1L22,8)
1*SY2(L1L23,2)*SFL1L2)
CSYM(J000+2,K000-1) = CSYM(J000+2,K000-2)
IF((I+1).GE.IEND) GO TO S0
K000 = K + 9
IF(1.GE.(KTERM/2)) K000 = K + 3
CSYM(J000,K000) = (1.00,0.00)*((F2 + (D2PR/2,00))*SY(L1L32,4)*SY
2(L1L33,2)*SFL1L3)
CSYM(J000,K000+2) = (-1.00,0.00)*((D2/DSQRT(2,00))*SY(L1L32,6)*S
Y2(L1L33,2)*SFL1L3)
CSYM(J000+1,K000) = (1.00,0.00)*((F2 + (D2PR/2,00))*SY(L1L32,4)*
SY2(L1L33,2)*SFL1L3)
CSYM(J000+1,K000+1) = CSYM(J000,K000+2)
CSYM(J000+2,K000) = (-1.00,0.00)*(F2*SY(L1L32,7)*SY2(L1L33,2)*SF
1L1L3)
CSYM(J000+2,K000-2) = (-1.00,0.00)*((D2/DSQRT(2,00))*SY(L1L32,8)
1*SY2(L1L33,2)*SFL1L3)
CSYM(J000+2,K000-1) = CSYM(J000+2,K000-2)
S0 XZ = 1.00
IF(11.EQ.1) XZ = DSQRT(2,00)
CSYM(J,K) = (-1.00,0.00)*((F0 + DPR)*SY(LL21,1)*SY2(LL23,1)*SF
1LL2)
CSYM(J,K-6) = (-1.00,0.00)*((F2 + D2PR)*SY(LL21,1)*SY2(LL23,3)*S
1FL2*XZ)

```

9-MAY-1984 08:37:36

27-JUL-1983 09:52:14

```

CSYM(J,K+3)      = (1.00,0.00)*(0*SY(LL22,3)*SY2(LL23,1)*SFLL2)
CSYM(J,K-3)      = (1.00,0.00)*(02*SY(LL22,3)*SY2(LL23,3)*SFLL2*XZ)
CSYM(J1,K)       = (-1.00,0.00)*(F0*SY(LL21,1)*SY2(LL23,1)*SFLL2)
CSYM(J1,K-6)     = (-1.00,0.00)*(F2*SY(LL21,1)*SY2(LL23,3)*SFLL2*XZ)
CSYM(J1,K+2)     = CSYM(J,K+3)
CSYM(J1,K+3)     = CSYM(J,K+3)
CSYM(J1,K-4)     = CSYM(J,K-3)
CSYM(J1,K-3)     = CSYM(J,K-3)
CSYM(J2,K)       = (-1.00,0.00)*((F0 - DPR)*SY(LL21,1)*SY2(LL23,1)*S
SFLL2)
CSYM(J2,K-6)     = (-1.00,0.00)*((F2 - D2PR)*SY(LL21,1)*SY2(LL23,3)*
SFLL2*XZ)
CSYM(J2,K+2)     = CSYM(J,K+3)
CSYM(J2,K-4)     = CSYM(J,K-3)
CSYM(J3,K)       = (1.00,0.00)*((F0 + (DPR/2.00))*SY(LL22,4)*SY2(LL2
3,1)*SFLL2)
CSYM(J3,K-6)     = (1.00,0.00)*((F2 + (D2PR/2.00))*SY(LL22,4)*SY2(LL
23,3)*SFLL2*XZ)
CSYM(J3,K-3)     = (1.00,0.00)*(0*SY(LL22,5)*SY2(LL23,1)*SFLL2)
CSYM(J3,K-2)     = CSYM(J3,K-3)
CSYM(J3,K-9)     = (1.00,0.00)*(02*SY(LL22,5)*SY2(LL23,3)*SFLL2*XZ
)
CSYM(J3,K-8)     = CSYM(J3,K-9)
CSYM(J3,K+2)     = (-1.00,0.00)*((0/DSQRT(2.00))*SY(LL22,6)*SY2(LL
23,1)*SFLL2)
CSYM(J3,K-4)     = (-1.00,0.00)*((02/DSQRT(2.00))*SY(LL22,6)*SY2(L
L23,3)*SFLL2*XZ)
CSYM(J4,K)       = (1.00,0.00)*((F0 - (DPR/2.00))*SY(LL22,4)*SY2(LL2
3,1)*SFLL2)
CSYM(J4,K-6)     = (1.00,0.00)*((F2 - (D2PR/2.00))*SY(LL22,4)*SY2(LL
23,3)*SFLL2*XZ)
CSYM(J4,K-3)     = CSYM(J3,K-3)
CSYM(J4,K-2)     = CSYM(J4,K-3)
CSYM(J4,K-9)     = CSYM(J3,K-9)
CSYM(J4,K-8)     = CSYM(J3,K-9)
CSYM(J4,K+1)     = CSYM(J3,K+2)
CSYM(J4,K-5)     = CSYM(J3,K-4)
CSYM(J5,K)       = (-1.00,0.00)*(F0*SY(LL22,7)*SY2(LL23,1)*SFLL2)
CSYM(J5,K-6)     = (-1.00,0.00)*(F2*SY(LL22,7)*SY2(LL23,3)*SFLL2*XZ)
CSYM(J5,K-2)     = (-1.00,0.00)*((0/DSQRT(2.00))*SY(LL22,8)*SY2(LL
23,1)*SFLL2)
CSYM(J5,K-1)     = CSYM(J5,K-2)
CSYM(J5,K-8)     = (-1.00,0.00)*((02/DSQRT(2.00))*SY(LL22,8)*SY2(L
L23,3)*SFLL2*XZ)
CSYM(J5,K-7)     = CSYM(J5,K-8)
IF(.NOT.L000) GO TO 49
K000 = K - 3 - (6*II) - (3*(I - II))
IF(1.GT.(KTERM/2)) K000 = K - 3 - (6*II) - (3*((KTERM/2) - II))
CSYM(J,K000)     = (1.00,0.00)*(0*SY(LL12,3)*SY2(LL13,1)*SFLL1)
CSYM(J1,K000-1)  = CSYM(J,K000)
CSYM(J1,K000)    = CSYM(J,K000)
CSYM(J2,K000-1)  = CSYM(J,K000)
CSYM(J3,K000-3)  = (1.00,0.00)*((F0 + (DPR/2.00))*SY(LL12,4)*SY2(L
L13,1)*SFLL1)
CSYM(J3,K000-1)  = (-1.00,0.00)*((0/DSQRT(2.00))*SY(LL12,6)*SY2(LL
113,1)*SFLL1)
CSYM(J4,K000-3)  = (1.00,0.00)*((F0 - (DPR/2.00))*SY(LL12,4)*SY2(L

```

9-MAY-1984 08:37:36

27-JUL-1983 09:52:14

```

1L13,1)*SFLL1)
CSYM(J4,KODD-2) = CSYM(J3,KODD-1)
CSYM(J5,KODD-3) = (-1.00,0.00)*(F0*SY(LL12,7)*SY2(LL13,1)*SFLL1)
CSYM(J5,KODD-5) = (-1.00,0.00)*((0/DSQRT(2.00))*SY(LL12,8)*SY2(LL
113,1)*SFLL1)
CSYM(J5,KODD-4) = CSYM(J5,KODD-5)
IF(11.EQ.1) GO TO 55
CSYM(J,KODD-3) = (1.00,0.00)*(D2*SY(LL12,3)*SY2(LL13,3)*SFLL1)
CSYM(J1,KODD-4) = CSYM(J,KODD-3)
CSYM(J1,KODD-3) = CSYM(J,KODD-3)
CSYM(J2,KODD-4) = CSYM(J,KODD-3)
CSYM(J3,KODD-6) = (1.00,0.00)*((F2 + (D2PR/2.00))*SY(LL12,4)*SY2(
1L13,3)*SFLL1)
CSYM(J3,KODD-4) = (-1.00,0.00)*((D2/DSQRT(2.00))*SY(LL12,6)*SY2(L
1L13,5)*SFLL1)
CSYM(J4,KODD-6) = (1.00,0.00)*((F2 - (D2PR/2.00))*SY(LL12,4)*SY2(
1L13,3)*SFLL1)
CSYM(J4,KODD-5) = CSYM(J3,KODD-4)
CSYM(J5,KODD-6) = (-1.00,0.00)*(F2*SY(LL12,7)*SY2(LL13,3)*SFLL1)
CSYM(J5,KODD-8) = (-1.00,0.00)*((D2/DSQRT(2.00))*SY(LL12,8)*SY2(L
1L13,5)*SFLL1)
CSYM(J5,KODD-7) = CSYM(J5,KODD-8)
55 KODD = (6*(II + 1)) + 1 + (3*(I - II))
IF(1.GT.(KTERM/2)) KODD = (6*(II + 1)) + 1 + (3*((KTERM/2) - II))
CSYM(J000,KODD) = (1.00,0.00)*((F0 + (DPR/2.00))*SY(L1L22,4)*SY2
1(L1L23,1)*SFL1L2)
CSYM(J000,KODD-3) = (1.00,0.00)*(D*SY(L1L22,5)*SY2(L1L23,1)*SFL1
1L2)
CSYM(J000,KODD-2) = CSYM(J000,KODD-3)
CSYM(J000,KODD+2) = (-1.00,0.00)*((D/DSQRT(2.00))*SY(L1L22,6)*SY
12(L1L23,1)*SFL1L2)
CSYM(J000+1,KODD) = (1.00,0.00)*((F0 - (DPR/2.00))*SY(L1L22,4)*S
1Y2(L1L23,1)*SFL1L2)
CSYM(J000+1,KODD-3) = CSYM(J000,KODD-3)
CSYM(J000+1,KODD-2) = CSYM(J000,KODD-3)
CSYM(J000+1,KODD+1) = CSYM(J000,KODD+2)
CSYM(J000+2,KODD) = (-1.00,0.00)*(F0*SY(L1L22,7)*SY2(L1L23,1)*SF
1L1L2)
CSYM(J000+2,KODD-2) = (-1.00,0.00)*((D/DSQRT(2.00))*SY(L1L22,8)*
1SY2(L1L23,1)*SFL1L2)
CSYM(J000+2,KODD-1) = CSYM(J000+2,KODD-2)
XZ = 1.00
IF(11.EQ.1) XZ = DSQRT(2.00)
CSYM(J000,KODD-6) = (1.00,0.00)*((F2 + (D2PR/2.00))*SY(L1L22,4)*SY
12(L1L23,3)*SFL1L2*XZ)
CSYM(J000,KODD-9) = (1.00,0.00)*(D2*SY(L1L22,5)*SY2(L1L23,3)*SFL
11L2*XZ)
CSYM(J000,KODD-8) = CSYM(J000,KODD-9)
CSYM(J000,KODD-4) = (-1.00,0.00)*((D2/DSQRT(2.00))*SY(L1L22,6)*S
1Y2(L1L23,3)*SFL1L2*XZ)
CSYM(J000+1,KODD-6) = (1.00,0.00)*((F2 - (D2PR/2.00))*SY(L1L22,4)*
1SY2(L1L23,3)*SFL1L2*XZ)
CSYM(J000+1,KODD-9) = CSYM(J000,KODD-9)
CSYM(J000+1,KODD-8) = CSYM(J000,KODD-9)
CSYM(J000+1,KODD-5) = CSYM(J000,KODD-4)
CSYM(J000+2,KODD-6) = (-1.00,0.00)*(F2*SY(L1L22,7)*SY2(L1L23,3)*SF
1L1L2*XZ)

```

9-MAY-1984 08:37:36

27-JUL-1983 09:52:14

```

CSYM(J000+2,K000-6) = (-1.00,0.00)*((D2/DSQRT(2.00))*SY(L1L22,8)
1*SY2(L1L23,3)*SFL1L2*x7)
CSYM(J000+2,K000-7) = CSYM(J000+2,K000-8)
IF((I+1).GE.IEND) GO TO 49
K000 = (9*I) + 13
IF(1.GE.(KTERM/2)) K000 = (9*(KTERM/2))+ 7
CSYM(J000,K000) = (1.00,0.00)*((F0 + (DPR/2.00))*SY(L1L32,4)*SY2
1(L1L33,1)*SFL1L3)
CSYM(J000,K000+2) = (-1.00,0.00)*((D/DSQRT(2.00))*SY(L1L32,6)*SY
12(L1L33,1)*SFL1L3)
CSYM(J000+1,K000) = (1.00,0.00)*((F0 - (DPR/2.00))*SY(L1L32,4)*S
1Y2(L1L33,1)*SFL1L3)
CSYM(J000+1,K000+1) = CSYM(J000,K000+2)
CSYM(J000+2,K000) = (-1.00,0.00)*(F0*SY(L1L32,7)*SY2(L1L33,1)*SF
1L1L3)
CSYM(J000+2,K000-2) = (-1.00,0.00)*((D/DSQRT(2.00))*SY(L1L32,8)*
1SY2(L1L33,1)*SFL1L3)
IF(11.EQ.1) GO TO 49
CSYM(J000,K000-3) = (1.00,0.00)*((F2 + (D2PR/2.00))*SY(L1L32,4)*SY
12(L1L33,5)*SFL1L3)
CSYM(J000,K000-1) = (-1.00,0.00)*((D2/DSQRT(2.00))*SY(L1L32,6)*S
1Y2(L1L33,3)*SFL1L3)
CSYM(J000+1,K000-3) = (1.00,0.00)*((F2 - (D2PR/2.00))*SY(L1L32,4)*
1SY2(L1L33,3)*SFL1L3)
CSYM(J000+1,K000-2) = CSYM(J000,K000-1)
CSYM(J000+2,K000-3) = (-1.00,0.00)*(F2*SY(L1L32,7)*SY2(L1L33,3)*SF
1L1L3)
CSYM(J000+2,K000-5) = (-1.00,0.00)*((D2/DSQRT(2.00))*SY(L1L32,8)
1*SY2(L1L33,3)*SFL1L3)
CSYM(J000+2,K000-4) = CSYM(J000+2,K000-5)
49 IF((11.EQ.1).OR.(11.EQ.(KTERM/2))) GO TO 56
CSYM(J,7) = (-1.00,0.00)*((F2 + D2PR)*SY(LL1,1)*SY2(LL3,2)*SFLL
1)
CSYM(J,10) = (1.00,0.00)*(D2*SY(LL2,3)*SY2(LL3,2)*SFLL)
CSYM(J1,7) = (-1.00,0.00)*(F2*SY(LL1,1)*SY2(LL3,2)*SFLL)
CSYM(J1,9) = CSYM(J,10)
CSYM(J1,10) = CSYM(J,10)
CSYM(J2,7) = (-1.00,0.00)*((F2 - D2PR)*SY(LL1,1)*SY2(LL3,2)*SFL
1L)
CSYM(J2,9) = CSYM(J,10)
CSYM(J3,7) = (1.00,0.00)*((F2 + (D2PR/2.00))*SY(LL2,4)*SY2(LL3,
12)*SFLL)
CSYM(J3,4) = (1.00,0.00)*(D2*SY(LL2,5)*SY2(LL3,2)*SFLL)
CSYM(J3,5) = CSYM(J3,4)
CSYM(J3,9) = (-1.00,0.00)*((D2/DSQRT(2.00))*SY(LL2,6)*SY2(LL3,2)*S
1FLL)
CSYM(J4,7) = (1.00,0.00)*((F2 - (D2PR/2.00))*SY(LL2,4)*SY2(LL3,
12)*SFLL)
CSYM(J4,4) = CSYM(J3,4)
CSYM(J4,5) = CSYM(J3,4)
CSYM(J4,8) = CSYM(J3,9)
CSYM(J5,7) = (-1.00,0.00)*(F2*SY(LL2,7)*SY2(LL3,2)*SFLL)
CSYM(J5,5) = (-1.00,0.00)*((D2/DSQRT(2.00))*SY(LL2,8)*SY2(LL3,2)*S
1FLL)
CSYM(J5,6) = CSYM(J5,5)
IF((1.NOT.L000).OR.(1.EQ.IEND)) GO TO 56
CSYM(J000,4) = (1.00,0.00)*((F2 + (D2PR/2.00))*SY(L1L12,4)*SY2(

```


9-MAY-1984 08:37:36
27-JUL-1983 09:52:14

```

1L1L13,2)*SFL1L1)
  CSYM(J000,6) = (-1.00,0.00)*((02/DSQRT(2.00))*SY(L1L12,6)*SY2(L1L1
13,2)*SFL1L1)
  CSYM(J000+1,4-K0) = (1.00,0.00)*((F2 - (02PR/2,00))*SY(L1L12,4)*SY
12(L1L13,2)*SFL1L1)
  CSYM(J000+1,5) = CSYM(J000,6)
  CSYM(J000+2,4) = (-1.00,0.00)*(F2*SY(L1L12,7)*SY2(L1L13,2)*SFL1L1)
  CSYM(J000+2,2) = (-1.00,0.00)*((02/DSQRT(2.00))*SY(L1L12,8)*SY2(L1
1L13,2)*SFL1L1)
  CSYM(J000+2,3) = CSYM(J000+2,2)
  CSYM(J,4) = (1.00,0.00)*(D*SY(LL2,3)*SY2(LL3,1)*SFL1)
  CSYM(J1,3) = CSYM(J,4)
  CSYM(J1,4) = CSYM(J,4)
  CSYM(J2,3) = CSYM(J,4)
  CSYM(J3,3) = (-1.00,0.00)*((D/DSQRT(2.00))*SY(LL2,6)*SY2(LL3,1)*SFL1)
  CSYM(J4,2) = CSYM(J3,3)
  CSYM(J,1) = ((1.00,0.00)*((2.00*B) - (SFL1*(F0 + DPR)*SY(LL1,1)*SY
12(LL3,1)))) + ((0.00,-1.00)*DROTK1)
  CSYM(J1,1) = ((-1.00,0.00)*(SFL1*F0*SY(LL1,1)*SY2(LL3,1))) + ((0.0
10,-1.00)*DROTK1)
  CSYM(J2,1) = ((1.00,0.00)*(-2.00*B) - (SFL1*(F0 - DPR)*SY(LL1,1)*
1SY2(LL3,1)))) + ((0.00,-1.00)*DROTK1)
  CSYM(J3,1) = ((1.00,0.00)*(B + (SFL1*(F0 + (DPR/2,00))*SY(LL2,4)*S
1Y2(LL3,1)))) + ((0.00,-1.00)*DROTK1)
  CSYM(J4,1) = ((1.00,0.00)*(-B + (SFL1*(F0 - (DPR/2,00))*SY(LL2,4)*
1SY2(LL3,1)))) + ((0.00,-1.00)*DROTK1)
  CSYM(J5,1) = ((-1.00,0.00)*(SFL1*F0*SY(LL2,7)*SY2(LL3,1))) + ((0.0
10,-1.00)*DROTK1)
  J = J + 6
  IF((.NOT.L000).OR.(1.E0.IEND)) GO TO 48
  CSYM(J000,3) = (-1.00,0.00)*((D/DSQRT(2.00))*SY(L1L12,6)*SY2(L1L13
1,1)*SFL1L1)
  CSYM(J000+1,2) = CSYM(J000,3)
  CSYM(J000,1) = ((1.00,0.00)*(B + (SFL1L1*(F0 + (DPR/2,00))*SY(L1L1
12,4)*SY2(L1L13,1)))) + ((0.00,-1.00)*DROTK2)
  CSYM(J000+1,1) = ((1.00,0.00)*(-B + (SFL1L1*(F0 - (DPR/2,00))*SY(L
11L12,4)*SY2(L1L13,1)))) + ((0.00,-1.00)*DROTK2)
  CSYM(J000+2,1) = ((-1.00,0.00)*(SFL1L1*F0*SY(L1L12,7)*SY2(L1L13,1)
1)) + ((0.00,-1.00)*DROTK2)
  JCOUNT = JCOUNT + 3
40 CONTINUE
121 CONTINUE
  RETURN
  DEBUG TRACE,SUBCHK,SUBTRACE
  AT 100
  TRACE ON
  AT 101
  TRACE OFF
  END

```

9-MAY-1984 08:37:36
27-JUL-1983 09:52:14

GORDON AND MESSENGER SUBROUTINES

SUBROUTINE CSQZ(A,AMP,IDIM,JDIM,N,M,SQTOL)
IMPLICIT REAL*8(A-H,O-Z)

SUBROUTINE CSQZ TRANSFORMS, BY A SERIES OF COMPLEX JACOBY
ROTATIONS, AN N BY N COMPLEX BAND MATRIX, A, OF BAND WIDTH
M-1 INTO A COMPLEX SYMMETRIC TRIDIAGONAL MATRIX, A
A = TRANSPOSE(R)*A*R

ENTERING THE SUBROUTINE, A(I,1) CONTAINS THE ITH DIAGONAL
ELEMENT AND A(I,J+1) CONTAINS THE JTH ELEMENT FROM THE
DIAGONAL IN THE ITH ROW. N IS THE LENGTH OF THE COLUMNS OF
A, AND M IS THE HALF BAND WIDTH PLUS ONE.

LEAVING THE SUBROUTINE A(I,1) CONTAINS THE DIAGONAL ELEMENTS
AND A(I,J) CONTAINS THE NEW OFF DIAGONAL ELEMENTS ORDERED

AS BEFORE

ON ENTERING THE VECTOR TO BE ROTATED IS IN AMP, AT THE EXIT
AMP CONTAINS THE ROTATED VECTOR.

```

COMPLEX*16 A(IDIM,JDIM),AMP(IDIM),B,G,S,SX,C,CX,CS,U,V,TEMP
DIMENSION RG(2)
EQUIVALENCE (G,RG(1))
WRITE(6,699) N,M,((A(I,J),I=1,N),J=1,M)
699 FORMAT(1H,10X,'N=',I4,4X,'M=',I4,/,10X,'CSYM MATRIX ENTERING SUB
ROUTINE',/,1X,20I4.5,4X,20I4.5,4X,20I4.5,4X,20I4.5))
SQTOL = 0.00
GRASS = 0.00
DO 101 LJM=1,N
GRASS = GRASS + 1.00
101 SQTOL = CDABS(A(LJM,1)) + SQTOL
DO 102 KID=2,M
LOW = N+1-KID
DO 102 LJM=1,LOW
GRASS = GRASS + 2.00
102 SQTOL = 2.00*CDABS(A(LJM,KID)) + SQTOL
SQTOL = 1.0-15*SQTOL/DSQRT(GRASS)
MX = M - 2

DO 20 L=1,MX
NR = M - L
NQ = NR + 1
NX = N - NR

IF(NX) 20,20,5

5 DO 15 K=1,NX

DO 25 J=K,NX,NR
IF(J-K) 40,50,40
50 IF(CDABS(A(J,NQ)) - SQTOL) 15,15,60
60 B = -A(J,NR)/A(J,NQ)
GO TO 80
40 IF(RG(1)**2+RG(2)**2-SQTOL**2) 15,15,70
70 B = -A(J-1,NQ)/G

```

9-MAY-1984 08:37:36
27-JUL-1983 09:52:14

```

C
67 SX = 1.00/(1.00 + B**2)
   S = CDSQRT(SX)
   C = B*S
   CX = C**2
   CS = C*S
   I = J + NR - 1
C THESE STATEMENTS ROTATE AMP
   TEMP = AMP(I)
   AMP(I) = C*TEMP - S*AMP(I+1)
   AMP(I+1) = C*AMP(I+1) + S*TEMP
C THESE FIVE STATEMENTS ROTATE THE CROSS ELEMENTS
   U = A(I,1)
   V = A(I+1,1)
   A(I,1) = CX*U - 2.00*CS*A(I,2) + SX*V
   A(I+1,1) = SX*U + 2.00*CS*A(I,2) + CX*V
   A(I,2) = CS*(U-V) + (CX-SX)*A(I,2)
68 IZ = I-1
C THIS LOOP TRANSFORMS THE APPROPRIATE COLUMNS
   DO 90 IX=J,IZ
     IK = I-IX+1
     U = A(IX,IK)
     V = A(IX,IK+1)
     A(IX,IK) = C*U - S*V
90   A(IX,IK+1) = S*U + C*V
75 IF(J-K) 95,85,95
95   A(J-1,NQ) = C*A(J-1,NQ) - S*G
85   IK = MIN0(NR,N-I)
     IF(IK-2) 55,45,45
C THIS LOOP TRANSFORMS THE APPROPRIATE ROWS
45 DO 10 IX=2,IR
     U = A(I,IX+1)
     A(I,IX+1) = C*U - S*A(I+1,IX)
10   A(I+1,IX) = S*U + C*A(I+1,IX)
55 IF(I+NR=N) 30,25,25
30   G = -S*A(I+1,NQ)
     A(I+1,NQ) = C*A(I+1,NQ)
25 CONTINUE
C END OF THE LOOP OVER J. ONE OFF-DIAGONAL ELEMENT DESTROYED
15 CONTINUE
C END OF THE LOOP OVER K. ONE SET OF OFF-DIAGONAL ELEMENTS
  DESTROYED.
20 CONTINUE
C END OF THE LOOP OVER L. NX SETS OF OFF-DIAGONAL ELEMENTS
  DESTROYED
  RETURN
END)

```

9-MAY-1984 08:37:36
27-JUL-1983 09:52:14

SUBROUTINE CORT(A,B,ANP,IDIM,N,M,TOL,EIGVAL)
IMPLICIT REAL*8(A-H,O-Z)

INTEGER HELL
DIMENSION A(1),B(1),ANP(1),SM(2),EIGVAL(1)
COMPLEX*16 SC

EQUIVALENCE (SC,SM(1))

IX = 2*N
NI=2

TOL = 0.00
GRASS = DFLUAT(N)
DO 200 KID=1,NX,2

200 TOL = DSQRT(A(KID)**2 + A(KID+1)**2) + TOL + 2.00*DSQRT(B(KID)**2
1+B(KID+1)**2)

TOL = 1.0-15*TOL/DSQRT(3.00*GRASS)

SHR AND SHI CONTAIN THE TOTAL SHIFT

SHR = 0.00

SHI = 0.00

K WILL COUNT THE NUMBER OF ITERATIONS PER EIGENVALUE

K = 0

ASSIGN 100 TO HELL

IF (DABS(EIGVAL(1))+DABS(EIGVAL(2)),NE,0.00) ASSIGN 101 TO HELL

GO TO HELL,(100,101)

100 K = K + 1

ATR = A(NX-1) + A(NX-3)

ATI = A(NX) + A(NX-2)

SM(1) = ATR**2 - ATI**2 - 4.00*(A(NX-1)*A(NX-3) - A(NX)*A(NX-2) -
1.0*(NX-3)**2 + B(NX-2)**2)

SM(2) = 2.00*ATR*ATI - 4.00*(A(NX-1)*A(NX-2) + A(NX)*A(NX-3) - 2.0
10*B(NX-3)*B(NX-2))

SC = CDSQRT(SC)

STR = (ATR - SM(1))*0.500

STI = (ATI - SM(2))*0.500

STTR = (ATR + SM(1))*0.500

STTI = (ATI + SM(2))*0.500

TEMP = CDABS(DCMPLX(A(NX-1)-STR,A(NX)-STI))

TEMP0 = CDABS(DCMPLX(A(NX-1)-STTR,A(NX)-STTI))

IF(TEMP0.GT,TEMP) GO TO 102

STR = STTR

STI = STTI

GO TO 102

101 K = K + 1

IF (K,GE,M) GO TO 999

STR = EIGVAL(NX-1) - SHR

STI = EIGVAL(NX) - SHI

102 IF (K,LE,M) GO TO 104

999 WRITE(6,103) M

103 FORMAT(26H CORT HAS NOT CONVERGED IN,13,11H ITERATIONS)

CALL EXIT

104 SHR = SHR + STR

SHI = SHI + STI

9-MAY-1984 08:37:36
27-JUL-1983 09:52:14

```

00 24 I=N,NX,2
A(I-1) = A(I-1) - STR
20 A(I) = A(I) - STI
CR = 1.000
CI = 0.000
CSR = 0.00
CSI = 0.00
UR = 0.000
UI = 0.000
00 14 J=N,NX,2
GR = A(I-1)-UR
SI = A(I) - UI
QR = CR*A(I-1) + CI*A(I) - CSR*B(I-3) + CSI*B(I-2)
QI = CI*A(I-1) + CR*A(I) - CSI*B(I-3) - CSR*B(I-2)
10 IF(I.EQ,NX) GO TO 10
SM(1) = QR**2 - QI**2 + B(I-1)**2 - B(I)**2
SM(2) = 2.00*(QR*QI + B(I-1)*B(I))
SC = CDSORT(SC)
RR = SM(1)
RI = SM(2)
IF(I.EQ,NX) GO TO 18
S(I-1) = SR*RR - SI*RI
S(I-2) = SR*RI + SI*RR
10 RS = 1.00/(RR**2 + RI**2)
SR = (RR*B(I-1) + B(I)*-I)*RS
SI = (RR*B(I) - B(I-1)*-I)*RS
CSR = CR*SR - CI*SI
CSI = CR*SI + CI*SR
QR = (RR*QR + RI*QI)*RS
QI = (RR*QI - RI*QR)*RS
IR = GR + A(I+1)
II = GI + A(I+2)
SXR = SR**2 - SI**2
SXI = 2.00*SR*SI
UR = SXR*IR - SXI*II
QI = SXR*II + SXI*IR
A(I-1) = GR + UR
A(I) = GI + UI
TAR = AMP(I-1)
TAI = AMP(I)
TBR = AMP(I+1)
TBI = AMP(I+2)
AMP(I-1) = TAR*CR - TAI*CI + TBR*SR - TBI*SI
AMP(I) = TAI*CR + TAR*CI + TBI*SR + TBR*SI
AMP(I+1) = TBR*CR - TBI*CI - TAR*SR + TAI*SI
AMP(I+2) = TBI*CR + TBR*CI - TAI*SR - TAR*SI
10 CONTINUE
S(NX-1) = SR*QR - SI*QI
S(NX-2) = SR*QI + SI*QR
A(NX-1) = GR
A(NX) = GI
85 IT = NX
30 IT = IT - 2
IF(ABS(B(IT-1)) + ABS(B(IT)).LE.TOL) GO TO 40
IF(IT-NI) 100,100,30
40 IF(NX-IT-4) 50,60,70
50 A(NX-1) = A(NX-1) + SHR

```

9-MAY-1984 08:37:36
27-JUL-1983 09:52:14

```

A(NX) = A(NX) + SHI
NX = NX - 2
K = 0
GO TO 00
60 ALR = -b(NX-3)
   ALI = -b(NX-2)
   AMR = 0.500*(A(NX-3) - A(NX-1))
   AMI = 0.500*(A(NX-2) - A(NX))
   SM(1) = ALR**2 - ALI**2 + AMR**2 - AMI**2
   SM(2) = 2.00*(ALR*ALI + AMR*AMI)
   SC = CDSQRT(SC)
   ANR = SM(1)
   ANI = SM(2)
   TAR = AMR + ANR
   TAI = AMI + ANI
   TBR = ANR - AMR
   TBI = ANI - AMI
   SIG = 1.000
   IF(TAR**2 + TAI**2.61, TBR**2 + TBI**2) GO TO 05
   TAR = TBR
   TAI = TBI
   SIG = -1.000
65 TBR = 0.500/(ANR**2 + ANI**2)
   SM(1) = (ANR*TAR + ANI*TAI)*TBR
   SM(2) = (ANR*TAI - ANI*TAR)*TBR
   SC = CDSQRT(SC)
   CR = SM(1)
   CI = SM(2)
   TAR = ANR*CR - ANI*CI
   TAI = ANR*CI + ANI*CR
   TBR = 0.500/(TAR**2 + TAI**2)
   SR = SIG*(TAR*ALR + TAI*ALI)*TBR
   SI = SIG*(TAR*ALI - ALR*TAI)*TBR
   TAR = A(NX-3)
   TAI = A(NX-2)
   TBR = A(NX-1)
   TBI = A(NX)
   TCR = b(NX-3)
   TCI = b(NX-2)
   CXR = CR**2 - CI**2
   CXI = 2.00*CR*CI
   SXR = SR**2 - SI**2
   SXI = 2.00*SR*SI
   CSR = CR*SR - CI*SI
   CSI = CR*SI + CI*SR
   TR = CXR - SXR
   TI = CXI - SXI
   UR = 2.00*(TCR*CSR - TCI*CSI)
   UI = 2.00*(TCI*CSR + TCR*CSI)
   A(NX-3) = TAR*CXR - TAI*CXI + TBR*SXR - TBI*SXI - UR + SHR
   A(NX-2) = TAR*CXI + TAI*CXR + TBR*SXI + TBI*SXR - UI + SHI
   A(NX-1) = TAR*SXR - TAI*SXI + TBR*CXR - TBI*CXI + UR + SHR
   A(NX) = TAR*SXI + TAI*SXR + TBR*CXI + TBI*CXR + UI + SHI
   b(NX-3) = 2.00*(AMR*CSR - AMI*CSI) + TCR*TR - TCI*TI
   b(NX-2) = 2.00*(AMR*CSI + AMI*CSR) + TCR*TI + TCI*TR
   I = NX - 2
   TAR = AMP(I-1)

```

9-MAY-1984 08:37:36
27-JUL-1983 09:52:14

```
TAI = AMP(I)
TBR = AMP (I+1)
TBI = AMP(I+2)
AMP(I-1) = TAR*CR - TAI*CI - TBR*SR + TBI*SI
AMP(I) = TAI*CR + TAR*CI - TBI*SR - TBR*SI
AMP(I+1) = TBR*CR - TBI*CI + TAR*SR - TAI*SI
AMP(I+2) = TBI*CR + TBR*CI+ TAI*SR + TAR*SI
K = 0
NX = NX - 4
GO TO 80
70 NI = IT + 2
GO TO HELL,(100,101)
80 IF(NX.LT.NI) GO TO 90
95 IF(NX-NI-2) 50,60,85
90 IF(NI.EQ.2) RETURN
NI = 2
GO TO 95
END
```

SECTIONS

	BYTES	ATTRIBUTES							
DE	2965	PIC	CON	REL	LCL	SHR	EXE	RD	NOWR
TA	44	PIC	CON	REL	LCL	SHR	NOEXE	RD	NOWR
TAL	504	PIC	CON	REL	LCL	NOSHR	NOEXE	RD	WR
AL SPACE ALLOCATED		3513							

HINTS

CESS	TYPE	NAME
00000		CORT

IS

CESS	TYPE	NAME	ADDRESS	TYPE	NAME	ADDRESS	TYPE	N
00128	R*8	ALI	2-000000120	R*8	ALR	2-000000138	R*8	A
00148	R*8	ANI	2-000000140	R*8	ANR	2-000000030	R*8	A
00070	R*8	CI	2-000000068	R*8	CR	2-000000080	R*8	C
00170	R*8	CXI	2-000000168	R*8	CXR	2-0000000A0	R*8	G
00010	R*8	GRASS	2-000000178	I*4	HELL	2-00000018C	I*4	I
00190	I*4	II	2-000000188	I*4	K	2-000000184	I*4	K
000140	I*4	N	2-000000180	I*4	NI	2-00000017C	I*4	N
000A8	R*8	QR	2-0000000C0	R*8	RI	2-0000000B8	R*8	R
00000	C*16	SC	2-000000020	R*8	SHI	2-000000018	R*8	S
00150	R*8	SIG	2-0000000C8	R*8	SR	2-000000040	R*8	S
00050	R*8	STT1	2-000000048	R*8	STTR	2-0000000F8	R*8	S
001A8	R*8	TAI	2-000000100	R*8	TAR	2-000000118	R*8	T
00160	R*8	TCI	2-000000158	R*8	TCR	2-000000058	R*8	T

REFERÊNCIAS

- 1) Axel, F.S., Biophys. Struct. Mechanism 2, 181-218 (1976).
- 2) Rozantzev, E.G., "Free Nitroxyl Radicals" - Plenum Press, (1970).
- 3) Briere, R., Lamaire, H. & Rassat, A., Bull. Soc. Chim. Fr. 32, 3273-3290 (1965).
- 4) Ogawa, S. & Mc Connell, H., Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 61, 819-826 (1968).
- 5) Rosantzev, E. G. & Sholle, V.D., Synthesis 190, (1971).
- 6) Konberg, R.D. & Mc Connell, H.M., Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 55, 8-13 (1966).
- 7) Andersen, B. & Andersen, P., Acta. Chem. Scand., 20, 720-740 (1968).
- 8) Lajzerowicz-Bonneteau, J., Acta. Cryst. B-24, 196-210 (1968).
- 9) Lozos, G.P. & Hoffmann, B.H., J. Phys. Chem. 78, 2110-2117 (1974).
- 10) Hoffman, B.M. & Eames, T.B., J. Am. Chem. Soc. 91, 2169-2170 (1969).
- 11) Mc Connell, H.M., "Spin Labeling Theory and Applications" cap. 11, ed: L.Berliner, Academic Press. (1976).

- 12) Carrington, A. & McLachlan, A.D., "Introduction to Magnetic Resonance with Application in Chemistry and Chemical Physics", Harper & Row (1967).
- 13) Luckhurst, G.R., "Spin Labeling Theory and Applications", cap. 4, ed: L.J. Berliner, Academic Press (1976).
- 14) Poole, C.P. Jr., & Farach, H.A., "The Theory of Magnetic Resonance", Wiley Interscience (1972).
- 15) Nordio, P.L., "Spin Labeling Theory and Applications", cap. 2 ed: L.J. Berliner, Academic Press (1976).
- 16) Goodman, B.A. & Raynor, J.B., Adv. Inorg. Chem. Radiochem, 13, 135 - 362 (1970).
- 17) McCalley, R.C., Shimshick, E.J. & McConnell, H.M., Chem. Phys. Lett. 13, 115-119 (1972).
- 18) Slichter, C.P., "Principles of Magnetic Resonance", cap. 5, Springer Verlag (1978).
- 19) Goldman, S.A., Bruno, G.V., Polnaszek, C.F. & Freed, J.H., J. Chem. Phys. 56(2), 716-730 (1972).
- 20) Egelstaff, P.A., J. Chem. Phys. 53(7), 2590-2598 (1970).
- 21) McConnell, H.M. & McFarland, B.G., Quart. Rev. Biophys. 3, 91-136 (1970).
- 22) Redfield, A.G., Adv. Mag. Reson. 1, 1-32 (1976).

- 23) Freed, J.H. & Fraenkel, G.K., J. Chem. Phys. 39, 326-335 (1963).
- 24) Freed, J.H., "Electron Spin Relaxation in Liquids", cap.8, ed. L.T. Muus & P.M. Atkins, Plenum Press. (1972).
- 25) Freed, J.H., Ann. Rev. Phys. Chem. 23, 265-310 (1972).
- 26) Polnaszeck, C.F., Bruno, G.V. & Freed, J.H., J. Chem. Phys. 58 (8), 3185-3199 (1973).
- 27) Polnaszeck, C.F. & Freed, J.H., J. Phys. Chem. 79, 2283-2306 (1975).
- 28) Polnaszeck, C.F., "An Electron Spin Resonance Study of Rotational and Spin Relaxation in Liquid Crystal Media", Tese Ph. D. apresentada na Universidade de Cornell (1976).
- 29) Freed, J.H., "Spin Labeling Theory and Applications", cap. 3, ed: Berliner, L.J., Academic Press (1976).
- 30) Goldman, S.A., Bruno, G.V. & Freed, J.H., J. Phys. Chem. 76, 1858-1860 (1972).
- 31) Mason, R.P. & Freed, J.H. J. Phys. Chem. 78, 1321-1323 (1974).
- 32) Wilkinson, J.H., "The Algebraic Eigenvalue Problem". Oxford University Press (1965).
- 33) Gordon, R.G. & Messenger, T., em "Electron Spin Resonance in Liquids" ed: L.T. Mews, & P.W. Atkins, cap. 13, Plenum Press (1972).

- 34) Hyde, J. & Dalton, L.R., em "Spin Labeling Theory and Applications", cap. 1, Academic Press (1979).
- 35) Thomas, D.D., Dalton, L.R. & Hyde, J.S., J. Chem. Phys. 65, 3006-3024 (1976).
- 36) Lefebvre, R. & Maruani, J., J. Chem. Phys. 42, 1480-1496 (1965).
- 37) Neal, M.W. & Florini, J.R., Analytical Biochem. 55, 328-335 (1973).
- 38) Rodrigues, J., "Interação de radicais nitróxido com a molécula de Hemoglobina: Um estudo por RPE." Tese de Mestrado apresentada no IFQSC-USP (1984).
- 39) Perutz, M.F., J. Cryst. Growth., 3, 54-56 (1968).
- 40) Drabkin, D.L., J. Biol. Chem. 164, 703-718 (1946).
- 41) Perutz, M.F., Tratter, I.F. Howells, E.R. & Green, D.W., Acta Cryst. 8, 241-245 (1955).
- 42) Bauer, R.S. & Berliner, L.J., J. Mol. Biol. 128, 1-19 (1979).
- 43) Von der Meid, J.P., Rev. Bras. Fisic., 6(1), 1 (1976).
- 44) Polnaszek, C.F. "Analysis of Spin Probe Spectra" não publicado (1975).
- 45) Schreier, S., Polnaszek, C.F. & Smith, I.C.P., Biochim. Biophys. Acta 515, 375-436 (1978).

- 46) Poole, C.P. Jr., "Electron Spin Resonance", cap. 14, Inter-science (1967).
- 47) Robinson, B.H., & Dalton, L.R., J. Chem. Phys. 72, 1312-1324 (1980).
- 48) Beth, A.H., Wilder, R., Wilkerson, L.S., Perkins, R.C., Meriwether, B.P., Dalton, L.R., Park, C.R. & Park, J.H., J. Chem. Phys. 71(5), 2074-2082 (1979).
- 49) Chien, J.C.W. & Dickinson, L.C., em "Biological Magnetic Resonance" ed: L.J. Berliner & J. Reuben, 155-211 (1981).
- 50) Chien, J.C.W., J. Mol. Biol., 133, 385-398 (1970).
- 51) Ohnishi, S., Boyene, J.C.A. & Mc Connell, H.M., Proc. Nat.Acad. Sci. 56, 809-813 (1966).
- 52) Lee, B. & Richards, F.M., J. Mol. Biol. 55, 370-395 (1971).
- 53) Richards, F.M., Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 6, 151 (1978).
- 54) Nagel, R.L. & Bookdin, R.M., em "Biochemical and Clinical Aspects of Hemoglobin Abnormalities", ed: W.S. Caughey, 205-215, Academic Press (1978).
- 55) Baldwin, J.M., Prog. Biophys. Molec. Biol., 29, 225-320 (1975).
- 56) Zager, S.A. & Freed, J.H., J. Chem. Phys., 77, 3344-3359 (1982).
- 57) Eames, T.B. & Hoffman, B.M., J.Am. Chem. Soc. 93, 3141-3147(1971).

- 58) Grendell, J., Freed, J.H. & Fraenkel, G.K., J. Chem. Phys. 37, 2832-2841 (1962).
- 59) Johnson, M.E., FEBS. Lett., 97, 363-368 (1979).
- 60) Hwang, J.S., Mason, R.P., Hwang, L.P. & Freed, J.H., J. Phys. Chem. 79, 489-511 (1975).
- 61) Yu, N.T. & Jo, B.H., Arch. Biochem. Biophys. 156, 469-480 (1973).
- 62) Finney, J.L. & Poole, P.L. "Protein Hydration and Enzyme Activity: The Role of Hydration-Induced Conformation and Dynamical Changes in the Activity of Lysozyme". Aceito para publicação - no: Comments on Molecular and Cellular Biophysics.
- 63) Rupley, J.A., Yang, P.H. & Tollin, em "Water in Polymers" ed: S.P. Rowland, ACS, 111-132 (1980).
- 64) Andrew, E.R., Bryant, D.J. & Rizvi, T.Z., Chem. Phys. Lett., 95, 463-466 (1983).
- 65) Gellin, B.R. & Karplus, M., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 72, 2002-2006 (1975).
- 66) Johnson, M.E., Biochem., 20, 3319-3328 (1981).
- 67) Freed, J.H., Bruno, G.V. & Polnaszeck, C.F., J. Phys. Chem., 75, 3385-3399 (1971).
- 68) Edmonds, A.R., "Angular Momentum in Quantum Mechanics", cap.4, e Apendice II. Princeton University Press (1960).