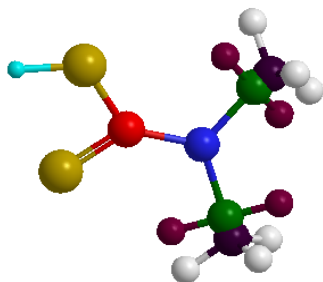


UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP – DEPARTAMENTO DE FÍSICA E MATEMÁTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA APLICADA À MEDICINA E
BIOLOGIA



“Efeito dos surfactantes sobre o sensor sólido de óxido nítrico preparado pelo processo Sol-Gel”

Jair Pereira de Melo Junior

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

RIBEIRÃO PRETO – SP

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FICHA CATALOGRÁFICA

Junior, Jair Pereira de Melo

“Efeito dos surfactantes sobre o sensor sólido de óxido nítrico preparado pelo processo sol-gel”

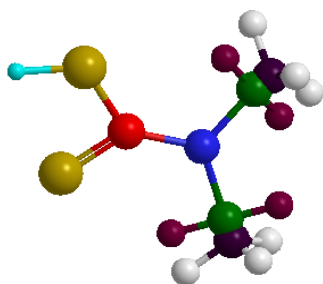
Ribeirão Preto, 2009. p.145: il. ; 30cm

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

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

1. Biossensores, 2. EPR, 3. Óxido Nítrico, 4. Sol Gel, 5. Surfactantes

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



“Efeito dos surfactantes sobre o sensor sólido de óxido nítrico preparado pelo processo Sol-Gel”

Jair Pereira de Melo Junior
Orientador: Prof. Dr. Carlos F. O. Graeff

**Tese apresentada à faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP,
como parte das exigências para a obtenção do
título de Doutor em Ciências, Área de
concentração: Física Aplicada à Medicina e
Biologia.**

RIBEIRÃO PRETO – SP

2009

“Aos meus filhos, *Nicolas F. Melo e Calebe F. Melo*, mesmo que ainda estejam pequenos e sem consciência do significado deste manuscrito, espero que, em um futuro próximo este trabalho sirva de motivação para que eles possam se empenhar na busca do conhecimento; a vocês dedico esta tese”.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos F. O. Graeff, primeiro por confiar no meu trabalho, segundo pela direção a qual me conduziu e pela permanente motivação que culminou na conclusão deste trabalho.

A minha família pelo incentivo constante.

Ao Prof. Dr. Osvaldo Baffa Filho, que sempre que busquei orientação não mediu esforços para me ajudar.

A CAPES pelo apoio financeiro.

Ao técnico Carlos Alberto Brunello pelo auxílio técnico e pelo companheirismo dedicado, posso dizer que sem ele esse trabalho não teria conclusão, obrigado por tudo Carlão.

Aos técnicos, José Luiz Aziani, Élcio Aparecido Naves por todo o suporte instrumental que ofereceram.

À Ângela Kinoshita, pelo incentivo, motivação e companheirismo.

Ao grupo de Fotobiofísica: Prof. Dr. Youri Borissevitch, Cássia, Pablo, Marcelo, Fábio e Prof. Dr. Amando Siuti Ito pela amizade e colaborações.

Aos colegas que fazem parte do grupo de pesquisa: Marcelo Caetano, George Barbosa, Jorge Luna, Fernando Condeles, Felipe Chen, Fernando Castro, João Borin, Prof. Dr. Osvaldo Baffa, e Prof. Dr. Marcelo Mulato pelo companheirismo ao longo desta jornada.

E a Deus, por que Ele é o centro.

“Se buscares a sabedoria como a prata e como a tesouros escondidos a procurares, então, entenderas o temor do Senhor e acharás o conhecimento de Deus. Porque o Senhor dá a sabedoria, e da sua boca vem a inteligência e o entendimento. Ele reserva a verdadeira sabedoria para os retos; é escudo para os que caminham na sinceridade, guarda as veredas do juízo e conserva o caminho dos seus santos.” (provérbios 2:4-8)

Jesus é o senhor

RESUMO

Em trabalhos anteriores nós apresentamos um sensor sólido de óxido nítrico (NO) preparado pelo método sol-gel utilizando como aprisionadores complexos de Fe^{2+} -DETC. Neste trabalho, reportamos o efeito de alguns surfactantes (CTAB-catiônico, SDS-aniônico, Triton X100-neutro e o plurônico F127) sobre o sensor. A ressonância paramagnética eletrônica (RPE) foi usada para quantificar o número de moléculas de NO- Fe^{2+} -DETC. A presença dos surfactantes aumenta a resistência mecânica dos sensores sólidos, sendo mais pronunciada nos sensores contendo CTAB e Triton. Sem os surfactantes não há sinal do complexo NO- Fe^{2+} -DETC. O tempo de secagem foi otimizado para 30 min. O sinal mais intenso foi obtido com os sensores contendo os surfactantes a 12 mM. Os surfactantes de um modo geral aumentam a quantidade de NO aprisionado. A difusão do NO foi estimada através do tempo de aprisionamento do NO sendo maior na presença do F127 e SDS. A saturação do sinal de NO nos sensores acontece em 10 min. Uma maior mobilidade dos complexos NO- Fe^{2+} -DETC foi encontrada nos sensores contendo SDS e F127 e foi estimada pela forma de linha. Para os sensores no estado sólido o limite de detecção foi de 2 μM utilizando o F127 como aditivo, para o SDS, CTAB e Triton o limite foi de 6 μM , 8 μM e 10 μM respectivamente. Na solução coloidal a menor quantidade detectada foi de 0,1 μM também com o F127. A sensibilidade dos sensores aumenta em pelo menos 5 vezes nos sensores sólidos preparados com o F127 em detrimento aos demais e pode ser melhorada utilizando surfactantes mistos.

Palavras chave: Biossensores, RPE, óxido nítrico, sol gel, surfactantes.

ABSTRAT

In previous work we present a solid sensor for nitric oxide (NO) prepared by sol-gel method using the trapped complex of Fe^{2+} -DETC. In this work, we report the effect of some surfactants (CTAB, cationic, anionic, SDS, Triton-X100 and neutral pluronic F127) on the sensor. The electron paramagnetic resonance (EPR) was used to quantify the number of molecules of NO-Fe^{2+} -DETC. The use of surfactant increases the mechanical strength of solid sensors, being more pronounced in sensors containing CTAB and Triton. Without the surfactant no EPR signal of the complex NO-Fe^{2+} -DETC was observed. The drying time was optimized to 30 min. The strongest EPR signal was obtained with the sensors containing the surfactant to 12 mM. The surfactants in general increase the amount of NO trapped. The diffusion of NO was estimated by the time of trapping of the NO that it was higher in the presence of F127 and SDS. The signal saturation of the NO sensors occurs in 10 min. A higher mobility of the complex NO-Fe^{2+} -DETC was found in sensors containing SDS and F127 and was estimated by lineshapes. For the solid state sensors the detection limit was 2 μM using the F127 as additive and for the SDS, CTAB and Triton the limit was 6 μM , 8 μM and 10 μM respectively. In the colloidal solution the least amount detected was 0.1 μM also with the F127. The sensitivity of the sensors increases at least 5 times in the solid sensors prepared with the F127 in detriment to the other and can be improved by using mixed surfactants.

Key words: Biosensors, EPR, nitric oxide, sol gel, surfactants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Níveis Zeeman de um elétron em um campo magnético externo aplicado.....	27
Figura 2. Formas de linhas Gaussianas e Lorentzianas: (a) absorção e (b) primeira derivada.	27
Figura 3. Definição dos ângulos característicos φ e θ para descrever a orientação do campo magnético B_0 com respeito ao elipsóide g no sistema de eixos x, y e z.	30
Figura 4. Desdobramento hiperfino dos níveis de energia do átomo de Hidrogênio na presença de um campo magnético aplicado.	32
Figura 5. Diagrama do orbital molecular para o óxido nítrico.	37
Figura 6. Etapa indefinida entre a produção do NO e a célula alvo.	39
Figura 7. Caminhos possíveis e simplificados da formação do complexo $\text{Fe}(\text{DTC})_2\text{NO}$ através da reação de um $\text{DNIC}-(\text{GS})_2$ com eDTC em sistemas biológicos.	39
Figura 8. (A) Espectro de RPE (310K) e (B) solução congelada (77K) de células de levedura com DETC e encubadas com um composto vasodilatador que libera NO. O sinal em $g = 2$ em (B) é originado do $\text{Cu}^{2+}\text{DETC}$	43
Figura 9. Fórmulas estruturais dos principais agentes utilizados como aprisionadores de NO. ...	44
Figura 10. Estrutura geométrica e reação de aprisionamento do complexo Fe-DETC. O ferro pode se ligar tanto no estado férrico quanto ferroso. O complexo ferroso é paramagnético. ...	45
Figura 11. Esquema proposto para os quatro possíveis tipos de Fe-DTCs complexos.	48
Figura 12. Esquema da transição sol-gel: (a) formação de gel particulado e (b) formação de gel polimérico.	54

Figura 13. Processo de aprisionamento de um material dentro da estrutura porosa de uma matriz de sílica pelo processamento sol-gel.	56
Figura 14. Possível arranjo da estrutura da matriz sol-gel contendo o complexo para o aprisionamento do NO.....	61
Figura 15. Intensidade do sinal de RPE do NO após o aprisionamento pelo sensor SG(Fe ²⁺ -DETC). Potência 20 mW e amplitude de modulação 0,4 mT (4 G).	63
Figura 16. Intensidade do sinal RPE do NO (2,5mM) em função da quantidade (volume) de FeDETC em 60µl de solução sol-gel. A secagem dos géis ocorreu a 50°C durante 2 dias dentro de uma estufa.....	65
Figura 17. Comparação do decaimento do sinal do NO com o tempo nas amostras (B) com e (C) sem DMF. Potência 20 mW e amplitude de modulação 0,4 mT (4 G).....	67
Figura 18. Espectros de absorção UV/Vis do Fe ⁺³ -DETC, DETC e SGFeDETC1 e SGFeDETC2 (com ditionito) em suspensão de DCM.	68
Figura 19. Reação de descomplexação envolvendo o efeito da protonação do grupamento enxofre do dietilditiocarbamato (DETC).....	69
Figura 20. Fórmula estrutural do Dodecil Sulfato de Sódio, demonstrando o caráter hidrofóbico e hidrofílico dos surfactantes.	72
Figura 21. Mecanismo de formação das micelas por agregação dos monômeros.....	74
Figura 22. Inserção do anel na solução para medir a tensão superficial em função da concentração do surfactante.....	75
Figura 23. Modelo proposto por <i>Stigter</i> para explicar o comportamento e a organização dos monômeros na formação de uma micela.	76
Figura 24. Comportamento da tensão superficial da água versus concentração do surfactante..	77

Figura 25. 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.....	82
Figura 26. Esquema ilustrativo do processo de síntese dos sensores desde a preparação das soluções até o aprisionamento do NO.	90
Figura 27. Comparação entre os sinais obtidos a partir do complexo NO-Fe ²⁺ -DETC no sensor no estado sólido, na temperatura ambiente, em solução congelada (77K) e em solução na temperatura ambiente.....	98
Figura 28. Sinal integrado em função do tempo de imersão do NO nas soluções de NaNO ₂ em meio redutor (ditionito de sódio).	101
Figura 29. Resultado do estudo da tensão superficial nas soluções SG com os surfactantes em diferentes concentrações.....	106
Figura 30. Evolução do sinal de RPE em função das concentrações dos surfactantes: (a) SDS, (b) CTAB, (c) Triton e (d) F127.....	109
Figura 31. Intensidade do sinal de RPE em função da concentração dos surfactantes.	111
Figura 32. Intensidade do sinal de RPE obtido a partir de sensores sólidos preparados pelo método SG utilizando o F127 como aditivo.....	116
Figura 33. Intensidade dos sinais obtidos a partir dos sensores no estado sólido preparados de com a mistura dos surfactantes, SDS, CTAB e Triton X100 com o F127.....	118
Figura 34. Sinais de RPE obtido a partir do sensor sólido em diferentes posições angulares alteradas sem retirar a amostra da cavidade após cada medida.	121
Figura 35. Comparação entre as formas de linha dos sinais de RPE na solução SG e nos sensores no estado sólido.....	122
Figura 36. Curva de calibração do complexo NO-Fe ²⁺ -DETC em solução DMF.	124
Figura 37. Curva de calibração do complexo NO-Fe ²⁺ -DETC em solução SG(Fe ²⁺ -DETC) sem surfactante.	125

Figura 38. Comparação entre as intensidades dos sinais de RPE <i>versus</i> o número de radicais NO em solução DMF e SG, com e sem surfactante.	126
--	-----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação das NOS conforme abreviaturas, sinonímias e dependência de Ca^{2+} .	35
Tabela 2. Taxas de aprisionamento dos radicais livres através dos vários complexos de Ferro-ditiocarbamato. ProDTC = L-prolina ditiocarbamato; DTCS = N-(ditiocarboxi) sarcosina; MGD = N-metil-d-glucamina ditiocarbamato.	46
Tabela 3. Algumas aplicações do processamento SG na fabricação de biossensores.	58
Tabela 4. Caracterização dos complexos Fe-DETC em solução DMF, SG líquido e SG sólido.	62
Tabela 5. Principais surfactantes utilizados atualmente com suas respectivas fórmulas moleculares.	73
Tabela 6. Condições em que foram feitas as medidas de EPR nos ensaios realizados.	81
Tabela 7. Preparação das soluções para o estudo da concentração dos surfactantes na matriz sol-gel. A relação Fe^{3+} -DETC:SG foi mantida de 1:3 em volume.	85
Tabela 8. Preparação das soluções diluídas de SG(F127-Fe^{3+} -DETC) em etanol.	86
Tabela 9. Preparação das soluções para análise da mistura de surfactantes.	87
Tabela 10. Relação entre os volumes de SG(Fe^{3+} -DETC) e NaNO_2 em diferentes concentrações a fim de obter, após redução em ditionito NO, em diferentes concentrações.	92
Tabela 11. Relação entre os volumes de Fe^{3+} -DETC e NaNO_2 em diferentes concentrações a fim de obter, após redução em ditionito, NO em diferentes concentrações.	93
Tabela 12. Estimativa do teor percentual de NO liberado entre os tempos de aprisionamento de 2 a 60 min para os surfactantes utilizados.	103

Tabela 13. Análise da superfície dos sensores sólidos, principais parâmetros avaliados pelo método BET.....	104
Tabela 14. Intensidade dos sinais de RPE adquirida a partir dos sensores preparados com diferentes surfactantes e em concentrações que variam de 6 - 16mM.	113
Tabela 15. Avaliação qualitativa dos complexos Fe-DETC e NO-Fe-DETC em solução DMF, SG líquido e SG sólido	114
Tabela 16. Coeficiente angular das curvas de calibração adquiridas por dupla integração do sinal de RPE.	127

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RPE – Ressonância paramagnética eletrônica;
NO – Monóxido de nitrogênio (Óxido nítrico);
EDRF – Fator de relaxamento derivado do endotélio;
NOS – Enzima sintetase do NO;
CaM – Calmodulina;
GMP – Guanosina monofosfato;
GC – Enzima guanilato ciclase;
GTP – Guanosina trifosfato;
GMPc – Guanosina monofosfato cíclico;
DNIC – Complexo ferro-dinitrosil;
DNIC-(GS) – Ferro glutathionildinitrosil;
FeDETC – ferro dietilditiocarbamato;
MGD – N-metil-D-glucamina ditiocarbamato;
DETC – N,N-dietilditiocarbamato de sódio;
DTCS – Ditiocarbamato sarcosina;
DTCs – Ditiocarbamatos
MNIC – Complexo ferromononitrosil;
LPS – Lipopolissacarídeo bacteriano;
SG – Sol-gel;
TEOS – Tetraetil-ortosilicato;
ORMOSIL – Silicato organicamente modificado;
DMF – N,N-dimetilformamida;
SG(Fe²⁺-DETC) – Sol-gel ferro dietilditiocarbamato;
CTAB – Brometo de cetiltrimetilamônio;
SDS – Dodecilsulfato de sódio;
Triton X100 – Polietileno glicol p-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenil éter;
F127 – Bloco copolimérico;
SG(F127-Fe²⁺-DETC) – Sol-gel ferro dietilditiocarbamato contendo F127;
CMC – Concentração micelar crítica;
NO-Fe²⁺-DETC – Complexo paramagnético MNIC;
MNIC – Mononitrosil ferro complexos;
Heme – Grupamento onde se liga o ferro na molécula da hemoglobina;
DMSO – Dimetilsulfóxido;
BSA – Albumina do soro bovino;

SUMÁRIO

1 Introdução.....	20
2 Fundamentação Teórica.....	23
2.1 Ressonância Paramagnética Eletrônica	23
2.1.2 Princípios de Ressonância Paramagnética Eletrônica	24
2.1.3 O Efeito Zeeman.....	24
2.1.4 O Fenômeno da Ressonância.....	26
2.1.5 Interações entre o Elétron e sua vizinhança – O fator g	28
2.1.6 A Estrutura Hiperfina - Momento magnético Nuclear e o Efeito Zeeman Nuclear	31
3 A molécula do NO.....	34
3.2 Química do NO: Aspectos Biologicamente relevantes	35
3.2.1 Biossíntese e enzimologia	35
3.3 Propriedades Físico-Química do NO.....	36
3.4 Degradação e transporte do Óxido Nítrico	38
4 Métodos de Quantificação do NO	41
4.1 Detecção do NO pela técnica de aprisionamento de <i>Spins</i>	42
4.2 Propriedades físico-químicas dos complexos de ferro mononitrosil com ligantes ditiocarbamatos.....	45
5 A técnica do processamento Sol-Gel.....	53
5.1 Princípios físico-químicos da técnica	53
5.2 Principais aplicações da técnica SG	57
6. O sensor sólido de NO.....	60

6.1 Processo de síntese dos sensores: Estado inicial da técnica	60
6.2 Comportamento óptico do Fe-DETC nos sensores sólidos	68
7. O papel dos surfactantes na produção de materiais pelo método sol-gel utilizando o precursor TEOS	72
8. Material e Métodos	80
8.1 O Espectrômetro de RPE	80
8.2 Preparação dos sensores: Soluções utilizadas no processo de síntese e aprisionamento do NO	83
8.2.1 Soluções SG preparados com SDS, e CTAB, Triton X100	83
8.2.2 Solução SG preparada com F127 (SG-F127)	84
8.2.3 Soluções para o estudo da concentração dos surfactantes SDS, CTAB, Triton X100 e F127	85
8.2.4 Solução geradora de NO	86
8.2.5 Solução mista de surfactantes	87
8.2.6 Síntese dos sensores e obtenção dos sinais do complexo $\text{NO-Fe}^{2+}\text{-DETC}$	88
8.2.7 Tempo de aprisionamento do NO	89
8.3 Sensor no estado líquido	91
8.4 Caracterização dos sensores	95
8.4.1 Medida da tensão superficial	95
8.4.2 Isotropia do complexo $\text{NO-Fe}^{2+}\text{-DETC}$	96
8.4.3 Área específica e distribuição do volume de poros (BET)	96
9. Resultados e Discussão	98
9.1 Tempo de aprisionamento do NO no sensores sólidos	101
9.1.1 Caracterização dos materiais: Análise BET e tensiometria pelo método do anel	103

9.2 Resposta do sinal de RPE em função da concentração dos surfactantes utilizados na confecção dos sensores no estado sólido	107
9.3 Surfactantes mistos: Efeito da mistura dos surfactantes sobre o sensor sólido	117
9.4 Sinais obtidos a partir do sensor no estado líquido	119
9.4.1 Isotropia do sinal	120
9.4.2 Intensidade dos sinais de RPE em função do número de radicais NO	123
10. Conclusão	130
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	131
APÊNDICES	141
APÊNDICE A – Trabalhos desenvolvidos além do projeto de doutorado.....	142
APÊNDICE B – Participação em eventos e publicações	145

Capítulo 1

Introdução

1 Introdução

Desde a descoberta do papel do óxido nítrico (NO) no processo de relaxamento muscular cardíaco¹, inúmeros pesquisadores têm se empenhado em monitorar e quantificar essa molécula na intenção de conhecer suas atividades biológicas, mecanismos de ação e suas funções relacionadas a certas patologias. A quantidade de publicações relacionadas ao NO supera qualquer base de pesquisa já registrada na história, desde a fisiologia e bioquímica até o desenvolvimento de dispositivos de detecção. Quanto mais se investiga o NO mais se descobre funções relacionadas a processos biológicos outrora desconhecidos.

A demonstração da produção do NO ainda é difícil, sendo na maioria das vezes feita de maneira indireta. Aliás, todas as pesquisas pioneiras não detectaram o NO diretamente devido a sua alta reatividade. Sua presença tem sido deduzida, considerando-se as concentrações de nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-).

A detecção e quantificação de moléculas específicas dentro de organismos vivos e sistemas modelo é crucial para a compreensão dos processos bioquímicos inerentes. Este, é evidentemente um grande desafio quando a molécula de interesse está presente em baixas concentrações ou tem uma meia vida curta, que são características de muitas moléculas mensageiras envolvidas na sinalização de eventos biológicos. A especificidade de um método analítico depende das propriedades da molécula. Dessa forma, a detecção do NO por ressonância paramagnética eletrônica (RPE) enfrenta alguns problemas, pois, o NO em solução aquosa não é detectável por esta técnica, entretanto, isso pode ser resolvido

¹ A descoberta do papel do NO no processo de relaxamento muscular cardíaco rendeu o *Prêmio Nobel* de medicina de 1997 a Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro e Ferid Murad.

aprisionando o NO dentro de complexos paramagnéticos que o torna mais estável e susceptível a detecção por este método. Além disso, as propriedades estruturais e eletrônicas destas espécies e os produtos paramagnéticos das reações biológicas do NO podem ser caracterizados.

Atualmente há uma grande quantidade de compostos aprisionadores de NO em uso, dentre eles, vale destacar, os derivados de ditiocarbamatos. Em trabalhos anteriores, apresentamos um sensor sólido de NO baseado no aprisionamento de complexos de ferro-dietilditiocarbamato dentro de matrizes porosas preparadas pelo método sol-gel, trabalho pioneiro na detecção e quantificação do NO no estado sólido na temperatura ambiente. Aqui, reportamos o efeito de alguns surfactantes sobre propriedades físico-químicas do sensor, dentre elas, resistência mecânica, limite de detecção, relação sinal-ruído dos sinais RPE, porosidade do material sólido, tempo de aprisionamento, tempo de secagem e limite de detecção.

Capítulo 2

Princípios de RPE

2 Fundamentação Teórica

2.1 Ressonância Paramagnética Eletrônica

A ressonância paramagnética eletrônica (RPE) é uma técnica que permite detectar e caracterizar moléculas através dos elétrons desemparelhados sem alterar ou destruí-las [1]. O fenômeno pode ser observado nos radicais livres, íons com camadas eletrônicas incompletas, defeitos em sólidos etc.

Os radicais livres geralmente apresentam um tempo de vida relativamente curto, entretanto, desempenham funções importantes em muitos processos fisiológicos [2]. Isso tudo faz da técnica de RPE um instrumento de grande aplicação nas diversas áreas de interesse biológico. Por outro lado, é bastante utilizada na catálise para investigar espécies paramagnéticas. As informações obtidas vão da simples confirmação de uma dada espécie, até a determinação de sua simetria, tipo de coordenação, vizinhança e estado de oxidação [3].

A extrema sensibilidade da RPE quando comparada às outras técnicas espectroscópicas, é certamente sua maior vantagem e por isso tem sido usada para a investigação e caracterização de sítios ativos de baixa abundância [3]. A seguir será apresentada uma pequena introdução sobre os princípios da técnica de RPE que ajudarão no entendimento dos espectros obtidos a partir do complexo NO-Fe²⁺-DETC.

2.1.2 Princípios de Ressonância Paramagnética Eletrônica

Um elétron livre possui um momento angular intrínseco, conhecido simplesmente como **spin**, denotado pelo vetor **S**, o qual, em uma dada direção, pode somente assumir dois valores, $M_s = \pm 1/2 \hbar$ onde $\hbar = h/2\pi$. O momento magnético μ_s de um elétron está relacionado ao momento angular pela seguinte expressão:

$$\mu_s = -g_e \beta S \quad (1)$$

onde o fator g_e do elétron livre tem valor de $g_e = 2,002319$; β é o magnéton de Bohr, $\beta = eh/4\pi mc$, sendo e e m a carga e a massa do elétron, respectivamente e c a velocidade da luz [3].

2.1.3 O Efeito Zeeman

A energia de interação do momento magnético do elétron com um campo magnético **B**, aplicado externamente é dada por:

$$E = - \mu_s \cdot \mathbf{B} \quad (2)$$

onde **B** é a densidade de fluxo magnético, medido em Tesla (T) ou Gauss (1 T = 10^4 G).

Na mecânica quântica o vetor μ é substituído por um operador levando à seguinte Hamiltoniana, ou seja, ao operador de energia:

$$H = g_e \beta \mathbf{B} \cdot \mathbf{S} \quad (3)$$

Assumindo que $\mathbf{B}$ é aplicado apenas na direção z (B_x e B_y são zero e $B = B_z$), a Hamiltoniana corresponde simplesmente a:

$$H = g_e \beta B S_z \quad (4)$$

As energias correspondentes às duas orientações permitidas do *spin* são:

$$E = \left(\pm \frac{1}{2} \right) g_e \beta B \quad (5)$$

Estes dois níveis de energia são freqüentemente referidos de níveis *Zeeman*. O menor nível de energia corresponde a $M_s = -1/2$, para o caso de $\mathbf{B}$ e $\boldsymbol{\mu}_s$ serem paralelos. Os dois são antiparalelos quando $M_s = +1/2$, associado ao nível mais energético. A diferença de energia entre estes dois níveis é:

$$\Delta E = g_e \beta B \quad (6)$$

No equilíbrio térmico, sob influência do campo magnético externo aplicado, a população de *spin* é dividida entre os dois níveis de acordo com a lei de Maxwell-Boltzmann:

$$\frac{n_1}{n_2} = e^{-\frac{\Delta E}{kT}} \quad (7)$$

onde k é a constante de Boltzmann, T a temperatura absoluta, n_1 e n_2 são as populações de *spin* caracterizadas pelos valores de M_s de $+1/2$ e $-1/2$, respectivamente. A 77K, em um campo de 3000 G, n_1 e n_2 diferem em menos de 0,005 [3].

2.1.4 O Fenômeno da Ressonância

A transição entre os dois níveis **Zeeman** de um sistema paramagnético pode ser induzida pela irradiação de uma onda eletromagnética favorável, com uma frequência ν satisfazendo a condição de ressonância:

$$\Delta E = g_e \beta B = h\nu \quad (9)$$

Através da equação acima pode-se deduzir que a frequência necessária para ocorrer a transição está na região das microondas. Um esquema de energia dos níveis **Zeeman** e as correspondentes transições podem ser vistas na figura 1, bem como a absorção e sua primeira derivada, a qual por razões que serão explicadas a seguir é a usual representação do espectro de RPE.

Com o processo de absorção de energia, a população dos dois níveis de energia n_1 e n_2 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. Esta energia liberada deve ser dissipada dentro da rede como fônons, ou seja, em energia vibracional, rotacional ou translacional. O mecanismo pelo qual a dissipação ocorre é chamado de relaxação **spin**-rede e é caracterizado por um decaimento exponencial de energia em função do tempo [3].

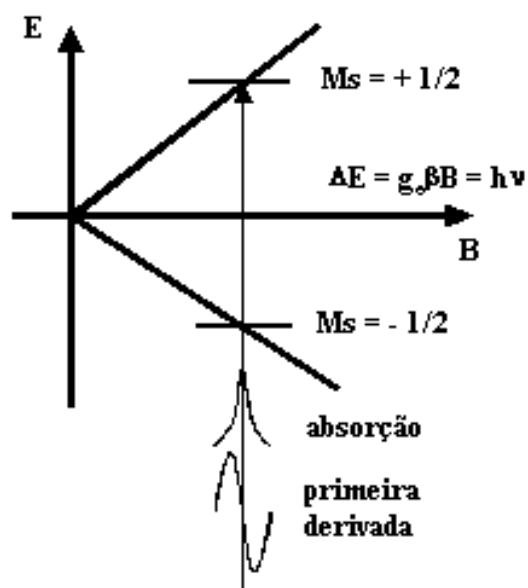


Figura 1. Níveis Zeeman de um elétron em um campo magnético externo aplicado.

As formas de linhas típicas dos sinais de RPE são Gaussianas e Lorentzianas. A figura 2 ilustra as características dos dois tipos de linhas, em termos da (a) absorção normalizada e (b) da primeira derivada [3].

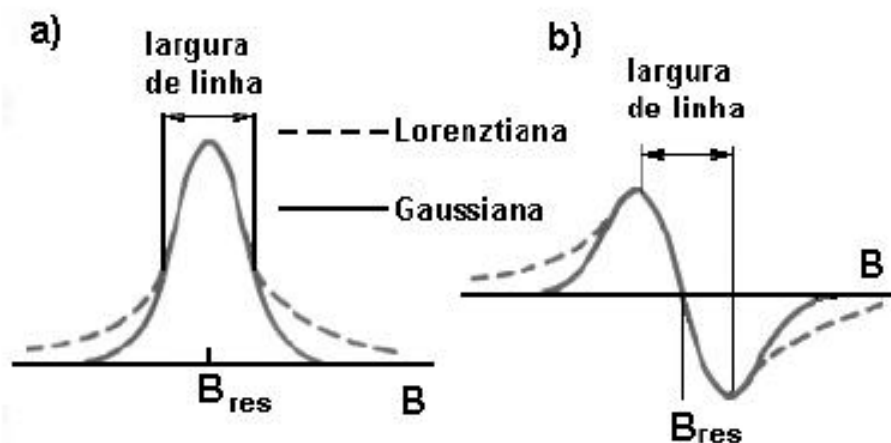


Figura 2. Formas de linhas Gaussianas e Lorentzianas: (a) absorção e (b) primeira derivada.

2.1.5 Interações entre o Elétron e sua vizinhança – O fator g

Nos sistemas químicos reais, o elétron não está livre, mas está associado a espécies paramagnéticas. A primeira interação ocorre entre o *spin* S e o momento angular orbital L . O último está associado ao momento magnético da seguinte forma:

$$\mu_L = -g_L \beta L \quad (10)$$

onde g_L é o fator g orbital. O acoplamento entre estes dois momentos gera um momento angular resultante:

$$J = L + S \quad (11)$$

Considerando um sistema duplo ($S = 1/2$) não degenerado, no estado fundamental e com momento magnético nuclear igual a zero ($\mu_n = 0$) a interação com um campo magnético externo pode ser expressa em termos de uma perturbação da Hamiltoniana pelos três termos seguintes:

$$H_{\text{pert}} = g_e \beta \mathbf{B} S + \beta \mathbf{B} L + \lambda \mathbf{L} S \quad (12)$$

O primeiro e Segundo termo corresponde às energias *Zeeman* do elétron e *Zeeman* orbital, respectivamente. O terceiro termo representa a energia de acoplamento *spin*-órbita. A constante de acoplamento *spin*-órbita, λ , mistura as funções de onda do estado fundamental com as dos estados excitados.

Através do efeito de acoplamento *spin*-órbita, o elétron pode adquirir algum momento angular. Os valores padrões de λ para vários átomos têm sido obtidos dos espectros

atômicos. A Hamiltoniana inicial, chamada de Hamiltoniana de **Spin** concebida somente com o **spin** e seu movimento dentro da órbita, pode ser expressa de uma maneira simples:

$$H = \beta \mathbf{B} \cdot \mathbf{g} \cdot \mathbf{S} \quad (13)$$

$\mathbf{S}$ agora é um **spin** fictício e $\mathbf{g}$ é um tensor de segunda ordem (ou uma matriz simétrica 3x3) que representa a anisotropia de interação do elétron desemparelhado e o campo magnético externo. Esta equação também descreve o fato de que a contribuição orbital do momento magnético pode ser diferente ao longo dos diferentes eixos moleculares. Em outras palavras, o momento magnético do elétron em um sistema paramagnético real não é exatamente antiparalelo ao **spin** e sua magnitude não é a de um elétron livre, mas depende da orientação do sistema no campo magnético aplicado. Este conceito pode ser sumarizado como:

$$\mu_S = -\beta \mathbf{g} \mathbf{S} \quad (14)$$

a qual é análoga à equação (1).

O tensor $\mathbf{g}$ pode ser visualizado em um elipsóide, onde os valores de g_{xx} , g_{yy} , e g_{zz} dependem dos eixos de simetria do íon paramagnético com respeito ao campo magnético aplicado (figura 3)[3]. Como consequência da anisotropia de $\mathbf{g}$ tem-se que o campo ressoante de uma espécie paramagnética depende da orientação dos centros paramagnéticos no campo magnético.

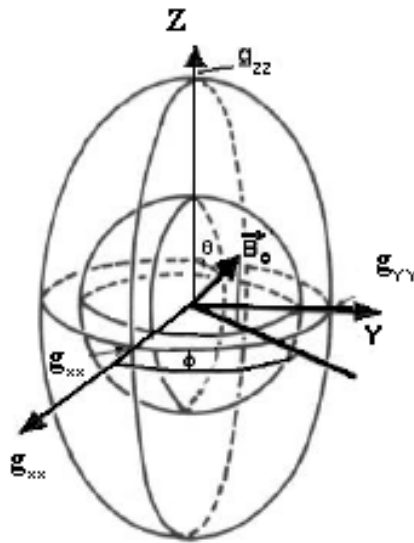


Figura 3. Definição dos ângulos característicos φ e θ para descrever a orientação do campo magnético B_0 com respeito ao elipsóide g no sistema de eixos x , y e z .

O valor de g corresponde a estas três orientações (g_{xx} , g_{yy} e g_{zz}) são os elementos principais do tensor g (elementos diagonal). Este é o caso de uma simetria ortorrômbica. Entretanto, no caso de simetria axial, o elipsóide é axialmente simétrico, tendo duas componentes iguais (por exemplo, $g_{xx} = g_{yy}$) e diferentes da terceira delas (g_{zz}). As componentes idênticas são usualmente denotadas de $g_{\perp} = g_{xx} = g_{yy}$ e a outra componente $g_{\parallel} = g_{zz}$, se Oz é o eixo de simetria principal. Neste caso, dois valores particulares de campo ressonante são observados: $B_{\perp}$ para $\theta = \pi/2$ independente de φ e $B_{\parallel}$ para $\theta = 0$. No caso de simetria esférica, o elipsóide passa a ser uma esfera e todas as componentes principais são iguais (sistema isotrópico) e denotadas por $g_{iso} = g_{xx} = g_{yy} = g_{zz}$. O único campo ressonante é observado em B_{iso} independente de θ e φ .

2.1.6 A Estrutura Hiperfina - Momento magnético Nuclear e o Efeito Zeeman Nuclear

Até agora foi considerada apenas a interação entre o *spin* eletrônico e o campo magnético externo. O que é mais interessante para a química é a interação entre o *spin* S e o campo magnético interno, particularmente aquele devido ao magnetismo do núcleo da molécula em questão.

Vários núcleos possuem *spin* (momento angular nuclear) e correspondentes momentos magnéticos nuclear (μ_n) que estão associados através da seguinte expressão:

$$\mu_n = g_n \beta_n I \quad (15)$$

onde g_n é o fator g nuclear e β_n é o magnéton nuclear, o qual é menor que o magnéton de Bohr por um fator de 1838, ou seja, a razão entre a massa do elétron e o próton. Quando um centro paramagnético contém um ou mais núcleos com *spin* nuclear diferente de zero, a interação entre o elétron desemparelhado e o núcleo origina uma separação da energia Zeeman, e conseqüentemente, novas transições que são responsáveis pela chamada estrutura hiperfina do espectro de RPE.

Uma interação hiperfina típica é a observada para o átomo de hidrogênio como mostra a figura 4. O *spin* eletrônico interage com o *spin* nuclear ($I = 1/2$), sendo que este último pode assumir duas orientações $M = \pm 1/2$.

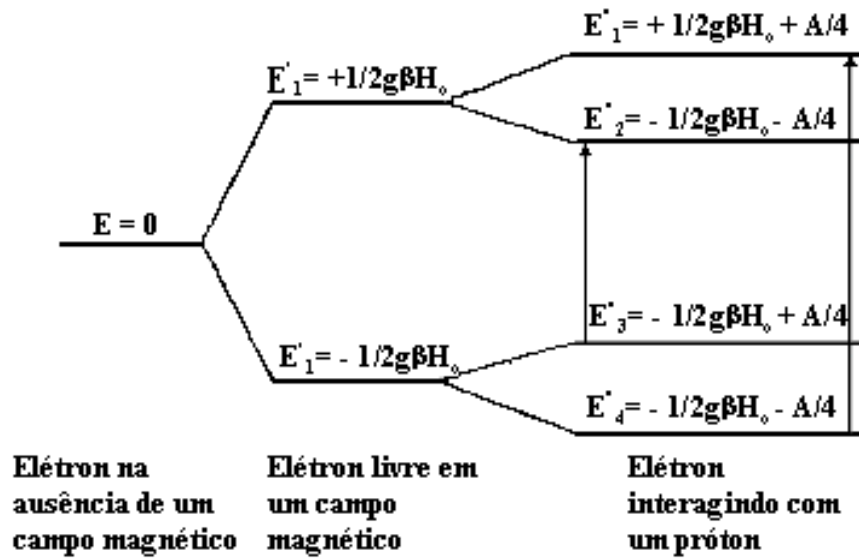


Figura 4. Desdobramento hiperfino dos níveis de energia do átomo de Hidrogênio na presença de um campo magnético aplicado.

Deste modo, o momento magnético nuclear separa cada nível Zeeman em dois sub-níveis correspondendo a duas linhas de ressonância [4]. No caso de n núcleos equivalentes, isto é, que interagem igualmente com o elétron desemparelhado, possuindo *spin* I , o espectro de RPE consiste de $2nI + 1$ linhas, as quais formam a estrutura hiperfina. Portanto, o número de separações na estrutura hiperfina leva ao número e a natureza dos núcleos interagentes. O espaçamento entre duas linhas consecutivas é chamado de constante hiperfina (A). Em geral, quando um ou mais núcleos com $I \neq 0$ estão presentes num sistema, a interação hiperfina é dependente da orientação e deve ser expressa por um tensor.

A Hamiltoniana de *spin* para um sistema com $S = 1/2$ que contenha j núcleos com $I \neq 0$ pode ser escrita como:

$$H = \mu_n \beta g S + \sum_j I A S \quad (16)$$

onde A é o tensor hiperfino.

Capítulo 3

A molécula de NO

3 A molécula do NO

3.1 Fisiologia do Óxido Nítrico

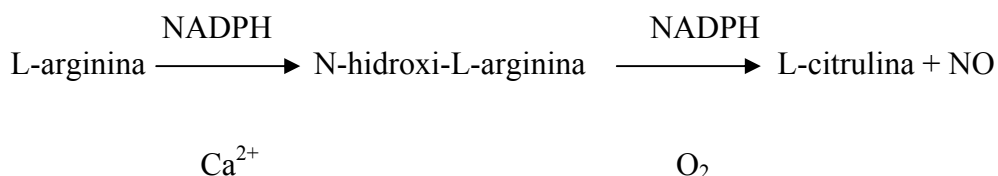
A convergência de várias linhas de pesquisa levou ao reconhecimento de que o óxido nítrico (NO) atua como mecanismo fundamental de sinalização nos sistemas cardiovascular e nervoso [5,6] e desempenha a função de defesa no sistema imunológico [7]. Acredita-se também que ele esteja relacionado a danos no tecido em situações de isquemia [8] e morte neural [9]. Sua ação na imuno-regulação está presente na inflamação e nos mecanismos de auto-imunidade [10].

Como sinalizador age dentro de muitos tecidos na regulação de diversas áreas do processo fisiológico incluindo neurotransmissão e defesa imune [11,12]. É altamente tóxico em altas concentrações [13,14]. O interesse no estudo do NO intensificou a partir do momento que ficou comprovado ser o óxido nítrico o responsável pela atividade de vasodilatação derivada do endotélio (EDRF) [15]. A identificação do NO como mediador fisiológico para tal processo ficou estabelecida entre 1987-1988 por Ignarro [16], Moncada [5] e Furchgott [17].

3.2 Química do NO: Aspectos Biologicamente relevantes

3.2.1 Biossíntese e enzimologia

Biologicamente, o NO é sintetizado por uma única enzima, a NO sintase, que é um complexo enzimático auto-suficiente do tipo P450 [18] a partir da L-arginina conforme a reação clássica:



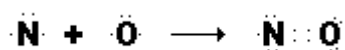
Muitas células são capazes de sintetizar o NO através de hemeoproteínas [19-21] da família citocromo P450, denominadas de NO sintases (NOS), elas podem ser classificadas quanto a dependência de Ca^{2+} conforme pode ser visto na *tabela 1*.

Tabela 1. Classificação das NOS conforme abreviaturas, sinonímias e dependência de Ca^{2+} .

Nome	Abreviatura	SINONÍMIA	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	
	<i>eNOS</i> (endothelial-NOS)		
Sintase endotelial	<i>EC-NOS</i> (endothelial	Isoforma I I	Ca^{2+} - Dependente
<i>NOS III</i>	constitutive-NOS)		

3.3 Propriedades Físico-Química do NO

O NO é um gás incolor na temperatura ambiente². Sua máxima solubilidade em água é semelhante a do oxigênio puro, 2-3 mM. É uma molécula não polar 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 tem 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 5).

² Ponto de ebulição, -151,7 °C a 1 atm.

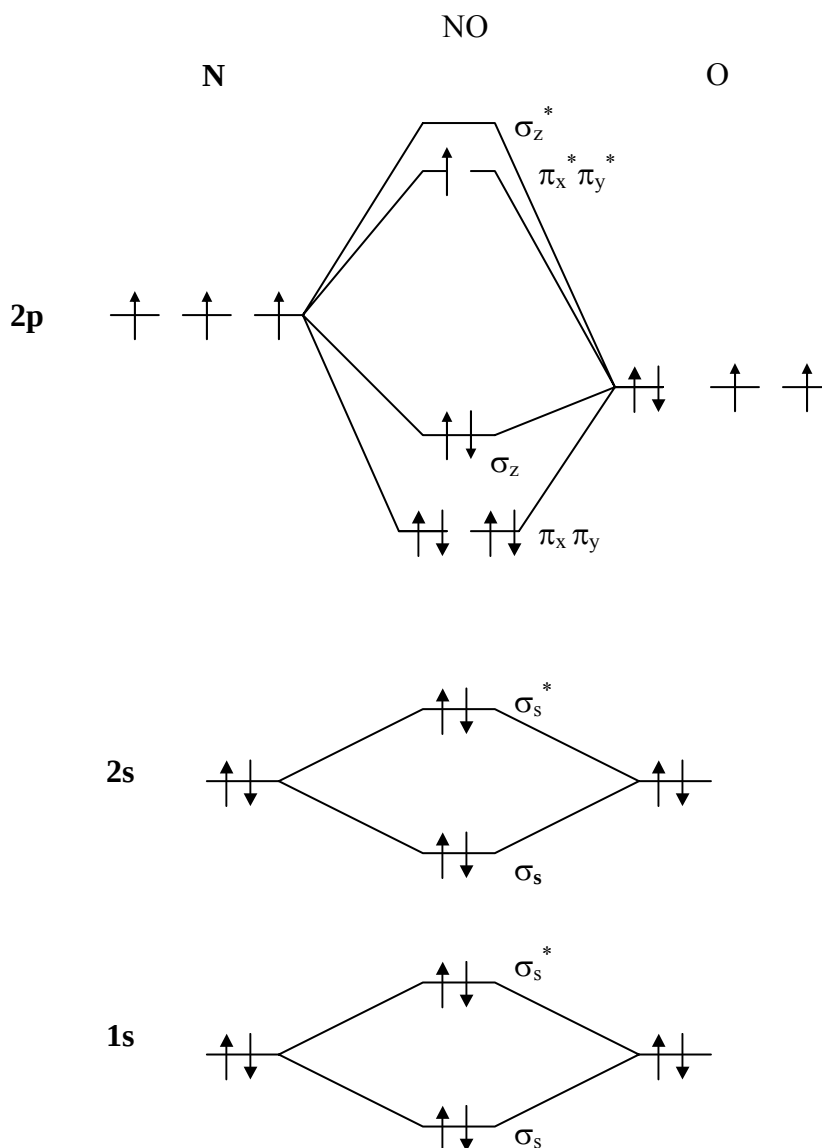
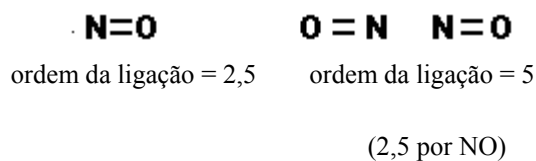


Figura 5. Diagrama do orbital molecular para o óxido nítrico.

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 [22]. 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 [23].



Como este trabalho está focado na utilização de complexos de Fe^{2+} -DETC 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 [24-26]. 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 [27]. Pode também formar complexos com metais de transição não associados com um grupamento heme [28]. Outras reações de nitrosação envolvendo o NO são prováveis de ocorrer nas células [29].

3.4 Degradação e transporte do Óxido Nítrico

Na ausência do oxigênio, o NO ligado à hemoglobina é relativamente estável; entretanto, na presença do oxigênio, o NO é imediatamente convertido em nitrato, e o ferro hêmico é oxidado a met-hemoglobina. Além dessa reação de inativação, foi recentemente demonstrado que o NO também se liga reversivelmente à globina dos grupos sulfidríla reativos de um resíduo de cisteína. Portanto, deve haver um ou vários eventos entre a produção do NO e a célula alvo (veja a figura 6)

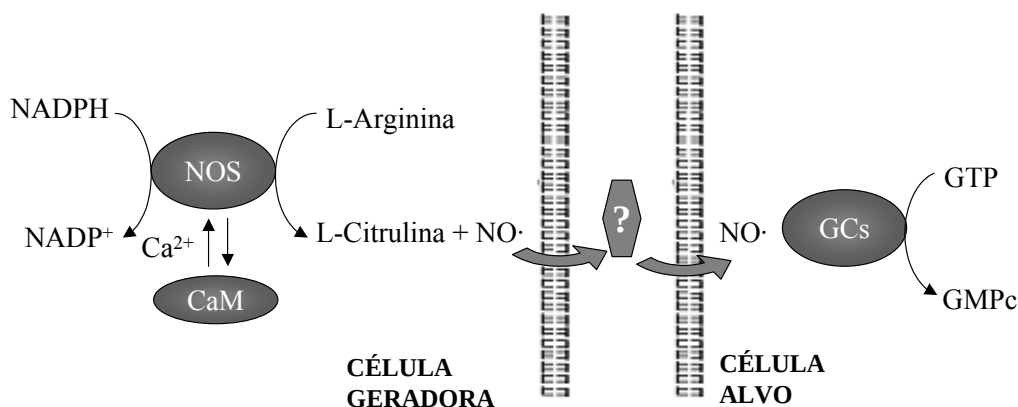


Figura 6. Etapa indefinida entre a produção do NO e a célula alvo.

Por exemplo, Ueno et al (2002) [30] propuseram um modelo de transporte do NO mostrando que em sistemas biológicos, o NO é transferido de um DNIC, como o ferrodiglutationildinitrosil $[\text{DNIC}-(\text{GS})_2]$ para o $\text{Fe}(\text{DTC})_2$, formando $\text{FeNO}(\text{DTC})_2$, por um processo conhecido como transnitrosilação. O modelo proposto pode ser visto na figura 7.

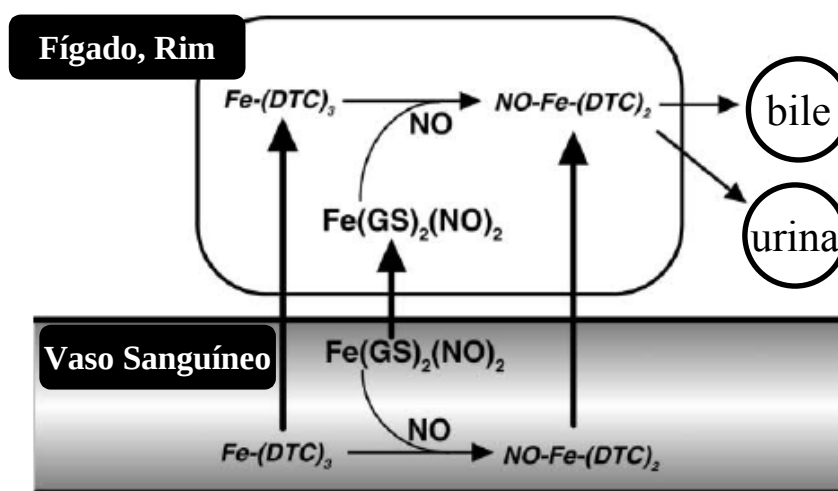


Figura 7. Caminhos possíveis e simplificados da formação do complexo $\text{Fe}(\text{DTC})_2\text{NO}$ através da reação de um $\text{DNIC}-(\text{GS})_2$ com eDTC em sistemas biológicos.

Capítulo 4

Métodos de Quantificação do NO

4 Métodos de Quantificação do NO

Existe uma série de sensores de NO endógeno em desenvolvimento e outros já no mercado. Entre os sistemas de detecção mais importantes estão: (1) quimioluminescência usando a reação de NO com ozônio ou luminol; (2) fluorometria utilizando indicadores fluorescentes de NO; (3) espectrofotometria utilizando a formação de NO-hemoglobina (NO-Hb); (4) espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) usando aprisionadores de *spin* tais como Hb, compostos orgânicos e complexos de ferro-ditiocarbamato (FeDTC); e (5) métodos eletroquímicos usando microeletrodos específicos.

O encapsulamento do Fe-DETC em uma matriz de sílica apresenta uma série de vantagens sobre o estado da técnica, as quais serão detalhadas a seguir.

A quimioluminescência, por exemplo, requer uma reação na fase gasosa do NO com o ozônio [31]. Apesar de muito sensível e seletivo ao NO, o método requer que a solução aquosa seja purgada com um gás inerte para levar o NO da solução até o analisador. Portanto, é um método incapaz de monitorar o NO intracelular. O outro método quimioluminescente utilizando Luminol tem sérias limitações por utilizar H₂O₂ que é citotóxico [32-34]. Os métodos eletroquímicos utilizando microsensores detectam NO *in situ* e em tempo real [35]. No entanto, a seletividade ao NO ainda é de forma geral um problema. Um segundo problema potencial, no que diz respeito às aplicações é o fato de que um potencial elétrico (ou corrente elétrica) é aplicado para a detecção. Essa corrente elétrica pode perturbar de maneira significativa o organismo-sistema em análise, por exemplo, quando o objeto de estudo é a neurotransmissão, seu emprego não seria recomendado.

Uma condição importante para a determinação de NO *in vivo* e *in situ* é minimizar o distúrbio ou invasão causada pela medida no sistema. Como já mencionado, a técnica de RPE utilizando aprisionadores de NO é utilizada com sucesso nessas situações, inclusive na realização de imagens *in vivo* em pequenos animais [36].

4.1 Detecção do NO pela técnica de aprisionamento de *Spins*

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 quimioluminescência) e também não há necessidade de um contato direto com ela (como no método eletroquímico). No entanto se limita a espécies paramagnéticas, como vimos anteriormente.

A técnica do aprisionamento de *spin* combinada com RPE se tornou um dos mais poderosos métodos para a medida direta da produção de NO em sistemas biológicos e tem sido explorada por diversas áreas de pesquisa. Complexos de ferro com derivados de ditiocarbamatos (DTCs)³ estão entre os principais agentes aprisionadores de *spin* utilizados atualmente, devido a alta afinidade do NO a complexos de ferro resultando na formação dos complexos nitrosil NO-Fe²⁺-DETC exibindo intenso sinal tripleto ($g_{av} = 2,04$) na temperatura ambiente e um espectro com simetria axial ($g_{\perp} = 2,03$, $g_{\parallel} = 2,02$) em baixas temperaturas [37,38]. Tanto Fe²⁺-DETC quanto Fe³⁺-DETC pode reagir com o NO diretamente para produzir NO-Fe²⁺-DETC mesmo na presença do oxigênio [39].

Mordvintcev e colaboradores [37] observaram que quando Fe²⁺ não era adicionado nas amostras, o ânion DETC não somente capturava o Fe²⁺ disponível nas células como também Cu²⁺ que produz um sinal de Cu²⁺DETC com sinal em $g = 2$ conforme a *figura 8*. Eles demonstraram que o NO-Fe²⁺-DETC apresenta um espectro de RPE em solução com

³ Os DTCs podem ser, dentre outros, MGD ou DETC.

$g_{\text{iso}} = 2,03$ e um desdobramento hiperfino $A(^{14}\text{N}) = 1,3 \text{ mT (13 G)}$ *figura 8A* [37,38] e um espectro axial ($g_x = g_y = g_{\perp}$ e $g_z = g_{\parallel}$) em solução congelada caracterizado por um proeminente $g_{\perp} = 2,035$ com desdobramento hiperfino tripleto e um pico em $g_{\parallel} = 2,02$ (*figura 8B*).

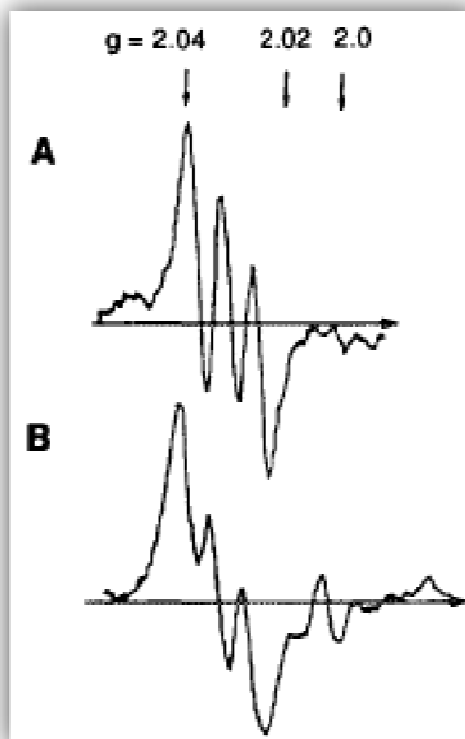


Figura 8. (A) Espectro de RPE (310K) e (B) solução congelada (77K) de células de levedura com DETC e encubadas com um composto vasodilatador que libera NO. O sinal em $g = 2$ em (B) é originado do $\text{Cu}^{2+}\text{DETC}$.

Os DTCs podem ser classificados em dois grupos conforme a solubilidade do seu complexo de ferro em água, onde o dietilditiocarbamato é o representativo insolúvel (DETC), enquanto que N-metil-D-glucamina ditiocarbamato (MGD) e sarcosina ditiocarbamato (DTCS) os solúveis em água, a estrutura desses complexos pode ser vista na *figura 9*.

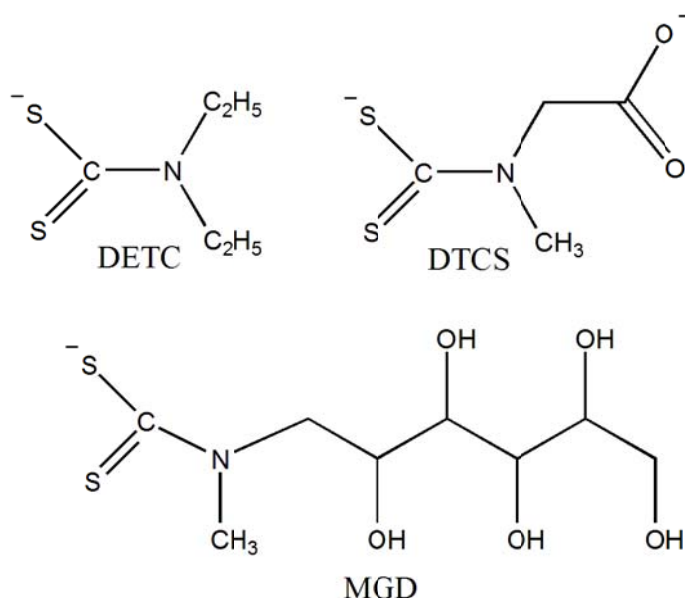


Figura 9. Fórmulas estruturais dos principais agentes utilizados como aprisionadores de NO.

Foi utilizado em nossos experimentos o dietilditiocarbamato (DETC). Vanin e colaboradores [37] foram os primeiros a usar o complexo FeDETC como um aprisionador para o NO. Desde então, este complexo tem sido largamente utilizado para a determinação do NO gerado em culturas de células e tecidos [40]. É insolúvel em água, mas é lipido-solúvel (hidrofóbico) e permeável através da membrana celular, sendo assim, o mais adequado para a detecção do NO intracelular e intramembranoso [41].

Foi demonstraram em experimentos de RPE com ratos, que o complexo Fe²⁺-DETC é um aprisionador mais eficiente de NO do que o hidrofílico Fe²⁺-MGD. Esta diferença pode ser devido a alta estabilidade do complexo ferro mononitrosil paramagnético com DETC (MNIC-DETC).

4.2 Propriedades físico-químicas dos complexos de ferro mononitrosil com ligantes ditiocarbamatos

Complexos Fe^{2+} -DETC são utilizados frequentemente como aprisionadores de NO e representam uma das poucas técnicas disponíveis para detecção do NO *in vivo* [42-47], isso é possível devido a alta afinidade do NO ao ferro [48].

A eficiência do método analítico está ligada a estabilidade do NO complexado. Frente a um tempo de vida extremamente pequeno, o aprisionamento através do Fe^{2+} -DETC apresenta boa estabilidade em tecidos biológicos. Todos os ditiocarbamatos compartilham as pontes de enxofre comportando como um ligante bidentado. O nitrogênio pode modificar a físico-química do composto sendo responsável pelo caráter lipofílico e pela solubilidade do complexo. Os dois ligantes mantêm o íon metálico em uma conformação planar deixando o sítio de coordenação axial livre para possíveis ligações. A figura 10 representa o mecanismo de formação do complexo Fe-DETC e subsequente aprisionamento do NO [49].

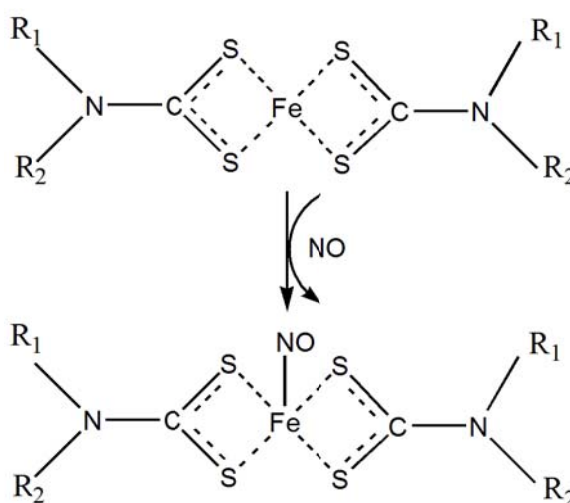


Figura 10. Estrutura geométrica e reação de aprisionamento do complexo Fe-DETC. O ferro pode se ligar tanto no estado férrico quanto ferroso. O complexo ferroso é paramagnético.

Os ligantes DETC são bastante solúveis em água e ótimos quelantes⁴ para os íons ferro, entretanto, produzem complexos lipofílicos com solubilidade moderada (10^{-7} M em pH = 7) [50]. Todavia, concentrações de até 50 μ M podem ser atingidas em soluções aquosas por até 20 min, com o surgimento, após um tempo prolongado, de pequenas partículas pretas. O Fe^{2+} -DETC é susceptível a degradação em meio aquoso liberando substâncias tóxicas como o dissulfeto de carbono e amina.

A taxa de aprisionamento do NO à complexos ditiocarbamatos, tanto no estado férrico quanto ferroso, é significativamente elevada. Para o Fe-DETC, a taxa de aprisionamento do NO livre é da ordem de 10^6 – 10^8 (Ms)⁻¹[51]. Esse fator faz desses compostos, agentes eficientes para estabilizar o NO complexado (NO- Fe^{2+} DETC) para subsequente quantificação através de métodos espectroscópicos como a ressonância paramagnética eletrônica (RPE). A tabela 2 mostra as taxas de aprisionamento dos principais ditiocarbamatos utilizados atualmente.

Tabela 2. Taxas de aprisionamento dos radicais livres através dos vários complexos de Ferro-ditiocarbamato. ProDTC = L-prolina ditiocarbamato; DTCS = N-(ditiocarboxi) sarcosina; MGD = N-metil-d-glucamina ditiocarbamato.

Complexo	Taxa de aprisionamento (Ms) ⁻¹	Solvente	pH
Fe^{2+} -ProDTC	$1,1 \cdot 10^8$	Tampão fosfato	7,0
Fe^{3+} -DTCS	$4,8 \cdot 10^8$	Tampão fosfato	7,4
Fe^{2+} -MGD	$1,2 \cdot 10^6$	Tampão fosfato	7,4
Fe^{2+} -DTCs	$1,7 \cdot 10^6$	Tampão fosfato	7,4

O complexo férrico nitrosil NO- Fe^{3+} -DETC é diamagnético, mas o estado ferroso NO- Fe^{2+} -DETC é paramagnético ($S = 1/2$) e pode ser detectado em soluções ou

⁴ Quelantes:

tecidos congelados por RPE, evidentemente se a quantidade de complexos exceder o limite de detecção instrumental (da ordem de picomols) [49].

O NO oxida facilmente, o que lhe confere um tempo de vida bastante pequeno na presença do oxigênio gasoso, entretanto, complexos NO-Fe²⁺-DETC apresentam um tempo de vida da ordem de 4h mesmo na presença de concentrações de oxigênio da ordem de mM. Borbulhando com ar durante 4h uma solução de NO-Fe²⁺-MGD 1mM, apenas a metade do Fe²⁺ é oxidado a Fe³⁺ na temperatura ambiente. Isso indica que, a presença de um ligante nitrosil, ajuda a manter o complexo no estado reduzido fazendo dos Fe-DTCs aprisionadores eficientes para o NO *in vivo* [52].

O paramagnetismo dos complexos NO-Fe²⁺-DTCs pode ser afetado por vários mecanismos, dentre eles podemos destacar as reações com peroxinitritos (ONOO⁻) que são potentes agentes oxidantes resultantes das reações do NO com radicais superóxido (O₂⁻). Neste caso, o complexo passa ser diamagnético (NO-Fe³⁺-DTCs) pela oxidação do Fe²⁺ a Fe³⁺. Aprisionadores Fe-DTCs, usualmente na concentração de 1 mM, protegem o NO livre contra os radicais superóxido em tecidos biológicos [53-55].

De acordo com o exposto, fica claro que a aplicação dos Fe-DTCs como aprisionadores requer a consideração de quatro diferentes complexos: férrico e ferroso, com ou sem ligantes nitrosil. Observe o esquema a seguir, proposto por Vanin et al. [49], demonstrando as possíveis rotas de formação dos complexos.

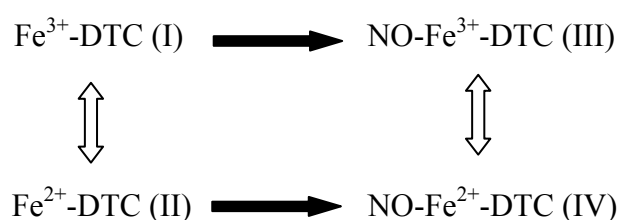


Figura 11. Esquema proposto para os quatro possíveis tipos de Fe-DTCs complexos.

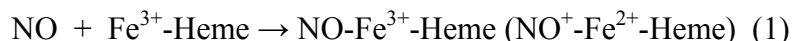
Esses quatro complexos podem ser facilmente distinguidos através dos espectros obtidos por RPE e absorção óptica. O complexo I possui alto *spin* ($S = 5/2$) e pode ser observado com RPE em $g = 4.3$ [56]. O complexo férrico mononitrosil III é diamagnético, enquanto que o complexo ferroso MNIC IV é paramagnético ($S = 1/2$) e observável por RPE em $g = 2.035$. A seta vertical representa as reações redox reversíveis. As reações de nitroação são irreversíveis devido a forte ligação dos NO ao ferro.

Freqüentemente, amostras em solução aquosa apresentam uma mistura dos complexos I–IV. Nesse caso, o espectro óptico aparece como uma superposição dos complexos e é difícil de analisar. Já os espectros obtidos por EPR são facilmente identificados. Uma vez que os complexos II e III, não são detectados por EPR, as espécies paramagnéticas I e IV são caracterizadas a partir da diferença no fator g .

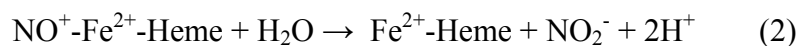
A análise dos valores dos parâmetros dos espectros de RPE a partir desses complexos tem demonstrado que o elétron desemparelhado está localizado principalmente no orbital d^2_z do ferro com configuração eletrônica d_7 (Fe^+). O NO por sua vez, aparece ligado nesses complexos na forma de NO^+ . Diante disso, a fórmula geral do MNIC com ditiocarbamatos pode ser descrita como $\text{Fe}^+(\text{NO}^+)(\text{S}_2\text{NCR}_2)_2$ [57].

A oxidação reversível, pode ocorrer para o complexo hidrofóbico MNIC ($\text{NO-Fe}^{2+}\text{-DETC}$). Em princípio, $\text{NO-Fe}^{3+}\text{-DETC}$ pode existir na forma de uma estrutura ressonante $\text{NO}^+\text{-Fe}^{2+}\text{-DETC}$, que pode ser sintetizado através da reação de aprisionamento

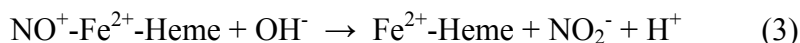
NO. A transição do complexo $\text{Fe}^{3+}\text{-NO}$ para o estado $\text{Fe}^{2+}\text{-NO}^+$ foi previamente proposto para ser um mecanismo de autoxidação-redução do $\text{Fe}^{3+}\text{-NO}$ semelhantemente ao que ocorre comumente em complexos nitrosil de vários grupamentos heme de proteínas a nível biológico [58]. A reação abaixo ilustra o mecanismo de formação do complexo nitrosilado.



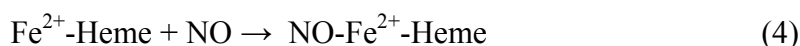
O íon nitrosônio ferroso ($\text{Fe}^{2+}\text{-NO}^+$) quando atacado pela água ou íons hidróxido liberam um íon nitrosônio deste complexo na forma de nitrito e $\text{Fe}^{2+}\text{-Heme}$ (vide equações 2 e 3).



ou

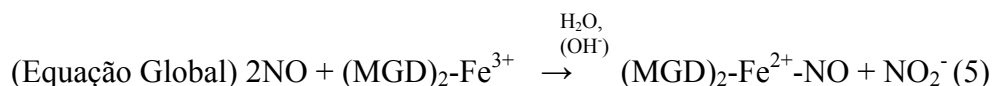
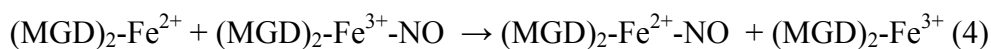
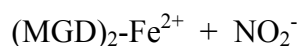
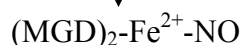


No caso da hemoglobina e mioglobina o $\text{Fe}^{2+}\text{-Heme}$ reage com o NO formando MNIC paramagnético (eq. 4):



Os mecanismos de oxidorredução dos complexos férrico e ferroso foram bem caracterizados através dos espectros de absorção óptica conforme descreve Vanin e colaboradores [56]. Os experimentos envolveram a oxidação e redução do Fe^{2+} através de dois mecanismos: (1) a presença de uma agente redutor como ascorbato ou ditionito, (2) a presença do próprio NO após 1h de contato com complexo $\text{Fe}^{3+}\text{-DTC}$. O espectro de absorção do $\text{Fe}^{3+}\text{-MGD}$ absorve em 340, 385 e 520 nm com a solução apresentando uma coloração **escura**, que aponta para a existência do ferro no estado férrico ($\text{Fe}^{3+}\text{-MGD}$). Adicionando um agente redutor como o ascorbato, a solução vai perdendo a cor tornado-se **incolor** o que

aponta para a redução do Fe^{3+} a Fe^{2+} caracterizando o complexo Fe^{2+} -MGD. Tais soluções quando em condições aeróbicas, voltam novamente ao estado férrico perceptível pela mudança na coloração de incolor para escura. Adicionando NO à solução de Fe^{3+} -MGD a coloração da solução muda para **amarelo claro** indicando a formação de NO-Fe^{3+} -MGD. A adição de um agente redutor faz com que a solução mude a coloração para verde-claro pela formação do paramagnético NO-Fe^{2+} -MGD com picos de absorção em 314, 368 e 450 nm. Os mesmos efeitos foram observados para o DETC. Processos semelhantes de nitrosilação e redução podem ser vistos nas ferrohemo proteínas [58]. Ainda, há uma possibilidade do próprio NO agir como redutor transformando em MNIC paramagnético. A forma como ocorre a denitrosilação do complexo Fe^{3+} -MGD ainda é desconhecido. O mecanismo proposto pode ser visto nas equações abaixo.



Vale salientar que a estabilidade desses complexos e eficiência como aprisionadores de NO ocorre para uma razão $\text{MGD:Fe} > 2$. Valores menores que esse afetam na sensibilidade do aprisionamento exigindo altas concentrações de NO. No caso de baixa concentração de NO, esses complexos começam a se decompor. A quantidade de MGD ou

DETC atualmente adicionada com ferro em ensaios em animais vivos é da ordem de 2 mmol/kg, essa quantidade deveria ser muito maior, isso porque, MGD e Fe^{2+} são misturados com antecedência em soluções aeróbicas [59-61], causando a oxidação incontrolada do Fe^{2+} resultando em uma pobre reprodutibilidade das medidas por EPR.

O processo de oxidorredução, conforme dito, também acontece com o DETC, entretanto, diferentemente do hidrofílico MNIC-MGD, o MNIC-DETC não é oxidado pelo oxigênio e sua forma diamagnética, sendo localizada em um meio hidrofóbico é capaz de transformar rapidamente na forma paramagnética.

Capítulo 5

Técnica do Processamento Sol-Gel

5 A técnica do processamento Sol-Gel

5.1 Princípios físico-químicos da técnica

A técnica do sol-gel foi empregada pela primeira vez em escala industrial pela Schott Glass em 1939, para a deposição de camadas delgadas de óxidos sobre vidros [62,63]. Remarcável desenvolvimento nesta área ocorreu em meados da década de 80, através da preparação de materiais compósitos constituídos por géis inorgânicos impregnados por polímeros orgânicos e copolímeros formados por ligações químicas primárias entre cadeias poliméricas orgânicas e inorgânicas [64].

O método sol-gel é um processo no qual uma suspensão coloidal transforma-se em gel pelo estabelecimento de ligações entre as partículas ou entre as espécies moleculares, levando à formação de uma rede sólida tridimensional. Portanto, trata-se de qualquer rota de síntese de materiais onde ocorre uma transição de um sistema sol⁵ para um sistema gel⁶.

Os géis podem ser classificados de acordo com a estrutura das partículas em coloidais ou poliméricos. Estes resultam da agregação linear de partículas primárias (figura 11a), que só pode ocorrer pela alteração apropriada das condições físico-químicas da suspensão. Aqueles são geralmente preparados a partir de soluções onde se promovem reações de polimerização. Neste caso, a gelatinização ocorre pela interação entre as longas cadeias poliméricas lineares (figura 11b).

⁵ O termo sol define uma dispersão de partículas coloidais (dimensão entre 1 e 100nm) estável num fluido.

⁶ O termo gel, um sistema formado pela estrutura rígida de partículas coloidais (gel coloidal) ou de cadeias poliméricas (gel polimérico).

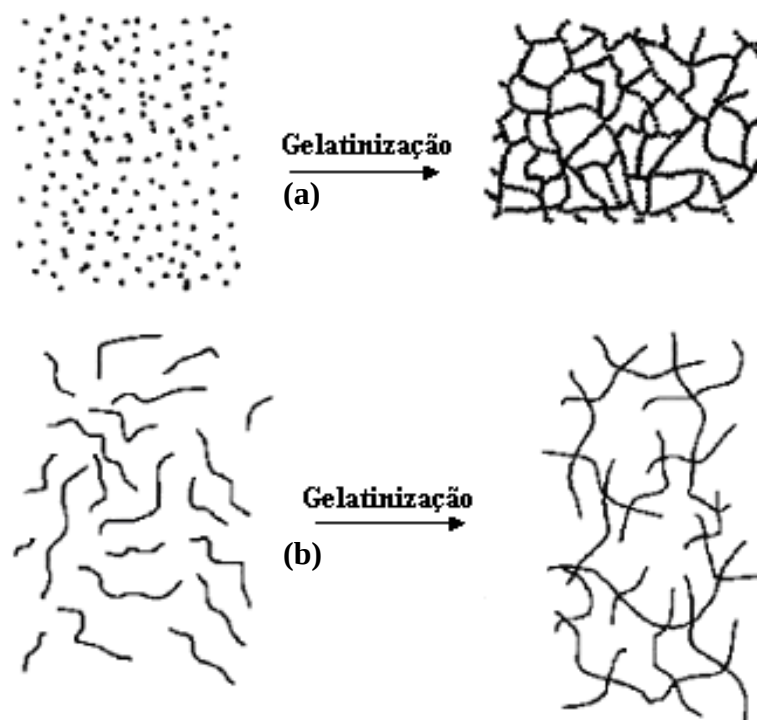


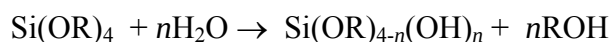
Figura 12. Esquema da transição sol-gel: (a) formação de gel particulado e (b) formação de gel polimérico.

A química do processo sol-gel é baseada em reações de polimerização. Os precursores usualmente empregados são soluções aquosas de sais inorgânicos (cloretos, nitratos, sulfetos, etc.) ou alcóxidos dissolvidos em solventes orgânicos. Após as reações de hidrólise e subsequente condensação das espécies hidratadas, pode-se ter a formação de partículas coloidais ou de cadeias poliméricas lineares [65]. Os precursores mais utilizados na rota de preparação dos sólidos pelo processo sol-gel são do tipo alcóxidos, como o tetraetilortossilicato (TEOS) o que justifica a utilização desse composto neste trabalho como veremos na seção experimental.

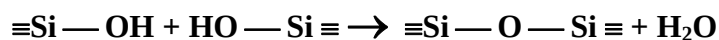
A hidrólise de uma solução de tetraalcóxissilanos em um solvente orgânico, como o álcool, leva à formação de partículas com função silanol, as quais formam um sol pela polimerização via condensação, e a continuação do processo leva a um gel [66]. Esta transformação é designada transição sol-gel. Após secagem do gel, um xerogel é formado.

A reação de polimerização que leva à transição sol-gel pode ser dividida em duas etapas básicas [66]:

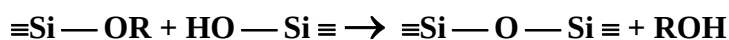
(1) a hidrólise do grupo alcóxido com a formação de grupos reativos do tipo silanol onde os grupos alcóxidos (OR) são substituídos por grupos (OH);



(2) a condensação do grupo silanol, a qual leva inicialmente à formação do sol e conseqüentemente ao gel;



ou



Do mecanismo de reação apenas a hidrólise é bem conhecida, pois as reações de condensação começam antes das reações de hidrólise terminarem, tornando o mecanismo muito complexo e envolvendo muitas reações de hidrólise e condensação ao mesmo tempo [67]. Todavia, fatores como pH, razão molar $\text{H}_2\text{O}/\text{Si}$ e a presença de catalisadores pode forçar a hidrólise completa antes do início da condensação [68].

As reações de hidrólise e condensação ocorrem via substituição nucleofílica bimolecular no átomo de silício. Sob condições ácidas a hidrólise envolve a protonação do grupo alcóxido, seguida pelo ataque nucleofílico da água para formar um intermediário pentacordenado. Sob condições básicas, acredita-se que o mecanismo envolva o ataque nucleofílico do átomo de silício pelo ânion hidróxido para formar um intermediário pentacordenado carregado negativamente, seguido pela saída de um ânion alcóxido.

A razão molar água:silano, a natureza e concentração do catalisador e o tipo de precursor alcóxido são parâmetros que afetam fortemente as reações de hidrólise e condensação, que por sua vez ditam as propriedades do material final. Em geral, baixo valor de pH (condição ácida 2 - 6) e baixo teor de água produzem materiais densos com tamanho médio de poros pequeno, enquanto preparações com valores altos de pH (condição básica >7) e altos teores de água produzem materiais mais porosos [69].

A incorporação de materiais orgânicos em matrizes inorgânicas pela técnica sol-gel é feita basicamente por três processos [70]: (1) a morfologia contínua do poro da matriz inorgânica é explorada para a impregnação de materiais orgânicos, (2) os componentes orgânicos são dispersos no sol e após a gelatinização esses materiais orgânicos permanecem presos dentro da matriz do óxido, (3) um componente orgânico se liga covalentemente ao precursor orgânico ligado quimicamente na estrutura inorgânica, tornando-se parte de uma rede integrada; estes materiais são chamados de silicatos organicamente modificados (ORMOSIL). A figura 13 ilustra um dos processos de aprisionamento conforme descrito anteriormente.

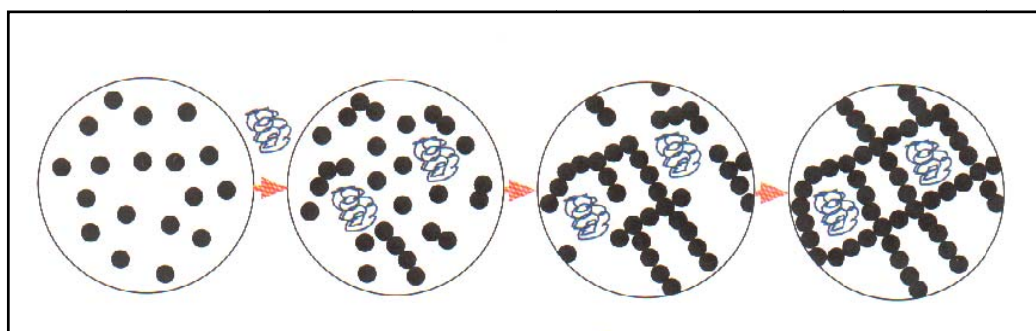


Figura 13. Processo de aprisionamento de um material dentro da estrutura porosa de uma matriz de sílica pelo processamento sol-gel.

Aditivos químicos podem ser utilizados para o controle dos sóis, a fim de reduzir o tempo de processamento e de se evitar o aparecimento de trincas nas membranas durante a secagem. Os aditivos mais utilizados são os que contêm amida em sua estrutura, como por exemplo, o N,N-dimetilformamida (DMF)[71,72].

A princípio Viart et al. [71] e Lenza e Vasconcelos [73-75], observaram o efeito do DMF na síntese do gel. O sol contendo o aditivo, apresentou uma evolução direcionada a uma estrutura contendo maior proporção de anéis de Si-O-Si o que promove um melhor arranjo dos poros na estrutura do sólido obtido como um produto final da polimerização. Vale ressaltar que, a eficiência do aprisionador FeDETC está intimamente relacionada à densidade de poros contida no interior da matriz.

5.2 Principais aplicações da técnica SG

Atualmente, os materiais obtidos pela técnica do sol-gel tem sido utilizados no aprisionamento de enzimas [76], anticorpos [77], catalisadores inorgânicos [78], estendendo-se para aplicações na indústria da microfabricação [79] e na produção de materiais cerâmicos.

O uso do processo sol-gel na produção de sensores para aplicações analíticas na indústria química tem despertado considerável interesse [80] devido a vários fatores: a facilidade da fabricação, a flexibilidade do projeto de síntese e o fato de que a oclusão de materiais no seu interior como as enzimas não altera suas atividades catalíticas [81-85].

A flexibilidade do processo de sol-gel para a fabricação de biossensores merece destaque. Estudos demonstram não só as diversas formas de imobilização das enzimas em diversos materiais inorgânicos, como também, a aplicação na fabricação de transdutores. A Tabela 3 mostra alguns exemplos de biossensores obtidos pelo processo de sol-gel.

Tabela 3. Algumas aplicações do processamento SG na fabricação de biossensores.

Analito	Tipo de biossensor	Enzima	Descrição	Limite de detecção
H ₂ O ₂	Optico	HRP	Membrana de silicato	8 µM
Glicose	Amperométrico	Gox	Microeletrodo	500 ppm
Fenol	Optico	HRP	Membrana de silicato	5 µM
NO ₂	Optico	SGC	Fibra óptica recoberta	111 µM
Uréia	Conduutométrico	Urease	“Screen Printer”	30 µM
Fenol	Amperométrico	TPH	Medida a 40°C	2,5 µM
<i>E. coli</i>	Amperométrico	Enterotoxina	Filme fino	360 µM

*As siglas utilizadas significam: HRP (peroxidase de raiz forte), GOx (glicose oxidase), SGC (guanilato ciclase solúvel), TPH (fenol hidrolase termoestável).

Como pode ser visto (tabela 3), a versatilidade do processo de sol-gel pode ser demonstrado nos últimos avanços tecnológicos para a fabricação de biossensores inteligentes. Atualmente, o foco das pesquisas apontam para o desenvolvimento de biossensores com materiais biocompatíveis, capazes de quantificar determinado metabólito na corrente sanguínea. Gerritsen et al. [86] tem estudado a biocompatibilidade de sensores para a glicose, implantados de forma subcutânea recobertos por materiais inorgânicos produzidos pelo processo de sol-gel.

Outra linha de pesquisa ascendente, busca a imobilização de materiais bi-lamelares lipídicos (membranas lipídicas) em matrizes produzidas pelo processo de sol-gel, afim de obter biossensores ópticos de alto desempenho para a análise e o controle de metabólitos importantes na corrente sanguínea [87]. O alvo principal é a fabricações de dispositivos, que além de determinar o analito, possam eliminar substâncias reguladoras na corrente sanguínea para o controle contínuo de certas doenças, como a diabetes.

Capítulo 6

O Sensor Sólido de NO: Estado Inicial da Técnica

6. O sensor sólido de NO

6.1 Processo de síntese dos sensores: Estado inicial da técnica

A proposta de um sensor sólido para identificação e quantificação do NO surgiu a partir da necessidade de conhecermos os mecanismos de ação desta pequena molécula nos sistemas biológicos. Dentre os problemas encontrados na quantificação do NO, comum em todas as técnicas atualmente utilizadas, destaca-se a instabilidade em meio aquoso, a baixa concentração e o tempo de vida extremamente pequeno nos organismos vivos.

Neste capítulo, serão apresentados alguns resultados importantes, que obtivemos durante estudos anteriores [88-90], sobre a produção do sensor sólido de NO pela técnica do sol gel (SG). Esses resultados foram o ponto de partida para execução do trabalho descrito nesta tese.

O processo sol gel (SG), de um modo geral, utilizado na obtenção do ferro-complexo Fe^{3+} -DETC, encapsulado no interior de uma matriz de sílica, envolve a síntese de uma solução coloidal através da policondensação do precursor TEOS imerso em um solvente (etanol) utilizando um ácido como catalisador [90].

O SG contendo o complexo de ferro passa por um processo térmico de secagem confluindo para um sólido vítreo. Esse método foi aperfeiçoado em virtude de problemas de reprodutibilidade dos sinais de RPE através do uso de tubos capilares de vidro, de capacidade 120 μL (detalhes na seção material e métodos). A rede desse material é formada por anéis estruturados por ligações O-Si-O formando um arranjo altamente poroso, o que permite a imobilização de materiais de interesse específico, neste caso, o Fe^{2+} -DETC [89]. A figura a seguir sugere a maneira pela qual o Fe^{2+} -DETC se encontraria no interior do sólido.

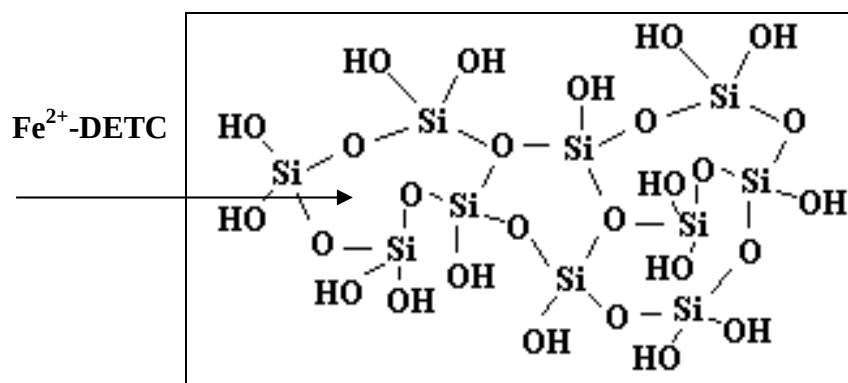


Figura 14. Possível arranjo da estrutura da matriz sol-gel contendo o complexo para o aprisionamento do NO.

O $\text{Fe}^{3+}\text{-DETC}$ é adicionado ao SG ainda no estado coloidal e uma alíquota da mistura (60 μL), é transferida para um tubo capilar de vidro com capacidade de $\sim 120 \mu\text{L}$. Os tubos, logo em seguida, são colocados no interior de uma estufa com controle digital de temperatura para secagem a 50°C . Durante algum tempo (1 a 2 dias), ocorre a gelação e envelhecimento do gel com a formação de um xerogel, um sólido vítreo contendo o $\text{Fe}^{3+}\text{-DETC}$ preso nos seus interstícios (poros). Atingindo o estado sólido, os capilares são submetidos a um processo de oxidorredução. O Fe^{3+} é transformado em Fe^{2+} a partir do momento em que os capilares (sensores) são colocados em contato com uma solução de ditionito de sódio. Uma vez preparados os sensores, os mesmos são colocados no interior de outra solução contendo NO a uma concentração conhecida para acontecer o aprisionamento formando o complexo paramagnético $\text{NO-Fe}^{2+}\text{-DETC}$. Depois da retirada do excesso de umidade, os capilares são colocados na cavidade ressonante do equipamento de RPE para obtenção dos sinais.

Vários fatores podem interferir na síntese do sensor, dentre eles, podemos destacar o pH, a quantidade de Fe por molécula de DETC (Fe:DETC), a temperatura de

secagem, o volume de solução utilizado durante a secagem, o tempo de secagem, massa de sensor, reprodutibilidade e a presença de um surfactante [89].

As reações químicas envolvidas na síntese são complexas e pouco se conhece sobre os mecanismos inerentes. O efeito dos surfactantes, sobre algumas propriedades do sensor (resposta do sinal EPR, sensibilidade, limite de detecção, estabilidade do sinal, mudança na largura de linha, relação sinal ruído) é alvo de discussão da presente tese.

Da preparação das matrizes pelo processo SG, observou-se uma alteração na coloração do complexo Fe^{3+} -DETC, que na presença do solvente DMF, apresentava uma coloração negra (marrom escuro) e que após ser misturado junto à solução coloidal (SG) e subsequente agitação mecânica, durante 24h o conjunto ($\text{SG} + \text{Fe}^{3+} + \text{DETC}$) passa a ter uma tonalidade amarelo clara a qual é mantida durante o processo de envelhecimento do gel, tornando-se então, característica do produto final (gel seco). A coloração da solução é um indicativo do tipo de complexo que está sendo formado. A tabela 3 sumariza o processo de formação desses complexos, demonstrando o comportamento do Fe-DETC em três diferentes meios, e a coloração característica de cada uma.

Tabela 4. Caracterização dos complexos Fe-DETC em solução DMF, SG líquido e SG sólido

Complexo	Estado	Ditionito	Resultado	Complexado	Coloração
$\text{Fe}^{3+} + \text{DETC}$	Líquido	Não	Fe^{3+} -DETC	Sim	Marrom alaranjado
$\text{Fe}^{3+} + \text{DETC}$	Líquido	Sim	Fe^{2+} -DETC	Sim	Incolor
$\text{Fe}^{3+} + \text{DETC}$	SG líquido	Não	$\text{SG}(\text{Fe}^{3+}\text{-DETC})$	sim	Amarelo claro
$\text{Fe}^{3+} + \text{DETC}$	SG líquido	Sim	$\text{SG}(\text{Fe}^{2+}\text{-DETC})$	Sim	Incolor
$\text{Fe}^{3+} + \text{DETC}$	SG sólido	Não	$\text{SG}(\text{Fe}^{3+}\text{-DETC})$	Sim	Amarelo Claro
$\text{Fe}^{3+} + \text{DETC}$	SG sólido	Sim	$\text{SG}(\text{Fe}^{2+}\text{-DETC})$	Sim	Incolor

Com esse procedimento, entretanto, encontramos alguns problemas. Vários capilares foram preparados com o objetivo de assegurar a reprodutibilidade dos sinais de RPE do NO. Embora tenham sido preparados a partir de uma mesma solução estoque ($\text{SG} + \text{Fe}^{3+} +$

DETC)_{SG líquido} e nas mesmas condições de secagem, e submetidos ao mesmo processo de redução (ditionito), nem todos apresentaram o sinal característico do NO, o sinal característico pode ser visto na figura 15.

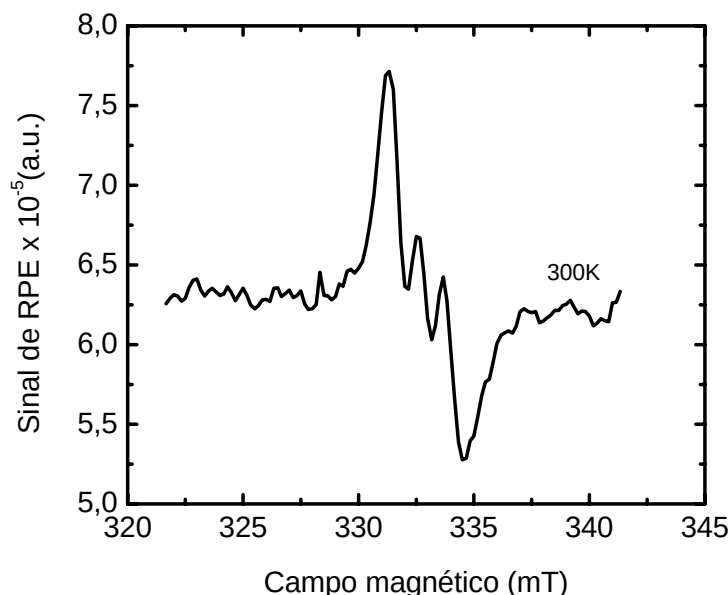


Figura 15. Intensidade do sinal de RPE do NO após o aprisionamento pelo sensor SG(Fe²⁺-DETC). Potência 20 mW e amplitude de modulação 0,4 mT (4 G).

Isso nos levou a aperfeiçoar o método de preparação do sensor baseado no fato de que a reprodutibilidade do sinal basicamente dependeria de dois fatores preponderantes: (1) a presença do complexo Fe³⁺-DETC, imobilizado nos poros da matriz sol-gel no estado sólido, (2) NO disponível na solução, para que no ato da imersão dos capilares ocorra o aprisionamento, formando NO-Fe²⁺-DETC.

A hipótese do ferro não se complexar foi descartada, uma vez que, na presença do ditionito de sódio o ferro recomplexa com o DETC. A inexistência do NO na solução, também pôde ser desconsiderada, já que alguns sensores apresentaram o sinal característico do NO. Portanto, inferimos que o DETC não estava se distribuindo uniformemente dentro da solução sol gel, ocupando regiões preferenciais, ou que, o ferro complexado estivesse de

alguma forma permanecendo no estado férrico (Fe^{3+}) no sensor sólido mesmo após o aprisionamento do NO. No momento da tomada das alíquotas, para o subsequente processo de secagem dentro dos capilares, estaríamos aleatoriamente tomando uma porção onde o DETC não estava presente. Isso é possível, baseado no fato de que, as soluções $\text{SG}(\text{Fe}^{3+}\text{-DETC})$ eram estocadas durante alguns dias, o que levaria a formação de partículas dispersas do complexo, ou ainda a descomplexação do DETC por degradação temporal.

Para confirmarmos se realmente estávamos tendo problemas de inhomogeneidade na distribuição do $\text{Fe}^{3+}\text{-DETC}$ na solução SG, precisávamos encontrar uma forma de assegurar que o complexo realmente se encontrava no interior dos capilares que seriam utilizados como aprisionadores de NO.

Assim, modificamos o processo de síntese do sensor em apenas um detalhe, não misturando as soluções ($\text{SG} + \text{Fe}^{3+}\text{-DETC}$) para a armazenagem (estoque) de forma que o volume total contido no capilar fosse uma soma das porções equivalentes de cada solução. Para isso, passamos misturar o $\text{Fe}^{3+}\text{-DETC}$ ao SG bem como preparar a solução do complexo férrico no momento das análises, o que não era feito anteriormente.

A mudança na técnica nos proporcionou resultados importantes. Em um novo ensaio experimental, novos capilares foram preparados e todos eles apresentaram o sinal característico, assegurando a reprodutibilidade dos sensores. Outro fato também importante, foi o tempo de secagem do gel que passou de 10 dias para 2 dias à temperatura controlada de 50°C .

Para analisar a quantidade ideal de $\text{Fe}^{3+}\text{-DETC}$ a ser adicionada na solução sol-gel, fizemos um experimento preparando alguns capilares com diferentes proporções volumétricas entre o $\text{Fe}^{3+}\text{-DETC}$ e o SG.

Foram preparados 5 capilares. O processo de secagem dos géis aconteceu a 50°C no interior de um estufa. A solução aprisionadora continha NO numa concentração de 2,5

mM (solução saturada). Após secagem dos géis, os sinais de RPE foram obtidos após a inserção dos capilares contendo o sensor sólido na solução de NO. Os resultados podem ser vistos na figura 16.

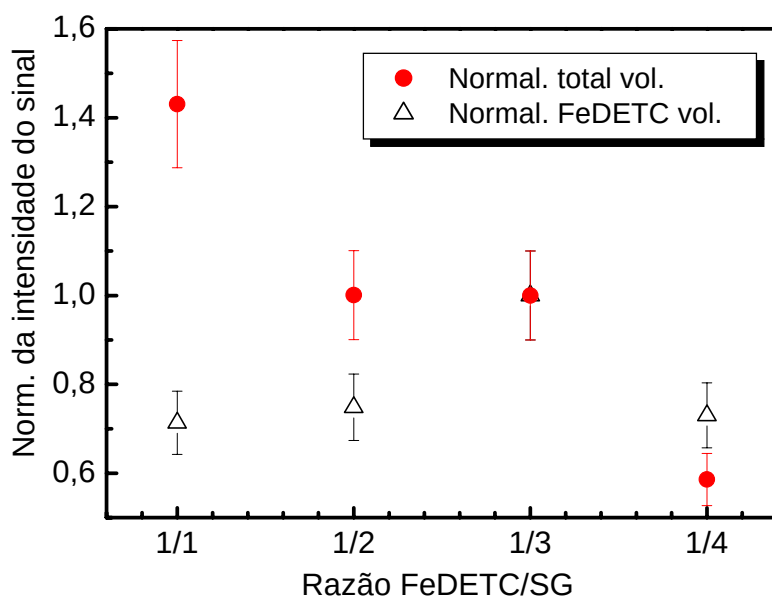


Figura 16. Intensidade do sinal RPE do NO (2,5mM) em função da quantidade (volume) de FeDETC em 60µl de solução sol-gel. A secagem dos géis ocorreu a 50°C durante 2 dias dentro de uma estufa.

Duas diferentes normalizações foram utilizadas. Na primeira os sinais foram normalizados pelo volume total da solução (círculos cheios). Podemos notar de fato que a sensibilidade do sensor pôde ser melhorada por volta de 40% usando uma razão de 1:1 ao invés de 1:3. Todavia, se os resultados são normalizados pelo volume de aprisionadores Fe^{2+} -DETC (triângulos abertos) podemos notar que a melhor razão FeDETC/SG a ser usada é sem dúvida de 1:3.

A estrutura do nosso sensor é dependente dos reagentes e compostos utilizados no processamento sol-gel. Dentre eles podemos dar ênfase ao Triton X100 e DMF, elementos fundamentais na produção das matrizes. A forma do sensor sólido consiste de um arranjo de anéis Si–O–Si de vários tamanhos, nos quais cada ligação formará uma estrutura cíclica. Isso

promove uma melhor distribuição da rede de poros melhorando conseqüentemente o número de aprisionadores Fe^{2+} -DETC ativos. O DMF é um aditivo de secagem eficiente. Através dos espectros na região do infravermelho, a intensidade da absorção era mais pronunciada nas amostras contendo este composto. Dessa forma, decidimos investigar o papel do DMF no processamento sol-gel, bem como no decaimento do sinal do NO com o tempo.

Neste experimento, avaliamos o efeito do aditivo DMF na estabilidade do sinal. Para tanto, 1ml de DMF foi adicionado na solução SG no estado coloidal, novos sensores foram preparados e submetidos ao tratamento térmico. Com o uso do DMF conseguimos melhores resultados em comparação às soluções que não continham esse aditivo. As matrizes se, cas apresentaram-se melhor distribuídas dentro do capilar no produto final (gel seco), pelo menos internamente com maior resistência mecânica. Outro fato relevante ao processamento com o DMF foi a pequena redução do volume do gel após a secagem. Sem o DMF, essa redução chegava até a 1/8 do volume inicial culminando em uma forte contração do gel que poderia influenciar na eficiência do aprisionamento do NO, pois haveria uma redução do tamanho relativo dos poros da rede da matriz. A figura 17 mostra a intensidade relativa do sinal de RPE do NO em duas situações, com ou sem DMF.

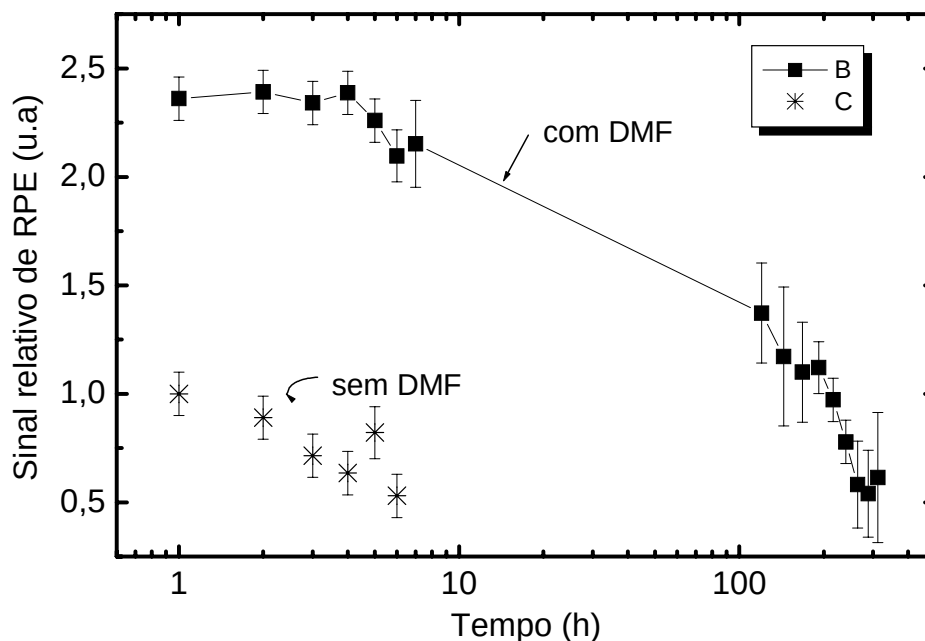


Figura 17. Comparação do decaimento do sinal do NO com o tempo nas amostras (B) com e (C) sem DMF. Potência 20 mW e amplitude de modulação 0,4 mT (4 G).

Como pode ser visto, o complexo $\text{NO-Fe}^{2+}\text{-DETC}$ permanece no interior da matriz SG, mesmo depois de 14 dias, durante o qual o sinal de RPE pôde ser observado na amostra contendo o aditivo (DMF). No caso da amostra sem DMF, a intensidade do sinal relativo inicial é menor em comparação a amostra com DMF em um fator de $\sim 2,2$. A maior sensibilidade do $\text{NO-Fe}^{2+}\text{-DETC}$ na matriz SG conseguida nos nossos experimentos sem o DMF foi de 7 dias com um decréscimo da intensidade neste período de um fator de ~ 2 , enquanto que com o uso do DMF pode ser observada uma redução da intensidade em um fator de ~ 4 no decorrer dos 14 dias de monitoramento.

6.2 Comportamento óptico do Fe-DETC nos sensores sólidos

No capítulo 4 foram abordados alguns aspectos referentes ao comportamento óptico dos complexos Fe-DTCs em meio líquido e os mecanismos de oxidação-redução associados à formação de complexos nitrosilados. O estado (ferrico ou ferroso) dos complexos DTCs foi caracterizado através dos espectros de absorção e através das mudanças na coloração das soluções. Fez-se necessário, portanto, saber se o FeDETC apresenta um comportamento no sensor sólido semelhante àqueles encontrados e bem caracterizados em solução (Vanin Principal). Diante disso, foram feitos alguns experimentos para compararmos os espectros de absorção do Fe^{3+} -DETC e DETC em solução de diclorometano (DCM) bem como da suspensão de partículas sólidas SGFeDETC_1 (sem ditionito) e SGFeDETC_2 (com ditionito) em de DCM como pode ser visto na figura 18 [86].

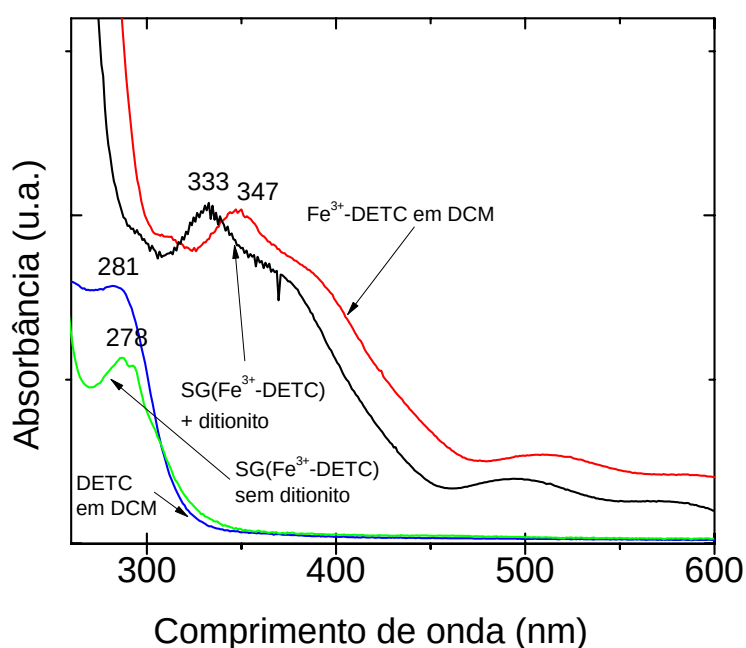


Figura 18. Espectros de absorção UV/Vis do Fe^{3+} -DETC, DETC e SGFeDETC1 e SGFeDETC2 (com ditionito) em suspensão de DCM.

O complexo Fe^{3+} -DETC apresenta em DCM uma cor negra (marrom escuro) e um espectro de absorção com três bandas em 347, 385 e 510 nm. No entanto, no meio ácido, presente na solução coloidal (dispersão SGFeDETC), sua cor muda para amarelo claro e o espectro de absorção do vidro final SGFeDETC não é similar ao do Fe^{3+} -DETC em DCM, todavia, se assemelha ao espectro do DETC (Figura 18). Um fato interessante, é que após adição do vidro a uma solução saturada com ditionito de sódio sua cor muda para incolor e após algum tempo para marrom escuro e o espectro apresenta bandas similares ao do Fe^{3+} -DETC em DCM.

Segundo Biazotto [88], uma possível explicação para as mudanças observadas, pode estar relacionada a descomplexação do Fe^{3+} -DETC, em virtude da protonação do enxofre carregado negativamente com conseqüente descomplexação e regeneração do DETC, conforme a figura 19.

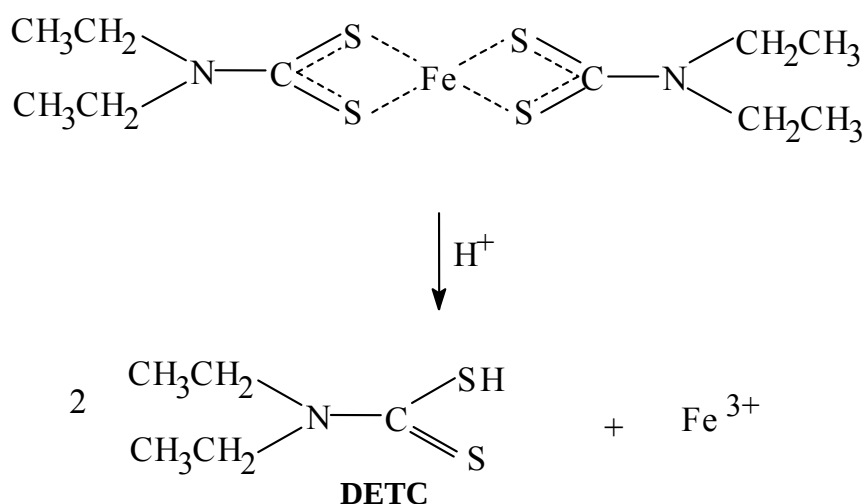


Figura 19. Reação de descomplexação envolvendo o efeito da protonação do grupamento enxofre do dietilditiocarbamato (DETC).

Adicionando ditionito de sódio, ocorre a recomplexação do Fe-DETC, reduzindo o próton ligado ao enxofre levando a formação do ânion que volta a complexar com

o Fe. Isso pôde ser visto pela mudança na coloração da matriz $(\text{SG} + \text{Fe}^{3+} + \text{DETC})_{\text{sólido}}$ (amarelo claro) minutos depois da sua imersão na solução saturada de ditionito de sódio, mostrando-nos a recomplexação e redução do ferro formando $\text{SG}(\text{Fe}^{2+}\text{-DETC})_{\text{sólido}}$ (incolor).

Embora os espectros de $\text{Fe}^{+3}\text{-DETC}$ e SGFeDETC2 apresentem bandas de absorção similares, observamos em SGFeDETC2 um deslocamento das bandas para menor comprimento de onda, que pode ser atribuído à mudança na geometria da molécula devido ao ambiente rígido da matriz.

Capítulo 7

O Papel dos Surfactantes

7. O papel dos surfactantes na produção de materiais pelo método sol-gel utilizando o precursor TEOS

Conhecer a estrutura dos materiais utilizados na confecção de sensores sólidos para detecção e quantificação do NO é extremamente importante, principalmente no que diz respeito a rede de poros que são formadas durante o processo de síntese. Poros distribuídos de forma regular facilitam a difusão do NO e ajudam no aprisionamento, aumentando a densidade de complexos Fe^{2+} -DETC.

Diversos são os meios utilizados para produção de materiais porosos estruturalmente organizados, desde a utilização de microesferas, que são retiradas em uma etapa do processo de síntese, até o uso de aditivos químicos comumente chamados de surfactantes (ou tensoativos). São compostos que possuem atividade na superfície da interface entre duas fases, tais como ar-água, óleo-água, e na superfície de sólidos. Caracterizam-se por possuir duas regiões distintas na mesma molécula: uma região polar (hidrofílica) e outra região não-polar (hidrofóbica). O Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) (figura 20) é um bom exemplo desta natureza ambígua dos surfactantes.

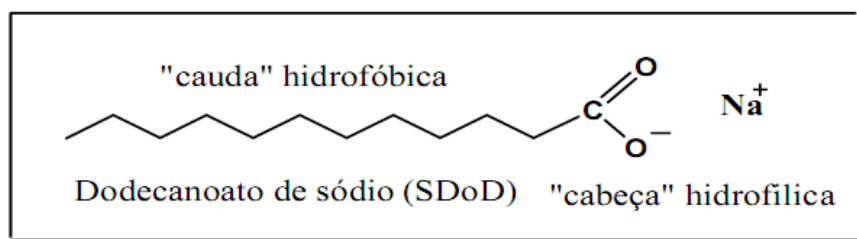


Figura 20. Fórmula estrutural do Dodecil Sulfato de Sódio, demonstrando o caráter hidrofóbico e hidrofílico dos surfactantes.

Esta particularidade na estrutura química dos surfactantes é responsável pelos fenômenos de atividade na tensão superficial de interfaces, pela formação de agregados moleculares (micelas) e camadas lamelares em alguns casos. São classificados conforme a espécie tenso-ativa em aniônicos (carga negativa), catiônicos (carga positiva), neutros e anfóteros (ou zwitteriônicos). A tabela abaixo sumariza os principais surfactantes utilizados atualmente.

Tabela 5. Principais surfactantes utilizados atualmente com suas respectivas fórmulas moleculares.

Surfactante	Fórmula	Classificação
Brometo de dodeciltrimetilamônio (DoTAB)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Br}^-$	Catiônico
Brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Br}^-$	Catiônico
Dodecilsulfato de sódio (SDS)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SO}_4^-\text{Na}^+$	Aniônico
Decanoato de sódio (SDeC)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{COO}^-\text{Na}^+$	Aniônico
Propionato de N-alkil-N,N-dimetil-β-alkilamônio	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$	Zwitteriônico
N-dodecil-N,N-dimetil-betaína	$\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{COO}^-$	Zwitteriônico
Óxido de dodecil dimetilamina	$\text{C}_{12}\text{H}_{25}-\text{N} \begin{array}{c} \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \end{array} \text{O}$	Não-iônico
N-aquilfenol-m-polioxietileno	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{H}$	Não-iônico

Uma das características comum a todos os surfactantes é a capacidade de formar micelas a partir de uma determinada concentração. A concentração onde inicia o processo de formação das micelas (micelinização) é chamada de concentração micelar crítica (C.M.C), que é uma propriedade intrínseca e característica do surfactante. A figura 21 esquematiza o processo de micelinização.

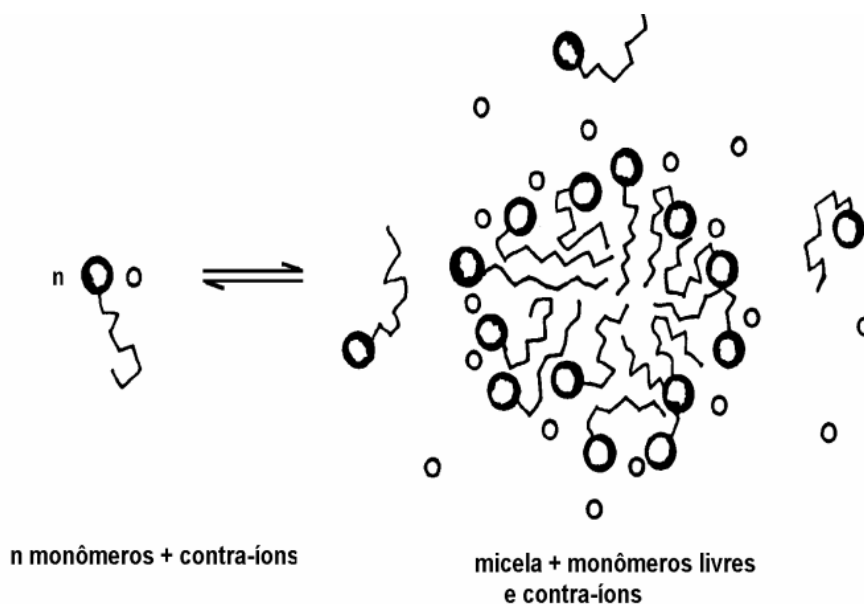


Figura 21. Mecanismo de formação das micelas por agregação dos monômeros.

Portanto, a CMC representa a concentração máxima a partir da qual o monômero começam a se agregar. Neste momento, os monômeros rearranjam-se espontaneamente de tal forma que adquirem uma conformação termodinâmica estável e solúvel (figura 21) [91-93].

Este fenômeno deve-se à ação do efeito hidrofóbico, isto é, à alta organização das moléculas de água que promovem a auto-associação das caudas hidrofóbicas dos monômeros e, em consequência, a formação dos agregados. A formação de micelas depende, dentre outros fatores, do meio reacional onde a hidrofobicidade é fundamental bem como o tipo de surfactante utilizado. Na água, o SDS apresenta uma CMC igual a 8 mM em pH $\sim 7,00$. O comportamento em meio não aquoso, como no nosso caso (solução coloidal sol gel), é variado e em alguns casos ainda desconhecido.

Embora seja uma técnica indireta, a tensão superficial é bastante usada para obter informações quantitativas no estudo de interações entre surfactantes e polímeros. Um

dos métodos utilizados é o método do anel [94] que mede a variação da tensão superficial do líquido contra a concentração do surfactante (vide figura 22).



Figura 22. Inserção do anel na solução para medir a tensão superficial em função da concentração do surfactante.

Os surfactantes são capazes de reduzir a tensão superficial de soluções aquosas. Tais substâncias tendem a se acumular mais na superfície da água e em muitos casos elas formam um filme monomolecular de moléculas adsorvidas na superfície. Normalmente o filme superficial formado é bem homogêneo e não aceita mais nenhuma molécula quando a solução atinge a CMC. Se continuarmos a aumentar a concentração, acima dessa concentração crítica notaremos que a tensão superficial permanecerá constante. Para concentrações abaixo da concentração crítica, a tensão superficial varia linearmente com o aumento da concentração. O desvio da linearidade é observado em concentrações muito baixas ou muito altas, acima da concentração crítica.

O processo de micelinização acontece da seguinte forma: Na água, as moléculas dos surfactantes tentam arranjar-se de modo a minimizar a repulsão entre grupos hidrofóbicos. Em consequência, os monômeros tendem a se orientar na superfície de tal forma que os grupos polares do surfactante ficam na solução aquosa, próxima da superfície, e os grupos apolares fiquem na interface ar-água minimizando o contato com a água. Esta primeira forma de arranjo é uma tentativa das cadeias alquílicas escaparem do efeito da repulsão da água, estabelecendo-se na fase gasosa por que são mais solúveis nesta fase. Este fenômeno,

termodinamicamente espontâneo, gera diminuição na tensão superficial da água, pois provoca uma desorganização das moléculas de água na sua superfície [95].

Dentre os modelos propostos para ilustrar a forma de uma micela destaca-se o modelo de Stigter [96] (figura 23). Neste caso os monômeros se organizariam em forma esférica, de tal maneira que a parte hidrofóbica do surfactante ficaria voltadas para o centro, enquanto que a hidrofílica ficaria disposta na superfície em interface com a água.

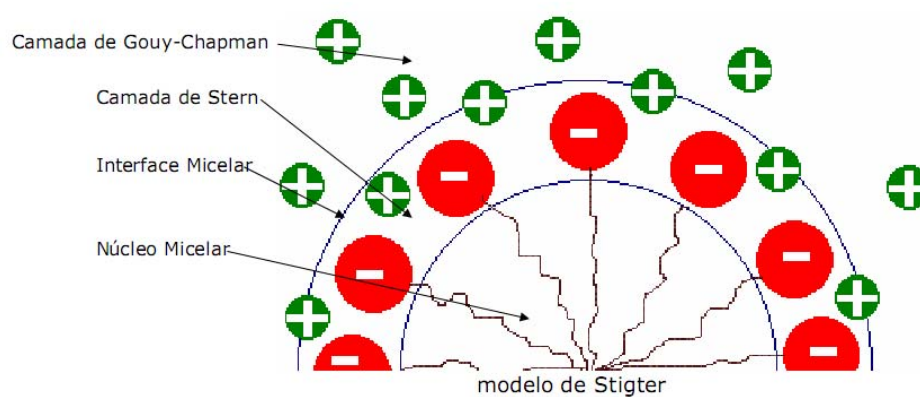


Figura 23. Modelo proposto por *Stigter* para explicar o comportamento e a organização dos monômeros na formação de uma micela.

A figura 24 ilustra o comportamento da tensão superficial à medida que a concentração de surfactante é aumentada.

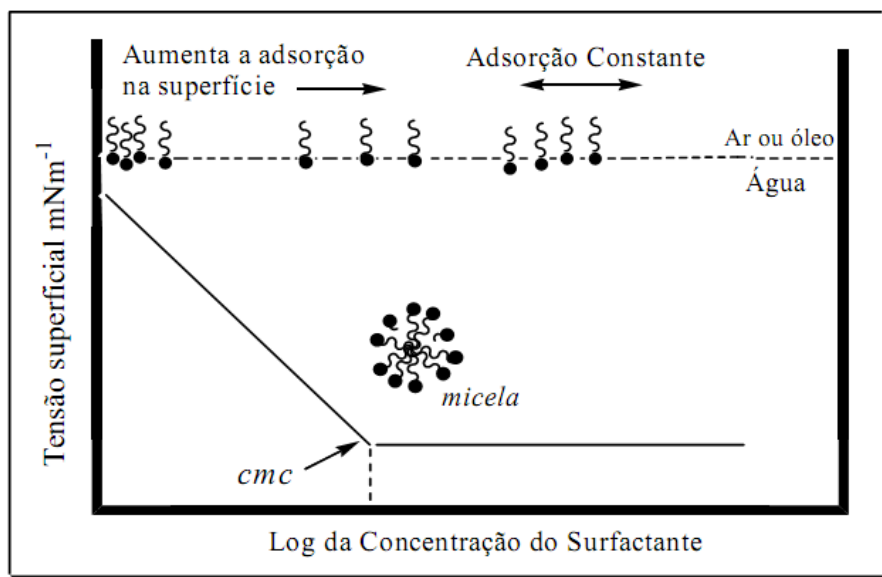


Figura 24. Comportamento da tensão superficial da água versus concentração do surfactante.

Valverde et al. (2003), estudando a fotocondutividade em filmes finos mesoestruturados, utilizaram o SDS no processo de síntese dos materiais pelo método sol-gel para produzir filmes com estruturas lamelares altamente organizadas. O estudo da fotocondutividade desses filmes fornece informações sobre o mecanismo de transporte de cargas no interior do dispositivo [97].

Compostos no estado sólido, caracterizados por uma estrutura atômica arranjada por forças de natureza covalente, podem se dispor formando camadas ou lamelas [98-99]. Tais camadas podem ser eletricamente neutras e serem mantidas por ligações fracas do tipo *Van der Waals*. Assim sendo, as forças que mantêm as lamelas unidas (forças interlamelares) são bem mais fracas que as forças existentes entre os átomos presentes na lamela (forças intralamelares), causando uma forte anisotropia ao composto [100]. Esse processo, chamado de intercalação permite a inclusão de espécies como íons, átomos ou moléculas entrem no espaço interlamelar. Para tanto, geralmente há um aumento na distância interlamelar da matriz hospedeira (composto lamelar), para que haja uma perfeita acomodação da espécie convidada (espécie que se liga no espaço interlamelar).

O interesse nas reações de intercalação está exatamente no fato de que elas modificam as propriedades das espécies do novo material formado e tais modificações surgem da alteração na densidade eletrônica entre as espécies envolvidas. Restrições geométricas e espaciais são impostas a ambas. A presença de íons, átomos ou moléculas entre os planos basais da espécie hospedeira certamente terá um impacto sobre as propriedades físicas em seu “*bulk*”, incluindo densidade, condutividade e características ópticas [100].

A síntese de materiais silicatos utilizando surfactantes tem crescido rapidamente na última década. A criação de uma rede amorfa com tamanhos de poros controlados faz desse método uma ferramenta promissora para produção de sensores, suporte para catalisadores, membranas filtrantes e uma variedade aplicações ópticas.

Materiais mesoporosos com diferentes morfologias podem ser obtidos pelo método SG empregando surfactantes como aditivos. Entre os surfactantes não iônicos o F127 tem sido usado largamente como “*templante*” devido a formação de poros maiores do que os obtidos com o catiônico CTAB. Filmes finos altamente organizados, com a estrutura porosa, distribuída de forma hexagonal ou cúbica são obtidos com o uso do F127 [101].

Rottman et al. (1999) reportaram que o uso do CTAB como aditivo na produção de matrizes dopadas pelo método SG modifica as propriedades estruturais dos dispositivos bem como a funcionalidade específica [102].

O F127 é um surfactante com propriedades bastante peculiares em solução aquosa: na temperatura ambiente, ocorre uma transição do estado líquido para um estado, comumente chamado de hidrogel, com inúmeras aplicações dentre elas a liberação de drogas em locais específicos. Ficou comprovada a habilidade dos hidrogéis com F127 de preservar a bioatividade de polipeptídios *in vitro* e *in vivo* [103,104].

Capítulo 8

Material e Métodos

8. Material e Métodos

8.1 O Espectrômetro de RPE

Nos ensaios experimentais, o processo de caracterização do NO foi feito através da espectroscopia por ressonância paramagnética eletrônica (RPE).

Os espectrômetros de RPE são classificados de acordo com a frequência e a modulação das microondas de trabalho. 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*. 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 e adaptado para ser controlado remotamente por um microcomputador através de placas e cabos GPIB. Esse instrumento 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 de banda-X. Com as adaptações, o espectrômetro pode operar com várias

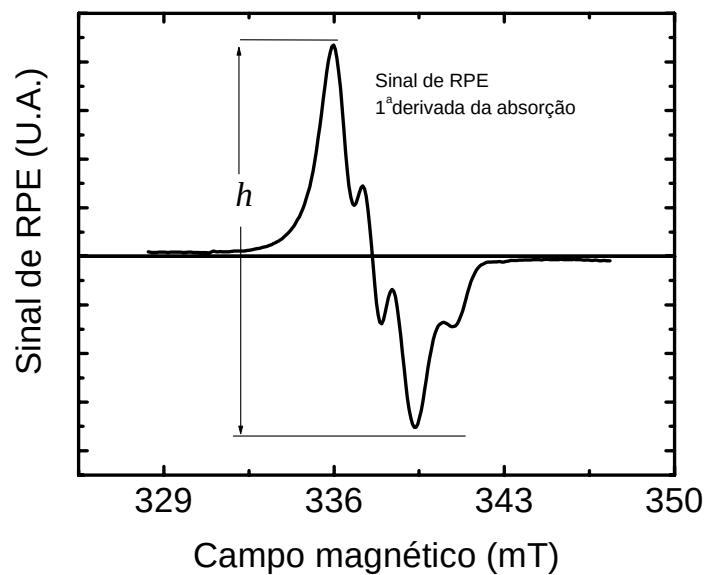
freqüências de modulação do campo magnético e também pode obter espectros de ressonância magnética detectada eletricamente (EDMR). A caracterização dos sinais do NO foi feita ajustando no espectrômetro os seguintes parâmetros (tabela 6).

Tabela 6. Condições em que foram feitas as medidas de EPR 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	500ms

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: 1) medindo-se a altura do sinal, como na figura (25a); ou 2) medindo-se a área da curva obtida entre a linha base e o sinal por dupla integração, como na figura (25b). No nosso caso, os surfactantes alteram a forma de linha de acordo com propriedades inerentes a cada um deles, sendo assim, a intensidade do sinal das espécies paramagnéticas será determinada pela dupla integração.

a)



b)

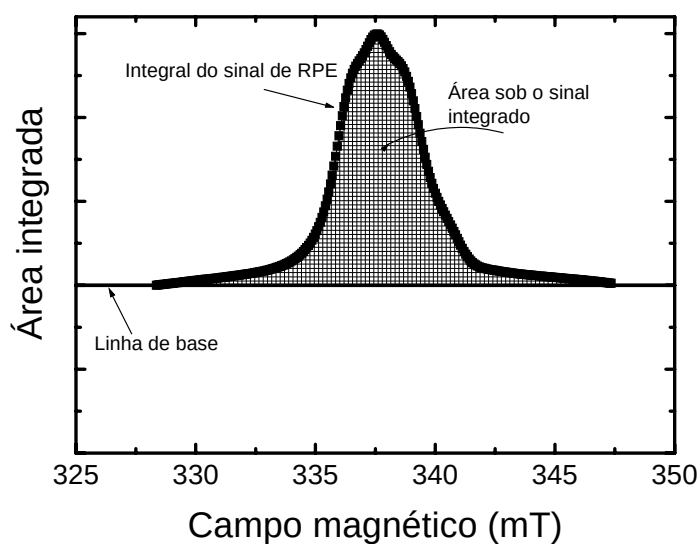


Figura 25. Métodos de obtenção da intensidade do sinal de RPE: (a) pela altura do sinal, e (b) pela área obtida por dupla integração do próprio sinal de RPE.

8.2 Preparação dos sensores: Soluções utilizadas no processo de síntese e aprisionamento do NO

Em estudos anteriores [90] ficou comprovado a eficiência de um sensor sólido para quantificação do NO, baseado na síntese de materiais sólidos a partir de um precursor de sílica pelo processo SG, entretanto, o limite de detecção ainda precisa ser melhorado. Para tanto, um estudo sobre o efeito de alguns surfactantes (Triton X100, CTAB, SDS e F127) foi feito, tanto no sensor no estado sólido, quanto no estado líquido (SG no estado líquido). Por questões didáticas, a parte experimental será apresentada em duas etapas (1) estudo dos surfactantes no sensor sólido e (2) no estado líquido. O objetivo dos dois estudos é verificar se o efeito produzido sobre os sensores sólidos ocorre também no líquido.

Foram utilizados os seguintes reagentes: um precursor a base sílica, TEOS (Aldrich), DETC⁷ (Aldrich), cloreto de férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (VETEC), DMF (Labsynth), ditionito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) (VETEC), Triton X100 (VETEC), CTAB (Fluka), SDS (Fluka), F127 (BASF), etanol (VETEC), ácido clorídrico (HCl) (Labsynth) e água deionizada. As soluções utilizadas na produção dos sensores tanto no estado sólido quanto líquido são descritas a seguir.

8.2.1 Soluções SG preparados com SDS, e CTAB, Triton X100

Os sensores sólidos foram preparados a partir de duas soluções distintas. Para os ensaios com os surfactantes CTAB, Triton X100 e SDS foi preparada uma solução SG misturando sob agitação, 4 mL de TEOS, 4 mL de etanol e 1,45 mL de H_2O . O pH foi

⁷ O dietilditiocarbamato é um dos derivativos do ditiocarbamato, amplamente usado como aprisionadores de NO em ensaios biológicos.

ajustado para ~ 2 com HCl 2M, sendo adicionado gota a gota. Após a solução ter sido submetida ao ultra-som durante 10 min, com subsequente agitação magnética com auxílio de um agitador do tipo “VORTEX” (Marconi MA 162) por 90 minutos, 1 mL de DMF foi adicionado e a solução resultante agitada magneticamente por mais 30 minutos.

A solução de Fe^{3+} -DETC foi preparada no momento das análises, dissolvendo 20 mg de FeCl_3 e 67 mg de DETC em 10 mL de DMF com subsequente agitação magnética durante 60 min.

8.2.2 Solução SG preparada com F127 (SG-F127)

O F127 foi preparado segundo método descrito por GIBAUD, et al. (2005) com modificações [103]. Neste caso, a solução SG foi preparada pela dissolução dos seguintes reagentes: 4,27 mL de TEOS foi colocado em um béquer e mantido sob agitação com 1,5 mL de HCl 0,055M. Em seguida, foram adicionados 22,81 mL de etanol (álcool etílico absoluto) e 1,14 g de F127 lentamente sob agitação constante. A solução resultante permaneceu sob agitação durante 1h até a dissolução total. O procedimento diferenciado na preparação do F127 se dá devido a baixa solubilidade (10%) em meio aquoso desse surfactante em detrimento aos demais (Triton X, CTAB e SDS), exigindo que a dissolução do F127 aconteça de forma lenta, em pequenas quantidades e sob agitação constante e, portanto em uma concentração limite (40mg/mL).

As soluções SG preparadas nas duas maneiras distintas foram armazenadas no refrigerador, em especial aquela preparada com F127, pois, a mesma pode se transformar em hidrogel dependendo da concentração do surfactante utilizado, prejudicando o processo de síntese dos sensores sólidos. A solução final para preparação dos sensores foi obtida pela mistura da solução de Fe^{3+} -DETC com a solução SG (contendo ou não os surfactantes) na proporção volumétrica de 1:3 (1 Fe^{3+} -DETC:3SG) (imediatamente antes das medidas). O

conjunto foi mantido sob agitação até a mudança de cor da solução de marrom escuro (quase preto) para amarelo-claro. A solução final será chamada de SG(Fe^{3+} -DETC) para o SDS, CTAB e Triton X100 e SG(F127- Fe^{3+} -DETC) para o F127.

8.2.3 Soluções para o estudo da concentração dos surfactantes SDS, CTAB, Triton X100 e F127

As soluções dos surfactantes foram preparadas através da dissolução dos sais em meio aquoso (água deionizada), sob agitação constante, da seguinte maneira: 0,1442 g de SDS (99%, PM = 288,38g/mol), 0,1822 g de CTAB (99%, PM = 364,46 g/mol) e 0,3224 g de Triton (99%, PM = 646,86) foram adicionadas, cada um por sua vez, em béqueres de 25 mL de modo a obter uma solução aquosa final (estoque) a 100mM.

Para a determinação da concentração ideal dos surfactantes nas matrizes sólidas, alíquotas dos surfactantes foram adicionadas à solução SG + Fe^{3+} -DETC a fim de obter soluções cujas concentrações variaram de 0-16 mM, conforme tabela abaixo.

Tabela 7. Preparação das soluções para o estudo da concentração dos surfactantes na matriz sol-gel. A relação Fe^{3+} -DETC:SG foi mantida de 1:3 em volume.

$V_{\text{SURFACTANTE}}$	V_{Gel} (mL)		[Surfactante] _{final} mM
	(90 μL +30 μL Fe^{2+} - DETC)	[Surfactante] _{inicial} mM	
0 μL	120 μL	-	0,0
27 μL	120 μL	50	6,0
38 μL	120 μL	50	8,0
50 μL	120 μL	50	10,0
63 μL	120 μL	50	12,0
78 μL	120 μL	50	14,0
94 μL	120 μL	50	16,0

*[Surfactante]_{inicial} e [Surfactante]_{final} representa, respectivamente, as concentrações inicial e final dos surfactantes antes e depois da diluição.

Para o F127, em virtude de ser um polímero sua massa molar é um valor aproximado, dessa forma, optou-se estudar a variação da concentração em unidades de mg/mL. As soluções foram preparadas pela diluição, em etanol, de 1 mL da solução original SG(F127-Fe³⁺-DETC) (saturada 40mg/ml) preparada conforme descrito na seção 8.2.2. A tabela 11 sumariza a preparação das soluções SG-F127 em concentrações que variaram de 3 a 40mg/mL.

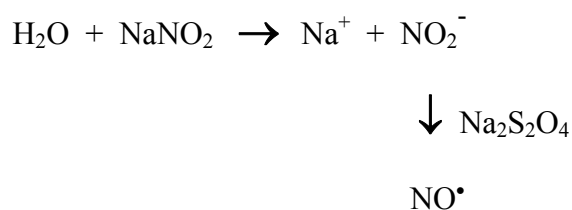
Tabela 8. Preparação das soluções diluídas de SG(F127-Fe³⁺-DETC) em etanol.

Volume de F127 a 40mg/mL	Volume de etanol	[]final
1 mL	12,3 mL	3 mg/mL
1 mL	7 mL	5 mg/mL
1 mL	3 mL	10 mg/mL
1 mL	1 mL	20 mg/mL
1 mL	0,33	30 mg/mL
1 mL	0 mL	40 mg/mL

8.2.4 Solução geradora de NO

O NO para o aprisionamento através do sensor foi gerado da seguinte forma: NaNO₂ 10 mM (250 µl), água deionizada (750 µl) e Na₂S₂O₄ (145mg) foram misturados em um tubo de *Ependorf* de 1,5ml de capacidade. A concentração final do NO na solução foi de 2,0 mM (condição de saturação).

No estudo da sensibilidade dos sensores (limite de detecção) a concentração do NO variou de 0 a 2,0 mM através da diluição da solução saturada de nitrito de sódio 10 mM. A reação abaixo mostra o mecanismo de liberação do NO na solução aprisionadora a partir do nitrito de sódio NaNO₂ sólido.



8.2.5 Solução mista de surfactantes

As soluções de SG(F127-Fe³⁺-DETC) foram preparadas de acordo com a metodologia utilizada na seção 8.2.2. Em seguida, alíquotas de cada surfactante (SDS, CTAB e Triton) inicialmente a 50 mM, foram adicionadas à alíquotas da solução SG(F127-Fe³⁺-DETC) de acordo com a concentração esperada. O volume de SG(F127-Fe³⁺-DETC) foi mantido em 176μL em uma concentração inicial de 40mg/mL. A tabela 9 descreve o processo de síntese para cada surfactante. O procedimento descrito foi realizado para cada um dos surfactantes (SDS, CTAB e Triton X100) separadamente.

Tabela 9. Preparação das soluções para análise da mistura de surfactantes.

Volume surfactantes a 50 mM	Volume da solução SG(F127-Fe ³⁺ -DETC)	[] final do surfactante
24μL	176μL	6 mM
34μL	176μL	8 mM
44μL	176μL	10 mM
56μL	176μL	12 mM
68μL	176μL	14 mM
83μL	176μL	16 mM

8.2.6 Síntese dos sensores e obtenção dos sinais do complexo NO-Fe²⁺-DETC

Os sensores sólidos foram preparados colocando-se 60 µL da solução final, conforme descrito nas seções 8.2.1 e 8.2.2 (SG + Fe³⁺-DETC) contendo os surfactantes em concentrações variando entre 0 e 16 mM, no interior de tubos capilares de ~100µL de capacidade e diâmetro interno ~1mm. A massa dos sensores foi obtida pela diferença entre a massa capilar + gel depois da secagem e a massa do capilar medida previamente, através de uma balança analítica de precisão. Os capilares contendo as soluções foram colocados no interior de uma estufa com controlador digital de temperatura para secagem a 30° C. O tempo de secagem foi de ~ 24h, após esse período a sílica se desprende do interior do capilar, sinalizando que os materiais estão secos.

O uso dos tubos capilares se deu devido a necessidade de produção de sensores pequenos no menor tempo possível. Os primeiros sensores produzidos eram feitos dentro de béqueres, com um volume de solução de ~ 5 mL, que levavam cerca de 17 dias para estarem prontos. Do sólido final, era retirado um pequeno pedaço suficiente para ser introduzido em um tubo de RPE. Vários problemas foram encontrados, onde um deles era a dificuldade de extrair um pedaço homogêneo sem quebrá-lo, a reprodutibilidade também era comprometida [88].

Para obtenção dos sinais de NO-Fe²⁺-DETC, os capilares contendo o sensor sólido (SG +Fe³⁺+DETC) após secagem a 30°C foram colocados em uma solução redutora saturada de ditonito de sódio Na₂S₂O₄ (145mg/mL de água) durante 30 min. Após esse tempo, os capilares foram retirados e colocados na solução liberadora de NO durante um tempo que variou de 2 a 60 min. Os capilares depois de retirados da solução geradora de NO e

o excesso de líquido eliminado, com auxílio de um papel absorvente, os mesmos foram colocados dentro de tubos de RPE para obtenção dos sinais. Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

8.2.7 Tempo de aprisionamento do NO

Para a determinação do tempo de aprisionamento do NO nos complexos FeDETC e indiretamente o tempo de difusão entre os poros dos sensores, foi preparada uma bateria de 5 capilares para cada surfactante, na concentração de 12mM. A preparação dos sensores é descrita nas seções 8.2.1 e 8.2.2.

Após os sensores passarem pelo processo de secagem, e identificados de acordo com o surfactante utilizado, individualmente e por sua vez, os mesmos foram inseridos dentro da solução redutora de ditionito de sódio durante 30 min e em seguida em soluções de NO em tempos que variaram de 2 a 60 min. Depois de vencido cada tempo, com auxílio de um papel toalha, o excesso de umidade foi retirado e os sinais foram obtidos colocando os capilares no interior de tubos específicos de RPE. A massa de cada sensor utilizado nesse ensaio foi anotada de acordo com o tempo utilizado. A intensidade dos sinais lançada em gráfico como função do tempo de aprisionamento do NO.

A figura 26 sumariza todo o processo de síntese dos sensores desde a preparação das soluções até a obtenção dos sinais a partir do aprisionamento e complexação do NO, com prévia redução do Fe^{3+} -DETC a Fe^{2+} -DETC através do ditionito de sódio.

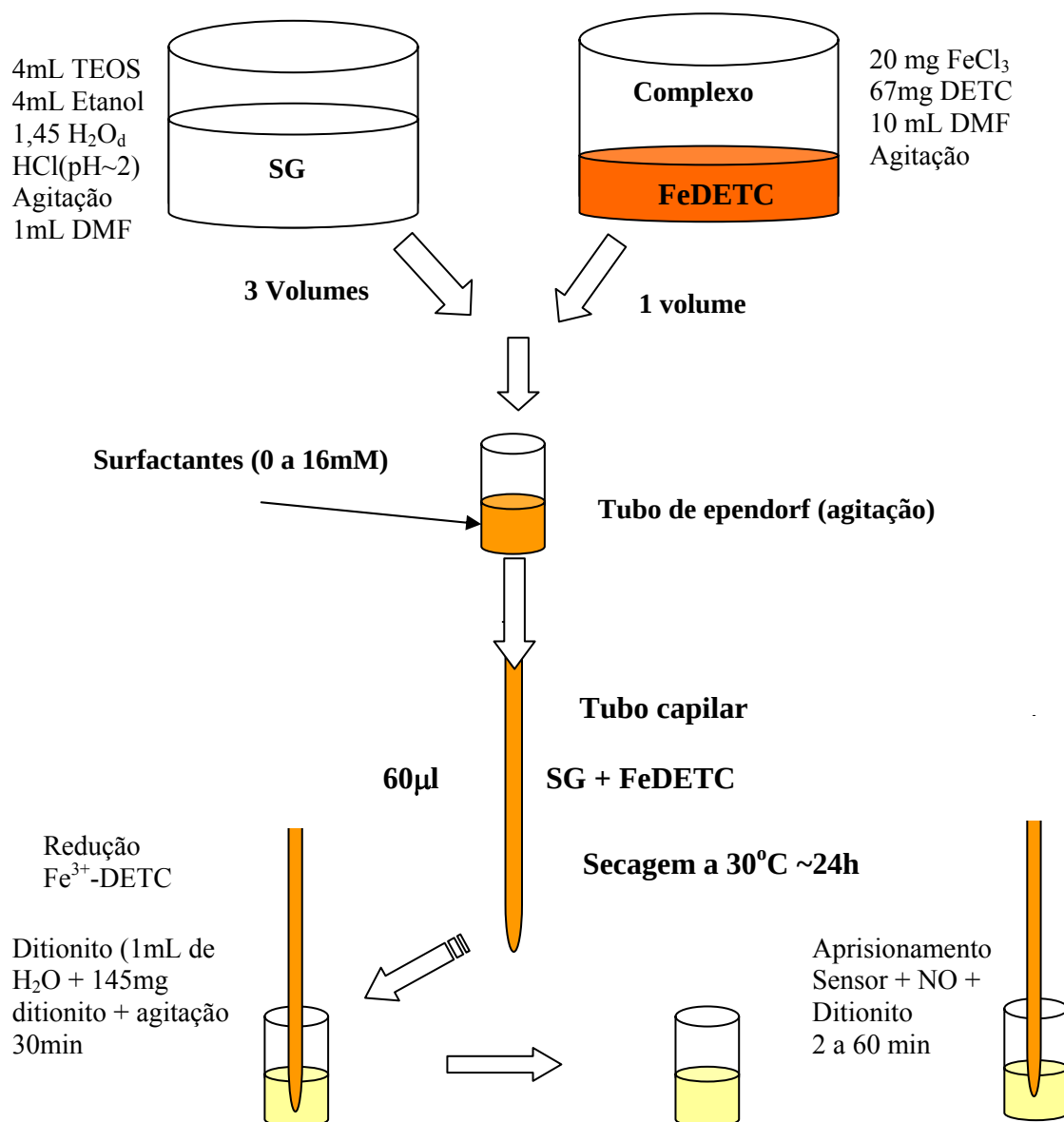


Figura 26. Esquema ilustrativo do processo de síntese dos sensores desde a preparação das soluções até o aprisionamento do NO.

8.3 Sensor no estado líquido

Para compararmos os sinais obtidos nos sensores sólidos com os sinais obtidos nos meios líquidos dividimos os experimentos em dois grupos: (1) Solução pura (sem surfactante), que se subdivide em (a) solução SG(Fe^{3+} -DETC) e (b) FeDETC em solução DMF (2) Solução com surfactante, subdividindo-se em, (c) FeDETC em solução DMF mais surfactantes (SDS, CTAB e Triton X100) (d) SG(Fe^{3+} -DETC) mais surfactantes (SDS, CTAB e Triton X100 e (e) SGFeDETC-F127. As soluções foram preparadas segundo os procedimentos descritos nas seções 8.2.1, 8.2.2 e 8.2.3, A concentração final dos surfactantes nos sensores foi de 12 mM. A concentração do NO nas soluções analisadas variou de 0 – 2 mM. A metodologia para o estudo dos sinais no estado líquido é descrita a seguir:

Grupo (1): Sem surfactante

(a) **Solução SG(Fe^{3+} -DETC):** Para esta solução, 7,5 mL de solução SG foi misturada com 2,5 mL de solução de Fe^{3+} -DETC com subsequente agitação mecânica (20 min). Em seguida, alíquotas da solução de NaNO_2 nas seguintes concentrações iniciais: 0,2; 0,5; 5 e 10 mM, foram adicionadas à solução SG(Fe^{3+} -DETC), gerando soluções com 10 concentrações diferentes de NO. A cada uma delas foi adicionado 145mg de ditionito de sódio, sendo o conjunto submetido a agitação mecânica através de um dispositivo do tipo **Vortex** por 20 min. Em seguida, cada solução, por sua vez, foi transferida para uma **flat cell** de quartzo com capacidade para 150 μL para as medidas de RPE na temperatura ambiente e no estado líquido. A tabela 10 abaixo mostra a preparação das amostras para análise.

Tabela 10. Relação entre os volumes de SG(Fe^{3+} -DETC) e NaNO_2 em diferentes concentrações a fim de obter, após redução em ditionito NO, em diferentes concentrações.

Volume SG(Fe^{3+} -DETC) (mL)	Volume NaNO_2 (μL)	[NaNO_3] inicial (mM)	[NO] (mM)
10,0	5	0,2	$1,0 \cdot 10^{-4}$
10,0	6	0,5	$3,0 \cdot 10^{-4}$
10,0	5	5,0	$2,5 \cdot 10^{-3}$
10,0	10	10,0	$1,0 \cdot 10^{-2}$
10,0	50	10,0	$5,0 \cdot 10^{-2}$
10,0	100	10,0	$1,0 \cdot 10^{-1}$
10,0	150	10,0	$1,5 \cdot 10^{-1}$
10,0	500	10,0	$5,0 \cdot 10^{-1}$
10,0	1000	10,0	1,0
10,0	1900	10,0	2,0

- (b) **Fe^{3+} -DETC em solução DMF sem surfactante**: A 10 mL de solução de Fe^{3+} -DETC (20 mg de FeCl_3 + 67mg de DETC + 10 mL de DMF) juntou-se alíquotas de NaNO_2 em pelos menos 4 concentrações iniciais (0,2; 0,5; 5 e 10 mM) preparadas previamente, a fim de obter 10 soluções contendo NO em concentrações que variam de 0 a 2 mM. As soluções finais (NO + Fe^{3+} -DETC) após redução com ditionito de sódio (145mg) foram transferidas, uma de cada vez, para o interior de uma *flat cell* de 150 μL de capacidade. A tabela 11 ilustra a diluição, bem como o volume de cada alíquota utilizada.

Tabela 11. Relação entre os volumes de Fe^{3+} -DETC e NaNO_2 em diferentes concentrações a fim de obter, após redução em ditionito, NO em diferentes concentrações.

Volume Fe^{3+} -DETC (mL)	Volume NaNO_2 (μL)	$[\text{NaNO}_3]$ inicial (mM)	$[\text{NO}]$ (mM)
10,0	5	0,2	$1,0 \cdot 10^{-4}$
10,0	6	0,5	$3,0 \cdot 10^{-4}$
10,0	5	5,0	$2,5 \cdot 10^{-3}$
10,0	10	10,0	$1,0 \cdot 10^{-2}$
10,0	50	10,0	$5,0 \cdot 10^{-2}$
10,0	100	10,0	$1,0 \cdot 10^{-1}$
10,0	150	10,0	$1,5 \cdot 10^{-1}$
10,0	500	10,0	$5,0 \cdot 10^{-1}$
10,0	1000	10,0	1,0
10,0	1900	10,0	2,0

Grupo (2): Com surfactantes

(c) **Fe^{3+} -DETC em solução DMF mais surfactantes (SDS, CTAB e Triton X100)**: Para os ensaios utilizando os surfactantes SDS, CTAB e Triton X100, foram feitas as mesmas diluições apresentadas na tabela 10, diferindo apenas em um detalhe, a solução de Fe^{3+} -DETC foi preparada, antes da adição do NaNO_2 , com as soluções de SDS, CTAB e Triton X100 numa concentração final de 12mM, a partir da diluição de uma solução estoque de NaNO_2 a 50 mM. As soluções **Fe^{3+} -DETC** contendo os surfactantes foram preparadas juntando, sob agitação, 7,6 mL da solução de Fe^{3+} -DETC com 2,4 mL de cada um dos surfactantes (SDS, CTAB e Triton X100) a 50 mM. A concentração do NO foi obtida conforme tabela 10. Das soluções finais, alíquotas foram transferidas para o interior de uma *flat cell* de 150 μL de capacidade para análise por RPE.

- (d) **SG(Fe³⁺-DETC) mais surfactantes (SDS, CTAB e Triton X100)**: As amostras SG(Fe³⁺-DETC) foram preparadas conforme descrito no item (a), entretanto, antes de adicionar as alíquotas de NaNO₂ como mostra a tabela 9, a 7,6 mL da solução SG(Fe³⁺-DETC) juntou-se 2,4 mL de cada um dos surfactantes (SDS, CTAB e Triton X100) a 50 mM, obtendo uma concentração final de 12mM. Para a determinação do sinal RPE, as soluções finais foram adicionadas a uma *flat cell*, a temperatura ambiente, para execução da parte experimental.
- (e) **SGFeDETC-F127**: Para as soluções preparadas com F127, cuidados especiais foram tomadas, haja visto que, durante alguns minutos, na temperatura ambiente a solução pode se transformar em um hidrogel. A introdução, bem como a retirada das soluções da *flat cell* deve ser rápida. A solução **SG(F127-Fe³⁺-DETC)** foi preparada pela dissolução dos seguintes reagentes: 4,27 mL de TEOS foi colocado em um béquer e mantido sob agitação com 1,5 mL de HCl 0,055M. Em seguida, foram adicionados 22,81 mL de etanol (álcool etílico absoluto) e 1,14 g de F127 lentamente sob agitação constante. A solução resultante permaneceu sob agitação durante 1h até a dissolução total. Para o estudo da concentração de F127 (mg/ml), foram obtidas por diluição concentrações compreendidas entre 3 a 40 mg/mL como mostra a tabela 8. Em seguida, alíquotas das soluções finais foram transferidas para uma *flat cell* para obtenção dos sinais de RPE.

8.4 Caracterização dos sensores

8.4.1 Medida da tensão superficial

Para verificar o comportamento dos surfactantes nas soluções SG com intuito de explicar o efeito dos diferentes tipos de surfactantes (aniônicos, catiônicos e neutros) sobre o sinal do NO nos géis à base de TEOS, foram feitos alguns experimentos baseadas na tensão superficial. Os ensaios foram feitos com auxílio de um tensímetro tipo F701 cujo método de determinação empregado, consiste na introdução de um anel sobre a superfície do líquido que se quer medir.

A tensão superficial foi determinada, variando a concentração dos surfactantes nas soluções SG(Fe^{3+} -DETC). As soluções foram preparadas segundo o procedimento descrito nas seções 8.2.1 e 8.2.2, tomando-se volumes maiores para os ensaios experimentais. Para a solução SG, juntamos a 8 mL de etanol, 8 mL de TEOS, 2,9 mL de água, 2,4 mL de HCl 0,1M; (pH $\sim$ 2), 2 mL de DMF, sob agitação constante. A 17,45 mL dessa solução foram adicionados 5,82 mL de Fe^{3+} -DETC (1 Fe^{3+} -DETC:3SG) preparado pela dissolução de 67 mg de DETC e 20 mg de FeCl_3 em 10 mL de DMF com subsequente agitação magnética e tratamento no ultra-som durante 20 min. O volume final da solução foi de $\sim$ 23,3 mL.

As soluções dos surfactantes foram preparadas pela dissolução de alíquotas, suficientes para uma concentração final de 100 mM. Para isso, 0,2883g de SDS, 0,36446 de CTAB e 0,64686g de Triton X100 foram dissolvidos em 10 mL de água deionizada, separadamente, em béqueres de 50 mL de capacidade. Os surfactantes foram adicionados na solução SG(Fe^{3+} -DETC) em alíquotas de 0,5 mL, após a qual, foi obtida tensão superficial. A

concentração dos surfactantes variou de 0 a 40 mM. Os valores foram lançados em tabela para análise dos resultados.

8.4.2 Isotropia do complexo NO-Fe²⁺-DETC

Neste experimento foi feita uma análise da conformação geométrica do complexo dentro dos sensores. Para isso, tomou-se os sinais de RPE em diversas posições angulares obtendo os espectros e comparando a forma de linha de cada um deles conforme o ângulo de incidência do campo magnético sobre as amostras.

8.4.3 Área específica e distribuição do volume de poros (BET)

O método BET foi utilizado para avaliar a estrutura dos sensores. Para caracterização dos sensores foi utilizado o equipamento *Micromeritics ASAP 2020 V3.01 H* em parceria com a *Universidade Blaise Pascal em Clermont-Ferrand (França)*. A área específica e o volume de poros foram determinados pelo método BET e a distribuição do volume de poros foi obtida pelo método BJH. Os experimentos foram feitos tomando massas de aproximadamente 0,3g dos sensores sólidos contendo cada um dos surfactantes.

Capítulo 9

Resultados e Discussão

9. Resultados e Discussão

Um dos fatores mais importantes do presente trabalho reside no fato de que o sinal do complexo $\text{NO-Fe}^{2+}\text{-DETC}$ obtido a partir do sensor no estado sólido, na temperatura ambiente é semelhante ao sinal obtido em solução congelada (77K). Isso merece destaque, uma vez que, permite a aplicação do sensor em meio biológico sem destruição da amostra, abrindo espaço para determinação do NO em tempo real em órgãos e tecidos.

A figura 27 mostra o sinal RPE do complexo $\text{NO-Fe}^{2+}\text{-DETC}$ tanto em meio sólido à temperatura ambiente quanto em solução congelada a 77K.

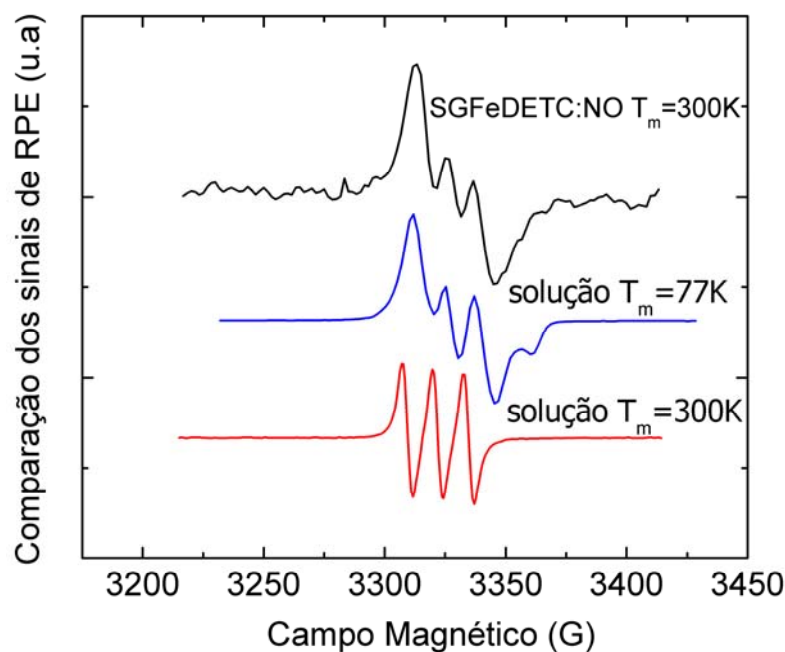


Figura 27. Comparação entre os sinais obtidos a partir do complexo $\text{NO-Fe}^{2+}\text{-DETC}$ no sensor no estado sólido, na temperatura ambiente, em solução congelada (77K) e em solução na temperatura ambiente.

A semelhança do sinal obtido a partir do sensor sólido (matriz sol-gel) na temperatura ambiente em comparação à solução congelada (77K) pode ser explicada em função do ambiente rígido imposto ao NO quando aprisionado na rede de poros, o que lhe impõem restrições ao movimento. Dentro da matriz, a rotação da molécula NO-Fe²⁺- DETC é dificultada e o material passa a se comportar como NO-Fe²⁺- DETC na solução congelada.

A possibilidade da utilização do sensor à temperatura ambiente, no estado sólido é muito importante, já que, nas soluções líquidas as medidas espectrais por RPE são comprometidas. Os líquidos em geral, são absorvedores de microondas, o que traz uma série de complicações, entre elas a necessidade de tubos de RPE especiais de custo elevado, como por exemplo, os chamados tubos de célula plana.

Sensores no estado sólido, utilizando matrizes porosas, para identificação e quantificação do NO, à temperatura ambiente, pode-se dizer que é algo inédito, havendo na literatura apenas um trabalho semelhante, utilizando matrizes de zeólita [106]. Dessa forma, a proposta de um sensor sólido de NO, pioneira na quantificação de NO através de materiais porosos utilizando a técnica de RPE, associada ao aprisionamento de *spins*, alia uma série de vantagens, como descrito a seguir:

(1) O fato de estarmos encapsulando o Fe²⁺-DETC em uma matriz sólida, resolve a princípio, o “problema” da solubilidade do complexo em água, dentre os DTCs disponíveis no mercado podemos escolher, o DETC por ser mais barato. A baixa solubilidade do Fe-DETC tem dificultado o seu uso como aprisionador de NO em meios biológicos, em virtude da sua precipitação na forma de sólidos dispersos.

(2) O Fe²⁺-DETC ficando confinado na matriz, minimiza os efeitos no sistema biológico, e em especial nos níveis de NO endógeno.

(3) Nós verificamos que o complexo NO-Fe²⁺-DETC encapsulado é muito mais estável que o não encapsulado, o que permite, por exemplo, que as medidas dos níveis

de NO endógeno possam ser realizadas e armazenadas por até uma semana a temperatura ambiente, para sua posterior leitura em um aparelho de RPE situado em um lugar diferente do local da coleta [90].

(4) Além disso, lembrando o fato de não haver restrições quanto à solubilidade do sensor na forma sólida, podemos em princípio, sintetizar um sólido com uma densidade elevada de Fe^{2+} -DTC e obtermos um aumento significativo na sensibilidade ao NO.

(5) A sílica é uma matriz transparente, portanto mudanças nas propriedades óticas (absorção ou luminescência) provocados pela complexação do NO com o Fe^{2+} -DTC também podem ser utilizadas pelo sensor, neste caso tratar-se-ia de um sensor ótico. Esse fato é ainda mais atraente, pois em princípio podemos visualizar a aplicação desse material na forma de um optodo⁸. Caso a sílica impregnada com Fe^{2+} -DETC seja depositada na ponta de uma fibra ótica, a mesma torna-se a um sensor semelhante aos microeletrodos utilizados em eletroquímica, com as vantagens já mencionadas.

(6) A matéria prima para a confecção do sensor não é cara, o processo sol-gel é simples e o sensor pode ser reutilizado por diversas vezes [90].

Nessa direção, inúmeros pesquisadores tem se empenhado em conhecer os mecanismos de interação do complexo NO- Fe^{2+} -DETC em meios biológicos. Isso ocorre, em virtude de algumas propriedades peculiares do DETC, como a hidrofobicidade, permitindo dosar os níveis de NO tanto no meio intra quanto extracelular.

⁸ Eletrodo com propriedades óticas.

9.1 Tempo de aprisionamento do NO no sensores sólidos

Sendo os sensores preparados pelo método SG constituídos de uma rede de poros distribuídos no interior do sólido e levando em conta que o NO se liga aos complexos de FeDETC (Fe^{2+} -DETC ou Fe^{3+} -DETC) contidos na rede da matriz por difusão, foi avaliado o tempo de aprisionamento do NO para cada um dos surfactantes nas diferentes concentrações (0-16 “dados não apresentados”). A figura 28 ilustra a intensidade do sinal de RPE *versus* tempo de aprisionamento para a concentração de 12 mM.

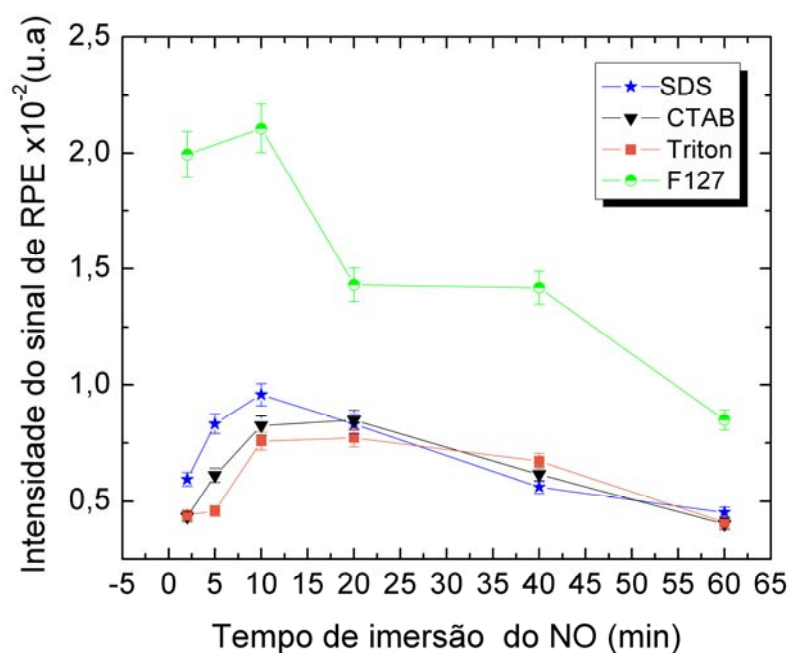


Figura 28. Sinal integrado em função do tempo de imersão do NO nas soluções de NaNO_2 em meio redutor (ditionito de sódio).

Através da dinâmica de aprisionamento do NO nos complexos Fe^{2+} -DETC, podemos observar que um máximo acontece em 10 min para todos os surfactantes. Não obstante, após 2 min já é possível observar o sinal do complexo NO-Fe^{2+} -DETC mostrando

que algumas moléculas de NO já foram aprisionadas. A intensidade do sinal para o F127 é maior do que a dos demais surfactantes, chegando a ser cerca de 5 vezes maior do que o Triton X100 e CTAB, logo nos primeiros 2 min. Devido a possibilidade de liberação do NO, os sinais foram obtidos imediatamente após a retirada dos sensores das soluções de NO. Em trabalhos anteriores [89], o tempo de aprisionamento foi de 60 min, de acordo com a figura 28 neste tempo, boa parte do NO já foi liberada. A idéia é a seguinte, antes de colocarmos os sensores na solução de NO, uma reação química de redução acontece na presença do ditionito de sódio, fazendo com que haja NO livre na solução em concentrações específicas, neste caso, 2 mM. Ao ser colocado o sensor nesta solução, o NO, por difusão, penetra no interior do sensor através da rede de poros. Até certo tempo de imersão, a maioria, ou boa parte do NO foi aprisionado, como mostra a figura 28, esse tempo foi de 10 min, determinado pela máxima intensidade do sinal de RPE.

Se o sensor permanece ainda em solução, há duas possibilidades a serem avaliadas:

- (1) A primeira delas é a descomplexação de parte do Fe^{2+} -DETC;
- (2) A segunda é a oxidação de parte do NO em virtude do oxigênio contido na solução. Pode ser que o NO esteja sendo oxidado a nitrito ou nitrato, é o que comumente acontece em meios biológicos devido a troca com o oxigênio da hemoglobina no processo de respiração celular;

A tabela 12 mostra o percentual de NO que foi liberado ou descomplexado entre o tempo inicial (2min) e o tempo final (60 min).

Tabela 12. Estimativa do teor percentual de NO liberado entre os tempos de aprisionamento de 2 a 60 min para os surfactantes utilizados.

Surfactante	2min	60 min	% liberada
SDS	0,5944	0,4518	23,99
CTAB	0,4403	0,4083	7,27
Triton	0,4403	0,4091	7,09
F127	1,9945	0,8483	57,47

A taxa de NO, possivelmente liberada é variada, mostrando que o uso de cada um dos surfactantes resulta em sensores com resposta diferente, permitindo que os mesmos possam ser utilizados como liberadores controlados de NO, que hoje representa uma área de pesquisa em ascensão. Os resultados demonstram que é possível controlar a velocidade de liberação do NO e assim ajustar a composição do sensor de acordo com a necessidade. A completa caracterização quanto a liberação de NO está programada para estudos ou projetos futuros.

9.1.1 Caracterização dos materiais: Análise BET e tensiometria pelo método do anel

A porosidade dos sensores pôde ser avaliada qualitativamente através do tempo de aprisionamento do NO. Aparentemente, poros maiores favoreceriam a difusão do NO influenciando no tempo de aprisionamento. Para compreendermos a maneira pela qual os surfactantes aumentam a intensidade dos sinais de RPE, foram feitos alguns experimentos para caracterizarmos em parte, a estrutura dos sensores.

A medida da superfície interna dos materiais sólidos foi feita pelo conhecido método de Brunauer, Emmett e Teller (BET), que calcula a área superficial através da quantidade de gás (geralmente nitrogênio N₂) adsorvido em uma amostra. Para isso, pequenas

alíquotas de gás são introduzidas num porta amostra vedado e evacuado. Pela diferença de pressão de cada de cada uma dessas injeções de gás, é possível determinar a quantidade de N_2 que a amostra reteve na superfície. Sabendo-se o tamanho das moléculas do N_2 e estimando através de cálculos o número de camadas de gás adsorvido, é possível determinar a área que este gás ocupa na superfície do sólido analisado.

O processo de síntese dos sensores envolve uma série de reagentes, de tal forma que, cada um, de uma forma ou de outra influenciará na obtenção do sólido final. De um modo geral, cada etapa do processo influencia na morfologia das matrizes. Num primeiro momento, a cinética das reações de hidrólise e condensação é determinante. Dependendo da velocidade dessas reações, o sistema poderá gerar partículas maiores ou menores, o que afetará as características físico químicas dos sóis, géis, xerogeis e dos materiais sólidos que serão formados.

Sendo assim, a temperatura do sistema, a quantidade e a natureza dos eletrólitos e do líquido dispersante, a quantidade e o tipo de precursor utilizado (neste caso o TEOS), o próprio pH e até mesmo o método de mistura, será decisivos na produção dos sensores. O objetivo deste estudo foi avaliar a superfície dos materiais visando compreender o papel dos surfactantes na estruturação das redes de poros. A tabela 13 mostra os principais parâmetros obtidos e os valores associados.

Tabela 13. Análise da superfície dos sensores sólidos, principais parâmetros avaliados pelo método BET.

SURFACTANTES	Vol. dos Poros cm^3/g	Largura dos Poros(nm)	Diâmetro dos Poros (nm)	Adsorção m^2/g	Área superficial m^2/g
SDS	0,38	2,98	3,96	204,10	501,22
CTAB	0,38	2,70	3,84	202,74	554,39
TRITON	0,46	3,06	4,12	289,40	583,48
F127	0,39	3,02	3,98	206,2	503,13

A dimensão dos poros na rede dos sensores sólidos parece não influenciar no aprisionamento do NO. Os resultados da análise estrutural dos materiais feita por BET, não mostraram uma diferença significativa na área de superfície, nem tão pouco no volume dos poros, capaz de justificar o aumento na intensidade dos sinais de RPE com os diferentes surfactantes. Em outras palavras, não há, aparentemente, uma relação direta entre a intensidade do sinal de RPE com a morfologia dos poros, tudo indica que os surfactantes de alguma maneira aumentam a densidade de complexos Fe^{2+} -DETC no interior dos sensores, produzindo sinais com intensidades diferentes. As mudanças na intensidade dos sinais, ainda não são bem compreendidas, entretanto, a coloração dos sensores (amarelo-claro) em concentrações de surfactante maiores que 12 mM sugere a formação de complexos diamagnéticos NO- Fe^{3+} -DETC, fazendo com que o sinal comece a decrescer.

Os monômeros dos surfactantes podem se organizar no meio líquido, basicamente de duas maneiras, a saber, através de micelas ou formando camadas organizadas chamadas de lamelas. Para avaliarmos uma das possibilidades descritas, foram feitas medidas da tensão superficial das soluções SG com os diferentes surfactantes utilizados. A concentração variou de 0 a 16 mM. A figura 29 mostra o comportamento da tensão superficial em função da concentração dos surfactantes. Neste caso, todos eles deram a mesma resposta no que diz respeito à tensão superficial.

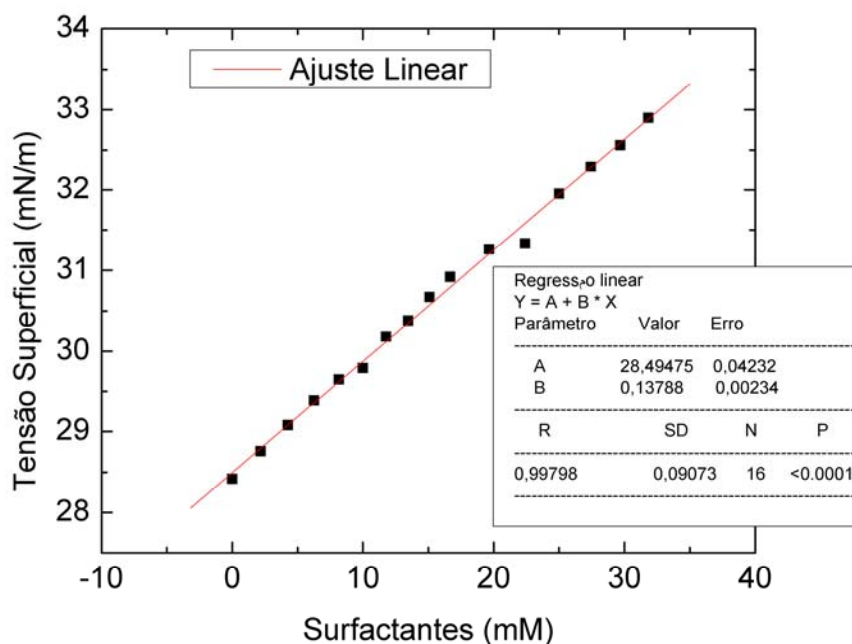


Figura 29. Resultado do estudo da tensão superficial nas soluções SG com os surfactantes em diferentes concentrações.

De acordo com o gráfico da figura 29 não há, pelo menos no meio de estudo, a formação de micelas dos surfactantes. O comportamento da tensão superficial é um tanto inusitado, esperava-se que, a tensão superficial diminuísse com a adição dos surfactantes e no caso de haver a formação de micelas, houvesse uma mudança brusca na curva: tensão superficial *versus* concentração, como foi mostrado na figura 24, entretanto, no intervalo das concentrações estudadas, a tensão superficial fez foi é aumentar. Os experimentos foram repetidos e os resultados reproduzidos da mesma maneira.

9.2 Resposta do sinal de RPE em função da concentração dos surfactantes utilizados na confecção dos sensores no estado sólido

Na busca de materiais otimizados, para serem usados como sensores de NO, uma série trabalhos voltados para quantificação dessa molécula tem sido publicados, e certamente, outras matrizes, provavelmente estão sendo desenvolvidas ou pesquisadas para produção de um sensor sólido. O sensor “ideal” dentro da metodologia adotada neste trabalho deverá ter:

- ☒ Boa resistência mecânica, permitindo a reutilização por mais de uma vez;
- ☒ Rede de poros bem distribuída o que permite uma boa difusão do NO no seu interior aumentando a quantidade de aprisionadores FeDETC ativos e estáveis;
- ☒ Síntese rápida – Hidrólise e condensação rápida;
- ☒ Sensibilidade $< 1 \mu\text{M}$ (picomol “pmol”);
- ☒ O ideal é que o sensor seja transparente, permitindo possíveis aplicações ópticas;

Diante do fato de que os surfactantes estão sendo usados extensivamente na produção de materiais mesoporosos e altamente organizados, este trabalho apresenta uma rota alternativa, com intuito de aumentar a sensibilidade dos sensores preparados pelo método SG, através do uso de aditivos como os surfactantes.

A escolha dos surfactantes foi feita segundo algumas propriedades peculiares de cada um, a saber, a carga elétrica líquida e a quantidade de monômeros que se agregam na formação das micelas, na seguinte ordem: SDS (aniônico), CTAB (catiônico), Triton X100

(neutro) e F127 (neutro). Para cada um deles, foi avaliado o efeito produzido sobre os sinais de RPE, obtidos a partir do complexo $\text{NO-Fe}^{2+}\text{-DETC}$ aprisionado na rede de poros dos sensores. Para preparação dos sensores foi utilizado o método SG.

O parâmetro principal na determinação do NO por essa técnica, basicamente, é a quantidade de complexos FeDETC ativos⁹, que por sua vez depende de sólido com uma rede de poros bem estruturada. Avaliando o comportamento do sinal em função da concentração dos surfactantes, num primeiro momento, nota-se que na ausência do surfactante não há sinal do $\text{NO-Fe}^{2+}\text{-DETC}$, entretanto, conforme varia a concentração dos surfactantes, o sinal característico vai aumentando. Os gráficos obtidos em concentrações que variaram de 0 – 16 mM foram agrupados em uma mesma figura para melhor visualização. Cada surfactante e suas respectivas concentrações podem ser vistos na figura 30 que ilustra a evolução dos sinais RPE de acordo com o surfactante utilizado.

⁹ Chamamos de Fe-DETC ativo os complexos de $\text{Fe}^{2+}\text{-DETC}$ suficientes para aprisionar o NO, já que, complexos férrico $\text{Fe}^{3+}\text{-DETC}$ também são formados e podem aprisionar o NO formando MNICs diamagnéticos.

Evolução do sinal de RPE (G) x [] dos surfactantes

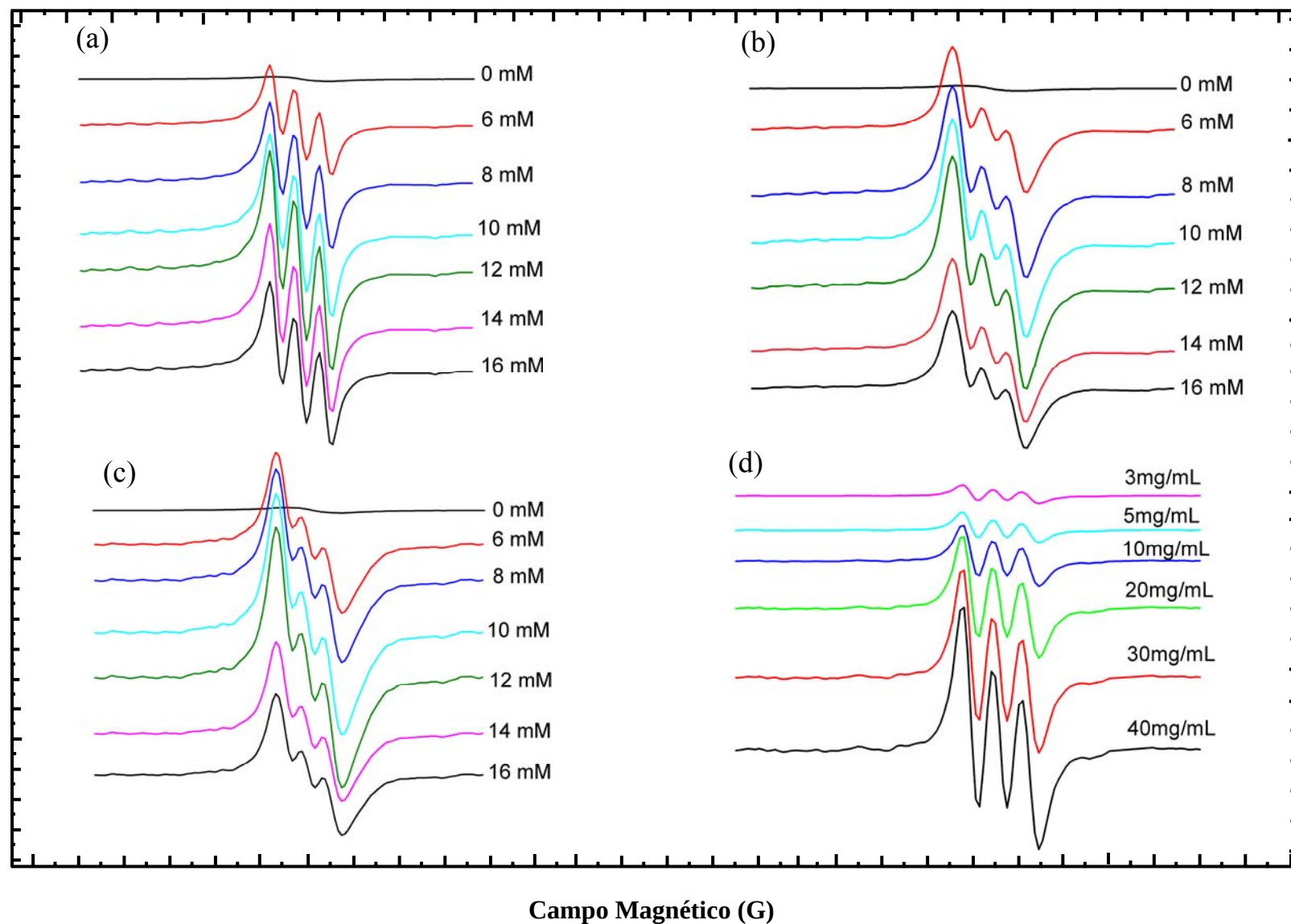


Figura 30. Evolução do sinal de RPE em função das concentrações dos surfactantes: (a) SDS, (b) CTAB, (c) Triton e (d) F127.

Na figura 30, podemos notar que na ausência dos surfactantes, não há sinal de RPE, entretanto, conforme aumentamos a concentração, em todos os casos, a intensidade do sinal aumenta significativamente evoluindo até certa concentração, após a qual começa a diminuir. Vale salientar que, a concentração do NO em todos os ensaios foi mantida a mesma (2 mM). Os resultados são intrigantes, pois, numa mesma concentração de surfactante sendo os sensores preparados seguindo a mesma metodologia variando apenas a quantidade e natureza dos surfactantes, a resposta do sinal de RPE é afetada de maneira distinta. Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

A intensidade do sinal foi obtida pela dupla integração dos sinais de RPE (área abaixo da curva de absorção) e foi escolhida como método padrão para compararmos a resposta do sinal para cada um dos surfactantes. Primeiro, por ser o método mais eficaz para estimar a quantidade de espécies paramagnéticas contidas nas amostras avaliadas, já que, a dupla integração é proporcional ao número de “*spins*” e segundo, devido o fato de não haver uma homogeneidade na forma de linha dos sinais de RPE o que poderia induzir erros nas comparações. A dupla integração foi feita com auxílio do **software OriginLab 8.0**, ajustando cuidadosamente a linha base antes de fazer a integração dos sinais.

Lançando a intensidade dos sinais obtidos, como função das concentrações dos surfactantes em um gráfico é possível determinar o ponto onde a intensidade do sinal é máxima (vide figura 31).

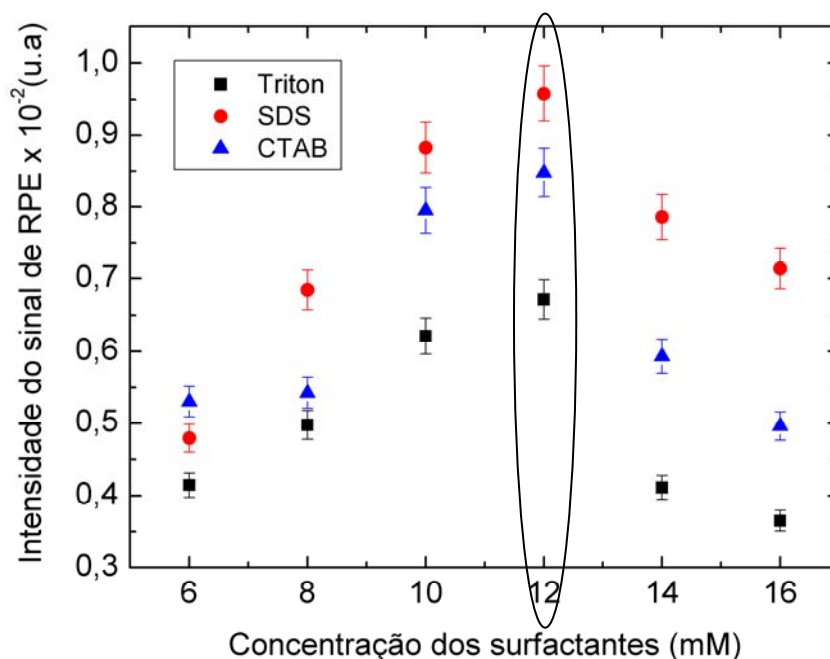


Figura 31. Intensidade do sinal de RPE em função da concentração dos surfactantes.

A concentração ideal, dentro dos parâmetros avaliados foi de 12 mM, tendo uma maior intensidade com o SDS (~ dobro do Triton) seguida do CTAB e por fim Triton X100. Para concentrações acima de 16 mM os sensores ficam gelatinosos e a secagem só ocorre em temperaturas mais elevadas (~ 90°C) e os sinais de NO não são detectáveis, provavelmente devido a degradação do DETC [106] ou até pela dificuldade de difusão do NO na rede de poros, pois, mesmo depois de secos os sólidos permanecem gelatinosos e aderem na parede dos capilares dificultando a execução dos experimentos. O tempo de permanência nas soluções de NO para o aprisionamento foi de 10 min.

Um problema que tínhamos em trabalhos anteriores [89,90] estava na resistência mecânica dos sensores, que na presença da água quebravam-se facilmente, esse problema foi resolvido com o uso dos surfactantes. Os materiais obtidos tornaram-se mais resistentes e o tempo de secagem também foi reduzido a menos da metade (cerca de 12 horas). A temperatura de secagem pôde então ser reduzida a 30°C, conservando o DETC

ativo. Reduzir a temperatura foi importante, pois o DETC degrada facilmente em temperaturas mais elevadas dificultando a formação dos complexos com o ferro [106].

Um dos maiores desafios na produção de sensores sólidos utilizando matrizes sol-gel com complexos Fe^{2+} -DETC é dentre outras, a eficiência no aprisionamento. Em outras palavras, saber a quantidade de complexos Fe^{2+} -DETC que foram imobilizados no interior da matriz sólida e que estão ativos. Sendo a intensidade dos sinais proporcional as espécies paramagnéticas e que o sinal detectado é do complexo NO- Fe^{2+} -DETC, podemos inferir que a intensidade do sinal também é proporcional à quantidade de complexos Fe^{2+} -DETC. Nessa direção, dá de se entender que a maior resposta do sinal na concentração de 12 mM implica que de alguma forma os surfactantes estão aumentando a quantidade de Fe^{2+} -DETC ativos, ou seja, complexados, para o subsequente aprisionamento do NO.

Levando em conta que a concentração do NO em todas as soluções (figura 31) foi de 2mM, que o volume da solução aprisionadora foi de 1 mL (10^{-3}L) e que a intensidade do sinal do gráfico da figura 31 foi obtida para cada **mg** de sensor, podemos calcular a quantidade de spins, contida na solução e relacionar com a intensidade do sinal de RPE para cada surfactante nas respectivas concentrações. A quantidade de **spins** presente na solução aprisionadora é de $1,2040 \cdot 10^{18}$ **spins**, calculada pela seguinte fórmula:

$$N_{\text{spins}} = [\text{NO}](\text{mol} / \text{L}) \times V(\text{L}) \times 6,02 \cdot 10^{23}$$

Portanto, cada concentração apresentou uma intensidade diferente para uma mesma quantidade de **spins** contida na solução aprisionadora. Os valores das intensidades e as respectivas concentrações dos surfactantes podem ser vistos na tabela 14.

Tabela 14. Intensidade dos sinais de RPE adquirida a partir dos sensores preparados com diferentes surfactantes e em concentrações que variam de 6 - 16mM.

Surfactante			Concentração (mM)
Intensidade do sinal (u.a) x 10 ⁻²			
SDS	CTAB	Triton	
0,5299	0,4789	0,4145	6
0,6844	0,5421	0,4974	8
0,8826	0,7948	0,6212	10
0,9579	0,8479	0,6715	12
0,7858	0,5929	0,4111	14
0,7143	0,4958	0,3649	16

Como pode ser visto na tabela, para uma mesma concentração de NO equivalente a $1,2040 \cdot 10^{18}$ *spins*, disponível na solução aprisionadora, há respostas diferentes quanto a intensidade do sinal de RPE no que diz respeito a concentração e tipo de surfactante utilizado.

Como foi mencionado, a condição para a aquisição do sinal de RPE do complexo paramagnético NO-Fe²⁺-DETC é a disponibilidade de Fe²⁺-DETC, seja no sensor no estado sólido ou líquido. Se havia NO disponível ($2 \text{ mM} = 1,2040 \cdot 10^{18}$ *spins* – radicais NO), só há um motivo que justifique a diferença nas intensidades, é que a medida que aumentamos a concentração dos surfactantes a quantidade de moléculas de NO aprisionadas também aumenta, saturando em 12 mM. A quantidade de NO aprisionado é diretamente proporcional ao número de aprisionadores disponíveis, ou seja, da quantidade de complexos de Fe²⁺-DETC ativos. Dessa forma, se compararmos, por exemplo, a intensidade do sinal para o SDS, em 6 mM e 12 mM, percebe-se que em 12 mM, a quantidade de complexos Fe²⁺-DETC ativos é aproximadamente o dobro do valor encontrado em 6 mM. O mesmo efeito pode ser observado com os outros surfactantes.

O Fe pode formar complexos com o DETC tanto no estado férrico (Fe³⁺-DETC) quanto ferroso (Fe²⁺-DETC). Semelhantemente, o NO também pode ser aprisionado

com o complexo, tanto no estado férrico quanto ferroso. Dessa forma, é importante sabermos se o FeDETC está sendo formado no estado férrico ou ferroso.

A coloração dos sensores durante o processo de síntese até o produto final (sólido) é um indicativo do tipo de complexo formado. A caracterização dos complexos de ferro, portanto, pode ser feita qualitativamente observando a coloração da solução conforme reportado na literatura [56]. A tabela 15 apresenta a coloração característica de cada complexo formado.

Tabela 15. Avaliação qualitativa dos complexos Fe-DETC e NO-Fe-DETC em solução DMF, SG líquido e SG sólido

Complexo	Estado	Resultado	Complexado	Coloração
$\text{Fe}^{3+} + \text{DETC}$	Sol. DMF	$\text{Fe}^{3+}\text{-DETC}$	Sim	Marrom alaranjado
$\text{Fe}^{3+} + \text{DETC}$	Sol. DMF	$\text{Fe}^{2+}\text{-DETC}$	Sim	Incolor
$\text{Fe}^{3+} + \text{DETC}$	SG líquido	$\text{SG}(\text{Fe}^{3+}\text{-DETC})$	Sim	Amarelo claro
$\text{Fe}^{3+} + \text{DETC}$	SG líquido	$\text{SG}(\text{Fe}^{2+}\text{-DETC})$	Sim	Incolor
$\text{Fe}^{3+} + \text{DETC}$	SG sólido	$\text{SG}(\text{Fe}^{3+}\text{-DETC})$	sim	Amarelo Claro
$\text{Fe}^{3+} + \text{DETC}$	SG sólido	$\text{SG}(\text{Fe}^{2+}\text{-DETC})$	Sim	Incolor
$\text{NO} + \text{Fe}^{3+} + \text{DETC}$	Sol. DMF	$\text{NO-Fe}^{2+}\text{-DETC}$	Sim	Verde claro
$\text{NO} + \text{Fe}^{3+} + \text{DETC}$	SG líquido	$\text{NO-Fe}^{2+}\text{-DETC}$	Sim	Verde claro
$\text{NO} + \text{Fe}^{3+} + \text{DETC}$	Sol. DMF	$\text{NO-Fe}^{3+}\text{-DETC}$	Sim	Amarelo claro
$\text{NO} + \text{Fe}^{3+} + \text{DETC}$	SG sólido	$\text{NO-Fe}^{3+}\text{-DETC}$	Sim	Amarelo claro
$\text{NO} + \text{Fe}^{3+} + \text{DETC}$	SG sólido	$\text{NO-Fe}^{2+}\text{-DETC}$	Sim	Verde claro

Durante o processo de síntese dos sensores sólidos, quando FeCl_3 e DETC foram misturados juntamente com o SG, a solução tornou-se escura e com o passar do tempo (30 min) sob agitação, a solução foi se tornando **marrom alaranjada**, demonstrando que o complexo formado apresenta-se na forma férrica ($\text{Fe}^{3+}\text{-DETC}$).

As soluções de $\text{SG-Fe}^{3+}\text{-DETC}$, após inseridas dentro dos tubos capilares (com ou sem surfactante), passaram por um processo de secagem para que os solventes voláteis

fossem removidos promovendo reações de hidrólise e condensação até alcançar o produto final, a saber, um sólido poroso contendo nos seus interstícios o complexo Fe^{3+} -DETC. Após secagem, o sólido é colocado em contato com uma solução de NO em meio redutor (ditionito) para o aprisionamento. A cor final dos sensores preparados com algum dos surfactantes, após a imersão na solução de NO, foi **verde claro** indicando a formação de NO-Fe^{2+} -DETC, enquanto que a coloração dos sensores preparados sem surfactante foi de **amarelo claro** indicando a formação de NO-Fe^{2+} -DETC. Lembrando que o NO pode ser aprisionado tanto na forma de Fe^{2+} -DETC quanto na forma de Fe^{3+} -DETC. O complexo férrico NO-Fe^{3+} -DETC é diamagnético e apresenta uma cor **amarelo claro** característica e, portanto não exibe sinal por EPR [56] (veja tabela).

Diante disso, inferimos, que o sinal de RPE dos sensores preparados sem um surfactante (0,00 mM da figura 30) deve-se à formação do complexo diamagnético NO-Fe^{3+} -DETC ($S = 0$). Já os sensores preparados com o uso de um surfactante apresentaram **coloração incolor** (Fe^{2+} -DETC) quando colocados na solução redutora de ditionito e após serem inseridos na solução de NO tornaram-se **verdeclaro** sinalizando a formação do complexo paramagnético NO-Fe^{2+} -DETC. Essa coloração (**verdeclaro**) intensifica a medida que a concentração dos surfactantes aproxima de 12 mM. O mecanismo pelo qual os surfactantes influenciam na densidade de complexos Fe^{2+} -DETC nas matrizes sólidas não é ainda compreendido, todavia, o papel desses aditivos é perceptível e significativo.

Para o F127, os sinais foram avaliados de forma semelhante, todavia, os gráficos foram feitos, lançando a intensidade dos sinais de RPE em função da concentração de F127 em mg/mL. A diferença no procedimento justifica-se pelas dificuldades do processamento SG com esse surfactante (baixa solubilidade do F127) e pelo fato de que o F127 sendo um polímero possui um elevado e aproximado peso molecular, o que nos forneceria valores, também aproximados, no caso do uso da concentração em unidade molar

(mM). Além disso, dependendo da concentração do F127, o simples fato da solução atingir a temperatura ambiente ($\sim 25^{\circ}\text{C}$) induz a formação de hidrogéis o que não é interessante no estudo em questão.

A máxima concentração alcançada, dentro das condições de preparação dos sensores foi de 40 mg/mL. Na figura 30 (d), semelhantemente ao que ocorreu com o SDS, CTAB e Triton X100, o sinal aumenta proporcional a concentração de F127. A resposta dos sensores através da intensidade do sinal de RPE *versus* concentração em mg/mL, merece destaque como pode ser visto na figura 32.

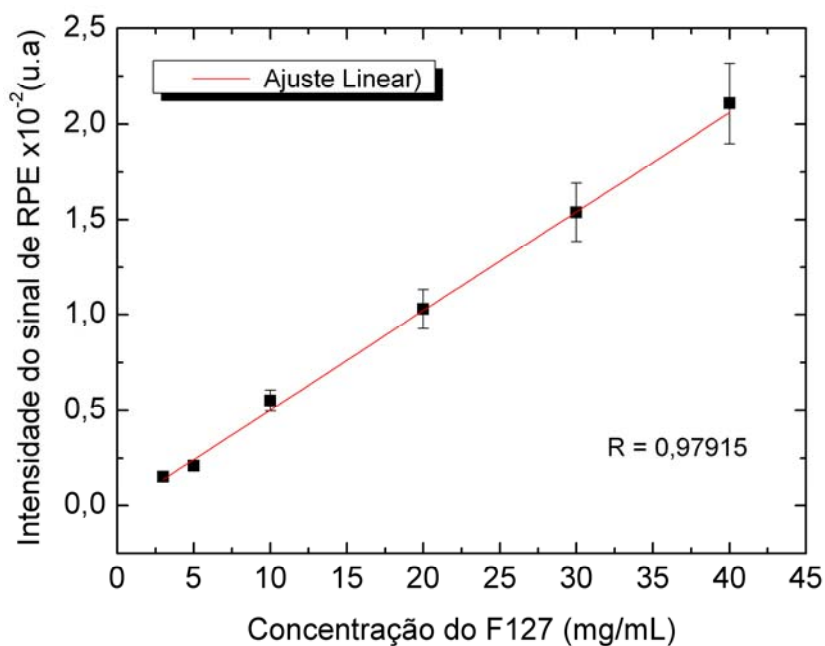


Figura 32. Intensidade do sinal de RPE obtido a partir de sensores sólidos preparados pelo método SG utilizando o F127 como aditivo.

A resposta do sensor para esse surfactante aproxima-se da linearidade num intervalo de 3 a 40 mg/mL. Isso quer dizer que, a intensidade do sinal, sendo proporcional a quantidade de espécies paramagnética na amostra, é diretamente proporcional a concentração do surfactante. O F127 na forma de hidrogel tem sido usado como liberador de NO, neste

caso, tudo leva a crer, que ele seria bastante eficiente como sensor liberador de NO no estado sólido.

Na concentração de 40 mg/mL a intensidade do sinal de RPE para o F127 é cerca de 3 vezes maior do que a do Triton X100 e supera a melhor resposta do SDS em 1,5 vezes. Neste caso, a concentração de NO foi mantida em 2mM e portanto, com a mesma quantidade *spins*.

9.3 Surfactantes mistos: Efeito da mistura dos surfactantes sobre o sensor sólido

Interações entre surfactantes iônicos e polímeros não-iônicos hidrossolúveis têm recebido especial atenção. Os motivos são, dentre outros, as características reológicas em decorrência das aplicações em processos industriais. A finalidade é identificar em solução, as propriedades físicas e químicas, acompanhadas de possíveis mecanismos que interpretem a ligação do surfactante sobre o polímero. As interações são governadas por intrincadas forças entre as cadeias e segmentos, agregação entre as cadeias e por forças eletrostáticas.

Questionamentos são feitos com relação à natureza da interação entre o surfactante e o polímero. A mais “popular” interpretação refere-se ao caráter hidrofóbico, tanto do surfactante como de seções da cadeia polimérica. Sabe-se que, no entanto, somente hidrofobicidade não abrange todos casos, embora a literatura tem explorado diferentes modificações estruturais para deixar surfactantes e polímeros com caráter cada vez mais hidrofóbico e, assim, explorar as consequências destas modificações.

Foram misturadas em concentrações que variaram de 0-16 mM os surfactantes SDS, CTAB e Triton X100 com soluções de SG(F127-Fe³⁺-DETC) inicialmente a 40 mg/mL (vide tabela 9). O objetivo é avaliar as mudanças na intensidade do sinal, devido às possíveis

interações entre os surfactantes supracitados e o F127. A intensidade dos sinais em função das concentrações dos surfactantes pode ser vista na figura 33.

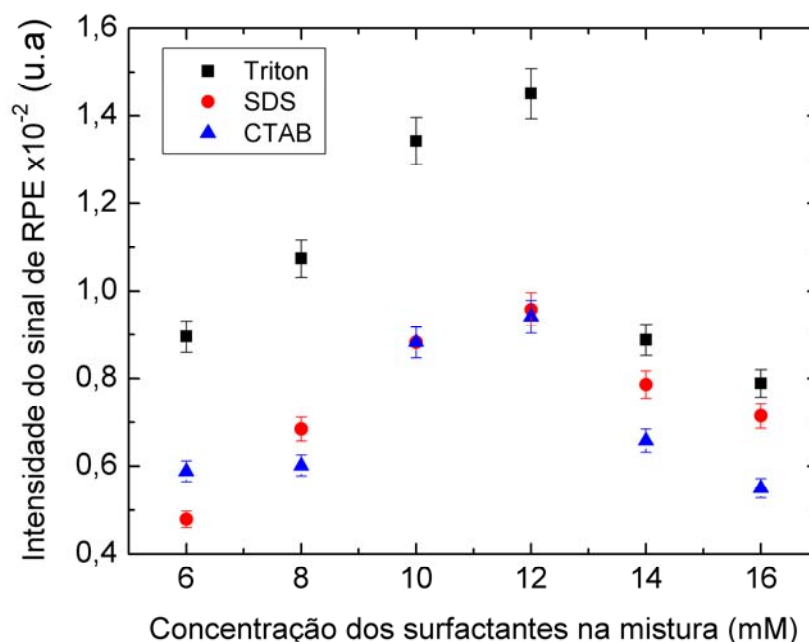


Figura 33. Intensidade dos sinais obtidos a partir dos sensores no estado sólido preparados de com a mistura dos surfactantes, SDS, CTAB e Triton X100 com o F127.

Se compararmos os sinais obtidos na figura 31 com os sinais da figura 33 é possível notar que houve uma inversão dos surfactantes no que diz respeito à intensidade dos sinais. O Triton X100, por exemplo, na figura 31 foi o menos sensível de todos, com uma intensidade máxima em 12 mM, equivalente a 0,67 enquanto que associado ao F127 esse valor passa a ser de 1,45 (duas vezes maior). A intensidade do sinal do CTAB também aumenta de 0,85 para 0,94 enquanto que o SDS permanece praticamente o mesmo.

Percebe-se, que é possível aumentar a sensibilidade do sensor através de uma mistura dos surfactantes, como no caso do Triton X100. O interessante é que, o melhor resultado encontrado na mistura de surfactantes foi para o Triton X100. Neste caso, a interação de natureza eletrostática não parece ser o fator dominante, já que, ambos os surfactantes (Triton e F127) são neutros.

9.4 Sinais obtidos a partir do sensor no estado líquido

A inclusão e imobilização de aprisionadores de NO em matrizes porosas apresenta muitas vantagens em relação ao complexo livre na fase líquida, dentre as quais podemos citar: a fácil manipulação, a menor invasividade, a possibilidade de inclusão de outros compostos orgânicos e inorgânicos numa mesma matriz e a reutilização do sensor por mais de uma vez [90]. Até o presente momento, conseguimos resultados importantes no que diz respeito à produção de um sensor sólido, abrindo novas perspectivas no desenvolvimento de biossensores capazes de quantificar a molécula de NO por RPE. Todavia, o limite de detecção foi de 0,01 mM (10 μ M), concentração essa que impossibilita a aplicação do sensor a nível fisiológico < 1 μ M.

Para compararmos o efeito do meio em que o NO está sendo complexado, sobre o sinal RPE, foi feito um estudo da concentração do NO, bem como do papel dos surfactantes sobre o sensor no estado líquido. No caso do meio líquido não há possíveis interferências na difusão do NO causada eventualmente pela rede de poros e dessa forma, podemos inferir que é possível obter, nas condições experimentais, uma boa densidade de complexos Fe^{2+} -DETC. Isso pode justificar a semelhança entre o sinal obtido com o sensor no estado sólido na presença do F127 e SDS e o sinal obtido no SG no estado coloidal, bem como a redução no limite de detecção encontrado nesses surfactantes em detrimento ao Triton e CTAB.

Para a solução SG, foi levado em conta, a dispersão coloidal formada logo após a mistura de seus componentes ainda no estado líquido, no processo de gelificação. A influência dos surfactantes sobre o sinal também pôde ser avaliada e comparada com os

sensores sólidos. As análises foram feitas à temperatura ambiente utilizando uma *flat cell* para aquisição dos sinais de RPE.

Os primeiros estudos direcionados para a quantificação do NO utilizando a técnica de aprisionamento de *spins*, conforme reportados na literatura foram feitos em soluções de dimetilsulfóxido (DMSO) ou albumina bovina (BSA). Os estudos, de um modo geral estão focados na detecção e quantificação do NO em soluções congeladas, enquanto que o nosso sensor opera à temperatura ambiente. Vale ressaltar, que não foram encontradas referências quanto ao estudo do NO em soluções coloidais. No presente estudo, foi utilizado DMF como solvente, tanto para o Fe^{2+} -DETC puro (sem o gel e surfactante) quanto para o Fe^{2+} -DETC na solução coloidal SG (com ou sem surfactante).

9.4.1 Isotropia do sinal

As moléculas em solução diluída e não viscosa possuem um movimento rápido e randômico, por isso, todos os efeitos da anisotropia de *spin* são anulados, isto é, os espectros de amostras em solução são independentes da orientação magnética. Conseqüentemente os valores de *g* e da constante hiperfina serão uma média dos valores principais dos tensores *g* e hiperfino, respectivamente (g_{xx} , g_{yy} , g_{zz} e A_{xx} , A_{yy} , A_{zz}). Esses valores são conhecidos como *g* isotrópico. Geralmente estes espectros isotrópicos possuem linhas finas. Quando se abaixa a temperatura as moléculas já não possuem mais movimentos rápidos nem randômicos, por isso os espectros registrados terão a contribuição de todas as possíveis orientações.

Como os valores de *g* e os desdobramentos hiperfinos dependem da direção do campo magnético em relação aos eixos moleculares, um espectro com muito mais

informações será obtido. Ao invés de linhas finas encontradas nos espectros isotrópicos, teremos agora espectros com linhas mais largas.

A figura 34 mostra os sinais do complexo NO-Fe^{2+} -DETC de acordo com o ângulo de incidência do campo magnético sobre a amostra em algumas posições. O experimento foi feito colocando uma marcação no tubo de RPE contendo as amostras dos sensores sólidos. Após cada medida do sinal, a posição angular do tubo foi sendo mudada.

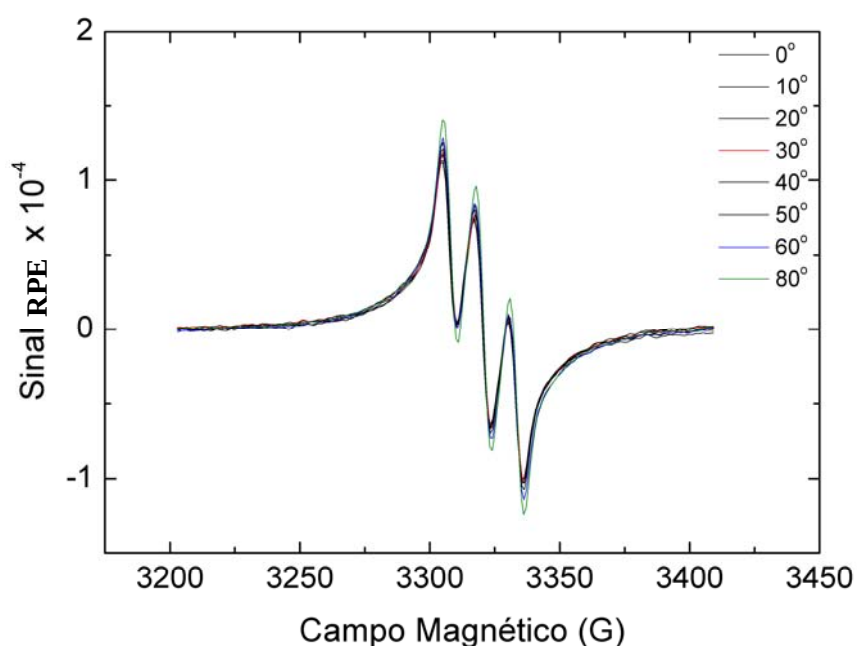


Figura 34. Sinais de RPE obtido a partir do sensor sólido em diferentes posições angulares alteradas sem retirar a amostra da cavidade após cada medida.

A primeira característica peculiar dos sinais de RPE do complexo NO-Fe^{2+} -DETC em meio líquido é a forma de linha dos espectros. Fazendo uma comparação entre as formas de linha dos sinais adquiridos, tanto com o sensor no estado sólido quanto líquido é possível fazer inferências sobre a mobilidade das espécies paramagnéticas contidas no interior dos sensores. O espectro em solução apresenta simetria definida entre os picos, enquanto que, aqueles adquiridos a partir das soluções congeladas, na maioria das vezes apresentam picos pouco simétricos. A comparação entre as formas de linha pode ser vista na figura 35.

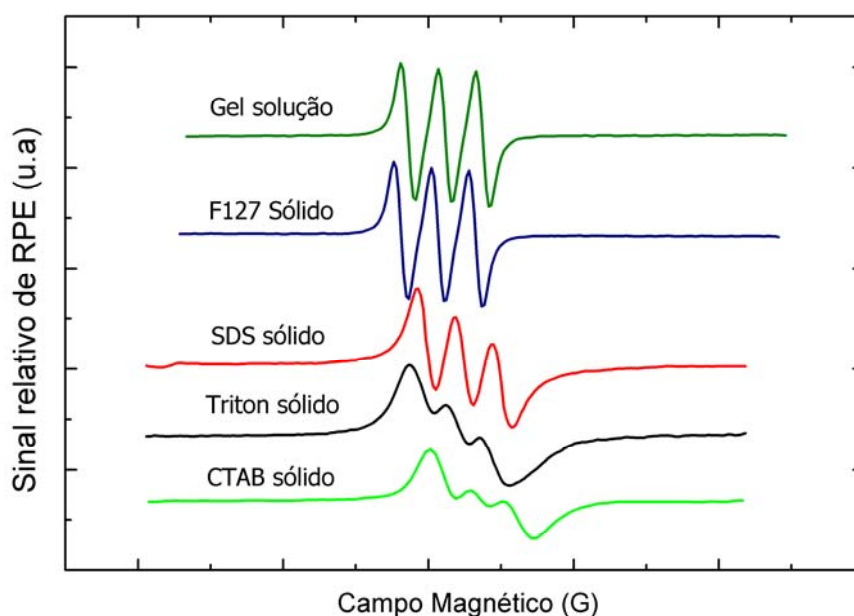


Figura 35. Comparação entre as formas de linha dos sinais de RPE na solução SG e nos sensores no estado sólido.

Um fato inusitado ocorreu, a forma de linha para o SDS e F127 são muito parecidas com a forma de linha do Gel no estado líquido, isso implica que o movimento das espécies paramagnéticas nos sensores preparados com esses surfactantes possuem um grau de mobilidade que se aproxima do gel líquido. O mesmo não pôde ser visto com o Triton X100 e CTAB. Essa mobilidade, talvez justifique o fato de que o tempo de aprisionamento do NO, nos sensores preparados com o SDS e F127 é superior àqueles encontrados para o Triton X100 e CTAB.

9.4.2 Intensidade dos sinais de RPE em função do número de radicais NO

O efeito dos surfactantes pode ser visto no gel no estado coloidal, semelhantemente ao que ocorreu no sensor sólido. As soluções foram preparadas e os sinais obtidos com auxílio de uma *flatt cell* de 150 μ L de capacidade. A primeira análise foi feita com a solução de Fe-DETC¹⁰ utilizando como solvente o DMF. Esta curva foi tomada como referência para compararmos os outros sinais, tanto no estado sólido como líquido, levando em conta que nesse caso temos o número máximo de radicais NO aprisionados. As concentrações de NO variaram de 0 a 2 mM. Em todos os ensaios a solução passou pelo processo de redução, tanto para liberação do NO a partir do NaNO₂ quanto para reduzir o ferro complexado a Fe²⁺-DETC. O redutor utilizado foi o ditionito de sódio (veja materiais e métodos).

As curvas de calibração foram plotadas através da intensidade do sinal de RPE (dupla integral do sinal) em função do número de radicais NO. Para as soluções contendo apenas Fe-DETC (sem a solução SG), o sinal não demonstrou nenhuma mudança significativa com a adição dos surfactantes (**dados não apresentados**). Sendo assim, foram enfatizadas apenas as soluções de Fe-DETC em DMF sem a presença dos surfactantes. Para as soluções utilizando o SG, duas situações foram avaliadas: com e sem o surfactante. A figura 36 mostra a intensidade dos sinais de RPE como função das espécies paramagnéticas (NO-Fe²⁺-DETC) para o Fe-DETC em solução DMF. A curva tem um comportamento linear no intervalo de concentração estudado (0 - 2 mM).

¹⁰ Levando em conta que poderá haver a formação de espécies diamagnéticas NO-Fe³⁺-DETC, tomamos o cuidado de usar, neste caso, o termo geral Fe-DETC.

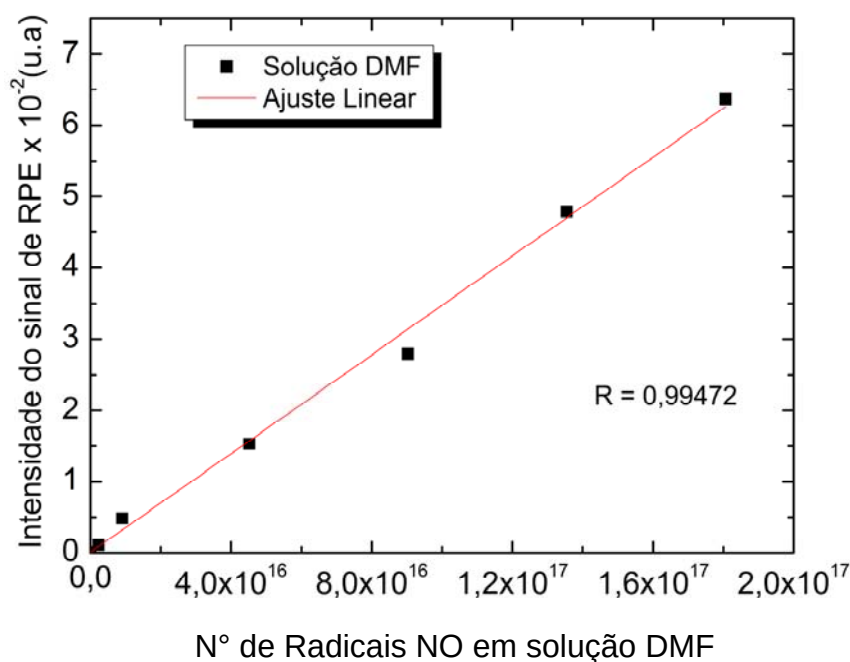


Figura 36. Curva de calibração do complexo NO-Fe²⁺-DETC em solução DMF.

As medidas foram feitas preparando-se uma solução para cada concentração de NO, sendo que para cada uma delas os ensaios foram feitos em triplicata. Através dos parâmetros do ajuste linear foi possível determinar a quantidade de espécies paramagnéticas contidas nas soluções em estudo. A equação da reta é dada por:

$$\text{Intensidade} = (4,5354 \cdot 10^{-5} \pm 9,6447 \cdot 10^{-4}) + (3,4669 \cdot 10^{-19} \pm 1,0311 \cdot 10^{-20}) \cdot [\text{NO}] \quad (1)$$

Semelhantemente, outra curva foi plotada para os sensores na solução SG sem a presença dos surfactantes e a intensidade dos sinais foi comparada com a do Fe-DETC em solução DMF. Na figura 37 temos a curva de calibração da intensidade dos sinais de RPE para o complexo NO-Fe²⁺-DETC em solução SG sem surfactante.

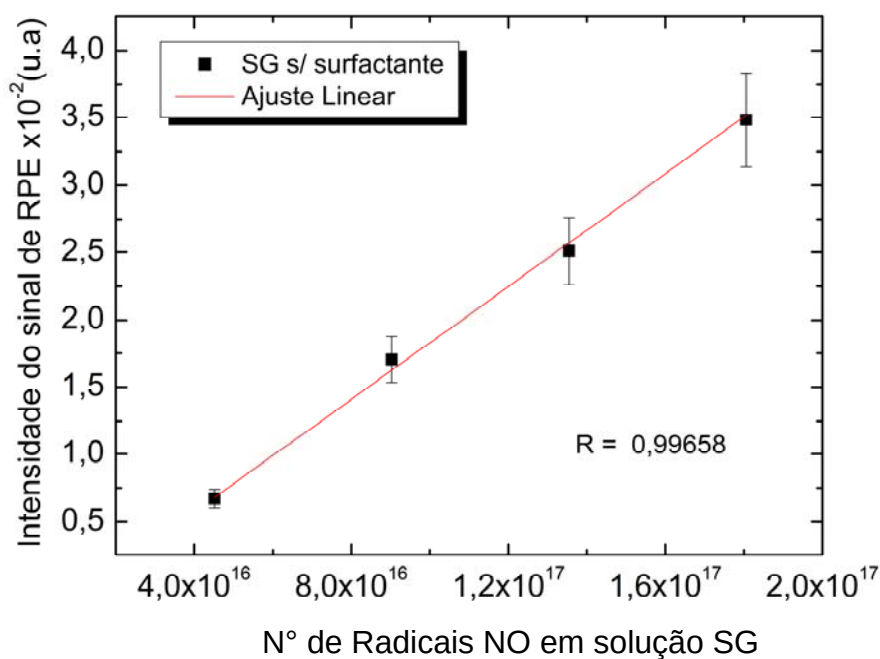


Figura 37. Curva de calibração do complexo NO-Fe²⁺-DETC em solução SG(Fe²⁺-DETC) sem surfactante.

Aparentemente, os surfactantes não interferem nos sinais, na ausência da solução coloidal SG, é o caso da solução contendo apenas Fe-DETC em DMF (figura 36), entretanto, nas soluções SG(Fe²⁺-DETC), os sinais são influenciados de alguma maneira. A figura 36 mostra que a presença do SG atrapalha o aprisionamento do NO, já que, o que difere a curva da figura 37 da figura 36 é apenas a presença da solução coloidal SG. A intensidade de sinal diminui com a presença da solução SG. Entretanto, com a adição de um surfactante a intensidade do sinal aumenta bem como a sensibilidade do sensor. A figura 38 sumariza a resposta dos sensores quanto a intensidade dos sinais em relação a cada um dos surfactantes bem como a quantidade de radicais NO complexados com o Fe²⁺-DETC. Os sinais foram obtidos utilizando as soluções em uma concentração de surfactante equivalente a 12 mM, onde houve maior resposta dos sensores como descrito anteriormente (figura 31).

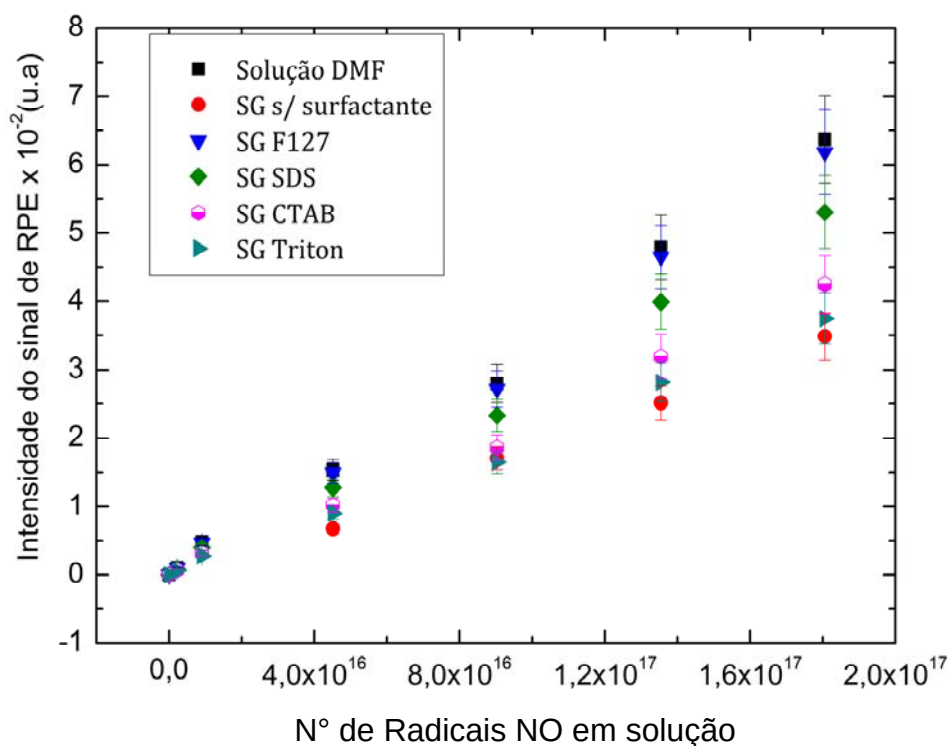


Figura 38. Comparação entre as intensidades dos sinais de RPE *versus* o número de radicais NO em solução DMF e SG, com e sem surfactante.

Observe que as curvas de calibração para cada caso, em SG ou simplesmente em solução DMF têm uma resposta linear ao ajuste de reta. Para a solução SG sem surfactante, a menor concentração detectada, mesmo em solução foi de 0,5 mM. O limite de detecção aumenta significativamente de acordo com o surfactante utilizado.

É possível identificar o sensor de maior resposta quando em contato com o NO, comparando-se os valores dos coeficientes angulares das curvas de calibração obtida através da intensidade dos sinais (figura 38). A tabela 16 mostra os valores dos coeficientes angulares de cada curva.

Tabela 16. Coeficiente angular das curvas de calibração adquiridas por dupla integração do sinal de RPE.

Solução	Solvente	Surfactante	Coeficiente angular
NO-Fe ²⁺ -DETC	DMF	Não	$3,47.10^{-19} \pm 1,03.10^{-20}$
SG(Fe ²⁺ -DETC)	DMF	Não	$2,10.10^{-19} \pm 7,09.10^{-21}$
SG(Fe ²⁺ -DETC)	DMF	F127	$3,37.10^{-19} \pm 1,00.10^{-20}$
SG(Fe ²⁺ -DETC)	DMF	SDS	$2,89.10^{-19} \pm 8,58.10^{-21}$
SG(Fe ²⁺ -DETC)	DMF	CTAB	$2,31.10^{-19} \pm 6,87.10^{-21}$
SG(Fe ²⁺ -DETC)	DMF	Triton	$2,14.10^{-19} \pm 6,05.10^{-21}$

A maior sensibilidade do sensor na solução SG foi obtida com o F127, que praticamente se iguala ao NO-Fe²⁺-DETC em solução DMF sem o gel (**dados não apresentados**). Isso quer dizer que, o uso do F127 faz com que a solução SG se comporte como se fosse a solução de DMF.

O limite de detecção utilizando a solução com o F127 foi de 0,1 µM (**dados não apresentados**) cerca de 100 vezes menor em comparação aos sensores sólidos produzidos anteriormente, onde a menor concentração de NO, medida através do sensor no estado sólido foi de 10 µM, utilizando o *Triton X100* como surfactante [90]. Para os sensores no estado sólido produzidos neste estudo, o limite de detecção foi de 2 µM utilizando o F127 como surfactante, o que caracteriza uma diminuição no limite de detecção de cerca de 5 vezes em detrimento ao melhor resultado encontrado no estado sólido conforme descrito anteriormente. Para o SDS, CTAB e Triton os limites de detecção foram, 6 µM, 8 µM e 10 µM respectivamente (**dados não apresentados**). Vale reforçar que não foi observado em nenhuma das amostras que não continham o agente redutor ditionito de sódio (Na₂S₂O₄) o sinal característico do complexo NO- Fe²⁺-DETC.

O limite de detecção diminui e a sensibilidade do sensor aumenta nas amostras contendo o F127 e SDS, tanto em meio líquido quanto no estado sólido. Entretanto, a

sensibilidade dos sensores diminui no estado sólido quando comparada com os resultados obtidos a partir das soluções SG no estado coloidal. Uma explicação possível seria que, algumas moléculas de DETC estariam se decompondo durante o processo de secagem, ou até o efeito do pH da solução poderia estar influenciando na estabilidade do DETC. Um estudo mais aguçado deverá ser feito para elucidar o comportamento do DETC durante a síntese das matrizes sólidas.

A coloração dos sensores indica o tipo de complexo formado. Como foi dito, os sensores preparados com F127 e SDS apresentaram cor **verde claro** semelhante aquela da solução coloidal, enquanto que Triton e CTAB apresentaram além dos traços de cor **verde claro**, parte **amarelo claro** e com alguns traços mais escuros (quase preto) indicando que além do complexo NO-Fe²⁺-DETC (verde) havia também o diamagnético NO-Fe³⁺-DETC (**amarelo claro**) e possivelmente uma quantidade de Fe³⁺-DETC (cor escura). A coloração verde intensifica à medida que a sensibilidade do sensor aumenta.

Outro fator importante no uso dos surfactantes foi a reprodutibilidade, o que não conseguimos com os sensores preparados sem o uso dos surfactantes. A reprodutibilidade foi testada medindo o sinal do NO a partir de uma série de capilares preparados na mesma concentração de surfactante e nas mesmas condições experimentais. Os sinais obtidos não mostraram desvios significativos quanto a amplitude e forma de linha.

Capítulo 10

Conclusão

10. Conclusão

O efeito de alguns surfactantes sobre o sinal RPE do complexo $\text{NO-Fe}^{2+}\text{-DETC}$ obtido a partir de um sensor sólido preparado pelo método SG foi apresentado. O processo de síntese do sensor foi otimizado com o uso dos surfactantes reduzindo a temperatura de secagem para $\sim 30^\circ$. Diferentes concentrações foram usadas e a concentração ideal que alia sinais intensos e boas propriedades mecânicas foi de 12 mM acima disso os sensores se tornam gelatinosos e aderentes a superfície dos capilares. A máxima intensidade do sinal de RPE foi obtida para um tempo de aprisionamento do NO de 10 min para todos os surfactantes, entretanto, em 2 min moléculas de NO já haviam sido complexadas. A sensibilidade do sensor no estado sólido aumenta cerca de *cinco* vezes com o uso do F127. O limite de detecção com o sensor no estado sólido foi de 2 μM com o F127. No meio coloidal o limite de detecção foi de 0,1 μM para o mesmo surfactante. O DETC pode estar sendo degradado durante o processo de síntese ou afetado pelo pH. Há uma semelhança quanto a forma de linha dos sinais EPR entre os sensores no estado sólido e no estado coloidal para o F127 e SDS. Os surfactantes de um modo geral aumentam a quantidade de NO aprisionado nos complexos de $\text{Fe}^{2+}\text{-DETC}$, aumentando a sensibilidade dos sensores. A intensidade do sinal de RPE pode ser aumentada utilizando surfactantes mistos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] NAGANO, T.; YOSHIMURA, T. Bioimaging of Nitric Oxide. **Chem. Rev.** v. 102, n. 4, pp. 1235-1269, 2002.
- [2] GALLY, J.A. et al. The NO hypothesis: Possible effects of a short-lived, rapidly diffusible signal in the development a function of the nervous system. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v. 87, pp. 3547-3551, 1990.
- [3] IMELIK, B.; VIDRINE, J.C. Catalyst Characterization: Physical Techniques for Solid Materials, Plenum Press, New York and London (1993).
- [4] BESOHN, M. An Introduction to Electron Paramagnetic Resonance, W.A. BENJAMIN, Inc. 1996.
- [5] 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, pp. 524-526, 1987.
- [6] NATHAN, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells **FASEB J.** v. 6, n. 12, pp. 3051-3064, 1992.
- [7] 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, pp. 11147-11151, 1993.
- [8] 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, pp. 1797-1804, 1992.
- [9] MANCHESTER, K.S. Chronic administration of nitroglycerin decreases cerebral infarct size. **Neurology.** v. 43, n. 2, pp. A365, 1993.

- [10] FLORA, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Rev. Ass. Med. Brasil** v. 46, n. 3, pp. 265-271, 2000.
- [11] GARTHWAITE, J.; BOULTON, C.L. **Nitric Oxide Signaling in the Central Nervous System Annu. Rev. Physiology.** v. 57, pp. 683-706, 1995.
- [12] HIBBS, J.B.; TAINTOR, R.R.; VAVRIN, Z. Microphage cytotoxicity: Role of L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. **Science** v. 235, pp. 473-476, 1987.
- [13] DRAPIER, J.C.; WEIZESBIN, J.; HIBBS, J.B. Interferon gamma and tumor necrosis factor induce the L-arginina cytotoxic effects or mechanism in murine macrophages. **European J. Immuno.** v.18, pp. 1587-1592, 1988.
- [14] BURNEY, S. et al. Amechanistic Analysis of Nitric Oxide-Induced Cellular Toxicity, **Nitric Oxide**, v. 1, n. 2, pp. 130-144, 1997.
- [15] IGNARRO, L.J. et al. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possess pharmacology and chemical properties identical to those of nitric radical. **Circulation Research.** v. 61, pp. 866-879, 1987.
- [16] IGNARRO, L.J. et al. Endothelium derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v. 84, pp. 9265-9269, 1987.
- [17] FURCHGOTT, R.F. Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite. In: _____ Vasodilatation: Vascular Smooth Muscle, Peptides, Autonomic Nerves, and Endothelium. VANHOUTTE, P.M.; ed. Raven Press, New York, NY. pp. 401-414, 1988.
- [18] MARLETTA, M. A. Nitric oxide synthase structure and mechanism, **J. Biological Chemistry**, v. 268, n. 17, pp. 12231-12234, 1993.
- [19] BREDT, D.S. et al. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P450 reductase. **Nature (London)**, v. 351, pp. 714-718, 1991.
- [20] STWEHR, D.J. et al. Activated murine macrophages secrete a metabolite of arginine with the bioactivity of endothelium-derived relaxing factor and the chemical reactivity of nitric oxide. **J. Exp. Med.**, v. 169, pp. 1011-1020, 1989.

- [21] WHITE, K. A.; MARLETTA, M.A., Nitric Oxide synthase is a cytochrome P-450 type hemoprotein, **Biochemistry**, v. 31, pp. 6627-6631, 1991.
- [22] FUKUTO, J.M. Chemistry of Nitric Oxide: **Biochemistry, Molecular Biology, and Therapeutic Implications**, Academic Press, Cap.1, pp. 1-13, 1995.
- [23] RAGSDALE, R.O. Reactions of nitrogen (II) oxide, In: **Developments in inorganic Nitrogen Chemistry** (C. B. Colburn, ed), v. 2 Elsevier, New York.
- [24] KEILIN, D.; HARTREE, E.F. Reactions of nitric oxide with hemoglobin and methaemoglobin. **Nature**, v. 139, pp. 548, 1937.
- [25] KON, H. Paramagnetic resonance study of nitric oxide hemoglobin. **J. Biol. Chem.** v. 243, pp. 4350-4357, 1968.
- [26] GIBSON, Q.H.; ROUGHTON, F.J.W. The kinetics and equilibrium of the reactions of nitric oxide with sheep hemoglobin. **J. Physiol.** v. 139, pp. 507-526, 1957.
- [27] IGNARRO, L. J. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** v. 30, pp. 535-540, 1990.
- [28] GALPIN, J. R. et al. The interaction of nitric oxide with soybean lipoxygenase-1, **Biochim. Biophys. Acta.** v. 536, n. 5, pp. 356-362, 1978.
- [29] MARLETTA, M. A. Mammalian Synthesis de nitrite, nitrate, nitric oxide, and N-nitrosating agents. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 1, n.5, pp. 249-257, 1988.
- [30] UENO, T. et al. In vivo nitric oxide transfer of a physiological NO carrier, dinitrosyl dithiolato iron complex, to a target complex. **Biochem. Pharm.** v. 63, n.1, pp. 485-493, 2002.
- [31] 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), pp. 309.
- [32] LEONE, A.M. et al. Visualization of Nitric Oxide Generated by Activated Murine Macrophages. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 221, n.1, pp. 37-41, 1996.

- [33] KIKUCHI, K. et al. Real time measurement of nitric oxide produced ex vivo by luminol-H₂O₂ chemiluminescence method. **J. Biol. Chem.** v. 268, pp. 23106-23110, 1993.
- [34] KOJIMA, H. et al. Real-time measurement of nitric oxide production in rat brain by the combination of luminol-H₂O₂ chemiluminescence and microdialysis. **Neurosci. Lett.** v. 233, pp.157-159, 1997.
- [35] MALINSKI, T.; MESAROS, S.; TROMBOULIAN, P. Nitric oxide measurement using electrochemical methods. **Methods Enzymol.** v. 268, pp. 58-69, 1996.
- [36] YOSHIMURA, T. et al. In vivo EPR detection and imaging of endogenous nitric oxide in lipopolysaccharide-treated mice. **Nat. Biotechnology.** v. 14, pp. 992-994, 1996.
- [37] MORDVINTCEV, P. et al. On-line detection of nitric oxide formation in liquid aqueous phase by electron paramagnetic resonance spectroscopy. **Anal. Biochem.** v.199, pp.142-146, 1991.
- [38] KOMAROV, A. et al. In vivo *spin trapping* of nitric oxide in mice. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 195, pp.1191-1198, 1993.
- [39] FUJII, S.; YOSHIMURA, T. A new trend in iron-dithiocarbamate complexes: as an endogenous NO *trapping* agent. **Cordination Chemistry Reviews.** v. 198, pp. 89-99, 2000.
- [40] HENRY, Y.; GUISSANI, A. Contribution of *spin-trapping* EPR techniques for the measurement of NO production in biological systems. **Analisis.** v. 28, n. 6, pp. 445-454, 2000.
- [41] VANIN, A.F.; Iron diethyldithiocarbamate as *spin trap* for nitric oxide detection. **Methods Enzimol.** v. 301, pp. 269-279, 1999.
- [42] VANIN, A.F.; MORDVINTCEV, P.I.; KLESCHYOV, A.L. Appearance of nitric oxide in animal tissues. **Stud. Biophys.** v.102, pp.135–143, 1984.
- [43] MORDVINTCEV, P. et al. On-line detection of nitric oxide formation in liquid aqueous phase by electron paramagnetic resonance spectroscopy. **Anal. Biochem.** v.199, pp.142–146, 1991.

- [44] OHNISHI, S. Measurement of NO using electron paramagnetic resonance. **Meth. Mol. Biol.**; v.100, pp.129-153, 1996.
- [45] VANIN, A.F.; HUISMAN, A.; FAASSEN, V.E. Iron dithiocarbamates as *spin* trap for nitric oxide: pitfalls and successes. **Meth. Enzymol.** v.359, pp.27-42, 2002.
- [46] BROWN, L.A.; KEY, B.J.; LOVICK, T.A. Bio-imaging of nitric oxide-producing neurones in slices of rat brain using 4,5-diaminofluorescein. **Journal of Neuroscience Methods.** v. 92, n.1-2, pp.101-110. 1999.
- [47] YOSHIMURA, T.; KOTAKE, Y. Spin trapping of nitric oxide with the iron-dithiocarbamate complex: chemistry and biology. **Antioxid. Redox Signal.** v. 5, pp. 639-647, 2004.
- [48] MACDONALD, C.; PHILIPS, W.; MOWER, H. An electron spin resonance study of some complexes of iron, nitric oxide and anionic ligands. **J. Am. Chem. Soc.** v. 87, pp. 3319-3326, 1965.
- [49] VANIN, A.F.; FAASSEN, E.V. Mononitrosyl-iron complexes with dithiocarbamate ligands: Physico-Chemical Properties. In:_____. Radicals for Life: The Various Forms of Nitric Oxide. Edited by: Anatoly F. Vanin and Ernst van Faassen. **Elsevier publication** (2007).
- [50] SHINOBU, L.; JONES, S.; JONES, M. Sodium N-methyl d-glucamine dithiocarbamate and cadmium intoxication. **Acta Pharm. Toxicol.** v. 54, pp. 189-194b, 1984.
- [51] WOLDMAN, Y. et al. *Spin* trapping of nitric oxide by nitronyl nitroxides: measurement of the activity of NO synthase from rat cerebellum. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 202, pp. 195-203, 1994.
- [52] VANIN, A.F. et al. Why iron-dithiocarbamates ensure detection of nitric oxide in cells and tissues, **Nitric Oxide: Biol. Chem.** v.15, pp. 295–311, 2006.
- [53] FUJII, S. et al. Reaction of nitric oxide with iron(III) complex of N-(dithiocarboxy) sarcosine: a new type of reductive nitrosylation involving iron as an intermediate, **J. Chem. Soc. Dalton Trans.** pp. 3310-3315, 2000.
- [54] POU, S. et al. Spin trapping of nitric oxide by ferro-chelates: kinetic and in-vivo pharmacokinetic studies. **Biochim. Biophys. Acta.** v.1427, pp. 216-226, 1999.

- [55] VANIN, A.F; HUISMAN, A.; STROES, E. Antioxidant capacity of mononitrosyl-iron-dithiocarbamate complexes: implications for NO trapping. **Free Rad. Biol. Med.** v.30, pp. 813-824, 2001.
- [56] VANIN, A.F et al. Redox properties of iron-dithiocarbamates and their nitrosyl derivatives: implications for their use as traps for nitric oxide in biological systems. **Biochim. Biophys. Acta.** v.1474, pp. 365-377, 2000.
- [57] GOODMAN, B.A.; RAYNOR, J.B.; SYMONS, M.C.R. Electron spin resonance of (N',N-diethyldithiocarbamate) nitrosyl iron. **J. Chem. Soc. (A).** pp. 2572-2575, 1969.
- [58] HOSHINO, M. et al. Studies on the reaction mechanism for reductive nitrosylation of ferrihemoproteins in bujer solutions, **J. Am. Chem. Soc.** v.118, pp. 5702-5707, 1995.
- [59] ZWEIER, J.L.; WANG, P.; KUPPUSAMY, P. Direct measurement of nitric oxide generation in the ischemic heart using electron paramagnetic resonance spectroscopy, **J. Biol. Chem.** v. 270, pp. 304-307, 1995.
- [60] FUJII, H.; KOSCIELNIAK, J.; BERLINER, L.J. Determination and characterization of nitric oxide generation in mice in vivo L-band EPR spectroscopy, **Magn. Res. Med.** v. 38, pp. 565-568, 1997.
- [61] MIKOYAN, V.D. et al. Complexes of Fe^{2+} with diethyldithiocarbamate or N-methyl-D-glucamine dithiocarbamate as traps of nitric oxide in animal tissues: comparative investigations, **Biochim. Biophys. Acta.** v. 1336, pp. 225-234, 1997.
- [62] KISTLER, S.S. Coherent expanded-aerogels. **J. Phys. Chem.** v. 36, pp. 52-64, 1932.
- [63] KLEIN, L. C. Sol-Gel Technology for Thin Films, Fibers, Performs, Electronics and Speciality Shapes, Noyes, Park Ridge, N. Y. (1988).
- [64] BRAUN, S. et al. in:_____. KAMELY, D., CHAKRABARTY, A., KORNGUTH, S.E. (Eds.), Kluwer Academic Publishers, Amsterdam, 1991, p. 205.
- [65] "Sol-Gel Science and Technology", edited by AEGERTER M. A., JAFELLICCI Jr., M., SOUZA, D. F.; ZANOTTO, E. D., World Scientific, Singapore (1989).
- [66] ALFAYA, A.A.S.; KUBOTA, L.T. A utilização de materiais obtidos pelo processo de sol-gel na construção de biossensores. **Química Nova**, v. 25, pp. 835-841, 2002.

- [67] BRINKER, C.J. Hydrolysis and condensation of silicates: effects on structure, **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 100, pp. 31-50, 1998.
- [68] KEEFER, K.D. in:_____. Silicon Based Polymer Science: A Comprehensive Resource. eds. ZEIGLER, J.M. and FEARON, F.W.G. **ACS Advances in Chemistry** Ser. n. 224, (**American Chemical Society**: Washington, DC, 1990) pp. 227-240.
- [69] BUCKLEY, A. M.; GREENBLATT, M. The sol-gel preparation of silica gels. **J. Chem. Educ.** v. 71, pp. 599-602, 1994.
- [70] MACKENZIE, J.D.; CHUNG, Y.J.; YAT, H.U. Rubbery ormosils and their applications. **Journal of Non-Crystalline Solids**. v. 147, pp. 271-279, 1992.
- [71] VIART, N.; NIZNANSKY, N.; REHSPRINGER, J.L. Structural Evolution of a Formamide Modified Sol-Spectroscopic Study. **Sol -Gel Sci. Technol.** v. 8, pp.183-187, 1997.
- [72] ORCEL, G. et al. Effect of formamide additive on the chemistry of silica sol-gels II. Gel structure, **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 105, pp. 223-231 G., 1988.
- [73] LENZA, R.F.S.; VASCONCELOS, W.L. Síntese de membranas cerâmicas via método sol-gel utilizando TEOS e N,N-dimetilformamida. **Química Nova**, v. 25, pp. 893-896, 2002.
- [74] LENZA, R.F.S.; VASCONCELOS, W. L. Preparation of silica by sol-gel meted using fomamide. **Materials Research**, v. 4, pp. 189-194, 2001.
- [75] LENZA, R.F.S.; VASCONCELOS, W.L. Structural evolution of silica sols modified with formamide. **Materials Research**, v. 4, pp. 175-179, 2001.
- [76] MOMENI, N. et al. CCD-camera based capillary chemiluminescent detection of retinol binding protein. **Anal. Chim. Acta.** v. 387, pp. 21-27, 1999.
- [77] GUN, J.; LEV, O. Sol-gel derived, ferrocenyl-modified silicate-graphite composite electrode: Wiring of glucose oxidase. **Anal. Chim. Acta.** v. 336, pp. 95-106, 1996.
- [78] ZHAO, M.; XIA, Y.; WHITESIDES, G.M. Fabrication of three-dimensional micro-structures: Microtransfer molding. **Adv. Mater.** v. 8, pp. 837, 1996.

- [79] LI, J.; TAN, S. N. Applications of amperometric silica sol-gel modified enzyme biosensors. **Anal. Lett.** v. 33, pp.1467-1477, 2000.
- [80] HIRATSUKA, R.S.; SANTILLI, C.V.; PULCINELLI, S.H. O processo sol-gel: Uma visão físico-química. **Química Nova**, v. 18, pp. 171-180, 1995.
- [81] BRINKER, C. J.; SCHERER, G. W. **Sol-Gel Science - The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing**, Academic Press, Inc.: San Diego, 1990.
- [82] ILER, R.K. **The chemistry of silica**. Wiley, New York, 1979.
- [83] SAKKA, S. in: Better ceramics through chemistry, eds. Brinker, C. J., CLARK, D.E., and ULRICH, D.R. (Elsevier-North-Holland, New York, 1984) p. 91.
- [84] HENCH, L. L.; WEST, J. K. The sol gel process. **Chem. Rev.** v. 90, pp. 33-72, 1990.
- [85] CORRIU, R.J.P.; LECLERCQ, D. Recent developments of molecular chemistry for sol-gel processes. **Angew. Chem., Int.** v. 35, pp.1420-1436, 1996.
- [86] GERRITSEN, M. et al. Biocompatibility evaluation of sol-gel coatings for subcutaneously implantable glucose sensors - doped sol-gel materials. **Biomaterials**, v. 21, p. 71, 2000.
- [87] SASAKI, D. Y.; LOY, D. A.; YAMANAKA, S. A. Immobilized lipid-bilayer materials in a silica matrix. US Patent 6048546 A, 2000.
- [88] BIAZZOTTO, J.C.; BORIN, J.F.; FARIA, R.M.; GRAEFF, C.F.O. Nitric oxide sensors obtained through the entrapment of iron complexes in sol-gel matrix, **Proceedings of the Spring MRS Meeting**. 2002.
- [89] JUNIOR, J.P.M.; BIAZZOTTO J.C.; BRUNELLO C.; GRAEFF, C.F.O. Solid state nitric oxide sensor prepared by sol-gel entrapment of iron-dithiocarbamate in a siloxane matrix. **J. Non-cryst. Solids**, v. 348, pp. 235-239, 2004.
- [90] JUNIOR, J.P.M. **Sensor sólido para o óxido nítrico utilizando a técnica sol-gel**. 2004. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Departamento de Física e Matemática, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2004.
- [91] SHAW, D.J. Introduction to colloid and surface chemistry; 4º ed. Oxford: Butterworth Heinemann, 1992.

- [92] MANIASSO, N. Ambientes Micelares em Química Analítica. **Química Nova**. v. 24, pp. 87-93, 2001.
- [93] FENDLER, J. H. Reactivity control in membrane mimetic systems. *Pure Appl. Chem.*, v. 54, pp. 1809-1817, 1982.
- [94] GODDARD, E.; POLTMER, D. Surfactant Interaction: Interfacial Aspects. **Journal of Colloid and Interface Science**. v. 256, pp. 228-235, 2002.
- [95] FOLMER, B.M.; KRONBERG, B. Effect of Surfactant-Polymer Association on the Stabilities of Foams and Thin Films: Sodium Dodecyl Sulfate and Poly(vinyl pyrrolidone). **Langmuir**. v. 16, pp. 5987-5992, 2000.
- [96] DAL-BÓ, A. et al. Ethyl(hydroxyethyl) cellulose–sodium dodecanoate interaction by surface tension and electrical conductivity techniques. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**. v. 256, pp. 171-180, 2005.
- [97] VALVERDE, G.; MACEDO, J.G.; CRUZ, D. Photoconductivity in Mesostructured Thin Films. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**. v. 26, pp. 605–608, 2003.
- [98] DINES, M. B. Intercalation in layered compounds. **J. Chem. Educ.** v. 51, pp. 221-223. 1974.
- [99] JAISWAL, A. et al. Layer-by-layer self-assembly of Prussian blue colloids. **J. Colloid Interface Sci.** v. 261, pp. 330-335, 2003.
- [100] DRESSELHAUS, M. S.; DRESSELHAUS, G. Intercalation Compounds of Graphite. **Advances in Physics**., v. 51, pp. 1-186, 2002.
- [101] FRYE, G.G. et al. Characterization of the surface area and porosity of sol-gel films using SAW devices, **Mat. Res. Soc. Symp. Proc.** v. 121, pp. 349-354, 1988.
- [102] ROTTMAN, C. et al. Surfactant-Induced Modification of Dopants Reactivity in Sol-Gel Matrixes. **J. Am. Chem. Soc.** v. 121, pp. 8533-8543, 1999.
- [103] GIBAUD, A. et al. Comparative Study by X-Ray Reflectivity of Mesoporous Silica Thin Films Templated by F127 and P123 Surfactants. **AZoNano – Online Journal of Nanotechnology**. v. 1, pp. 1-7, 2005.

- [104] JEREMY, L. England Stabilization and Release Effects of Pluronic F127 in Protein Drug Delivery. **Journal of Undergraduate Sciences Biochemistry**. v. 5, 2, pp. 17-24, 2007.
- [105] NARENDRA, B.; RANDOLPH, T.W.; CLELAND, J.L. Stability of Protein Formulations: Investigation of Surfactant Effects by a Novel EPR Spectroscopic Technique. **Pharmaceutical Research**. v. 12, pp. 2-11, 1994.
- [106] FAASSEN, E.V.; VANIN, A. NO trapping in biological systems with a functionalized zeolite network. **Analytical Methods: Nitric Oxide**. v. 15, pp. 233-240. 2006.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Trabalhos desenvolvidos além do projeto de doutorado

Durante a execução deste projeto foram desenvolvidas pesquisas que não faziam parte do projeto original. Tais pesquisas serão desenvolvidas em um projeto futuro de pós doutorado:

- I) Estudo dos sinais de RPE a partir de outra matriz a base sílica, entretanto solúvel em água. Essa matriz é o THEOS (tetra-etoxi-ortosilicato) e terá grande relevância no desenvolvimento de sensores pelo método sol gel, uma vez que, sendo solúvel em água, a quantidade de reagente, possivelmente tóxico poderá ser reduzida, aumentando o número de aplicações biológicas.

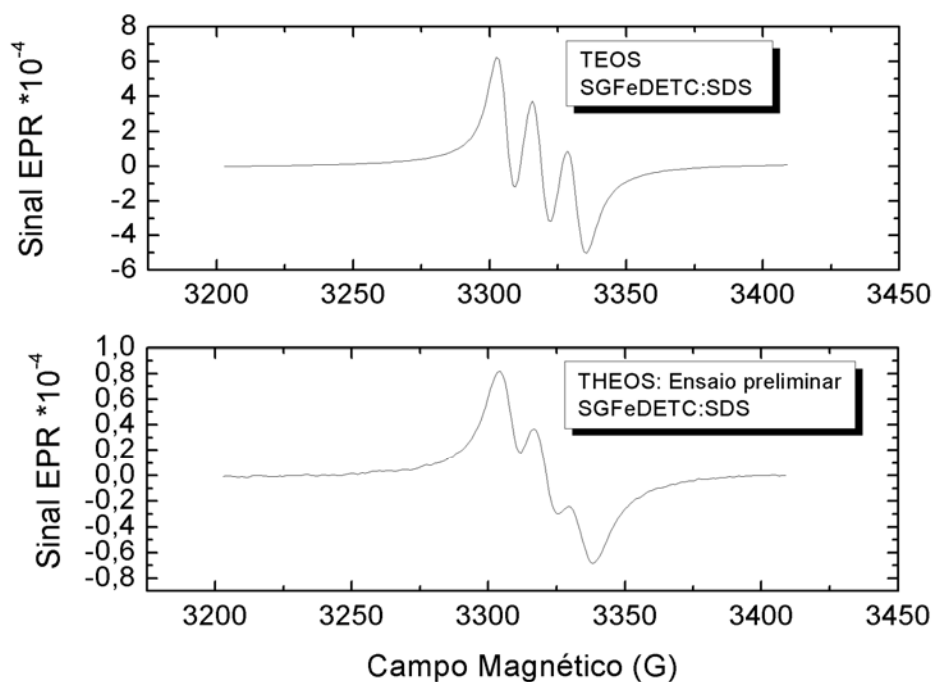


Figura A1. Ensaios preliminares para a síntese de sensores utilizando a matriz THEOS hidrossolúvel.

- II) Foi feito durante este tempo um estudo do sinal do NO em banda K. Os resultados são promissores, pois facilitará a determinação das espécies para magnéticas nas amostras analisadas devido a forma de linha do sinal.

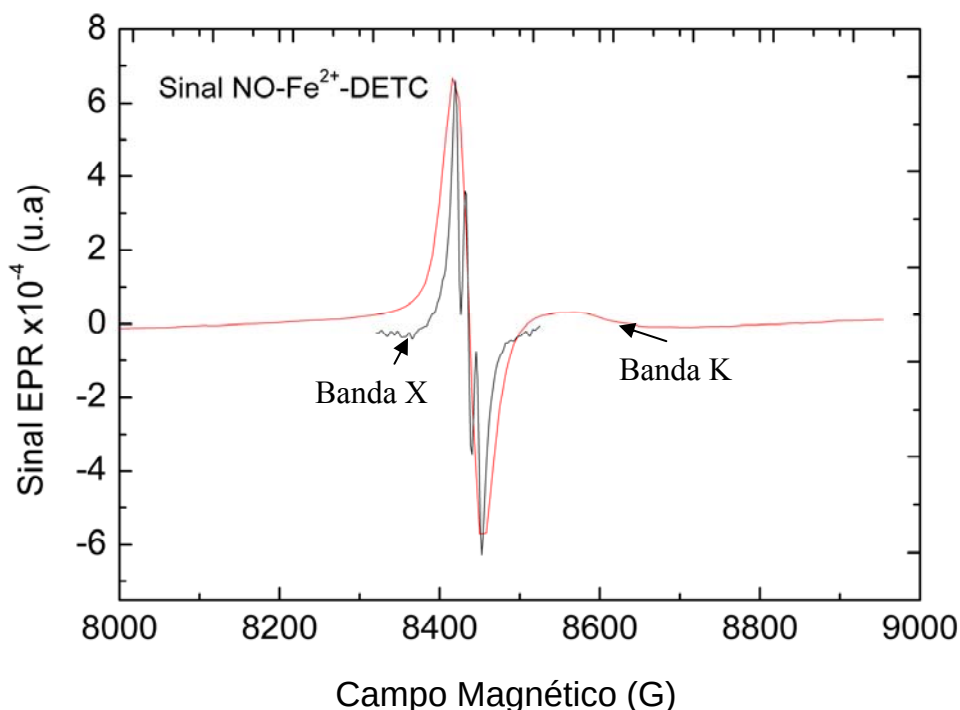


Figura A2. Comparação entre os sinais obtidos através de experimentos com equipamentos de RPE operando em banda X e EDMR banda K.

- III) Outro estudo que foi feito, está relacionado com o efeito do solvente no processo de síntese dos sensores. Os materiais obtidos pelo método sol gel passam por uma série de reações de hidrólise e condensação confluindo para o produto final, a saber, sólidos porosos com possibilidade de imobilização de compostos orgânicos e inorgânicos na rede. Durante a síntese, os solventes são evaporados, diante disso, foi feito alguns estudos sobre o papel de solventes voláteis como a acetona na confecção dos sensores. Os resultados apontam para materiais mais resistentes e com tempo de secagem

reduzido para ~ 8 h à temperatura de 30° . A amplitude do sinal de RPE aumenta atingindo um máximo com a adição de $20\mu\text{L}$ de acetona. Este estudo abre perspectivas para investigar a influência de outros solventes no processo de síntese dos sensores.

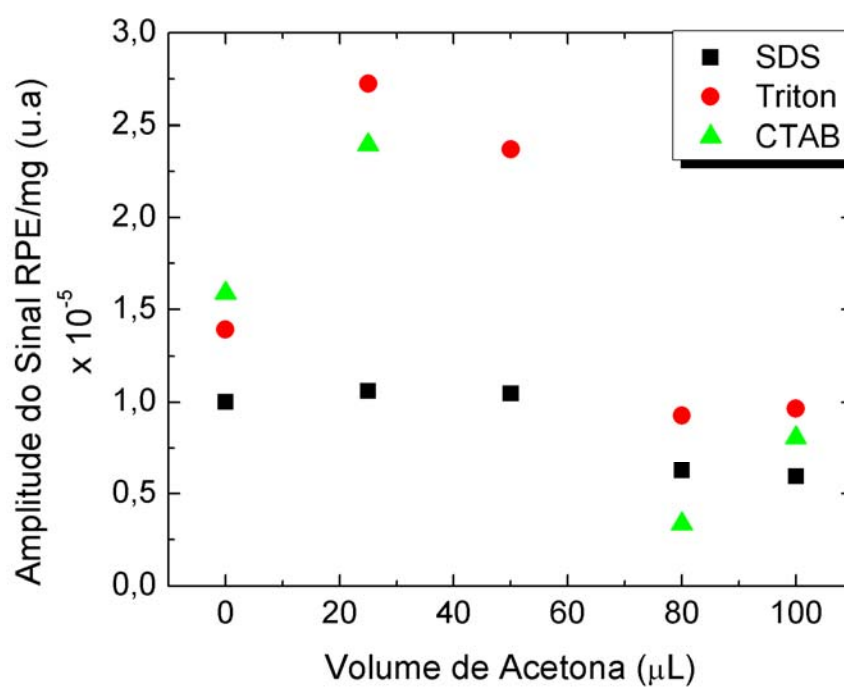


Figura A3. Amplitude do sinal de RPE para os diferentes tipos de surfactantes na presença de alíquotas de acetona.

APÊNDICE B – Participação em eventos e publicações

Durante o período do doutorado participei de dois congressos internacionais da SBPmat com apresentação oral, dos principais resultados. Além disso, foi publicado um artigo em periódico e outro está sendo redigido.

1. **JUNIOR, J.P.M.**; BIAZOTTO J.C.; BRUNELLO C.; GRAEFF, C.F.O. Solid state nitric oxide sensor prepared by sol-gel entrapment of iron-dithiocarbamate in a siloxane matrix. **J. Non-cryst. Solids**, v. 348, pp. 235–239, 2004.
2. **JUNIOR, J.P.M.**; BRUNELLO C.; GRAEFF, C.F.O. Surfactants effects on the solid nitric oxide sensor prepared by sol gel process.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)