

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO” – UNESP

Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais – POSMAT

Mayler Martins

SENSORES SÓLIDOS PARA DETECÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

BASEADOS EM CUCURBIT[6]URIL E EM

SILOXANO-POLI(OXIPROPILENO)

BAURU

2011

Mayler Martins

**SENSORES SÓLIDOS PARA DETECÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO
BASEADOS EM CUCURBIT[6]URIL E EM SILOXANO-
POLI(OXIPROPILENO)**

Tese apresentada como requisito para obtenção do título de Doutor à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais, área de concentração Materiais Poliméricos, Híbridos, e Nano-Estruturados, sob a orientação do Prof. Dr. Carlos Frederico de Oliveira Graeff.

Bauru/SP

2011

Martins, Mayler.

Sensores sólidos para detecção de óxido nítrico baseados em cucurbit[6]uril e em siloxano-poli(oxipropileno) / Mayler Martins, 2011. 103 f. : il.

Orientador: Carlos Frederico de Oliveira Graeff

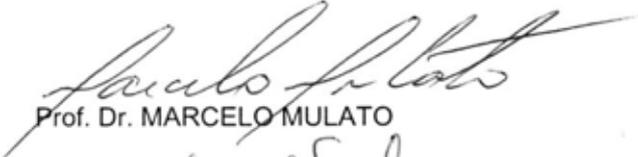
Tese (Doutorado)-Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências, Bauru, 2011

1. Óxido Nítrico. 2. Sensor. 3. Cururbi[6]uril. 4. siloxano-poli(oxipropileno). I. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências. II. Título.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE MAYLER MARTINS, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS, DO(A) FACULDADE DE CIÊNCIAS DE BAURU.

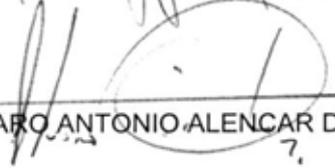
Aos 30 dias do mês de junho do ano de 2011, às 14:00 horas, no(a) Anfiteatro da Pós-graduação / FC, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. CARLOS FREDERICO DE OLIVEIRA GRAEFF do(a) Departamento de Física / Faculdade de Ciências de Bauru, Prof. Dr. MARCELO MULATO do(a) Departamento de Física / Universidade de São Paulo, Prof. Dr. JOSE HUMBERTO DIAS DA SILVA do(a) Departamento de Física / Faculdade de Ciências de Bauru, Prof. Dr. CARLOS JOSÉ LEOPOLDO CONSTANTINO do(a) Departamento de Física Química e Biologia / Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente, Prof. Dr. ALVARO ANTONIO ALENCAR DE QUEIROZ do(a) Departamento de Física e Química / Universidade Federal de Itajubá, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da TESE DE DOUTORADO de MAYLER MARTINS, intitulado "SENSORES SÓLIDOS PARA DETECÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO". Após a exposição, o discente foi argüido oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: APROVADO . Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.


Prof. Dr. CARLOS FREDERICO DE OLIVEIRA GRAEFF


Prof. Dr. MARCELO MULATO


Prof. Dr. JOSE HUMBERTO DIAS DA SILVA


Prof. Dr. CARLOS JOSÉ LEOPOLDO CONSTANTINO


Prof. Dr. ALVARO ANTONIO ALENCAR DE QUEIROZ

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Carlos F. O. Graeff

À FC/UNESP e a FFCLRP/USP

Ao grupo do Prof. Dr. Grégoire Jean-François Demets

Ao grupo da Prof. Dr^a Leila A. Chiavacci da FCFar/UNESP

Ao grupo do Prof. Dr. Aldo Job da FCT/UNESP

Ao grupo do Prof. Dr. Paulo N. L. Filho da FC/UNESP

Ao Prof. Eduardo Ribeiro Azevedo do IFSC

Aos membros da Banca

Aos meus colegas e professores da POSMAT e da FFCLRP

À FAPESP e CNPQ

Às demais pessoas que contribuíram para este trabalho

MARTINS, M. **Sensores sólidos para detecção de óxido nítrico baseados em cucurbit[6]uril e em siloxano-poli(oxipropileno)**. 2011. 103f. Tese (Doutor em Ciência e Tecnologia de Materiais) - UNESP, Faculdade de Ciências, Bauru, 2011.

RESUMO

O óxido nítrico (NO) é um radical livre conhecido por desempenhar importantes funções fisiológicas, sendo associado, entre outros processos, ao fator de relaxamento da musculatura lisa vascular, importante para a regulação da pressão sanguínea. Para a determinação dos mecanismos através do qual o NO influencia e controla os processos fisiológicos, é de fundamental importância o desenvolvimento de sensores que possibilitem a sua determinação quantitativa.

Neste trabalho, foram obtidos e caracterizados sensores sólidos para NO através de duas maneiras: 1 - Encapsulamento do complexo ferro(II)-dietilditiocarbamato (FeDETC) na matriz híbrida de siloxano-poli(oxipropileno) (PPO) utilizando um método sol-gel modificado. 2 – Formação de um complexo de inclusão do FeDETC com cucurbit[*n*]urilas.

A detecção de NO, nesses sensores, se dá através de Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica, baseada na formação de um complexo paramagnético estável ferro(II)-DETC-NO, o qual exibe três linhas características no espectro de RPE ($g_{ef} = 2,04$).

Os sensores apresentaram bom desempenho. O sensor baseado em PPO, apresentou sensibilidade de $2,5 \times 10^8 \mu\text{M}^{-1}$, com faixa de trabalho entre 100 nM e 1 mM. O sensor CB[6]/FeDETC apresentou o limite de detecção de 2,9 nM, limite de quantificação de 16 nM. A faixa de trabalho desse sensor é de $1,37 \times 10^{15}$ spins/g a 1×10^{19} spins/g. Esses resultados são comparáveis aos melhores sensores divulgados na literatura.

Palavras-chave: Óxido nítrico, sensor, ferro(II)-dietilditiocarbamato, ressonância paramagnética eletrônica.

MARTINS, M. **Solid state oxide nitric sensors based in cucurbit[6]uril and in siloxane-poly(oxypropylene)**. 2011. 103f. Thesis (Doctor of Materials Science and Technology) - UNESP, Faculdade de Ciências, Bauru, 2011.

ABSTRACT

The nitrogen monoxide (NO) is a free radical known to play important physiological roles, being associated with, among other processes, the relaxation factor of vascular smooth muscles, important for the regulation of blood pressure. To determine the mechanisms by which NO influences and controls the physiological processes is of fundamental importance the development of sensors that allow the quantitative determination of NO.

In this work, solid-state sensors for NO were obtained by two ways: 1 - Encapsulation of the complex iron (II)-diethyldithiocarbamate (FeDETC) in the hybrid matrix of siloxane-poly (oxipropilene) (PPO) using a modified sol-gel method . 2 - Formation of an inclusion complex with the FeDETC cucurbit[*n*]uril.

The detection of NO in these sensors, is performed by Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy, based on the formation of a stable paramagnetic complex iron(II)-DETC-NO, which displays three characteristic lines in the EPR spectrum ($g_{ef} = 2.04$) .

The sensors showed good performance. The PPO based sensor showed a sensitivity of $2.5 \times 10^8 \mu\text{M}^{-1}$, a working range between 100 nM and 1 mM. The sensor CB[6]/FeDETC showed the detection limit of 2.9 nM, quantification limit of 16 nM. The working range of this sensor is between 1.37×10^{15} spins/g and 1×10^{19} spins/g. These results are comparable to the best sensors reported in the literature.

Key-words: Nitric oxide, sensor, iron(II)-diethyldithiocarbamate, electronic paramagnetic resonance.

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	10
2 – A MOLÉCULA DE ÓXIDO NÍTRICO: ASPECTOS RELEVANTES	12
2.1 – MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DE NO.....	15
3 - ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA.....	19
3.1 - INTERAÇÃO DO SPIN ELETRÔNICO COM SPINS NUCLEARES: INTERAÇÕES HIPERFINAS	24
3.2 - ANISOTROPIA DO FATOR G.	26
3.3 – INTENSIDADE E FORMA DA LINHA.....	30
3.4 - FORMA DA LINHA.....	31
3.5 - A MODULAÇÃO DE CAMPO.....	32
3.6 - MEDIDA DA QUANTIDADE DE SÍTIOS PARAMAGNÉTICOS.....	32
3.7 - SIMULAÇÃO DE ESPECTRO RPE.....	33
4 – MATRIZES UTILIZADAS NA CONSTRUÇÃO DO SENSORES.	34
4.1 - CUCURBIT[N]URIL.....	34
4.2 - SILOXANO-POLI(OXIPROPILENO).....	38
5 - OBJETIVOS.....	41
6 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
6.1 - O ESPECTRÔMETRO RPE	42
6.2 – ESPECTRÔMETRO RPE UTILIZADO NESTE TRABALHO.....	43
6.3 – PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO AQUOSA DE NO E DA ATMOSFERA CONTENDO NO	44
6.4 – APRISIONAMENTO DO NO NOS SENSORES.....	45
6.5 – PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE FeDETC	45
6.6 – OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE MEDIDA	46
6.7 – PREPARAÇÃO DOS SENSORES BASEADOS EM PPO	47
6.8 – SENSORES BASEADOS EM CB[6]	48
6.8.1 – Preparação dos sensores baseados em CB[6]	48
6.8.2 - Investigação da interação do NO com o CB[6].....	49
6.9 – CÁLCULO DO NÚMERO DE SÍTIOS PARAMAGNÉTICOS DOS SENSORES.	51
6.10 – DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DOS SENSORES.	52
7 – RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	54
7.1 – SIMULAÇÃO DOS ESPECTROS RPE	54

7.2 – OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE MEDIDA.....	57
7.3 – EFEITO DA QUANTIDADE DE SENSOR CB[6]/FeDETC.....	62
7.4 – INVESTIGAÇÃO DA INTERAÇÃO DO NO COM O CB[N].....	63
7.5 – CARACTERIZAÇÃO DO SENSOR CB[6]/FeDETC.	65
7.5.1 – <i>Estudo do complexo CB[6]FeDETC e CB[6]/NO por RMN.....</i>	65
7.5.2 – <i>Estudo do complexo CB[6]FeDETC e CB[6]/NO por FTIR.....</i>	69
7.5.3 – <i>Caracterização térmica do sensor.....</i>	73
7.5.4 – <i>Estequiometria do complexo CB[6]/FeDETC.....</i>	75
7.5.5 – <i>Modelagem molecular das moléculas de CB[6] e FeDETC.....</i>	76
7.5.6 – <i>Estrutura molecular do sensor CB[6]/FeDETC.....</i>	78
8 – ANÁLISE DA PERFORMANCE DOS SENSORES.....	81
8.1 - SENSORES BASEADOS EM PPO400/FeDETC.....	81
8.2 - SENSORES BASEADOS EM CB[6]/FeDETC.....	85
8.2.1 - <i>Estabilidade do sinal do sensor CB[6]/FeDETC.....</i>	85
8.2.2 – <i>Reposta do sensor em função da concentração do NO em solução.....</i>	87
9 – CONCLUSÕES.....	92
10 – REFERÊNCIAS.....	94
APÊNDICE.....	102

1 – INTRODUÇÃO

Dispositivos para o controle e a automação de processos analíticos no laboratório clínico ou na monitoração de cirurgias de grande porte são considerados atualmente uma área estratégica da biotecnologia. Neste sentido, o desenvolvimento de novos materiais para a utilização no desenvolvimento de dispositivos sensores tem recebido importantes investimentos dos órgãos governamentais, bem como de empresas químico-farmacêuticas dos países desenvolvidos. A busca por métodos para detecção de óxido nítrico (NO) com alta sensibilidade se intensificou após a associação do NO à relaxamento da musculatura lisa vascular derivada do endotélio, de grande importância para a atividade fisiológica.

O grupo de pesquisa coordenado pelo Prof. Carlos F. de O. Graeff há alguns anos se dedica à quantificação do radical livre NO através da técnica de espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica. Este grupo de pesquisa desenvolveu o conceito de sensor sólido para NO baseado na oclusão de um agente complexante de NO em uma matriz sólida. O agente complexante comumente utilizado é o complexo ferro(II)-dietilditiocarbamato ($\text{Fe}^{2+}(\text{DETC})_2$) [1].

O desafio do grupo é a obtenção de um sensor sólido cujas principais características sejam alta sensibilidade ao NO (na ordem de nM), alta estabilidade, especificidade e reprodutibilidade. A chave para obtenção de tais propriedades é a matriz na qual é aprisionado o complexo $\text{Fe}^{2+}(\text{DETC})_2$. A matriz deve garantir a estabilidade do complexo de ferro e permitir a rápida difusão do NO através de si. É desejável que a matriz apresente ainda boa estabilidade térmica, biocompatibilidade e não citotoxicidade, o que permitiria a utilização do sensor em medidas *in vivo*.

Dentre os principais sensores sólidos desenvolvidos no grupo se destacam um sensor baseado em matriz de tetraortossilicato (TEOS) e um baseado em matriz de látex. Ambos

utilizam a técnica de espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) para sua caracterização e detecção do NO.

O primeiro foi obtido através do aprisionamento do complexo $\text{Fe}^{2+}(\text{DETC})_2$ em uma matriz sólida de TEOS pelo processo sol-gel [1,2]. Diferentes parâmetros de síntese foram alterados e os seus efeitos sobre as propriedades do sensor foram analisados. O sensor apresentou alta estabilidade (14 dias), e possui limite de detecção de 0,01mM.

O segundo sensor foi construído com base em uma matriz sólida de látex contendo $\text{Fe}^{+2}(\text{DETC})_2$ [3]. O látex é um material promissor para aplicações biomédicas, pois apresenta excelentes propriedades de biocompatibilidade e de estímulo natural a angiogênese. O sensor apresentou uma alta estabilidade (40 dias), é reutilizável e é capaz de detectar NO em concentrações mínimas de 0,1 mM. Este sensor ainda apresentou excelentes propriedades mecânicas, como alta tenacidade. Apesar da alta estabilidade desses dispositivos, considerando que a concentração no NO endógeno varia entre 10 nM e 10 μM , dependendo do tecido onde é produzido, é necessário trabalhar para aumentar o limite de detecção e faixa de trabalho dos dispositivos.[2]

Embora o sensor baseado em TEOS tenha se mostrado eficiente quanto à detecção do NO, ele não demonstrou ser passível de reutilização devido à baixa resistência mecânica da sílica, que se quebra facilmente após a sua imersão na solução aquosa de NO. Desta forma, para tentar melhorar as propriedades mecânicas desta matriz, além de melhorar a sensibilidade e limite de detecção do dispositivo, desenvolvemos um sensor baseado no material híbrido orgânico-inorgânico dissiloxano-poli(oxipropileno) (PPO).

Na busca por novas matrizes, que permitam melhor difusão de NO e estabilidade do agente complexante, desenvolvemos também um sensor baseado no complexo de inclusão formado pelas moléculas de $\text{Fe}^{+2}(\text{DETC})_2$ e cucurbit[*n*]urilas CB[*n*].

2 – A MOLÉCULA DE ÓXIDO NÍTRICO: ASPECTOS RELEVANTES

O monóxido de nitrogênio, ou óxido nítrico (NO), desempenha um papel fundamental na patologia e fisiologia humana e de outros sistemas biológicos. Por este motivo, nos últimos anos, um grande número de pesquisadores direcionaram seus esforços na intenção de conhecer o mecanismo de produção, armazenamento e distribuição do NO e encontrar novos processos fisiológicos com participação do NO [3-7].

A grande relevância do NO para mecanismos fisiológicos fez com que esta molécula fosse eleita a "molécula do ano", em 1992.[8] O NO é um importante agente sinalizador em diversos processos fisiológicos, como por exemplo na sinalização do relaxamento da musculatura lisa vascular, dilatando os vasos sanguíneos. Esta capacidade explica a ação da nitroglicerina no alívio da angina e insuficiência cardíaca, já que esta substância é doadora de NO.

O NO possui um papel patológico e fisiológico no sistema nervoso.[8,9] Os neurônios produzem NO, que age como um neurotransmissor e como uma molécula de sinalização. O cérebro é o órgão que possui a maior concentração de NO, no organismo. Como o NO é produzido extensivamente no sistema nervoso, falhas em seu metabolismo podem levar ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, tais como o mal de Alzheimer e mal de Parkinson.

O NO é uma molécula neutra de baixo peso molecular, solúvel em ambientes aquosos ou hidrofóbicos.[9] Estas características fazem com que o NO tenha coeficiente de difusão elevado, de $3300 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$. Para efeito de comparação, o coeficiente de difusão do O_2 é de $2800 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$. Como a espessura da parede celular é da ordem de 50-300 μm , em um segundo, o NO pode se difundir por 30 vezes a espessura da parede, o que o permite alcançar os vasos sanguíneos, onde ele é rapidamente consumido.

O NO está envolvido com comportamentos como o aprendizado, a capacidade de concentração, percepção, agressão, ansiedade e depressão. Acredita-se ainda que o transtorno obsessivo-compulsivo também seja influenciado pelo NO.[10] As células envolvidas no processo de cicatrização de feridas também produzem grande quantidade de NO, já que este processo envolve a resposta a um processo inflamatório.[11] Neste caso, o NO tem o papel de disparar o processo de cicatrização. A redução da bioatividade do NO, leva a disfunção endotelial e obstrução de pequenas artérias, sendo um precursor da aterosclerose.[12] A hipertensão arterial causada pela falha no metabolismo do NO eleva o risco de óbito por doenças cardiovasculares.

Diante do exposto, é de fundamental importância, para as pesquisas a cerca da bioquímica do NO, o desenvolvimento de dispositivos que possibilitem a detecção quantitativa do NO, com alta sensibilidade, seletividade e baixo limite de quantificação. Estes dispositivos possuem grande potencial não apenas para uso em laboratórios de pesquisa, mas também em laboratórios clínicos, auxiliando em diagnósticos, tendo em vista o grande número de enfermidades causadas pela falta ou excesso de NO no organismo.

A concentração fisiológica do NO sofre grande variação, dependendo do tecido, cobrindo 6 ordens de grandeza [13]. Em um mesmo tecido, os valores de concentração de NO divulgados na literatura podem sofrer grandes variações. Em artérias, são relatados valores entre 2,5 nM e 390 nM. A Tabela 2.1 mostra alguns valores típicos da concentração de NO em alguns tecidos.

A solubilidade em água do NO é de 1,9 mM, a 25°C, sendo que a sua solubilidade aumenta em solventes apolares.[14] O NO é uma molécula neutra que contém um elétron desemparelhado na camada de valência, o que lhe confere um caráter radicalar, com alta reatividade e baixo tempo de meia vida (5 a 10 s *in vitro*). O NO reage facilmente com o O₂,

formando NO_2 . O NO pode se complexar com metais de transição, como o ferro, através da delocalização de seu elétron de valência desemparelhado para os orbitais d do metal.

Outra aplicação importante de sensores para NO é no controle da qualidade do ar, já que o NO também se apresenta como um poluente atmosférico, sendo emitido por veículos a combustão interna. Desta forma, o desenvolvimento de sensores para NO poderá contribuir para a melhoria da qualidade de vida e saúde pública no Brasil e no mundo.

Tabela 2.1: Concentrações típica de NO em tecidos, obtida através de ensaios *in vitro*. [13]

Tecido	Concentração de NO
Traquéia suína	2 pM
Artéria femural de cachorro	2,5 nM
Artéria mamária humana	20 nM
Artéria coronária de rato	295 nM
Tecido cardíaco de rato	650 nM
Córtex cerebral de rato	1,0 μM
Tecido cardíaco de coelho	1,2 μM
Cerebelo de rato	1,8 μM

2.1 – Métodos de quantificação de NO.

O baixo tempo de meia vida e baixas concentrações fisiológicas impõem um grande desafio na detecção de quantificação de NO in vivo. Diversas técnicas tem sido utilizadas para detecção e quantificação de NO. As principais delas são o método eletroquímico, método de Griess e ressonância paramagnética eletrônica.

A técnica eletroquímica mais utilizada para a construção de sensores para NO é a amperometria.[15] Essa técnica envolve a aplicação de um potencial fixo num eletrodo de trabalho em relação a um de referência, e monitoramento da corrente produzida pela oxidação ou redução do NO na superfície do eletrodo. Como o potencial de redução do oxigênio é similar ao do NO, um sensor eletroquímico para NO normalmente emprega reação de redução do NO. Este método tem mínima interferência de espécies como nitrito, nitrato, dopamina, ascorbato e l-arginina. Devido à possibilidade de construir eletrodos de pequenas dimensões, este método é pouco invasivo. Esta técnica tem um baixo tempo de resposta, de alguns segundos, e alta sensibilidade. O limite de detecção desta técnica é tipicamente menor que 0,5 nM, sendo que já foi alcançado o limite de 50 pM [15].

O método de Griess é um método enzimático-colorimétrico que consiste na oxidação do NO e posterior redução do nitrato a nitrito, utilizando-se a enzima nitrato redutase [16,17]. O nitrito é então tratado com os reagentes de Griess, obtendo-se um composto de coloração rosada. Este composto é então quantificado por espectrofotometria, em 540 nm. A principal desvantagem deste método é a interferência do nitrito previamente existente na amostra. O método de Griess é o mais utilizado para quantificação de NO. Este método é disponibilizado comercialmente, com limite de detecção que alcança 1 μ M [17-19].

Um método não citotóxico de alta sensibilidade, seletividade e mínima invasão para detecção de NO em células e tecidos, muito utilizado no meio acadêmico, é através do aprisionamento do NO utilizando agentes complexantes e detecção através de espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) [1-4]. A RPE é uma técnica específica para detecção de caracterização de moléculas que possuem um elétron desemparelhado. O NO é um radical livre, com um elétron desemparelhado no orbital $2p\pi^*$ [20].

Ferrocplxos derivados do ditiocarbamato (DTC), como o ferro-N-metil-glucamina ditiocarbamato (FeMGD), ferro-dietilditiocarbamato (FeDETC) e ferro-N-(ditiocarboxi)sarcosina (FeDTCS), estão entre os agentes complexantes de NO mais utilizados, devido à alta afinidade deste gás por complexos de ferro [21-24]. A Figura 2.2 mostra a fórmula estrutural desses ferrocplxos. Dentre estes ferrocplxos, o FeDETC é especialmente interessante, devido ao seu custo reduzido e pelo fato de ser facilmente encontrado no mercado. Apesar de não ser hidrosolúvel, como os demais carbamatos, isto não é um problema relevante quando se trata de sensores sólidos.

A detecção de NO através de espectroscopia RPE utilizando os ferrocplxos derivados de DTC é baseada na formação de um complexo estável ferro(II)-DETC-NO, que possuem longo tempo de meia vida. O complexo exibe três linhas características no espectro de RPE ($g_{ef} = 2,04$) à temperatura ambiente e um espectro com simetria axial ($g_{\perp} = 2,037$, $g_{\parallel} = 2,015$) à baixa temperatura [25]. Espectros típicos são mostrados na Figura 2.2.

A utilização desses ferrocplxos como agentes complexantes de NO, geralmente é feita na forma de suspensão aquosa, no caso do FeDETC, insolúvel, ou na forma de solução aquosa, do caso do FeDTCS e FeMGD, solúveis. Porém, a medida RPE em solução aquosa requer o uso de uma *flatcell*, que é um tubo de quartzo achatado na parte central, para evitar a absorção excessiva das microondas pela água.

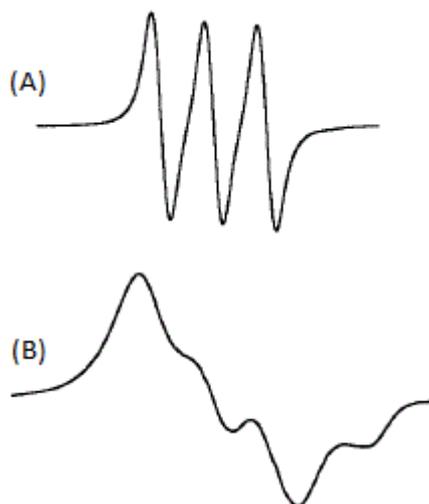
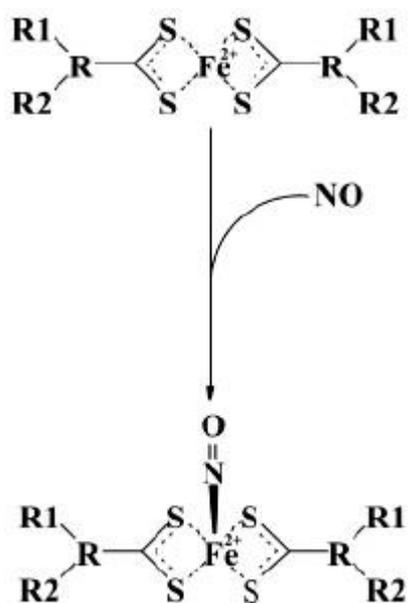


Figura 2.1: Sinal RPE típico de soluções de complexos de carbamatos de ferro complexados com NO, a temperatura ambiente (A) e a 77 K (B). [21]

Inconvenientes desta metodologia, como a baixa solubilidade do complexo $\text{Fe}(\text{DETC})_2$ em meios aquosos, a relativa instabilidade do complexo ferronitrosil NO em solução (estabilidade por até dez horas em pH neutro) e o alto custo de uma *flatcell*, aliado a sua limitação quanto à concentração das espécies paramagnéticas (analito), impõe sérias dificuldades e restrições ao seu uso.

Estas restrições podem ser contornadas através do uso de sensores sólidos, que possuem vantagens importantes, como maior estabilidade (dias), menor contaminação da amostra, fácil manipulação, e não ter o problema da solubilidade do agente complexante. Desta forma é possível detectar e quantificar o NO tanto em soluções (congeladas ou não), tecido animal, sangue, na atmosfera ou em outros materiais.



FeMGD: $\text{R}=\text{N}$; $\text{R}_1=\text{CH}_3$; $\text{R}_2=\text{CH}_2(\text{CHOH})_4\text{CH}_2\text{OH}$

FeDTCS: $\text{R}=\text{N}$; $\text{R}_1=\text{CH}_3$; $\text{R}_2=\text{CH}_2\text{COO}^-$

FeDETC: $\text{R}=\text{N}$; $\text{R}_1=\text{C}_2\text{H}_5$; $\text{R}_2=\text{C}_2\text{H}_5$

Figura 2.2: Fórmula estrutural dos ferrocomplexos derivados de carbamatos mais comuns.[23]

3 - ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA

O paramagnetismo eletrônico ocorre em todos os átomos, íons, radicais livre orgânicos e moléculas com número ímpar de elétrons [26,27]. A ressonância paramagnética eletrônica (RPE) é uma técnica espectroscópica baseada na absorção de microondas por substâncias paramagnéticas na presença de campo magnético externo. RPE é uma técnica poderosa, atualmente aplicada em vários campos da ciência. É a principal técnica utilizada neste trabalho. A seguir serão discutidos os fundamentos da técnica.

Quando um elétron livre está na presença de um campo magnético \vec{H} , seu movimento de equilíbrio é paralelo ao campo, já que o torque, $\vec{\tau}$, que o campo exerce sobre o momento magnético de spin, \vec{S} , dado pela equação 3.1, nesta posição, é nulo.

$$\vec{\tau} = g\beta \vec{S} \times \vec{H} \quad (3.1)$$

Nesta equação, g é um fator espectroscópico, chamado fator g , que para um elétron livre vale $g=2.0023$ e β é o Magnéton de Born, que vale $\beta=0,927 \times 10^{-23} \text{ J.T}^{-1}$.

Num material, o valor do fator g se altera em relação ao valor do fator g para o elétron livre, de acordo com a vizinhança. Assim, o fator g pode refletir as características do material no qual os elétrons desemparelhados estão presentes. A medida do fator g para um sinal desconhecido é importante para a identificação da origem do sinal.

Se o spin estiver na presença de campo magnético transversal, seu movimento será o de precessão em torno da direção do campo, conforme mostra a Figura 3.1. O torque que atua sobre o spin, é perpendicular ao plano de \vec{S} e \vec{H} .

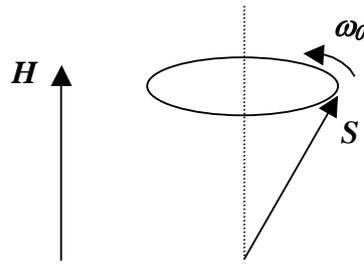


Figura 3.1: Movimento de precessão de um spin na presença de um campo magnético [26].

O torque produz uma variação no momento angular, dada pela lei de Newton:

$$\frac{d\vec{J}}{dt} = \vec{\tau} \quad (3.2)$$

Onde \vec{J} é o momento angular do elétron e t o tempo. Como o momento angular é proporcional ao spin, $\vec{J} = \hbar\vec{S}$, a combinação das equações 3.1 e 3.2 fornece a equação de movimento do spin, dada por

$$\frac{d\vec{S}}{dt} = \gamma \vec{S} \times \vec{H} \quad (3.3)$$

onde γ é a razão giromagnética e é dada por:

$$\gamma = -\frac{ge}{2mc} \quad (3.4)$$

onde e e m são respectivamente a carga e a massa do elétron e c a velocidade da luz no vácuo.

A solução da equação 3.3 num campo H estático é o movimento de precessão do spin em torno do campo, com frequência angular ω_0 , dada por:

$$\omega_0 = \gamma H \quad (3.5)$$

Para o elétron livre o valor de γ é $2\pi \cdot 28$ GHz/T. Em campos com intensidade em torno de 1 T a frequência angular do movimento de precessão ω_0 situa-se na faixa das

microondas. Portanto, em condição de ressonância, este elétron interage com as microondas modificando seu movimento de precessão.

Do ponto de vista quântico, o momento magnético, μ , do elétron livre é dado por:

$$\mu = \gamma S \hbar \quad (3.6)$$

onde \hbar é a constante de Planck dividida por 2π . Substituindo a equação 3.4 na 3.5, temos:

$$\mu = -\frac{ge\hbar}{4\pi mc} S = -g\beta S \quad (3.7)$$

Do ponto de vista quântico, elétrons livres alinhados ao acaso, na presença de um campo magnético \vec{H} , sofrem um desdobramento do nível energético, onde no nível energético inferior o spin do elétron se alinha na direção do campo magnético e no nível superior o alinhamento se dá na direção oposta ao campo. A precessão do spin corresponde à transição entre esses dois estados. A energia dos níveis resultantes é dada pela aplicação do operador Hamiltoniano, \hat{H} , numa função de onda consistente com a equação de Schrödinger. O Hamiltoniano de um íon em um material, na presença de um campo magnético, é dado por:

$$\hat{H} = g\beta HS \quad (3.8)$$

Desta forma, as energias possíveis para o elétron, obtidas da solução do Hamiltoniano, se o campo magnético está direcionado ao longo do eixo z , é dada por:[27-29]

$$E = g\beta HS_z = \pm \frac{1}{2} g\beta H \quad (3.9)$$

sendo que os autovalores de S para um elétron é $m_s = \pm \frac{1}{2}$

Este fenômeno é conhecido como efeito Zeeman e é ilustrado na Figura 3.2. Os níveis energéticos resultantes desse efeito são chamados níveis de Zeeman.

Se um campo magnético alternado, proveniente de uma radiação eletromagnética de frequência ν é aplicado, transições ocorrerão entre os dois níveis se a seguinte condição for satisfeita:

$$h\nu = g\beta H_r \quad (3.10)$$

onde H_r é o valor do campo magnético externo quando o sistema se encontra na condição de ressonância.

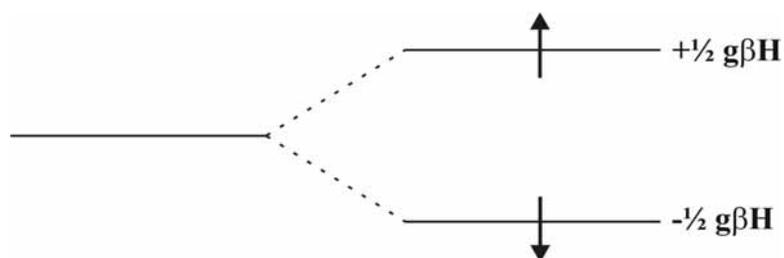


Figura 3.2: Ilustração do desdobramento do nível energético de um elétron na presença de um campo magnético de intensidade \vec{H} .

Esta condição é ilustrada pela Figura 3.3. Para campos magnéticos na ordem de kG, a frequência conveniente para que ocorra a transição é na região das microondas (GHz). Normalmente os espectrômetros de RPE alcançam a condição de ressonância variando o campo magnético para uma frequência fixa, já que variações de frequência na ordem de microondas, tecnicamente, não é fácil de ser obtida [29].

Um espectrômetro RPE mede a absorção de microondas em função do campo magnético. Desta forma, é obtida uma curva de absorção, mostrada na Figura 3.4 (A). O sinal RPE é a derivada desta curva (Figura 3.4 (B)), devido a aspectos experimentais, que serão discutidos posteriormente.

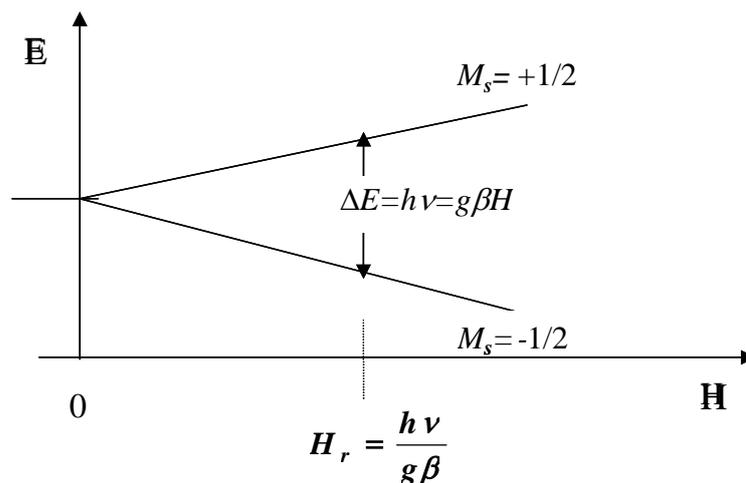


Figura 3.3: Desenho esquemático da transição eletrônica entre os níveis de Zeeman [27].

No espectrômetro RPE, a amostra é ajustada numa cavidade ressonante na qual o campo magnético oscilante (radiação) tem amplitude máxima. A cavidade é localizada entre os pólos de um magneto, e a potência de microondas é ajustada de modo a evitar a saturação devido a processos de relaxação.

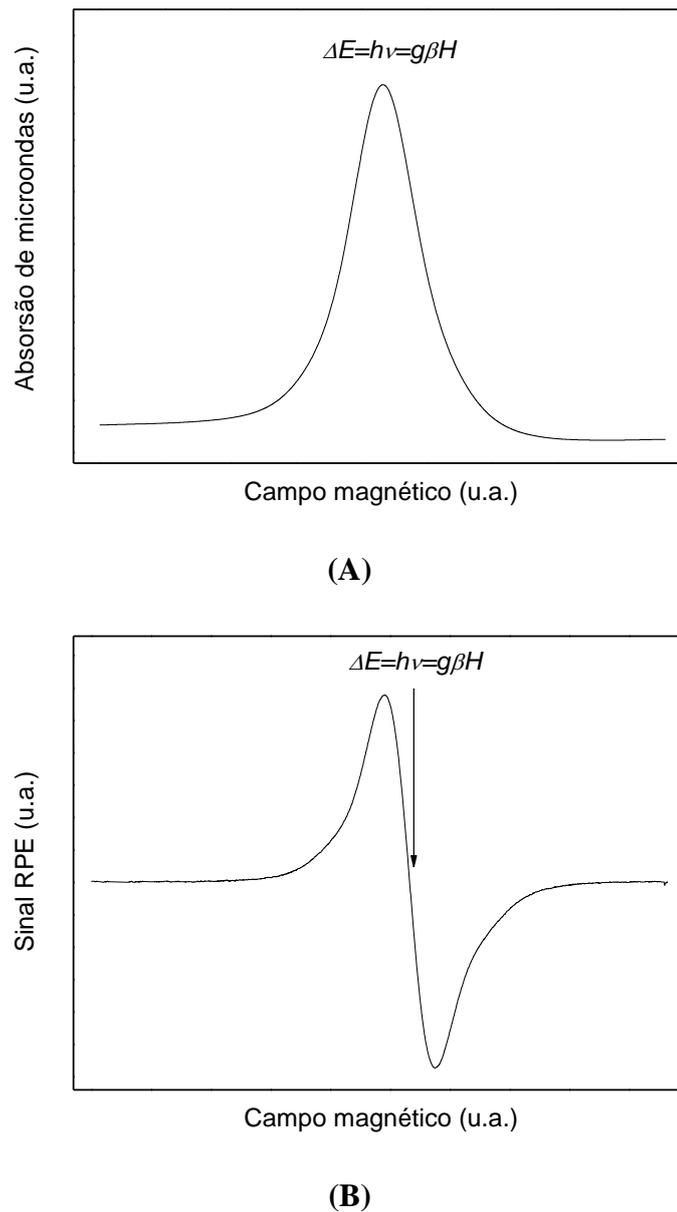


Figura 3.4: Curva de absorção em um espectro de EPR (A) e espectro de EPR, dado pela primeira derivada da curva de absorção (B) [28,31].

3.1 - Interação do spin eletrônico com spins nucleares: interações hiperfinas

Um núcleo atômico tem spin não nulo se possuir um número ímpar de prótons e/ou de nêutrons.[27,28,32] Interação entre o spin eletrônico e nuclear pode aumentar o número de níveis energéticos, resultando na chamada estrutura hiperfina. Para um spin nuclear I , cada

transição leva a $(2I + 1)$ componentes hiperfinos igualmente separados e de igual probabilidade. Os níveis de energia da interação hiperfina estão esquematizados na Figura 3.5. A energia que separa esses níveis é chamada de constante de acoplamento hiperfino, A . As regras de seleção para transições hiperfinas são $\Delta S = \pm 1$ e $\Delta I = 0$. A distância entre os picos corresponde à constante de acoplamento hiperfino (A) e o centro entre os níveis (linha tracejada) determina o fator g efetivo.

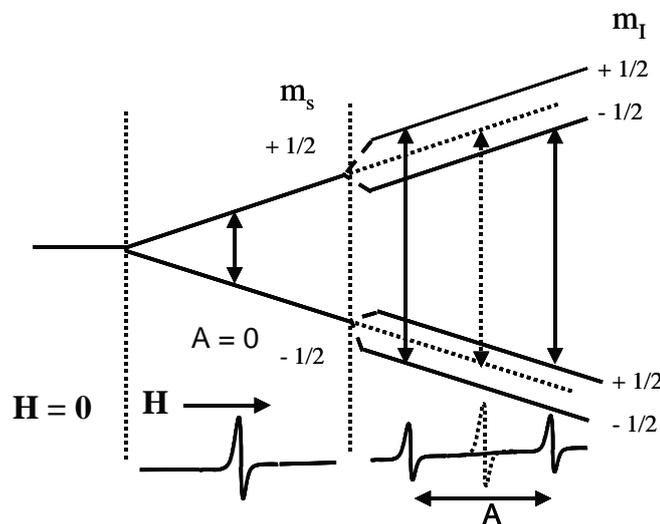


Figura 3.5: Desenho esquemático da estrutura hiperfina da interação de um elétron com um núcleo de spin $1/2$ e com constante de acoplamento hiperfino A , e a primeira derivada das curvas de absorção em um campo magnético H [30].

O Hamiltoniano deve ser modificado, para levar em consideração as componentes da interação hiperfina. Desta forma, ele se torna:

$$\hat{H} = g\beta HS + ASI + g_N\beta_N IH \quad (3.11)$$

onde A representa a constante de acoplamento hiperfino, I o spin nuclear, g_N e β_N são, respectivamente, o fator g e o magneton de Bohr para o núcleo.

A aplicação do Hamiltoniano fornece as energias permitidas, dadas por:

$$E = g\beta H_S + A S m_s m_I - g_N \beta_N m_I \quad (3.12)$$

onde m_s e m_I representam os números quânticos do spin do elétron e do núcleo.

3.2 - Anisotropia do fator g .

O momento angular orbital L , também contribui para o paramagnetismo devido ao movimento orbital do elétron, através da interação fina [27-29]. O número quântico L assume valores inteiros entre $-L$ e $+L$. Para um íon livre, este acoplamento dá origem a um novo desdobramento dos estados L e S , que estão arranjados de acordo com o momento angular total J ($J=L+S$). O campo cristalino induz uma perturbação na interação spin-órbita. Desta forma, o valor do fator g efetivo dependerá da orientação relativa do cristal e do campo magnético. Então, o momento magnético μ do elétron se torna anisotrópico. A equação de ressonância deve então considerar a orientação da amostra, sendo então dada por:

$$h\nu = g(\theta, \phi) \beta H_r \quad (3.13)$$

onde θ e ϕ são os ângulos entre o campo magnético externo e os eixos principais do tensor g , como mostrado na Figura 3.6.

Torna-se então necessário desenvolver uma nova Hamiltoniana em função do um fator g em uma direção arbitrária. Neste caso, o fator g é um tensor dado por [29]:

$$g = \begin{pmatrix} g_{xx} & g_{xy} & g_{xz} \\ g_{yx} & g_{yy} & g_{yz} \\ g_{zx} & g_{zy} & g_{zz} \end{pmatrix} \quad (3.14)$$

Por ser quase sempre simétrico o tensor g possui apenas seis elementos matriciais. Sempre existe um sistema de eixos principais, X , Y e Z , no qual o tensor g contém somente elementos diagonais, conhecidos como elementos principais. Então, g pode ser escrito como:

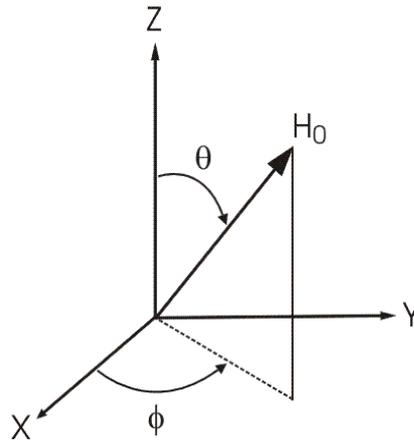


Figura 3.6: Orientação do campo magnético em relação aos principais eixos de coordenadas do tensor g [29].

$${}^d g = \begin{pmatrix} g_{XX} & 0 & 0 \\ 0 & g_{YY} & 0 \\ 0 & 0 & g_{ZZ} \end{pmatrix} \quad (3.15)$$

Desta forma, o Hamiltoniano pode ser escrito como:

$$\hat{H} = \begin{pmatrix} S_x \\ S_y \\ S_z \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} g_{XX} & 0 & 0 \\ 0 & g_{YY} & 0 \\ 0 & 0 & g_{ZZ} \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} H_0^x \\ H_0^y \\ H_0^z \end{pmatrix} \quad (3.16)$$

Algum dos eixos principais pode ser orientado por algum elemento de simetria da molécula [29]. Se as direções X , Y e Z são equivalentes, como em sítios tetraédricos, octaédricos ou cúbicos, então $g_{xx} = g_{yy} = g_{zz}$. Neste caso, o fator g é isotrópico e pode ser representado por um único valor.

Se a molécula possui um único eixo de simetria triplo ou superior coincidente com o eixo Z , então X e Y são equivalentes. Isto é chamado de simetria axial e $g_{xx} = g_{yy} \neq g_{zz}$. É comum neste caso chamarmos os fatores g de: $g_{//}$ o fator g paralelo ao eixo de simetria ($g_{//} = g_{zz}$) e g_{\perp} o fator g perpendicular ao eixo de simetria ($g_{\perp} = g_{xx} = g_{yy}$). Para moléculas que não possuem nenhum eixo de simetria triplo (C_3) ou superior, todos os fatores g principais são diferentes ($g_{xx} \neq g_{yy} \neq g_{zz}$).

No caso de amostras em pó ou solução congeladas, as entidades paramagnéticas estão randomicamente orientadas e o espectro de EPR observado representa a superposição de todos os possíveis valores de H_r . Quando os valores principais do fator g diferem uns dos outros significativamente, eles podem ser obtidos pelo espectro. Na Figura 3.7 é ilustrado um exemplo disso para um sistema onde $g_{//} > g_{\perp}$.

A ressonância pode ocorrer somente na faixa de campo entre $g_{//}$ e g_{\perp} . O campo mínimo (H_{min}) e máximo (H_{max}) no qual a ressonância irá ocorrer são dados respectivamente por:

$$H_{min} = \frac{h\nu}{g_{//}\beta} \quad (3.17)$$

$$H_{max} = \frac{h\nu}{g_{\perp}\beta} \quad (3.18)$$

A ressonância começa a ocorrer quanto $H=H_{min}$, e somente moléculas com eixo de simetria Z praticamente paralelo a H irão contribuir para o sinal. A medida que H se aproxima de H_{min} , o sinal aumenta de intensidade até atingir seu valor máximo. Isto ocorre pelo fato da maioria das moléculas tem seus eixos de simetria mais próximos a um plano perpendicular a H [27].

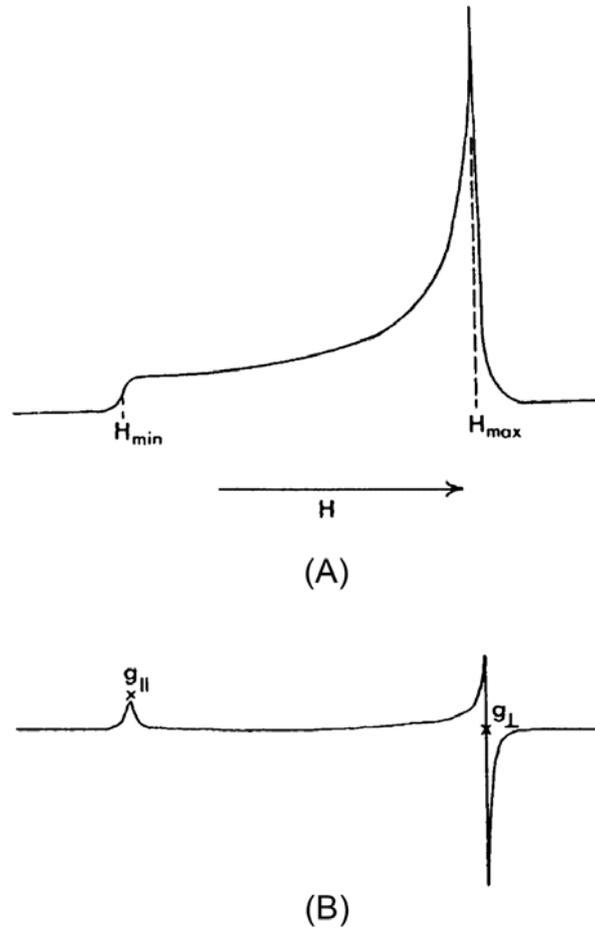


Figura 3.7: Espectro de absorção (A) e sua primeira derivada (B) típico de amostras contendo espécies paramagnéticas randomicamente orientadas de um sistema de simetria axial com $g_{//} > g_{\perp}$. [29]

Para um sistema de simetria axial, o fator g efetivo (g_{ef}) para um ângulo θ entre o campo magnético e os eixos de simetria é dado por:

$$g_{ef}^2 = g_{//}^2 \cos^2 \theta + g_{\perp}^2 \sin^2 \theta$$

O caso mais complicado é quando $g_{xx} \neq g_{yy} \neq g_{zz}$. Novamente, nos casos em que a anisotropia de g é suficientemente grande, os fatores g principais podem ser obtidos do espectro de uma amostra com as espécies paramagnéticas orientadas randomicamente. Na Figura 3.8 podemos ver um exemplo deste caso, onde X , Y e Z foram definidos tais que g_{zz} é o fator g maior, g_{yy} é o intermediário, e g_{xx} é o menor.

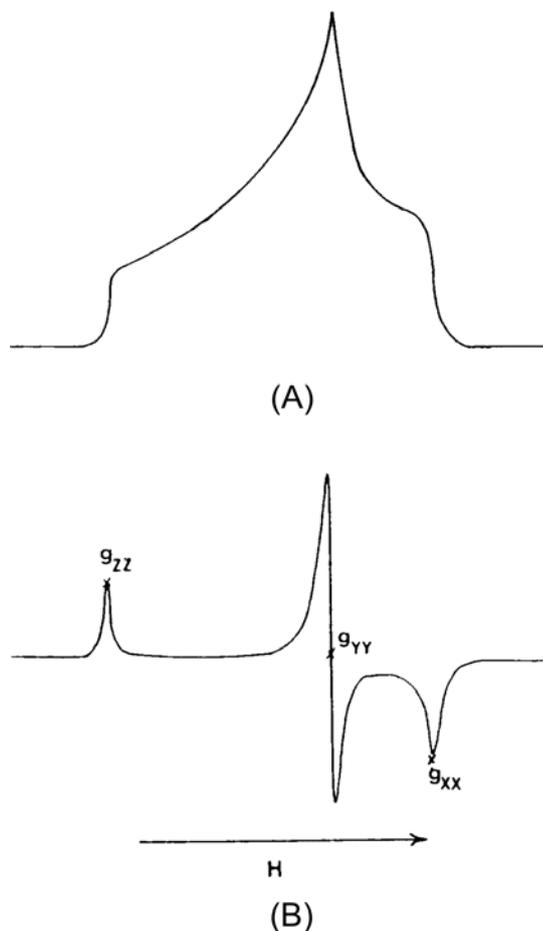


Figura 3.8: Espectro de absorção (A) e sua primeira derivada (B) típico de uma amostra com espécies paramagnéticas randomicamente orientadas em um sistema com $g_{xx} \neq g_{yy} \neq g_{zz}$ [29].

3.3 – Intensidade e forma da linha.

Para determinar a natureza e concentração de centros paramagnéticos em materiais, é necessário resolver os vários sinais que podem ocorrer em valores similares, para determinar os parâmetros do Hamiltoniano. Para isso, é necessário ter informações a respeito da probabilidade de transição, como também sobre a forma das linhas esperadas. A forma das linhas também nos dão parâmetros fundamentais a respeito do mecanismo de relaxação.

A separação dos níveis de Zeeman são da ordem de alguns 1×10^{-5} eV, que é um valor muito pequeno comparando-se com a amplitude de transições eletrônicas, da ordem de alguns eV. Conseqüentemente, a distribuição de Boltzman nos dá uma pequena diferença entre as populações dos níveis fundamental e excitado a temperatura ambiente. Desta forma, o processo de relaxação assume grande importância na espectroscopia RPE. Tempos de relaxação grandes provocam a saturação da população do nível excitado e conseqüente diminuição na intensidade do sinal RPE. Tempos pequenos provocam o alargamento das linhas de absorção.

3.4 - Forma da linha.

A forma esperada de uma linha espectral é uma lorentziana. A equação para o espectro de absorção é função do campo magnético, e é dada por:[28]

$$I(H) = \frac{I_0}{(H - H_0)^2 / \gamma^2 + 1} \quad (3.19)$$

onde H_0 e I_0 são respectivamente o campo e a intensidade no centro da linha. γ é definido por $\gamma = \Delta H_{1/2} / 2$.

Um alinha na forma de uma gaussiana se origina da distribuição estatística do momento magnético de spin, resultando num alargamento não homogêneo das linhas. A equação do espectro de absorção é dada por:

$$I(H) = I_0 \exp\left(\frac{-(H - H_0)^2}{\gamma^2}\right) \quad (3.20)$$

Materiais sólidos geralmente exibem linhas espectrais na forma de gaussiana. Como o campo local é distribuído através do acoplamento com fônons, a ressonância ocorre em todo o intervalo da distribuição. Sistemas com altas concentrações de spins favorecem o equilíbrio

entre as populações dos estados fundamental e excitado, produzindo espectros largos com forma gaussiana.

3.5 - A modulação de campo

O sinal RPE apresenta uma pequena variação na absorção de microondas na cavidade, e precisa ser amplificado. Para evitar perturbações no sinal devido a ruídos e mudança de linha base, como também para otimizar sinais largos de baixa intensidade, um campo de modulação de baixa amplitude e baixa frequência é sobreposto ao campo magnético externo. A detecção sincronizada é realizada com o auxílio de um amplificador normal a fase. Esse processo representa a derivada da curva de absorção de microondas [28,32]. Quanto maior a amplitude de modulação, maior será o valor da derivada do espectro de absorção, ou seja maior a amplitude do sinal RPE, porém, menor será a resolução do sinal.

3.6 - Medida da quantidade de sítios paramagnéticos

A determinação da quantidade de sítios paramagnéticos, ou spins, em uma amostra é baseada na comparação do sinal da amostra com o sinal de uma mostra de referencia, que possua a quantidade de sítios paramagnéticos conhecido [27]. Todos os fatores que podem afetar a intensidade do sinal, como temperatura, amplitude de modulação, potência de microondas e sensibilidade da cavidade, devem ser os mesmos para as duas amostras. O número de sítios paramagnéticos é proporcional à área da curva de absorção da amostra, ou seja, proporcional à segunda derivada do sinal RPE.

3.7 - Simulação de espectro RPE

A simulação de espectro RPE é uma forma de verificar os valores extraídos do espectro. Para simular um espectro, é necessário calcular a posição e intensidade de todas as linhas de ressonância, em cada posição de ressonância, uma linha com formato apropriado deve ser construída.

Espectro de pó é obtido de sítios paramagnéticos aleatoriamente orientados. A simulação de espectro em pó necessita do cálculo de um monocristal para uma série de orientações, caracterizado pelo ângulo polar e azimutal, e sua soma (integração numérica)

4 – MATRIZES UTILIZADAS NA CONSTRUÇÃO DO SENSORES.

Neste trabalho foram investigados sensores para NO baseados em dois diferentes materiais. O sensores constituídos de moléculas de CB[*n*] foram obtidos através de colaboração com o Prof. Dr. Grégoire Jean-François Demets, do Departamento de Química da FFCLRP/USP, onde o CB[*n*] são sintetizadas. O precursor para a matriz siloxano-poli(oxipropileno) foi obtido em colaboração a Prof. Leila A. Chiavacci, do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Araraquara. Estes materiais serão apresentados a seguir.

4.1 - Cucurbit[*n*]uril

A inclusão de moléculas na cavidade de hospedeiros tem um grande potencial tecnológico, como para conduzir novas transformações químicas, simular a atividade enzimática e isolar espécies reativas. Neste contexto, os cucurbit[*n*]uril tem atraído grande interesse nos últimos anos [33-41].

Diversos trabalhos demonstram que o cucurbit[*n*]uril pode ser utilizado para tratamento de água, na remoção de compostos aromáticos de água contaminada ou na remoção de resíduos em água utilizada na indústria têxtil [33-35]. Foi demonstrado também que, sua alta porosidade e estabilidade podem ser aproveitadas para o desenvolvimento de materiais porosos para estocagem de acetileno, um gás explosivo com grande aplicação na síntese de compostos orgânicos [36].

Cucurbit[*n*]uril (CB[*n*]) são compostos macrocíclicos simétricos baseados em *n* unidades de glicoluril ligadas através de grupos metilenos em suas aminas, formando uma molécula com geometria aproximadamente cilíndrica, contendo uma cavidade [37-42]. O

portal da cavidade é formada por n carbonilas. A Figura 4.1 mostra um desenho esquemático da molécula de CB[n]. Durante a síntese do CB[n] são formados análogos com $n=5$ a $n=11$, com exceção de $n=9$. O análogo mais comum é o cucurbit[6]uril (CB[6]). O CB[n] se apresenta como um pó de cor branca. A Figura 4.2 mostra a estrutura das moléculas CB[5], CB[6] e CB[7], como propostas por J. W Lee *et al* [37].

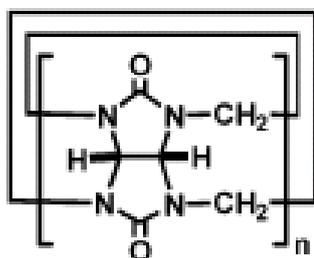


Figura 4.1: Desenho esquemático da estrutura do CB[6] [37].

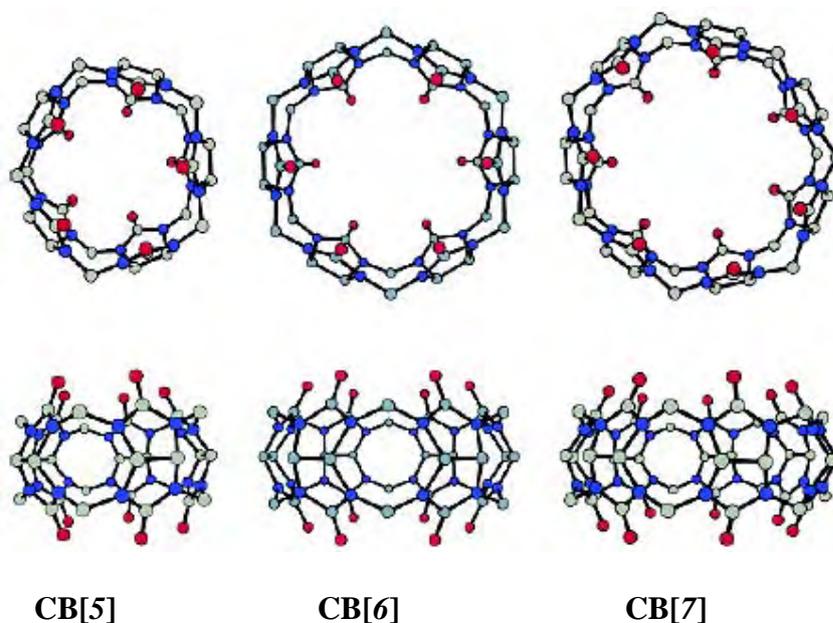


Figura 4.2: Estrutura obtidas por difração de raios-X do CB[5], CB[6] e CB[7] [37]. As cores correspondem a oxigênio (vermelho), nitrogênio (azul) e carbono (verde).

O CB[n] é sintetizado através de reações de condensação entre glicolurila e formaldeído, utilizando-se catalisadores ácidos. Em uma única síntese, são obtidos os diversos análogos, em diferentes proporções, que podem ser separados por diferença de solubilidade.

Com dimensões relativamente grandes, a cavidade das moléculas de CB[n] são hidrofóbicas. As dimensões dessas moléculas, como também sua solubilidade em água, são apresentadas pela Tabela 4.1. O tamanho da cavidade aumenta com a quantidade de unidades glicolurílicas. O comprimento da cavidade é o mesmo para todos os homólogos.

O CB[n] possui baixa solubilidade em água ou solventes orgânicos, especialmente o CB[6], que é praticamente insolúvel. No entanto, a solubilidade do CB[n] é relativamente alta em soluções ácidas concentradas. São compostos que possuem alta inércia química e alta estabilidade térmica. Estas moléculas se decompõem em temperaturas superiores a 400 °C [39,43].

Tabela 4.1: Propriedades das moléculas de CB[n] [37,43].

	CB[5]	CB[6]	CB[7]
Diâmetro externo (Å)	13,1	14,4	16,0
Diâmetro interno (Å)	4,4	5,8	7,3
Diâmetro da cavidade (Å)	2,4	3,9	5,4
Comprimento (Å)	9,1	9,1	9,1
Volume da cavidade (Å ³)	82	164	279
Solubilidade em H ₂ O (mM)	20-30	0,018	20-30

O mapa de potencial eletrostático das moléculas de cucurbituril (Figura 4.3) mostra que o portal e interior de suas cavidades possuem potencial negativo, indicando que esta região possui alta densidade eletrônica e é altamente sujeita a ataques nucleofílicos.

As propriedades apresentadas permitem o CB[n] acomodar moléculas em seu interior, formando complexos de inclusão [43]. A formação desses complexos são afetadas por fatores como a característica hidrofóbica da cavidade, que indica afinidade por compostos de baixa polaridade, interações íon-dipolo entre cátions e as carbonilas dos portais, formação de ligações de hidrogênio, responsáveis pela formação de adutos pelos portais, e pela dimensão do portal, que limita o tamanho da molécula complexada.

As moléculas de cucurbituril podem acomodar pequenas moléculas de solvente, como o tetraidrofurano, em seu interior [43]. O mecanismo de formação de complexos de inclusão mais provável é um mecanismo dissociativo, que envolve duas etapas [34,37]: a primeira envolve a saída da molécula de solvente, que geralmente se encontra alojada na cavidade da molécula de CB[n]. A segunda etapa envolve a entrada da nova molécula na cavidade. Este processo, normalmente, é bastante demorado. Apesar da estrutura da molécula de CB[6] ser bastante rígida, o portal de sua cavidade pode sofrer uma deformação durante o estado de transição durante a saída ou entrada de moléculas [37].

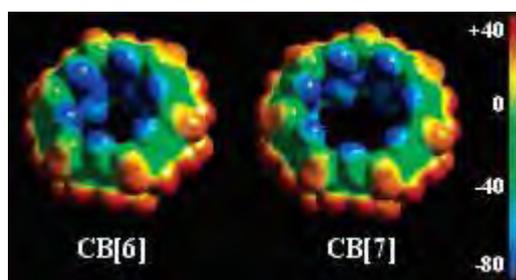


Figura 4.3: Mapas de potencial de ionização do CB[6], CB[7] [37,43].

4.2 - Siloxano-poli(oxipropileno)

O siloxano-poli(oxipropileno) (PPO) é um material híbrido orgânico-inorgânico, que possui boas propriedades mecânicas aliada a uma distribuição de poros, o que o torna um material interessante para o desenvolvimento de sensores para NO. Este material é obtido através do método sol-gel [44].

O processo sol-gel consiste na formação de uma rede a partir de um sol polimérico, que consiste numa dispersão estável de um polímero precursor num solvente [45]. Através da alteração dos parâmetros físico-químicos do sol, como o pH, ocorre reações de policondensação, que leva o sistema a um gel polimérico. O gel é composto pelas cadeias de polímeros ligadas umas às outras, contendo um solvente entre elas. Após a secagem do gel, obtém-se o produto final.

O precursor híbrido $3(\text{EtO})\text{Si}-(\text{PPO})-\text{Si}(\text{OEt})_3$ (PPO) pode ser obtido através da reação de 3-isocianatopropiltrietoxissilano (IsoTrEOS) e O.O'Bis(2-aminopropil(polioxipropileno)) em tetrahidrofurano (THF) [44]. A Figura 4.4 mostra a fórmula estrutural do precursor, onde n é o grau de polimerização.

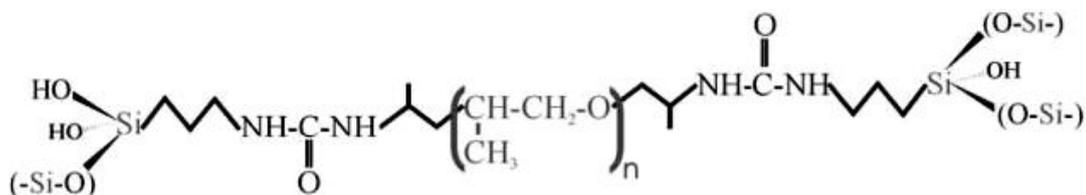


Figura 4.4: Fórmula estrutural do PPO [44].

O PPO tem sido estudado para aplicação como eletrólito sólido em dispositivos electrocrômicos e baterias, por possuir grande transparência e boa condutividade iônica, estabilidade química e propriedades mecânicas, devido a presença de ligações covalentes entre siloxano e a fase polimérica [46-48].

Materiais híbridos orgânico/inorgânico obtidos pelo processo sol-gel tem sido também investigados com o objetivo de produzir nanopartículas magnéticas, devido a possibilidade de produzir partículas de tamanho apropriado com desordem superficial. Essas nanopartículas podem ser aplicadas em dispositivos magnéticos de alta densidade de armazenamento e como partícula magnética com aplicações biomédicas [49].

Devido à sua rede de poros do PPO, é possível aprisionar moléculas de FeDETC em uma matriz de PPO, obtendo-se sensores para NO. A rede de poros da matriz garante que o NO se difundirá para o interior da matriz, permitindo o seu aprisionamento no FeDETC. A Figura 4.4 mostra um desenho esquemático de um sensor para NO baseado no sistema PPO/FeDETC.

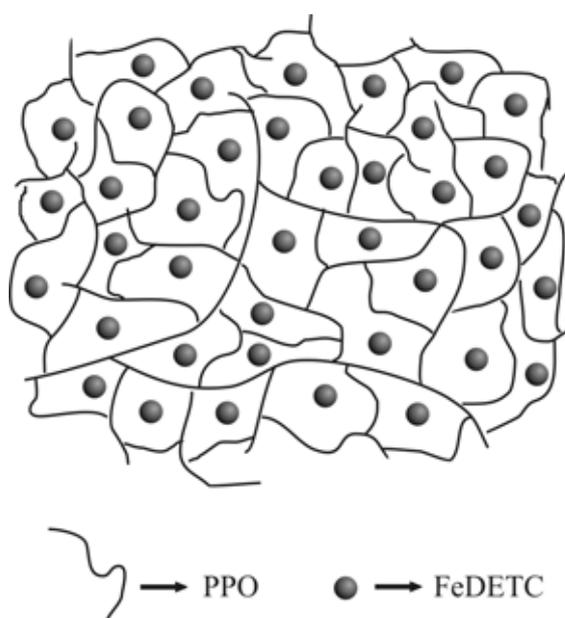


Figura 4.4: Desenho esquemático do sensor de PPO/FeDETC.

Silva e outros [50], desenvolveram um sistema de liberação controlada de NO baseado em FeDETC aprisionado numa matriz de PPO. O sistema apresentou boa resistência mecânica e estabilidade. O NO se manteve aprisionado no sistema por até 45 dias, quando a matriz era mantida à temperatura ambiente, no escuro. A taxa de liberação de NO da matriz foi acelerada através da aplicação de campo magnético ou através do aumento da temperatura.

5 - OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho foi desenvolver e otimizar sensores para NO, utilizando materiais inovadores que permitam obter alta sensibilidade e especificidade. Estes sensores foram obtidos através da oclusão do ferrocomplexo FeDETC em matrizes orgânicas e híbridas.

Os principais objetivos específicos, quanto ao desenvolvimento do projeto, podem ser citados:

- Demonstrar um sensor baseado na oclusão de FeDETC no material híbrido siloxano-poli(oxipropileno) para determinação de NO *in vivo* e *ex vivo*;
- Preparar e caracterizar um complexo de inclusão entre as moléculas de CB[6] e FeDETC.
- Demonstrar um sensor para NO baseado no complexo de inclusão entre as moléculas de CB[6] e FeDETC.

6 – MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 - O espectrômetro RPE

Um espectrômetro RPE possui os componentes básicos de todo espectrômetro, que é uma fonte de radiação eletromagnética, um porta amostra e um detector. O espectro é obtido pela mensuração da quantidade de radiação absorvida pelos spins desemparelhados, através do detector. A seguir serão discutidos os principais componentes de espectrômetro RPE, cuja representação esquemática, um pouco mais detalhada, está mostrada na Figura 6.1.

Fonte de microondas: é uma fonte de radiação monocromática, que pode ser ajustada dentro de um pequeno limite. Na banda X, a frequência é em torno de 9,3 GHz.

Magneto externo: produz um campo magnético homogêneo e estável em intensidades que podem ultrapassar 600 mT. Este campo é constantemente alterado durante a tomada do espectro. Na maioria dos espectrômetros RPE o campo é medido através de uma sonda Hall.

Cavidade ressonante: localizada entre os pólos do magneto, é o local onde a amostra é posicionada. Um campo oscilante estacionário é produzido perpendicularmente ao campo estático, pela onda eletromagnética. A amostra é posicionada de forma que este campo oscilante seja máximo.

Cristal detector: detecta as ondas transmitidas pelos guias de onda. Quando o fenômeno de RPE ocorre na amostra, é absorvida energia na cavidade e a corrente de detecção no cristal detector é modificada.

A tomada do espectro consiste em medir a corrente de detecção em função do campo magnético.

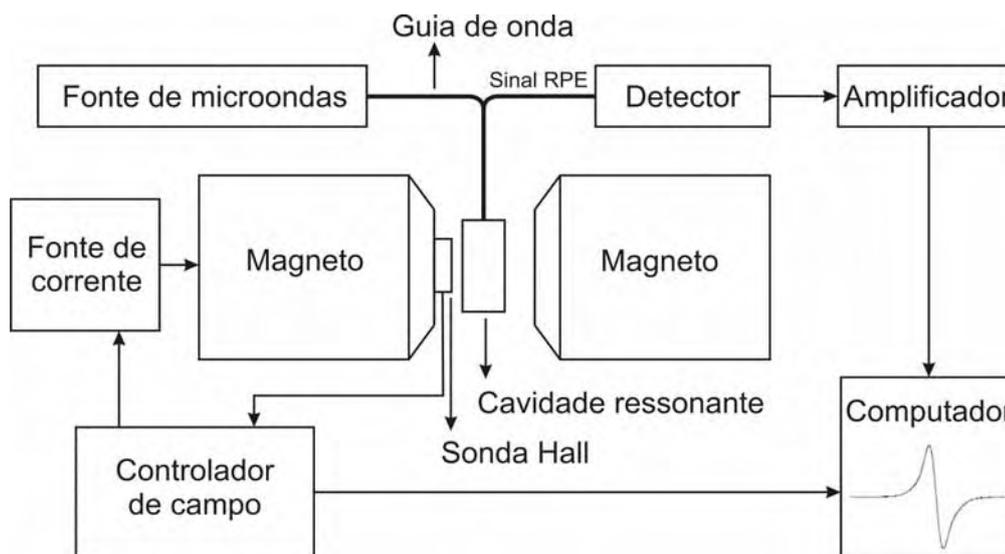


Figura 6.1: Representação esquemática simplificada de um espectrômetro RPE [32].

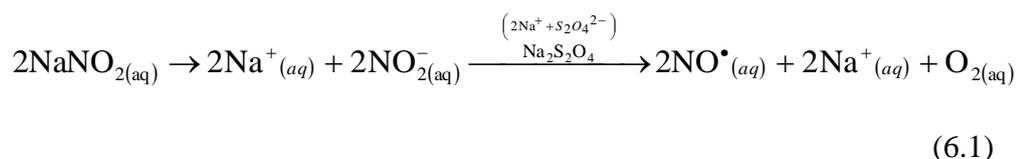
6.2 – Espectrômetro RPE utilizado neste trabalho.

As medidas RPE foram realizadas num espectrômetro Magnettech Miniscope MS300. Este espectrômetro opera com campos magnéticos de 500 a 4500 G, modulação de campo entre 50 mG e 7 G, potência de microondas entre 100 μ W e 50 mW e com microondas de frequências entre 9,3 e 9,55 GHz, sendo portanto um espectrômetro que opera na banda-X.

Este espectrômetro RPE possui potência máxima de microondas de 50 mW, sensibilidade de 8×10^9 Spins/G, frequência entre 9,3 e 9,55 GHz e amplitude de modulação máxima de 7 G, a 100 kHz.

6.3 – Preparação da solução aquosa de NO e da atmosfera contendo NO

As soluções de NO foram preparada através da redução do nitrito de sódio (NaNO_2) por ditionito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), como descrito na reação a seguir. Ambos os reagentes foram adquiridos da VETEC Química.

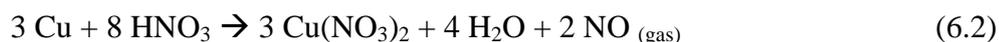


Para esta reação foi utilizada água ultra-pura, obtida através de em um sistema de purificação de água Millipore Direct-Q 3.

Tendo em vista que a máxima solubilidade do NO em água é de 2,2 mM [1], foi preparada uma solução aquosa de nitrito de sódio com concentração de 4,4 mM e uma de ditionito de sódio com o dobro dessa concentração. Desta forma, misturando-se alíquotas iguais das duas soluções, obteve-se uma solução saturada de NO.

Soluções com diferentes concentrações foram obtidas através do acréscimo de quantidades determinadas de água nas soluções de nitrito de sódio e ditionito de sódio, antes de sua mistura.

A preparação de uma atmosfera contendo NO foi preparada através da reação de cobre metálico (Cu^0), obtido de fios elétricos, com uma solução aquosa de ácido nítrico (HNO_3) 65%. Esta reação, como mostrado a seguir, se dá pela oxidação do Cu^0 e da redução do íon nitrato.



6.4 – Aprisionamento do NO nos sensores

O aprisionamento do NO foi feito através do procedimento descrito a seguir. Primeiramente, foi preparada água ultra-pura livre de O₂, borbulhando N₂ na água durante 30 minutos. Este método é apontado como um dos mais eficientes para a expulsão do O₂ da água [56,57].

Soluções de ditionito e nitrito foram previamente preparadas em concentrações pré-estabelecidas, a fim de produzir óxido nítrico em concentrações específicas. Os sensores foram então imersos em 5 mL de água. Em seguida foi adicionado 100 µl de solução de ditionito de sódio seguido de 100 µl de solução de nitrito de sódio, sob fraca agitação.

Após 30 minutos, os sensores foram recolhidos e secos em dessecador, sob vácuo, durante 1 h. Os sensores baseados em CB[6] foram recolhidos através de filtração em membrana Millipore com diâmetro de poros de 22 µm.

6.5 – Preparação da solução de FeDETC

Neste trabalho escolhemos o dietilcarbamato de ferro (FeDETC) como agente complexante de NO devido ao seu baixo custo e facilidade de complexação. A solução saturada de FeDETC (14,8 mM) foi preparada diluindo-se a proporção de 12 mg de cloreto de ferro hexahidratado (FeCl₃.6H₂O) e 20 mg de dietilditiocarbamato de sódio (DETC, C₅H₁₀NNaS₂.3H₂O), marca Acros, para 3 mL de dimetilformamida (DMF, C₃H₇ON), marca J. T. Baker. Antes de seu uso, a solução permaneceu sob agitação durante pelo menos 15 minutos em agitador magnético.

6.6 – Otimização dos parâmetros de medida

Foram determinados os valores adequados para a amplitude de modulação e potência das microondas, para o sinal de EPR dos complexos CB[6]/FeDETC/NO e PPO/FeDETC/NO. Assim as medidas foram efetuadas de forma a obter o sinal de maior intensidade possível, sem que houvesse perda de resolução. As medidas RPE foram realizadas utilizando-se 5 mg do complexo CB[6]/FeDETC e 30 mg de PPO/FeDETC. As amostras foram mergulhadas em uma solução saturada de NO durante 15 minutos e secas por 1 hora.

Para determinar a amplitude de modulação adequada, foram efetuadas diversas medidas EPR em uma mesma amostra, variando a amplitude de modulação entre 100 mG e 7 G, e mantendo-se constante a potência de microondas em 50,12 mW, ganho de 1, além dos demais parâmetros. Foi então traçada uma curva da intensidade do sinal em função da amplitude de modulação. Com o auxílio desta curva, e comparando a forma do sinal para cada amplitude de modulação, foi selecionada a amplitude de modulação que permite a obtenção do sinal mais intenso sem perda de resolução.

O número de elétrons excitados depende da potência de microondas. Os elétrons situados no estado excitado retornaram para o estado fundamental por relaxação espontânea. Para baixas potências de microondas, a absorção da radiação depende linearmente da potência. Nesta situação, a população no estado fundamental é maior que a população do estado excitado. Aumentando a potência de microondas, os elétrons passam a estar distribuídos de forma igualitária entre os estados fundamental e excitado. Esta situação é chamada de saturação de spin. Com um novo aumento na potência de microondas, todos os elétrons que tiveram relaxação espontânea serão excitados novamente imediatamente. Nesta situação, a população do estado excitado é maior que a população do estado fundamental. Desta forma, um número reduzido de elétrons estarão aptos a absorver microondas e a

intensidade do sinal tenderá a diminuir. A potência de microondas ideal é então o valor correspondente à transição entre o regime linear e de saturação de spin.

Para determinar potência de microondas adequada foram efetuadas diversas medidas EPR em uma mesma amostra, variando a potencia entre 0,1 mW e 50,12 mW, e mantendo-se constante a amplitude de modulação no melhor valor obtido na etapa anterior, ganho em 1, como também os demais parâmetros. Todas as medidas foram realizadas a temperatura ambiente. Através da construção e análise da curva de intensidade do sinal em função a potência de microondas, foi determinada a potência ideal.

6.7 – Preparação dos sensores baseados em PPO

Sensores para NO foram obtidos através do encapsulamento do aprisionamento de NO, FeDETC, numa matriz de siloxano-poli(oxipropileno) (PPO). Foi utilizado PPO com peso molecular de 400 g/mol. A matriz foi obtida através do processo sol-gel. Este sensor tem um aspecto de um material sólido e flexível.

Foi preparado FeDETC utilizando-se o procedimento já discutido, porém, substituindo-se o solvente DMF por água. Obteve-se FeDETC na forma de um precipitado, que foi filtrado, seco durante 3 horas e triturado em seguida, obtendo-se um pó fino.

O sol foi obtido pela mistura do precursor PPO e do FeDETC em pó, na razão mássica de $[FeDETC]/[PPO] = 0,065$. Ao adicionar 5 μ l de água, sob agitação, à 80 mg de precursor, o material sofreu a transição sol-gel. Os sensores, na forma de placas, foram então levados ao dessecador, para completar a secagem.

6.8 – Sensores baseados em CB[6]

6.8.1 – Preparação dos sensores baseados em CB[6]

Os sensores baseados em CB[6], que possuem a forma de pó, foram preparados através da complexação das moléculas de CB[6] e FeDETC, segundo o procedimento descrito a seguir. Foram colocados 80 mg de CB[6] em 60 mL de solução de FeDETC 14,8 mM, que inicialmente tinha a coloração marrom escuro, como mostrado na Figura 6.2 (A). A razão molar de CB[6]/FeDETC é de 1:10.

Após agitação constante em agitador magnético, por 24 hs, a mistura de FeDETC e CB[6] adquiriu a coloração verde, como mostrado na Figura 6.2 (B). Após agitação por 48 hs, a coloração da mistura se tornou laranja, como mostrado na Figura 6.2 (C).

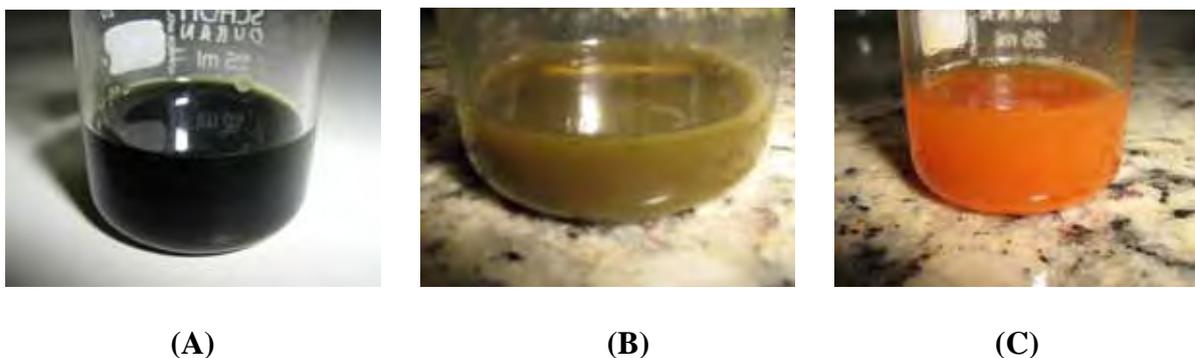


Figura 6.2: Fotografia da mistura inicial de FeDETC e CB[n] em DMF (A), solução de FeDETC e CB[n] após 24 hs de agitação (B) e após 48 hs de agitação (C).

A mudança de coloração da solução indica que houve a formação de um complexo entre o FeDETC e o CB[6]. Após 48 hs de agitação, o complexo foi filtrado em membrana

filtrante Millipore com diâmetro de poros de 22 μm , lavado com DMF, e deixado em dessecador, para secagem.

6.8.2 - Investigação da interação do NO com o CB[6]

Como a cavidade da molécula de NO é eletrofílica e hidrofóbica, esperamos que as moléculas de CB[6] sejam capazes de aprisionar NO em seu interior. Para investigar a capacidade do CB[6] de aprisionar e manter estáveis moléculas de NO, o CB[6] foi exposto ao NO de diferentes maneiras, como será discutido a seguir.

Após a exposição ao NO, foram realizadas medias RPE, para verificar a existência de sinal RPE característico do NO. Os valores dos parâmetros para regulação do espectrômetro RPE são apresentados na Tabela 6.1. Os experimentos realizados serão descritos em seguida.

Tabela 6.1: Valores dos parâmetros utilizados para regulação do espectrômetro durante a caracterização do sinal RPE dos sistemas.

Frequência de microondas	9,419 GHz
Potência do microondas	50 mW
Constante de tempo	0
Campo Central	334,5 mT (3345 G)
Tempo de Varredura	120 s
Número de varreduras	4
<i>Temperatura</i>	300 K

Para investigar a interação do CB[6] com NO em solução aquosa, foram imersos 35 mg de amostra de CB[6] em solução aquosa saturada de NO, por 20 min. A solução foi filtrada para recolhimento da amostra e em seguida a amostra, que foi seca à temperatura ambiente, sob vácuo, por 1 h. A amostra foi levada ao espectrômetro para realização da medida RPE.

Para verificar a interação do CB[6] com NO em atmosfera, foram transferidos 25 mg de amostra de CB[6] para um recipiente de vidro especialmente projetado para o experimento, como mostrado na Figura 6.3. Este recipiente foi especialmente projetado para este experimento e permite a entrada e saída de gás. A atmosfera do recipiente foi limpa com fluxo de N₂ a 3 l/min, durante 5 minutos. Em seguida, foi injetado NO na câmara. A câmara permaneceu fechada por 30 minutos. A amostra foi então transferida para um tubo de quartzo e levada ao espectrômetro para realização da medida RPE, a temperatura ambiente.



Figura 6.3: Vidraria utilizada para colocar as amostras em contato com NO gasoso.

6.9 – Cálculo do número de sítios paramagnéticos dos sensores.

O cálculo do número de sítios paramagnéticos, ou número de spins, no sensor, pode ser feito através da comparação entre área sob a curva de absorção do sensor com a de um padrão. Foi utilizado um padrão de silício contendo $1,13 \times 10^{15}$ spins.

Os sensores baseados em RPE, baixas concentrações de NO, comumente apresentam um sinal com linha base com grande inclinação. A correção da linha base pode levar à alteração da área sob a curva de absorção e, conseqüentemente, provocar erro na quantidade de sítios paramagnéticos calculado. Para contornar esse problema, foi adotado o procedimento descrito a seguir.

Foi medido o número de sítios paramagnéticos e a amplitude pico a pico de um sinal (Figura 6.4) que não necessitava de correção de linha base. Foi calculada a relação entre a quantidade de sítios paramagnéticos e a amplitude do sinal. O número de sítios paramagnéticos dos demais sinais foi calculado a partir da sua amplitude, utilizando-se a referida relação.

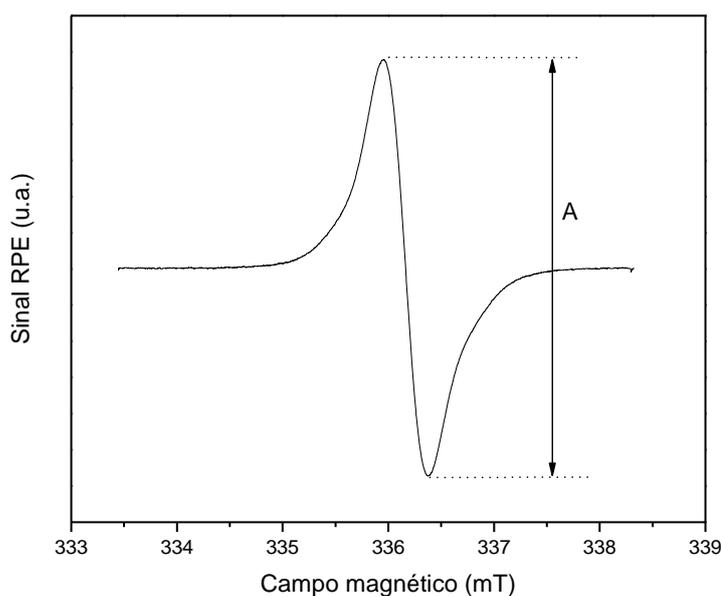


Figura 6.4: Representação da amplitude (A) do sinal RPE.

6.10 – Determinação dos parâmetros dos sensores.

Um sensor é caracterizado por parâmetros tais como a faixa linear de trabalho, sensibilidade, limite de detecção, faixa de trabalho, limite de quantificação e especificidade [51]. Esses parâmetros são determinados a partir da curva de calibração do sensor.

A curva de calibração é obtida através da medida do sinal de diversos sensores, após serem colocados em soluções padrões de diferentes concentrações. A curva de calibração é o gráfico da resposta do sensor em função da concentração do analito.[51]

A faixa linear de trabalho é o intervalo de concentração em que a resposta do sensor varia linearmente com a concentração do analito. A inclinação da reta obtida através da regressão linear na faixa linear de trabalho é a sensibilidade do sensor.

O limite de detecção (LD), é a menor quantidade do analito que pode ser detectada. No domínio do sinal (LD_s), é definido por: [52-54]

$$LD_s = \bar{x} + ks \quad (6.3)$$

Onde \bar{x} é a média do sinal do branco e s é o desvio padrão do branco. k é uma constante, que comumente é assumida como 3, o que leva a um nível de confiança de 99,86% [54].

O limite de detecção no domínio da concentração do analito (LD_c) é definido por:

$$LD_c = \frac{LD_s - \bar{x}}{m} = \frac{ks}{m} \quad (6.4)$$

Onde m é a sensibilidade.

A faixa de trabalho do sensor é definida como os limites de detecção inferior e superior.

O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade de analito, presente numa amostra, que pode ser quantificada. No domínio do sinal (LQ_s) é definido pela relação:

$$LQ_s = \bar{x} + ks \quad (6.5)$$

Onde k usualmente é tomado como 5 [52]. No domínio das concentrações, o limite de quantificação (LD_C) é definido como:

$$LQ_C = \frac{LQ_s - \bar{x}}{m} = \frac{ks}{m} \quad (6.6)$$

A especificidade do sensor é definida como a capacidade de um método medir uma substância específica, independentemente das outras substâncias existentes na solução do analito ou no sensor.

7 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

7.1 – Simulação dos espectros RPE

A simulação do espectro RPE dos sensores foram feitas utilizando-se o programa computacional EPR-NMR, versão 6.4 [55]. As simulações foram realizadas pelo autor deste trabalho e posteriormente refinadas em colaboração com Augusto B. Neto, do Laboratório de Novos Materiais e Dispositivos (LNMD), da POSMAT/FC/UNESP.

A Figura 7.1 mostra os espectros RPE experimental e simulado do sensor de PPO exposto a uma solução saturada de NO. O espectro foi obtido utilizando-se frequência de 9,408 GHz, amplitude de modulação de 0,7 mT e potência de microondas de 50 mW, à temperatura ambiente. A simulação do espectro revelou que o sinal possui forma Gaussiana, com $g_{\perp} = 2,04606$, $g_{\parallel} = 2,03670$, constantes de acoplamento hiperfino $A_{\perp} = 1,22$ mT e $A_{\parallel} = 1,49$ mT, o que leva aos valores de $g_{iso} = 2,04294$ e $A_{iso} = 1,31$ mT. A largura de linha na direção X e Y é de 0,80 mT, enquanto na direção Z é de 1,20 mT.

O sinal RPE do sensor de PPO possui o formato típico apresentado por NO em solução congelada e é o mesmo formato de sinal apresentado pelos outros sensores de matrizes sólida desenvolvidos pelo grupo [2,3]. Isto pode ser devido a baixa mobilidade do NO imposta pela matriz no estado sólido.

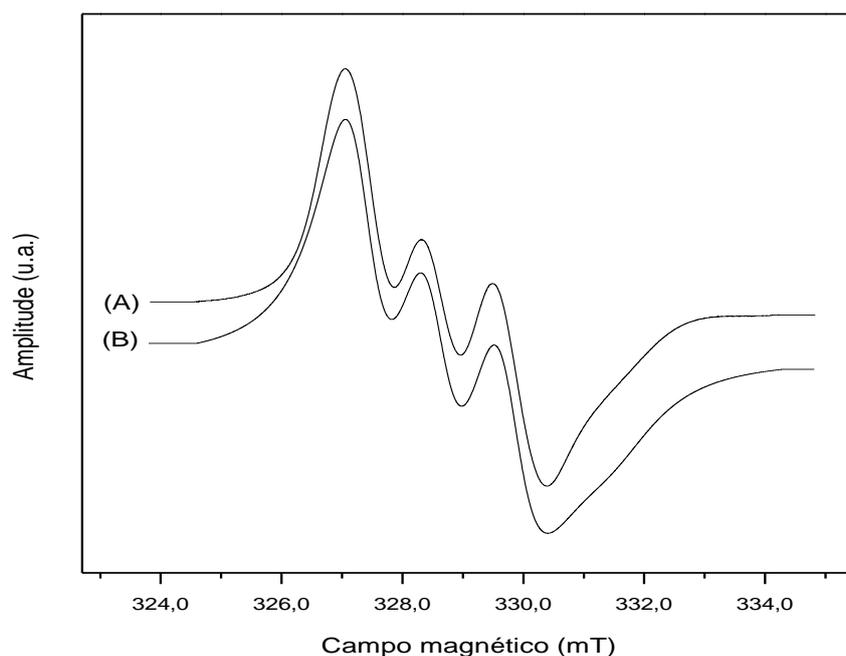


Figura 7.1: Espectro RPE experimental (A) de um sensor de PPO após sua exposição do NO, obtido a temperatura ambiente, e espectro simulado (B).

A Figura 7.2 mostra os espectros RPE experimental e simulado do sensor de CB[6]/FeDETC, exposto a uma solução saturada de NO. O espectro foi obtido utilizando-se frequência de 9,42 GHz, amplitude de modulação de 0,7 mT e potência de microondas de 50 mW, à temperatura ambiente. A simulação do espectro mostrou que o sinal possui forma de combinação de Lorentzianas, com $g_{\perp} = 2,03950$, $g_{\parallel} = 2,01550$, constantes de acoplamento hiperfino $A_x = A_y = A_z = 0$ e $g_{iso} = 2,03150$. A largura de linha na direção X e Y é de 1,80 G, enquanto na direção Z é de 0,97 G.

Os valores do fator g, tanto do sensor de PPO quanto do sensor de CB[6]/FeDETC, são similares ao da literatura, para amostras de FeDETC com NO [1-3,20]. Isto indica que o sinal RPE dos sensores são provenientes do NO.

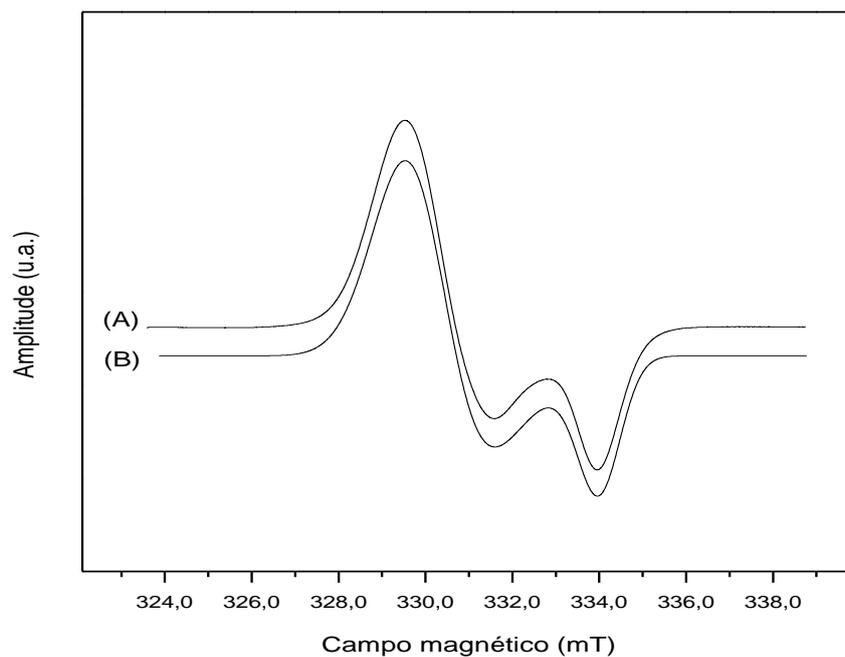


Figura 7.2: Espectro RPE experimental (A) de um sensor de CB[6]/FeDETC após sua exposição ao NO, obtido a temperatura ambiente, e espectro simulado (B).

O sinal se caracteriza pela total ausência de acoplamento hiperfino. Kleschyov e outros [59], obtiveram espectro RPE similar ao da amostra do sensor CB[6]/FeDETC, para uma mostra de DNIC-glutationa, cuja estrutura é mostrada na Figura 7.3 (A), medido na temperatura do nitrogênio líquido. Ueno e outros [60] obtiveram espectro similar para uma amostra de ferro dinitrosil ditiolado (DNIC-(GS)₂), cuja estrutura é mostrada na Figura 7.3 (B), a temperatura de 77 K. O ferro nesse complexo tem o estado de oxidação +1 e com dois elétrons desemparelhados nos grupos nitrosil.

Portanto, é possível que um complexo similar esteja sendo formado no sensor de CB[6]/FeDETC. Isto sugere que a molécula de FeDETC pode estar sendo quebrada durante a complexação com o CB[6].

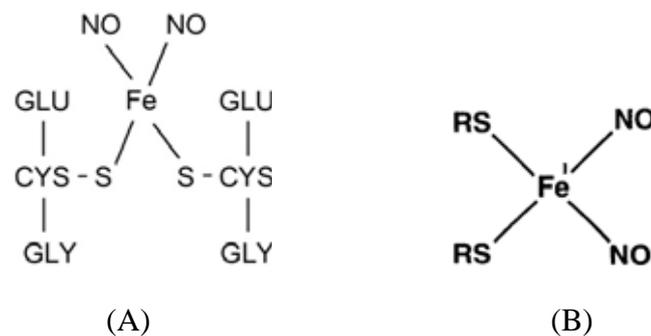


Figura 7.3: Estrutura da molécula de DNIC-glutathiona (A) [59] e da molécula de DNIC-(GS)₂ (B) [60], onde RS é um ligante contendo tiol.

7.2 – Otimização dos parâmetros de medida.

Os espectros RPE obtidos durante a otimização dos parâmetros de medida são mostrados a seguir. As medidas foram realizadas com 6 mg de amostra de CB[6]/FeDETC/NO, ou com 5 mg de amostra de PPO400/FeDETC/NO.

As Figuras 7.4 e 7.5 mostram o sinal RPE para amplitudes de modulação de 0,01 mT e 0,7 mT, para amostras de CB[6]/FeDETC/NO e PPO400/FeDETC/NO, respectivamente. O objetivo desses espectros é comparar a forma de linha para diferentes amplitudes de modulação. Então, os espectros foram normalizados. Para ambas as amostras foi utilizada potência de microondas de 50 mW. Percebemos que para ambas as amostras, não houve perda da resolução do sinal para a máxima amplitude de modulação, de 0,7 mT.

A Figuras 7.6 mostra a relação entre a amplitude pico a pico do sinal RPE para a mostras de CB[6]/FeDETC/NO (A) e de PPO400/FeDETC/NO (B). O sinal de RPE sofre um aumento de intensidade com o aumento da amplitude de modulação, sendo que a máxima intensidade do sinal é obtida para a amplitude de modulação de 0,7 mT.

Desta forma, para as demais medidas, será utilizada uma amplitude de modulação de 0,7 mT, pois esta fornece um sinal de maior intensidade, sem perda de resolução. Tipicamente a amplitude ideal para uma amostra é da ordem da largura de linha do sinal RPE [28,58]. A largura de linha é definida como a diferença entre os campos magnéticos referentes ao máximo e ao mínimo do sinal RPE. A largura de linha da amostra de CB[6]/FeDETC/NO é de 2,0 mT, enquanto que para a amostra de PPO400/FeDETC/NO é de 1,2 mT. Tendo em vista os valores de linha das amostras, a amplitude de modulação possivelmente poderia ser aumentada sem prejuízo para a resolução do sinal. No entanto a amplitude de modulação de 0,7 mT é a máxima suportada pelo espectrômetro RPE utilizado.

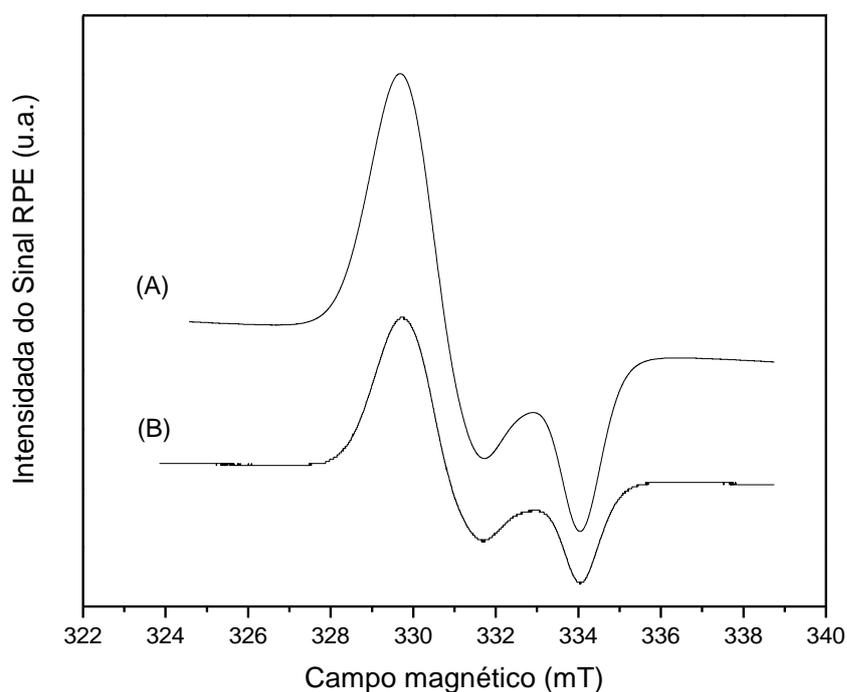


Figura 7.4: Espectros do complexo CB[6]/FeDETC/NO, com amplitude de modulação de 0,01 mT (ganho=1) (A) e amplitude de modulação de 0,7 mT (ganho=70) (B).

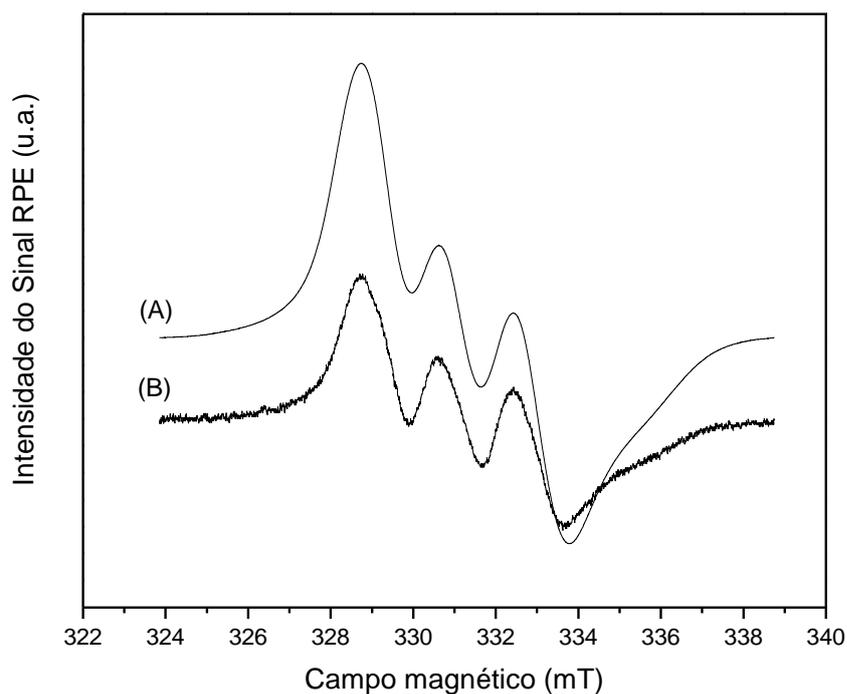


Figura 7.5: Espectros do complexo PPO400/FeDETC/NO, com amplitude de modulação de 0,01 mT (ganho=1) (A) e com amplitude de modulação de 0,7 mT (ganho=50) (B).

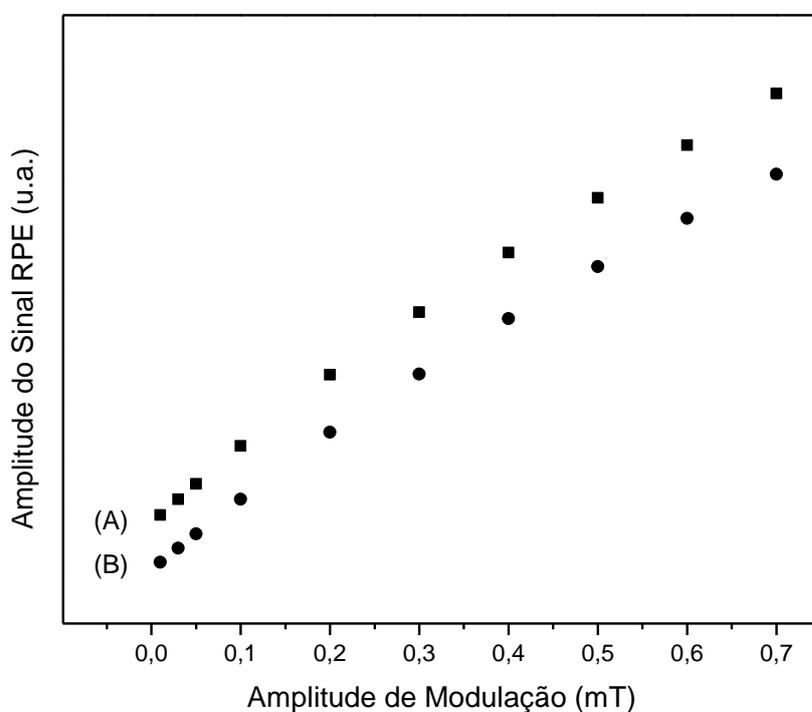


Figura 7.6: Relação entre a amplitude pico a pico do sinal RPE e a amplitude de modulação para o complexo CB[6]/FeDETC/NO (A) e para o complexo PPO400/FeDETC/NO (B).

Os espectros RPE em função da potência são mostrados nas Figuras 7.7 e 7.8 para amostras de CB[6]/FeDETC/NO e PPO400/FeDETC/NO, respectivamente. A amplitude pico a pico do sinal RPE, para ambas as amostras, aumenta com o aumento da potência de microondas. A Figura 7.9 (A) e (B) mostra a relação entre a o logaritmo da intensidade pico a pico do sinal e o logaritmo da potência, para amostras de CB[6]/FeDETC/NO e PPO400/FeDETC/NO, respectivamente. A linha representa a regressão linear, para cada uma das amostras. O coeficiente angular, para a amostra de CB[6]/FeDETC/NO vale 0,502, e para a amostra de PPO400/FeDETC/NO vale 0,519. Isto mostra que existe uma relação linear entre a amplitude pico a pico do sinal e a raiz quadrada da potência de microondas. Portanto, o complexo na máxima potência de microondas se encontra longe da saturação, ou seja, a população de spins em nível não excitado é muito maior que a população em níveis excitados. Desta forma, nas demais medidas desse trabalho, será utilizada uma potência de 50,12 mW, já que essa potência permite obter a maior intensidade de sinal possível, sem que haja saturação de spin.

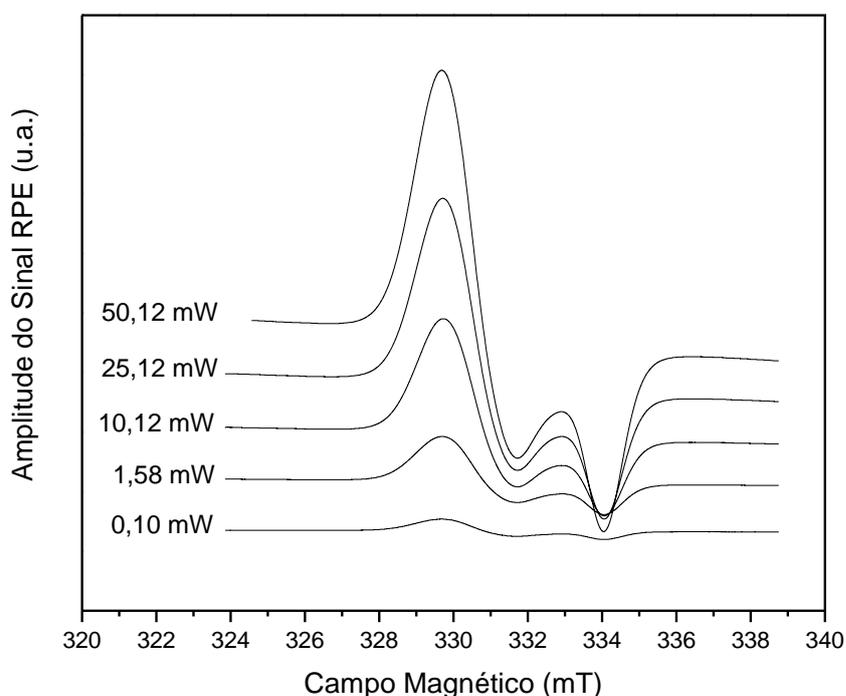


Figura 7.7: Espectros do complexo CB[6]/FeDETC/NO, variando a potencia de microondas entre 0,1 mW e 50,12 mW.

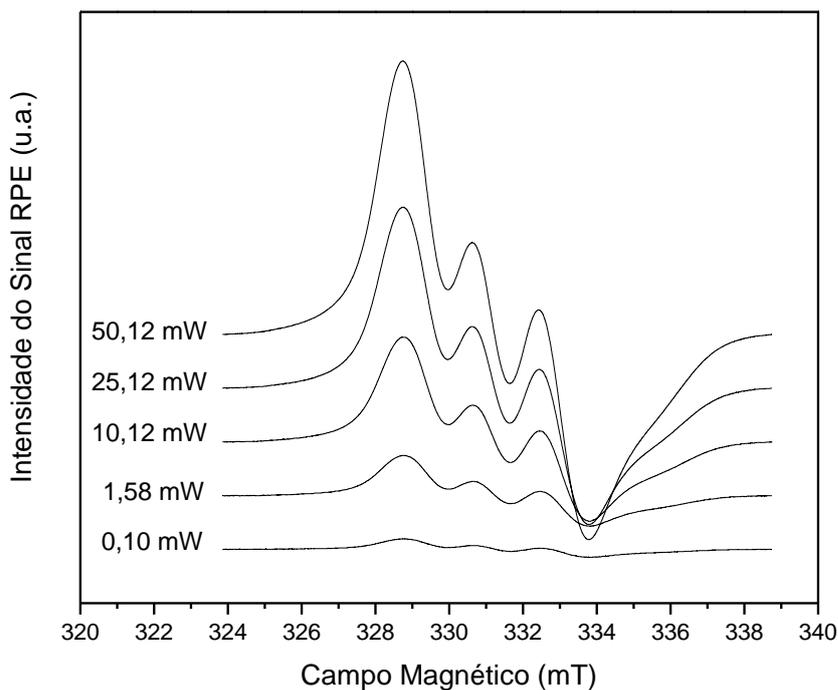


Figura 7.8: Espectros do complexo PPO400/FeDETC/NO, variando a potencia de microondas entre 0,1 mW e 50,12 mW.

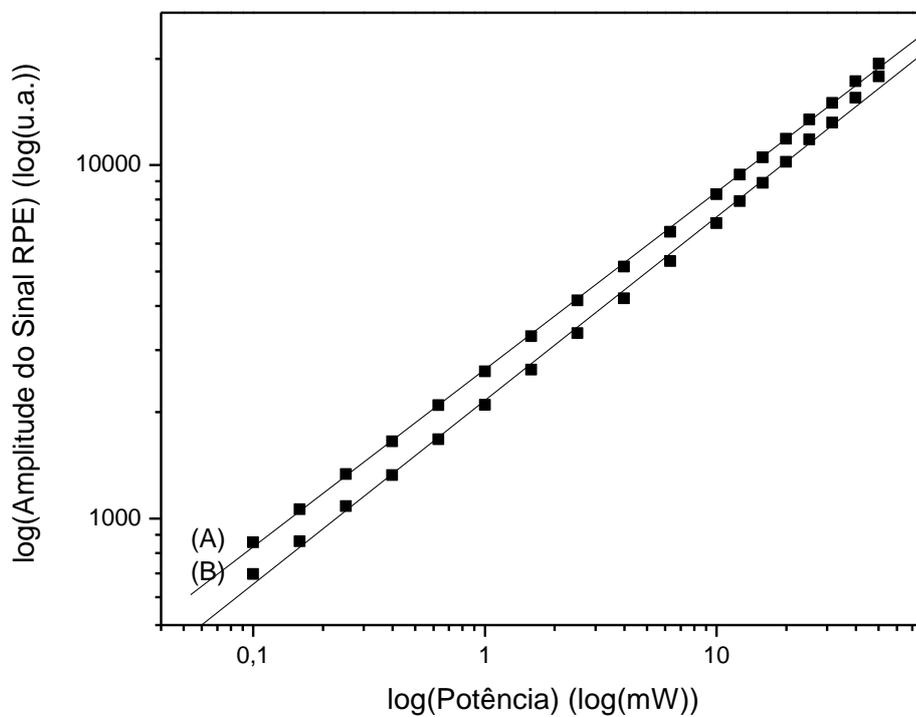


Figura 7.9: Relação entre o logaritmo da intensidade pico a pico do sinal EPR e o logaritmo da potencia de microondas, para uma amplitude de modulação de 0,7 mT, para o complexo CB[6]/FeDETC/NO (A) e para o complexo PPO400/FeDETC/NO (B).

7.3 – Efeito da quantidade de sensor CB[6]/FeDETC

O aumento da quantidade de sensor utilizado leva ao aumento da quantidade de sítios para aprisionamento de NO e, conseqüentemente, ao aumento do número de sítios paramagnéticos. Desta forma, a amplitude do sinal pode ser maior para maiores quantidades de sensor, melhorando o desempenho do sensor.

Para verificar a influência da quantidade do sensor em seu desempenho, foram medidos o sinal RPE de sensores de diferentes massas. Cada sensor, cada um com uma massa, foi mergulhado em 5 mL de uma solução saturada de NO por 20 minutos, filtrados em membrana, secos por 1 hora e em seguida levados ao espectrômetro RPE.

A Figura 7.10 mostra a amplitude do sinal RPE e o número de spins por massa de sensor em função da massa de sensor utilizado. A amplitude do sinal aumenta com o aumento da massa de sensor utilizada, enquanto o número de spins por massa diminui. Para massas maiores que 30 mg, a amplitude do sinal tende a saturar, indicando que nesta condição a quantidade de sítios para aprisionamento de NO tende a ser maior que a quantidade de moléculas de NO disponíveis na solução.

Para a quantidade de solução referida, a massa de sensor ideal é de 30 mg. No entanto, para a confecção da curva de calibração do sensor, neste trabalho, será utilizada uma massa de 20 mg de sensor. O motivo é a baixa disponibilidade de sensor, já que a molécula de CB[6] é difícil de ser obtida devido ao baixo rendimento de sua síntese.

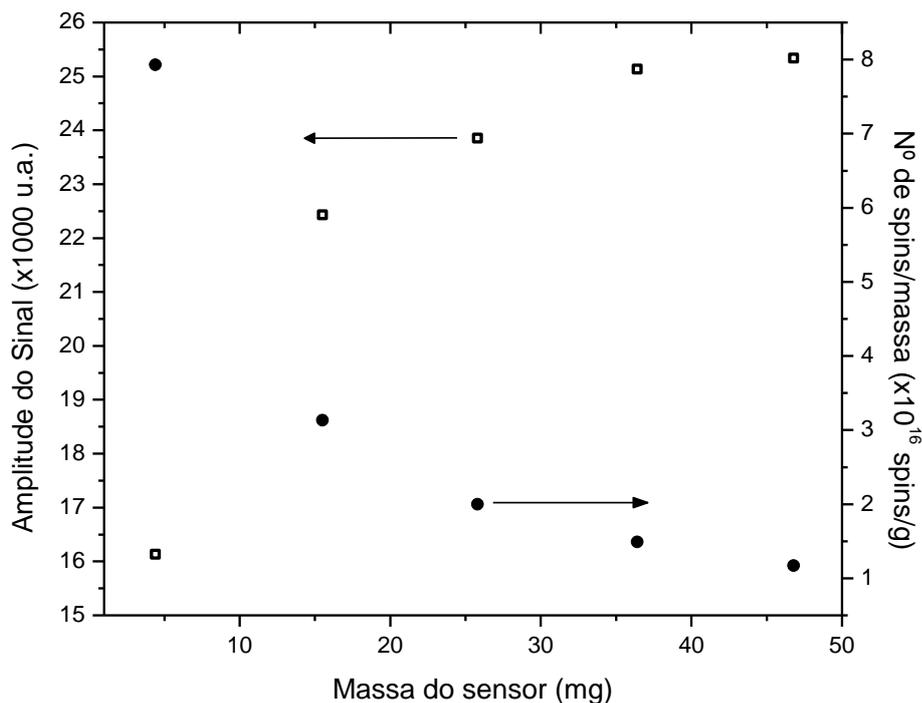


Figura 7.10: Amplitude do sinal e número de spins por massa quantidade do sensor CB[6]/FeDETC em função da massa do sensor.

7.4 – Investigação da interação do NO com o CB[n]

As amostras de CB[n] preparadas através da imersão numa solução de NO, com posterior filtragem e secagem, não apresentaram sinal RPE. Já as amostras expostas à uma atmosfera rica em NO, apresentaram. O espectro RPE da amostra de CB[6] foi tomado no espectrômetro Miniscope, utilizando-se amplitude de modulação de 0,7 mT, potência de 50 mW, frequência de 9,419 GHz e 6 repetições.

O sinal RPE para a amostra de CB[6]/NO ao NO gasoso é mostrada na Figura 7.11. Este resultado sugere que a molécula de CB[n] é capaz de aprisionar NO gasoso. O espectro da amostra de CB[6]/NO não exibe interações hiperfinas, com fator $g=2,00$. O valor do fator g

indica que a origem do sinal pode ser do NO. No entanto, a forma do sinal pode indicar que o NO está reagindo com a molécula de CB[6]. Estes resultados indicam que o CB[6] tem potencial para aplicação como sensores de NO gasoso.

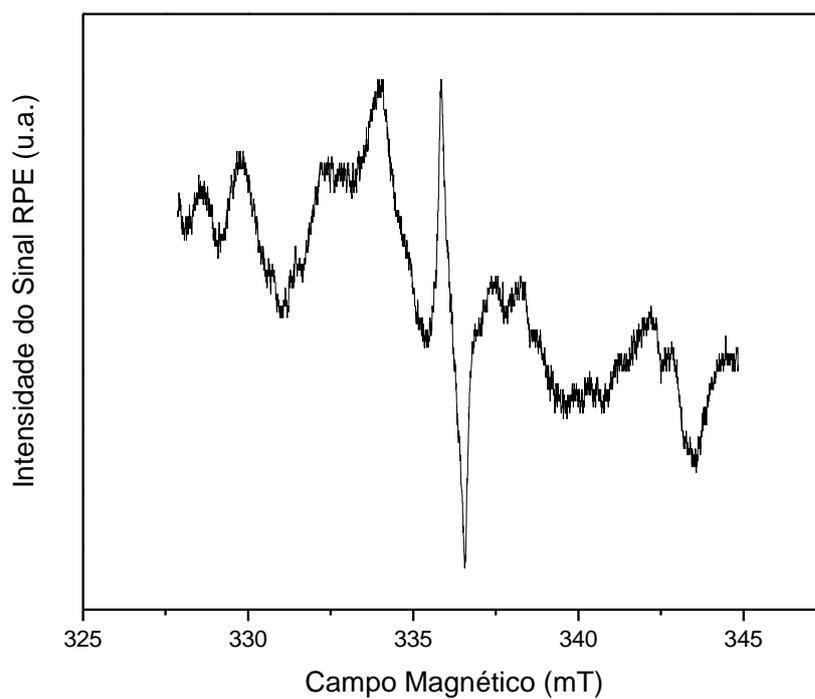


Figura 7.11: Espectro RPE do sistema CB[6]/NO.

7.5 – Caracterização do sensor CB[6]/FeDETC.

7.5.1 – Estudo do complexo CB[6]FeDETC e CB[6]/NO por RMN

Os espectros RMN das amostras foram obtidos em colaboração com o Prof. Dr. Eduardo Ribeiro Azevedo, do IFSC/USP, num espectrômetro Varian INOVA 400, em estado sólido. A amostra de CB[6]/NO foi preparada expondo-se o CB[6] a uma atmosfera rica em NO. A amostra de CB[6]/FeDETC/NO foi preparada mergulhando o complexo CB[6]/FeDETC numa solução saturada de NO. Em seguida a amostra foi filtrada e seca.

A Figura 7.12 mostra os espectros RMN ^1H das amostras estudadas. A banda das amostras de CB[6]/FeDETC, CB[6]/FeDETC/NO e CB[6]/NO sofreram um pequeno deslocamento para a esquerda de 0,75, 9,50 e 15,32 ppm, respectivamente. Houve ainda um grande alargamento da banda e aumento da intensidade e largura das bandas laterais das amostras que contém ferro. Houve ainda uma mudança na distância das linhas laterais. Esses resultados indicam uma mudança na anisotropia devido ao deslocamento da nuvem eletrônica, indicando uma interação entre as moléculas de CB[6] e a de FeDETC, e ainda a complexação com a molécula de NO.

A Figura 7.13 mostra os espectros RMN ^{13}C das amostras de CB[6] complexadas com ferro e com NO. A banda relativa ao grupo C=O das amostras de CB[6]/FeDETC, CB[6]/FeDETC/NO, e CB[6]/NO sofreram, respectivamente, um deslocamento para esquerda de 1,15, 0,88 e 0,25 ppm, em relação à amostra de CB[6]. A banda relativa ao grupo CH sofreu deslocamento para esquerda de 0,24 e 0,15 ppm, nas amostras de CB[6]/FeDETC e CB[6]/NO respectivamente, e deslocamento para a direita de 0,31 ppm na amostra de CB[6]/FeDETC/NO, relativamente à amostra de CB[6]. A banda relativa ao grupo CH₂ sofreu

deslocamento para esquerda de 0,60 na amostra de CB[6]/FeDETC em relação à amostra de CB[6].

A Tabela 7.1 mostra os tempos de relaxamento do RMN ^1H de amostras de CB[6], CB[6]/FeDETC, CB[6]/FeDETC/NO e CB[6]/NO, obtidos via ^{13}C . Os carbonos C_1 , C_2 e C_3 correspondem, respectivamente, ao C=O, CH e ao CH_2 . A presença do FeDETC provocou a diminuição do tempo de relaxamento do ^1H para cerca de 1%. O tempo de relaxamento dos ^1H da amostra de CB[6]/FeDETC/NO aumentou em uma ordem de grandeza em relação à amostra de CB[6]/FeDETC, devido à presença do NO. A amostra de CB[6]/NO apresentou um pequeno aumento no tempo de relaxamento do ^1H em relação à amostra de CB[6].

A Tabela 7.2 mostra os tempos de relaxamento do RMN ^{13}C de amostras de CB[6], CB[6]/FeDETC, CB[6]/FeDETC/NO e CB[6]/NO. O tempo de relaxamento do ^{13}C sofreu uma grande redução com a complexação do FeDETC ao CB[6]. A amostra de CB[6]/FeDETC/NO apresentou tempo de relaxamento levemente maior que a amostra de CB[6]/FeDETC, mas menor que a amostra de CB[6].

Apesar dos espectros não mostrarem grande mudança na posição das bandas entre as amostras, para todas as amostras estudadas, foi possível perceber grande variação no tempo de relaxamento dos isótopos estudados, o que indica mudança na anisotropia. A presença do Fe na amostra provoca uma grande diminuição no tempo de relaxamento tanto do ^1H quando do ^{13}C , enquanto a presença do NO provoca um pequeno aumento.

A diminuição do tempo de relaxamento indica uma mudança no ambiente magnético nas amostras. O aumento do tempo de relaxamento devido à presença do NO pode indicar ainda uma mudança conformacional nas moléculas.

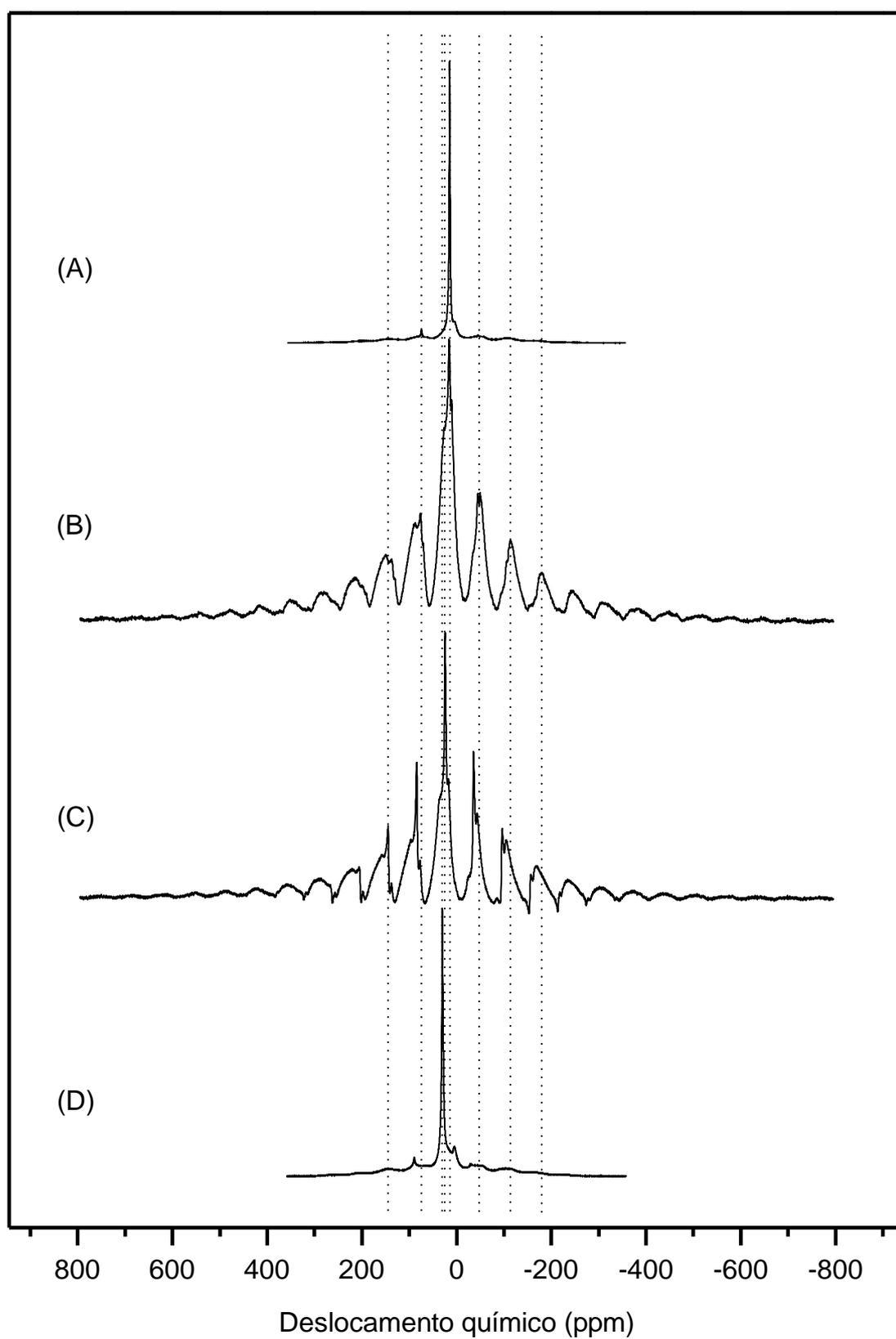


Figura 7.12: Espectros RMN ^1H de amostras em estado sólido de CB[6] (A), CB[6]/FeDETC (B), CB[6]/FeDETC/NO (C) e CB[6]/NO (D).

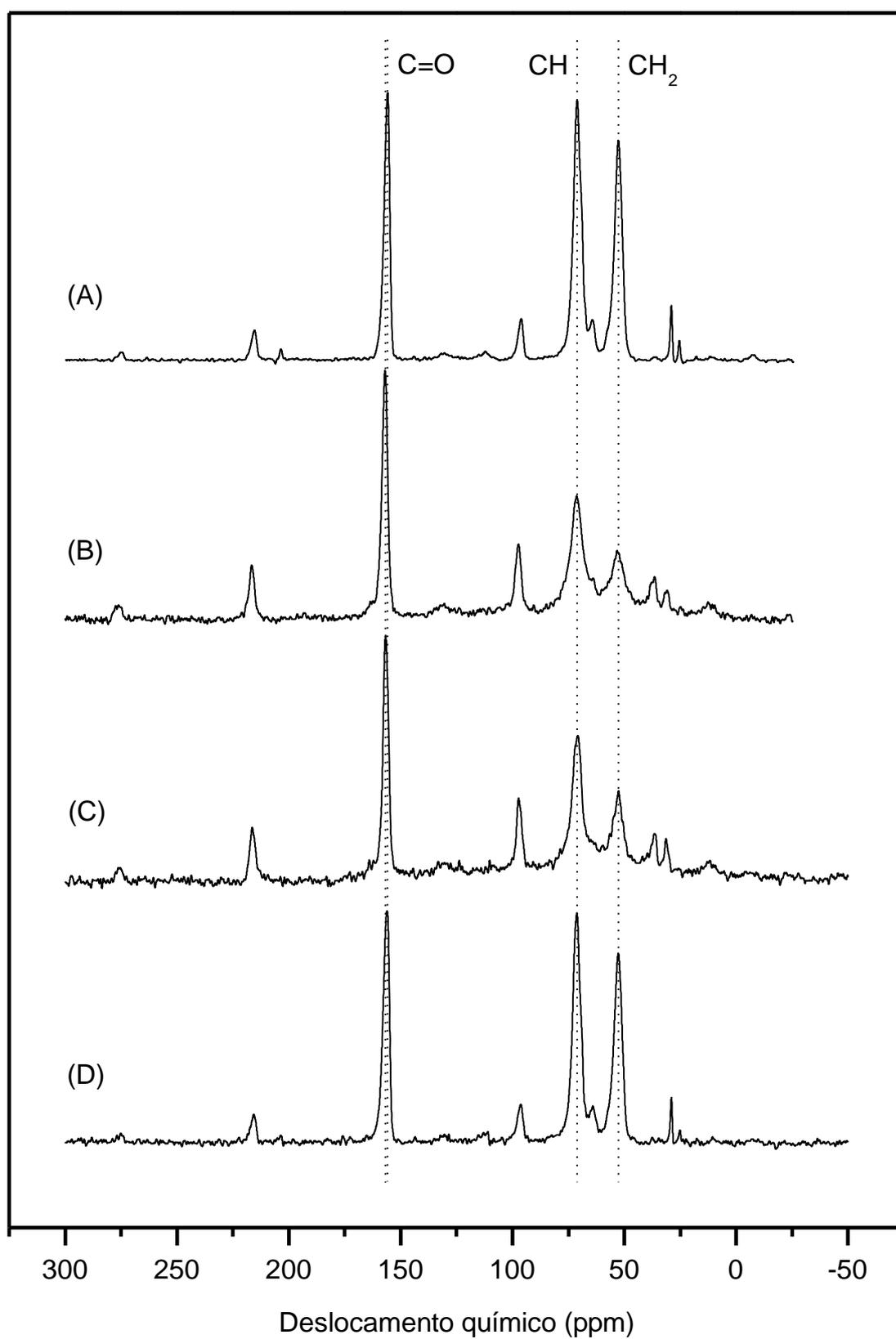


Figura 7.13: Espectros RMN ^{13}C de amostras em estado sólido de CB[6] (A), CB[6]/FeDETC (B), CB[6]/FeDETC/NO (C) e CB[6]/NO (D).

Tabela 7.1: Tempos de relaxamento do RMN ^1H de amostras de CB[6], CB[6]/FeDETC e CB[6]/FeDETC/NO, obtidos via ^{13}C .

Amostra	Tempo de relaxamento (s)		
	Erro (s)		
	Via C_1	Via C_2	Via C_3
CB[6]	0,64	0,66	0,68
	0,02	0,02	0,01
CB[6]/FeDETC	0,064	0,074	0,082
	0,003	0,006	0,007
CB[6]/FeDETC/NO Solução	0,102	0,116	0,13
	0,003	0,003	0,02
CB[6]/NO gás	0,81	0,79	0,81
	0,02	0,03	0,02

Tabela 7.2: Tempos de relaxamento do RMN ^{13}C de amostras de CB[6], CB[6]/FeDETC e CB[6]/FeDETC/NO.

Amostra	Tempo de relaxamento (s)		
	Erro (s)		
	C_1	C_2	C_3
CB[6]	21	28	24
	2	4	4
CB[6]/FeDETC	6	11	4
	1	7	3
CB[6]/FeDETC/NO Solução	16	10	12
	5	7	6
CB[6]/NO gás	25	24	27
	3	2	4

7.5.2 – Estudo do complexo CB[6]FeDETC e CB[6]/NO por FTIR

Os espectros FTIR foram realizados no laboratório do Prof. Dr. Paulo Noronha Lisboa Filho, com auxílio de Larisa Baldo de Arruda, da POSMAT/FC/UNESP. O equipamento utilizado é um Bruker Vertex 70, no intervalo de 50 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} , com

resolução espectral de 4 cm^{-1} , e 32 varreduras. A análise dos espectros foi realizada em colaboração com Erika S. B. Uhle, do LNMD.

A Figura 7.14 mostra os espectros FTIR das amostras de FeDETC, CB[6], CB[6]/FeDETC e CB[6]/FeDETC/NO. A seguir serão discutidas as alterações do espectro do CB[6] ao ser complexado com o FeDETC.

A banda localizada em 2998 cm^{-1} , na amostra de CB[6], pode ser atribuída à deformação axial da ligação C-H [61,62]. Esta banda sofreu um deslocamento para 2992 cm^{-1} , além de um aumento na largura, na amostra de CB[6]/FeDETC. A banda em 2931 cm^{-1} , na amostra de CB[6], pode ser atribuída à deformação axial do grupo CH_2 . Na amostra de CB[6]/FeDETC, esta banda sofreu um deslocamento para 2938 cm^{-1} , além de um estreitamento.

A amostra de CB[6]/FeDETC apresentou uma banda nova em 1655 cm^{-1} , correspondente à ligação C-N ($\text{C}_2\text{H}_5\text{N}$) do FeDETC [63]. No espectro da molécula de FeDETC, esta banda pode ser vista como um banda de baixa intensidade, em 1678 cm^{-1} . A banda situada em 1726 cm^{-1} pode ser correspondente à deformação axial do grupo C=O do CB[6]. [64] Esta banda não sofreu deslocamento em relação a amostra complexada com FeDETC. A banda em 1324 pode corresponder à ligação CN (NCO) do CB[6]. Esta banda também não sofreu deslocamento. A banda situada em 1461 cm^{-1} pode ser referente à deformação angular do grupo CH_2 da molécula de CB[6] e sofreu um deslocamento para 1473 cm^{-1} .

Em 1180 cm^{-1} , na amostra de CB[6], se localiza a banda referente à deformação axial assimétrica da ligação CN (NCO). Esta banda se deslocou para 1188 cm^{-1} , na amostra de CB[6]/FeDETC. Em 1126 cm^{-1} surgiu uma nova banda na amostra de CB[6]/FeDETC, associada à ligação C-S do FeDETC [65]. A banda referente à deformação axial simétrica da

ligação CN (CH_2N) da molécula de CB[6] sofreu deslocamento de 794 cm^{-1} para 798 cm^{-1} após a complexação com o FeDETC.

A banda localizada em 669 cm^{-1} na amostra de CB[6] se deslocou para 676 cm^{-1} na amostra de CB[6]/FeDETC. Esta banda pode estar relacionada à ligação CN (NCO) do CB[6], e também à ligação CN (SCN) do FeDETC. A banda localizada em 625 cm^{-1} na amostra de CB[6] pode estar relacionada à deformação angular do C=O (NCO). Na amostra de CB[6]/FeDETC, esta banda se deslocou para 614 cm^{-1} , além de sofrer um aumento de intensidade, devido a presença do enxofre. Nesta amostra, a banda está também relacionada à deformação angular do N-C-S e à deformação axial simétrica do C-S, da molécula de FeDETC.

Devido a presença do NO, a amostra de CB[6]/FeDETC sofreu alteração na banda localizada a 1726 cm^{-1} , atribuída à ligação C=O, que se deslocou para 1722 cm^{-1} . A banda referente à ligação C-H₂, do CB[6], localizada em 1473 cm^{-1} , se deslocou para 1375 cm^{-1} . Observa-se ainda um deslocamento da banda em 613 cm^{-1} , para 595 cm^{-1} . Esta região é característica da ligação M-NO, onde M é um metal. Houve uma grande redução na intensidade relativa da banda que pode ser referente a ligação C-N ($\text{C}_2\text{H}_5\text{N}$) do FeDETC, localizada em 1655 cm^{-1} .

Comparando-se os espectros das amostras de CB[6] e CB[6]/NO, percebemos apenas o deslocamento da banda referente à deformação simétrica da ligação C=O do CB[6], de 1726 cm^{-1} para 1765 cm^{-1} . Isto indica que a interação do NO se dá com o portal da cavidade do CB[6], onde se localiza a ligação afetada.

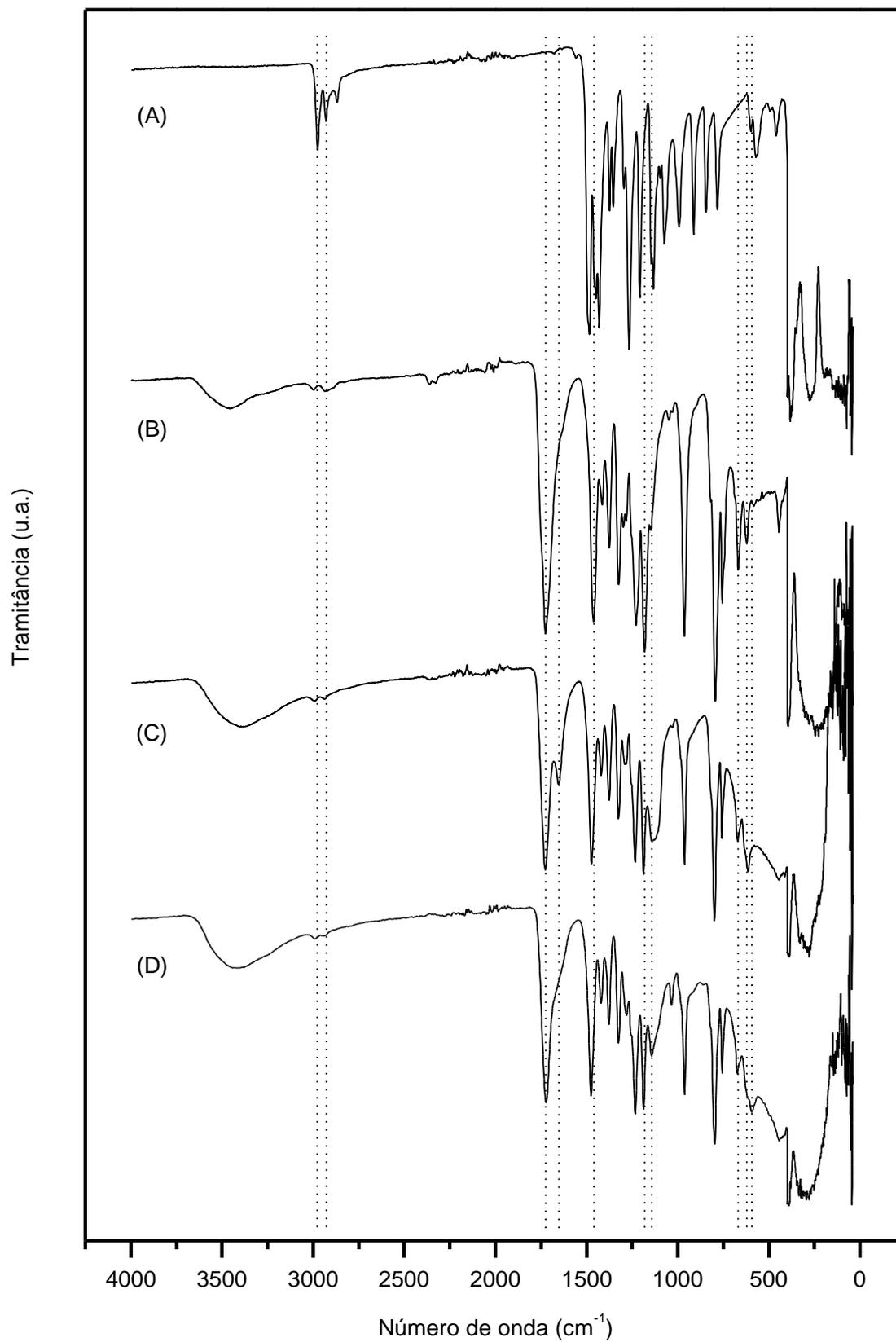


Figura 7.14: Espectro FTIR de amostras de FeDETC (A), CB[6] (B), CB[6]/FeDETC (C) e CB[6]/FeDETC/NO (D).

7.5.3 – Caracterização térmica do sensor

A caracterização térmica das amostras foi realizada no laboratório do Prof. Dr. Aldo Eloizo Job, na faculdade de Ciência e Tecnologia da UNESP. Os ensaios foram realizados num equipamento TG/FTIR acoplado. A análise térmica foi realizada num equipamento Netzsch modelo 204, com 10 mg de amostra num cadinho de alumina, atmosfera de argônio a 25 mL min⁻¹ e taxa de aquecimento de 5°C min⁻¹, de 25 a 700°C.

A Figura 7.15 mostra a curva termogravimétrica (TG) de uma amostra de CB[6]. A perda de massa, devido à degradação do composto, ocorre em três etapas. A primeira etapa ocorre entre 40°C e 150°C, com a perda de cerca de 13% da massa. Essa etapa pode estar relacionada à perda de água e componentes voláteis, como solvente residual. A segunda etapa ocorre entre 320°C e 490°C, com perda de cerca de 60% da massa. A terceira etapa ocorre entre 490°C e 690°C, com perda de 26% da massa, aproximadamente. A massa residual é menor que 1% da massa total, e pode ser atribuída à carbono.

A Figura 7.16 mostra a curva TG de uma amostra de CB[6]/FeDETC. A decomposição desta amostra ocorre em duas etapas. Na primeira, que ocorre entre 40°C e 140°C, houve perda de aproximadamente 14% da massa, o que pode estar relacionado à perda de água. Na segunda, entre 270°C e 470°C, houve perda de cerca de 55% da massa. A massa residual é de aproximadamente 30%, e pode ser atribuída ao ferro contido no FeDETC. A temperatura de degradação do complexo diminuiu em relação à amostra de CB[6], devido a presença do FeDETC. Possivelmente o aumento da temperatura provoca a descomplexação do CB[6], bem como a do Fe e DETC. A perda de massa em temperatura menores pode indicar que a molécula de DETC se degrada em temperaturas mais baixas que a de CB[6].

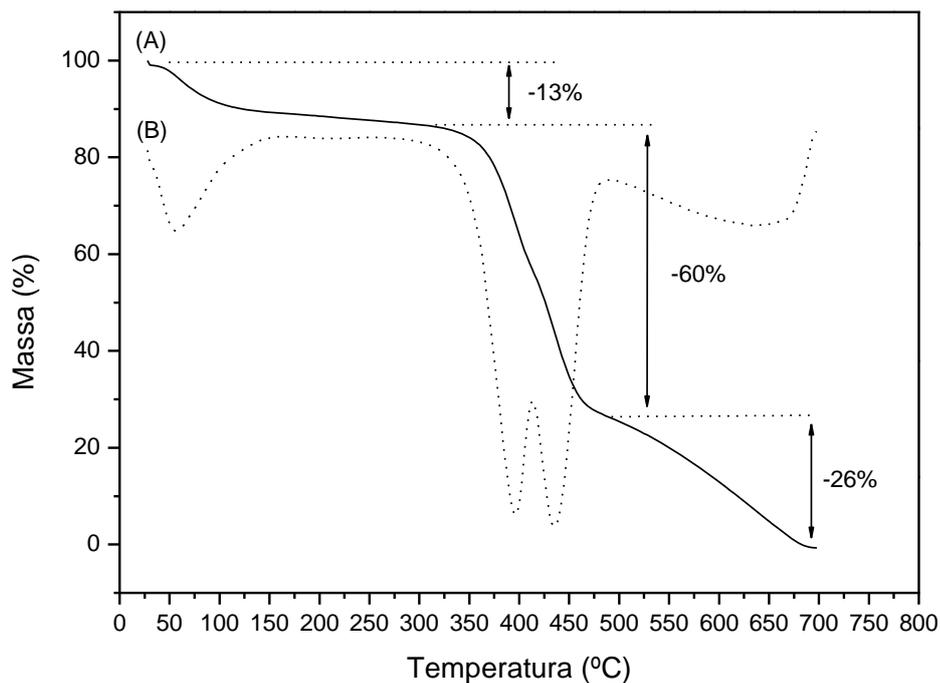


Figura 7.15: Curva termogravimétrica de uma amostra de CB[6] (A) e derivada do espectro (B).

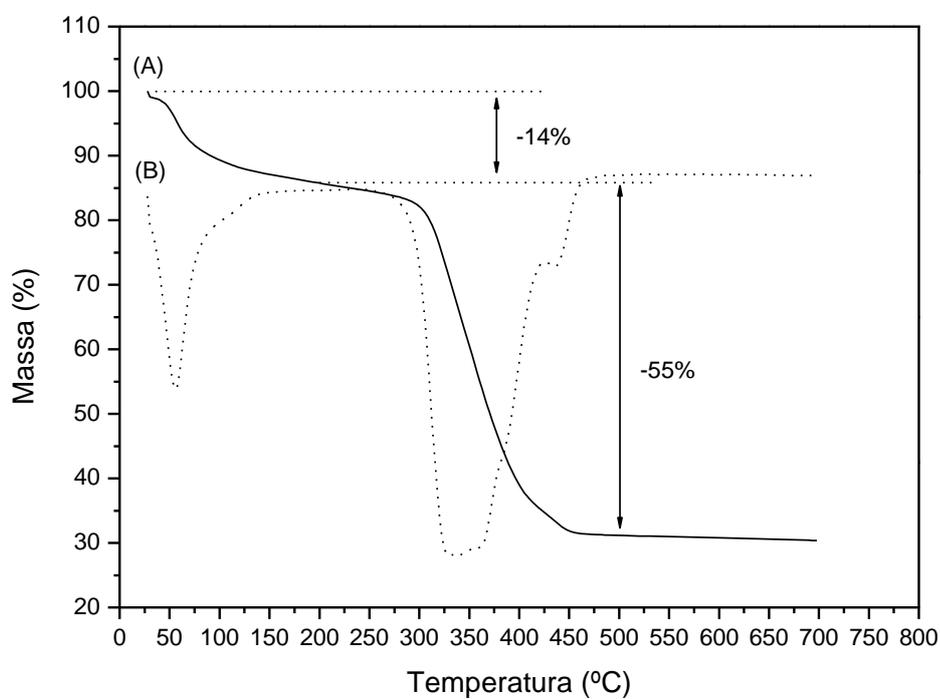


Figura 7.16: Curva termogravimétrica de uma amostra de CB[6]/FeDETC (A) e derivada do espectro (B).

7.5.4 – Estequiometria do complexo CB[6]/FeDETC.

Para verificar qual a quantidade máxima em mols de FeDETC é possível complexar por mol de CB[6], preparamos diversas soluções contendo sempre 80 mg de CB[6], que corresponde a $8,03 \times 10^{-5}$ mols, e diferentes quantidade de FeDETC. A concentração de FeDETC nas soluções foram sempre a máxima (14,8 M). A quantidade de FeDETC foi controlada através do volume da solução. As soluções foram mantidas sob agitação moderada por 2 dias, a temperatura de 30°C. Em seguida a solução foi filtrada e o complexo CB[6]/FeDETC foi seco em dessecador por um dia e pesado. Através do peso inicial do CB[6] e do peso final do complexo FeDETC/CB[6] foi possível calcular a quantidade complexada de FeDETC. É importante ressaltar que o CB[6] não é solúvel em DMF e apenas permanece em suspensão na solução.

A Figura 7.17 mostra que o número de mols de FeDETC complexado no CB[6] aumenta em função do número de mols inicial de FeDETC, se estabilizando em torno da quantidade molar inicial de FeDETC de $4,5 \times 10^{-4}$ mol. Essa concentração corresponde a uma razão molar de CB[6]/FeDETC é de 1:2,08. Cada ponto desta curva representa a média entre 6 medidas.

O grande desvio padrão evidenciado pela Figura 7.17 pode ser devido a diferenças nos parâmetros de preparação de diferentes lotes de sensores, como diferença de temperatura, pequenas diferenças na velocidade de agitação, e grau de absorção de água pelo DMF durante a preparação e pela perda de amostra durante a filtragem, já que o o FeDETC é um pó bastante fino que, mesmo quando centrifugado e filtrado com membrana de diâmetro de poros de 0,11 μm , é perdido em quantidade relativamente grande. Para evitar a perda de amostra, o filtrado foi centrifugado por 10 minutos a 2000 rpm e filtrado novamente, a fim de recolher maior quantidade do complexo.

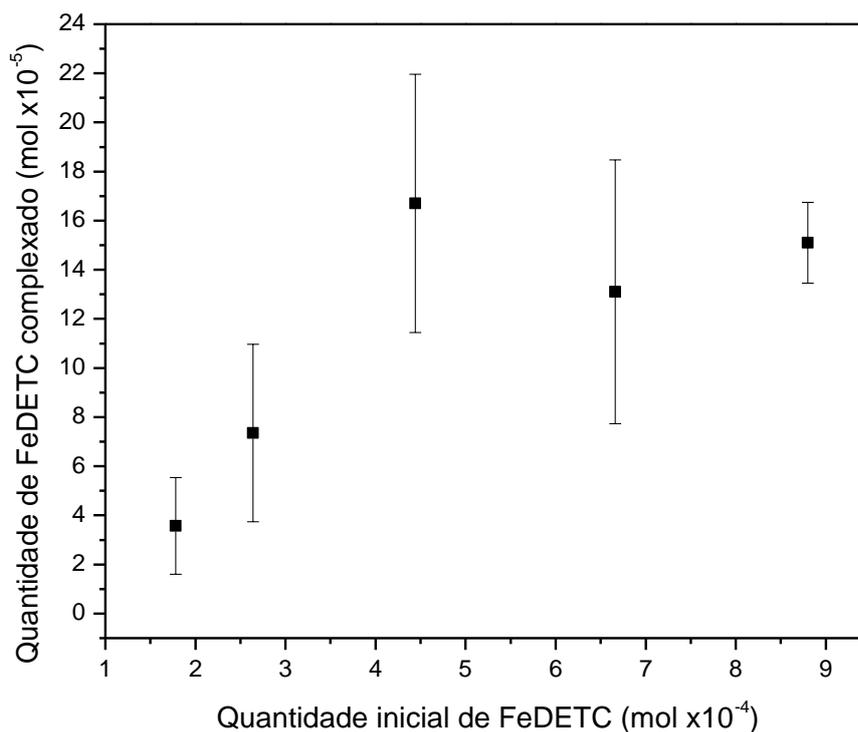


Figura 7.17: Número de mols de FeDETC complexado em função do número de mols de FeDETC inicial.

7.5.5 – Modelagem molecular das moléculas de CB[6] e FeDETC

A modelagem molecular das moléculas de CB[6] e FeDETC foram realizadas por Augusto B. Neto, do LNMD. Foi utilizado o pacote computacional GAMESS, com uma abordagem DFT com o funcional híbrido B3LYP. As funções de base utilizadas foram: 6-31G para todos os átomos do CB[6] e 6-31G(2d,1p) para a molécula de FeDETC. Estes cálculos são preliminares e necessitam de refinamento.

A Figura 7.18 mostra o mapa de potencial eletrostático da molécula de CB[6]. A cavidade da molécula, bem como seu portal, possuem potencial negativo, enquanto seu exterior possui potencial positivo. Este resultado está de acordo com a literatura [37,43].

A Figura 7.19 mostra o mapa de potencial eletrostático da molécula de FeDETC. A molécula apresenta uma de suas extremidades com potencial positivo e a outra com potencial negativo. Os resultados preliminares dos cálculos DFT mostraram ainda que é possível acomodar até duas moléculas de FeDETC na cavidade da molécula de CB[6].

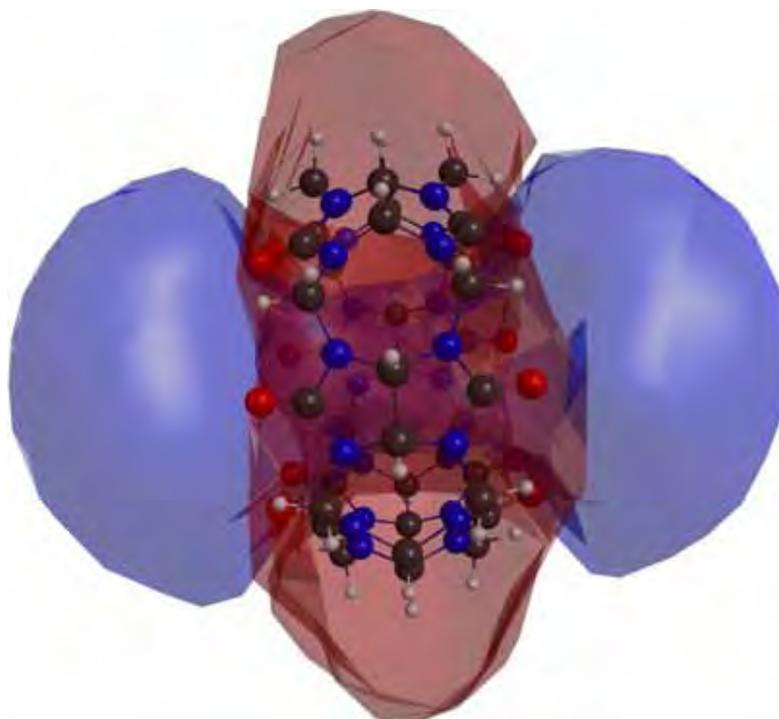


Figura 7.18: Mapa de potencial eletrostático da molécula de CB[6]. A cor azul mostra a região com potencial negativo, enquanto a vermelha mostra a região com potencial positivo.

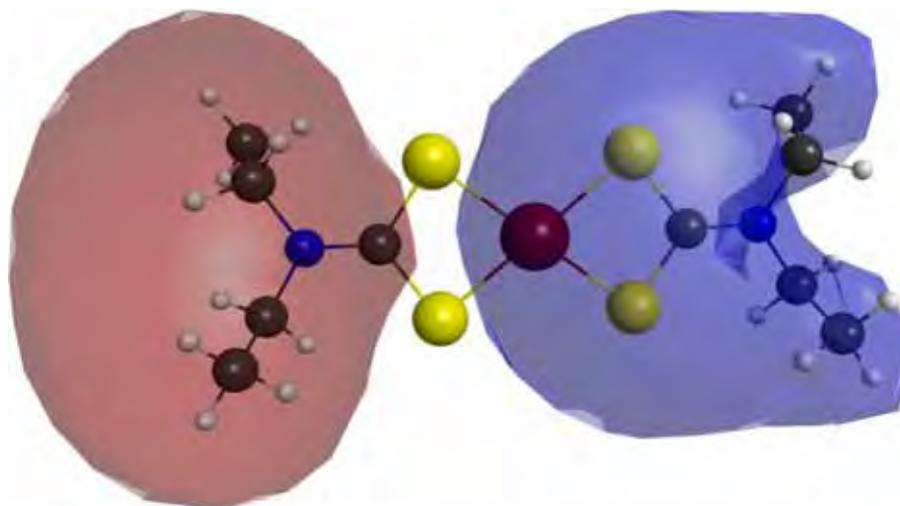


Figura 7.19: Mapa de potencial eletrostático da molécula de FeDETC. A cor azul mostra a região com potencial negativo, enquanto a vermelha mostra a região com potencial positivo.

7.5.6 – Estrutura molecular do sensor CB[6]/FeDETC

Os resultados da análise RMN e FTIR mostraram alteração na estrutura eletrônica dos grupos C=O, CH, CH₂ e C-N da molécula de CB[6], indicando que a molécula de FeDETC interagiu não apenas com o portal da cavidade do CB[6], mas com toda a molécula.

Com relação à molécula de FeDETC, foi possível apenas a identificação da banda relativa à ligação C-N. As demais bandas estão sobrepostas às bandas da molécula de CB[6]. Isto impede a proposição de quais sítios da molécula de FeDETC interagem com a de CB[6]. No entanto, podemos supor que uma das extremidades, ou ambas, da molécula de FeDETC está interagindo eletrostaticamente com a molécula de CB[6].

A estequiometria do complexo, sugerida pelos cálculos estequiométricos e análise TG, sugere que a molécula de FeDETC pode estar se complexando também pelo lado exterior da cavidade da molécula de CB[6].

Ao trabalhar com o complexo CB[6]/FeDETC em solução de NO, notou-se que o complexo sofreu grande dispersão e pequena solubilização na solução de NO, o que pode indicar que o complexo não está sofrendo polimerização. Então, uma hipótese de uma molécula de FeDETC estar se complexando com suas moléculas de CB[6] se torna menos provável.

Existe ainda a possibilidade da molécula de FeDETC ter sido quebrada durante a complexação, como foi sugerido pelo resultado das medidas RPE. Esta hipótese não pode ser comprovada através das medidas FTIR, já que a banda referente à ligação Fe-S não pode ser distinguida no espectro.

Baseando-se nesses resultados, juntamente com o da modelagem molecular, podemos supor que uma das extremidades da molécula de FeDETC está penetrando na cavidade do CB[6], com a extremidade oposta para fora do portal da cavidade. A figura 7.20 mostra a estrutura proposta para este complexo. O átomo de ferro pode estar localizado nas proximidades do portal, do lado de fora da cavidade. O lado da molécula de FeDETC que se encontra externa à cavidade, pode estar interagindo de forma fraca com o exterior de outra molécula de CB[6]. Esta proposta está também de acordo com a forma do espectro RPE obtido, que sugere que a molécula de NO não está presa, mas possui liberdade para se movimentar.

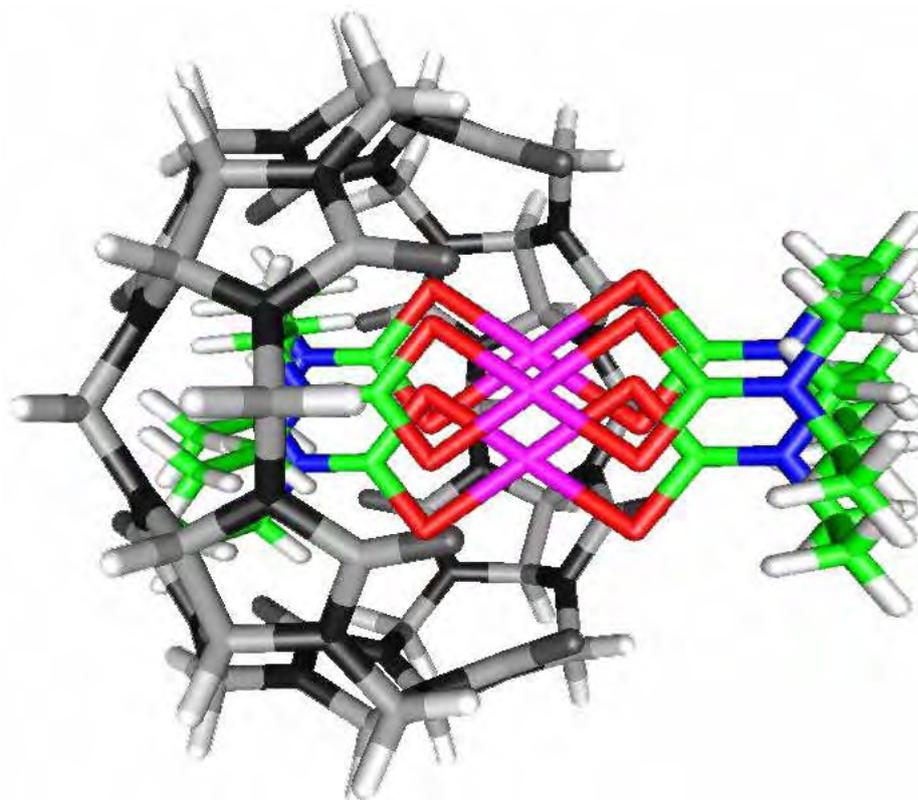


Figura 7.20: Estrutura proposta para o complexo de inclusão CB[6]/FeDETC. A molécula de CB[6] é mostrada em tons de cinza, enquanto a molécula de FeDETC é mostrada em cores.

8 – ANÁLISE DA PERFORMANCE DOS SENSORES

8.1 - Sensores baseados em PPO400/FeDETC

A figura 8.1 apresenta os sinais típicos de sensores de NO baseados em PPO400/FeDETC expostos a concentrações de NO entre 1 mM e 10 μ M. Esta figura mostra que amplitude pico a pico do sinal aumenta com o aumento da concentração de NO. As medidas RPE foram tomadas no espectrômetro Miniscope, com potência de 50,12 mW, amplitude de modulação de 0,7 mT e ganho 1.

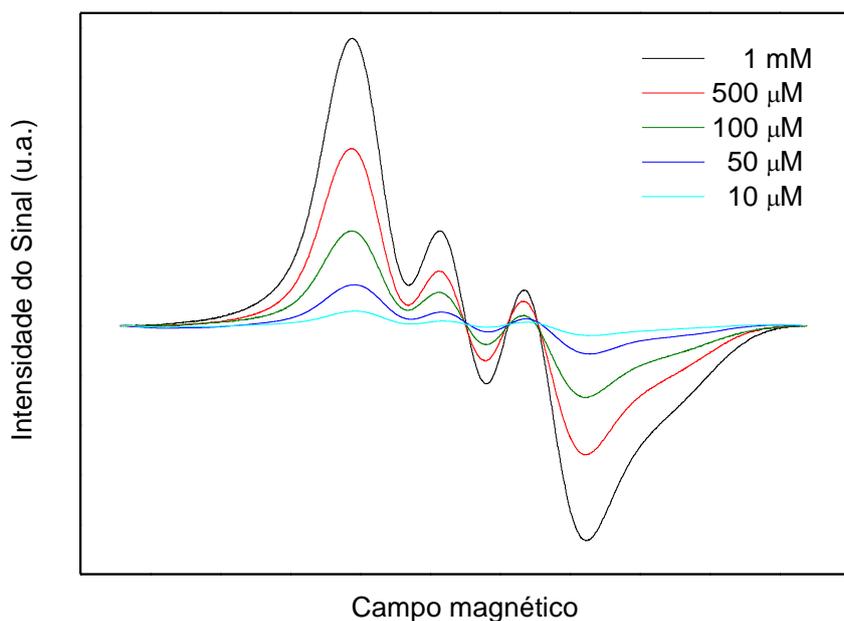


Figura 8.1: Sinais RPE típicos de sensores de NO baseados em PPO400/FeDETC, expostos a concentrações de NO entre 1 mM e 10 μ M.

A Figura 8.2 mostra a curva de calibração do sensor de PPO400, para um intervalo de concentração de 10 μ M a 2 mM. Esta curva foi obtida expondo 30 mg do sensor de

PPO400/FeDETC a soluções de concentrações conhecidas de NO. Cada ponto representa a média de 3 amostras.

A partir do ponto referente a $[\text{NO}]=1 \text{ mM}$, a intensidade se estabilizou, indicando que possivelmente a quantidade de agentes complexantes de NO é menor que a quantidade de NO disponível na solução. A estabilização do sinal pode ainda ser devido á possível dificuldade do NO se difundir para dentro da matriz de PPO.

Na referida figura, a reta representa uma regressão linear com $R^2=0,983$, que representa uma boa linearidade entre a amplitude pico a pico do sinal e a concentração de NO na solução. Esta relação é dada por:

$$\text{Amplitude} = 552,108 + 1,113 \times 10^7 * [\text{NO}]$$

Com o ganho de 1, o sinal pôde ser acompanhado até a concentração de $10 \mu\text{M}$.

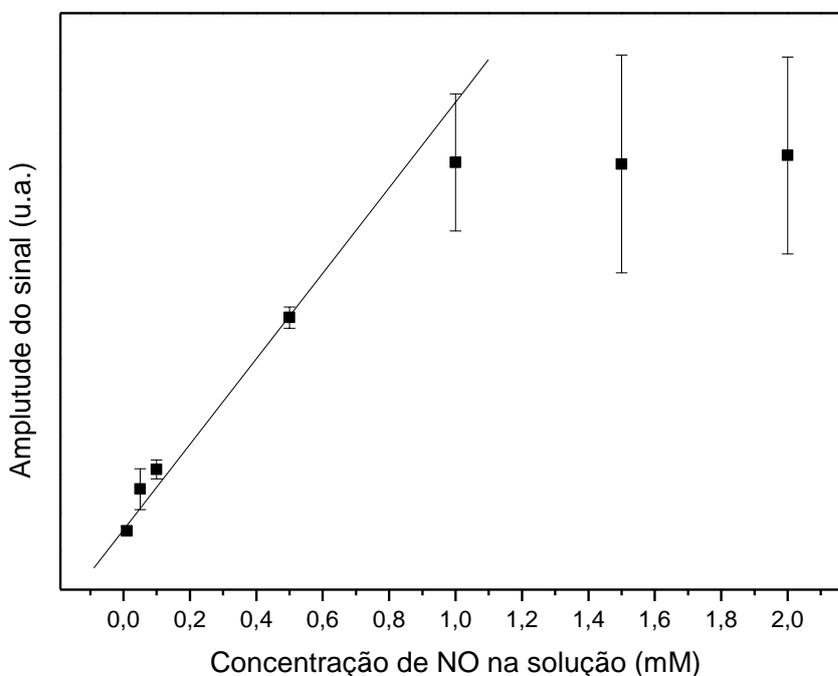


Figura 8.2: Curva de calibração do sensor PPO400/FeDETC, para o intervalo de concentração de NO entre $10 \mu\text{M}$ e 2 mM .

Para concentrações menores, o ganho foi aumentado para 50, para que o sinal possa ser obtido. A Figura 8.3 mostra os sinais típicos de sensores PPO400/FeDETC expostos a baixas concentrações de NO. Com o aumento do ganho, o sinal pôde ser acompanhado até a concentração de 100 nM.

A reta representa a regressão linear com $R^2=0,977$. Desta forma, o sensor apresentou uma boa linearidade entre a amplitude pico a pico do sinal e a concentração de NO na solução. Esta relação é dada por:

$$\text{Amplitude} = 314,627 + 2,506 \times 10^8 * [\text{NO}]$$

Desta forma, podemos indicar as principais propriedades do sensor de NO baseado em PPO400/FeDETC:

- Sensibilidade: $2,5 \times 10^8 \mu\text{M}^{-1}$ (para concentrações abaixo de 1 mM)
- Faixa de trabalho: 100 nM a 1 mM

Durante a preparação do complexo FeDETC, tanto o Fe^{2+} e Fe^{3+} provenientes dos reagentes podem se complexar com o DETC, formando os complexos $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{DETC})_2$ e $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{DETC})_3$. [66,67] O sensor baseado em PPO possui em seu interior complexos FeDETC com dois estados de oxidação distintos: Fe^{2+} e Fe^{3+} . O complexo Fe^{3+} -NO não é paramagnético, portanto, não exibe sinal RPE. Desta forma, a amplitude do sinal não reflete a real quantidade de NO aprisionada no sensor.

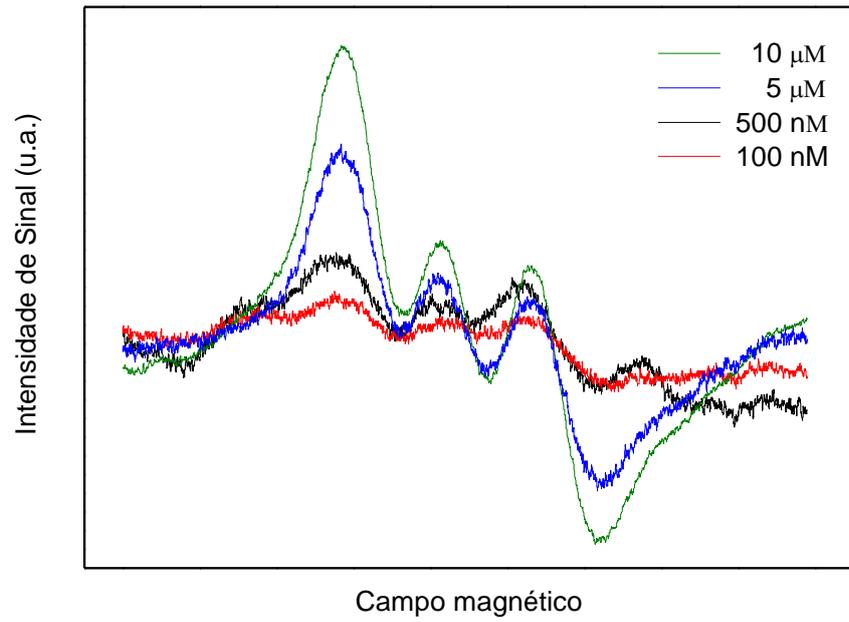


Figura 8.3: Sinais RPE típicos de sensores de NO baseados em PPO400/FeDETC, expostos a concentrações de NO entre 100 nM a 10 μM .

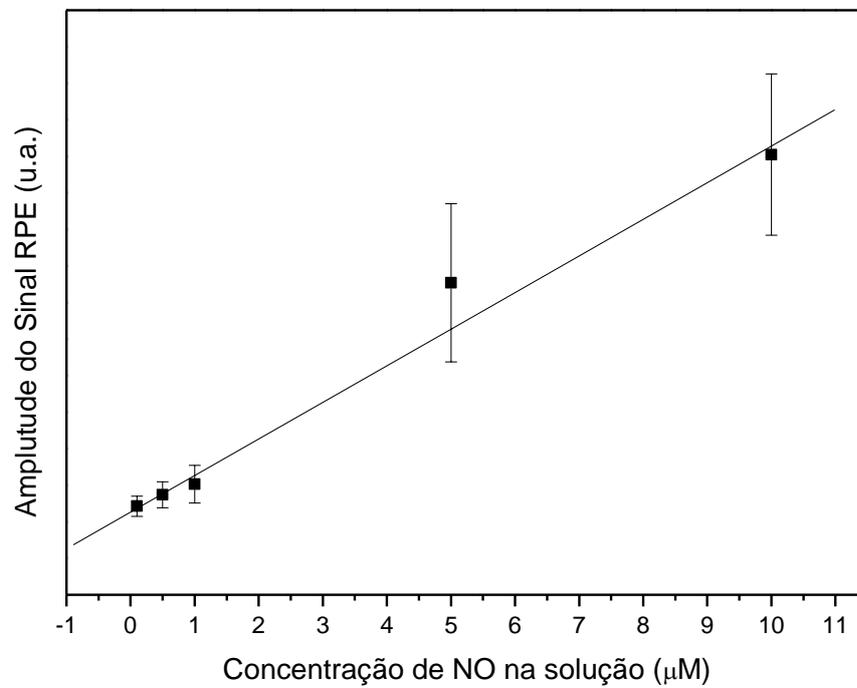


Figura 8.4: Curva de calibração do sensor PPO400/FeDETC, para o intervalo de concentração de NO entre 100 nM a 10 μM .

8.2 - Sensores baseados em CB[6]/FeDETC

A caracterização do sensor CB[6]/FeDETC foi realizada em função do número de sítios paramagnéticos, ou número de spins, no sensor. Para calcular o número de sítios paramagnéticos no sensor CB[6]/FeDETC foi obtido o sinal RPE de uma amostra padrão de silício que contém $1,13 \times 10^{15}$ spins. A medida foi realizada com amplitude de modulação de 0,7 mT, potência de microondas de 50 mW e ganho de 20. A dupla integração desse sinal resultou numa área normalizada pelo ganho de 17,19 u.a.

A dupla integração do sinal obtido do sensor de CB[6]/FeDETC/NO exposto a maior concentração de NO, medido nas mesmas condições experimentais que o padrão de silício, resultou numa área normalizada pelo ganho de 868,09 u.a. A amplitude pico a pico do sinal RPE desta amostra é de 10176 u.a. Desta forma, o número de spins na amostra é de $7,99 \times 10^{16}$ spins. A relação entre o número de spins do sensor e a amplitude do sinal RPE normalizada pelo ganho é de $3,92 \times 10^{13}$. Para as demais amostras de sensor CB[6]/FeDETC, o número de spins foi calculado através da amplitude do sinal normalizada pelo ganho, utilizando-se esta relação. A seguir serão discutidas as principais características do sensor CB[6]/FeDETC.

8.2.1 - Estabilidade do sinal do sensor CB[6]/FeDETC

Devido à alta reatividade do NO, é necessário avaliar a estabilidade do sinal EPR no sensor CB[6]/NO. Para avaliarmos a estabilidade do sinal EPR dos sensores, monitoramos o sinal em função do tempo, observando como se modifica o número de spins no sensor.

A Figura 8.5 mostra a dependência número de spins no sensor com o tempo. Os sensores foram estocados em temperatura de 25°C e atmosfera ambiente, durante a análise. Esta figura mostra que a intensidade do sinal RPE do sensor caiu com o tempo.

O tempo de meia vida do decaimento do número de spins é $T_{1/2}=20$ h. O sinal RPE característico do NO pode ser monitorado por 30 dias após o aprisionamento do NO. A redução da intensidade do sinal com o tempo pode estar associada à descomplexação do NO com o ferro, promovendo a liberação do NO.

A medida do sinal RPE do sensor pode ser feita várias horas após o aprisionamento do NO, ao contrário dos sensores líquidos já existentes. No entanto, a queda do sinal nas primeiras horas após o aprisionamento do NO, requer que a medida RPE seja efetuada sempre no mesmo tempo até a medida, utilizado para a confecção da curva de calibração do sensor.

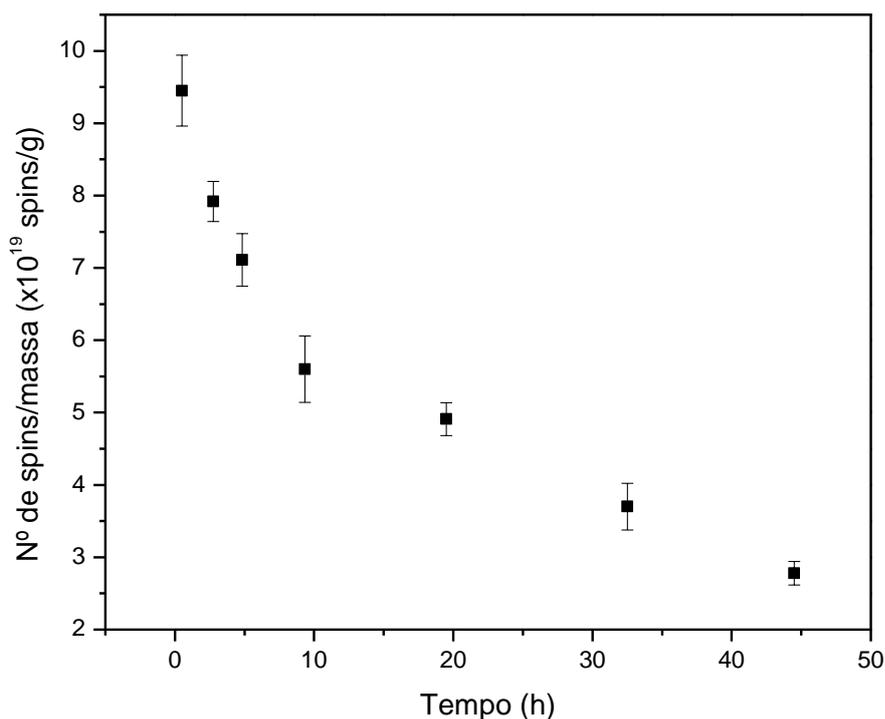


Figura 8.5: Número de spins no complexo CB[6]/FeDETC/NO em função do tempo.

8.2.2 – Reposta do sensor em função da concentração do NO em solução

Sensores baseados no sistema CB[6]/FeDETC foram mergulhados em soluções de NO com concentração variando entre 2 mM e 600 nM, por 30 minutos. Após filtração em sistema de membrana e secagem por 30 minutos, o espectro RPE das amostras foram tomados, utilizando-se o espectrômetro RPE Miniscope. Cada medida foi realizada com quantidade média de 14 mg de amostra, utilizando-se amplitude de modulação de 0,7 mT e potência de 50,12. O ganho de cada medida foi ajustado a fim de se obter a maior amplitude de sinal possível, para cada amostra.

A Figura 8.6 mostra a relação entre o número de spins no sensor CB[6]/FeDETC em função da concentração de NO na solução. Observa-se que o número de spins diminui com a diminuição da concentração de NO. Este resultado mostra que o sistema CB[6]/FeDETC é promissor quanto à aplicação como sensor de NO.

A menor concentração de NO em que o sensor apresentou sinal RPE foi de 100 nM. Para concentrações inferiores a esta, o NO pode estar sendo totalmente oxidado pelo oxigênio presente na solução, além de se difundir para a atmosfera.

Para concentrações de NO superiores a 1 mM, o N° de spins/massa do sensor se manteve estável. Isto pode ser devido ao fato de que esta concentração está próxima da saturação (1,9 mM). Há perda de NO devido a difusão para atmosfera e oxidação pelo O₂ presente na solução. Além disso, 10 mL de uma solução de NO com concentração de 1,9 mM fornece $1,14 \times 10^{19}$ moléculas de NO enquanto a massa média de sensor em solução, de 14 mg, corresponde a cerca de $4,48 \times 10^{18}$ sítios disponíveis para aprisionamento do NO, sendo que alguns desses sítios são de Fe³⁺, que não exhibe sinal RPE. Então a estabilização da curva pode ser justificada também pela quantidade de sítios de Fe²⁺ ser menor que a quantidade de NO presente em solução.

O sensor apresentou uma faixa linear de trabalho entre 100 nM e 10 mM. Foi feita então uma regressão linear nessa faixa, a fim de determinar a sensibilidade do sensor. Foi obtido uma reta cuja equação é dada por:

$$(\text{N}^\circ \text{ de spins/Massa}) = 8,55 \times 10^{22} * (\text{Concentração de NO})$$

A sensibilidade do sensor é de $8,55 \times 10^{22} \text{ spins.g}^{-1}.\text{M}^{-1}$, e o coeficiente de correlação da curva é $R^2=0,93$. Desta forma, apesar do sensor apresentar um grande sensibilidade, ele apresenta uma baixa confiabilidade. Como a sensibilidade do espectrômetro RPE utilizado é de $8 \times 10^9 \text{ spins/g}$, as medidas efetuadas não se aproximaram do limite do equipamento.[58]

A Figura 8.7 mostra sinais RPE do sensor CB[6]/FeDETC exposto à soluções de NO com concentrações de 1 mM (A), 100 nM (B) e sem a presença de NO (C), na qual é possível perceber a relação sinal/ruído do sensor. A relação sinal/ruído tem uma grande diminuição para o sensor exposto à concentração mais baixa de NO, em relação ao exposto à concentração mais alta.

A intensidade pico a pico do branco (ruído) tem um valor médio de 45,50 u.a., com desvio padrão de 3,69 u.a. Em termos de spins/g, isto corresponde a um valor médio de $9,73 \times 10^{14} \text{ spins/g}$, com desvio padrão de $7,98 \times 10^{13} \text{ spins/g}$. Desta forma, através da Equação 6.3, foi calculado o limite de detecção no domínio do sinal, que vale $LD_S=1,21 \times 10^{15} \text{ spins/g}$. De posse desses valores, através da Equação 6.4, foi calculado o limite de detecção do sensor CB[6]/FeDETC no domínio das concentrações, que é de $LD_C=2,9 \text{ nM}$.

Utilizando-se a Equação 6.5, foi determinado o limite de quantificação no domínio do sinal, com sendo de $LQ_S=1,37 \times 10^{15} \text{ spins/g}$. No domínio das concentrações, o limite de quantificação foi determinado pela Equação 6.5, com o valor de $LQ_C=16 \text{ nM}$.

Este limite de detecção é três ordens de grandeza menor que o alcançado pelo método de Griess, que é o mais utilizado comercialmente [17]. É comparável com a da

maioria dos sensores descritos na literatura [15,16]. No entanto, é cerca de duas ordens de grandeza maior que os sensores com menor limite de detecção já construídos [15].

A faixa de trabalho do sensor, dada pelos limites inferiores e superiores do limite de quantificação, é de $1,37 \times 10^{15}$ spins/g a $9,88 \times 10^{18}$ spins/g. O sensor apresenta ainda uma grande especificidade, inerente a técnica de construção utilizando-se carbamatos e medida por RPE, como já é bem estabelecido na literatura [29,59].

Para melhor análise dos resultados, a escala da curva de calibração do sensor foi ajustada para logarítmica, em ambos os eixos, como mostra a Figura 8,8. A regressão linear é mostrada na figura e é dada pela seguinte relação:

$$\log(\text{N}^\circ \text{ de spins/Massa}) = 20,972 + 0,585 * \log(\text{Concentração de NO})$$

Neste caso, o coeficiente de correlação é $R^2=0,977$. Desta forma, trabalhando-se com a escala logarítmica, a linearidade do sensor é maior, levando a uma maior confiabilidade

A boa performance do sensor CB[6]/FeDETC pode ser devida a localização do sítio de ferro fora da cavidade do CB[6], o que facilita a difusão e complexação do NO.

É importante ressaltar que os parâmetros do sensor, discutidos anteriormente, valem para a sua aplicação na determinação do NO sem solução aquosa. O sensor pode ser aplicado desde na determinação de NO em sangue, órgãos e tecidos aos gases do escapamento de automóveis e atmosfera. Para cada aplicação, os parâmetros do sensor devem ser determinados especificamente.

Os parâmetros do sensor aplicado à determinação do NO em solução aquosa podem não refletir todo o potencial do sensor, já que ocorre grande oxidação do NO devido ao O_2 presente em solução. A reação de produção de NO, dada pela equação 6.1, também produz O_2 como sub-produto. Além disso, ocorre a difusão de NO da solução para a atmosfera. Devido à esses fatores, a concentração de NO presente na solução é menor que a concentração atribuída nos experimentos.

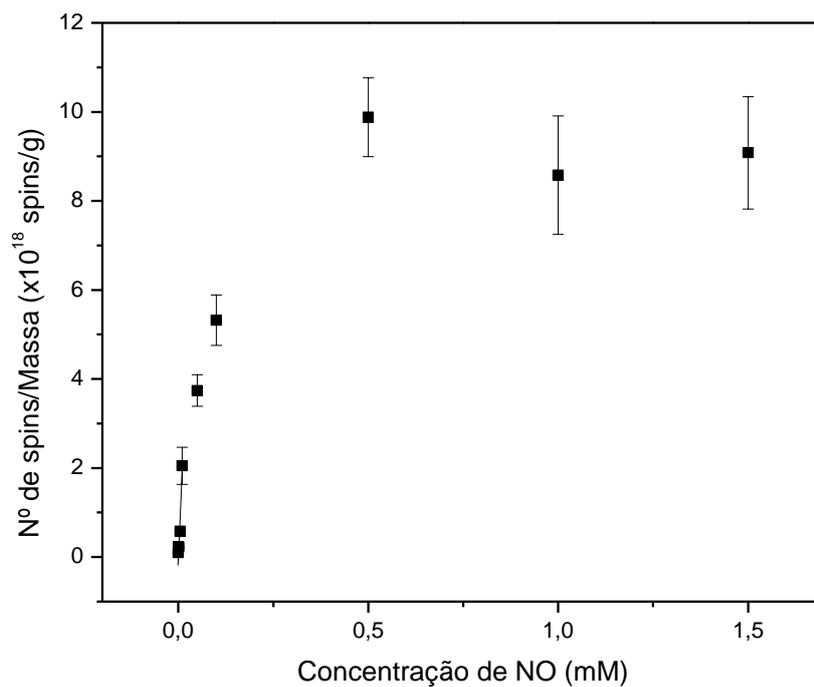


Figura 8.6: Curva de calibração do sensor CB[6]/FeDETC.

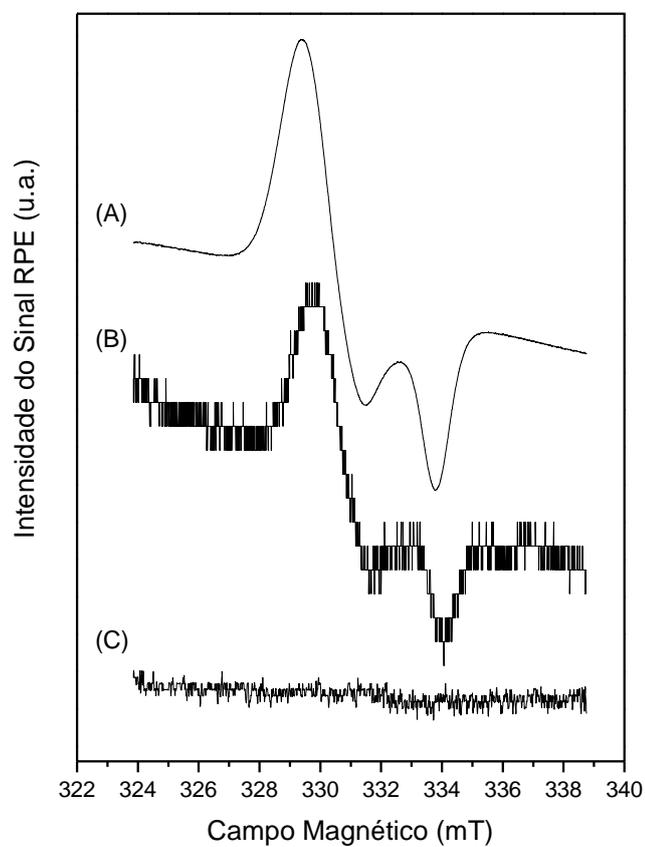


Figura 8.7: Sinais RPE do sensor CB[6]/FeDETC exposto à soluções de NO com concentrações de 1 mM (A), 500 nM (B) e sem a presença de NO (C).

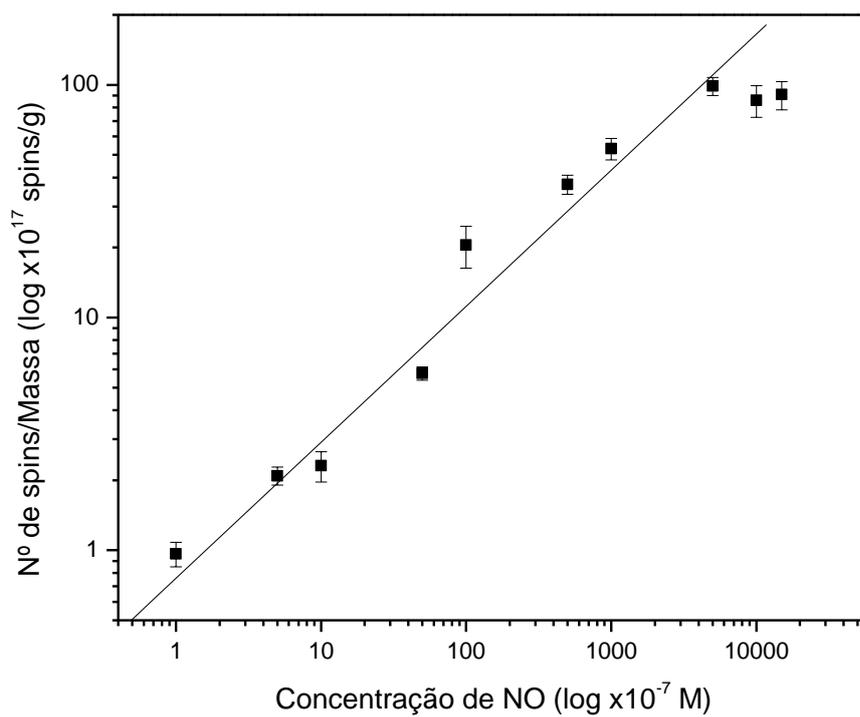


Figura 8.8: Curva de calibração do sensor CB[6]/FeDETC em escala logarítmica.

9 – CONCLUSÕES

Foi desenvolvido e caracterizado um complexo de inclusão entre as moléculas de FeDETC e CB[6], além de um material sol-gel baseado no precursor PPO400 com FeDETC incluído. A caracterização desses materiais demonstraram que são sensores para NO por EPR de bom desempenho.

O sensor baseado em PPO, apresentou sensibilidade de $2,5 \times 10^8 \mu\text{M}^{-1}$, com faixa de trabalho entre 100 nM e 1 mM. O sensor CB[6]/FeDETC apresenta elevada estabilidade do complexo ferronitrosil. O limite de detecção desse sensor é de 2,9 nM, limite de quantificação de 16 nM. A faixa de trabalho desse sensor é de $1,37 \times 10^{15}$ spins/g a $9,88 \times 10^{18}$ spins/g. O bom desempenho de sensor pode ser devido ao fato de, no complexo de inclusão, a molécula de FeDETC penetrar apenas parcialmente na de CB[6], deixando o átomo de ferro exposto, acessível à molécula de NO.

A oxidação do NO na solução e difusão para a atmosfera provocam uma diminuição no valor da concentração das soluções padrão utilizadas na construção da curva de calibração do sensor. Desta forma, as soluções possuem concentração menor que a atribuída durante os experimentos. Então, novos experimentos com soluções de NO com concentrações mais precisas podem demonstrar que o desempenho dos sensores pode ser melhor que o demonstrado nesse trabalho. A perda de material durante o processo de filtragem do sensor de CB[6]/FeDETC contribui para a perda de desempenho do sensor, já que as moléculas que são perdidas para a solução são mais expostas ao NO e levam consigo grande quantidade deste.

A Tabela 9.1 apresenta a comparação da estabilidade e menor concentração que apresentou sinal RPE entre os sensores de PPO400/FeDETC, CB[6]/FeDETC e os sensores sólidos já produzidos em nosso laboratório. Observamos que o sensor de PPO400 apresentou estabilidade equivalente ao sensor mais estável já obtido (látex), e menor limite de detecção.

Este sensor apresentou uma melhoria na estabilidade mecânica em relação ao sensor baseado em TEOS, obtido pela mesma técnica, que se apresentou muito quebradiço. O sensor CB[6]/FeDETC apresentou o melhor desempenho, conseguindo medir menores concentrações de NO.

Tabela 9.1: Comparação entre as propriedades do sensor de PPO e outros sensores sólidos desenvolvidos em nosso laboratório.

	Látex	TEOS	PPO	CB[6]
Estabilidade (Dias)	40	15*	40	30
Menor concentração de NO mensurável (μM)	100	10	0,1	0,01

*A intensidade do sinal caiu pela metade após as primeiras 4 h

10 – REFERÊNCIAS

1. MELO, J. P.; BIAZZOTTO, J. C.; BRUNELLO, C. A.; GRAEFF, C. F. O. Solid state nitric oxide sensor prepared by sol-gel entrapment of iron-diethyldithiocarbamate in a siloxane matrix. **Journal of Non-Crystalline Solids**. v.348, p.235-239, 2004.
2. 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. **Mat. Res. Soc. Symp. Proc.** v.723, 2002.
3. HERCULANO, R. D.; BRUNELLO, C. A.; GRAEFF, C. F. O. Solid State Nitric Oxide Sensor Using a Latex Rubber Matrix. **Macromol. Symp.** v.245–246, p.529–532, 2006.
4. PALMER, P. M. J.; FERRIGE, A. G; MONCADA, S. Nature. v.327, n.524, 1987.
5. GREEN, L. C.; TANNENBAUM, S. R.; GOLDMANN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science**. v.212, p.56-58, 1981.
6. REES, D. D.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. PROC. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. **Natl. Acad. Sci. USA**. v.86, p.3375-3378, 1989.
7. BIAZZOTTO, J. C.; BORIN, J. F.; FARIA, R. M.; GRAEFF, C. F. O. IN: K. J. SHEA, M. J. ROBERTS, M. Molecularly Imprinted Materials-Sensors and Other Devices. **MRS**. v.7, p. 723, 2002.
8. CHUNG, K. K. K.; DAVID, K. K. Emerging roles of nitric oxide in neurodegeneration. **Nitric Oxide**. v.22, p.290–295, 2010.
9. THOMAS, D. D.; RIDNOUR, L. A.; ISENBERG, J. S.; FLORES-SANTANA, W.; SWITZER, C. H.; DONZELLI, S.; HUSSAIN, P.; VECOLI, C.; PAOLOCCI, N.; AMBS, S.; COLTON, C. A.; HARRIS, C. C.; ROBERTS, D. D.; WINK, D. A. The chemical

- biology of nitric oxide: Implications in cellular signaling. **Free Radical Biology & Medicine**. v.45, p.18–31, 2008.
10. UMATHE, S. N.; BHUTADA, P. S.; JAIN, N. S.; MUNDHADA, Y. R.; BORKAR, S. S.; DHUMAL, B. Role of nitric oxide in obsessive–compulsive behavior and its involvement in the anti-compulsive effect of paroxetine in mice. **Nitric Oxide**. v.21, p.140–147, 2009.
 11. SCHWENTKER, A.; VODOVOTZ, Y.; WELLER, R.; BILLIAR, T. L. Nitric oxide and wound repair: role of cytokines? **Nitric Oxide**. v.7, p.1–10, 2002.
 12. GILANI, M.; KAISER, D. R.; BRATTELI, C. W.; ALINDER, C.; RAJALA, S.; BANK, A. J.; COHN, J. N. Role of nitric oxide deficiency and its detection as a risk factor in pre-hypertension. *J. of the Amer. Soc. of Hypert.* v.1(1), p. 45–55, 2007.
 13. HALL, C. N.; GARTHWAITE, J. What is the real physiological NO concentration in vivo? **Nitric Oxide**. v.21, p.92–103, 2009.
 14. BARRETO, R. L.; CORREIA, C. R. D.; MUSCARÁ, M. N. Óxido Nítrico: Propriedades e Potenciais usos Terapêuticos. **Quim. Nova**. v.28(6), p.1046-1054, 2005.
 15. Davies, I. R.; Zhang, X. Nitric Oxide Selective Electrodes. **Methods in Enzymology**. v.436. 2008.
 16. Schulz, K.; Kerber, S.; Kelm, M. Reevaluation of the Griess Method for Determining NO/NO₂⁻ in Aqueous and Protein-Containing Samples. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**. v.3, n.3, p.225–234, 1999.
 17. Disponível em <<http://www.promega.com/resources/protocols/technical-bulletins/0/griess-reagent-system-protocol/>>. Acesso em 06 de junho de 2011.
 18. Disponível em <<http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp07921.pdf>>. Acesso em 06 de junho de 2011.
 19. Disponível em <<http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Bulletin/g4410bul.Par.0001.File.tmp/g4410bul.pdf>>. Acesso em 05 de junho de 2011.

20. NAGANO, T.; YOSHIMURA, T. Bioimaging of Nitric Oxide. **Chem. Rev.** v.102, p.1235-1269, 2002
21. TSUCHIYA, K.; YOSHIKUMI, M.; HOUCHI, H.; MASON, R. P. Nitric Oxide-forming Reaction between the Iron-N-Methyl-D-glucamine Dithiocarbamate Complex and Nitrite. **J Biol Chem.** v.275, n.3. Janeiro, p.1551–1556, 2000.
22. LU, C.; KOPPENOL, W. Redox cycling of iron complexes of N-(dithiocarboxy)sarcosine and N-methyl-d-glucamine dithiocarbamate. **Free Radical Biology & Medicine.** v.39, p.1581 – 1590, 2005.
23. WEAVER, J.; PORASUPHATANA, S.; TSAI, P.; BUDZICHOWSKI, T.; ROSEN, G. M. Spin trapping nitric oxide from neuronal nitric oxide synthase: A look at several iron-dithiocarbamate complexes. **Free Radical Research.** v.39, n.10, p.1027-1033, 2005.
24. POU, S.; TSAI, P.; PORASUPHATANA, S.; HALPERN, R. J. CHANDRAMOULI, G. V. R.; BARTH, E. D.; ROSEN, G. M. Spin trapping of nitric oxide by ferro-chelates: kinetic and in vivo pharmacokinetic studies. **Biochimica et Biophysica Acta.** v.1427, p.216-226, 1999.
25. MÜLSCH, A.; MORDVINTCEV, P.; BASSENGE, E.; JUNG, F.; CLEMENT, B.; BUSSE, R. In Vivo Spin Trapping of Glyceryl Trinitrate–Derived Nitric Oxide in Rabbit Blood Vessels and Organs. **American Heart Association, Inc.**v.92, p.1876-1882.
26. REZENDE, S. M.; Ressonância Magnética II: Ressonância Ferromagnética e Ondas de Spin. **Escola Brasileira de Magnetismo.** Rio de Janeiro. Resumos: São Paulo: SBF, v.2, p.15.1, 1999.
27. POOLE JR., C. P. **Electron Spin Resonance.** Wiley-Interscience. 2.ed. New York: 1967.
28. POOLE JR., C. P.; FARACH, H. A. **Handbook of Electron Spin Resonance.** AIP. New York: 1994.

29. BRUSTOLON, M. GIAMELLO, E. **Electron Paramagnetic Resonance**. Wiley-Interscience. New Jersey: 2009.
30. BORIN, J. F. **Estudos de ressonância paramagnética eletrônica de óxido nítrico ligado a complexos de ferro**. 2003. 137f. Tese (Doutorado em ciências). FFCLRP/USP, Ribeirão Preto, 2003.
31. WEIL, J. A.; BOLTON, J. R.; WERTZ, J. E. **Electron Paramagnetic Resonance. Elementary Theory and Practical Applications**. Wiley-Interscience. New York: 1994.
32. CALAS, G. **Electron paramagnetic resonance**. Reviews in Mineralogy and Geochemistry. v.18; n.1, p.513-571, 1988.
33. KARCHER, S.; LLER, A. K.; JEKEL, M. Cucurbituril for Water Treatment. Part I: Solubility of Cucurbituril and Sorption of Reactive Dyes. **Wat. Res.** v.35, n.4, p.3309–3316, 2001.
34. LLER, A. K., KARCHER, S.; JEKEL, M. Cucurbituril for Water Treatment. Part II: Ozonation and Oxidative Regeneration of Cucurbituril. **Wat. Res.** v.35, n.14, p.3317–3324, 2001.
35. KARCHER, S.; KORNMÜLLER, A.; JEKEL, M. Removal of Reactive Dyes by Sorption/Complexation with Cucurbituril. **Wat.Sci. and Tech.** v.40, n.4-5, p.425-433, 1999.
36. LIM, S.; KIM, H.; SELVAPALAM, N.; KIM, K.; CHO, S. J.; SEO, G.; KIM, K. Cucurbit[6]uril: Organic Molecular Porous Material with Permanent Porosity, Exceptional Stability, and Acetylene Sorption Properties. **Angew. Chem. Int.** v.47, p.3352 –3355, 2008.
37. LEE, J. W.; SAMAL, S.; SELVAPALAN, N.; KIM, H.; KIM, K. Cucurbituril Homologues and Derivatives: New Opportunities in Supramolecular Chemistry. **Acc. Chem. Res.** v.26, p.621-630, 2003.

38. MARQUEZ, C.; HUDGINS, R. R.; NAU, W. N. Mechanism of Host-Guest Complexation by Cucurbituril. **J. Am. Chem. Soc.** v.126, p.5806-5816, 2004.
39. LAGONA, J.; MUKHOPADHYAY, P.; CHAKRABARTI, S.; ISAACS, L. The Cucurbit[n]uril Family. **Angew. Chem. Int. Ed.** v.44, p.4844 – 4870, 2005.
40. XIAO, X.; TIANA, Z.; HEA, L.; XUEA, S.; ZHANGA, Y.; ZHUA, Q.; TAOA, Z. Supramolecular assemblies of host–guest complexes of cucurbit[6]uril with some organic molecules. **J. of Mol. Str.** v.965(1-3), p. 109-115, 2010.
41. VOSTRIKOVAA, K. E.; PERESYPKINAA, E. V.; DREBUSHCHAKA, V. A.; NADOLINNYA, V. A. Tuning of the nitronyl nitroxide radical magnetic and electronic properties by inclusion in cucurbit[n]urils. **Polyhedron**. Article in Press. 2011.
42. JEON, W. S.; MOON, K.; PARK, S. H.; CHUN, H.; HO KO, Y.; LEE, J. Y.; LEE, E. S.; SAMAL, S.; SELVAPALAM, N.; REKHARSKY, M. V.; SINDELAR, WL.; SOBRANSINGH, D.; INOUE, Y.; KAIFER, A. E.; KIM, K. Complexation of Ferrocene Derivatives by the Cucurbit[7]uril Host: A Comparative Study of the Cucurbituril and Cyclodextrin Host Families. **J. Am. Chem. Soc.** v.127, p.12984-12989, 2005.
43. DEMETS, G. F. CUCURBITURILAS. **Quim. Nova.** v.30, n.5, p.1313-1322, 2007.
44. CHAKER, J. A.; SANTILLI, C. V.; PULCINELLI, S. H.; DAHMOUCHE, A. K. BRIOISB,V; JUDEINSTEINC, P. Multi-scale structural description of siloxane–PPO hybrid ionic conductors doped by sodium salts. **J. Mater. Chem.** v.17, p.744–757, 2007.
45. ALFAYA, A. A. S.; KUBOTA, L. A Utilização de Materiais Obtidos pelo Processo de Sol-Gel na Construção de Biossensores. **Quim. Nova.** v.25(5), p.835-841, 2002.
46. CHAKER, J.; DAHMOUCHE, K.; BRIOIS, V.; SANTILLI, C. V.; PULCINELLI, S. H.; JUDEINSTEIN, P. Structure and Electrical Properties of Potassium-Doped Siloxane-Poly(oxypropylene) Ormolytes. **J. of Sol-Gel Sci. and Tech.** v.26, p.1075–1080, 2003.

47. SARMENTO, V. H. V.; DAHMOUCHE, K.; PULCINELLI, S. H.; SANTILLI, C. V. Effect of lithium doping on the evolution of rheological and structural properties during gelation of siloxane–poly(oxypropylene) nanocomposites. **J. Mater. Chem.** v.15, p.3962–3972, 2005.
48. CHAKER, J. A.; SANTILLI, C. V.; PULCINELLI, S. H.; DAHMOUCHE, K.; BRIOIS, V.; JUDEINSTEIN, P. Multi-scale structural description of siloxane–PPO hybrid ionic conductors doped by sodium salts. **J. Mater. Chem.** v.17, p.744–757, 2007.
49. CHIAVACCI, L. A.; DAHMOUCHE, K.; SILVA, N. J. O.; CARLOS, L. D.; AMARAL, V. S.; BERMUDEZ, V. Z.; PULCINELLI, S. H.; SANTILLI, C. V.; BRIOIS, V.; CRAIEVICH, A. F. Effect of presence of an acid catalyst on structure and properties of iron-doped siloxane-polyoxyethylene nanocomposites prepared by sol–gel. **J. of Non-Cryst. Solids.** v.345&346, 585–590, 2004.
50. SILVA, R. F. **Sistemas de liberação controlada de óxido nítrico baseados em ditiocarbamatos.** 92f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Materiais). POSMAT/FC/UNESP, Bauru, 2009.
51. THÉVENOT, D. R.; TOTH, K.; DURST, R. A.; WILSON, G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Bios. & Bioel.** V.16, p.121-131, 2001.
52. MOCÁK, J.; JANIGA, I.; RÁBAROVÁ, E. Evaluation of IUPAC Limit of Detection and Iso Minimum Detectable Value - Electrochemical Determination of Lead. **Nova Biotech.** v.9(1), p. 91-100, 2009.
53. IUPAC Gold Book. Limit of Detection. Orange Book. p.5. Disponível em <<http://goldbook.iupac.org/L03540.html>>. Acesso em 28 de julho de 2011.

54. Johannes Corley. Best practices in establishing detection and quantification limits for pesticide residues in foods. **Handbook of Residue Analytical Methods for Agrochemicals**. John Wiley & Sons Ltd. 2003.
55. WEIL, J. A. EPR-NMR 6.40. Disponível em <<http://www.chem.queensu.ca/eprnmr/>>. Acesso em 05 de junho de 2011.
56. VENCEL, T.; DONOVALOVÁ, J.; GÁPLOVSKÝ, A.; KIMURA, T.; TOMA, S. Oxygen Exclusion from the Organic Solvents Using Ultrasound and Comparison with Other Common Techniques Used in Photochemical Experiments. **Chem. Pap.** v.59(4), p.271—274, 2005.
57. FRANCIS, M. J. Effect of Degassing on the Electrical Conductivity of Pure Water and Potassium Chloride Solutions. **J. Phys. Chem. C.** v.112, p.14563–14569, 2008.
58. Magnettech GmbH. **Operation Hints for the MiniScope MS200**. Disponível em <<http://www.magnettech.de>>. Acesso em 04 de fevereiro de 2011.
59. KLESCHYOV, A. L.; WENZELA, P.; MUNZELA, T. Electron paramagnetic resonance (EPR) spin trapping of biological nitric oxide. **Journal of Chromatography B.** v.851(1-2), p.12-20, 2007.
60. UENO, T.; YOSHIMURA, T. The physiological activity and in vivo distribution of dinitrosyl dithiolato iron complex. **Japanese Journal of Pharmacology.** v.82(2), p.95-101, 2000.
61. SOCRATES, G. **Infrared and Raman characteristic group frequencies**. Wiley-Interscience. 3. ed. 2001.
62. PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introduction to spectroscopy**. Brooks/Cole Pub Co. 4. ed. 2009.

63. U.S. SECRETARY OF COMMERCE ON BEHALF OF THE USA. **NIST Livro de Química na Web**. Disponível em <<http://webbook.nist.gov/chemistry/>>. Acesso em 15 de março de 2011.
64. CAO, M.; LIN, J.; LÜ, J.; YOU, Y.; LIU, T.; CAO, R. Development of a polyoxometallate-based photocatalyst assembled with cucurbit[6]uril via hydrogen bonds for azo dyes degradation. **Hazard Mater.** v. 186(1), p.948-51, 2011.
65. MCCLAIN, A.; HSIEH, Y. Synthesis of Polystyrene-Supported Dithiocarbamates and Their Complexation with Metal Ions. **J. of Appl. Pol. Sci.** v. 92, p.218-225, 2004.
66. Lu, C.; Koppenol, W. H. Redox cycling of iron complexes of N-(dithiocarboxy)sarcosine and N-methyl-d-glucamine dithiocarbamate. **Free Radical Biology & Medicine.** v.39, p.1581–1590, 2005.
67. Fujii, J.; Kobayashi, K.; Tagawab, S.; Yoshimura, T. Reaction of nitric oxide with the iron(III) complex of N-(dithiocarboxy)sarcosine: a new type of reductive nitrosylation involving iron(IV) as an intermediate. **J. Chem. Soc., Dalton Trans.** p.3310–3315, 2000.

APÊNDICE

Além do trabalho original, o autor desenvolveu outras atividades no Laboratório de Novos Materiais e dispositivos (LNMD), tais como:

- Atuação na implantação do laboratório: O aluno participou ativamente na implantação do LNMD, acompanhando a instalação da infra-estrutura básica (mesas, bancadas, instalações elétricas) e trabalhando no processo de aquisição da vidraria, reagentes e diversos equipamentos e instrumentos para o laboratório, sendo que o ano de 2008 foi dedicado prioritariamente a esta finalidade.
- Síntese de carbamatos e estudo de seu desempenho em sensores de NO: O aluno realizou a síntese de carbamatos ainda não explorados pelo grupo, como Fe_2^+ -di(N-(ditiocarboxi)sarcosina) e Fe_2^+ -di(N-(ditiocarboxi)-L-prolina). No entanto, os sensores preparados com esses carbamatos não tiveram desempenho superior ao tradicional FeDETC. Portanto, sua utilização foi descontinuada.
- Busca de novas matrizes para construção de sensores para óxido nítrico: Foram realizados extensos estudos quanto á busca de novas matrizes para o desenvolvimento de sensores para NO. Duas matrizes promissoras estudadas foram as de celulose bacteriana e de poliestireno sulfonado.
- Projeto e montagem de um espectrômetro de ressonância plasmônica de superfície (RPS): A RPS é uma técnica óptica de grande sensibilidade, através da qual é possível construir sensores. Como superfície sensora seletiva ao NO, pode ser utilizados filmes finos de cucurbit[6]uril, PPO, ftalocianinas e outros materiais, depositados sobre filme fino de ouro. O estudo da técnica e dos instrumentos disponíveis no mercado, bem como o projeto do espectrômetro

RPS consumiu grande esforço. Porém, diante dos resultados promissores oferecidos pelo CB[n], os esforços foram concentrado neste material.