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

Sensor sólido de óxido nítrico utilizando látex como matriz

Rondinelli Donizetti Herculano

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 de
concentração: Física Aplicada à Medicina
e Biologia.

**RIBEIRÃO PRETO – SP
2005**

FICHA CATALOGRÁFICA

Herculano, Rondinelli Donizetti

“Sensor Sólido de Óxido Nítrico Utilizando Látex como Matriz.”

Ribeirão Preto, 2005.

68 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Física Aplicada a Medicina e Biologia.

Orientador: **Carlos Frederico de Oliveira Graeff.**

1. Sensor de Óxido Nítrico.
2. Matriz de látex, FeDETC.
3. Aprisionamento do NO.

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

Sensor sólido de óxido nítrico utilizando látex como matriz

Rondinelli Donizetti Herculano

Orientador: Dr. Carlos F.O. Graeff

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 de
concentração: Física Aplicada à Medicina
e Biologia.

RIBEIRÃO PRETO - SP

2005

À minha família, especialmente aos meus irmãos Heleno e Osvaldo Jr. pelo apoio incondicional que me deram durante todo o tempo em que estive fora, aos meus verdadeiros amigos (e suas famílias) de Tambaú/SP pela força e confiança, a todos vocês dedico este trabalho, pois a conquista é nossa, e não poderia de esquecer de meus pais Osvaldo e Orandi, mesmo não estando aqui, certamente estão torcendo por mim de algum lugar.

**Aos meus amigos e colegas de
laboratório do Grupo Ressomat:
Ângela Kinoshita, George B. Silva,
Jair Jr., Marcelo Caetano, João Borin,
Fernando Castro e Carlos Brunello.**

Aos amigos de república (Alexandre Mana, Silvio Leão Vieira, Danievertton Moretti) que considero como irmãos, pois me ensinaram muitas coisas e evidentemente a crescer. Não posso me esquecer de agradecer a Mônica Campitelli e ao Pablo Diniz Batista que me ajudaram no momento que mais precisei, e pode ter certeza que sempre serei grato.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos F. O. Graeff, primeiramente pelo projeto que deu origem a essa dissertação, segundo por confiar em meu trabalho e pela permanente motivação que resultou na conclusão deste trabalho.

A CAPES, CNPQ (I.M.M.P.) pelo apoio financeiro.

Aos técnicos: Carlos Alberto Brunello, José Luiz Aziani, Eldereis de Paula e Élcio Aparecido Naves por todo o suporte que ofereceram.

Ao Jair Pereira de Melo Junior, João Francisco Borin e Juliana Biazoto por terem iniciado o tema que resultou no presente trabalho.

À minha família, pelo apoio incondicional.

Ao Grupo Sensormat: Danievertton Moretti, Júlio Ugucioni, Ernando, Pablo Diniz, José Fernando, Mariselma, Ademar e Gláucio.

Ao pessoal da Pós-Graduação em Física Aplicada à Medicina e Biologia, em especial à Hellen, Adelson, Tiago, Rebeca, Júlia, Márcio, Cássia, Pablo Gonçalves, Kátia, Luís Perles, Ana Paula, “Andréia Galina”, Rodrigo e Eric Alexandre.

Não posso esquecer de minhas vizinhas que amo de paixão: Alice, Amanda, Ariane, Juliana, Beatriz, Joyce.

Para pessoal da casa da Pós-Graduação 12 e 13, pelo companheirismo e pelos momentos especiais. Muito Obrigado.

E a Deus, por tudo.

RESUMO

O óxido nítrico (NO) é um dos mais importantes radicais livres da fisiologia humana. Desde a sua descoberta, inúmeras pesquisas são realizadas com o objetivo de encontrar métodos alternativos para detecção e quantificação deste radical *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo*. Este trabalho consistiu no desenvolvimento e aperfeiçoamento de um sensor de NO construído a partir de uma matriz sólida de látex. O sensor proposto baseia-se no aprisionamento do complexo ferro(II)-dietilditiocarbamato $\text{Fe}^{+2}(\text{DETC})_2$, dentro da matriz sólida. Neste caso, o NO é armadilhado no FeDETC, o que permite a sua detecção. O látex foi usado como matriz sólida por ser promissor em aplicações biomédicas, pois apresenta excelentes propriedades de *bio-compatibilidade* e de estímulo natural a *angiogênese*.

Para a detecção do NO, bem como para a caracterização do sensor, foi utilizada a técnica de ressonância paramagnética eletrônica (RPE), devida a sua seletividade e sensibilidade. As análises dos processos de otimização do sensor sólido envolveram as concentrações de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e DETC, temperatura do látex, proporção de FeDETC na matriz de látex, homogeneidade da membrana, sensibilidade e reprodutibilidade do sinal de RPE.

O sensor apresentou uma alta estabilidade quando observado por RPE. A detecção do NO pôde ser obtido mesmo depois de 40 dias de exposição ambiente. Ele pode ser reutilizado e é capaz de medir o NO em concentrações de até 0,1mM. Estes resultados faz do látex-FeDETC um sensor promissor de NO onde a detecção com resolução espacial pode ser atingida.

ABSTRACT

Nitric oxide (NO) is one of the most important free radicals of the human physiology. Since its discovery, many efforts have been preformed in order to find alternative methods of detection and quantification for this radical *in vitro*, *in vivo* and *ex vivo*. In this work a NO sensor is made with a solid latex matrix was developed and improved. The proposed sensor is based on encapsulating the complex iron(II)-diethyldithiocarbamic $\text{Fe}^{+2}(\text{DETC})_2$ in a solid matrix. In this case, the NO radical is trapped in FeDETC, which allows its detection. The latex was used as solid matrix due to excellent biocompatible, natural angiogenesis properties and it is a promising material to be applied in biological systems. The electron paramagnetic resonance (EPR), a selective and sensible technique, was used for the NO detection and sensor characterization. The fabrication and optimization processes was analyzed by $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ and DETC concentrations, latex temperature, FeDETC/latex ratio, membrane homogeneity, sensitivity and reproducibility of the RPE signal.

The sensor presents high stability when observed by EPR. The NO detection can be observed even after the sensor is exposed to ambient atmosphere for 40 days. It can be reused and is able to measure NO concentration of 0,1mM. These results make the latex-FeDETC a promising NO sensor.

ÍNDICE

Prefácio.....	01
Capítulo 1 – Ressonância Paramagnética Eletrônica.....	03
1.1 – Introdução.....	03
1.2 - O Fenômeno da Ressonância Paramagnética.....	04
1.3 - Absorção de Energia e Relaxação Spin-Rede.....	07
1.4 - Interação Nuclear Hiperfina.....	10
1.5 – Constituição do espectrômetro de RPE.....	12
1.5.1 - Fonte do Campo Magnético Externo.....	12
1.5.2 - Fonte de Microondas.....	13
1.5.3 - Guia de Ondas e Cavidade Ressonante.....	13
1.5.4 - Sistema de Detecção e Registro do Espectro.....	15
Capítulo 2 – O Látex Natural.....	16
2.1 – Introdução.....	16
2.2 - O Látex da Seringueira.....	16
2.3 - Borracha Natural.....	18
2.4 - Beneficiamento do Látex Natural.....	19
Capítulo 3 – A Molécula de NO.....	21
3.1 – Introdução.....	21
3.2 - Fisiologia do Óxido Nítrico.....	22
3.3 - A Bioquímica do NO.....	22

3.3.1 - Biossíntese e enzimologia.....	22
3.3.2 - Propriedades Físico-Químicas do NO.....	23
3.4 - Métodos de Quantificação de NO.....	26
3.5 - O aprisionador “trap” de NO FeDETC ₂	28
 Capítulo 4 – Técnicas Experimentais.....	 31
4.1 - Preparação das Amostras.....	31
4.1.1 - Soluções de FeDETC e Látex.....	31
4.1.2 - Fabricação do Sensor Sólido.....	32
4.1.3 - Resposta dos Sensores ao NO.....	35
4.2 - Calibração do Espectrômetro de RPE.....	36
 Capítulo 5 – Resultados e Discussões.....	 41
5.1 – Estudo da Concentração de FeDETC.....	43
5.2 – Procedimento I.....	45
5.3 – Procedimento II.....	49
5.4 – Procedimento III.....	52
5.4.1 - Estudo da Temperatura do Processo de Secagem do Látex.....	57
5.4.2 – Proporção de FeDETC na Matriz de Látex.....	59
5.5 – Curva de Calibração do NO pelo método de RPE.....	61
5.6 – Comentários Finais.....	62
 Capítulo 6 – Conclusões e Perspectivas.....	 63
 Referências.....	 64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	- Níveis de energia do elétron em função da intensidade do campo magnético H_r é o valor do campo na ressonância		5
Figura 1.2	- Absorção das microondas de um espectro de RPE (a) e a primeira derivada do espectro de absorção das microondas(b).		6
Figura 1.3	- Transições do elétron entre os dois níveis de energia provocada pela ressonância e pela relaxação spin-rede		7
Figura 1.4	- Esquema de níveis de energia para um sistema com $S = I = \frac{1}{2}$ na presença de um campo magnético externo intenso.		11
Figura 2.1	- Estrutura molecular da borracha (a), macromolécula constituída por vários meros (b)		17
Figura 2.2	- Vista Parcial do seringal da ESALQ		18
Figura 2.3	- Corte para sangria da seringueira em meia espira e coleta. Madeira leve (densidade $0,45 \text{ g/cm}^3$), mole de baixa durabilidade natural.		19
Figura 3.1	- Diagrama do orbital molecular para o óxido nítrico.		24
Figura 3.2	- Esquema demonstrando o kit do método de Griess		27
Figura 3.3	- Esquema demonstrando o método		27

quimioluminescente

Figura 3.4	- Estrutura do complexo $\text{Fe}(\text{NO})\text{DETC}_2$		29
Figura 3.5	- Diagrama do orbital molecular para derivados ditiocarbamatos de FeNO^{2+} com geometria tetragonal piramidal (TP)		29
Figura 3.6	- Fórmulas estruturais dos compostos utilizados na obtenção de “traps” de NO.		30
Figura 4.1	- Solução de látex à esquerda e o complexo FeDETC ($\text{FeCl}_3 + \text{DETC} + \text{DMF}$) à direita.		32
Figura 4.2	- Representação do processamento para a produção da solução látex- FeDETC .		33
Figura 4.3	- (a) amostra e (b) sensores.		33
Figura 4.4	- (a) solução de látex, (b) solução de FeDETC e (c, d) mistura de látex e FeDETC		34
Figura 4.5	- Espectrômetro VARIAN E4 utilizado para estudo e caracterização dos sensores de NO.		37
Figura 4.6	- Métodos de obtenção da intensidade do sinal de RPE: (a) pela altura do sinal, e (b) pela área obtida por dupla integração do próprio sinal de RPE.		38
Figura 4.7	- Espectro de RPE obtido utilizando-se os parâmetros adquiridos da Tabela 4.2		40
Figura 5.1	- Sinal de RPE de NO em função dos números de		44

moles de cloreto de ferro e DETC.

	Monitoramento do sinal de RPE obtido do sensor	
Figura 5.2	- fabricado pelo procedimento I e imerso por 2 h em uma solução de 2,5mM de NO.	 46
Figura 5.3	- Intensidade pico a pico do sinal de RPE em função do tempo.	 47
Figura 5.4	- Espectro de RPE de dois sensores, (a) e (b) obtidos a partir da mesma amostra.	 48
Figura 5.5	- Comportamento do sinal de RPE para o sensor “tipo” membrana: (a) = Início, (b) = 192h, (c) = 360h, (d) = 552h, (e) = 864h	 49
Figura 5.6	- Intensidade do sinal RPE em função do tempo dos sensores de NO fabricados com diferentes velocidades de rotação. Os sensores forma imersos em uma solução de 2.5 mM de NO por 2 horas.	 50
Figura 5.7	- Intensidade do sinal RPE em função do tempo dos sensores de NO fabricados. Os sensores forma imersos em uma solução de 2.5 mM de NO por 2h.	 51
Figura 5.8	- Intensidade do sinal RPE em função do tempo dos sensores de NO fabricados. Os sensores foram imersos em uma solução de 2.5 mM de NO por 2 horas.	 53
Figura 5.9	- Reprodutibilidade dos sensores em solução de 2,5mM	 55

	Comportamento do sinal de RPE para o sensor	
Figura 5.10	- preparado pelo método III: (a) = Início, (b) = 426h, (c) = 700h.	 56
	Espectros de RPE de um sensor em uma primeira	
Figura 5.11	- imersão em solução de NO (curva preta) e em uma segunda imersão, 40 dias após (curva vermelha).	 57
	Resposta dos sensores obtidos a partir de	
Figura 5.12	- temperaturas diferentes.	 58
	Intensidade do sinal de RPE em função do tempo	
Figura 5.13	- para cada sensor. As proporções entre FeDETC e látex seguem a numeração apresentada na Tabela 5.2. Concentração de NaNO ₂ de 2,5mM.	 60
	Curva de Calibração: Sinal de RPE x	
Figura 5.14	- Concentração de NO.	 62

LISTAS DE TABELAS

Tabela 3.1	- Classificação das NOS conforme abreviaturas, sinónímias e dependências de Ca^{2+}		23
Tabela 3.2	- Métodos de detecção de NO		26
Tabela 4.1	- Proporções entre FeDETC e látex utilizadas para a fabricação dos sensores.		35
Tabela 4.2	- Condições em que foram feitas as medidas de RPE nos ensaios realizados.		39
Tabela 5.1	- Relação das concentrações molares e números de moles.		44
Tabela 5.2	- Relação das Amplitudes dos sinais dos sensores e suas respectivas massas.		54
Tabela 5.3	- Relação entre os sensores e as temperaturas da matriz		58
Tabela 5.4	- Proporções utilizadas entre FeDETC e látex no estudo de sensibilidade do sensor.		59

PREFÁCIO

O óxido nítrico (NO) é uma molécula produzida nos sistemas biológicos que desempenha papel fundamental em fisiologia, patologia e farmacologia, e tem sido amplamente estudado nas últimas décadas. Atualmente, pesquisas sobre o mecanismo de produção, armazenamento e distribuição do NO nos seres vivos têm sido objeto de interesse de pesquisadores em todo o mundo.

A detecção direta da produção do NO nos seres vivos apresenta uma série de dificuldades devidas, principalmente a sua alta reatividade. É comum a detecção de sua presença de maneira indireta, considerando-se as concentrações de nitrato (NO_3) e nitrito (NO_2) no meio.

Por apresentar um elétron desemparelhado em sua camada de valência, o NO possui propriedades paramagnéticas, sendo possível sua detecção por espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE).

Tendo em vista a importância biológica e econômica do óxido nítrico, pretendemos, neste trabalho, desenvolver e caracterizar um sensor para a detecção e quantificação do NO baseadas na técnica de RPE utilizando uma matriz sólida desenvolvida a partir do látex natural.

O látex extraído da seringueira *Hevea brasiliensis* tem se mostrado promissor em aplicações biomédicas. Membranas constituídas deste material têm sido usadas como próteses e enxertos médicos devido a suas características de bio-compatibilidade[1] e estímulo natural a angiogênese[2,3].

Nosso sensor consiste no aprisionamento do complexo ferro(II)-dietilditiocarbamato $\text{Fe}^{2+}(\text{DETC})_2$, dentro de uma matriz sólida de látex. O látex- $\text{Fe}(\text{DETC})_2$ foi obtido pela mistura do látex (extraído da fazenda experimental da Escola Superior de Agricultura-ESALQ, USP-Piracicaba/SP).

Estudamos algumas metodologias de preparo dos sensores em função das respostas de reprodutibilidade, sensibilidade e estabilidade. Conseguimos obter um protocolo de preparação dos sensores com repostas satisfatórias dentro dos quesitos citados.

No **Capítulo 1** será discutida a espectroscopia por RPE, com ênfase no fenômeno da ressonância paramagnética e interação nuclear hiperfina. O **Capítulo 2** discorre sobre o látex natural, discutindo o látex da seringueira e o látex natural. O **Capítulo 3** trata da molécula do NO, discorrendo sobre: Fisiologia do NO, Bioquímica do NO, e Métodos de Quantificação do NO.

As técnicas experimentais utilizadas são discutidas no **Capítulo 4**. Os resultados obtidos e as discussões serão discutidos no **Capítulo 5**. No **Capítulo 6, - Conclusões e Perspectivas Futuras -** retoma pontos interessantes abordados neste trabalho, além de indicar pontos a serem explorados experimentalmente e teoricamente.

Capítulo 1 – RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA

1.1 - Introdução

A (espectroscopia por Ressonância Paramagnética Eletrônica-RPE ou *Electron Paramagnetic Resonance-EPR*), é uma técnica que permite detectar e caracterizar moléculas com elétrons desemparelhados (espécies paramagnéticas), sem alterar ou destruir as moléculas [4]. Alguns exemplos destas espécies são: radicais livres, biradicais, defeitos pontuais em sólidos ou imperfeições cristalinas. Radicais livres são frequentemente encontrados em sistemas biológicos, e são moléculas com um só elétron desemparelhado. Para poder detectar estas moléculas, o elétron desemparelhado deve absorver energia eletromagnética em presença de um campo magnético. Regulla e Deffner [5] definem o fenômeno RPE como a absorção ressonante de energia eletromagnética em substâncias paramagnéticas pela transição do spin de um elétron desemparelhado entre diferentes níveis de energia, em presença de um campo magnético. As primeiras observações experimentais da ressonância paramagnética eletrônica foram reportadas em 1945 por Zavoisky [6] medindo a potência absorvida na faixa de radio-freqüência. Cummerow e Halliday [7], em 1946, também realizaram medições de RPE, mas na região das microondas.

1.2 - O Fenômeno da Ressonância Paramagnética

Para o nosso caso, usaremos $\text{spin} = \frac{1}{2}$, portanto teremos 2 níveis de energia. A transição entre os dois níveis Zeeman ($\pm \frac{1}{2} g_e \beta H$) de um sistema paramagnético pode ser induzida pela irradiação de uma onda eletromagnética, com uma frequência ν satisfazendo a condição de ressonância:

$$\Delta E = g_e \beta H_r = h\nu \quad (2.1)$$

Sendo:

ΔE = diferença de energia para elétrons entre os dois níveis.

g_e = é denominado fator g .

$\beta = e\hbar/2m_e c$ é o magneton de Bohr.

H_r = é o campo magnético de ressonância.

h = é a constante de Planck.

ν = frequência de microondas.

O fator g , ou fator de desdobramento espectroscópico vale 2,0023 para o elétron livre.

Com o processo de absorção de energia, a população dos dois níveis de energia N_- e N_+ tende a se igualar. Entretanto, o elétron situado no nível mais elevado libera um quantum de energia $h\nu$ e retorna para o nível de menor energia, satisfazendo a lei de equilíbrio de Maxwell-Boltzmann. Um esquema de energia dos níveis Zeeman e as correspondentes transições podem ser vistas na figura 1.1.

[Figura 1.1] Níveis de energia do elétron em função da intensidade do campo magnético H_r é o valor do campo na ressonância.

A outra condição para que aconteça a ressonância é que a componente magnética da onda eletromagnética deve ser perpendicular ao campo H_r . Nos experimentos, para atingir a ressonância, segundo a equação (2.1), pode-se variar a frequência do campo eletromagnético oscilante ou o valor do campo magnético. Na prática prefere-se, por considerações experimentais, varrer o campo (H_r), deixando a frequência ν fixa. Valores típicos para arranjos experimentais de RPE são: Banda-X, tem-se que $\nu = 9.5\text{GHz}$ e $H_r \cong 340\text{ mT}$; para a Banda-K, $\nu = 25\text{GHz}$ e $H_r \cong \sim 900\text{ mT}$; para a Banda-Q, $\nu = 70\text{GHz}$ e $H_r \cong \sim 2500\text{ mT}$.

As formas de linhas típicas dos sinais de RPE são Gaussianas e Lorentzianas [8]. A figura 1.2 ilustra as características do tipo de linha Gaussiana, em termos da (a) absorção normalizada e (b) da primeira derivada.

[Figura 1.2] Absorção das microondas de um espectro de RPE (a) e a primeira derivada do espectro de absorção das microondas(b).

1.3 - Absorção de Energia e Relaxação Spin-Rede

De acordo com a equação (2.1), a interação da onda eletromagnética de energia $h\nu$ com um elétron desemparelhado (localizado num campo magnético H_r), faz com que este experimente uma transição do nível inferior, com energia $-\frac{1}{2}g\beta H_r$, ao nível superior, com energia $+\frac{1}{2}g\beta H_r$, ou vice-versa (Figura 1.3). Em equilíbrio termodinâmico, geralmente o nível inferior de energia tem uma população maior que o nível superior, portanto o sistema de spins absorve energia da onda eletromagnética nesse processo. Paralelamente a isto acontece também o contrário, ou seja, um elétron pode experimentar uma transição desde o nível superior para o inferior (ou vice-versa) e ceder energia ao ambiente que o rodeia (rede).

[Figura 1.3] Transições do elétron entre os dois níveis de energia provocada pela ressonância e pela relaxação spin-rede.

Na ausência de onda eletromagnética (mas, na presença do campo H), se o sistema de spins encontra-se à temperatura (T), existirá uma diferença de população (n_0) entre os dois níveis de energia. Se N_+ representa o número de spins no nível superior e, N_- representa o número de spins no nível inferior, então, os spins se distribuirão entre os dois níveis de acordo a distribuição de Boltzmann:

$$\frac{N_+}{N_-} = \exp\left(-\frac{\Delta E}{kT}\right) = \exp\left(-\frac{g\beta H}{kT}\right) \quad (2.2)$$

Tudo o que foi anteriormente descrito pode ser mais bem entendido utilizando o conceito de probabilidades de transição. Se $P\uparrow$ representa a probabilidade por unidade de tempo de que o elétron experimente uma transição do nível inferior ao superior produzida por uma onda eletromagnética, e $P\downarrow$ a probabilidade de transição contrária (ver figura 1.3), então, a taxa de mudança do nível superior (por causa da ressonância) é dada por:

$$\frac{dN_+}{dt} = N_- P\uparrow - N_+ P\downarrow \quad (2.3)$$

$N = N_+ + N_-$, representa o número total de spins.

E $n_0 = N_+ - N_-$, representa a diferença de população no equilíbrio termodinâmico, e esta diferença é necessária para que exista absorção de energia na presença da onda eletromagnética. Contudo, o sistema de spins não está isolado, portanto parte da energia ganha acaba sendo cedida para outros sistemas. Esse mecanismo é denominado relaxação spin-rede. Toda vez que o valor de N_+ supera o valor no equilíbrio termodinâmico, devido à absorção de energia da onda eletromagnética, este mecanismo de relaxação, caracterizado por um tempo t_1 (chamado de tempo de relaxação spin-rede), restabelece o equilíbrio.

$$N_+ = \frac{1}{2} (N + n) \text{ e } N_- = \frac{1}{2} (N - n) \quad (2.4)$$

E a equação (2.3) pode ser escrita como:

$$\frac{dn}{dt} = N(P\uparrow - P\downarrow) - n(P\uparrow + P\downarrow) \quad (2.5)$$

Assume-se que $P\uparrow = P\downarrow = P$, neste caso a equação (2.5) fica:

$$\frac{dn}{dt} = -2nP \quad (2.6)$$

A probabilidade P está relacionada com a intensidade da onda eletromagnética.

Por outro lado, se $W\uparrow$ representa a probabilidade por unidade de tempo de que a relaxação spin-rede produza a transição do nível inferior ao superior e, $W\downarrow$ a probabilidade para a transição contrária (figura 1.4), então, a taxa de mudança do nível superior (causada pela relaxação) é dada por:

$$\frac{dN_+}{dt} = N_- W\uparrow - N_+ W\downarrow \quad (2.7)$$

Usando as expressões (2.4), a equação (2.7) fica como:

$$\frac{dn}{dt} = N(W\uparrow - W\downarrow) - n(W\uparrow + W\downarrow) \quad (2.8)$$

Se definirmos $T_1 = 1/(W\uparrow + W\downarrow)$, representando o tempo característico que o sistema demora a atingir o equilíbrio termodinâmico;

E, $n_0 = N(W\uparrow - W\downarrow)/(W\uparrow + W\downarrow)$, representa a diferença de população no equilíbrio térmico.

Então, a equação (2.8) fica como:

$$\frac{dn}{dt} = \frac{n_0 - n}{T_1} \quad (2.9)$$

Neste caso, diferentemente do que foi analisado anteriormente $W\uparrow \neq W\downarrow$.

Combinando as equações (2.6) e (2.9) tem-se a taxa de transição total devida à onda eletromagnética e a relaxação spin-rede:

$$\frac{dn}{dt} = \frac{n_0 - n}{T_1} - 2nP \quad (2.10)$$

No estado estacionário, $dn/dt = 0$, e (2.10) fica como:

$$n = \frac{n_0}{1 + 2PT_1} \quad (2.11)$$

Se $2PT_1 \ll 1$, então $n \approx n_0$ e a absorção de energia da onda eletromagnética não perturba muito a diferença de população de seu valor (n_0) no equilíbrio termodinâmico. No entanto, se $P \gg 1/T_1$, o sistema de spins não consegue liberar o excesso de energia absorvida para a rede o suficientemente rápido e então, a diferença de população tende a zero ($n \rightarrow 0$). Esta condição é conhecida como condição de saturação [9]. Como a probabilidade P depende da potência das microondas, a forma de evitar a saturação é utilizar valores de potência adequados.

1.4 - Interação Nuclear Hiperfina

Além do campo magnético externo, o elétron desemparelhado está sujeito a campos magnéticos locais, que se adicionam vetorialmente ao campo externo, produzido, por exemplo, pelos núcleos vizinhos. A interação entre o elétron desemparelhado e o momento magnético de um núcleo vizinho chama-se de interação nuclear hiperfina. Este tipo de interação faz com que os níveis de energia do elétron (figura 1.1 e 1.3) sofram um desdobramento criando uma estrutura espectral chamada de estrutura hiperfina (ver figura 1.4).

O spin nuclear está caracterizado pelo número quântico I , e como no caso do elétron, a componente em z do spin nuclear está quantizada e é representada pelo número quântico m_I . Para um núcleo com spin I , m_I pode adquirir $2I+1$ valores possíveis, o que significa que existem $2I+1$ estados possíveis do spin nuclear.

[Figura 1.4] Esquema de níveis de energia para um sistema com $S = I = 1/2$ na presença de um campo magnético externo intenso.

Como H_{local} depende de m_I , a ressonância pode ser observada para $2I+1$ valores do campo magnético externo H_{ext} . Assim, o espectro RPE consistirá de várias linhas de igual intensidade, conhecidas como linhas de desdobramento hiperfino, e a separação (A) entre as linhas é chamada de constante de desdobramento hiperfino, a qual é uma medida da intensidade da interação entre o elétron e o núcleo.

Devido à extensão espacial da função de onda de um elétron desemparelhado, é freqüente observar interação hiperfina com mais de um núcleo. Desta forma, a interpretação da estrutura hiperfina permite conhecer o espalhamento microscópico do elétron. Existem dois casos limites:

a) quando o elétron desemparelhado está localizado principalmente num íon central rodeado de átomos pertencentes a moléculas coordenadas (íons de metais de transição), predomina a interação com o núcleo central, no entanto a interação com os núcleos dos átomos coordenados é muito menor.

b) no outro caso, o elétron desemparelhado interage igualmente com um número de núcleos equivalentes, e é comum em radicais orgânicos.

1.5 – Constituição do Espectrômetro de RPE

O espectrômetro de RPE é composto das seguintes partes [10]:

- a) a fonte do campo magnético externo.
- b) a fonte de microondas.
- c) a guia de ondas e a cavidade ressonante.
- d) o sistema de detecção e registro do espectro.

1.5.1 - Fonte do Campo Magnético Externo

O campo magnético é produzido com eletroímãs que geram um campo suficientemente homogêneo sobre o volume da amostra. O valor do campo pode variar entre zero e vários milhares de Gauss. O campo deve ser homogêneo no espaço e não variar no tempo, mas variações menores de 10mG são toleráveis para trabalhos de alta resolução, e variações de até 100mG são geralmente aceitáveis com amostras biológicas devido a presença de linhas inerentemente largas. A homogeneidade obtém-se com peças polares de desenho apropriado que podem ter um diâmetro de até 40cm e uma separação de 4 a 8cm. A estabilização do campo é conseguida usando um dispositivo sensível a campo magnético tal como um cristal de efeito Hall. A voltagem de saída do cristal devido ao efeito Hall é uma função linear do campo magnético e é usado em uma retro alimentação para estabilizar o campo e permitir sua variação de forma controlada.

1.5.2 - Fonte de Microondas

Existem vários tipos de fontes de microondas: magnetrons, klytrons, e geradores de estado sólido tais como varactors, e osciladores de efeito Gunn. O gerador de microondas mais usado no momento é o gerador de diodo Gunn.

Para entendermos o mecanismo de geração de microondas vamos utilizar a klystron. A klystron gera potência de microondas na faixa de frequências de 500 até 35000 MHz, e alguns produzem potência de onda continua (CW) até 25 kW. Outros produzem potência pulsada de até 10^4 W, mas em espectrômetros de ressonância paramagnética eletrônica, o klystron proporciona saída de CW com potências menores de 1W. O klystron é uma válvula formada por um cátodo esquentado por corrente contínua, um ânodo e um eletrodo refletor. O ânodo é uma cavidade adjacente a uma caixa cujas paredes frente ao cátodo e ao refletor são grelhas metálicas. A cavidade está formada pelo corpo da válvula de tal forma que o ânodo está ao potencial de terra. Lateralmente, o ânodo termina numa janela de material isolador que se acopla ao guia de ondas. Ao aplicar um potencial negativo ao cátodo, os elétrons emitidos (por emissão termoiônica) aceleram-se para o ânodo atravessando as grelhas em direção ao refletor. Como o potencial do refletor também é negativo, os elétrons são freados e repelidos pelo refletor voltando ao ânodo. Para determinados potenciais do refletor, os elétrons emitidos pelo cátodo e os repelidos pelo refletor começam a oscilar em fase, e a densidade de elétrons muda periodicamente em forma sustentada. Estas oscilações são as que geram as microondas.

1.5.3 - Guia de Ondas e Cavidade Ressonante

Para levar as microondas para a cavidade ressonante utiliza-se uma guia de onda, a qual é um tubo oco comprido de seção transversal retangular com paredes internas metálicas e polidas. Suas dimensões estão determinadas pelo comprimento de onda das microondas (3 cm no caso de 9 GHz). As

componentes da ponte de microondas são, por exemplo: o T mágico, o isolador, o medidor de comprimento de onda (ou frequência), e o atenuador.

O T mágico é um dispositivo que serve para acoplar a energia da microonda para dentro e fora da cavidade ressonante. Atua dirigindo a microonda que sai do klystron para a cavidade ressonante, e a microonda que é refletida pela cavidade é dirigida para o detector. Esta função também é realizada por outro dispositivo chamado circulador.

Num espectrômetro típico, o T mágico está conectado com o klystron através de um isolador e um atenuador. O isolador é um dispositivo de ferrita que faz circular a microonda num sentido só. Desta forma impede-se que as ondas refletidas na ponte retornem ao klystron. O atenuador é uma peça de material dielétrico de superfície condutora que é introduzido no guia de ondas e absorve uma fração variável da potência gerada pelo klystron.

A cavidade ressonante é um dispositivo usado para concentrar ou focar a energia das microondas de forma análoga a uma lente. A cavidade ressonante pode ser retangular ou cilíndrica, de transmissão ou reflexão. Uma cavidade de transmissão tem um orifício de acoplamento em ambos de seus extremos para a guia de onda. Uma cavidade de reflexão tem um orifício de acoplamento só num de seus extremos, que recebe o nome de íris. A cavidade de reflexão é mais usada que a de transmissão devido a ser menos ruidosa. Como dentro da cavidade produzem-se ondas estacionárias, ao colocar a amostra dentro dela, a posição da amostra deve coincidir com a de máximo campo magnético e de mínimo campo elétrico. O grau na qual uma cavidade é capaz de amplificar o campo de microonda é descrita pelo fator Q definido por:

$$Q = 2\pi(\text{máxima energia da microonda armazenada na cavidade}) / (\text{energia perdida por ciclo}).$$

Valores de Q da ordem de 5000 a 10000 são típicos para cavidades retangulares de boa qualidade operando na banda-X.

1.5.4 - Sistema de Detecção e Registro do Espectro

Os espectrômetros de RPE modernos usam um diodo semicondutor para detectar as microondas, atuando como um retificador, transformando as microondas em corrente contínua. Quando o campo magnético externo atinge o valor em ressonância, a amostra começará a absorver energia das microondas. Isto causará uma pequena diminuição no Q da cavidade e, por conseguinte, uma diminuição nas microondas refletidas. Desta forma, uma absorção ressonante aparecerá como uma mudança na corrente no detector.

Geralmente os sinais gerados no diodo são pouco intensos, para tal utilizam-se esquemas de detecção apropriados, por exemplo, a técnica de **detecção sensível à fase**. Para realizar este tipo de detecção, colocam-se um par de bobinas de Helmholtz (controladas por um oscilador) em ambos os lados da cavidade ressonante. Desta forma, um campo magnético AC de amplitude pequena e de frequência ν_m (100 kHz) é superposto ao campo DC. Quando o campo magnético na amostra está perto da ressonância, uma componente do sinal detectado estará modulado na frequência ν_m . Este sinal é amplificado num amplificador de banda estreita, cuja saída serve como uma das entradas do detector sensível à fase. A outra entrada deste detector é o sinal de entrada das bobinas de modulação (bobinas de Helmholtz). A saída filtrada do detector é proporcional tanto à diferença de amplitude como à diferença de fase dos dois sinais de entrada.

A saída do detector sensível à fase é retificada e enviada a um registrador que pode ser um osciloscópio, graficador, ou microcomputador. Se a amplitude do campo de modulação mantém-se pequena comparada com a largura do sinal de RPE, o sinal registrado será próximo da **primeira derivada** (ou primeiro harmônico) do sinal de absorção.

Capítulo 2 - O LÁTEX NATURAL

2.1 – Introdução

A seringueira *Hevea brasiliensis* é uma árvore extensivamente cultivada no sudeste da Ásia, no entanto é nativa da bacia do rio Amazonas, no Brasil. A borracha natural é um material de elevado valor econômico para a indústria, principalmente a automobilística, devido a suas características físicas, como elasticidade, plasticidade, resistência ao desgaste (fricção), propriedades de isolamento elétrico.

O látex extraído da seringueira *Hevea brasiliensis* tem se mostrado promissor em aplicações biomédicas. Membranas feitas deste material têm sido usadas como próteses e enxertos médicos devido a suas características de bio-compatibilidade e estímulo natural a angiogênese [11].

2.2 - O Látex da Seringueira

O látex da seringueira *Hevea brasiliensis* forma um sistema coloidal polifásico e polidisperso. Depois de centrifugado, o látex pode ser representado como sendo formado por três componentes fundamentais:

1. **Fase borracha (37%) (hidrocarboneto isoprênico)**, ver figura 2.1.

Apresenta coloração branca, formada quase exclusivamente de borracha.

[Figura 2.1] Estrutura molecular da borracha (a), formas das cadeias (b).

2. Soro (48%)

Fração intermediária aquosa é o meio dispersivo do sistema coloidal látex e contém proteínas e sais dissolvidos.

3. Fração de fundo (depósito) (15%)

Apresenta coloração amarela e é constituída por: lutóides (proteínas, fosfolipídios e sais minerais) e partículas Frey-Wyssling (constituídas de carotenóides e lipídios conferindo à borracha, a coloração amarela).

O processo de separação destas partes se dá através da ação de uma força centrífuga elevada (40.000 rpm).

O látex pode ser considerado um composto perecível devido à composição do soro que contém carboidratos, proteínas, sais minerais e microorganismos, sendo que ele se coagula espontaneamente de 8 a 10 horas após a colheita, separando a borracha em forma de coágulo.

O látex natural no primeiro instante que se escoia da seringueira, tem pH levemente alcalino ou neutro (7,0-7,2). Por efeito de ações químicas e, sobretudo bioquímicas vai se acidificando rapidamente, em contato com o ar.

A figura 2.2 mostra a vista parcial do seringal de onde é produzido o látex que serve como matriz para o sensor sólido.

[Figura 2.2] Vista Parcial do seringal da ESALQ.

2.3 - Borracha Natural

A borracha é um importante produto natural o qual é obtido de um líquido leitoso (látex) extraído de uma variedade de árvores tropicais, especialmente da *Hevea brasiliensis*. A quantidade de borracha em látex varia entre 30 e 50% [12]. As partículas de borracha estão suspensas numa emulsão aquosa a qual também contém materiais protéicos. Elas são prontamente coaguladas por ácidos tais como ácido fórmico ou ácido acético, e para uso comercial são então formadas em chapas por tratamento em uma prensa aquecida. A figura 2.3 mostra a coleta do látex.

[Figura 2.3] Corte para sangria da seringueira em meia espora e coleta. Madeira leve (densidade $0,45 \text{ g/cm}^3$), mole, de baixa durabilidade natural.

2.4 - Beneficiamento do Látex Natural

Devido ao fato do látex natural de seringueira sofrer modificações em suas características de qualidade em um período relativamente curto, torna-se necessária a utilização de certos artifícios para aumentar a durabilidade destes produtos no mercado. O principal artifício é a estabilização do látex bruto com amônia em quantidade suficiente para elevar o pH até aproximadamente 10,2.

Sob o ponto de vista técnico, o beneficiamento do látex e produtos secundário da seringueira segue duas linhas básicas [13], linha de látex concentrado e linha de borracha sólida. Elas são definidas, principalmente, pelos produtos finais do beneficiamento e pela utilização industrial a que se

destinam os produtos. A linha que mais nos interessa é a de látex concentrado, pois deste material saem os produtos destinados a aplicações médicas.

A matéria prima da linha de látex concentrado é o látex de campo, sendo que este passa por um processo de concentração (retirada da água) elevando o teor de borracha seca para 60 % através de processo físico-mecânico (centrifugação) ou físico-químico (cremagem). Deste processo resulta o látex com 60% de borracha seca e o soro que contém entre 0,5% e 2% de borracha seca.

Capítulo 3 – A MOLÉCULA DE NO

3.1 - Introdução

Em 1980, Furchgott e Zawadzki [14] demonstraram que o relaxamento vascular induzido por acetilcolina é dependente da presença do endotélio e evidenciaram que este efeito foi mediado por um fator humoral lábil, mais tarde conhecido como fator de relaxamento dependente do endotélio (EDRF). O óxido nítrico foi escolhido como a molécula do ano de 1992 [15].

O óxido nítrico pode ser um oxidante ou um redutor dependendo do meio em que ele está e é rapidamente destruído pelo oxigênio [16], sendo que sua oxidação produz nitrito e nitrato. O NO tem o menor peso molecular de qualquer produto de secreção celular de mamíferos; sua meia-vida é curta e a especificidade de suas reações é mínima. O NO é citotóxico e vasodilatador [17] e modula reações inflamatórias ou antiinflamatórias, dependendo do tipo celular e do estímulo.

A molécula do NO tem um elétron desemparelhado e reage facilmente com oxigênio, radical superóxido, ou metais de transição, como ferro, cobalto, manganês ou cobre. O NO tem alta afinidade com o heme, encontrado em proteínas intracelulares (óxido nítrico-sintase, cicloxigenase e guanilato ciclase) e também se liga a grupos -SH, formando tiol; é um gás incolor e estável e moderadamente solúvel em água.

3.2 - Fisiologia do Óxido Nítrico

O interesse na molécula de NO teve um grande crescimento nas últimas duas décadas após as descobertas de seu papel fundamental na fisiologia humana. Esta molécula de apenas dois átomos é um mensageiro muito importante e versátil em sistemas biológicos [18].

O óxido nítrico atua como mecanismo fundamental de sinalização nos sistemas cardiovascular e nervoso [19,20] e está presente no mecanismo de ação do sistema imunológico [21]. Acredita-se também que ele esteja relacionado a danos no tecido em situações de isquemia [22] e morte neural [23]. Sua ação na imuno-regulação está presente na inflamação e nos mecanismos de auto-imunidade [24]. Como sinalizador, age dentro de muitos tecidos na regulação de diversas áreas do processo fisiológico incluindo neurotransmissão. É altamente tóxico em altas concentrações [25,26]. O interesse no estudo do NO intensificou-se a partir do momento que ficou comprovado ser o óxido nítrico o responsável pela atividade de vasodilatação derivada do endotélio (EDRF) [27].

3.3 - A Bioquímica do NO

3.3.1 - Biossíntese e enzimologia

Nos sistemas biológicos, o NO é sintetizado por uma única enzima, a NO sintase, que é um complexo enzimático auto-suficiente do tipo P450 a partir da L-arginina conforme a reação clássica (ver tabela 3.1):

[Tabela 3.1] Classificação das NOS conforme abreviaturas, sinónímias e dependências de Ca^{2+} .

Nome	Abreviatura	Sinónímia	Dependência- Ca^{2+}
Sintase neuronal	<i>bNOS</i> (brain-NOS)	Isoforma I	Ca^{2+} - Dependente
<i>NOS I</i>	<i>nNOS</i> (neural-NOS)	Isoenzima I	
Sintase indusível	<i>iNOS</i> (inducible-NOS)	Isoforma II	Ca^{2+} - independente
<i>NOS II</i>	<i>macNOS</i> (macrophage-NOS)	Isoenzima II	
Sintase endotelial	<i>eNOS</i> (endothelial-NOS)	Isoforma I I	Ca^{2+} - Dependente
<i>NOS III</i>	<i>EC-NOS</i> (endothelial constitutive-NOS)		

3.3.2 - Propriedades Físico-Químicas do NO

O NO é um gás incolor na temperatura ambiente. Sua máxima solubilidade em água é semelhante a do oxigênio puro, 2 - 3 mM [28]. É uma molécula apolar, o que caracteriza a sua alta difusão através das membranas. Certamente uma das propriedades mais importantes do NO para o presente trabalho é o paramagnetismo. Usando uma descrição básica, o formalismo de Lewis, fica evidente que o NO apresenta um elétron desemparelhado.

Sua configuração pode ser representada em forma de um diagrama de orbital molecular onde o elétron desemparelhado reside em um orbital antiligante do tipo $\pi_x^* \pi_y^*$ (figura 3.1).

[Figura 3.1] Diagrama do orbital molecular para o óxido nítrico.

Ao contrário do carbono e oxigênio, o NO não tem a tendência de dimerização, ou seja, em condições normais de temperatura e pressão o NO tende a permanecer na forma monomérica [29]. Esta deficiência de dimerização tem sido atribuída ao fato de que a ordem da ligação da molécula não muda quando duas moléculas de NO interagem entre si [30].

ordem da ligação = 2,5 ordem da ligação = 5
(2,5 por NO)

Como este trabalho está focado na utilização de complexos de Fe como agentes aprisionadores do NO, nos limitaremos a uma abordagem superficial das reações químicas envolvendo grupamentos de ferro.

O NO se liga a grupos Fe-heme para produzir complexos heme-nitrosil.[31] Semelhantemente, o Fe^{2+} complexado com uma protoporfirina IX na forma heme, tem alta afinidade ao NO como pode ser visto nas heme-proteínas.

A afinidade de ligação da hemoglobina - NO excede sua afinidade de ligação para o monóxido de carbono em várias ordens de magnitude. O NO reage com o íon Fe^{2+} do heme para produzir espécies paramagnéticas NO-heme [32]. Pode também formar complexos com metais de transição não associados com um grupamento heme [33]. Outras reações de nitroação envolvendo o NO são prováveis de ocorrer nas células [34].

O óxido nítrico é solúvel em metanol (14 mM), tolueno (11 mM), e *n*-hexano (18 mM), sugerindo que é lipossolúvel e pode prontamente se dissolver nas membranas das células. A reação mais conhecida do NO em fluidos fisiológicos contendo oxigênio é a oxidação do mesmo gerando nitrito (NO_2^-):

A velocidade de reação de formação de NO_2^- nesta reação é de segunda ordem na concentração de NO e de primeira ordem na concentração de O_2 :

$$d[\text{NO}_2^-]/dt = k[\text{NO}]^2[\text{O}_2] \quad (3.2)$$

3.4 - Métodos de Quantificação de NO

O NO é uma molécula altamente reativa e de curta duração na forma livre, estando presente em baixa concentração em sistemas biológicos. A maioria de seus métodos de detecção consiste em reagir-lo com alguma substância que o torne estável e passível de mensuração. Tabela 3.2 mostra o resumo de alguns métodos de detecção de NO e suas sensibilidades.

[Tabela 3.2] Métodos de detecção de NO.

Método	Espécie medida	Condições de medida	Aplicações *	Sensibilidade	Especificidade
Griess	NO, nitrito e nitrato	Absorb. (548 nm)	NC, CC, PO	μM	Muito baixa
Químio-luminescente	NO	Câmara de ozonização	NC, CC, PO, C	10 nM	Alta
RPE	NO-TRAP	Spin trap ou proteína	NC, CC, PO	μM	Média-alta
Eletro-química	NO	Eletrodos específicos	NC, CC, PO, A, C	10 nM	Alta

*NC: líquidos biológicos sem célula, CC: cultura de células, PO: órgãos em perfusão, A: animais, C: aplicações clínicas.

O Método de Griess mede a quantidade de NO, nitrito e nitrato em uma amostra. Neste método, todo o NO é oxidado e todo Nitrato é convertido a nitrito pela enzima nitrato redutase. A quantidade total de nitrito é então medida pela reação de diazotização estequiométrica com o reagente de Griess resultando em um produto de cor púrpura que absorve a luz de comprimento de onda = 540nm. Este método é disponível em kits comerciais (figura 3.2).

[Figura 3.2] Esquema demonstrando o kit do método de Griess.

O Método Quimioluminescente consiste em reagir o NO gasoso com ozônio, produzindo o radical NO_2 no estado excitado (NO_2^*). Quando retorna ao estado fundamental, cada NO_2^* libera um fóton que é medido por um fotossensor. Este método é muito sensível, mas destrói a amostra (figura 3.3).

[Figura 3.3] Esquema demonstrando o método quimioluminescente.

O método eletroquímico consiste na utilização de eletrodos feitos de tubos capilares de fibra de carbono envolvidos em camada de porfirina (Ni-3-metoxi-4-hidroxifenil porfirina) e Nafion (poliácido polifluoretado que rejeita ânions) recobertos com uma membrana “passa gás”. Quando o NO entra no

tubo, modifica o potencial do eletrodo, que é comparado com um eletrodo de referência.

A quantificação do NO através do método de RPE possui a vantagem de ser uma técnica que não destrói a amostra (como nos métodos de Griess e quimioluminescente) e também não há necessidade que se entre em contato direto com ela (como no método eletroquímico). No entanto se limita a espécies paramagnéticas, como vimos anteriormente.

A medida direta de NO só é possível sob duas condições especiais: NO na fase gasosa sob pressão controlada ou NO aprisionado por um *trap* ou adsorvida em matrizes inorgânicas.

3.5 - O aprisionador *trap* de NO FeDETC₂

Traps de NO são compostos capazes de se ligarem a ele formando compostos estáveis e com características especiais. Os complexos de ferro são os mais conhecidos *traps* de NO usados em técnicas de RPE por apresentarem sinais bastante característicos e poderem ser usados em experimentos *in-vivo* e *ex-vivo*.

Os complexos ferroditiocarbamatos são exemplos de *traps* na detecção de NO via RPE. Estes complexos foram extensamente estudados nos anos 60 e 70 devido a suas propriedades paramagnéticas únicas [35]. Hoje se sabe que sua importância é muito maior por causa das suas propriedades endógena de capturar moléculas de NO [36].

Um dos *traps* que utilizamos em nossos laboratórios é o $\text{Fe}[\text{S}_2\text{CN}(\text{C}_2\text{H}_5)_2]_2$ (FeDETC₂) em que o NO se liga para formar $\text{Fe}(\text{NO})[\text{S}_2\text{CN}(\text{C}_2\text{H}_5)_2]_2$, também conhecido como MNIC-DETC ou $[\text{Fe}(\text{NO})\text{DETC}_2]$, cuja estrutura é mostrada na (figura 3.4):

[Figura 3.4] Estrutura do complexo $\text{Fe}(\text{NO})\text{DETC}_2$.

Os complexos ferronitrosil pentacoordenados contendo ligantes quelantes com enxofre geralmente possuem geometria tetragonal piramidal. O complexo $\text{Fe}(\text{NO})\text{DETC}_2$ possui esta geometria com um ângulo de aproximadamente 173° na ligação Fe-N-O à temperatura de 20°C . A não linearidade do grupo FeNO faz com que o átomo de oxigênio fique acima dos anéis quelatos, mas preferencialmente na direção de um dos átomos de enxofre, resultando em um simetria C_1 para a molécula.

O diagrama de energia dos orbitais moleculares de complexos como o $\text{Fe}(\text{NO})\text{DETC}_2$ é mostrado na (figura 3.5).

[Figura 3.5] Diagrama do orbital molecular para derivados ditiocarbamatos de FeNO^{2+} com geometria tetragonal piramidal (TP).

O complexo $\text{Fe}(\text{NO})\text{DETC}_2$ é insolúvel em água e sua utilização geralmente procede na forma de suspensão aquosa ou em solução de soroalbumina bovina (BSA) ou suína (PSA) ou ainda o uso do dimetilformamida (DMF). Outros *traps* de NO que possuem o mesmo tipo de estrutura e são

solúveis em água são complexos quelatos de Fe com *N*-metil-*D*-glutamina dietilditiocarbamato de sódio (MGD) e com *N*-(ditiocarboxi)sarcosina (DTCS). Suas fórmulas estruturais são mostradas na (figura 3.6).

[Figura 3.6] Fórmulas estruturais dos compostos utilizados na obtenção de “traps” de NO.

Como o composto $\text{Fe}(\text{NO})\text{DETC}_2$ não possui nenhum eixo de simetria C_3 , os valores principais de g diferem entre si ($g_{xx} \neq g_{yy} \neq g_{zz}$). Este composto exibe um espectro de RPE de três linhas devido às interações hiperfinas com o nitrogênio do grupo nitrosil, com $g_{zz} = 2.028$, $g_{xx} = 2.048$ e $g_{yy} = 2.039$; e constantes de acoplamento hiperfino $A_z = 14.9$ G, $A_x = 12.6$ G, e $A_y = 12,2$ G.

Capítulo 4 – Métodos Experimentais

Neste capítulo, descrevemos os materiais e técnicas utilizadas na fabricação e caracterização dos sensores. Conforme descrito anteriormente, neste trabalho estudamos o látex natural como matriz para o complexo FeDETC que é o aprisionador de NO. Ao longo deste trabalho, realizamos três diferentes procedimentos para a fabricação do sensor, buscando obter reprodutibilidade e sensibilidade satisfatórias. Todas as medidas de caracterização do sensor foram feitas com um espectrômetro de RPE. Na primeira parte do capítulo, descrevemos os métodos de preparação das amostras, que incluem a descrição do material utilizado no preparo das soluções e do sensor sólido. Na segunda parte, descrevemos as características do espectrômetro utilizado, bem como as técnicas de calibração.

4.1 - Preparação das Amostras

A preparação da matriz de Látex é dividida em duas etapas: i) preparação das soluções de Látex e FeDETC e ii) obtenção do sensor a partir das soluções.

4.1.1 - Soluções de FeDETC e Látex

Para a preparação das soluções de FeDETC foram utilizados os seguintes compostos: Cloreto de ferro ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), N-N-dimetilformamida (DMF) ($\text{C}_3\text{H}_7\text{ON}$), N,N-dietilditiocarbamato de sódio trihidratado (DETC) ($\text{C}_5\text{H}_{10}\text{NNaS}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) adquirido da (Acrós Organics, Bélgica). A solução de FeDETC foi preparada dissolvendo-se 12 mg de Cloreto de ferro com 20mg de DETC em 3 mL de DMF sob agitação magnética durante 10 minutos. O látex foi coletado sob a supervisão do Prof. Dr. Marcos Silveira Bernardes da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - Esalq, da Universidade de São

Paulo – USP. As soluções, (figura 4.1), foram mantidas em geladeira, à temperatura de 4°C.

[Figura 4.1] Solução de látex à esquerda e o complexo FeDETC ($\text{FeCl}_3 + \text{DETC} + \text{DMF}$) à direita.

4.1.2. - Fabricação do Sensor Sólido

Para a obtenção do sensor foram estudados três diferentes procedimentos:

- (a)** Fabricação dos sensores a partir da mistura da solução de látex com o complexo FeDETC.
- (b)** Fabricação dos sensores utilizando a técnica de Spin-Coating.
- (c)** Fabricação dos sensores a partir da deposição da solução de látex em vidro de relógio lapidado.

Nos dois primeiros procedimentos, não obtivemos boa reprodutibilidade, que conseguimos depositando o látex e o complexo FeDETC em um vidro de relógio lapidado **(c)**.

(a) Fabricação dos sensores a partir da mistura do látex com o complexo FeDETC.

Neste procedimento misturamos 3 mL de FeDETC com 3 mL de Látex, como mostra a (figura 4.2), obtendo uma solução de látex-FeDETC.

[Figura 4.2] Representação do processamento para a produção da solução látex-FeDETC.

Para a obtenção do sensor sólido a solução de látex-FeDETC foi submetida a um procedimento de secagem a temperatura ambiente. Em seguida a amostra, (figura 4.3-a) é dividida em pedaços iguais, (figura 4.3-b) formando os sensores de NO.

[Figura 4.3] (a) amostra e (b) sensores.

(b) Fabricação dos sensores utilizando a técnica de Spin-Coating.

De maneira análoga ao procedimento descrito no item (a), misturamos 1mL de FeDETC com 1 mL de Látex, obtendo uma solução de látex_FeDETC. Esta solução foi depositada sobre um vidro de relógio lapidado variando-se os parâmetros: velocidades de 500, 1000 e 2000 rpm com rampa de 250, 500 e

1000 rpm/s respectivamente. Substrato e amostra foram deixados à temperatura ambiente para a evaporação do solvente. Depois de seca, a amostra foi retirada do substrato, obtendo-se o sensor.

(c) Fabricação dos sensores a partir da deposição da solução de látex em vidro de relógio lapidado.

Depositamos com auxílio de uma micropipeta a solução de látex sobre placa de Petri de maneira a formar uma película não muito espessa, (figura 4.4-a). Em seguida, utilizando a mesma micropipeta e adicionamos a solução de FeDETC sobre a solução de látex, (figura 4.4-b)

Com este método, conseguimos manter homogeneidade na concentração de FeDETC nos diferentes sensores. A mistura, (figuras 4.4-c, 4.4-d), foi deixada em estufa para secagem. Testamos diversas temperaturas: 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 50 °C e 60 °C.

[Figura 4.4] (a) solução de látex, (b) solução de FeDETC e (c, d) mistura de látex e FeDETC.

Estudamos o efeito da proporção entre complexo de FeDETC e látex na resposta do sensor ao NO. A tabela 4.1 lista as relações entre as soluções estudadas.

[Tabela 4.1] Proporções entre FeDETC e látex utilizadas para a fabricação dos sensores.

Sensor	Matriz de látex	Complexo FeDETC
1	0,2ml	0,1ml
2	0,1ml	0,1ml
3	0,1ml	0,2ml
4	0,1ml	0,3ml
5	0,1ml	0,4ml
6	0,1ml	0,5ml

4.1.3 - Resposta dos Sensores ao NO

Os sensores de NO obtidos a partir dos métodos descritos nos itens 4.2 (a), (b) e (c) foram estudados e caracterizados a partir do espectro de RPE que detecta a molécula de NO conjugada ao FeDETC. A molécula de NO pode ser obtida através da equação (4.1). A adição de ditionito de sódio a uma solução aquosa de nitrito de sódio causa a redução do nitrito a óxido nítrico. O NO liberado pode ser aprisionado pelo FeDETC que pode ser detectado pelo espectro de RPE.

Foram preparadas soluções de $NaNO_2$ com concentrações de 1,0 M, 10 mM, 5 mM e 2,5 mM em água Milli Q. As soluções de NO foram preparadas utilizando-se ditionito de sódio ($Na_2S_2O_4$) adquirido da LABSYNTH (Diadema, Brasil) e nitrito de sódio ($NaNO_2$) adquirido da ECIBRA (Curitiba, Brasil). Os sensores foram então imersos nestas soluções por diferentes tempos e em seguida foram realizadas medidas de RPE.

4.2 - Calibração do Espectrômetro de RPE

Os espectrômetros de RPE são classificados de acordo com a frequência e a modulação das microondas de trabalho. Com relação à modulação das microondas, existem espectrômetros que operam com microondas sem nenhuma modulação, chamados de CW (do inglês: *Continuous Wave* ou onda contínua); e os que operam com microondas moduladas, chamadas de espectrômetros pulsados.

Com relação à frequência das microondas, os espectrômetros levam os nomes das bandas de frequência com que operam. O espectrômetro de Banda X opera com frequência de microondas de aproximadamente 9.5 GHz, o de Banda K, 24 GHz e o de Banda Q, 35 GHz. Existem ainda comercialmente os espectrômetros de Banda L (1.5 GHz), Banda S (3.2 GHz) e Banda W (95 GHz). As frequências altas são utilizadas quando se pretende uma melhor resolução do fator g, enquanto que, as frequências baixas são usadas quando a resolução da interação hiperfina é um parâmetro importante, quando a presença de água impede o uso de frequências mais altas, ou quando queremos realizar medidas com amostras grandes, já que o tamanho da cavidade do espectrômetro é inversamente proporcional à frequência de trabalho.

Neste trabalho foi utilizado um espectrômetro VARIAN-E4 acoplado a um amplificador **Lock-in** EG&G 7260, a um **frequencímetro** HEWLETT PACKARD 5350B adaptado para ser controlado computacionalmente através de placa e cabos GPIB (figura 4.5).

[Figura 4.5] Espectrômetro VARIAN E4 utilizado para estudo e caracterização dos sensores de NO.

O espectrômetro opera com campos magnéticos de 0.025 a 0.6 T (250 a 6000 G) e com microondas não moduladas de frequências de 8.8 a 9.6 GHz sendo, portanto um espectrômetro CW de banda-X. Com as adaptações, o espectrômetro pode operar com várias frequências de modulação do campo magnético e também pode obter espectros de ressonância magnética detectada eletricamente (RMDE).

A técnica de RPE é capaz de quantificar a concentração das entidades paramagnéticas presentes na amostra em estudo. Para essa quantificação dois métodos são geralmente utilizados: i) medindo-se a intensidade do sinal, como mostra a (figura 4.6-a) e ii) medindo-se a área da curva obtida entre a linha de base e o sinal por dupla integração, como mostra a (figura 4.6-b)

a)

b)

[Figura 4.6] Métodos de obtenção da intensidade do sinal de RPE: (a) pela altura do sinal, e (b) pela área obtida por dupla integração do próprio sinal de RPE.

Em nosso trabalho a intensidade do sinal será determinada pelo método (1), pois estamos estudando apenas uma espécie paramagnética na qual não observamos nenhuma mudança significativa na forma de linha nos vários espectros analisados.

A caracterização dos sinais do NO através da RPE foi feita ajustando no espectrômetro os seguintes valores dados na tabela 4.2.

[Tabela 4.2] Condições em que foram feitas as medidas de RPE nos ensaios realizados.

Potência das microondas	20 mW
Freqüência das microondas	9.48 GHz
Amplitude de modulação	0,4 mT (4 G)
Campo Central	331,5 mT (3315 G)
Faixa de Varredura	20 mT (200G)
Número de varredura	2
Tempo de varredura	2
Constante de tempo	300ms

Utilizando os dados da tabela 4.2, o espectro obtido para uma amostra com concentrações: $[\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}] = 14,8 \text{ mM}$, $[\text{DETC}] = 29,6 \text{ mM}$, $[\text{NaNO}_2] = 2,5\text{mM}$ e 150mg de ditionito de sódio($[\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4] = 0,86\text{M}$) é mostrado na (figura 4.7).

[Figura 4.7] Espectro de RPE obtido utilizando-se os parâmetros adquiridos da Tabela 4.2.

Capítulo 5 – Resultados e Discussões

Na área de pesquisa e desenvolvimento de sensores, algumas características para a viabilidade na detecção e quantificação da substância desejada são esperadas. Nosso trabalho, sensores de NO através da RPE, tem como objetivo principal obter uma curva de resposta satisfatória. A curva de resposta pode ser definida como sendo a intensidade do sinal de RPE em função da concentração do NO, depois de calibrada deve ser suficiente para quantificar a concentração de NO em meios biológicos. Para isso destacamos as seguintes características esperadas: **(a) estabilidade, (b) reprodutibilidade e (c) sensibilidade.**

(a) Estabilidade:

A instabilidade ou alta reatividade do NO é um dos grandes problemas na detecção do óxido nítrico, pois o NO oxida rapidamente na presença do oxigênio o que dificulta o seu monitoramento na maioria dos métodos disponíveis atualmente. [37,38]. Para avaliarmos a estabilidade dos sensores, monitoramos o sinal de RPE em função do tempo, observando como se modifica a forma e a intensidade do sinal.

(b) Reprodutibilidade

A reprodutibilidade é uma propriedade dos sensores de responder da mesma maneira quando submetidos às mesmas condições. A reprodutibilidade dos sensores é avaliada comparando-se os espectros de RPE dos sensores fabricados com os mesmo parâmetros e mesmas condições: concentrações de NO e tempo de imersão.

(c) Sensibilidade

A sensibilidade é uma propriedade do sensor em responder de maneira diferente quando alteramos a concentração da substância a ser quantificada. Ou seja, quando alteramos a concentração de NO esperamos uma mudança na intensidade do espectro de RPE. A partir desta propriedade podemos obter uma curva da intensidade do espectro de RPE em função da concentração de NO, determinando assim uma curva de calibração.

Como discutido no capítulo 4, os sensores de NO foram fabricados a partir de três métodos diferentes. Neste capítulo, apresentaremos os resultados obtidos para cada método de fabricação. A partir destes resultados foi possível obter uma curva de resposta.

5.1 – Estudo da Concentração de FEDETC

Pela equação da Molaridade (5.1) podemos ver que o número de moles é proporcional à concentração molar.

$$M = \frac{n}{V(l)} \quad (5.1)$$

Sendo:

$$n = \frac{m(g)}{MM} \quad (5.2)$$

Substituindo (5.2) em (5.1) temos:

Então:

$$M = \frac{m(g)}{M.M \times V(l)} \quad (5.3)$$

Aonde n = números de moles, m = massa em gramas, MM = massa molecular (ou peso molecular) e V = volume em litros, sendo a massa molar do $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ = 270,30 e a massa do DETC = 225,31. Para estes experimentos foi utilizado os seguintes números de moles de $(\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O})$ e de DETC(ver tabela 5.1).

[Tabela 5.1] Relação das concentrações molares e números de moles.

Concentração de (FeCl ₃ .H ₂ O)	Número de moles (FeCl ₃ .6H ₂ O)	Concentração de DETC	Número de moles DETC
14,8 mM	$7,4 \times 10^{-7}$	29,6 mM	$1,18 \times 10^{-6}$
7,4 mM	$3,7 \times 10^{-7}$	14,8 mM	$5,9 \times 10^{-7}$
3,7 mM	$1,85 \times 10^{-6}$	7,4 mM	$2,95 \times 10^{-7}$
1,85 mM	$0,925 \times 10^{-6}$	3,7 mM	$1,475 \times 10^{-7}$
0,925 mM	$0,4625 \times 10^{-6}$	1,85 mM	$7,375 \times 10^{-8}$

Pode-se observar que a relação molar entre o ferro e DETC são de 2:1, ou seja, a cada 1 molar de ferro, temos 2 molar de DETC.

Abaixo temos o sinal de RPE do NO em função da concentração de FeDETC (figura 5.1).

[Figura 5.1] Sinal de RPE de NO em função dos números de moles de (FeCl₃.6H₂O+DETC+DMF).

Podemos ver que, de acordo com a equação 5.1 (considerando um volume constante), a concentração molar aumenta se o número de moles é

aumentado, pois ambas são diretamente proporcionais. Contudo, não podemos aumentar a quantidade de Fe arbitrariamente. Por exemplo, nos experimentos realizados em nosso laboratório, a concentração máxima de Fe que (juntamente com o dobro de concentração DETC) proporciona uma solução homogênea, no volume padrão de DMF, foi de 14,8 mM. Em consequência disto, pôde ser observado que a superfície do sensor apresenta um excesso de pó numa coloração escura. Na realidade, esse excesso surge antes mesmo da solução (FeDETC) ser levada à matriz de látex. Enfim, pela figura 5.1 podemos ver que o sinal de RPE aumenta com o aumento da concentração de FeDETC, mas em concentrações acima de 14,8mM observamos que o sinal de RPE decai porque o pó escuro, na verdade são ferros da solução de FeDETC que não foram absorvidos pela matriz de látex.

5.2 - Procedimento I

Fabricação dos sensores a partir da mistura do látex com o complexo FeDETC.

Neste método **(4.1.2-a)** os sensores foram fabricados a partir da mistura do látex com o complexo FeDETC.

Na figura 5.2 apresentamos os sinais de RPE em função do tempo após a exposição à solução de NO. Os sensores sólidos ficaram duas horas mergulhados em uma solução de NO com concentração de 2,5 mM.

[Figura 5.2] Monitoramento do sinal de RPE obtido do sensor fabricado pelo **procedimento I** e imerso por 2 h em uma solução de 2,5mM de NO.

Como pode ser visto, o complexo $\text{Fe}^{2+}\text{NO}(\text{DETC})_2$ permanece no interior da matriz de látex por 12 dias após a exposição ao NO. A intensidade do sinal de RPE diminui pela metade após 60 horas. Após cerca de 200 horas, a intensidade do sinal de RPE tende a zero, como pode ser observado na figura 5.3.

[Figura 5.3] Intensidade pico a pico do sinal de RPE em função do tempo.

Alguns fatores podem estar relacionados a essa redução da intensidade do sinal de RPE. São eles: a) reações de oxidação do NO e b) descomplexação do ferro promovendo uma redução na eficiência e na quantidade de aprisionadores de NO.

Uma das vantagens nesta propriedade do sensor em armazenar NO por um longo período é a possibilidade da realização da medida do sinal de RPE após algumas horas, facilitando a utilização do sensor. Entretanto, a desvantagem está na impossibilidade de reutilização do sensor, ou seja, um mesmo sensor não pode ser utilizado em várias medidas. Uma alternativa viável seria utilizar um sensor para cada medida (sensor descartável). Sendo necessário apenas que todos os sensores tenham a mesma resposta quando exposto a NO. Entretanto, utilizando o procedimento I para a fabricação dos sensores não é possível obter uma reprodutibilidade, como pode ser observado na figura 5.4.

[Figura 5.4] Espectro de RPE de dois sensores, (a) e (b) obtidos a partir da mesma amostra.

A figura 5.4 apresenta o espectro de RPE de dois sensores obtidos a partir de uma mesma amostra e que foram imersos em uma solução de 2,5 mM de NO por 2 horas. Percebe-se que os espectros de RPE se diferenciam na intensidade e na forma.

Essa diferença pode ser explicada pela não homogeneidade de FeDETC na amostra. Dificilmente após a divisão da amostra para a obtenção dos sensores conseguiremos uma mesma concentração de FeDETC. Sendo o FeDETC o composto responsável pelo aprisionamento de NO, sua concentração determinará tanto a forma como a intensidade do sinal de RPE. Assim, sensores com diferentes concentrações de FeDETC terão diferentes espectros de RPE. A não reprodutibilidade dos sensores impossibilita a calibração do sensor através de uma curva de resposta.

5.3 Procedimento II

Fabricação dos sensores utilizando a técnica de *Spin-Coating*.

Neste método (4.1.2-b) foi utilizado a técnica de *spin-coating* para depositar o complexo FeDETC na matriz de látex. Obtemos um sensor fino e homogêneo. Fabricamos sensores variando-se a rampa e velocidade de rotação do spinner conforme descrito no capítulo 4. A figura 5.5 apresenta os espectros de RPE obtidos para os sensores depois de imersos em solução de 2,5 mM de NO por 2 horas.

[Figura 5.5] Comportamento do sinal de RPE para o sensor “tipo” membrana: (a) = Início, (b) = 192h, (c) = 360h, (d) = 552h, (e) = 864h.

Observa-se novamente uma redução da intensidade do sinal de RPE em função do tempo. Os sensores fabricados com velocidade de 500 rpm mantêm o sinal de RPE característico do NO por 100 dias, enquanto que, os fabricados com 1000 e 2000 rpm por 40 dias.

A figura 5.6 mostra que sinal de NO decresce exponencialmente em função do tempo. Observa-se que o decaimento do sinal é semelhante ao método de preparação I, entretanto com uma taxa menor.

[Figura 5.6] Intensidade do sinal RPE em função do tempo dos sensores de NO fabricados com diferentes velocidades de rotação. Os sensores foram imersos em uma solução de 2.5 mM de NO por 2 horas.

Observamos que a membrana produzida com velocidade de 500 rpm mantém por mais tempo o sinal de RPE característico do NO quando comparada com as obtidas por 1000 e 2000 rpm. Isto pode ser explicado pelo fato de que uma maior velocidade de rotação acarreta uma menor quantidade do complexo FeDETC.

Para avaliarmos a reprodutibilidade dos sensores obtidos a partir deste método de preparação comparamos o espectro de RPE do sensor depois de imerso em solução de 2,5 mM de NO por 2 horas. Os sensores foram fabricados utilizando os mesmos parâmetros. São eles: velocidade 500 rpm, 1mL de látex e 1mL de FeDETC.

[Figura 5.7] Intensidade do sinal RPE em função do tempo dos sensores de NO fabricados. Os sensores foram imersos em uma solução de 2.5 mM de NO por 2 horas.

Observamos na figura 5.7 que os espectros de RPE dos sensores são diferentes tanto na forma como na intensidade do sinal. Utilizando este método de preparação não é possível depositar a mesma quantidade de FeDETC para cada sensor fabricado. A não reprodutibilidade nos leva a abandonar este método de preparação, caso estejamos interessados em obter uma curva de resposta.

5.4 Procedimento III

Fabricação dos sensores a partir da deposição da solução de látex em vidro de relógio lapidado.

O último método de preparação foi desenvolvido visando garantir que todos os sensores fossem preparados com a mesma quantidade de FeDETC e Látex, buscando uma boa reprodutibilidade entre os sensores. Conforme descrito na seção (4.1.2-c) do capítulo 4, neste procedimento todo o FeDETC depositado incorpora-se à amostra. A figura 5.8 apresenta os espectros de RPE de diferentes sensores fabricados com os mesmos parâmetros e submetidos às mesmas condições. Como pode ser observado, os espectros de RPE são semelhantes na forma e na intensidade do sinal, ou seja, o método de preparação permite reprodutibilidade.

[Figura 5.8] Intensidade do sinal RPE em função do tempo dos sensores de NO fabricados. Os sensores foram imersos em uma solução de 2.5 mM de NO por 2 horas.

A tabela 5.2 apresenta a amplitude pico a pico do sinal de RPE obtida a partir de dez diferentes sensores imersos em uma solução de 2,5 mM de NO por 2 horas.

[Tabela 5.2] Relação das Amplitudes dos sinais dos sensores e suas respectivas massas.

Sensores	Amplitude (U.A.)	Massa(g)	Amplitude Normalizada
N.º 1	$1,747 \times 10^{-4}$	$10,520 \times 10^{-3}$	$1,661 \times 10^{-2}$
N.º 2	$1,758 \times 10^{-4}$	$10,500 \times 10^{-3}$	$1,674 \times 10^{-2}$
N.º 3	$1,783 \times 10^{-4}$	$10,540 \times 10^{-3}$	$1,692 \times 10^{-2}$
N.º 4	$1,787 \times 10^{-4}$	$10,600 \times 10^{-3}$	$1,686 \times 10^{-2}$
N.º 5	$1,785 \times 10^{-4}$	$10,480 \times 10^{-3}$	$1,704 \times 10^{-2}$
N.º 6	$1,752 \times 10^{-4}$	$10,500 \times 10^{-3}$	$1,668 \times 10^{-2}$
N.º 7	$1,783 \times 10^{-4}$	$10,550 \times 10^{-3}$	$1,690 \times 10^{-2}$
N.º 8	$1,756 \times 10^{-4}$	$10,500 \times 10^{-3}$	$1,673 \times 10^{-2}$
N.º 9	$1,745 \times 10^{-4}$	$10,480 \times 10^{-3}$	$1,665 \times 10^{-2}$
N.º 10	$1,778 \times 10^{-4}$	$10,530 \times 10^{-3}$	$1,689 \times 10^{-2}$
Média			$1,680 \times 10^{-2}$

O gráfico na figura 5.9 apresenta o histograma dos dados da tabela 5.2. Através deste observamos uma boa reprodutibilidade dos sensores.

[Figura 5.9] Reprodutibilidade de sensores em solução de NO (2,5mM).

Avaliamos a durabilidade do sinal em uma amostra com o tempo por cerca de 1000 horas após a imersão em solução de NO. A intensidade do sinal decaí exponencialmente como nos métodos de preparo I e II. Notamos que durante todo este período, o sinal se manteve, havendo apenas uma redução na estabilidade do sinal. Conforme a figura 5.10. Notamos que os sensores mantiveram o sinal de presença de NO por cerca 40 dias.

[Figura 5.10] Comportamento do sinal de RPE para o sensor preparado pelo método III: (a) = Início, (b) = 426h, (c) = 700h.

Depois de 40 dias o sensor não apresenta o espectro característico do NO. A não reutilização do sensor pode ser observada através da figura 5.11. Esta apresenta o espectro de RPE do sensor reutilizado (depois de 40) dias em uma solução de 2.5 mM. Podemos notar que houve um decréscimo na intensidade do sinal em comparação ao espectro inicial.

O decaimento do sinal ocorre porque no complexo FeDETC algumas moléculas de Fe^{2+} oxidaram transformando em Fe^{3+} . Uma sugestão seria “lavar” o sensor com uma solução de ditionito de sódio para reduzir os ferros que oxidaram.

[Figura 5.11] Espectros de RPE de um sensor em uma primeira imersão em solução de NO (curva preta) e em uma segunda imersão, 40 dias após (curva vermelha).

5.4.1 - Estudo da Temperatura no Processo de Secagem do Látex

Como estamos interessados em aperfeiçoar o sensor, procuramos encontrar qual a melhor temperatura da matriz do látex para um melhor funcionamento do sensor, ou seja, qual temperatura que o sinal de RPE do óxido nítrico (NO) será maior. Neste estudo observarmos o comportamento das seguintes temperaturas: 4°C, 10°C, 20°C, 40°C.

Para tanto, preparamos cinco sensores sólidos variando as temperaturas do látex como mostra a tabela 5.3. Para este experimento não variamos a temperatura do complexo FeDETC. A mistura do látex com o complexo FeDETC foi feita a temperatura ambiente (20°C).

[Tabela 5.3] Relação entre os sensores e as temperaturas da matriz

Sensores	Temperatura °C
S1*	4
S2	10
S3	20
S4	40
S5*	40

A temperatura do complexo FeDETC nos cinco sensores foi de 20°C. No sensor S5* a temperatura do látex foi de 40°C, entretanto, logo após adicionar o complexo FEDETC deixamos secar a temperatura ambiente (20°C). Os sensores foram imersos em uma solução de 2,5 mM por duas horas. A figura 5.12 apresenta a intensidade pico a pico do espectro de RPE em função do tempo.

[Figura 5.12] Resposta dos sensores obtidos a partir de temperaturas diferentes.

Observa-se que o sensor S2 possui uma intensidade maior em função da concentração de NO. Inferimos que temperaturas maiores e menores que 10°C provocam quebras de ligações do complexo FeDETC com a matriz de látex, que pode ser observado com a diminuição do sinal de RPE. Para uma melhor otimização utilizamos uma temperatura de 10°C para a matriz de látex, enquanto que, 20°C para o complexo FeDETC.

5.4-2- Proporção de FeDETC na Matriz de Látex.

Como já encontramos a melhor concentração para o complexo, agora estudaremos qual a proporção de FeDETC que se deve colocar na matriz de látex.

A intensidade do sinal é proporcional à quantidade de sítios de aprisionamento de NO disponíveis na matriz de látex. Por isso, avaliamos os efeitos da proporção de FeDETC nas amostras na sensibilidade dos sensores. A Tabela 5.4 lista as proporções de FeDETC e látex utilizadas neste experimento.

[Tabela 5.4] Proporções utilizadas entre FeDETC e látex no estudo de sensibilidade do sensor.

Sensor	Matriz de látex	Complexo FeDETC
1	0,2ml	0,1ml
2	0,1ml	0,1ml
3	0,1ml	0,2ml
4	0,1ml	0,3ml
5	0,1ml	0,4ml
6	0,1ml	0,5ml

As curvas de sinal de RPE em função do tempo para cada um destes sensores estão dispostas na figura 5.13. A concentração da solução de FeDETC foi de 14,8mM. A concentração de NO utilizada nas medidas foi de 2,5mM.

[Figura 5.13] Intensidade do sinal de RPE em função do tempo para cada sensor. As proporções entre FeDETC e látex seguem a numeração apresentada na Tabela 5.2. Concentração de NaNO_2 de 2,5mM.

A figura 5.13 mostra que além da sensibilidade, a estabilidade do sinal de RPE também aumenta com o aumento da proporção de FeDETC. Entretanto, para o sensor 6 vimos que a quantidade de FeDETC não conseguiu ser totalmente absorvida pela matriz de látex. O excesso do complexo de FeDETC pôde ser observada no vidro de relógio lapidado, e por esta razão, decidimos utilizar a proporção 4:1 para os sensores sólidos.

5.5 - Curva de Calibração de NO pelo método de RPE

A técnica de quantificação de NO através do método de RPE utilizada consiste em capturar todo o NO contido na amostra com um aprisionador “trap” e depois medir a intensidade do sinal de RPE do composto trap-NO resultante. Por isso construímos uma curva padrão que relacionasse a intensidade do sinal de RPE e a concentração de NO adicionada à mistura.

Para sabermos que quantidade de NO estávamos colocando na amostra, utilizamos como fonte desta molécula o NaNO_2 , que reduzido pelo ditionito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) forma NO quantitativamente.

As concentrações das substâncias utilizadas neste ensaio foram baseadas em estudos encontrados na literatura que objetivavam a melhor sensibilidade do método.

Supomos que a quantidade de NO presente em cada amostra é exatamente igual à quantidade molar de nitrito de sódio. Em presença de ditionito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) todo o nitrito é reduzido à NO.

Estávamos interessados em medir quantidades pequenas de NO, por isso utilizamos pequenas concentrações de NaNO_2 . Nessas condições, apenas o sinal do complexo $\text{Fe}(\text{NO})\text{DETC}_2$ foi observado no espectro de RPE. Os espectros obtidos para a curva de calibração são mostrados na (figura 5.14):

[Figura 5.14] Curva de Calibração: Sinal de RPE x Concentração de NO.

5.6 – Comentários Finais

Em relação ao sensor híbrido de NO, utilizando matriz sol-gel (SG) [39] e detecção do NO em solução [40], conseguimos ter uma estabilidade maior [40 dias contra 14 dias (SG) e apenas 2 horas (solução)]. Entretanto, detectou-se o NO em uma concentração de até 0,1mM (ou 100μM), enquanto, que sem otimização o sensor (SG) foi possível detectar concentrações de até 0,01mM, o que abre espaço para ensaios em meios de cultura de células e tecidos de ratos tratados com LPS [41]

O sensor á base de látex pode ser reutilizado com uma perda relativamente pequena na amplitude do sinal. Já na reutilização utilizando o sensor com matriz sol-gel (SG) se pode observar que o principal problema foi que os vidros (capilares) tendem a quebrar em pedaços, especialmente após ficarem muitos dias expostos ao ar, enquanto á base de látex não houve nenhuma objeção.

Capítulo 6 – Conclusões e Perspectivas

Um novo sensor para NO baseado na utilização do spin *trap* FeDETC aprisionado dentro de uma matriz de látex foi obtido. Esse material possui características interessantes para aplicações na espectroscopia de RPE.

Para obtenção do sensor estudamos três métodos diferentes de preparo, e verificamos que o método III (fabricação a partir da deposição da solução de látex em vidro de relógio lapidado) é o mais eficaz porque adquirimos a estabilidade, sensibilidade e a reprodutibilidade dos sensores.

Em relação à estabilidade conseguimos que o NO ficasse mantido dentro da matriz látex-FeDETC por 40 dias à temperatura ambiente, e detectamos o NO em uma concentração de até 0,1mM (ou 100 μ M), e conseguimos reproduzir vários sensores que obtiveram os mesmos sinais característicos, e pudemos fazer a curva de calibração.

Estudamos o efeito da temperatura do látex antes de formar o sensor, variamos a temperatura de 4°C até 40°C. Observamos que a temperatura de 10°C apresentou o maior sinal de RPE e verificamos que temperaturas acima ou abaixo desse valor ocorrem diminuição do sinal de NO.

Estudamos ainda diferentes concentrações de cloreto de ferro ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e de DETC. Variamos a concentração de cloreto de ferro 0,925mM até 14,8mM e de DETC em 1,85mM até 29,6mM e observamos que com o aumento das concentrações de ambos, proporciona o aumento do sinal de NO, entretanto, concentrações acima de 14,8mM de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e acima de 29,6mM de DETC, o sinal característico começa a decair. Depois de encontrada a melhor concentração de ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e DETC, verificamos que adição de FeDETC aumenta a sensibilidade do sensor assim como sua estabilidade, mas com ressalvas.

Existem ainda aspectos a serem explorados, como aumentar a sensibilidade de 0,1mM para a ordem de alguns micros para que possamos detectar o NO em meios biológicos, reutilizar o sensor sem que ocorra perda de sinal).

Nossos resultados mostram que o material híbrido produzido através do processamento látex usando a técnica do spin *trap* é bastante promissor na produção de sensores de óxido nítrico.

Referências

- 1 - NIKIFORIDIS G. et al. Quantitative assessment of angiogenesis in the chick and its chorioallantoic membrane by computerized analysis of angiographic images. **European Journal of Radiology** 29 (1999) 168-179.
- 2 - SIAMBLIS D. et al. A novel radiological approach for the experimental study of angiogenesis: angiographi of the chick embryo and its chorioallantoic membrane. **European Journal of Radiology** 21, (1996) 220-224.
- 3 - OKAMOTO T. et al. Advanced glycation end products induce angiogenesis in vivo. **Microvascular Research** 63, 186-195 (2002).
- 4 - NAGANO, T. and YOSHIMURA, T. Bioimaging of Nitric Oxide. **Chem. Rev.** v. 102, n.4, p.1235-1269, 2002
- 5 - REGULLA DF, DEFFNER U, DOSIMETRY BY ELECTRON-SPIN-RESONANCE SPECTROSCOPY OF ALANINE. **INTERNATIONAL JOURNAL OF APPLIED RADIATION AND ISOTOPES** 33 (11): 1101-& 1982
- 6 - ZAVOISKY E, PARAMAGNETIC ABSORPTION IN SOME SALTS IN PERPENDICULAR MAGNETIC FIELDS. **ZHURNAL EKSPERIMENTALNOI I TEORETICHESKOI FIZIKI** 16 (7): 603-606, 1946.
- 7 - CUMMEROW RL, HALLIDAY D, PARAMAGNETIC LOSSES IN 2 MANGANOUS SALTS. **PHYSICAL REVIEW** 70 (5-6): 433-433, 1946.
- 8 - SWARTZ, H. M.; BOLTON, J.R.; BORG, D. C. **Biological Applications**

- of Electron Spin Resonance**. New York: John Wiley & Sons, 1972. 568p
- 9 - POOLE, J. C. **Electron Spin Resonance: a comprehensive treatise on experimental techniques**. [S1]: Dover Publications, Inc, New York, 1998.
- 10 - IKEYA, M. **New Applications of Electron Spin Resonance**: Dating, Dosimetry and Microscopy. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. 1993
- 11 - M. C. O. ALVES – “Teste da angiogênese estimulada por membrana de látex natural.” – Dissertação de Mestrado, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras – USP, Ribeirão Preto, 2003
- 12 - D’ AUZAC *et al* - Physiology of Rubber Tree Latex - **CRC Press** - 1989
- 13 - BERNARDES, M. S. – **Sangria da Seringueira – 2ª edição** – Capítulo 16 – Piracicaba 2000.
- 14 - FURCHGOTT RF, ZAWADZKI JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, 1980; 288:373-6.
- 15 - KOSHLAND JR., DE. The molecule of year. **Science**, 1992; 258:1861
- 16 - ARCHER S. Measurement of nitric oxide in biological models. **FASEB J**, 1993; 7:349-60.
- 17 - MONCADA S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Reviews**, 1991; 43:109-42.
- 18 - BORIN, J. F. – “Estudos de Ressonância Paramagnética Eletrônica de

- Óxido Nítrico Ligado a Complexos de Ferro.” – Tese de Doutorado, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras – USP, Ribeirão Preto, 2003
- 19 - PALMER, P. M. J.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric-oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**. v. 327, p. 524-526, 1987.
- 20 - NATHAN, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells **FASEB J.** v. 6, n. 12, p. 3051-3064, 1992
- 21 - KHATSENKO, O. G. Nitric oxide is a mediator of the decrease in cytochrome P450-dependent metabolism caused by immunostimulants. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v. 90, p. 11147–11151, 1993.
- 22 - JAESCHKE, H.; SCHINI, V. B.; FARHOOD, A. Role of nitric oxide in the oxidant stress during ischemia/reperfusion injury of the liver. **Life Sci.** v. 50, p. 1797-1804, 1992
- 23 - MANCHESTER, K. S. Chronic administration of nitroglycerin decreases cerebral infarct size. **Neurology**. v. 43, n. 2, p. A365, 1993.
- 24 - FLORA, R., ZILBERSTEIN B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Rev. Ass. Med. Brasil** v. 46, n. 3, p. 265-271, 2000.
- 25 - DRAPIER, J.C., WEIZESBIN, J., HIBBS, J.B. Interferon gamma and tumor necrosis factor induce the L-arginine cytotoxic effects or mechanism in murine macrophages. **European J. Immuno.** v.18, p. 1587-1592, 1988.
- 26 - BURNEY, S., TAMIR, S., GAL, A., and TANNENBAUM, S.R. A mechanistic Analysis of Nitric Oxide-Induced Cellular Toxicity, **Nitric Oxide**, v. 1, n. 2, p. 130-144, 1997.

- 27 - IGNARRO, L. J., BYRNS, R.E., BUGA, G.M., WOOD, K.S. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possess pharmacology and chemical properties identical to those of nitric radical. **Circulation Research**. v. 61, p. 866-879, 1987.
- 28 - KIECHELE FL, MAILINSKI T. Nitric Oxide: Biochemistry, pathophysiology, and detection. **Am J Clin Pathol**, 1993; 100:567-575.
- 29 - FUKUTO, J. M., Chemistry of Nitric Oxide: **Biochemistry, Molecular Biology, and Therapeutic Implications**, Academic Press, Cap.1, p. 1-13, 1995.
- 30 - RAGSDALE, R. O. Reactions of nitrogen (II) oxide, In: **Developments in inorganic Nitrogen Chemistry** (C. B. Colburn, ed), v. 2 Elsevier, New York.
- 31 - GIBSON, Q. H., ROUGHTON, F. J. W. The kinetics and equilibrium of the reactions of nitric oxide with sheep hemoglobin. **J. Physiol**. v. 139, p. 507-526, 1957.
- 32 - IGNARRO. L. J. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol**. v. 30, p. 535-540, 1990.
- 33 - GALPIN, J. R., VELDINK, G.A., VLIEGENYTHART, J.F.G., BOLDINGH, J. The interaction of nitric oxide with soybean lipoxygenase-1, **Biochim. Biophys. Acta**. v. 536, n. 5, p. 356-362, 1978.
- 34 - MARLETTA, M. A., Mammalian Synthesis de nitrite, nitrate, nitric oxide, and N-nitrosating agents. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 1, n.5, p. 249-257, 1988.
- 35 - ENEMARK, J. H.; FELTHAN, R. D. Principles of Structure, Bonding, and

- Reactivity for Metal Nitrosyl Complexes. **Coordination Chemistry Reviews**. v. 13, p. 339-406, 1974.
- 36 - FUJII, S.; YOSHIMURA, T. A new trend in iron–dithiocarbamate complexes: as an endogenous NO trapping agent. **Coord. Chem. Rev.** v. 198, p. 98-99, 2000.
- 37 - HAMPL, V.C., WALTERS, S.L. In **Methods in Nitric Oxide Research**. Eds. FEELISCH, M. and STAMLER, J.S. (John Wiley & Sons, New York, 1996), p. 309.
- 38 - MALINSKI, T., MESAROS, S., TROMBOULIAN, P. Nitric oxide measurement using electrochemical methods. **Methods Enzymol.** v. 268, p. 58-69, 1996.
- 39 - Melo JR. JAIR P. – “Sensor Sólido para óxido nítrico utilizando a técnica sol-gel” – Dissertação de Mestrado, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras – USP, Ribeirão Preto, 2004
- 40 - HIDEO, K. Paramagnetic Resonance Study of Nitric Oxide Hemoglobin. **The Journal of Biological Chemistry**. v.243, n.16, p.4350-4357, 1968.
- 41 - LASKIN, D. L., RODRIGUEZ, D. V., HECK, D. E., HWANG, S. M., OHNISHI, S. T., DURHAM, S. K., and GOLLER, N. L. Hepatic Nitric Oxide Production Following Acute Endotoxemia in Rats is Mediated by Increased Inducible Nitric Oxide Synthase Gene Expression. **Hepatology**. V.22, p.223-234, 1995.