**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FFCLRP - DEPARTAMENTO DE FÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA APLICADA À MEDICINA E
BIOLOGIA**

**“Dosimetria das Radiações e Reforço de Dose Produzido por
Nanopartículas de Ouro em Materiais Tecido-Equivalentes: Alanina,
2-Metilalanina, Asparagina e Glutamato Monossódico”.**

Iara Souza Lima

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
da USP, como parte das exigências para a
obtenção do título de Mestre em Ciências.
Área: Física Aplicada à Medicina e Biologia

RIBEIRÃO PRETO –SP

2019

IARA SOUZA LIMA

**Dosimetria das Radiações e Reforço de Dose Produzido por
Nanopartículas de Ouro em Materiais Tecido-
Equivalentes: Alanina, 2-Metilalanina, Asparagina e Glutamato
Monossódico**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
da USP, como parte das exigências para a
obtenção do título de Mestre em Ciências.
Área: Física Aplicada à Medicina e Biologia

Orientador: Prof. Dr. Oswaldo Baffa Filho

Co-orientador: Prof. Dr. Éder José Guidelli

RIBEIRÃO PRETO –SP

2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTA DOCUMENTO, POR MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha Catalográfica

Lima, S, I

(Dosimetria das Radiações e Reforço de Dose Produzido por Nanopartículas de Ouro em Materiais Tecido-Equivalentes: Alanina, 2-Metilalanina, Asparagina e Glutamato Monossódico). Iara

Souza Lima; orientador Oswaldo Baffa; Co-orientador Éder José Guidelli –
Ribeirão Preto, 2019.

123 f. : Il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, 2019.

1. Ressonância Paramagnética Eletrônica - 2. Asparagina - 3. Radicais Livres, -
4. Dosimetria -5. Nano partículas de Ouro.

Lima, S. I. Dosimetria das Radiações e Reforço de Dose Produzido por Nanopartículas de Ouro em Materiais Tecido-Equivalentes: Alanina, 2-Metilalanina, Asparagina e Glutamato Monossódico). Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr. Oswaldo Baffa Filho

Instituição: FFCLRP-USP

Julgamento: Aprovada

Profa. Dr. Patricia Nicolucci

Instituição: FFCLRP-USP

Julgamento: Aprovada

Profa. Dr Angela Mitie Otta Kinoshita

Instituição: Universidade do Sagrado Coração

Julgamento: Aprovada

Prof. Dr. José Fernando Diniz Chubaci

Instituição: IF-USP-SP

Julgamento: Aprovada

*“...A alma cresce à
altura daquela que admira ...”*

Ellen G. White

Dedico

*Primeiramente “Aquele” que tudo se fez possível,
no qual amo em oculto e em aberto, que inspira os meus dias
a sempre a ser válidos.*

*Aos meus pais, pelo amor incondicional e
incentivo, sempre me fortaleceu quando os momentos não
eram favoráveis e sempre se alegrando até nas pequenas
conquistas.*

Ofereço

*Ao meu querido e amado irmão
Marcelo, por sempre ser meu exemplo de
coragem, bondade.*

*Ao meu amado noivo André, pelo amor e
companheirismo que suportou e suportará minha jornada
acadêmica até mesmo na distância.*

*Aos meus professores, pelo qual tenho uma imensa
admiração e respeito.*

Agradecimentos

Primeiramente venho confessar que os agradecimentos foi a última etapa dessa dissertação, até mesmo da correção final, isso porque tenho muito que agradecer, por essa razão, estava a cada dia acumulando motivos, detalhes e sentimentos. Infelizmente as palavras não serão suficientes diante da minha gratidão, mas assim o farei. Sou muito grata a Aquele que sempre esteve ao meu lado, meu Tudo, minha inspiração. Durante esses dois anos posso dizer que foram os mais prósperos em minha vida, principalmente devido ao fato que tenho dois excelentes professores, tutores e amigos. Sou realmente grata ao professor Baffa (Bigboss) e ao professor Éder (Nanoboss) meus exemplos. Ao professor Dr. Arthur do departamento de Química, por sempre disponibilizar reagente, ao Dr. Alexandre Collelo, e a toda equipe do setor de Radioterapia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, pelas irradiações, pelo qual se concretizou meu trabalho. A professora Dr. Anne Skinner pelas sugestões e correções do primeiro artigo e a professora Dr. Ângela pelo apoio nas simulações. Aos técnicos dos laboratórios, Carlos Brunello, meu querido Carlão pelas conversas sobre violão e sugestões de barzinho (nunca visitei), e ao Eldereis pela paciência e disponibilidade em irradiar todos aqueles dosímetros, considerando aquelas doses altíssimas que levava quase o dia inteiro, grata. A universidade de São Paulo, à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, a todos os funcionários do Departamento de Física pelo apoio e informações. Aos meus colegas de laboratório pelo companheirismo, amizade e pelas boas risadas e piadas sem graças, por todos os cafés preparados (somo todos viciados), pelas parodias e danças, sem falar daquelas sexta-feira frias e cinzas ouvindo músicas da bad, grata por fazerem parte deles. Por todas as vezes que aqueles dosímetros não funcionaram, pelos tubos de quartzo entupidos (tornei-me especialista em remove-los), pelas correções das figuras (Nanoboss estou melhorando), pelas simulações (Bigboss variei todos aqueles parâmetros). E quase para finalizar aos meus familiares e amigos, que foram essenciais em todas as etapas. A minha querida amiga Sudi (Azizam, Sudabela) ashegatan, com você tive excelentes momentos, nunca a esquecerei, grata por tudo. A Setti pelo carinho e doçura, a Carlis pela amizade, parceira dos forrós e das canções, a Jenny, por todas os momentos que cozinhamos juntas. E nessa tendência, a uma grande pessoa que conheci no término do meu trabalho, pelo qual sou muito grata, em você senhorita Vitória encontrei uma das amizades mais sinceras e puras que já tive, sou lhe grata por tudo que tem feito, sua companhia em todas as madrugadas estudando juntas foi e será as melhores escolhas que fiz aqui em Ribeirão Preto, ao apoio, aos aconselhamentos, as conversas, as risadas, enfim, por

tudo, você realmente conhece minha alma de pada-à-pada. E por fim, as agências de fomento, FAPESP, CAPES e CNPq, pelo financiamento da pesquisa e pelo apoio financeiro para o desenvolvimento desse trabalho.

Resumo

A interação da radiação ionizante com moléculas de alanina promove a quebra do grupo amina, formando radicais livres paramagnéticos estáveis. Nesse contexto, estudamos a asparagina, um aminoácido composto por dois grupos NH_2 , visto que a possível quebra dos dois grupos NH_2 , poderia formar radicais livres estáveis, possibilitando aumento da sensibilidade e estabilidade dosimétricas. A espectroscopia por ressonância paramagnética eletrônica (EPR) revelou a natureza paramagnética dos radicais presentes na asparagina irradiada com raios-X, bem como o comportamento dependente da dose (intensidade EPR). Os radicais livres foram investigados por EPR, FTIR e simulação computacional. A modelagem computacional do espectro de EPR, utilizando parâmetros obtidos experimentalmente, revelou a existência de dois radicais induzidos por radiação em temperatura ambiente, relacionados à quebra da ligação entre os dois grupos NH_2 formando assim os radicais I e II. O espectro simulado está em boa concordância com o espectro experimental de EPR. A otimização dos parâmetros espectroscópicos, relação sinal-ruído (S/N) e intensidade foram encontrados para fins dosimétricos com uma potência de micro-ondas de 2 mW, e amplitude de modulação de 1 mT. As propriedades dosimétricas da asparagina são caracterizadas por uma dose-resposta linear na faixa de doses terapêuticas, mínima dose detectável de 0,1 Gy, incluindo uma baixa dependência energética (80 KV-6MV) e independência com taxa de dose (100-600 cGy / min) em uma faixa de relevância para a radioterapia. A estabilidade do sinal de EPR também foi investigada e o sinal permanece muito estável em temperatura ambiente, com uma perda de 11% em um período de 6 meses. Mesmo possuindo qualidades dosimétricas apropriadas a asparagina é menos sensível que a alanina. Visto isso, a última parte do trabalho buscou o aumento da sensibilidade dosimétrica- pela inserção de nanopartículas de ouro em asparagina, glutamato monossódico, alanina e 2-metil-alanina. Os resultados mostraram que as nanopartículas de ouro interagem de maneira diferente com cada material devida à característica intrínseca dos aminoácidos, proporcionando estabilização ou agregação das nanopartículas de ouro. Agregação das nanopartículas foi observada para a asparagina e para o glutamato monossódico. O sinal dosimétrico mostrou-se dependente da concentração de AuNPs, tamanho e dose depositada. Para concentrações superiores à 0,5%, o ganho dosimétrico diminuiu, provavelmente devido a segregação e auto-absorção das nanopartículas vizinhas. E por fim, a dependência com a dose, que revelou, que o ganho dosimétrico é dependente da dose depositada, e que isso é influenciado pela capacidade de recombinação de cada material. Para

materiais mais sensíveis à radiação, a formação de radicais livres é superior para uma mesma dose do que para materiais menos sensíveis.

Palavras Chave: Ressonância Paramagnética Eletrônica, Asparagina, Radicais Livres, Dosimetria, Nano partículas de Ouro.

Abstract

The interaction of the ionizing radiation with alanine molecules promotes the breakdown of the amine group, forming stable paramagnetic free radicals. In this context, we investigated asparagine, an amino acid composed of two NH_2 groups, which could then form more stable free radicals and possibly increase the dosimetric sensitivity. The EPR signal revealed the paramagnetic nature present in asparagine irradiated with X-rays, as well as the dose-dependent behavior of its concentration (EPR intensity). Free radicals were investigated by EPR, FTIR and computer simulation. The computational modeling of the EPR spectrum, using experimentally obtained parameters, revealed the existence of two radiation-induced radicals at room temperature related to the breakdown of the bond between the two NH_2 groups thus forming radical I and radical II. The simulated spectrum is in good agreement with the RPE experimental spectrum. The optimization of spectroscopic parameters, signal-to-noise ratio (S/N) and intensity were found for dosimetric purposes with a microwave power of 2 mW, and a modulation amplitude of 1 mT. The dosimetric properties of asparagine are characterized by a linear dose-response in the therapeutic dose range, minimum detectable dose of 0.1 Gy, including low energy dependence (80 KV-6MV) and a dose rate (100-600 cGy / min) independence in a range of clinical relevance. Stability of the EPR signal was also investigated and the signal remains very stable at room temperature, with a loss of 11% over a period of 6 months. Even with good dosimetric properties, asparagine is less sensitive than alanine. Thus, the last part of this work was focused on increasing the dosimetric sensitivity by the insertion of gold nanoparticles in asparagine, monosodium glutamate, alanine and 2-methy-alanine. The results revealed that the gold nanoparticles interact differently for each material due to the intrinsic characteristics of the amino acids, which cause aggregation or stabilization of the nanoparticles. Aggregation occurred in asparagine and monosodium glutamate. There was amplification of the dosimetric signal for all amino acids containing gold nanoparticles. In addition, it presented a dependence with concentration, size and dose deposited. At concentrations higher than 0.5%, the dosimetric gain decreases possibly due to segregation and self-absorption of neighboring nanoparticles. The size also influenced the decrease in the dosimetric gain, since for the aggregated materials, the average size of the gold nanoparticles increased considerably, causing the gold nanoparticles to occupy external spaces of the crystal, increasing the segregation and self-absorption. And finally, the dose dependence, which revealed that, the dose enhancement factor is dependent of the deposit dose, and it is influenced

by the ability of each material to recombine. For more sensitive materials the formation of free radicals are superior for the same dose than for less sensitive materials.

Keyword: Electronic Paramagnetic Resonance, Asparagine, Free Radicals, Dosimetry, Gold Nanoparticles.

Lista de Símbolos e Abreviaturas

ΔE	Diferença de Energia
μ_{ab}	Coefficiente de absorção da radiação
2MA	2-metil-alanina
$AgNO_3$	Nitrato de Prata
Ala	Alanina
Asn	Asparagina
App	Amplitude pico-à-pico
D_{ala}	Dose depositada na alanina
D_{Nc}	Dose depositada nos nanocompósitos
DSL	Diferença
g_e	Espalhamento dinâmico de luz
GMS	Razão giromagnética de elétron
H	Glutamato Monossódico
h	Campo Magnético
$HAuCl_4$	Constante de Planck
h_{ffc}	Ácido Cloro Áurico
m_s	Constante de Acoplamento Hiperfino
$NaBH_4$	Momento de spin
N_c	Boro Hidreto de Sódio
NpAu	Nanocompósito
RPE	Nanopartículas de Ouro
β	Ressonância Paramagnética Eletrônica
ν	Magnéton de Bohr
ρ	Frequência
ψ	Densidade
	Fluência de energia

SUMÁRIO

Capítulo 1: Introdução	15
Capítulo 2: Fundamentação Teórica.....	17
2.1 Ressonância Paramagnética Eletrônica	17
2.1. Paramagnetismo Eletrônico	19
2.2 Ressonância Paramagnética Eletrônica	21
2.3 Processo de Relaxação.....	22
2.3.1 Relaxação Spin-rede.....	23
2.3.2 Relaxação Spin-spin.....	23
2.3.3 Solução da equação de Bloch para T_1	25
2.3.4 Solução da equação de Bloch para T_2	26
2.4 Fator g e a forma de linha	27
2.5 Interação Hiperfina e Superhiperfina.....	32
2.6 Espectrômetro de RPE	36
2.7 Dosimetria por Ressonância Paramagnética Eletrônica	43
2.7.1 Dosímetro de Alanina	44
2.8 Nanotecnologia em aplicações dosimétrica	49
1.9 Objetivo	53
1.9.1 Objetivo Específico	53
1.10 Justificativa	53
Capítulo 3: Procedimentos Experimentais	54
3.1 Caracterização do Sinal Dosimétrico.....	54
3.1.1 Preparação dos Dosímetros	54
3.1.2 Irradiação.....	55
3.2 Nanodosimetria.....	56
3.2.1 Síntese de Nanopartículas de Ouro (NpAu).....	56
3.4 Técnicas e Caracterização.....	57
3.4.1 Medidas de RPE	57
3.4.2 FTIR	59
3.4.3 Simulação Computacional dos Espectros de RPE	59
3.5 Nanodosimetria.....	60
3.5.1 Espectroscopia UV-Vis	60
3.5.2 Espalhamento Dinâmico de Luz Para	60
Capítulo 4: Resultados e Discussão.....	61

4.1 Estudos dos Parâmetros Espectroscópicos	62
4.1.1 Potência de Micro-ondas	62
4.1.2 Amplitude de Modulação	63
4.2 Estudo dos Radicais	65
4.2.1 Espectroscopia Vibracional Espectroscopia.....	66
4.2.2 EPR Simulação Computacional	69
4.3 Estabilidade dos Radicais I e II.....	77
4.4 Caracterização Dosimétrica	79
4.4.1 Dose-Resposta.....	79
4.4.2 Mínima Dose Detectável	80
4.4.3 Dependência Energética.....	81
4.4.4 Taxa Dose.....	83
4.5 Estudo e Caracterização dos NpAu nos Dosímetros/Ouro	84
4.5.1 Espectroscopia UV-Vis	84
4.5.3 Espalhamento Dinâmico de Luz	93
4.5 Interação das Nanopartículas de Ouro/Dosímetros.....	94
4.6 Reforço de Dose.....	95
4.6.1 Ressonância Paramagnética Eletrônica	95
4.7 Influências da Sensibilidade do Material Dosimétrico e da Dose de Radiação no Fator de Aumento de Dose Causado por Nanopartículas de Ouro.	99
4.7.1 Influência da Porcentagem em Massa de NpAu	100
4.7.2 Influência da Sensibilidade do Material dosimétrico.....	102
4.7.2 Influência do Tamanho das NpsAu	105
Capítulo 5 Conclusões.....	109
5.1 Propriedades Dosimétricas	109
5.2 Nanocompósitos de Ouro.....	109
Referências	110
Anexo A.....	119
Princípios de Dosimetria.....	119

Capítulo 1: Introdução

Ressonância Paramagnética Eletrônica é um poderoso e sensível método para caracterização de estruturas eletrônicas de materiais com elétrons desemparelhados (Bert M. Weckhuysen, Ralf Heidler, 2004). Os primeiros estudos foram empregados na década de 40, em meados de 1945, a partir da detecção do sinal de radiofrequência de uma amostra interpretada como linhas de ressonância paramagnética (Weil; Bolton; Wertz, 1995), tornando-se uma importante ferramenta para diversas áreas tais como química, biologia e física.

A observação do fenômeno é baseada através da interação do spin dos elétrons com um campo magnético externo aplicado em uma amostra com o intuito de quebrar a degenerescência dos níveis de energias. Essa amostra é então irradiada com ondas eletromagnéticas de comprimento de onda apropriado e a sua absorção medida, resultando em um espectro característico. As informações contidas no espectro de ressonância, como intensidade do sinal, valor do fator g , forma da linha, e estrutura do espectro devido a acoplamento hiperfino são de suma importância para compressão do material estudado e suas propriedades físicas. Utilizando a técnica para fins dosimétricos, a medida da concentração dos radicais livres induzidos pela radiação ionizante é proporcional a dose aplicada. A determinação do efeito da radiação nos aminoácidos é comumente realizada tendo em vista a importância biológica desses compostos, exemplos incluem: alanina, ácido aspártico, glicina, serina, valina (Prydz; Henriksen, 1961) (Sagstuen, Sanderud, Hole, 2004) (Shields; Hamrick, 1976). Além disso, para fins dosimétricos, dentre os aminoácidos, a L- α -alanina tem sido extensivamente estudada, devido às suas boas propriedades dosimétricas. O radical livre mais estável à temperatura ambiente e que mais contribui para o espectro de EPR é atribuído à de-aminação da molécula de alanina (Vanhalewyn, 2000).

Devido à alta estabilidade e sensibilidade do radical livre produzido pela de-aminação na alanina, nós conduzimos uma investigação da L-asparagina, por conter dois grupos NH_2 . A L-asparagina foi o primeiro aminoácido a ser isolado. Mesmo sendo tão antigo, possui poucos relatos na literatura sobre a natureza do radical induzido pela radiação ionizante à temperatura ambiente e, até recentemente, nenhum trabalho sobre aplicações dosimétricas. Os primeiros estudos para determinação dos radicais livres presente na molécula de Asn após a irradiação foram empregados em cristais únicos.

Sevilla, em 1970 (Sevilla M, 1970), usando espectroscopia de RPE, reportou a formação de dois radicais variando a temperatura de 77 K à 190 K. Observou-se a formação de um ânion no grupo amina à 175 K e, com o aumento da temperatura para 190 K, outro radical era formado a partir de uma abstração do hidrogênio do carbono- α (Sevilla M, 1970). Posteriormente, Close et al em 1977 (Close; Fouse; Bernhard, 1977) usando espectroscopia de RPE e ENDOR observou em temperatura ambiente a formação de dois radicais, o primeiro a partir da abstração de um hidrogênio e o segundo não identificado (Close; Fouse; Bernhard, 1977).

Recentemente um trabalho de Knudtsen et al em 2014 (Knudtsen et al., 2014) reportou a formação de três radicais induzidos pela radiação ionizante usando Teoria da Densidade do Funcional (*Density Functional Theory* -DFT) pela espectroscopia de EPR após irradiado (raios- γ) a uma temperatura de 275 K. O Radical I era indentificado como uma abstração de um hidrogênio localizado no único grupo metileno do amino ácido; no entanto, o Radical II era uma abstração de um hidrogênio do grupo amina, e o Radical III não foi identificado (Knudtsen et al., 2014). Entretanto, um outro trabalho conduzido por Strzelczak et al (Strzelczak et al., 2006) usando também DFT, estudou a formação dos radicais a partir da variação da temperatura de 77 K à 293 K. Esses autores tiveram a confirmação de quatro radicais livres em L-asparagina, concluindo a formação do ânion no grupo amina como reportado por Sevilla a uma temperatura de 175 K (Sevilla M, 1970) e também a confirmação do radical proposto por Close et al, a partir da abstração do hidrogênio em temperatura ambiente, além da confirmação da presença desse mesmo radical pelo aumento da temperatura para 190 K (Close; Fouse; Bernhard, 1977). Acima dessa temperatura, uma possível deamidação e descarboxilação pode ocorrer quando a temperatura é levada para 293 K. Nesse contexto, Strzelczak et al sugeriu um mecanismo de deamidação e descarboxilação na molécula de L-asparagina quando irradiada com raios- γ com o aumento da temperatura (Strzelczak et al., 2006), entretanto uma validação experimental do mecanismo proposto não foi reportada.

Nesse trabalho, a modelagem computacional do espectro de EPR usando parâmetros obtidos experimentalmente nos permitiu confirmar a produção de dois radicais livres induzidos por radiação, e que são estáveis à temperatura ambiente após irradiação de asparagina por raios-X, ambos causados pela deaminação da asparagina. Após a identificação dos radicais, uma caracterização completa de suas propriedades físicas foi realizada visando uma aplicação para detecção de radiação em dosimetria. Além disso, devido à grande afinidade dos grupos amina com nanopartículas metálicas,

foi realizada a caracterização de nanocompósitos de asparagina contendo nanopartículas de ouro (Asn), comparando com outros materiais dosimétricos já utilizados na literatura, tais como, alanina (ala), 2-metila-alanina (2MA) e glutamato monossódico (GMS) (Bermann F., 1971; Heydari et al., 2002; Waldeland et al., 2010; Waldeland; Malinen, 2011; Soliman et al., 2014; Wolfe et al., 2015; Guidelli E.J.; Lima I.; Baffa O., 2018a), com o objetivo melhorar a sensibilidade dosimétrica, além de comparar o comportamento do fator de aumento de dose causado pelas nanopartículas de ouro com os diferentes aminoácidos e composto. Para isso, foram utilizadas técnicas de caracterização como a espectroscopia de absorção óptica na região do UV- Visível, espalhamento dinâmico de luz (DLS) e espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FTIR). A espectroscopia por EPR foi utilizada para o estudo da influência do coeficiente de absorção da radiação dos nanocompósitos na sensibilidade dos dosímetros.

Capítulo 2: Fundamentação Teórica

2.1 Ressonância Paramagnética Eletrônica

O princípio básico da técnica por ressonância paramagnética eletrônica é abordado nesse capítulo, bem como: suas particularidades a respeito da otimização dos parâmetros espectroscópicos, o funcionamento de um espectrômetro e sua aplicação em dosimetria das radiações.

A técnica de espectroscopia por Ressonância Paramagnética Eletrônica é aplicável em sistemas que apresentam spin eletrônico diferente de zero, por exemplo: átomos e moléculas com elétrons desemparelhados, radicais livres, íons com camadas eletrônicas incompletas, elétrons de condução e defeitos em sólidos (Swartz HM, Bolton JR, 1972; Ikeya M., 1993). Em escala atômica a magnetização da matéria surge a partir da movimentação das cargas, estando fortemente relacionada com o momento magnético intrínseco μ , entretanto, classicamente é possível verificar a existência de pequenas correntes em um material magnético em escala atômica, provocadas por elétrons orbitando ao redor do núcleo atômico e por elétrons rotacionando em seus próprios eixos. Tais correntes em escala macroscópicas são tão pequenas que são representadas como dipolos magnéticos.

Classicamente, o elétron é considerado uma esfera carregada negativamente movimentando-se numa órbita circular em volta do núcleo e entorno de seu próprio eixo, um movimento intrínseco com número quântico de spin ($S = \frac{1}{2}$.) O movimento produzido pelo elétron induz uma corrente circular na direção oposta ao seu movimento.

Segundo a teoria eletromagnética, a corrente produzida gera um campo magnético equivalente a um dipolo localizado no centro de um círculo e orientado perpendicularmente ao plano de uma órbita, e, portanto, descrito como um dipolo magnético, μ . A magnitude do valor do dipolo magnético μ , é expresso em termos do momento angular orbital $\vec{L}$, e do spin do elétron $\vec{S}$, acoplados de várias formas em átomos diferentes, como visto na Figura (1).

Figura (1): Desenho ilustrativo do movimento do elétron em função do momento angular $\vec{L}$, e de spin $\vec{S}$, e orientado perpendicularmente ao plano de uma órbita.

De acordo com Russell-Saunders, o esquema de acoplamento mais comum, é aquele em que vários vetores $\vec{I}_1, \vec{I}_2, \dots, \vec{I}_n$ de diferentes elétrons formam um vetor resultante $\vec{L}$, e vários vetores de spin $\vec{S}_1, \vec{S}_2, \dots, \vec{S}_n$ formam também um vetor resultante $\vec{S}$, combinam-se da seguinte forma:

$$\vec{\mu} = \vec{\mu}_L + \vec{\mu}_S \quad (1)$$

Onde: $\vec{\mu}_L = -\beta\vec{L}$ e $\vec{\mu}_S = -g_e\beta\vec{S}$, o valor negativo que acompanha as equações é devido à da carga do elétron, β é o magnéton de Bohr ($\beta = eh/4\pi mc$) e g_e é fator de desdobramento espectroscópico do elétron. Portanto, o momento magnético total expresso em termos de $\vec{L}$ e $\vec{S}$, segundo a equação é:

$$\vec{\mu} = -\beta(\vec{L} + g_e\vec{S}) \quad (2)$$

Geralmente, estes dipolos magnéticos anulam-se mutuamente devido às orientações randômicas dos átomos (Gómez et al., 2011). A Figura (2) abaixo ilustra uma hipotética distribuição aleatória desses dipolos magnéticos.

Figura (2): Distribuição aleatória dos dipolos magnéticos que mutuamente anulam-se devido as orientações dos átomos.

2.1. Paramagnetismo Eletrônico

A definição de paramagnetismo se dá em sistemas que possuem um momento magnético próprio e, na presença de um campo magnético externo, tende a alinhar-se em

direção do campo magnético aplicado. Nessa condição, um sistema que contem momento magnético total nulo dado pela orientação aleatória, como já citado, torna-se magnetizado ou magneticamente polarizado, pois cada átomo experimenta um torque mecânico $\vec{N}$ que depende da magnitude do campo magnético aplicado, como:

$$\vec{N} = \vec{\mu} \times \vec{H}_0 \quad (3)$$

A interação entre o acoplamento do momento $\vec{\mu}_L$ e $\vec{\mu}_S$ formam um vetor de momento angular total $\vec{J} (\vec{J} = \vec{L} + \vec{S})$, que possui uma energia de acoplamento E, dada pela equação:

$$E = \lambda L \cdot S \quad (4)$$

Em que λ é a constante de acoplamento spin-órbita. Assim, ao aplicar um campo magnético $\vec{H}_0$ na direção z, o dipolo magnético tem uma energia de interação como descrito na equação (5),

$$E = -\vec{\mu} \times \vec{H}_{0Z} = -(\vec{\mu}_L + \vec{\mu}_S) \times \vec{H}_{0Z} = \beta(\vec{L} + g_e \vec{S}) \times \vec{H}_{0Z} \quad (5)$$

O campo magnético externo aplicado destruirá a degenerescência dos níveis de energia do sistema, fenômeno conhecido como Efeito Zeeman (Figura 3). Os níveis de energias são separados por $2S + 1$ níveis, devido ao elétron ser um férmion com $|\vec{S}| = \frac{1}{2}$. Portanto, o sistema possuirá dois níveis de energia Zeeman diferentes, um paralelo ao campo ($m_S = +\frac{1}{2}$) e um antiparalelo ao campo ($m_S = -\frac{1}{2}$). Cada nível de energia, bem como a diferença entre eles são descritos nas equações abaixo.

$$E_+ = +\frac{1}{2} g_e \mu \vec{H}_{0Z} \quad (6)$$

$$E_- = -\frac{1}{2} g_e \mu \vec{H}_{0Z} \quad (7)$$

$$\Delta E = E_+ - E_- = g_e \mu \vec{H}_{0Z} \quad (8)$$

Figura (3): Representação do Efeito Zeeman a partir da aplicação de um campo magnético externo gerando degenerescência em dois níveis, paralelo ao campo ($m_s = +\frac{1}{2}$) e antiparalelo ao campo ($m_s = -\frac{1}{2}$).

2.2 Ressonância Paramagnética Eletrônica

Para satisfazer a condição de ressonância em um sistema paramagnético, é necessário que ocorra transições de dipolos magnéticos em nível eletrônico. Tais transições são induzidas por campos magnéticos oscilantes, excitações térmicas, ou estímulos que garantam ao sistema outros graus de liberdade como vibração e translação.

As transições ocorrem quando a energia do campo oscilante ($\vec{H}_1$), ou seja, a energia da radiação incidente coincide com a diferença de energia entre os estados degenerados, conforme a equação (9):

$$\Delta E = E_+ - E_- = g_e \mu H_0 = h\nu \quad (9)$$

A princípio, o sistema paramagnético encontra-se em equilíbrio térmico, denominado como equilíbrio térmico de Boltzmann, com a seguinte distribuição:

$$\frac{N_+}{N_-} = e^{\frac{-\Delta E}{TK_B}} = e^{\frac{\mu g_e H_1}{TK_B}} \quad (10)$$

Em que, N_+ e N_- são as populações de spins nos estados $m_s = +\frac{1}{2}$ e $m_s = -\frac{1}{2}$ respectivamente, ΔE é a diferença de energia entre os estados degenerados, T a temperatura absoluta e K_B é a constante de Boltzmann. No equilíbrio térmico, os níveis de baixa energia estão majoritariamente ocupados e, assim, absorverão majoritariamente, a energia do campo incidente, alterando o equilíbrio térmico a partir da transição do nível de menor energia $\left(-\frac{1}{2}\right)$, mais ocupado, ao nível de maior energia $\left(+\frac{1}{2}\right)$, menos ocupado (Atherton, 1993), como ilustrado na Figura (3). Entretanto, em temperaturas e campos magnéticos regulares, o termo exponencial é muito pequeno, tal que essa exponencial possa ser aproximada por uma expansão em série de potências até o primeiro termo:

$$e^{-X} \approx 1 - X \quad (11)$$

Assim,

$$\frac{N_+}{N_-} = 1 - \frac{\Delta E}{TK_B} = \frac{\mu g_e H_1}{TK_B} \quad (12)$$

Exemplificando, em uma temperatura de 298 K e um campo magnético de 3.000 G ou 0,3 T a distribuição mostra uma proporção de $\frac{N_+}{N_-} = 0.9986$, significando que a diferença entre os estados N_+ e N_- é consideravelmente pequena, levando as populações dos dois níveis efeito Zeeman estarem proporcionalmente iguais, mas com um pequeno excesso no nível de baixa energia (N_-), possibilitando assim a absorção dos campos oscilantes aplicados. Desta forma, a detecção de elétrons desemparelhados torna-se factível a partir da absorção seletiva de fótons pelo sistema paramagnético em função do campo magnético aplicado.

2.3 Processo de Relaxação

De acordo com a previsão teórica, a equação (13) reescrita a partir da equação (12), considerando que as transições entre o nível de menor energia ocorrem continuamente para o nível de maior energia, o sinal de EPR tende à zero com a absorção de micro-ondas, devido à diferença entre os níveis de populações n de spin tornar-se nula.

$$n = n(0)e^{-2Pt} \quad (13)$$

$$P = \frac{dE}{dT} = n P \Delta E \quad (14)$$

Onde $n = N_- - N_+$ é a diferença de população de spin, P é a probabilidade de transição induzida pelas micro-ondas e $\frac{dE}{dT}$ é a taxa de absorção de energia do campo de radiação. Nessa condição, o resultado seria à saturação das linhas de absorção, que poderia ser observada em um intervalo de tempo muito curto, tornando a técnica de espectroscopia inadequada. Entretanto, essa previsão teórica não se aplica devido a um mecanismo de transferência de energia do sistema de spins com a sua vizinhança, tal mecanismo é chamado relaxação, caracterizando-se em dois tipos: spin-rede e spin-spin. Assim, uma rápida transição de spins do estado $m_s = +\frac{1}{2}$ para o estado $m_s = -\frac{1}{2}$, mantém a diferença de população entre os níveis Zeeman suficiente para aquisição do sinal de RPE (Murphy, 2009).

2.3.1 Relaxação Spin-rede

A relaxação do tipo spin-rede origina-se através da interação entre o spin eletrônico com os campos magnéticos produzidos pelas vibrações dos átomos ou da rede cristalina próxima ao elétron desemparelhado. Estes campos se acoplam ao momento magnético do elétron, produzindo transições entre os estados de spin, tal processo associa-se a um tempo característico T_1 .

2.3.2 Relaxação Spin-spin

A relaxação spin-spin surge da interação do spin eletrônico com os campos magnéticos gerados por outros spins dos elétrons e núcleos nas vizinhanças. Assim como a relaxação spin-rede, a relaxação spin-spin também pode ser caracterizada com um tempo de relaxação característico proporcional à T_2 .

Outra maneira de compreender o mecanismo de relaxação é a partir da aplicação do segundo campo magnético ($h\nu = \vec{H}_1$) necessário para ocorrer ressonância. Esse campo tem que ser perpendicular ao campo $\vec{H}_0$. Nessa situação, a magnetização irá girar em torno do campo efetivo, $H_{\text{eff}} = \vec{H}_0 + \vec{H}_1$.

Na condição de ressonância, o torque produzido pela componente magnética do campo de micro-ondas fará com que a resultante do momento magnético que estava na direção z gire para o plano xy e precessione em fase, em torno da componente $\vec{H}_1$. Entretanto, a magnetização do eixo z será nula enquanto $\omega = \omega_0$. Ao sair desta condição, os momentos magnéticos tendem a retornar ao equilíbrio com tempos característicos T_1 e T_2 , tal que T_1 é o tempo necessário para que a magnetização do eixo z alcance 63% do seu valor de saturação, e T_2 é o tempo necessário para que o sistema de spins perca sua coerência de fase. Na Figura (4) é ilustrado o mecanismo de relaxação de um sistema de spins (Murphy, 2009).

Figura (4): Mecanismo de relaxação de um sistema de spins quando submetido a um campo magnético estático e outro variável durante um certo intervalo de tempo.

Em uma primeira aproximação, o decaimento das componentes no plano xy e da componente z da magnetização seria proporcional à diferença, $\delta \vec{M}$ de $\vec{M}$ com

relação ao seu valor de equilíbrio $\vec{M}_0$, e ao torque aplicado, descritas pelas equações de Bloch (Murphy, 2009).

$$\frac{dM_x(t)}{dt} = \gamma (M_{(t)} \times H_{(t)})_x - \frac{M_x(t)}{T_2} \quad (15)$$

$$\frac{dM_y(t)}{dt} = \gamma (M_{(t)} \times H_{(t)})_y - \frac{M_y(t)}{T_2} \quad (16)$$

$$\frac{dM_z(t)}{dt} = \gamma (M_{(t)} \times H_{(t)})_z - \frac{M_z(t) - M_0}{T_1} \quad (17)$$

2.3.3 Solução da equação de Bloch para T_1

Nesse caso, como T_1 reflete a volta da magnetização para o eixo-z, direção em que o campo magnético estático é aplicado, tem-se, $\vec{H}_{z0} \neq 0$ e $\vec{H}_{x0} = \vec{H}_{y0} = 0$, a solução da equação de Bloch fica do tipo: $M_z(t) = M_z + [M_z(0) - M_z]e^{\frac{-t}{T_1}}$. Como exemplificado na Figura (5), a volta da magnetização longitudinal é representada graficamente pela exponencial tendendo a uma constante t .

Figura (5): Representação gráfica da volta da magnetização longitudinal ao longo do eixo-z, representada por exponencial crescente a partir da resolução da equação de Bloch para o tempo característico T_1

2.3.4 Solução da equação de Bloch para T_2

O tempo característico (T_2) reflete a perda da magnetização transversal ao longo do eixo x-y. Na solução será considerado que a magnitude da magnetização transversal em um tempo zero é M_0 e o ângulo entre M_0 e o eixo-x é ϕ_0 , e, portanto, a solução em termos de x-y segue as equações abaixo bem como seu decaimento em termos das exponenciais na Figura (6).

$$M_x = M_0(0)\cos(\gamma\beta t - \phi_0)e^{\frac{-t}{T_2}} \quad (18)$$

$$M_y = -M_0(0)\sin(\gamma\beta t - \phi_0)e^{\frac{-t}{T_2}} \quad (19)$$

Figura (6): Representação gráfica do decaimento exponencial da perda de coerência de fase em ao longo dos eixos-xy em um tempo característico T_2 a partir da resolução das equações de Bloch.

Quando ambos mecanismos de relaxação contribuem para o sinal de RPE, a largura das linhas de ressonância (ΔH) pode ser escrita pela equação (20) (MURPHY, 2009).

$$\Delta H \propto \frac{1}{T_1} + \frac{1}{T_2} \quad (20)$$

A partir da equação (20) acima, pode-se dizer que quando $T_1 > T_2$, ΔH depende principalmente do mecanismo de interação spin-spin. Diminuindo a distância da interação spin-spin, que é a concentração de spins, o tempo característico T_1 se tornará muito curto, assim, a interação spin-rede terá uma influência maior na largura de linha do que a interação spin-spin. Em um sistema de spins francamente acoplados com a rede-cristalina tende-se a obter um tempo característico T_1 longo, sendo interpretado como quando o elétron desemparelhado não tem tempo para retornar ao estado fundamental, resultando em uma diferença da população de spins para os dois níveis de energia que tende a se aproximar de zero, diminuindo a intensidade do sinal de RPE.

Os tempos de relaxação são característicos de cada espécie paramagnética e estão relacionadas ao efeito de saturação do sinal de RPE com o aumento da potência de micro-ondas, de maneira quanto maior for o tempo de relaxação, mais rapidamente se obtém a saturação do sinal de RPE, entretanto sistemas com um curto tempo característico T_1 são mais difíceis de saturação. A intensidade do sinal de RPE está intrinsicamente relacionado com a dependência do sistema em função dos parâmetros espectroscópicos, tal como, micro-ondas e amplitude de modulação, que serão abordados ao decorrer dos resultados obtidos nessa dissertação.

2.4 Fator g e a forma de linha

O fator g é descrito pela simples equação de ressonância, equação (21), sendo um valor característico para cada tipo de composto.

$$g_e = \frac{h\nu}{\beta_e H_r} \quad (21)$$

Para um elétron livre o valor de g é 2,0023, para a situação do experimento de RPE já citado, entretanto em um átomo/molécula real existe um desvio deste valor devido ao acoplamento spin-orbita (Murphy, 2009). A magnitude dessa resultante é dependente da direção, e, portanto, anisotrópica, uma vez que os orbitais são orientados na molécula.

O estado do composto também influencia no desvio. Em solução de baixa viscosidade a anisotropia é promediada e têm-se um valor médio para o fator g, diferentemente quando todas as moléculas paramagnéticas estão fixas em um cristal. Desta forma, se a posição de um cristal for mudada em relação ao campo magnético no espectrômetro, o valor de g deverá variar, devido à anisotropia. Para cada molécula

paramagnética existe um único sistema de eixos, denominado "sistema de eixo principal". Os valores de g medidos ao longo desses eixos são denominados de g_x , g_y e g_z . A Figura (7) mostra como exemplo uma molécula de um íon metálico paramagnético coordenado por dois ligantes iguais na direção- z e outros quatro diferentes ligantes iguais na direção x,y (Murphy, 2009).

Figura (7): Sistema de coordenadas de uma molécula de um íon paramagnético em função da direção- z e na direção- xy .

Há pelo menos três classes de anisotropia: isotrópica, quando todos os valores de g são iguais ($g_x = g_y = g_z$); axial, quando existe um único eixo que difere dos outros dois ($g_x = g_y \neq g_z$), e a última classe, denominada rômbrica, ocorre quando todos os fatores g são diferentes ($g_x \neq g_y \neq g_z$). A figura (8) mostra a absorção e o espectro para as três classes de anisotropia com $S = \frac{1}{2}$.

Figura (8): Espectro para diferentes simetrias do fator g para o caso de sistemas paramagnéticos com $S=1/2$. (Hagen WR., 2008.).

Para uma melhor compreensão sobre a forma de linha usaremos o mesmo íon metal utilizado para exemplificar a dependência do valor de g em função da orientação da molécula no campo magnético, Figura (9).

Figura (9): Resultado da linha de absorção em função do fator-g na situação onde o campo magnético externo H_0 é paralelo ao eixo-z ou paralelo nos eixos x,y.

Para a classe mais simples, isotrópica, consideramos que o íon metálico em seu ambiente possui uma total simetria, nessa condição, os elétrons nos diferentes orbitais d possuem uma interação igual em todas as direções, portanto, o momento angular é igual em todas as direções. Assim, o momento magnético total é o mesmo em todas as direções ($\mu_x = \mu_y = \mu_z$ e, portanto, $g_x = g_y = g_z$), indiferentemente de como posicionado em um campo magnético externo. Em outras palavras, a magnitude do momento magnético total na direção do campo magnético será sempre o mesmo. Isso significa que há apenas um único valor de g e apenas um campo externo onde a ressonância ocorre: $g_e \mu H_0 = h\nu$, assim sendo, ocorrerá apenas uma linha de absorção, como visto na Figura (8).

Supondo agora uma simetria axial, tal que o momento magnético total na direção-z é amplo, para essa condição, se o momento magnético na direção-z está paralelo ao campo magnético externo, a diferença de energia entre os dois níveis de energia para o elétron desemparelhado será $2\mu_z H_0$, necessitando apenas de um pequeno campo magnético (H_1) para obter ressonância. Entretanto, se consideramos outras direções, tal como, no eixo-x ou eixo-y (ou outra direção dentro do plano-x,y) paralelas ao campo magnético externo, a diferença de energia será $2\mu_{x,y} H_1$, levando $\mu_{x,y}$ tornar-se pequeno, necessitando de um campo magnético ($H_{x,y}$) mais amplo para ocorrer ressonância.

Rotacionando o íon de modo que ' $z \parallel H$ ' torna-se ' $z \perp H$ ' (plano x,y $\parallel H$), o momento magnético total na direção do campo magnético externo irá decrescer a partir

de μ_z para $\mu_{x,y}$, resultando em uma e única linha de absorção no espectro a partir da mudança de direção H_z para $H_{x,y}$ (Bert M. Weckhuysen, Ralf H., 2004) Figura (9).

As coordenadas polares também são uma ferramenta matemática capaz de fornecer uma clareza maior sobre a dependência angular no valor de g_e um sistema de spins. Primeiramente, define-se a orientação do campo magnético (dado como um vetor) com suas respectivas coordenadas da molécula (e vice-versa), a partir de dois ângulos polares, θ e ϕ , onde θ é o ângulo entre o vetor $\vec{H}_0$ e o eixo-z, e ϕ é o ângulo entre a projeção do $\vec{H}_0$ no plano xy e o eixo x, como demonstrado na Figura (10) abaixo.

Figura (10): Orientação do campo magnético ($\vec{H}_0$) com seus respectivas coordenadas polares em uma molécula.

A partir disso, as direções usadas são:

$$l_x = \sin \theta \cos \phi \quad (21)$$

$$l_y = \sin \theta \sin \phi \quad (22)$$

$$l_z = \cos \theta \quad (23)$$

E, portanto, em uma condição de ressonância anisotrópica com um spin $S = \frac{1}{2}$, o sistema sujeito a uma interação Zeeman eletrônica pode ser definido como (MURPHY, 2009),

$$H_{\text{ressonante}} = \frac{h\nu}{g(l_x, l_y, l_z)} \text{ com } g(l_x, l_y, l_z) = \sqrt{l_x^2 g_x^2 + l_y^2 g_y^2 + l_z^2 g_z^2} \quad (24)$$

Ou em termos dos ângulos polares, como na equação (24),

$$g(\theta, \phi) = \sqrt{g_x^2 \sin^2 \theta \cos^2 \phi + g_y^2 \sin^2 \theta \sin^2 \phi + g_z^2 \cos^2 \theta} \quad (25)$$

Por exemplo, um espectro com a forma de linha axial pode escrito a partir da equação abaixo.

$$g_{\text{axial}}(\theta) = \sqrt{g_{xy}^2 \sin^2 \theta + g_z^2 \cos^2 \theta} \quad (26)$$

2.5 Interação Hiperfina e Superhiperfina

As possíveis interações na espectroscopia por RPE surgem quando o elétron desemparelhado interage com núcleos vizinhos, causando degenerescências. Há pelo menos três tipos de interações que podem ocorrer. As duas primeiras são resultado da interação entre o elétron desemparelhado e o núcleo magnético, tal como a interação nuclear hiperfina, quando o elétron desemparelhado interage com momento magnético nuclear do próprio átomo, e a interação *superhiperfina*, se a interação ocorre com núcleos magnéticos vizinhos. O terceiro tipo é denominada *spin-spin*, quando a interação ocorre a partir de dois elétrons desemparelhados em diferentes átomos na molécula. Os três possíveis tipos de interações do elétron desemparelhado em relação a sua vizinha estão sumarizados na Figura (11), como anteriormente explicado.

Figura (11): Possíveis interações magnéticas em RPE.

As possíveis orientações do spin nuclear no campo magnético tem multiplicidade $2I + 1$ com valores de m_I ($m_I = I, I - 1, \dots, 0, \dots, +I - 1, \dots, -I$). Cada orientação corresponde a uma energia diferente, induzindo um campo magnético local. Para núcleos com $I = \frac{1}{2}$, duas orientações são possíveis para o campo magnético local, ao longo da direção do campo magnético aplicado $\left(+\frac{1}{2}\right)$, e contrário ao campo aplicado $\left(-\frac{1}{2}\right)$. Cada orientação cria um pequeno campo magnético adicional no sítio de localização do elétron (Figura (12 A)). Com a orientação do campo magnético local $\vec{H}_{local}$ paralela ao spin do elétron, este será adicionado ao campo magnético externo $\vec{H}_0$ e com orientação antiparalela o campo será subtraído. Dessa forma, a condição de ressonância será satisfeita duas vezes, resultando em um espectro com duas linhas hiperfinas (Swartz HM, Bolton JR, 1972). A Figura (12 B) e a equação (27) descrevem a condição de ressonância, considerando agora o campo local, como também esquematizado na mesma figura. A magnitude do desdobramento entre as linhas hiperfinas é chamada de acoplamento hiperfino (hfc) (Murphy, 2009).

$$h\nu = \beta_e g_e (\vec{H}_0 + \vec{H}_{local}) \quad (27)$$

Figura (12): Interação hiperfina com spin nuclear $\frac{1}{2}$ a partir do momento campo magnético do núcleo levando o surgimento de um campo local (A). Sinal de RPE a partir de um elétron desemparelhado interagindo com um núcleo magnético com spin nuclear $\frac{1}{2}$ (B).

Para n núcleos equivalentes, o espectro consiste de $(2nI + 1)$ linhas cujas intensidades relativas são dadas por uma expansão binomial de Pascal de ordem n (Tabela1), obtidos pela seguinte expressão $(1 + x)^n$. A intensidade de cada pico dependerá da quantidade de microestados atuantes nos subníveis do sistema, proporcional aos coeficientes da expansão binomial (Swartz H. M. , Bolton J. R., 1972).

Tabela (1): Coeficientes da expansão binominal de Pascal até $n = 8^{10}$ correspondente à quantidade de microestados atuantes nas interações hiperfinas e os coeficientes correspondentes à intensidade relativa e ao número de linhas de RPE.

Intensidade relativa das linhas RPE									
n									Nº de linhas
0				1					1
1				1		1			2
2				1		2		1	3
3				1		3		3	4
4				1		4		6	5
5				1		5		10	6
6				1		6		15	7
7				1		7		21	8
8				1		8		28	9

Portanto, o número e a intensidade das linhas dependerão da quantidade de núcleos magnéticos vizinhos, sendo característicos de cada molécula. A largura das linhas dependerá da força e tempo de relaxação das interações, podendo também ser afetada pela condição de saturação, devido aos movimentos moleculares e interações magnéticas (Atherton, 1993).

A Figura (13) representa o espectro de um radical formado em uma amostra de alanina após irradiação. O espectro é composto por cinco linhas características, justificado a partir da interação do elétron desemparelhado localizado no átomo do carbono central com os quatros núcleos de hidrogênio vizinhos com intensidade de 1:4:6:4:1 (Vanhaelewyn, 2000; Garcia, 2009).

Figura (13): Níveis de degenerescência causada pela interação do elétron desemparelhado com os quatro núcleos de vizinhos, formando o espectro característico de alanina.

2.6 Espectrômetro de RPE

O espectrômetro de RPE é constituído por quatro principais unidades: unidade de campo magnético, unidade de micro-ondas, a cavidade ressonante e a unidade de detecção (modulação, amplificação e registro do sinal) (Weil; Bolton; Wertz, 1995). Um desenho esquemático em relação ao espectrômetro de RPE é exemplificado na Figura (14).

Figura (14): Desenho esquemático das principais unidades do espectrômetro de RPE.

Unidade de geração do campo magnético: O campo magnético é produzido por eletroímãs que geram campos uniformes na região entre os polos. Um sistema de varredura conectado à fonte possibilita a variação linear do campo magnético entre os polos do eletroímã.

Unidade de geração de micro-ondas: O compartimento de micro-ondas é composto por mais partes do que visto na Figura (14). Nesse contexto, uma breve explicação sobre as principais partes que formam tal compartimento estará sendo discutida ao decorrer, desde o caminho percorrido da micro-ondas a partir da fonte geradora até o cristal detector. Para isso, um esquema ilustrativo na Figura (15) seguindo uma ordem numérica estará especificando cada parte seguido de uma breve definição.

Figura (15):Diagrama de bloco das principais partes da unidade de micro-ondas.

Fonte geradora (1): as micro-ondas são geradas em válvulas eletrônicas especiais, denominada “Klystron”, em sistemas mais antigos ou por dispositivos de estado sólido como o “diodo Gunn”. Os espectrômetros de EPR são construídos para operarem com frequências fixas e campo magnético variável. Perturbações sérias na frequência da fonte geradora podem ocorrer quando uma significativa reflexão da energia de micro-ondas volta para o sistema gerador. Por isso, dispositivos como o isolador, o medidor de comprimento de ondas (ou frequência) e o atenuador são responsáveis por transmitir a energia de micro-ondas a partir do gerador até a cavidade ressonante sem reflexão para o gerador e com controle, mediante a um guia de onda o qual é um tubo oco e de seção transversal retangular com paredes internas metálicas e polidas. Suas dimensões são determinadas pela frequência das micro-ondas.

Isolador (2): permite a passagem da energia de micro-ondas em uma direção e que é fortemente atenuada quando refletida.

Mediador de comprimento de ondas (3): uma cavidade de um cilindro ressonante, onde o comprimento da energia da onda é ajustado em micrometros de maneira que, quando a frequência ressonante do mediador de comprimento de onda

corresponde a frequência de micro-ondas incidente, há um decréscimo na potência detectada pelo cristal detector. Nos espectrômetros modernos a frequência é detectada eletronicamente e esse dispositivo não é mais usado.

Atenuador (4): responsável por controlar o fluxo da energia de micro-ondas incidente sobre a amostra, dessa forma, a radiação incidente pode ser precisamente e acuradamente controlada.

Como a grande parte dos espectrômetros de RPE são espectrômetros de reflexão, nessa condição o cristal detector deveria apenas medir a energia de micro-ondas voltando a partir da cavidade. Entretanto, outro dispositivo chamado circulador torna possível o envio da parte dessa energia não absorvida pela amostra para o cristal detector.

Circulador (5): a energia da micro-ondas é direcionada para três compartimento, passando de C_A para C_B até ser anexada em C_C onde finalmente as micro-ondas refletidas são direcionadas apenas para o cristal detector não voltando para a fonte de micro-ondas.

Cristal detector (6): um cristal de diodo, que converte a potência de micro-ondas em uma corrente elétrica. Para níveis baixos (menores do que $1\mu W$), a corrente do diodo é proporcional à potência de micro-ondas, entretanto, para níveis altos (superior $1mW$), a corrente do diodo é proporcional a raiz quadrada da potência de micro-ondas. Para análises quantitativas as medidas da intensidade do sinal bem como a sensibilidade otimizada, deve operar na região linear do diodo. Um segundo atenuador é responsável por controlar a corrente do diodo para otimização da performance do espectrômetro.

Cavidade ressonante: a cavidade ressonante armazena a energia das micro-ondas em ondas estacionárias produzidas no seu interior, resultando na amplificação do fraco sinal vindo da amostra por um fator que varia de 10^2 a 10^4 . Basicamente é uma caixa metálica com dimensões retangulares e cilíndricas. As cavidades são caracterizadas pelo fator-Q de qualidade, que indica o quão eficiente é o armazenamento da energia da micro-ondas dentro da cavidade.

Figura (16): Potência de micro-ondas refletida em uma cavidade ressonante.

O fator-Q é definido como a energia armazenada por ciclo, relacionada com a quantidade de energia perdida durante um período de micro-ondas, como exemplificado na equação (27). Essa perda de energia é associada à geração de calor nas paredes da cavidade devido a criação de uma corrente elétrica proveniente da micro-ondas.

$$Q = \frac{2\pi (\text{energia armazenada})}{\text{energia dissipada por ciclo}} \quad (27)$$

Quando o fator Q aumenta, a sensibilidade do espectrômetro também aumenta. Outra maneira de mensurar o fator Q é expressá-lo em termos da frequência de ressonância ($\nu_{ressonante}$) e a variação de frequência ($\Delta\nu$), descrita como a largura à meia-altura da curva de ressonância da cavidade ou “dip”. Portanto, a equação (28) é outro caminho para expressar fator-Q de qualidade.

$$Q = \frac{\nu_{ressonante}}{\Delta\nu} \quad (28)$$

Uma consequência da ressonância é o padrão de ondas dentro da cavidade, uma vez que uma onda eletromagnética possui componentes elétricas e magnéticas exatamente fora de fase, quando o campo magnético é máximo, o campo elétrico é mínimo, e vice-versa. A separação espacial dentro da cavidade do campo elétrico e do campo magnético é um meio que espectrômetro trabalha para obter vantagem na espectroscopia, uma vez

que na maioria das amostras mensuradas não possuem ressonância a partir da absorção de micro-ondas via campos elétricos, além disso o fator-Q de qualidade é degradado pelo aumento da energia dissipada via campos elétricos (Bert M. Weckhuysen, Ralf Heidler, 2004).

Portanto, a componente magnética dessa micro-onda será absorvida na espectroscopia por RPE. Assim, o posicionamento da amostra na cavidade deve ser de forma a ocupar a região de máximo campo magnético e mínimo campo elétrico, ou seja, a amostra é colocada no plano de nós do campo elétrico $\vec{E}_0$, logo no ponto de máximo do campo magnético $\vec{H}_1$, como mostra a Figura (18), dessa maneira, aumentando o sinal ressonante.

Figura (18): Desenho esquemático da cavidade ressonante de um espectrofotômetro de RPE, bem como o padrão de ondas estacionárias para amplificação do sinal de EPR.

Unidade de detecção e registro do sinal: A detecção em fase do sinal de RPE é obtida com a modulação do campo magnético por meio de bobinas adicionais localizadas nas laterais da cavidade. O sinal de ressonância é modulado com uma frequência que vai de 10 a 100 kHz e baixa amplitude, melhorando a relação sinal-ruído. Nesse caso, se há algum sinal de RPE, o campo de modulação rapidamente varre parte do sinal e a amplitude da micro-ondas refletida a partir da cavidade é modulada na mesma frequência. Para um sinal de RPE que é aproximadamente linear sobre um intervalo de uma gama de valores da amplitude de modulação, o sinal de RPE é transformado em uma senóide sendo proporcional à inclinação do sinal de absorção de micro-ondas, como visto

na Figura (19). A amplificação é feita por um amplificador sensível à fase (sistema lock-in) e, como resultado, fornece um sinal DC (derivada da curva) que é proporcional à amplitude de modulação do sinal modulado. O amplificador compara o sinal modulado com o sinal de referência que possui a mesma frequência que o campo de modulação. Por isso é apenas sensível para o sinal que possui a mesma frequência e uma fase fixa com o sinal de modulação. Qualquer sinal, como exemplo: ruído e interferência elétrica, que não preencha esses requisitos, são descartados.

Figura (19): Campo de modulação e fase de sensibilidade da detecção.

O sinal de RPE de um sistema de spins $S = \frac{1}{2}$ como mostra na Figura (13), pode ser caracterizado por um determinado valor do campo magnético da ressonância H , a amplitude pico a pico do sinal A_{pp} , e o valor da largura de linha pico a pico ΔA_{pp} . A medida da intensidade do sinal de RPE, ou seja, a medida de concentração de spins que produz este sinal, é associada ao valor da dupla integral deste sinal ou à medida da amplitude pico a pico do sinal A_{pp} que, em certas condições, é diretamente proporcional à concentração de centros paramagnéticos.

2.7 Dosimetria por Ressonância Paramagnética Eletrônica

Radiações com energia suficiente podem ionizar a matéria, extraindo os elétrons de seus estados de ligação atômicos. Estes elétrons desemparelhados podem ser armadilhados por impurezas ou defeitos inerentes do material, formando átomos e/ou moléculas com excesso e deficiência de elétrons metaestáveis (Gómez et al., 2011). Desta forma, a dosimetria por RPE utiliza centros paramagnéticos como indicadores de dose de materiais irradiados em laboratório ou pela radioatividade natural (R., 2006).

A produção de elétrons desemparelhados no material será função da quantidade de energia depositada pela radiação ionizante, e, portanto, uma medida da concentração desses elétrons desemparelhados pode ser utilizada como uma medida da energia depositada pela radiação ionizante, como medida de dose absorvida. Neste contexto, a técnica de RPE torna-se viável para quantificar dose absorvida, devido à sua capacidade de detectar espécies com elétrons (spin) desemparelhados a partir do monitoramento de elétrons desemparelhados que são gerados ou destruídos pela radiação ionizante.

A curva de dose-resposta de um material utilizando esta técnica será construída com os valores da intensidade do espectro de RPE para cada dose, sendo tais doses medidas a partir da amplitude pico-a-pico A_{pp} , ou pelas medidas da dupla integral do sinal, como representado na Figura (20), que mostra a formação de elétrons desemparelhados a partir da intensidade do I do espectro de RPE, sendo linearmente proporcional à dose absorvida D , que pode ser expressa com a taxa de dose $\dot{D}$ multiplicada pelo tempo t . O valor I_0 seria o sinal existente com dose zero. Dessa forma, a curva de dose-resposta é descrita simplesmente pela equação (29).

$$I(t) = I_0 + cDt \quad (29)$$

Figura (20): Dosimetria por Ressonância Paramagnética Eletrônica utilizando o incremento da intensidade do sinal, a partir da amplitude pico-a-pico do sinal A_{pp} de um espectro de alanina.

Um bom material dosimétrico apresenta uma curva de dose-resposta como mostrada na Figura (20). Entretanto, são também esperadas outras características que definem o perfil dosimétrico de um material, tais como: estabilidade, sensibilidade e reprodutibilidade, que dependerão do tempo de vida dos radicais originados pela radiação, das doses depositadas e da energia da radiação.

2.7.1 Dosímetro de Alanina

A alanina é um aminoácido constituinte das proteínas e sua estrutura molecular é composta por um grupo carboxílico (COOH), um grupo amino (NH_2), um grupo metil (CH_3) e um átomo de hidrogênio, todos ligados a um átomo de carbono central, Figura (21) (Vollhardt, K.P.C, Score, 1994). O grupo metil é o responsável por diferenciá-la dos demais aminoácidos, fazendo da alanina o menor e mais simples aminoácido (Gómez et al., 2011).

Figura (21): Estrutura molecular da alanina, composta por um grupo carboxílico (COOH), um grupo amino (NH₂), um grupo metil (CH₃) e um átomo de hidrogênio, todos ligados a um átomo de carbono central.

Após o processo de irradiação, algumas ligações da molécula de alanina são quebradas, aparecendo na molécula um comportamento paramagnético. O espectro de alanina como já explicado anteriormente é devido à recombinação rápida de todas as moléculas, exceto do grupo amino, pelo qual, o elétron desemparelhado localizado no C₂ interage com os prótons da vizinhança por meio de uma interação hiperfina (Figura 22), Tal quebra é tão estável que a molécula de alanina sofre um dano permanente e, conseqüentemente, também o comportamento paramagnético, o que a torna um dosímetro de interesse para a técnica de RPE (Hansen; Olsen, 1989) e por isso tem sido investigada há mais de 40 anos como material dosimétrico (Bradshaw, W. W.; Cadena, D. G.; Crawford, G. W.; Spetzler; W., 1962). O radical livre induzido no dosímetro de alanina era assumido por muitos anos ser um único radical, nomeado como SAR (*stable alanine radical*) (Heydari et al., 2002), formado pela deaminação de um ânion de alanina protonada (Miyagawa, I.; Gordy, W. J. Chem. Miyagawa, I.; Gordy, 1960; Arber, J. M.; Sharpe, P. H. G.; Joly, H. A.; Morton; F., 1991), como exemplificado na Figura (22).

Contudo, recentes estudos tem mostrado que o espectro de alanina é formado por pelos menos três radicais estáveis em temperatura ambiente (Heydari et al., 2002). Dois desses radicais contribuem para cerca de 90 a 95% do sinal obtido (Vanhaelewyn, 2000).

Figura (22): Estrutura do radical R1 da alanina (SAR).

O segundo radical R2 é resultado de uma interação hiperfina do próton do grupo metil com três permutas não equivalentes com prótons do grupo amino, Figura (23). O grupo amino não possui rotação livre, mas os prótons estão situados em posições que são determinadas pela difração de nêutrons (Vanhaelewyn, 2000).

Figura (23): Estrutura do radical R2 da alanina.

Por fim, o ultimo radical R3 (Figura (24)), resultado de duas interações hiperfinas, ambas entre o elétron desemparelhado (Waldeland; MAlinen, 2011). Este radical é ainda alvo de investigação quanto ao sinal de RPE sendo muito provável que esteja associado ao ruído que o sinal apresenta.

Figura (24): Estrutura do radical R3 da alanina.

Portanto, a interação da radiação ionizante com a molécula do aminoácido alanina produz radiais livres estáveis em temperatura ambiente, tornando-se factível a determinação da dose a partir da determinação da concentração de radicais (Miyagawa I. and Gordy W., 1960).

O espectro de alanina é obtido em condições experimentais com a otimização dos parâmetros espectroscópicos que garantem a melhor relação sinal-ruído e alta sensibilidade. Dentre as características dosimétricas da alanina, destacam-se a linearidade, apresentando um comportamento linear para uma faixa de dose que se estende desde alguns poucos Gy até aproximadamente 100 kGy e, acima deste valor, a curva é sublinear alcançando uma região de saturação passando por um máximo em aproximadamente 1000 kGy (Regulla; Deffner, 1982a).

Além dessa ampla linearidade, outras qualidades fazem da alanina um material dosimétrico adequado, tais como, uma resposta independente da energia acima de 100 KeV e independência com a taxa de dose. Além disso, é tecido equivalente em termos da energia de absorção e propriedades de espalhamento da radiação ionizante; e apresenta pouca dependência com a temperatura e humidade (Berman N F., 1971; Sagstuen et al., 1997; Waldeland, 2011; Waldeland; Malinen, 2011; Gallo et al., 2017).

Mediante essas características, o dosímetro de alanina tornou-se um dosímetro padrão pela IAEA (International Atomic Energy Agency) para ser usado no programa de padronização de doses altas devido às seguintes qualidades: pouco decaimento do sinal de RPE com o tempo; os dosímetros não requerem nenhum tratamento químico nem térmico antes e depois da irradiação; o sinal não é destruído depois do registro do espectro permitindo a releitura posterior dos dosímetros (Nam JW, 1989; Gómez et al., 2011).

Apesar dessas considerações a alanina possui desvantagem dosimétrica que impedem que seja considerado perfeitamente ideal (Alzimami; Maghraby; Bradley, 2014). Por exemplo, suas aplicações médicas são limitadas, devido principalmente à sua sensibilidade limitada abaixo de 5 Gy (Maghraby; Tarek, 2006), um espectro complexo mostrando dependência do tempo durante as primeiras horas após a irradiação (Nagy; Desrosiers, 1996; Heydari et al., 2002; Olsson et al., 2002). Nas aplicações médicas para modalidades radioterápicas como, radioterapia de intensidade modulada (IMRT) que utiliza campos pequenos de radiação para tratamento de câncer, o dosímetro de alanina apresentou desvantagem em relação a outros detectores, isso porque a dosimetria deve-se adequar ao planejamento, ou seja, as dimensões dos detectores também deverão ser reduzidas para proporcionar resolução espacial adequada, isso implica que a redução do volume ativo do dosímetro de alanina afeta a sensibilidade, uma vez que a sensibilidade depende do número de radicais formados pela radiação ionizante (Guidelli et al., 2012).

Uma outra aplicação médica é em procedimentos de radiocirurgia, nesse caso a incerteza obtida nas medidas também a colocou em desvantagem em comparação a outros detectores (A. Mack, 1976). Portanto, a limitação da sensibilidade para doses baixas e a redução do volume ativo do dosímetro de alanina são fatores que prejudicam a expansão da dosimetria por RPE em aplicações clínicas. Por isso, muitos pesquisadores têm focado em como otimizar a sensibilidade da alanina por meio de materiais c.

Alguns materiais incorporados em alanina proporcionaram um aumento considerável na sensibilidade no dosímetros, como por exemplo o óxido de gadolínio (Gd_2O_3) que mostrou aumentou em duas vezes a sensibilidade da alanina pura (Brai, M.,

Gennaro, G., Marrale, M., Bartolotta, A., D'oca, 2007) e o iodeto de potássio (KI) que a partir da variação da porcentagem em massa (5%, 10%, 15%) desse material, apresentou um aumento significativo principalmente com a maior porcentagem em massa testada (15% de KI) quando irradiadas com feixes de raios-X com energia efetiva de 50 KeV e comparadas com dosímetros não dopados irradiados com ^{60}Co , com um aumento de 2,2, 3,4 e 4,5 vezes para as amostras contendo 5%, 10% e 15% de KI respectivamente (Chen; Nicolucci; Baffa, 2008).

Entretanto, outros dopantes apresentaram vantagem e desvantagens. Por exemplo, o iodeto de chumbo (PbI) possibilitou uma detecção de dose da ordem de 10 mGy em uma porcentagem mássica de 30%, porém o aumento da sensibilidade em função do aumento da porcentagem mássica influenciou na perda da propriedade de tecido equivalência da alanina (Chen F., 2007), e por último, o ácido bórico (H_3BO_3), que não proporcionou aumento na sensibilidade do dosímetro de alanina, mas por outro lado, reduziu o valor da mínima dose detectável (Brai M., 2007). Um ponto relevante da influência dos materiais adicionados em alanina é a homogeneidade. A mistura de óxidos e sais metálicos produz um efeito de segregação entre os cristais da impureza (dopante) e o cristais de alanina produzindo inomogeneidades no volume sensível do detector, além de redução do volume sensível do detector (Guidelli; Baffa, 2014a)

Novamente, percebemos as limitações para expansão da dosimetria por RPE em aplicações clínicas. Portanto, dentro desse contexto, nosso grupo de pesquisa tem mostrado que a adição de materiais nanoestruturados ($\text{Nps}_{\text{metálicas}}$) pode otimizar a sensibilidade do dosímetro de alanina, principalmente devido ao elevado número atômico (Z) e a capacidade de se distribuir de forma homogênea na estrutura da alanina proporcionando homogeneidade e, dependendo da concentração de nanopartículas metálicas ainda permitir que o dosímetro de alanina continue sendo tecido-equivalente

2.8 Nanotecnologia em aplicações dosimétrica

As propriedades apresentadas pelos materiais em nanoescala tem despertado interesse em vários campos da ciência, tais como, Física, Química, Biologia, Medicina e na Ciências da Saúde (Guidelli et al., 2012a). Isso porque possuem características únicas como homogeneidade e estabilidade em relação ao seu próprio tamanho. A partir disso,

as nanopartículas metálicas tem sido amplamente empregadas em diagnósticos médicos (Liu H, Zhang X., Xing B., Han P., 2010; L. Austin A., Kang B., 2011), em sistemas de entrega de drogas (G. Aliev, H. H. Palacios, V. B. Shadlinski, D. Gokhman, 2011), cicatrizações de feridas (Kwan K. H., 2011), tratamentos radioterapêuticos (Kong T., J. Zeng, X. Wang, X. Yang, J. Yang, S. MC Quarrie, A. MC Ewan, W. Roa, 2008), sensores (O. Stranik, H. M. MC Evoy, 2005) e detectores de radiação (Guidelli et al, 2012;. Funaro M, A. Di Bartolome O, Pelosi P, 2011).

Para dosimetria de feixes de mais baixa energia, como a seção de choque das $Np_{\text{metálicas}}$ é maior do que a seção de choque da alanina, a probabilidade de eventos com a radiação ionizante aumenta, dessa forma, proporcionando um ganho na sensibilidade dosimétrica de forma homogênea. Além disso, diminui também os problemas de inhomogeneidades gerados no volume sensível do detector (Guidelli; Baffa, 2014a). Os principais mecanismos de interação da radiação ionizante com as $Np_{\text{metálicas}}$ se dão através dos efeitos fotoelétrico e Compton.

Em suma, o ganho na sensibilidade dosimétrica é proporcionado pela ejeção dos elétrons das $Np_{\text{metálicas}}$ a partir dos eventos (Fotoelétrico e Compton) causados pela interação da radiação ionizante. Os elétrons ejetados possuem energia cinética suficiente para garantir uma maior quebra das ligações da molécula de alanina, o que por sua vez produz um maior número de radicais paramagnéticos.

O ganho em sensibilidade dosimétrica devido a inserção das $Np_{\text{metálicas}}$ é descrito pelo fator DEF (do inglês *Dose Enhancement Factor*) (Guidelli; Baffa, 2014a). Na previsão teórica os valores de DEF são calculados como a razão entre o coeficiente de absorção mássica das $Np_{\text{metálicas}}$ e o coeficiente de absorção mássica da alanina pura, como a seguinte equação (30):

$$DEF \approx \frac{(\mu_{en}/\rho)_{Nc,hv}}{(\mu_{en}/\rho)_{ala,hv}} \quad (30)$$

Onde $(\mu_{en}/\rho)_{hv}$ é o coeficiente de absorção mássico para o fóton com uma energia específica hv ; o subscrito Nc e ala representa a quantidade de $Np_{\text{metálicas}}$ e de alanina pura respectivamente (Guidelli et al., 2012a). Os valores esperados para os coeficientes de absorção mássica para uma dada energia de radiação ionizante são obtidos pelo NIST (National Institute of Standards and Technology) uma base de dados para

referências em Física (‘National Institute of Standards and Technology-NIST’, 2009). Experimentalmente, os DEFs são calculados como sendo o quociente da amplitude pico-à-pico da linha central do espectro de EPR da alanina obtido após a irradiação. As Np_{Smetálicas}, especialmente as de ouro, também têm sido utilizadas como agentes radiosensibilizadoras em tecidos tumorais devido ao seu elevado número atômico (Z) que aumenta a absorção da radiação ionizante (Herold M.D., 2000; Roeske J.C., 2007; Wu D., 2011). Conforme é mostrado na Figura (25), o coeficiente de absorção mássica para as Np_{Smetálicas} de ouro (Z=79) para fótons de baixa energia é maior para o ouro do que para a alanina.

Figura (25): Coeficiente de absorção mássica para alanina e para o ouro com fótons de baixa energia, segundo a base de dados disponível no NIST (‘National Institute of Standards and Technology-NIST’, 2009).

Assim como no dosímetro de alanina, a inserção de materiais com elevado número (Z) atômico aumenta o coeficiente de absorção mássica ($\frac{\mu}{\rho}$) comparados com tecidos moles, portanto, proporcionando um aumento a probabilidade de interação da radiação ionizante no tumor, sem alterar a absorção da radiação ionizante pelos tecidos circunvizinhos saudáveis, consequentemente, aumentando a dose no tumor.

Dentro desse contexto, a inserção de NpAu (nanopartículas de ouro) na matriz do dosímetro de alanina, como já reportado na literatura, é uma alternativa viável para amplificação do sinal dosimétrico (Guidelli et al, 2012; Guidelli; Baffa, 2014a),

possibilitando o aumento de dose no volume sensível do detector (Guidelli; Baffa, 2014a). Além disso, em comparação entre os métodos comumente usados para síntese de Nps metálicas que utiliza grandes quantidades de polímeros para manter a estabilidade da mesma, o grupo de pesquisa como previamente citado, adequou-se a rota sintética para não utilização de polímeros durante a síntese de Nps metálicas, para posterior incorporação nos dosímetros de alanina, visto que o uso de tais polímeros acarretaria a redução do volume sensível do dosímetro.

Assim sendo, a síntese de um material híbrido contendo Nps metálicas inseridas em uma matriz de alanina permite que os elétrons ejetados atinjam diretamente as moléculas de alanina, além de melhorar a homogeneidade do material, possibilitando a construção de detectores de tamanho reduzido. Vale ressaltar ainda, a verificação de uma possível interação do grupo amina da alanina com a superfície das nanopartículas metálicas, tornando-as mais estáveis (Guidelli et al., 2012b). As contribuições já obtidas, envolvem a investigação dos mecanismos envolvidos na formação das nanoestruturas metálicas e a capacidade da alanina em acomodá-las em sua matriz cristalina, bem como, os fatores que influenciam na resposta dosimétrica têm mostrado um grande avanço para o desenvolvimento da dosimetria por RPE.

1.9 Objetivo

Os objetivos desse trabalho foi o estudo das propriedades dosimétricas de L-asparagina como um novo material dosimétrico para Ressonância Paramagnética Eletrônica, e a comparação de sua sensibilidade à radiação ionizante com materiais já conhecidos, tais como, alanina, 2-metilalanina e glutamato monossódico, com e sem a inserção de nanopartículas de ouro.

1.9.1 Objetivo Específico

Estudo da dependência do sinal em função da micro-ondas e amplitude de modulação, bem como, compreensão da natureza dos possíveis radicais induzidos após a irradiação por raios-X por meio de simulação computacional. E comparação da sensibilidade à radiação ionizante de L-asparagina, alanina, 2-metilalanina e glutamato monossódico após a inserção de nanopartículas de ouro.

1.10 Justificativa

A alanina até então é o material dosimétrico padrão, devido à alta estabilidade do seu radical paramagnético pela quebra do grupo NH_2 . Apesar de todas as considerações referente as suas características dosimétricas, apresenta baixa sensibilidade quando exposta a certas qualidades de energia. Portanto, se faz necessário a busca de materiais alternativos que apresentem alta sensibilidade e estabilidade do sinal dosimétrico. Dentro desse cenário, a L-asparagina é um potencial candidato para dosimetria das radiações, visto que a sua molécula possui dois grupos NH_2 , pelo qual poderia formar mais radicais livres estáveis assim como na alanina. Adicionalmente a inserção de nanopartículas de ouro poderia amplificar a sua sensibilidade.

Capítulo 3: Procedimentos Experimentais

3.1 Caracterização do Sinal Dosimétrico

3.1.1 Preparação dos Dosímetros

As amostras de L-Asparagina hidratada (Asn) ($C_4H_8N_2O_3$) (Asn) (Acros Chemical Company, 99% de peso molecular) conhecida como 2-Amino-3-carbonil-ácido-propânico, com peso molecular de 132,1 g com estrutura molecular mostrado na Figura (26), foram utilizadas como recebidas.

Figura (26): Estrutura molecular de L-Asparagina hidratada.

As especificações dos outros materiais também utilizados, para o estudo da sensibilidade dos nanocompósitos são: L-alanina (ala) Vetc Brasil (98%); 2-Metilalanina: Sigma-Aldrich (99%) (2MA) e Glutamato monossódico (GMS) Loja comercial. Todos os materiais foram usados como recebido. Os materiais foram colocados em capsulas gelatinosas farmacêuticas, como visto na Figura (27) contendo uma massa de aproximadamente de 100 mg, de maneira que material de encapsulamento não influenciava nas irradiações. As amostras eram estocadas antes e após as irradiações de maneira a evitar luz e calor, em condições de temperatura e umidade ambiente do laboratório.

Figura (27): Cápsula de armazenamento dos dosímetros.

3.1.2 Irradiação

As amostras foram irradiadas no Departamento de Física (FFCLRP) da Universidade de São Paulo, no ar, com um tubo de raio-X da marca Isovolt Titan E-160M-2 GE, operando com 160 kV em um kVp de 42 keV e 10 mA e um filtro de 2 mm de alumínio e 0.8mm de berílio. Estas amostras foram irradiadas com doses de 2 a 30 Gy para fornecer uma curva de dose-resposta, e com 100 Gy para o estudo dos parâmetros espectroscópicos e estabilidade do sinal de RPE e para o estudo da sensibilidade dos nanocompósitos respectivamente.

Para outros estudos, tais como dependência energética e taxa de dose, foram usados um acelerador linear PRIMUS (6 MV) e um equipamento de raio-X de Ortovoltagem Siemens Stabilipan (80 KV) respectivamente com doses de 2 a 12 Gy. Para as irradiações com o acelerador linear foi adicionada uma placa de 0,5 cm de acrílico (build-up) sobre as cápsulas de forma a satisfazer as condições de equilíbrio de partículas carregadas.

3.2 Nanodosimetria

3.2.1 Síntese de Nanopartículas de Ouro (NpAu)

Os reagentes químicos empregados no experimento eram de grau analítico e usados como recebido. As NpAu foram sintetizadas por meio da redução de um sal de ouro Au (III). Para isso, adicionou-se uma solução aquosa de 200 ml de ácido cloroáurico (HAuCl₄, 99.999%, Sigma-Aldrich) em uma concentração de 2 mmol. L⁻¹ à solução de 200 ml de borohidreto de sódio (NaBH₄, Sigma-Aldrich) em uma concentração de 8 mmol.L⁻¹, mantendo-se o sistema sobre forte agitação por 12 h em temperatura ambiente. A solução inicial mudou sua cor de amarelo para vermelho, indicando a formação de dispersão coloidal. A estequiometria da redução do sal de ouro ocorre segundo a equação química abaixo:

A formação de NpsAu foi confirmada por meio da espectroscopia na região do UV-Visível. O tamanho médio das NpsAu foi analisado pela técnica de espalhamento dinâmico de luz.

Em seguida, preparou-se uma solução aquosa de DL-Alanina, 2-metilalanina, L-asparagina e glutamato monossódico em uma concentração de 1,1 mol.L⁻¹. Para a incorporação das NpsAu com os aminoácidos, realizou-se a mistura das duas soluções, nas proporções desejadas, conforme a Tabela (2).

Tabela (2): Identificação das amostras para cada porcentagem em massa de NpAu utilizada.

Dosímetros (% massa)	NpAu (% massa)	Identificação das amostras
100,00	0,00	0% NpAu
99,90	0,10	0,1% NpAu
99,50	0,50	0,5% NpAu
99,00	1,00	1% NpAu
97,00	3,00	3% NpAu

Após a mistura, a cor das soluções sofreu pequenas alterações, como observado na Figura (28), atribuídas às diferentes concentrações de nanopartículas de ouro presentes

em cada amostra e à segregação destas. As amostras foram secadas na estufa em uma temperatura de 60 °C até a obtenção de uma estrutura cristalina, posteriormente maceradas para forma de pó, para o armazenamento em cápsulas, como mencionado previamente.

Figura (28): Suspensões coloidais de NpsAu em (a) ala, (b) 2MA, (c) Asn e (d) GMS. A porcentagem em massa de ouro aumenta da esquerda para direita.

Após a mistura das soluções, as técnicas de Espectroscopia UV-Vis e espalhamento dinâmico de luz foram utilizadas para caracterização. As irradiações seguem a mesma descrição no capítulo (3.1.2) com doses de 2 à 100 Gy.

3.4 Técnicas e Caracterização

3.4.1 Medidas de RPE

As amostras foram analisadas através de um espectrômetro de banda-X da marca JEOL, modelo JES-FA 200 (9,5GHz), do Laboratório de Ressonância Magnética Aplicada, do Departamento de Física da FFCLRP-USP. O equipamento possui uma cavidade cilíndrica operando em modo TE011. O espectrômetro opera com campos magnéticos variando de 0 até 500 mT e possui todos os comandos controlados por um

microcomputador com sistema operacional Windows. A Figura (29) mostra o espectrômetro utilizado para aquisição dos espectros de RPE.

A massa de cada amostra era aproximadamente de 80 mg posicionado no centro da cavidade ressonante que corresponde a máxima altura de 1 cm dentro do tubo de quartzo, assegurando assim que toda a amostra esteja dentro do volume ativo do campo ressonante da cavidade de RPE.

Para possíveis repostas de variação da sensibilidade do espectrômetro, medidas de rotina utilizando um padrão de Mn^{2+} foram realizadas, para assegurar a confiabilidade das medidas. Para determinação dos parâmetros espectroscópicos, as medidas de RPE foram otimizadas para prover a melhor resolução espectral do sinal-ruído. Dessa maneira, o espectro foi adquirido em temperatura ambiente à ~ 300 K, como primeira derivada da curva de absorção (Borgonove et al., 2007), e a medida pico-à-pico da amplitude do sinal (A_{pp}) da linha central do espectro, usando o primeiro máximo e o segundo mínimo, era usado como parâmetro da dependência da dose proveniente do amostra (Alexandre; Baffa; Nascimento O., 1992).

Figura (29): Espectrômetro de banda-X da marca JEOL, modelo JES-FA 200 (9,5GHz), do Laboratório de Ressonância Magnética Aplicada, do Departamento de Física da FFCLRP-USP.

3.4.2 FTIR

Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR do inglês Fourier Transform Infrared) foi realizada com um espectrômetro Bomem MB 100 na região entre 4000 e 400 cm^{-1} . Para isso, foi utilizado o método de pastilhas de KBr, no qual uma pequena quantidade da amostra é misturada com brometo de potássio e prensada até que se obtenha uma pastilha.

3.4.3 Simulação Computacional dos Espectros de RPE

A simulação do espectro de Asn foi realizada usando o programa computacional de simulação da JEOL IsoSimu/FA Version 2.1. A simulação computacional obtida considerava a interação hiperfina isotrópica entre dois radicais livres diferentes localizado em C₂ e C₄ na molécula de Asn e os núcleos de hidrogênios próximos a estes, de forma que as condições empregadas nos parâmetros do software simulado levassem a uma melhor concordância com o espectro experimental observado. O espectro simulado foi reconstruído seguindo três categorias:

1. Posição do sinal (campo magnético ressoante): calculado a partir do valor-g, característica intrínseca de cada espécie, frequência de micro-ondas, e o valor do spin nuclear, como no caso hidrogênio ($S=\frac{1}{2}$).
2. Forma de linha (Gaussiana e Lorentziana): responsável por levar o espectro simulado a ser similar ao espectro experimental.
3. Intensidade relativa do sinal: calculado a partir do número de tipo de núcleo responsável por causar degenerescência (acoplamento hiperfino) e a largura de linha.

A Figura (30) mostra a interface do software, bem como, as caixas de diálogos para inserção de supostos valores; exemplo: número de espécies de radicais), tipo de núcleo, forma de linha, constante hiperfina (A_{ffc}) e o valor de g.

Figura (30): Interface do software de simulação computacional da JEOL IsoSimu/FA Version 2.1.

3.5 Nanodosimetria

3.5.1 Espectroscopia UV-Vis

Para obtenção dos espectros na região do ultravioleta-visível foi utilizado um espectrofotômetro Ultrospec 2100 pro (Amersham Pharmacia). As medidas foram realizadas a partir das soluções adicionadas em uma cela de quartzo com 1 cm de caminho óptico.

3.5.2 Espalhamento Dinâmico de Luz Para

Para medida da distribuição de tamanho de partícula utilizando a técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS do inglês Dynamic Light Scatterig) foi utilizado um sistema Zeta-Sizer (Malvern Instruments). Os dados foram coletados em um ângulo fixo em 90° e comprimento de onda também fixo (633 nm/laser He-Ne). Para realização dessas análises, as soluções foram adicionadas em uma cela acrílica de 1 cm. O algoritmo utilizado como método de análise foi o NNLS (Non-Negative Least Squares), que encontra o melhor ajuste por mínimos quadrados. Tal método, consiste em análise de alta resolução, sendo muito eficiente para analisar misturas.

Para as medidas de RPE, seguimos as mesmas descrições dos procedimentos do capítulo 3 (3.4.1).

Capítulo 4: Resultados e Discussão

Neste capítulo serão apresentados os primeiros resultados para o objetivo proposto dessa dissertação, verificar se a Asn é sensível a radiação ionizante e a sua viabilidade para uso dosimétrico. Para isso, a otimização dos parâmetros espectroscópios foram os primeiros passos desse trabalho, tais como, a dependência do sinal com a potência de micro-ondas e a amplitude de modulação.

O estudo desses parâmetros tem como objetivo principal a otimização da relação da razão do sinal-ruído (S/R) e o aumento da sensibilidade do sinal dosimétrico. Para isso, uma amostra de asparagina foi irradiada com uma dose de 100 Gy, espectro da Figura (31). A amplitude do sinal pico-à-pico foi normalizada pela massa da amostra para análises quantitativas. Para estes estudos foram utilizados e mantidos constantes os parâmetros da Tabela (3).

Tabela (3): Parâmetros utilizados para o estudo de potência e modulação.

Campo central	342 mT
Varredura do campo	1,5 mT
Ganho	2000
Tempo	2 minutos
Constante de tempo	0.3 segundos
Número de varreduras	5

Figura (31): Espectro de RPE de L-asparagina irradiado com uma dose de 100 Gy para obtenção dos parâmetros espectroscópicos.

4.1 Estudos dos Parâmetros Espectroscópicos

4.1.1 Potência de Micro-ondas

Na Figura (32) é mostrado o perfil da dependência do sinal em função da potência de micro-ondas; a amplitude do sinal crescerá em uma proporção direta com a raiz quadrada da micro-ondas recebido pela amostra. Entretanto, essa relação é apenas obedecida para certos níveis de potência, acima disso o nível da intensidade tende a um decréscimo, ocorrendo a saturação do sinal que reduz a absorção das micro-ondas, pelo qual probabilidade de transição do spin é diretamente proporcional.

A amplitude do sinal aumenta com o aumento da potência no intervalo de 0,1-3 mW. Portanto, acima de 3mW a intensidade do sinal diminui, sugerindo a saturação do sinal e um longo tempo de relaxação, que leva a um estado de spin-up superpovoado.

Portanto, a otimização da potência de micro-ondas deveria ser escolhida dentro de um regime linear para evitar distorções do espectro. Visando uma alta relação sina-ruído, a potência de 2 mW foi escolhida porque corresponde à potência que leva à maior intensidade do sinal.

Figura (32): Amplitude pico-à-pico do sinal de RPE em função da raiz quadrada da potência de micro-ondas. O sinal possui uma linear tendência com o aumento da potência a partir de 0.25mW à 2.0mW e satura para valores acima de 3mW.

4.1.2 Amplitude de Modulação

A dependência do sinal em função da amplitude de modulação é vista na Figura (33 a). As medidas empregadas estavam dentro de um intervalo de 0.2 a 2.0mT. A amplitude do sinal também aumenta com a modulação. Altos valores de modulação podem distorcer as linhas individuais no espectro. O crescimento do sinal torna-se visível a partir de 0.4mT e tende a saturação em 2.0 mT. Uma vez mais, a relação sinal-ruído é mais relevante para propósitos dosimétricos do que a definição do espectro. Como retratado na Figura (33b). O aumento da amplitude de modulação leva ao alargamento das linhas de RPE, entretanto a intensidade é maximizada. Portanto, dentro do regime

linear, o valor de 1.0 mT, foi escolhido por produzir uma boa intensidade do sinal sem comprometer a resolução do espectro.

Figura (33): (a) Amplitude pico-à-pico do sinal de RPE em função da amplitude de modulação mostrando um aumento da intensidade do sinal a partir de 0.4mT à 1.0mT e uma saturação em 2.0 mT. (b) Aumento da sensibilidade do sinal com a otimização da amplitude de modulação.

Portanto, a fim de fornecer uma otimização dos parâmetros espectroscópicos em relação ao sinal-ruído, adotamos uma potência de micro-ondas de 2mW e uma amplitude de modulação de 1mT para fins dosimétricos descritos nas próximas etapas.

4.2 Estudo dos Radicais

Na maioria dos amino ácidos o radical estabilizado a uma temperatura de 295 K é formado a partir do processo de deaminação ou por uma abstração do átomo de hidrogênio de um carbono, ou então, em outro átomo de C do lado da cadeia (Saxebol Gunnar, 1975). Dentro desse contexto, se prevê que os possíveis radicais induzidos na molécula da L-asparagina seja associado a quebra do grupo NH_2 .

Para uma correta determinação /identificação dos possíveis radicais induzidos pela radiação ionizante, a distorção do espectro de RPE deve ser evitada. Nesse contexto, os valores dos parâmetros espectroscópicos tais como, potência de micro-ondas e amplitude de modulação foram otimizados, como descrito na Tabela (4) para que a resolução das linhas espectrais fosse maximizada.

Tabela (4): Parâmetros utilizados para o estudo dos radicais livres induzidos pela radiação ionizante.

Potência Micro-ondas	0,2 mW
Amplitude de Modulação (espectroscopia)	0,2 mT
Amplitude de Modulação (dosimetria)	1,0 mT
Ganho	2000x
Tempo	4 min.
Constante de tempo	0.3 seg.
Número de varreduras	100 scans

Na Figura (34), o espectro de RPE da Asn fornece um espectro com pelo menos oito linhas espectrais com maior resolução exibindo um complexo sinal com várias linhas de RPE superpostas, sugerindo que pelo menos mais de uma espécie de radical poderia ser formado durante a irradiação. Os fatores g encontrados para os picos são: 2.440, 2.032, 2.023, 2.015, 2.09, 2.003, 1.997, 1.988 para S_1 , S_2 , S_3 , S_4 , S_5 , S_6 , S_7 e S_8 linhas. O pico mais intenso está localizado no centro de sinal do espectro de RPE em 2.023 para S_3 (Figura 34). Por essa razão, foi também realizada uma investigação sobre a natureza desses possíveis radicais induzidos por raios-X através das técnicas de espectroscopia vibracional e simulação computacional.

Figura (34): Espectro de RPE da Asn com baixa modulação e potência de micro-ondas para resolução das linhas espectrais.

4.2.1 Espectroscopia Vibracional Espectroscopia

Para obter alguma evidência experimental sobre os possíveis radicais induzidos pela radiação ionizante, recorreu-se a espectroscopia por FTIR em uma tentativa de identificá-los, uma vez que essa técnica fornece uma informação em relação aos grupos funcionais presentes. Em nossa hipótese, esperávamos uma redução da intensidade das bandas de FTIR relacionadas com as quebras proporcionadas pela radiação ionizante quando comparadas com uma amostra de L-asparagina não irradiada. Nesse cenário, ao observarmos a redução da intensidade das bandas da molécula de L-asparagina, poderíamos assim, evidenciar experimentalmente quais são os possíveis grupos que são quebrados ou abstrações causadas pela radiação ionizante. A Figura (3) mostra uma análise comparativa entre os espectros de amostras de L-asparagina irradiada com dose de 2 kGy e não irradiada.

Figura (35): Espectro de FTIR de uma amostra irradiada e não irradiada de L-asparagina.

Os diferentes grupos funcionais presentes na Asn foram identificados e confirmados pelo espectro de FTIR. O espectro vibracional da Asn não irradiado está de acordo com os espectros de FTIR encontrados na literatura (Kathiravan; Sathiskumar; Balakrishnan, 2013; Sylvestre et al., 2014). Entretanto, não houve nenhuma diferença significativa entre o espectro de FTIR irradiado e não irradiado. A única possível diferença é uma pequena redução da intensidade relativa encontrada em 1650-1529 cm^{-1} , que está associada ao movimento tesoura (dobramento angular) de NH_2 (Figura 35). Essa redução da intensidade é, portanto, pequena para ser confiável, e uma investigação mais profunda deverá ser feita para identificação das espécies dos radicais formados. Qual outra ferramenta poderia ser capaz de fornecer uma resposta sobre a natureza dos radicais livres induzidos?

As bandas associadas ao grupo NH_3^+ foram encontradas entre os intervalos em 3601-3462 cm^{-1} , 1584-1523 cm^{-1} , e para o grupo NH_2^+ em 3500-3420 cm^{-1} e 1650-1529 cm^{-1} respectivamente. Tais intervalos são as combinações de estiramentos simétricos e assimétricos. O grupo COO^- foi encontrado sob forma dissociada entre um intervalo em 1740-1660 cm^{-1} , banda relacionada ao estiramento simétrico.

O estiramento assimétrico devido ao grupo CH_2 aparece dentro do intervalo em $3000\text{-}2900\text{ cm}^{-1}$. O grupo C-N aparece em 831 cm^{-1} devido ao movimento tesoura, e o grupo C-N em 558 cm^{-1} à rotação. As atribuições dos modos fundamentais de vibração devido aos grupos NH_2^+ , NH_3^+ , COO^- , CH_2 , e OH^- foram marcadas e os resultados estão resumidos na Tabela (5).

Tabela (5): Modos fundamentais de vibração da asparagina.

Número de onda cm^{-1}	Atribuições
558	C-C-N (rotação)
597	C-C-O (rotação)
671	O-H-O
802	C-C (estiramento)
831	C-N (estiramento)
915	H-O-C-O (torção)
1121	H-N-C (rotação)
1400	H-C-H (rotação)
1584-1523	NH_3^+ (tesoura assimétrica)
1650-1529	NH_2^+ (tesoura assimétrica)
1681	C-O (estiramento)
1740-1660	COO^- (estiramento)
3000-2900	CH_2 (tesoura assimétrica)
3115	O-H (estiramento)
3420-3340	NH_2^+ (estiramentos simétrico)
3500-3420	NH_2^+ (estiramentos assimétrico)
3601-3462	NH_3^+ (estiramentos assimétrico)

Como a espectroscopia por FTIR não foi suficientemente sensível, não viabilizou a identificação dos radicais livres produzidos em Asn irradiados com raios-X, evidenciando a necessidade de utilização de outro método de identificação. Portanto, a fim de responder à questão proposta acima, a simulação computacional do espectro de RPE a partir de parâmetros otimizados para fins espectroscópicos, e não dosimétricos, obtidos experimentalmente torna-se uma outra ferramenta para esse propósito.

4.2.2 EPR Simulação Computacional

O espectro de simulação computacional considerou uma interação isotrópica hiperfina com os núcleos de hidrogênios vizinhos do elétron desemparelhado. Como ponto de partida, simulou-se o resultado do espectro de RPE relativo a dois possíveis radicais livres a partir da quebra dos dois NH_2 na molécula de L-asparagina, produzidos sobre a irradiação de raios-X, como visto na Figura (36).

Figura (36): Estrutura molecular e formação dos radicais livres induzidos em L-asparagina pela radiação ionizante.

A quebra dos dois grupos NH_2 localizada no carbono C₄ formaria as três linhas identificadas como Radical I (C₄) devido interação hiperfina com dois núcleos de hidrogênios vizinhos, e o Radical II (C₂) composto por cinco linhas devido a interação hiperfina do elétron desemparelhado com os quatro núcleos de hidrogênios vizinhos como descrito no esquema na Figura (37). A superposição dos espectros simulador a

partir do Radical I e Radical II resulta em um espectro de RPE como mostrado na (Figura 37), apresentando uma boa concordância com o espectro experimental.

Figura (37): (a) Radicais livres simulados, formados a partir da quebra dos dois grupos NH_2 . (b) Os hidrogênios demarcados representam os núcleos vizinhos que possivelmente interagirão com o elétron desemparelhado a partir de uma interação hiperfina. A superposição dos espectros simulados produzidos pelos Radicais I e II mostrando ser similar ao espectro experimental.

Os parâmetros utilizados para a simulação do espectro de RPE estão sumarizados na Tabela (6).

Tabela (6) Interações isotrópica hiperfinas com núcleos de hidrogênio (spin $1/2$).

Interações Isotrópica Hiperfinas		
Parâmetros ($1/2$)	Radical I	Radical II
Frequência [MHz]	9500,000	9500,000
Largura da varredura [mT]	100	100
Razão Lorentziana	100	100
Largura de linha [mT]	2,700	1,500
Valor de g	2,0021	1,9995
Centro do sinal	339.0200	339.4600
Intensidade	85,0	65,0
Spin nuclear 1	0,940	0,200
Spin nuclear 2	4,890	6,000
Spin nuclear 3		2,100
Spin nuclear 4		1,780

O espectro simulado final é resultante da superposição dos espectros produzidos pelos Radicais I e II como proposto nesse trabalho, entretanto, para uma correta afirmação de sua similaridade com o espectro experimental, uma comparação entre o espectro experimental e simulado foi empregada, como mostra na Figura (38).

Figura (38): Superposição do espectro de RPE dos radicais I e II obtidos pela simulação computacional. O espectro experimental é também mostrado para propósitos de comparação.

O espectro simulado mostra uma boa concordância com o espectro experimental de Asn, concordando assim com a hipótese proposta nesse trabalho. Entretanto, o espectro simulado sugeriu a quebra dos dois grupos amina nos lados diferente da cadeia, e não a descarboxilação em C₂, como previamente reportado na literatura (Strzelczak et al., 2006).

Uma possível descarboxilação, como sugerido por Strzelczak et al (Strzelczak et al., 2006), poderia resultar em uma interação hiperfina do elétron desemparelhado com os núcleos de hidrogênio vizinhos e também com o núcleo de nitrogênio. Seguindo essa lógica, nos simulamos também um espectro de RPE dos radicais livres considerando uma descarboxilação e uma deamidação, bem como a influência do núcleo de nitrogênio.

A Figura (39) esquematiza a quebra do grupo carboxílico localizado em C₂, considerando uma interação hiperfina com os três núcleos vizinhos de hidrogênio juntamente com o núcleo de nitrogênio. Os parâmetros utilizados para a simulação do espectro de RPE estão sumarizados na Tabela (7).

Tabela (7): Interações isotrópica hiperfinas considerando três núcleos de hidrogênio (spin $1/2$) e a influência do núcleo de nitrogênio (spin 1).

Interações Isotrópica Hiperfinas		
Parâmetros ($1/2 / 1$)	Radical I	Radical II
Frequência [MHz]	9500.000	9500.000
Largura da varredura [mT]	100	100
Razão Lorentziana	100	100
Largura de linha [mT]	2.700	1.100
Valor de g	2.00211	1.99952
Centro do sinal	339.0200	339.4600
Intensidade	85	60
Spin nuclear 1 ($1/2$)	0.940	0.200
Spin nuclear 2 ($1/2$)	4.890	6.000
Spin nuclear 3 ($1/2$)		2.100
Spin nuclear 4 (1)		9,00

Figura (39): (a) Esquema com a estrutura molecular e formação dos radicais livres induzidos em L-asparagina pela radiação ionizante considerando uma descarboxilação e uma deamidação. Os radicais induzidos a partir grupo carboxílico localizado em C₁ e grupo amino localizado em C₄, respectivamente. A partir da quebra do grupo carboxílico, o espectro simulado foi obtido considerando uma interação hiperfina devido ao elétron desemparelhado com três núcleos de hidrogênio vizinhos, e também com o núcleo de nitrogênio representado pelas linhas demarcadas, formando três linhas adicionais no espectro de EPR. (b) Para a deamidação os dois hidrogênios demarcados representam núcleos vizinhos que interagem com o elétron desemparelhado pela interação hiperfina aparecendo as três linhas. (c) O espectro resultante pela superposição dos dois radicais é muito diferente do obtido experimentalmente e do espectro simulado seguindo de duas quebras do grupo NH₂.

Além da interação dos quatro núcleos vizinhos de hidrogênio e a influência do nitrogênio considerando uma descarboxilação, uma outra possível interação poderia ser agora com mais dois núcleos vizinhos de hidrogênios extras localizado em C₃, somando ao total, cinco núcleos de hidrogênio, mantendo ainda o núcleo de nitrogênio interagindo com o sistema. Para essa segunda possível interação, também foi simulado o espectro de RPE como mostra a Figura (40). Os parâmetros utilizados para a simulação do espectro de RPE da condição considerada está sumarizado na Tabela (8).

Tabela (8): Interações isotrópica hiperfinas considerando seis núcleos de hidrogênio (spin $1/2$) e a influência do núcleo de nitrogênio (spin 1).

Interações Isotrópica Hiperfinas		
Parâmetros ($1/2$ / 1)	Radical I	Radical II
Frequência [MHz]	9500.000	9500.000
Largura da varredura [mT]	100	100
Razão Lorentziana	100	100
Largura de linha [mT]	2.700	1.100
Valor de g	2.00211	1.99952
Centro do sinal	339.0200	339.4600
Intensidade	85	60
Spin nuclear 1 ($1/2$)	0.940	0.200
Spin nuclear 2 ($1/2$)	4.890	6.000
Spin nuclear 3 ($1/2$)		2.100
Spin nuclear 4 ($1/2$)		1.780
Spin nuclear 5 ($1/2$)		2.000
Spin nuclear 6 (1)		9,00

Figura (40): (a) Esquema de formação de radicais livres a partir da quebra do grupo carboxílico e amino na estrutura molecular da L-asparagina pela radiação ionizante considerando a influência do nitrogênio devido à interação hiperfina. (b) A segunda possibilidade poderia ser a interação hiperfina devido ao elétron desemparelhado (localizado em C₂) com os três hidrogênios vizinhos demarcados, além dos dois hidrogênios vizinhos próximos a partir da descarboxilação. A quantidade de linhas para o espectro simulado é similar ao espectro simulado com quatro hidrogênios vizinhos, exceto devido à intensidade das linhas de ressonância, neste caso mais intensas. Mantendo a deamidação em C₄, o espectro simulado permanece o mesmo, com três linhas. (c) Mais uma vez, a superposição desses dois possíveis radicais induzidos é muito diferente do espectro experimental de RPE da L-asparagina.

O espectro de RPE simulado do radical livre produzido considerando uma descarboxilação localizado em C₂ possui linhas adicionais devido a uma interação hiperfina extra com o núcleo de nitrogênio ligado em C₂. Portanto, o espectro simulado difere em grande quantidade em relação ao experimental, sugerindo então, que a descarboxilação em C₂ não é realmente o que acontece.

Baseado em nosso resultado experimental e dados simulados, propõe-se duas quebra do grupo NH₂, localizado em C₄ e em C₂ na molécula de Ans, ao contrário de uma deamidação em C₄ e uma descarboxilação em C₁, como previamente reportado (Strzelczak et al., 2006). Deve-se notar que nenhum desses estudos relatados anteriormente são experimentalmente comparáveis ao nosso trabalho. Knudtsen et al (Knudtsen et al., 2014), por exemplo, irradiou as amostras em uma temperatura de 275 K e as leituras de RPE foram feitas a uma temperatura de 240 K. Devido à baixa temperatura pelo qual foi exposta durante à irradiação e as leituras de RPE, é possível que diferentes radicais livres fossem produzidos.

O trabalho conduzido por Close et al (Close DM, 1977) é de difícil comparação porque os parâmetros das medidas não foram descritos. O espectro obtido em nosso trabalho é na verdade similar ao reportado por Strzelczak et al (Strzelczak et al., 2006), exceto pela diferença relativa na intensidade da linhas de RPE, provavelmente devido ao fato de que a irradiação ocorreu em nitrogênio líquido, assim sendo, modificando a razão da concentração relativa e o tipo de radicais induzidos pela radiação ionizante.

Portanto, acredita-se que a quebra dos dois grupos NH₂, como aqui proposto, produz radicais estáveis quando a irradiação e as leituras de RPE ocorrem em temperatura ambiente.

4.3 Estabilidade dos Radicais I e II

A estabilidade do radical livre induzido pela radiação ionizante é uma propriedade importante a ser determinada. Neste contexto, a L-asparagina foi monitorada desde os primeiros dias até 6 meses após o final da irradiação (Figura 41). Nenhum decaimento detectável do sinal de RPE foi observado neste período, revelando que os radicais I e II são estáveis em temperatura ambiente por tempos relativamente longos. Deve-se notar que esse longo tempo de vida das espécies radicais identificadas é observado apenas em amostras sólidas. Em meio aquoso, é mais provável que a

recombinação aconteça, e os tempos de vida dos radicais livres sejam muito mais curtos, dificultando leitura do espectro de RPE.

Figura (41): Tempo de estabilidade da intensidade do sinal dosimétrico de RPE.

Com uma compreensão mais completa dos radicais livres produzidos na asparagina sob irradiação com raios- X e sabendo-se que estes radicais livres são estáveis à temperatura ambiente, é importante verificar todas as aplicações tecnológicas possíveis que este conhecimento poderia providenciar.

Além de permitir a identificação das espécies de radicais, a espectroscopia RPE também permite a quantificação desses radicais livres. Como já mencionado, em alguns aminoácidos, como a alanina, a concentração de radicais livres induzidos pela radiação é linearmente dependente da dose de radiação à qual a amostra foi previamente exposta.

Portanto, uma potencial aplicação de radicais livres paramagnéticos em aminoácidos irradiados é a sua utilização para detecção de radiação e dosimetria por meio de espectroscopia RPE.

4.4 Caracterização Dosimétrica

Para estabelecer um dado material como um bom dosímetro de radiação para RPE, é necessário investigar suas propriedades dosimétricas, tais como linearidade com a dose administrada, dependência de energia, dependência da taxa de dose e estabilidade do sinal de RPE. Como discutido no capítulo 4 (4.1.1, 4.1.2), os parâmetros espectroscópicos otimizados para as medidas de RPE foram 0,2 mW para potência de micro-ondas e 0.2 mT para amplitude de modulação. Entretanto, para fins dosimétricos, a relação sinal-ruído é mais relevante do que a resolução espectral, e as distorções espectrais são toleradas desde que a intensidade do sinal-ruído seja melhorada (Guidelli; Lima; Baffa, 2018b). Para esse fim, nós adotamos os parâmetros otimizados de 2 mW para potência de micro-ondas e 1 mT para amplitude de modulação. As principais propriedades dosimétricas foram avaliadas para Asn como segundo passo desse trabalho, descritas nas próximas sessões.

4.4.1 Dose-Resposta

Um bom dosímetro deve apresentar linearidade, possuindo uma sensibilidade adequada no intervalo de dose absorvida e, assim, oferecendo uma resposta linear dentro dos limites estabelecidos (Borgonove et al., 2007). A Figura (42) mostra a curva de dose-resposta para L-asparagina na faixa de 2 a 30 Gy. A incerteza das medições é inferior a 5% e corresponde a três desvios padrão com 9 varreduras de acumulação cada.

A dependência da intensidade do sinal RPE mostra uma boa curva dose-resposta linear no intervalo de dose considerado, com um coeficiente de correlação $R^2 = 0,996$. Essa boa linearidade, juntamente com a sensibilidade para esta faixa de dose de radiação, torna Asn um potencial detector para aplicações médicas, como avaliação de dose em tratamentos de radioterapia.

Figura (42): Curva de dose-resposta de L-asparagina como função da dose absorvida da radiação ionizante no intervalo de 2 a 30 Gy.

4.4.2 Mínima Dose Detectável

A mínima dose detectável, representa a dose que produz um sinal RPE igual ao valor médio do sinal de dose zero mais três desvios padrão (Brai et al., 2007). Em outras palavras, a mínima dose detectável representa a menor dose capaz de produzir um sinal dosimétrico que é significativamente diferente do sinal de fundo de uma amostra não irradiada. A Figura (43) mostra o sinal de uma amostra não irradiada em comparação com amostras irradiadas na faixa de 0 a 1,5 Gy. Para esse estudo o ganho foi aumentando de um fator 5 em relação aos espectros com dose na faixa de 2 a 30 Gy, para se registrar o sinal dosimétrico. Vale ressaltar que nenhum sinal de ESR é detectado para a amostra não irradiada, e um sinal de RPE pode ser detectado para amostras irradiadas com doses tão baixas quanto 0,1 Gy.

Figura (43): Curva de dose-resposta para mínima dose detectável no intervalo de 0-1,5 Gy.

4.4.3 Dependência Energética

Dosímetros baseados em aminoácidos são de especial interesse para aplicações médicas. Nesse cenário, diferentes sistemas terapêuticos usam fontes de diferentes energias de radiação. Portanto, é importante verificar se diferentes qualidades de energia acarretam em diferentes espécies de radicais, ou produzem quantidades diferentes de radicais livres. Além disso, em termos de dosimetria de radiação, a dependência energética deve ser estudada em uma ampla faixa de energia para evitar a introdução de erros sistemáticos na avaliação da dose (Davidson; Jordan, 2009). Usualmente, $^{60}\text{Co-}\gamma$ (cerca de 1,25 MeV) é usado como feixe de referência (Davidson; Jordan, 2009), e a resposta dosimétrica para outros fótons de energia é normalizada pela resposta ao feixe de $^{60}\text{Co-}\gamma$ (Borgonove et al., 2007; Guidelli et al, 2012).

No entanto, por razões de segurança, as fontes ^{60}Co - γ estão sendo substituídas por aceleradores lineares. Portanto, estudamos a dependência energética de L-asparagina e L-alanina irradiada com dois tipos diferentes de feixes, 6 MV e 80 KV, e com doses de 2 Gy a 12 Gy, como visto na Figura (44).

Figura (44): Curva de dose-resposta para os dosímetros de L-asparagina e L-alanina irradiados com diferentes qualidades de energia (80 KV e 6 MV).

A dependência energética dos materiais foi analisada utilizando os coeficientes angulares das curvas normalizadas para 6 MV (Borgonove et al., 2007). A incerteza associada a cada ponto de dose é o desvio padrão de três leituras dos dosímetros com 7 varreduras de acumulação. Os valores dos coeficientes angulares são especificados na Tabela (8), assim como a razão (80 KV / 6 MV) e o coeficiente de correlação (R^2).

Tabela (8): Parâmetros da regressão linear

Dosímetro	Qualidade de Feixe	Coefficiente Angular	R ²	Razão das Inclinações (80 KV/6 MV)
L-alanina	80 KV	11.55816 ± 0.31	0.996	0.729
	6 MV	15.8436 ± 0.48	0.995	
L-asparagina	80 KV	1.30849 ± 0.073	0.984	0.700
	6 MV	1.86804 ± 0.075	0.992	

Em resumo, as curvas de dose-resposta para ambas as qualidades de feixe foram lineares ao longo do intervalo de dose estudado. A dependência energética foi de 27% e 30% para L-alanina e L-asparagina, respectivamente. A resposta do dosímetro de alanina é independente de energia para fótons acima de 100 KeV (Chen; Nicolucci; Baffa, 2008), embora para fótons de baixa energia de 100 KeV uma diminuição significativa na resposta tenha sido medida cerca de 40% em relação à energia de ⁶⁰Co (Regulla; Deffner, 1982b; Zeng; MC Caffrey, 2005; Waldeland et al., 2010; Guidelli et al., 2012a; Fleeson et al., 2017).

Nossos resultados em relação à alanina concordam com os dados relatados na literatura. Portanto, a L-asparagina mostra uma dependência energética comparável à L-alanina. Além disso, a inserção na Figura (44) revela que não há diferença entre os espectros de RPE da asparagina irradiada com diferentes energias de fótons, sugerindo que os mesmos radicais livres são produzidos para os diferentes feixes, mas em quantidades diferentes.

4.4.4 Taxa Dose

A influência da taxa de dose na produção de radicais livres foi estudada pela irradiação de L-asparagina com fótons de 6 MV e 551,5 cGy usando taxas de dose média variando de 100 a 600 cGy / min (Figura 45). A intensidade do sinal de RPE foi a mesma para todas as taxas de dose testadas, revelando que a produção / concentração de radicais livres não depende da taxa de dose.

Figura (45): Um gráfico da dependência da taxa de dose do sinal RPE da L-asparagina.

4.5 Estudo e Caracterização dos NpAu nos Dosímetros/Ouro

4.5.1 Espectroscopia UV-Vis

A espectroscopia UV-Vis pode ser usada como um método simples e confiável para monitorar a estabilidade de soluções de NpsAu. Além de identificar a formação de NpsAu é possível também estimar sua forma a partir de bandas específicas de absorção. Para Nps esféricas de ouro, por exemplo, o pico de absorção parece em torno de 515 nm (Sun, H. M.; Gao, Z. W.; Gao, L. X.; Hou, 2011) (Parab, H.; Jung, C.; Woo, M. A.; Park, 2013). Os espectros UV-Vis obtidos com diferentes porcentagens em massa de ouro para os diferentes materiais, encontram-se na Figura (46). Esse pico de absorção está relacionado ao movimento coletivo dos elétrons de condução na superfície da nanopartícula metálica, denominado como pico de absorção plasmônica.

Figura (46): Espectros UV-Vis das soluções coloidais de ouro suspensas em com diferentes porcentagens em massa de ouro e suspensas em soluções de (a) ala; (b) 2MA; (c) Asn e (d) GMS.

O surgimento dos picos de absorção ocorre pelo movimento oscilatório dos elétrons livres das nanopartículas metálicas à medida que um campo luminoso atravessa uma partícula. Isso porque o tamanho dessas partículas metálicas é muito menor que o comprimento de onda da luz, e, portanto, os elétrons livres em sua superfície irão sofrer a ação do campo elétrico da onda transiente direcionado no sentido contrário ao campo elétrico do qual estão sendo submetidas momentaneamente (Khlebtsov, 2008), como mostra a Figura (47).

Figura (47): Oscilações dos elétrons na superfície das nanopartículas metálicas, conhecida com banda de oscilação plasmônica.

A intensidade do pico de absorção plasmônica é proporcional à concentração de NpsAu, e o tamanho das partículas está relacionada com o comprimento de onda do pico de máxima absorção. A largura à meia altura (FWHM) relaciona-se com a distribuição de tamanho das partículas (I. Medina-Ramirez, 2009). É possível notar que os picos plasmônicos mantêm o mesmo padrão para todas as porcentagens em massa de ouro para alanina e 2-metil-alanina, não havendo deslocamentos e aumento da largura a meia altura indicando que nas soluções de ambos os aminoácidos as nanopartículas de ouro são estáveis e não mudam de forma e/ou tamanho ao interagir. A Figura (29 a, b), que mostra a suspensão coloidal das NpAu em alanina e 2-metil-alanina para diferentes porcentagens em massa de ouro, evidencia a estabilidade das NpsAu, pois mantém a coloração original após a inserção da NpsAu. As pequenas alterações na intensidade da cor são atribuídas as diferentes concentrações de NpsAu presentes em cada amostra.

Entretanto, para asparagina e para o glutamato monossódico é observado um comportamento diferente, visto que houve, para todas as porcentagens em massa de ouro, um deslocamento e um aumento da largura à meia altura da banda de ressonância plasmônica para as NpAus suspensas em soluções aquosas desses aminoácidos. Essas alterações são também observadas pela coloração das amostras (Figura 29 c, d). A coloração roxa significa uma possível agregação das NpsAu na presença desses aminoácidos. Portanto, o espectro eletrônico exibe uma nova banda em aproximadamente

em 700 nm (Figura 47 c, d). Essa banda em 700 nm resulta da interação entre partículas adjacentes, devido à maior proximidade das NpAus em agregados, gerando ressonâncias em energias menores (Guidelli; Ramos; Baffa, 2016) (Figura 48).

Figura (48): Esquema ilustrando o acoplamento plasmônico, quando duas ou mais partículas se aproximam o suficiente uma da outra, bem como sua contribuição para agregação.

De acordo com a teoria DLVO desenvolvida por Derjaguin, Landau, Verwey, e Overbeek (Everett D.H., 1988), a estabilidade de uma suspensão coloidal é determinada pelo balanceamento entre interação eletrostática e a interação de van der Waals entre as partículas. A estabilidade pode ser compreendida em termos da variação de energia livre em função da distância de separação das partículas em um sistema, isso porque partículas em nanoescala possuem energia livre interfacial muito grande devido à enorme razão superfície/volume (Everett D.H., 1988). Assim sendo, a estabilidade de um sistema coloidal é determinada pela soma das forças atrativas de van der Waals e das forças repulsivas das camadas elétricas existente entre os nanocompósitos. A teoria DLVO pode ser descrita pela seguinte equação (30):

$$V_T = V_A + V_R \quad (30)$$

Sendo,

V_T representa a energia potencial total; V_A e V_R as contribuições associadas em função das forças atrativas e repulsivas entre as partículas respectivamente. Os valores de V_A e V_R são dados pelas seguintes equações:

$$V_A = -\frac{aA_H}{12D} \quad (31)$$

$$V_R = 2\pi\epsilon_0 \epsilon a\zeta^2 e^{-KD} \quad (32)$$

No caso da equação (32), A_H é a constante de Hamaker, a é o raio da partícula e D é a distância entre partículas, ϵ_0 é a permissividade no vácuo, ϵ é a constante dielétrica do meio, $\frac{1}{K}$ é espessura da dupla camada elétrica e depende da força iônica do meio e ζ é o potencial zeta.

Quando duas partículas de mesma natureza estão em sistema coloidal contendo água e outro solvente, a força atrativa de van der Waals dependerá da natureza da partícula e do solvente, como também da distância entre as partículas, mas independe da carga das partículas, do pH do meio e da concentração de eletrólitos na solução.

Entretanto, as forças repulsivas, resultante da interação entre as duplas camadas elétricas com cargas superficiais idênticas, dependem da distância entre as partículas, do potencial de superfície, do pH e do solvente (Adamson A. W., 1976). Por fim, o que determina se um sistema coloidal é estável ou sofre agregação, é uma barreira de energia resultante a partir da combinação das forças atrativas e repulsivas. Por exemplo, se as partículas possuírem uma repulsão suficientemente alta, a dispersão resistirá à agregação e o sistema coloidal será estável. No outro extremo, se as partículas colidem com energia suficiente para superar essa barreira, a força atrativa prevalecerá a ponto de ocorrer uma forte adesão, que pode ser irreversível (Myers, 1999).

Portanto, mediante as informações citadas acima, uma investigação foi efetuada para compreender qual força estaria atuando sobre o sistema coloidal da asparagina e glutamato monossódico. Nesse contexto, ao analisar as quantidades de fatores que podem influenciar o sistema, a priori, a força repulsiva foi escolhida, devido a dependência do pH e do solvente em que estão suspensas as NpsAu. A partir disso foi analisado o pH da solução de NpAu, bem como a solução pura dos aminoácidos e, para as diferentes porcentagens de massa de NpAu. Na Tabela (9) estão sumarizados os pHs para os diferentes materiais para as diferentes porcentagens em massa de NpAu. As soluções contendo os materiais foram preparadas tendo como solvente água Mili-Q (pH=9,0) em uma concentração de $2,5 \text{ g L}^{-1}$, o pH das NpsAu era de 7,0.

Tabela (9): Valores do pH para os diferentes materiais para as diferentes porcentagens de massa de NpAu.

Valores de pH					
Materiais	Solução Pura	0,1% NpAu	0,5% NpAu	1,0% NpAu	3,0%NpAu
Ala	7,6	6,6	7,0	7,9	7,1
2MA	7,2	7,4	7,1	7,2	7,6
GMS	6,8	6,1	7,0	7,0	7,0
Asn	4,3	4,2	4,1	4,2	4,2

É notável perceber que, para os aminoácidos alanina e 2-metil-alanina não houve mudanças consideráveis dos valores do pH, tanto na solução pura, quanto para variação da porcentagem em massa de NpAu. Consequentemente, as suspensões mantiveram-se estáveis para todas as variações de porcentagem de NpAu.

Essa neutralidade do pH pode ser compreendida a partir da desprotonação do grupo carboxílico desses aminoácidos, o que promove neutralização do solvente. Isso ocorre porque a alanina e a 2-metil-alanina são zwitterions. Assim os grupos funcionais desses aminoácidos podem atuar tanto como um aceitador ou um doador de próton de acordo com o pH do meio em que se encontram. O ponto isoelétrico da alanina é 6,2 e dessa forma, quando acima do ponto isoelétrico, o grupo carboxílico comporta-se com um ácido, liberando H^+ no meio e ficando com carga negativa sob a forma COO^- . Por outro lado, em um meio com pH abaixo do ponto isoelétrico, comporta-se como uma base aceitadora de elétrons, ficando com o grupo amino protonado na forma NH_3^+ .

O mesmo se aplica para 2-metil-alanina, visto que a diferença entre eles é apenas um grupo metil a mais. O pH do solvente (água Mili-q) era de 9,0, acima do ponto isoelétrico desses aminoácidos, portanto favorecendo a liberação de H^+ na solução, neutralizando-a, e assim, formando uma distribuição equilibrada de cargas, sendo observada pela proximidade do pH neutro. Além de não haver alteração do pH do meio, ocorre uma estabilização estérica com as Nps com uma provável interação do grupo amina da alanina com a superfície das nanopartículas metálicas, tornando-as mais estáveis (Guidelli et al., 2012b).

Entretanto, na asparagina, na qual ocorre agregação, é observado que o pH tende a valores ácidos. Assim como todo aminoácido, a asparagina também é um zwitterion, e seu ponto isoelétrico é 5,41. Como previsto teoricamente o grupo carboxílico da asparagina comporta-se como um ácido, liberando H^+ isso porque o pH do meio está acima do seu ponto isoelétrico. Um ponto interessante é que a asparagina poderia interagir de maneira similar como a alanina e a 2-metil-alanina. Em todos os casos teremos espécies protonadas e desprotonadas. No ponto isoelétrico o número de espécies protonadas é igual ao número de espécies desprotonadas. Para pH ácido, o número de espécies protonadas é maior que o número de espécies desprotonadas; para pH alcalino, o número de moléculas desprotonadas é maior que o número de espécies protonadas. Quanto mais extremo o pH, maior a diferença entre o número de moléculas protonadas e desprotonadas. O ponto isoelétrico mais baixo da asparagina faz com ela apresente maior desprotonação, liberando H^+ no meio alterando de forma mais significativa o pH da solução.

Como reportado anteriormente, as forças repulsivas são dependentes do pH e do solvente. Por sua vez, podemos inferir que a diminuição do pH afeta no equilíbrio das distribuições de cargas na superfície da NpAu, de maneira que passa a interagir com o agente de revestimento, o tetrabohidreto (BH_4^-). O BH_4^- é responsável por manter a carga superficial das NpsAu negativa, entretanto, quando exposto a um pH ácido, a espécie iônica torna-se do tipo BH_3^+ (Zewde et al., 2016) dessa forma, ocorrendo uma falta das interações negativas entre NpsAu, criando um ambiente instável na solução coloidal que levou à agregação das mesmas. como exemplificado na Figura (49).

Figura (49): Desestabilidade da suspensão coloidal na Asn devido a diminuição do pH, promovendo agregação.

Um outro extremo abordado agora, é compreender porque as NpsAu sofreram agregação mesmo com o pH neutro do glutamato monossódico. O glutamato monossódico é um sal do ácido glutâmico contendo dois grupos carboxílicos localizados nas extremidades na cadeia, com um sódio ligado. O ponto isoeletrico do ácido glutâmico é de 4,25, em uma solução com água Mili-q (pH de 9,0) os dois grupos carboxílicos liberariam H^+ na suspensão coloidal de NpAu (Alisa D. Roddick-Lanzilotta. James MC Quillan, 2000), o que promoveria uma diminuição do pH assim como a asparagina. Entretanto não ocorre acidificação no meio, isso se deveria ao fato que o Na^+ , um contra íon (responsável por manter a estabilidade elétrica) presente na molécula faz uma ligação com oxigênio de um dos grupos carboxílicos ao invés de um hidrogênio ligado a oxigênio.

Dessa forma, a ausência do átomo de hidrogênio causada pela interação do Na^+ diminui a quantidade de H^+ liberados em solução e, portanto, não há redução tão significativa do pH. Isso seria uma possível explicação para o valor relativamente neutro do pH da solução de GMS. Porém, não explica a razão da agregação. Um trabalho recente conduzido por Christau S. et al (Christau et al., 2017) observou a formação de agregados quando submeteu a suspensão coloidal de NpAu com sais de sódio (NaF , NaCl e NaBr) (Christau et al., 2017). Isso porque a presença dos sais enfraquece a estabilidade coloidal das cargas negativas estabilizadoras ao redor da partícula, levando assim à agregação irreversível de partículas e à sedimentação (Alkilany, A. M.; Murphy, 2009; Chegel, V.;

Rachkov, O.; Lopatynskyi, A.; Ishihara, S.; Yanchuk, I.; Nemoto, Y.; Hill, J. P.; Ariga, 2012). A conclusão dos autores é que a blindagem proporcionada pelas cargas negativas em torno das NpsAu é desequilibrada por três efeitos específicos, um deles é: íons de ação contrária (ou seja, emparelhamento de íons e adsorção de íons na superfície da NpAu), o que resulta na agregação das partículas (Christau et al., 2017). Em nosso contexto, não estamos utilizando sais de sódio, mas temos um sódio (carga positiva) ligado ao oxigênio (carga negativa), e que é liberado quando o GMS se encontra em solução aquosa (Figura 50).

Figura (50): Ionização do grupo carboxílico e emparelhamento de íons ao redor das NpsAu desestabilizando eletrostaticamente a suspensão coloidal.

Em resumo pode se dizer que a Ala e 2MA não alteram o pH e por isso não afetam a estabilidade das NpsAu. O GMS embora tenha ponto isoelétrico baixo, possui menos H^+ disponível devido a substituição por Na^+ , logo, também não altera o pH drasticamente, como verificado experimentalmente. Por fim, a asparagina tem ponto isoelétrico baixo e tende a liberar mais H^+ , como constatado pelo baixo valor de pH.

4.5.3 Espalhamento Dinâmico de Luz

A distribuição de tamanho de partículas obtidas pela técnica de espalhamento dinâmico de luz revelou uma distribuição de partículas com tamanho médio como mostrado na figura a seguir. Para alanina, uma vez mais não foi identificado nenhuma alteração relevante em relação ao tamanho das partículas devido à interação com as NpsAu. O tamanho médio das NpsAu é de (9 nm.), o que condiz com o que já foi obtido na literatura (Guidelli E.J. Baffa O., 2014b) (Figura 51).

Figura (51): Distribuição de tamanho das NpsAu obtidas pela técnica de espalhamento dinâmico da luz para as diferentes porcentagens em massa de ouro para alanina, 2-metilalanina, asparagina e glutamato monossódico.

Na Figura (51) é visto o mesmo comportamento para a 2-metil-alanina, não havendo alteração do seu tamanho devido à interação com as NpsAu, que apresentaram um tamanho médio de 9 nm. Um estudo também conduzido pelo nosso grupo de pesquisa foi realizado sobre a resposta dosimétrica da 2-metil-alanina com a inserção de NpsAu Wolfe T. et al, 2015 (Wolfe et al., 2015) (o que será abordado nas próximas sessões), entretanto nenhuma caracterização da interação da NpsAu com as moléculas desse

aminoácido foi experimentalmente realizado. Para a asparagina, Figura (51), foi mostrado um crescimento médio do tamanho das partículas devido à interação das NpsAu com as moléculas de asparagina. Os valores médios dos tamanhos variam com o aumento da porcentagem em massa de NpAu, assim como na espectroscopia por UV-vis, evidenciando que a agregação proporcionada pela desestabilidade eletroestática devido ao aumento do tamanho médio das NpsAu.

O mesmo aumento do tamanho médio das NpsAu foi observado para o glutamato monossódico (Figura 51) em comparação com a alanina e a 2-metil-alanina. Assim como a asparagina, o aumento é proporcional a porcentagem em massa da NpsAu, diferindo no valor do tamanho médio.

Portanto, pela técnica DLS, é possível afirmar que a interação das NpsAu com as moléculas de alanina e 2-metil-alanina não promove o crescimento das partículas. Por outro lado, foi observado na asparagina e no glutamato monossódico que a interação das NpsAu promove o crescimento das partículas, provavelmente devido a agregação.

A partir do conjunto das duas técnicas de caracterização, é possível afirmar que para a alanina e 2-metil-alanina, as NpsAu são esféricas, com um diâmetro médio de aproximadamente 9 nm, e são estáveis em tamanho em forma, pois não sofrem alterações morfológicas pelo aumento da porcentagem em massa de NpAu.

4.5 Interação das Nanopartículas de Ouro/Dosímetros

A interação das NpsAu com as moléculas dos aminoácidos ocorre por meio de complexos. Na literatura foi observado a formação de um complexo com a molécula de alanina com a nanopartículas de cobre (Tarallo M. B. C.F. ; Vieira A.J.; Monge E. D.; Leite A. ; Borthagaray C. Q.; Gambino G.; Torre D., 2009). Esse estudo revelou que a via de interação dos átomos de cobre com as moléculas de alanina ocorria através do grupo NH_2 da alanina, resultado constatado devido ao desaparecimento da banda associada à combinação do estiramento simétrico e torção do grupo NH_3^+ ($\approx 2100 \text{ cm}^{-1}$). Além disso, o estudo mostrou a permanência da cristalinidade da alanina mesmo quando essas moléculas não formavam complexos com o cobre (Tarallo M. B. C.F. ; Vieira A.J.; Monge E. D.; Leite A. ; Borthagaray C. Q.; Gambino G.; Torre D., 2009).

Geralmente, o ouro não reage com grupos aminas, entretanto, em suspensões coloidais, NpAus interagem por meio de ligações covalentes fracas (Leff D. V., 1996; Sylvestre J.P., 2004). Estudos reportam que o grupo NH_2 interage com as NpsAu por meio de uma ligação covalente, enquanto o grupo NH_3^+ interage eletrostaticamente, devido ao fato de que este está ligado a superfície negativa da NpAu (Sylvestre J.P., 2004). Uma vez mais, nosso grupo de pesquisa tem proposto que a via de interação da alanina/ouro é por meio do grupo amino da molécula, o que garante estabilidade estérica ao sistema. Mediante isso, é possível afirmar que a mesma interação com o grupo amina da molécula possa ocorrer para os demais aminoácidos e composto.

4.6 Reforço de Dose

4.6.1 Ressonância Paramagnética Eletrônica

A Figura (52) mostra os espectros de RPE para os diferentes materiais para as diferentes porcentagens em massa de NpAu. As amostras foram irradiadas com feixe de raios-X de energia efetiva de 42 keV e dose de 25 Gy. Os espectros característicos de cada material são provenientes dos radicais livres induzidos pela radiação ionizante. Todos os espectros foram normalizados pela massa de cada amostra. A amplitude pico-à-pico (App) é proporcional à quantidade de radicais paramagnéticos induzidos que, por sua vez, é proporcional a dose de radiação absorvida.

Figura (52): Comparação dos espectros de RPE para as diferentes porcentagens em massa de NpAu e com 0% de NpAu. (a) L-alanina (Ala). (b) 2 metil-alanina (2MA). (c) L-asparagina (Asn). (d) Glutamato monossódico (GMS).

Em comparação aos espectros de RPE com 0% de NpAu, é possível observar um aumento na intensidade do sinal para todas as amostras contendo NpsAu. O aumento da dose absorvida é devido ao aumento do coeficiente de absorção da radiação proporcionado pela inserção de Nps com alto número atômico ($Z=79$) (Figura 53).

Figura (53): Elétron ejetado da NpAu, provocando a formação de mais radicais livres na alanina e aumentando a sensibilidade dosimétrica.

O mesmo comportamento foi observado por Guidelli J.E. em 2014 para as amostras de alanina. Para 2MA, Wolfe T et al (Wolfe et al., 2015) reportou um ganho em sensibilidade para os dosímetros dopados com uma concentração de 0,1% de NpAu para diferentes energias de feixe de radiação (Wolfe et al., 2015). Uma vez mais, todos os materiais analisados apresentaram ganho em sensibilidade, incluindo a asparagina e o glutamato monossódico (Figura 52 c,d), mesmo com a formação de agregados.

A partir disso, é possível estimar o ganho em sensibilidade dosimétrica, definido como a razão da dose absorvida pelas amostras com a adição de NpsAu e a dose absorvida pelas amostras puras. Em condições de equilíbrio de partículas carregadas, a dose depositada por um feixe monoenergético será igual ao kerma colisional. Dessa forma, nas amostras sem NpsAu a dose depositada pode ser estimada como (Cunningham, 1983; F. H. ATTIX, 2004):

$$D_{ala} = \Psi \left(\frac{\mu_{ab}}{\rho} \right) ala, hv \quad (32)$$

E a dose depositada nos compósitos de alanina e NpsAu será(Cunningham, 1983; Attix F.H., 2004).

$$D_{Nc} = \Psi \left(\frac{\mu_{ab}}{\rho} \right) Nc, hv \quad (33)$$

Nas equações acima, Ψ é a fluência de energia do feixe de fótons incidentes; $\left(\frac{\mu_{ab}}{\rho} \right)_{ala}, hv$ é o coeficiente mássico de absorção da radiação para a alanina pura para uma dada energia hv dos fótons incidentes; $\left(\frac{\mu_{ab}}{\rho} \right) Nc, hv$ é o coeficiente mássico de absorção da radiação para os nanocompósitos alanina/ouro, para a energia hv dos fótons incidentes[60]. Assim, o ganho em sensibilidade dos dosímetros será (Attix F.H., 2004):

$$\text{Ganho} = \frac{D_{Nc}}{D_{ala}} = \frac{\Psi \left(\frac{\mu_{ab}}{\rho} \right) Nc, hv}{\Psi \left(\frac{\mu_{ab}}{\rho} \right)_{ala} hv} \quad (34)$$

Considerando que as fluências sejam as mesmas, a equação (34) pode ser reescrita como:

$$\text{Ganho} = \frac{D_{Nc}}{D_{ala}} = \frac{\left(\frac{\mu_{ab}}{\rho} \right) Nc, hv}{\left(\frac{\mu_{ab}}{\rho} \right)_{ala} hv} \quad (35)$$

Na teoria, o ganho é estimado pela razão entre os coeficientes de absorção da radiação de cada amostra contendo NpsAu e o coeficiente mássico de absorção da radiação do aminoácido (0% NpAu) (Attix F. H, 2004). Após a observação do aumento da sensibilidade para todos os materiais para as diferentes porcentagens em massa de NpAu, conduziremos agora, um novo estudo sobre o ganho experimental.

4.7 Influências da Sensibilidade do Material Dosimétrico e da Dose de Radiação no Fator de Aumento de Dose Causado por Nanopartículas de Ouro.

No trabalho de Guidelli J.E. em 2014, o autor observou a influência da energia do feixe de radiação para otimização do ganho dosimétrico da alanina, e a porcentagem em massa de NpAu inseridas nos materiais. Uma comparação entre o ganho teórico e experimental foi proposto pelo autor, que observou que quanto maior a energia efetiva do feixe de radiação, menor será o ganho dosimétrico. Em outras palavras, quanto menor a energia efetiva do feixe de radiação, maior será o ganho dosimétrico/ reforço de dose, isso porque aumenta a probabilidade de eventos fotoelétricos, devido a ejeção de elétrons das NpsAu. Para as variações de porcentagens em massa de ouro, foi analisado como a concentração influencia na acomodação dentro da matriz da alanina (Guidelli; Baffa, 2014a). Um ponto interessante no trabalho conduzido por Wolfe T. et al (Wolfe et al., 2015), foi a influência da dose no ganho dosimétrico da 2MA, revelando que dentro do intervalo de dose estudado pelos autores (0-5 Gy); para baixas doses o ganho dosimétrico era maior em comparação com as maiores doses aplicadas (Wolfe et al., 2015).

Dentro desse contexto, foi realizado um estudo com os diferentes materiais dosimétrico para compreender a influência da porcentagem em massa de NpAu, da dose aplicada, da agregação e da sensibilidade. Para isso, os materiais foram irradiados com um feixe de energia efetivo de 42 keV, em um intervalo de dose de 2-100 Gy.

4.7.1 Influência da Porcentagem em Massa de NpAu

As curvas de dose-resposta dos materiais mostrados na Figura (54) evidenciam o aumento da sensibilidade dosimétrica a partir da incorporação das NpsAu para todos os materiais analisados, construídas juntamente com a curva para os materiais puros.

Figura (54): Curva de dose-resposta para diferentes porcentagens de NpAu para: (a) alanina; (b) 2MA; (c) asparagina e (d) glutamato monossódico.

É possível observar que a relação entre a concentração das NpsAu e o ganho em dose depositada não obedece a uma relação linear. Isso pode ser explicado devido ao fato dessa linearidade obedecer a dois regimes: o primeiro para baixas concentrações de NpAu, de 0% até 0,1%, com um dado coeficiente angular promovendo o aumento da sensibilidade dos dosímetros; e o segundo para concentrações acima de 0,1% com coeficiente angular da reta menor que o primeiro, sofrendo uma pequena redução. Entretanto ao fixar a concentração de NpAu, a resposta dos nanocompósitos com a dose depositada é linear, assim como nos dosímetros puro.

O mesmo comportamento foi verificado por Guidelli J.E. em 2014 para os dosímetros de alanina. Segundo o autor, para pequenas quantidades de ouro adicionadas

na matriz do dosímetro, as NpAu se acomodam internamente em sua estrutura cristalina, fazendo com que o elétron ejetado da NpAu deposite dose preferencialmente nas moléculas do dosímetros ao seu redor, otimizando a entrega de dose às moléculas de alanina (Leung M. K. K., 2011; Guidelli E.J. and Baffa O., 2014a). Aumentando a concentração de nanopartículas de ouro, as NpAu tendem a se acomodar em posições externas aos cristais dos dosímetros. Assim, o elétron ejetado por uma partícula segregada irá depositar dose preferencialmente nas NpAu vizinhas que também estão segregadas (Leung M. K. K., 2011; Guidelli and Baffa, 2014a).

Outra possibilidade é que, à medida que a concentração de NpAu aumenta, aumenta a segregação das NpAu, aumentando também a probabilidade de que o elétron ejetado por uma NpAu seja absorvido por outra NpAu vizinha (Guidelli E.J. and Baffa O., 2014a) Figura (55). Dessa forma, a dose depositada nas moléculas do dosímetro aumenta em uma menor proporção em função do aumento da concentração de NpAu.

Figura (55): Desenho esquemático mostrando a auto-absorção dos elétrons ejetados à medida que aumenta a concentração de NpAu. (a) baixa concentração de NpAu; (b) alta concentração de NpAu. Figura modificada a partir de Guidelli et al, 2014.

A partir desses resultados, podemos concluir que o aumento da concentração de NpsAu pode resultar em um menor aumento do sinal dosimétrico, devido a segregação e

a auto absorção das NpsAu. É válido ressaltar que esse comportamento não foi observado apenas na alanina, mas sim por todos os materiais estudados aqui.

4.7.2 Influência da Sensibilidade do Material dosimétrico

A sensibilidade do material dosimétrico poderia influenciar no valor do aumento de dose, visto que um material mais sensível seria capaz de produzir mais radicais livres para uma determinada dose, consequentemente o fator de aumento será maior. Para isso, analisamos a dependência do sinal em função da potência de micro-ondas para cada material. A intensidade do sinal de RPE foi normalizada pela massa de cada material (Figura 56).

Figura (56): Dependência do sinal de RPE em função da potência de micro-ondas: alanina; 2MA; asparagina e glutamato monossódico.

Assim como estudado nos capítulos anteriores, a intensidade do sinal de RPE é relacionado pelo sinal/ruído (S/R). Dentro desse contexto, a potência de micro-ondas é um importante parâmetro espectroscópico para otimização da intensidade do sinal de

RPE, pois, é a partir da energia fornecida pela micro-ondas que ocorrem as transições dos estados degenerados, uma vez que, o mecanismo de relaxação característico de cada material põe um limite na potência de micro-ondas aplicadas. Através do mecanismo de relaxação podemos estabelecer qual material dosimétrico é mais sensível. Quanto mais curto é o tempo de relaxação mais sensível é o material (Lund et al.,), significando o quão forte esse sistema de spins está acoplado com a rede-cristalina para garantir a diferença da população de spins, necessitando assim, de valores altos de micro-ondas. Em outras palavras, o quanto mais alto for o valor da potência de micro-ondas aplicado no sistema, mais sensível é o material.

A otimização da potência de micro-ondas foi escolhida dentro da região de linearidade do sistema, com maior intensidade. Através desse critério, os valores de micro-ondas encontrados foram 5, 9, 2, e 2 mW para alanina, 2MA, asparagina e glutamato monossódico respectivamente. A 2MA é o material dosimétrico mais sensível, seguido pela alanina, glutamato monossódico e asparagina a Figura (56).

Esse resultado está em concordância com a literatura, pois a 2MA é cerca 70% mais sensível do que alanina, material dosimétrico padrão (Soliman et al., 2014), o glutamato monossódico mesmo apresentando características desejáveis para uso dosimétrico (Guidelli E.J., Lim I., Baffa O., 2018b), ainda é menos sensível do que alanina. Asparagina segue o mesmo padrão.

Para o estudo do ganho dose, o fator de reforço de dose foi analisado para os diferentes materiais a partir da variação da concentração das NpsAu para as diferentes doses aplicadas (Figura 57).

Figura (57): Ganho dosimétrico em função da concentração para diferentes doses aplicadas em (a) alanina; (b) 2MA; (c) asparagina e (d) glutamato monossódico.

Diferentemente do que esperávamos, a ordem de ganho em sensibilidade dosimétrica ocorreu de maneira oposta, quanto maior a sensibilidade do material dosimétrico, menor foi o ganho, seguindo a ordem decrescente abaixo:

$$\text{Asparagina} > \text{Glutamato monossódico} > \text{Alanina} > \text{2MA}$$

Apesar da agregação, a asparagina e o glutamato monossódico apresentaram um fator de aumento superior em comparação aos materiais mais sensíveis (alanina e 2MA), sugerindo que a sensibilidade é um fator mais efetivo para o reforço de dose do que a agregação.

4.7.2 Influência do Tamanho das NpsAu

O tamanho das Nps pode ser um fator de influência para diminuição do ganho em sensibilidade dosimétrica, visto que, dificulta a acomodação das Nps no interior dos cristais, o que possivelmente, favorece a auto absorção, contribuindo para um decréscimo do ganho dosimétrico. Sistemas homogêneos onde não há agregação e segregação, apresentaram menor auto absorção e, conseqüentemente, os ganhos em dose serão maiores. Por outro lado, para sistemas onde há aumento de tamanho e segregação das partículas metálicas, a auto absorção se torna mais relevante.

Em sistemas agregados, grande parte da energia cedida aos elétrons será depositada nas partículas metálicas vizinhas. No entanto, mesmo com a agregação, a asparagina e o glutamato monossódico apresentaram ser suscetíveis ao ganho dosimétrico produzido pelas Nps. Além disso, os sistemas agregados apresentaram um ganho em sensibilidade maior do que para sistemas dispersos, sugerindo que o tamanho das Nps não foi um fator de grande relevância para diminuição do ganho dosimétrico, ainda que observado. Atribui-se a agregação, por exemplo, o decréscimo do ganho em dose para porcentagens em massa de ouro em asparagina acima de 1%.

Os resultados (Figura 57) sugerem também que a diminuição do ganho em sensibilidade dosimétrica é influenciada tanto pelo aumento da concentração das NpsAu e pela sensibilidade do material, uma vez que, tanto para os materiais em sistemas bem dispersos quanto para os materiais em sistemas agregados pôde-se detectar a influência da auto absorção, devido ao aumento da concentração.

Além disso, é notável a dependência do ganho com a dose, uma tendência observada para todos os materiais para todas as porcentagens em massa de NpAu. À medida que a dose aumenta o ganho dosimétrico diminui exponencialmente. Essa mesma dependência foi observada por Wolfe T. et al. (Wolfe et al., 2015), entretanto, os autores não forneceram uma explicação para tal comportamento. A Figura (58) mostra o ganho em função da dose para diferentes porcentagens de NpAu. O ganho foi calculado como sendo a amplitude pico-à-pico da amostra contendo NpAu (A_{ppNpAu}) dividida pela amplitude pico-à-pico da amostra pura (A_{ppAA}) para cada porcentagem de NpAu.

Figura (58): Ganho dosimétrico em função da dose para diferentes porcentagens em massa de NpAu (a) alanina; (b) 2MA; (c) asparagina e (d) glutamato monossódico.

Comparando uma dose de 2 Gy e de 100 Gy em uma concentração de 1% de NpAu, o ganho reduziu cerca de 43%, 50%, 50%, e 65% para alanina, 2MA, asparagina e glutamato monossódico respectivamente. A quantidade de radicais livres induzidos pela radiação ionizante é proporcional à dose, mas depende também da sensibilidade do material dosimétrico. Quanto mais sensível for o material mais radicais livres serão formados para uma mesma dose de radiação ionizante. Por sua vez, o ganho dosimétrico é estimado pela razão entre a intensidade do sinal da amostra contendo NpsAu, pela intensidade do sinal da amostra pura. Como o sinal da amostra pura aparece como denominador no cálculo experimental do reforço de dose, um valor maior no denominador (maior sinal da amostra pura) causa então a redução do ganho.

Além disso, o fato de que o ganho diminui com o aumento da dose poderia ser explicado com base na cinética de reação de formação de radicais livres nos aminoácidos. Quanto maior a dose, maior a formação de radicais. Porém, quanto maior a concentração de radicais livres formados, maior será a probabilidade de recombinação desses radicais

de forma que a número de recombinações de radicais deve ser maior para doses maiores, o que pode levar a saturação do sinal para altas doses. A alanina, por exemplo, apresenta saturação para doses aproximadamente acima de 100 kGy (Regulla DF, 1982). Quando NpsAu são introduzidas nos materiais, a quantidade de radicais formados aumenta, de forma que a resposta dosimétrica fica mais próxima do valor de saturação, como exemplificado no esquema da Figura (59).

Figura (59): Recombinações dos radicais livres da molécula de alanina devido o aumento de dose e inserção de NpsAu.

Por exemplo, caso os dosímetros sejam irradiados com a dose de saturação da alanina de 100 kGy. Para essa mesma dose, supondo um ganho em intensidade de sinal de EPR de duas vezes (razão dos coeficientes mássicos de absorção), o sinal da amostra com NpAu será o mesmo que sinal da alanina pura irradiada com 200 kGy. Porém, como a alanina tem saturação de 100 kGy, os espectros de RPE proveniente das amostras com e sem Nps apresentarão a mesma intensidade e, nesse caso, o ganho em sinal dosimétrico será nulo. Em outras palavras, o ganho em sinal de RPE tende à a um à medida que a dose depositada no dosímetro tende a dose de saturação característica do material dosimétrico.

Nesse contexto, o ganho dosimétrico do sinal de RPE é maior para os materiais menos sensíveis, como a asparagina e o glutamato monossódico do que para a 2MA e alanina. Vale ressaltar que, de maneira geral, todos os materiais apresentaram aumento da intensidade do sinal dosimétrico com o aumento da concentração de ouro para as

diferentes doses aplicadas. Nessas condições, é observado também um aumento do ganho em sensibilidade dosimétrica para todos os materiais em uma concentração de 1% de ouro em comparação as outras concentrações. Portanto, pode-se inferir que o fator de aumento de dose causado pela inserção de NpsAu nas matrizes desses aminoácidos, são influenciados pela sensibilidade do material e pela dose depositada de maneira tão significativa quanto o aumento da concentração das NpsAu e o consequente aumento do coeficiente de absorção mássico.

Capítulo 5 Conclusões

5.1 Propriedades Dosimétricas

Dois radicais estáveis à temperatura ambiente / Os radicais I e II são formados pela quebra dos dois grupos NH_2 do aminoácido. Dose-resposta linear (2-30 Gy) em faixa de dose terapêutica. Pequena dependência energética (cerca de 30% na faixa de 80 KV-6MV). Taxa de dose (100-600 cGy / min) de independência sobre a faixa de relevância clínica mínima dose detectável de 0,1 Gy. Além disso, os radicais induzidos foram identificados na irradiação à temperatura ambiente, um ponto relevante, uma vez que muitos processos bioquímicos e medições dosimétricas ocorrem em temperatura ambiente.

5.2 Nanocompósitos de Ouro

A interação das NpsAu com os aminoácidos revelou um processo característico de cada AA. A formação ou não de agregados depende do comportamento do aminoácido no solvente que foi exposto; as técnicas de espectroscopia UV-Vis e espalhamento dinâmico da luz indicaram que as NpsAu são esféricas e não mudam de forma e/ou tamanho ao interagir com as moléculas de alanina e 2MA. Entretanto, devido à agregação a asparagina e o glutamato monossódico não apresentam o mesmo comportamento. O aumento do ganho em sensibilidade nos nanocompósitos, em função da porcentagem em massa de ouro não é linear. Constatou-se que o ganho em sensibilidade mostrou ser também dependente do aumento da dose aplicada, e que isso é influenciado pela capacidade de recombinação de cada material. Foi observado para todos os materiais, uma sensibilidade dosimétrica efetiva para uma concentração de 1% de ouro. As perspectivas desse trabalho, será a confirmação da influência do aumento da dose aplicada nos materiais dentro do intervalo de saturação de cada um, bem como, otimizar o meio da inserção das Nps para um controle da agregação da asparagina e glutamato monossódico.

Referências

Aliev G., H. H. Palacios, V. B. Shadlinski, D. Gokhman, K. G. and J. L. European Journal of Neurolog. v. 18, p. 344, 2011.

Alisa d., roddick-lanzilotta, James Mc Quillan. An in Situ Infrared Spectroscopic Study of Glutamic Acid and of Aspartic Acid Adsorbed on TiO₂: Implications for the Biocompatibility of Titanium. Journal of Colloid and Interface Science, v. 227, n. 1, p. 48–54, 2000.

Alkilany, A. M.; Murphy, C. J. Gold Nanoparticles with a Polymerizable Surfactant Bilayer: Synthesis, Polymerization, and Stability Evaluation. Langmuir, n. 25, p. 13874–13879., 2009.

Alzimami, K. S.; Maghraby, A. M.; Bradley, D. A. Comparative Study of Some New EPR Dosimeters. Radiation Physics and Chemistry, v. 95, 2014.

Arber, J. M.; Sharpe, P. H. G.; Joly, H. A.; Morton, J. R. . P.; F., K. Appl. Radiat. Isot, p. 42, 665., 1991.

Atherton, N. M. Principles of Electron Spin Resonance. Ellis Horwood Ltd, 1993.

Attix, F. H. Introduction to radiological physics and radiation dosimetry. In: Madison: John Wiley& Sons. Chapter 11, 290 p, 2004.

Austin, B. Kang, C.-W. Y. and M. A. E.-S. J. Am. Luminescência Opticamente Estimulada em Condições de Ressonância Plasmônica Chem. Soc., v. 133, p. 17594,2011.

Bermann F., D. C. H. and D. S. In Advances in Physical and Bioloological Radiation Detectors. (International Atomic Energy Agency, Vienna, v. STI/PUB/26, p. 311, 1971.

Bert M. Weckhuysen, Ralf heidler, R. A. S. Electron Spin Resnonance Spectroscopy. Mol.Sieves, v. 4, p. 295–335, 2004.

Borgonove, A. F. et al. Energy Dependence of Different Materials in ESR Dosimetry for Clinical X-Ray 10 MV Beam. *Radiation Measurements*, v. 42, n. 6–7, p. 1227–1232, 2007.

Bradshaw, w. w.; Cadena, d. g.; Crawford, G. W.; Spetzler, H.; W., A. The use of alanine as a solid dosimeter. *Radiat.*, p. 17, 11., 1962.

Brai, M., Gennaro, G., Marrale, M., Bartolotta, A., D'oca, M. C. ESR Response to Gamma-Rays of Alanine Pellets Containing B(OH)(3) or Gd₂O₃. *Appl. Radiat. Isot.* 65, n. 4, p. 435–439, 2007.

Brai M, Marrale M, Gennaro G, Bartolotta, A D 'oca, M C Rosi, G. Improvement of ESR Dosimetry for Thermal Neutron Beams through the Addition of Gadolinium. *Phys. Med. Biol*, v. 52, p. 5219–5230, 2007.

Chegel, V.; Rachkov, O.; Lopatynskiy, A.; Ishihara, S.; Yanchuk, I.; Nemoto, Y.; Hill, J. P.; Ariga, K. Gold Nanoparticles Aggregation: Drastic Effect of Cooperative Functionalities in a Single Molecular Conjugate. *J. Phys. Chem. C*, n. 116, p. 2683–2690, 2012.

Chen, F.; Nicolucci, P.; Baffa, O. Enhanced Sensitivity of Alanine Dosimeters to Low-Energy X-Rays: Preliminary Results. *Radiation Measurements*, v. 43, n. 2–6, p. 467–470, 2008.

Christau S., Moeller T., Genzer J., Koehler R., and Klitzing R. V. Salt-Induced Aggregation of Negatively Charged Gold Nanoparticles Confined in a Polymer Brush Matrix. *ACS/Macromolecules*, 2017.

Close, D. M.; Fouse, G. W.; Bernhard, W. A. ESR and ENDOR Study of Single Crystals of L-Asparagine·H₂O x-Irradiated at Room Temperature. *The Journal of Chemical Physics*, v. 66, n. 4, p. 1534, 1977.

Close DM, F. G. and B. W. ESR and ENDOR Study of Single Crystals of L-Asparagine.H₂O x-Irradiated at Room Temperature,. *Journal of Chemical Physics*, v. 66,

p. 1534–1540, 1977.

Cunningham, H. E. J. J. R. *The Physics of Radiology*. Fourth ed. ed. Springfield: Charles C Thomas, 1983.

Davidson, M. T. M.; Jordan, K. J. Dosimetric Evaluation of Sucrose and Granulated Cane Sugar in the Therapeutic Dose Range. *Medical Physics*, v. 36, n. 4, p. 1340–1350, 2009.

Funaro M., A. DI Bartolomeo, P. Pelosi, M. S. S. and A. P. *Micro Nano Lett.* v. 6, p. 759, 2011.

GALLO, S. Characterization of Phenolic Pellets for ESR Dosimetry in Photon Beam Radiotherapy. *Radiat Environ Biophys*, v. 1, n. 56, p. 471–480, 2017.

Garcia, T. A Methodology for Choosing Parameters for ESR Readout of Alanine Dosimeters for Radiotherapy. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 78, p. 782–790, 2009.

Gómez, J. Kinoshita A. Chen F. Guidelli E.J., Rech A. Alves G. Baffa, O. Dosimetria Por Ressonância Magnética Eletrônica Electron Magnetic Resonance Dosimetry. *Revista Brasileira de Física Médica*, v. 5, n. 3, p. 113–124, 2011.

Guidelli E.J, Ramos A P, Zaniquelli M E D, Nicolucci P. and Baffa O. Synthesis and characterization of silver/alanine nanocomposites for radiation detection in medical applications: the influence of particle size on the detection properties *Nanoscale*. V. 4 n. 9, p 2884-2893, 2012.

Guidelli, E. J.; Baffa, O. Influence of Photon Beam Energy on the Dose Enhancement Factor Caused by Gold and Silver Nanoparticles : An Experimental Approach Influence of Photon Beam Energy on the Dose Enhancement Factor Caused by Gold and Silver Nanoparticles : An Experimental Appr. v. 032101, 2014a.

Guidelli, E. J.; Baffa, O. Potential Application of Metal Nanoparticles for Dosimetric Systems: Concepts and Perspectives. *AIP Conference Proceedings*, v. 1626, n. 5, p. 5–14, 2014b.

Guidelli, E. J.; Lima, I. S.; Baffa, O. Monosodium Glutamate for Accidental, Retrospective, and Medical Dosimetry Using Electron Spin Resonance. *Radiation and Environmental Biophysics*, 2018a.

Guidelli, E. J.; Ramos, A. P.; Baffa, O. Silver Nanoparticle Films for Metal Enhanced Luminescence: Toward Development of Plasmonic Radiation Detectors for Medical Applications. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, v. 224, p. 248–255, 2016.

Hansen, J. W.; Olsen, K. J. Predicting Concentration High-LET Decay in Free-Radical in L-Alanine Following Radiation Exposures. *Int. J. Radiat. Appl. httrum. Part A*, v. 40, p. 935–939, 1989.

Herold DM, Das IJ, Stobbe CC, Iyer RV, Chapman JD. Gold microspheres: a selective technique for producing biologically effective dose enhancement. *Int J Radiat Biol*;76:1357-64, 2000.

I. MEDINA-RAMIREZ, et al. ‘Green Synthesis and Characterization of Polymer-Stabilized Silver Nanoparticles,’ *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, v. 73, p. 185–191, 2009.

Ikeya M. *New Applications of Electron Spin Resonance: Dating, Dosimetry and Microscopy*. World Scientific, Singapore, p.395., 1993.

International Commission on Radiological Units (ICRU), *Measurements. Radiation Quantities and Units*. In: Report 33, 1980.

K. H. Kwan, X. L. and K. W. Y. *Nanomedicine*. v. 6, p. 595, 2011.

Kathiravan, P.; Sathiskumar, S.; Balakrishnan, T. Growth and Characterization of Pure and Ag + Doped L-Asparagine Monohydrate Single Crystals. *India Licensed Under Creative Commons Attribution CC BY*, p. 4, 2013.

Khlebtsov, N. G. *Optics and Biophotonics of Nanoparticles with a Plasmon Resonance*, "

"Quantum Electronics, v. 38, p. 504–529, 2008.

Knudtsen, Ingerid S. Aalbergstjø G. S. Hole, Eli O Sagstuen, E. Radiation Effects on Crystalline L-Asparagine, Revisited: Radical Formation by EMR and Periodic DFT after X-Irradiation at 275 K. Radiation Physics and Chemistry, v. 106, p. 151–159, 2014. L. A.

Leff, D. V. Brandt, L.; Heath, J. R. Langmuir 'Synthesis and Characterization of Hydrophobic, Organically-Soluble Gold Nanocrystals Functionalized with Primary Amines,'. Langmuir, v. 12, p. 4723–4730, 1996.

Leung M. K. K. Irradiation of Gold Nanoparticles by X-Rays: Monte Carlo Simulation of Dose Enhancements and the Spatial Properties of the Secondary Electrons Production". Medical Physics, v. 38, p. 624–631, 2011.

Liu H., Zhang X., Xingb. , Han P., S. S. G. and Z. C. Small. v. 6, p. 1087, 2010.

Lund A., Olsson S., Bonora M., Lund E., Gustafsson H., New Materials for ESR Dosimetry. Spectrochimica Acta Part A 58 1301–1311, 2002.

M. B. C.-F. Tarallo, A.J. ; Vieira, E. D. ; Monge, A. ; Leite, C. Q. ; Borthagaray, G. ; Gambino, D. ; Torre, M. H. 'Research Of New Mixed-Chelate Copper Complexes With Quinoxaline N1,N4-Dioxide Derivatives And Alanine As Ligands, Potential Antimycobacterial Agents,'. Anales de la Asociación Química Argentina, v. 97, p. 9, 2009.

Maghraby, A.; Tarek, E. A New EPR Dosimeter Based on Sulfanilic Acid. Radiation Measurements, v. 41, n. 2, p. 170–176, 2006.

Miyagawa I. And Gordy W. 'Electron Spin Resonance Of An Irradiated Single Crystal Of Alanine - 2nd-Order Effects In Free Radical Resonances,'. Journal of Chemical Physics, v. 32, p. 255–263, 1960.

Miyagawa, I.; gordy, W. J. Chem Miyagawa, I.; Gordy, W. J. C. Phys. p. 32, 255., 1960.

Mojgan Z. Heydari, Eirik Malinen, Eli O. Hole, and Einar Sagstuen. Alanine Radicals. 2.

The Composite Polycrystalline Alanine EPR Spectrum Studied by ENDOR, Thermal Annealing, and Spectrum Simulations. *J. Phys. Chem.*, v. 106, p. 8971–8977, 2002.

Murphy, D. M. EPR (Electron Paramagnetic Resonance) Spectroscopy of Polycrystalline Oxide Systems. v. 1, P 1-150, 2009.

Myers D., Surfaces Interfaces, and Colloids, 2 nd ed, John Wiley & Sons, Inc., New York, USA, 1999.

Nagy, V. Y.; desrosiers, M. F. Complex Time Dependence of the EPR Signal of Irradiated L- α -Alanine. *Applied Radiation and Isotopes*, v. 47, n. 8, p. 789–793, 1996.

Nam JW, R. D. The Significance of the International Dose Assurance Service for Radiation Processing. *Int J Rad Appl Instrum, Part A, Appl Radiat Isot.*, v. 40, n. 953–5, p. 10–12, 1989.

National Institute of Standards and Technology-NIST. Physical Reference Data, 2009.

Olsson, S. EPR Dosimetric Properties of 2-Methylalanine: EPR, ENDOR and FT-EPR Investigations. *Radiation research*, v. 157, n. 2, p. 113–21, 2002.

Parab, H.; jung, C.; woo, M. A.; park, H. G. J. N. ‘An Anisotropic Snowflake-like Structural Assembly of Polymer- Capped Gold Nanoparticles,’. *Journal of Nanoparticle Research*, v. 13, p. 2173–2180, 2013.

Prydz, S.; henriksen, T. Radiation Induced Free Radicals in Alanine and Some Related Amino Acids. *Electron Spin Resonance Studies. Acta Chemica Scandinavica*, 1961.

Regulla, D. F.; deffner, U. Dosimetry by ESR Spectroscopy of Alanine. *Int. J. Appl Radiat. Isot*, v. 33, p. 1101–1114, 1982a.

Roeske, J.C., Nunez, L., Hoggarth, M., Labay, E., Weichselbaum, R.R. ‘Characterization of the Theoretical Radiation Dose Enhancement from Nanoparticles,’. *Technology in Cancer Research & Treatment*, v. 6, p. 395–401, 2007.

Sagstuen, E.; sanderud, A.; hole, E. O. The Solid-State Radiation Chemistry of Simple Amino Acids, Revisited. *Radiation Research*, v. 162, n. 2, p. 112–119, 2004.

Saxebol G. An ESR Study of Irradiated N-Acetyl-L-Alanine at 295 K. *T. J. Radiat. Biol*, v. 27, n. 3, p. 293–296, 1975.

Sevilla M. Radicals Formed by the Reaction of Electrons with Amino Acids in Alkaline Glass. *Journal of Physical Chemistry*, v. 74, p. 2096–2102, 1970.

STRANIK O., MCEVOY H. M, and B. D. M. *Sens. Actuators, B.*, v. 107, p. 148, 2005.

Shields, H.; hamrick, P. J. The Influence of Crystal Structure on Radical Formation in X-irradiated Amino Acids. *The Journal of Chemical Physics*, v. 64, n. 1, p. 263–270, 1976.

Soliman, Y. S.Ali, Laila I. Moustafa, H. Tadros, Soad M. EPR Dosimetric Properties of 2-Methylalanine Pellet for Radiation Processing Application. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 102, p. 11–15, 2014.

Strzelczak G. Bergès J. Houée-Levin, ChantalP., Dariusz B. Kr. EPR Spectroscopy and Theoretical Study of γ -Irradiated Asparagine and Aspartic Acid in Solid State *Biophysical Chemistry* v. 125, p. 92–103, 2007.

Sun, H. M.; gao, Z. W.; gao, L. X.; hoU, K. J. ‘Star-PDMAEMA--CD-Stabilized Colloidal Gold Nanoparticles: Synthesis, Characterization and PH-Controlled Assembly,’. *Journal of Macromolecular Science Part a-Pure and Applied Chemistry*, v. 48, p. 291–298, 2011.

Swartz HM, bolton JR, B. D. *Biological applications of electron spin resonance*.Wiley-Interscience, 1972.

Sylvestre S., Sebastian S. ,Edwin S., Amalanathan M., Ayyapan S. Jayavarthanan T. Oudayakumar K., Solomon S. ‘Surface Chemistry of Gold Nanoparticles Produced by Laser Ablation in Aqueous Media’. *Journal of Physical Chemistry B*, v. 108, p. 16864–

16869, 2004.

R., G. Direct Dating of Human Fossils. *American Journal of Physical Anthropology*, v. 131, p. 24, 26, 27, 38, 2006.

Tauhata, L., salati, I. P. A., Di prinzio, R., M. A. R. R. Radioproteção e Dosimetria: Fundamentos. In: 9ª revisão ed. 345p.

Vanhaelewyn G., Amira S. , Mondelaers W., Callens F. Decomposition Study of the Electron Paramagnetic Resonance Spectrum of Irradiated Alanine. *Spectrochimica Acta Part A*, v. 56, p. 387–397, 2000.

Vollhardt, K.P.C, scorE, N. E. Organic Chemistry. In: W.H.Freeman and Company. 2nd editio ed. p. 1031–1034.

Waldeland E., Eli H., Sagstuen O. , Malinen E.E. The Energy Dependence of Lithium Formate and Alanine EPR Dosimeters for Medium Energy x Rays. 1 E. Waldeland, E.O. Hole, E. Sagstuen, and E. Malinen, The energy dependence of lithium formate and alanine EPR dosimeters for medium energy x rays, *Med. Phys.* 37(7), 3569–3575 2010.

Waldeland, E. Lithium Formate EPR Dosimetry. Department of Medical Physics The Norwegian Radium Hospital Oslo University Hospital, n. 1049, p. 35, 2011.

Waldeland, E.; malinen, E. Review of the dose-to-water energy dependence of alanine and lithium formate EPR dosimeters and LiF TL-dosimeters - Comparison with Monte Carlo simulations. In: *Radiation Measurements*, 9, Anais 2011.

Weil, J. A.; bolton, J. R.; wertz, J. E. Electron Paramagnetic Resonance: Elementary Theory and Applications. *Magnetic Resonance in Chemistry*, v. 33, n. 1, p. 80–80, 1995.

Wolfe T. ,Guidelli, E. J., Gómez J., .Baffa O., Nicolucci P. Experimental Assessment of Gold Nanoparticle-Mediated Dose Enhancement in Radiation Therapy Beams Using Electron Spin Resonance Dosimetry. *Physics in Medicine and Biology*, v. 60, n. 11, p. 4465–4480, 2015.

Wu, Di; Zhang, Xiao-Dong; Liu, Pei-Xun; Zhang, Liang-An; Fan, Fei-Yue; Guo, Mei-Li 'Gold Nanostructure: Fabrication, Surface Modification, Targeting Imaging, and Enhanced Radiotherapy,' *Current Nanoscience*, v. 7, p. 110–118, 2011.

Zeng, G. G.; MC CaffreY, J. P. The Response of Alanine to a 150 KeV X-Ray Beam. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 72, p. 537–540, 2005.

Zewde, B. A Review of Stabilized Silver Nanoparticles – Synthesis, Biological Properties, Characterization, and Potential Areas of Applications. *JSM Nanotechnol Nanomed*, v. 4, n. 2, p. 1043, 2016.

Anexo A

Princípios de Dosimetria

Na dosimetria determina-se a quantidade de dose absorvida ou taxa de dose resultante de interações entre radiação ionizante e matéria. A medida dosimétrica é feita por meio de dispositivos que detectam radiação, e geralmente são constituídos de um elemento ou material sensível, por meio de diversos processos pelo quais tipos diferentes de radiação interagem com o material. Para isto, é necessário ter conhecimento de algumas quantidades radiológicas, tais como, estocástica e não estocástica. A definição de uma quantidade estocástica é probabilística, pois não pode ser prevista, tendo domínio finito e fornecida pela sua média com erro arbitrário pequeno. Enquanto uma quantidade não estocástica pode ser predita como, uma função pontual que relaciona às radiações ionizantes a um módulo igual, ao valor esperado de uma quantidade estocástica (Attix, 1986).

As quantidades, portanto, são determinadas por grandezas radiológicas que tem como objetivo uma medida física em um ponto ou uma região de interesse que seja correlacionada com o efeito biológico real da radiação ionizante. Dentre essas grandezas dosimétricas estão: Kerma (K), Exposição (X) e Dose absorvida (D).

O kerma (K) é uma quantidade não estocástica, sendo o quociente dE_{tr} por dm , onde dE_{tr} é a soma de todas as energias cinéticas iniciais de todas as partículas carregadas liberadas por partículas neutras ou fótons, incidentes em um material de massa dm (Tauhata, L., Salati, I. P. A., Di Prinzio, R., Di Prinzio, 2013). É descrito pela equação (32) e possui unidade J/kg, que equivale ao gray (Gy).

$$K = \frac{dE_{tr}}{dm} \quad (32)$$

O kerma tem a vantagem de ser independente da complexidade do transporte de energia pelas cargas secundárias, podendo ser calculada a partir da fluência (número de partículas incidentes em uma área), pela seguinte equação (33):

$$K = \frac{\mu_{tr}}{\rho} E \phi = \frac{\mu_{tr}}{\rho} \Psi \quad (33)$$

Sendo $\frac{\mu_{tr}}{\rho}$ o coeficiente de transferência de energia específica.

A exposição (X) é uma quantidade não estocástica utilizada apenas para descrever raios-X e γ . É o quociente entre dQ por dm equação (34), onde dQ é o valor absoluto da carga total de íons de um dado sinal, produzidos no ar, quando todos os elétrons (negativos e positivos) liberados pelos fótons no ar, em uma massa dm, são completamente freados no ar

$$X = \frac{dQ}{dm} \quad (34)$$

Ao relacionarmos a exposição durante o intervalo de tempo, teremos a taxa de exposição descrita como na equação (35):

$$\text{Taxa de exposição} = \frac{dQ}{dm} \quad (35)$$

A relação entre a energia absorvida e a massa do volume de material atingido é a base da definição da grandeza dose absorvida. A Dose absorvida é definida como uma função num ponto P, de interesse, descrita pela equação como (equação 36):

$$D = \frac{dE}{dm} [J Kg^{-1}] = Gy \quad (36)$$

Onde dE é a energia média depositada pela radiação no ponto P de interesse, num meio de massa dm (tauahata, L., Salati, I. P. A., Di Prinzio, R., Di Prinzio, 2013).

A dose absorvida pode ser relacionada em função dos coeficientes de absorção mássico $\left(\frac{\mu_{en}}{\rho}\right)$, definido como a fração de partículas que produz interação ao longo de uma distância (dl) em um meio de densidade (ρ) (ICRU), 1980).

O coeficiente de absorção de energia mássico $\left(\frac{\mu_{en}}{\rho}\right)$ de um material para partículas ionizantes não carregadas é definido como o produto $\left(\frac{\mu_{tr}}{\rho}\right)$, e (1- g) equação (37), onde g é a fração de energia das partículas secundárias carregadas que é perdida por radiação de frenagem (*bremsstrahlung*) no material,

$$\left(\frac{\mu_{en}}{\rho}\right) = \left(\frac{\mu_{tr}}{\rho}\right)(1- g) \quad (37)$$

tendo como unidade no SI o $m^2 kg^{-1}$.

Para valores pequenos de número atômico Z e energia $h\nu$, g se aproxima de zero e $\left(\frac{\mu_{en}}{\rho}\right) = \left(\frac{\mu_{tr}}{\rho}\right)$. Dessa forma na condição de equilíbrio de partículas carregadas e ausência de perdas por *bremsstrahlung*, $\left(\frac{\mu_{en}}{\rho}\right)$ é igual a $\left(\frac{\mu_{tr}}{\rho}\right)$, assim, a dose absorvida, D , no volume V , é igual ao kerma, equação (38):

$$D = K = \Psi \left(\frac{\mu_{tr}}{\rho} \right) = \Psi \left(\frac{\mu_{en}}{\rho} \right) \quad (38)$$