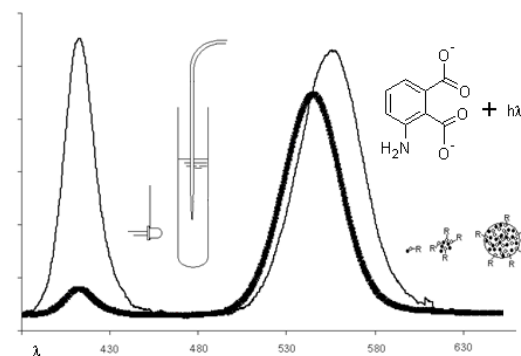


Sensores Luminescentes para Espécies Reativas de Oxigénio e Azoto

Abel José Assunção Duarte
2013





Sensores Luminescentes para Espécies Reativas de Oxigénio e Azoto

Abel José Assunção Duarte

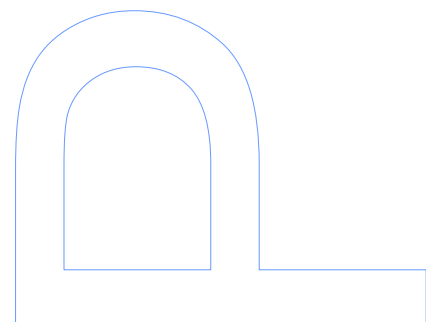
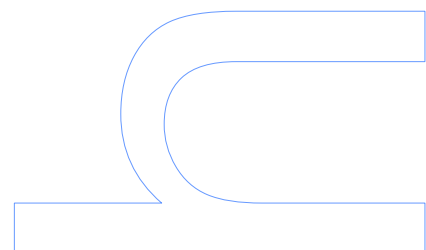
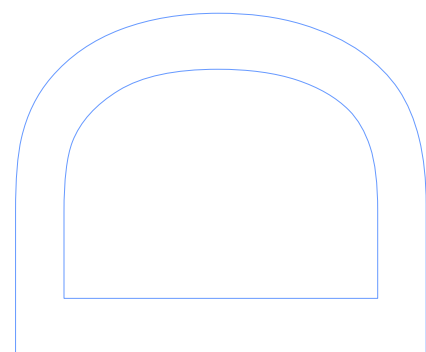
Programa Doutoral em Química
Departamento de Química e Bioquímica
2013

Orientador

Prof. Dr. Joaquim C. G. Esteves da Silva, Professor
Associado com Agregação, Faculdade de Ciências da
Universidade do Porto

Coorientador

Dr^a Maria do Carmo Veiga Fernandes Vaz, Professora
Coordenadora, Instituto Superior de Engenharia do Porto



Agradecimentos

Agradeço à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto por me ter admitido no Plano Doutoral em Química.

Gostaria de agradecer ao Professor Doutor Joaquim C. G. Esteves da Silva pelo apoio, motivação e orientação no desenvolvimento deste trabalho. Às pessoas com quem trabalhei: o Professor Borges, o Fábio, o João, a Helena, a Isa, a Natércia e a Mariana pela inestimável ajuda ao longo deste tempo. Às pessoas sem as quais jamais teria percorrido este percurso: a Doutora Ilda, a Raquel, a Laura, a Salomé, a Elisabete, a Renata, o Nuno, a Simone, a Marta, o Emanuel, a Diana e a Diana pela amizade e simpatia.

Agradeço ao Instituto Superior de Engenharia do Porto, ISEP, por me ter admitido como membro o seu corpo docente e ter proporcionado realizar este trabalho e ao Programa de Formação Avançada de Docentes do Instituto Politécnico do Porto, IPP.

Gostaria de agradecer à Professora Doutora Maria do Carmo Vaz pelo apoio e incentivo a realizar esta formação e à Doutora Cristina Delarue-Matos por me obrigar a seguir em frente...

Agradeço ao Departamento de Engenharia Química do ISEP, à sua Direção: Maria João, Elisa e Madalena e a todos os colegas, particularmente à Eng^a Teresa, pela preocupação em tornar o meu percurso mais fácil. Aos meus alunos.

Gostaria de agradecer à minha família... À minha grande família!

Maria João e Maria Miguel



Resumo

As espécies reativas de oxigénio e azoto são moléculas, iões ou radicais responsáveis pelo regulamento dos processos biológicos, assim como estão associados ao aparecimento e desenvolvimento de muitas patologias e em última análise pelo envelhecimento e morte dos próprios seres vivos. Dispor de ferramentas analíticas que permitam detetar e quantificar é de importância fundamental para o progresso de inúmeras áreas relacionadas com a química que acontece nos sistemas biológicos. O objetivo deste trabalho foi desenvolver sistemas sensores para espécies reativas de oxigénio e azoto, desde o sensor químico até à parte instrumental.

Foram desenvolvidos vários componentes e equipamentos analíticos que foram usados nos trabalhos científicos ao longo desta Tese. Usaram-se LEDs como fonte de radiação para a fluorescência, para tal construiu-se uma fonte de alimentação elétrica regulável para os LEDs. Os LEDs iluminavam diretamente a amostra ou estavam num suporte que permitia um bom acoplamento de radiação a uma fibra ótica. Por sua vez a fibra ótica conduzia a radiação para o suporte da mostragem ou, mais simplesmente, a sua extremidade era o suporte do sensor químico. Usam-se várias configurações geométricas de modo a otimizar a deteção da radiação luminosa. A radiação emitida por fluorescência ou quimiluminescência era recolhida, também, por fibras óticas e guiadas para os respetivos detetores. Para melhorar o desempenho destes componentes, estes foram construídos em contentores de policloreto de vinilo preto de modo a garantir a menor interferência de radiação externa ao processo e o local de amostragem, quer de excitação quer da emissão de radiação, era espelhado.

Desenvolveu-se um sistema sensor para peróxido de hidrogénio com base em luminol, o qual foi imobilizado em nanoestruturas de sílica sintetizadas por um processo de Sol-Gel e detetado a quimioluminescência de um modo remoto. A suspensão aquosa destas partículas, com dimensões inferiores a 500 nm, responde proporcionalmente à concentração de peróxido de hidrogénio entre 0,05 a 2 milimolar e tem um limite de deteção de 1 micromolar. Provou-se ser possível incorporar luminol em matrizes de Sol-gel, podendo estas serem facilmente imobilizadas sobre a extremidade da fibra ótica e

monitorizar por quimioluminescência espécies reativas de oxigénio e azoto por sondas óticas remotas.

Sintetizou-se com êxito um novo sensor seletivo para o óxido nítrico – a fluoresceinamina reduzida. O óxido nítrico oxida seletivamente a fluoresceinamina reduzida conferindo-lhe novamente fluorescência e esta resposta é linear de 10 a 750 micromolar com um limite de deteção de 1 micromolar de óxido nítrico. O sistema sensor químico/equipamento é simples e bastante económico, mais uma vez, usou-se fibras óticas para conduzir a radiação entre os diferentes componentes do equipamento, logo, a fluoresceinamina desenvolve fluorescência suficiente para poder-se pensar numa deteção remota.

Otimizou-se vários processos de síntese de nanopartículas semicondutores cristalinas bimetálicos (quantum dots), nomeadamente de cádmio/telúrio estabilizados com ácido mercaptossuccínico, cádmio/telúrio estabilizados com ácido mercaptoacético, cádmio/telúrio estabilizados com ácido 3-mercaptopropiónico e cádmio/selénio estabilizados com ácido 3-mercaptopropiónico e nanopartículas de cádmio/telúrio recobertas com cádmio/enxofre estabilizadas com glutatona. No entanto, não se conseguiu nenhum resultado seletivo a nenhuma espécie reativa de oxigénio ou azoto, visto estes serem oxidantes e a presença de oxidantes extingue a fluorescência dos quantum dots. Experimentou-se várias estratégias de síntese com outros estabilizadores, diferentes técnicas de recobrimento e, finalmente, funcionalização das nanopartículas, mas nunca com resultados positivos. No entanto, os quantum dots, dos quais se otimizou a síntese, apresentam um elevado rendimento quântico, logo excelentes candidatos para sensores fluorescentes

Descobriu-se que a lactose modificada é fluorescente e responde seletivamente à presença do ião hipoclorito por extinção da fluorescência. Embora a caracterização das estruturas em que a lactose se transforma ainda esteja em investigação, a lactose modificada diminui a fluorescência linearmente de 0,04 a 25 milimolar em função do logaritmo do inverso da concentração do anião hipoclorito com um limite de deteção de 13 micromolar. A lactose modificada é um sensor económico e, principalmente e ao contrário das nanoestruturas de cádmio, telúrio e selénio, não apresenta toxicidade, por isso é um sensor com potencial analítico para análises *in vivo*.

Palavras-chave

Espécies Reativas de Oxigênio; Espécies Reativas de Azoto; Quimioluminescência; Fluorescência; Sensor Químico; Luminol; Fluoresceinamina Reduzida; Lactose Modificada; Nanomateriais; Quantum Dots; Miniaturização; Fibras Óticas.

Abstract

The reactive species of oxygen and nitrogen are molecules, ions or radicals responsible for the regulation of biological processes and also are associated with the arising and development of many pathologies and ultimately by the aging and death of living beings themselves. Have analytical tools that allow detect and quantify is crucial for the progress of many areas related to chemistry that occurs in biological systems. This study aim was to develop sensor systems for reactive species of oxygen and nitrogen since the chemistry sensor to the equipment devices.

Along this thesis were used in scientific works developments of some devices and analytical equipment. LEDs are used as light source for fluorescence to this we constructed an adjustable power source. LEDs were directly illuminating the sample or were in a backing that allowed a good coupling of radiation to an optical fiber. By other way, fiber optic conducted light to the holder or simply to fiber end where is the chemical sensor. Were used various geometric configurations in order to optimize the detection of light. The light emitted by fluorescence or chemiluminescence was collected also by optical fibers and guided to the respective detectors. To Improve the performance of these components, these containers were constructed of black polyvinyl chloride to ensure the least interference from external light to the process and the sampling site was mirrored either in the excitation or emission spot.

It was developed a sensor system for hydrogen peroxide based on luminol, which was immobilized in nanostructures synthesized silica by a sol-gel process and the chemiluminescence detected in a remote mode. The aqueous suspension of these particles, with dimensions below 500 nm, responds proportionally to the concentration of hydrogen peroxide from 0,05 to 2 millimolar and has a detection limit of 1 micromolar. It was proved that is possible to incorporate luminol in sol-gel matrices, which may be easily immobilized on the end of the fiber optic and monitor by chemiluminescence reactive species of oxygen and nitrogen by optical remote probes.

Was synthesized successfully a new selective sensor for nitric oxide - reduced fluoresceinamine. Nitric oxide selectively oxidizes the reduced fluoresceinamine giving it again this fluorescence and at this response is linear between 10-750 micromolar with a detection limit of 1 micromolar of nitric oxide. The system of chemical sensor and equipment is quite simple and economical, yet again, optical fibers was used to conduct light between different equipment components. fluoresceinamine develops enough fluorescence to be used in a remote sensing.

Various processes were optimized for the bimetallic crystalline semiconductor nanoparticles (quantum dots) synthesis, in particular cadmium/tellurium stabilized with mercaptosuccinic acid, cadmium/tellurium stabilized with mercaptoacetic acid, cadmium/tellurium stabilized with 3-mercaptopropionic acid and cadmium/selenium stabilized with 3-mercaptopropionic acid and nanoparticles of cadmium/tellurium coated with cadmium/sulfur stabilized with glutathione. However, none of quantum dots reacted selectively with any reactive species of oxygen and nitrogen, since these oxidize by quenching fluorescence. We experimented several synthetic strategies with other stabilizers, different techniques of coating and, finally, the functionalization of the nanoparticles, never with positive results. However, the optimized quantum dots, have a high quantum yield, so it still are excellent candidates for fluorescent sensors.

It was found that modified lactose is fluorescent and selectively responds to the presence of hypochlorite ion by quenching of fluorescence. Although the characterization of the structures in which the lactose is transformed is still under investigation, modified lactose decreases fluorescence linearly from 0.04 to 25 millimolar against the logarithm of the inverse of the concentration of hypochlorite anion with a detection limit of 13 micromolar. The modified lactose is an economic sensor and especially unlike nanostructures and cadmium, tellurium and selenium, shows no toxicity and therefore is a potential sensor for analytical analysis in vivo.

Keyword

Reactive Oxygen Species, Reactive Nitrogen Species, Chemiluminescence, Fluorescence, Chemical Sensor; Luminol; Reduced Fluoresceinamine; Modified Lactose; Nanomaterials; Quantum Dots; Miniaturization; Optical Fibers.

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract	v
Índice	vii
Lista de quadros	xi
Lista de figuras	xii
1. Espécies reativas de oxigénio e azoto.....	1
1.1. Introdução.....	2
1.2. Função das espécies reativas de oxigénio nos seres vivos	6
1.2.1. Toxicidade das espécies reativas de oxigénio.....	6
1.2.2. Mecanismos biológicos para a deteção das espécies reativas de oxigénio	8
1.2.3. Espécies reativas de oxigénio como sinalizadores intercelulares	11
1.3. Sensores e biossensores <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	14
1.3.1. Sensores de espécies reativas de azoto.....	15
1.3.2. Sensores de espécies reativas de oxigénio	17
1.4. Estrutura da tese	19
1.5. Objetivos.....	21
1.6. Bibliografia.....	22
2. Equipamento	27
2.1. Introdução.....	27
2.2. Fonte de radiação.....	30
2.3. Seleção do comprimento de onda.....	36
2.3.1. Monocromador	36
2.3.2. Rede de difração facetada por reflexão	36
2.3.3. Filtro	38
2.4. Porta amostras	39
2.4.1. Fibra ótica.....	40
2.5. Detetor ótico	44
2.5.1. Tubo fotomultiplicador	44
2.5.2. Fotodíodo	45
2.5.3. Dispositivos de acoplamento de carga (CCD).....	46

2.6. Conclusões.....	48
2.7. Bibliografia.....	49
3. Doseamento do peróxido de hidrogénio por quimioluminescência	51
3.1. Introdução	51
3.1.1. Possíveis mecanismos de reação química do luminol	52
3.1.2. Utilização de fibras óticas	58
3.2. Procedimento experimental	60
3.2.1. Reagentes.....	60
3.2.2. Preparação de soluções.....	60
3.2.3. Síntese do material sensor.....	61
3.2.4. Instrumentação.....	62
3.2.5. Medição da quimioluminescência.....	62
3.2.6. Tratamento de dados	64
3.3. Resultados	65
3.3.1. Caracterização morfológica dos materiais sensores de silício	65
3.3.2. Quimioluminescência do peróxido de hidrogénio.....	67
3.3.3. Quimioluminescência do peróxido de hidrogénio em fibra ótica	69
3.4. Conclusões.....	73
3.5- Bibliografia	74
4. Doseamento do óxido nítrico com fluoresceína reduzida por fluorescência.....	77
4.1. Introdução	77
4.1.1. Fluoresceína e seus derivados.....	78
4.1.2. Síntese da fluoresceína e seus derivados	79
4.1.3. Fluoresceína como sensor.....	82
4.2. Procedimento experimental	85
4.2.1. Reagentes.....	85
4.2.2. Preparação de soluções.....	85
4.2.3. Geração do óxido nítrico	86
4.2.4. Instrumentação.....	88
4.2.5. Medição da fluorescência.....	88
4.2.6. Tratamento de dados	89
4.3. Resultados	90
4.3.1. Fluoresceína reduzida	90
4.3.2. Resposta do sensor fluoresceína reduzida ao óxido nítrico	91
4.3.3. Aplicação do sensor para medição de óxido nítrico	93

4.3.4. Análise de interferentes	94
4.4. Conclusões	96
4.5. Bibliografia	97
5. Semicondutores nanocristalinos fluorescentes (Quantum dots)	101
5.1. Introdução	101
5.2. Nanocristais semicondutores	103
5.2.1. Confinamento quântico	104
5.2.2. Síntese aquosa de quantum dots	106
5.2.3. Formação de quantum dots de cádmio/telúrio e cádmio/selénio	110
5.2.4. Recobrimento dos quantum dots	115
5.2.5. Funcionalização	116
5.3. Procedimento experimental	119
5.3.1. Reagentes	119
5.3.2. Síntese aquosa de quantum dots	119
5.3.2.1. Solução aquosa de telureto	120
5.3.2.2. Solução aquosa de selenossulfato	120
5.3.2.3. Síntese de CdTe estabilizados com ácido 3-mercaptopropiónico ou mercaptopropiónico	120
5.3.2.4. Síntese de CdTe estabilizados com ácido mercaptoacético	121
5.3.2.5. Síntese de CdSe estabilizados com ácido 3-mercaptopropiónico	121
5.3.2.6. Síntese de CdTe recobertos com Zn/S em glutatona	122
5.3.3. Síntese de CdTe estabilizados com derivados da hidroxiquinolina	122
5.3.4. Síntese de CdTe estabilizados com outros ligandos	124
5.3.5. Funcionalização de CdTe	124
5.3.6. Instrumentação	125
5.4. Resultados	126
5.5. Conclusão	133
5.6. Bibliografia	135
6. Lactose modificada como sensor fluorescente	139
6.1. Introdução	139
6.1.1. Propriedades físicas e químicas da lactose	140
6.1.2. Hidrólise da lactose	141
6.1.3. Oxidação e redução da lactose	144
6.1.4. Degradação aquosa da lactose	145
6.2. Procedimento experimental	148

6.2.1. Reagentes.....	148
6.2.2. Preparação de soluções.....	148
6.2.2.1. Soluções tampão de pH com força iónica ajustada para 0,10 mol/L.....	149
6.2.2.2. Solução aquosa de hipoclorito de sódio e sua padronização	149
6.2.2.3. Solução aquosa de peroxinitrito	150
6.2.2.4. Solução aquosa de carbonato de sódio 0,1 mol/L.....	150
6.2.2.5. Solução aquosa de fosfato de sódio 0,1 mol/L.....	151
6.2.2.6. Solução aquosa de superóxido de potássio ($ \text{O}_2^- = 0,1 \text{ mol/L}$).....	151
6.2.3. Preparação da lactose fluorescente	151
6.2.4. Instrumentação.....	152
6.2.5. Evolução da fluorescência da lactose fluorescente com o valor de pH.....	152
6.2.6. Reversibilidade da fluorescência da lactose modificada.....	153
6.2.7. Análise de dados.....	153
6.3. Resultados	154
6.3.1. A fluorescência da lactose.....	154
6.3.2. Resposta da lactose fluorescente a diferentes analítos	156
6.3.3. Aplicação do sensor lactose fluorescente para medição do ião hipoclorito.	157
6.3.4. Composição da lactose modificada fluorescente	159
6.4. Conclusões.....	161
6.5. Bibliografia.....	162
7. Conclusões e perspetivas de futuro	165
7.1. Conclusões.....	165
7.2. Perspetivas de futuro.....	167

Lista de quadros

Tabela 1.1 – Resumo das mais vulgares espécies reativas de oxigénio e azoto, agrupadas em radicais e não radicais. Adaptado de [19]. 5

Tabela 5.1 – Resumo de algumas condições de sínteses aquosas de CdTe agrupadas de acordo com o ligando bifuncional utilizado. Apresentam-se apenas ligandos que contêm grupo tiol. ... 112

Lista de figuras

- Figura 1.1 - Geração de espécies reativas de oxigénio na membrana interna mitocondrial. O oxigénio é convertido em superóxido através da xantina oxidase, do complexo I (NADH-ibiquinona oxirredutase), do complexo III (ubiquinol-citocromo c oxirredutase) ou outra enzima celular. Este por sua vez pode ser convertido, através da peroxidase desmutase, em peróxido de hidrogénio que pode dar origem ao ião hidroxilo pela ação de enzimas hidrolíases com centros ferro-enxofre como a aconitase. Adaptado de [7-8]. 3
- Figura 1.2 - Espécies reativas de oxigénio podem afetar as funções das proteínas. Exemplo de três mecanismos (de cima para baixo): oxidação direta dos grupos tióis do aminoácido, por exemplo cisteína, e consequente alteração da forma/função da proteína; modificação da proteína por oxidação de partes proteicas com consequente dissociação; por fim ativação/desativação enzimática por fosforilação. 10
- Figura 1.3 - Representação do modo de deteção de espécies reativas de oxigénio ou de azoto por alteração das proteínas. Adaptado de [27]. 10
- Figura 1.4 – Representação da estratégia de deteção para o peróxido de hidrogénio recorrendo à metodologia de proteína específica. Adaptado de [60]. 14
- Figura 2.1 – Representação esquemática do equipamento para medir luminescência (circulo pequeno com exceção do monocromador) e do espectrofluorímetro (circulo maior). As setas indicam o movimento da radiação através dos diferentes componentes, que podem passar através de um selecionador de comprimentos de onda. 28
- Figura 2.2 – Espectros das lâmpadas de xenon contínua (esquerda) HPX-2000, e pulsada (direita) PX-2, da Ocean Optics. Adaptado de [1]. 31
- Figura 2.3 – Espectro característico da lâmpada de mercúrio. 31
- Figura 2.4 – Espectro característico da lâmpada de (a) halogéneo/tungsténio HL-2000, (b) de deutério D-2000 e (c) da combinada halogéneo/tungsténio com a de deutério DH-2000 da Ocean Optics. Adaptado de [1]. 32
- Figura 2.5 – Espectros de diferentes LEDs existentes no mercado. Adaptado de [12]. 33
- Figura 2.6 – Fotografia da fonte de radiação da lâmpada de halogéneo/tungsténio (20W), e respetiva alimentação elétrica, acoplada a uma fibra ótica de plástico, esquerda. Esquema da deformação no vidro formada em torno da extremidade da fibra ótica de plástico, direita. 34
- Figura 2.7 – Circuito eletrónico da fonte de alimentação elétrica estabilizada. Cortesia do Eng^o Emanuel Lomba do Instituto Superior de Engenharia do Porto. 35

Figura 2.8 – Fotografia da montagem da fonte de alimentação elétrica estabilizada para alimentar LEDs, esquerda. Vista de frente com pormenor do suporte para os LEDs, direita.....	35
Figura 2.9 – Espectro duma lâmpada de halogéneo/tungsténio de 20 W e da mesma radiação depois de ter passado pelo monocromador Fastei-Erbert com os comprimentos de onda selecionados de 450, 500, 600 e 700 nm. A intensidade luminosa do espectro de halogéneo/tungsténio (radiação indireta com 3 ms de aquisição) é muito superior à intensidade dos espectros da mesma radiação que passou pelo monocromador (lido diretamente no detetor com 5 s de aquisição).	37
Figura 2.10 – Diagrama do monocromador de Czerny-Turner, (esquerda). Fotografia de um monocromador Fastie-Erbert (Czerny-Turner mas com um só espelho colimador/reorientador) modificado por nós para acoplar fibras óticas, as setas a branco indicam o percurso da radiação desde a fonte até à fibra ótica (direita).....	37
Figura 2.11 – Espectros de transmitância de um filtro de passo alto, baixo e da combinação dos dois (da esquerda para a direita). Adaptado de [1].	38
Figura 2.12 – Geometrias da extremidade da fibra ótica com 600 μm de diâmetro. Corte transversal (esquerda), oblíquo a 45° (centro) e em cone com 20 mm de comprimento (direita).	41
Figura 2.13 – a) esquema do par fibra ótica em paralelo, b) pormenor da extremidade das duas fibras, c) acoplamento do filme sensor com o sentido da radiação nas duas fibras óticas.....	41
Figura 2.14 – Esquema de uma montagem com múltiplas fibras óticas e com pormenores da vista de frente.....	42
Figura 2.15 – Esquema de uma montagem com uma única fibra ótica e excitação feita diretamente sobre a solução com o analíto. Adaptado de [23] sem fibra ótica de emissão.....	42
Figura 3.1 – Número de publicações de artigos por ano desde 1940. Resultados obtidos por pesquisa na Web of Knowledge no dia 30 de Janeiro de 2012, com as palavras “luminol” e “chemiluminescence” para os diferentes anos.....	56
Figura 3.2 – Comportamento típico da quimioluminescência do luminol em meio aquoso. Intensidade da radiação total em função do tempo após juntar o substrato, esquerda, e o espectro, direita.	57
Figura 3.3 – Esquema da instalação para medir a quimioluminescência. Microbureta, MB, tubo fotomultiplicador, PMT, câmara escura, CE, computador pessoal, PC.	63
Figura 3.4 – Esquema da instalação para medir a quimioluminescência com fibra ótica. Microbureta, MB, tubo fotomultiplicador, PMT, computador pessoal, PC, câmara escura, CE, Fibra ótica, FO.....	63

Figura 3.5 – Imagens SEM dos materiais sensores obtidos pelo procedimento NM1 (a e b) e pelo procedimento NM2 (c e d).....	66
Figura 3.6 – Análise de energia dispersa de raio-X ao nanomaterial do processo NM2. Resultados idênticos foram obtidos no material sensor sintetizado por NM1.....	67
Figura 3.7 – Resposta quimioluminescente da adição do peróxido de hidrogénio, à suspensão aquosa do material sensor e correspondente ajuste linear.	68
Figura 3.8 – Resposta quimioluminescente transportada através de uma fibra ótica em função do simétrico do logaritmo decimal da concentração de peróxido de hidrogénio, a), e o respetivo ajuste linear para a gama de 50 a 2000.10 ⁻⁶ mol/L, b).	70
Figura 3.9 – Evolução do logaritmo da resposta quimioluminescente em função do simétrico do logaritmo da concentração do peróxido de hidrogénio para duas concentrações diferentes de luminol na preparação das nanopartículas.....	71
Figura 4.1 – Esqueleto da estrutura química dos derivados de fluoresceína.....	79
Figura 4.2 – Estrutura química de 2',7'-difluorofluoresceína [21].	79
Figura 4.3 – Dependência do pH do meio na estrutura da fluoresceína.	80
Figura 4.4 – Equilíbrio químico dos tautómeros neutro e monodesprotonado com as respetivas lactonas, não fluorescentes (direita).	81
Figura 4.5 – Possível mecanismo de formação da 5(6)nitrofluoresceína.....	83
Figura 4.6 – Esquema da estratégia de tornar a fluoresceinamina sensor de óxido nítrico.	84
Figura 4.7 – Esquema da instalação geradora de óxido nítrico (ii).....	87
Figura 4.8 – Esquema da disposição dos componentes para a medição da fluorescência numa cuvete. PC computador pessoal, CCD detetor, LED fonte de alimentação, FO fibra ótica e CUV suporte da cuvete.	88
Figura 4.9 – Evolução da intensidade de fluorescência da fluoresceinamina reduzida, ao comprimento de onda de 522 nm ao longo do tempo quando excitada com LED a 450 nm. A seta indica a adição dos 0,100 mL de água desionizada à fluoresceinamina reduzida com o catião cobalto(II).....	90
Figura 4.10 – Perfil de fluorescência (excitação a 450 nm e emissão a 522 nm) antes e depois de se ter adicionado óxido nítrico à fluoresceína reduzida (seta indica o momento da adição).	91
Figura 4.11 – a) Espectros de emissão da fluoresceinamina reduzida quando em presença de diferentes concentrações de óxido nítrico, excitados com LED de 450 nm. b) Respetiva curva de calibração para o óxido nítrico, NO , ao comprimento de onda de emissão de 522 nm.....	92

- Figura 4.12 – Detecção do óxido nítrico pelo sensor fluoresceinamina reduzida. a) Resposta a diferentes concentrações crescentes de óxido nítrico produzido pela decomposição do nitrito em meio ácido e b) pela hidrólise dietilamina NONOato de sódio, em função do tempo. 94
- Figura 4.13 – Avaliação da interferência de outras espécies químicas. a) Igual concentração dos analitos e medidos três vezes. b) Evolução do sinal de fluorescência após adição do analito sensor fluoresceína reduzida, óxido nítrico (linha grossa), peróxido de hidrogênio (tracejado) e superóxido de potássio (linha fina). 95
- Figura 5.1 – Representação relativa das ordens de grandeza, desde o angstrom ao decímetro. 103
- Figura 5.2 – Representação esquemática do possível mecanismo de fluorescência para os quantum dots baseado na dependência do confinamento quântico com o tamanho da partícula. Abs é a energia absorvida (de excitação), FL é a energia devolvida (a fluorescência), τ_i corresponde à dissipação da energia por conversão interna antes da emissão. 104
- Figura 5.3 – Representação esquemática do confinamento quântico como permeabilidade à radiação. Pequeno quantum dot transparente ao feixe luminoso a) de maior dimensão com interação com a radiação (fluorescente) b) e quantum dot demasiado grande, completamente opaco c). 106
- Figura 5.4 – Representação de uma possível processo para a formação dos quantum dots. Adaptado de [21]. 108
- Figura 5.5 – Estrutura química do ácido mercaptoacético (TGA) e do ácido 3-mercaptopropiónico (MPA) com os respetivos valores da constante de dissociação [50]. 113
- Figura 5.6 – Estrutura do complexo cádmio:MPA com estequiometria de 1:2, cíclica (esquerda) e aberta (direita). Adaptado de [50, 52]. 113
- Figura 5.7 – Diagrama de Pourbaix para o sistema CdTe-água. Adaptado de [56]. 115
- Figura 5.8 – Diagrama da estrutura molecular para um sistema sensor com quantum dots na sua composição. Adaptado de [60, 62]. 117
- Figura 5.9 – Estruturas de derivados da 8-hidroxiquinolina: 5-mercapto-8-hidroxiquinolina (esquerda) e derivado com radical de cadeia longa, 7-oxo-6-sulfanil-octa-N-5-(8-hidroxiquinolina) amida (direita). 123
- Figura 5.10 – Fluorescência de suspensões aquosas de CdTe e CdTe/ZnS em solução tampão fosfato/hidrogenofosfato pH 9,1 quando excitadas com LEDs de 405 nm. 127
- Figura 5.11 – Análise morfológica por microscopia de varrimento eletrônico das nano partículas de CdTe estabilizadas com ácido mercaptoacético não purificados. Escala de 400 μm (esquerda) e 1 μm (direita). 127

Figura 5.12 – Análise da composição elementar por espectroscopia de dispersão de energia de raio-X dos quantum dots de CdTe estabilizados com ácido mercaptoacético.	128
Figura 5.13 – Análise morfológica por microscopia de varrimento eletrônico das nano partículas de CdTe/ZnS estabilizadas com glutathione reduzida. Escala de 500 μm (esquerda) e 1 μm (direita).	128
Figura 5.14 – Análise da composição elementar por espectroscopia de dispersão de energia de raio-X dos quantum dots de CdTe/ZnS estabilizados com glutathione reduzida.	129
Figura 5.15 – Evolução da intensidade de fluorescência de uma suspensão aquosa de CdSe, em solução tampão fosfato/hidrogenofosfato pH 9,1, quando excitadas com LEDs de 410 nm.	130
Figura 5.16 – Evolução típica do valor máximo da intensidade de fluorescência e correspondente comprimento de onda, λ_{em} , em função do tempo de refluxo para a síntese de CdSe com o ácido mercaptoacético como estabilizador.	130
Figura 5.17 – Análise morfológica por microscopia de varrimento eletrônico das nano partículas de CdTe/ZnS estabilizadas com 5-mercapto-8-hidroxiquinolina. Escala de 500 μm (esquerda) e 0,5 μm (direita).	131
Figura 5.18. – Análise da composição elementar por espectroscopia de dispersão de energia de raio-X das estruturas de CdTe/ZnS estabilizados com 5-mercapto-8-hidroxiquinolina.	132
Figura 6.1 – Estruturas da α -lactose (esquerda) e β -lactose (direita).	141
Figura 6.2 – Hidrólise da lactose em galactose e glucose (da esquerda para a direita, respetivamente) e correspondentes estruturas abertas (em baixo) que mostra que são aldeídos no carbono anomérico.	142
Figura 6.3 – Estruturas da lactulose (esquerda) e da 4'-galactosil-lactose (direita).	144
Figura 6.4 – Redução e oxidação da lactose a lactitol e ácido lactobiónico, respetivamente.	145
Figura 6.5 – Esquema da degradação aquosa dos açúcares em furano [27].	146
Figura 6.6 – Após a hidrólise da lactose em galactose (cima) e glucose (baixo), esquema da reação destes até chegar ao respetivo 5-hidroximetil-2-furaldeído. Adaptado de [29].	146
Figura 6.7 – Espectros de emissão da fluorescência ao longo das primeiras 72 horas de refluxo da solução aquosa da lactose. Gráfico pequeno: evolução da intensidade de fluorescência ao comprimento de onda de 431 nm para além das 72 horas.	155
Figura 6.8 – Variação da intensidade de fluorescência a 431 nm com o valor de pH do meio.	155
Figura 6.9 – Resposta da lactose fluorescente à ausência e presença de óxido nítrico, da solução de lactose acabada de preparar (linha contínua) e da lactose seca e tornada solução aquosa no mesmo volume (tracejado).	156

Figura 6.10 – Extinção da fluorescência de algumas espécies reativas de oxigênio e azoto. X representa a concentração do respetivo analito em mol/L. 157

Figura 6.11 – Quociente entre as intensidades de fluorescência relativa inicial e na concentração (IFo/IF) em função da função p da concentração do ião hipoclorito. Linhas são os respetivos ajustes lineares. 158

Figura 6.12 – Cromatograma típico da lactose fluorescente obtido em água desionizada. 159

Figura 6.13 – Absorvância das frações aquosas retiradas a tempos diferentes correspondente ao cromatograma da Fig.6.12. 160

1. Espécies reativas de oxigénio e azoto

“O holocausto do oxigénio foi uma crise de poluição a nível mundial ocorrida há cerca de dois biliões de anos. [...]

O aparecimento da fotossíntese utilizadora de oxigénio e o meio ambiente rico nesse gás originado pelos processos fotossintéticos puseram à prova o engenho dos micróbios, [...] apanhados nas novas condições de vida responderam-lhes inventando diversos dispositivos intracelulares e agentes eliminadores de substâncias tóxicas, tirando partido, mais tarde, do perigoso poluente.

[...] criou um dínamo utilizador do oxigénio que modificou para sempre a vida e os locais onde ela existe.”

Lynn Margulis e Dorion Sagan [1]

1.1. Introdução

Há cerca de 2 mil milhões de anos os seres vivos iniciaram uma revolução no modo de adquirir energia, alguns substituíram os processos de respiração anaeróbio, por exemplo, a fermentação, pelo aeróbio. Esta mudança está intimamente relacionada com a eficácia do processo, por exemplo, a fermentação da glucose origina 2 moléculas de adenosina trifosfato enquanto na respiração aeróbia da mesma glucose obtém-se um saldo positivo de 38 dessas moléculas energéticas.

Há cerca de mil e seiscentos milhões de anos os seres vivos fotossintéticos tornaram a atmosfera do nosso planeta oxidante. O oxigénio é responsável pela oxidação dos metais e matéria orgânica e é tóxico para os seres vivos anaeróbios. No entanto, os organismos que realizam a respiração aeróbia passaram a ter uma enorme vantagem evolutiva devido à independência das fontes de energia e ao excesso de energia disponível para outras atividades biológicas, culminando na tomada de consciência da matéria sobre si mesma, do pensamento abstrato e das artes.

O processo químico da oxidação dos alimentos resulta de um complexo sistema de reações químicas interligadas, denominada de cadeia respiratória. Este processo que ocorre ao nível celular na mitocôndria, tem como último aceitador de eletrões o oxigénio. Ao longo deste processo formam-se diversas espécies químicas que têm em comum a elevada reatividade, uma vez que possuem pelo menos um eletrão desemparelhado [2]. Estes intermediários químicos muito reativos denominam-se genericamente de espécies reativas de oxigénio. A evolução favoreceu os seres vivos que incorporaram estes intermediários num grande número de processos biológicos e a sua presença/quantidade relativa existente nas células, tornaram-se tão importantes que dita o sucesso ou a morte do ser vivo [3].

Embora o oxigénio molecular possa ser considerado como não reativo, a sua redução univalente leva à formação de espécies com eletrões desemparelhados na camada de valência, ou seja, espécies químicas reativas com átomos de oxigénio na sua composição [4,5]. Algumas das espécies mais estudadas são o radical superóxido, o peróxido de hidrogénio, o oxigénio singleto e o radical hidroxilo. Estas

espécies são produzidas continuamente nos tecidos biológicos (Fig.1.1), por exemplo o radical hidroxilo pode ser produzido por duas vias: por cisão homolítica da molécula peróxido de hidrogénio por ação da radiação ultravioleta e visível na superfície da pele ou, de uma forma mais quantitativa, pela redução do dioxigénio a superóxido, que sofre uma primeira protonação a hidroperóxido e uma segunda a peróxido de hidrogénio. Posteriormente ocorre a conseqüente cisão homolítica que resulta na formação do radical hidroxilo [6].

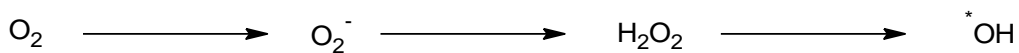


Figura 1.1 - Geração de espécies reativas de oxigénio na membrana interna mitocondrial. O oxigénio é convertido em superóxido através da xantina oxidase, do complexo I (NADH-ibiquinona oxirredutase), do complexo III (ubiquinol-citocromo c oxirredutase) ou outra enzima celular. Este por sua vez pode ser convertido, através da peroxidase desmutase, em peróxido de hidrogénio que pode dar origem ao ião hidroxilo pela ação de enzimas hidrolíases com centros ferro-enxofre como a aconitase. Adaptado de [7-8].

Nem todas as espécies reativas existentes nas células são estritamente de oxigénio, de facto algumas contêm também azoto na sua composição – espécies reativas de azoto. À semelhança das espécies reativas de oxigénio, estas espécies têm a capacidade de se difundir livremente nos sistemas de membrana celular, são sintetizados a partir do aminoácido L-Arginina, por uma família específica de óxido nítrico sintetase. O seu tempo de semi-vida é muito curto, podendo, na presença de oxigénio, formar o dióxido de azoto, ser oxidado a nitrito ou, por reação com o grupo heme da hemoglobina, a nitrato. Assim sendo, uma das formas mais populares de monitorização do óxido nítrico *in vivo* é através da quantificação destas espécies [9].

Desde a sua descoberta, a algumas décadas atrás, como um subproduto que promove o relaxamento do músculo vascular quando se liga e ativa a guanilil ciclase solúvel [10-12], o óxido nítrico tem vindo a ser identificado como mensageiro secundário (atua sobre uma determinada célula alvo sem que tenha sido introduzido nela) em vários eventos fisiológicos. De facto, já foi indicado como: neurotransmissor [13], participante no sistema imunitário do hospedeiro [14] e como espécie intimamente relacionado com patologias como a isquemia (causar disfunção erétil, torpor das extremidades, retinopatia diabética ou acidentes vasculares), inflamação, cancro e neurodegeneração [15]. Adicionalmente, há evidências que os produtos da sua oxidação, como o dióxido de azoto, o trióxido de diazoto, o peroxinitrito, o nitrito e

o nitrato, desempenham um papel importante quer nos processos fisiológicos, quer nos processos patogénicos [15-18].

A produção destas espécies reativas de oxigénio e azoto pode ser entendida como um processo que apresenta vantagens ou desvantagens para o ser vivo. Um dos poucos exemplos que só apresenta vantagens é o uso destes radicais pelos fagócitos para matarem outras bactérias [9]. Qualquer mecanismo que envolva espécies reativas de oxigénio apresenta sempre, ao longo das suas reações em cascata, algum intermediário com efeitos prejudiciais. Em última análise, a consequência da geração de espécies reativas de oxigénio durante o metabolismo celular, é responsável pela morte da própria célula. Recentemente, alguns investigadores propuseram que, à semelhança das espécies reativas de azoto, também as de oxigénio podem funcionar como mensageiros secundários, desempenhando um importante papel nas trocas de informação na célula [2]. Neste sentido, verificam-se que estão diretamente relacionadas com os sistemas de deteção de oxigénio, tais como células de corpo carotídeo, quimiorreceptores nas células musculares lisas das artérias pulmonares e células produtoras de eritropoietina e desempenham um papel fundamental no controlo homeostático, uma vez que as espécies reativas de oxigénio são responsáveis por manter os níveis de oxigénio em organismos multicelulares em situações de hipoxia [9].

Atualmente são inúmeras as espécies reativas já identificadas (Tab.1.1), sendo que o ácido hipocloroso, o peróxido de hidrogénio, os peróxidos orgânicos, os aldeídos e o ozono são as espécies que se encontram em concentrações mais elevadas no interior das células [19].

As espécies reativas desempenham um papel importante nos seres vivos, deste modo, identificar e quantificar estes intermediários em tempo real e *in vivo*, é uma tarefa para a qual se tem despendido bastante atenção e esforço. Nos últimos anos têm vindo a ser realizadas várias pesquisas, no sentido de compreender melhor os mecanismos químicos e bioquímicos em que estas espécies participam, de forma a desenvolver novos sensores e/ou biossensores [6,9,20,21]. De seguida efetuar-se-á uma visão geral sobre o papel biológico das espécies reativas, juntamente com o desenvolvimento recente dos sensores luminescentes para a sua deteção.

Tabela 1.1 – Resumo das mais vulgares espécies reativas de oxigénio e azoto, agrupadas em radicais e não radicais. Adaptado de [19].

Espécie Reativa de Oxigénio		Espécie Reativa de Azoto	
Radicais	Não radicais	Radicais	Não radicais
superóxido	ozono	óxido nítrico	Peroxinitrito
hidroxilo	singleto oxigénio	dióxido de azoto	ácido peroxinitroso
peróxido	peróxido de hidrogénio		alquilo peroxinitrito
alquoxilo	ácido hipocloroso		anião nitroxilo
hidroperóxido			catião nitroxilo
carbonato			anião nitrónio
			ácido nitroso
			trióxido de diazoto
			tetróxido de diazoto
			cloreto de nitrónio

1.2. Função das espécies reativas de oxigénio nos seres vivos

1.2.1. Toxicidade das espécies reativas de oxigénio

As espécies reativas de oxigénio são derivadas do oxigénio molecular, originadas ao longo do metabolismo da produção de energia e/ou durante os processos de defesa de infeções nas células e tecidos. Os seus malefícios estão largamente documentados em revistas científicas [22-26] e o seu modo de atuar pode ser direto, oxidação de um qualquer substrato, ou indireto através dos produtos destes intermediários com outras substâncias existentes nas células. A teoria da toxicidade das espécies reativas de oxigénio [5] sugere que estas espécies estão diretamente relacionadas com inúmeras doenças, desde infeções, inflamações, cancro e doenças relacionadas com estilos de vida, passando pelas doenças metabólicas como arteriosclerose ou diabetes *millitus*, até às doenças neurológicas como a doença de Alzheimer. No entanto, a simples presença destas espécies não poderá ser o único responsável pelo desenvolvimento destas patologias, uma vez que a simples aplicação de agentes antioxidantes na prevenção e tratamento destas doenças ainda não alcançou resultados satisfatórios. Assim sendo, a complexidade das interações não se limita à capacidade oxidante das espécies reativas de oxigénio, pelo que há ainda um longo percurso a percorrer na compreensão destes mecanismos.

Todas as espécies reativas produzidas pelos organismos são rapidamente desintoxicadas e eliminadas por uma vasta variedade de moléculas biológicas, o que implica que a sua concentração seja mantida num baixo nível [27]. O radical hidroxilo só sobrevive 10^{-10} segundos em sistemas biológicos, o alquoxilo existe durante 10^{-6} segundos e, genericamente, os peróxidos orgânicos tem um tempo de semi-vida inferior a 20 segundos, adicionalmente são espécies extremamente móveis, com coeficientes de difusividade na ordem dos 10^7 a 10^9 $\text{m}^{-1}\text{s}^{-1}$ [28]. No entanto, a ação do meio exterior, por exemplo o efeito das radiações, a presença de drogas, oscilações

muito bruscas de temperatura, do valor de pH, da temperatura, da pressão osmótica, da concentração do oxigénio e nutrientes, pode provocar um incremento na produção das espécies reativas de oxigénio para valores superiores às exigências fisiológicas, resultando, assim, no stress oxidativo [27, 29-31].

Após a síntese biológica das espécies reativas de oxigénio e azoto, estas reagem em cascata e podem originar inúmeros intermediários até à formação de espécies não reativas, que se considera o fim da reação. A grande reatividade é, normalmente, vista como sendo prejudicial. Um exemplo bem descrito é a reatividade do radical hidroxilo sobre os lípidos, cuja reação em cadeia altera inicialmente a fluidez das membranas e depois conduz a sua destruição [9]. Este tipo de reações cruzadas intra e intermoleculares também se pode observar no efeito do radical hidroxilo sobre as cadeias de ácidos nucleicos, impedindo assim que se proceda à reparação, replicação e/ou transcrição do DNA e RNA [32]. Muitas vezes o radical hidroxilo é como uma “molécula fantasma”, o seu efeito sobre os tecidos é bastante visível, no entanto não é fácil a sua deteção e quantificação quando a reação está a ocorrer. Como tal, a pesquisa por métodos bioanalíticos flexíveis para a deteção destas espécies ainda é um campo em franco crescimento [6, 9].

As espécies reativas de oxigénio podem ser geradas em condições biológicas, devido a uma resposta a um interferente tóxico ou como um subproduto do oxigénio, através do uso de enzimas, tais como as da cadeia respiratória mitocondrial, as da via metabólica do ácido araquidónico, a superfamília do citocromo P450, a glucose oxidase, as aminoácidos oxidases, a xantina oxidase, a NADH/NADPH oxidase ou a óxido nítrico oxidase [33-34]. Em condições normais, a quantidade em excesso destas espécies é regulado endogenamente pelo sistema de defesa antioxidante como a superóxido dismutase, a glutathione peroxidase, a catalase, as peroxirredoxinas (peroxidases hemicas), a tioredoxina, ou via exógena através dos alimentos como micronutrientes e vitaminas [2, 35-36]. De facto, quando as concentrações destas espécies se encontram em valores moderados/baixos, as células têm mecanismos eficazes para estabelecer um novo equilíbrio de oxidação-redução. No entanto, quando a produção das espécies reativas de oxigénio excede a capacidade antioxidante inicia-se uma série de reações do stress oxidativo, ou seja, o efeito das espécies reativas é fundamentalmente uma questão de quantidade relativa, como tal, existe uma concentração a partir da qual começam-se a manifestar problemas tais como proliferação, diferenciação, senescência, autofagia, apoptose e necrose [37-41].

As funções das proteínas celulares são inevitavelmente modeladas pelo potencial de oxidação-redução da célula, isto é, a conformação das proteínas é uma

forma de sinalização da concentração das espécies reativas de oxigénio e do stress oxidativo [2]. No entanto, o mecanismo através do qual ocorre esta modulação das proteínas, em vez da sua destruição, ainda não se encontra totalmente esclarecido. Efetivamente, o aumento da concentração destas espécies desencadeia processos como a inativação ou modificação estrutural de proteínas, bem como outras macromoléculas celulares, iniciando-se assim o processo de degeneração. Este processo aumenta quanto maior for a concentração das espécies reativas de oxigénio.

A toxicidade inerente às espécies reativas de oxigénio tem vindo a ser amplamente estudada. Recentemente alguns estudos têm provado que estas mesmas moléculas atuam como sinalizadores biológicos. Este paradoxo está subjacente aos seres vivos e entender os seus mecanismos é perceber o modo como mantêm a sua integridade biológica e conseqüentemente o seu envelhecimento. Conhecer as várias vias que regulam as espécies reativas de oxigénio é perceber a sua toxicidade e a importância de como controlam todo o processo biológico. Controlar as suas concentrações é poder atuar nos seus mecanismos para mitigar os efeitos nefastos na saúde, especificamente, dos seres humanos.

1.2.2. Mecanismos biológicos para a deteção das espécies reativas de oxigénio

A importância das espécies reativas de oxigénio e da necessidade de uma melhor compreensão dos mecanismos pelos quais estas espécies são produzidas, levou a um recente aumento na pesquisa de sensores ou biossensores para os detetar e/ou quantificar. No entanto, a maioria dos sensores descritos são adequados para a deteção *in vitro* e apenas fornecem alguma informação útil em estudos *in vivo*. Deste modo, é premente o desenvolvimento de sensores de forma a compreender melhor o papel desempenhado pelas espécies reativas de oxigénio quer nas vias metabólicas; quer nos processos patológicos [9].

Muitos dos métodos de determinação e quantificação de espécies reativas de oxigénio são feitos, não diretamente sobre a espécie mas sobre um qualquer interveniente do seu mecanismo, por exemplo a deteção eletroquímica do hidroxilo durante a oxidação lipídica [42]. Para tal, o conhecimento do mecanismo global é fulcral para o desenvolvimento dos referidos sensores. Ao longo dos últimos anos têm

sido desenvolvidos alguns captadores específicos de espécies reativas de oxigénio em organelos e indicadores de potencial de oxidação-redução de proteínas, o que tem permitido visualizar de uma forma precisa as mudanças espaço-temporais do potencial de oxidação-redução no interior de células e mesmo de animais. Estes avanços permitiram obter informação dos locais ou células responsáveis pelas várias sinalizações celulares e outros eventos biológicos, que eram inacessíveis até então [43-45]. De facto, a informação que se pode obter é preciosa, particularmente na área das doenças relacionadas com o desenvolvimento do stress oxidativo, como o cancro, a síndrome metabólico ou lesões neurodegenerativas. No entanto, a aplicação destas técnicas em tecidos vivos é ainda limitada, pelo que a evolução destas metodologias analíticas são fundamentais.

Uma das grandes dificuldades no estudo quantitativo é a instabilidade da concentração das espécies reativas de oxigénio, tanto em condições fisiológicas como patológicas, o que leva a que seja difícil estabelecer uma correlação entre a concentração das mesmas e dos seus mecanismos subjacentes. Muito trabalho de pesquisa está a ser realizado com biossensores no intuito de melhor compreender os seus mecanismos e possíveis correlações. Os biossensores mais comuns, para deteção de espécies reativas de oxigénio, são proteínas e isto deve-se, essencialmente, ao conhecimento já adquirido de alguns mecanismos nos quais estas proteínas participam (Fig.1.2). Este tipo de sensores atua de acordo com o método de deteção oxidação-redução e embora já sejam objeto de estudo há algum tempo, ainda não existe uma definição clara e consensual [27]. Genericamente usa-se uma proteína juntamente com uma pequena molécula, ou ião, que reagem especificamente com a espécie reativa de oxigénio, que por sua vez regularia a atividade de uma proteína, uma sinalização celular, uma transcrição de genes ou qualquer outro processo celular [46-48]. As moléculas que convertem a mudança do potencial de oxidação-redução numa alteração da atividade da proteína têm de possuir uma base molecular que lhes permita efetuar reações reversíveis. As proteínas que possuem aminoácidos essenciais, tais como a cisteína, a metionina e a selenocisteína, podem sofrer reações reversíveis em condições biológicas [49], pelo que são as mais usadas para o desenvolvimento deste tipo de biossensores. O aminoácido cisteína é um dos mais abundantes e a maioria das proteínas tem cisteína e metionina na sua estrutura de base, o que torna ambos os aminoácidos muito relevantes na deteção das espécies reativas de oxigénio. Quando um resíduo de cisteína deteta uma alteração no potencial de oxidação-redução do meio, altera a conformação da proteína e isto pode refletir-se num sinal para o meio ambiente [50]. Logo, a maioria dos sistemas de

deteção de espécies reativas de oxigênio, baseiam-se na ativação ou desativação de proteínas reguladas pelo potencial de oxidação redução, que encontra na cisteína o bloco principal, uma espécie de interruptor com o seu grupo tiol a responder ao potencial de oxidação redução do meio (Fig.1.3).

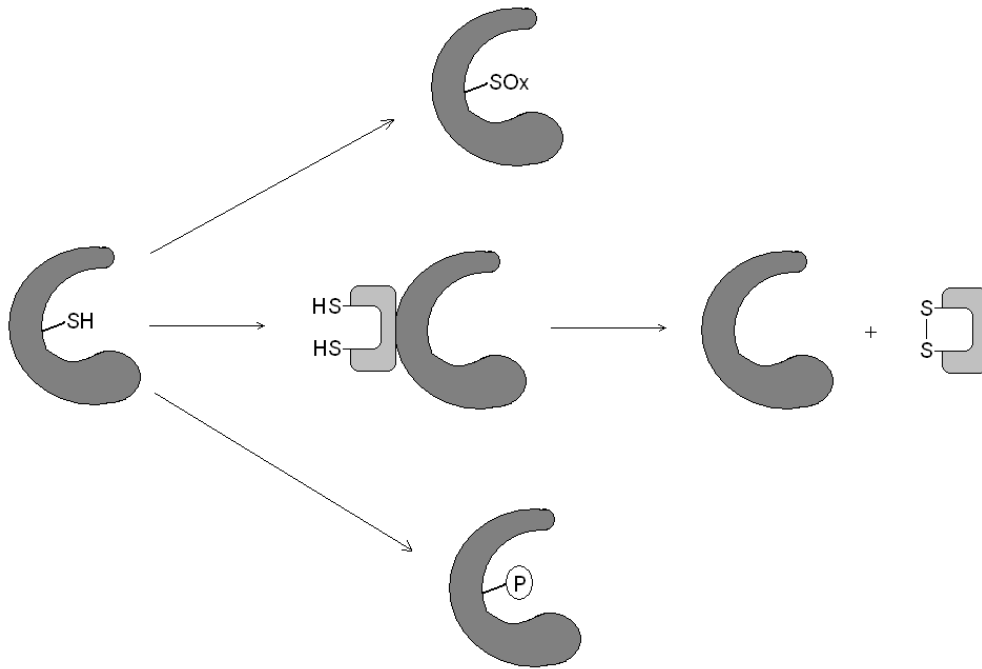


Figura 1.2 - Espécies reativas de oxigênio podem afetar as funções das proteínas. Exemplo de três mecanismos (de cima para baixo): oxidação direta dos grupos tióis do aminoácido, por exemplo cisteína, e consequente alteração da forma/função da proteína; modificação da proteína por oxidação de partes proteicas com consequente dissociação; por fim ativação/desativação enzimática por fosforilação.

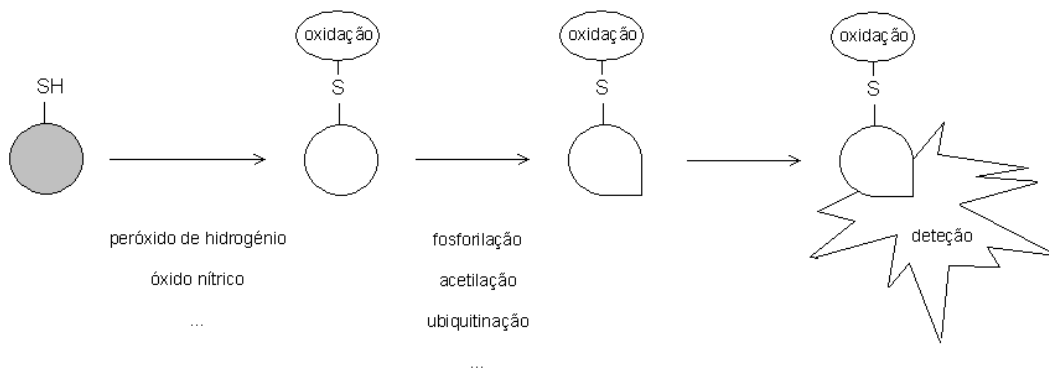


Figura 1.3 - Representação do modo de deteção de espécies reativas de oxigênio ou de azoto por alteração das proteínas. Adaptado de [27].

Um exemplo claro desse mecanismo é a deteção de espécies reativas de oxigénio com proteínas de mamíferos. Visto que os grupos tióis são facilmente oxidados pelas espécies reativas de oxigénio e podem sofrer oxidação a ácido sulfénico, sulfínico e sulfónico, pontes dissulfureto e nitrotióis [51]. Normalmente a reação dá-se por etapas, iniciando-se com o grupo sulfureto da cisteína a ser oxidado a ácido sulfénico, altamente instável, para terminar na formação de ligações dissulfito, significativamente mais estáveis [52, 53]. No entanto, estas ligações podem ser novamente reduzidas a tióis, pelos redutores existentes no meio celular [54]. A formação das ligações dissulfito é responsável pela conformação quaternária das proteínas, pelo que se encontra relacionada com o aumento da rigidez da proteína e a diminuição da atividade química dos centros ativos.

De facto, apesar do enorme esforço colocado na investigação dos sensores para espécies reativas de oxigénio, há ainda um longo percurso a percorrer para esclarecer e aprofundar o conhecimento do seu mecanismo químico/bioquímico, bem como a alteração das conformações das proteínas, que ocorre quando estas são usadas como indicadores de potencial de oxidação-redução [27]. Assim sendo, devem ser efetuados mais estudos nesse sentido explorando, por exemplo, técnicas de espectroscopia de massa e cristalografia, para monitorizar a evolução *in vivo* em células e/ou tecidos das espécies reativas de oxigénio, de forma a compreender algumas patologias associadas.

1.2.3. Espécies reativas de oxigénio como sinalizadores intercelulares

Espécies reativas de oxigénio são moléculas biologicamente relevantes, que desempenham um importante papel nos seres vivos. Estão associadas a fenómenos como apoptose ou outros efeitos tóxicos e, mais recentemente, têm sido indicadas como espécies sinalizadoras em células e tecidos [55]. Esta função sinalizadora das espécies reativas de oxigénio tem sido revestida de alguma controvérsia, uma vez que para desempenhar este papel de sinalizador molecular é necessário um grande grau de especificidade. No entanto, as espécies reativas são por natureza o oposto, são espécies com elevada reatividade e portanto têm tendência a reagir

indiferenciadamente. Deste modo, como pode uma espécie reativa ser suficientemente específica para funcionar como molécula de sinalização? A maioria dos processos que conduzem a uma especificidade química requerem o reconhecimento macromolecular através da complementaridade das formas das respetivas macromoléculas (modelo clássico da bioquímica chave e fechadura). No entanto, as espécies reativas funcionam de uma forma ligeiramente diferente, o reconhecimento é feito a nível atómico, ou seja, participam numa série de reações químicas especificamente num determinado átomo da proteína alvo, conferindo-lhe modificações permanentes [56].

O tema das espécies reativas de oxigénio como moléculas sinalizadores tem vindo a ganhar atenção da comunidade científica, e como prova disso, temos o aparecimento das várias teorias que se refletem num crescente número de publicações sobre o assunto [2, 9, 55-56]. Um dos principais temas é o controlo dos níveis de oxigénio e as suas relações com as espécies reativas. A concentração de oxigénio num organismo é muito relevante, uma vez que independentemente de se encontrar em excesso ou défice pode afetar a sua integridade funcional, bem como a estrutura e função dos organelos, células, tecidos e órgãos. Um exemplo disso mesmo é o fornecimento reduzido de oxigénio (hipóxia) que leva a uma redução da glucose e conseqüente insuficiência de energia nos órgãos. Como tal, é crucial manter o oxigénio numa concentração adequada, sendo que, essa homeostasia é conseguida através de um sistema bastante complexo. Este sistema responde às variações da pressão parcial de oxigénio com uma série de reações de sinalização em cascata, usando as espécies reativas de oxigénio como mensageiros secundários. Para baixos valores da pressão parcial de oxigénio (hipóxia), considera-se que o mecanismo é ainda algo controverso, no entanto, para altos valores da pressão parcial do oxigénio (normóxia), sabe-se que o mecanismo de sinalização requer hidroxilases ou quinases e fosfatases. De acordo com a maioria dos estudos já efetuados, estes mecanismos incluem sempre enzimas hemo, tais como a NADPH oxidase e diferentes unidades transportadoras de eletrões da cadeia de transporte mitocondrial. Duas das principais questões destas teorias são a alta reatividade e a carga das espécies reativas. Como tal, radicais, como o superóxido, são menos propensos a atuar como mensageiros secundários, uma vez que a carga diminui a sua difusividade. No entanto, o seu produto da dismutação, o peróxido de hidrogénio, que não tem carga, tem uma maior mobilidade e pode participar em reações de transferência de um ou dois eletrões nas células. Vulgarmente o peróxido de hidrogénio é degradado no citosol ou nas mitocôndrias pela ação da glutathione peroxidase ou catalisado nas peroxisomas, no entanto, também pode ser degradado, não enzimaticamente, a hidroxilo pela ação do

catião ferro (II), reagente de Fenton [57]. Isto é particularmente importante visto que irá afetar as ligações ferro enxofre principalmente em macromoléculas com resíduos de cisteína. Deste modo, verifica-se que a concentração das espécies reativas de oxigénio tem funções de sinalização uma vez que alteram a ativação de determinadas vias específicas e modulam a expressão dos genes e a conformação de proteínas funcionais (Fig.1.2) [56].

Espécies reativas de oxigénio não são substâncias altamente reativas que reagem indiferentemente com biomoléculas com um qualquer efeito tóxico, são essencialmente participantes delicados, com grande reatividade, é certo, e que de um modo implacável, controlam, supervisionam e regulam o processo mais elaborado que conhecemos no universo - a vida. Nos últimos anos temos assistido ao aparecimento de inúmeros campos das ciências da vida dedicados a este tema [58].

1.3. Sensores e biossensores *in vivo* e *in vitro*

Espécies reativas de oxigénio e azoto desempenham um importante papel nos meios biológicos, no entanto, o mecanismo através do qual este processo se desenrola é pouco conhecido e naturalmente controverso [59]. Como tal, não é de admirar que o número de publicações com novos sensores e/ou biossensores tenha aumentado exponencialmente nos últimos anos [9, 27, 59]. O resultado deste crescente interesse é o desenvolvimento de inúmeras moléculas capazes de responder, através da alteração de uma característica mensurável, à presença das espécies reativas de oxigénio e azoto (Fig.1.4). A maioria destas moléculas foram adaptações de moléculas biológicas com mecanismos de ação já conhecidos. A interação entre as espécies reativas e o sensor pode ser através de: uma reação de oxidação redução, um mecanismo não seletivo para as espécies reativas de oxigénio e azoto, visto estas serem fortes oxidantes, ou uma outra afinidade química qualquer.

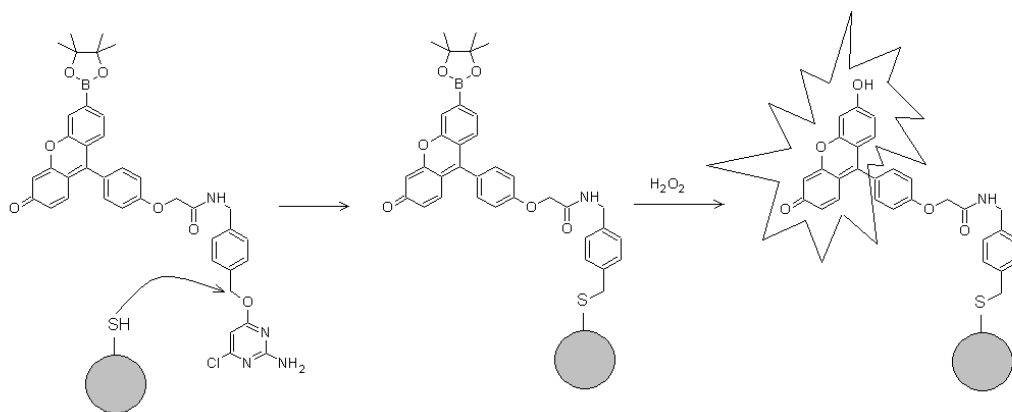


Figura 1.4 – Representação da estratégia de deteção para o peróxido de hidrogénio recorrendo à metodologia de proteína específica. Adaptado de [60].

Neste trabalho dá-se particular atenção aos estudos realizados *in vivo* apoiados em técnicas de fluorescência, uma técnica não invasiva e bastante sensível. No entanto, não é fácil criar um sensor para funcionar em condições citoplasmáticas. De facto, um biossensor para medições *in vivo* deve ser: solúvel em água, permeável à membrana celular, não tóxico e excitável em comprimentos de onda que não causem reação química nem autofluorescência, ou seja, deverá ser excitável acima dos 450 nm. Adicionalmente deverá possuir boas propriedades fotofísicas e excelentes características de deteção, tal como a seletividade, ser facilmente capturado pela célula, ter boa difusividade e reversibilidade. Além de tudo isso, deve responder em tempo real e ter uma qualquer proporcionalidade manuseável e de fácil utilização com a concentração da espécie reativa [21].

1.3.1. Sensores de espécies reativas de azoto

Atualmente são várias as estratégias que têm vindo a ser adotadas para desenvolver sensores bastante sensíveis e seletivos para as espécies reativas de azoto. O óxido nítrico tem sido um dos analitos mais explorados no interior de células vivas e através do qual se tem obtido bons resultados [61-62]. Por outro lado, também têm sido usados sensores baseados em proteínas [63] ou mesmo recorrendo a tecnologias emergentes como nanotubos [64], no entanto, os sensores mais comuns são constituídos por uma molécula orgânica juntamente com um metal. Embora os fluoróforos orgânicos tenham grandes desvantagens para a deteção *in vivo*, como baixa intensidade de fluorescência e fotoestabilidade, inércia química ou fotobranqueamento, o seu uso para detetar espécies reativas em células tem sido amplamente usado e tem-se obtido alguns casos de sucesso [21]. Os sensores baseados em compostos orgânicos apresentam a grande vantagem de se poder quantificar o analito, normalmente por extinção da fluorescência, devido à forte dependência da fluorescência com a concentração.

Um dos primeiros casos de sucesso para espécies reativas de azoto foi o fluoróforo fluoresceína. Conhecida pelo seu grande rendimento quântico, a fluoresceína mostrou-se bastante sensível, no entanto, a intensidade de fluorescência está muito dependente do valor de pH do meio, bem como, a sua elevada fotodegradação, o que levou à procura de outros fluoróforos orgânicos. Como tal,

foram desenvolvidos sensores à base de rodamina [65] ou cianina [66] e, por exemplo, no caso da cianina foram obtidos avanços significativos na bioimagem do óxido nítrico em tecidos vivos. Um outro sensor orgânico frequentemente usado é a o-fenilenodiamina e os seus derivados [67]. Tal facto deve-se à existência de eletrões livres nas diaminas vicinais, o que altera significativamente a energia do grupo aromático e uma vez sequestrados, por exemplo, pelo óxido nítrico, ocorre a extinção da fluorescência da o-fenilenodiamina e dos seus derivados [21]. Aliás, esta teoria da transferência de eletrões fotoinduzidos que extinguem a fluorescência de um qualquer fluoróforo que contenha dois grupos anima consecutivos é relativamente aceite [68], por exemplo, a molécula vicinal diaminobenzoacridina reage com o óxido nítrico e é usada com muito sucesso para mapear os macrófagos [69].

Apesar do facto de alguns fluoróforos orgânicos serem bons sensores para espécies reativas de azoto, estas moléculas apresentam o problema de não reagirem reversivelmente e de, frequentemente, reagirem de forma indireta com o analito [21]. Alternativamente existem os sensores compostos por uma molécula orgânica e um metal. Estes possuem a vantagem de reagir diretamente com o analito, através de um processo de oxidação-redução entre a espécie reativa e o catião metálico que por sua vez condiciona a fluorescência da molécula. Uma outra vantagem desta classe de sensores é a capacidade de reagir reversivelmente. Ao longo dos anos têm sido usados vários metais na constituição destes sensores organometálicos, nomeadamente, os catiões cobre, ruténio, ródio ou o ferro [70]. De todas as possibilidades exploradas, o cobre parece ser o mais promissor, uma vez que é um metal versátil que permite medições diretas em tempo real e no interior de células vivas. Um exemplo de um sensor organometálico baseado em cobre é o ácido cobre-(2-{2-cloro-6-hidroxi-[(2-metil-quinolina-8-ilamina)-metil]-3-oxo-3H-xanteno-9-il)-benzoico, em que o catião cobre, que se encontra complexado na estrutura da quinolina, é reduzido pela ação direta do óxido nítrico a cobre(I) e ocorre então um incremento da fluorescência do fluoróforo [71-72]. Este aumento é proporcional à concentração de óxido nítrico, sendo que este sensor é específico.

Uma estratégia recente para melhorar a sensibilidade dos sensores para o óxido nítrico é a retenção celular. De facto, verifica-se que quanto mais tempo o sensor permanecer na célula maior é a sensibilidade e menor o ruído de fundo. Esta estratégia foi desenvolvida quando se descobriu que a retenção celular da calceína, um complexo de fluoresceína, se devia ao grupo iminodiacético. Pelo que ao acoplar um sensor a este grupo aumenta-se a sensibilidade ao analito, mesmo que este se encontre em quantidades vestigiais no interior da célula [73].

Atualmente são inúmeros os exemplos de sensores para espécies reativas de azoto com o recurso a fluoróforos, nomeadamente através do uso de ácido fólico, derivados da calceína ou derivados do boro-dipirrometano, como sensores para o peroxinitrito [73-75] ou sensores com estruturas mais complexas como o manganês(III)-meso-(tetrakis(4-sulfonato-fenil))-porfirina imobilizada em xerogel dopado com dendímeros para monitorizar o ácido nitroso [76]. No entanto, as espécies mais estudadas continuam a ser o óxido nítrico e o peroxinitrito, remetendo para segundo plano todas as restantes espécies reativas de azoto.

1.3.2. Sensores de espécies reativas de oxigénio

O desenvolvimento de sensores para espécies reativas de oxigénio, tal como para as espécies reativas de azoto, começou pelos fluoróforos orgânicos. Um fluoróforo orgânico que tem sido amplamente usado na deteção do peróxido de hidrogénio intracelular, é uma fluoresceína reduzida, a diclorodihidrofluoresceína [20]. Este composto, na forma de sal, penetra facilmente nas células e após sofrer oxidação torna-se fluorescente, podendo ser detetado por várias técnicas fluorescentes como, por exemplo, a microscopia confocal ou citometria de fluxo. O processo é tão simples que se tornou bastante popular para monitorizar espécies oxidantes em células. O mecanismo pelo qual se torna fluorescente na presença de um oxidante, é uma oxidação a dois eletrões e não é específico para o nenhum oxidante que participe com um par de eletrões, como no caso do peróxido de hidrogénio, mas continua, por exemplo, a ser amplamente usado para medir a quantidade peróxido de hidrogénio na forma de stresse oxidativo em células endoteliais [77]. Mesmo com a falta de seletividade, a diclorodihidrofluoresceína permite obter informação acerca de outros constituintes, por exemplo a taxa de nitração celular quando se adiciona um qualquer dador de óxido nítrico ao meio citoplasmático pela monitorização do sensor na presença de peróxido de hidrogénio [78]. No entanto, a reação não se ocorre somente com o peróxido de hidrogénio. De facto, a diclorodihidrofluoresceína não é específica, uma vez que outras espécies reativas também têm um potencial oxidativo adequado à oxidação do sensor. Independentemente desta ausência de especificidade, este sensor é usado como medida da capacidade oxidante do meio citoplasmático. Recentemente, surgiram alguns sensores fluorescentes seletivos para o peróxido de hidrogénio, nomeadamente a 3,7-bis(pinacolato)borofenoxazina que é oxidada a

fenoxazina [79], a oxidação do vermelho de amplex, a resorufina, através da peroxidase de rábano [80]. Hideg *et al* tem vindo a usar o DanePy e HO-1889NH, dois derivados do pirrol, para detetar o oxigénio singleto e o superóxido, respetivamente, e a sua aplicação mostrou-se seletiva e a extinção da fluorescência proporcional aos despectivos analitos [81-82].

No seguimento da procura de sensores para espécies reativas de oxigénio desenvolveu-se a hidroxifenil fluoresceína, composto não fluorescente que se encontra hoje disponível no mercado. Tal como a diclorodihidrofluoresceína, este composto reage extensivamente com as espécies reativas de oxigénio, segundo um mecanismo de oxidação-redução, e não se mostra específico para nenhuma delas, no entanto, pequenas modificações na sua estrutura podem se mostrar altamente seletivas. Um outro exemplo é o 4[N-metil-N(4-hidroxifenil)amino]-7-nitro-benzofurazano, que não é fluorescente, mas após a reação com radicais peróxido origina um composto fluorescente [83]. Os sensores para espécies reativas de oxigénio já deram provas de responder a quantidades vestigiais quer *in vitro* quer *in vivo*, com um excelente contraste e fora da zona de autofluorescência celular, no entanto, carecem de seletividade porque são sensores essencialmente de oxidação-redução.

1.4. Estrutura da tese

O trabalho desenvolvido ao longo do Plano Doutoral resultou nesta tese que consta de sete capítulos.

O primeiro capítulo faz-se a apresentação das espécies reativas de oxigénio e azoto, onde se encontram e qual o seu papel no seres vivos. Mostra-se a sua importância quer como pilares do funcionamento dos processos biológicos quer como o responsável por inúmeras patologias e, em última análise, os responsáveis pela não imortalidade dos seres vivos. Neste capítulo encontram-se também a organização da tese assim como os objetivos propostos neste Plano Doutoral.

O segundo capítulo apresenta de um modo particular o desenvolvimento e aperfeiçoamento dos diferentes constituintes dos equipamentos de medição. Ao longo de todos os trabalhos recorreu-se quase sempre a equipamento de medida concebido e desenvolvido no laboratório, por um lado na tentativa de experimentar e otimizar diferentes estratégias de medição, por outro lado inovar o modo como essas mesmas medições possam ser efetuadas.

No terceiro e quarto capítulos estão descritos dois casos de sucesso de dois sensores químicos que resultaram em artigos publicados em revistas científicas internacionais. O sensor químico luminol que desenvolve quimioluminescência na presença de peróxido de hidrogénio foi imobilizado numa estrutura de sílica e a radiação desenvolvida foi transportada através de fibras óticas até ao detetor apresentado no terceiro capítulo. No capítulo quarto está descrito o desenvolvimento do sensor químico fluorescente fluoresceína reduzida, a qual produz um sinal proporcional à presença seletiva de óxido nítrico. Este sistema sensor usou fibras óticas como meio de transporte da radiação luminosa emitida pelo sensor desde a amostra até ao detetor.

O capítulo cinco descreve a utilização de materiais semicondutores nanocristalinos fluorescentes como sensores químicos para as espécies reativas de oxigénio e azoto. São descritas as diferentes estratégias pelas quais se pode atuar no desenvolvimento de sensores baseados nestes nanomateriais, nomeadamente, a

constituição das nanoestruturas, a composição da camada superficial e modos de funcionalização dos mesmos.

No capítulo seis encontra-se descrito um novo sensor químico para espécies reativas de oxigênio, a lactose alterada. O sensor está caracterizado analiticamente, a lactose alterada é fluorescente e apresenta extinção de fluorescência na presença de alguns analitos, nomeadamente ao ião hipoclorito, no, entanto, carece de caracterização química.

O sétimo e último capítulo apresenta-se as conclusões obtidas e sugestões para trabalho futuro.

1.5. Objetivos

O objetivo geral desta Tese de Doutoramento foi o desenvolvimento de sensores para espécies reativas de oxigénio e azoto.

As espécies reativas de oxigénio e azoto são indicadas como os responsáveis pelo regulamento dos processos biológicos, no entanto, estão associados ao aparecimento e desenvolvimento de muitas patologias. É de importância fundamental dispor de ferramentas analíticas que permitam a sua monitorização em tempo real e *in vivo*.

Este trabalho teve como objetivo a idealização, conceção e síntese de sensores químicos para espécies reativas de oxigénio e azoto. Conceber e construir estruturas onde se possam inserir os sensores químicos de modo a otimizar as características sensores e tornar o sistema sensor de reduzidas dimensões (se possível portátil) robusto e sem nunca esquecer o fator económico.

A luminescência foi o método analítico escolhido devido ao reduzido número de interferentes, logo à partida maior seletividade e menores limites de deteção, e simplicidade de construção dos equipamentos.

Faz parte deste trabalho a busca de substâncias com elevadas intensidades de fluorescência, modificar a sua estrutura química de modo a se tornarem sensores químicos seletivos de espécies reativas de oxigénio e azoto - nanoengenharia.

1.6. Bibliografia

- [1] L. Margulis, D. Sagan, 1986, “Microcosmos – quatro biliões de anos de evolução microbiana”, Edições 70, Lisboa, Portugal.
- [2] Eberhardt, M. K., 2001, “Reactive oxygen metabolites – Chemistry and medical Consequences”, CRC Press, Boca Raton.
- [3] T. Kietzmann, A. Gorch, 2005, *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 16, 474-486.
- [4] B. Halliwell, J. M. C. Guttering, 2007, “Free Radicals in Biology and Medicine” Fourth Edition, Oxford University Press.
- [5] S. C. Litescu, S. A. V. Eremia, M. Diaconu, A. Tache, G. Radu, 2011, “Environmental Biosensors - Biosensors Applications on assessment of Reactive Oxygen Species and Antioxidants”, Vernon Somest Edition, 95-114.
- [6] M. J. Davies, R. T. Dean, 1997, “Radical-Mediated Protein Oxidation. From Chemistry to Medicine”, Oxford Science Publications, United Kingdom, 25-120.
- [7] S. Raha, B. H. Robinson, 2000, *Trends in biochemical Science*, 25 (10), 502-508.
- [8] J. E. Ricci, N. Waterhouse, D. R. Green, 2003, *Cell Death and Differentiation*, 10, 488-492.
- [9] C. Gonzalez, G. Sanz-Alfayate, M. T. Agapito, A. Gomez-Nino, A. Rocher, A. Obeso, 2002, *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 132, 17-41.
- [10] R. F. Furchgott, 1999, *Bioscience Reports (Nobel Lecture)*, 19 (4), 235-251.
- [11] L. I. Ignarro, 1999, *Bioscience Reports (Nobel Lecture)*, 19 (2), 51-71.
- [12] F. Murad, 1999, *Bioscience Reports (Nobel Lecture)*, 19 (3), 133-154.
- [13] J. Garthwaite, 2008, *European Journal of Neuroscience*. 27, 2783-2802.
- [14] C. Bogdan, 2001, *Nature Immunology*, 2 (10), 907-916.

- [15] L. J. Ignarro, 2000, "Nitric Oxide Biology and Pathobiology", Academic Press, 1 Edition, San Diego.
- [16] J. M. Fukuto, A. S. Dutton, K. N. Houk, 2005, *Biochemistry Chemical Biology*, 6 (4), 612-619.
- [17] M. T. Gladwin, A. N. Schechter, D. B. Kim-Shapiro, R. P. Patel, N. Hogg, S. Shiva, R. O Cannon III, M. Kelm, D. A. Wink, M. G. Espey, E. H. Oldfield, R. M. Pluta, B. A. Freeman, J. R. Lancaster Jr, M. Feelisch, J. O Lundberg. 2005, *Nature Chemical Biology*, 1 (6), 308-314.
- [18] C. Szabó, H. Ischiropoulos, R. Radi, 2007, *Nature Reviewa Drug Discovery*, 6 (8), 662-680.
- [19] S. Borgmann, 2009, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2009, 394, 95-105.
- [20] B. Kalyanaraman, V. Darley-Usmar, K. J. A. Davies, P. A. Dennery, H. J. Forman, M. B. Grisham, G. E. Mann, K. Moore, L. J. Roberts II, H. Ischiropoulos, 2012, *Free Radical Biology & Medicine*, 52, 1-6.
- [21] L. E. McQuarde, S. J. Lippard, 2010, *Current Opinion in Chemical Biology*, 14, 43-49.
- [22] D. A. Butterfield, J. Drake, C. Pocernich, A. Castegna, 2001, *Trends in Molecular Medicine*, 7 (12), 548-554.
- [23] I. Dalle-Donne, R. Rossi, R. Colombo, D. Giustarini, A. Milzani, 2006, *Clinical Chemistry*, 52 (4), 601-623.
- [24] S. Jaeger, C. U. Peitzlik, 2008, *Current Alzheimer Research*, 5 (1), 15-25.
- [25] R. H. Knopp, P. Paramsothy, B. Atkinson, A. Dowdy, 2008, *American Journal of Cardiology*, 101 (8), S48-S57.
- [26] J. Wang, B. Hu, L. Hong, H. Cai, C. Zhang, 2008, *Clinica Chimica Acta*, 390 (1-2), 67-71.
- [27] Y. Wang, J. Yang, J. Yi, 2012, *Antioxidants & Redox Signaling*, 16 (7), 649-657.
- [28] R. Kohen, A. Nyska, 2002, *Toxicology Pathology*, 30, 620-650.
- [29] R. Lui, M. Gao, Z. Yang, G. Du, 2008, *Brain Research*, 1216, 104-115.
- [30] R. K. Monroe, S. W. Halvorsen, 2009, *Neurotoxicology*, 30, 589-598.
- [31] S. Pillai, C. Oresajo, J. Hayward, 2005, *International Journal of Cosmetic Science*, 27 (1), 17-34.

- [32] T. Kietzmann, J. Fandrey, H. Acker, 2000, *News in Physiological Sciences*, 15, 202-208.
- [33] T. Finkel, 2001, *IUBMB Life*, 52, 3-6.
- [34] H. Cai, D. G. Harrison, 2012, *Circulation Research*, 87, 840-844.
- [35] B. A. Freeman, J. D. Crapo, *Laboratory investigation*, 47 (5), 412-426.
- [36] R. Brigelius-Flohé, A. Banning, K. Schnurr, 2003, *Antioxid Redox Signal*, 5 (2), 205-215.
- [37] H. M. Sowter, R. Raval, J. Moore, P. J. Ratcliffe, A. L. Harris, 2003, *Cancer Research*, 63, 6130-6134.
- [38] S. Hara, J. Hamada, C. Kobayasshi, Y. Kondo, N. Imura, 2001, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 287 (4), 808-813.
- [39] L. E. Huang, J. Gu, M. Schau, H. F. Bunn, 1998, *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA*, 95, 7987-7992.
- [40] R. K. Bruick, S. L. McKnight, 2001, *Science*, 294, 1337-1340.
- [41] P. C. Mahon, K. Hirota, G. L. Semenza, 2001, *Genes & Development*, 15, 2675-2686.
- [42] D. R. Thévenot, K. Toth, R. A. Durst, G. S. Wilson, 2001, *Biosensors & Bioelectronics*, 16, 121-131.
- [43] Y. C. Chang, C. N. Huang, C. H. Lin, H. C. Chang, C. C. Wu, 2010, *Proteomics*, 10 (16), 2961-2971.
- [44] D. P. Jones, Y. Go, 2011, *Current Opinion in Chemical Biology*, 15, 103-112.
- [45] A. J. Meyer, T. P. Dick, 2010, *Antioxidants & Redox Signaling*, 13 (5), 621-650.
- [46] D. A. I. Mavridou, E. Saridakis, P. Kritsiligkou, A. D. Goddard, J. M. Stevens, S. J. Ferguson, C. Redfield, 2011, *Jornal of Biological Chemistry*, 285 (28), 24943-24956.
- [47] S. Ueda, H. Nakamura, H. Masutani, T. Sasada, S. Yonehara, A. Takabayashi, Y. Yamaoka, J. Yodoi, 1998, *The Journal of Immunology*, 161, 6689-6695.
- [48] C. C. Winterbourn, M. B. Hampton, 2008, *Free Radical Biology & Medicine*, 45, 549-561.
- [49] D. P. Jones, 2010, *Journal of Internal Medicine*, 268 (5), 432-448.
- [50] J. J. Haddad, 2002, *Cellular Signalling*, 14, 879-897.

- [51] N. Brandes, S. Schmitt, U. Jakob, 2009, *Antioxidants & Redox Signaling*, 11 (5), 997-1014.
- [52] A. Claiborne, T. C. Mallett, J. I. Yeh, J. Luba, D. Parsonage, 2001, *Advances in Protein Chemistry*, 58, 215-276.
- [53] C. B. Poor, P. R. Chen, E. Duguid, P. A. Rice, C. He, 2009, *the Journal of Biological Chemistry*, 284 (35), 2317-2324.
- [54] O. Blokhina, E. Virolainen, K. V. Fagerstedt, 2003, *Annals of Botany*, 91, 179-194.
- [55] B. D'Autréaux, M. B. Toledano, 2007, *Molecular Cell Biology*, 8, 813-824.
- [56] C. Nathan, 2003, *The Journal of Clinical Investigation*, 111 (6), 769-778.
- [57] J. T. Mason, S. Kim, D. B. Knaff, M. J. Wood, 2006, *Biochemistry*, 45 (45), 13409-13417.
- [58] O. H. Petersen, A. Spat, A. Verkhatsky, 2005, *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 360, 2197-2199.
- [59] T. Acker, J. Fandrey, H. Acker, 2006, *Cardiovascular Research*, 71, 195-207.
- [60] D. Srikun, A. E. Albers, C. I. Nam, A. T. Iavarone, C. J. Chang, 2010, *Journal of the American Chemical Society*, 132, 4455-4465.
- [61] M. Sato, N. Hide, Y. Umezawa, 2005, *Proceedings of the National Academy of Science*, 102 (41), 14515-14520.
- [62] M. Sato, T. Nakajima, M. Goto, Y. Umezawa, 2006, *Analytical Chemistry*, 78, 8175-8182.
- [63] E. M. Boon, M. A. Marletta, 2006, *Journal of the American Chemical Society*, 128, 10022-10023.
- [64] J. Kim, D. A. Heller, H. Jin, P. W. Barone, C. Song, J. Zhang, L. J. Trudel, G. N. Wogan, S. R. Tannenbaum, M. S. Strano, 2009, *Nature Chemistry*, 1 (6), 473-481.
- [65] H. Kojima, M. Hirotsu, N. Nakatsubo, K. Kikuchi, Y. Urano, Y. Higuchi, Y. Hirata, T. Nagano, 2001, *Analytical Chemistry*, 73, 1967-1973.
- [66] E. Sasaki, H. Kojima, H. Nishimatsu, Y. Urano, K. Kikuchi, Y. Hirata, T. Nagano, 2004, *Journal of the American Chemical Society*, 127, 3684-3685.
- [67] X. Sun, Y. Xu, W. Zhu, C. He, L. Xu, Y. Yang, X. Qian, 2012, *Analytical Methods*, 4, 919-922.

- [68] H. Kojima, N. Nakatsubo, K. Kikuchi, S. Kawahara, Y. Kirino, H. Nagoshi, Y. Hirata, T. Nagano, 1998, *Analytical Chemistry* 70, 2446-2453.
- [69] J. Hu, L. Yin, K. Xu, J. Gao, L. Tong, B. Tang, 2008, *Analytical Chimica Acta*, 606, 57-62.
- [70] M. H. Lim, S. J. Lippard, 2007, *Accounts of Chemical Research*, 40, 41-51.
- [71] M. H. Lim, B. A. Wong, W. H. Pitcock, D. Mokshagundam, M. Baik, S. J. Lippard, 2006, *Journal of the American Chemical Society*, 128, 14364-14373.
- [72] M. H. Lim, D. Xu, S. Lippard, 2006, *Nature Chemical Biology*, 2 (7), 375-380.
- [73] S. Izumi, Y. Urano, K. Hanaoka, T. Terai, T. Nagano, 2009, *Journal of the American Chemical Society*, 131, 10189-10200.
- [74] J. C. Huang, D. J. Li, J. C. Diao, J. Hou, J. L. Yuan, G. L. Zou, 2007, *Talanta*, 72, 1283-1287.
- [75] Z. N. Sun, H. L. Wang, F. Q. Liu, Y. Chen, P. Kwong, H. Tam, D. Yang, 2009, *Organic Letters*, 11 (9), 1887-1890.
- [76] K. P. Dobomeier, D. A. Riccio, M. H. Schoenfisch, 2008, *Analytical Chemistry*, 80, 1247-1254.
- [77] Y. Tampo, S. Kotamraju, C. R. Chitamber, S. V. Kalivendi, A. Kesler, J. Joseph, B. Kalyanaraman, 2003, *Circulation Research*, 92, 56-63.
- [78] S. Kotamraju, Y. Tampo, A. Keszler, C. R. Chitambar, J. Joseph, A. L. Haas, B. Kalyanaraman, 2003, *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 100 (19), 10653-10658.
- [79] E. W. Miller, A. E. Albers, A. Pralle, E. Y. Isacoff, C. J. Chang, 2005, *Journal of the American Chemical Society*, 127, 16652-16659.
- [80] V. Mishin, J. P. Gray, D. E. Heck, D. L. Laskin, J. D. Laskin, 2010, *Free Radical Biology & Medicine*, 48, 1485-1491.
- [81] E. Hideg, C. Barta, T. Kálai, I. Vass, K. Hideg, K. Asada, 2002, *Plant Cell Physiology*, 43 (10), 1154-1164.
- [82] C. Barta, T. Kálai, I. Vass, K. Hideg, E. Hideg, 2002, *Acta Biologica, Szegediensis*, 46 (3-4), 149-150.
- [83] B. Heyne, C. Beddie, J. C. Scaiano, 2007, *Organic & Biomolecular Chemistry*, 5, 1454-1458.

2. Equipamento

2.1. Introdução

Simultaneamente com o desenvolvimento da química do sistema sensor, o aperfeiçoamento e a conceção de novos e melhores componentes instrumentais, que permitam registar e manipular os sinais dos sensores químicos são aspetos preponderantes do ponto de vista analítico. Neste capítulo ir-se-á abordar a medição de radiação gerada pela matéria.

Os equipamentos que permitem medir radiação gerada pela matéria são genericamente denominados de luminómetros, constituídos por porta amostras e detetor. No entanto, se a origem dessa radiação for outra radiação eletromagnética (mecanismo de fluorescência) então é necessário incorporar uma fonte de radiação. Obtém-se assim um fluorímetro ou um espectrofluorímetro, dependendo se se pretende ou não discriminar os comprimentos de onda, respetivamente (Fig.2.1). Entre o porta amostras e a fonte de radiação e o porta amostras e o detetor, pode-se colocar um monocromador, que permite filtrar (seleccionar) uma gama de comprimentos de onda. O meio mais comum de propagação da radiação entre cada um dos componentes é o ar, mas, recentemente, esta condução de radiação pode ser guiada no interior de fibras óticas.

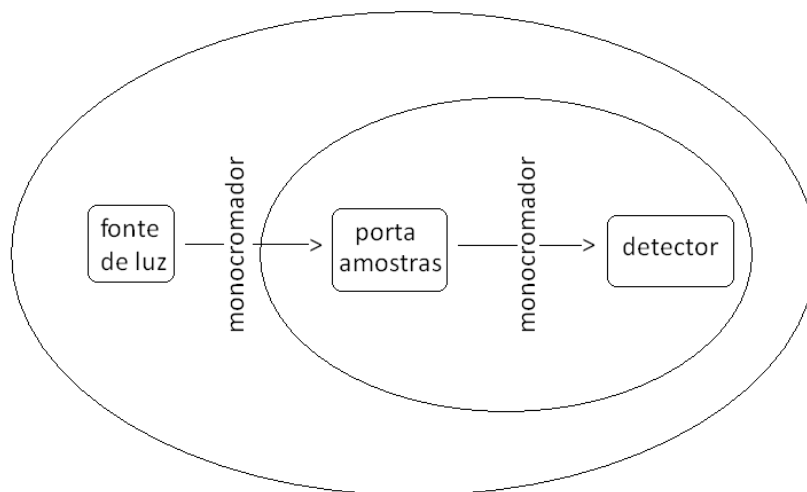


Figura 2.1 – Representação esquemática de um equipamento para medir luminescência (círculo pequeno com exceção do monocromador) e do espectrofluorímetro (círculo maior). As setas indicam o movimento da radiação através dos diferentes componentes, que podem passar através de um selecionador de comprimentos de onda.

Existem três maneiras de adquirir um equipamento para medir luminescência:

- i) Comprar o equipamento completo, tal e qual como é disponibilizado no mercado. É equipamento de grande porte, dispendioso e requer experiência para a sua utilização. Com ele é possível, por exemplo, medir fluorescência polarizada, anisotropia, tempos de vida, fluorescência (matrizes de emissão excitação) através de cuvete ou remotamente através de fibra ótica ou quimioluminescência.
- ii) Adquirir partes do equipamento em miniatura e proceder à sua montagem. Esta nova conceção apareceu no mercado com a empresa americana Ocean Optics em 1989 [1]. Presentemente existem outras como a Avantes [2] ou a portuguesa Scansci [3]. O equipamento é construído em função das necessidades, pela aquisição e junção dos diferentes módulos. A grande vantagem é o custo e as reduzidas dimensões dos diferentes componentes torna-os efetivamente portáteis e versáteis (o equipamento é desenhado para as funções e necessidades do utilizador). Outra vantagem é o grande número de módulos disponíveis. A Ocean Optics comercializa mais de 150 000 unidades e dispositivos diferentes. No entanto, requer por parte do operador ou do instalador, mais conhecimentos do método instrumental e tem como principal

desvantagem a relativa precisão e/ou sensibilidade. Estes módulos podem ser bastante versáteis, por exemplo, o porta amostras para cuvetes de 4 vias pode servir como porta cuvetes para fluorescência e para absorvância, dependendo se a ligação entre a entrada e saída da radiação está a 90°, fluorescência, ou a 180°, absorvância. Usam-se dois meios de transporte da radiação: o ar e as fibras óticas. Os diferentes componentes são alinhados de modo que a radiação emitida por um seja recolhida noutro componente. Este é o modo mais tradicional, no entanto, com o desenvolvimento das fibras óticas, a radiação passou a poder ser telescopicamente transportada entre os diferentes componentes.

iii) Considerando que a monitorização da luminescência em áreas tão diversas como processos industriais, saúde ou ambiente requer controlos cada vez mais eficientes, resultados em tempo real, robustos e pouco dispendioso, surgiu um terceiro modo de obter equipamento de medida [4,5]. Os investigadores têm dedicado especial atenção ao desenvolvimento de equipamentos que integram módulos construídos face às características de funcionamento do sensor químico e do tipo de sinal emitido. Por exemplo, a tradicional cuvette pode ser substituída por uma fibra ótica que, imobilizando o sensor químico na sua extremidade, permite detetar e quantificar analitos por simples imersão [6-9]. Presentemente, a construção de pequenos circuitos eletrónicos que já contenham acoplados o sensor químico são já realidade, levando ao aparecimento de publicações especializadas neste domínio, tal como a “Lab On a Chip” editada pela Real Sociedade de Química de Inglaterra desde 2001 [10]. A ideia do tradicional equipamento de grandes dimensões, dispendioso, pesado e de manipulação complexa, tem sido radicalmente substituída por pequenos dispositivos, portáteis, económicos e de uso intuitivo.

2.2. Fonte de radiação

Este componente pode ser usado em fluorímetros ou espectrofluorímetros. Devem gerar radiação com os comprimentos de onda necessários, de preferência com grande intensidade e forçosamente têm de ser estáveis ao longo do tempo de utilização. As fontes de radiação mais usadas são as lâmpadas de xenon ou mercúrio, contínuas ou pulsadas, lâmpadas de halogéneo/tungsténio, lâmpadas de deutério (normalmente trabalham aos pares como as de halogéneo/tungsténio), díodos emissores de luz (LED), díodos lasers e lasers.

A radiação das lâmpadas de xenon é obtida por descarga elétrica entre dois terminais de metal no interior de um bolbo com xenon a alta pressão. Pertencem a um grupo de fontes de radiação denominadas de HID (high intensity discharge). Emitem com intensidade praticamente constante dos 300 aos 800 nm (Fig.2.2). As lâmpadas de mercúrio funcionam do mesmo modo, no entanto o gás no interior da lâmpada é o mercúrio a baixa pressão. Estas últimas emitem uma intensidade praticamente constante entre os 250 e os 600 nm, no entanto, o seu espectro contém riscas, picos de acentuada intensidade, a comprimentos de onda muito bem definidos, os máximos são a 253,652; 296,728; 302,150; 313,155; 334,148; 365,015; 404,656; 407,783; 435,833; 546,074; 576,960 e 579,066 nm, o que permite utilizar esta lâmpada para calibrar comprimentos de onda [1]. As lâmpadas de xenon e de mercúrio são as mais usadas em fluorímetros e espectrofluorímetros completos devido à sua estabilidade quer a nível dos comprimentos de onde quer a nível da intensidade luminosa, isto ao longo das suas 1000 a 2000 horas de funcionamento útil. No entanto requerem fontes de alimentação elétrica estáveis, com grandes potenciais e tensões, logo são dispendiosas. O facto de produzirem espectros contínuos de radiação obriga à utilização de um monocromador ou filtro ótico de corte para selecionar comprimentos de onda.

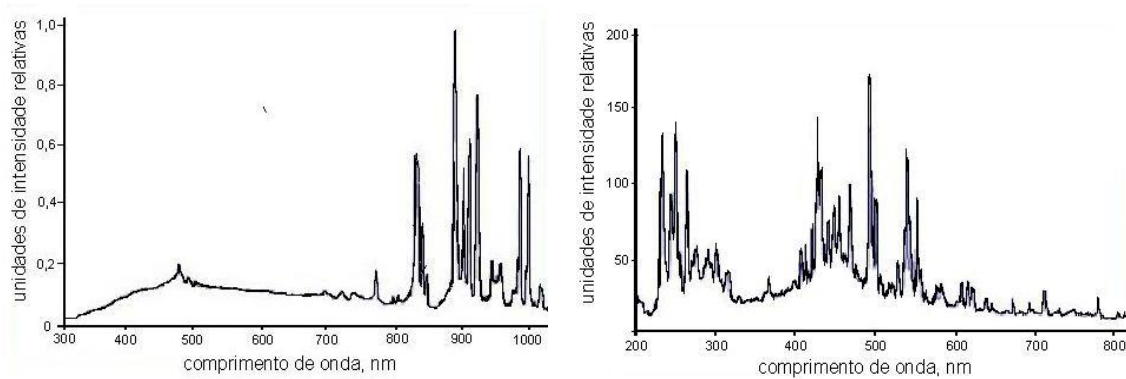


Figura 2.2 – Espectros das lâmpadas de xenon contínua (esquerda) HPX-2000, e pulsada (direita) PX-2, da Ocean Optics. Adaptado de [1].

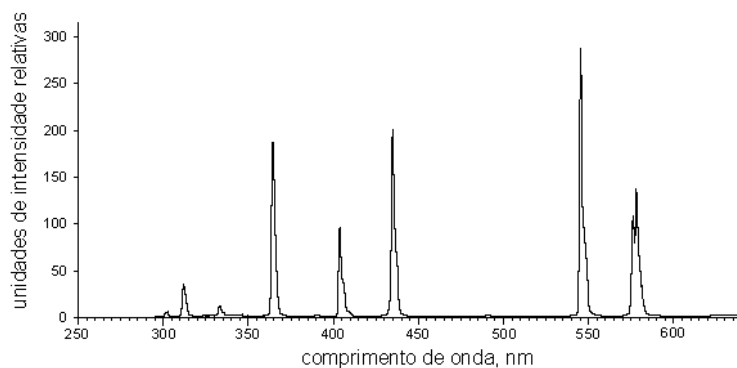


Figura 2.3 – Espectro característico da lâmpada de mercúrio.

As lâmpadas de halogéneo/tungsténio são constituídas por um filamento de tungsténio no interior de um bolbo com um gás inerte e com vapores de iodo ou bromo. Têm uma vida útil de 2000 a 4000 horas, com eficiência uniforme para comprimentos de onda superiores a 350 nm (Fig.2.4a) e são extremamente baratas, são habitualmente usadas na iluminação industrial ou doméstica. As lâmpadas de deutério são usadas para gerar radiação no ultravioleta (Fig.2.4b). Visto que o vidro absorve a radiação ultravioleta, principalmente no ultravioleta afastado, UVB e UVC, o bolbo é feito de quartzo e são cheias do isótopo de hidrogénio, o deutério. As lâmpadas de deutério são estáveis a partir dos 160 nm e podem ter tempos de vida superiores a 1000 horas. As lâmpadas de halogéneo/tungsténio e as de deutério encontram-se com muita frequência juntas, pois permitem trabalhar do ultravioleta ao visível (Fig.2.4c). Este conjunto pode obrigar à existência de monocromadores, mas é uma solução bastante versátil, tem grandes intensidades de radiação por unidade de área e é relativamente económico.

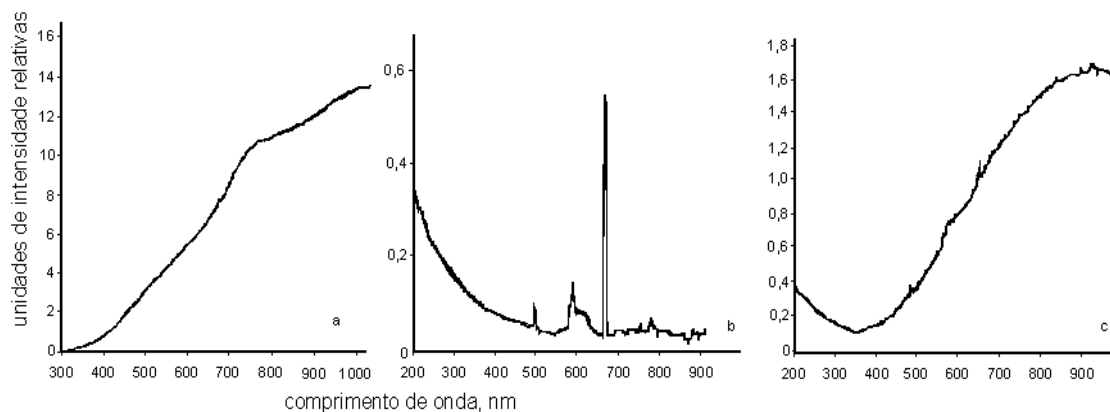


Figura 2.4 – Espectro característico da lâmpada de (a) halogéneo/tungsténio HL-2000, (b) de deutério D-2000 e (c) da combinada halogéneo/tungsténio com a de deutério DH-2000 da Ocean Optics. Adaptado de [1].

Os lasers, os díodos lasers e os LEDs caracterizam-se por produzirem irradiação monocromática (gama muito estreita e com comprimentos de onda muito bem definidos), dispensando, assim, o uso de fendas e monocromadores e a consequente redução drástica da intensidade da fonte luminosa. A potência varia conforme a natureza do dispositivo, mas em geral os LEDs são os menos intensos, seguidos pelos díodos lasers e os mais intensos são os lasers, chegando estes a ter uma intensidade tal de radiação que permite serem usados na indústria para soldar, fundir, cortar ou abalar materiais. A radiação nos lasers e díodos lasers é colimada (propaga-se como um feixe de ondas praticamente paralelas) e pode atingir os 100 Watts nos lasers de operação contínua de dióxido de carbono (10600 nm) [11].

As grandes vantagens dos LEDs são: o tempo médio de vida pode chegar aos 10 anos; baixo custo, mesmo incluindo a fonte de alimentação elétrica estabilizada; baixo consumo de energia elétrica (o funcionamento típico é à volta de 3 Volts - 40 mW); alta eficiência, a transformação de energia elétrica em luminoso é muito grande comparada com outros dispositivos geradores de radiação; atinge estabilidade de emissão luminosa em alguns segundos; reduzida dimensão (diâmetro típico da cápsula é cerca de alguns milímetros) [12]. Mesmo sendo discreto o comprimento de onda, é possível obter LEDs para quase todos os comprimentos de onda, desde o ultravioleta [13] até ao infravermelho [14] (Fig.2.5).

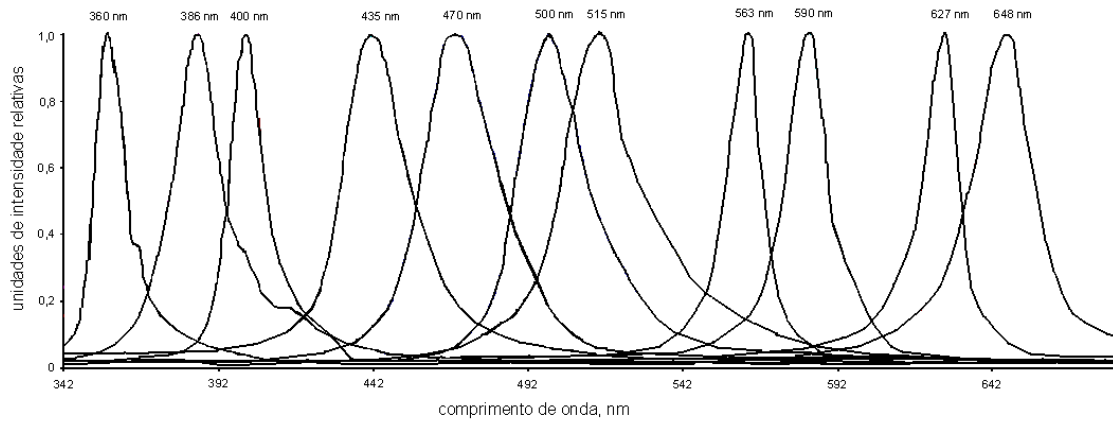


Figura 2.5 – Espectros de diferentes LEDs existentes no mercado. Adaptado de [12].

Ao longo do trabalho desenvolvido, foram construídas algumas fontes de radiação adaptadas tanto às necessidades energéticas como às exigências da conceção do equipamento.

Com o objetivo de canalizar a radiação produzida por uma qualquer fonte numa fibra de vidro realizou-se o seguinte sistema: construiu-se um suporte para lâmpadas de halógeno/tungsténio para acoplar a radiação a uma fibra ótica com 1 mm de diâmetro de núcleo de vidro. Na Fig.2.6 pode ver-se o bolbo afastado alguns milímetros da fibra ótica, terminando esta numa forma mais alargada. O calor emanado pelo bolbo de halógeno/tungsténio foi suficientemente grande para provocar uma diminuição da viscosidade da fibra de vidro e, conseqüentemente, causar uma contração por engrossamento do diâmetro da fibra. Esta alteração cresceu até atingir uma distância tal que entra em equilíbrio térmico e deixou de crescer. A deformação térmica acarretada pelo bolbo da lâmpada de halógeno/tungsténio aumenta a intensidade de radiação que entra para a fibra ótica. Este modo de introduzir radiação numa fibra ótica foi usado na metodologia usada no artigo “Reduced fluoresceinamine as a fluorescente sensor for nitric oxide” editado na revista online Sensors volume 10 (3) em 2010 (mais pormenores no capítulo 4).

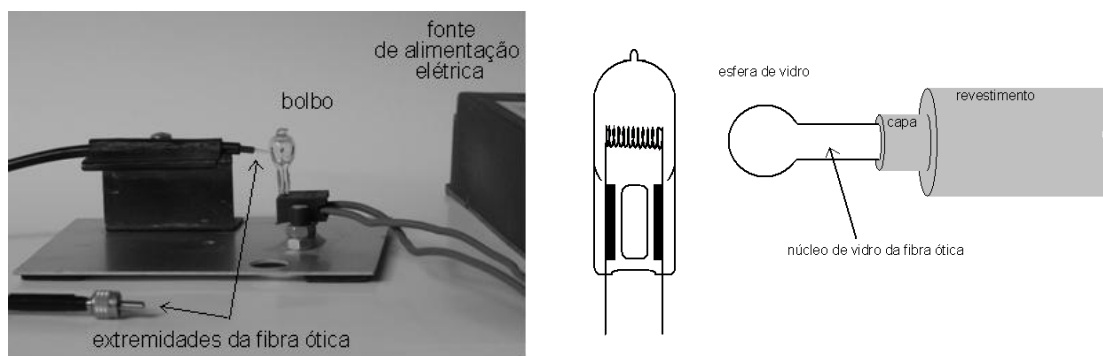


Figura 2.6 – Fotografia da fonte de radiação da lâmpada de halogéneo/tungsténio (20W), e respetiva alimentação elétrica, acoplada a uma fibra ótica de plástico, esquerda. Esquema da deformação no vidro formada em torno da extremidade da fibra ótica de plástico, direita.

Montou-se uma fonte de alimentação elétrica estabilizada para alimentar LEDs com uma precisão de cerca de 0,1 V. É constituída por uma fonte de alimentação de um PC, um circuito eletrónico que permite obter uma corrente elétrica estabilizada de 0 a 9 V (Fig.2.7) e um suporte para LEDs com o respetivo acoplamento às fibras óticas, (Fig.2.8). Os LEDs de alto brilho foram adquiridos à Roithner LaserTechniks GmbH [15], consoante o comprimento de onda desejado e foram montados num dispositivo que permite introduzir o máximo de energia luminosa na fibra ótica.

Esta fonte de alimentação serviu para alimentar os LEDs nos trabalhos dos artigos publicados: “Reduced fluoresceinamine as a fluorescent sensor for nitric oxide” editado na revista científica online Sensors volume 10 (3), em 2010 (mais pormenores no capítulo 4), “optical fiber sensor for Hg(II) based on carbon dots” editado na revista científica Biosensors and Bioelectronics, volume 26 (4) nas páginas 1302 a 1306, em 2010 e “Layer-by-layer immobilization of carbon dots fluorescent nanomaterials on single optical fiber” editado na revista científica Analytica Chimica Acta, volume 735, páginas 90 a 95, em 2012.

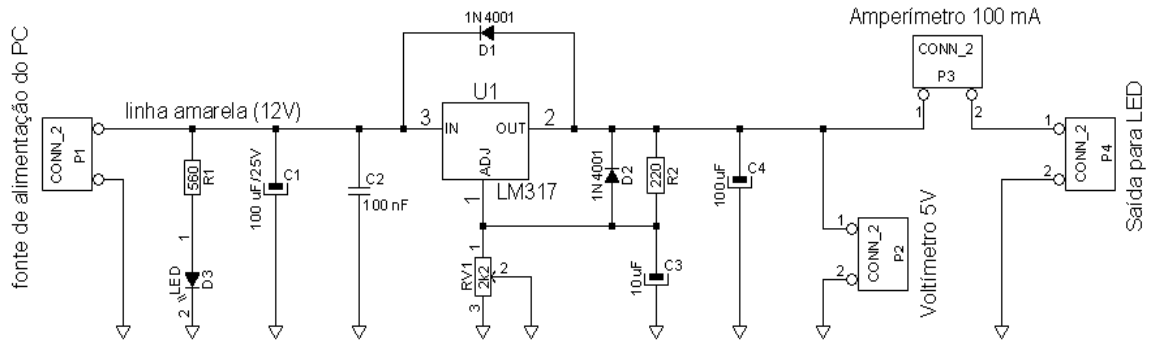


Figura 2.7 – Circuito eletrónico da fonte de alimentação elétrica estabilizada. Cortesia do Eng^o Emanuel Lomba do Instituto Superior de Engenharia do Porto.



Figura 2.8 – Fotografia da montagem da fonte de alimentação elétrica estabilizada para alimentar LEDs, esquerda. Vista de frente com pormenor do suporte para os LEDs, direita.

2.3. Seleção do comprimento de onda

2.3.1. Monocromador

O monocromador é um dispositivo capaz de atuar sobre um feixe de radiação com muitos comprimentos de onda e selecionar um feixe de radiação com apenas alguns comprimentos de onda, ou seja, dispersa ou difrata a radiação policromática numa monocromática. Como tal, estes dispositivos não necessitam ser acoplados a fontes de radiação como os LEDs monocromáticos ou os lasers, porque já emitem numa gama de comprimentos de onda estreita.

Uma das principais desvantagens de usar monocromadores é a redução em algumas décadas da intensidade luminosa, por isso só são usados com fontes de radiação que debitam um grande número de fótons por unidade de área e tempo, por exemplo lâmpadas de deutério ou halogéneo/tungsténio, e quando é estritamente necessário usar radiação monocromática.

Os mais populares sistemas para obter radiação monocromática são as redes de difração facetada por reflexão e os filtros, sendo os mais comuns os coloridos, de passo alto e passo baixo, podendo também encontrar, muito raramente, monocromadores prismáticos.

2.3.2. Rede de difração facetada por reflexão

Encontram-se redes de difração em equipamentos dos quais é necessário ter um grande controlo no comprimento de onda a usar. São de conceção elaborada e, conseqüentemente, dispendiosos, mas a possibilidade de controlar o comprimento de

onda de forma exata e precisa (Fig.2.9), de forma automática, através de um motor elétrico por exemplo, tornaram estes dispositivos de uso generalizado (Fig.2.10).

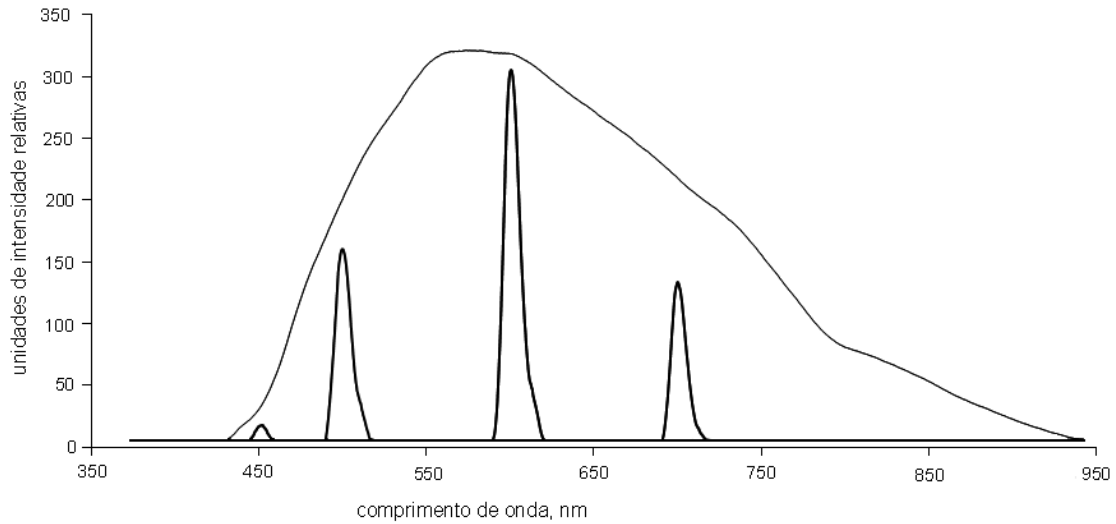


Figura 2.9 – Espectro duma lâmpada de halógeno/tungsténio de 20 W e da mesma radiação depois de ter passado pelo monocromador Fastie-Erbert com os comprimentos de onda selecionados de 450, 500, 600 e 700 nm. A intensidade luminosa do espectro de halógeno/tungsténio (radiação indireta com 3 ms de aquisição) é muito superior à intensidade dos espectros da mesma radiação que passou pelo monocromador (lido diretamente no detetor com 5 s de aquisição).

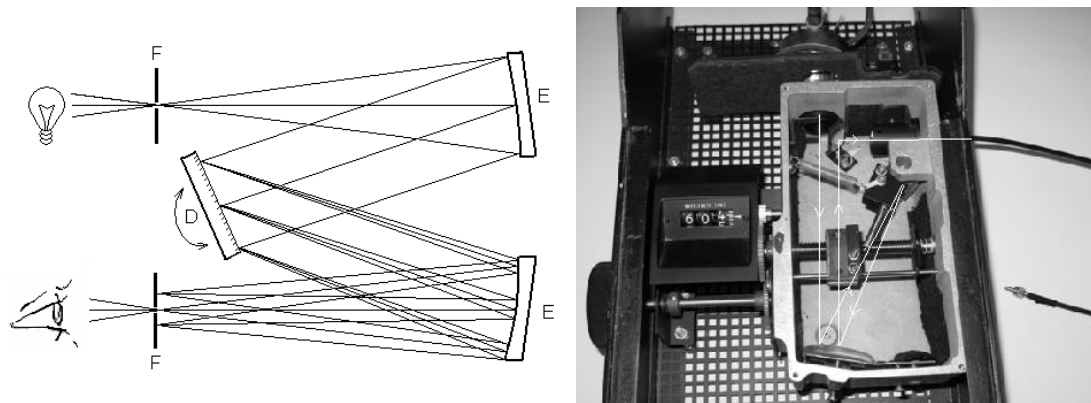


Figura 2.10 – Diagrama do monocromador de Czerny-Turner, (esquerda). Fotografia de um monocromador Fastie-Erbert (Czerny-Turner mas com um só espelho colimador/reorientador) modificado por nós para acoplar fibras óticas, as setas a branco indicam o percurso da radiação desde a fonte até à fibra ótica (direita).

Todos os monocromadores requerem radiação com feixes estreitos. É necessário ter fendas entre a fonte de radiação e o monocromador, e a radiação deve ser o mais paralela possível, isto é radiação colimada.

2.3.3. Filtro

Os filtros de radiação são membranas que permitem filtrar a radiação. São dispositivos que se colocam no percurso da radiação e só deixam passar determinadas gamas do espectro luminoso. Há os filtros de passo alto, baixo e os que combinam os filtros de passo alto e baixo.

Um filtro de passo alto permite cortar a radiação até determinado comprimento de onda, deixando passar os restantes, vulgarmente com uma eficiência superior a 90% da radiação incidente, Fig.2.11. O filtro de passo baixo corta os comprimentos de onda superiores. A combinação dos dois tipos de filtros permite selecionar gamas de comprimentos de onda que podem ir até 25 nm (largura de banda a meia altura), no entanto, podem ter transmitâncias tão pequenas como 20% da radiação incidente.

No trabalho que originou o artigo “Layer-by-layer immobilization of carbon dots fluorescent nanomaterials on single optical fiber” editado na revista científica *Analytica Chimica Acta*, volume 735, páginas 90 a 95, em 2012, usou-se um filtro de passo alto incorporado na fibra ótica para eliminar qualquer interferência da radiação de excitação que a fonte de alimentação possa provocar, diminuindo-se, deste modo, o limite de deteção do método.

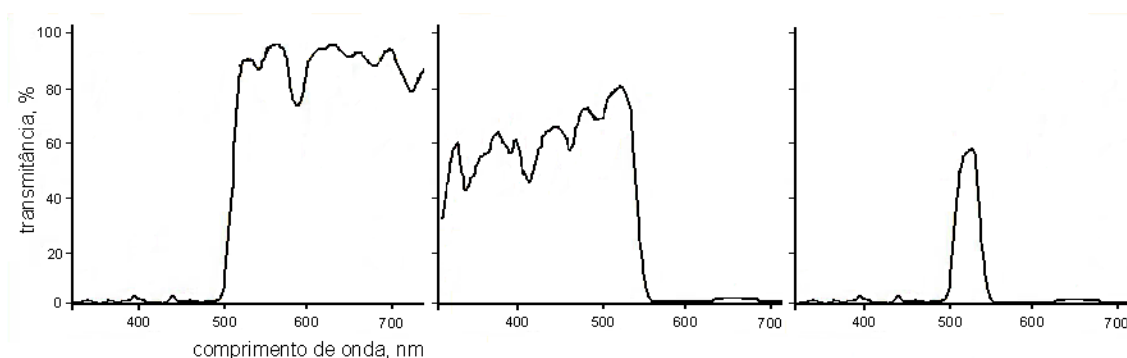


Figura 2.11 – Espectros de transmitância de um filtro de passo alto, baixo e da combinação dos dois (da esquerda para a direita). Adaptado de [1].

A grande vantagem dos filtros é a sua robustez na seleção dos comprimentos de onda ao longo do tempo, a simplicidade de uso e o preço.

2.4. Porta amostras

O local onde se dá a interação da matéria com a radiação luminosa é o local por excelência do desenvolvimento de um sistema sensor. Para sistemas em que o analito alvo se encontra no seio de um líquido, há, genericamente, três modos de acondicionar para desenvolver a interação com a radiação: em cuvete, numa célula de fluxo e remotamente através de uma sonda.

A tradicional cuvete é um recipiente amovível, normalmente retangular com capacidade até 3 mL (com um percurso ótico muito bem definido, normalmente 10 mm), onde é possível adicionar a mistura líquida do sensor com o analito. É excitada numa das faces com a radiação e colocado o detetor a 90° no mesmo plano. Podem ser construídas em plástico (poliestireno ou polimetilmetacrilato, por exemplo, para medir todos os comprimentos de onda superiores a 400 nm), em vidro (se a gama de trabalho for superior a 375 nm) ou em quartzo ou de sílica fundida (permite usar comprimentos de onda do ultravioleta afastado). Encontram-se com muita frequência nos equipamentos de bancada, são de fácil utilização, bastante versáteis e relativamente económicas, exceção feita às cvetes de quartzo. No entanto, o sistema de medição com cuvete requer grandes volumes de amostra e normalmente pré-tratamento.

As células de fluxo encontram uma grande aplicação nos sistemas de injeção em fluxo convencionais, nomeadamente, a análise por injeção em fluxo (FIA), análise por injeção sequencial (SIA) e multicomutação (MC) [16,17]. As células de fluxo acopladas ao detetor contêm tubos de reduzidas dimensões, vulgarmente com 1 mm de diâmetro, para entrada e saída dos líquidos a monitorizar, são construídos num material que lhe confere transparência nos comprimentos de onda de trabalho. As grandes vantagens desses sistemas de fluxo são a sua reduzida dimensão, portabilidade e baixo custo.

2.4.1. Fibra ótica

A grande inovação encontra-se na tentativa de instalar o sensor químico na extremidade de uma fibra ótica e fazer a análise *in vivo* ou *in situ* mas remotamente – espectroscopia assistida por fibras óticas, podendo pensar-se em monitorizar locais tão pequenos como o interior de uma célula [18]. À parte do problema da conceção do sensor químico e sua imobilização, instrumentalmente existem alguns desafios na construção de tais sondas. Neste caso, o próprio suporte do sensor é a continuidade do transporte de radiação entre a fonte e o detetor. As fibras óticas são um excelente modo de conduzir radiação, visto serem imunes a interferências eletromagnéticas. Têm uma baixa perda de sinal, são flexíveis e permitem deteções remotas [19]. Além disso, têm a capacidade de poder fazer deteção simultânea permitindo mesmo a multiplexação (capacidade de no mesmo suporte ter vários fluxos de dados analógicos, por exemplo, na mesma fibra enviar radiação de excitação e receber sinal, em sentido oposto, para o detetor) [4,20].

As fibras óticas com diâmetros pequenos, vulgarmente inferiores a 1 mm, têm áreas disponíveis na extremidade para o sensor muito reduzidas. Jorge *et al* [21] descreve um sistema de fibra ótica bifurcada (em forma de Y em que a extremidade sensor é única e as outras duas opostas, uma ligada à fonte de radiação e a outra ao detetor) sensor fluorescente para oxigénio, em que estudam o efeito da geometria da ponta da fibra como fator preponderante no rendimento do sinal.

Considerando uma fibra ótica com 600 μm de diâmetro de núcleo e supondo que o resultado do cortes origina superfícies lisas, ou seja sem rugosidade, o corte transversal representa a área mínima para exposição do sensor (0,28 mm^2). Esta área aumenta 2,25 vezes se efetuar um corte oblíquo a 45° (0,63 mm^2) e é 67,5 vezes superior se afunilar a fibra num cone com 20 mm de comprimento (18,9 mm^2) (Fig.2.12).

São várias as disposições para usar fibras óticas como suporte das amostras e pode-se mesmo já encontrar alguns suportes de filmes sensores comercializados.

O arranjo de duas fibras óticas em paralelo, juntas na extremidade do sensor e derivando depois para o detetor e a fonte de radiação (Fig.2.13) é a geometria de conceção mais antiga que ainda hoje se usa [22] e de construção bastante simples, no

entanto, esta disposição só permite praticamente usar os filmes sensores transversalmente às fibras ou seja, a menor área.

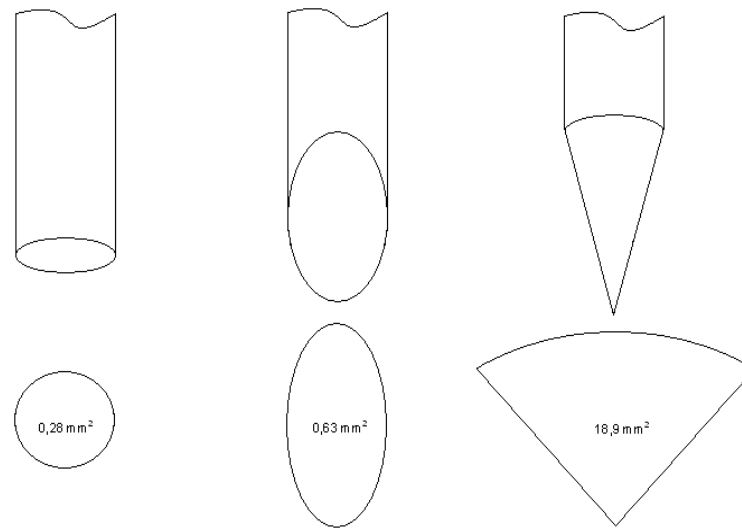


Figura 2.12 – Geometrias da extremidade da fibra ótica com 600 μm de diâmetro. Corte transversal (esquerda), oblíquo a 45° (centro) e em cone com 20 mm de comprimento (direita).

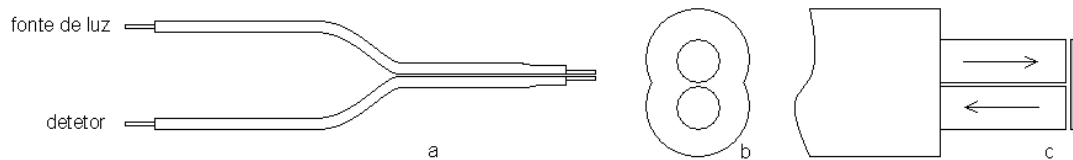


Figura 2.13 – a) Esquema do par fibra ótica em paralelo, b) pormenor da extremidade das duas fibras, c) acoplamento do filme sensor com o sentido da radiação nas duas fibras óticas.

Pode-se obter uma fibra bifurcada através da fusão de duas outras [21] ou por partilha da radiação numa mesma fibra ótica [1]. O resultado é existir apenas uma única fibra ótica do lado do sensor e, como tal, usufruir das possibilidades de geometria aplicadas à ponta (Fig.2.12). A vantagem da fibra única do lado do sensor vem acompanhada de uma perda de sinal, normalmente, perde-se 50% do sinal de emissão [21].

Outros arranjos podem ser obtidos, por exemplo, usar várias fibras óticas para a excitação, aumentar assim a quantidade de radiação a incidir na amostra, e recolhendo o sinal resultante numa única central (Fig.2.14). Embora este arranjo

amente a eficiência de fluorescência, isto torna a cabeça sensor demasiado grande, o que pode ser um problema. Outro arranjo possível é usar uma única fibra ótica com o sensor acoplado numa das extremidades sendo a excitação efetuada diretamente na solução que contém o analito [23] (Fig.2.15).

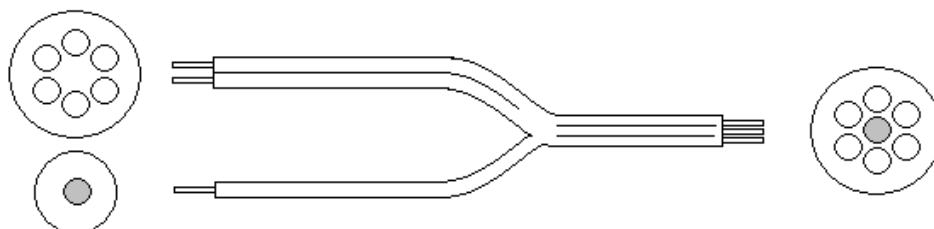


Figura 2.14 – Esquema de uma montagem com múltiplas fibras óticas e com pormenores da vista de frente.

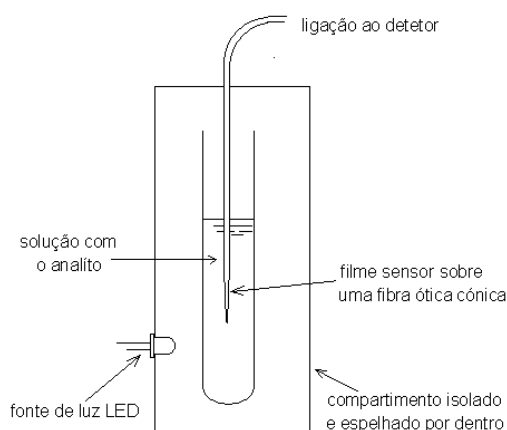


Figura 2.15 – Esquema de uma montagem com uma única fibra ótica e excitação feita diretamente sobre a solução com o analito. Adaptado de [23] sem fibra ótica de emissão.

Os trabalhos que originaram artigos, em que se usaram fibras óticas para conduzir radiação foram: “Luminol-based nanostructured composit materials for chemiluminescent sensing of hydrogen peroxide” editado na revista científica Analytical Letters em 2010 (mais pormenores no capítulo 3) e “Reduced fluoresceinamine as a fluorescente sensor for nitric oxide” editado na revista científica online Sensors em 2010 (mais pormenores no capítulo 4), em que se usou uma geometria de corte transversal (90°) e os artigos “Optical fiber sensor for Hg(II) based on carbon dots” editado na revista científica Biosensors and Bioelectronics, volume 26

(4), páginas 1302 a 1306, em 2010 e “Layer-by-layer immobilization of carbon dots fluorescent nanomaterials on single optical fiber” editado na revista científica *Analytica Chimica Acta*, volume 735, páginas 90 a 95, em 2012, em que se usaram fibras óticas como suporte do sensor químico com a geometria em cone.

2.5. Detetor ótico

Detetor ótico é um dispositivo capaz de provocar a transdução de energia luminosa em energia elétrica, ou seja, de gerar uma corrente elétrica ou uma diferença de corrente elétrica mensurável quando exposto a radiação eletromagnética.

Se o detetor origina um sinal elétrico proporcional à quantidade de fótons recebidos e na ausência de radiação gera um sinal nulo (o sinal produzido na inexistência de radiação denomina-se de corrente ou sinal de negro), estamos perante um detetor ideal. Os parâmetros mais importantes num detetor são: a sensibilidade (incremento da resposta em função da quantidade de radiação recebida), o comprimento de onda a que responde, o tempo de estabilização, o tipo e o tempo de resposta, a sensibilidade à temperatura, alimentação elétrica, eficiência e o ganho.

2.5.1. Tubo fotomultiplicador

Os tubos fotomultiplicadores ou células fotoelétricas são tubos de vidro sob vácuo que têm um foto-cátodo (negativo) coberto de material que absorve radiação e emite eletrões, que são projetados para um ânodo (coletor de eletrões que é positivo) e pelo percurso são multiplicados por uma série de placas (dínodos) que se encontram a grandes diferenças de potencial elétrico.

São muito usados em diferentes instrumentos analíticos, caracterizam-se por ter uma elevada sensibilidade com uma rápida resposta (na ordem das unidades dos nanosegundos), grandes gamas de comprimentos de onda (podendo ir dos 100 aos 1000 nm), baixa corrente de escuro (na ordem dos nanoAmperes) e ganhos na ordem de 10^7 [24]. São de reduzidas dimensões e a grande desvantagem é não discriminarem o comprimento de onda.

2.5.2. Fotodíodo

Os fotodíodos são díodos (dispositivo formado pela junção de dois semicondutores com características diferentes) que apresentam condução de corrente elétrica num só sentido na ausência de radiação. Quando se expõe à radiação eletromagnética, a resistência elétrica da junção n-p decresce, permitindo o fluxo nos dois sentidos. Existe uma proporcionalidade entre a energia luminosa e a intensidade de corrente ou a diferença de potencial gerada, dependendo se são fotocondutores ou fotovoltaicos, respetivamente [25].

Encontram-se em quase todos os tipos de dispositivos com necessidade de detetar radiação, devido às suas reduzidas dimensões (chegam a ter áreas inferiores a um milímetro quadrado), desde televisores até equipamentos médicos ou instrumentos astronómicos. Têm preços muito baixos e cobrem uma vasta gama de radiação eletromagnética; pode ir desde os 190 a 1100 nm se forem feitos de silício, de 400 a 1700 nm os de germânio, de 800 a 2600 nm se forem constituídos por índio, gálio e arsénio ou de 1000 a 3500 nm os de sulfureto de chumbo(II) [15].

Encontram-se também em instrumentos analíticos porque têm uma resposta linear de corrente de saída em função da radiação incidente, têm elevadas eficiências quânticas (na ordem dos 80%) e um tempo de vida muito grande. São de reduzidas dimensões, o que pode ser uma desvantagem visto ter uma área proporcionalmente reduzida, são leves e mecanicamente resistentes.

As desvantagens destes detetores são a sua baixa sensibilidade, têm ganhos muito reduzidos normalmente 10^5 vezes inferiores aos tubos fotomultiplicadores (mas também não necessitam de ser alimentados) e o tempo de resposta pode ser lento.

A construção de sistemas de reduzida dimensão, portáteis e robustos têm recorrido a este tipo de detetores [12], no entanto, os fotodíodos continuam a ser estudados de modo a melhorar as suas características, como por exemplo aumentar a sensibilidade à reação quimiluminescente do luminol com o peróxido de hidrogénio [26], ou melhorar o tempo de resposta usando fotodíodos orgânicos para ensaios imunoenzimáticos por fluorescência [27], ou ainda a incorporação de nanomateriais na conceção dos fotodíodos de modo a conferir-lhe seletividade no comprimento de onda, maior rapidez de resposta, incremento no ganho ou diminuição da corrente de escuro [28].

Os díodos emissores de luz (LEDs) também podem funcionar como recetores de radiação e gerar um sinal elétrico mensurável. São dos sistemas de deteção mais

económicos (todos os componentes podem custar cerca de 0,5 euros), é possível integrar em construções de muita reduzida dimensão, no entanto, têm pouca sensibilidade [29,30].

Existem, ainda, os fotodíodos avalanche. Funcionam de modo idêntico aos convencionais mas trabalham com polarizações inversas muito mais elevadas, tendo assim, ganhos superiores, são mais dispendiosos (20 a 100 vezes superiores), são mais sensíveis e uma relação sinal/corrente de escuro melhorada. Já existem descrições para sistemas miniaturizados com fotodíodos avalanche para fluorescência [31,32] que permitem, inclusivamente, determinar tempos de semi-vida [33].

Ainda dentro dos fotodíodos uma pequena referência aos fototransístores. Têm um bom ganho, no entanto, não detetam níveis baixos de radiação. Há muito poucos trabalhos com estes detetores, numa pesquisa efectuada no Web of Knowledge of Science a 06 de Junho de 2012, com as palavras “phototransistor fluorescence” originou apenas 4 resultados.

2.5.3. Dispositivos de acoplamento de carga (CCD)

Dispositivos de acoplamento de carga foram inventados em 1969 nos laboratórios da AT&T Bells e, hoje em dia, são amplamente usados nas indústrias relacionadas com a imagem. Uma célula de um CCD é constituída por uma parte fotossensível (baseia-se no efeito fotoelétrico, ou seja, conversão de energia luminosa em diferença de potencial elétrico) e uma região de transmissão do sinal (o CCD propriamente dito), sendo a sua intensidade proporcional ao tempo de exposição. Uma disposição em linha de células sensores permite obter uma imagem unidirecional, por exemplo a captura dos espectros de radiação em função do comprimento de onda [1-3, 34], e se construir uma matriz bidimensional destas células é possível obter uma imagem (princípio de funcionamento das imagens digitais) [35].

Os CCDs são tipicamente construídos para lerem radiação eletromagnética na região do visível, a sua eficiência diminui quando se aproxima do ultravioleta, por exemplo para 550 nm têm uma sensibilidade inferior a 30%, no entanto, este valor cai para 10% para um comprimento de onda de 450 nm. Mesmo assim, existem dispositivos de acoplamento de carga a lerem diretamente comprimento de onda na ordem dos 0,1 nm (raio-X) com um incremento de preço de cerca de 10 vezes [36].

Apesar de ser um detetor dispendioso, ao contrário dos outros detetores que dão informação sobre a quantidade de radiação total, os CCD lineares permitem obter

informação discriminada em função do comprimento de onda com maior sensibilidade [27, 37].

2.6. Conclusões

A construção de dispositivos eficientes, específicos e direccionados para um ou um conjunto delimitado de analítos é uma opção que torna a medição um processo rápido (ideal será obter resultados em tempo real), portátil (a miniaturização torna os dispositivos de reduzidas dimensões, não só leves mas principalmente pouco gastadores de energia), de fácil utilização (qualquer pessoa pode levar a cabo a medição sem necessitar de fazer formação para o caso) e economicamente viável.

Foram executados alguns equipamentos com sucesso, por exemplo a imobilização do sensor na extremidade de uma fibra ótica afinilada que permitia monitorizar catiões mercúrio no seio de uma solução aquosa por fluorescência, usando simples díodos emissores de luz (LEDs) como excitação e a deteção feita num dispositivo de acoplamento de carga de reduzidas dimensões [23], ou a monitorização do óxido nítrico em solução aquosa por absorvância, numa célula em fluxo em perspex, com o sensor imobilizado num filme de NAFION, usando um LED como excitação e a deteção feita num dispositivo de acoplamento de carga de reduzidas dimensões [38].

A conceção física e eletrónica do dispositivo são desafios, que com a actual tecnologia, podem ser solucionados. O fulcro do desenvolvimento reside na miniaturização do sistema sensor químico com a conseqüente emissão da radiação. Muitas vezes a imobilização reduz drasticamente a emissão do sinal que por mais sensível que seja o detetor, inviabiliza um processo químico que funciona em cuvette (meio líquido) quer por obstrução da radiação, quer por redução do acesso do analíto ao sensor. Mas, o mais preponderante de todos os fatores é a redução da quantidade de fenómeno. A emissão está associada a uma quantidade de matéria que desenvolve interação com a radiação, metade dessa quantidade pode simplesmente emitir metade do sinal e assim sucessivamente, mas como objetivo último, pretende-se detetar sinal da responsabilidade de uma única entidade (seja molécula ou ião, por exemplo) [39].

2.7. Bibliografia

- [1] <http://www.oceanoptics.com/homepage.asp>, 17 de Abril de 2012.
- [2] <http://www.avantes.com/>, 17 de Abril de 2012.
- [3] <http://www.scansci.com/>, 17 de Abril de 2012.
- [4] U. Guth, W. Vonau, J. Zosel, 2009, Measurement Science and Technology, 20, 1-14.
- [5] V. Vojinovic, J. M. S. Cabral, L. P. Fonseca, 2006, Sensors and Actuators B, 114, 1083-1091.
- [6] S. Beutel, S. Henkel, 2011, Applied Microbiology and Biotechnology, 91, 1493-1502.
- [7] M. E. Bosch, A. J. R. Sánchez, F. S. Rojas, C. B. Ojeda, 2007, Sensors, 7, 797-859.
- [8] D. J. Monk, D. R. Walt, 2004, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 379, 931-945.
- [9] O. S. Wolfbeis, 2000, Analytical Chemistry, 72, 81R-89R.
- [10] <http://www.rsc.org/publishing/journals/lc/article.asp> 07 Maio de 2012.
- [11] <http://www.rp-photonics.com/lasers.html> 14 Maio de 2012.
- [12] O`Toole, M.; Diamond, D., 2008, Sensors, 8, 2453-2479.
- [13] Y. Taniyasu, M. Kasu, T. Makimoto, 2006, Nature, 441, 325-328.
- [14] E. H. Kim, K. C. Kim, D. H. Kim, J. H. Baek, T. G. Kim, 2010, IEEE Journal of Quantum Electronics, 46 (9), 1381-1387.
- [15] <http://www.roithner-laser.com/> 16 Maio de 2012.
- [16] D. Christodouleas, C. Fotakis, A. Economou, K. Papadopoulos, M. Timotheou-Potamia, A. Calokerinos, 2011, Analytical Letters, 44, 176-215.
- [17] A. Ruiz-Medina, E. J. Llotent-Martínez, 2010, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 53, 250-261.
- [18] T. Vo-Dinh, Y. Zhang, 2011, Wiley Interdisciplinary Reviews – Nanomedicine and nanobiotechnology, 3 (1), 79-85.
- [19] K. Peters, 2011, Smart Materials and Structures, 20, 013002 (17p).
- [20] D. R. Walt, 2010, Chemical Society Reviews, 39, 38-50.
- [21] P. A. S. Jorge, P. Caldas, C. C. Rosa, A. G. Oliva, J. L. Santos, 2004, Sensors and Actuators B: Chemical, 103, 290-299.

- [22] T. Sung, Y. Lo, 2012, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 165, 119-125.
- [23] H. M. R. Gonçalves, A. J. Duarte, J. C. G. Esteves da Silva, 2010, *Biosensors and Bioelectronics*, 26, 1302-1306.
- [24] http://sales.hamamatsu.com/assets/pdf/parts_L/L10671_TLSZ1012E01.pdf 05 Junho de 2012.
- [25] <http://goldbook.iupac.org/P04598.html> 05 Junho de 2012.
- [26] H. Kim, C. Kang, M. S. Kang, 2003, *Journal of the Korean Physical Society*, 42, S336-S339.
- [27] H. Nakajima, Y. Okuma, K. Morioka, M. Miyake, A. Hemmi, T. Tobita, M. Yahiro, D. Yokoyama, C. Adachi, N. Soh, K. Nakano, S. Xue, H. Zeng, K. Uchiyama, T. Imato, 2011, *Journal of Separation Science*, 34, 2906-2912.
- [28] G. Konstantatos, E. H. Sargent, 2010, *Nature Nanotechnology*, 5, 391-400.
- [29] M. Pokrzywnicka, D. J. Cocovi-Solberg, M. Miró, V. Cerdà, R. Koncki, L. Tymecki, 2011, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399, 1381-1387.
- [30] L. Tymecki, M. Rejnis, M. Pokrzywnika, K. Strzelak, R. Koncki, 2012, *Analytica Chimica Acta*, 721, 92-96.
- [31] D. Palubiak, M. M. El-Desouki, O. Marinov, M. J. Deen, Q. Fang, 2011, *IEEE Sensors Journal*, 11 (10), 2401-2412.
- [32] J. Wu, X. Liu, L. Wang, L. Dong, Q. Pu, 2012, *Analyst*, 137, 519-525.
- [33] T. Miyata, T. Iwata, S. Nakayama, T. Araki, 2012, *Measurement Science and Technology*, 23, 035501 (7pp).
- [34] <http://www.thorne.com/> 08 Junho de 2012.
- [35] M. V. Vijayakumar, M. K. Ghat, 2012, *Methods in Enzymology*, 506, 257-271.
- [36] S. M. Gruner, M. W. Tate, E. F. Eikenberry, 2002, *Review Scientific Instruments*, 73, 2815-2842.
- [37] K. Ren, Q. Liang, B. Yao, G. Luo, L. Wang, Y. Gao, Y. Wang, Y. Qiu, 2007, *Lab-On-A-Chip*, 7, 1574-1580.
- [38] Ana Marta P. Rilo, 2009, "Sensores para espécies reativas de oxigénio e azoto", Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.
- [39] Y. Sako, M. Hiroshima, C. Pack, K. Okamoto, K. Hibino, A. Yamamoto, 2011, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 4 (2), 183-192.

3. Doseamento do peróxido de hidrogénio por quimioluminescência

3.1. Introdução

A quimioluminescência tem sido desenvolvida nos últimos anos como método analítico para dosear espécies reativas de oxigénio e de azoto [1,2]. O luminol (5-amino-2,3-dihidro-ftalazina-1,4-diona) é o reagente mais usado para monitorizar peróxido de hidrogénio, no entanto, a reação requer a presença de um catalisador, que pode ser, entre outros, a peroxidase de rábano-silvestre [3-9], a hemina (uma porfirina com ferro – derivado da hemoglobina) [10], a hemoglobina [3,11], o catião cobalto(II) [12-16], o complexo cobalto(II)-etanolamina [17,18] e o anião periodato [19,20].

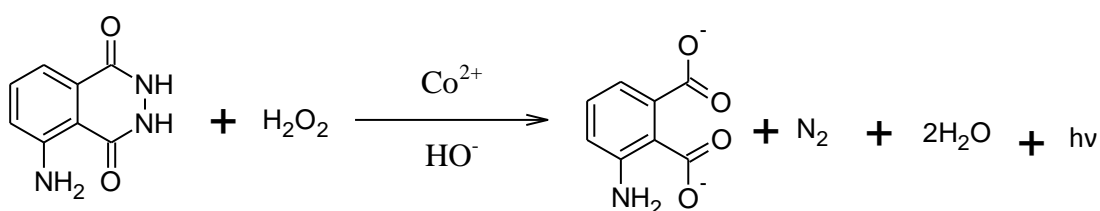
O sistema quimioluminescente luminol/cobalto(II) está entre os mais sensíveis para a quantificação do peróxido de hidrogénio com limites de deteção na gama dos 10^{-9} mol/L [21]. Recorrendo a este sistema, vários autores desenvolveram técnicas para o doseamento do peróxido de hidrogénio em água da chuva. Marle *et al* [14] utilizou o dispositivo microfluídico (com volume de amostra de 0,020 mL) com o qual obteve uma gama de resposta polinomial de $0,1-7,5 \cdot 10^{-6}$ mol/L (coeficiente de correlação 0,9955) e zona de linearidade de $0,1-1,0 \cdot 10^{-6}$ mol/L (coeficiente de correlação de 0,9905). Também para medir o peróxido de hidrogénio na água da chuva, Tahirivic *et al* [12] imobilizou o catião cobalto, numa membrana de celulose que

quando exposta a uma mistura de luminol com o oxidante produzia radiação luminosa. Este sinal originou uma resposta linear de $20\text{-}1600 \cdot 10^{-6}$ g/L, ou seja, de $0,6\text{-}47 \cdot 10^{-6}$ mol/L, de peróxido de hidrogénio (coeficiente de correlação 0,9991). Greenway *et al* [13] desenvolveu um sistema de análise por injeção em fluxo com aplicação de ultrassons à câmara de reação, obtendo uma gama linear de $10\text{-}200 \cdot 10^{-9}$ mol/L (coeficiente de correlação de 0,9945), com limite de deteção (triplo do desvio padrão) e de quantificação de $1 \cdot 10^{-9}$ e $3,3 \cdot 10^{-9}$ mol/L, respetivamente.

Como resultado do trabalho desenvolvido e descrito neste capítulo, resultou o artigo “Luminol-based nanostructured composit materials for chemiluminescent sensing of hydrogen peroxide” editado na revista científica *Analytical Letters*, volume 43, páginas 2762 a 2772, em 2010.

3.1.1. Possíveis mecanismos de reação química do luminol

A quimioluminescência do luminol provocada pelo peróxido de hidrogénio em meio alcalino, na presença do catião cobalto(II), origina anião 3-aminofalato, azoto diatómico e emite uma intensa luz azul (com comprimento de onda de cerca de 425 nm em solução aquosa). A reação química global pode ser representada da seguinte forma [10]:

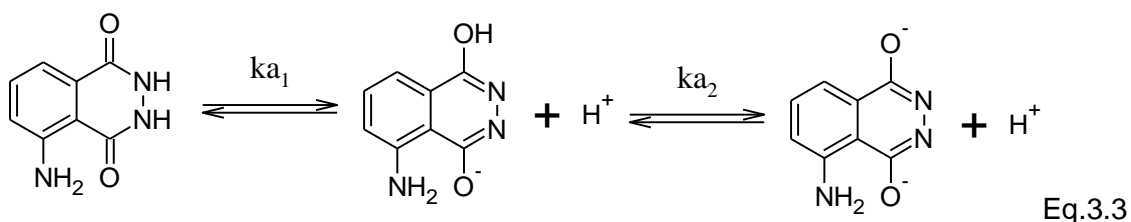
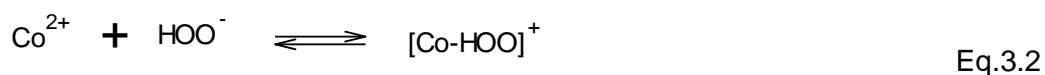


Eq.3.1

em que $h\nu$ é a radiação emitida pela reação química.

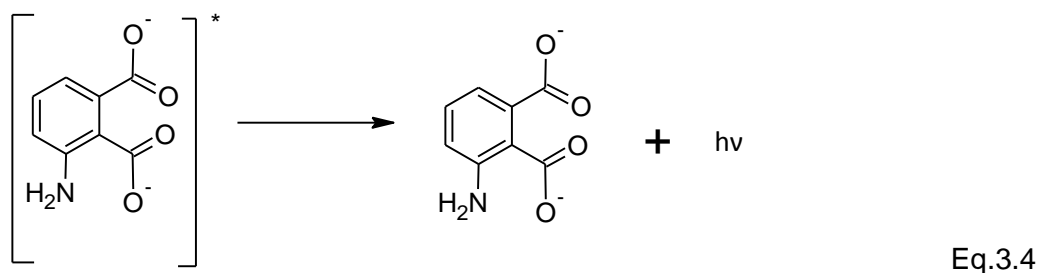
Tem havido muitas propostas de explicação do mecanismo que ainda não se encontra completamente esclarecido, no entanto, parece haver duas etapas distintas para que a oxidação do luminol possa ocorrer: a formação de um complexo

intermediário do peróxido de hidrogênio (Eq.3.2) pela presença do catalisador [22], e o luminol encontrar-se desprotonado (Eq.3.3), ou seja, encontrar-se em meio alcalino [23].



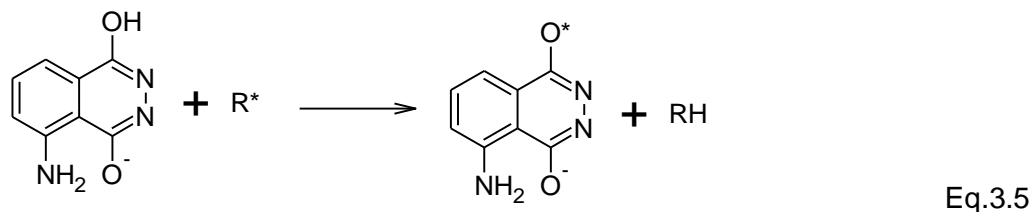
A primeira desprotonação tem um valor pK_{a1} entre 6,2 e 6,7 e a segunda tem um valor de pK_{a2} igual a 15,1. O baixo valor desta segunda constante faz com que, em meio alcalino, exista apenas a espécie resultante da tautomeria enólica monodesprotonada.

O responsável pela emissão de radiação luminosa, parece ser, definitivamente, o intermediário em estado eletronicamente excitado do ião 3-aminofalato e produto último da reação química [24]:



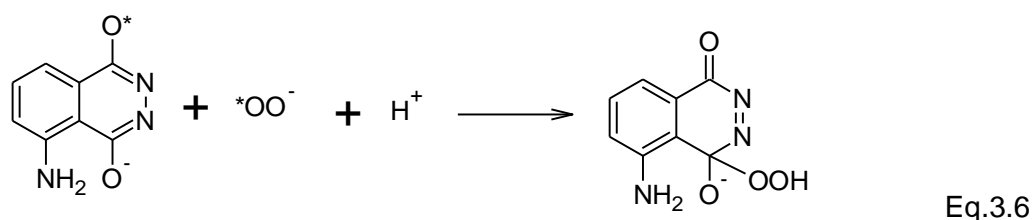
Desde o tautómero enólico monodesprotonado até ao aparecimento do ião 3-aminofalato eletronicamente excitado a divergência é muita e, principalmente, tudo aponta para que diferentes intermediários possam existir dependendo do catalizador usado e do agente de oxidação presente na reação de quimioluminescência [23].

Vladimirov *et al* [26] descreve o resumo do mecanismo de luminescência do luminol de uma forma simples e generalizada quanto ao oxidante, dividindo-o em três etapas. Inicia-se com a oxidação do luminol do seguinte modo:

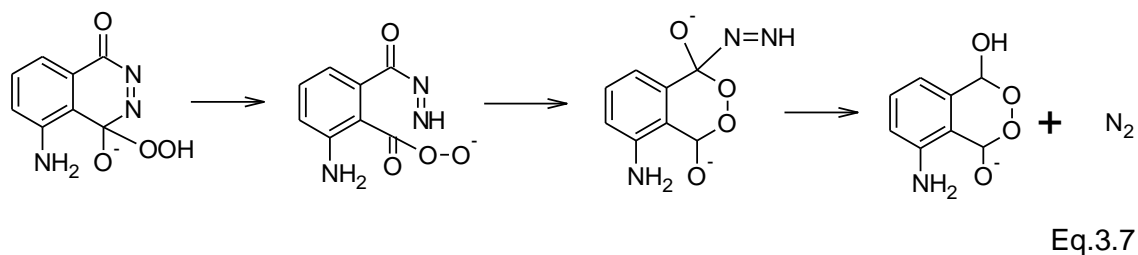


Consiste na oxidação do anião luminol por um forte oxidante (*one-electron oxidation*), como por exemplo um radical ou catião metálico, a luminol oxil radical [25] (Eq.3.5).

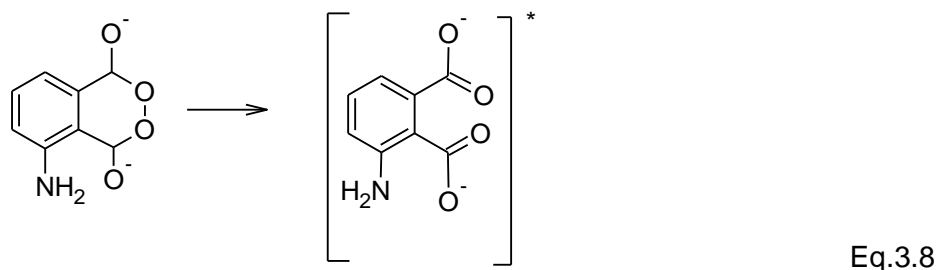
A segunda etapa é a formação do intermediário hidroperóxido (4-hidroperoxil-1-oxi-5-amino-ftalazina-4-olate) à custa do superóxido (Eq.3.6):



O carbono ligado ao superóxido, no intermediário hidroperóxido, rompe a ligação com o azoto permitindo formar endoperóxido. Por fim a ligação ao azoto é quebrada, formando-se azoto molecular (Eq.3.7):

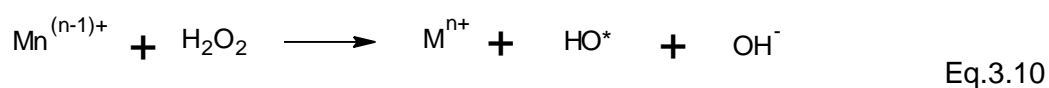
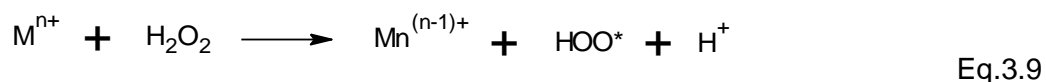


A última etapa consiste na rutura entre os oxigénios do produto anterior na forma dianónica, formando o intermediário em estado eletronicamente excitado 3-aminoftalato (Eq.3.8) responsável pela emissão de radiação como se pode ver na Eq.3.4:



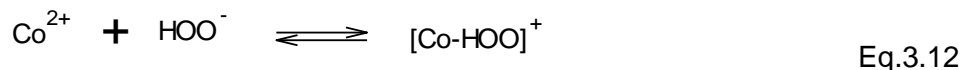
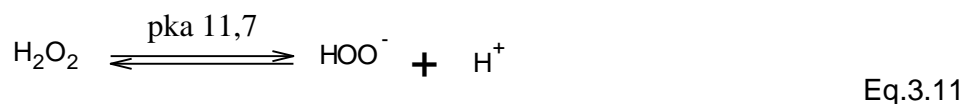
O peróxido de hidrogénio não oxida diretamente o luminol, necessitando de um catalisador, normalmente um ião de um metal de transição ou os seus complexos.

Um dos mecanismos propostos para este efeito, prevê a formação de radicais na presença de iões de metais de transição com pelo menos dois estados de oxidação (além do estado fundamental, por exemplo o cobre, cobalto, crómio, manganês ou ferro), do seguinte modo [27]:



Um exemplo bem estudado com este mecanismo é o reagente de Fenton (decomposição do peróxido de hidrogénio na presença de catião ferro(II)).

O outro mecanismo de oxidação do peróxido de hidrogénio envolve dois electrões (*two-electron oxidation*). Primeiro o peróxido de hidrogénio desprotona-se (Eq.3.11) e depois forma um complexo com o ião do metal de transição, por exemplo o cobalto (II) [18, 22, 27] (Eq.3.12):



Este complexo peroxo-cobalto pode ser diretamente o oxidante que inicia o mecanismo da quimioluminescência do luminol (Eq.3.5) ou produzir, por decomposição, um outro oxidante forte, o oxigênio.

Apesar do mecanismo ainda suscitar dúvidas e necessitar de esclarecimentos, a quimioluminescência do luminol como técnica analítica tem grandes potencialidades. O número de artigos com a pesquisa “luminol and chemiluminescence” na base de dados da Web of Knowledge [28] revelou que até à década de 70 praticamente nada tinha sido editado sobre o assunto. No entanto, a partir dessa data começou a suscitar algum interesse e a partir dos anos 90 tem-se publicado cerca de 200 publicações por ano (Fig.3.1).

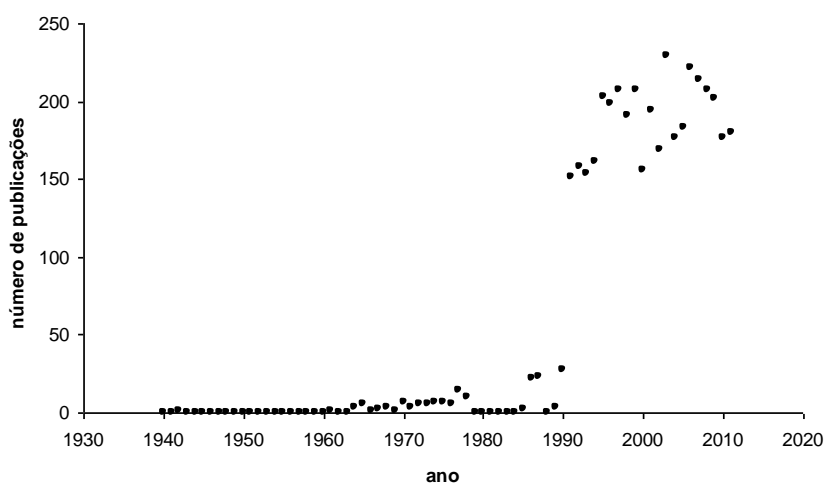


Figura 3.1 – Número de publicações de artigos por ano desde 1940. Resultados obtidos por pesquisa na Web of Knowledge no dia 30 de Janeiro de 2012, com as palavras “luminol” e “chemiluminescence” para os diferentes anos.

Há dois motivos principais para tornar este método interessante: a grande sensibilidade do método e a simplicidade do equipamento associado à sua medição.

Além disso, o método tem poucas interferências, não existem muitas substâncias com capacidade de produzirem radiação, requer ainda um determinado par oxidante/catalisador, o que torna a especificidade ainda maior. Esta ausência do efeito das interferências do meio onde o analito está inserido, associado ao facto do método não necessitar de fonte de excitação, elimina problemas de estabilidade da radiação luminosa e reduz significativamente o ruído de fundo, resultando numa franca redução do limite de deteção e/ou quantificação. Estima-se que os métodos quimioluminescentes possam ser 100000 vezes mais sensíveis que os métodos espectroscópicos de absorção e 1000 vezes mais sensíveis que os fluorimétricos [21,29]. O sistema quimioluminescente do luminol é versátil, tem características diferentes em função do substrato (oxidante) e do ativador (catalisadores iões metálicos ou enzimas), serve tanto para monitorizar os diferentes substratos como os diferentes catalisadores, logo, é um excelente candidato a medições de analitos em tempo real e em *in vivo* [30-32].

A radiação emitida pela reação química do luminol é uma banda com a emissão total de radiação em alguns segundos (Fig.3.2). Na maioria dos métodos analíticos interessa a quantidade total de radiação emitida ao longo do tempo em função do analito em estudo e não a intensidade a um determinado comprimento de onda, então o detetor não necessita de ser um espectrómetro mas um simples tubo fotomultiplicador, mais barato e muito mais sensível, é suficiente.

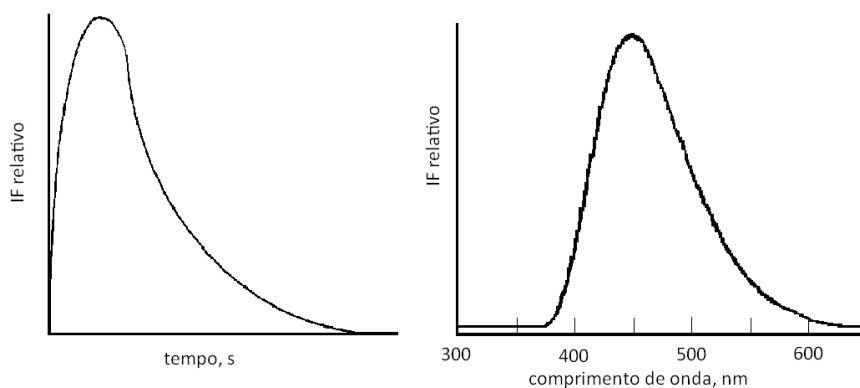


Figura 3.2 – Comportamento típico da quimioluminescência do luminol em meio aquoso. Intensidade da radiação total em função do tempo após juntar o substrato, esquerda, e o espectro, direita.

3.1.2. Utilização de fibras óticas

A radiação chega ao detetor por simples exposição direta, meio de transporte o ar, ou conduzida através de uma fibra ótica. A fibra ótica apresenta algumas vantagens, tais como a reduzida perda de sinal ao longo do percurso, não necessita de alinhar o detetor com a reação quimioluminescente, a radiação propaga-se no interior da fibra ótica qualquer que seja o percurso, e pode, ainda, servir de suporte ao sensor através de uma imobilização do luminol com ou sem o catalisador, funcionando deste modo como sonda - deteção remota.

Alguns métodos quimioluminescentes para doseamento do peróxido de hidrogénio são baseados no uso de sistemas heterogéneos, por exemplo, Zhang *et al* [33] e Guo *et al* [34] usaram, com sucesso, para o sistema luminol/peróxido de hidrogénio, os catalisadores nanopartículas de ouro e prata, respetivamente, em suspensão. No entanto, pode-se proceder à imobilização dos reagentes em diferentes tipos de matrizes sólidas.

Imobilizações feitas sobre o luminol, em resinas de permuta aniónica, permitiu construir sistemas de injeção em fluxo para o peróxido de hidrogénio, em que o catalisador também se encontrava imobilizado, obtendo-se limites de deteção baixos, como por exemplo hemoglobina imobilizada em Sol-Gel com um limite de deteção de $0,1 \cdot 10^{-3}$ mol/L [11], ou peroxidase de rábano-silvestre imobilizado em membranas de quitosano com um limite de $40 \cdot 10^{-6}$ mol/L e um tempo de vida do sistema de cerca de três meses [35].

Sistemas em que apenas o catalisador foi imobilizado em resina Dowex-50, cobalto(II) complexado com monoetanolamina, permite medir peróxido de hidrogénio na presença de luminol para sistemas com injeção de fluxo, com limites de deteção na ordem das décimas dos milimolar, para misturas com valores de pH alcalinos [5], neutros [18] ou ácido (neste último verifica-se um acréscimo de cerca de 23 nm do máximo do comprimento de onda) [17].

Nozaki *et al* [8] descreve um sistema em que a peroxidase de rábano-silvestre é imobilizado sobre chitoperls BC-3001, no qual é possível proceder à reativação da enzima através do uso de uma solução de imidazole.

Ramos *et al* [6] imobilizou cobalto(II) pelo processo Sol-Gel e fixou-o na extremidade de uma fibra ótica, a qual é introduzida no líquido, que já continha o luminol, para monitorizar o peróxido de hidrogénio, o p-iodofenol, o ácido p-coumarino e o 2-naftol. Este sensor remoto tem um limite de deteção para o peróxido de hidrogénio de $5 \cdot 10^{-5}$ mol/L.

Nanopartículas à base de silício, especificamente as produzidas pelo processo de Sol-Gel, estão a ser cada vez mais usadas como material de suporte para sensores bioanalíticos com desenvolvimento de radiação. As ligações covalentes estabelecidas entre o suporte e a molécula sensora, por um lado são fundamentais para a sua estabilidade, a concentração do sensor não deve variar ao longo da sua vida de sensor, por outro lado há um incremento do sinal. Além disso, nanopartículas de Sol-Gel podem ser suficientemente pequenas para o uso em processos biológicos e não são tóxicas [36].

Neste capítulo serão apresentados a síntese e a caracterização de nanoestruturas à base de silício, dopadas com luminol e cobalto(II) que apresentam atividade quimioluminescente quando expostas ao peróxido de hidrogénio. As nanopartículas de silício são suspensas em solução aquosa, têm resposta proporcional à quantidade de peróxido de hidrogénio adicionado, o sinal é conduzido até ao tubo fotomultiplicador através de uma fibra ótica. Todo este trabalho deu origem a um artigo científico publicado na revista *Analytical Letters* em 2010 [37].

3.2. Procedimento experimental

3.2.1. Reagentes

Luminol (97%), Tetraetoxisilano, isobutil-trimetoxisilano, triton X-100, foram obtidos da Sigma-Aldrich Química S.A. (Espanha), etanol absoluto, ácido clorídrico (37%), solução aquosa padrão de cloreto de cobalto(II) 0,1000 mol/L, peróxido de hidrogénio (30%), carbonato de sódio e hidrogenocarbonato de sódio pró-análise foram adquiridos à Merck (Alemanha). A água desionizada utilizada tem resistividade superior a 4 M Ω /cm.

3.2.2. Preparação de soluções

Solução concentrada de luminol 5×10^{-3} mol/L foi preparada pela dissolução de 25 mg de luminol sólido em tampão carbonato/hidrogenocarbonato 0,05 mol/L (pH = 10,1) e foi diluída até ao volume final de 28 mL. A solução de luminol foi armazenada ao abrigo da radiação.

A primeira diluição da solução de peróxido de hidrogénio foi obtida pela diluição a 1:30 da solução a 30% em solução tampão carbonato/hidrogenocarbonato 0,05 mol/L (pH = 10,1). Todas as restantes diluições foram efetuadas por diluições sucessivas em solução tampão carbonato/hidrogenocarbonato. Estas soluções foram sempre preparadas diariamente, à temperatura ambiente e nunca foram previamente desarejadas.

A solução de cobalto(II) foi obtida pela respetiva diluição da solução padrão de cloreto de cobalto(II) em solução tampão carbonato/hidrogenocarbonato.

A solução sensor para o peróxido de hidrogénio foi obtida pela mistura de 2 mL de solução concentrada de luminol com 10 mL de solução de cobalto(II) em solução tampão de carbonato 0,05 mol/L.

3.2.3. Síntese do material sensor

As sínteses dos materiais à base de silício foram executadas de acordo com Hool et al [38]. Para esse efeito realizaram-se duas estratégias diferentes:

NM1 → A solução precursora foi preparada pela mistura de 1 mL de tetraetoxisilano, 0,05 mL de isobutil-trimetoxisilano, 0,312 mL de etanol e 0,100 mL de ácido clorídrico 0,1 mol/L, num eppendorf de 2 mL e deixou-se agitar durante uma hora.

Para um novo eppendorf colocou-se 1 mL de solução precursora, 0,100 mL de Triton X-100 e 0,500 mL de solução sensora, agitou-se mais 15 minutos, transferiu-se para um vidro de relógio e deixou-se secar ao ar, à temperatura ambiente e no escuro.

Formou-se um granulado branco que foi macerado num almofariz de ágata antes de usar.

NM2 → A solução precursora foi preparada pela mistura de 0,5 mL de tetraetoxisilano com 0,050 mL de ácido clorídrico 0,1 mol/L, num eppendorf. Para um outro eppendorf adicionou-se 1 mL de solução sensor e 0,090 mL de Triton X-100 e agitou-se a mistura durante 30 minutos.

Juntou-se ao sensor o precursor e agitou-se novamente durante 30 minutos. Centrifugou-se a mistura a 13200 rotações/minuto durante 2 minutos, obtendo-se um pó branco no fundo.

Este pó foi lavado duas vezes com água desionizada e separado por centrifugação, realizadas nas mesmas condições. O sólido foi seco ao ar, à temperatura ambiente e no escuro.

3.2.4. Instrumentação

As análises de microscopia eletrónica de varrimento (scanning electronic microscopy – SEM) e de energia dispersa de raio-X (energy dispersive X-ray – EDS) foram realizadas num FEI Quanta 400FEG/EDAX Genesis X4M de microscopia eletrónica de varrimento de alta resolução, estando os materiais dispersos em etanol.

A quimioluminescência foi lida num tubo fotomultiplicador Hamamatsu H7467PMT (Middlesex, NJ, USA) ligado a um computador pessoal e as adições dos volumes de peróxido de hidrogénio foram efetuadas numa microbureta controlada por computador pessoal (Crison MicroBU 2030).

3.2.5. Medição da quimioluminescência

Construiu-se uma câmara estanque à luz, onde estava colocado um tubo de ensaio de polietileno que continha cerca de 1 mg de material sensor suspenso em 0,050 mL de água desionizada ou, alternativamente, 0,100 mL de solução tampão de carbonato/hidrogenocarbonato (pH = 10,1). Foram adicionadas quantidades controladas, através de uma microbureta, de peróxido de hidrogénio com diferentes concentrações ao tubo de polietileno. A quimioluminescência foi registada num tubo fotomultiplicador a um tempo de aquisição de 0,1 s, usando duas configurações diferentes:

Configuração 1 - A amostra (tubo polietileno) foi colocada a cerca de 5 cm em frente à janela do tubo fotomultiplicador. Colocou-se um espelho em volta do tubo de polietileno de modo que a radiação refletida se dirigisse para o detetor (Fig.3.3).

Configuração 2 - O detetor foi colocado fora da câmara escura, e a radiação produzida no tubo de polietileno foi conduzida através de uma fibra ótica de vidro com 1 mm de diâmetro de núcleo (Fig.3.4).

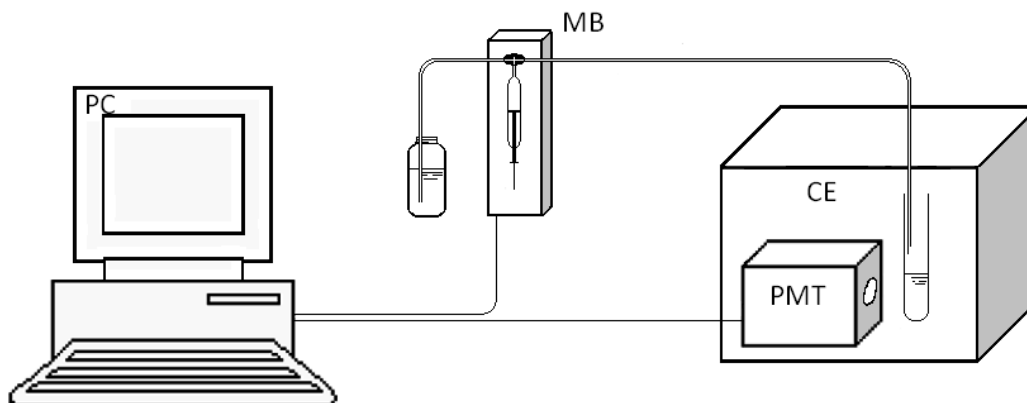


Figura 3.3 - Esquema da instalação para medir a quimioluminescência. Microbureta, MB, tubo fotomultiplicador, PMT, câmara escura, CE, computador pessoal, PC.

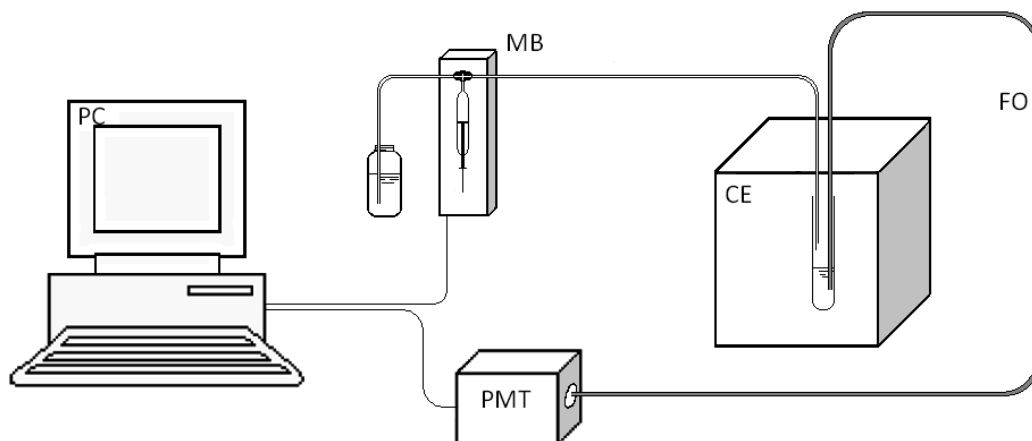


Figura 3.4 - Esquema da instalação para medir a quimioluminescência com fibra ótica. Microbureta, MB, tubo fotomultiplicador, PMT, computador pessoal, PC, câmara escura, CE, Fibra ótica, FO.

Os resultados são sempre a média de três ensaios independentes.

3.2.6. Tratamento de dados

A cada adição de peróxido de hidrogénio, o material sensor respondeu com um pico de grande intensidade e de um modo aparentemente instantâneo de quimioluminescência. Cada medida de quimioluminescência correspondeu ao somatório de 10 aquisições num tempo de integração de 1 s. Todos os cálculos foram efetuados na folha de cálculo Microsoft-Excel. O limite de deteção, LOD, foi obtido do seguinte modo:

$$LOD = \frac{3s}{b} \quad \text{Eq.3.13}$$

em que s é o desvio padrão de 16 brancos e b é o declive da reta de calibração.

3.3. Resultados

3.3.1. Caracterização morfológica dos materiais sensores de silício

Por análise das imagens obtidas por microscopia eletrónica de varrimento, SEM, concluiu-se que os materiais sintetizados pelo processo NM1 apresentam um tamanho típico na ordem dos 5 μm , enquanto os produzidos pela síntese NM2 têm dimensões de nanopartículas, ou seja, na ordem dos cerca de 500 nm (Fig.3.5).

Nas figuras Fig.3.5(a) e Fig.3.5(b) podem ver-se a morfologia do material formado pelo procedimento mais demorado, logo, reação química mais lenta. Apresenta um especto homogéneo com uma morfologia tendencialmente esférica, devido à presença do emulsionante Triton X-100. O material formado pelo processo NM2, Fig.3.5(c) e Fig.3.6(d), também apresenta uma morfologia essencialmente esférica, no entanto tem um tamanho cerca de 10 vezes inferior e apresenta-se misturado com outras estruturas. O processo NM2 é mais rápido, logo, há uma tendência para a formação de estruturas cristalinas em detrimento da nucleação, maior variedade ou ausência de forma definida e com partículas menores. O aglomerado, Fig.3.5(c), é um material altamente poroso, conseqüentemente, tem uma área superficial bastante elevada.

Sob o ponto de vista do efeito da área na reatividade ao peróxido de hidrogénio, os nanomateriais, obtidos em NM2, devem detetar concentrações mais baixas devido à maior relação entre a área e o volume das partículas. Por outro lado, as partículas maiores devem responder a concentrações maiores de peróxido de hidrogénio e responder durante mais tempo porque o luminol que se encontra no interior das partículas está mais indisponível para reagir.

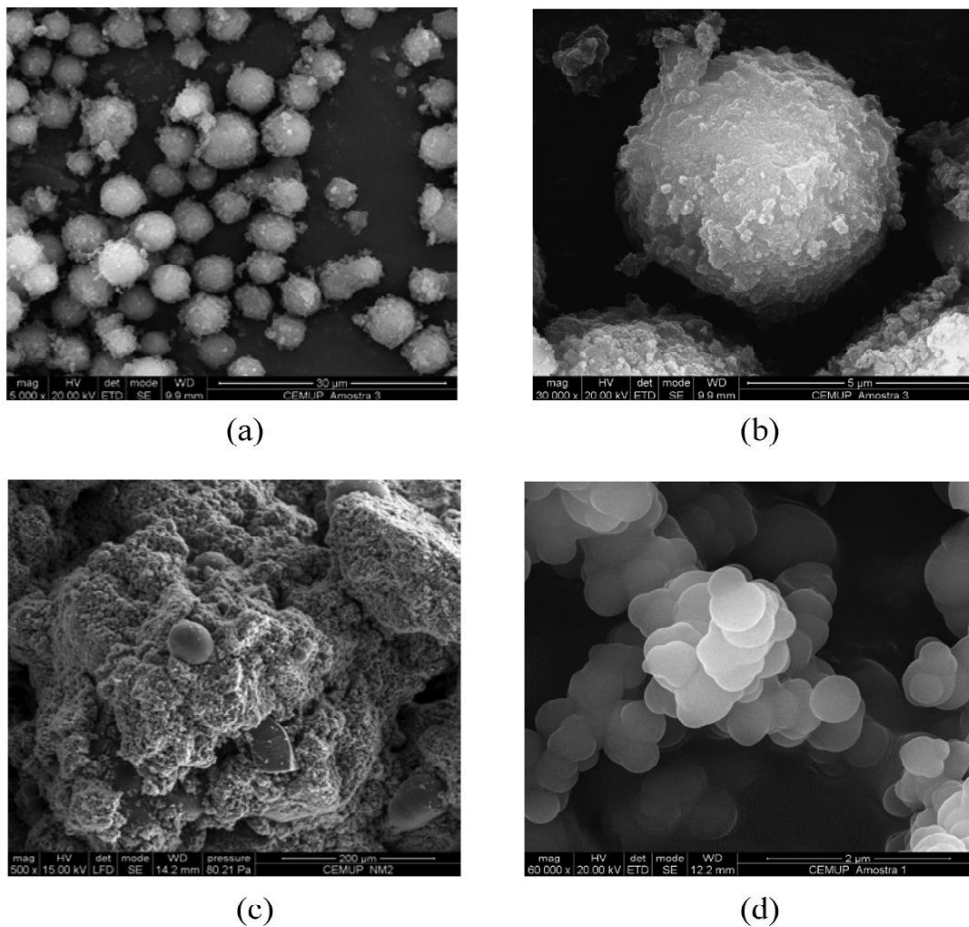


Figura 3.5 – Imagens SEM dos materiais sensores obtidos pelo procedimento NM1 (a e b) e pelo procedimento NM2 (c e d).

A composição química obtida por análise de energia dispersa de raio-X dos materiais de silício, mostra, qualquer que seja o processo de síntese, que são constituídos principalmente por silício, oxigênio, carbono e sódio (Fig.3.6). A presença de silício e oxigênio, em maior quantidade, mostra que o núcleo é constituído por sílica, e a presença de carbono e sódio mostra a presença de luminol e/ou tampão carbonato e hidrogenocarbonato, o luminol é o sal sódico e os carbonatos são de sódio. Não foi possível ver o azoto nem o cobalto porque as suas quantidades relativas estão abaixo do limite de deteção dos EDS (cerca de 0,1% m/m).

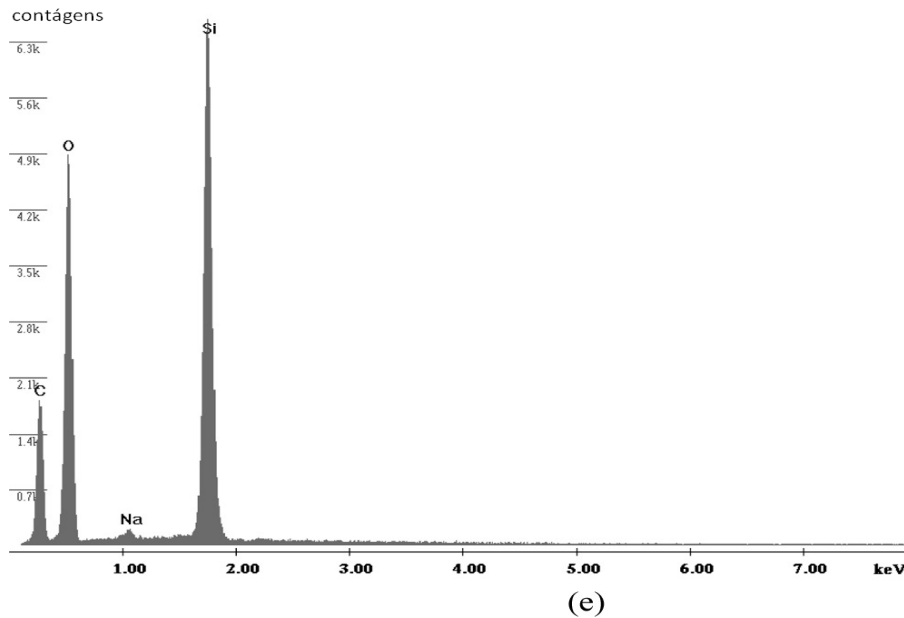


Figura 3.6 – Análise de energia dispersa de raio-X ao nanomaterial do processo NM2. Resultados idênticos foram obtidos no material sensor sintetizado por NM1.

3.3.2. Quimioluminescência do peróxido de hidrogénio

A fim de verificar se o material sensor, após imobilizado, respondia à presença de peróxido de hidrogénio, montou-se a instalação da Fig.3.3 e colocou-se cerca de 1 mg de sensor preparado pelo processo NM1, suspenso em 0,050 mL de solução tampão carbonato/hidrogenocarbonato. Quando se adicionavam iguais volumes de peróxido de hidrogénio de diferentes concentrações, em quantidades de sensor sempre renovadas, obtinha-se uma resposta quimioluminescente que variava linearmente com a concentração de peróxido de hidrogénio, Fig.3.7. Ficou demonstrado que o luminol e o cobalto(II) foram imobilizados na matriz pelo processo de Sol-Gel e mantêm a capacidade de reagir com o peróxido de hidrogénio produzindo radiação luminosa.

Experimentou-se, também, o nanomaterial sensor sintetizado pelo processo NM2 e, embora com morfologias diferentes, deu resultados muito similares.

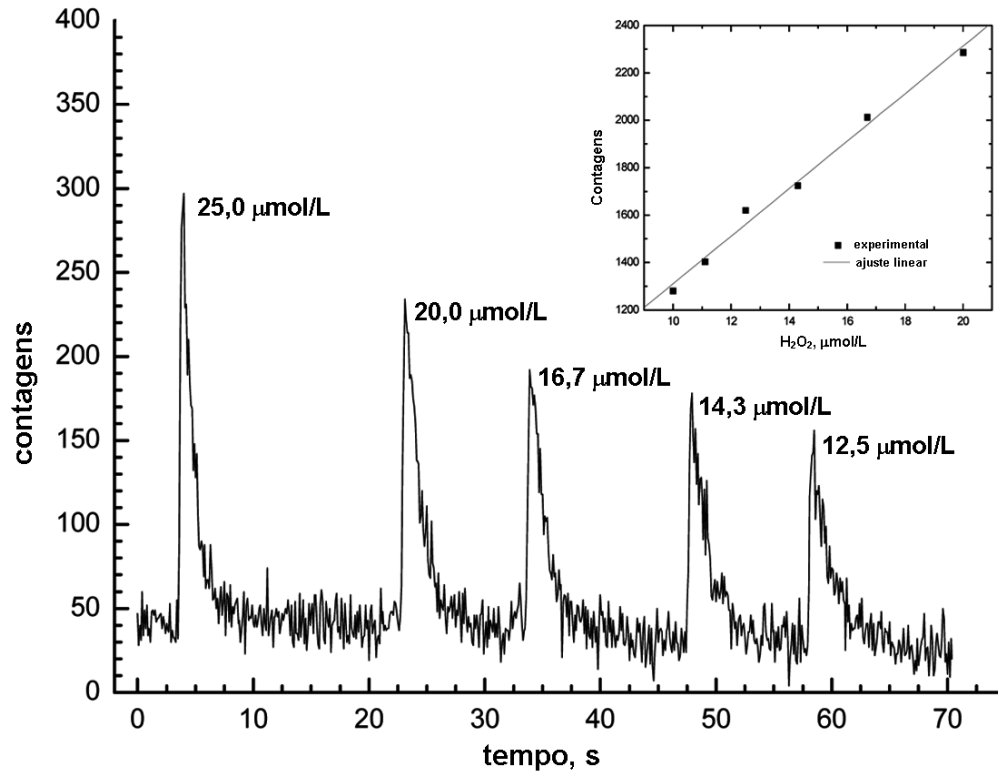


Figura 3.7 – Resposta quimioluminescente da adição do peróxido de hidrogénio, à suspensão aquosa do material sensor e correspondente ajuste linear.

A resposta das partículas sensores após cada adição do peróxido de hidrogénio é rápida, muito inferior a 1 s, com um pico agudo e retorna à linha de base em cerca de 2 s. Verifica-se que é diretamente proporcional na gama de concentrações de 10 a 20.10⁻⁶ mol/L, Fig.3.7, e apresenta um coeficiente linear superior a 0,994. Analiticamente a sua resposta é:

$$Contagens = 309 + 100 \cdot [H_2O_2] \quad \text{Eq.3.14}$$

em que $[H_2O_2]$ é a concentração do peróxido de hidrogénio em 10⁻⁶ mol/L.

3.3.3. Quimioluminescência do peróxido de hidrogénio em fibra ótica

Quando se usa uma fibra ótica para conduzir a radiação entre o meio reacional e o detetor (Fig.3.4) há uma diminuição na sensibilidade do método. Esta diminuição é justificada pela redução da quantidade de radiação que chega ao detetor. Passa-se de uma exposição completa do detetor, para uma situação em que há uma limitação física da área transversal da fibra ótica, na qual a área útil é inferior a 1 mm². Além disso, existem as eficiências inerentes ao facto de se ter incorporado um objeto entre o tubo de polietileno e o detetor.

No entanto, este sistema tem uma grande vantagem analítica ao permitir detetar quimioluminescência remotamente (*in situ*, *in vivo*, on-line, por exemplo). Esta deteção remota permite monitorizar peróxido de hidrogénio em locais de pequena dimensão, estando apenas limitado pelo tamanho da fibra ótica.

O sistema responde ao peróxido de hidrogénio em várias décadas, com um comportamento típico como mostra a Fig.3.8(a). No entanto, tem uma resposta não linear, deixa de responder para concentrações inferiores a 10⁻⁵ mol/L e apresenta um acentuado incremento na quimioluminescência para valores superiores a 10⁻² mol/L de peróxido de hidrogénio. Contudo, pode-se encontrar uma zona linear na gama de 50 a 300.10⁻⁶ mol/L com um limite de deteção cerca de 20.10⁻⁶ mol/L e um coeficiente de correlação superior a 0,995. A resposta típica é:

$$Contagens = 1,15 \cdot 10^3 + 27 \cdot [H_2O_2] \quad \text{Eq.3.15}$$

em que $[H_2O_2]$ é a concentração do peróxido de hidrogénio em 10⁻⁶ mol/L.

Um procedimento para tirar proveito do sinal existir ao longo de muitas décadas, é efetuar a calibração não em função da concentração do analito, mas sobre o simétrico do logaritmo decimal da concentração, [39, 40]. Se aplicar uma calibração semi-logaritmica à representação gráfica da Fig.3.8(a), pode obter-se um ajuste linear,

Fig.3.8(b), numa gama superior, agora de 50 a $2000 \cdot 10^{-6}$ mol/L, com um limite de deteção de $1 \cdot 10^{-6}$ mol/L e um coeficiente de correlação superior a 0,997, sendo a resposta analítica:

$$\text{Contagens} = 4,73 \cdot 10^5 + 1,07 \cdot 10^4 \cdot \text{Log}([H_2O_2]) \quad \text{Eq.3.16}$$

em que $[H_2O_2]$ é a concentração do peróxido de hidrogénio em 10^{-6} mol/L.

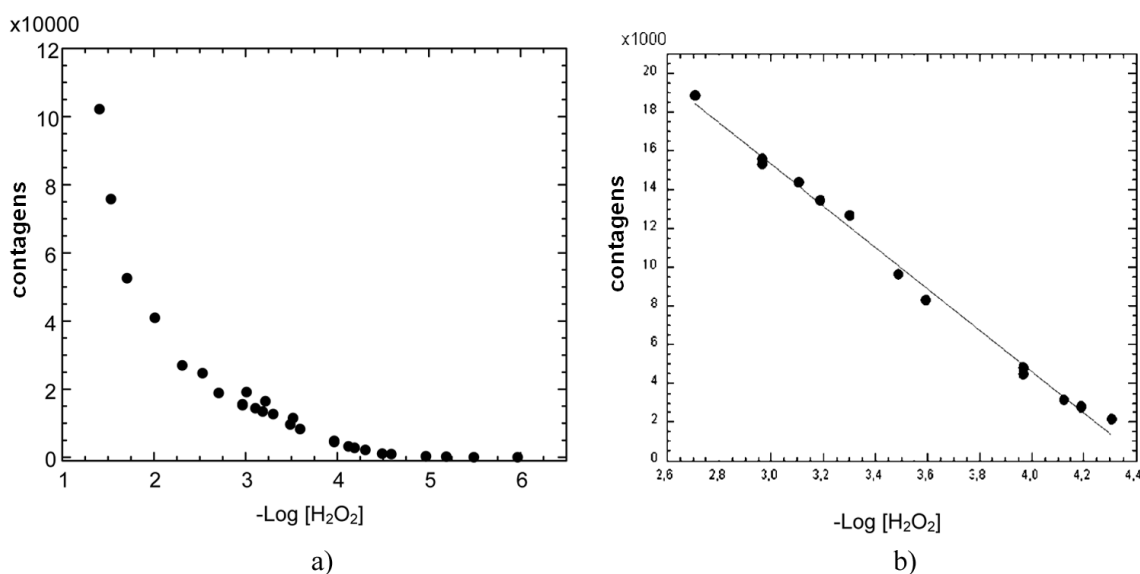


Figura 3.8 – Resposta quimioluminescente transportada através de uma fibra ótica em função do simétrico do logaritmo decimal da concentração de peróxido de hidrogénio, a), e o respetivo ajuste linear para a gama de 50 a $2000 \cdot 10^{-6}$ mol/L, b).

Da análise dos resultados de quimioluminescência dos dois métodos, com e sem o uso de fibras óticas para conduzir a radiação, constata-se que o método com a fibra ótica, tal como esperado, é menos sensível que o método direto devido às limitações inerentes à área e aos acoplamentos físicos da fibra ótica.

Verificou-se que variações na massa do material sensor em torno dos 1 mg não afetam os resultados do ajuste linear. Estudou-se, também, a estabilidade do material sensor ao longo do tempo, e se devidamente guardado ao abrigo da radiação, a resposta continua a ser linear no material com dois meses de idade, ao fim do qual começa a ter uma ligeira perda no sinal produzido para a mesma concentração de peróxido de hidrogénio.

A quantidade de cobalto(II) presente nas estruturas de sílica não afeta a quimioluminescência, no entanto, a quantidade de luminol imobilizado é crítica, (Fig.3.9) tendo uma influência maior quanto maior for a quantidade de peróxido de hidrogénio presente na amostra. Estes resultados provam que para pequenas quantidades de peróxido de hidrogénio, a quantidade de luminol existente nas nanopartículas é suficiente para consumir todo o peróxido, por outro lado, quando a concentração de peróxido de hidrogénio é grande, cerca de 10^{-3} a 10^{-4} mol/L, o luminol parece tornar-se o reagente limitante e daí a forte dependência da quimioluminescência com a quantidade deste.

Com o aumento da quantidade de luminol usado na preparação das nanopartículas aumenta a sensibilidade ao peróxido de hidrogénio, mas o limite de deteção não é afetado.

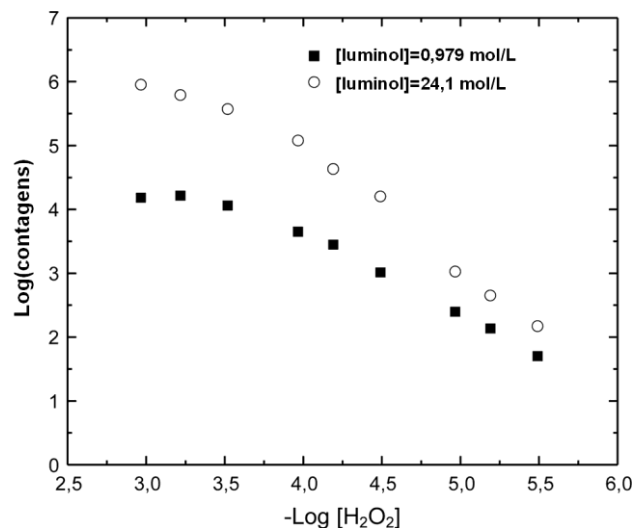


Figura 3.9 – Evolução do logaritmo da resposta quimioluminescente em função do simétrico do logaritmo da concentração do peróxido de hidrogénio para duas concentrações diferentes de luminol na preparação das nanopartículas.

A pesquisa bibliográfica efetuada revelou não existirem aplicações para medir peróxido de hidrogénio com nanomateriais e, principalmente, serem monitorizados remotamente através de uma única fibra ótica.

Blum *et al* [40] com imobilização em membranas de *nylon* e usando a enzima peroxidase de rábano-silvestre, Preuschoff *et al* [41] com membranas de Biodyne™ da Pall (Alemanha) e UltraBind da Gelman Sciences (USA) com várias enzimas (peroxidase de rábano silvestre, peroxidase microbiana (mPOD) e glucose oxidase), trabalharam em sistema de injeção em fluxo, usaram um feixe de fibras óticas para

transportar a radiação da célula da reação química até ao detetor. Obtiveram sinal quimioluminescente até à concentração de 10^{-8} mol/L para o peróxido de hidrogénio. A quantidade de radiação luminosa que chega ao detetor é diretamente proporcional à quantidade de fibras óticas usadas na condução da radiação, se uma fibra ótica transportar uma certa quantidade de radiação, duas transportam o dobro e assim sucessivamente até encher toda a área da janela do detetor e/ou o meio reacional não poder conter mais fibras.

A imobilização do luminol com, ou sem, o catalisador provoca uma diminuição do sinal de quimioluminescência, e embora outros trabalhos refiram imobilizações com deteções para o peróxido de hidrogénio com outras montagens [5, 18], este sistema de fibra ótica única (com 1 mm de diâmetro) é de conceção simples, muito barata e permite antever duas situações ainda mais atrativas: primeiro imobilizar o material sensor na cabeça da fibra ótica (podemos pensar numa imobilização sobre a fibra ótica cortada transversalmente, em ângulo diferente dos 90° ou mesmo com outras geometrias, como por exemplo afunilada, em cone, para aumentar a área de exposição do material sensor); segundo, se o processo de fixação do material sensor à cabeça tiver êxito, então podemos passar para fibras óticas mais finas, por exemplo fibras óticas de telecomunicações, com apenas 0,05 mm de diâmetro. Com imobilizações sobre as fibras óticas muito finas, podemos detetar e dosear peróxido de hidrogénio remotamente, noutras aplicações bioanalíticas, por exemplo no interior de células vivas.

3.4. Conclusões

Foram produzidos com sucesso nanoestruturas de sílica pelo método de Sol-Gel funcionalizados com luminol e cobalto(II) que são sensíveis à presença de peróxido de hidrogénio. As nanoestruturas são constituídas maioritariamente por silício e oxigénio – sílica.

Observou-se que dependendo da metodologia de síntese dos nanomateriais, obtinham-se diferentes características morfológicas, mas tanto as micropartículas como as nanopartículas geravam quimioluminescência na presença do peróxido de hidrogénio.

Caracterizou-se o material sensor com uma exposição direta do detetor ao meio reacional, observou-se que emitia quimioluminescência para concentrações de peróxido de hidrogénio inferiores a $2 \cdot 10^{-3}$ mol/L e um limite de deteção na ordem de alguns micromolar.

A medição da quimioluminescência através de uma fibra ótica de vidro é uma via analiticamente muito interessante, embora reduza a sensibilidade do método, a imobilização em nanoestruturas de silício são compatíveis com a imobilização sobre a fibra ótica de vidro e a modificação da geometria da cabeça sensora parecem ser a via a seguir para melhorar a eficiência deste método – sondas óticas remotas para monitorizar quimioluminescência de espécies químicas de oxigénio e azoto em organismos vivos.

3.5- Bibliografia

- [1] C. Lu, G. Song, J. Lin, 2006. *Trends in Analytical Chemistry*, 25 (10), 985-995.
- [2] D. Komrskova, A. Lojek, J. Hrbac, M. Ciz, 2006, *Luminescence*, 21, 239-244.
- [3] K. Hool, T. A. Nieman, 1988, *Analytical Chemistry*, 60, 834-837.
- [4] A. N. Diaz, M. C. R. Peinado, M. C. T. Minguez, 1998, *Analytical Chimica Acta*, 363, 221-227.
- [5] B. Li, Z. Zhang, Y. Jin, 2001, *Sensors and Actuators B*, 72, 115-119.
- [6] M. C. Ramos, M. C. Torijas, A. N. Diaz, 2001, *Sensors and Actuators B*, 73, 71-75.
- [7] G. Zhou, G. Wang, J. Xu, H. Chen, 2001, *Sensors and Actuators B*, 81, 334-339.
- [8] O. Nozaki, H. Kawamoto, 2003, *Luminescence*, 18, 203-206.
- [9] A. Stenfeldt, C. Dahlgren, 2007, *Luminescence*, 22, 507-510.
- [10] E. L. Bastos, L. F. M. L. Ciscato, F. H. Bartoloni, L. H. Catalani, P. Romoff, W. J. Baader, 2007, *Luminescence*, 22, 126-133.
- [11] B. Li, Z. Zhang, L. Zhao, 2001, *Analytica Chimica Acta*, 445, 161-167.
- [12] A. Tahirovic, A. Copra, E. Omanovic-Miklicanin, 2007, *Talanta*, 72, 1378-1385.
- [13] G. M. Greenway, T. Leelasattarathul, S. Liawruangrath, R. A. Wheatley, N. Youngvises, 2005, *The Analyst*, 131, 501-508.
- [14] L. Marle, G. M. Greenway, 2005, *Analytica Chimica Acta*, 548, 20-25.
- [15] J. Li, P. K. Dasgupta, 2001, *Analytica Chimica Acta*, 442, 63-70.
- [16] J. Yuan, A. M. Shiller, 2000, 34, 3973-3980.
- [17] J. Lin, X. Shan, S. Hanaoka, M. Yamada, 2001, *Analytical Chemistry*, 73, 5043-5051.
- [18] S. Hanaoka, J. Lin, M. Yamada, 2001, *Analytica Chimica Acta*, 426, 57-64.
- [19] Y. Zhou, T. Nagaoka, F. Li, G. Zhu, 1999, *Talanta*, 48, 461-467.

- [20] J. Lin, H. Arakawa, M. Yamada, 1998, *Analytica Chimica Acta*, 371, 171-176.
- [21] A. M. Garcia-Campana, W. R. G. Baeyens, X. Zhang, Chemiluminescence-based analysis. An introduction to principles, instrumentation and applications, Chap2. *In: A. M. Garcia-Campana, W. R. G. Baeyens, 2001, Chemiluminescence in Analytical Chemistry*, eds. New York: Marcel Dekker Inc., New York.
- [22] T. G. Burdo, W. R. Seltz, 1975, *Analytical chemistry*, 47 (9), 1639-1643.
- [23] J. Du, Y. Li, J. Lu, 2001, *Analytica Chimica Acta*, 448, 79-83.
- [24] E. H. White, M. M. Bursey, 1964, *Journal of the American Chemical Society*, 86, 941-942.
- [25] S. Kulmala, T. Ala.Kleme, D. Papkovsky, K. Loikas, 1998, *Analytical chemistry*, 70, 1112-1118.
- [26] Y. A. Vladimirov, E. V. Proskurnina, 2009, *Biochemistry (Moscow)*, 74, 1545-1566.
- [27] C. Xiao, D. W. King, D. A. Palmer, D. J. Wesolowski, 2000, *Analytical Chimica Acta*, 415, 209-219.
- [28] <http://apps.webofknowledge.com/>, 30 de Janeiro de 2012.
- [29] A. Roda, M. Guardigli, E. Michelini, M. Mirasoli, P. Pasini, 2003, *Analytical Chemistry*, 75, 462A-470A.
- [30] A. Roda, M. Guardigli, P. Pasini, M. Mirasoli, E. Michelini, M. Musiani, 2005, *Analytical Chimica Acta*, 541, 25-36.
- [31] J. Wang, D. Xing, Y. He, X. Hu, 2002, *FEBS Letters*, 523, 128-132.
- [32] Y. Wei, D. Xing, S. Luo, W. Xu, 2008, *Journal of Biomedical Optics*, 13 (2), 024023.1-024023.7.
- [33] Z. Zhang, H. Cui, C. Lai, L. Liu, 2005, *Analytical Chemistry*, 77, 3324-3329.
- [34] J. Guo, H. Cui, W. Zhou, W. Wang, 2008, *Journal of Photochemistry and Photobiology A*, 193, 89-96.
- [35] G. Zhou, G. Wang, J. Xu, H. Chen, 2002, *Sensors and Actuators B*, 81, 334-339.
- [36] A. Burns, O. Hooisweng, U. Wiesner, 2006, *Chemical Society Reviews*, 35, 1028-1042.
- [37] A. J. Duarte, C. Rocha, F. Silveira, G. G. Aguilar, P. A. S. Jorge, J. M. M. Leitão, M. Algarra, J. C. G. E. Da Silva, 2010, *Analytical Letters*, 43, 2762-2772.
- [38] K. Hool, T. A. Nieman, 1988, *Analytical Chemistry*, 60, 834-837.
- [39] L. J. Blum, S. M. Gautier, P. R. Coulet, 1988, *Analytical Letters*, 21, 717-726.
- [40] J. C. G. Esteves da Silva, J. R. M. Dias, J. M. S. Magalhães, 2001, *Analytical Chimica Acta*, 450, 175-184.
- [41] F. Preuschoff, U. Spohn, G. Blankenstein, K. H. Mohr, M. R. Kula, 1993, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 346, 924-929.

4. Doseamento do óxido nítrico com fluoresceinamina reduzida por fluorescência

4.1. Introdução

A determinação de espécies reativas de oxigênio e azoto, incluindo o óxido nítrico, é objeto de estudo em numerosos processos fisiológicos e patológicos. Várias têm sido as metodologias propostas para a monitorização do óxido nítrico *in vitro* e *in vivo*, desde quimiluminescência e fluorescência, passando pela eletroquímica, até à ressonância paramagnética eletrónica [1-6].

A grande vantagem do uso de sistemas de fluorescência, usando fluoresceína e seus derivados como sensores, é a sua elevada sensibilidade associada a uma instrumentação simples e de reduzido custo. Existe ainda a possibilidade de imobilização destes sensores em suportes sólidos com possibilidade de acoplamento em fibras óticas para posterior controlo remoto em medições *in vivo*. Kojima et al desenvolveu um sensor para óxido nítrico baseado em diaminofluoresceína [6], que, embora tenha baixa seletividade, tem sido usado para amostras *in vivo* [2]. Entre os derivados da fluoresceína, os ácidos 2-[6-(4'-hidroxi)fenoxi-3*H*-xanteno-3-on-9-il]benzóico e o 2-[6-(4'-amino)fenoxi-3*H*-xanteno-3-on-9-il]benzóico foram sintetizados por Setsulinai *et al* e mostraram-se bastante seletivos ao radical hidroxilo e ao ião hipoclorito, respetivamente [7].

A 1',7'-diclorofluoresceína reduzida, assim como a dihidrorodamina, espécies não fluorescentes, são frequentemente usadas na deteção e quantificação de espécies reativas de oxigénio e azoto porque a sua forma oxidada é muito fluorescente [8, 9]. Usando fluoresceína reduzida Nakahara *et al* desenvolveu uma metodologia simples, expedita e económica de quantificação do peróxido de hidrogénio. É seletiva e pode ser aplicada a matrizes como soro de vitelo, saliva humana, água da chuva e estrato de massa de trigo com resultados satisfatórios [10].

Como resultado do trabalho desenvolvido e descrito neste capítulo resultou o artigo "Reduced fluoresceinamine as a fluorescent sensor for nitric oxide" editado na revista científica Sensors no volume 10 (3), páginas 1661 a 1669, em 2010.

4.1.1. Fluoresceína e seus derivados

A fluoresceína e os seus derivados são corantes amplamente usados em várias áreas, desde a química analítica (indicador na titulação do catião prata segundo o método de Fajans [11] ou sensores de pH [12], por exemplo) até à microbiologia celular (indicadores intracelulares de pH [13], marcadores moleculares como proteínas, DNA, toxinas ou drogas [14], entre outros), passando pelo diagnóstico clínico (oftalmológico [15], tumores cerebrais [16], por exemplo). São também largamente usados em áreas de engenharia como traçador: em rios [17], aquíferos subterrâneos [18] ou mesmo na deteção de fugas em sistemas hidráulicos de grande envergadura. A característica que torna esta família de compostos tão apelativos é o elevado rendimento quântico da sua fluorescência e a excelente biocompatibilidade.

Esta família de compostos é formada por uma estrutura rígida tricíclica característica dos xantenos, ligada a um ácido orto-benzóico pela posição *para* relativamente ao oxigénio e pode ter substituintes quer na estrutura do xanteno, os X_is, quer na estrutura do ácido benzoico, Y_is (Fig.4.1). O xanteno faz um ângulo diédrico de quase 90° com o anel benzénico [19].

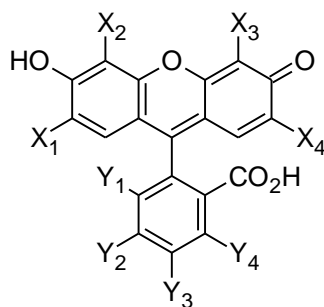


Figura 4.1 – Esqueleto da estrutura química dos derivados de fluoresceína.

A estrutura xanténica é responsável pela fluorescência, é o fluoróforo, que no caso da fluoresceína (estrutura mais simples, em que todos os substituintes X_i e Y_i são o hidrogénio (Fig.4.1)), apresenta em solução aquosa, em meio alcalino, um rendimento quântico de 0,93 [20]. Sun *et al* descreve ainda a síntese de derivados fluorados da fluoresceína que podem atingir rendimentos quânticos de 0,97 (Fig.4.2) [21]. A introdução de diferentes substituintes leva a que estes corantes tenham vários comprimentos de onda de absorção com diferentes absorvidades molares e, conseqüentemente, diferentes desvios de Stokes (diferença entre o comprimento de onda de excitação e de emissão), logo esta família de derivados da fluoresceína vai ter diferentes rendimentos quânticos [20-22].

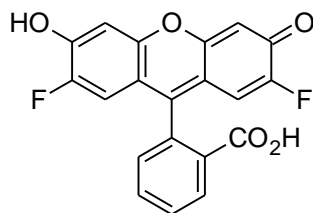
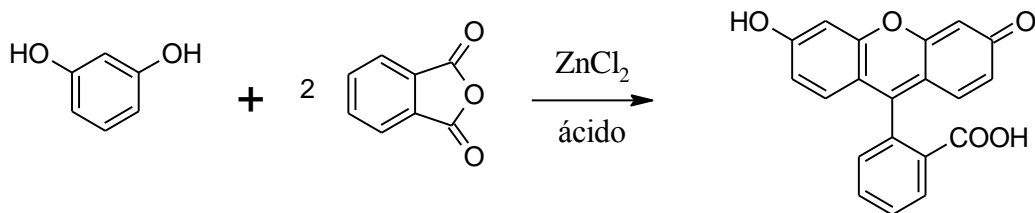


Figura 4.2 – Estrutura química de 2',7'-difluorofluoresceína [21].

4.1.2. Síntese da fluoresceína e seus derivados

A fluoresceína foi sintetizada pela primeira vez pelo químico alemão Adolf von Baeyer em 1871, através da condensação do anidrido ftálico com resorcino na presença do catalisador cloreto de zinco (via reação de Friedel-Crafts):



Eq.4.1

Dependendo do solvente e do valor de pH, a fluoresceína pode apresentar diversos tautómeros que têm propriedades fotofísicas distintas. Em solução aquosa, para valores de pH inferiores a 2, a fluoresceína encontra-se essencialmente protonada. Esta espécie tem uma absorvidade molar de $5,3 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a 437 nm e um rendimento quântico de 0,18. Entre os valores de pH de 2,1 e 4,3 predomina a fluoresceína neutra, a espécie com menor absorvidade ($1,1 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) mas com um rendimento quântico de 0,30. Na zona de valores de pH entre 4,3 e 6,4 mais de 50 % do total da fluoresceína encontra-se monodesprotonada, apresentando uma absorvidade molar de $2,9 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ e um rendimento quântico de 0,37. Para valores de pH superiores a 6,5 a espécie predominante é a dianiónica que apresenta maior absorvidade molar ($7,7 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) e rendimento quântico de 0,93 (Fig.4.3) [20].

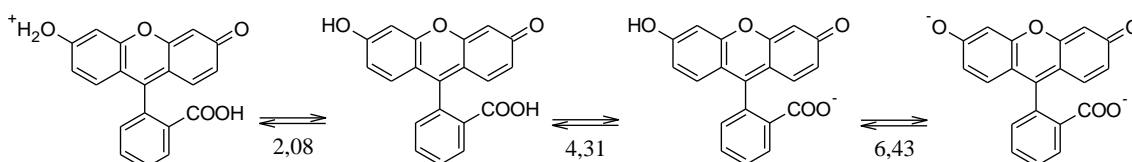


Figura 4.3 – Dependência do pH do meio na estrutura da fluoresceína.

Os ésteres cíclicos (lactonas) são estruturas, que por interromperem a mobilidade eletrónica na estrutura xanténica, não são fluorescentes (Fig.4.4) [21].

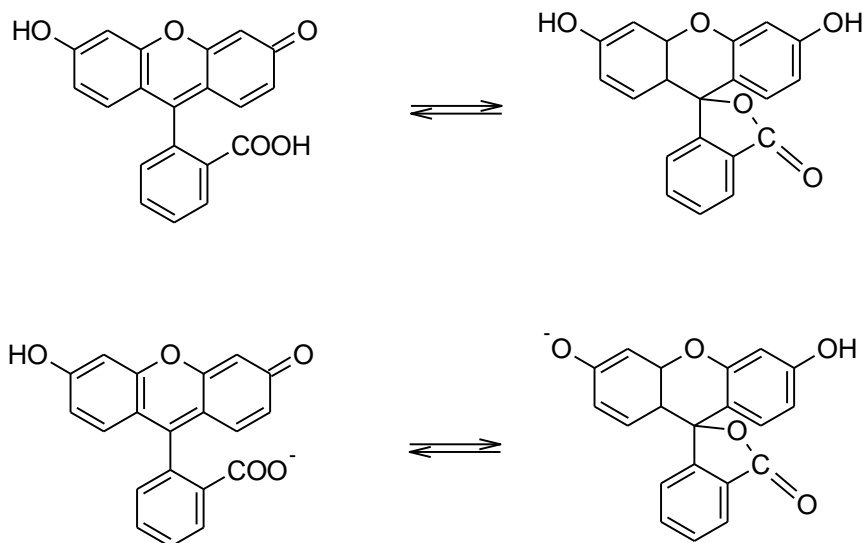


Figura 4.4 – Equilíbrio químico dos tautómeros neutro e monodesprotonado com as respetivas lactonas, não fluorescentes (direita).

A fluorescência da fluoresceína pode ser explicada pela transferência de eletrões fotoinduzidos da estrutura plana rígida do xanteno. Embora o seu mecanismo constitua uma incógnita, sabe-se que os substituintes desempenham uma influência fulcral nas características fotofísicas da molécula, principalmente na fluorescência, provocando aumento, diminuição ou mesmo a completa extinção [22].

Para a síntese de derivados da fluoresceína são utilizados dois processos distintos: condensação dos derivados do resorcinol com anidrido ftálico ou simplesmente alterando os substituintes de uma estrutura já existente.

A obtenção dos derivados da fluoresceína por condensação é preferível visto produzir compostos mais bem definidos, com maior pureza e menos produtos indesejados [23]. Por exemplo, Sun *et al*, sintetizou fluoresceínas fluoradas a partir de fluororesorcinóis com anidrido ftálico e obteve fluorofluoresceínas com elevada fotoestabilidade e rendimento quântico de 0,85 a 0,97 e com um grau de pureza superior a 96 % [21]. A 5-, ou 6-carboxifluoresceína, foram obtidas pela condensação do resorcinol com o anidrido 4-carboxiftálico em ácido metanossulfónico e posteriormente separadas com metanol/hexano e etanol/hexano, ficando cada um dos compostos com uma pureza de 98 % [24]. Patil *et al* sintetizou uma série de derivados da fluoresceína com dupla banda de emissão, pela condensação do 4-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)benzeno-1,3-diol com diferentes anidridos (ftálico, succínico,

maleico, ftálico-4-carboxílico e 3-amino-ftálico), obtendo derivados benzimidazolil da fluoresceína sensores de pH, com rendimentos quânticos entre 0,12 e 0,96 [25].

A obtenção de derivados da fluoresceína por modificação de uma fluoresceína já existente pode ser conduzida por diversas metodologias. Por exemplo, a síntese de nitroderivados pode ser efetuada por substituição eletrófila fazendo a reação da fluoresceína com ácido nítrico fumante ou com uma mistura de ácido nítrico e ácido sulfúrico [26]. A síntese de uma fluoresceína com uma unidade quelante catecol foi obtida pela reação da 5(6)-carboxifluoresceína com o 2,3-dibenziloxibenzilamina na presença de N,N'-diciclohexilcarbodiimida e N-hidroxisuccinimida, com um rendimento de 27% [27]. Li *et al* sintetizou a 3-epoxipropoxifluoresceína, a partir da fluoresceína e da hepicloridrina que é sensível à histidina [28].

4.1.3. Fluoresceínamina como sensor

A fluoresceínamina comercial é, normalmente, uma mistura dos isómeros 5-aminofluoresceína e 6-aminofluoresceína, 5(6)-aminofluoresceína. Devido à facilidade de ligação do grupo amino com um grupo ácido de uma estrutura a analisar, formando conjuntos fluorescentes, a fluoresceínamina é amplamente usada para estudar estruturas de proteínas e membranas, ácidos nucleicos e nucleótidos, fenómenos de transporte de lípidos e metabolitos em geral [29].

A sua síntese inicia-se pela condensação do resorcinol com o ácido 4-nitroftálico, originando a 5(6)nitrofluoresceína [30], cujos isómeros purificados por cristalização são submetidos à redução do grupo nitro a amino [31]. Na Fig.4.5 está representado um possível mecanismo para a formação do 5(6)nitrofluoresceína, adaptado do mecanismo proposto por Eshghi *et al* [23] para a fluoresceína. A obtenção do isómero 5 ou 6-nitrofluoresceína depende se o ataque do resorcinol se faz no grupo carboxílico 1 ou 2 do ácido 4-nitroftálico. Esta reação permite chegar a uma mistura racémica dos dois isómeros que podem ser separados por cristalização fracionada [32].

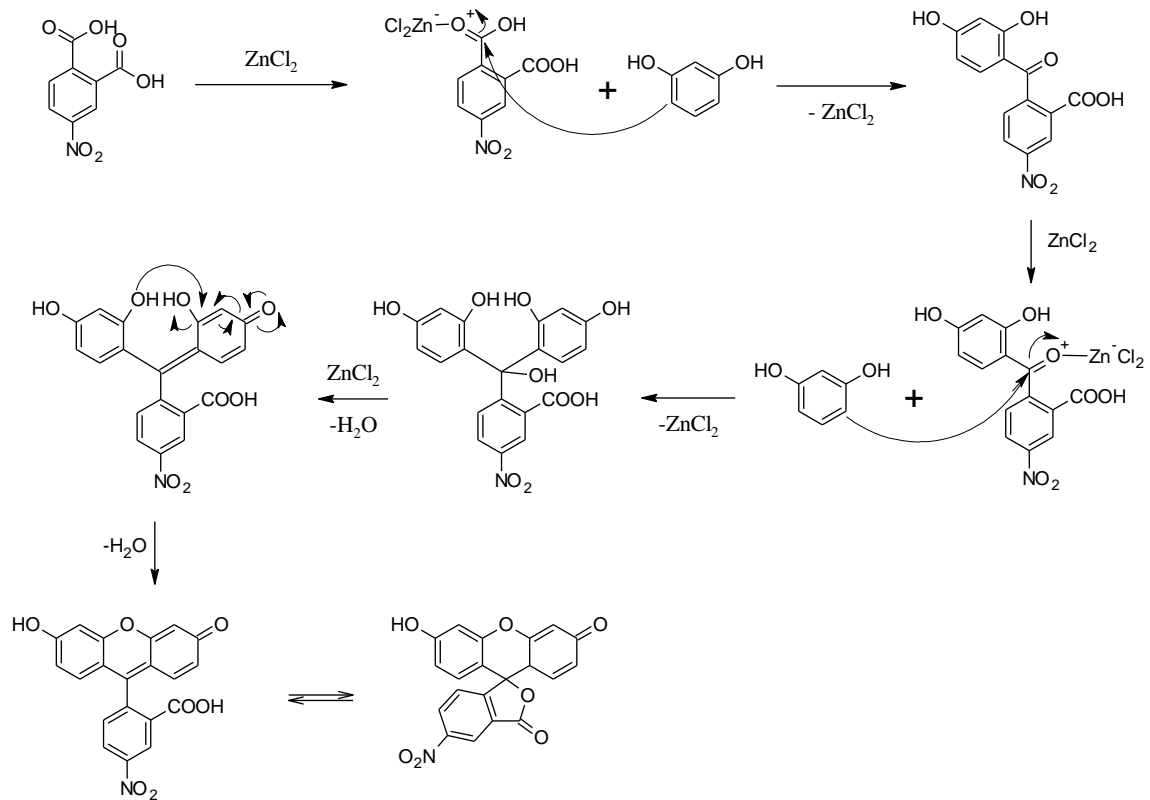


Figura 4.5 – Possível mecanismo de formação da 5(6)nitrofluoresceína.

Após separação dos isómeros procede-se à redução do grupo nitro. Para esse fim, Sigmundo *et al* usou o sistema redutor sulfureto/hidrogenossulfureto e conseguiu uma rendimento de 77 % para o derivado acetilado da 5-aminofluoresceína [32]. McKinney *et al* com o mesmo sistema chegou ao valor de 80 % de rendimento e reduziu a nitrofluoresceína com o sistema alternativo de hidrogenação, através do catalisador sólido níquel-alumínio (Raneu Nickel), conseguindo alcançar 96 % de conversão [30].

Na família das fluoresceínas, a fluoresceinamina é dos derivados com menor rendimento quântico (0,015), no entanto a sua derivatização a amidas torna-as bastante mais fluorescentes, a N-fluoresceinilacrilamida ou a N-fluoresceinilbenzamida têm rendimentos quânticos de 0,76 e 0,79, respetivamente [33]. Isto leva a supor que a fluoresceinamina pode ser um ótimo sensor fluorescente quando imobilizado pelo grupo amina.

A fluoresceinamina comercial é um indicador bastante comum e relativamente económico que pode ser facilmente imobilizado em suportes sólidos. O radical amina é ligado às terminações hidróxido, ligação promovida pelo gluteraldeído em meio ácido,

originando filmes limpos, transparentes na zona do visível e no ultravioleta próximo, permeáveis a analitos de reduzida dimensão. Estes filmes servem, por exemplo, de sondas de pH e são capazes de aderirem à superfície de fibras óticas [34,35]. Duong *et al* ligou covalentemente com sucesso o grupo amina da fluoresceinamina às terminações epóxido do Sol-gel 3-glicidoxipropiltrimetoxisilano e metiltrietoxisilano. O sólido obtido pelo processo de Sol-gel apresentava boa transparência na zona de excitação/emissão, estabilidade mecânica e química, uma resposta rápida ao catião hidrogénio, reprodutível, seletiva e sensível, com resposta linear entre o valor de pH de 4 e 10 (coeficiente de correlação 0,995) [36].

Sabendo que as espécies reativas de oxigénio e azoto são oxidantes, é possível pensar numa estratégia de identificação/quantificação das mesmas recorrendo ao facto de moléculas fluorescentes perderem esta característica quando se encontram na forma reduzida, tornando a adquiri-la na forma oxidada. O diacetato de diclorofluoresceína, não fluorescente, é o sensor mais usado na deteção por fluorescência de peróxido de hidrogénio no interior das células. A dihidrorodamina, molécula também não fluorescente, é frequentemente usada para detetar peroxinitrito no interior das células por fluorescência. Estes são dois exemplos de sensores que adquirem fluorescência quando passam à forma oxidada [37].

Procedimento análogo pode ser encontrado com a fluoresceinamina, quando reduzida, através do zinco metálico em meio ácido [38]. Esta perde a capacidade de fluorescência e torna a emitir radiação quando regressa à forma oxidada, particularmente na presença de óxido nítrico, como se pode ver no esquema da Fig.4.6.

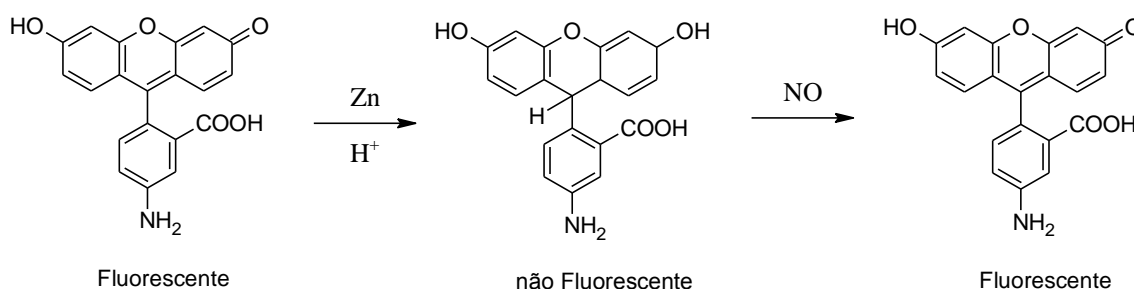


Figura 4.6 – Esquema da estratégia de tornar a fluoresceinamina sensor de óxido nítrico.

A provável estrutura da fluoresceinamina reduzida da Fig.4.6 foi obtida por analogia com as estruturas oxidada e reduzida da diclorofluoresceína e da dihidrorodamina [8].

4.2. Procedimento experimental

4.2.1. Reagentes

A fluoresceinamina, dietilamina NONOato de sódio, zinco em pó, cloreto de trishidroximetilaminometano (Tris), citrato de sódio e superóxido de potássio foram obtidos da Sigma-Aldrich Química S.A. (Espanha). A solução aquosa padrão de cloreto de cobalto(II) 0,1000 mol/L, solução aquosa de peróxido de hidrogénio (30 %), dihidrogenofosfato de potássio, hidrogenofosfato de sódio, nitrito de sódio, hidróxido de sódio, solução aquosa de hipoclorito de sódio, as soluções aquosas concentradas de ácido clorídrico e ácido sulfúrico foram adquiridos à Merck (Alemanha). A água desionizada utilizada com resistividade superior a 4 MΩ/cm.

4.2.2. Preparação de soluções

A solução tampão Tris-citrato, pH 7,4, foi preparada pela dissolução de 3,0285 g de cloreto de trishidroximetilaminometano e 2,9410 g de citrato de trisódio dihidratado em cerca de 480 mL de água desionizada, e ajustado o valor de pH a 7,4 com solução aquosa de hidróxido de sódio 1 mol/L. Perfez-se o volume final de 500,0 mL com água desionizada.

A solução tampão fosfato pH 7,4 foi preparada pela dissolução de 21,9105 g de dihidrogenofosfato de potássio e 0,4827 g de hidrogenofosfato de sódio em cerca de 480 mL de água desionizada, e ajustado o valor de pH a 7,4 com solução aquosa de hidróxido de sódio 1 mol/L. Completou-se o volume final de 500,0 mL com água desionizada.

Com exceção da solução inicial de fluoresceinamina, todas as restantes são preparadas em solução tampão fosfato pH 7,4 e preparadas diariamente.

Fluoresceinamina reduzida foi preparada do seguinte modo: começou-se por diluir 1,4 mL de solução ácida de fluoresceinamina $1,45 \cdot 10^{-3}$ mol/L (obtida pela

dissolução de 12,6 mg de fluoresceinamina em 25 mL de solução aquosa de ácido clorídrico 0,10 mol/L) com 14 mL de solução aquosa de ácido clorídrico 0,10 mol/L e, posteriormente, adicionou-se cerca de 0,5 g de zinco metálico. A mistura é posta a agitar num tubo Falcon de 15 mL, por inversões, até a fluorescência ou a cor amarela desaparecer (cerca de 30 minutos). A cor amarela inicial da fluoresceinamina sobrepõe-se à mistura com zinco metálico (um pó cinzento). A solução de trabalho da fluoresceinamina reduzida foi feita pela diluição de 5 mL de solução límpida de fluoresceinamina reduzida acabada de centrifugar, à qual foi acrescentado 10 mL de tampão Tris pH 7,4 e, por fim, 4,7 mL de solução aquosa de hidróxido de sódio 0,10 mol/L. Esta solução de fluoresceinamina reduzida é estável pelo menos durante duas horas, sem aparecimento significativo da fluorescência. Durante este período evitou-se que esta solução estivesse em contacto com o ar.

A solução aquosa de cloreto de cobalto(II) 0,01 mol/L foi preparada a partir da solução de concentração 0,1000 mol/L com água desionizada.

As soluções aquosas de ácido sulfúrico e clorídrico foram obtidas pela respetiva diluição com água desionizada a partir das concentradas, e a solução de hidróxido de sódio foi obtida pela respetiva dissolução e diluição do sólido em água desionizada.

4.2.3. Geração do óxido nítrico

Produziu-se óxido nítrico com dois métodos diferentes: (i) usando um doador que por decomposição química liberta óxido nítrico para a solução aquosa e (ii) gerando uma solução saturada em óxido nítrico por passagem de uma corrente de óxido nítrico gasoso.

- (i) Pesaram-se 7,0 mg de dietilamina NONOato de sódio, dissolveu-se e diluiu-se ao volume final de 10,0 mL com tampão fosfato de valor de pH 7,4 previamente desoxigenado, ou seja, fez-se borbulhar uma corrente de azoto através da solução tampão durante uma hora. Todas as diluições necessárias foram feitas por diluição rigorosa com solução tampão fosfato pH 7,4 desoxigenada e evitando a exposição das soluções ao ar e à luz. A

estequiometria é de 1,5 mole de óxido nítrico por cada mole de dietilamina NONOato de sódio.

- (ii) Cerca de 22 g de nitrito de sódio com um pouco de água foram colocados num recipiente hermeticamente fechado ao qual estava ligado uma bureta que continha ácido sulfúrico 6 mol/L, desta saía um tubo de silicone que iria conduzir os gases formados para um frasco de polietileno. Este estava também hermeticamente fechado, continha cerca de 800 mL de solução aquosa de hidróxido de sódio a 20 %. Deste último frasco saía um tubo que mergulhava na solução tampão fosfato pH 7,4 que se pretende saturar com óxido nítrico (Fig.4.7). Todo este sistema foi previamente desoxigenado, conseguindo-se assim saturar mais rapidamente a solução de óxido nítrico. Depois gotejam-se, à média de uma gota por minuto, o ácido sulfúrico, produzindo-se deste modo uma mistura de gases com azoto na sua composição, os NO_x, que foram posteriormente passados (lavados) através da solução alcalina, onde todos os gases ficam retidos com exceção do óxido nítrico.

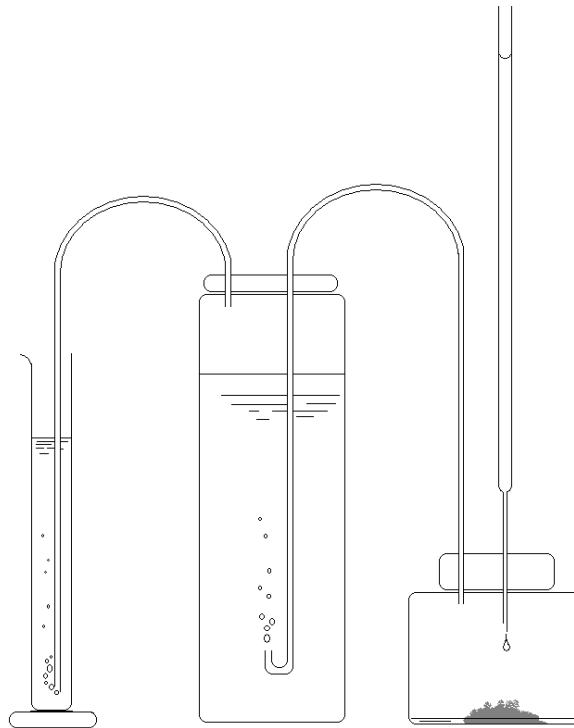


Figura 4.7 – Esquema da instalação geradora de óxido nítrico (ii).

4.2.4. Instrumentação

A medição da fluorescência foi executada em cuvetes de quartzo com agitação feita através de uma barra magnética. A montagem realizada no laboratório consistia numa fonte estabilizada de eletricidade que alimentava um LED a 450 nm da Roithner Lasertechnik (ref. LED450-01), um porta cuvetes de 4 vias da OceanOptic (CUV-ALL-UV 4-way) colocado em cima de um agitador magnético, um detetor de carga acoplada (charge-coupled device) da OceanOptic (USB4000), uma fibra ótica de vidro com 1,0 mm de diâmetro no núcleo que conduz a radiação da fonte de alimentação ao porta cuvetes e, ligado a 90° em relação a esta, uma fibra de vidro com 0,600 mm de diâmetro no núcleo (P600-2-UV-VIS) que guiava a radiação do suporte das cuvetes até ao detetor. Estes componentes estavam ligados entre si como mostra a (Fig.4.8).

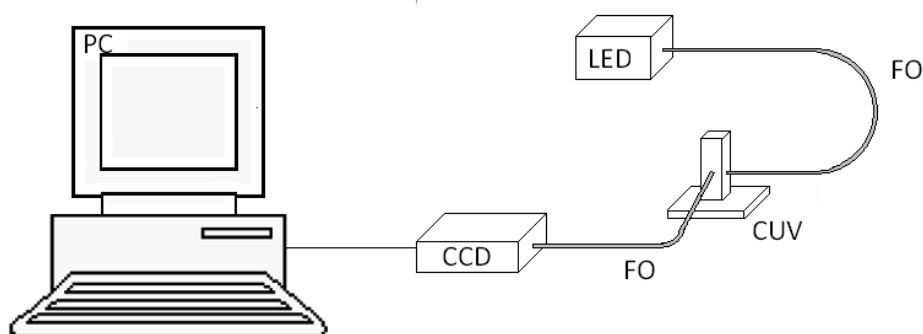


Figura 4.8 – Esquema da disposição dos componentes para a medição da fluorescência numa cuvette. PC computador pessoal, CCD detetor, LED fonte de alimentação, FO fibra ótica e CUV suporte da cuvette.

4.2.5. Medição da fluorescência

A medição do óxido nítrico proveniente de (i), do dietilamina NONOato de sódio, foi feita do seguinte modo: 4,8 mL de fluoresceinamina reduzida foram colocados em frascos de vidro de 20 mL de capacidade e termoestatizado a 37° C,

pelo menos durante 30 minutos. Adicionou-se 0,20 mL de cloreto de cobalto(II) 0,01 mol/L e 0,20 mL de solução de óxido nítrico a diferentes concentrações. Esta mistura ficou a reagir durante 1 hora e depois foi lida a fluorescência do conteúdo na cuvete com agitação.

O óxido nítrico preparado pelo processo (ii), assim como as restantes soluções a monitorizar (os interferentes), foram medidos do seguinte modo: 2,40 mL de fluoresceinamina reduzida foram colocados na cuvete com constante agitação e adicionou-se 0,100 mL de solução aquosa de cloreto de cobalto(II) 0,01 mol/L. Por último, adicionou-se 0,1 mL de solução óxido nítrico, ou qualquer uma das restantes soluções, e seguidamente mediu-se a fluorescência.

O tempo de integração da intensidade de fluorescência, em unidades relativas de fluorescência, foi de 5 segundos, com um amaciamento do sinal de 10 vezes (o resultado da intensidade de fluorescência para cada comprimento de onda resulta da média das 10 intensidades de fluorescência vizinhas).

4.2.6. Tratamento de dados

Os cálculos foram executados numa folha de cálculo Microsoft-Excel. O limite de deteção foi determinado como sendo o quociente entre o triplo do desvio padrão de 16 brancos e o declive da reta de calibração obtida.

Para os estudos cinéticos, a taxa de formação do óxido nítrico foi determinada pelo incremento da intensidade de fluorescência ao comprimento de onda de emissão de 522 nm, e a respetiva constante foi obtida pela representação gráfica do logaritmo da intensidade de fluorescência efetiva (intensidade de fluorescência subtraída da linha de base) em função do tempo. O tempo de meia vida foi determinado pelo quociente entre 0,6931 e a constante de velocidade. Todos os resultados são a média de três réplicas independentes.

4.3. Resultados

4.3.1. Fluoresceinamina reduzida

A preparação de fluoresceinamina reduzida é simples, uma vez que é o produto da reação entre a fluoresceinamina e o zinco metálico em meio ácido. O excesso de zinco metálico é removido por centrifugação ficando em solução a fluoresceinamina reduzida (Fig.4.6) e catião zinco. A solução com sensor de fluoresceinamina reduzida é obtida pela neutralização do líquido centrifugado e diluição em tampão Tris pH 7,4.

A perda da fluorescência vem acompanhada pela perda da coloração amarelada característica da fluoresceinamina em meio ácido. Quando colocada numa cuvette com agitação, a fluoresceinamina reduzida com o catalisador cobalto (II) ganha fluorescência pelo simples contacto com o ar à razão de cerca de 28 unidades de intensidade relativas de fluorescência por minuto (Fig.4.9).

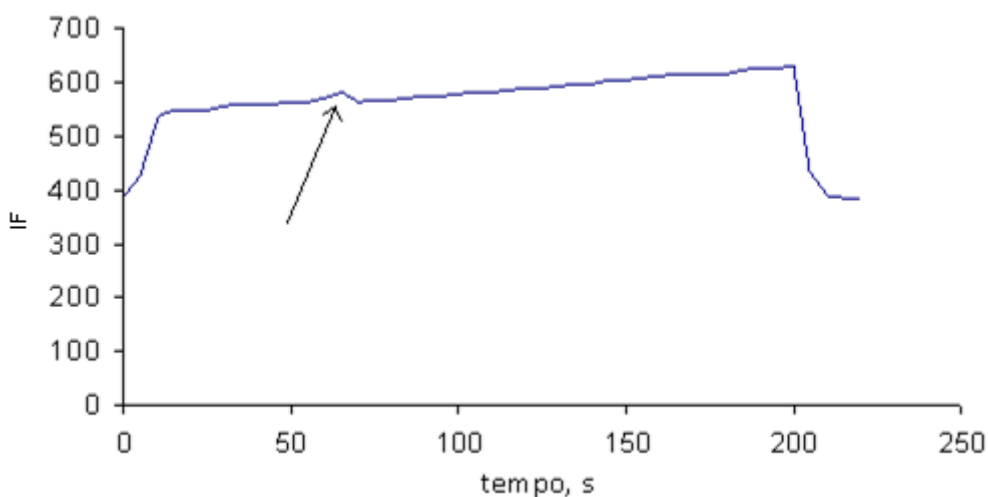


Figura 4.9 – Evolução da intensidade de fluorescência da fluoresceinamina reduzida, ao comprimento de onda de 522 nm ao longo do tempo quando excitada com LED a 450 nm. A seta indica a adição dos 0,100 mL de água desionizada à fluoresceinamina reduzida com o catião cobalto(II).

A Fig.4.10 mostra a evolução do sinal de fluorescência, antes e depois, da adição de óxido nítrico à solução de fluoresceinamina reduzida com constante agitação. O sistema responde de uma forma bastante rápida para um sensor de fluorescência, cerca de 80 % do sinal da fluorescência em 10 s, no entanto a fluorescência continua a aumentar a uma taxa de 640 unidades de intensidade relativa de fluorescência por minuto.

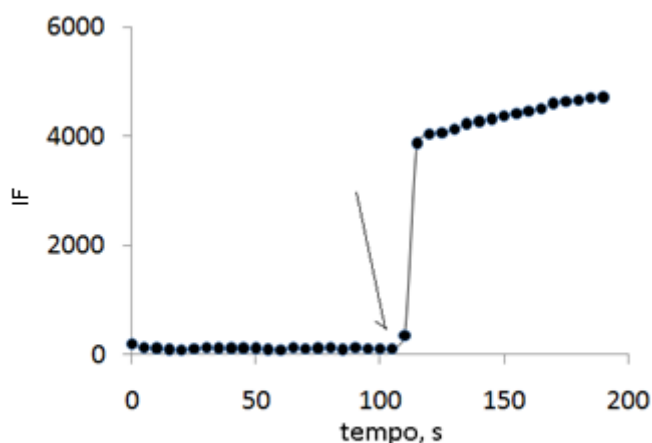


Figura 4.10 – Perfil de fluorescência (excitação a 450 nm e emissão a 522 nm) antes e depois de se ter adicionado óxido nítrico à fluoresceína reduzida (seta indica o momento da adição).

Com o intuito de avaliar o potencial analítico da fluoresceinamina reduzida, arquitetou-se a sequência de equipamentos como ilustra na Fig.4.8, na ausência de luz ambiente, e mediu-se o ressurgimento da fluorescência pela adição de diferentes analitos.

4.3.2. Resposta do sensor fluoresceinamina reduzida ao óxido nítrico

O óxido nítrico foi medido numa cuvete na instalação esquematizada na Fig.4.8. A medição da fluorescência é efetuada imediatamente após a adição da solução de óxido nítrico à mistura de fluoresceinamina reduzida na presença de catião

cobalto(II) numa cuvete provida de agitação. Verificou-se que na presença do catião cobalto(II), a velocidade de reação entre a fluoresceinamina reduzida e o óxido nítrico aumentava o sinal de fluorescência. Para o mesmo tempo de reação, a intensidade de fluorescência era o dobro se efetuada na presença de cobalto(II), parece que este funciona como um catalisador para a fluoresceinamina adquirir fluorescência. Como tal, foi sempre adicionada solução aquosa de cloreto de cobalto em todos os ensaios efetuados.

A relação quantitativa foi monitorizada com soluções de dietilamina NONOato de sódio a diferentes concentrações e resultou em diferentes e proporcionais intensidades nos espectros de emissões ao comprimento de onda de máxima variação a 522 nm. A Fig.4.11(a) mostra esta relação entre o espectro de emissão e a concentração de óxido nítrico, libertado pela dietilamina NONOato de sódio ao fim de uma hora de tempo de reação. O mesmo resultado foi conseguido, na mesma gama de concentrações, quando se usou solução de óxido nítrico gerado pela decomposição dos nitritos, o que sugere que o sistema da fluoresceinamina reduzida é sensor para o óxido nítrico, qualquer que seja a sua proveniência.

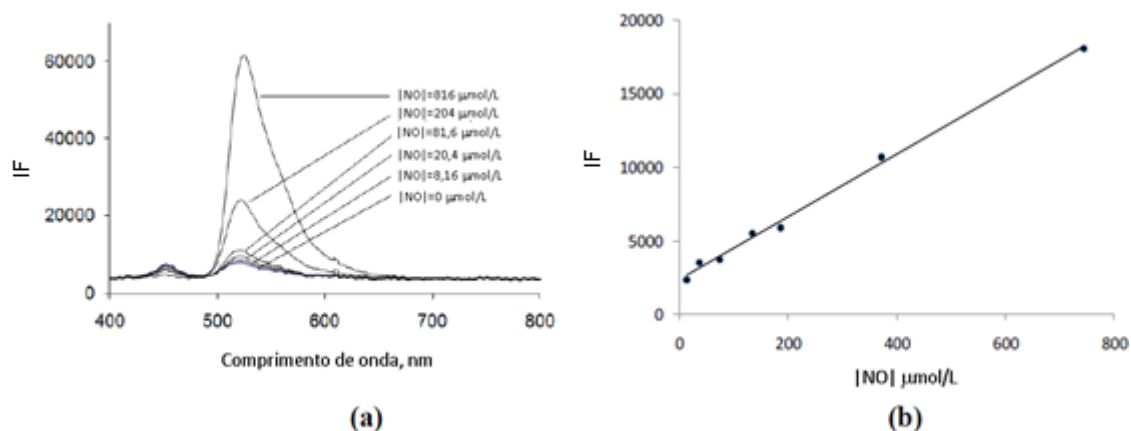


Figura 4.11 – a) Espectros de emissão da fluoresceinamina reduzida quando em presença de diferentes concentrações de óxido nítrico, excitados com LED de 450 nm. b) Respetiva curva de calibração para o óxido nítrico, [NO], ao comprimento de onda de emissão de 522 nm.

Existe uma zona de concentrações de óxido nítrico, cuja resposta fluorescente é linear. A análise detalhada da Fig.4.11(b) mostra que a linearidade está compreendida entre 10 a $750 \cdot 10^{-6}$ mol/L com um limite de deteção de cerca de $1 \cdot 10^{-6}$ mol/L (com um coeficiente de correlação de 0,998), cuja equação do ajuste:

$$IF = 2,5 \cdot 10^3 + 20,6 \cdot [NO]$$

em que $[NO]$ é a concentração de óxido nítrico em 10^{-6} mol/L.

Foi encontrada uma correlação semelhante quando se usou óxido nítrico gerado pela decomposição do nitrito em meio ácido e se adicionou este, a diferentes concentrações, à cuvete, com constante agitação, que continha fluoresceinamina reduzida com catião cobalto(II). No entanto o uso deste método de medição produziu resultados menos reprodutíveis comparado com o método do dador de óxido nítrico.

Com a finalidade de avaliar a repetibilidade, estudou-se a variabilidade do máximo da intensidade da emissão de fluorescência para as concentrações de óxido nítrico de 38, 94 e 380 $\mu\text{mol/L}$, obtendo-se um desvio padrão relativo de três medições independentes de 1 %, 0,7 % e 0,5 %, respetivamente. Estes resultados mostram que o sistema de fluoresceinamina reduzida para monitorizar óxido nítrico tem uma boa precisão.

4.3.3. Aplicação do sensor para medição de óxido nítrico

O sensor fluoresceinamina reduzido responde à presença de óxido nítrico em solução, quer seja gerado pela decomposição química de nitrito em meio ácido, Fig4.12(a) quer pela obtido pela hidrólise da dietilamina NONOato de sódio (Fig4.12b).

Na Fig.4.12(a) pode ver-se a resposta proporcional do sistema a crescentes concentrações de óxido nítrico obtido pela decomposição do nitrito. Estes resultados mostram a facilidade de deteção do óxido nítrico em solução aquosa.

O gráfico Fig.4.12(b) mostra a resposta crescente e a estabilidade do sinal de fluorescência adquirido após a adição de solução fresca de dietilmanina NONOato ao sistema fluoresceinamina reduzida. Assumindo uma cinética de primeira ordem, a constante cinética é de $12 \pm 1 \text{ min}^{-1}$, este valor encontra-se dentro da ordem de grandeza relatado na literatura que é de 16 min^{-1} [39]. Estes resultados confirmam e validam que a fluoresceinamina reduzida é um sensor para detetar óxido nítrico.

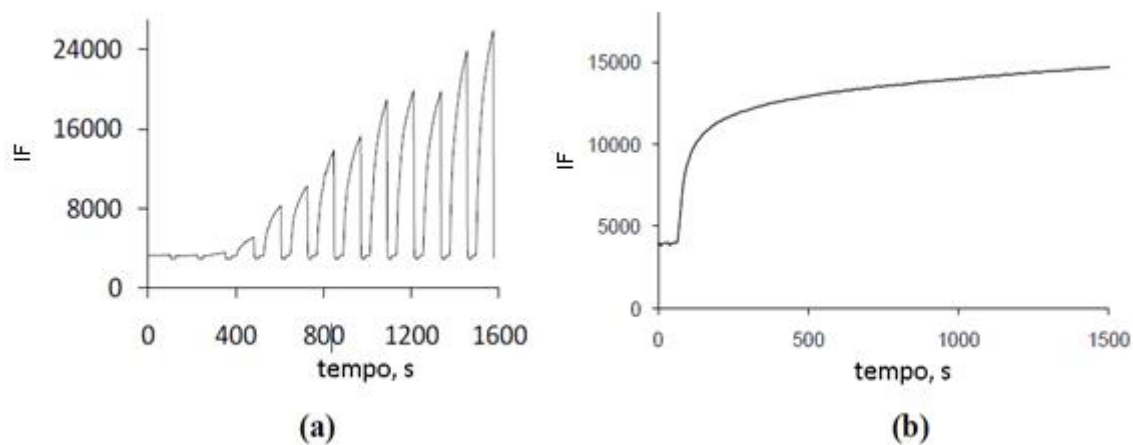


Figura 4.12 – Detecção do óxido nítrico pelo sensor fluoresceinamina reduzida. a) Resposta a diferentes concentrações crescentes de óxido nítrico produzido pela decomposição do nitrito em meio ácido e b) pela hidrólise da dietilamina NONOato de sódio, em função do tempo.

4.3.4. Análise de interferentes

No sentido de avaliar a possibilidade de haver interferência química no incremento da intensidade de fluorescência do sistema, comparou-se o desenvolvimento do sinal de fluorescência quando exposto à mesma quantidade (todas as soluções tinham uma concentração de $4 \cdot 10^{-4}$ mol/L) de diferentes analitos. As comparações foram realizadas com óxido nítrico, peróxido de hidrogénio, superóxido de potássio, ferro(II), hipoclorito de sódio e nitrito de sódio. A solução tampão fosfato, a pH 7,4, foi usada como branco e leu-se a resposta uma hora após a adição do analito. Para facilitar as comparações, a linha de base foi subtraída em todos os ensaios.

A resposta de todos estes analitos está condensada na Fig.4.13(a), onde se pode constatar que a resposta do óxido nítrico é superior aos interferentes estudados. O superóxido (cerca de 49 % da resposta do óxido nítrico) e o peróxido de hidrogénio (cerca de 38 % da resposta do óxido nítrico) apresentam maior interferência, enquanto o ferro(II) desenvolve só 10 % da intensidade de fluorescência da fluoresceinamina

reduzida. Todos os restantes analítos estudados apresentam uma interferência inferior a 5 % do sinal do óxido nítrico.

As amostras estiveram a incubar a 37° C durante uma hora, no entanto a resposta ao óxido nítrico é mais rápida, Fig4.13(b), em relação às espécies químicas interferentes, principalmente às mais interferentes, peróxido de hidrogénio e o superóxido de potássio, isto para iguais concentrações de todos os analitos. Nos primeiros minutos as respostas são parecidas, mas a resposta ao óxido nítrico tem um incremento superior. É esta característica que torna o sensor seletivo ao óxido nítrico. Então, podemos usar tempos de incubação inferiores a uma hora e usar este sistema sensor para monitorizar óxido nítrico em sistemas de análise em fluxo, por exemplo.

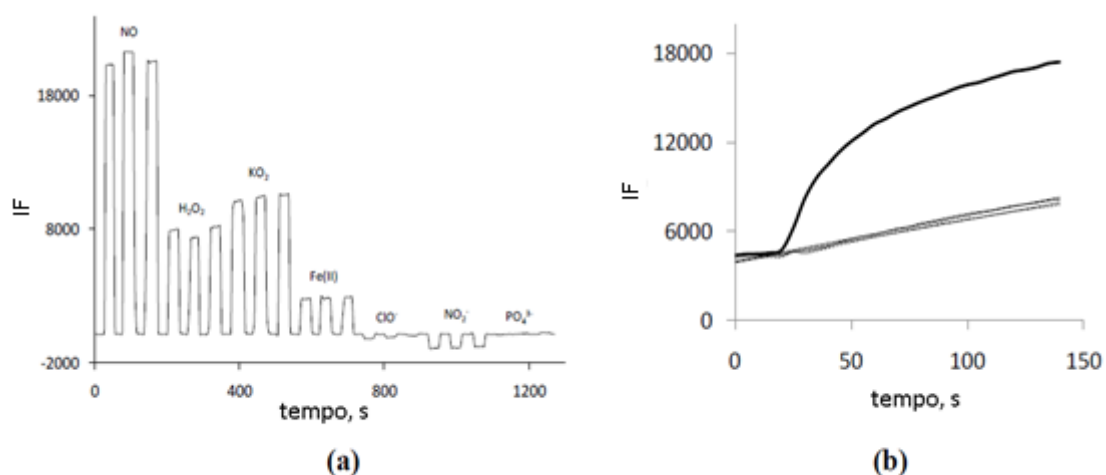


Figura 4.13 – Avaliação da interferência de outras espécies químicas. a) Igual concentração dos analítos e medidos três vezes. b) Evolução do sinal de fluorescência após adição do analíto sensor fluoresceína reduzida, óxido nítrico (linha grossa), peróxido de hidrogénio (tracejado) e superóxido de potássio (linha fina).

4.4. Conclusões

Foi proposto e avaliado um novo sensor para óxido nítrico, baseado na oxidação da fluoresceinamina reduzida na presença de cloreto de cobalto (II).

O seu baixo custo, a grande seletividade e a rapidez de resposta são as características que conferem grandes potencialidades deste sensor para técnicas de triagem.

Além disso, a versatilidade do sistema sensor pode permitir novos desenvolvimentos analíticos, por exemplo, imobilizar a fluoresceinamina reduzida numa matriz sólida; a imobilização do sensor na extremidade de uma fibra ótica para monitorização remota do óxido nítrico *in vivo*; ou, devido à simplicidade e reduzida dimensão do equipamento usado, usar o sensor em sistemas miniaturizados para sistemas portáteis ou acoplamento de medição em tempo real tipo sistema de fluxo.

4.5. Bibliografia

- [1] D. Yao, A. G. Vlessidis, N. P. Evmiridis, 2004, *Microchimica Acta*, 147, 1, 1-20.
- [2] M. M. Tarpey, D. A. Wink, M. B. Grisham, 2004, *American journal of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 286, R431-R444.
- [3] H. Kojima, M. Hirotani, N. Nakatsubo, K. Kikuya, Y. Urano, T. Higuchi, Y. Hirata, T. Nagano, 1998, *Analytical Chemistry*, 73, 1967-1973.
- [4] M. Schaferling, D. B. M. Grogel, S. Schreml, 2011, *Microchimica Acta*, 174, 1-18.
- [5] X. Chen, Z. Zhong, Z. Xu, L. Chen, Y. Wang, 2010, *Free Radical Research*, 44, 587-604.
- [6] H. Kojima, N. Nakatsubo, K. Kikuchi, S. Kawahara, Y. Kirino, H. Nagoshi, Y. Hirata, T. Nagano, 1998, *Analytical Chemistry*, 70, 2446-2453.
- [7] K. Setsukinai, Y. Urano, K. Kakinuma, H. J. Majima, T. Nagano, 2003, *the Journal of Biological Chemistry*, 278, 5, 3170-3175.
- [8] M. Wrona, K. Patel, P. Wardman, 2005, *Free Radical Biology and Medicine*, 38, 262-270.
- [9] M. G. Bonini, C. Rota, A. Tomasi, R. P. Mason, 2006, *Free Radical Biology and Medicine*, 40, 968-975.
- [10] R. Nakahara, S. Kashitani, K. Hayakawa, Y. Kitani, T. Yamaguchi, Y. Fujita, 2009, *Journal of Fluorescence*, 19, 769-775.
- [11] J. Basset, R. C. Denney, G. H. Jeffery, J. Mendham, 1981, *Vogel – Análise inorgânica Quantitativa*, 4ª Ed. Editora Guanabara, Rio de Janeiro, Brasil.
- [12] H. N. Kim, K. M. K. Swamy, J. yoon, 2011, *Tetrahedron Letters*, 52, 2340-2343.
- [13] J. Han, K. Burgess, 2010, *Chemical Reviews*, 110, 2709-2728.
- [14] S. M. Borisov, O. Wolfbeis, 2008, *Chemical Reviews*, 108, 423-461.
- [15] M. F. Marmor, J. G. Ravin, 2011, *Achieves of Ophthalmology*, 129, 7, 943-948.

- [16] T. Okuda, K. Kataoka, T. Yabuuchi, H. Yugami, A. Kato, 2010, *Journal of Clinical Neuroscience*, 17, 118-121.
- [17] A. Tazioli, 2011, *Hydrological Sciences Journal*, 57, 7, 1314-1324.
- [18] L. H. C. Chua, A. P. Robertson, W. K. Yee, E. B. Sguy, E. Y. M. Lo, T. T. Lim, S. K. Tan, 2007, *Ground Water*, 45, 1, 85-88.
- [19] K. Tanaka, T. Miura, N. Umezawa, Y. Urano, K. Kikuchi, T. Higuchi, T. Nagano, 2001, *Journal of the American Chemical Society*, 123, 2530-2536.
- [20] R. Sjoback, J. Nygren, M. Kubista, 1995, *Spectrochimica Acta Part A*, 51, L7-L21.
- [21] W. Sun, K. R. Gee, H. Klaubert, R. P. Hangland, 1997, *Journal of Organic Chemistry*, 62, 6469-6475.
- [22] X. Zhang, 2010, *Photochemical and Photobiological Sciences*, 9, 1261-1268.
- [23] H. Eshghi, N. Mirzaie, 2011, *Chemical Papers*, 65, 4, 504-509.
- [24] Y. Ueno, G. Jiao, K. Burgess, 2004, *Synthesis*, 15, 1591-1594.
- [25] V. S. Patil, V. S. Padalkar, K. R. Phatangare, V. D. Gupta, P. G. Umape, N. Sekar, 2012-03-14, *The Journal of Physical Chemistry*, 116, 536-545.
- [26] D. V. Samoilov, V. P. Martynova, A. V. El'tsov, 1999, *Russian Journal of General Chemistry*, 69, 9, 1450-1460.
- [27] C. Queirós, A. M. G. Silva, S. C. Lopes, G. Ivanova, P. Gameiro, M. Rangel, 2012, *Dyes and Pigments*, 93, 1447-1455.
- [28] X. Li, H. Ma, S. Dong, X. Duan, S. Liang, 2004, *Talanta*, 62, 367-371.
- [29] Y. Duan, W. Sun, M. Wang, S. Liu, Q. X. Li, 2009, *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, 6, 35-43.
- [30] R. M. McKinney, F. C. Churchill II, 1970, *Journal of the Chemical Society C: Organic*, 5, 654-656.
- [31] R. M. McKinney, J. T. Spillane, G. W. Pearce, 1962, *Journal of Organic Chemistry*, 27, 3986-3988.
- [32] H. Sigmund, W. Pfeleiderer, 2003, *Helvetica Chimica Acta*, 86, 2299-2334.
- [33] C. Munkholm, D. R. Parkinson, D. R. Walt, 1990, *Journal of the American Chemical Society*, 112, 2608-2612.
- [34] L. A. Saari, W. R. Seitz, 1982, *Analytical Chemistry*, 54, 821-823.

- [35] Z. Zhang, Y. Zhang, W. Ma, R. Russell, Z. M. Shakhsher, C. L. Grant, W. R. Seitz, D. C. Sundberg, 1989, *Analytical Chemistry*, 61, 202-205.
- [36] H. D. Duong, O. Sohn, H. T. Lam, J. I. Rhee, 2006, *Microchemical Journal*, 84, 50-55.
- [37] B. Kalyanaraman, V. Darley-Usmar, K. J. A. Davies, P. A. Dennery, H. J. Forman, M. B. Grisham, G. E. Mann, K. Moore, L. J. Roberts II, H. Ischiropoulos, 2012, *Free Radical Biology and Medicine*, 52, 1-6.
- [38] M. Hudlicky, 1984, *Reductions in Organic Chemistry*, Ellis Horwood Limited, New York, USA.
- [39] J. A. Hrabie, J. R. Klose, D. Wink, L. Keefer, 1993, *Journal of Organic Chemistry*, 58, 1472-1476.

5. Semicondutores nanocristalinos fluorescentes (Quantum dots)

5.1. Introdução

O rendimento quântico da maioria dos fluoróforos orgânicos usados como sensores de espécies reativas de oxigénio e/ou azoto é relativamente baixo, principalmente se se considerar as alterações químicas necessárias para os tornar sensores seletivos ou as modificações do meio onde estes vão operar, por exemplo processos de imobilização.

No intuito de procurar substâncias ou materiais com melhores propriedades foto-físicas, a atenção recaiu sobre uma tecnologia que apareceu há cerca de 30 anos – a nanotecnologia. Desde a aplicação a componentes para a eletrónica [1] até à utilização na química [2], encontra na área da biologia uma franca expansão nos últimos anos [3, 4].

Perante procedimentos à escala humana, por exemplo reatores com elevada capacidade, é possível controlar a composição química, o tamanho, a forma ou os centros reativos de entidades com dimensões submicroscópicas, pelo controlo de fatores como a temperatura, a pressão, a força iónica, o valor de pH ou a composição química do meio reacional [5]. Entre alguns comportamentos e características muito peculiares e inesperadas destas entidades, a propriedade fluorescência foi eleita para dar continuidade ao trabalho proposto.

As partículas de reduzida dimensão de cádmio/telúrio ou cádmio/selénio são as que detêm maior rendimento quântico conhecido [6], logo, são ótimas candidatas para serem quimicamente manipuladas (funcionalização) e posteriormente acopladas (imobilização) ao dispositivo miniaturizado, para as tonar sensores de espécies reativas de oxigênio e azoto. Além disso, e comparando com os corantes fluorescentes orgânicos, estas nanopartículas têm desvios de Stokes (distância entre o valor máximo do comprimento de onda de excitação e de emissão) que podem ter entre 300-400 nm, tempos de semi-vida 10 vezes inferiores e o espectro de emissão significativamente mais estreito. No entanto, esta largura de banda está diretamente relacionada com a pureza de tamanhos das nanopartículas (populações homogêneas originam larguras de banda mais estreitas) [7].

5.2. Nanocristais semicondutores

O quantum dot é uma estrutura física e quimicamente bem definida. Acredita tratar-se de uma organização cristalina, com uma quantidade muito pequena de um determinado material, vulgarmente um semicondutor, que devido a essas pequenas dimensões, na ordem dos nanómetros, apresenta comportamentos particulares e distintos do mesmo material com dimensões macroscópicas. Aparecem frequentemente associados a termos como nanocristais, nanopartículas, nanotubos ou nanoeletrónica, por exemplo, em que o prefixo nano (deriva do termo grego que significa anão) reporta que pelo menos uma das dimensões seja a unidade, dezena ou centena de nanómetro ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$) (Fig.5.1).

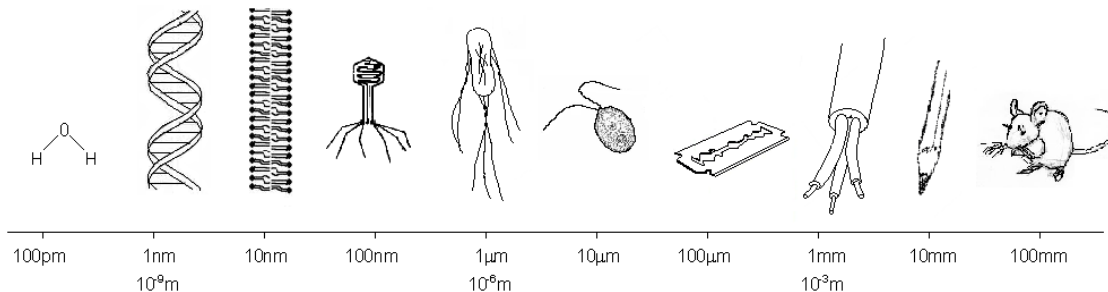


Figura 5.1 – Representação relativa das ordens de grandeza, desde o angstrom ao decímetro.

Os quantum dots são, por exemplo, cristais bimetálicos formados pelos elementos químicos da tabela periódica dos grupos IIB-VIA (por exemplo CdTe, CdSe, CdS ou ZnS) ou pelos grupos IIIA-VA (por exemplo InAs ou InP) [4], com apenas algumas centenas ou poucos milhares de átomos, dependendo do tamanho que varia entre a unidade até às dezenas de nanómetros.

5.2.1. Confinamento quântico

Os quantum dots têm a capacidade de absorver radiação eletromagnética, nomeadamente desde o ultravioleta afastado até ao infravermelho próximo. Ao contrário da maioria dos fluoróforos moleculares que apresentam uma banda estreita de absorção, estes absorvem em gamas muito alargadas de comprimentos de onda, por exemplo desde o ultravioleta afastado até ao visível [8].

Quando se excita eletronicamente uma nanopartícula, contrariamente ao que ocorre nos materiais macroscópicos em que a energia pode ser dissipada ao longo de toda a estrutura, as possibilidades de relaxamento dos eletrões são mais limitadas. Como tal, o eletrão excitado fica confinado ao reduzido volume da partícula (um volume “quântico”) e pode ser obrigado a reemitir uma quantidade de energia inferior, mas muito próxima da de excitação, chama-se a isto o confinamento quântico [3]. Esta é uma das principais teorias para explicar porque é que os quantum dots apresentam fluorescência (Fig.5.2).

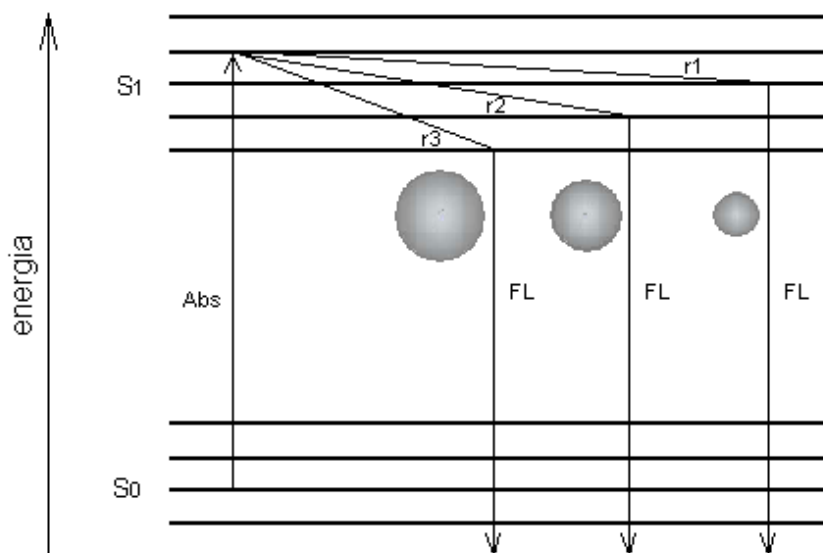


Figura 5.2 – Representação esquemática do possível mecanismo de fluorescência para os quantum dots baseado na dependência do confinamento quântico com o tamanho da partícula. Abs é a energia absorvida (de excitação), FL é a energia devolvida (a fluorescência), r_1 corresponde à dissipação da energia por conversão interna antes da emissão.

Adicionalmente explica, também, a dependência do comprimento de onda máximo de emissão com o tamanho da partícula, uma vez que quanto maior for a partícula, maior a possibilidade de relaxamento antes da emissão, logo, menor a energia emitida, ou seja, maior o comprimento de onda. No esquema da Fig.5.2 r_1 representa o relaxamento do quantum dot de menor dimensão, conseqüentemente com maior energia de emissão. À medida que o tamanho da partícula aumenta, r_2 e por fim r_3 , a emissão de energia luminosa diminui, ou seja, aumenta o comprimento de onda, respetivamente.

O confinamento quântico pode ser visto como uma possibilidade da matéria ser transparente à radiação eletromagnética. A concepção da teoria atômica, no início do século XX, teve na experiência de Rutherford um marco decisivo. As partículas alfa atravessam a folha de ouro porque a matéria é constituída essencialmente de espaços vazios. Quando na sua trajetória encontra um obstáculo, as partículas alfa são desviadas da sua trajetória retilínea [9]. Quanto maior for o número de partículas, ou seja, o número de camadas de átomos de ouro, maior a probabilidade de colisão e, conseqüentemente, a diminuição da quantidade de partículas alfa a incidirem no alvo em linha reta à fonte. No limite, há uma espessura a partir da qual o feixe de partículas alfa não é atravessado pela folha de ouro, a folha torna-se opaca.

O confinamento quântico pode ser visto como um conceito de opacidade. Suponhamos uma solução coloidal de nanopartículas. Existe um certo número de átomos que constituem os quantum dots abaixo do qual a radiação os atravessa sem sofrer alteração, isto é não encontra átomos no seu caminho. Com o aumento do tamanho, aumenta o número de átomos, logo, a probabilidade de interação da radiação eletromagnética com os átomos no interior do quantum dot aumenta. Isto implica que a energia luminosa pode sofrer relaxamento mas ainda assim conseguir ser reemitida, embora com menor energia.

Aumentar o tamanho dos quantum dots aumenta a dissipação da energia luminosa, logo aumenta o comprimento de onda. A partir de um determinado número de átomos, a energia que penetra na nanopartícula vai ser de tal modo dissipada que não pode ser reemitida na forma de radiação eletromagnética. Este é o tamanho a partir do qual os quantum dots deixam de ser percecionados como fluorescentes (Fig.5.3).

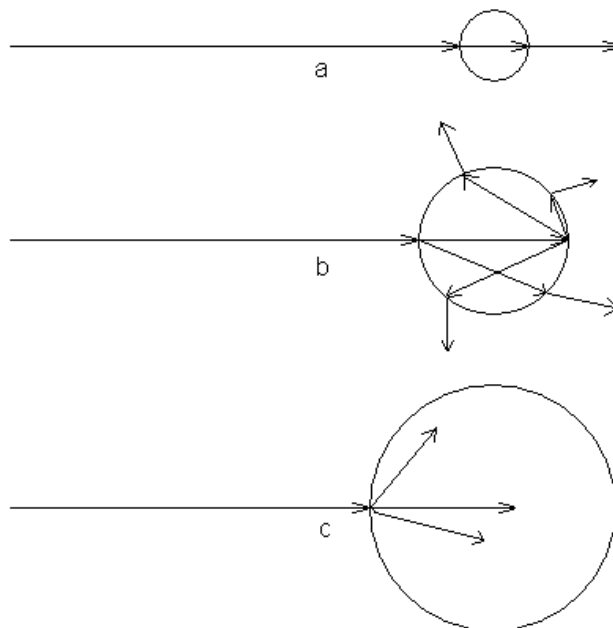


Figura 5.3 – Representação esquemática do confinamento quântico como permeabilidade à radiação. Pequeno quantum dot transparente ao feixe luminoso a) de maior dimensão com interação com a radiação (fluorescente) b) e quantum dot demasiado grande, completamente opaco c).

Os elementos que constituem o núcleo dos quantum dots definem a gama de absorção e emissão. Deste modo, e usando o conceito de engenharia molecular, é possível, através da seleção dos elementos que os constituem, bem como da manipulação do tamanho da nanopartícula, definir uma gama de absorção/emissão desde o ultravioleta afastado até ao infravermelho próximo [5,10].

5.2.2. Síntese aquosa de quantum dots

Tradicionalmente a síntese de quantum dots consistia numa reação de oxidação/redução entre um elemento do grupo IIB (por exemplo o cádmio na forma de catião bivalente) e um elemento calcogénio, do grupo VIA, como o selénio [11] e o telúrio [12] (ambos na forma de anião bivalente), no seio de um solvente orgânico, vulgarmente a trioctilfosfina ou o óxido de trioctilfosfina, a altas temperaturas.

A síntese organometálica pode ser baseada na termólise de precursores, formação prévia de compostos que contenham os átomos semicondutores na sua

estrutura e que por decomposição pirolítica formam os quantum dots [13, 14], ou por alcoólise, processo análogo ao da hidrólise em que em vez de água existe um álcool [15, 16]. No entanto, qualquer uma destas vias de síntese requer grande quantidade de energia, usa substâncias extremamente tóxicas quer para o ambiente quer para o operador e, embora produza quantum dots com elevado rendimento quântico, estes são muito instáveis, principalmente na presença de ar, e são praticamente insolúveis em água, comprometendo o seu uso em sistemas sensores em meios citoplasmáticos [17].

A síntese por via húmida vem solucionar alguns destes problemas. O excepcional controlo de tamanho (obtêm-se suspensões monodispersas, que se definem como um conjunto de partículas em suspensão cuja forma não varia mais do que 5% do desvio padrão da amostra [18]) e forma, é então conseguido sobre as nanopartículas, quer sejam produzidas diretamente sobre uma qualquer superfície (síntese epitaxial), quer sintetizadas no seio da solução aquosa (síntese coloidal) [8].

O processo de síntese aquosa é bastante mais simples, o que permite um maior e mais refinado controlo sobre as variáveis (composição química de todos os constituintes e, principalmente, temperaturas de operação mais baixas - a ebulição das soluções aquosas é à volta de 100°C). Resulta uma maior reprodutibilidade das nanopartículas e maior estabilidade. Por exemplo, face à exposição ao ar, é possível sintetizar quantum dots altamente especializados, com uma produção pouco poluente e em larga escala [19]. Este processo de síntese é também mais económico (estima-se que a síntese aquosa de quantum dots de cádmio/selénio seja 8 vezes mais económica que a via alcoólise). No entanto esta diferença é bem mais acentuada se se produzir quantum dots encarapuçados, por exemplo com um revestimento com um outro par semiconductor [8]. No entanto o grau de cristalização é inferior na síntese aquosa, porque a temperatura de trabalho é inferior às temperaturas típicas de recozimento (200 a 360°C).

A formação dos quantum dots pode ser vista e interpretada à luz da teoria da produção de hidrossóis monodispersos de LaMer e Dineger [20]. Há uma primeira fase caracterizada pela formação dos percussores das nanopartículas (i), que quando atinge a sobressaturação começa a dar-se a nucleação (ii) e por fim, estes núcleos podem continuar a crescer mesmo abaixo da saturação e podem mesmo entrar numa fase de coalescência ou de maturação (iii) (Fig.5.4).

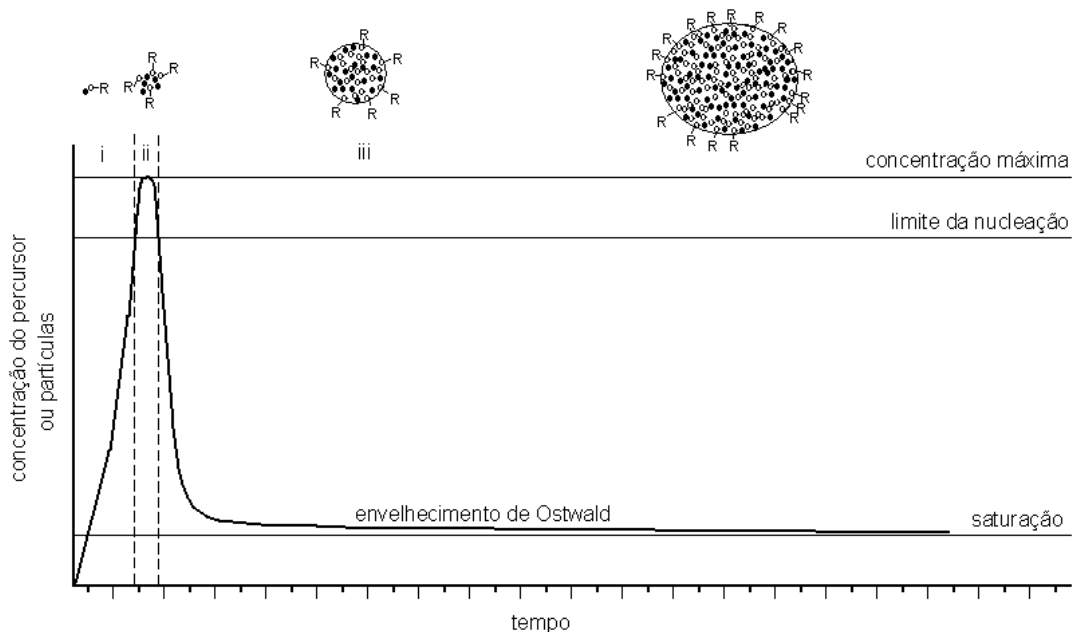


Figura 5.4 – Representação de um possível processo para a formação dos quantum dots. Adaptado de [21].

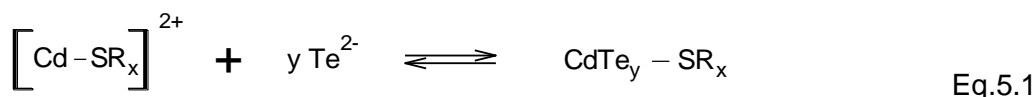
A síntese direta aquosa é um processo que usa equipamentos simples e reagentes de perigosidade reduzida em que é possível controlar a composição do meio reacional, assim como, as condições de reação (tempo de mistura dos reagentes [22], temperatura [23], desarejamento ou recobrimentos sucessivos [24], por exemplo). Consequentemente, é possível obter nanopartículas bastante monodispersas, com uma composição química bem definida, forma e tamanho bem determinado e com reduzida aglomeração. A síntese aquosa permite obter quantum dots com elevada qualidade a um custo significativamente reduzido.

A síntese aquosa tem início quando se adiciona o elemento calcogénio, na forma de anião aquoso ou se faz borbulhar uma corrente do respetivo hidreto gasoso a uma solução aquosa, devidamente desoxigenada, com o semiconductor na forma catiónica e na presença de um estabilizador (o catião encontra-se na forma de complexo) [25]. Dá-se início à fase i, Fig.5.4, com a formação rápida de pequenas estruturas com uma qualquer estequiometria, Eq.5.1, vulgarmente denominadas de precursores e, quase em simultâneo, inicia-se a agregação e formam-se as primeiras partículas com poucas dezenas de átomos.

Entende-se por agregação o fenómeno associado à formação de partículas, em que a sua origem está na associação de moléculas ou iões, e é distinta de

aglomeração que é a formação de partículas por junção de outras já existentes ou obtidas por redução de tamanho [26].

A formação do precursor, a nucleação, pode ser entendida como:



onde $\left[\text{Cd-SR}_x \right]^{2+}$ é o complexo do catião com o estabilizador SR_x , que reage com y aniões Te^{2-} , para originar o precursor $\text{CdTe}_y - \text{SR}_x$.

A função dos estabilizadores é fundamental na nucleação. Por um lado condiciona a disponibilidade do catião semiconductor (por sequestro do catião ou por estereoquímica do quelato formado, etc.). Por exemplo, a introdução de alcanos de cadeia longa, tensioativos ou polímeros, condiciona a forma das nanopartículas, que podem ser desde esferas simples, passando por cilindros, cubos ou até mesmo a formas estreladas. No entanto, estes estabilizadores de elevado peso molecular diminuem o rendimento quântico, a condutividade e/ou a atividade catalítica [27]. Por outro lado, as reações de formação dos complexos alteram o potencial de oxidação/redução do catião semiconductor [25].

Além do ligando e da conseqüente alteração do potencial de oxidação/redução do sistema, a razão quantitativa relativa entre os diferentes intervenientes é crucial no desenvolvimento da nucleação e, conseqüentemente, nas características dos quantum dots. Grandes quantidades relativas do elemento calcogénio torna os quantum dots suscetíveis de serem oxidados. Grandes quantidades relativas de ligando provocam um rápido crescimento das nanopartículas com superfícies irregulares e com baixa eficiência quântica. Estas relações estão também diretamente ligadas ao valor de pH do meio reacional. A concentração de hidrogénio condiciona as protólises, logo, influencia as diferentes formas químicas existentes em solução aquosa [28].

Com o rápido gasto dos reagentes e o precursor a atingir a saturação, dá-se início à segunda fase da formação dos quantum dots, fase ii, Fig.5.4. Nesta fase a agregação é o fenómeno predominante e permite à solução baixar a concentração de precursor formado. Obtêm-se desta forma partículas de maiores dimensões, cujo núcleo é constituído por átomos dos quantum dots e está rodeado por uma camada de moléculas orgânicas do estabilizador.

O crescimento das nanopartículas e o envelhecimento, ou maturação, de Ostwald são processos energeticamente favoráveis, fase iii, Fig.5.4. No entanto, esta fase é conduzida sob refluxo e pode durar alguns dias. Apesar da solução já se encontrar abaixo da saturação, os nanocristais vão continuar a crescer para diminuir as áreas superficiais obtendo assim maior estabilidade. Este fenómeno de absorção das partículas mais pequenas pelas de maior dimensão é um processo significativamente mais lento, de tal modo que as nanopartículas atingem um tamanho tal que a sua massa específica permita serem depositadas no fundo do reator, isto é, ocorre a precipitação.

5.2.3. Formação de quantum dots de cádmio/telúrio e cádmio/selénio

Os quantum dots de cádmio/telúrio (CdTe) e cádmio/selénio (CdSe) foram escolhidos por se encontrarem entre os que têm maiores rendimentos quânticos. Além disso, estes dois quantum dots podem emitir em toda a zona do visível: CdTe para comprimentos de onda de 600 até 725 nm [29] e CdSe para comprimentos de onda mais baixos de 470 a 625 nm [30]. Com a finalidade de serem usados como sensores ou de fazerem parte da estrutura do sensor que irá operar num meio citoplasmático, os quantum dots de CdTe e CdSe foram sintetizados em meio aquoso. Este processo de síntese origina nanopartículas com elevado grau de pureza, estruturas química e morfologicamente bem definidas e estáveis. Além disso, formam soluções coloidais, isto é, as partículas permanecem suspensas em solução [31, 32].

O estudo das proporções de cada um dos reagentes e das condições de reação ótimas, decorre de modo empírico. Consegue-se fazendo variar sistematicamente todas as gamas das diferentes variáveis e correlaciona-las com um determinado objetivo das nanopartículas [6].

Existem vários métodos de síntese aquosa, por exemplo a síntese assistida por micro-onda [33], sistema da micela [34] ou a técnica hidrotérmica com o uso de estabilizadores bifuncionais, concretamente a família dos ácidos tioalcanos. Esta última foi a escolhida por ser mais estável, menos tóxica e apresentar um custo mais reduzido quer sob o ponto de vista económico quer ambiental [31].

O estabilizador é uma molécula bifuncional. Normalmente deve ter um grupo tiol que se liga aos quantum dots, e um grupo carboxílico, que quando desprotonado lhe confere estabilidade coloidal por repulsão de cargas [5]. Além de passivar o núcleo do semiconductor, estas moléculas orgânicas são parte integrante e controladora do mecanismo de síntese [22].

Na tab.5.1 encontra-se uma pequena compilação bibliográfica, agrupada pelo ligando bifuncional, em que um dos grupos é o tiol, e com algumas características evidenciadas. A proporção entre os átomos de cádmio e o ligando é sempre superior a 1, encontrando-se o ligando frequentemente no dobro da quantidade do catião cádmio. A quantidade de telúrio é sempre inferior à do ligando, sendo 50 a 5% da quantidade total de cádmio, ou não é quantificado, quando é colocada uma corrente de telureto de hidrogénio a borbulhar na solução aquosa de cádmio/ligando. Em todos os estabilizadores com grupos funcionais carboxílicos, a síntese ocorre em meio fortemente alcalino enquanto a amina se processa em meio ácido.

Os estabilizadores escolhidos e usados para a síntese aquosa de CdTe e CdSe foram o ácido mercaptoacético (TGA – thioglycolic ácido) e o ácido 3-mercaptopropiónico (MPA – mercaptopropionic ácido) (Fig.5.5). Estes poderosos agentes quelantes têm dois grupos funcionais que podem sofrer duas desprotonações, no grupo carboxílico e no grupo tiol, estão dependentes do valor de pH do meio. Em solução aquosa com valores de pH superiores a 7, em ambos os estabilizadores, os grupos carboxílicos estão completamente desprotonados, favorecendo a formação dos respetivos complexos com o catião cádmio com várias relações estequiométricas.

Relativamente ao TGA predomina a estequiometria 1:1 e 1:2 (cádmio:TGA) para valores de pH entre 4,8 e 6,0. Esta relação passa para 1:3 em condições de valores de pH superiores a 10,7 [51]. A estrutura predominante para o estabilizador MPA é de 1:1 e 1:2 (cádmio:MPA) em torno do valor de pH neutro [52]. No geral, os complexos formados têm estruturas cíclicas com o MPA, os dois grupos ligam-se ao catião metálico (Fig.5.6) enquanto com o TGA só liga o grupo tiol, estrutura aberta idêntica ao cádmio:MPA, Fig.5.6 [50, 52, 53].

Tabela 5.1– Resumo de algumas condições de sínteses aquosas de CdTe agrupadas de acordo com o ligando bifuncional utilizado. Apresentam-se apenas ligandos que contêm grupo tiol.

Ligando	Cd:L:Te	pH	Especificações	Ref.
Ácido mercaptoacético	1:1,8:0,25	9,0	Q 9-aminoacridina	35
	1:2,4:0,2	9,0		36
	1:2,42:0,46	11,6	Síntese otimizada a 140°C	37
	1:2,4:0,2		Recozimento a 160 e 180°C	38
	1:1,2:0,45	9,0	Recozimento autoclave	39
	1:2,43:0,47	11,4	Purificação por diálise	40
	1:1,5:borb	11,2	Purificação por 2-propanol	41
	1:2,4:borb	11,6	São negativos	12
	1:1,3:0,46	11,8	São negativos	42
	1:1:0,124	8,2	Revestidos a Cd/S	43
	1:2,5:0,5		Purificação por diálise	44
	1:1,2:borb	11,5		45
	1:5:0,05	9,0		46
N-N'- dimetilaminoetanotiol	1:2,4:0,25	6,0	Q antraquinona-1-sulfonato	35
	1:2,4:borb	5,5	São positivos	12
	1:3:0,46	5,0	São positivos	42
	1:2,5:0,46	5,0	Passivados L-cisteína	47
L-cisteína	1:2,4:0,2	9,0		36
	1:2,4:borb	11,6	São negativos ou positivos	12
	1:2,5:0,5		Purificação por diálise	44
	1:3:0,5	9,0		46
Glutathiona	1:2,4:0,2	9,0		36
	1:2,5:0,5		Purificação por diálise	44
Ácido 3- mercaptopropiónico	1:1,2:0,45	9,0	Recozimento autoclave	39
	1:2,4:0,5	8,1		24
	1:2,4:0,5	8,1		6
2-mercaptoetanol	1:2,4:borb	11,6	São negativos (pH alcalino)	12
	1:5:0,05	9,0		46
	1:2,42:0,23	11,2	A 25°C	48
	1:2,42:0,46	11,2	A 96°C	48
Tioglicerol	1:2,4:borb	11,6	São negativos (pH alcalino)	12
	1:2,42:0,46	11,2	A 96°C	48
	1:2,42:0,46	11,2	Precipitação 2-propanol	49
tioglicerol:2,3-mercapto- 1-propanol (1:1)	1:2,4:borb	11,6	São negativos (pH alcalino)	12

Q- extinção da fluorescência quando na presença de.

borb adição de telureto na forma de gás, H₂Te.



Figura 5.5 – Estrutura química do ácido mercaptoacético (TGA) e do ácido 3-mercaptopropiónico (MPA) com os respetivos valores da constante de dissociação [50].

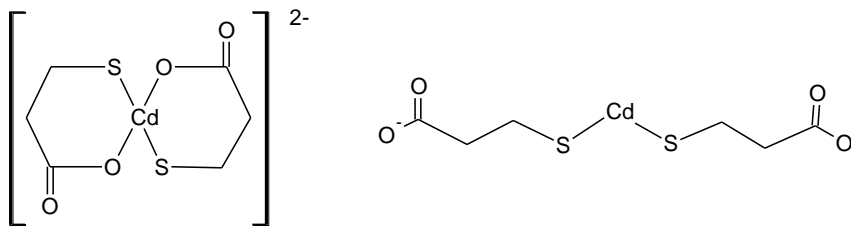
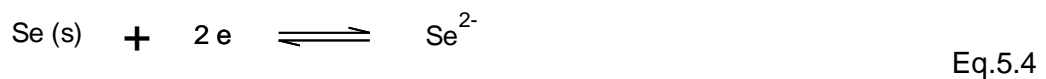


Figura 5.6 – Estrutura do complexo cádmio:MPA com estequiometria de 1:2, cíclica (esquerda) e aberta (direita). Adaptado de [50, 52].

Poder-se-ia pensar numa reação de oxidação/redução entre o catião cádmio e o anião telureto:



O potencial da semi-pilha de redução em condições normais é -0,4030 V, -1,143 V e 0,924 V, para o cádmio, telúrio e selénio, respetivamente [54]. Em condições normais e atividades unitárias, o potencial de oxidação/redução da pilha cádmio/telúrio é 0,740 V e da pilha cádmio/selénio 0,521 V. Logo as reações espontâneas produziriam cádmio e telúrio metálicos e cádmio e selénio, também, metálicos, respetivamente.

Segundo o Princípio de Le Chatelier, a inclusão de um agente complexante vai competir com o catião cádmio reduzindo os respectivos potenciais das pilhas. No entanto, o resultado da reação entre o anião telureto ou seleneto vai ocorrer com os complexos de cádmio e o seu produto final é uma liga metálica. Além disso, as moléculas dos estabilizadores fazem parte da constituição do produto de reação (Eq.5.1).

Têm sido propostos alguns mecanismos para a síntese aquosa de quantum dots. A formação dos complexos de cádmio/tiocarboxilatos é uma etapa que poderá não suscitar dúvidas no que diz respeito às relações estequiométricas, fortemente dependentes das proporções iniciais do catião e do complexante e do valor de pH do meio [55]. No entanto, o processo de oxidação/redução para a obtenção dos núcleos de CdTe e CdSe é um exercício que necessita, ainda, de muita fundamentação experimental.

Voloshchuk *et al* descreve o sistema de CdTe em água na forma de Diagrama de Pourbaix, tendo em conta apenas os potenciais de redução normais dos aquohidroxocomplexos de cádmio e telúrio (Fig.5.7). Nos sistemas com valores de potencial normal de redução inferiores a cerca de 0,1 V e superiores a -1,4 V, existem valores de pH do meio em que é possível sintetizar e obter, de uma forma estável, semicondutores de CdTe [56].

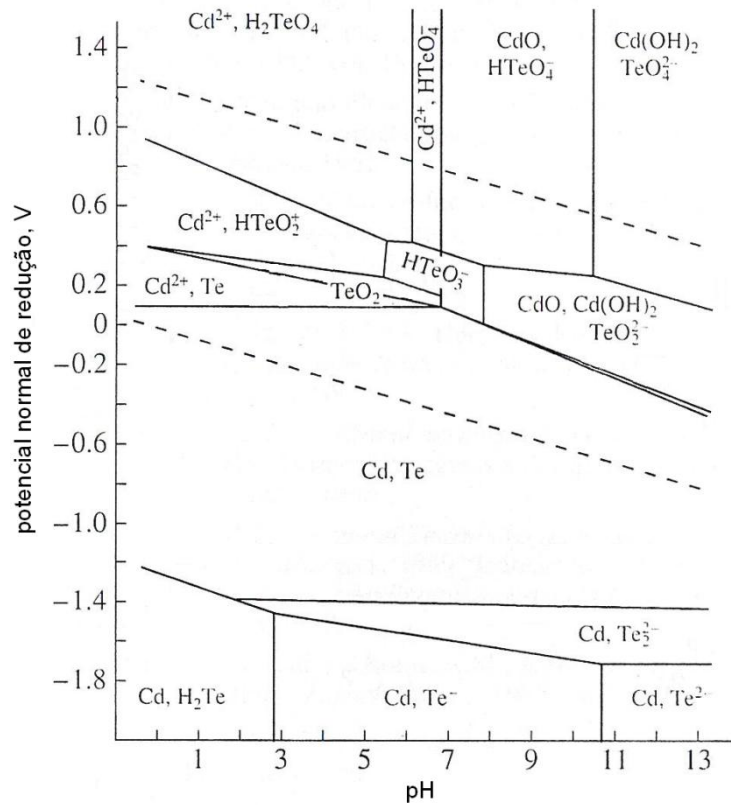


Figura 5.7 – Diagrama de Pourbaix para o sistema CdTe-água. Adaptado de [56].

Este sistema torna-se significativamente mais complexo se se adicionarem os estabilizadores dos quantum dots, porque aumenta o número de espécies químicas presentes assim como as suas possíveis interações [57].

5.2.4. Recobrimento dos quantum dots

Após a obtenção dos quantos dots é importante garantir que as suas características se mantêm ao longo do tempo. Já foi referida a importância dos estabilizadores na síntese, no entanto, os quantum dots são formados por uma camada externa desses mesmos estabilizadores conferindo-lhes estabilidade.

Nos estabilizadores bifuncionais, o enxofre liga-se aos quantum dots ficando outro grupo funcional exposto ao meio. Por exemplo, os quantum dots tiocarboxilados, são obtidos em meio alcalino e originam nanopartículas negativas (grupo carboxílico

desprotonado). Por outro lado, quando os estabilizadores têm grupos amina, os quantum dots são sintetizados em meio ácido e ficam positivos [12]. A existência de cargas na sua superfície faz com que haja repulsão entre as nanopartículas e origina verdadeiras soluções coloidais ou, então, atraem-se e, por coalescência ou agregação, crescem e precipitam. Além disso, a camada externa evita o contacto de espécies químicas existentes no meio com os quantum dots. Por exemplo, evita a oxidação degradativa dos átomos de telúrio com a consequente extinção da fluorescência.

O sucesso da síntese de quantum dots de calcogénios com estabilizadores tiolados, prende-se à ideia de que na camada exterior existe enxofre na sua composição, ou mesmo, que se forma uma camada externa constituída por cádmio e enxofre, CdS [58]. O enxofre provém da termólise do estabilizador.

A formação de uma camada externa em toda a extensão da nanopartícula, denominada de aplicação de uma cápsula, ou seja, encapsulamento, não só protege o núcleo, com também melhora as propriedades fotofísicas, como a diminuição da banda de emissão ou aumento da intensidade luminosa, em virtude de colmatar possíveis defeitos de superfície [30]. Adotou-se como nomenclatura para os quantum dots, primeiro definir o núcleo e só depois a constituição da cápsula, por exemplo, quantum dots de cádmio e telúrio revestidos a cádmio e enxofre são representados por núcleo/cápsula: CdTe/CdS.

Experimentalmente, a adição de um encapsulamento aos quantum dots é realizada em duas etapas: primeiro sintetiza-se o núcleo e depois, ou se adicionam os reagentes para promover a formação da cápsula [43, 59], ou, após purificação dos núcleos, recobrem-se os quantum dots numa nova etapa. É vulgar recorrer-se a núcleos hidrofóbicos obtidos por síntese orgânica, por terem melhores propriedades fotofísicas e, posteriormente, proceder ao encapsulamento em fase aquosa.

5.2.5. Funcionalização

Pretende-se usar os quantum dots como parte do sistema sensor para as espécies reativas de oxigénio e azoto. A funcionalização consiste na engenharia molecular da superfície dos quantum dots, ou seja, em alterar a composição química e

constituição dessa camada, de modo a este poder reagir com um determinado analito e provocar uma alteração mensurável nas propriedades fotofísicas dos quantum dots.

O sistema sensor deve ter o quantum dot capaz de desenvolver um bom rendimento quântico na sua superfície de um modo quimicamente estável, isto é, deve estar ancorado numa molécula que tem um corpo, preferencialmente que confira solubilidade ao sistema, no qual está acoplado o grupo funcional, Fig.5.8. A transferência ou a influência de energia, entre o grupo funcional e o quantum dot, encontra no mecanismo de transferência de energia de ressonância de Forster o exemplo mais usado e melhor compreendido [60, 61]. De todos os fatores, a distância entre o quantum dot e o grupo funcional e o modo como o segmento hidrofílico conduz a energia, são os mais importantes.

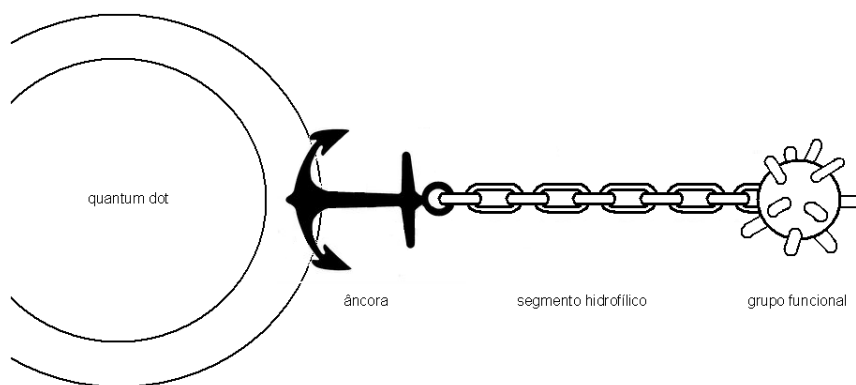


Figura 5.8 – Diagrama da estrutura molecular para um sistema sensor com quantum dots na sua composição. Adaptado de [60, 62].

Existem três estratégias para construir os sistemas sensores com quantum dots obtidos por via húmida: síntese direta, permuta de ligandos e o encapsulamento com uma molécula ou um conjunto de moléculas com grupos funcionais.

A camada superficial que envolve os quantum dots, pode já conter o grupo funcional. Neste caso, utiliza-se a síntese direta que consiste na simples preparação e purificação dos quantum dots, economiza-se tempo e recursos, assim como a degradação das características fotofísicas provocadas pelas diferentes operações, para de seguida serem usados como sistemas sensores [59].

Nem sempre é possível conseguir que o segundo grupo funcional dos estabilizadores (o grupo que confere solubilidade durante a síntese das nanopartículas) seja simultaneamente funcional para o analito. Então, recorre-se à permuta de ligandos que consiste na substituição do estabilizador por um outro. Este novo ligante deve ter uma parte capaz de se ligar ao quantum dot, sendo os mais descritos na literatura os ácidos carboxílicos ou aminas. No entanto os grupos tióis são os que melhores resultados originam devido à sua afinidade para o cádmio e o zinco [62], e por fazerem na outra extremidade o grupo funcional sensor. Muitas vezes, esta substituição pode ser realizada com moléculas de dimensão superior aos estabilizadores originais, como por exemplo, com polietileno glicol modificado com tióis, obtendo-se assim partículas mais estáveis às variações do valor do pH do meio [63]. Como a substituição do ligando vem quase sempre acompanhada de uma diminuição da intensidade de fluorescência, constatou-se que, após purificação dos quantum dots, era possível criar uma nova camada de um outro par semiconductor com o novo ligando, ou seja, substituir a camada externa do ligando e, simultaneamente, aumentar-se a estabilidade da nanopartícula [43, 64, 65].

Por fim, temos o encapsulamento da nanopartícula por um conjunto de moléculas com grupos funcionais sensores que é adicionado à nanopartícula já passivada. O encapsulamento vem sempre acompanhado de uma maior estabilidade do quantum dot, no entanto, este aumento da distância entre a entidade fluorescente e o grupo funcional pode inviabilizar o seu uso. Um dos processos mais antigo, e mais usado, é o recurso a um encapsulamento com sílica, que consiste na formação de uma rede robusta de siloxano por hidrólise e condensação de silanos. Este pode incorporar moléculas com grupos funcionais, originando nanopartículas bastante resistentes às variações do valor de pH, boa solubilidade nos meios citoplasmáticos, propriedades fotofísicas e com toxicidades reduzidas [66]. O recurso a cadeias longas anfifílicas (estruturas com extremidade hidrofílica oposta a uma hidrofóbica) permite criar um micélio a envolver o quantum dot, tornando-o mais estável, não tóxico, sem perder significativamente as suas propriedades [67, 68]. O acoplamento químico é uma prática frequente, por exemplo, promover ligação covalente entre uma amina e um ácido carboxílico através do uso de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida [62], ou a formação de uma hidrazona pela reação entre uma hidrazina e um aldeído na presença de anilina [69]. No entanto, os promotores do acoplamento covalente adicionados sempre em grande excesso, produzem, muitas vezes, intermediários indesejados, além de poderem reagir indiscriminadamente com os grupos existentes - reações cruzadas. Consequentemente estes procedimentos não são eficientes.

5.3. Procedimento experimental

5.3.1. Reagentes

O borohidreto de sódio, cloreto de cádmio, ácido mercaprossuccínico, ácido 3-mercaptopropiónico, ácido mercaptoacético, acetato de cádmio dihidratado, glutatona reduzida, trielilamida, diclorometano deuterado, 4,5-diamino-6-hidroxi-2-mercaptopiridina, ácido 11-mercaptopundecanóico, ácido acetilmercaptohexanóico, sarcosina, sulfureto de carbono, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida, N-hidroxissuccinimida, N,N'-d ciclohexilcarbodiimida, N,N'-diisopropilcarbodiimida, 4-(dimetilamino)piridina, fluoresceinamina, rodamina 6G e nicotinamina, foram obtidos da Sigma-Aldrich Química S.A. (Espanha). O telúrio metálico em pó, selénio metálico em pó, tiosulfato de sódio, álcool etílico 95%, pastilhas de hidróxido de sódio, ácido clorídrico 37%, nitrato de zinco, 8-hidroxiquinolina, ácido clorossulfónico, cloreto de estanho(II) dihidratado, metanol, anidrido acético, diclorometano, hidrogenossulfato de sódio anidro, amoníaco concentrado, etanol 95%, cloreto de sódio, cloreto de potássio, hidrogenofosfato de sódio, dihidrogenofosfato de potássio, sulfato de ferro(II) e cloreto de ferro(III) foram adquiridos à Merck (Alemanha). A água desionizada com resistividade superior a 4 MΩ/cm.

5.3.2. Síntese aquosa de quantum dots

Os vários quantum dots de cádmio/telúrio, CdTe, e de cádmio/selénio, CdSe, com diferentes ligandos, foram sintetizados de acordo com as referências [6] para os de telúrio e [70] para os de selénio.

Os quantum dots de CdTe com diferentes estabilizadores foram obtidos a dois valores de pH diferentes: pH 6,5 para o caso do ácido mercaptossuccínico e

mercaptopropiónico e pH 11 para o ligando ácido mercaptoacético. Usou-se este valor de pH alcalino para sintetizar CdTe com todos os outros ligandos e manteve-se a relação cádmio:ligando:telúrio de 1:2,4:0,5.

5.3.2.1. Solução aquosa de telureto

Pesaram-se 50 mg de borohidreto de sódio para um tubo de plástico, com cerca de 1 cm de diâmetro e 5 cm de comprimento, cuja tampa tem dois furos com dois tubos embutidos, um para ligar à corrente de azoto e o outro para aliviar a pressão dentro do tubo. Adicionaram-se 80 mg de telúrio metálico em pó ($6,3 \cdot 10^{-4}$ moles), colocou-se uma barra magnética no interior e juntou-se 2 mL de água desionizada. Rolhou-se o tubo e colocou-se a agitar, normalmente, de um dia para o outro.

5.3.2.2. Solução aquosa de selenossulfato

Pesaram-se 5,9 mg de selénio metálico ($7,5 \cdot 10^{-5}$ moles) em pó para um balão de 25 mL de fundo redondo com tubuladura simples esmerilado, adicionaram-se 59 mg de tiosulfato de sódio e dissolveu-se tudo em 4 mL de água desionizada. Aqueceu-se a cerca de 80° C, durante 5 horas, e deixou-se arrefecer ao abrigo do ar.

5.3.2.3. Síntese de CdTe estabilizados com ácido 3-mercaptopossuccínico ou mercaptopropiónico

Dissolveram-se 230 mg de cloreto de cádmio ($1,25 \cdot 10^{-3}$ moles) em 400 mL de água desionizada que já continha 452 mg de ácido mercaptopossuccínico ($3 \cdot 10^{-3}$ moles) ou, em alternativa 0,388 mL de ácido 3-mercaptopropiónico ($3 \cdot 10^{-3}$ moles), num balão de fundo redondo de 500 mL com tubuladura esmerilada. Ajustou-se o valor de pH a

6,5 com solução aquosa de hidróxido de sódio 1 mol/L, 0,1 mol/L ou 0,01 mol/L, conforme necessário, e fez-se passar pela solução aquosa uma corrente de azoto pelo menos durante 30 min, ao fim dos quais se adicionou o sobrenadante da solução aquosa de telureto na completa ausência de ar. Aqueceu-se à ebulição, ainda com a corrente de azoto, e manteve-se em refluxo até ao comprimento de onda de emissão desejado (a medição da fluorescência é feita na solução devidamente arrefecida à temperatura ambiente). Concentrou-se no evaporador rotativo cerca de 10 vezes, e adicionou-se igual volume de etanol e centrifugou-se. O sólido obtido secou-se no liofilizador até se encontrar com a aparência de pó solto.

5.3.2.4. Síntese de CdTe estabilizados com ácido mercaptoacético

Dissolvam-se 230 mg de cloreto de cádmio ($1,25 \cdot 10^{-3}$ moles) em 400 mL de água -desionizada que já continha 0,420 mL de ácido mercaptoacético ($3 \cdot 10^{-3}$ moles), num balão de fundo redondo de 500 mL com tubuladura esmerilada. Ajustou-se ao valor de pH 11 com solução aquosa de hidróxido de sódio 1 mol/L, 0,1 mol/L ou 0,01 mol/L, conforme necessário, e fez-se passar uma corrente de azoto pelo menos 30 min, ao fim dos quais se adicionou o sobrenadante da solução aquosa de telureto na completa ausência de ar. Aqueceu-se à ebulição, ainda com a corrente de azoto, e manteve-se em refluxo até ao comprimento de onda de emissão desejado. Concentrou-se e secou-se o sólido como em 5.3.2.3.

5.3.2.5. Síntese de CdSe estabilizados com ácido 3-mercaptopropiónico

Dissolveram-se 192 mg de acetato de cádmio ($7,2 \cdot 10^{-4}$ moles) em 144 mL de água desionizada que já continha 0,131 mL de ácido 3-mercaptopropiónico ($1 \cdot 10^{-3}$ mole), num balão de fundo redondo de 250 mL com tubuladura esmerilada. Ajustou-se ao valor de pH 9,3 com solução aquosa de hidróxido de sódio 1 mol/L,

0,1 mol/L ou 0,01 mol/L, conforme necessário, e fez-se passar uma corrente de azoto pelo menos 30 min, ao fim dos quais se adicionou 3,87 mL de solução aquosa de selenossulfato na completa ausência de ar. Aqueceu-se à ebulição, ainda com a corrente de azoto, e manteve-se em refluxo até ao comprimento de onda de emissão desejado. Concentrou-se e secou-se o sólido como em 5.3.2.3.

5.3.2.6. Síntese de CdTe recobertos com Zn/S em glutaciona

Dissolveram-se 72,5 mg de glutaciona reduzida em 5,2 mL de solução aquosa de nitrato de zinco 0,0096 mol/L. Adicionou-se água desionizada até a um volume final de 45 mL e ajustou-se o valor de pH da solução resultante a 6,5. Fez-se passar uma corrente de azoto durante 30 minutos e juntaram-se 32 mg de CdTe estabilizado com ácido mercaptossuccínico. Aqueceu-se a mistura até à ebulição e deixou-se em refluxo durante 1,5 hora. Concentrou-se e secou-se o sólido como em 5.3.2.3.

5.3.3. Síntese de CdTe estabilizados com derivados da hidroxiquinolina

Sintetizou-se vários derivados da hidroxiquinolina mercaptados com a intenção de os usar como estabilizadores na produção de quantum dots. A síntese do 5-mercapto-8-hidroxiquinolina por várias vias, foi levado a cabo pela Vanessa Guimarães [71], e do derivado com radical mercapto numa cadeia longa, 7-oxo-6-sulfanil-octa-N-5-5(8-hidroxiquinolina) amina, pelo Nuno Barbosa e Nuno Almeida [72] (Fig.5.9). No entanto, a via sulfonação/redução, adaptada de Bankovskis *et al*, foi a via utilizada [73]. Experimentaram-se todos os novos tióis sintetizados na síntese de CdTe segundo o procedimento 5.3.2.3 – Síntese de CdTe estabilizados com ácido mercaptossuccínico ou ácido mercaptopropiónico, sempre com as proporções molares de Cd:ligando:Te de 1:2,4:0,5.

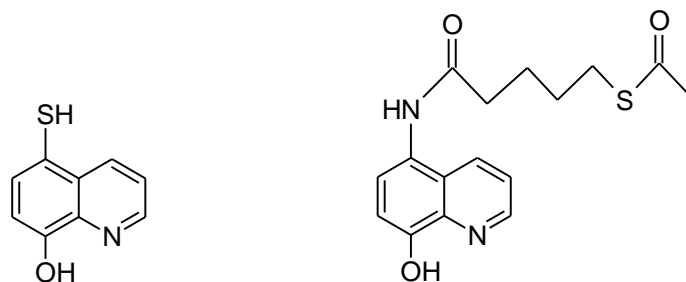


Figura 5.9 – Estruturas de derivados da 8-hidroxiquinolina: 5-mercapto-8-hidroxiquinolina (esquerda) e derivado com radical de cadeia longa, 7-oxo-6-sulfanil-octa-N-5-(8-hidroxiquinolina) amida (direita).

Pesaram-se 7,6 g de 8-hidroxiquinolina e dissolveram-se em 50 mL de ácido clorossulfônico num balão de fundo redondo e tubuladura simples esmerilada, previamente arrefecido em banho de gelo e com agitação magnética. Quando terminou a emanação de vapores de cloreto de hidrogénio, deixou-se a mistura repousar durante 17 horas. Arrefeceu-se o balão com banho de gelo e diluiu-se com cerca de 700 mL de água desionizada gelada, filtrou-se o precipitado formado e lavou-se com cerca de 25 mL de água desionizada gelada. Tornou-se a suspender o precipitado com 45 mL de ácido clorídrico concentrado e adicionou-se uma solução aquosa que continha 35 g de cloreto de estanho(II) dissolvidos em 40 mL de ácido clorídrico concentrado. Deixou-se a reação ocorrer cerca de uma hora à temperatura ambiente e com agitação vigorosa. Filtrou-se e lavou-se o precipitado com ácido clorídrico concentrado, transferiu-se para um balão de fundo redondo com tubuladura simples esmerilada de 100 mL, lavou-se à securo o precipitado 3 vezes, com cerca de 50 mL de metanol de cada vez, num evaporador rotativo.

Para um balão de fundo redondo com tubuladura simples esmerilada de 1 L, colocou-se o precipitado laranja obtido anteriormente, adicionou-se 50 mL de diclorometano, 14,66 mL de trietilamina, 22,1 mL de anidrido acético e deixou-se a reagir durante 12 horas na presença de uma atmosfera de argón. Adicionaram-se 250 g de gelo e 300 mL de diclorometano. Transferiu-se para um funil de decantação e separaram-se as fases. Extraíu-se mais 4 vezes com 300 mL de diclorometano de cada vez. Secou-se a fase orgânica com hidrogenossulfato de sódio anidro, filtrou-se e levou-se à securo num evaporador rotativo.

Foram realizados estudos de RMN em diclorometano deuterado.

5.3.4. Síntese de CdTe estabilizados com outros ligandos

Sintetizaram-se vários CdTe com diferentes ligandos, para além dos já mencionados, experimentou-se também: 8-hidroxiquinolina, 4,5-diamino-6-hidroxi-2-mercaptopiridina, ácido 11-mercaptoundecanóico, ácido acetilmercaptohexanóico e o N-(ditiocarboxy)sarcosina de diamónio (obtida pela reação de 10 g de sarcosina com 12 mL de sulfureto de carbono em 30 mL de etanol com 26 mL de amoníaco. Filtrou-se o sólido branco obtido). Os procedimentos foram os mesmos do ponto 5.3.2.3 – Síntese de CdTe estabilizados com ácido mercaptossuccínico ou ácido mercaptopropiónico para valores de pH próximos de 7 e 5.3.2.4 – Síntese de CdTe estabilizados com ácido mercaptoacético para valores de pH francamente alcalinos.

5.3.5. Funcionalização de CdTe

Os quantum dots usados para a funcionalização foram os de CdTe estabilizados com ácido mercaptossuccínico, mercaptopropiónico e mercaptoacético, e os de CdSe estabilizados com ácido mercaptoacético, devidamente purificados e liofilizados. No sentido de estudar e compreender o funcionamento da funcionalização, foram testados alguns compostos com suposta capacidade de estabilização das nanopartículas, mas nem sempre com capacidade sensor para as espécies reativas de oxigénio e azoto.

Todo o procedimento foi realizado em solução tampão fosfato salino ao valor de pH 7,4. Esta solução tampão obteve-se por dissolução e diluição ao volume final de 1 L de 8,00 g de cloreto de sódio, 0,20g de cloreto de potássio, 1,44 g de hidrogenofosfato de sódio e 0,24 g de dihidrogenofosfato de potássio, imediatamente antes de perfazer o volume final ajustou-se o valor de pH para 7,4.

Num eppendorf de 2 mL colocou-se 1 mL de solução de quantum dots 1 mg/mL com 0,250 mL de solução contendo 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida e N-hidroxissuccinimida 34 e $25 \cdot 10^{-3}$ mol/L, respetivamente, agitou-se durante 30 minutos e adicionou-se 0,500 mL de molécula sensor para funcionalizar, com concentração cerca de $2 \cdot 10^{-3}$ mol/L. Deixou-se o eppendorf em agitação durante uma hora e por fim

centrifugou-se a suspensão obtida. Ressuspendeu-se o sólido obtido com tampão fosfato pH 7,4 e mediu-se a intensidade de fluorescência.

Experimentou-se o mesmo procedimento para o ativador N,N'-diisopropilcarbodiimida, também com a concentração de $34 \cdot 10^{-3}$ mol/L e o conjunto ativador N,N'-dicitohexilcarbodiimida e 4-(dimetilamino)piridina às mesmas concentrações do primeiro, ou seja 34 e 25 mmol/L, respetivamente.

As substâncias utilizadas para funcionalizar as nanopartículas usadas neste procedimento foram: os complexos tri(N-(ditiocarboxy)sarcosina)ferrato, triclortrinicotinaminaferrato e o diclorodinicotinaminaferrico e, as moléculas nicotinamina, fluoresceinamina e rodamina 6G.

5.3.6. Instrumentação

As medições de fluorescência dos quantum dots suspensos em solução aquosa, foram realizadas no fluorímetro constituído por um detetor USB4000 com grating de 350 a 1100 nm, acoplado a um suporte CUV-ALL-UV de 4 vias para cuvetes de 10 mm, através de uma fibra ótica P600-025-UV-Vis, todos estes componentes são oriundos da OceanOptics. A radiação produzida por LEDs de alto brilho da Roithner Lasertechnik, com diferentes comprimentos de onda máximos, foram estabilizados com uma fonte de alimentação elétrica descrita da secção Instrumentação. A radiação de excitação foi conduzida por uma fibra de vidro com 1 mm de diâmetro de núcleo revestida a plástico preto.

A análise morfológica, por microscopia de varrimento eletrónico e a microanálise elementar, por espetrometria de dispersão de energia de raio-X, foram realizados num FEI Quanta 400FEG E SEM EDAX Genesis X4M.

5.4. Resultados

Otimizaram-se os diferentes processos de síntese de modo a obter nanopartículas com características definidas e estáveis, quer a nível de utilização quer no ambiente de utilização ao longo do tempo.

Os quantum dots de cádmio telúrio estabilizados com ácido mercaptoacético foram os que apresentavam melhores características para serem usados como base fluorescente do sensor. Após síntese e purificação, apresentam suspensões límpidas em solução tampão fosfato/hidrogenofosfato com valor de pH de 9,1, esta suspensão ostentava uma grande intensidade de fluorescência quando excitados com uma vasta gama de LEDs desde os 360 nm até aos 450 nm, têm uma banda relativamente estreita de emissão de radiação, cerca de 50 nm a meia altura e são bastante estáveis ao longo do tempo (suspensões com mais de 2 anos guardadas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, não perderam intensidade de fluorescência). Similares resultados obtiveram-se para os quantum dots de CdTe/ZnS estabilizados em glutatona (Fig.5.10).

A análise morfológica revela que os CdTe estabilizados com ácido mercaptoacético na solução que lhes deu origem, apresentam-se aglomerados em formas esféricas com dimensões na ordem das dezenas de nanómetro (Fig.5.11) e são constituídos principalmente por cádmio, telúrio e enxofre (Fig.5.12). Estes quantum dots de CdTe quando purificados e encapsulados com zinco enxofre, promovem um aumento de tamanho numa das dimensões, tornando-se bastonetes (Fig.5.13) cuja análise de composição evidencia, agora também, a presença de zinco na sua constituição (Fig.5.14).

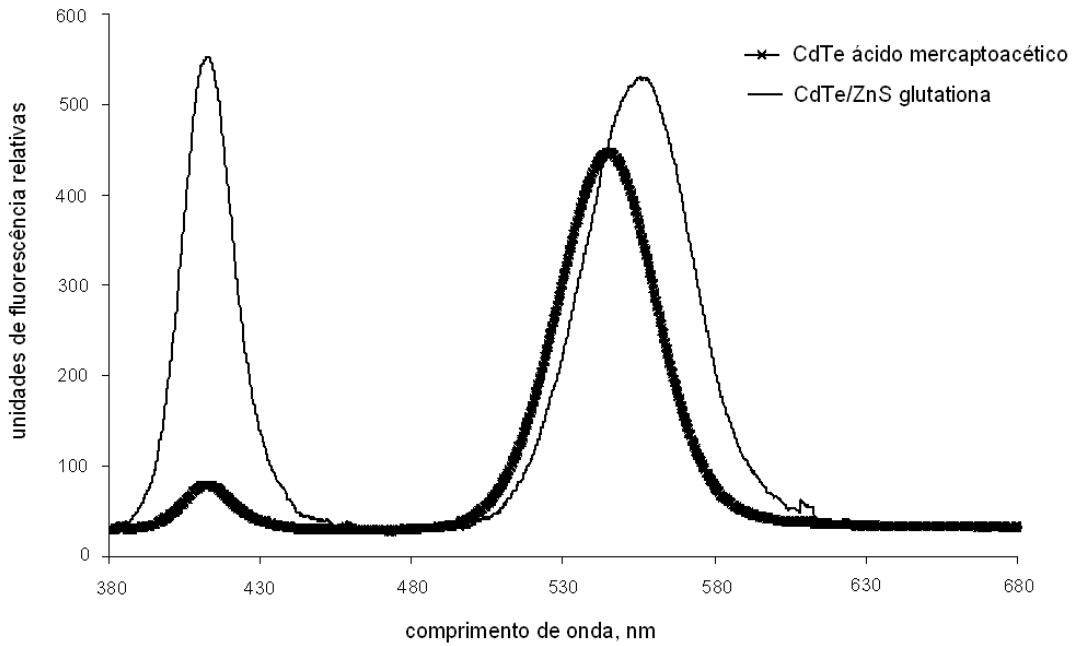


Figura 5.10 – Fluorescência de suspensões aquosas de CdTe e CdTe/ZnS em solução tampão fosfato/hidrogenofosfato pH 9,1 quando excitadas com LEDs de 405 nm.

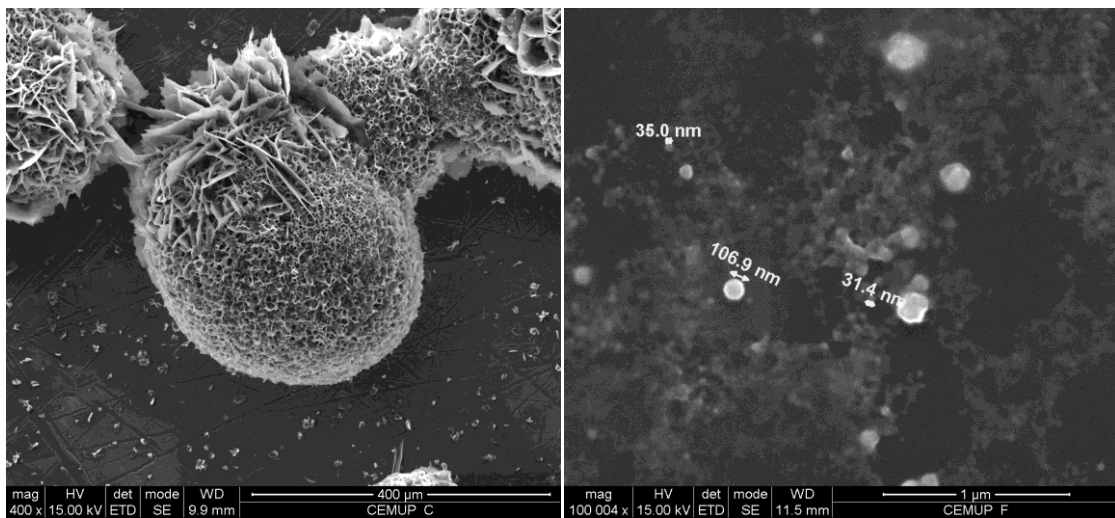


Figura 5.11 – Análise morfológica por microscopia de varrimento eletrónico das nanopartículas de CdTe estabilizadas com ácido mercaptoacético não purificados. Escala de 400 µm (esquerda) e 1 µm (direita).

O processo de purificação optado foi a precipitação com recurso ao álcool etílico seguido da centrifugação e posterior liofilização. Ao contrário do procedimento por diálise, este procedimento é um processo de simples execução, sem recurso a utensílios ou equipamentos dispendiosos, e produz pós de nanopartículas homogéneos cuja ressuspensão origina soluções com as mesmas características

fotofísicas. Sucessivas lavagens com etanol provocam consecutivas perdas irreversíveis de intensidade de fluorescência.

Label A: CEMUP 15 keV CdTe TGA

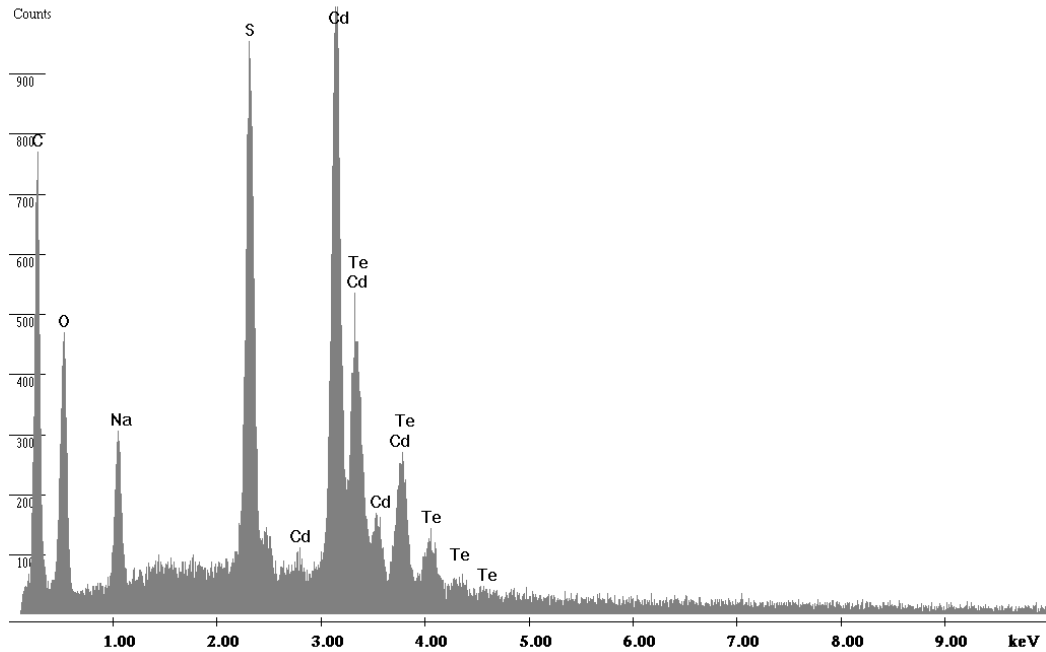


Figura 5.12 – Análise da composição elemental por espectroscopia de dispersão de energia de raio-X dos quantum dots de CdTe estabilizados com ácido mercaptoacético.

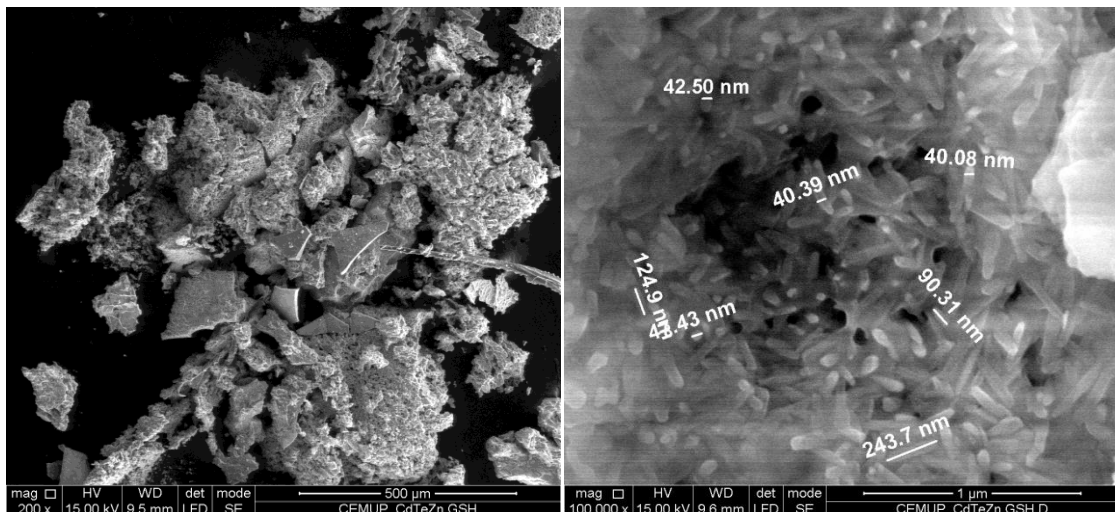


Figura 5.13 – Análise morfológica por microscopia de varrimento eletrônico das nanopartículas de CdTe/ZnS estabilizadas com glutathione reduzida. Escala de 500 µm (esquerda) e 1 µm (direita).

Label A: CEMUP 15 keV CdTeZn GSH

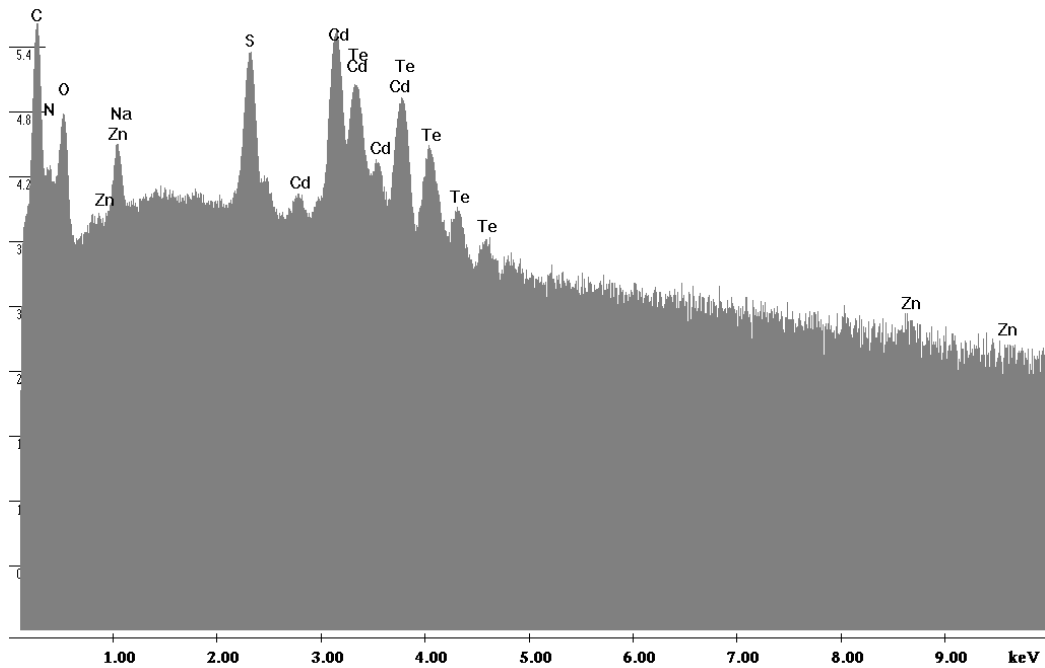


Figura 5.14 – Análise da composição elemental por espectroscopia de dispersão de energia de raio-X dos quantum dots de CdTe/ZnS estabilizados com glutatona reduzida.

Resultados similares foram encontradas nos CdTe estabilizadas com os ácidos mercaptossuccínico e mercaptopropiónico, no entanto é com o estabilizador mercaptoacético que os quantum dots de CdTe apresentam maior intensidade de fluorescência, face à igual quantidade mássica relativa.

Sintetizaram-se, também com sucesso, quantum dots de cádmio selénio que, embora com uma intensidade de fluorescência significativamente inferior (Fig.5.15) são obtidos com uma rota igualmente simples, conseguindo-se nanopartículas bastante estáveis e com a possibilidade promissora de mudança para uma escala de produção significativamente superior.

Esta síntese é mais rápida que para as nanopartículas à base de telúrio (os CdTe geralmente ao fim de 96 horas ainda continuam em crescimento) obtendo-se uma intensidade máxima de fluorescência ao fim de cerca de 60 horas de refluxo correspondente a um comprimento de onda de cerca de 525 nm (Fig.5.16).

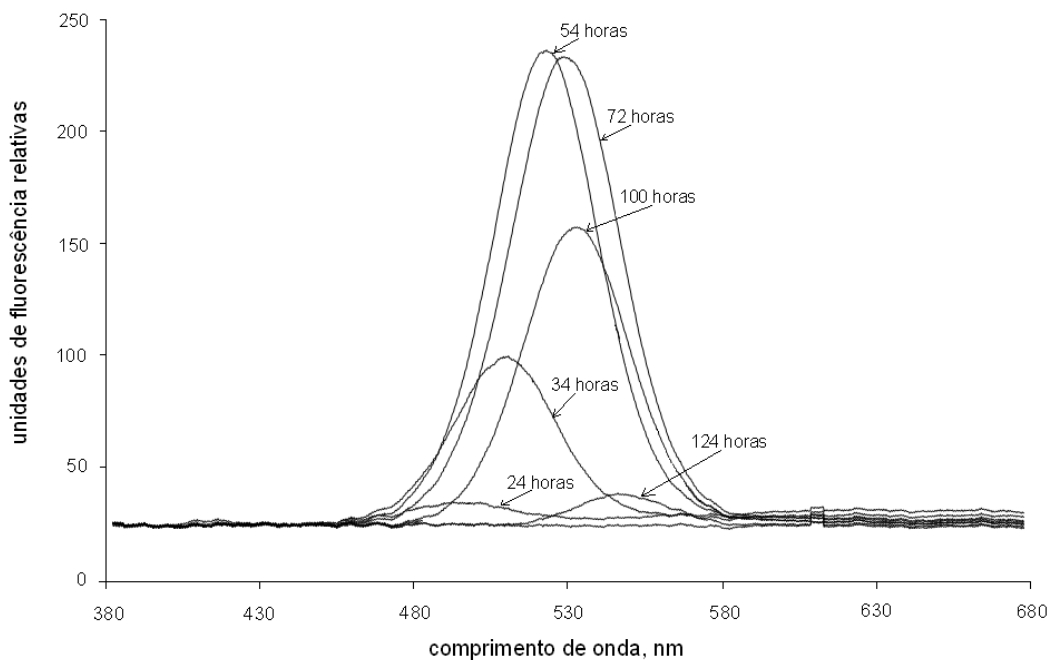


Figura 5.15 – Evolução da intensidade de fluorescência de uma suspensão aquosa de CdSe, em solução tampão fosfato/hidrogenofosfato pH 9,1, quando excitadas com LEDs de 410 nm.

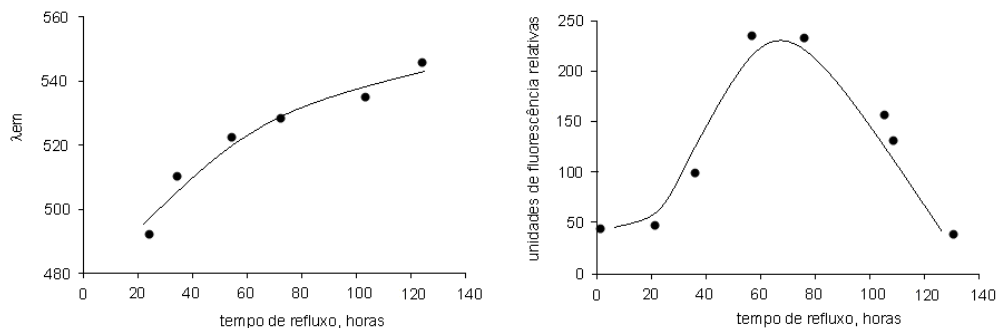


Figura 5.16 – Evolução típica do valor máximo da intensidade de fluorescência e correspondente comprimento de onda, λ_{em} , em função do tempo de refluxo para a síntese de CdSe com o ácido mercaptoacético como estabilizador.

Este é um comportamento típico da evolução de todas as nanopartículas sintetizadas. Quando se inicia o refluxo, após a adição do calcogeneto à solução aquosa de tiocomplexo de cádmio e da formação dos núcleos, os quantum dots começam por apresentar um intensidade de fluorescência reduzida a um determinado comprimento de onda. Com o decorrer do tempo, o valor máximo da intensidade de fluorescência aumenta correspondendo, também, a um valor cada vez maior de

comprimento de onda. A intensidade acaba por ter um valor máximo, ao fim do qual decresce até à completa extinção da fluorescência, o comprimento de onda associado continua a crescer de cada vez com menor incremento, até que tende para um determinado valor máximo imediatamente antes da extinção da fluorescência (Fig.5.16).

A síntese de CdTe recorrendo a outros estabilizadores (por exemplo o 5-mercaptop-8-hidroxiquinolina ou a 7-oxo-6-sulfanil-octa-N-5-5(8-hidroxiquinolina) amina) ou mesmo outros ligandos comercialmente disponíveis (4,5-diamino-6-hidroxi-2-mercaptopiridina, ácido 11-mercaptopundecanóico, ácido acetilmercaptohexanóico), parecem produzir estruturas organizadas à escala nano (Fig.5.17) que, após purificação, aparentam ter uma composição química definida (Fig.5.18). No entanto não foi possível verificar fluorescência em nenhuma destas estruturas.

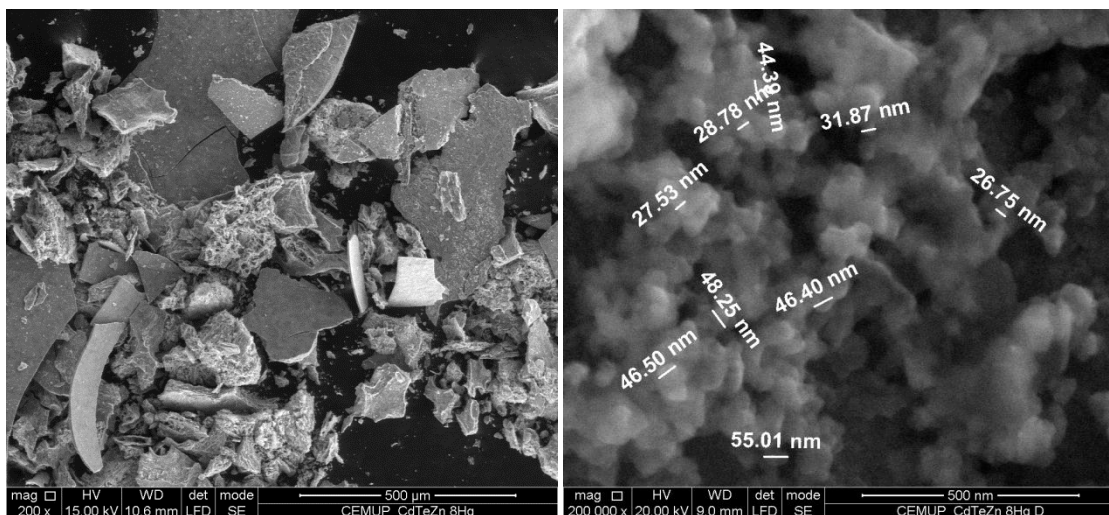


Figura 5.17 – Análise morfológica por microscopia de varrimento eletrónico das nanopartículas de CdTe/ZnS estabilizadas com 5-mercaptop-8-hidroxiquinolina. Escala de 500 µm (esquerda) e 0,5 µm (direita).

A funcionalização dos quantum dots e posterior teste à sensibilidade das diferentes espécies reativas de oxigênio e azoto não foram conseguidas. A tentativa de obter nanopartículas funcionalizadas nunca foi além do uso dos diferentes ativadores, estes provocam a completa extinção da fluorescência. Pensa-se que as terminações da camada externa dos quantum dots não tenha só grupos carboxílicos e a sua simples ativação provoca aglomeração irreversível destas estruturas.

Label A: CEMUP 15 keV CdTeZn 8Hq

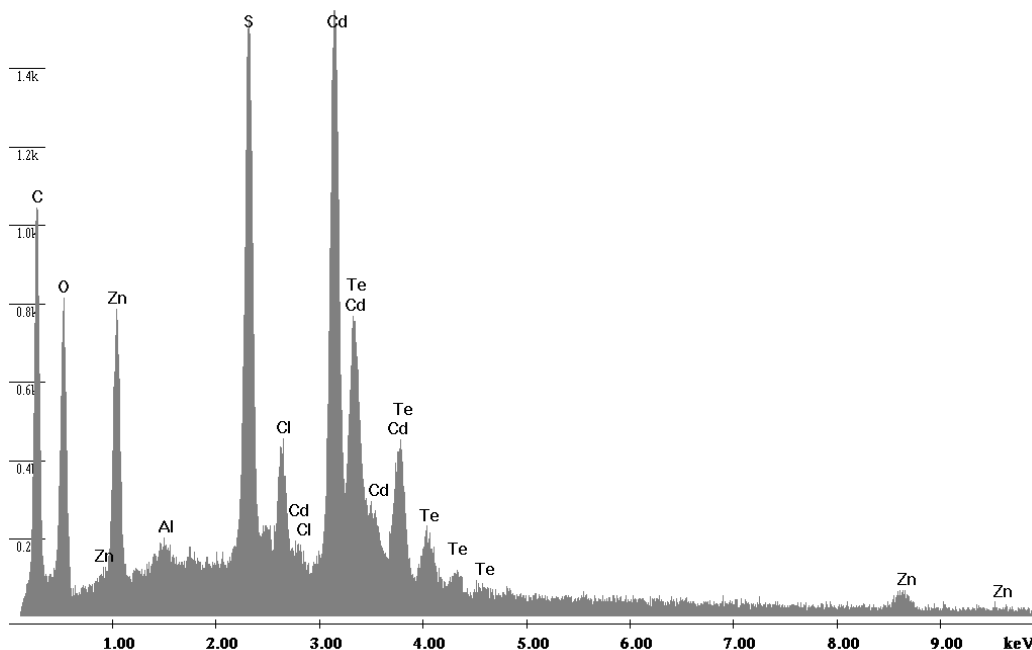


Figura 5.18. – Análise da composição elementar por espectroscopia de dispersão de energia de raio-X das estruturas de CdTe/ZnS estabilizados com 5-mercaptop-8-hidroxiquinolina.

5.5. Conclusão

O interesse nos semicondutores aumentou drasticamente nos últimos anos. A sua quase exclusiva aplicação no campo da física ótica e eletrónica alargou-se à química e à biologia, não só como sensores mas em muitas outras áreas como a catálise química ou como transportadores de princípios ativos. Não obstante à toxicidade dos seus constituintes, sabe-se, por exemplo, que as nanopartículas com cádmio libertam catiões tóxicos de cádmio, havendo, por isso, um percurso inteiro ainda por percorrer, no sentido de compreender como estas novas partículas interagem com o meio onde estão a ser inseridas, isto é, a própria toxicidade do conjunto quantum dot [19].

Sintetizaram-se com sucesso vários nanocristais bimetálicos, nomeadamente de cádmio/telúrio estabilizados com ácido mercaptoacético, ácido mercaptoacético e ácido mercaptosuccínico e cádmio/selénio com ácido mercaptosuccínico. A síntese aquosa baseou-se na adição do respetivo calcogeneto aquoso à solução, também ela aquosa, com os respetivos tiocomplexos catiónicos, na completa ausência de oxigénio. Este procedimento simples, e ambientalmente mais verde que o seu precursor organometálico, permite obter nanopartículas relativamente puras e em larga escala. O controlo do tempo é a chave para definir o tamanho das nanoestruturas, logo das suas propriedades fotofísicas.

Recobriram-se estes quantum dots com uma camada externa de cádmio/enxofre usando como estabilizador a glutatona reduzida. Este processo pouco altera as propriedades fotofísicas, no entanto, aumenta o comprimento de onda de emissão, reduz a solubilidade em água e permite manusear a camada externa da nanopartícula, ou seja, é possível modificar a composição química das moléculas externas no sentido de conferir especificação e seletividade a determinados analitos.

Sintetizaram-se moléculas bifuncionais que contêm o grupo tiol, como a 5-mercapto-8-hidroxiquinolina e a 7-oxo-6-sulfanil-octa-N-5-5(8-hidroxiquinolina) amina. A utilização destas moléculas e de outras adquiridas comercialmente, como a 4,5-diamino-6-hidroxi-2-mercaptopiridina, ácido 11-mercaptoundecanóico ou o ácido

acetilmercaptohexanóico, resultaram em precipitados de cor castanha escura, pretos, amarelos e avermelhados (dependendo do valor de pH inicial utilizado) que não apresentam fluorescência. Incluiu-se nestas tentativas os ligandos não tiolados 8-hidroxiquinolina e o N-(ditiocarboxy)sarcosina de diamónio (sendo este um conhecido sensor do óxido de nítrico) cujas suspensões obtidas também não apresentavam fluorescência.

A funcionalização com o recurso a ativadores com moléculas, ainda não descritas na bibliografia, também não foi conseguida.

Identificar a composição atómica, o modo como os átomos estão acomodados, entender a distribuição dos mesmos no interior ou à superfície das nanopartículas e as suas possíveis interações com moléculas ou estruturas acopladas, é importante para se proceder à nanoengenharia dos Quantum dots para, finalmente, adaptar às diversas aplicações sensores de espécies reativas de oxigénio e azoto.

5.6. Bibliografia

- [1] P. Prabhakaran, W. J. Kim, K. Lee, P. N. Prasad, 2012, *Optical Materials Express*, 2 (5), 578-593.
- [2] H. Goesmann, C. Feldmann, 2010, *Angewandte Chemie International Edition*, 49, 1362-1395.
- [3] H. Mattoussi, G. Palui, H. B. Na, 2012, *Advanced Drugs Delivery Reviews*, 64, 138-166.
- [4] H. Kuang, Y. Zhao, W. Ma, L. xu, L. Wang, C. Xu, 2011, *Trends in Analytical Chemistry*, 30 (10), 1620-1636.
- [5] D. V. Talapin, J. Lee, M. V. Kovalenko, E. V. Shevchenko, 2010, *Chemical Reviews*, 110, 389-458.
- [6] L. Li, H. Qian, N. Fang, J. Ren, 2006, *Journal of Luminescence*, 116, 59-66.
- [7] X. Gao, L. Yang, J. A. Petros, F. F. Marshall, J. W. Simons, S. Nie, 2005, *Current Opinion in Biotechnology*, 16, 63-72.
- [8] A. M. Smith, S. Nie, 2010, *Accounts of Chemical Research*, 43 (2), 190-200.
- [9] H. Geiger, J. H. Fellow, E. Marsden, 1909, *Proceedings of Royal Society, series A* 82, 495-500.
- [10] R. C. Somers, M. G. Bawendi, D. G. Nocera, 2007, *Chemical Society Reviews*, 36, 579-591.
- [11] C. Landes, C. Burda, M. Braun, M. A. El-Sayed, 2001, *Journal of Physical Chemistry B*, 105, 2981-2986.
- [12] N. Gaponik, D. V. Talapin, A. L. Rogach, K. Hoppe, E. V. Shevchenko, A. kornowski, A. Eychmuller, H. Weller, 2002, *Journal of Physical Chemistry B*, 106, 7177-7185.
- [13] J. C. Brennan, T. Siergrist, P. J. Carrol, M. S. Stucznski, L. E. Brus, 1989, *Journal of the American Chemical Society*, 111 (11), 4141-4143.
- [14] C. B. Murray, D. J. Norris, M. G. Bawendl, 1993, *Journal of the American Chemical Society*, 115, 8706-8715.
- [15] S. C. Goel, M. Y. Chiang, W. E. Buhro, 1990, *Journal of the American Chemical Society*, 112 (14), 5636-5637.
- [16] O. I. Micic, C. J. Curtis, K. M. Jones, J. R. Sprague, A. J. Nozik, 1994, *Journal of Physical Chemistry*, 98, 4966-4969.

- [17] X. Michalet, F. F. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Sundaresan, A. M. Wu, S. S. Gambhir, S. Weiss, 2005, *Science*, 307, 538-544.
- [18] J. T. G. Overbeek, 1982, *Advances in Colloid and Interface Science*, 15, 251-277.
- [19] P. C. Ke, M. H. Lamm, 2011, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 13, 7273-7283.
- [20] V. K. LaMer, R. H. Dinegar, 1950, *Journal of the American Chemical Society*, 72 (11), 4847-4854.
- [21] C. B. Murray, C. R. Kagan, 2000, *Annual Review of Materials Science*, 30, 545-610.
- [22] F. Aldeek, L. Balan, J. Lambert, R. Schneider, 2008, *Nanotechnology*, 19, 475401 (9pp).
- [23] Y. Khalavaka, B. Mingler, G. Friedbacher, G. Okrepka, L. Shcherbak, O. Panchuk, 2010, *Physica Status Solidi A*, 207 (2), 370-374.
- [24] Y. Liu, W. Chen, A. G. Joly, Y. Wang, C. Pope, Y. Zhang, J. Bovin, P. Sherwood, 2006, *Journal of Physical Chemistry B*, 110, 16992-17000.
- [25] A. L. Rogach, T. Franzl, T. A. Klar, J. Feldmann, N. Gaponik, V. Lesnyak, A. Shavel, A. Eychmuller, Y. P. Rakovich, J. F. Donegan, 2007, *Journal of Physical Chemistry*, 111, 14628-14637.
- [26] G. Nichols, S. Byard, M. Bloxham, J. Botterill, N. J. Dawson, A. Dennis, V. Diart, N. C. North, J. D. Sherwood. 2002, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 91 (10), 2103-2109.
- [27] C. Burda, X. Chen, R. Narayanan, M. A. El-Sayed, 2005, *Chemical Reviews*, 105 (4), 1025-1105.
- [28] H. Borchert, D. V. Talapin, N. Gaponik, C. McGinley, S. Adam, A. Lobo, T. Moller, H. Weller, 2003, *Journal of Physical Chemistry*, 107, 9662-9668.
- [29] T. Rajh, O. I. Miéié, A. J. Nozik, 1993, *Journal of Physical Chemistry*, 97, 11999-12003.
- [30] B. O. Dabbousi, J. Rodriguez-Viejo, F. V. Mikulec, J. R. Heine, H. Mattoussi, R. Ober, K. F. Jensen, M. G. Bawendi, 1997, *Journal of Physical chemistry*, 101, 9463-9475.
- [31] W. W. Yu, E. Chang, R. Drezek, V. L. Colvin, 2006, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 348, 781-786.
- [32] G. P. C. Drummen, 2010, *International Journal of Molecular Science*, 11, 154-163.
- [33] Y. He, L. Sai, H. Lu, M. Hu, W. Lai, Q. Fan, L. Wang, W. Huang, 2007, *Chemistry of Materials*, 19, 359-365.
- [34] M. P. Pileni, 2000, *Catalysis Today*, 58, 151-166.
- [35] T. Uematsu, T. Waki, T. Torimoto, S. Kuwabata, 2009, *Journal of Physical Chemistry C*, 113, 21621-21628.
- [36] Y. Zhang, H. Zhang, M. Ma, X. Guo, H. Wang, 2009, *Applied Surface Science*, 255, 4747-4753.

- [37] M. Li, Y. Ge, Q. Chen, S. Xu, N. Wang, X. Zhang, 2007, *Talanta*, 72, 89-94.
- [38] H. Zhang, L. Wang, H. Xiong, L. Hu, W. Li, 2003, *Advanced Materials*, 15 (20), 1712-1715.
- [39] J. Guo, W. Yang, C. Wang, 2005, *Journal of Physical Chemistry*, 109, 17467-17473.
- [40] M. Gao, S. Kirstein, H. Mohwald, A. L. Rogach, A. Kornowski, A. Eychmuller, H. Weller, 1998, *Journal of Physical Chemistry*, 102, 8360-8363.
- [41] D. V. Talapin, A. L. Rogach, E. V. Shevchenko, A. Kornowski, M. Haase, H. Weller, 2001, *Journal of the American Chemical Society*, 124, 5782-5790.
- [42] C. Gerhards, C. Schulz-Drost, V. Sgobba, D. M. Guldi, 2008, *Journal of Physical Chemistry*, 112, 14482-14491.
- [43] H. Peng, L. Zshang, C. Soeller, J. Travas-Sejdic, 2007, *Journal of Luminescence*, 127, 712-726.
- [44] L. Zhang, C. Xu, B. Li, 2010, *Microchemical Journal*, 95 (2), 186-191.
- [45] A. Shavel, N. Gaponik, A. Eychmuller, 2006, *Journal of Physical Chemistry B*, 110, 19280-19284.
- [46] J. Liu, Z. shi, Y. Yu, R. Yang, S. Zuo, 2010, *Journal of Colloid and Interface Science*, 42 (2), 278-282.
- [47] C. Schulz-Drost, V. Sgobba, D. M. Guldi, 2007, *Journal of Physical Chemistry*, 111, 9694-9703.
- [48] A. L. Rogach, L. Katsikas, A. Kornowski, D. Su, A. Eychmuller, H. Weller, 1996, *Berichte der Bunsengesellschaft für Physikalische Chemie*, 100, 1772-1778.
- [49] A. M. Kapitonov, A. P. Stupak, S. V. Gaponenko, E. P. Petrov, A. L. Rogach, A. Eychmuller, 1999, *Journal of Physical Chemistry*, 103, 10109-10113.
- [50] Q. Fernando, H. Freiser, 1958, *Journal of the American Chemical Society*, 80 (18), 4928-4931.
- [51] I. Turyan, D. Mandler, 1995, *Electrochimica Acta*, 40, (9), 1093-1100.
- [52] M. A. Vairavamurthy, W. S. Goldenberg, S. Ouyang, S. Khalid, 2000, *Marine Chemistry*, 70, 181-189.
- [53] G. Crisponi, A. Diaz, V. M. Nurchi, T. Pivetta, M. J. T. Estévez, 2002, *Polyhedron*, 21, 1319-1327.
- [54] R. C. Weast, D. R. Lide, 1990, *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 70th Edition, Boca Raton, Florida.
- [55] V. Swayambunathan, D. Hayes, K. H. Schmidt, Y. X. Liao, D. Meisel, 1990, *Journal of the American Chemistry Society*, 112, 3831-3837.
- [56] A. G. Valoshchuk, N. I. Tspishchuc, 2001, *Inorganic Materials*, 38 (11), 1114-1116.
- [57] A. Shavel, N. Gaponik, A. Eychmuller, 2006, *Journal of Physical Chemistry*, 110, 19280-19284.

- [58] A. L. Rogach, 2000, *Materials Science and Engineering B*, 69-70, 435-440.
- [59] T. Jin, F. Fujii, Y. Komai, J. Seki, A. Seiyama, Y. Yoshioka, 2008, *International Journal of Molecular Science*, 9, 2044-2061.
- [60] I. L. Medintz, H. Mattoussi, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2009, 11, 17-45.
- [61] W. R. Algar, A. J. Tavares, U. J. Krull, 2010, *Analytica Chimica Acta*, 637, 1-25.
- [62] K. Susumu, H. T. Uyeda, I. L. Medintz, T. Pons, J. B. Delehanty, H. Mattoussi, 2007, *Journal of the American Chemical Society*, 129, 13987-13996.
- [63] R. Hong, N. O. Fischer, A. Verma, C. M. Goodman, T. Emrick, V. M. Rotello, 2004, *Journal of the American Chemical Society*, 126, 739-743.
- [64] Q. Wang, Y. Xu, X. Zhao, Y. Chang, Y. Liu, L. Jiang, J. Sharma, D. Seo, H. Yan, 2007, *Journal of the American Chemical Society*, 129, 6380-6381.
- [65] D. Zhou, Y. Li, E. A. H. Hall, C. Abell, D. Klenerman, 2011, *Nanoscale*, 3, 201-211.
- [66] N. Erathodiyil, J. Y. Ying, 2011, *Accounts of Chemical Research*, 44 (10), 925-935.
- [67] B. Dubertret, P. Skourides, D. J. Norris, V. Noireaux, A. H. Brivanlou, A. Libchaber, 2002, *Science*, 298, 1759-1762.
- [68] W. W. Yu, E. Chang, J. C. Falkner, J. Zhang, A. M. Al-Somali, C. M. Sayes, J. Johns, R. Drezek, V. L. Colvin, 2007, *Journal of the American Chemical Society*, 129, 2871-2879.
- [69] J. B. Blanco-Canosa, I. L. Medintz, D. Farrell, H. Mattoussi, P. E. Dawson, 2010, *Journal of the American Chemical Society*, 132, 10027-10033.
- [70] X. Chen, J. L. Hutchison, P. J. Dobson, G. Wakefield, 2009, *Journal of Materials Science*, 44, 285-292.
- [71] Vanessa Guimarães, 2009, 2009, "Redução do ácido 8-hidroxiquinolina-5-sulfónico", integrado na disciplina Compostos Bioativos na conceção de Fármacos do Mestrado em Química, Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.
- [72] Nuno Barbosa, Nuno Almeida, 2009, "Síntese de tiois", integrado na disciplina Compostos Bioativos na conceção de Fármacos do Mestrado em Química, Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.
- [73] J. Bankovskis, M. Cirule, P. I. Brusilovskii, I. A. Tsilinskaya, 1979, *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 15, 1205-1207.

6. Lactose modificada como sensor fluorescente

6.1. Introdução

A lactose é um composto natural que se encontra apenas no leite dos mamíferos. A sua concentração média varia de espécie para espécie, existe desde 0,3 % m/v no urso polar ou 0,7 % m/v na foca cinzenta, pode encontrar-se com valores moderados de 2,1 % m/v nos coelhos ou 4,1 % m/v nas cabras, mas pode atingir quantidades relativamente altas como 7,0 % m/v nos humanos ou mesmo 10,2 % m/v no macaco-verde [1].

A digestão da lactose é feita somente através da β -galactosidase ou lactase, enzima presente nos primeiros tempos de vida dos mamíferos, na sua ausência a lactose não é decomposta e os mamíferos não a podem absorver, conseqüentemente é excretada ou consumida pelos microrganismos da flora intestinal e podem libertar ácidos orgânicos e gases, resultam em sintomas como diarreia, dor, inchaço ou flatulência. Há uma boa parte da população humana que chega mesmo a sofrer de intolerância à lactose, estima-se que cerca de 70 % da população mundial, tenha um certo grau de intolerância, principalmente pessoas oriundas do Médio Oriente, Índia e grande parte de África. Para além do uso do leite pelos mamíferos na fase de lactante, os humanos adultos usam, na sua alimentação, leite de outras espécies como o de cabra ou de vaca, não só diretamente na forma de leite como na forma de derivados

(iogurte, queijo ou na própria confeção de vários alimentos). A lactose em pó é usada na indústria alimentar e farmacêutica, principalmente como excipiente para os comprimidos [2].

A lactose é sintetizada nas glândulas mamárias a partir da glucose proveniente do sangue e ocorre nas células epiteliais que envolvem os alvéolos das glândulas mamárias. Para se formar uma molécula de lactose são necessárias duas moléculas de glucose e energia, isto na presença de enzimas [3].

A indústria de transformação alimentar, principalmente a produção de queijo, produz grandes quantidades de subprodutos do qual é fácil obter lactose pura em grandes quantidades (estima-se que só na Europa e na América do Norte se produzam 1,4 milhões de toneladas de lactose do soro do leite [4]). Ao longo de mais de 150 anos de tentativas de tornar este subproduto facilmente digerível ou pelo menos reduzir a sua intolerância, originaram o aparecimento de vários derivados da lactose que podem ser obtidos laboratorial ou industrialmente. Os derivados da lactose mais importantes e já devidamente caracterizados, são obtidos pela hidrólise ácida e enzimática, a hidrogenação e a oxidação, operações associados quase sempre a fenómenos de isomerização [5].

O nosso interesse pela lactose apareceu quando se procedia à funcionalização de nanopartículas luminescentes com ácido fólico na forma de preparado farmacêutico. O processo provocava incremento na intensidade de fluorescência nas nanoestruturas. Após rastreamento da causa do incremento, constatou-se que a simples ebulição de uma solução aquosa contendo o excipiente, a lactose, adquiria capacidade de fluorescência. O resultado do refluxo da solução aquosa de lactose respondeu, por extinção da fluorescência a alguns analitos, nomeadamente às espécies reativas de oxigénio e azoto.

6.1.1. Propriedades físicas e químicas da lactose

A lactose é um dissacarídeo, a β -D-galactopiranosil-(1-4)-D-glucose, com o nome sistemático de β -O-D-galactopyranosyl-(1-4)- α -D-glucopyranose (α -lactose) ou β -O-D-galactopyranosyl-(1-4)- β -D-glucopyranose (β -lactose) (Fig.6.1). Carboidrato este constituído por dois monossacarídeos, a galactose e a glucose, unidos por uma ligação β -1,4-glicosídica.

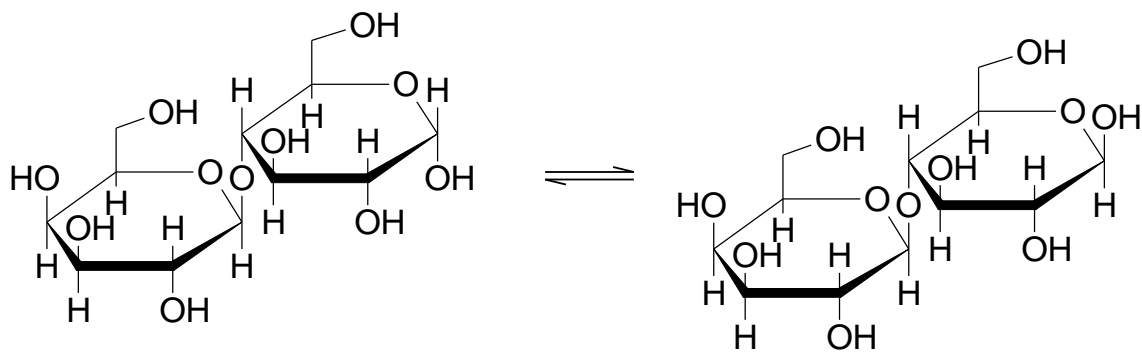


Figura 6.1 – Estruturas da α -lactose (esquerda) e β -lactose (direita).

As duas formas isoméricas, a α -lactose e a β -lactose, apresentam propriedades distintas. A forma α -lactose no estado cristalino apresenta-se nonohidratada com um ponto de fusão de 201,6 °C, tem uma solubilidade em água de 7,4 % a 20 °C e a rotação específica da solução aquosa é de +89,4° a 20 °C. Os cristais da α -lactose têm a forma de prismas, pirâmides ou “tomahawks”, dependendo das condições de cristalização. A forma β -lactose é anidra quando no estado cristalino, com um ponto de fusão de 252,2 °C e uma solubilidade em água, a 20 °C, de 48 %. As suas soluções aquosas têm uma rotação específica, a 20 °C, de +35,20°. A forma dos cristais varia entre diamante irregular, se proveniente de soluções aquosas, prisma curvo ou tipo agulha se cristalizado através de soluções alcoólicas. Em solução aquosa, estas duas formas são interconvertíveis e atingem um equilíbrio, qualquer que sejam as proporções iniciais dos isómeros, em 37,3 % de α -lactose e 62,7 % de β -lactose, correspondendo a uma rotação específica a 20 °C de +55,3°. As proporções de equilíbrio dos isómeros e, conseqüentemente, a rotação específica é fortemente dependente do valor de pH, da presença de outros solventes/substâncias e da temperatura [4, 6-7].

6.1.2. Hidrólise da lactose

A lactose pode ser hidrolisada química (ácida ou básica) ou enzimaticamente, nos respetivos monómeros, a D-glucose e a D-galactose, sendo todas estas três estruturas redutoras. Ou seja, quando se rompe a ligação hemiacetálica formam-se

grupos aldeídos capazes de sofrer oxidação por agentes oxidantes (Fig.5.2). A hidrólise da lactose é um dos processos mais usados para a transformar em produtos mais solúveis, mais doces, anulando assim, o efeito da sua intolerância e principalmente torna-a de fácil digestão, não só para os seres humanos mas para outros seres vivos. Como por exemplo, pode ser usada como fonte de carbono em processos de fermentação do vinho, do pão ou outros [2].

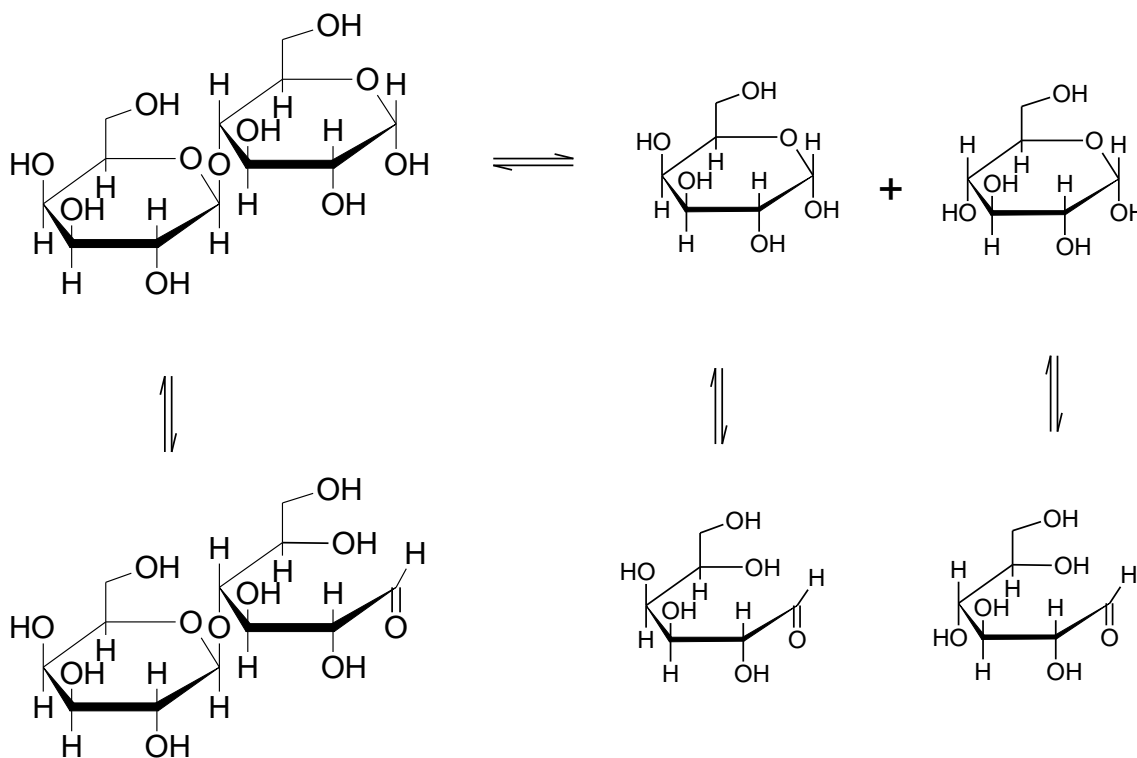


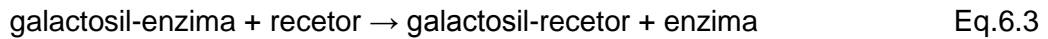
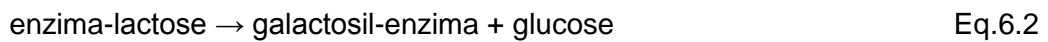
Figura 6.2 – Hidrólise da lactose em galactose e glucose (da esquerda para a direita, respetivamente) e correspondentes estruturas abertas (em baixo) que mostra que são aldeídos no carbono anomérico.

A hidrólise ácida é um processo relativamente antigo, um dos primeiros registos remonta a 1812 aos trabalhos de *Vogel* [8], e consiste num simples aquecimento (pode ir até aos 150°C) em meio ácido (geralmente a valores de pH inferiores a 1,5). A hidrólise alcalina também dissocia a lactose nos respetivos monómeros, no entanto produz uma série de outros produtos por reações laterais, como por exemplo a lactulose ou isosacarinato [9, 10].

No entanto, é com a hidrólise enzimática que o processo, com grande interesse industrial, contínua em aperfeiçoamento [11, 12]. Este processo permite não só clivar a lactose mas também pode formar diversos galacto-oligossacarídeos. Esta família de

derivados é, genericamente, mais solúvel e têm menor valor calórico que a lactose, dependendo da temperatura e da composição qualitativa e quantitativa do meio onde está a decorrer a reação [13]. Os diversos galacto-oligossacarídeos podem ser adoçantes, ou seja, ainda têm a capacidade de conferir a sensação de doce mas passam pelo intestino delgado dos humanos e não são digeridos, mas recentemente tem-se descoberto algumas características prébióticas (ingredientes alimentares não digeríveis, que beneficiam o hospedeiro por estimular o crescimento ou actividade de uma ou várias comunidades de microrganismos residentes no cólon [14]) e são usados com esse fim.

Estima-se que existam 3 passos no mecanismo de formação dos galacto-oligossacarídeos, quando se usa a enzima mais popular a β -galactosidase ou lactase [15]:



Quando o recetor é a água, ou seja, a reação ocorre em meio aquoso e não se encontra presente qualquer outro recetor, forma-se a galactose. Mas quando o recetor é outro açúcar, portanto em meios cuja água não existe ou escasseia, formam-se os di-, tri- ou superiores galactosil-oligossacarídeos, por exemplo a lactulose (produzida em meio alcalino na presença de frutose [16]) (Fig.6.3 esquerda), e as 3' a 4' ou a 6'-galactosil-lactose (produzidas dependente da fonte (microrganismo) da enzima [17]) (Fig.6.3 direita).

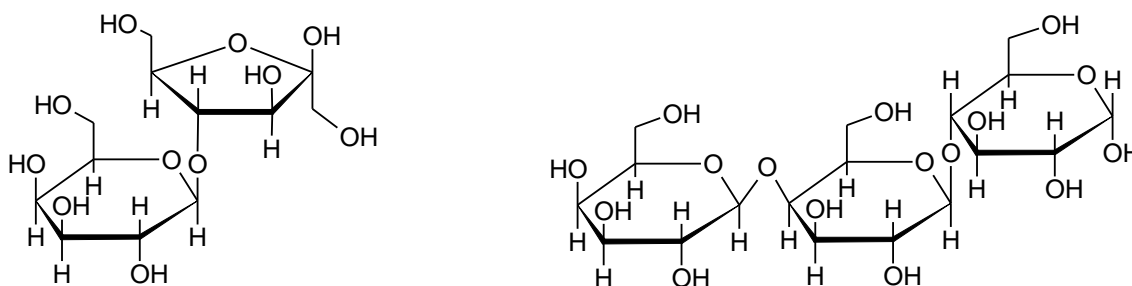


Figura 6.3 – Estruturas da lactulose (esquerda) e da 4'-galactosil-lactose (direita).

6.1.3. Oxidação e redução da lactose

O produto mais importante da oxidação da lactose é o ácido lactobiónico. Usado comercialmente em formulações cosméticas pela sua ação antioxidante e dissecante, é o principal componente, na forma de sal de ferro, na constituição de fluidos conservantes para os órgãos transplantados [18]. Devido às propriedades quelantes do lactobionato para o catião cálcio, é muito usado em formulações farmacêuticas como fortificante de cálcio.

A oxidação do grupo aldeído da glucose a ácido foi realizada pela primeira vez por Fischer and Meyer, em 1889, com o oxidante bromo (Fig.6.4). Apesar da seletividade da reação apenas os processos eletroquímicos, de catálise heterogénea e os biocatalíticos, mostraram-se economicamente viáveis [19]. O processo electroquímico, estabelecido desde a década de 50 do séc. XX, permitia obter rendimentos elevados, no entanto o processo é catalisado por bromo ou iodo em meio alcalino. A catálise heterogénea permite uma fácil e económica separação dos produtos de reação, no entanto, há a formação de vários produtos indesejados o que obriga a uma posterior separação. O uso de enzimas ou microrganismos é conduzido a baixas temperaturas, geralmente entre 25 a 50° C, a valores de pH constantes. A catálise enzimática é um processo significativamente mais rápido o que o torna bastante mais económico [19], possível de se produzir em grande escala e a operar de um modo contínuo [20].

O produto pretendido na redução da lactose, pela ação do hidrogénio na presença de um catalisador, é o lactitol, adoçante com características similares ao manitol, xilitol ou arabitol. A redução é efetuada sobre o carbono anomérico da

glucose, em que se converte o aldeído em álcool. As condições em que a redução é efetuada são preponderantes no sucesso da obtenção do produto final, o recurso à biossíntese, quer com o uso de enzimas ou microrganismos, não é muito usada, o processo químico com recurso a catalisadores continua a ser o proposto [21, 22].

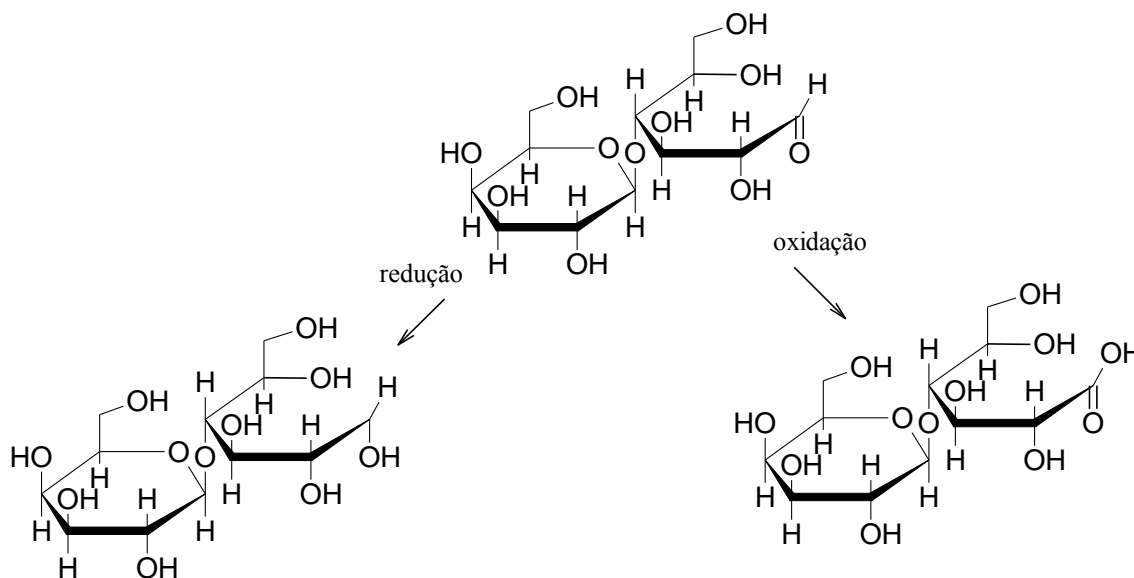


Figura 6.4 – Redução e oxidação da lactose a lactitol e ácido lactobiónico, respetivamente.

6.1.4. Degradação aquosa da lactose

A degradação de carboidratos pode ser efetuada de muitos modos diferentes. Os processos mais usados e estudados, sem intervenção de enzimas, são a reação de Millard e a caramelização. A reação de Millard é uma série de reações complexas entre os açúcares redutores e aminas, por exemplo aminoácidos, que resultam em centenas de substâncias capazes de atuar sobre os sensores de paladar e odor, por exemplo, as reações associadas aos processos de cozinhar os alimentos [23]. A caramelização é um dos processos de produção de substâncias análogas mas usando apenas os hidrocarbonetos redutores, normalmente o processo realiza-se a temperaturas elevadas [24. 25].

O furano e seus derivados (alquil furanos, dihidrofuranos, furanonas e tetrahidrofuranos) são compostos que se encontram naturalmente nos alimentos e bebidas, principalmente os que foram sujeitos a tratamento térmico. A família dos

furanos está frequentemente associada às propriedades organoléticas dos alimentos, como o sabor e o odor, no entanto, está estabelecido desde 1995 que alguns desses furanos podem ser carcinogênicos e a partir de 2004 foi deliberado pela autoridade Europeia para a Segurança Alimentar como “efetivamente cancerígeno para ratos e ratazanas...”. Supõe-se que os derivados do furano têm propriedades toxicológicas semelhantes ao próprio furano [26].

O processo de síntese do furano passa pela degradação dos açúcares, mais concretamente das hexoses redutoras com libertação de ácido fórmico ou acético, a derivados da aldotetrose, esta estrutura posteriormente fecha e forma o anel furano (Fig.6.5) [27].

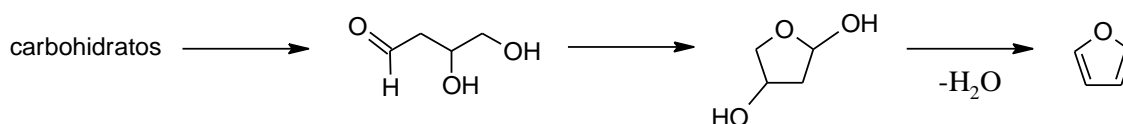


Figura 6.5 – Esquema da degradação aquosa dos açúcares em furano [27].

A composição salina, o valor de pH (capacidade tampão do valor de pH) e a temperatura do meio reacional são os principais fatores que influenciam a taxa, a rapidez, o rendimento e a estrutura do furano formado [28]. A presença de diferentes catalisadores influenciam a obtenção de diferentes membros da família dos furanos, por exemplo, a presença de amberlyst-15 e hidrocalcita favorece a formação do 2-furaldeído a partir da arabinose, do 5-hidroximetil-2-furaldeído a partir da ramnose e do 5-metil-2-furaldeído a partir da lactose (Fig.6.6) [29].

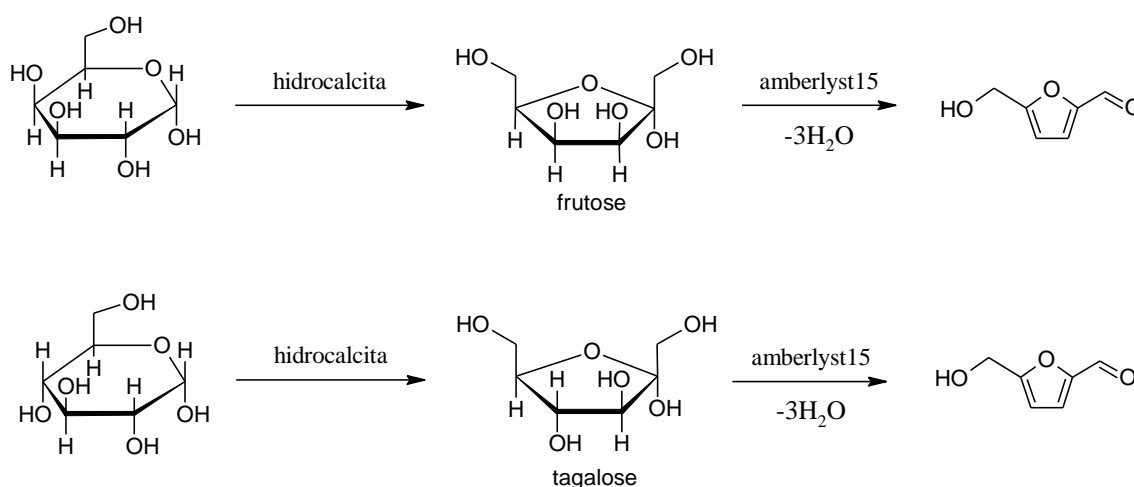


Figura 6.6 – Após a hidrólise da lactose em galactose (cima) e glucose (baixo), esquema da reação destes até chegar ao respetivo 5-hidroximetil-2-furaldeído. Adaptado de [29].

O furano e seus derivados apresentam características fluorescentes. É prática corrente usar a fluorescência para monitorizar a reação de Millard, desde sistemas complexos como usar o leite como reagente [30, 31] até sistemas perfeitamente controláveis com lactose e caseinato [23].

Se na reação de Maillard que produz derivados de furanos passíveis de serem controlados através da fluorescência, os derivados furanos do processo de caramelização da lactose também o serão [27, 29].

6.2. Procedimento experimental

6.2.1. Reagentes

A lactose, hipoclorito de sódio 10-15 %, superóxido de potássio, foram adquiridos à Sigma-Aldrich Química (Espanha). Hidrogenoftalato de potássio, nitrato de potássio, dihidrogenofosfato de potássio, hidrogenofosfato de sódio decahidratado, borax, nitrito de sódio, hidróxido de sódio, cloreto de sódio, peróxido de hidrogénio 30 %, dióxido de manganês, carbonato de sódio, fosfato de sódio, ácido clorídrico concentrado da Merck (Alemanha). A determinação do cloro livre foi efetuado com o recurso ao kit de cloro livre da Hanna Instruments (Roménia) para a gama de concentrações de 0,00 a 2,50 ppm com uma precisão de 0,03 ppm. Usou-se água desionizada com uma resistividade superior a $4M\Omega/cm$.

6.2.2. Preparação de soluções

A solução de óxido nítrico preparou-se conforme o ponto 4.2.3 (Geração do óxido nítrico (ii)) cuja concentração na solução aquosa saturada é de 1,8 mmol/L à temperatura ambiente.

6.2.2.1. Soluções tampão de pH com força iónica ajustada para 0,10 mol/L

Tampão ftalato (pH 3,883) – pesaram-se 5,057 g hidrogenoftalato de potássio (seco a 110°C e condicionado num exsiccador) e 2,523 g de nitrato de potássio, dissolveu-se e diluiu-se ao volume final de 500,0 mL com água desionizada.

Tampão fosfato (pH 6,748) – pesaram-se 1,6947 g dihidrogenofosfato de potássio (seco a 110°C e condicionado num exsiccador) e 4,459 g de hidrogenofosfato de sódio, dissolveu-se e diluiu-se ao volume final de 500,0 mL com água desionizada.

Tampão borax (pH 9,043) – pesaram-se 1,907 g borax (seco a 110°C e condicionado num exsiccador sob solução de açúcar) e 4,052 g de nitrato de potássio, dissolveu-se e diluiu-se ao volume final de 500,0 mL com água desionizada.

6.2.2.2. Solução aquosa de hipoclorito de sódio e sua padronização

As diferentes concentrações da solução de hipoclorito de sódio foram obtidas pela conveniente diluição rigorosa com água desionizada (usaram-se sempre fatores de diluição inferiores a 50 vezes).

A aferição das soluções de hipoclorito foi realizada com kit da determinação de cloro livre da Hanna Instruments, do qual se aferiu-se uma concentração, com convenientes diluições rigorosas de modo que a concentração esteja dentro da gama de funcionamento, obtendo-se as restantes concentrações pelos respetivos fatores de diluição.

6.2.2.3. Solução aquosa de peroxinitrito

Seguiu-se e adaptou-se o procedimento descrito por Pou *et al* [32].

Dissolveu-se 5 mL de ácido clorídrico concentrado em cerca de 80 mL de água desionizada, adicionou-se 7,15 mL de peróxido de hidrogénio a 30% e fez-se o volume final de 100 mL com água desionizada. Preparou-se uma segunda solução pela dissolução e diluição de 4,14 g de nitrito de sódio ao volume final de 100 mL com água desionizada. Ambas as soluções foram mantidas a 4° C e armazenadas no frigorífico.

Para preparar o peroxinitrito, colocaram-se iguais volumes das duas soluções, em recipientes separados, em banho de gelo fundente para arrefecer a cerca de 0 °C, mediu-se, para outro recipiente, igual volume de solução aquosa de hidróxido de sódio 1,5 mol/L. Juntou-se a solução de nitrito à solução de peróxido de hidrogénio e, imediatamente a seguir, adicionou-se a solução aquosa de hidróxido. Em meio ácido o peroxinitrito é formado e imediatamente a seguir é degradado, embora a adição de hidróxido de sódio pare a formação de peroxinitrito, a finalidade é, fundamentalmente, conservar o que já formou. A cor amarela denuncia a presença de peroxinitrito.

Transferiu-se 1 mL de solução aquosa de peroxinitrito para um eppendorf, adicionaram-se cerca de 13 mg de dióxido de manganês, agitou-se vigorosamente e centrifugou-se a 15000 r.p.m. durante 5 min. O sobrenadante foi então convenientemente diluído com hidróxido de sódio 1 mol/L e estimou-se a concentração por absorção, contra a solução aquosa de hidróxido de sódio 1 mol/L. A absorvidade molar é 1670 L.mol⁻¹.cm⁻¹ ao comprimento de onda de 302 nm. Usou-se solução aquosa de hidróxido de sódio 0,1 mol/L como líquido de diluição do peroxinitrito. As soluções foram preparadas diariamente.

6.2.2.4. Solução aquosa de carbonato de sódio 0,1 mol/L

Pesaram-se 1,0599 g de carbonato de sódio, dissolveu-se e diluiu-se com água desionizada ao volume final de 100 mL. Procedeu-se às respetivas diluições, conforme o necessário, com água desionizada.

6.2.2.5. Solução aquosa de fosfato de sódio 0,1 mol/L

Pesaram-se 1,6394 g de fosfato de sódio, dissolveu-se e diluiu-se com água desionizada ao volume final de 100 mL. Procedeu-se às respetivas diluições com água desionizada.

6.2.2.6. Solução aquosa de superóxido de potássio ($[O_2^-] = 0,1 \text{ mol/L}$)

Pesaram-se 0,0711 g de superóxido de potássio, dissolveu-se e diluiu-se ao volume final com água desionizada. Agitou-se e guardou-se a solução ao abrigo da luz. Solução preparada só quando necessário usar.

6.2.3. Preparação da lactose fluorescente

Colocaram-se cerca de 3,80 g de lactose num balão de fundo redondo de 2 L de capacidade, dissolveu-se e diluiu-se a um litro com água desionizada. Montou-se o sistema de refluxo e deixou-se em ebulição até se obter a intensidade de fluorescência pretendida. Quando necessário, concentrou-se num evaporador rotativo até reduzir o seu volume em 90%. Todas as soluções com a lactose fluorescente foram armazenadas no frigorífico (se usadas dentro de dois ou três dias) ou congelador (para períodos de armazenamento superiores a quatro dias). As soluções aquosas de lactose fluorescente foram usadas após remoção do local de armazenamento e deixadas sobre a banca no laboratório o tempo suficiente para se estabelecer o equilíbrio térmico.

6.2.4. Instrumentação

Os espectros de fluorescência foram registados num Horiba Jovin Yvon Fluoromax 4 TCSPC, entre os 360 e 650 nm, quando excitados com o comprimento de onda de 330 nm, com um tempo de integração de 0,1 s e slits de 5 nm. Medições efetuadas em cuvete de UV em quartzo (Sigma-Aldrich).

A cromatografia líquida foi efetuada em dois equipamentos diferentes, num sistema da ThermoFinnigan (ThermoScientific), que consiste numa bomba SpectraSystem P1000 e um detetor SpectraSystem UV6000LP, e noutra sistema LC-20AD com detetor SPD-M20A da Shimadzu. Em ambos os cromatógrafos usou-se sempre a mesma coluna e loop, uma coluna preparativa Supercisil™ LC-18 (5 µm, 250x4,6 mm) da Supelco (Sigma Aldrich) e um loop de 250 µL o qual era cheio com uma seringa VICI (Valco Instruments Co. Inc.) de 1000 µL. Usou-se água desionizada filtrada (funil de Buchner com placa purososa de vidro fina (0,10-0,16 µm) sob vácuo) e desarejada (ultrasons durante 30 minutos) como solvente com um caudal volumétrico de 1,0 mL/min.

6.2.5. Evolução da fluorescência da lactose fluorescente com o valor de pH

Para uma cuvete de quartzo, colocou-se 1,60 mL de solução de lactose fluorescente e adicionou-se 0,800 mL de solução aquosa de cloreto de sódio a 0,10 mol/L com diferentes valores de pH. Ajustou-se o valor de pH da solução aquosa de cloreto de sódio no aparelho de pH Crimson, por adição de pequenas quantidades de solução aquosa de hidróxido de sódio 1 mol/L (de modo que se percorreu toda a gama de valores de pH alcalinos) ou, por pequenas adições de solução aquosa de ácido clorídrico 1 mol/L (abrange os valores de pH ácidos). O valor de pH é o valor da solução antes da mistura com o sensor lactose fluorescente.

6.2.6. Reversibilidade da fluorescência da lactose modificada

100,0 mL de solução de lactose fluorescente foi seca no evaporador rotativo, a 60°C sob vácuo, e depois secou-se em alto vácuo, à temperatura ambiente durante a noite. Redissolveu-se e diluiu-se o sólido formado com água desionizada ao volume final de 100,0 mL.

6.2.7. Análise de dados

Todos os espectros foram a média de ensaios obtidos em triplicado, à exceção do limite de detecção que usou-se 12 amostras de branco (água desionizada).

Os espectros foram normalizados do seguinte modo: sempre que se iniciava uma série de medidas dos espectros, traçou-se sempre o branco (mesmas condições e com o mesmo fator de diluição). A normalização foi obtida pelo quociente entre a intensidade de fluorescência na presença do analíto pelo valor da intensidade de fluorescência do branco em percentagem. A normalização dos espectros do branco foi obtida pelo quociente entre a média de todos os espectros de branco e o respetivo espectro.

A representação do quociente da intensidade de fluorescência inicial (na ausência do ião hipoclorito) (IF_0) e a intensidade de fluorescência para uma determinada concentração (IF), IF_0/IF , função do logaritmo decimal do inverso dessa mesma concentração (função p da concentração, pX), permitiu dividir a gama das concentrações em 3 partes. Procedeu-se ao ajuste linear em cada uma das zonas, a interceção das retas obtidas são os limites das gamas de concentração. O limite de detecção corresponde ao desvio padrão dos pontos que pertencem à zona, desta representação gráfica, cujo declive não tem significado, logo, não depende da concentração do analíto.

6.3. Resultados

O aquecimento de carboidratos leva à formação de novas substâncias, o cozimento dos alimentos, por exemplo. O processo de caramelização da sacarose, vulgarizado nas cozinhas do mundo inteiro, é um fenómeno essencialmente de desidratação, cisão e rearranjo dos seus constituintes. O açúcar é aquecido a mais de 100 °C, a água evapora e as reações químicas dão-se no seio do açúcar fundido.

O tratamento térmico feito à lactose não é uma caramelização. Procedeu-se a um refluxo, durante dias, da lactose dissolvida em solução aquosa a baixas concentrações, logo tratou-se de um processo hidrotérmico. Por isso nunca chega ao processo de caramelização propriamente dito.

6.3.1. A fluorescência da lactose

A solução aquosa de lactose não apresenta qualquer tipo de fluorescência, no entanto, após 3 a 4 horas em ebulição a solução aquosa começa a adquirir uma ligeira tonalidade amarelada. Amostras arrefecidas desta solução demonstram uma pequena fluorescência a cerca de 430 nm quando excitada a 330 nm. A banda de fluorescência torna-se mais proeminente a partir das 7 horas de refluxo e continua a crescer até cerca das 70 horas. Com o aumento do tempo de refluxo a intensidade de fluorescência sofre um ligeiro decréscimo, pelo menos até ao tempo de 200 horas de refluxo (Fig.6.7).

Igual procedimento com o dissacarídeo não redutor, a sacarose, resultou sempre em soluções que não apresentavam tonalidade amarelada nem tinha fluorescência, mesmo ao fim de 200 horas de refluxo.

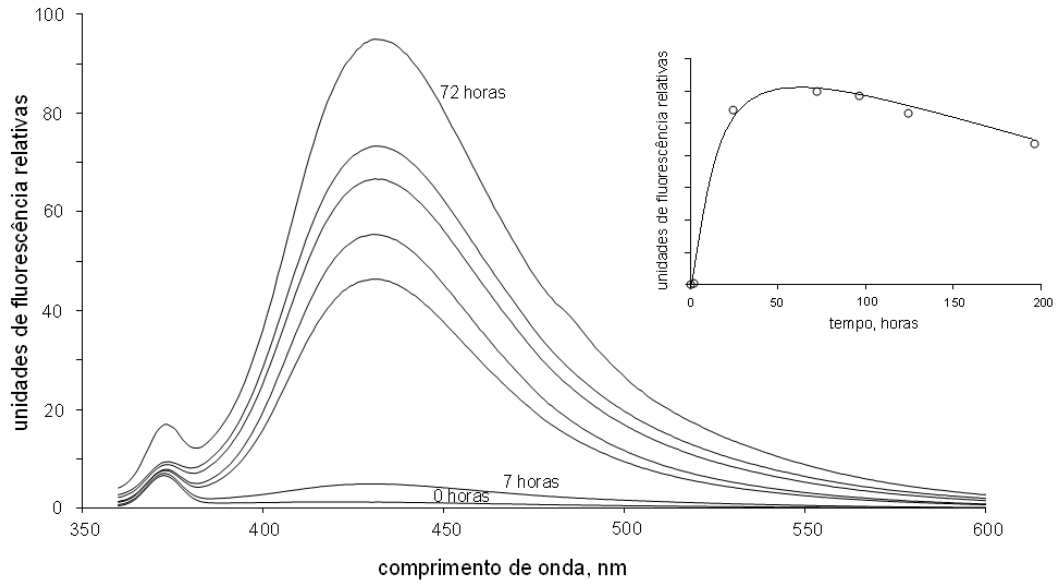


Figura 6.7 – Espectros de emissão da fluorescência ao longo das primeiras 72 horas de refluxo da solução aquosa da lactose. Gráfico pequeno: evolução da intensidade de fluorescência, ao comprimento de onda de 431 nm, para além das 72 horas.

A capacidade de fluorescência decresce abruptamente para valores de pH inferiores a 3 e para valores de pH superiores a 10. Este decréscimo é reversível, pelo menos para valores próximos e durante intervalos de tempo relativamente pequenos, inferiores a 1 hora, em que a solução esteve sujeita a estes valores extremos. Entre os valores de pH 3 e 10 não se verificou variação significativa da fluorescência (Fig.6.8).

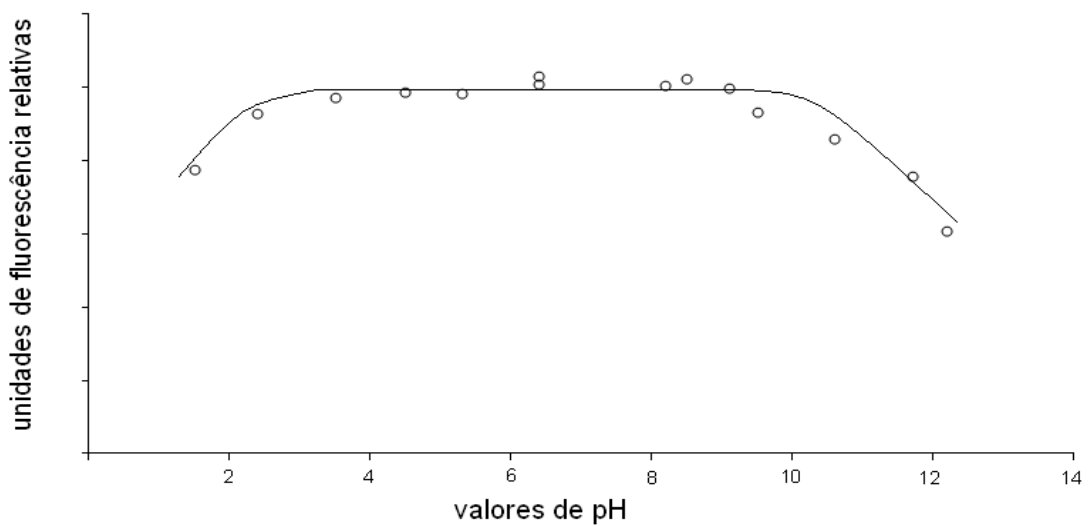


Figura 6.8 – Variação da intensidade de fluorescência a 431 nm com o valor de pH do meio.

A lactose fluorescente depois de produzida pode ser concentrada no evaporador rotativo em vácuo e seca, sem que este procedimento afete a sua capacidade fluorescente e mesmo a capacidade de extinção na presença de analíto, por exemplo na presença de óxido nítrico (Fig.6.9).

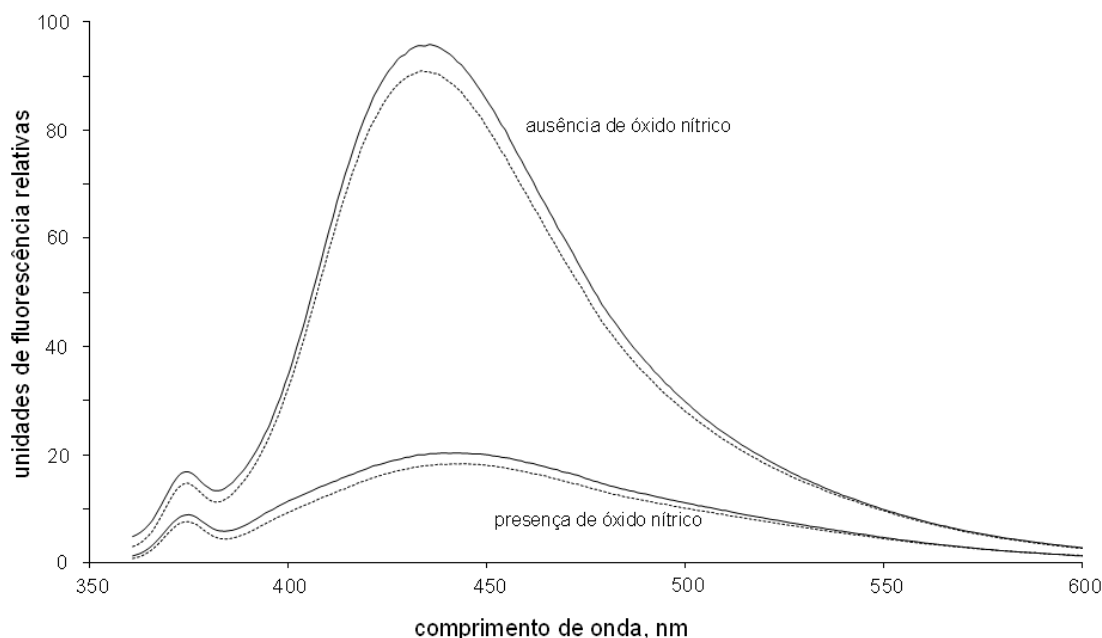


Figura 6.9 – Resposta da lactose fluorescente à ausência e presença de óxido nítrico, da solução de lactose acabada de preparar (linha contínua) e da lactose seca e tornada solução aquosa no mesmo volume (tracejado).

6.3.2. Resposta da lactose fluorescente a diferentes analíto

A lactose obtida por ebulição quando exposta a determinados analíto, nomeadamente espécies químicas com capacidade oxidante, estes provocam a extinção da sua fluorescência (Fig.6.10).

Das espécies reativas de oxigênio e azoto experimentados, o hipoclorito é quem responde a concentrações mais baixas, cerca de $3 \cdot 10^{-6}$ mol/L, provoca extinção abrupta até cerca de $12 \cdot 10^{-6}$ mol/L, concentração acima da qual responde mais suavemente até cerca de $20 \cdot 10^{-3}$ mol/L. A resposta do óxido nítrico e do peroxinitrito é semelhante, se bem que o óxido nítrico provoca extinção para concentrações na

ordem dos $50 \cdot 10^{-6}$ mol/L, por sua vez, o peroxinitrito só começa a responder à concentração de $100 \cdot 10^{-6}$ mol/L. O óxido nítrico só responde até cerca de $1 \cdot 10^{-3}$ mol/L mantendo uma fluorescência remanescente para concentrações superiores a este valor. O peroxinitrito extingue a 100 % a fluorescência para valores superiores a $10 \cdot 10^{-3}$ mol/L.

O superóxido e o nitrito só respondem para valores superiores a cerca de $10 \cdot 10^{-3}$ mol/L. A adição de peróxido de hidrogénio à lactose fluorescente, só obtém resposta para valores de concentração superiores a 0,1 mol/L.

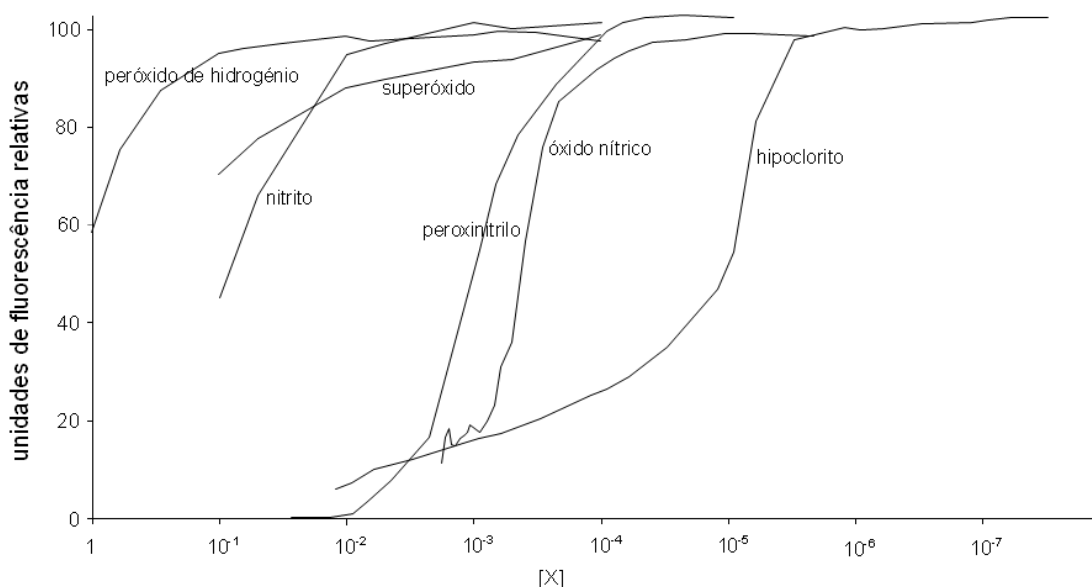


Figura 6.10 – Extinção da fluorescência de algumas espécies reativas de oxigénio e azoto. X representa a concentração do respetivo analito em mol/L.

6.3.3. Aplicação do sensor lactose fluorescente para medição do ião hipoclorito

Sendo o ião hipoclorito a espécie química que provoca extinção da fluorescência a concentrações mais baixas, pode dizer-se que a lactose fluorescente é sensor específico para o ião hipoclorito, pelo menos até ao valor da concentração onde o óxido nítrico começa a responder, cerca de $50 \cdot 10^{-6}$ mol/L (Fig.6.10).

A representação do quociente da intensidade de fluorescência inicial (na ausência do ião hipoclorito) e a intensidade de fluorescência para uma determinada concentração, função do logaritmo decimal do inverso dessa mesma concentração, resulta numa variação que se pode dividir em 3 zonas distintas (Fig.6.11).

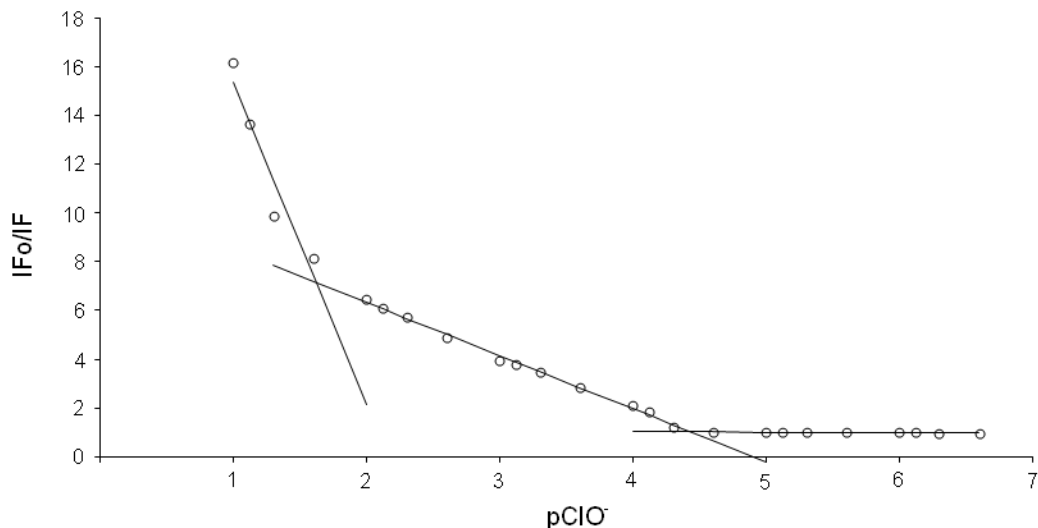


Figura 6.11 – Quociente entre as intensidades de fluorescência relativa inicial e na concentração (IFo/IF) em função da função p da concentração do ião hipoclorito. Linhas são os respectivos ajustes lineares.

O ajuste linear de cada uma destas zonas originou:

$$IFo/IF = 20,5 - 13,2xpClO^- \text{ para a zona de concentrações até } 1,62 \text{ em função } p,$$

$$IFo/IF = 10,7 - 2,18xpClO^- \text{ no intervalo de } [1,62;4,4] \text{ em função } p,$$

$$IFo/IF = 1,1 - 0,02xpClO^- \text{ para valores superiores a } 4,4 \text{ em função } p.$$

Os coeficientes de correlação são: 0,909; 0,995 e 0,884, respetivamente. O valor da correlação da zona central é forte e mostra uma boa linearidade. As baixas correlações nas zonas das extremidades são devidas à pouca linearidade que a zona de mais altas concentrações efetivamente tem e, no lado oposto, ao quase inexistente declive, embora com uma excelente linearidade. Os limites das diferentes zonas foram obtidos pela interceção dos diferentes ajustes lineares.

Três vezes o desvio padrão de doze brancos correspondem a 0,044 IFo/IF, ou seja com um nível de significância de 99,7 %, esse valor corresponde a um PCIO⁻ de 4,9, logo, uma concentração de hipoclorito de $12,6 \cdot 10^{-6}$ mol/L. Este valor é inferior ao limite inferior do ajuste linear para esta zona.

6.3.4. Composição da lactose modificada fluorescente

Pela análise preliminar de espectroscopia de massa concluiu-se que o produto da ebulição da lactose não era um único composto, apresentava-se com inúmeros picos que sugere a existência de variados compostos com diferentes massas moleculares. No sentido de separar e para posterior caracterização dos possíveis diferentes constituintes, procedeu-se à separação por cromatografia líquida. A separação com maior número de picos, indicadores da presença de diferentes compostos, foi conseguida em água, com um fluxo de 1 mL por minuto em que se usou uma quantidade de amostra de 0,250 mL (Fig.6.12). Crê-se tratar-se de substâncias diferentes pois as diferentes frações apresentam espectros de absorção diferentes (Fig.6.13).

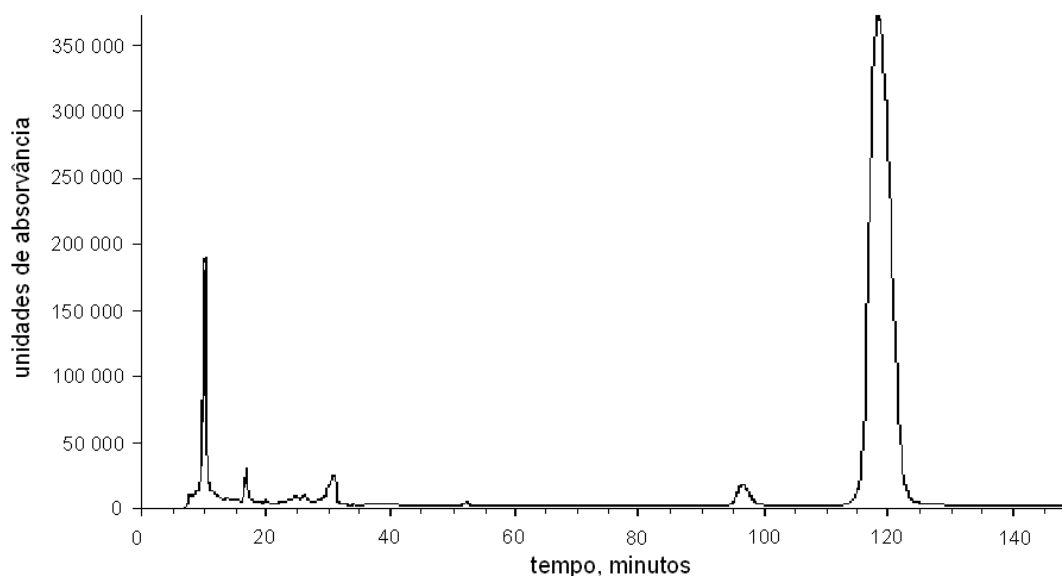


Figura 6.12 – Cromatograma típico da lactose fluorescente obtido em água desionizada.

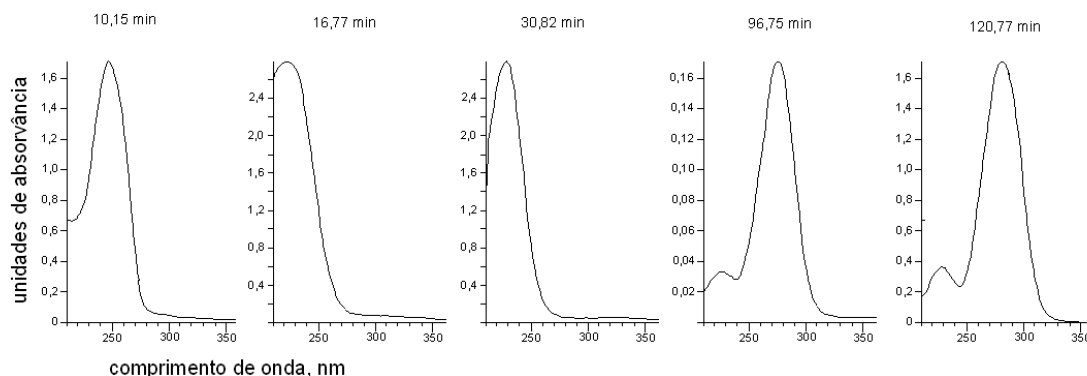


Figura 6.13 – Absorvância das frações aquosas retiradas a tempos diferentes correspondente ao cromatograma da Fig.6.12.

Foram recolhidas as diferentes frações de solução e colecionadas ao fim de um grande número de corridas, juntas, concentradas no evaporador rotativo e liofilizadas. Os sólidos assim obtidos foram analisados por ressonância magnética nuclear, no entanto as quantidades obtidas por este método continuam a ser insuficientes para se obter espectros capazes de serem interpretados, mesmo usando tempos de integração de 48 horas.

6.4. Conclusões

A lactose fluorescente é obtida por ebulição aquosa de uma solução diluída de lactose. O produto final adquire capacidade de fluorescência e reage com determinados analitos provocando extinção da fluorescência. As espécies reativas de oxigénio e azoto que respondem a menores concentrações são o hipoclorito e o óxido nítrico.

A separação dos constituintes da lactose fluorescente é um meio para proceder a sua caracterização, no entanto, embora o recurso a uma coluna preparativa ter-se mostrado eficiente na separação, este processo produz quantidades de frações muito diluídas e em reduzida quantidade. Transpôr a separação para uma coluna de enchimento com a resina C-18 pode ser a solução para se poder obter quantidades apreciáveis das diferentes frações, não só para se proceder à devida caracterização físico-química como descortinar qual das frações é responsável pelos fenómenos, quer da fluorescência quer da extinção da mesma.

A lactose é um subproduto sem grande utilização industrial, é barato e não tóxico. As perspetivas da lactose fluorescente ser usada como sensor para espécies reativas de oxigénio e azoto são promissoras, responde a níveis muito baixos de hipoclorito e óxido nítrico, parece não apresentar toxicidade, logo pode-se pensar em utilizações *in vivo* e pode ser um excelente candidato para funcionalizar nanopartículas, conferindo-lhe capacidade sensor e diminuir a sua toxicidade. Este trabalho ainda se encontra em execução.

6.5. Bibliografia

- [1] P. F. Fox, P. L. H. McSweeney, 1998, Dairy Chemistry and Biochemistry, Clackie Academic & Professional. Chapman & Hail, London.
- [2] H. van Bakkum, H. Roper, F. Voragen, 1994, "Carbohydrates as Organic Raw Material III", VCH, Wageningen, The Netherlands
- [3] K. Brew, R. L. Hill, 1975, Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology, 72, 105-152.
- [4] M. G. Ganzle, G. Haase, P. Jelen, 2008, International Dairy Journal, 18, 685-694.
- [5] N. Seki, H. Saito, 2012, International Dairy Journal, 22, 110-115.
- [6] F. Majd, T. A. Nickerson, 1978, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 26 (1), 207-210.
- [7] N. drapier-Beche, J. Fanni, M. Parmentier, 1999, Journal of Dairy Science, 2558-2563.
- [8] E. O. Whittier, 1925, Chemical Reviews, 2, 85-125.
- [9] W. M. Corbett, J. Kenner, 1953, Journal of the Chemical Society, 2245-2247.
- [10] H. Cho, D. Rai, N. J. Hess, Y. Xia, L. Rao, 2003, Journal of Solution Chemistry, 32 (8), 691-702.
- [11] Q. Husain, 2010, Critical Reviews in Biotechnology, 30 (1), 41-62.
- [12] A. Park, D. Oh, 2010, Applied Microbiology and Biotechnology, 85 (5), 1279-1286.
- [13] P. S. Panesar, R. Panesar, R. S. Singh, J. F. Kennedy, H. Kumar, 2006, Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 81, 530-543.
- [14] G. R. Gilson, M. B. Roberfroid, 1995, Journal of Nutrition, 125, 1401-1412.
- [15] R. R. Mahoney, 1998, Food Chemistry, 62 (2), 147-154.
- [16] Y. J. Lee, C. S. Kim, D. K. Oh, 2004, Applied Microbiology and Biotechnology, 64, 787-793.

- [17] N. Onishi, A. Yamashiro, K. Yokozeki, 1995, *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (11), 4022-4025.
- [18] J. H. Southard, F. O. Belzer, 1995, *Annual Review of Medicine*, 46, 235-247.
- [19] L. Gutiérrez, S. Hamoudi, K. Belkacemi, 2012, *International Dairy Journal*, 26, 103-111.
- [20] M. Satory, M. Furlinger, D. Haltrich, K. D. Kulber, F. Pittner, B. Nidetzky, 1997, 19 (12), 1205-1208.
- [21] J. Kuusisto, A. V. Tokarev, E. V. Murzina, M. U. Roslund, J. Mikkola, D. Y. Murzin, T. Salmi, 2007, *Catalysis Today*, 212, 92-99.
- [22] J. Kuusisto, J. Mikkola, M. Sparv, J. Warna, H. Karhu, T. Salmi, 2008, *Chemical Engineering Journal*, 139, 69-77.
- [23] G. G. Pan, L. D. Melton, 2007, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 10036-10042.
- [24] E. H. Ajandouz, L. S. Tchiakpe, F. D. Ore, A. Benajiba, A. Puigserver, 2001, *Food Chemistry and Toxicology*, 66 (7), 926-931.
- [25] M. A. C. Quintas, T. R. S. Brandão, C. L. M. Silva, 2007, *Journal of Food Engineering*, 83, 483-491.
- [26] <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/137.pdf>, consultado a 02 de Agosto de 2012.
- [27] J. Vranová, Z. Ciesarová, 2009, *Czech Journal of Food Sciences*, 27 (1), 1-10.
- [28] X. Huang, H. Duan, S. A. Barringer, 2011, *LWT- Food Science and Technology*, 44, 1761-1765.
- [29] J. Tuteja, S. Nishimura, K. Ebitani, 2012, *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 85 (3), 275-281.
- [30] F. J. Morales, C. Romero, S. Jiménez-Pérez, 1995, *Food Chemistry*, 57 (3), 423-428.
- [31] J. Calvarro, V. Gokmen, F. J. Morales, 2009, *European Food Research and Technology*, 229, 843-851.
- [32] S. Pou, S. Y. Nguyen, T. Gladwell, G. M. Rosen, 1995, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1244, 62-68.

7. Conclusões e perspetivas de futuro

Espécies reativas de oxigénio e azoto são moléculas, iões ou radicais constituídos por oxigénio e também por azoto, respetivamente. São originadas no interior das células durante as reações químicas da cadeia respiratória e desempenham funções preponderantes na vida das células. Concentrações adequadas são essenciais para um bom funcionamento dos seres vivos e na transmissão de informação intracelular e, principalmente nos seres vivos pluricelulares, nas interações intercelulares. No entanto, os desvios às quantidades ótimas provocam distúrbios e conseqüentemente são responsáveis por doenças, pelo envelhecimento e mesmo pela morte dos seres vivos.

As espécies reativas de oxigénio e azoto têm tempos de vida muito reduzidos, genericamente bastante inferiores a um segundo, e estão presentes em meios de constituição diversificada e bastante complexa. Encontrar sistemas de deteção e quantificação destas espécies químicas é um grande desafio pluridisciplinar que encontra na química o fulcro da deteção e quantificação. No entanto, traduzir uma qualquer característica química em algo passível de ser mensurável é também um repto de difícil concretização devido às reduzidas dimensões dos meios onde habitam, ao tempo de vida e, principalmente, às reduzidas concentrações que as espécies reativas de oxigénio e azoto se encontram.

A luminescência, particularmente a quimioluminescência e a fluorescência, é uma técnica simples, seletiva, restrita de uma família reduzida de substâncias, e capaz de detetar e medir quantidades muito reduzidas de material que emita radiação luminosa, mesmo inserida em meios tão complexos como os meios citoplasmáticos.

7.1. Conclusões

Foram desenvolvidos com sucesso alguns sistemas sensores químicos para espécies reativas de oxigénio e azoto.

O peróxido de hidrogénio foi doseado com estruturas obtidas pelo processo de Sol-Gel, constituídas essencialmente por sílica e oxigénio, impregnadas com luminol e catião cobalto(II). A resposta quimiluminescente do sistema sensor foi conduzida através duma fibra ótica com 1 mm de diâmetro até ao detetor. Este conjunto sistema sensor - fibra ótica - detetor responde linearmente a soluções aquosas de peróxido de hidrogénio de alguns micromolar até cerca de 2 milimolar. A medição da quimioluminescência através da imobilização do sensor químico e condução da radiação por uma fibra ótica é uma via muito interessante, porque permite pensar em sistemas sensores acoplados a fibras óticas para o controlo remoto de espécies reativas de oxigénio e azoto.

O óxido nítrico em solução aquosa foi avaliado pela oxidação da fluoresceinamina reduzida na presença do catião cobalto(II). O seu baixo custo, a grande seletividade e a rapidez de resposta são as características que conferem grandes potencialidades deste sensor. Usando um equipamento com alguns constituintes de conceção artesanal e a sua acoplação feita através de fibras óticas, este sistema tem uma resposta fluorescente linear na gama de 10 a 750 micromolar.

O ião hipoclorito e a molécula óxido nítrico foram doseados por extinção da fluorescência da lactose modificada. A lactose é um subproduto da indústria alimentar, abundante e de reduzido custo, que pode ser convertido num sensor químico para espécies reativas de oxigénio e azoto. Embora ainda não se saiba quais as estruturas da lactose modificada, pensa-se que não são tóxicas (por analogia com os derivados da reação de Millard ou do processo de caramelização), vantagem de se poder incorporar o sensor em medições in vivo, apesar da interferência mutua entre os iões hipoclorito e óxido nítrico. No entanto, este sensor é relativamente mais sensível ao ião hipoclorito, tendo um intervalo de linearidade logarítmica a duas retas entre 0,1 molar e 13 micromolar e entre 13 e 50 micromolar é seletivo ao hipoclorito.

Otimizou-se a síntese de várias nanoestruturas semicondutoras, nomeadamente de cádmio/telúrio e cádmio/selénio. As diferentes técnicas de síntese,

estabilização e funcionalização dos quantum dots adaptadas para sensores de espécies reativas de oxigénio e azoto nunca foram demonstradas positivamente.

Durante todo o trabalho houve sempre a preocupação de usar equipamentos adaptados às necessidades. A otimização dos equipamentos, compostos por diferentes partes, algumas construídas no laboratório, e interligadas por fibras óticas, foram sempre a solução seguida e mostraram-se ser soluções flexíveis, satisfatórias ao propósito utilizado e económicas.

7.2. Perspetivas de futuro

O desenvolvimento de sistemas sensores que permitam a deteção remota de analitos por simples imersão de uma fibra ótica, cuja extremidade contenha o sistema sensor químico é já uma realidade. Desenvolver mais e novos sensores químicos que tenham boas características luminescentes, boa seletividade e sejam economicamente interessantes, não é um assunto que se esgote num trabalho.

Os sensores apresentados mostram a possibilidade de podermos fazer mais com melhores características e mais económicos. O recurso aos quantum dots de Cd/Te e Cd/Se é uma forte possibilidade que ainda necessita de experimentação na funcionalização, imobilização e caracterização. O fato de não se ter conseguido resultados positivos, apenas mostrou que a teorização dos procedimentos à volta do tema não se encontra estabelecida e requer, também, maior estudo e compreensão acerca dos fenómenos e dos fatores que levam à formação das nanopartículas, da constituição e modificação da camada superficial das nanopartículas, responsável por tornar os quantum dots sensíveis à presença de um determinado analito. Nanopartículas de CdTe e CdSe têm uma vasta gama de comprimentos de onda de excitação e o seu elevado rendimento quântico são premissas bastantes para continuar a estudar modos e maneiras de os tornar sensores de espécies reativas de oxigénio e azoto, mesmo tendo contra a elevada toxicidade dos seus constituintes.

A monitorização da presença de espécies reativas de oxigénio e azoto e respetivas quantidades, em tempo real e de modo evasivo é de importância fundamental. Procedimentos mais fáceis, expeditos e económicos de visualizar a

presença destas espécies reativas pode mudar o modo como vemos o funcionamento celular, não só na perspectiva de compreender o seu funcionamento, mas também, no modo como poderemos atuar sobre determinadas patologias, corrigindo, por exemplo, as respetivas concentrações anómalas.

U. PORTO

FC FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DO PORTO

