

Nuno Ricardo Esteves Ferreira

**DETECÇÃO ELECTROQUÍMICA DE ÓXIDO NÍTRICO
EM FATIAS DE HIPOCAMPO DE RATO COM
MICROELÉCTRODOS DE FIBRA DE CARBONO**



**Universidade de Coimbra
Faculdade de Farmácia**

2006

**DETECÇÃO ELECTROQUÍMICA DE ÓXIDO NÍTRICO EM
FATIAS DE HIPOCAMPO DE RATO COM MICROELÉCTRODOS
DE FIBRA DE CARBONO**

Nuno Ricardo Esteves Ferreira

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da
Universidade de Coimbra para a obtenção do grau de
Mestre em Tecnologias do Medicamento na área de
Bioquímica

VII Curso de Mestrado em Tecnologia do Medicamento

**Universidade de Coimbra
Faculdade de Farmácia**

2006

Este trabalho foi levado a cabo nos laboratórios de Bioquímica e de Métodos Instrumentais de Análise da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, sob a orientação dos Professores Doutores João Laranjinha e Rui Barbosa.

“Corrigir ajuda, encorajar ajuda ainda mais”

Goethe

Durante esta caminhada fui corrigido várias vezes, o que sem dúvida ajudou o desenvolvimento deste trabalho. Mas o que realmente me fez avançar com muita determinação e entusiasmo, foram as palavras de encorajamento que sempre recebi de todos aqueles que me rodeiam.

Assim, gostava de agradecer ao Professor Doutor João Laranjinha e ao Professor Doutor Rui Barbosa por não se limitarem a serem meros orientadores científicos e terem sido verdadeiros orientadores no modo de estar e sentir a ciência, constituindo-se como um exemplo a seguir. Além disso, gostava de vos agradecer a honra da vossa amizade.

Gostaria também de agradecer a todos os professores do laboratório e da faculdade de farmácia pelos valiosos ensinamentos transmitidos, assim como à Fundação Ciência e Tecnologia, pela bolsa POCTI/BCI/42365/2001, que possibilitou a realização destes estudos.

À irmandade da bioquímica, que mais que bons colegas, se tornaram excelentes amigos e companheiros. A vós também o meu muito obrigado.

A todos os que não fazem parte do laboratório de bioquímica, mas que também fazem parte da minha vida, obrigado por me brindarem com a vossa amizade e companhia e me estimularem a ser cada vez melhor.

Por fim, gostava de agradecer especialmente à minha adorada família, pais e irmã, por terem tornado possível todo este percurso, apesar das dificuldades que muitas vezes sentiram para o conseguirem. Aquilo que fui, sou e alguma vez serei, devo-o a vós!

“Todo o homem que encontro me é superior em alguma coisa. E, nesse particular, aprendo com ele.”

(Emerson)



ÍNDICE

Abreviaturas	i
RESUMO.....	4
ABSTRACT	6
1. INTRODUÇÃO.....	8
1.1. Propriedades físico-químicas do óxido nítrico	8
1.2. Reactividade no meio biológico.....	9
1.2.1. Reacção com oxigénio molecular	10
1.2.2. Reacção com o anião superóxido	11
1.2.3. Reacção com outros radicais livres	12
1.2.4. Reacções com metais de transição livres ou ligados a proteínas	12
1.2.4.1. Guanilato ciclase solúvel	13
1.2.4.2. Hemoglobina	14
1.2.4.3. Catalase	15
1.3. Tempo de vida.....	15
1.4. O óxido nítrico mensageiro intercelular.....	16
1.4.1. Biossíntese de óxido nítrico	16
1.4.2. Óxido nítrico sintases.....	17
1.4.3. Cofactores.....	20
1.5. Relevância fisiológica do óxido nítrico	21
1.5.1. Regulação do tónus vascular	21
1.5.2. Modulação da resposta imunitária	22
1.5.3. O óxido nítrico neuromodulador	22
1.5.3.1. Difusão e regulação da actividade do óxido nítrico no cérebro	23
1.5.3.2. Alvos do óxido nítrico em mecanismos fisiológicos e patológicos	26
1.6. Hipocampo	28
1.7. Detecção e quantificação do óxido nítrico	30
1.7.1. Colorimetria	30
1.7.2. Quimioluminescência	31
1.7.3. Fluorimetria.....	32
1.7.4. Ressonância paramagnética electrónica.....	32
1.7.5. Electroquímica.....	33
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
2.1. Soluções.....	37
2.1.1. Electrólito de suporte	37
2.1.2. Soluções para modificação dos microeléctrodos	37
2.1.3. Soluções padrão de óxido nítrico	38
2.1.4. Soluções para calibração do sensor ISO-NOP	40
2.1.5. Soluções para os ensaios de selectividade	41
2.1.6 Soluções utilizadas na medição de óxido nítrico em fatias de hipocampo de rato.....	42

2.2. Técnicas electroquímicas	43
2.2.1. Voltametria cíclica	44
2.2.2. Voltametria de onda quadrada.....	45
2.2.3. Amperometria	47
2.3. Eléctrodos	47
2.3.1. ISO-NOP 2 mm Pt	47
2.3.2. Calibração do sensor ISO-NOP 2 mm Pt	48
2.3.3. Microeléctrodos de fibra de carbono	49
2.4. Modificação química dos microeléctrodos de fibra de carbono	53
2.4.1. Nafion [®] :	53
2.4.2. o-PD:	53
2.5. Caracterização dos microeléctrodos de fibra de carbono modificados com Nafion [®] e o-PD	54
2.5.1. Microscopia de varrimento electrónico	54
2.5.2. Sistema de análise por injeção em fluxo	56
2.5.3. Voltametria cíclica de varrimento rápido.....	58
2.5.4. Sensibilidade	59
2.5.5. Limite de detecção	60
2.5.6. Selectividade	60
2.5.7. Tempo de resposta	60
2.6. Monitorização do óxido nítrico nas fatias de hipocampo	61
2.6.1. Preparação das fatias de hipocampo.....	61
2.6.2. Sistema experimental	61
2.7. Análise dos resultados	64
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
3.1. Medida da libertação de óxido nítrico a partir do DETA/NO	65
3.2. Caracterização dos microeléctrodos de fibra de carbono	68
3.2.1. Potencial de oxidação do óxido nítrico	68
3.2.2. Sensibilidade	75
3.2.2.1. Calibração em fluxo	75
Dimensão das fibras	79
Espessura de filme depositado	79
Hidrofobicidade dos filmes poliméricos	79
3.2.2.2. Calibração em modo estacionário	80
3.2.2.3. Calibração com óxido nítrico preparado a partir do gás	82
3.2.3. Limite de detecção	88
3.2.4. Selectividade	90
3.2.5. Tempo de resposta	93
3.3. Monitorização de óxido nítrico em fatias de hipocampo	94
3.3.1. Produção de óxido nítrico por estímulo do receptor NMDA	94

3.3.2. Relação entre a produção de óxido nítrico e a concentração de NMDA	96
3.3.3. Relação entre a produção de óxido nítrico e estímulos consecutivos de NMDA.....	98
4. CONCLUSÕES	100
5. BIBLIOGRAFIA	101



ABREVIATURAS

Abreviaturas

5-HT	5-hidroxitriptamina
aa	aminoácido
AA	ácido ascórbico
AAO	ácido ascórbico oxidase
aCSF	fluido cerebrospinal
CA1	cornu ammonis 1
CA2	cornu ammonis 2
CA3	cornu ammonis 3
CaM	calmodulina
cAMP	adenosina monofosfato cíclica
cGMP	guanosina monofosfato cíclica
Cys	cisteína
DA	dopamina
DAN	2,3-diaminonaftaleno
DETA/NO	óxido nítrico dietilenotriamina
DNA	ácido desoxirribonucleico
DOPAC	ácido 3,4-dihidroxifenilacético
DPA	amperometria de impulso diferencial
DPV	voltametria de impulso diferencial
DTPA	dietilenotriamina penta acetato
e ⁻	eléctron
EA	eléctrodo auxiliar
EDRF	factor de relaxamento derivado do endotélio
EFC _R	Eléctrodos de fibra de carbono revestidos com uma camada de Nafion [®] e o-PD
E _f	potencial final
E _i	potencial inicial
E _{máx}	potencial máximo
E _{mín}	potencial mínimo
eNOS	óxido nítrico sintase endotelial
ER	eléctrodo de referência
ET	eléctrodo de trabalho
FAD	dinucleótido de flavina adenina
FCV	voltametria cíclica de varrimento rápido

FIA	análise por injeção em fluxo
FMN	mononucleótido de flavina
GCs	guanilato ciclase solúvel
GPES	"general purpose electrochemical system"
GSH	glutatião
H ₄ B	6R-5,6,7,8-tetrahidro-biopterina
Hb	hemoglobina
HbNO	nitrosohemoglobina
HIV	voltímetro de elevada impedância de entrada
I NOS	óxido nítrico sintase neuronal
i.d.	diâmetro interno
II NOS	óxido nítrico sintase indutível
III NOS	óxido nítrico sintase endotelial
IL-1	interleucina 1
INF γ	interferão gama
iNOS	óxido nítrico sintase indutível
L-arg	L-arginina
L-glu	L-glutamato
L-NHA	N ^G -hidroxi-L-arginina
LO \cdot	radical alcóxido
LOD	limite de detecção
LOO \cdot	radical peróxido
LPS	lipopolissacarídeo
LTP	potenciação a longo termo
m	declive
MDP	muramilo dipeptídeo
metHb	meta-hemoglobina
m-PD	meso-fenilendiamina
n.r.	não reportado
NADPH	fosfato de nicotinamida adenina-dinucleótico (reduzido)
NANC	não adrenérgico não colinérgico
Ni TSPc	tetrassulfonato níquel (II) ftalocianina
Ni(II)TMHPP	níquel (II) tetraquis (3-metoxi-4-hidroxifenil porfirina)
NMDA	N-metil-D-aspartato
nNOS	óxido nítrico sintase neuronal
NOS	óxido nítrico sintase

o.d.	diâmetro externo
o-PD	orto-fenilenodiamina
oxiHb	oxihemoglobina
oxiMb	oximioglobina
PBS	tampão fosfato salino
PDZ	domínio de atracção proteica
PPDA	poli (dialildimetil-amónia cloreto)
PSD-95	proteína densidade pós-sináptica 95
resor	resorcinol
RPE	ressonância paramagnética electrónica
SCE	eléctrodo de calomelanos saturado
SEM	microscopia de varrimento electrónico
SNAP	S-nitroso-N-acetil-D,L-penicilamina
SNC	sistema nervoso central
SNO-Hb	S-nitrosohemoglobina
SOD	enzima superóxido dismutase
SWV	voltametria de onda quadrada
TNF α	factor de necrose tumoral
α -CD	alfa-ciclodextrina



RESUMO

RESUMO

Na década de 80 o óxido nítrico (NO) foi identificado como o factor de relaxamento do endotélio (EDRF) e, desde então, tem havido um grande esforço no sentido de esclarecer a química, biologia e acções farmacológicas desta molécula. O NO é um gás hidrofóbico de natureza radicalar e com curto tempo de vida, que se difunde rapidamente no meio celular. As características físico-químicas desta molécula permitem que seja considerado um mensageiro intercelular atípico, nomeadamente o facto de a informação que veicula estar associada à dinâmica de concentração no tempo e no espaço de um modo independente da interacção com receptores membranares específicos. O NO é produzido por via enzimática pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) cuja activação leva à conversão da L-arginina em óxido nítrico e L-citrulina e está envolvido numa miríade de processos fisiológicos que incluem, entre outros, a vasodilatação, o relaxamento muscular liso, a resposta imune, inibição da agregação plaquetar, estando também envolvido a nível cerebral em fenómenos de neurotransmissão e neurodegenerescência.

Enquanto neuromodulador, o NO possui propriedades muito especiais, uma vez que não é armazenado em vesículas e se difunde rapidamente através das células onde é produzido para as células vizinhas, actuando assim numa área localizada do sistema nervoso central. A nível neuronal, a produção de NO ocorre via activação do receptor NMDA do glutamato, que inicia uma cascata de eventos intracelulares que modulam a plasticidade sináptica, o desenvolvimento, a aprendizagem e a memória de acordo com os modelos de potenciação e inibição de longo prazo. A activação excessiva destes receptores está na base do desenvolvimento de processos patológicos conducentes a fenómenos neurodegenerativos, como por exemplo a doença de Parkinson ou Alzheimer.

Um dos principais problemas no estudo da actividade biológica do NO é a determinação da sua concentração *in vivo*. A falta de dados quantitativos robustos levou à formulação simplista do dogma segundo o qual o NO é uma toxina para elevadas concentrações e um modulador fisiológico para baixas concentrações. No entanto não se conhece com rigor a concentração de NO nos tecidos e em particular no cérebro.

Portanto, o desenvolvimento de metodologias analíticas para a medição do NO *in vivo* é de uma grande relevância biológica e biomédica.

A maioria das metodologias são indirectas, quantificando produtos de oxidação ou decomposição do NO (e.g. espectrofotometria, colorimetria). As técnicas

electroquímicas permitem a medição directa em tempo real e com a utilização de microeléctrodos alia-se a resolução temporal a uma elevada resolução espacial.

Este trabalho teve como objectivo principal o desenvolvimento e caracterização de microeléctrodos de fibra de carbono modificados quimicamente com Nafion[®] e orto-fenilenodiamina (o-PD). Depois da sua construção, procedeu-se a uma avaliação sistemática das suas características analíticas.

Assim, o potencial de oxidação do $\dot{\text{N}}\text{O}$ ($+ 0,78 \pm 0,02 \text{ V}$) foi determinado por voltametria de onda quadrada. Os microeléctrodos foram posteriormente calibrados por amperometria a $+ 0,9 \text{ V}$, obtendo-se um valor médio de sensibilidade de $954 \pm 217 \text{ pA}/\mu\text{M } \dot{\text{N}}\text{O}$. Foram ainda caracterizados no que diz respeito ao limite de detecção ($6 \pm 2 \text{ nM } \dot{\text{N}}\text{O}$), tempo de resposta ($t_{50\%} 1,9 \pm 0,1 \text{ s}$) e selectividade contra potenciais interferentes com a sua detecção.

Esta primeira parte do trabalho serviu de base para a realização de estudos posteriores que envolveram a medição em tempo real da dinâmica de produção e decaimento de $\dot{\text{N}}\text{O}$ em fatias de hipocampo de rato. Neste âmbito, foram delineados três tipos de experiências: em primeiro lugar foi estimulada a produção de $\dot{\text{N}}\text{O}$ através da activação do receptor NMDA do glutamato com diferentes estímulos, tendo sido calculada uma carga total média de $95 \pm 8 \text{ nC}$, $n=4$ para os estímulos com 5 mM de L-glutamato e de $197 \pm 38 \text{ nC}$, $n=3$ para os estímulos com $10 \mu\text{M}$ de NMDA. De seguida, foi avaliada a intensidade da resposta em função da concentração de estímulo utilizada ($800 \pm 100 \text{ nM}$ de DETA/ $\dot{\text{N}}\text{O}$ para o estímulo de $10 \mu\text{M}$ de NMDA, $6,7 \pm 2,0 \mu\text{M}$ de DETA/ $\dot{\text{N}}\text{O}$ para o estímulo de $25 \mu\text{M}$ de NMDA e $13,0 \pm 3,0 \mu\text{M}$ de DETA/ $\dot{\text{N}}\text{O}$ para o estímulo de $50 \mu\text{M}$ de NMDA. O terceiro conjunto de experiências teve como objectivo a avaliação do perfil de resposta após estímulos consecutivos da mesma fatia de hipocampo (o primeiro estímulo produziu uma carga total de 41 nC enquanto que o segundo produziu uma carga total de $4,5 \text{ nC}$), ocorrendo um decaimento da intensidade do sinal de $80 \pm 10\%$ do primeiro para o segundo estímulo, em termos de carga total.



ABSTRACT

ABSTRACT

During the 80's NO was identified as the endothelium derived relaxing factor (EDRF). Since then, intense research has been conducted in order to elucidate its chemistry, biology and pharmacological actions. NO is a hydrophobic gas with a short half-life ($t_{1/2}$), that rapidly diffuses across cellular media. NO physical and chemical properties make it an unusual intercellular messenger as it conveys information according to its concentration dynamics in time and space and not to by the "traditional" membrane-receptor interaction.

NO is produced by stimulation of nitric oxide synthase (NOS), whose activation converts L-arginine in L-citruline and NO . This molecule is involved in a number of physiopathological processes such as vasodilation, smooth muscle relaxation, immune response and inhibition of platelet adhesion. It is also involved in neurotransmission and neurodegenerescence.

As a neuromodulator, NO possesses special features, as it is not stored in vesicles and it diffuses rapidly form source cells to neighbour cells, acting in a localized area of the central nervous system. Neuronally, NO production occurs via activation of the NMDA receptor for glutamate, initiating a sequence of events that modulate synaptic plasticity, learning and memory according to long term potentiation models. An excessive activation of these receptors may be the basis of the appearance of neurodegenerative processes leading to Parkinson's and Alzheimer's disease.

The determination of NO concentration in vivo is the main problem in the study of its biological activity. The lack of robust quantitative data lead to the idea that NO works as a toxin for high concentrations and as a physiological modulator for low concentrations. However, NO concentration in tissues, particularly in brain, is still not accurately known.

As a result of this, the development of analytical methodologies capable of making NO measurements in vivo is essential.

Most of these methodologies are not direct, quantifying NO oxidation or degradation products (e.g. spectrophotometry, colourimetry). Electrochemical methods allow direct and real time measurements in vivo, and carbon fibre microelectrodes have high spatial and temporal resolution.

The main objective of this work was the development and characterization of carbon fibre microelectrodes modified with one Nafion[®] layer and *o*-phenylenediamine. Following microelectrodes construction, they were analytically characterized.

$\dot{\text{NO}}$ peak potential was evaluated by square wave voltammetry ($+ 0,78 \pm 0,02 \text{ V}$). Afterwards, microelectrodes were calibrated by amperometry at a constant potential of $+ 0,9 \text{ V}$. the mean sensitivity of microelectrodes was $954 \pm 217 \text{ pA}/\mu\text{M } \dot{\text{NO}}$. They were also characterized in terms of detection limit ($6 \pm 2 \text{ nM } \dot{\text{NO}}$), response time ($t_{50\%} 1,9 \pm 0,1 \text{ s}$) and selectivity against potential interferents.

The first part of this work was the basis to posterior studies involving real time measurements of $\dot{\text{NO}}$ production and decay dynamics in rat hippocampal brain slices. Three different kinds of experiments were performed: first, $\dot{\text{NO}}$ production was stimulated via NMDA receptor activation with different stimuli and an average global charge of $95 \pm 8 \text{ nC}$, $n=4$ was calculated for stimuli with 5 mM L-glutamate and $197 \pm 38 \text{ nC}$, $n=3$ for stimuli with $10 \mu\text{M NMDA}$. In a second set of experiments, evaluation of response intensity according to the used stimuli concentration was made ($800 \pm 100 \text{ nM}$ of DETA/NO for $10 \mu\text{M NMDA}$, $6,7 \pm 2,0 \mu\text{M}$ of DETA/NO for $25 \mu\text{M NMDA}$ and $13,0 \pm 3,0 \mu\text{M}$ of DETA/NO for $50 \mu\text{M NMDA}$). The third group of tests was made to evaluate $\dot{\text{NO}}$ production via NMDA receptor as a consequence of multiple stimuli of the same hippocampal slice (with a global charge calculated for the first signal of 41 nC and $4,5 \text{ nC}$ for the second signal), with a decay of $80 \pm 10\%$ from the first stimuli to the second, in terms of global charge.



INTRODUÇÃO

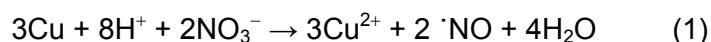
1. INTRODUÇÃO

1.1. Propriedades físico-químicas do óxido nítrico

Após a demonstração da relevância que o óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$) tem nos fenómenos de vasodilatação do músculo liso (Ignarro *et al.*, 1987; Palmer *et al.*, 1987; Moncada *et al.*, 1989), o interesse no estudo desta biomolécula não tem cessado de aumentar. Ao $\cdot\text{NO}$ têm sido atribuídas diversas actividades fisiológicas, desde a regulação da pressão sanguínea e adesão plaquetar até à agregação de neutrófilos, neurotransmissão e plasticidade sináptica, constituindo-se como um mensageiro intercelular de natureza radicalar com curto tempo de vida. Assim, o $\cdot\text{NO}$ é actualmente considerado um regulador fisiológico dos principais órgãos e sistemas. Por outro lado, o $\cdot\text{NO}$ e os seus oxidantes secundários são agentes citotóxicos produzidos por macrófagos e neutrófilos activados, tendo também implicações na neurodegenerescência (Beckman, 1996).

O $\cdot\text{NO}$ é um gás hidrofóbico e paramagnético e, tal como o O_2 e o CO , é relativamente solúvel em água. O $\cdot\text{NO}$ é uma das espécies radiculares no meio biológico com menor reactividade (Henry, 1997 a).

Em 1772 Joseph Priestly preparou o gás de acordo com a seguinte reacção:



O gás formado foi recolhido sobre água e designado de “ar nitroso”, tendo sido de imediato relatada a rapidez da sua reacção com o “ar comum” (O_2), formando um gás acastanhado (dióxido de nitrogénio) (Bonner and Stedman, 1996).

Na molécula de $\cdot\text{NO}$, os átomos de O e N encontram-se ligados através de uma tripla ligação. O azoto contém 5 electrões de valência, e o oxigénio possui 6. Uma vez que em cada orbital pode existir um máximo de 2 electrões, cada um com “spin” oposto do outro, há um electrão que fica desemparelhado numa das orbitais. De acordo com a teoria das orbitais moleculares, o $\cdot\text{NO}$ tem três orbitais ligantes completamente ocupadas e um electrão desemparelhado numa orbital π anti-ligante (figura 1.1.). Este electrão vai enfraquecer a ligação tripla, pelo que esta é efectivamente de 2,5 (Beckman, 1996; Bonner and Stedman, 1996).

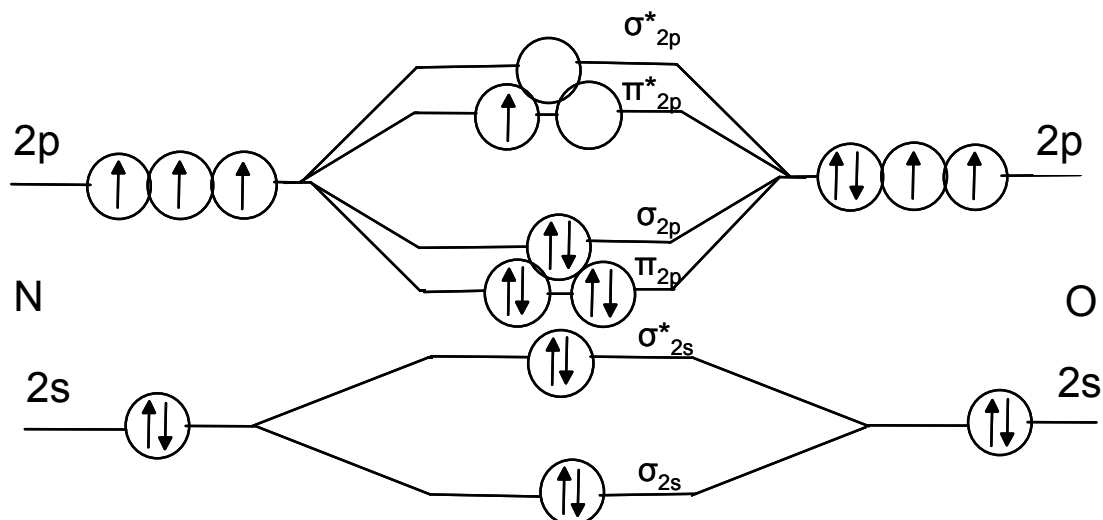
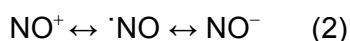


Figura 1.1. Diagrama de orbitais moleculares do $\cdot\text{NO}$.

A redução univalente do $\cdot\text{NO}$ produz o anião nitrosilo (NO^-), que se encontra no estado tripleto (fundamental). Como a maior parte das moléculas orgânicas se encontram num estado singuleto, a reacção entre eles é muito lenta. O estado singuleto do NO^- pode ser produzido em processos fotoquímicos.

Quando o $\cdot\text{NO}$ é oxidado, perde um e^- e produz-se o ião nitrosónio (NO^+), um intermediário na formação de nitrosaminas carcinogénicas e na desaminação do DNA e de resíduos de proteínas (Beckman, 1996; Bonner and Stedman, 1996).



1.2. Reactividade no meio biológico

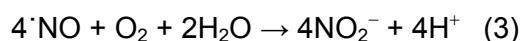
No meio biológico, o $\cdot\text{NO}$ apresenta uma reactividade comparável à do O_2 . Possui um electrão desemparelhado que lhe permite reagir rapidamente com outros radicais livres e formar complexos com metais de transição. Porém, não reage facilmente com moléculas orgânicas por estas terem as suas orbitais moleculares de valência completamente preenchidas (Beckman, 1996; Beckman *et al.*, 1996). A sua reactividade é muitas vezes considerada elevada não pelo $\cdot\text{NO}$ em si, mas sim devido à formação secundária de oxidantes fortes, tais como o peroxinitrito (ONOO^-) e o radical dióxido de azoto ($\cdot\text{NO}_2$). A formação destes oxidantes *in vivo* é prevenida em parte pela rápida remoção do $\cdot\text{NO}$ em reacções com oxihemoglobina nos glóbulos

vermelhos e pela inactivação do superóxido pela enzima superóxido dismutase (SOD) (Beckman *et al.*, 1996).

1.2.1. Reacção com oxigénio molecular

O O₂ encontra-se no estado tripleto e possui 2 electrões desemparelhados em orbitais distintas (Beckman, 1996). Ao reagir com o $\cdot\text{NO}$, produz várias espécies reactivas de óxidos de azoto (RNOS) (Wink *et al.*, 1996a), que exercem potenciais efeitos deletérios nos sistemas biológicos.

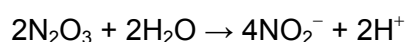
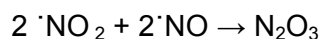
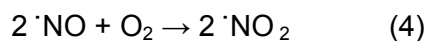
A reacção entre estas duas moléculas é distinta consoante ocorra em fase aquosa ou gasosa. Em solução aquosa, a auto oxidação do $\cdot\text{NO}$, na ausência de outros substratos, origina nitrito (NO₂⁻) com a seguinte estequiometria e lei de velocidade (Wink *et al.*, 1996a; Henry, 1997):



$$d[\cdot\text{NO}] / dt = 4k_{\text{aq}} [\text{O}_2] [\cdot\text{NO}]^2$$

$$4k_{\text{aq}} \approx 8,8 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$$

O mecanismo geralmente aceite é o seguinte:



Da observação da reacção 4, constata-se que a reacção entre o $\cdot\text{NO}$ e o O₂ é de 3ª ordem, sendo de 2ª ordem relativamente ao $\cdot\text{NO}$. Isto significa que para baixas concentrações do radical a reacção é muito lenta. É precisamente o que acontece em sistemas biológicos, onde a concentração fisiológica de $\cdot\text{NO}$ é inferior a 1 μM (Wink *et al.*, 1996a; Henry, 1997) e onde, por outro lado, a tensão de O₂ é também muito baixa. O $\cdot\text{NO}$ e o O₂ são muito mais solúveis nas membranas que na água, pelo que estas constituem focos relevantes na produção de espécies reactivas de nitrogénio.

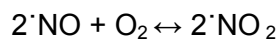
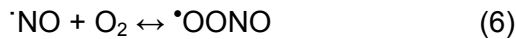
A auto oxidação do $\cdot\text{NO}$ também ocorre na fase gasosa, e é particularmente importante em termos de poluição atmosférica. Um dos produtos é o radical $\cdot\text{NO}_2$, um gás acastanhado altamente tóxico libertado pelos automóveis e na indústria e presente no “smog”. Outras espécies produzidas (N₂O₃ e N₂O₄) são também muito reactivas e tóxicas. Na fase gasosa a auto oxidação é mais lenta do que na fase aquosa e a

velocidade aumenta com a diminuição da temperatura (Wink *et al.*, 1996a; Henry, 1997):

$$d[\cdot\text{NO}] / dt = 2 k_g [\text{O}_2] [\cdot\text{NO}]^2 \quad (5)$$

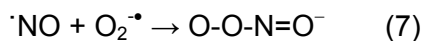
$$k_g = (6 - 7) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} (20^\circ\text{C})$$

O mecanismo da reacção é o seguinte (Henry, 1997):



1.2.2. Reacção com o anião superóxido

Uma reacção bastante importante e causa de ocorrências muito nefastas para as células é a reacção entre o $\cdot\text{NO}$ e o radical anião superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Esta redução univalente do O_2 parece ocorrer em todas as células com metabolismo aeróbio (Henry, 1997). A reacção entre ambos ocorre de acordo com a seguinte reacção:



$$d[\cdot\text{NO}] / dt = k [\cdot\text{NO}] [\text{O}_2^{\cdot-}]$$

$$k = 6,7 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$$

Note-se que esta reacção é cerca de três vezes mais rápida que a dismutação do $\text{O}_2^{\cdot-}$ pela SOD, o que sugere que, *in vivo*, o $\cdot\text{NO}$ é a única molécula que pode competir com a SOD para o ião superóxido, o que torna possível a formação de ONOO^- .

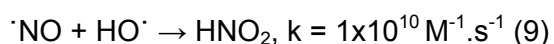
O ONOO^- , apesar de não ser um radical livre, uma vez que não tem electrões desemparelhados, é uma espécie fortemente oxidante e nitrante e muito mais reactiva que os seus precursores, o que torna esta molécula bastante mais nefasta para as células (Beckman *et al.*, 1990; Radi *et al.*, 1991b), podendo reagir com alvos biológicos como lípidos, tióis, resíduos de aminoácidos, bases de DNA e antioxidantes de baixo peso molecular (Beckman *et al.*, 1990; Radi *et al.*, 1991b, a; Yermilov *et al.*, 1996; Kikugawa *et al.*, 1997). O ONOO^- decompõe-se de acordo com uma reacção de 1ª ordem originando um produto com reactividade semelhante à do HO^\bullet (potente agente citotóxico), NO_2^\cdot e nitrato (NO_3^-) (Henry, 1997).

1.2.3. Reacção com outros radicais livres

Uma vez que possui um electrão desemparelhado, o $\cdot\text{NO}$ pode reagir rapidamente com outros radicais livres. O $\cdot\text{NO}$ pode reagir de forma bastante rápida com radicais alcoxilo ($\text{LO}\cdot$) e peroxilo ($\text{LOO}\cdot$), formando compostos relativamente estáveis (Padmaja and Huie, 1993).



O $\cdot\text{NO}$ pode também reagir de forma muito rápida com o $\text{HO}\cdot$ em solução aquosa (Wink *et al.*, 1996b).



É interessante verificar que o $\cdot\text{NO}$, ao reagir com espécies como os radicais hidroxilo, alcoxilo e peroxilo, vai convertê-las em espécies menos nefastas e de mais fácil desintoxicação, exercendo assim um papel protector contra o dano oxidativo, actuando como um antioxidante quebra cadeias da peroxidação lipídica.

1.2.4. Reacções com metais de transição livres ou ligados a proteínas

A reacção do $\cdot\text{NO}$ com metais de transição é central na sua actividade biológica (Stamler and Feelish, 1996). O $\cdot\text{NO}$ liga-se à maioria dos metais de transição, formando complexos metal-nitrosilo (Wink and Mitchell, 1998). De entre os metais de transição, a reacção entre o $\cdot\text{NO}$ e o ferro (Fe) é aquela que tem sido mais estudada, por ser este o metal mais abundante nos sistemas biológicos. O $\cdot\text{NO}$ pode reagir com a forma férrica (Fe^{3+}) e com a forma ferrosa (Fe^{2+}), mas a reacção com esta última ocorre a uma velocidade maior, uma vez que tem um electrão adicional na orbital d exterior (d^6), quando comparada com a forma férrica (d^5) (Tsai, 1994). A reacção do $\cdot\text{NO}$ com estes metais confere-lhe a possibilidade de activar ou inactivar diversas metaloproteínas. De facto, as metaloproteínas foram reconhecidas como sendo alvos moleculares do $\cdot\text{NO}$ mesmo antes de se saber que as células de mamíferos o sintetizavam. O $\cdot\text{NO}$ liga-se a praticamente todos os metais de transição (Mo, Mn, Fe, Co, Ni, Cu) que têm vários estados de oxidação que diferem entre si em 1 electrão (Beckman, 1996; Henry, 1997). A ligação de $\cdot\text{NO}$ a metaloproteínas é um fenómeno

muito geral e fundamental para a sua actividade fisiológica (Henry, 1997). Assume-se que estas reacções são de primeira ordem relativamente ao $\cdot\text{NO}$ (Stamler and Feelish, 1996).

A ligação ocorre através das orbitais d ou f do metal, havendo normalmente transferência parcial do electrão desemparelhado do $\cdot\text{NO}$ para a ligação (Beckman, 1996; Henry, 1997). Os complexos formados podem ser de 3 tipos, variando entre si no tipo de ligação (Bonner and Stedman, 1996):

i) O $\cdot\text{NO}$ doa 3 electrões, formando uma ligação bastante forte num complexo linear;

ii) A ligação que é mais fraca recebe 1 electrão do $\cdot\text{NO}$ e o complexo está dobrado num ângulo de 120° ;

iii) O $\cdot\text{NO}$ funciona como ponte entre dois metais.

A velocidade destas reacções é influenciada por vários factores, nomeadamente o tipo de metal, o tipo de ligando que está coordenado àquele, o grau de insaturação ou labilidade dos ligandos e o estado de “spin” do metal (Stamler and Feelish, 1996; Wink *et al.*, 1996a).

1.2.4.1. Guanilato ciclase solúvel

A ligação do $\cdot\text{NO}$ à forma solúvel da guanilato ciclase é o mecanismo de modulação da sinalização celular mais bem conhecido envolvendo o $\cdot\text{NO}$, sendo esta interacção responsável pela maior parte dos efeitos fisiológicos deste mensageiro intercelular (Eiserich *et al.*, 1998). A GSc pertence a uma família de enzimas que catalisam a ciclização de nucleótidos trifosfato e é uma hemoproteína heterodimérica. O $\cdot\text{NO}$ liga-se fortemente mas de forma reversível ao Fe^{2+} no anel porfirínico do heme, havendo uma elevada afinidade da enzima pelo radical ($10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). A ligação do radical à enzima provoca uma deslocalização do metal para fora do plano do anel, conduzindo à sua activação (Ignarro, 1996), aumentando o nível intracelular de guanosina monofosfato cíclico, um reconhecido segundo mensageiro (figura 1.2.). A quebra da ligação entre o $\cdot\text{NO}$ e o ferro hémico leva à sua inactivação (Stamler and Feelish, 1996). Uma questão interessante prende-se com o facto de as sintases do $\cdot\text{NO}$ (enzimas responsáveis pela síntese de $\cdot\text{NO}$) e a CGs não se localizarem nas mesmas células, reforçando a ideia de que o $\cdot\text{NO}$ funciona como mensageiro intercelular.

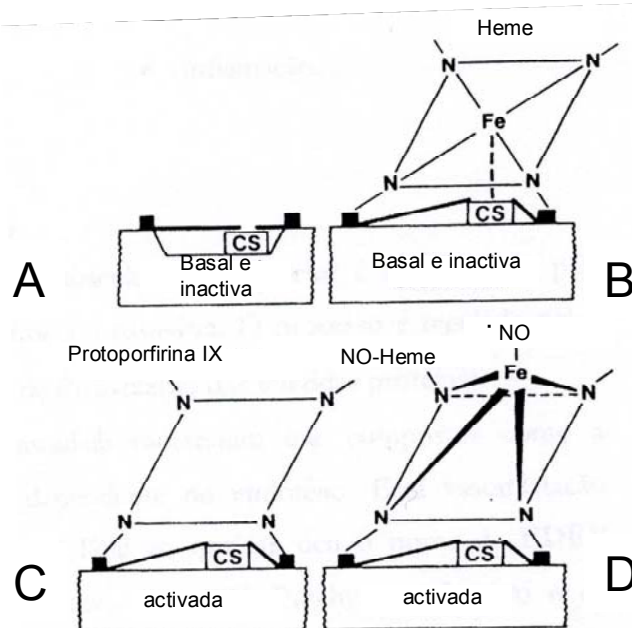
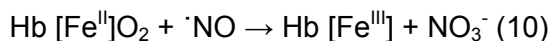


Figura 1.2. Mecanismo de activação da guanilato ciclase solúvel pelo $\cdot\text{NO}$. Quando o radical se liga ao grupo heme, quebra-se a ligação axial do centro metálico à cadeia polipeptídica e o ferro é puxado para fora do anel (B→D). Aquilo que permanece no ambiente da cadeia e que leva provavelmente à sua activação assemelha-se à protoporfirina IX (C). Quando esta é adicionada à enzima desprovida do heme (A) provoca a activação da mesma. Adaptado de Ignarro, 1996.

1.2.4.2. Hemoglobina

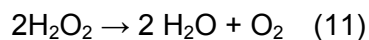
Outra reacção chave do $\cdot\text{NO}$, que ocorre a baixas concentrações, é aquela que envolve a sua ligação ao ferro ferroso da hemoglobina (Hb) (Doyle and Hoekstra, 1981; Sharma *et al.*, 1987; Eich *et al.*, 1996). Pensa-se que esta reacção constitui a principal via de eliminação do $\cdot\text{NO}$ sintetizado endogenamente (Lancaster, 1994). O produto desta reacção é a meta-hemoglobina (metHb) e NO_3^- .



Provavelmente, esta reacção constitui um mecanismo através do qual a difusão e concentração de $\cdot\text{NO}$ é controlada *in vivo* (Lancaster, 1994). Na realidade, as elevadas concentrações a que estas proteínas se encontram e a rapidez da sua reacção com $\cdot\text{NO}$ ($k = 3 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) fazem deste mecanismo o meio preferencial de remoção deste radical (Wink and Mitchell, 1998).

1.2.4.3. Catalase

A catalase é uma proteína essencial em todos os microorganismos aeróbios, plantas e animais, sendo responsável pela protecção celular contra os danos exercidos pelo peróxido de hidrogénio (H₂O₂). Esta enzima catalisa a reacção de redução de H₂O₂ a H₂O, exercendo desta forma uma acção antioxidante.



A ligação do $\cdot\text{NO}$ ao ferro hémico na enzima leva à formação de um complexo nitrosilo férrico, que inactiva a enzima (Hoshino *et al.*, 1993). Esta reacção ocorre com uma constante de velocidade de $3 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ e com uma constante de dissociação de $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, o que impede a ligação do H₂O₂ e inibe assim a actividade catalítica da enzima. Deste modo, o aumento de concentração de H₂O₂ pode contribuir para os efeitos citotóxicos do $\cdot\text{NO}$ (Davis *et al.*, 2001).

1.3. Tempo de vida

Há vários factores que contribuem para o curto tempo de meia vida ($t_{1/2}$) observado para o $\cdot\text{NO}$. Um deles é a reacção rápida com a oxihemoglobina/oximioglobina, proteínas responsáveis pela remoção/ inactivação do radical (Beckman, 1996).

Uma outra via que concorre para o curto tempo de meia vida do $\cdot\text{NO}$ consiste na sua reacção com o O₂, conforme referido anteriormente. No entanto, o facto de a reacção ser de terceira ordem implica que é necessário o encontro de 3 moléculas para que a reacção ocorra. Como a velocidade da reacção depende do quadrado da concentração do $\cdot\text{NO}$, a reacção é muito lenta para concentrações fisiológicas do radical (Beckman, 1996; Bonner and Stedman, 1996). Pelo contrário, a reacção entre o $\cdot\text{NO}$ e o O₂⁻ é muito rápida, contribuindo para o tempo de vida reduzido do $\cdot\text{NO}$.

1.4. O óxido nítrico mensageiro intercelular

O NO não é um mensageiro intercelular convencional: geralmente, as moléculas responsáveis pela comunicação intercelular são estruturalmente mais complexas, sendo por isso reconhecidas por receptores presentes na membrana das células alvos, em função da estrutura/geometria tridimensional (Beckman, 1996).

Esta noção levou à formulação da hipótese que suporta a actividade que reguladora do NO e que refere que no meio biológico o NO não veicula informação através da sua forma molecular, mas sim através da sua concentração ou reactividade. Não se liga a receptores à superfície das células alvo, mas antes à guanilato ciclase citosólica (Beckman, 1996).

As mesmas propriedades químicas que tornam o NO uma moléculas tóxica quando presente em concentração elevada permitem que funcione como mensageiro intercelular quando presente em concentrações baixas (Beckman, 1996; Ignarro, 1996):

- i) O facto de ser um gás hidrofóbico permite-lhe permear as membranas biológicas sem necessidade de receptores ou canais;
- ii) A sua natureza gasosa faz com que se difunda isotropicamente no tecido circundante;
- iii) O seu curto tempo de vida em meios biológicos faz com que o sinal produzido seja localizado.

1.4.1. Biossíntese de óxido nítrico

O processo de biossíntese de NO , em que há conversão da L-arg em citrulina e NO catalisado pela NOS, envolve 5 electrões e requer a presença de oxigénio e NADPH como co-substratos. A reacção ocorre em duas etapas: na primeira, a L-arg sofre uma hidroxilação ao nível do azoto do grupo guanidino, conduzindo à formação de N^G -hidroxi-L-arginina (L-NHA) como intermediário (Pufahl *et al.*, 1992); a segunda etapa desta reacção envolve a formação de NO e citrulina por oxidação do intermediário L-NHA (figura 1.4.)

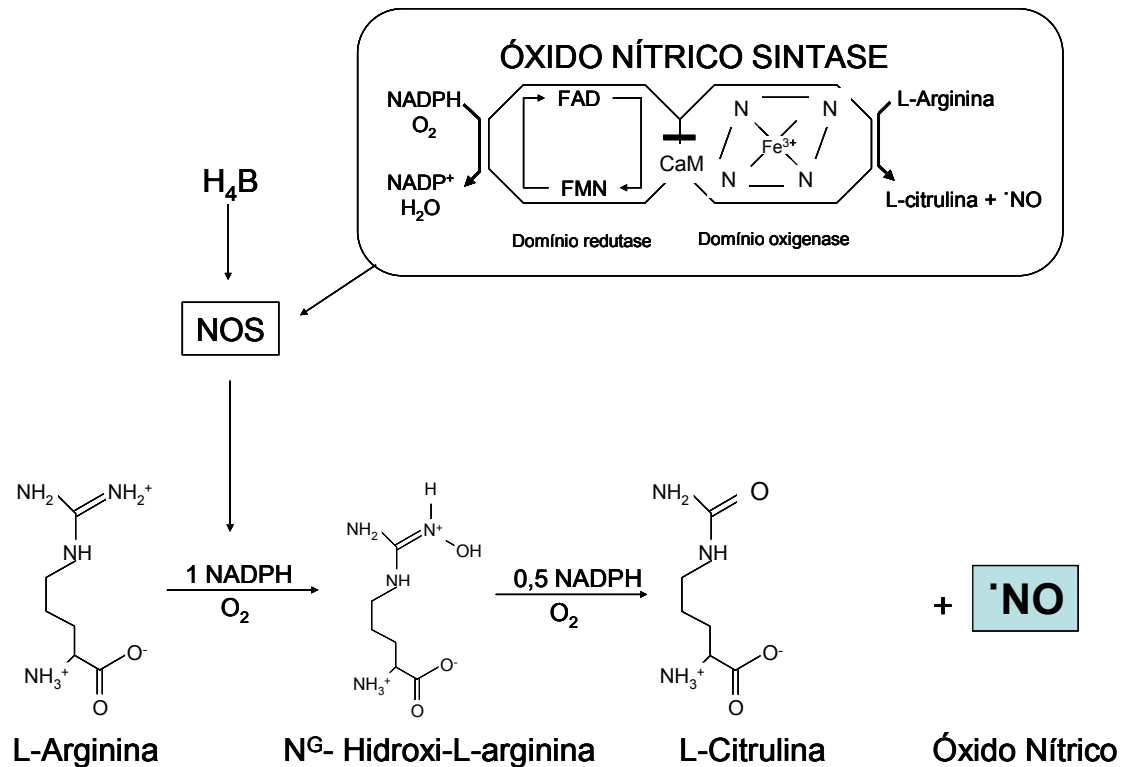


Figura 1.4. Reacção de catálise de ·NO a partir da NOS.

1.4.2. Óxido nítrico sintases

A biossíntese de ·NO é devida à acção da óxido nítrico sintase (NOS). Esta é uma enzima muito complexa quer em termos estruturais quer no modo de regulação, envolvendo vários co-factores e fenómenos de regulação pós-tradução (fosforilação, entre outros). Vários estudos permitiram identificar 3 isoformas desta enzima, que diferem entre si no tamanho, na sequência de aminoácidos, na distribuição nos tecidos, na regulação transcripcional e activação por Ca²⁺ intracelular. Estas foram designadas com base no tecido onde foram inicialmente clonadas ou pela ordem de clonagem: NOS neuronal (nNOS ou NOS I), NOS endotelial (eNOS ou NOS III), NOS indutível (iNOS ou NOS II).

Das três isoformas, a neuronal e endotelial são constitutivas e são activadas pelo complexo Ca²⁺/Calmodulina (CaM). A forma indutível desta enzima surge, entre outras células, nos astrócitos e macrófagos, sendo a sua expressão induzida por diferentes compostos, especialmente imunoestimulantes (Nathan, 1992). Enquanto as formas constitutivas permanecem activas por curtos períodos de tempo, produzindo pequenos fluxos de ·NO, a forma indutível pode produzir maiores quantidades de ·NO por períodos de tempo mais alargados. Esta via constitui normalmente um mecanismo de

defesa contra microrganismos e tumores, podendo no entanto, conduzir também a dano celular (Moncada and Higgs, 1993). Mesmo não sendo regulada pelo Ca^{2+} , a forma indutível da NOS tem um local de ligação para a CaM, indicando que esta é uma unidade estrutural desta isoforma (Cho *et al.*, 1992). As características destas três isoformas da NOS encontram-se sumariadas na tabela 1.1.

Tipo	Endotelial (NOS III)	Neuronal (NOS I)	Indutível (NOS II)
Localização Cromossômica	7q 35-36	12q 24.2	17cen-q12
Massa Molecular	133kDa (1203 aa)	161kDa (1433 aa)	131kDa (1144 aa)
Ca^{2+}- CaM	Dependente	Dependente	Liga CaM sem Ca^{2+}
Produção de NO	pmol/min/mg proteína Libertação curta duração	pmol/ min/mg proteína Libertação curta duração	nmol/ min/ mg proteína Libertação longa duração
Glucocorticóides			Indução inibida
Ativação/ Indução	Responde a Acetilcolina, bradicinina, glutamato, etc.	Responde a Acetilcolina, bradicinina, glutamato, etc.	Induzida por endotoxinas (LPS, MDP) ou citocinas ($\text{INF}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, IL-1)
Localização Subcelular	Membrana e Citosol	Citosol	Citosol
Localização tecidual	Células endoteliais, plaquetas	Cerebelo, córtex cerebral, sistema nervoso central, sistema nervoso periférico, glândula adrenal, astrócitos, músculo esquelético, neurónios NANC	Fígado, pulmão, aorta, macrófagos, linfócitos T, hepatócitos, células de Kupffer, fibroblastos, células tumorais, ilhéus de Langerhans, neuroblastomas, etc.

Tabela 1.1. Características das diferentes isoformas da NOS.

Mais recentemente foi descoberta uma nova isoforma da enzima, localizada na mitocôndria (Bates *et al.*, 1995). Em 1998, e recorrendo a técnicas de ressonância paramagnética electrónica (RPE), Giulivi e colaboradores demonstraram também a produção de NO por parte da mitocôndria (Giulivi *et al.*, 1998).

Esta isoforma é também constitutiva e localiza-se na membrana mitocondrial, sendo a sua actividade regulada pela concentração de Ca^{2+} existente na matriz. A constatação da presença de uma isoforma da NOS na mitocôndria, aliada ao facto do $\cdot\text{NO}$ inibir a citocromo oxidase de uma forma competitiva com o oxigénio, fortalece a ideia de que o $\cdot\text{NO}$ pode funcionar como regulador da respiração mitocondrial (Brown, 1995) (figura 1.3).

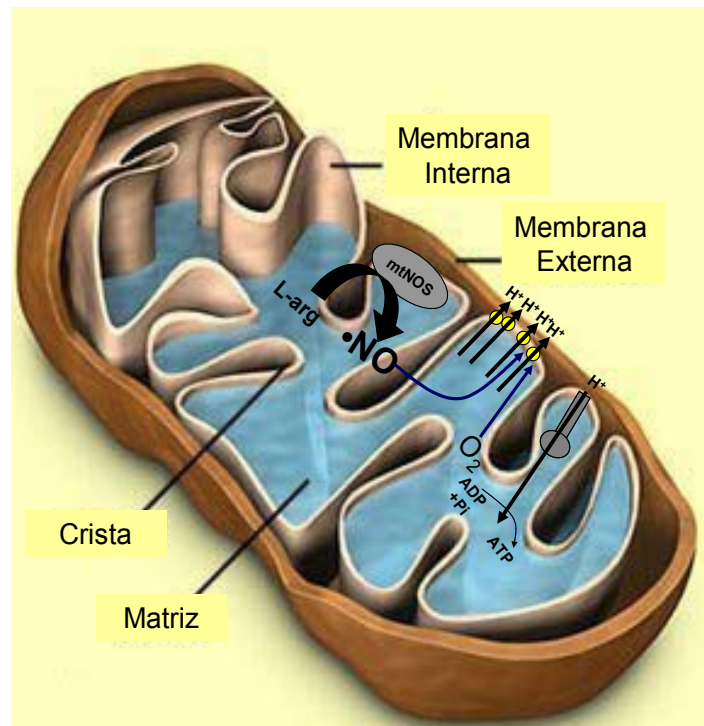


Figura 1.3. Esquema ilustrativo da localização da NOS na mitocôndria e da competição entre o $\cdot\text{NO}$ e o O_2 para a citocromo c oxidase.

Apesar das diferenças, as 3 isoformas partilham uma estrutura semelhante, baseada em 3 componentes (Crane *et al.*, 1997):

- i) Um domínio oxigenase no terminal amínico, contendo locais de ligação para os cofactores heme, (6R)-tetrahydro-biopterina (H_4B) e para o substrato L-arginina;
- ii) Um domínio redutase no terminal carboxílico, onde se ligam cofactores como o Dinucleótido de Flavina Adenina (FAD), Mononucleótido de Flavina (FMN) e NADPH (Alderton *et al.*, 2001);
- iii) Um local de ligação da proteína Calmodulina (CaM) que regula o fluxo de electrões entre os domínios oxigenase e redutase.

Todas as isoformas são homodímeros na forma activa (Marletta *et al.*, 1998). A dimerização que ocorre entre os domínios oxigenase de cada subunidade é promovida pela L-Arg e pelo H₄B (Crane *et al.*, 1997; Marletta *et al.*, 1998).

1.4.3. Cofactores

São vários os cofactores associados a estas enzimas que desempenham variadas funções na estrutura e na catálise. A H₄B é necessária à dimerização da enzima e afecta vários parâmetros referentes ao cofactor hémico. Especula-se sobre a sua participação directa na primeira parte da catálise, hipótese esta que continua a ser debatida. O FAD e o FMN, presentes no terminal carboxílico da enzima, participam na transferência de e do NADPH para o heme da proteína (Marletta, 1993; Marletta *et al.*, 1998).

Cada subunidade possui um cofactor hémico tipo P450 (Ferro-protoporfirina IX) (Marletta, 1993; Marletta *et al.*, 1998). O Fe hémico encontra-se na forma férrica de baixo “spin” e está axialmente coordenado ao resíduo Cys¹⁹⁴. A porção distal do bolso hémico é principalmente hidrofóbico, mas alguns resíduos hidrofílicos presentes na berma do bolso poderão afectar a ligação do H₄B e da L-Arg (Crane *et al.*, 1997). Parece haver também participação de ferro não hémico na reacção (Marletta *et al.*, 1998). O NADPH e o O₂ são co-substratos da reacção (Marletta, 1993).

Nas formas constitutivas da enzima, a ligação do complexo Ca²⁺- CaM é necessária para que haja fluxo de e do NADPH para o heme. Assim, a elevação dos níveis intracelulares de Ca²⁺ é um requisito à activação da enzima. A isoforma indutível da NOS tem uma elevada afinidade pela CaM, sem que seja necessário Ca²⁺ adicional. Por isso, desde que a enzima seja expressa encontra-se activa (Marletta, 1993; Marletta *et al.*, 1998).

1.5. Relevância fisiológica do óxido nítrico

Este radical participa em variados processos estando presente em praticamente todos os órgãos de mamíferos. Tal como foi salientado anteriormente, o NO é visto como um regulador dos principais órgãos e sistemas. A sua actividade no sistema nervoso, cardiovascular e imunitário é hoje mais bem conhecida e será discutida mais adiante, em particular a actividade no primeiro. No entanto, refira-se a título de exemplo que algumas das funções fisiológicas reguladas pelo NO incluem (Ignarro, 1996; Stamler and Feelish, 1996; Colasanti and Suzuki, 2000):

- i) Tónus vascular;
- ii) Inibição plaquetar;
- iii) Broncodilatação;
- iv) Motilidade intestinal;
- v) Contração muscular esquelética e lisa;
- vi) Função sexual masculina;
- vii) Neurotransmissão;
- viii) Imunidade não específica;
- ix) Morte celular apoptótica;
- x) Desenvolvimento do esfíncter pilórico gástrico.

1.5.1. Regulação do tónus vascular

O estado de contração do músculo liso endotelial é determinado pela interacção de duas proteínas: a actina e a miosina. O processo é regulado pelos níveis intracelulares de Ca^{2+} e estado de fosforilação das referidas proteínas.

Em 1980, Furchgott e Zawadzki mostraram que compostos como a acetilcolina induzem vasodilatação dependente do endotélio (figura 1.5.). Esta vasodilatação seria mediada por um factor humoral lábil ao qual se deu o nome de EDRF (Endothelium Derived Relaxation Factor) (Furchgott and Zawadzki, 1980). Em 1988, Ignarro e colaboradores e Moncada e colaboradores propuseram independentemente que o EDRF seria NO ou um composto semelhante. Sabia-se já que o NO era um potente vasodilatador responsável pelos efeitos dos nitrovasodilatadores (Ignarro *et al.*, 1988a; Ignarro *et al.*, 1988b). O cGMP tinha sido identificado como sendo o mediador das respostas a NO e EDRF (Moncada *et al.*, 1991).

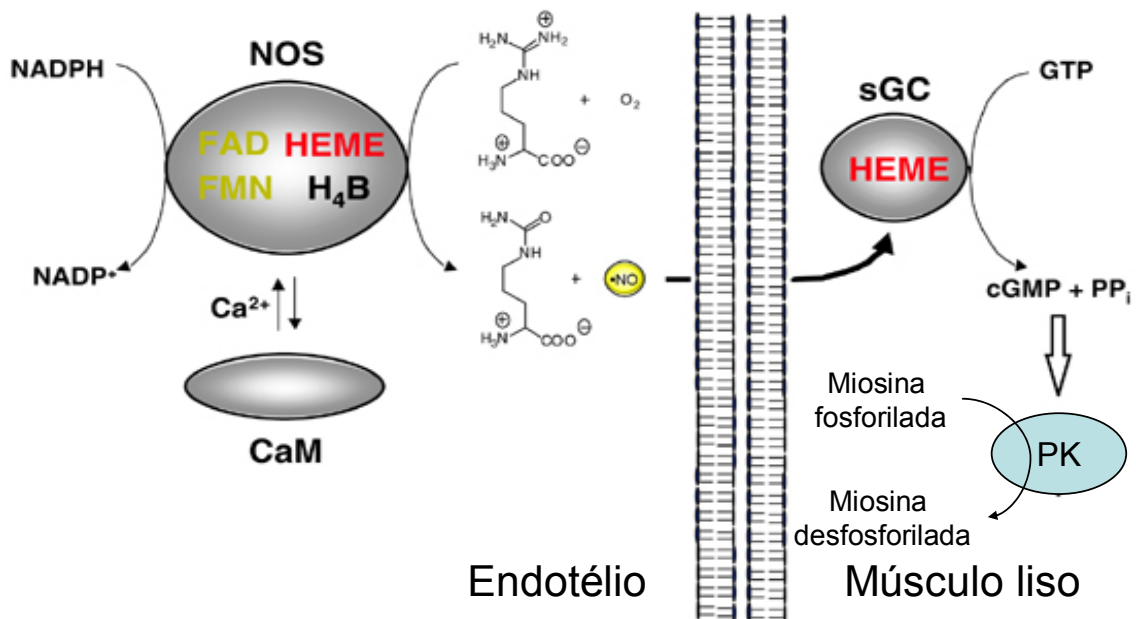


Figura 1.5. Síntese de NO pelo endotélio vascular e ação ao nível do tecido muscular liso.

1.5.2. Modulação da resposta imunitária

O NO é um agente citotóxico libertado por macrófagos e neutrófilos activados (Ignarro, 1996). Estas células podem ser activadas por citocinas de linfócitos sensibilizados em resposta a antígenos específicos ou por contacto com microorganismos ou LPS (Moncada *et al.*, 1991). Esta citotoxicidade resulta da elevada concentração a que o radical é produzido. Em elevadas concentrações o NO pode provocar danos em células invasoras e tumorais, tanto ao nível de proteínas com centros férricos (Fe-S, por exemplo), como do DNA e da respiração mitocondrial (por exemplo inibindo o complexo IV) (Moncada *et al.*, 1991; Ignarro, 1996). Os macrófagos e os neutrófilos também produzem $\text{O}_2^{\cdot-}$ pelo que é possível que haja produção de OONO^- , que é um forte agente oxidante (Ignarro, 1996), tal como descrito anteriormente.

1.5.3. O óxido nítrico neuromodulador

Os neurotransmissores são compostos sintetizados, armazenados em vesículas no terminal nervoso e libertados neste terminal em resposta a potenciais de acção. Os gases NO e CO constituem uma classe diferente de neurotransmissores que diferem

em vários aspectos dos convencionais: apresentam uma elevada reactividade química; atravessam rapidamente membranas biológicas; não são armazenados em vesículas; a sua síntese pode ser induzida quando necessário; possuem múltiplos alvos moleculares. Não existe, portanto, aqui um mecanismo de exocitose regulada.

Os neurónios que sintetizam NO são altamente ramificados. A produção do radical faz parte de um sistema de “feedback” que permite aos neurónios adaptarem-se a diferentes níveis e padrões de estimulação. O NO desempenha um importante papel nos processos de aprendizagem, memória e emoção de acordo com os modelos de potenciação e inibição a longo prazo. Por outro lado, a alteração dos níveis de cGMP, induzida por NO , pode influenciar a plasticidade sináptica (Ignarro, 1996).

1.5.3.1. Difusão e regulação da actividade do óxido nítrico no cérebro

Dado o seu baixo peso molecular e propriedades hidrofóbicas, o NO atravessa facilmente as membranas celulares e pode difundir-se do seu local de síntese para as células vizinhas, desde que a sua velocidade de difusão intercelular seja mais rápida que as reacções intracelulares (Lancaster, 1994; Wood and Garthwaite, 1994; Beckman and Koppenol, 1996; Lancaster, 1997; Ledo *et al.*, 2004). Estudos realizados para avaliar a distância de difusão do NO em condições fisiológicas, utilizando microelctrodos, reportaram valores na ordem dos 100-200 μm , atingindo uma concentração estacionária ao fim de 10-15 s, o que está de acordo com um elevado coeficiente de difusão, 3300 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ (Malinski *et al.*, 1993b; Meulemans, 1994). Evidências experimentais suportam a noção de que o NO actua como um mensageiro intercelular difusível no cérebro, sendo o caso da potenciação a longo termo (LTP) um exemplo dessa actividade do NO (Schuman and Madison, 1994; Wood and Garthwaite, 1994). A LTP é um modelo experimental usado para estudar as alterações sinápticas subjacentes aos processos de aprendizagem e memória no hipocampo. Este modelo implica a acção do NO como mensageiro intercelular uma vez que postula a existência de um mensageiro retrógrado, isto é, uma molécula que, uma vez produzida no terminal pós-sináptico é capaz de exercer uma acção também no terminal pré-sináptico. Uma vez que o NO , por não se armazenar em vesículas, se difunde radialmente em todas as direcções originado um gradiente de concentração a partir do ponto onde foi sintetizado, o tipo e o número de alvos na vizinhança irão determinar o perfil concentração/tempo do NO . Apesar do NO não ser muito reactivo com a maioria das biomoléculas, a sua rápida reacção com o $\text{O}_2^{\cdot-}$, com os radicais

lipídicos LOO[·], com as proteínas contendo metais de transição, com tióis e O₂ irá ditar o seu tempo de meia vida e regular a sua biodisponibilidade. De uma forma geral, a esfera difusional do [·]NO num determinado sistema biológico depende não só do seu coeficiente de difusão mas também da quantidade e da velocidade a que é sintetizado, o tempo de duração da libertação da célula onde foi produzido e a velocidade das reacções do [·]NO com o O₂ e outras moléculas biológicas.

No entanto, todas estas evidências levantam uma importante questão relacionada com a sinalização através do [·]NO, nomeadamente acerca da especificidade de acção de uma molécula altamente difusível, reactiva e potencialmente tóxica numa cascata de sinalização. A resposta a esta questão não é ainda completamente esclarecedora. De qualquer modo, uma primeira observação importante é que a biossíntese de [·]NO é altamente regulada. Nos neurónios, a síntese de [·]NO ocorre numa complexa sequência de eventos que envolvem a estimulação dos receptores NMDA para o glutamato (um canal iónico sensível à voltagem activado por glutamato) e o influxo de cálcio para o citosol, o qual, após ligação à CaM activa a nNOS; todo este processo é activado numa escala temporal de apenas alguns segundos (Garthwaite and Boulton, 1995b). Deste modo, e desde que estejam presentes todos os outros cofactores como a CaM, NADPH, FMN, FAD, H₄B e o heme, o passo fundamental no controlo da actividade da nNOS é um estímulo que permita a entrada de cálcio para a célula. A actividade da nNOS pode ser regulada pós-transdução por fosforilação. Esta pode ser catalisada por múltiplas cinases, incluindo a proteína cinase C, a cinase dependente de cAMP e a proteína cinase dependente de Ca²⁺/CaM (Bredt *et al.*, 1992), sugerindo que a síntese de [·]NO em resposta a um estímulo neuronal é modulada por diferentes cascatas de sinalização.

Um segundo nível de regulação advém da localização intracelular da nNOS e da disposição espacial dos componentes da maquinaria molecular envolvida nos mecanismos de estimulação, síntese e acção (figura 1.6.). O domínio bivalente PDZ da nNOS direcciona a enzima para membrana, permitindo ainda a interacção com um domínio PDZ na PSD-95.

Uma vez que o PSD-95 também se liga ao receptor NMDA do glutamato através de domínios PDZ, o PSD-95 acopla funcionalmente a activação do receptor NMDA à actividade da nNOS (Christopherson *et al.*, 1999). Para além deste acoplamento, a co-localização da nNOS com os receptores NMDA e PSD-95 nas “spines” dendríticas do hipocampo detectada por métodos microscópicos imunocitoquímicos otimizados para detectar antigénios sinápticos vem reforçar a ideia de uma organização supramolecular da cascata de sinalização através da sinapse como um modo de regulação da actividade do [·]NO no cérebro (Burette *et al.*, 2002). A primeira

consequência dessa organização é que a nNOS deve estar localizada dentro da esfera de concentração crescente de Ca^{2+} que ocorre após activação do receptor NMDA do glutamato, facilitando deste modo uma rápida e robusta activação da enzima. Além disso, o acoplamento físico entre o receptor NMDA e a nNOS através do PSD-95 pode ser regulado por uma proteína específica do cérebro denominada CAPON, que compete com a nNOS para o domínio PDZ e quebra a ligação daquela com o receptor NMDA (Jaffrey *et al.*, 1998). Outras proteínas associadas com o CAPON (por exemplo Dexas I, sinapsina) fornecem uma integridade estrutural ao complexo multiproteico e podem também ser alvos para a acção do NO (Jaffrey *et al.*, 2002). Deste modo, proteínas como CAPON podem entregar NO a alvos específicos.

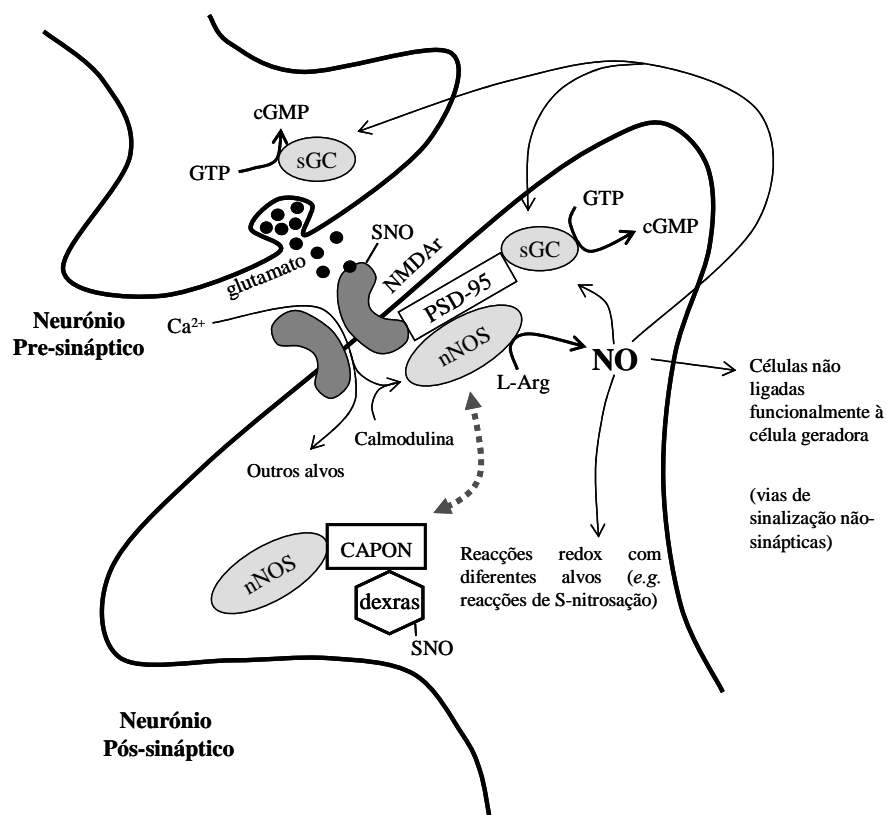


Figura 1.6. Acoplamento funcional do receptor NMDA para o glutamato com a óxido nítrico sintase e as vias de sinalização mediadas pelo NO . A interacção entre o receptor NMDA e a NOS via PSD-95 facilita a síntese de NO após o influxo de cálcio. A proteína adaptadora CAPON regula a síntese de NO , ligando a nNOS a alvos específicos (e.g. pequenas proteínas G como as Dexas). As vias de sinalização intra e extracelular são medidas por interacção com a guanilato ciclase solúvel e grupos tiol nas proteínas. O receptor NMDA é inibido por S-nitrosação de um resíduo cisteína crítico. Adaptado de Ledo *et al.*, 2004.

1.5.3.2. Alvos do óxido nítrico em mecanismos fisiológicos e patológicos

Todas as isoformas da NOS podem ser expressas no cérebro; a eNOS nas células endoteliais e neurónios; a nNOS em neurónios e a iNOS na microglia e astrócitos (Dawson and Dawson, 1998; Alderton *et al.*, 2001). A primeira vez que se sugeriu uma acção do NO a nível neuronal decorreu de observações relacionadas com a activação do receptor NMDA do glutamato e consequente síntese de NO em fatias de cérebro (Garthwaite and Boulton, 1995a). O receptor NMDA do glutamato inicia uma cascata de eventos intracelulares que modulam a plasticidade neuronal, o desenvolvimento, o envelhecimento e a doença, sugerindo fortemente um papel activo do NO nestes processos (Dawson and Dawson, 1998).

O alvo do NO melhor caracterizado é a sGC, que é activada pelo NO , levando à produção de cGMP (Ignarro, 1991). No entanto, descobertas recentes indiciam o envolvimento do NO em mecanismos de sinalização independentes da produção de cGMP (Boehning and Snyder, 2003). É de notar os mecanismos mediados pela química redox do NO com grupos tiol em proteínas e no glutatião, os quais devem envolver uma catálise por metais de transição e interconversão entre diferentes formas redox do NO (por exemplo NO^+). A formação de proteínas S-nitrosotiol que ocorrem num único resíduo crítico de cisteína foi descrita em inúmeras proteínas e poderá ser responsável pela regulação de factores de transcrição (indicando uma eventual expressão de genes mediada pelo NO), canais iónicos, proteínas G e várias enzimas (proteínas cinases, fosfatases e caspases), proteínas estruturais, etc. (Stamler *et al.*, 2001). A regulação dinâmica de proteína por nitrosação, por analogia com a regulação por fosforilação/desfosforilação, requer também desnitrosação, mas o conhecimento sobre os mecanismos responsáveis por este fenómeno permanece por clarificar.

Ao contrário dos mecanismos fisiológicos mediados pela activação do receptor NMDA, uma activação excessiva destes receptores (excitotoxicidade) é o mecanismo base que despoleta doenças neurológicas, como a doença de Alzheimer, Parkinson, esclerose múltipla, entre outras (Coyle and Puttfarcken, 1993; Dawson and Dawson, 1998). Não obstante a existência de resultados contraditórios, foi já estabelecido que o NO medeia a toxicidade do glutamato em culturas primárias de células corticais e numa variedade de outros modelos (Dawson *et al.*, 1991; Dawson and Dawson, 1998).

A actividade dupla do NO em fisiologia e patologia é explicada dogmaticamente em função da sua concentração; concentrações elevadas iniciam vias tóxicas, desviando o NO de processos fisiológicos. No entanto, uma alteração na concentração não implica necessariamente uma modificação qualitativa dos alvos. Por

exemplo, o $\cdot\text{NO}$ produzido em elevadas concentrações, numa gama de μM , por uma iNOS nos macrófagos, desempenha um importante papel na resposta imune, mas o $\cdot\text{NO}$ exerce um efeito antimicrobiano modificando selectivamente centros tiol e metálicos de proteínas críticas nos microrganismos (Stamler *et al.*, 2001). Deste modo, elevadas concentrações (μM) de $\cdot\text{NO}$ no cérebro podem activar a sGC e formar S-nitrosotióis. No entanto, e uma vez que os sistemas de defesa e reparação podem não ter capacidade de resposta, as células e os tecidos poderão ter uma dificuldade adicional em lidar com um elevado número de eventos disfuncionais despoletados pelo $\cdot\text{NO}$ e espécies relacionadas, tais como oxidação, nitroação e nitração de proteínas e DNA. Há muitos trabalhos que sugerem que as acções neurotóxicas do $\cdot\text{NO}$ são mediadas por espécies reactivas de nitrogénio, tais como o radical $\cdot\text{NO}_2$ e o ONOO^- (Radi *et al.*, 1991b; Ischiropoulos, 1998). Adicionalmente, a química nitrosativa pode desencadear modificações oxidativas secundárias, como no caso da oxidação de um resíduo de cisteína na enzima glutatião redutase mediada pela S-nitrosoglutatião (Becker *et al.*, 1998). Além disso, o oxigénio singleto, que é uma forma altamente reactiva do oxigénio molecular, foi sugerido como sendo um produto da reacção entre o $\cdot\text{NO}$ e o H_2O_2 (Noronha-Dutra *et al.*, 1993).

Ao nível subcelular é importante considerar os efeitos do $\cdot\text{NO}$ ao nível da mitocôndria (Boveris and Cadenas, 2000; Cadenas *et al.*, 2000), que podem levar à disfunção do organelo e ao envolvimento da mitocôndria disfuncional em doenças neurodegenerativas.

Paradoxalmente, o $\cdot\text{NO}$ e os radicais livres de oxigénio são produzidos nas células cerebrais durante a actividade normal e interagem em cascatas de sinalização (Bindokas *et al.*, 1996).

Deste modo, forma-se um quadro complexo em que os radicais livres de oxigénio e o $\cdot\text{NO}$ interagem de formas diversas, produzindo efeitos sinérgicos ou antagonistas. Os factores chave para que as interacções tomem um determinado rumo são a velocidade de fluxo e a compartimentalização do $\cdot\text{NO}$ e dos radicais livres de oxigénio, que modulam deste modo o ambiente redox das células, conjuntamente com os compostos neuroprotectores (como o ascorbato e o glutatião) e determinam a actividade biológica do $\cdot\text{NO}$ (Lipton *et al.*, 1993).

As catecolaminas também podem ter um papel importante no ambiente redox das células, uma vez que o $\cdot\text{NO}$ oxida a dopamina (DA) (Daveu *et al.*, 1997; Rettori *et al.*, 2002) e o DOPAC, conduzindo à formação das espécies radicais *o*-semiquinona e anião nitroxilo, num processo catalisado pela SOD (Laranjinha and Cadenas, 2002). Uma vez que o anião nitroxilo provoca uma diminuição das respostas mediadas pelo

receptor NMDA, estas interacções químicas podem ter relevância fisiológica (Kim *et al.*, 1999).

Estas considerações sugerem a necessidade de medir o NO em tempo real nos tecidos e o estudo da relação entre a dinâmica da concentração e as respostas biológicas. Como discutiremos adiante, a utilização de microelctrodos inseridos na esfera de difusão do NO no tecido constitui o melhor sistema para tais estudos.

1.6. Hipocampo

O sistema límbico encontra-se na superfície medial do lobo temporal e é fundamental para o normal funcionamento do ser humano. É composto por 3 estruturas: córtex olfativo, amígdala e hipocampo. Estas estruturas estabelecem ligação com várias outras partes do sistema nervoso central (SNC), nomeadamente o hipotálamo, tálamo e córtex cerebral (Thompson, 1993a).

Este sistema é “antigo”, em termos de evolução: forma a parte superior do cérebro de vertebrados mais primitivos, como o crocodilo. Nos mamíferos, o córtex cerebral expandiu-se e acabou por envolver totalmente o hipocampo, tornando-se, então, na maior estrutura do SNC. Nos mamíferos, o hipocampo é provavelmente o constituinte mais importante do sistema límbico, e é certamente o mais complexo, desempenhando um papel crítico nos processos de aprendizagem e memória de longa duração.(Thompson, 1993b). Na figura 1.7. pode-se ver a localização do hipocampo no SNC.

A remoção total do hipocampo impede o indivíduo de formar novas memórias de longa duração, embora as formadas antes da remoção permaneçam intactas e utilizáveis.

No hipocampo podem-se distinguir 5 áreas: giro dentado, CA1, CA2, CA3 e subículo, sendo este último contínuo com o córtex entorhinal (figura 1.7). Nesta estrutura, existe um circuito unidireccional da informação. O “input” para o lobo temporal medial tem origem nas áreas associativas do córtex onde existem informações processadas de várias modalidades sensoriais. Antes desta informação ser processada no hipocampo, passa pelo córtex rinal e parahipocampo. Destas regiões partem axónios que formam sinapses no giro dentado. As “*mossy fibers*” fazem ligação entre esta estrutura e a zona CA1, que é por sua vez ligada à região CA3 pelos colaterais de Schaeffer. Daqui, a informação segue para o subículo, responsável pelo “output” do hipocampo: pelo fornix parte informação para o hipotálamo (e depois tálamo) e para os corpos mamilares ou então para o córtex sensorial. Durante este processo são formadas as memórias de longa duração (Bear

et al., 1996; Purves *et al.*, 1997). O principal neurotransmissor envolvido neste circuito é o glutamato, mas vários outros neurotransmissores e neuromoduladores (dopamina, serotonina, noradrenalina, GABA e purinas) podem de alguma forma participar neste processo, modulando aquele circuito glutamatérgico.

Graças à sua arquitetura e organização simples, o hipocampo tem sido muito utilizado no estudo da transmissão sináptica, em especial, de processos como LTP (potenciação a longo prazo) e plasticidade. Na década 60 mostrou-se que o hipocampo pode ser separado do resto do cérebro, sendo também possível o seu seccionamento em fatias que se mantêm viáveis durante várias horas (Purves *et al.*, 1997).

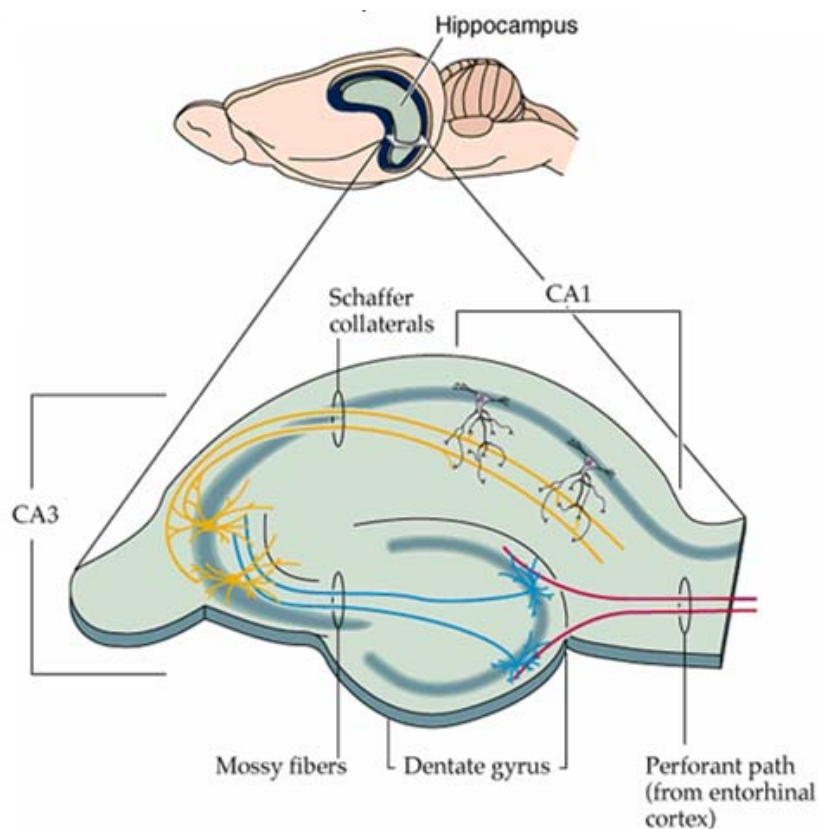


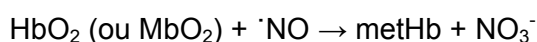
Figura 1.7. Representação esquemática do hipocampo de rato, onde se mostram as diferentes sub-regiões (CA1, CA3, “dentate gyrus”), assim como o “loop” tri-sináptico (“perforant path”, “mossy fibers”, “Schaffer collaterals”).

1.7. Detecção e quantificação do óxido nítrico

Desde a sua identificação como EDRF, têm sido desenvolvidas várias técnicas de modo a tornar possível a detecção selectiva do $\cdot\text{NO}$ em amostras biológicas, e especialmente *in vivo*. Idealmente, as técnicas utilizadas para a medição do $\cdot\text{NO}$ devem ser capazes de detectar concentrações na ordem dos nanomolar com um rápido tempo de resposta. Além destas, outras propriedades como a miniaturização, fácil calibração, estabilidade e facilidade de uso são importantes e devem ser tomadas em linha de conta no desenvolvimento de técnicas analíticas para quantificar o $\cdot\text{NO}$. Porém, o curto tempo de vida e a baixa concentração em que o radical existe em condições fisiológicas constituem alguns dos obstáculos a ultrapassar. A maior parte das técnicas de medição são indirectas, quantificando produtos de oxidação/decomposição do $\cdot\text{NO}$ (como NO_2^-) ou de reacção, que são removidos do meio biológico (Lantoine *et al.*, 1995; Beckman, 1996; Taha, 2003).

1.7.1. Colorimetria

Esta técnica baseia-se na reacção do $\cdot\text{NO}$ com a Hb. A ligação do $\cdot\text{NO}$ ao centro férrico da Hb resulta num desvio da banda de Soret, que é usada como um indicador qualitativo e quantitativo do $\cdot\text{NO}$ (Nims *et al.*, 1996). Posteriormente, a HbNO produz MetHb e NO_3^- .



A nitrosação da oxiHb ou oxiMb pode ser usada em medições directas de $\cdot\text{NO}$ em algumas amostras, especialmente na medição da concentração padrão em soluções. A principal desvantagem desta técnica é a falta de oxiHb ou oxiMb puras, o que aumenta o tempo necessário para as medições devido à necessidade de purificação. Adicionalmente, podem ocorrer reacções entre o centro porfirínico metálico e interferentes como o NO_2^- (Nims *et al.*, 1996).

Além da oxiHb e oxiMb têm sido desenvolvidos outros compostos que formam complexos corados na presença de oxigénio (Nims Raymond W. *et al.*, 1995). Estes compostos servem acima de tudo para quantificar o $\cdot\text{NO}$ em soluções padrão na ordem dos μM .

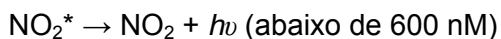
Podem também ser feitas medições colorimétricas indirectas do $\cdot\text{NO}$, baseadas na quantificação de NO_2^- e NO_3^- , os metabolitos biológicos do $\cdot\text{NO}$. A técnica mais comum é baseada no reagente de Griess, que adquire uma absorvância característica

a 543 nm quando na presença de NO_2^- . É uma técnica útil para quantificar NO_2^- na ordem de grandeza dos micromolar. Para quantificar NO_3^- é necessário reduzi-lo primeiro a NO_2^- não sendo possível distinguir o NO_2^- fisiológico do NO_2^- proveniente da oxidação do $\cdot\text{NO}$.

Os métodos espectrofotométricos para medições de $\cdot\text{NO}$ utilizam aparelhagem comum e procedimentos bem estabelecidos, apresentando uma boa reprodutibilidade e um limite de detecção entre 0,1 e 1 μM de $\cdot\text{NO}$.

1.7.2. Quimioluminescência

A maioria dos estudos em que o $\cdot\text{NO}$ é medido recorrendo à quimioluminescência envolve medições em fase gasosa. Esta metodologia para detecção do $\cdot\text{NO}$ foi inicialmente desenvolvida para monitorização ambiental (Fontijn *et al.*, 1970) e baseia-se na reacção do $\cdot\text{NO}$ com o ozono (O_3), produzindo dióxido de azoto no estado excitado:



Esta reacção é específica para o $\cdot\text{NO}$ e insensível ao NO_2^- , um potencial interferente nas medições de $\cdot\text{NO}$. A detecção de $\cdot\text{NO}$ em fase gasosa é mais simples do que em solução, pois a purga que é necessária nestes casos limita a sua aplicação em medições em tempo real. Têm sido reportados valores de sensibilidade num intervalo entre 0,1 e 50 nM (Marley *et al.*, 2000; Rassaf *et al.*, 2002; Yao *et al.*, 2002). A quimioluminescência em fase gasosa apresenta uma boa sensibilidade e selectividade, mas é necessária uma instrumentação dispendiosa, é uma técnica morosa, cara e necessita de vários reagentes para se poder realizar. A quimioluminescência tem sido aplicada na medição de $\cdot\text{NO}$ no ar expirado (Girgis *et al.*, 2003).

1.7.3. Fluorimetria

Os métodos fluorimétricos são muito úteis para se realizar a bioimagem do $\cdot\text{NO}$. Os reagentes fluorimétricos têm normalmente grupos amina adjacentes e exploram a capacidade do $\cdot\text{NO}$ produzir agentes N-nitrosantes para formar triazoles (Wiersma, 1970; Miles *et al.*, 1996). Um indicador muito utilizado na identificação do $\cdot\text{NO}$ é o DAN (2,3-diaminonaftaleno), que, ao reagir com o $\cdot\text{NO}$, forma um composto que emite fluorescência. Uma das principais desvantagens desta técnica é a morosidade e a falta de selectividade para valores baixos de pH devido à interferência do NO_2^- .

1.7.4. Ressonância paramagnética electrónica

Desde a década de 60 que os espectroscopistas de ressonância paramagnética electrónica (RPE) têm usado o $\cdot\text{NO}$ no estudo estrutural de metais em proteínas hémicas e não hémicas, uma vez que o $\cdot\text{NO}$ se liga fortemente ao ferro para formar complexos ferro-nitrosil.

Com a descoberta das funções que o $\cdot\text{NO}$ desempenha nos sistemas biológicos, a formação destes complexos é usada para detectar a presença de $\cdot\text{NO}$, uma vez que é difícil detectá-lo directamente, apesar de possuir um electrão desemparelhado (Hall and Buettner, 1996; Kalyanaraman, 1996; Kozlov *et al.*, 1996; Osipov *et al.*, 1996). De modo a ultrapassar estas dificuldades, tem sido usado o RPE indirecto, recorrendo a “armadilhas” de spin como por exemplo tiocarbamatos (Singh *et al.*, 1995; Vanin *et al.*, 2000; Saito and Yoshioka, 2002). A RPE indirecta tem a vantagem de uma monitorização cumulativa, mas tem como desvantagem a necessidade de operadores especializados, exigir equipamento complexo, e estar sujeita à interferência de várias espécies redox.

Em resumo, a maior parte das técnicas apresentadas até agora para detecção de $\cdot\text{NO}$ quantificam os seus produtos de reacção, apresentando várias desvantagens e estando sujeitas à acção de diversos interferentes.

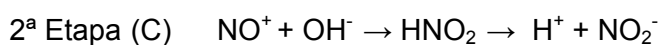
1.7.5. Electroquímica

De todas as técnicas analíticas que podem ser usadas na detecção de $\cdot\text{NO}$, a detecção electroquímica é a única que permite fazer uma medição directa e *in vivo* do $\cdot\text{NO}$. As técnicas electroquímicas apresentam diversas vantagens relativamente às outras, nomeadamente (Bedioui and Villeneuve, 2003; Ciszewski and Milczarek, 2003):

- i) Selectividade resultante da escolha do material de suporte para o eléctrodo de trabalho e do potencial aplicado;
- ii) Elevada sensibilidade e baixo limite de detecção;
- iii) Possibilidade de efectuar medidas em tempo real;
- iv) A utilização de microeléctrodos de reduzida dimensão (μm) permite fazer medições com elevada resolução espacial.

Apesar dos problemas inerentes à monitorização *in vivo*, a utilização de eléctrodos nestas medições constitui uma abordagem extremamente útil, uma vez que na superfície do eléctrodo a informação química é directamente convertida em sinal eléctrico. Se o sinal gerado for directamente proporcional à concentração da espécie a ser detectada, pode ser usado como sinal analítico (Ciszewski and Milczarek, 2003).

A reacção de oxidação do $\cdot\text{NO}$ à superfície de eléctrodos de trabalho inertes (e.g. Pt, carbono vítreo) ocorre em duas etapas: uma primeira electroquímica, seguida por uma reacção química (mecanismo EC), de acordo com as equações a seguir indicadas (Ciszewski and Milczarek, 2003).



Numa primeira etapa ocorre uma reacção electroquímica, em que há a transferência de um electrão de uma molécula de $\cdot\text{NO}$ para o eléctrodo, resultando na formação do ião nitrosónio (NO^+). Este ião é um ácido de Lewis relativamente forte e em solução aquosa é rapidamente convertido em NO_2^- . Se for aplicado um potencial suficientemente elevado, ocorrerá ainda uma posterior oxidação do NO_2^- a NO_3^- .

Tendo em conta que as matrizes biológicas são ricas em NO_2^- e que este se encontra normalmente em concentrações superiores àquelas verificadas para o $\cdot\text{NO}$, é importante que o sensor a utilizar seja capaz de distinguir o $\cdot\text{NO}$ dos seus produtos de oxidação, o NO_2^- e o NO_3^- , bem como outras espécies interferentes que se oxidem ao

potencial aplicado à oxidação do NO .

Existem dois tipos de sensores electroquímicos para detecção de NO . Um primeiro tipo baseia-se no eléctrodo de Clark, utilizado para medir O_2 . Consiste num disco de platina que funciona como eléctrodo de trabalho e um fio de prata que funciona como eléctrodo de referência. Os eléctrodos são inseridos no interior de um capilar. Este encontra-se cheio com uma solução de KCl/HCl e selado na extremidade com uma membrana permeável a gás. O NO , que é um gás, é oxidado na superfície activa do eléctrodo depois de ter atravessado a sua membrana. Estes sensores, apesar de terem uma resposta relativamente lenta, apresentam uma elevada selectividade.

O segundo tipo de sensor é baseado num eléctrodo de carbono ou metálico. Quando se usa um sensor deste tipo, apesar de terem uma elevada sensibilidade, apresentam como desvantagem uma menor selectividade para o NO , pelo que é necessário recorrer a modificações da superfície para tornar os eléctrodos selectivos para o NO . Esta é modificada por electropolimerização ou deposição de materiais à superfície de modo a torná-la mais adequada à detecção de NO (Malinski and Czuchajowski, 1996). Deste modo, o principal objectivo quando se tenta desenhar um novo sensor electroquímico (ou microeléctrodo) para detecção de NO é tentar otimizar as suas características analíticas, especialmente no que diz respeito a parâmetros como a sensibilidade e a selectividade, através da modificação da superfície.

Um dos procedimentos mais usados na modificação da superfície dos eléctrodos por filmes poliméricos tem sido a polimerização electroquímica de um determinado monómero. Este pode ser efectuada de três modos:

- i) Métodos galvanostáticos;
- ii) Voltametria cíclica;
- iii) Métodos potencioestáticos.

Os polímeros escolhidos para os revestimentos deverão formar um filme de reduzida espessura, insolúvel, estável e aderente. As condições de polimerização determinam em larga medida as propriedades físico-químicas do filme. Uma das grandes vantagens da electropolimerização é que permite modificar superfícies irregulares, como a superfície activa de muitos eléctrodos, ao mesmo tempo que possibilita uma monitorização contínua do processo de electropolimerização e permite um controlo da espessura do filme. Além disso, é um método simples de aplicar e a deposição dos polímeros pode ser feita em diversos suportes condutores. Actualmente, e de um modo geral, a modificação é feita de forma a conseguir um

revestimento com múltiplas camadas que permitam controlar a sensibilidade e a selectividade dos sensores, desempenhando cada camada uma função específica (Pontie *et al.*, 1999).

O primeiro microeléctrodo para detecção de NO foi desenvolvido por Shibuki em 1990 (Shibuki, 1990), e baseava-se no eléctrodo tipo Clark, tendo o autor revertido a polaridade do eléctrodo de oxigénio para + 0,9 V, de modo a detectar NO . Mais tarde, este primeiro eléctrodo permitiu o desenvolvimento do primeiro sensor de NO comercial, o ISO-NO, apresentado pela World Precision Instruments (WPI, USA).

O segundo marco no que diz respeito a microeléctrodos utilizado para medições de NO foi estabelecido em 1992, ao ser introduzido o sensor porfirínico (Malinski and Taha, 1992). Este microeléctrodo era composto por uma fibra de carbono modificada pela electropolimerização de níquel(II) tetraquis (3-metoxi-4-hidroxifenil) porfirina (Ni(II)-TMHPP). Esta modificação tinha como objectivo catalisar a oxidação do NO . Este filme era posteriormente revestido com Nafion[®] de modo a otimizar os resultados em termos de selectividade relativamente a interferentes aniónicos como o NO_2^- e o NO_3^- , por exemplo. O Nafion[®] é um polímero de troca catiónica que foi inicialmente utilizado na modificação de eléctrodos de carbono para melhorar a detecção de catecolaminas e indóis, como a dopamina e a serotonina, onde o principal problema era a interferência dos seus metabolitos, normalmente compostos com carga negativa (Brazell *et al.*, 1987).

O filme formado por este trocador catiónico perfluorsulfonado apresenta uma elevada estabilidade química, térmica e mecânica, bem como uma elevada condutividade e força iónica. Funciona como uma barreira à passagem de espécies aniónicas, impedindo a sua oxidação à superfície do eléctrodo. O Nafion[®], porém, não melhora a selectividade contra substâncias neutras ou catiónicas. Um dos problemas inerentes ao uso do Nafion[®] é que este também afecta a resposta temporal, pois o coeficiente de difusão de espécies neutras e catiónicas é mais reduzido no interior do filme (Kristensen *et al.*, 1986). Este microeléctrodo modificado tem sido aplicado com sucesso na medição de NO em células individuais e em outro tipo de aplicações (Malinski and Taha, 1992; Malinski *et al.*, 1993a; Malinski *et al.*, 1993b; Blatter *et al.*, 1995; Gerova *et al.*, 1998; Balbatun *et al.*, 2003).

O desenvolvimento deste tipo de sensores despoletou o interesse de muitos investigadores, no sentido de explorar novos polímeros capazes de conferir as propriedades analíticas aos microeléctrodos mais adequadas para a detecção e quantificação do NO . Nesta linha de investigação, vários materiais foram propostos para recobrirem a superfície do carbono, incluindo diferentes tipos de metalo-porfirinas, metalo-ftalocianinas, micropartículas de cobre-platina, paládio e óxido de irídio (Bedioui

e Villeneuve, 2003). Na maioria dos casos, os filmes catalíticos combinam-se com filtros moleculares/iónicos, de modo a conseguir-se uma melhor selectividade contra potenciais interferentes. Os filtros mais utilizados são o Nafion[®], orto-fenilenodiamina (o-PD) (Friedemann *et al.*, 1996; Pontie *et al.*, 1999), polilisina e polipirídio (Mitchell and Michaelis, 1998).

Em síntese, a dificuldade em fazer medições de $\dot{\text{NO}}$ em tempo real e de uma forma selectiva tem constituído o principal obstáculo à compreensão do seu papel na fisiopatologia do cérebro e, apesar de terem sido feitos bastantes progressos, é ainda necessária mais investigação na área dos microeléctrodos de modo a que a sua utilização possa ser feita de um modo mais generalizado. Neste sentido, o objectivo deste trabalho centrou-se no desenvolvimento e caracterização de microeléctrodos de fibra de carbono modificados com uma camada de Nafion[®] e o-PD, os quais, acoplados a técnicas amperométricas, demonstraram possuir a sensibilidade, selectividade, resolução espacial e temporal para a medição em tempo real da dinâmica de produção e decaimento de $\dot{\text{NO}}$ em fatias de hipocampo de rato. Deste modo, espera-se que com o desenvolvimento desta tecnologia se possa contribuir para a elucidação dos mecanismos pelos quais o $\dot{\text{NO}}$ exerce os seus efeitos biológicos no cérebro, sendo a sua utilização particularmente útil para responder a questões relacionadas com a cinética da produção de $\dot{\text{NO}}$ induzida por agonistas em diferentes áreas do cérebro nomeadamente (1); o tipo de relação que pode ser estabelecido entre a concentração de $\dot{\text{NO}}$ e os efeitos a nível celular (2); como é que o balanço entre espécies oxidantes e antioxidantes (estado redox) das células e dos tecidos modulam a cinética de libertação de $\dot{\text{NO}}$ e distribuição espacial (3); dar contributos para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas no sentido de modular a actividade do $\dot{\text{NO}}$ no cérebro (4).

MATERIAIS E MÉTODOS

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Soluções

As soluções prepararam-se utilizando água ultra pura com resistividade superior a 18 MΩcm obtida num sistema Milli-Q da Millipore (USA). Todos os compostos foram utilizados na preparação das diferentes soluções como recebidos.

2.1.1. Electrólito de suporte

O electrólito de suporte utilizado na medição electroquímica de NO foi o tampão fosfato salino (PBS), pH 7,4 com a seguinte composição em mM:

- i) NaCl 140
- ii) KCl 2,7
- iii) Na_2HPO_4 8,1
- iv) KH_2PO_4 1,8

Todos os sais foram fornecidos pela Merck.

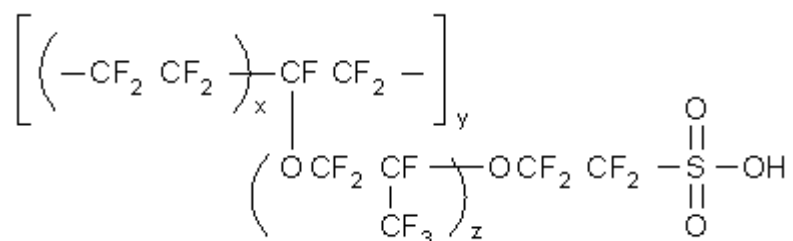
Ao tampão foi adicionado 100 μM de DTPA (Dietilenotriaminacetato-penta, Sigma), um agente quelante forte que permite remover os vestígios de ferro e outros metais da água desionizada. O PBS armazenou-se a 4 °C e utilizou-se à temperatura ambiente (22°C).

2.1.2. Soluções para modificação dos microelétrodos

A – Nafion[®] - O Nafion[®] (Aldrich, E.U.A) utilizou-se na forma comercial, isto é, uma solução a 5% numa mistura de alcoóis alifáticos e água.

B - *o*-PD – Preparou-se uma solução de *o*-PD (Fluka Chemica) 5 mM em PBS suplementado com 100 μM de ácido ascórbico para cada experiência. A solução saturou-se previamente com argon durante 10 minutos e manteve-se ao abrigo da luz de modo a evitar a foto-oxidação.

a) Nafion®



b) o-PD

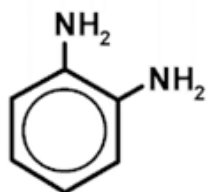


Figura 2.1. Estrutura química dos compostos utilizados para modificar a superfície dos microelétrodos de fibra de carbono.

2.1.3. Soluções padrão de óxido nítrico

Prepararam-se soluções padrão de $\dot{\text{N}}\text{O}$ a partir do gás purificado e de compostos químicos geradores de $\dot{\text{N}}\text{O}$, ou “dadores” de $\dot{\text{N}}\text{O}$. Tomaram-se precauções especiais na preparação das soluções padrão de $\dot{\text{N}}\text{O}$ a partir do gás, dada a toxicidade do $\dot{\text{N}}\text{O}$ e dos seus produtos da reacção com o O_2 . Assim, todo o processo de manuseamento e preparação das soluções realizou-se no interior de um nicho. Para evitar as trocas gasosas, utilizaram-se tubagens de aço inoxidável e vasos de vidro. O recurso ao teflon e a tampas de borracha foi limitado apenas aos pontos de união, tendo sido substituídos com regularidade.

As soluções padrão de $\dot{\text{N}}\text{O}$ foram preparadas borbulhando o gás (Air Liquide, França) em água previamente saturada com árgon durante 30 minutos. Este gás inerte é mais denso que o ar pelo que se mantém à superfície da solução, o que é uma vantagem relativamente ao azoto (Beckman *et al.*, 1996). Antes de ser borbulhado na água, o gás de $\dot{\text{N}}\text{O}$ passou por dois vasos contendo uma solução de NaOH 10M de

modo a remover óxidos superiores de azoto (e.g. NO_2 , N_2O_2 , N_2O_4) substâncias altamente reactivas e existentes na botija de NO gás. O fluxo de gás manteve-se durante cerca de uma hora, de modo a saturar a solução de NO . À temperatura de 22°C , a concentração de uma solução saturada de NO é de aproximadamente 2 mM (Beckman *et al.*, 1996) (figura 2.2.).

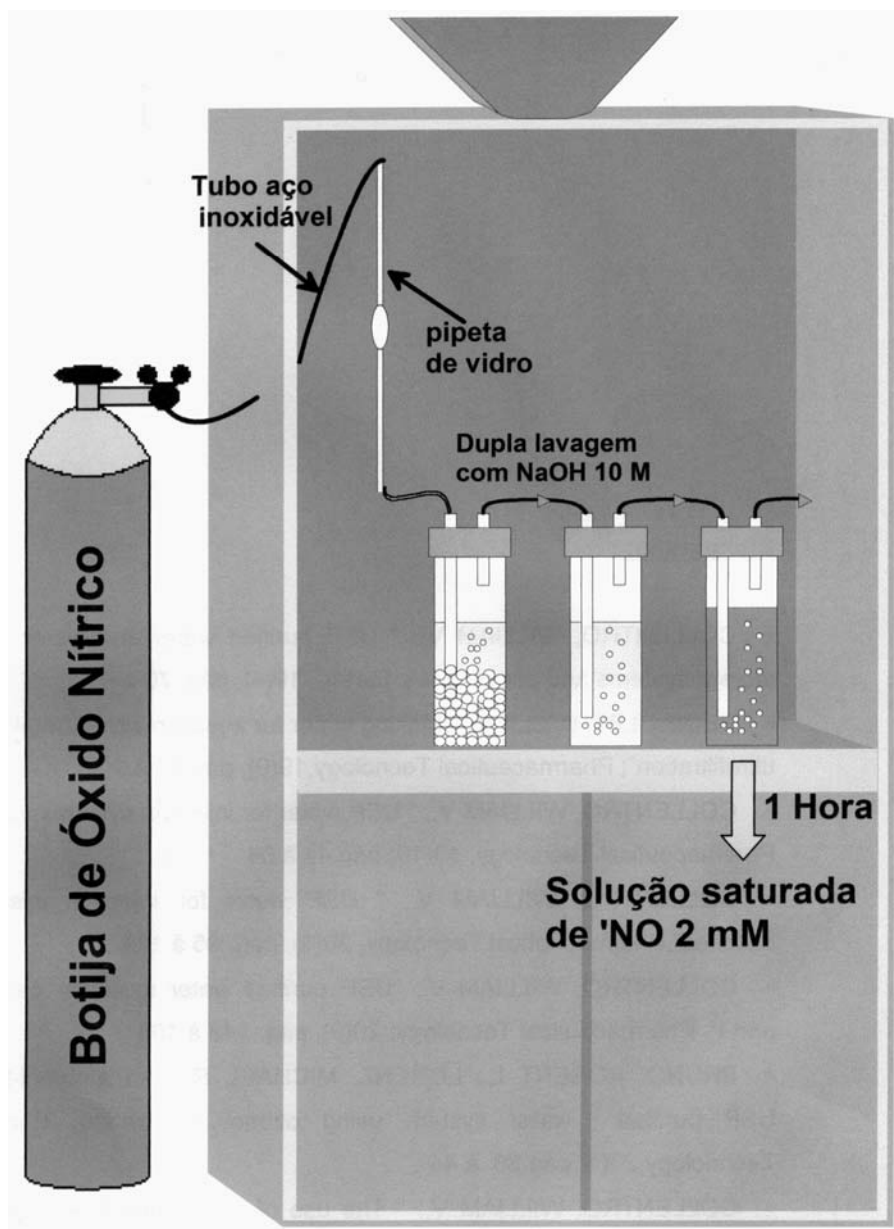


Figura 2.2. Representação esquemática do sistema utilizado para preparar soluções saturadas de NO a partir do gás. Todo o processo decorreu no interior de um nicho. A pipeta de vidro impede que haja refluxo de solução para a botija quando o sistema está desligado.

A preparação das soluções padrão de $\cdot\text{NO}$ para os diferentes ensaios realizados a partir da solução “stock” fez-se em vasos de 5 mL de capacidade, selados com um septo de borracha e cheios com PBS saturado com árgon durante 15 minutos. A transferência da solução “stock” de $\cdot\text{NO}$ para estes vasos fez-se recorrendo a microseringas gás “tight”, de modo a evitar as perdas de gás. Após a utilização do gás fez-se a purga do sistema com árgon durante alguns minutos.

Prepararam-se também soluções de $\cdot\text{NO}$ a partir de um dador de $\cdot\text{NO}$, o óxido nítrico/dietilenetriamina (DETA/NO), fornecido pela Sigma (figura 2.3.).

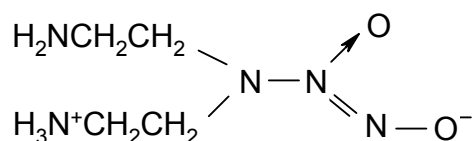


Figura 2.3. Estrutura química do DETA/NO, composto utilizado como dador de $\cdot\text{NO}$. Adaptado de (Keefer *et al.*, 1996).

O DETA/NO é utilizado para libertar $\cdot\text{NO}$ de uma forma controlada, tendo um tempo de meia vida de 52 horas à temperatura ambiente (Keefer *et al.*, 1996).

Preparou-se uma solução “stock” com a concentração de 10 mM DETA/NO em NaOH 0,01 M. Seguidamente repartiu-se em várias alíquotas e armazenou-se a $-18\text{ }^\circ\text{C}$. O $\cdot\text{NO}$ obtido a partir deste dador foi utilizado na realização de ensaios de sensibilidade, selectividade, limite de detecção e tempo de resposta dos microeléctrodos.

2.1.4. Soluções para calibração do sensor ISO-NOP (WPI)

A calibração do sensor ISO-NOP efectuou-se com soluções de $\cdot\text{NO}$ obtidas por reacção do NO_2^- com um excesso de KI em H_2SO_4 .

A solução “stock” de NO_2^- 50 μM preparou-se a partir de uma solução padrão comercial (Riedel de Haën) de NaNO_2 0,1 M. A solução “stock” de KI 0,2 M (Merck) preparou-se em água miliQ. Preparou-se ainda uma solução de H_2SO_4 (Merck) 0,2 M por diluição da solução concentrada de H_2SO_4 em água desionizada.

2.1.5. Soluções para os ensaios de selectividade

Para os ensaios de selectividade usaram-se as seguintes soluções:

- i) NO_2^- 100 μM . Esta solução preparou-se a partir de uma solução comercial (Riedel de Haën) de NaNO_2 0,1 M.
- ii) Ácido Ascórbico (AA) 10 mM (Fluka). Preparou-se em água miliQ previamente saturada com árgon.
- iii) Dopamina (DA) 10 mM (Fluka). Preparou-se em ácido perclórico a 1%.
- iv) 5-hidroxitriptamina (5-HT) 10 mM (Sigma). Preparou-se a solução “stock” em ácido perclórico a 1%.
- v) Tirosina 10 μM (Merck). Preparou-se em água miliQ.
- vi) H_2O_2 200 μM (Merck). Preparou-se por diluição de uma solução concentrada em água miliQ.
- vii) L-glutamato (L-Glu) (Biochemical), L-arginina (L-Arg) (Sigma) e n-metil-d-aspartato (NMDA) (Tocris Cookson Ltd., Avonmouth, U.K.). As soluções destes 3 compostos prepararam-se por diluição dos mesmos em água miliQ, para uma concentração final de 1 mM, 1 mM e 0,1 mM respectivamente.
- viii) ONOO^- . Preparou-se por adição de NO_2^- a uma solução ácida de H_2O_2 . A reacção foi interrompida por adição de NaOH (Beckman *et al.*, 1994).
- ix) Óxidos superiores de azoto (N_xO_y) 20 μM . Esta solução preparou-se a partir da solução saturada de gás de NO por exposição prolongada ao oxigénio, resultando então na decomposição do NO em óxidos superiores de azoto.

As soluções de AA, DA, 5-HT, tirosina foram mantidas ao abrigo da luz. Adicionalmente, as soluções “stock” de DA e 5-HT foram conservadas a $-18\text{ }^\circ\text{C}$. As soluções de AA, tirosina, H_2O_2 , ONOO^- e N_xO_y foram preparadas de fresco em cada dia de ensaios.

2.1.6 Soluções utilizadas na medição de óxido nítrico em fatias de hipocampo de rato

Após isolamento, as fatias de hipocampo recuperaram em fluido cerebrospinal (aCSF), preparado diariamente, e cuja constituição é a seguinte (em mM):

- i) NaCl 124
- ii) KCl 2
- iii) NaHCO₃ 25
- iv) KH₂PO₄ 1,25
- v) MgSO₄ 10
- vi) CaCl₂ 0,5

Todos os sais foram obtidos da Merck.

O aCSF foi suplementado com 10 mM de glucose (Merck), 1 mM de glutatião (GSH) (Sigma) e 0,2 mM de ascorbato (Fluka). O aCSF foi constantemente borbulhado com carbox, uma mistura gasosa de 95% O₂ e 5% CO₂, de modo a manter o pH 7,4. Durante as experiências, as fatias foram perfundidas com aCSF contendo 1,5 mM CaCl₂, mas sem GSH, ascorbato e MgSO₄ (Ledo *et al.*, 2002).

2.2. Técnicas electroquímicas

Os resultados obtidos no âmbito deste trabalho foram obtidos por recurso a métodos voltamétricos e amperométricos. Estes baseiam-se na relação existente entre os fenómenos químicos de transferência de carga e as propriedades eléctricas daí resultantes, podendo essa relação ser utilizada em determinações quantitativas.

Em voltametria mede-se a corrente produzida durante a oxidação ou redução de espécies electroactivas em função do potencial aplicado ao eléctrodo de trabalho (Stamford *et al.*, 1992). A reacção redox ocorre à superfície de um eléctrodo de trabalho, para o qual o analito em solução ou no fluído extracelular se difunde, gerando aí uma corrente faradaica que serve de sinal analítico. As diferentes técnicas voltamétricas variam entre si na forma como o potencial é aplicado e na amostragem da corrente. Neste trabalho utilizou-se um circuito de três eléctrodos, constituído por um eléctrodo de trabalho, um eléctrodo auxiliar e um eléctrodo de referência (figura 2.4.).

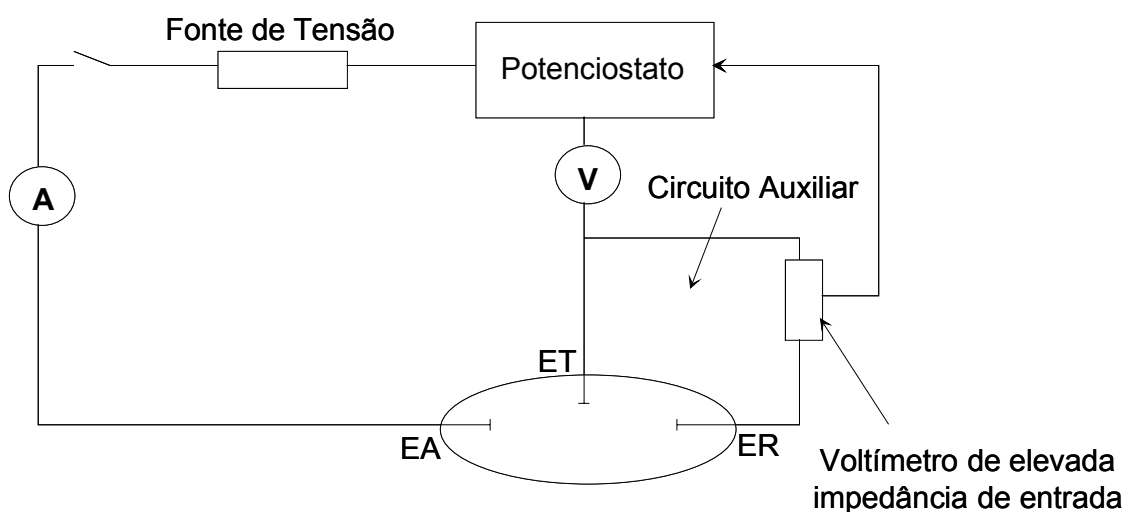


Figura 2.4. Circuito de 3 eléctrodos utilizado em voltametria. EA- Eléctrodo Auxiliar; ET- Eléctrodo de Trabalho; ER- Eléctrodo de Referência; A- Amperímetro; V- Voltímetro. Adaptado de Riley and Watson, 1987.

No circuito principal, entre ET e EA mede-se a corrente eléctrica. No circuito auxiliar mede-se a diferença entre ET e ER com um voltímetro de elevada impedância de entrada (HIV).

Recorrendo ao sistema de três eléctrodos é possível controlar com exactidão e rapidez (μs) o potencial aplicado eléctrodo de trabalho, recorrendo a um potenciostato (Riley and Watson, 1987; Brett and Brett, 1996a). Nos ensaios *in vitro* e nos processos de revestimento com *o*-PD, utilizou-se um eléctrodo de referência de Ag/AgCl (KCl 3M). Nos ensaios nas fatias de hipocampo, foi utilizado um eléctrodo de referência de Ag/AgCl (pellet) de modo que o potencial é estabelecido de acordo com a concentração do ião cloreto em solução. Como eléctrodo auxiliar utilizou-se um fio de platina. Nos ensaios em fatias de hipocampo foi utilizado um sistema de 2 eléctrodos. Neste caso não é necessário um terceiro eléctrodo porque a corrente que passa no circuito é muito reduzida, o que faz com que a queda ohmica seja muito pequena, pelo que o potencial do eléctrodo de referência se mantém constante (Brett and Brett, 1996a).

2.2.1. Voltametria cíclica

A voltametria cíclica consiste na aplicação de um potencial ao eléctrodo de trabalho que varia linearmente com o tempo. O varrimento do potencial é efectuado nos dois sentidos, da oxidação e da redução, periodicamente, conforme ilustrado na figura 2.5. No decurso do processo de varrimento de potencial, ocorrem fenómenos de oxidação ou redução das diferentes espécies electroactivas em solução. Existe também uma contribuição para o sinal de uma corrente capacitiva que resulta do processo de carga do eléctrodo durante o varrimento de potencial. Esta será tanto maior quanto maior a velocidade de varrimento.

Esta não se constitui como a técnica voltamétrica de maior relevo em termos analíticos, permitindo acima de tudo fazer uma caracterização qualitativa do sistema electroquímico em termos de espécies electroactivas aí presentes (Brett and Brett, 1996b; Pontie *et al.*, 1999; Pontie *et al.*, 2000).

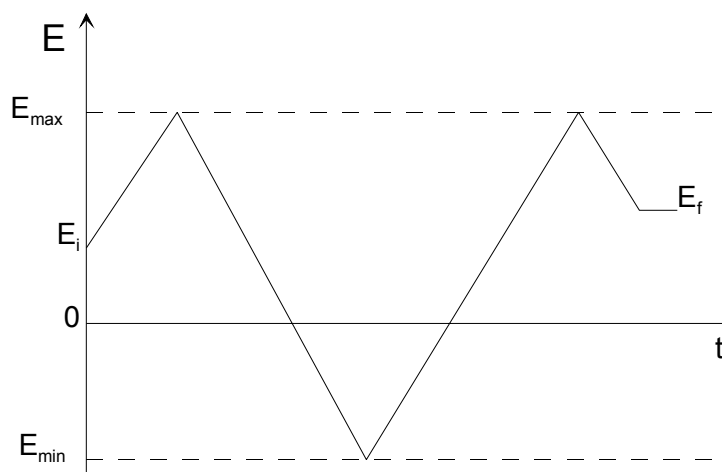


Figura 2.5. Forma da aplicação do potencial em voltametria cíclica. O potencial varia entre um valor máximo (E_{\max}) e um valor mínimo (E_{\min}), partindo de um potencial inicial (E_i) e terminando num valor final (E_f) em função de um tempo pré-determinado.

Neste trabalho usou-se a voltametria cíclica de rápido varrimento (FCV), na qual o potenciostato aplica ao eléctrodo de trabalho varrimentos de potencial no sentido catódico e anódico, podendo um varrimento durar apenas 14-20 ms e ser repetido cerca de 40 vezes por segundo (Stamford *et al.*, 1986). No caso da FCV, o potenciostato sujeita o eléctrodo de trabalho a uma onda de varrimento triangular contínua.

2.2.2. Voltametria de onda quadrada

A voltametria de onda quadrada (SWV) é uma técnica voltamétrica de impulso em que se sobrepõe uma onda quadrada a um varrimento de potencial em escada. A amostragem de corrente é feita no final dos impulsos directos e inversos e o sinal obtido é dado como uma intensidade da corrente resultante, apresentando uma boa sensibilidade e boa relação entre corrente faradaica e não faradaica. A figura 2.6. apresenta a forma de aplicação do potencial da SWV.

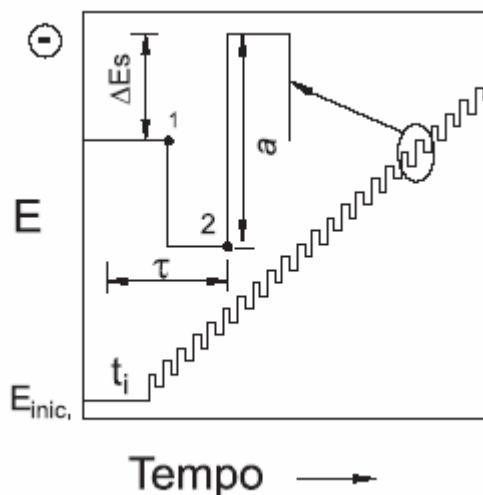


Figura 2.6. Forma de aplicação do potencial em voltametria de onda quadrada. Adaptado de Souza *et al.*, 2004.

As curvas de corrente-potencial apresentam perfil bem definido e são geralmente simétricas, isto porque as correntes são medidas somente no final de cada semi-período e as variações na altura e na largura do pulso de potencial são sempre constantes, para um determinado intervalo de potenciais.

A SWV tem como principais vantagens:

- i) Minimizar a corrente capacitiva, melhorando a resolução e a sensibilidade analítica.
- ii) Possibilitar varrimentos rápidos de potencial;
- iii) A análise da corrente directa e inversa possibilita a obtenção de dados mecanísticos semelhantes àqueles obtidos por voltametria cíclica, porém com maior sensibilidade. (Souza *et al.*, 2003; Souza *et al.*, 2004).

Neste trabalho, os voltamogramas de onda quadrada foram obtidos utilizando o potenciostato PGSAT 12 (Eco Chemie, The Netherlands), com um módulo de baixas correntes e controlado pela versão 4.9 do programa GPES. Os registos foram obtidos por varrimento do potencial entre +0,4 e +1,0 V para as soluções de NO e entre +0,4 to +1,3 V para as soluções de NO_2^- , com uma velocidade de varrimento de 50 mV/s e uma frequência de 25 Hz.

2.2.3. Amperometria

Consiste na aplicação de um potencial constante ao ET de forma a oxidar ou reduzir as espécies químicas electroactivas. É uma técnica muito sensível, com elevada resolução temporal, mas com baixa selectividade dado que são oxidadas todas as espécies presentes em solução que apresentem um potencial de oxidação inferior ao aplicado. Geralmente é aplicado um potencial 100 a 200 mV acima do potencial de oxidação-redução da espécie electroactiva em estudo.

2.3. Eléctrodos

2.3.1. ISO-NOP

Nos ensaios relativos à determinação da cinética de libertação de NO a partir do DETA/ NO e na aferição da concentração da solução padrão de NO preparada a partir do gás purificado utilizou-se o sensor comercial ISO-NOP conectado a um amperímetro ISO-NO Mark II (World Precision Instruments, Inc., USA). O sensor é constituído por um eléctrodo de platina com 2 mm de diâmetro e um eléctrodo de referência Ag/AgCl. Os eléctrodos são colocados numa manga de aço inoxidável com uma membrana de teflon na extremidade permeável a gás (figura 2.7.). O potencial aplicado ao eléctrodo de platina foi de + 865 mV vs Ag/AgCl. A noite anterior ao início das experiências serviu para polarizar o eléctrodo, de forma a atingir uma linha de base estável (World Precision Instruments, 1999).

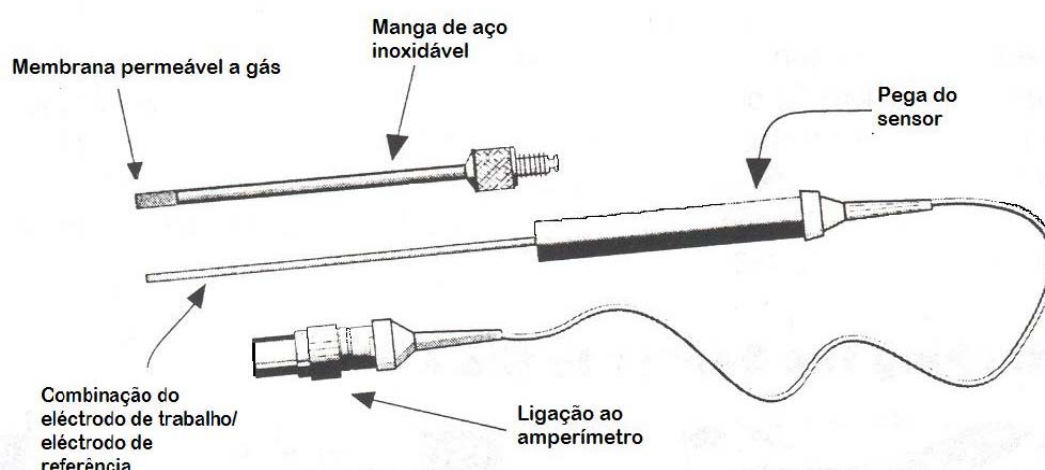


Figura 2.7. Representação esquemática de todos os componentes do sensor ISO-NOP 2 mm Pt. Adaptado de World Precision Instruments, 1999.

2.3.2. Calibração do sensor ISO-NOP 2 mm Pt

A calibração do sensor efectuou-se previamente aos ensaios de medição (figura 2.8.). Num vaso de vidro adicionaram-se partes iguais de H_2SO_4 0,2 M e KI 0,2 M. De seguida ajustou-se o sensor a um septo de borracha fornecido para o efeito e, com muito cuidado para evitar algum contacto mais violento da membrana de gás com o vaso de vidro ou a barra magnética e consequente inutilização da mesma, mergulhou-se o sensor na solução de calibração. Depois de se atingir uma corrente de fundo estável, deu-se início ao processo de calibração, por adições de solução padrão de NO_2^- 50 μM . Os dados relativos às experiências realizadas com este eléctrodo registaram-se num computador, usando como interface o programa Duo18.

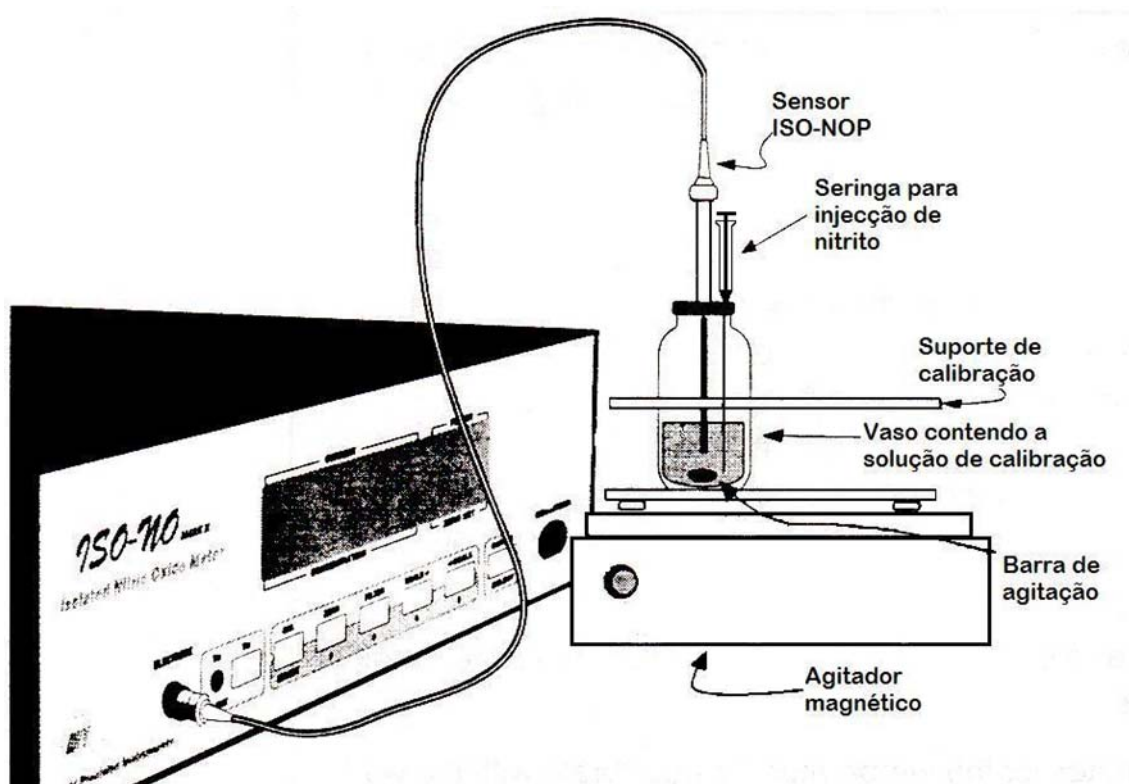


Figura 2.8. Representação esquemática da calibração do sensor ISO-NOP 2 mm Pt e equipamento envolvido na mesma. Adaptado de World Precision Instruments, 1999.

2.3.3. Microelétrodos de fibra de carbono

O carbono é o material de eleição na construção de microelétrodos destinados a medidas biológicas dada a sua estabilidade em meio biológico. O processo de construção destes microelétrodos foi semelhante ao descrito em trabalhos anteriores (Barbosa *et al.*, 1998; Ledo *et al.*, 2002) e estes encontram-se representados esquematicamente na figura 2.9.

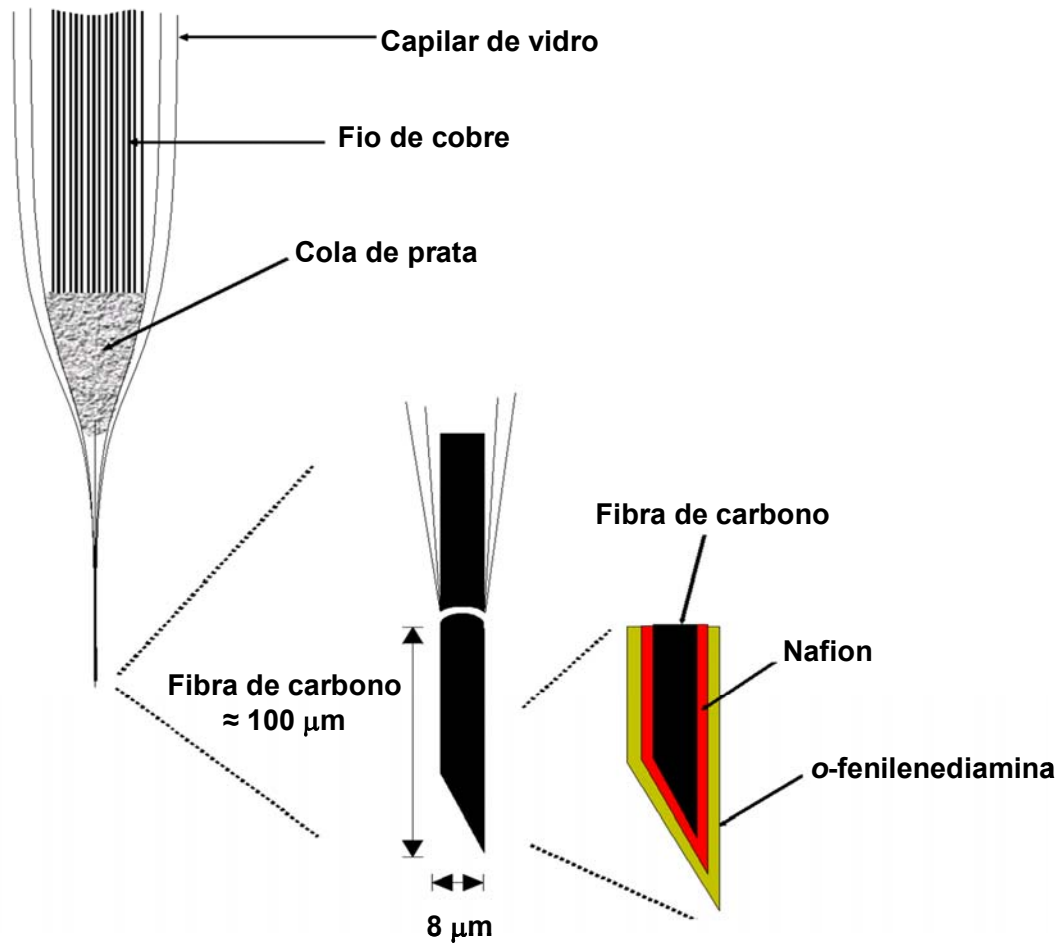


Figura 2.9. Representação esquemática do microelétrodo de fibra de carbono. Na primeira expansão ilustra-se a zona de selagem do vidro com a fibra e na segunda expansão ilustra-se os diferentes revestimentos a que a fibra foi sujeita.

A sua construção englobou os seguintes passos: em primeiro lugar inseriu-se uma fibra de carbono com 8 μm de diâmetro (Courtaulds, Ltd, UK) no interior de um capilar de vidro de borossilicato (1.6 mm i.d. x 2 mm o.d.), previamente cheio com acetona. A acetona desempenhou uma dupla função: serviu para limpar as fibras de resinas que recobriam a sua superfície e para facilitar a sua inserção no capilar, minimizando a atracção electrostática entre a fibra e o vidro. A inserção das fibras de carbono foi feita com o auxílio de uma pinça sob iluminação de fibra óptica (Schott KL 1500, Alemanha). Depois, a acetona evaporou lentamente, até que deixou de haver risco da fibra de carbono sair do capilar de vidro (figura 2.10.).

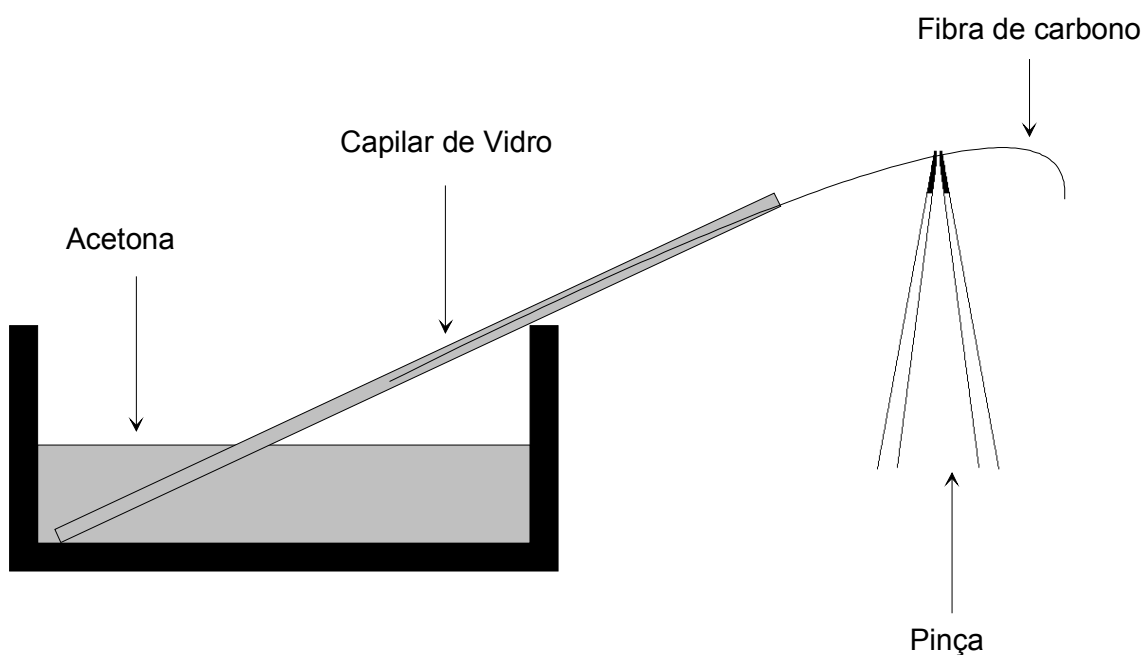


Figura 2.10. Esquema representativo da inserção da fibra de carbono no capilar de vidro com o auxílio de uma pinça.

Na etapa seguinte, o capilar de vidro já com a fibra foi estirado num “puller” vertical (Harvard Apparatus Ltd, UK). O “puller” tem dois parâmetros que se podem modificar de modo a obter pipetas com diferentes características. Após vários ensaios em que se variou a força de tensão e o aquecimento do filamento, obtiveram-se microelétrodos com as características adequadas aos objectivos do trabalho. A elevada resistência à tensão da fibra de carbono impede que esta se quebre quando o vidro parte, obtendo-se assim uma pipeta com a fibra de vidro fortemente selada pelo vidro colapsado e que prolonga vários centímetros para além da zona de selagem, bem como outra pipeta sem fibra (figura 2.11.).

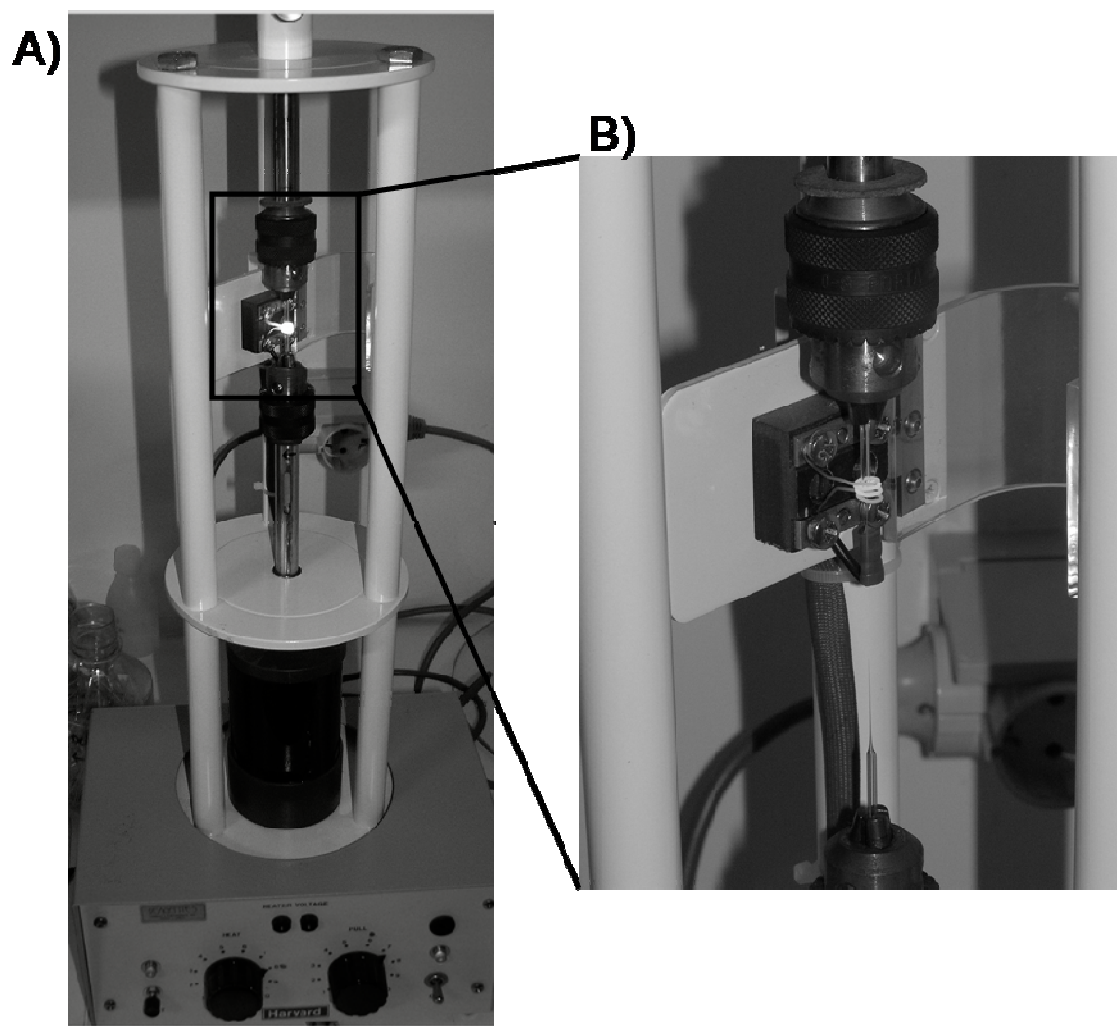


Figura 2.11. Fotografias do “puller” utilizado no estiramento dos capilares de vidro. A) - Fotografia geral do aparelho. B) – Ampliação da área delimitada em A.

Posteriormente ao estiramento, a fibra de carbono que ficou exposta foi visualizada num microscópio invertido (Olympus CK2, Japão) com uma ampliação de 200x e verificou-se a qualidade da selagem entre o vidro e a fibra de carbono, bem como a extensão interna da mesma fibra de modo a permitir um bom contacto eléctrico. Com um micrómetro instalado numa das oculares e um micromanipulador instalado no microscópio, cortou-se a fibra com uma pinça de modo a obter um comprimento de cerca de 100 μm . No interior do capilar colocou-se cola de prata (RS, UK) com uma seringa e seguidamente um fio de cobre. A cola de prata serviu para estabelecer contacto eléctrico entre a fibra de carbono e o fio de cobre. Para terminar o processo de construção do microeléctrodo utilizou-se cola de cianoacrilato para fixar

o fio de cobre ao capilar de vidro (Barbosa *et al.*, 1998), obtendo-se no final um eléctrodo idêntico ao mostrado na figura 2.12.

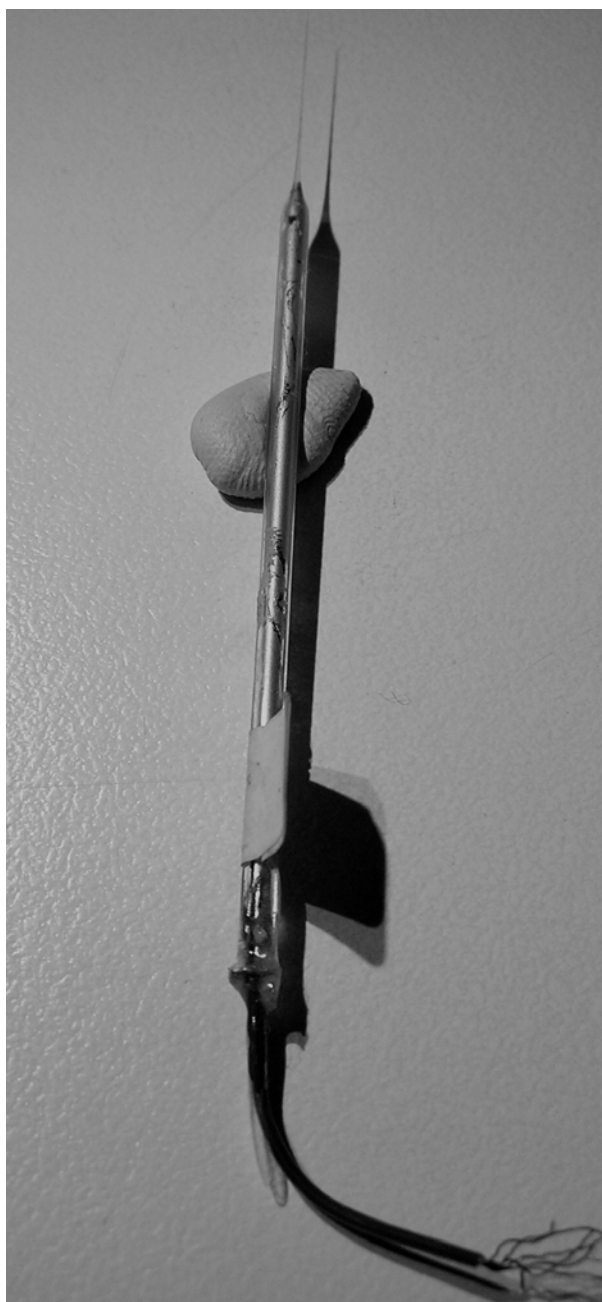


Figura 2.12. Fotografia ilustrativa do aspecto de um microeléctrodo de fibra de carbono.

2.4. Modificação química dos microelectrodos de fibra de carbono

2.4.1. Nafion[®]

Os microelectrodos foram revestidos inicialmente com uma camada de Nafion[®] mergulhando a fibra de carbono numa solução de Nafion[®] (5% em alcoóis alifáticos) à temperatura ambiente durante 30 segundos. A secagem do filme foi feita por evaporação numa estufa a 170 °C durante 10 minutos. Este processo de secagem do Nafion[®] a elevadas temperaturas conduz a microelectrodos com melhores características analíticas (Friedemann *et al.*, 1996; Gerhardt and Hoffman, 2001).

2.4.2. *o*-PD

O filme de *o*-PD foi depositado por electropolimerização a partir de uma solução de 5 mM de *o*-PD preparada em PBS suplementado com 100 μ M de AA. A solução foi feita de fresco para cada experiência e foi electropolimerizada na superfície da fibra de carbono por amperometria a um potencial constante de +0,9 V vs. Ag/AgCl durante 15 minutos. À medida que as moléculas de *o*-PD vão sendo depositadas na superfície da fibra de carbono, menos moléculas conseguem aceder a essa mesma superfície devido à restrição que o filme exerce na acumulação de monómeros de *o*-PD, conforme se ilustra na figura 2.13. (Friedemann *et al.*, 1996).

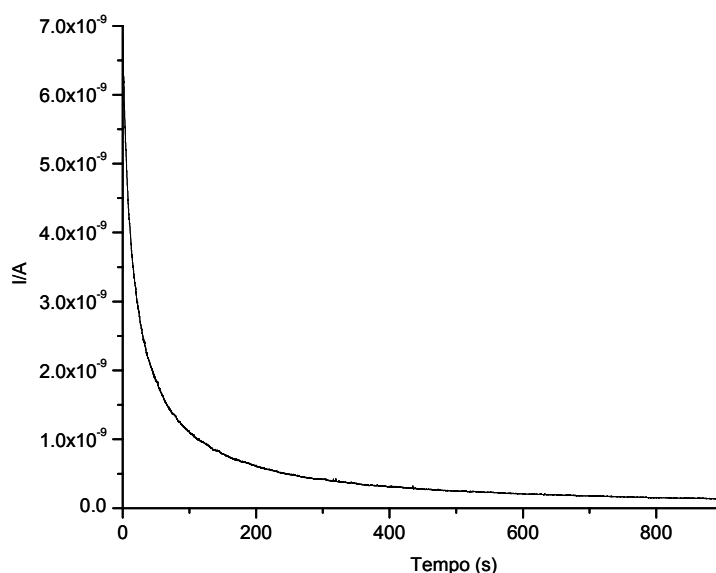


Figura 2.13. Registo amperométrico do decaimento de corrente observado a +0,9 V vs Ag/AgCl decorrente de electropolimerização do filme de *o*-PD.

2.5. Caracterização dos microelétrodos de fibra de carbono modificados com Nafion[®] e *o*-PD

2.5.1. Microscopia de varrimento electrónico

A microscopia de varrimento electrónico (SEM) é uma técnica que utiliza um feixe de electrões em vez de luz para formar uma imagem, apresentando diversas vantagens relativamente ao microscópio óptico.

O microscópio de varrimento electrónico tem uma grande profundidade de campo, o que permite a focagem de uma grande quantidade de amostra de uma só vez. Além disso, esta tecnologia possibilita a formação de imagens de elevada resolução, o que permite a distinção de pontos que se encontrem muito próximos utilizando uma ampliação maior. As amostras são de preparação relativamente simples e o único atributo que devem possuir é o de serem condutoras. O feixe de electrões é gerado a partir de um filamento que pode ser de diferentes materiais. O filamento utilizado nas experiências por SEM foi um cátodo de tungsténio submetido a uma voltagem que o leva à incandescência. O ânodo atrai fortemente os electrões gerados pelo filamento, criando um fluxo de electrões que atravessam a amostra e geram a imagem. As amostras devem ser bem fixas e no caso de serem não metálicas, como é o caso dos capilares a partir dos quais se constroem os microelétrodos de fibra de carbono, devem ser revestidas de modo a adquirirem condutividade (Stokes, 2003). Neste caso, as amostras foram recobertas com uma fina camada de ouro.

A microscopia óptica, com o grau de ampliação utilizado (200x), não permite observar os microelétrodos com grande detalhe. Neste sentido, utilizou-se a SEM para visualizar com mais pormenor a superfície das fibras de carbono, e as zonas de selagem dos microelétrodos.

As fotografias obtidas revelaram que as fibras de carbono apresentam uma superfície rugosa, com estrias longitudinais (figura 2.14.). O processo de construção dos microelétrodos feito por estiramento em “puller” vertical permitiu obter uma boa selagem entre o vidro e a fibra, tal como se pode observar na figura 2.15.

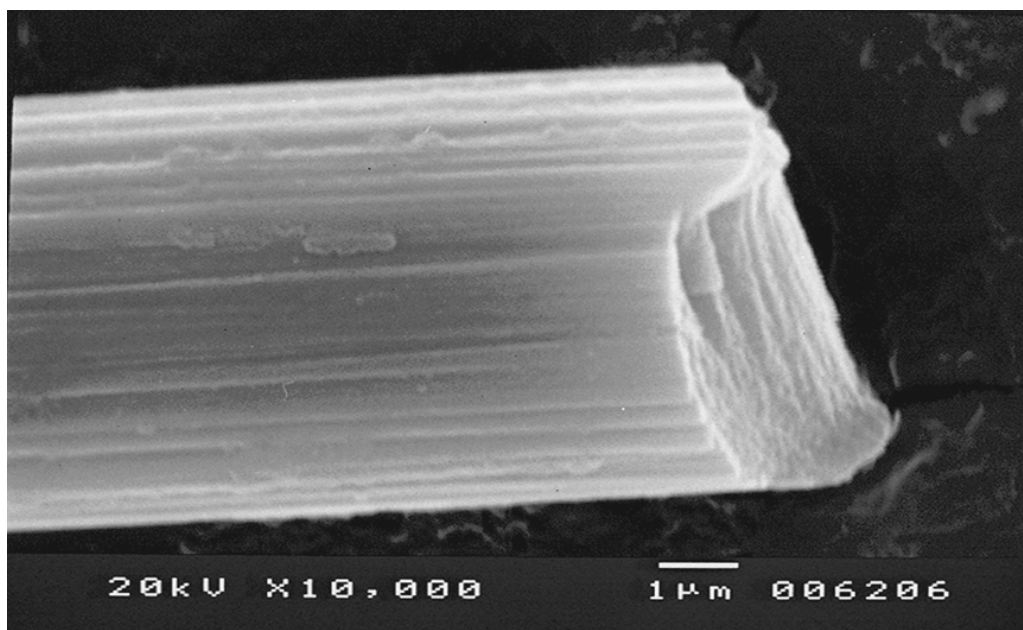


Figura 2.14. Fotografia obtida por microscopia de varrimento electrónico de uma fibra de carbono (Courtaulds, Ltd, UK), com 8 µm de diâmetro.

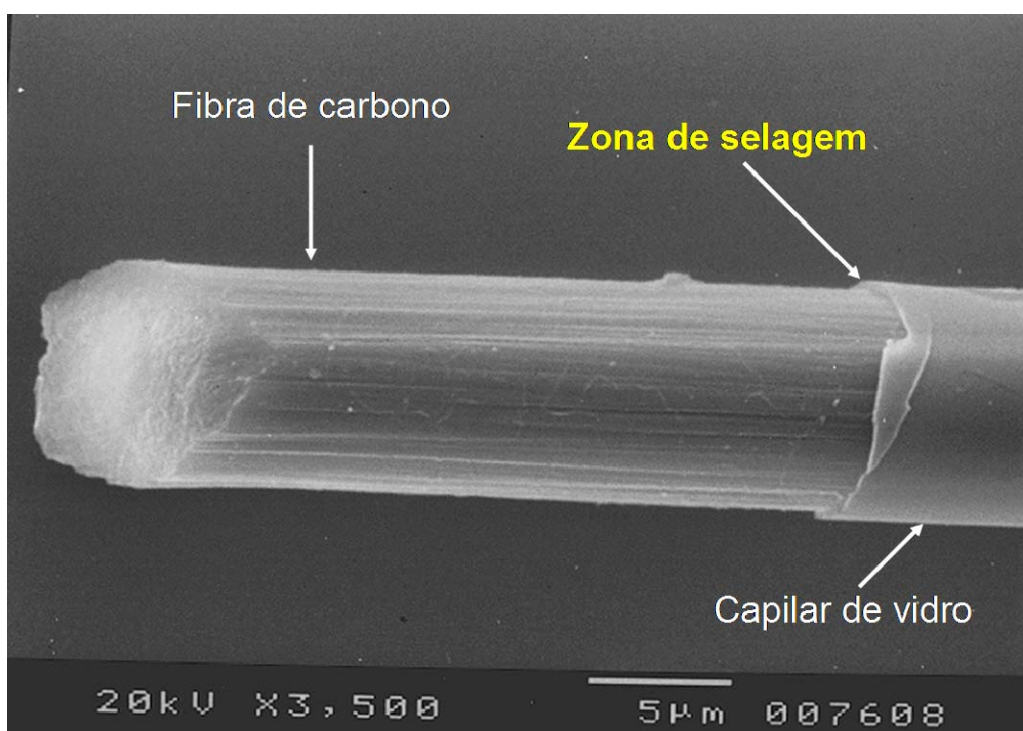


Figura 2.15. Fotografia obtida por microscopia de varrimento electrónico de um microeléctrodo de fibra de carbono. Nesta foto é possível distinguir visualmente a zona correspondente à fibra de carbono e ao capilar de vidro, bem como avaliar a selagem entre a fibra e o capilar de vidro.

Com um grau de ampliação até 2000 vezes, não foram visíveis alterações no aspecto superficial das fibras de carbono decorrentes da aplicação dos filmes poliméricos, Nafion[®] e *o*-PD (figura 2.16.).

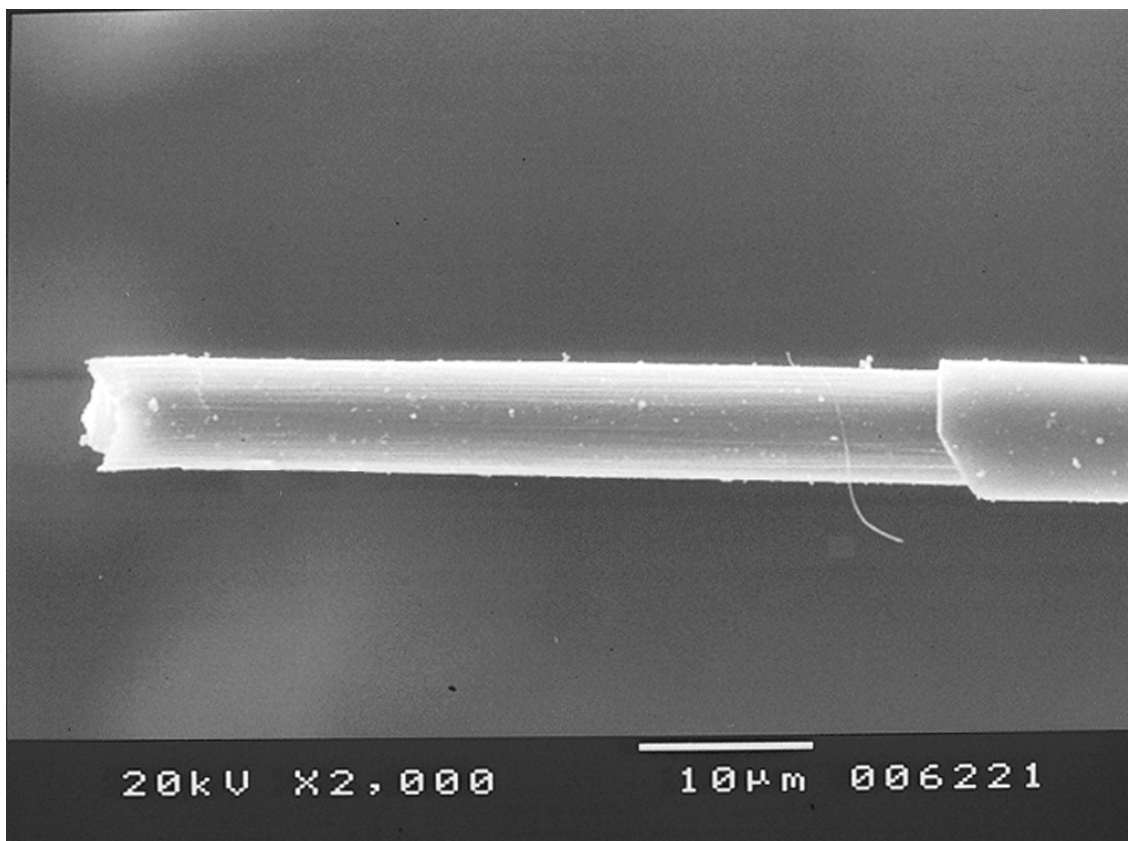


Figura 2.16. Fotografia obtida por microscopia de varrimento electrónico de um microelectrodo de fibra de carbono revestido com uma camada de Nafion[®] e uma camada de *o*-PD.

2.5.2. Sistema de análise por injeção em fluxo

Após a construção, os microelectrodos foram sujeitos a uma inspecção visual e foi feita uma triagem grosseira daqueles que se apresentavam defeituosos em termos de comprimento, selagem e colagem. Os microelectrodos seleccionados para os testes analíticos foram depois colocados numa célula de fluxo em acrílico (figura 2.17.) conjuntamente como o electrodo de referência e auxiliar. A célula de fluxo foi depois integrada num sistema de injeção em fluxo (FIA) onde foram realizados todos os ensaios de selectividade, sensibilidade, tempo de resposta e limite de detecção. O PBS foi utilizado como solução transportadora, na qual se injectaram as soluções dos

diferentes compostos utilizados por intermédio de uma válvula injectora de 4 vias, por comutação manual da válvula. A velocidade de fluxo determinada por uma bomba peristáltica foi de 2 mL/min, e o volume de solução teste injectado foi de 100 μ L. O microeléctrodo inseria-se na célula de fluxo ilustrada na figura 2.17., por onde fluía, de baixo para cima, a solução transportadora. Os eléctrodos de referência e o eléctrodo auxiliar colocaram-se num poço adjacente ao microeléctrodo. O sinal transitório de corrente foi medido ou por amperometria ou voltametria num potenciostato PGSTAT 12 e foi registado digitalmente num computador por recurso ao programa GPES 4.9. (figura 2.18.). O sistema FIA apresenta vantagens ao nível da reprodutibilidade dos ensaios e na facilidade com que é manipulado o microeléctrodo. Por outro lado, reproduz de um modo mais fiel as condições da câmara de perfusão onde se realizaram as experiências nas fatias de hipocampo.

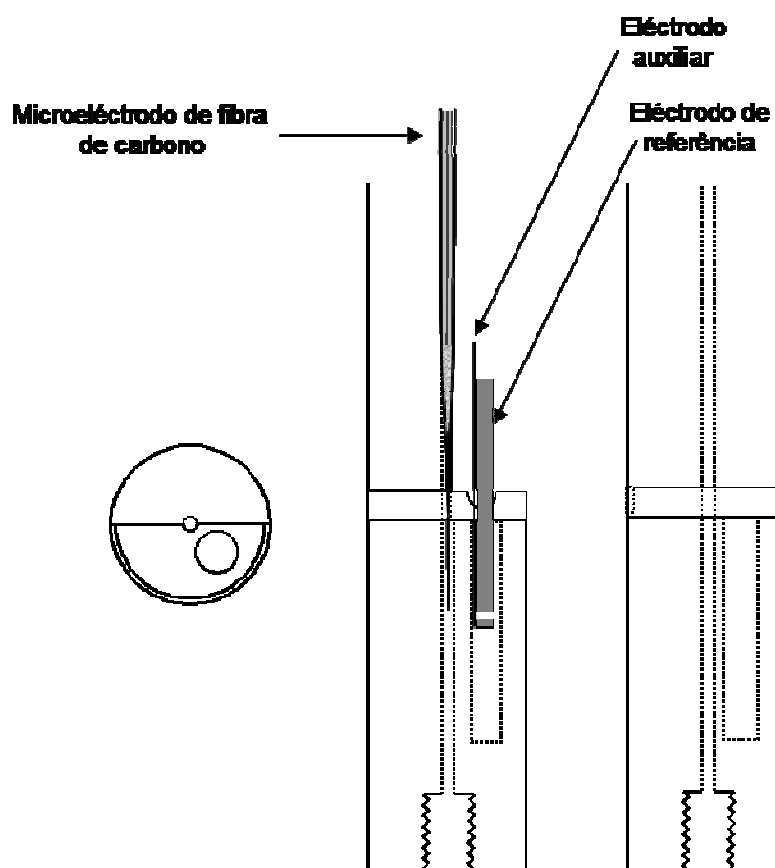


Figura 2.17. Célula de fluxo construída em acrílico para avaliação dos microeléctrodos. Da direita para a esquerda: perspectivas de topo, lateral e frontal. A posição do microeléctrodo, eléctrodo de referência e eléctrodo auxiliar está representada na figura central, em perspectiva lateral. Adaptado de (Barbosa, 1998).

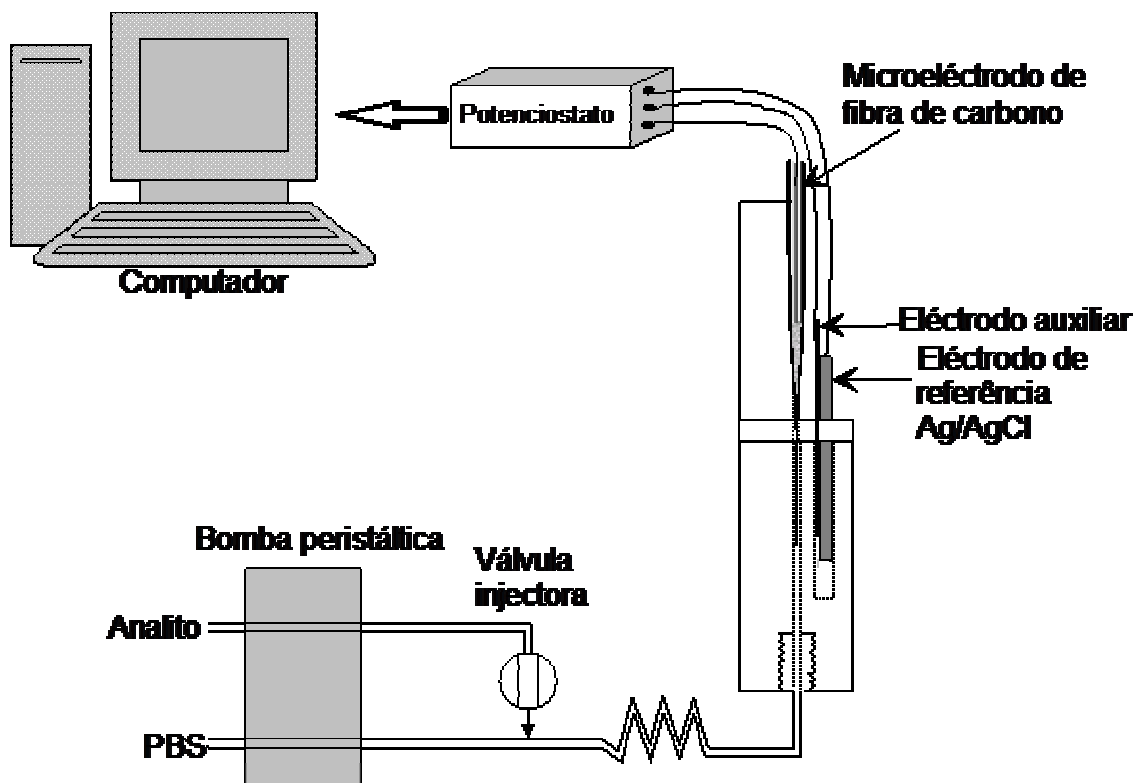


Figura 2.18. Montagem para análise por FIA usada nos testes realizados nos microelétrodos de fibra de carbono. Adaptado de (Barbosa, 1998)

2.5.3. Voltametria cíclica de varrimento rápido

Esta técnica voltamétrica foi efectuada recorrendo a um potenciostato EI-400 (Ensmann Instruments, Bloomington, USA) que permite efectuar varrimentos de potencial até 1000 V/s. Nos ensaios efectuados foi utilizada uma velocidade de varrimento de 200V/s no intervalo de -0,4 a +1,6 V. O potencial aplicado é suficientemente elevado para oxidar as fibras de carbono, o que contribui para uma melhoria em termos de sensibilidade (Hafizi *et al.*, 1990). No entanto, a este acréscimo em termos de sensibilidade poderá estar também associada uma diminuição do tempo de resposta (Stamford *et al.*, 1992). Os sinais foram filtrados a 2 KHz e monitorizados num osciloscópio digital (Tektronix TDS 220, Portland OR, USA). Os voltamogramas obtidos por FCV permitiram-nos descortinar os microelétrodos com propriedades eléctricas apropriadas. Na figura 2.19. mostram-se dois tipos de voltamogramas de microelétrodos com um perfil de resposta mais capacitivo e portanto mais adequados aos registos electroquímicos (A) e outro com perfil de resposta mais resistivo (B). Com

a experiência, é possível prever se o microeléctrodo tem uma melhor ou pior sensibilidade através da forma da corrente de base (Stamford *et al.*, 1995).

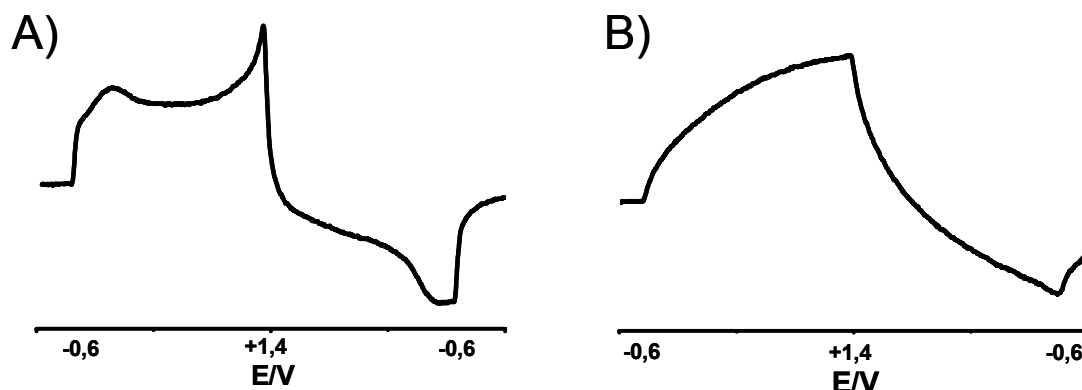


Figura 2.19. Voltamogramas obtidos por FCV de microeléctrodos com um bom perfil redox (A) e com um mau perfil redox (B). Microeléctrodos com o perfil mostrado em B devem ser rejeitados.

Por regra, um microeléctrodo que se apresente um bom perfil redox é capaz de produzir bons picos de oxidação dos compostos, tem um tempo de resposta rápido, uma corrente de base estável e apresenta pouco ruído. Em termos eléctricos, um eléctrodo tem um comportamento intermédio entre uma resistência e um condensador. Um bom microeléctrodo comporta-se de uma forma mais capacitiva, isto é, com picos transitórios nos pontos de inversão de potencial. Por seu turno, os maus microeléctrodos têm um comportamento mais resistivo, devido a uma deficiente selagem entre o vidro e o carbono ou a problemas de contacto eléctrico. Com a prática, distinguem-se os dois tipos de microeléctrodos, rejeitando-se os últimos (Stamford *et al.*, 1992).

2.5.4. Sensibilidade

A sensibilidade dos microeléctrodos foi avaliada através de calibrações em modo amperométrico. Realizaram-se calibrações em fluxo e em modo estacionário. Depois de se ter atingido uma linha de base estável, as soluções de NO preparadas quer a partir do gás, quer a partir do dador, foram injectadas repetidamente. A corrente de oxidação mediu-se com o potenciostato PGSAT 12 no modo amperométrico. Alternativamente utilizou-se um pico amperímetro (Tacussel/Radiometer AMU130, France). O potencial fixado foi de +0.9 V vs. Ag/AgCl. Para as calibrações em vaso,

após a obtenção de uma linha base estável, adicionaram-se concentrações crescentes de soluções de NO . Os valores de sensibilidade foram obtidos a partir da recta de regressão linear obtida em cada calibração.

2.5.5. Limite de detecção

O limite de detecção (LOD) dos microelétrodos determinou-se a partir de calibrações em modo amperométrico e em fluxo para valores de concentração de NO entre 13 e 100 nM. Os valores foram calculados de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{L.O.D.} = 3 \times \frac{S_{y/x}}{m}$$

$S_{y/x}$ → desvio padrão da recta de calibração

m → declive.

2.5.6. Selectividade

A determinação da selectividade dos microelétrodos foi determinada em modo amperométrico, por comparação entre a corrente produzida por 1 μM NO preparado a partir de DETA/ NO e a corrente produzida após injeção de 100 μM AA, 100 μM NO_2^- , 4 μM DA, 4 μM 5-HT, 1 mM L-glu, 1 mM L-arg, 0.1 mM NMDA, 10 μM tirosina, 200 μM H_2O_2 , 20 μM N_xO_y e 100 μM ONOO^- .

A selectividade é apresentada em termos raciométricos, isto é, como a razão entre a corrente produzida por 1 μM NO preparado a partir de DETA/ NO e a corrente produzida por igual concentração de cada um dos interferentes.

2.5.7. Tempo de resposta

O tempo de resposta dos microelétrodos foi determinado amperometricamente. Após a obtenção de uma linha de base estável, fizeram-se injeções sucessivas de uma solução de 260 nM NO preparada a partir do DETA/ NO e o tempo de resposta foi calculado como o tempo necessário para atingir 50% do sinal máximo de corrente após cada injeção. Foram utilizados microelétrodos sem revestimento como controlo.

2.6. Monitorização do óxido nítrico nas fatias de hipocampo

2.6.1. Preparação das fatias de hipocampo

Foram utilizados ratos Wistar sacrificados por deslocamento cervical. Após decapitação do animal, o cérebro foi isolado e colocado numa caixa de Petri, onde se procedeu ao isolamento dos dois hipocampos. Estes foram transferidos para uma folha de acetato de forma circular que foi colocada sobre o suporte do seccionador de tecidos. O hipocampo foi seccionado transversalmente em fatias com 400 μm de espessura. A folha de acetato contendo as mesmas foi transferida para uma nova caixa de petri contendo aCSF gelado e saturado com Carbox (95% O_2 e 5% CO_2) e aí as fatias foram separadas com o auxílio de pontas de Pasteur seladas. Aquelas que apresentavam melhor integridade foram aspiradas suavemente com uma pipeta Gilson de 5mL cortada na extremidade e transferidas para caixas de petri contendo aCSF.

Antes de serem utilizadas as fatias ficaram em recuperação pelo menos 1 hora à temperatura de 33°C. Durante este período manteve-se um fluxo constante de Carbox à superfície do aCSF (Ledo *et al.*, 2002).

2.6.2. Sistema experimental

A amperometria foi a técnica electroquímica utilizada para monitorizar a dinâmica de produção e decaimento de NO em fatias de hipocampo de rato, a um potencial de + 0,9 V. Para a realização destas experiências recorreu-se ao sistema instrumental esquematizado na figura 2.20. A solução de aCSF que perfundiu as fatias de hipocampo foi termostatzada a 33°C, assim como as soluções dos diferentes estímulos utilizadas. Todas as soluções foram constantemente borbulhadas com Carbox. A mudança de uma solução para outra era feita por intermédio de uma válvula de comutação, que permitia o fluxo da solução pretendida para câmara de perfusão através de uma serpentina de aquecimento que mantinha a temperatura da preparação entre os 32-33°C. Na câmara de perfusão acomodou-se o eléctrodo de referência.

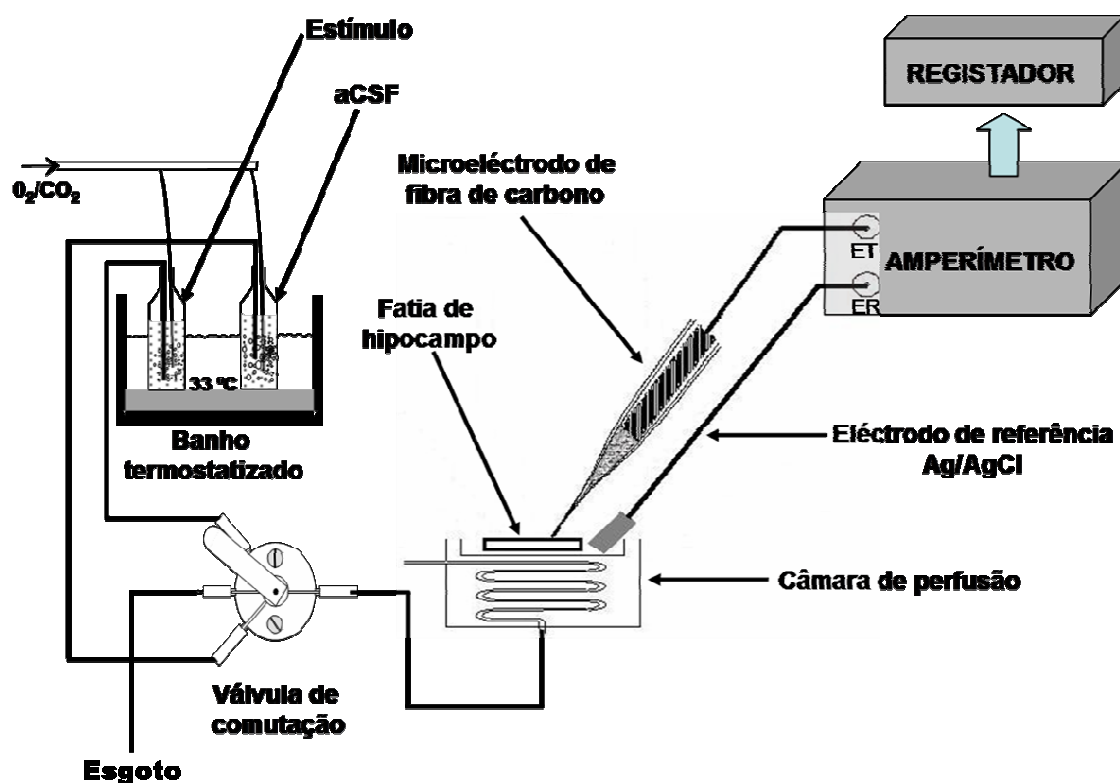


Figura 2.20. Representação esquemática de todos os componentes do sistema instrumental utilizado para monitorização de $^{\cdot}NO$ nas fatias de hipocampo de rato.

Cada experiência foi feita com uma fatia que foi transferida para uma câmara de perfusão termostaticada contendo 4mL de aCSF a 32°C. Esta era então imobilizada na membrana de uma caixa (Millicell-CM, 0,4 μm) pressionando-se a fímbria com uma pipeta de Pasteur selada. De seguida inseria-se com o máximo de suavidade possível e com a ajuda de um micromanipulador e uma lupa (Olympus, Japão) um microelectrodo de $^{\cdot}NO$ na região CA1 da fatia de hipocampo (figura 2.21).

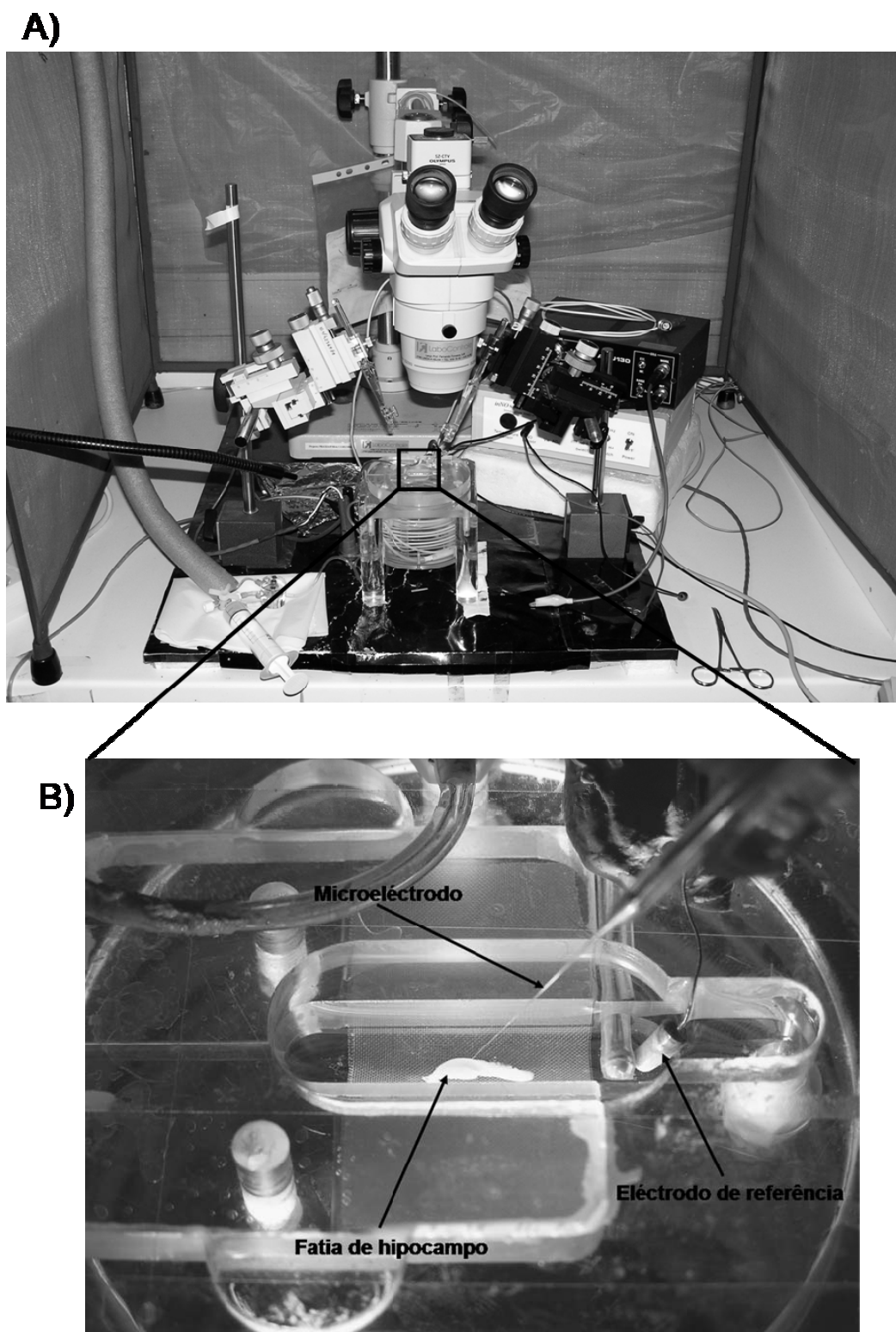


Figura 2.21. A) Fotografia do sistema instrumental utilizado para monitorização de NO nas fatias de hipocampo de rato. B) Foto ampliada da zona demarcada em A, em que se ilustra do posicionamento da fatia de hipocampo de rato na câmara de perfusão e colocação do microeléctrodo e do eléctrodo de referência.

Após obtenção de uma corrente de fundo estável, a produção de $\cdot\text{NO}$ foi estimulada com soluções de 10 μM NMDA ou 5 mM de glutamato, sendo estas perfundidas durante dois minutos.

2.7. Análise dos resultados

Os resultados obtidos são apresentados no texto e nas figuras como os valores médios \pm SEM. O significado estatístico das diferenças entre os valores médios de dois grupos foi avaliado por recurso ao teste de t de Student. As diferenças entre grupos foram consideradas estatisticamente significativas a um grau de confiança de 95% ($P < 0,05$). A carga eléctrica foi calculada por integração da corrente amperométrica, após subtração da respectiva corrente de base. A análise dos resultados e os gráficos das figuras realizaram-se com o auxílio de programas de computador disponíveis comercialmente (Microcal Origin[®]).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Medida da libertação de óxido nítrico a partir do DETA/NO

A preparação de soluções padrão de $\cdot\text{NO}$ tendo em vista a calibração dos EFC_R representa uma etapa laboriosa, demorada e que se reveste de cuidados vários devido às propriedades físico-químicas do $\cdot\text{NO}$. As soluções padrão de $\cdot\text{NO}$ podem ser obtidas por:

- i) Redução do NO_2^- por I⁻ ou AA em meio ácido;
- ii) Saturação de uma solução borbulhando o gás de $\cdot\text{NO}$ purificado numa solução aquosa previamente saturada com um gás inerte;
- iii) Decomposição química de compostos geradores de $\cdot\text{NO}$

A calibração do sensor ISO-NOP (WPI) foi feita segundo o procedimento (i). No entanto, apesar de se tratar de um procedimento com vantagens, não é o mais adequado na calibração dos microelctrodos de fibra de carbono modificados, uma vez que a elevada acidez da solução de calibração pode causar a decomposição dos polímeros de revestimento. As calibrações dos microelctrodos são, regra geral, efectuadas com soluções padrão preparadas a partir do gás ou alternativamente a partir do dador de $\cdot\text{NO}$ S-nitrosotiol (SNAP) (Keefer *et al.*, 1996; Bedioui and Villeneuve, 2003).

Contudo, existe uma outra classe de dadores de $\cdot\text{NO}$, denominada diazeniumdiolatos, que constituem uma via alternativa ao SNAP, apresentando algumas vantagens relativamente a este, designadamente a produção espontânea e reprodutível em meio aquoso de $\cdot\text{NO}$, não necessitando de catalisadores. O DETA/NO, por exemplo, é um dador de $\cdot\text{NO}$ que se enquadra nesta classe de dadores, libertando espontaneamente $\cdot\text{NO}$ a pH 7,4 com um tempo de meia vida de cerca de 57 horas a 22 °C. (Keefer *et al.*, 1996; Fitzhugh and Keefer, 2000). Devido a estas características, utilizou-se este dador nos ensaios de caracterização dos microelctrodos para preparação de soluções padrão de $\cdot\text{NO}$.

Em primeiro lugar foi necessário determinar o perfil de libertação do $\cdot\text{NO}$ a partir do dador. Para tal recorreu-se a um sensor comercial ISO-NOP (WPI). A figura 3.1. mostra-se o registo amperométrico de corrente de oxidação de $\cdot\text{NO}$ (A), e a respectiva curva de calibração efectuada a partir de soluções padrão de NO_2^- no intervalo de 100 a 1000 nM (B).

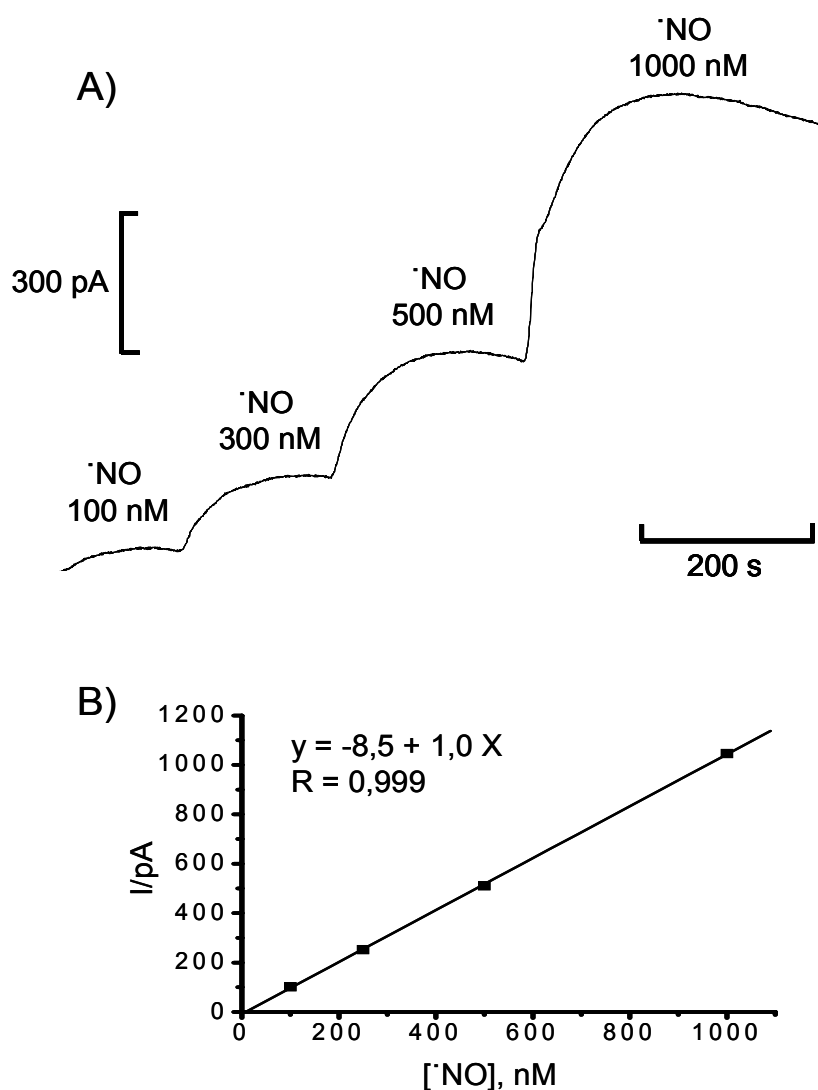


Figura 3.1. A) Resposta amperométrica do sensor ISO-NOP (WPI) após a adição sucessiva de 100, 300, 500 e 1000 nM de $\dot{\text{NO}}$, gerado a partir de NO_2^- . B) Recta de calibração obtida por regressão linear.

O sensor apresenta uma resposta linear na gama de concentrações testada, com uma sensibilidade de $1050 \text{ pA}/\mu\text{M } \dot{\text{NO}}$. As calibrações realizadas com este sensor de $\dot{\text{NO}}$ foram muito reprodutíveis, tendo sido obtido um valor médio de sensibilidade de $1140 \pm 80 \text{ pA}/\mu\text{M}$ ($n = 14$).

Depois de obtidos os dados relativos à sensibilidade do sensor ISO-NOP, o passo seguinte consistiu na determinação da cinética de libertação do $\dot{\text{NO}}$ em PBS pH 7,4, e à temperatura ambiente ($22 \text{ }^\circ\text{C}$), reproduzindo deste modo as condições de preparação dos padrões utilizados nos ensaios de caracterização dos microelctrodos. Utilizou-se um vaso idêntico ao utilizado na calibração do sensor ISO-NOP, ao qual se

adicionaram 20 mL de PBS. O vaso foi tapado com um septo de borracha apropriado após o sensor ter sido mergulhado no tampão. De seguida, saturou-se o PBS, borbulhando árgon durante cerca de 20 minutos. Fimdo esse tempo, adicionou-se com uma micro seringa “Hamilton” uma alíquota da solução “stock” de 10 mM de DETA/NO para uma concentração final de 100 μM , e sob agitação registou-se a corrente de oxidação ao longo do tempo. Na figura 3.2. mostra-se um registo típico do perfil de libertação de $\cdot\text{NO}$ em PBS pH 7,4 (a) e em meio alcalino (b).

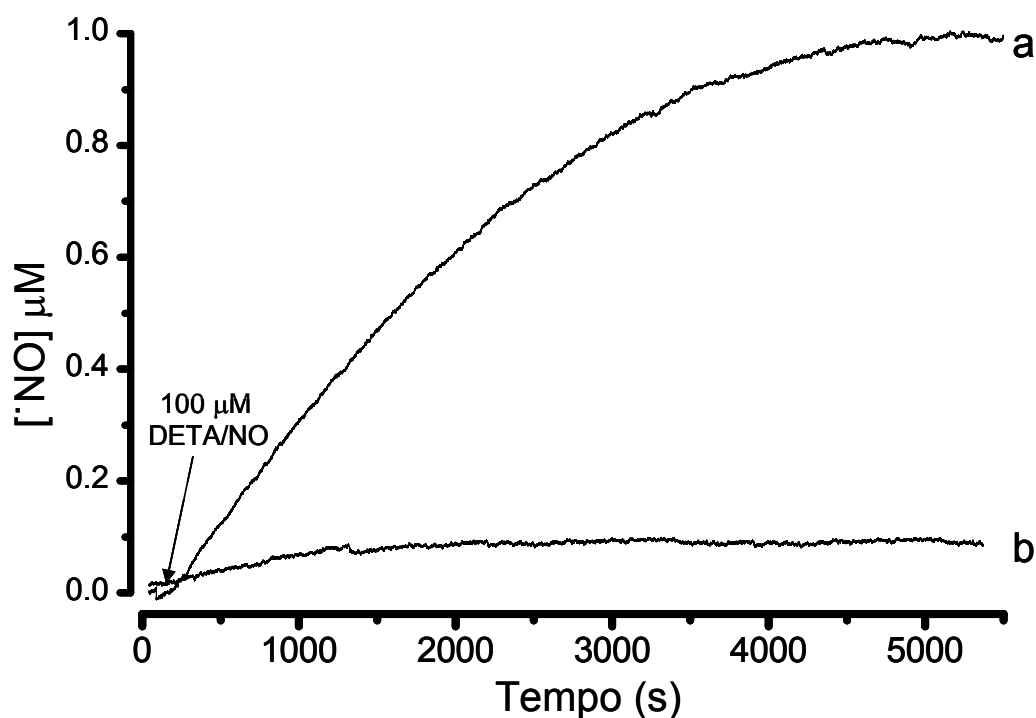


Figura 3.2. Medida amperométrica do $\cdot\text{NO}$ libertado após a adição de 100 μM de DETA/NO (seta), um dador de $\cdot\text{NO}$, a uma solução de PBS desoxigenada (a) e a uma solução de NaOH desoxigenada 0,01 M (b). Os valores de corrente, medidos com o sensor ISO-NOP (WPI), foram convertidos em concentração de $\cdot\text{NO}$, de acordo com a curva de calibração mostrada na figura 3.1.

Verificou-se que, após a adição de 100 μM de DETA/NO, a libertação de $\cdot\text{NO}$ a partir do dador aumenta gradualmente até que, aproximadamente 60 minutos após a adição, a concentração de $\cdot\text{NO}$ atinge um valor estacionário de cerca de 1 μM , calculado por interpolação na recta de calibração (figura 3.1.). Uma vez que estamos na presença de um eléctrodo protegido por uma membrana permeável apenas a gases, a corrente de oxidação resultante é uma medida selectiva do $\cdot\text{NO}$ formado a partir do dador em solução.

Dado que o DETA/NO é estável a pH básico, libertando $\cdot\text{NO}$ de uma forma residual, foi efectuado um ensaio controlo da libertação de $\cdot\text{NO}$ a partir do DETA/NO em meio alcalino. Os ensaios controlo foram realizados em condições idênticas às descritas acima. A adição de 100 μM de DETA/NO em meio alcalino provocou uma pequena variação na corrente de oxidação, correspondendo a cerca de 50 nM de $\cdot\text{NO}$, uma concentração aproximadamente 20 vezes inferior comparativamente à que se regista em PBS pH 7,4. Com base nos resultados obtidos, o procedimento seguido na preparação dos padrões de $\cdot\text{NO}$ envolveu a preparação de soluções de DETA/NO de concentração 100 vezes superior à concentração desejada de $\cdot\text{NO}$.

3.2. Caracterização dos microeléctrodos de fibra de carbono

3.2.1. Potencial de oxidação do óxido nítrico

O potencial de oxidação (Epa) depende de vários factores, tais como a superfície activa onde ocorre a reacção, o pré-tratamento electroquímico do suporte e as alterações químicas efectuadas na superfície do eléctrodo, bem como da célula electroquímica (Tabela 3.1.). De acordo com a informação da tabela, a combinação de diversos materiais de suporte e tratamentos químicos e electroquímicos origina diferentes valores para o potencial de oxidação do $\cdot\text{NO}$.

Tabela 3.1. Potencial de oxidação do $\cdot\text{NO}$ em diferentes tipos de microelétrodos.

ELÉCTRODO	REVESTIMENTOS CAMADA INTERNA/EXTERNA	POTENCIAL OXIDAÇÃO $\cdot\text{NO}$ (/eléctrodo de referência)	REFERÊNCIA
Fibra de carbono ($\varnothing = 0,5 \mu\text{m}$; tamanho = 2-6 μm)	NiTHMP ¹ / Nafion ²	+0,64 V vs SCE	(Malinski and Taha, 1992)
Fibra de carbono ($\varnothing = 8 \mu\text{m}$; Tamanho = 500 μm)	Celulose ⁴	+0,95 V vs Ag/AgCl	(Meulemans, 1994)
Fibra de carbono ($\varnothing = 8 \mu\text{m}$; Tamanho = 2 mm)	NiTHMP ¹ / Nafion ²	+0,75 V vs SCE	(Lantoine <i>et al.</i> , 1995)
Fibra de carbono ($\varnothing = 35 \mu\text{m}$; Tamanho = 100-150 μm)	Nafion ³ / <i>o</i> -PD ¹	+0,775 V vs SCE	(Friedemann <i>et al.</i> , 1996).
Fibra de carbono ($\varnothing = 30 - 35 \mu\text{m}$; Tamanho = 500 μm)	Nafion ² / (<i>m</i> -PD + resor) ¹	+0,70 V vs Ag/AgCl	(Park <i>et al.</i> , 1998)
Fibra de carbono ($\varnothing = 30 - 40 \mu\text{m}$; Tamanho = 200 250 μm)	NiTHMP ¹ / Nafion ³ / AAO ⁴ / polilisina ⁴	+0,65 V vs Ag/AgCl	(Mitchell and Michaelis, 1998)
Fibra de carbono ($\varnothing = 8 \mu\text{m}$; Tamanho = 0,8 mm)	NiTHMP ¹ / Nafion ³ Nafion ³ / <i>o</i> -PD ¹ Nafion ³ / (<i>m</i> -PD + resor) ¹ NiTHMP ¹ / Nafion ³ / <i>o</i> -PD ¹	+0,73-0,74 V vs SCE	(Pontie <i>et al.</i> , 1999)
Fibra de carbono ($\varnothing = 8 \mu\text{m}$; tamanho = 0,8 mm)	NiTSPc ¹ / Nafion ³	+0,70 V vs SCE	(Bedioui <i>et al.</i> , 1997)
Disco de carbono (disco; $\varnothing = 10 \mu\text{m}$)	CuPtCl ₆ ¹ / Nafion ⁴	+0,70 V vs SCE	(Pei <i>et al.</i> , 1999).
Fibra de carbono (fibra; $\varnothing = 8 \mu\text{m}$; tamanho = 1 mm)	Nafion ³ / <i>o</i> -PD ¹	+0,76 V vs SCE	(Pontie <i>et al.</i> , 2000)

1: Deposição electroquímica; 2: imersão e secagem por evaporação; 3: imersão seguida de tratamento térmico; 4: deposição de gota e secagem por evaporação. [NiTHMP = níquel (II) tetraquis (3-metoxi-4-hidroxifenil) porfirina; *o*-PD - orto – fenilenodiamina; *m*-PD - meso – fenilenodiamina; resor - resorcinol; AAO - oxidase do ácido ascórbico; NiTSPc = tetrassulfonato (níquel (II)) ftalocianina; SCE - eléctrodo de calomelanos. Adaptado de Pontie and Bedioui, 2000.

O potencial de oxidação do $\cdot\text{NO}$ foi determinado por SWV, efectuando-se varrimentos de potencial entre +0,4 V e +1,0 V, a uma velocidade de 50 mV/s. O microeléctrodo foi colocado num vaso contendo PBS saturado com árgon, conjuntamente com os eléctrodos de referência e auxiliar. De seguida, adicionou-se uma solução 1,3 mM de DETA/NO e uma hora depois registaram-se os voltamogramas.

A figura 3.3. mostra um voltamograma obtido em PBS saturado com árgon (a), e um voltamograma obtido após adição de 13 μM de $\cdot\text{NO}$ obtido a partir de uma solução com uma concentração de 1,3 mM de DETA/NO (b).

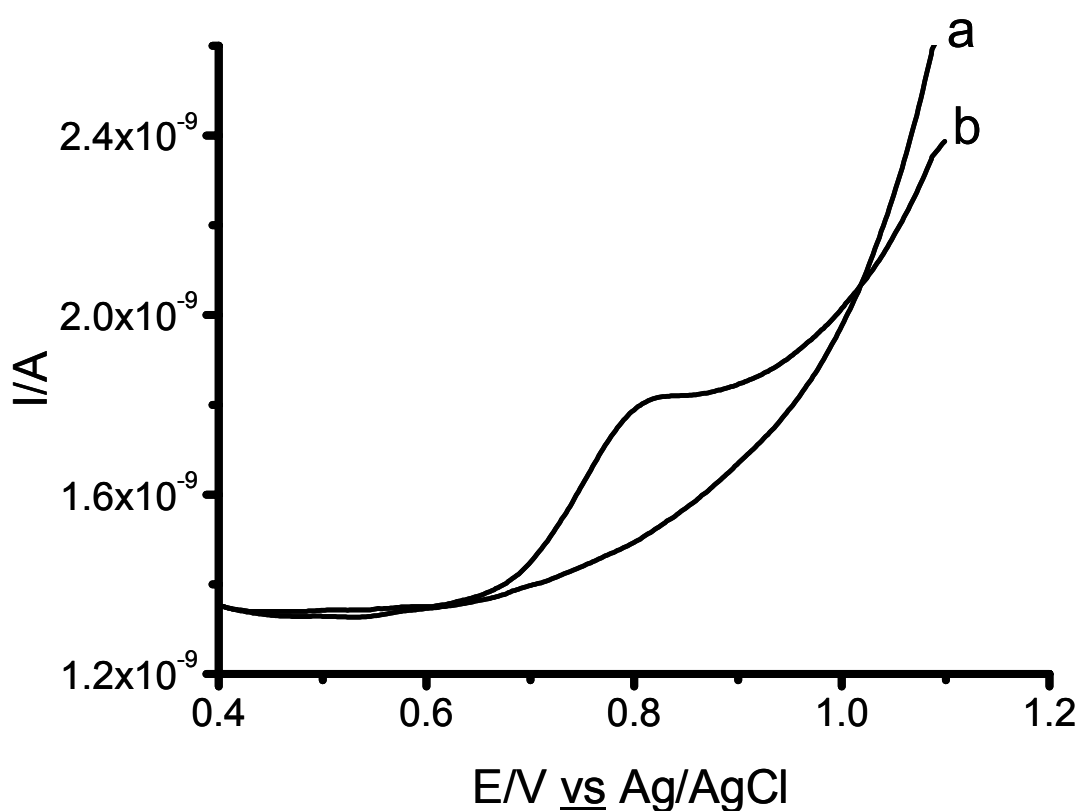


Figura 3.3. Voltamogramas de onda quadrada de uma solução de PBS saturada com árgon (a) e após a adição de 13 μM de $\cdot\text{NO}$ preparado a partir de uma solução de 1,3 mM de DETA/NO (b), obtidos com um microeléctrodo de fibra de carbono modificado com uma camada de Nafion[®] e *o*-PD. Potencial de oxidação do $\cdot\text{NO}$: +0,80 V.

O Epa do $\cdot\text{NO}$ para os microelctrodos modificados com uma camada de Nafion[®] e *o*-PD foi de + 0,80 V. O valor m3dio obtido foi de $+0,78 \pm 0,02$ V vs Ag/AgCl ($n = 13$).

Estes resultados foram confirmados com a utiliza3o de um padr3o de $\cdot\text{NO}$ preparado a partir do g3s (figura 3.4.), nas mesmas condi3oes experimentais. O padr3o de $\cdot\text{NO}$ foi preparado como descrito na sec3ao 2.1.3. Foi adicionada uma al3quota de solu3ao padr3o necess3ria para obter uma concentra3o de $13 \mu\text{M}$ e o voltamograma foi registado imediatamente a seguir 3 ad3ao da solu3o de $\cdot\text{NO}$.

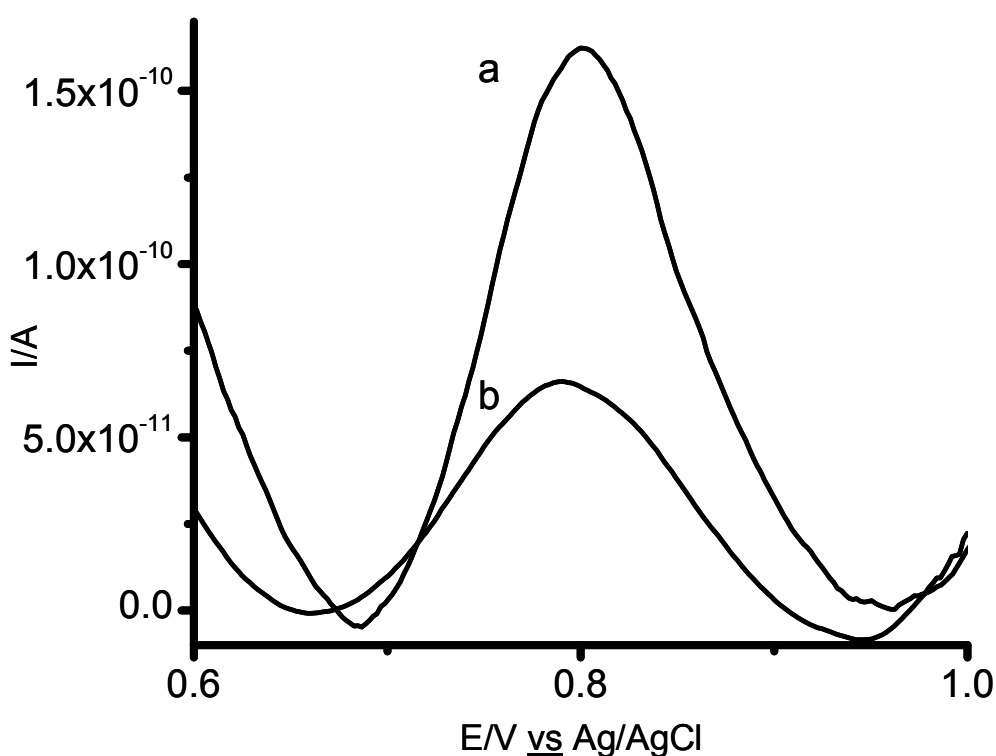


Figura 3.4. Voltamogramas de onda quadrada de uma solu3o de PBS desoxigenada ap3s a ad3ao de $13 \mu\text{M}$ de $\cdot\text{NO}$ preparado a partir do g3s (a); ap3s a ad3ao de $2 \mu\text{M}$ de $\cdot\text{NO}$ preparado a partir de uma solu3o de $200 \mu\text{M}$ de DETA/NO (b), obtidos com um microelctrodo de fibra de carbono modificado com uma camada de Nafion[®] e *o*-PD.

As diferenças existentes entre os potenciais de oxidação do $\cdot\text{NO}$ referenciados na tabela 3.1. e os obtidos neste trabalho podem dever-se a diferentes factores tais como o tipo de fibras de carbono utilizadas, o pré-tratamento electroquímico a que são sujeitas, o tipo de revestimento efectuado (número de camadas de Nafion[®] e temperatura de secagem bem como os outros tipos de filme utilizados) e as condições de registo utilizadas, bem como as técnicas electroquímicas utilizadas para a sua determinação.

Os revestimentos aplicados sobre as fibras de carbono contribuem para a modificação dos picos de oxidação, como é exemplo a aplicação do filme de TMHPP-Ni, introduzido por Malinski e Taha (1992), que possui um efeito catalítico sobre a oxidação do $\cdot\text{NO}$, baixando desse modo o potencial de oxidação do composto para valores cerca dos 650 mV (Malinski and Taha, 1992). O mecanismo subjacente a este efeito catalítico não está bem esclarecido e o papel desempenhado pelo filme porfirínico pode ser o de uma simples camada orgânica que modifica a superfície do eléctrodo, sem nenhuma interacção química específica com o $\cdot\text{NO}$ (Trevin *et al.*, 1996). Utilizando o mesmo tipo de revestimento utilizado neste trabalho (Nafion[®] e *o*-PD) e fibras de carbono, Friedemann e colaboradores reportam potenciais de oxidação do $\cdot\text{NO}$ ligeiramente diferentes daqueles aqui apresentados (Friedemann *et al.*, 1996). Tal facto pode ficar a dever-se a diferenças no diâmetro das fibras, número de camadas de Nafion[®] e temperatura de secagem.

Uma vez que o tempo de meia-vida do $\cdot\text{NO}$ na presença de O_2 é da ordem de 0,5-15s (Brazell *et al.*, 1987; Crespi *et al.*, 2001), e o facto da oxidação do NO_2^- ocorrer a um potencial que é apenas 60-80 mV superior ao do $\cdot\text{NO}$ (Malinski and Czuchajowski, 1996), levou alguns autores a sugerir que a potenciais elevados (e.g. +0,9 V), a corrente de oxidação registada seja devida à oxidação do NO_2^- e não do $\cdot\text{NO}$ (Malinski and Czuchajowski, 1996; Crespi *et al.*, 2001). Além disso, e tendo em conta a presença de NO_2^- em meio biológico, importava esclarecer qual a substância que está a ser detectada.

Assim, o conjunto seguinte de experiências teve como objectivo determinar a diferença entre os potenciais de oxidação do $\cdot\text{NO}$ e do NO_2^- (figura 3.5.). O procedimento experimental foi idêntico ao utilizado na determinação do potencial de oxidação do $\cdot\text{NO}$. Depois de concluída a saturação do PBS com árgon foi efectuado um voltamograma de onda quadrada para o PBS (a), após a adição de 10 μM de NO_2^- (b) e após a adição de 200 μM do mesmo composto (c).

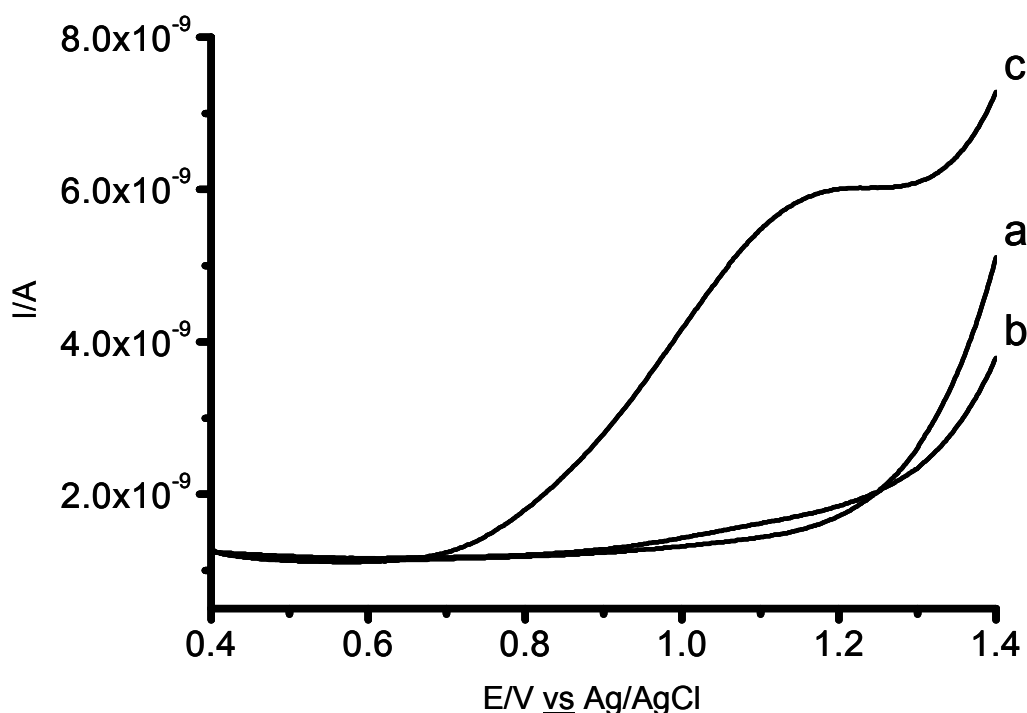


Figura 3.5. Voltamogramas de onda quadrada obtidos para microelétrodo revestido com 1 camada de Nafion[®] e *o*-PD. (a) PBS; (b) 10 μM NO_2^- ; (c) 200 μM NO_2^- . O potencial de oxidação do NO_2^- é +1,12 V vs Ag/AgCl. Condições instrumentais: velocidade de varrimento: 50mV/s; amplitude de pulso: 25mV; frequência: 25Hz.

É bem conhecido que o Nafion[®], devido à carga negativa dos grupos SO_3^- , dificulta o acesso de moléculas aniónicas como o NO_2^- à superfície do microelétrodo, conferindo assim uma elevada selectividade aos microelétrodo para compostos aniónicos (Malinski and Taha, 1992). Por conseguinte, a adição de 10 μM de NO_2^- não provocou uma alteração da corrente de fundo significativa, quando comparada com a corrente de fundo registada em PBS. Quando se aumentou a concentração de NO_2^- para 200 μM , registou-se um pico de potencial a + 1,12 V, tendo-se obtido um valor médio de $1,04 \pm 0,031$ V vs. Ag/AgCl, 3M ($n = 9$). A diferença entre os potenciais de oxidação do NO_2^- e do NO é de cerca de 260 mV, uma diferença maior que aquela que é referida na literatura, que reporta uma diferença de 60-80 mV (Malinski and Czuchajowski, 1996; Pontie *et al.*, 1999).

Foi realizado um outro conjunto de experiências, em que se efectuaram voltamogramas hidrodinâmicos para soluções de DETA/NO 100 μM e de NO_2^- 100 μM , num intervalo de potencial entre +0,2 e +1,4 V. Estes ensaios realizaram-se recorrendo ao sistema FIA (secção 2.5.2, figura 2.18.), tendo sido utilizado um procedimento semelhante para cada composto injectado. Para cada valor de potencial

aplicado, fizeram-se quatro injeções consecutivas de cada composto, com a concentração de 100 μM de NO_2^- e 100 μM de DETA/NO (1 μM \cdot NO). O incremento de potencial foi de 100 mV, e após terem sido registadas as correntes para cada valor de potencial, procedeu-se ao cálculo da média de cada conjunto de injeções e construiu-se o gráfico apresentado na figura 3.6.

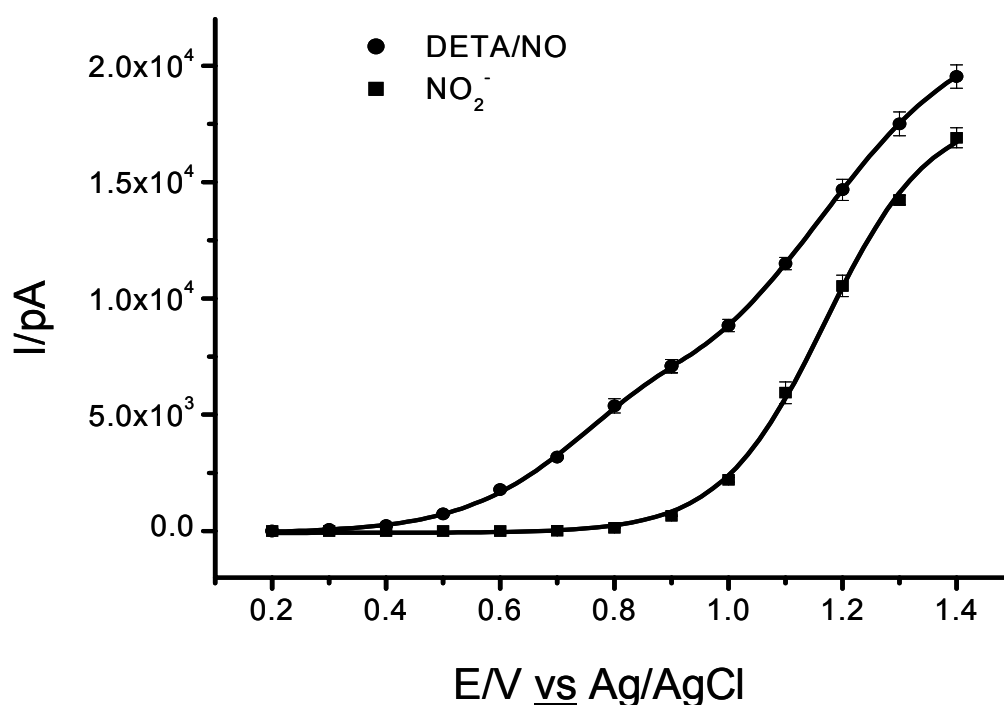


Figura 3.6. Voltamogramas hidrodinâmicos de soluções de 1 μM de \cdot NO preparado a partir de 100 μM de DETA/NO e de 100 μM de NO_2^- , injectadas no sistema FIA usando PBS como solução de transporte. Os valores de corrente foram registados com um microeléctrodo revestido com Nafion[®] e o-PD num intervalo de potencial entre +0,2 e +1,4 V.

Pode observar-se na figura que o DETA/NO dá origem a duas ondas de oxidação, uma primeira entre +0,4 e +0,9 V (potencial de meia-onda, +0,8 V) e uma segunda onda entre +0,9 e +1,4 V (potencial de meia-onda +1,2V). A oxidação do NO_2^- resultou no aparecimento de uma única onda de oxidação, entre +0,9 e +1,4 V (potencial de meia onda +1,2 V). Estes dados vêm reforçar os que foram obtidos por voltametria de onda quadrada, confirmando portanto uma diferença entre os potenciais de oxidação destes dois compostos, o que está de acordo com o mecanismo de reacção geralmente aceite para a oxidação do \cdot NO em superfícies sólidas (Malinski

and Czuchajowski, 1996). Pela análise do voltamograma verificou-se que o valor de potencial a que se regista uma melhor relação do sinal de $\cdot\text{NO}$ relativamente ao sinal de NO_2^- é de +0,9 V, pelo que se seleccionou este valor de potencial para a obtenção dos registos de corrente de oxidação do $\cdot\text{NO}$ produzido em fatias de hipocampo.

3.2.2. Sensibilidade

3.2.2.1. Calibração em fluxo

Tal como foi referido para o potencial de oxidação, há diversos factores que influenciam a performance analítica não só no que diz respeito à sensibilidade dos microelctrodos, mas também todos os outros parâmetros analíticos (limite de detecção, tempo de resposta e selectividade). É por isso importante ter em conta que factores como a superfície activa onde ocorre a reacção, o pré-tratamento electroquímico do suporte, o electrólito de suporte utilizado, o potencial a que ocorre a detecção, as alterações químicas efectuadas na superfície do eléctrodo, a célula electroquímica e o próprio equipamento utilizado modificam a performance geral de um microelctrodo, como se pode verificar pela análise da tabela 3.2. Pela observação dos valores fornecidos pela tabela, é possível verificar que, dada a disparidade de tratamentos efectuados à superfície de carbono e diferentes técnicas amperométricas utilizadas, torna-se muito importante não só comparar directamente diferentes tipos de eléctrodos, mas acima de tudo caracterizar devidamente os microelctrodos que se utilizam, de acordo com as suas especificidades e finalidades.

Os microelctrodos foram posicionados na célula de fluxo, conforme ilustrado na secção 2.5.2., figura 2.18. Depois da linha de base ter estabilizado, foram injectadas concentrações crescentes de $\cdot\text{NO}$ preparado a partir do DETA/NO.

Cada solução padrão foi preparada num vaso contendo 5 mL de PBS. Injectou-se em cada vaso 10 mM DETA/NO, de forma a atingir concentrações finais de 13, 26, 50 e 100 μM de DETA/NO, respectivamente. Esses vasos mantiveram-se privados do contacto com a atmosfera e à temperatura ambiente durante uma hora para obter as concentrações finais de 130, 260, 500 e 1000 nM de $\cdot\text{NO}$, respectivamente.

Na figura 3.7. mostra-se um registo amperométrico de fluxo para concentrações de DETA/NO injectadas repetidamente (A) e a respectiva curva de calibração e recta obtida por regressão linear (B).

Tabela 3.2. Sensibilidade para o NO de diferentes tipos de microelétrodos.

ELÉCTRODO	REVESTIMENTOS CAMADA INTERNA/EXTERNA	SENSIBILIDADE (LIMITE DE DETECÇÃO)	REFERÊNCIA
Fibra de carbono ($\varnothing = 30\text{-}35 \mu\text{m}$; tamanho = $100\text{-}150 \mu\text{m}$)	Nafion ² / <i>o</i> -PD ¹	31 pC/ μM [A] (35 nM) [A]	(Friedemann <i>et al.</i> , 1996)
Fibra de carbono ($\varnothing = 8 \mu\text{m}$; tamanho = $500 \mu\text{m}$)	Celulose ⁴	250-500 pA/ μM	(Meulemans, 1994)
Fibra de carbono ($\varnothing = 7 \mu\text{m}$; tamanho = 15mm)	Nafion ^{n.r.} / Membrana WPI ^{n.r.}	1,03 nA/ μM [A] (5 nM)	(Zhang <i>et al.</i> , 2000)
Fibra de carbono ($\varnothing = 0,1 \mu\text{m}$; tamanho = $150 \mu\text{m}$)	Membranas WPI ^{n.r.}	500 pA/ μM [A] (2 nM)	(Zhang <i>et al.</i> , 2002)
Disco de carbono ($\varnothing = 0,5 \text{mm}$)	PPDA ² / α -CD ² / Nafion ²	420 pA/ μM [DPA]	(Kitajima <i>et al.</i> , 2001)
Fibra de carbono ($\varnothing = 30\text{-}40 \mu\text{m}$; tamanho = $200 - 250 \mu\text{m}$)	NiTHMP ¹ / Nafion ² / AAO ⁴ / polilisina ⁴	1,34 pC/ μM [DPV] (0,5 nM)	(Mitchell and Michaelis, 1998)
Fibra de carbono ($\varnothing = 8 \mu\text{m}$; tamanho = $100\text{-}150 \mu\text{m}$)	Nafion ² / <i>o</i> -PD ¹	954 pA/ μM [A] (6 nM) [A]	(Ferreira <i>et al.</i> , 2005)
Fibra de carbono ($\varnothing = 8 \mu\text{m}$; tamanho = $0,8 \text{mm}$)	Nafion ² / <i>o</i> -PD ¹ Nafion ² / (<i>m</i> -PD + resor) ¹	9,6 nA/ μM [DPA] 4,9 nA/ μM [DPA] (27 nM) [DPA]	(Pontie <i>et al.</i> , 1999)
Fibra de carbono ($\varnothing = 6 \mu\text{m}$; tamanho = $2 - 4 \text{mm}$)	Acetato de celulose ⁴ / Nafion ⁴	440 pA/ μM	(Katrik and Zalesakova, 2002)
Fibra de carbono ($\varnothing = 0,5 \mu\text{m}$; tamanho = $2 - 6 \mu\text{m}$)	NiTHMP ¹ / Nafion ³	2,05 nA/ μM [DPV] (10 nM [DPV]; 20 nM [DPA])	(Malinski and Taha, 1992)
Fibra de carbono ($\varnothing = 8 \mu\text{m}$; tamanho = 1mm)	Nafion ² / <i>o</i> -PD ¹	9,6 nA/ μM [DPA]	(Pontie <i>et al.</i> , 2000)

1: Deposição electroquímica; 2: imersão seguida de tratamento térmico; 3: imersão e secagem por evaporação; 4: deposição de gota e secagem por evaporação; n.r.: não reportado. [NiTHMP = níquel (II) tetraquis (3-metoxi-4-hidroxifenil) porfirina; *o*-PD = orto – fenilenodiamina; *m*-PD = meso – fenilenodiamina; resor = resorcinol; AAO = oxidase do ácido ascórbico; PPDA = poli (cloreto dialildimetil-amónia); α -CD = α – ciclodextrina; DPA = Amperometria de impulso diferencial; A = Amperometria; DPV = Voltametria de impulso diferencial. Adaptado de Bedioui and Villeneuve, 2003.

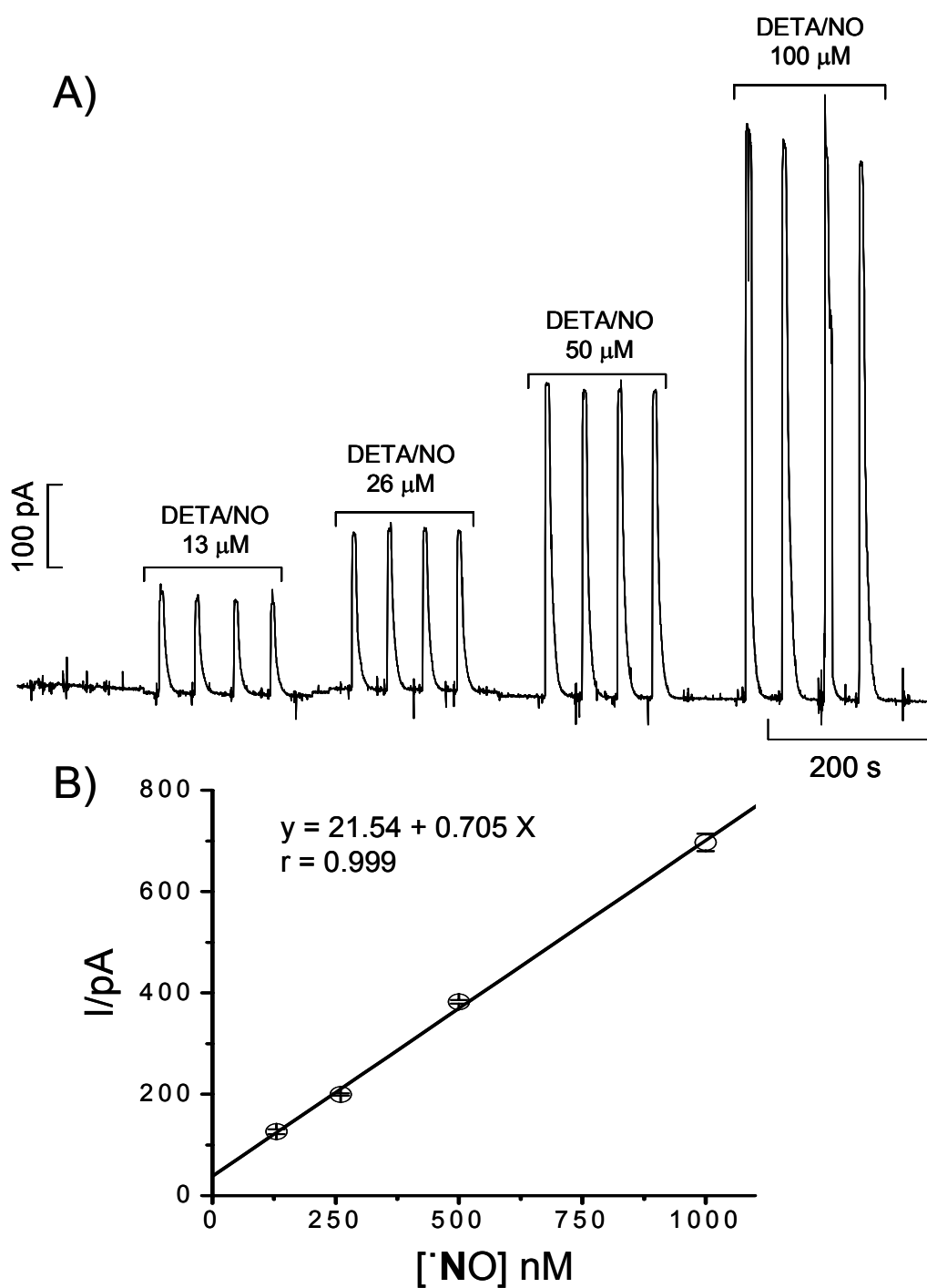


Figura 3.7. A) Registo amperométrico obtido no sistema FIA a um potencial constante de +0,9 V vs Ag/AgCl de soluções de DETA/NO num intervalo de 13 a 100 μ M (0,13 a 1 μ M de \cdot NO, respectivamente), utilizando um microeléctrodo de fibra de carbono modificado com Nafion[®] e *o*-PD. B) Recta de calibração obtida por regressão linear.

A sensibilidade dos microelctrodos foi calculada a partir do declive da recta de calibração obtida por regressão linear entre a corrente de oxidação medida e a concentração do $\cdot\text{NO}$. A média obtida foi de $954 \pm 217 \text{ pA}/\mu\text{M } \cdot\text{NO}$ ($n=6$).

No decurso deste trabalho, comparou-se a sensibilidade destes EFC_R com um conjunto de microelctrodos revestidos com seis camadas de Nafion[®] e uma camada de *o*-PD. Os microelctrodos revestidos com seis camadas de Nafion[®] calibraram-se utilizando os procedimentos descritos anteriormente. Verificou-se que estes elctrodos apresentaram um decréscimo significativo em termos de sensibilidade ao $\cdot\text{NO}$ (figura 3.8.).

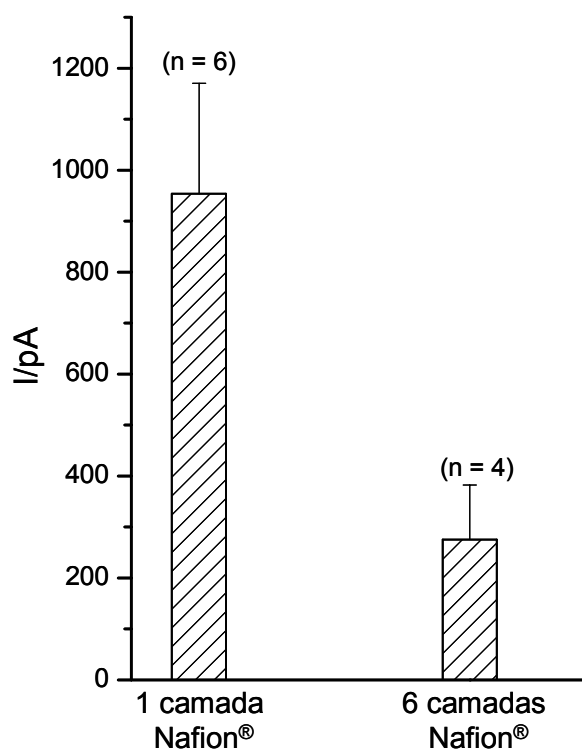


Figura 3.8. Comparação entre a sensibilidade dos EFC_R ($954 \pm 217 \text{ pA}/\mu\text{M } \cdot\text{NO}$; $n=6$), e dos microelctrodos revestidos com 6 camadas de Nafion[®] e *o*-PD ($276 \pm 106 \text{ pA}/\mu\text{M } \cdot\text{NO}$; $n=4$).

Comparando os valores de sensibilidade obtidos com os valores indicados na tabela 3.2., observa-se que existem diferenças entre os valores aí referenciados e os registados para estes microelctrodos. Há várias razões que podem justificar estas diferenças, as quais serão enumeradas de seguida.

Dimensão das fibras

As fibras de carbono utilizadas nos diferentes trabalhos, dada a especificidade de cada utilização, têm dimensões variáveis, sendo que, quanto maior o tamanho, maior será a superfície onde pode ocorrer a oxidação do analito (o NO , neste caso), podendo então uma mesma concentração originar uma maior corrente de oxidação.

Espessura de filme depositado

Há uma correlação entre a sensibilidade e a espessura final dos revestimentos, sendo que, quanto maior a espessura do filme, menor a sensibilidade ao NO . No caso dos filmes que são depositados electroquimicamente, o tempo de polimerização é um factor fundamental na espessura final do filme. Neste trabalho, a electrólise do filme de *o*-PD durou 15 minutos.

Como se pode observar na figura relativa à deposição do filme polimérico de *o*-PD na superfície do microeléctrodo (figura 2.13, secção 2.4.2.), regista-se um rápido decaimento da intensidade de corrente nos primeiros 200 s, que corresponde à polimerização de *o*-PD, seguido de um decréscimo mais lento. Este perfil de electropolimerização ocorre porque os filmes de *o*-PD são geralmente uniformes, muito compactos e aderentes à superfície do eléctrodo e a espessura do filme torna-se um factor limitante, pois à medida que se dá a polimerização na superfície do eléctrodo, limita-se o acesso de monómeros até que a superfície fica perfeitamente recoberta, e se atinge um valor de corrente mínimo. Deste modo, ao fim de 15 minutos de electropolimerização, é de esperar que se obtenha um filme bastante espesso, limitando fortemente o acesso de NO à superfície do microeléctrodo e diminuindo assim a sua sensibilidade relativamente a outro tipo de eléctrodos referenciados na literatura em que se utilizam iguais compostos na modificação da superfície dos eléctrodos mas o tempo de electropolimerização é menor (Murphy, 1998; Pontie *et al.*, 2000).

Hidrofobicidade dos filmes poliméricos

Um outro factor bastante relevante que afecta a sensibilidade é o grau de hidrofobicidade dos filmes. Quanto menos hidrofóbico for o revestimento, menos favorável será a partilha do NO da solução aquosa para as membranas. A análise da molhabilidade dos diferentes filmes depositados na superfície do microeléctrodo indica que o revestimento feito unicamente com Nafion[®] ou com *o*-PD conduz à formação de um filme mais hidrofóbico que no caso em que há associação dos dois filmes (Pontie

et al., 2000). Por outro lado, o filme de Nafion[®] é ainda mais hidrofóbico que o de *o*-PD, logo, permite uma melhor partilha do $\cdot\text{NO}$ da solução através do filme para a superfície do microeléctrodo, desde que a orientação dos grupos hidrofóbicos ($-\text{CF}_2-\text{CF}_2-$) e hidrofílicos (SO_3H) existentes no Nafion[®] estejam dispostos de tal modo que estes últimos não limitem o acesso das moléculas de $\cdot\text{NO}$ à interface carbono - Nafion[®] (Pontie *et al.*, 2000). Isto quer dizer que a associação de diferentes materiais confere um carácter hidrofóbico consideravelmente diferente daquele que cada um dos materiais proporciona individualmente. Portanto, é possível que a associação de várias camadas de Nafion[®] e de outros filmes poliméricos, como é geralmente reportado na literatura, conduza à formação de um filme globalmente mais hidrofóbico que aquele obtido pela associação de uma camada de Nafion[®] e uma de *o*-PD, como relatado neste trabalho. Assim, o elevado grau de hidrofobia do Nafion[®] poderá facilitar a partilha do $\cdot\text{NO}$ e aumentar a sensibilidade desses microeléctrodos.

3.2.2.2. Calibração em modo estacionário

Os microeléctrodos foram também calibrados em condições estacionárias. Este procedimento foi feito num vaso com 70 mL de capacidade, que foi cheio com PBS de modo a deixar o mínimo volume morto entre a solução e a atmosfera. Todas as aberturas foram tapadas com septos de borracha apropriados e deixou-se o PBS a saturar com argon durante cerca de 30 minutos. Simultaneamente, foi preparada uma solução padrão de $\cdot\text{NO}$ a partir do DETA/ $\cdot\text{NO}$ num vaso de 5 mL. A partir desse padrão retiraram-se alíquotas de 5 μM de DETA/ $\cdot\text{NO}$ (50 nM de $\cdot\text{NO}$) com uma micro seringa “gas tight” que foram injectadas no vaso. O registo de corrente e a recta de calibração resultante podem ser analisados na figura 3.9. A sensibilidade obtida para o microeléctrodo em questão foi de 2400 pA/ μM $\cdot\text{NO}$. Estes resultados indicam que os microeléctrodos possuem características de registo que permitem a sua calibração em ambos os sistemas de calibração. Mas como já foi referido, o sistema FIA foi o escolhido por se tratar daquele que melhor reproduz as condições utilizadas no sistema de perfusão das fatias de hipocampo de rato.

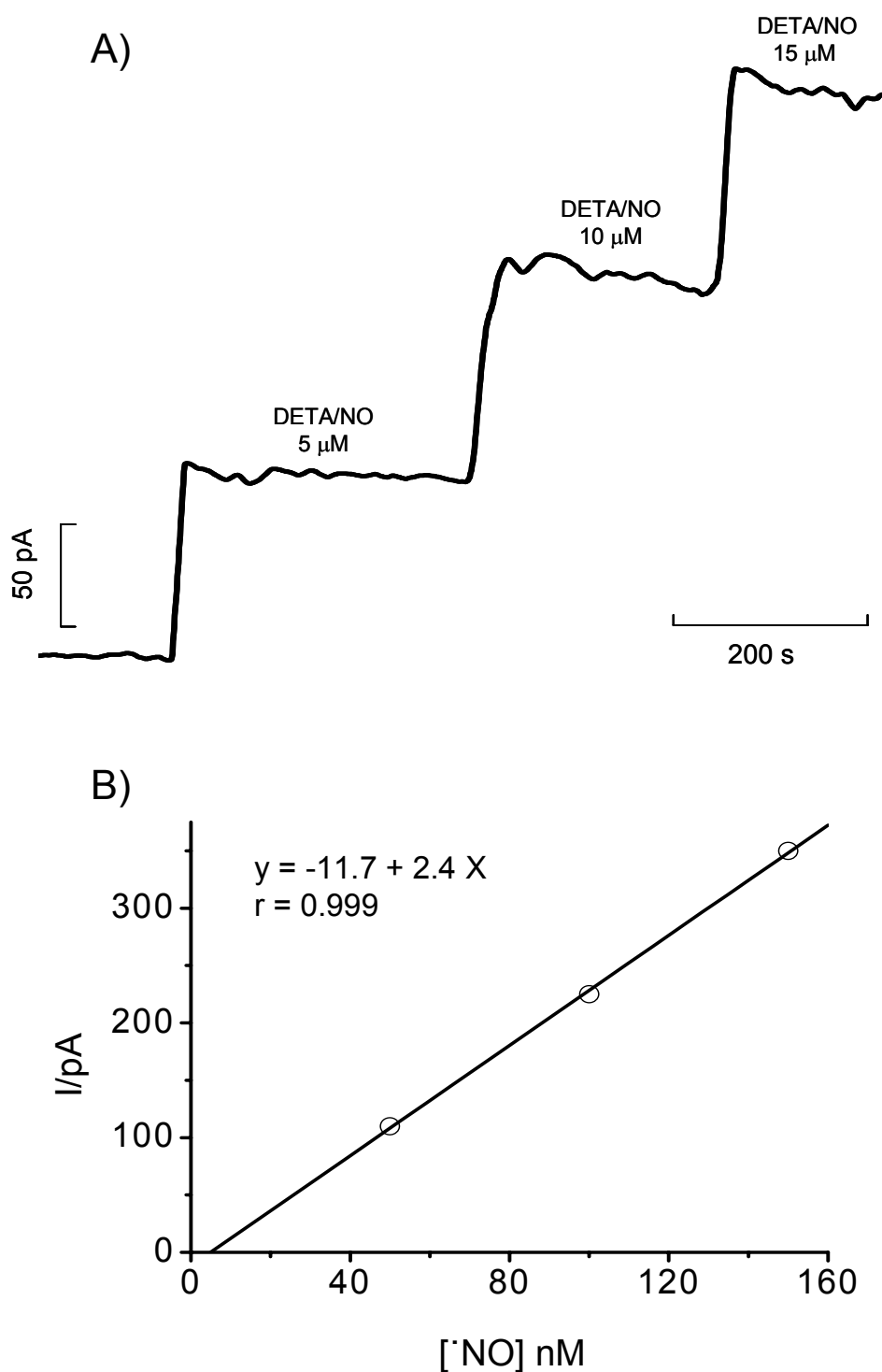


Figura 3.9. A) Resposta amperométrica a potencial constante de +0,9 V vs Ag/AgCl de um microeléctrodo revestido com Nafion[®] e α -PD a adições sucessivas de 5, 10 e 15 μM de DETA/NO (50, 100 e 150 nM de $\cdot\text{NO}$, respectivamente) a uma solução de PBS saturada com árgon. B) Recta de calibração obtida por regressão linear.

3.2.2.3. Calibração com óxido nítrico preparado a partir do gás

Os resultados relativos à sensibilidade obtidos com soluções padrão preparadas a partir de DETA/NO foram comparados com calibrações efectuadas a partir de soluções padrão preparadas com NO gás purificado. Na preparação das soluções padrão seguiu-se o procedimento descrito na secção 2.1.3. Em simultâneo com a preparação da solução “stock” de 2 mM de NO gás, encheram-se cinco vasos com 5 mL de PBS e saturaram-se com argon durante 15 minutos. Seguidamente adicionou-se solução “stock” de NO gás de modo a obter concentrações finais de 25, 50, 100, 300 e 500 nM de NO , respectivamente. Foram realizadas calibrações utilizando o sistema FIA. Após a obtenção de uma linha de base estável, foram injectadas as soluções padrão, tendo-se obtido o registo indicado na figura 3.10.

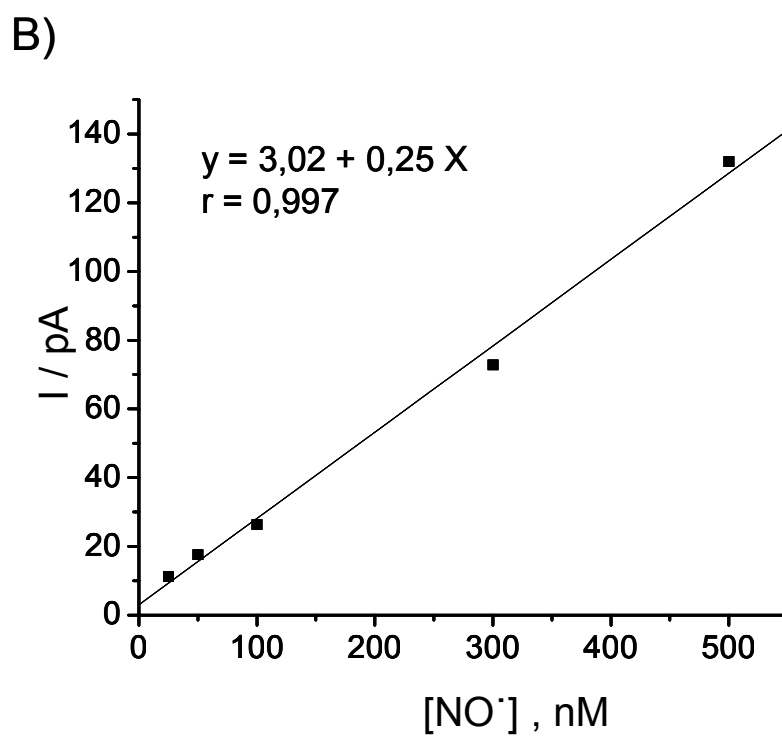
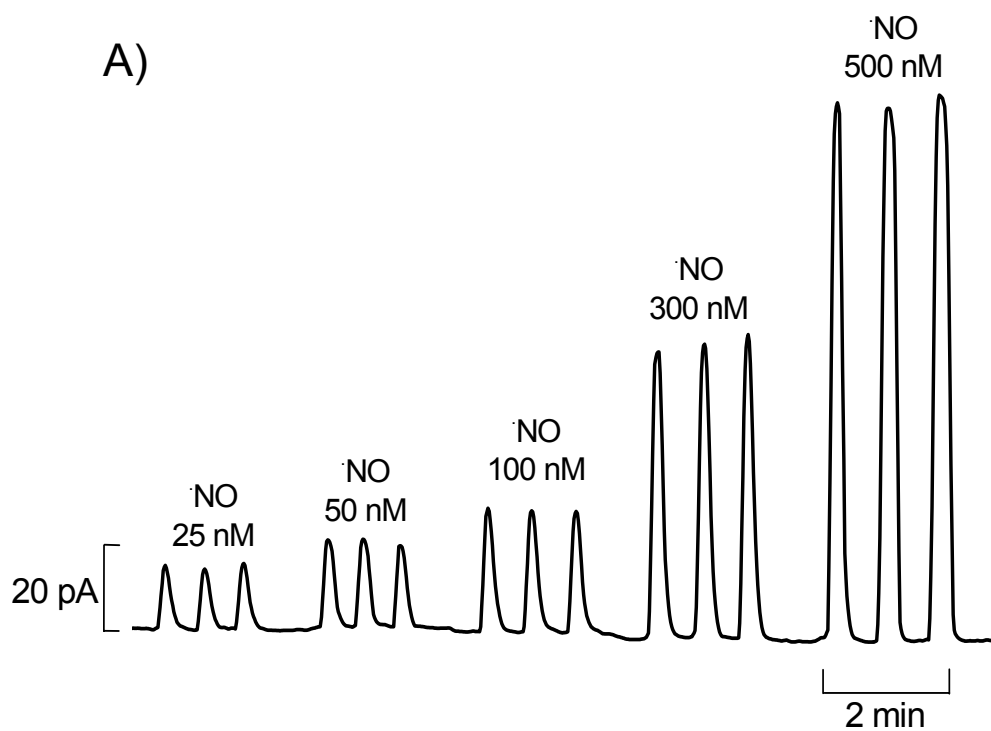


Figura 3.10. A) Registo amperométrico obtido no sistema FIA a um potencial constante de +0,9 V vs Ag/AgCl de soluções de $\cdot\text{NO}$ gás num intervalo de 25 a 500 nM, utilizando um microeléctrodo de fibra de carbono modificado com Nafion[®] e *o*-PD. B) Recta de calibração obtida por regressão linear.

A sensibilidade do microeléctrodo, calculada a partir do declive da recta, foi de 251 pA/ μ M $\dot{\text{NO}}$. A sensibilidade média obtida para as calibrações feitas com $\dot{\text{NO}}$ gás foi de 91 ± 24 pA/ μ M $\dot{\text{NO}}$ (n=10), o que é cerca de 10 vezes inferior aos valores obtidos com o dador (figura 3.11.).

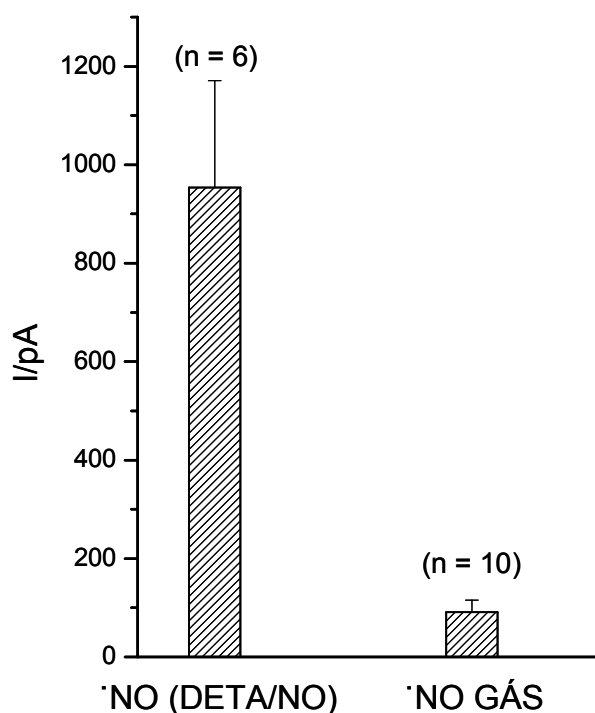


Figura 3.11. Sensibilidade das calibrações obtidas com padrões de $\dot{\text{NO}}$ obtidos a partir do gás e do dador (DETA/NO).

De modo a compreender a discrepância nos resultados dos valores de sensibilidade para o DETA/NO e o $\dot{\text{NO}}$ gás, determinou-se a concentração de $\dot{\text{NO}}$ da solução “stock”, recorrendo ao sensor ISO-NOP. Após uma calibração inicial do sensor ISO-NOP, este foi colocado num vaso de 20 mL cheio com PBS que foi colocado a saturar com árgon. Simultaneamente, preparou-se no nicho uma solução “stock” de $\dot{\text{NO}}$ gás. Procedeu-se depois a três injeções de 5 μ l da solução “stock” de $\dot{\text{NO}}$ gás e registou-se a amplitude de corrente. Como se pode observar na figura 3.12., as três injeções provocaram um aumento médio na corrente de cerca de 630 pA. Tendo por base o valor obtido da recta de regressão linear, em que se obteve uma sensibilidade de 1420 pA/ μ M de $\dot{\text{NO}}$, calculou-se uma concentração de 1,8 mM da solução “stock”, o que está de acordo com os valores reportados para uma solução saturada de $\dot{\text{NO}}$, à temperatura de 22 °C e à pressão de 1 atm. (Beckman *et al.*, 1996).

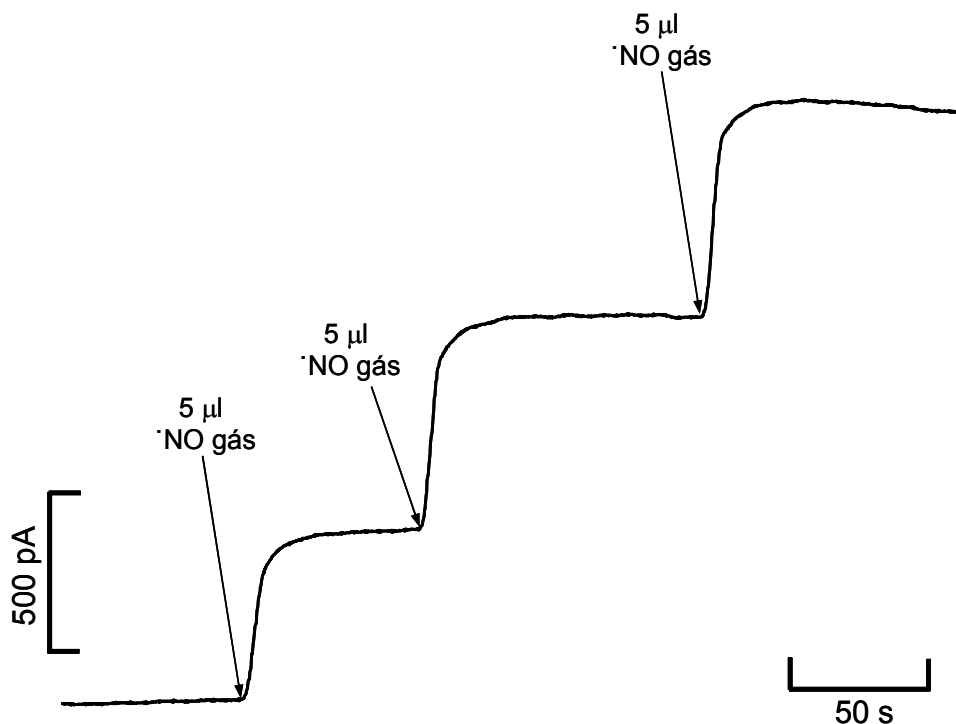


Figura 3.12. Resposta amperométrica registada pelo sensor 2 mm ISO-NOP (WPI) ao longo do tempo após três injeções de 5 µl do “stock” de $\cdot\text{NO}$ gás.

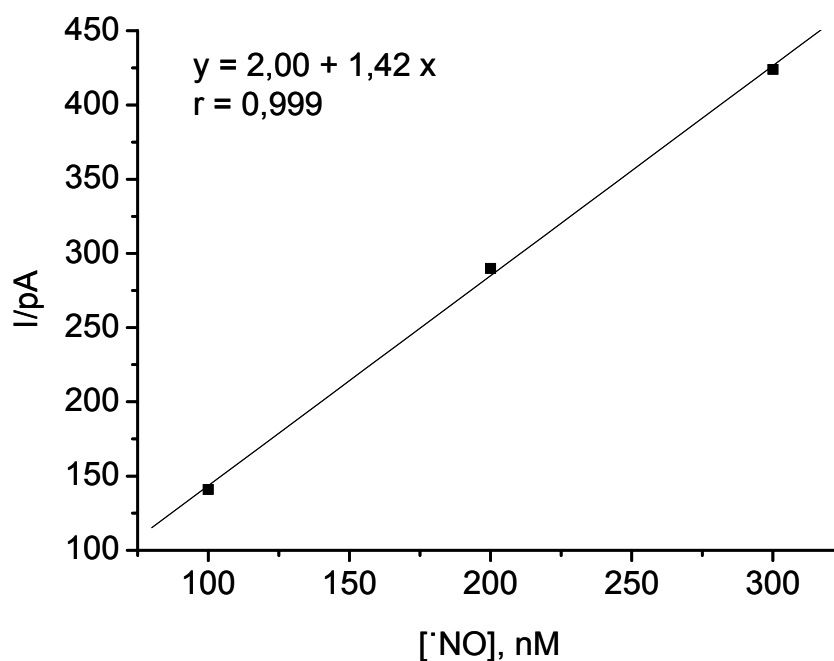


Figura 3.13. Curva de calibração e recta de regressão linear do sensor ISO-NOP com NO_2^- em meio ácido resultante da injeção de $\cdot\text{NO}$ num intervalo de concentrações de 100 a 300 nM.

Seguidamente, fez-se um controlo para confirmar a libertação de $\cdot\text{NO}$ a partir do DETA/NO controlando o pH. Quanto mais elevado o pH, maior a estabilidade do DETA/NO e menor a velocidade de libertação de $\cdot\text{NO}$. Deste modo, e utilizando o sistema FIA com o microeléctrodo ligado ao potenciostato, fizeram-se injeções de diferentes concentrações de dador a pH alcalino e neutro. Encheram-se três vasos de 5 mL de capacidade com PBS a pH 7,4 e outros três com NaOH 0,01M, aos quais foi adicionado DETA/NO de modo a obter soluções com 120, 200 e 400 μM . As soluções de DETA/NO preparadas em PBS foram injectadas sob um fluxo de PBS e as preparadas em NaOH 0,01M sob um fluxo de NaOH 0,01M. Os resultados obtidos mostram-se na figura 3.14.

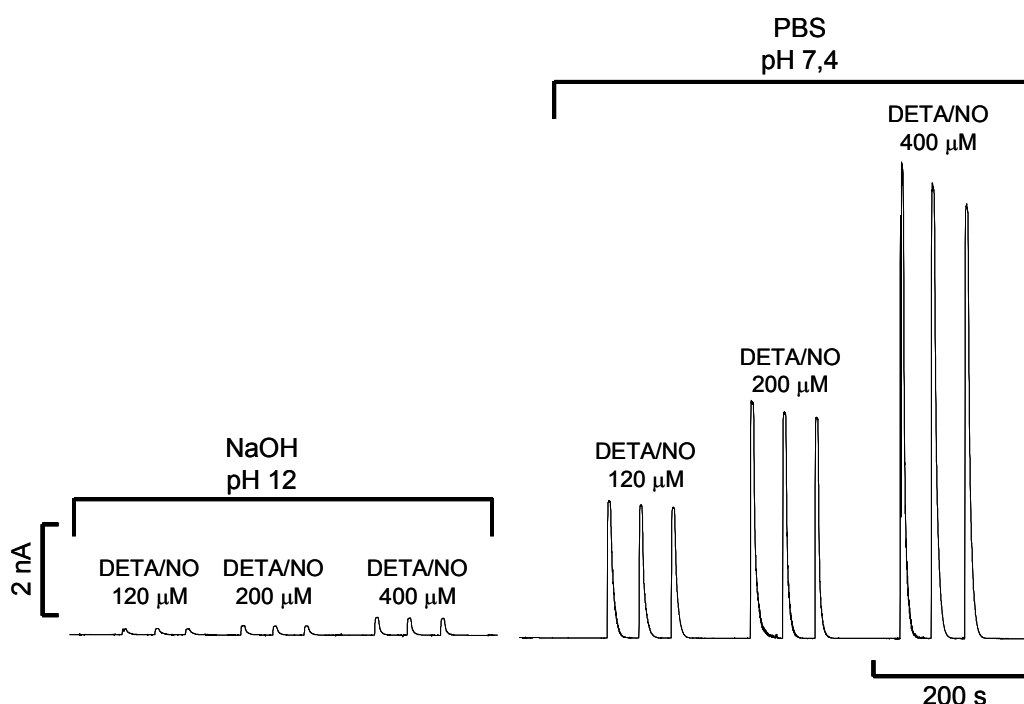


Figura 3.14. Registo amperométrico obtido no sistema FIA a um potencial constante de +0,9 V vs Ag/AgCl de soluções de DETA/NO num intervalo de 120 a 400 μM sob condições de libertação de $\cdot\text{NO}$ (pH 7,4) e sob condições de não libertação de $\cdot\text{NO}$ (pH 12), utilizando um microeléctrodo de fibra de carbono modificado com Nafion[®] e *o*-PD.

Tal como se pode confirmar pela figura 3.14., a injeção das soluções de DETA/NO a pH 12 não produz uma alteração significativa da corrente de oxidação quando comparada com soluções de DETA/NO de igual concentração, a pH 7,4. Os sinais obtidos a pH 12 devem-se ao facto de, mesmo a pH elevado, poder haver uma libertação residual de $\cdot\text{NO}$ a partir do dador (Keefer *et al.*, 1996).

Efectuou-se assim um outro controlo com DETA/HCl. Para tal, encheu-se um vaso com 5 mL de capacidade com HCl a pH = 1 e saturou-se com árgon durante 15 minutos. Em solução ácida ocorre uma rápida libertação de todo o $\cdot\text{NO}$ a partir do dador. A seguir foi adicionado DETA/NO de modo a atingir uma concentração de 5 mM. O vaso ficou uma hora em repouso para que ocorresse a libertação completa do $\cdot\text{NO}$. Em simultâneo, um outro vaso foi previamente cheio com PBS e saturado com árgon. O microeléctrodo foi aí colocado e o potenciostato foi ligado em modo amperométrico a +0,9 V vs Ag/AgCl. Após a obtenção de uma linha de base estável, o DETA/HCl foi injectado com uma micro seringa até atingir uma concentração de 25 μM . Posteriormente injectou-se DETA/NO de forma a atingir uma concentração de 50 μM (figura 3.15.).

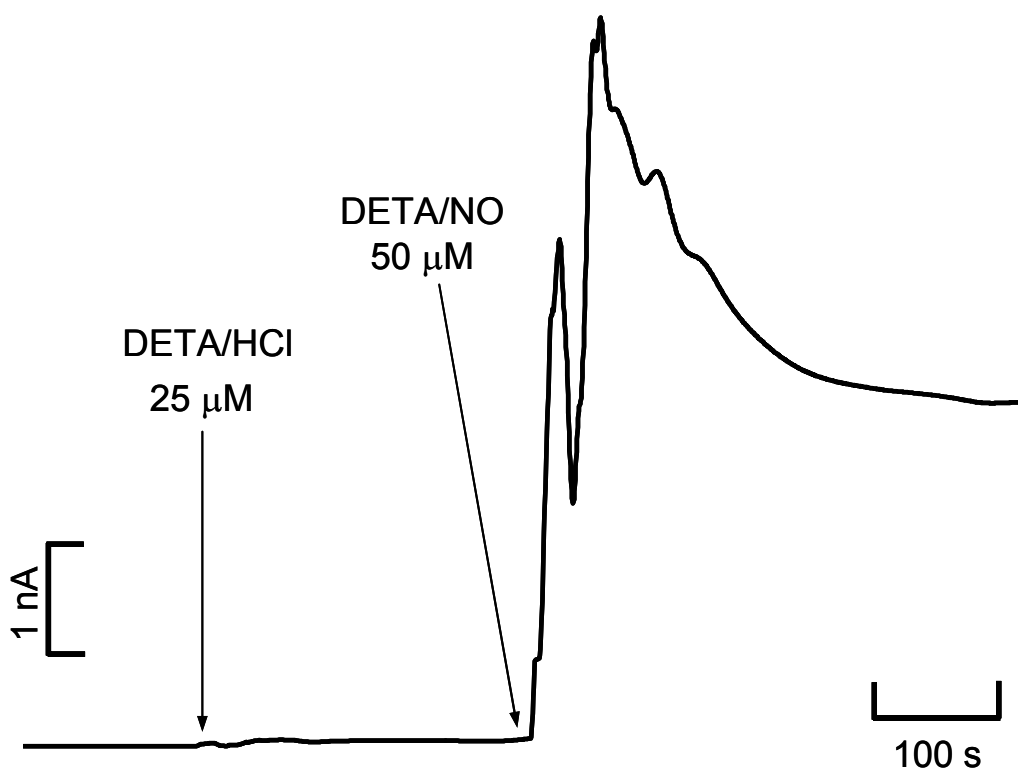


Figura 3.15. Resposta amperométrica a potencial constante de +0,9 V vs Ag/AgCl de um microeléctrodo revestido com Nafion[®] e o-PD a adições de 25 μM de DETA/HCl e 50 μM de DETA/NO a uma solução de PBS saturada com árgon.

Os resultados ilustrados na figura mostram que a injeção de DETA/HCl não altera a corrente de base, quando comparada com a injeção de 50 μM de DETA/NO. Assim, estes resultados eliminam a hipótese de o aumento da corrente de oxidação nos

ensaios com DETA/NO relativamente ao gás ser devido à oxidação da molécula dadora, que se encontra em excesso relativamente ao $\cdot\text{NO}$. Os controlos serviram então para confirmar que o incremento na amplitude observado aquando da injeção de uma determinada concentração de DETA/NO se deve ao $\cdot\text{NO}$ e não à molécula dadora. Actualmente não existe ainda uma explicação suficientemente consolidada para a diferença de corrente registada aquando da adição de uma igual concentração de $\cdot\text{NO}$ proveniente do dador e do gás, podendo essa justificação encontrar-se num acesso muito mais eficiente do $\cdot\text{NO}$ à superfície do microeléctrodo quando associado a uma molécula dadora ou a perdas de $\cdot\text{NO}$ no processo de preparação das soluções padrão de $\cdot\text{NO}$ gás.

3.2.3. Limite de detecção

Uma vez que as concentrações fisiológicas de $\cdot\text{NO}$ variam entre valores na ordem de grandeza de nanomolar, a determinação do LOD fez-se através da realização de calibrações para valores de baixas concentrações de $\cdot\text{NO}$ entre 13 e 100 nM, a partir de DETA/NO. O procedimento usado para estas calibrações foi idêntico ao que se utilizou para a determinação da sensibilidade, sendo que a única variação foi na concentração das soluções padrão injectadas.

Cada padrão foi injectado repetidamente e o registo amperométrico pode ser observado na figura 3.16. Da análise da figura ressalta logo à partida o facto de, também para esta gama de concentrações de $\cdot\text{NO}$, se observar uma boa reprodutibilidade de sinais em cada injeção, assim como um bom coeficiente de correlação. O cálculo do LOD fez-se de acordo com a fórmula anteriormente descrita (ver secção 2.5.5.), tendo-se obtido um valor médio de 6 ± 2 nM $\cdot\text{NO}$ ($n = 4$). Como referido anteriormente, o LOD depende de uma boa performance instrumental, e o recurso ao potenciostato PGSTAT 12 permitiu obter uma excelente relação sinal ruído.

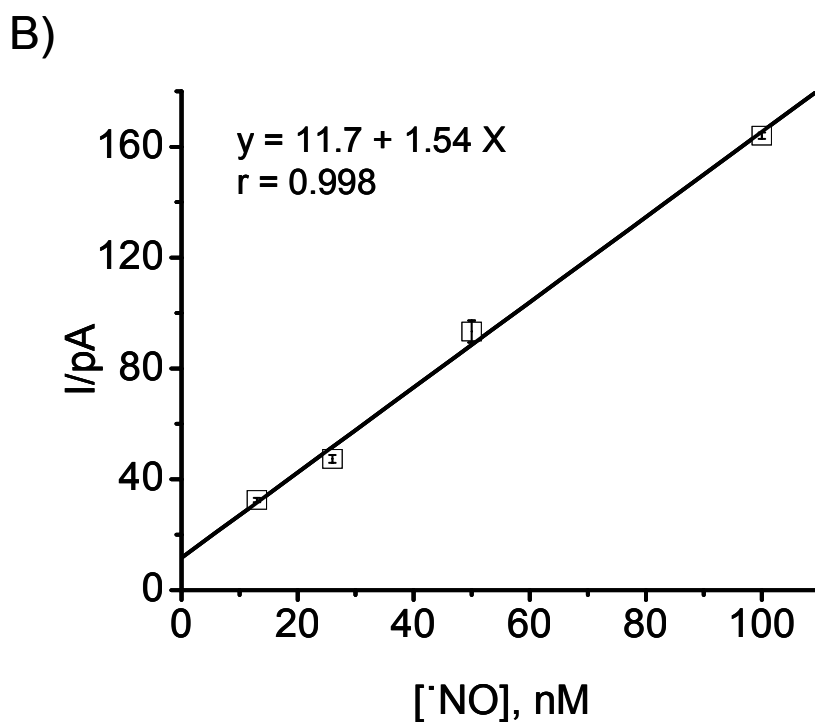
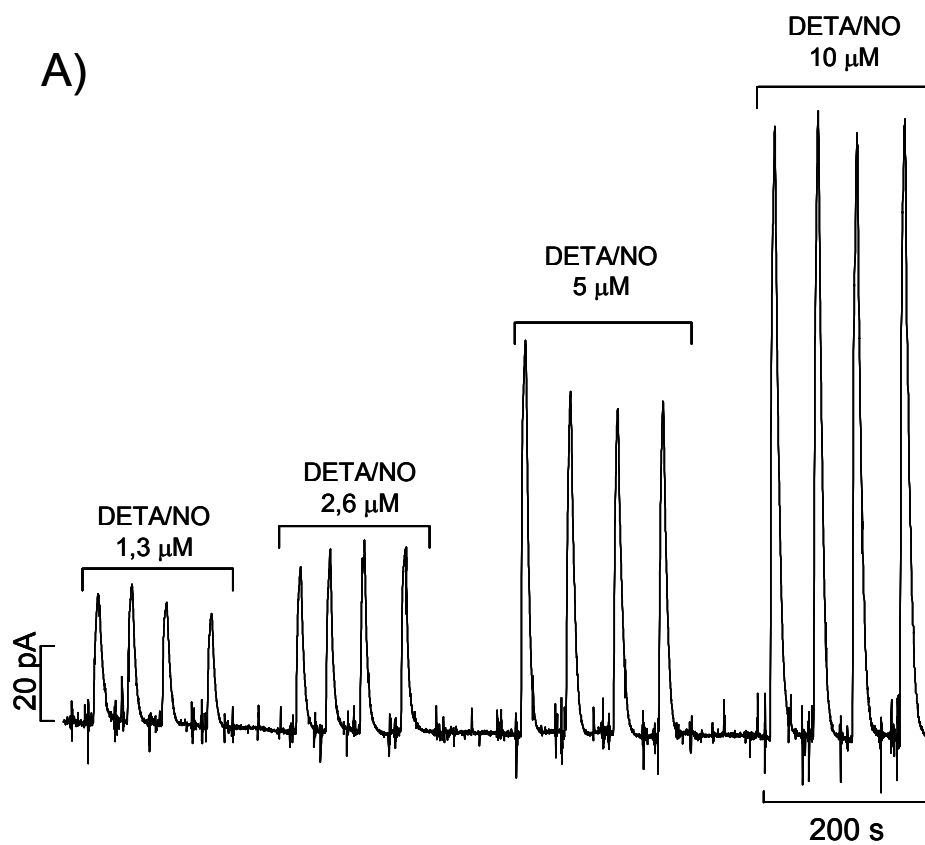


Figura 3.16. A) Registo amperométrico obtido no sistema FIA a um potencial constante de +0,9 V vs Ag/AgCl de soluções de DETA/NO num intervalo de 1,3 a 10 μM 1 (13 a 100 nM de $\cdot\text{NO}$, respectivamente), utilizando um microeléctrodo de fibra de carbono modificado com Nafion[®] e *o*-PD. B) Curva de calibração e recta de regressão linear.

O grau de hidrofobicidade e as diferenças existentes nos polímeros baseados em *o*-PD poderão ajudar a explicar esta melhoria no que diz respeito ao LOD relativamente a outros resultados reportados na literatura (Si *et al.*, 1995; Murphy, 1998). Na realidade, a *o*-PD forma um polímero mais hidrofóbico que outros polímeros normalmente utilizados nos revestimentos de microelétrodos, o que favorece a partilha de NO da solução aquosa para a superfície de carbono; além disso, a *o*-PD é facilmente oxidada e a inclusão de um monómero oxidado no filme pode ser responsável por interromper a estrutura em escada e aumentar a permeabilidade ao NO (Murphy, 1998).

3.2.4. Selectividade

Tal como referido anteriormente, a amperometria é uma técnica electroquímica que tem como vantagens a possibilidade de fazer medições em tempo real. No entanto, é preciso ter em linha de conta que, ao ser aplicado um determinado potencial a um eléctrodo, todos os compostos existentes em solução que tenham um potencial de oxidação igual ou inferior ao aplicado, ir-se-ão também oxidar e contribuir desse modo para a alteração da corrente medida. Em preparações biológicas com origem no sistema nervoso central (como as fatias de hipocampo) há uma variedade de compostos e seus metabolitos, tais como os catecóis, indóis, ascorbato, entre outros, que oxidam a um potencial significativamente mais baixo que o NO . Um outro problema relacionado com a selectividade tem a ver com a presença de NO_2^- , que possui um potencial de oxidação próximo do NO e que tanto pode existir na própria preparação como resultar da oxidação do NO . Também a presença de tirosina pode interferir com uma medição precisa do NO (Stingele *et al.*, 1998). Para além destes compostos foi importante verificar se o microelétrodo respondia aos estímulos utilizados exogenamente, tais como o L-glu, a L-arg e o NMDA. Para conferir ao microelétrodo a adequada selectividade, sem comprometer em demasia a sensibilidade, procedeu-se ao revestimento da fibra de carbono com uma camada de Nafion[®] e uma camada de *o*-PD. O primeiro, sendo um filme catiónico, deveria conferir selectividade relativamente a espécies aniónicas (NO_2^- e peroxinitrito, por exemplo), enquanto o segundo filme, sendo um filtro molecular, funcionaria com uma espécie de malha, não deixando atravessar espécies com um tamanho maior que a sua abertura de malha (DA e 5-HT, por exemplo).

A figura 3.17. mostra um registo amperométrico obtido a +0,9 V vs Ag/AgCl no sistema FIA para vários compostos injectados nas concentrações indicadas.

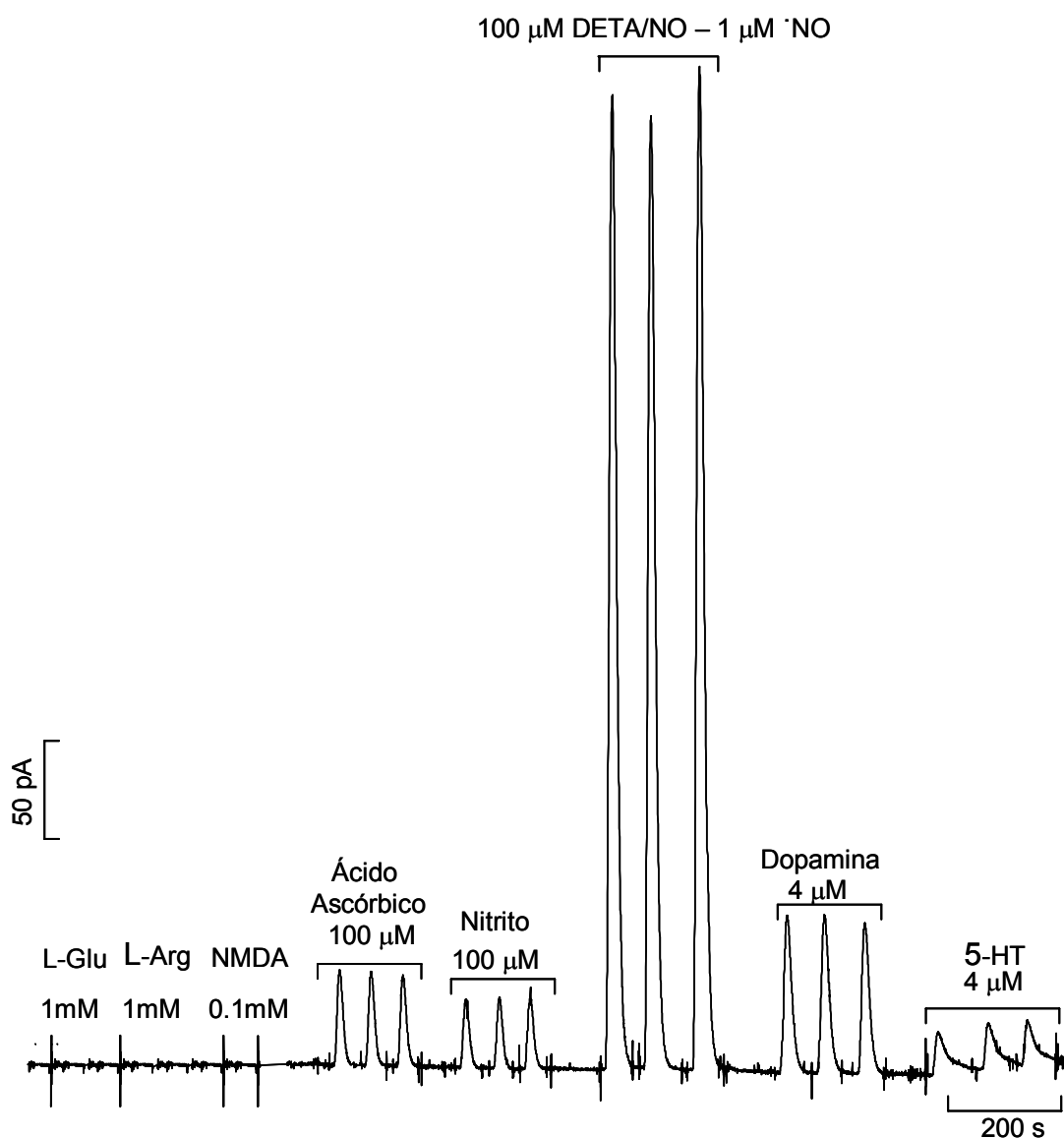


Figura 3.17. Registo amperométrico obtido no sistema FIA a um potencial constante de +0,9 V vs Ag/AgCl, obtido após a injeção de 1 μM de ·NO (preparado a partir de DETA/NO) e de potenciais interferentes com a sua detecção nas fatias de hipocampo de rato, utilizando um microeléctrodo de fibra de carbono modificado com uma camada de Nafion® e o-PD.

A selectividade foi determinada como a razão entre a amplitude da corrente de oxidação obtida após a injeção de 1 μ M de \cdot NO e a amplitude da corrente de oxidação calculada para igual concentração de cada interferente. Os valores obtidos apresentam-se na tabela 3.3.

Composto	Razão de Selectividade para microelétrdos com uma camada de Nafion [®] e o-PD (média \pm SEM)	Razão de Selectividade para microelétrdos com seis camadas de Nafion [®] e o-PD (média \pm SEM)
Nitrito	1099:1 \pm 325 (n=6)	562:1 \pm 218 (n=4)
Ácido Ascórbico	715:1 \pm 162 (n=6)	1227:1 \pm 405 (n=4)
Dopamina	20:1 \pm 3 (n=6)	24:1 \pm 9 (n=4)
5-HT	40:1 \pm 8 (n=6)	34:1 \pm 9 (n=4)
Tirosina	149:1 \pm 37 (n=5)	
N _x O _y	245:1 \pm 96 (n=4)	
ONOO ⁻	2119:1 \pm 1280 (n=4)	
H ₂ O ₂	> 10000:1 (n=5)	
L-Glu	> 10000:1 (n=6)	
L-Arg	>10000:1 (n=6)	
NMDA	>10000:1 (n=6)	

Tabela 3.3. Razões de selectividade de alguns dos principais interferentes com a detecção de \cdot NO nas fatias de hipocampo de rato obtidas para microelétrdos revestidos com 1 camada de Nafion[®] e o-PD e com 6 camadas de Nafion[®] e o-PD.

Os microelétrdos apresentam uma boa selectividade, à excepção das espécies catiónicas (DA e 5-HT), sugerindo que o filme de o-PD, para estes compostos, não impede de forma eficaz o acesso à superfície da fibra de carbono. Nalguns casos estes microelétrdos são mesmo insensíveis à injeção de elevadas concentrações de alguns interferentes, como é o caso do H₂O₂, do L-glu, da L-arg e do NMDA. O revestimento com uma camada de Nafion[®] a 170 °C confere um elevado grau de selectividade contra interferentes aniónicos, como se verifica para o caso do NO₂⁻ e do ascorbato. Globalmente, a selectividade é superior à obtida por Park e colaboradores com eléctros revestidos com 9 camadas da Nafion[®] (Park *et al.*, 1998). A temperatura de secagem do Nafion[®] poderá explicar estes resultados, pois está descrito que aumentando a temperatura de secagem se promove uma melhor

aderência do Nafion[®] à superfície do eléctrodo, não sendo necessárias tantas camadas para se obter um mesmo efeito em termos de selectividade (Friedemann *et al.*, 1996; Gerhardt and Hoffman, 2001). A comparação destes resultados com aqueles obtidos por Friedemann e colaboradores, no que diz respeito ao ascorbato e NO₂⁻, mostra que a razão de selectividade é semelhante para o ascorbato e um pouco inferior para o NO₂⁻, tendo sido usadas 6-8 camadas de Nafion[®]. No decorrer deste trabalho foram também testados microeléctrodos com seis camadas de Nafion[®], não se tendo registado diferenças significativas em termos de selectividade (tabela 3.3.).

A constatação de que não havia ganhos em termos de selectividade significativos, e de que a sensibilidade decrescia de forma assinalável como se observa na figura 3.8., levou a que os microeléctrodos revestidos com seis camadas de Nafion[®] e *o*-PD fossem preteridos relativamente aos de uma camada de Nafion[®].

3.2.5. Tempo de resposta

O tempo de resposta é um parâmetro importante no que diz respeito às medições em tempo real de [•]NO em sistemas biológicos. Uma vez que a aplicação dos diferentes filmes poliméricos tem como consequência uma diminuição no tempo de resposta dos microeléctrodos, utilizaram-se microeléctrodos sem revestimentos como controlo. O tempo que o sinal provocado pela injeção repetida de 260 nM de [•]NO preparado a partir de DETA/NO no sistema FIA demorou a atingir 50% da intensidade máxima ($t_{50\%}$) para os microeléctrodos não revestidos foi de $0,95 \pm 0,15$ s ($n=4$). No caso dos microeléctrodos revestidos com uma camada de Nafion[®] e uma camada de *o*-PD esse mesmo tempo de resposta foi de $1,90 \pm 0,1$ s.

Os valores obtidos indicam que estes microeléctrodos têm um tempo de resposta mais lento que o reportado na literatura (Malinski and Taha, 1992; Friedemann *et al.*, 1996; Mitchell and Michaelis, 1998; Mao *et al.*, 1999; Gerhardt and Hoffman, 2001). No entanto, a determinação deste parâmetro é largamente afectada pelo sistema de fluxo utilizado, nomeadamente a velocidade do fluxo, diâmetro e composição dos tubos, assim como a dispersão do próprio sistema FIA (Kristensen *et al.*, 1986). A baixa concentração de analito usada nesta determinação poderá também afectar negativamente o tempo de resposta. Finalmente, o pré-tratamento por FCV a que os microeléctrodos foram sujeitos contribui para um aumento de sensibilidade, mas tem consequências negativas no seu tempo de resposta (Gonon and Buda, 1985).

3.3. Monitorização de óxido nítrico em fatias de hipocampo

3.3.1. Produção de óxido nítrico por estímulo do receptor NMDA

Os estudos *in vitro* realizados sobre a caracterização dos EFC_R confirmam que a combinação entre o uso deste tipo de microelétrodos e o recurso a técnicas amperométricas permitem fazer uma detecção selectiva e em tempo real de $\dot{\text{NO}}$. O passo seguinte consistiu na sua aplicação em fatias de hipocampo de rato, de modo a acompanhar a dinâmica de produção e decaimento do $\dot{\text{NO}}$, e assim tentar compreender qual o seu papel nos processos fisiológicos e patológicos daí decorrentes.

Num primeiro conjunto de experiências estimulou-se a produção de $\dot{\text{NO}}$ com 5 mM de L-glu e 10 μM de NMDA (figura 3.21). A perfusão de 5 mM de L-glu (figura 3.18 A) durante dois minutos promoveu um aumento transitório da corrente resultante da oxidação do $\dot{\text{NO}}$, medida com o microelétrodo inserido na região CA1 do hipocampo. O valor máximo de corrente foi atingido ao fim de cinco minutos, e o decaimento até à linha de base teve uma constante de tempo de 348 s, valor calculado por regressão não-linear ($r=0,992$) do decaimento do sinal usando uma equação exponencial de primeira ordem. O valor médio da constante de tempo foi de 430 ± 72 s, $n=4$ (fig. 3.21 D). A carga total, calculada por integração do perfil de corrente/tempo, foi de 94 nC. A carga média calculada para estes ensaios foi de 95 ± 8 nC, $n=4$ (fig. 3.21. C).

Quando se usou como estímulo a perfusão durante dois minutos com 10 μM de NMDA (figura 3.18 B), a produção de $\dot{\text{NO}}$ caracterizou-se por uma carga total de 128 nC, tendo sido obtido um valor médio de carga de 197 ± 38 nC, $n=3$ (fig. 3.21. C). Neste caso, o valor máximo de corrente de oxidação do $\dot{\text{NO}}$ atingiu-se ao fim de 4,2 minutos e o decaimento foi exponencial, com uma constante de tempo calculada como sendo de 340 s ($r=0,996$). O valor médio da constante de tempo para estas condições de estímulo foi de 509 ± 222 s, $n=3$ (fig. 3.21 D).

Devido ao seu tamanho e polaridade, as moléculas de NMDA difundem mais lentamente do local de aplicação que as moléculas de $\dot{\text{NO}}$, processo esse que deverá aumentar o número de fontes de $\dot{\text{NO}}$ e assim provocar uma produção mais prolongada do gás, originado desse modo sinais com constantes de tempo mais alargadas, como verificado nos ensaios realizados.

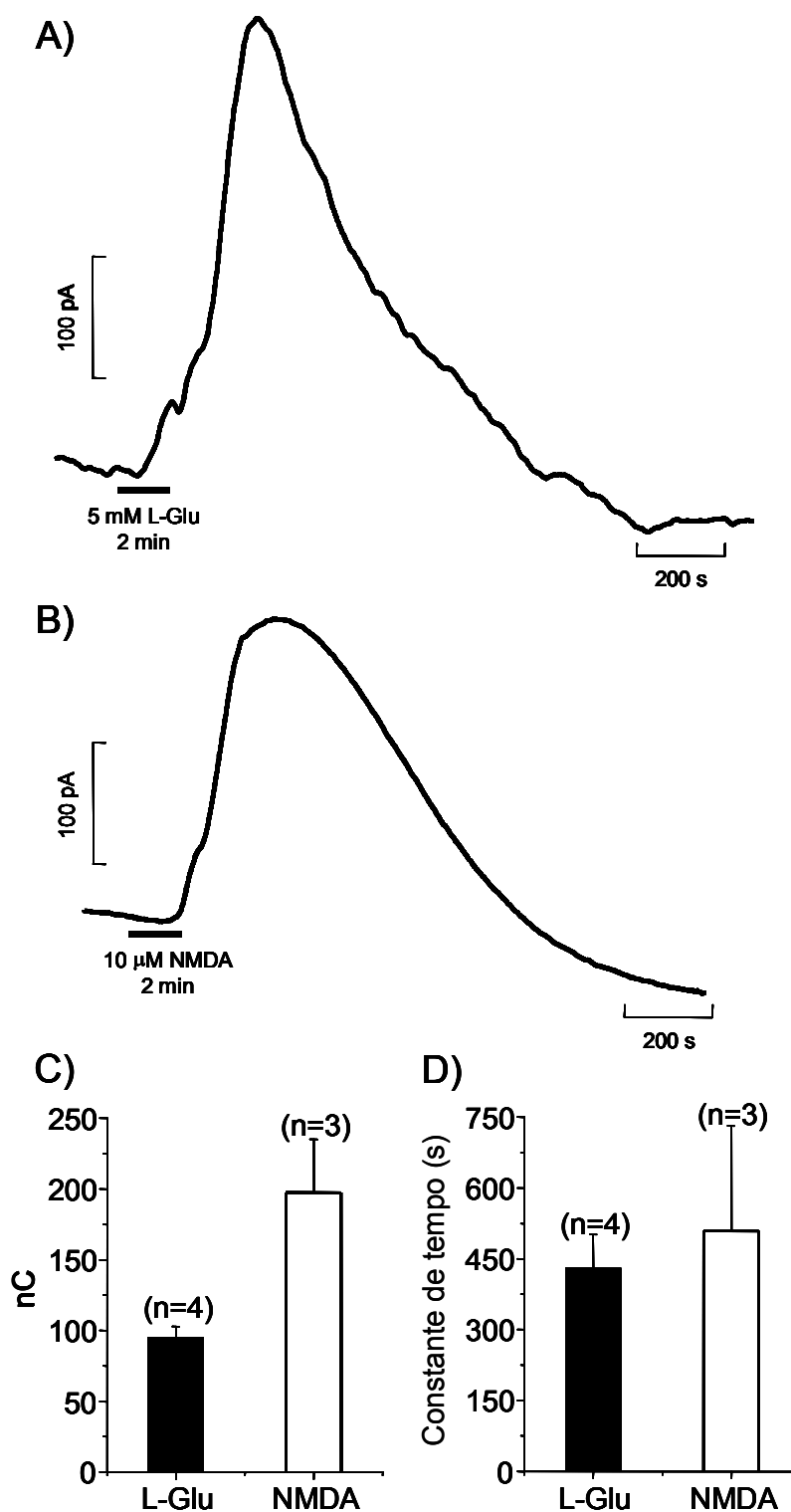


Figura 3.18. Registo amperométrico do perfil de corrente ao longo do tempo resultante de oxidação do \cdot NO produzido na região CA1 da fatia de hipocampo de rato após a perfusão durante dois minutos com 5 mM de L-glu (A) e 10 μ M de NMDA (B).

3.3.2. Relação entre a produção de óxido nítrico e a concentração de NMDA

O conjunto seguinte de experiências teve como objectivo avaliar a dependência da concentração de um estímulo de NMDA na intensidade da resposta, traduzida no aumento da corrente resultante da oxidação do $\cdot\text{NO}$. Para tal, e após calibração dos microelctrodos (ver secção 2.5.4.), as fatias foram estimuladas com concentrações de 10, 25 e 50 μM de NMDA durante dois minutos. Nos vários ensaios efectuados, cada fatia foi estimulada apenas uma vez com uma das concentrações de NMDA referidas e foi depois substituída por outra fatia, que foi sujeita a novo estímulo. Os resultados obtidos mostram que a produção de $\cdot\text{NO}$ é dependente da concentração de NMDA, num intervalo de 10 a 50 μM (fig 3.19 A).

De acordo com o valor médio de sensibilidade obtido nas calibrações dos microelctrodos, e analisando a amplitude média dos picos obtidos, 10 μM de NMDA induziu uma produção de $\cdot\text{NO}$ que, na altura máxima do pico correspondia, em média, a uma concentração de DETA/NO de 800 ± 100 nM (n=3). A perfusão de 25 μM de NMDA conduziu à obtenção de correntes de oxidação que na altura máxima do pico, correspondiam a uma concentração média de DETA/NO de $6,7 \pm 2,0$ μM (n=3). Fazendo o mesmo tipo de análise, a perfusão de 50 μM de NMDA durante dois minutos estimulou uma produção de $\cdot\text{NO}$ que na altura máxima do pico atingiu uma concentração média de $13,0 \pm 3,0$ μM (n=2). A dependência da produção de $\cdot\text{NO}$ relativamente à concentração do estímulo traduziu-se também através da obtenção de um EC_{50} de 34 μM , obtido por regressão não linear da carga total vs a concentração de NMDA, de acordo com uma função sigmoidal (figura 3.19 B).

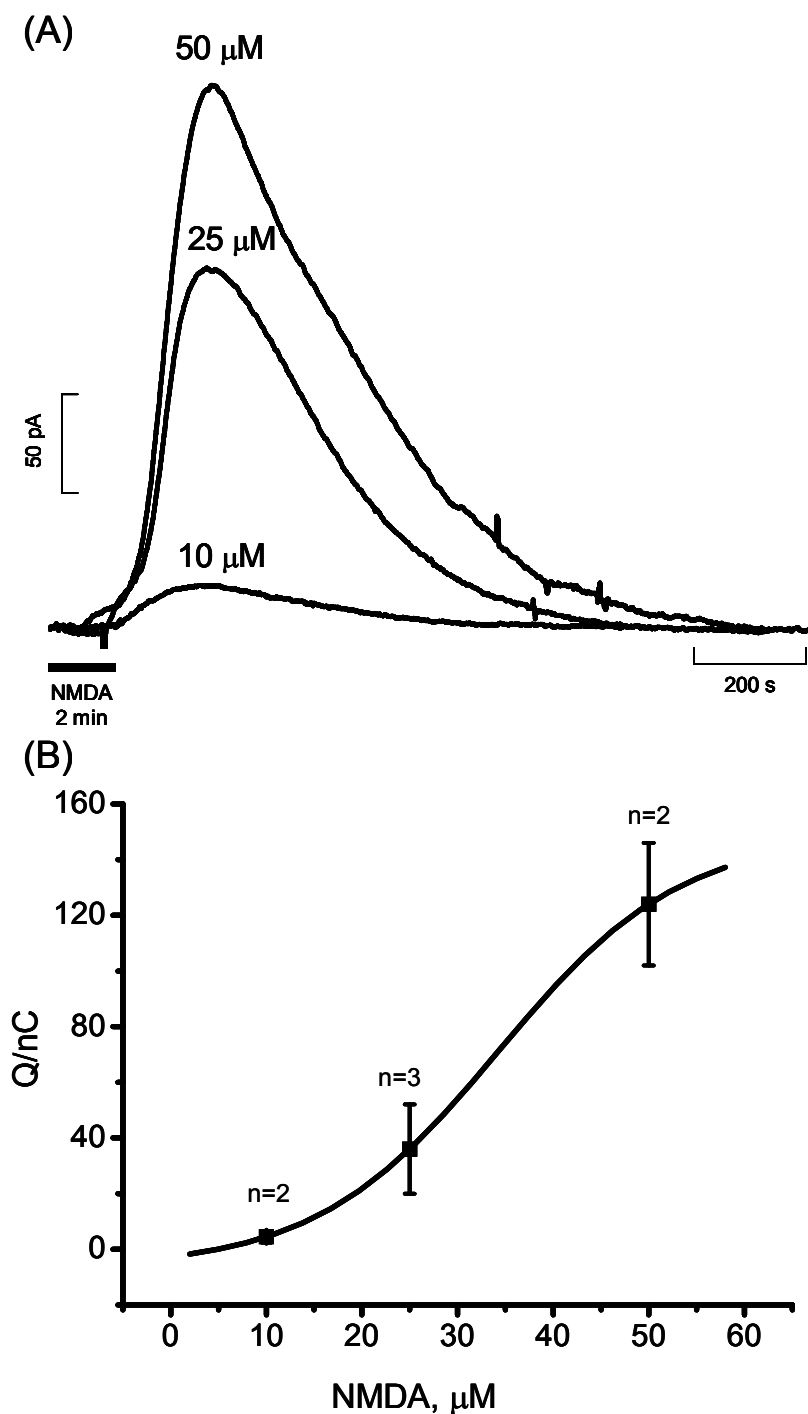


Figura 3.19. Registos amperométricos obtidos com um microelétrodo de fibra de carbono modificados com uma camada de Nafion e uma camada de *o*-PD decorrentes da perfusão durante dois minutos da zona CA1 das fatias de hipocampo de rato com 10, 25 e 50 μM de NMDA (A) e a respectiva curva dose - resposta do efeito do NMDA na produção de $\cdot\text{NO}$ (B). A análise por regressão não linear por ajuste de uma função sigmóide resultou na obtenção de um EC_{50} de 34 μM de NMDA.

3.3.3. Relação entre a produção de óxido nítrico e estímulos consecutivos de NMDA

Um terceiro conjunto de experiências foi realizado para avaliar o perfil de libertação de $\cdot\text{NO}$ após duas estimulações consecutivas durante dois minutos de $10\ \mu\text{M}$ de NMDA, na mesma fatia de hipocampo. Entre a primeira e a segunda estimulação decorreram cerca de 25 minutos. Os resultados obtidos estão registados na figura 3.20.

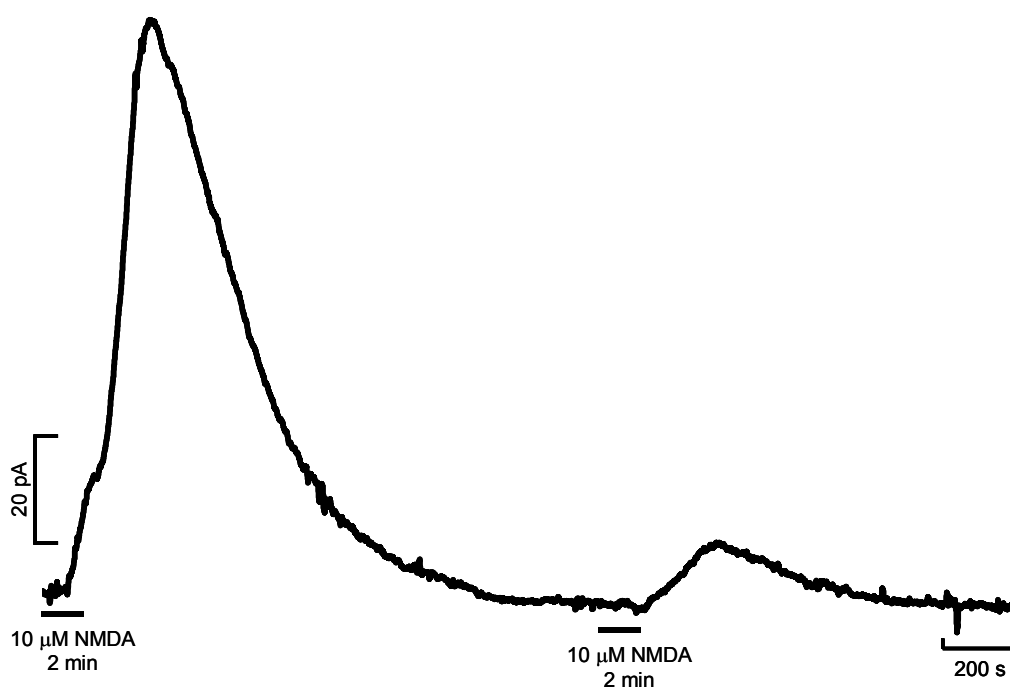


Figura 3.20. Produção de $\cdot\text{NO}$ induzida por perfusão de $10\ \mu\text{M}$ de NMDA durante 2 minutos na região CA1 do hipocampo, registada por amperometria.

Pela observação da figura constata-se que a segunda estimulação de $10\ \mu\text{M}$ de NMDA provoca uma diminuição acentuada da produção de $\cdot\text{NO}$. De facto, o primeiro estímulo conduziu a uma produção de $\cdot\text{NO}$ caracterizada por uma carga total de $41\ \text{nC}$ e atingiu no pico máximo uma corrente de oxidação de $110\ \text{pA}$, o que, de acordo com a calibração previamente realizada, correspondeu a $4,4\ \mu\text{M}$ de DETA/ $\cdot\text{NO}$. O segundo estímulo induziu uma produção de $\cdot\text{NO}$ 89% inferior à registada no primeiro estímulo, tendo-se obtido uma carga total de $4,5\ \text{nC}$ e uma corrente de oxidação no pico de produção de $\cdot\text{NO}$ de $12\ \text{pA}$ ($480\ \text{nM}$ de DETA/ $\cdot\text{NO}$). Em média, a percentagem de decréscimo do primeiro para o segundo sinal em termos de carga total foi de $80 \pm 10\%$ ($n=2$), e de $77 \pm 12\%$ ($n=2$).

O decréscimo na produção de NO após consecutivas estimulações com NMDA foi também reportado por Crespi e colaboradores (Crespi and Rossetti, 2004). Uma das hipóteses que podem explicar este facto é o NO inibir reversivelmente a NOS neuronal. Há estudos que demonstram que o NO inibe a NOS para valores de concentração de $10 \mu\text{M}$ (Rogers and Ignarro, 1992). No entanto, os resultados obtidos indicam que estes valores de concentração de NO são muito elevados no cérebro.

Um segundo aspecto a ter em conta é a possibilidade do NO reagir com grupos tiol no local de ligação do receptor, e desse modo dessensibilizar os receptores NMDA (Lei *et al.*, 1992; Manzoni *et al.*, 1992).

Um terceiro factor que poderá estar a contribuir para a diminuição do sinal poderá ter a ver com uma dessensitização dos receptores NMDA devido às aplicações repetidas de NMDA. É sabido que os receptores NMDA dessensibilizam na presença contínua de agonistas (Jones and Westbrook, 1996), pelo que é possível que ocorra uma inibição do receptor por feedback negativo, indo assim provocar um decréscimo na produção de NO mediada pelo receptor NMDA.

Além destes, há ainda outros factores que poderão estar a contribuir para a diminuição do sinal e que têm a ver por exemplo, com o facto da quantidade de NO produzida no primeiro estímulo ser tóxica para as células e ir interferir com os diferentes mecanismos celulares, como a respiração celular e mecanismos de morte celular como a necrose ou apoptose, diminuindo essa mesma viabilidade, o que também explicaria o segundo sinal diminuído relativamente ao primeiro.

No entanto, e independentemente do(s) mecanismos envolvidos, a diminuição da resposta de NO pode ter relevância para a regulação fisiológica e farmacológica dos fenómenos de neurotransmissão mediados pelos receptores NMDA para o glutamato (Jones e Westbrook, 1996), particularmente nas implicações relativamente aos efeitos citotóxicos que derivam da activação da NOS (Stamler *et al.*, 1992) na sequência de uma elevada reactividade para o receptor NMDA, assim como no actual paradigma acerca do papel neuromodulador do NO nos fenómenos de neurodegenerescência (Connop *et al.*, 1995; Kendrick *et al.*, 1996).



CONCLUSÕES

4. CONCLUSÕES

Considerando o papel do NO na regulação dos fenómenos de neurotransmissão e neurodegenerescência, a medição sensível, selectiva e em tempo real deste neurotransmissor com microelctrodos em fatias de hipocampo e em diferentes condições de estimulação do receptor NMDA constitui uma ferramenta analítica com elevadas potencialidades no estudo dos mecanismos pelos quais o NO exerce a sua actividade biológica no cérebro. Assim, o conjunto de resultados obtidos neste trabalho permitiu concluir que:

1. A construção de microelctrodos de fibra de carbono e o seu revestimento com uma camada de Nafion[®] e α -PD permitiu a realização de ensaios em fatias de hipocampo de uma forma sensível e selectiva no intervalo de concentrações na ordem de grandeza dos nanomolar. Além disso, as dimensões dos microelctrodos permitiram monitorizar a dinâmica de produção de NO com elevada resolução espacial e temporal.
2. A aplicação dos microelctrodos modificados na monitorização do NO nas fatias de hipocampo de rato permitiu acompanhar a dinâmica da concentração do NO após estímulo dos receptores NMDA do glutamato, em particular o perfil de produção de NO via estímulo do receptor NMDA do glutamato que se revelou ser transitório e dependente da concentração de estímulo utilizada. O conjunto de experiências levadas a cabo nas fatias de hipocampo de rato permitiu verificar ainda que uma segunda estimulação dos receptores NMDA é acompanhada de um decréscimo na produção de NO .



BIBLIOGRAFIA

5. BIBLIOGRAFIA

Alderton, W.K., Cooper, C.E., and Knowles, R.G. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal* 357, 593-615.

Balbatun, A., Louka, F.R., and Malinski, T. (2003). Dynamics of nitric oxide release in the cardiovascular system. *Acta Biochimica Polonica* 50, 61-68.

Barbosa, R.M. (1998). Mecanismos Iónicos Subyacentes à Secreção Pulsátil de Insulina pelo Ilhéu de Langerhans, Universidade de Coimbra, Coimbra.

Barbosa, R.M., Silva, A.M., Tome, A.R., Stamford, J.A., Santos, R.M., and Rosario, L.M. (1998). Control of pulsatile 5-HT/insulin secretion from single mouse pancreatic islets by intracellular calcium dynamics. *J.Physiol* 510 (Pt 1), 135-143.

Bates, T.E., Loesch, A., Burnstock, G., and Clark, J.B. (1995). Immunocytochemical evidence for a mitochondrially located nitric oxide synthase in brain and liver. *Biochem Biophys Res Commun* 213, 896-900.

Bear, M.F., Connors, B.W., and Paradiso, M.A. (1996). 20. Synaptic Mechanisms of Memory. Williams & Wilkins: Baltimore.

Becker, K., Savvides, S.N., Keese, M., Schirmer, R.H., and Karplus, P.A. (1998). Enzyme inactivation through sulfhydryl oxidation by physiologic NO-carriers. *Nat Struct Biol* 5, 267-271.

Beckman, J.S. (1996). The physiological and pathological chemistry of nitric oxide. In: *Nitric Oxide, Principles and Actions*, ed. J.L. Jr.: AP, 1-82.

Beckman, J.S., A.Wink, D., and S.Beckman, J. (1996). Nitric Oxide and Peroxynitrite. In: *Methods in Nitric Oxide Research*, ed. J. S.Stamler: John Wiley & Sons Ltd, 61-70.

Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A., and Freeman, B.A. (1990). Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 1620-1624.

Beckman, J.S., Chen, J., Ischiropoulos, H., and Crow, J.P. (1994). Oxidative chemistry of peroxynitrite. *Methods Enzymol.* 233, 229-240.

Beckman, J.S., and Koppenol, W.H. (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 271, C1424-1437.

Bedioui, F., Trevin, S., Devynck, J., Lantoine, F., Brunet, A., and Devynck, M.A. (1997). Elaboration and use of nickel planar macrocyclic complex-based sensors for the direct electrochemical measurement of nitric oxide in biological media. *Biosensors & Bioelectronics* 12, 205-212.

Bedioui, F., and Villeneuve, N. (2003). Electrochemical nitric oxide sensors for biological samples - Principle, selected examples and applications. *Electroanalysis* 15, 5-18.

Bindokas, V.P., Jordan, J., Lee, C.C., and Miller, R.J. (1996). Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine. *J Neurosci* 16, 1324-1336.

Blatter, L.A., Taha, Z., Mesaros, S., Shacklock, P.S., Wier, W.G., and Malinski, T. (1995). Simultaneous measurements of Ca²⁺ and nitric oxide in bradykinin-stimulated vascular endothelial cells. *Circ Res* 76, 922-924.

Boehning, D., and Snyder, S.H. (2003). Novel neural modulators. *Annu.Rev.Neurosci.* 26, 105-131.

Bonner, F.T., and Stedman, G. (1996). 1. The Chemistry of Nitric Oxide and Redox-Related Species. In: *Methods in Nitric Oxide Research*, ed. J.S.

Beckman, New York: John Wiley & Sons Ltd, 3-18.

Boveris, A., and Cadenas, E. (2000). Mitochondrial production of hydrogen peroxide regulation by nitric oxide and the role of ubisemiquinone. *IUBMB Life* 50, 245-250.

Brazell, M.P., Kasser, R.J., Renner, K.J., Feng, J., Moghaddam, B., and Adams, R.N. (1987). Electrocoating carbon fiber microelectrodes with Nafion improves selectivity for electroactive neurotransmitters. *J.Neurosci.Methods* 22, 167-172.

Bredt, D.S., Ferris, C.D., and Snyder, S.H. (1992). Nitric oxide synthase regulatory sites. Phosphorylation by cyclic AMP-dependent protein kinase, protein kinase C, and calcium/calmodulin protein kinase; identification of flavin and calmodulin binding sites. *J Biol Chem* 267, 10976-10981.

Brett, A.M.O., and Brett, C.M.A. (1996a). 7. Experiências Electroquímicas. In: *Electroquímica. Princípios e Aplicações*, Coimbra: Livraria Almedina, 191-218.

Brett, A.M.O., and Brett, C.M.A. (1996b). 9. Técnicas de Voltametria Cíclica e Varrimento Linear. In: *Electroquímica. Princípios e Aplicações*, Coimbra: Livraria Almedina, 191-218.

Brown, G.C. (1995). Nitric oxide regulates mitochondrial respiration and cell functions by inhibiting cytochrome oxidase. *FEBS Lett* 369, 136-139.

Burette, A., Zabel, U., Weinberg, R.J., Schmidt, H.H., and Valtschanoff, J.G. (2002). Synaptic localization of nitric oxide synthase and soluble guanylyl cyclase in the hippocampus. *J Neurosci* 22, 8961-8970.

Cadenas, E., Poderoso, J.J., Antunes, F., and Boveris, A. (2000). Analysis of the pathways of nitric oxide utilization in mitochondria. *Free Radic Res* 33, 747-756.

Cho, H.J., Xie, Q.W., Calaycay, J., Mumford, R.A., Swiderek, K.M., Lee, T.D., and Nathan, C. (1992). Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. *J Exp Med* 176, 599-604.

Christopherson, K.S., Hillier, B.J., Lim, W.A., and Bredt, D.S. (1999). PSD-95 assembles a ternary complex with the N-methyl-D-aspartic acid receptor and a bivalent neuronal NO synthase PDZ domain. *J Biol Chem* 274, 27467-27473.

Ciszewski, A., and Milczarek, G. (2003). Electrochemical detection of nitric oxide using polymer modified electrodes. *Talanta* 61, 11-26.

Colasanti, M., and Suzuki, H. (2000). The dual personality of NO. *Trends Pharmacol.Sci.* 21, 249-252.

Connop, B.P., Boegman, R.J., Jhamandas, K., and Beninger, R.J. (1995). Excitotoxic action of NMDA agonists on nigrostriatal dopaminergic neurons: modulation by inhibition of nitric oxide synthesis. *Brain Res* 676, 124-132.

Coyle, J.T., and Puttfarcken, P. (1993). Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 262, 689-695.

Crane, B.R., Arvai, A.S., Gachhui, R., Wu, C., Ghosh, D.K., Getzoff, E.D., Stuehr, D.J., and Tainer, J.A. (1997). The structure of nitric oxide synthase oxygenase domain and inhibitor complexes. *Science* 278, 425-431.

Crespi, F., Campagnola, M., Neudeck, A., McMillan, K., Rossetti, Z., Pastorino, A., Garbin, U., Fratta-Pasini, A., Reggiani, A., Gaviraghi, G., and Cominacini, L. (2001). Can voltammetry measure nitrogen monoxide (NO) and/or nitrites? *J.Neurosci.Methods* 109, 59-70.

Crespi, F., and Rossetti, Z.L. (2004). Pulse of Nitric Oxide Release in Response to Activation of N-Methyl-D-Aspartate Receptors in the Rat Striatum: Rapid Desensitisation, Inhibition by Receptor Antagonists and Potentiation by Glycine. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*

Daveu, C., Servy, C., Dendane, M., Marin, P., and Ducrocq, C. (1997). Oxidation and nitration of catecholamines by nitrogen oxides derived from nitric oxide. *Nitric Oxide* 1, 234-243.

Davis, K.L., Martin, E., Turko, I.V., and Murad, F. (2001). Novel effects of nitric oxide. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 41, 203-236.

Dawson, V.L., and Dawson, T.M. (1998). Nitric oxide in neurodegeneration. *Prog.Brain Res.* 118, 215-229.

Dawson, V.L., Dawson, T.M., London, E.D., Bredt, D.S., and Snyder, S.H. (1991). Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 6368-6371.

Doyle, M.P., and Hoekstra, J.W. (1981). Oxidation of nitrogen oxides by bound dioxygen in hemoproteins. *J Inorg Biochem* 14, 351-358.

Eich, R.F., Li, T., Lemon, D.D., Doherty, D.H., Curry, S.R., Aitken, J.F., Mathews, A.J., Johnson, K.A., Smith, R.D., Phillips, G.N., Jr., and Olson, J.S. (1996). Mechanism of NO-induced oxidation of myoglobin and hemoglobin. *Biochemistry* 35, 6976-6983.

Eiserich, J.P., Patel, R.P., and O'Donnell, V.B. (1998). Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules. *Mol.Aspects Med.* 19, 221-357.

Ferreira, N.R., Ledo, A., Frade, J.G., Gerhardt, G.A., Laranjinha, J., and Barbosa, R.M. (2005). Electrochemical measurement of endogenously produced nitric oxide in brain slices using Nafion/o-phenylenediamine modified carbon fiber microelectrodes. *Analytica Chimica Acta* 535, 1-7.

Fitzhugh, A.L., and Keefer, L.K. (2000). Diazeniumdiolates: Pro- and antioxidant applications of the "NONOates". *Free Radical Biology and Medicine* 28, 1463-1469.

Fontijn, A., Sabadell, A.J., and Ronco, R.J. (1970). Homogeneous Chemiluminescent Measurement of Nitric Oxide with Ozone - Implications for Continuous Selective Monitoring of Gaseous Air Pollutants. *Analytical Chemistry* 42, 575-&.

Friedemann, M.N., Robinson, S.W., and Gerhardt, G.A. (1996). o-Phenylenediamine-modified carbon fiber electrodes for the detection of nitric oxide. *Anal.Chem.* 68, 2621-2628.

Furchgott, R.F., and Zawadzki, J.V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, 373-376.

Garthwaite, J., and Boulton, C.L. (1995a). Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu.Rev.Physiol* 57, 683-706.

Garthwaite, J., and Boulton, C.L. (1995b). Nitric Oxide Signalling in the Central Nervous System. In: *Annu Rev Physiol: Annual Reviews Inc*, 683-706.

Gerhardt, G.A., and Hoffman, A.F. (2001). Effects of recording media composition on the responses of Nafion-coated carbon fiber microelectrodes measured using high-speed chronoamperometry. *Journal of Neuroscience Methods* 109, 13-21.

Gerova, M., Mesáros, S., Kristek, F., Kittová, M., and Malinski, T. (1998). NO concentration in the periendothelial area of the femoral artery of the dog measured in vivo. *Physiol Res* 47, 169-175.

Girgis, R.E., Qureshi, M.A., Abrams, J., and Swerdlow, P. (2003). Decreased exhaled nitric oxide in sickle cell disease: relationship with chronic lung involvement. *Am J Hematol* 72, 177-184.

Giulivi, C., Poderoso, J.J., and Boveris, A. (1998). Production of nitric oxide by mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* 273, 11038-11043.

Gonon, F.G., and Buda, M.J. (1985). Regulation of dopamine release by impulse flow and by autoreceptors as studied by in vivo voltammetry in the rat striatum. *Neuroscience* 14, 765-774.

Hafizi, S., KRUK, Z.L., and STAMFORD, J.A. (1990). Fast cyclic voltammetry: improved sensitivity to dopamine with extended oxidation scan limits. *J.Neurosci.Methods* 33, 41-49.

Hall, D.M., and Buettner, G.R. (1996). In vivo spin trapping of nitric oxide by heme: Electron paramagnetic resonance detection ex vivo. *Methods in Enzymology: Academic Press*, 188-192.

Henry, Y.A., Ducastel, B., Guissani, A. (1997). 2. Basic Chemistry of Nitric Oxide and Related Nitrogen Oxides. Springer-Verlag: Heidelberg.

Henry, Y.A., Ducastel, B., Guissani, A. (1997 a). 2. Basic Chemistry of Nitric Oxide and Related Nitrogen Oxides. Springer-Verlag: Heidelberg.

Hoshino, M., Ozawa, K., Seki, H., and Ford, P.C. (1993). Photochemistry of Nitric Oxide Adducts of Water-Soluble Iron(III) Porphyrin and Ferrilhemoproteins Studied by Nanosecond Laser Photolysis. *J. Am. Chem. Soc.* 115, 9568-9575.

Ignarro, L.J. (1991). Signal transduction mechanisms involving nitric oxide. *Biochem Pharmacol* 41, 485-490.

Ignarro, L.J. (1996). Nitric Oxide as a Communication Signal in Vascular and Neuronal Cells. In: Nitric Oxide. Principles and Actions, ed. J.L. Jr., NY: Academic Press, 111-131.

Ignarro, L.J., Buga, G.M., Byrns, R.E., Wood, K.S., and Chaudhuri, G. (1988a). Endothelium-derived relaxing factor and nitric oxide possess identical pharmacologic properties as relaxants of bovine arterial and venous smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 246, 218-226.

Ignarro, L.J., Buga, G.M., Wood, K.S., Byrns, R.E., and Chaudhuri, G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 84, 9265-9269.

Ignarro, L.J., Byrns, R.E., Buga, G.M., Wood, K.S., and Chaudhuri, G. (1988b). Pharmacological evidence that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide: use of pyrogallol and superoxide dismutase to study endothelium-dependent and nitric oxide-elicited vascular smooth muscle relaxation. *J Pharmacol Exp Ther* 244, 181-189.

Ischiropoulos, H. (1998). Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Arch Biochem Biophys* 356, 1-11.

Jaffrey, S.R., Benfenati, F., Snowman, A.M., Czernik, A.J., and Snyder, S.H. (2002). Neuronal nitric-oxide synthase localization mediated by a ternary complex with synapsin and CAPON. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 3199-3204.

Jaffrey, S.R., Snowman, A.M., Eliasson, M.J., Cohen, N.A., and Snyder, S.H. (1998). CAPON: a protein associated with neuronal nitric oxide synthase that regulates its interactions with PSD95. *Neuron* 20, 115-124.

Jones, M.V., and Westbrook, G.L. (1996). The impact of receptor desensitization on fast synaptic transmission. *Trends Neurosci* 19, 96-101.

Kalyanaraman, B. (1996). Detection of nitric oxide by electron spin resonance in chemical, photochemical, cellular, physiological, and pathophysiological systems *Methods in Enzymology: Academic Press*, 168-187.

Katrlík, J., and Zalesakova, P. (2002). Nitric oxide determination by amperometric carbon fiber microelectrode. *Bioelectrochemistry*. 56, 73-76.

Keefe, L.K., Nims, R.W., Davies, K.M., and Wink, D.A. (1996). "NONOates" (1-substituted diazen-1-ium-1,2-diolates) as nitric oxide donors: Convenient nitric oxide dosage forms. *Nitric Oxide, Pt A - Sources and Detection of NO; NO Synthase* 268, 281-293.

Kendrick, K.M., Guevara-Guzman, R., de la Riva, C., Christensen, J., Ostergaard, K., and Emson, P.C. (1996). NMDA and kainate-evoked release of nitric oxide and classical transmitters in the rat striatum: in vivo evidence that nitric oxide may play a neuroprotective role. *Eur J Neurosci* 8, 2619-2634.

Kikugawa, K., Hiramoto, K., Tomiyama, S., and Asano, Y. (1997). beta-Carotene effectively scavenges toxic nitrogen oxides: nitrogen dioxide and peroxynitrous acid. *FEBS Lett* 404, 175-178.

Kim, W.K., Choi, Y.B., Rayudu, P.V., Das, P., Asaad, W., Arnelle, D.R., Stamler, J.S., and Lipton, S.A. (1999). Attenuation of NMDA receptor activity and neurotoxicity by nitroxyl anion, NO. *Neuron* 24, 461-469.

Kitajima, A., Teranishi, T., and Miyake, M. (2001). Detection of nitric oxide on carbon electrode modified with ionic polymers and alpha-cyclodextrin. *Electrochemistry* 69, 16-20.

Kozlov, A.V., Bini, A., Iannone, A., Zini, I., and Tomasi, A. (1996). Electron paramagnetic resonance characterization of rat neuronal nitric oxide production ex vivo. *Methods in Enzymology: Academic Press*, 229-236.

Kristensen, E.W., Wilson, R.L., and Wightman, R.M. (1986). Dispersion in Flow-Injection Analysis Measured With Microvoltammetric Electrodes. *Analytical Chemistry* 58, 986-988.

Lancaster, J.R., Jr. (1994). Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 8137-8141.

Lancaster, J.R., Jr. (1997). A tutorial on the diffusibility and reactivity of free nitric oxide. *Nitric Oxide* 1, 18-30.

Lantoine, F., Trevin, S., Bedioui, F., and Devynck, J. (1995). Selective and Sensitive Electrochemical Measurement of Nitric-Oxide in Aqueous-Solution - Discussion and New Results. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 392, 85-89.

Laranjinha, J., and Cadenas, E. (2002). Oxidation of DOPAC by nitric oxide: effect of superoxide dismutase. *J Neurochem* 81, 892-900.

Ledo, A., Barbosa, R.M., Frade, J., and Laranjinha, J. (2002). Nitric oxide monitoring in hippocampal brain slices using electrochemical methods. *Methods Enzymol.* 359, 111-125.

Ledo, A., Frade, J., Barbosa, R.M., and Laranjinha, J. (2004). Nitric oxide in brain: diffusion, targets and concentration dynamics in hippocampal subregions. *Mol.Aspects Med.* 25, 75-89.

Lei, S.Z., Pan, Z.H., Aggarwal, S.K., Chen, H.S., Hartman, J., Sucher, N.J., and Lipton, S.A. (1992). Effect of nitric oxide production on the redox modulatory site of the NMDA receptor-channel complex. *Neuron* 8, 1087-1099.

Lipton, S.A., Choi, Y.B., Pan, Z.H., Lei, S.Z., Chen, H.S., Sucher, N.J., Loscalzo, J., Singel, D.J., and Stamler, J.S. (1993). A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 364, 626-632.

Malinski, T., and Czuchajowski, L. (1996). Nitric oxide Measurement by Electrochemical Methods. In: *Methods in NitricOxide Research*, ed. J.S. Stamler, NY: John Wiley & Sons, 319-339.

Malinski, T., Radomski, M.W., Taha, Z., and Moncada, S. (1993a). Direct electrochemical measurement of nitric oxide released from human platelets. *Biochem Biophys Res Commun* 194, 960-965.

Malinski, T., and Taha, Z. (1992). Nitric oxide release from a single cell measured in situ by a porphyrinic-based microsensor. *Nature* 358, 676-678.

Malinski, T., Taha, Z., Grunfeld, S., Patton, S., Kapturczak, M., and Tomboulian, P. (1993b). Diffusion of nitric oxide in the aorta wall monitored in situ by porphyrinic microsensors. *Biochem Biophys Res Commun* 193, 1076-1082.

-
- Manzoni, O., Prezeau, L., Marin, P., Deshager, S., Bockaert, J., and Fagni, L. (1992). Nitric oxide-induced blockade of NMDA receptors. *Neuron* 8, 653-662.
- Mao, L.Q., Jin, J.Y., Song, L.N., Yamamoto, K., and Jin, L.T. (1999). Electrochemical microsensor for in vivo measurements of oxygen based on Nafion and methylviologen modified carbon fiber microelectrode. *Electroanalysis* 11, 499-504.
- Marletta, M.A. (1993). Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem* 268, 12231-12234.
- Marletta, M.A., Hurshman, A.R., and Rusche, K.M. (1998). Catalysis by nitric oxide synthase. *Curr Opin Chem Biol* 2, 656-663.
- Marley, R., Feelisch, M., Holt, S., and Moore, K. (2000). A chemiluminescence-based assay for S-nitrosoalbumin and other plasma S-nitrosothiols. *Free Radic Res* 32, 1-9.
- Meulemans, A. (1994). Diffusion coefficients and half-lives of nitric oxide and N-nitroso-L-arginine in rat cortex. *Neurosci Lett* 171, 89-93.
- Miles, A.M., Wink, D.A., Cook, J.C., and Grisham, M.B. (1996). Determination of nitric oxide using fluorescence spectroscopy
Methods in Enzymology: Academic Press, 105-120.
- Mitchell, K.M., and Michaelis, E.K. (1998). Multimembrane carbon fiber electrodes for physiological measurements of nitric oxide. *Electroanalysis* 10, 81-88.
- Moncada, S., and Higgs, A. (1993). The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329, 2002-2012.
- Moncada, S., Palmer, R.M., and Higgs, E.A. (1989). Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem.Pharmacol.* 38, 1709-1715.
- Moncada, S., Palmer, R.M., and Higgs, E.A. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol.Rev.* 43, 109-142.

Murphy, L.J. (1998). Reduction of interference response at a hydrogen peroxide detecting electrode using electropolymerized films of substituted naphthalenes. *Analytical Chemistry* 70, 2928-2935.

Nathan, C. (1992). Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 6, 3051-3064.

Nims Raymond W., Darbyshire John F., Saavedra Joseph E., Christodoulou Danae, Hanbauer Ingeborg, Cox George W., Grisham Matthew B., Laval Franciose, Cook John A., Krishna Murali C., and Wink David A. (1995). Colorimetric Methods for the Determination of Nitric Oxide Concentration in Neutral Aqueous Solutions. *Methods* 7, 48-54.

Nims, R.W., Cook, J.C., Krishna, M.C., Christodoulou, D., Poore, C.M.B., Miles, A.M., Grisham, M.B., and Wink, D.A. (1996). Colorimetric assays for nitric oxide and nitrogen oxide species formed from nitric oxide stock solutions and donor compounds *Methods in Enzymology: Academic Press*, 93-105.

Noronha-Dutra, A.A., Epperlein, M.M., and Woolf, N. (1993). Reaction of nitric oxide with hydrogen peroxide to produce potentially cytotoxic singlet oxygen as a model for nitric oxide-mediated killing. *FEBS Lett* 321, 59-62.

Osipov, A.N., Gorbunov, N.V., Day, B.W., Elsayed, N.M., and Kagan, V.E. (1996). Electron spin resonance and mass spectral analysis of interactions of ferrylhemoglobin and ferrylmyoglobin with nitric oxide

Methods in Enzymology: Academic Press, 193-203.

Padmaja, S., and Huie, R.E. (1993). The reaction of nitric oxide with organic peroxy radicals. *Biochem Biophys Res Commun* 195, 539-544.

Palmer, R.M., Ferrige, A.G., and Moncada, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327, 524-526.

Park, J.K., Tran, P.H., Chao, J.K.T., Ghodadra, R., Rangarajan, R., and Thakor, N.V. (1998). In vivo nitric oxide sensor using non-conducting polymer-modified carbon fiber. *Biosensors & Bioelectronics* 13, 1187-1195.

Pei, J., Yu, N.-T., and Li, X.-Y. (1999). Electrocatalytic detection of biological nitric oxide at an ultramicroelectrode modified with an electrodeposited CuPtCl₆ film. *Analytica Chimica Acta* 402, 145-155.

Pontie, M., and Bedioui, F. (2000). Design of electrochemical microsensors to monitor nitric oxide production in biological systems: a global compilation. *Analisis* 28, 465-469.

Pontie, M., Bedioui, F., and Devynck, J. (1999). New composite modified carbon microfibers for sensitive and selective determination of physiologically relevant concentrations of nitric oxide in solution. *Electroanalysis* 11, 845-850.

Pontie, M., Gobin, C., Pauporte, T., Bedioui, F., and Devynck, J. (2000). Electrochemical nitric oxide microsensors: sensitivity and selectivity characterisation. *Analytica Chimica Acta* 411, 175-185.

Pufahl, R.A., Nanjappan, P.G., Woodard, R.W., and Marletta, M.A. (1992). Mechanistic probes of N-hydroxylation of L-arginine by the inducible nitric oxide synthase from murine macrophages. *Biochemistry* 31, 6822-6828.

Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Katz, L.C., and LaMantia, A.S. (1997). 23. Plasticity in the Adult Nervous System. Sinauer Associates Inc.: Sunderland.

Radi, R., Beckman, J.S., Bush, K.M., and Freeman, B.A. (1991a). Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem* 266, 4244-4250.

Radi, R., Beckman, J.S., Bush, K.M., and Freeman, B.A. (1991b). Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 288, 481-487.

Rassaf, T., Bryan, N.S., Kelm, M., and Feelisch, M. (2002). Concomitant presence of N-nitroso and S-nitroso proteins in human plasma. *Free Radic Biol Med* 33, 1590-1596.

Rettori, D., Tang, Y., Dias, L.C., Jr., and Cadenas, E. (2002). Pathways of dopamine oxidation mediated by nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 33, 685-690.

Riley, T., and Watson, A. (1987). 1. Classical dc Polarography. In: *Polarography and Other Voltammetric Methods*, ed. A.M. James, London: John Wiley and Sons, 1-99.

Rogers, N.E., and Ignarro, L.J. (1992). Constitutive nitric oxide synthase from cerebellum is reversibly inhibited by nitric oxide formed from L-arginine. *Biochem Biophys Res Commun* 189, 242-249.

Saito, K., and Yoshioka, H. (2002). Protective effect of spin trap agent, N-tert-butyl-alpha-phenylnitron on hyperoxia-induced oxidative stress and its potential as a nitric oxide donor. *Free Radic Res* 36, 143-149.

Schuman, E.M., and Madison, D.V. (1994). Locally distributed synaptic potentiation in the hippocampus. *Science* 263, 532-536.

Sharma, V.S., Traylor, T.G., Gardiner, R., and Mizukami, H. (1987). Reaction of nitric oxide with heme proteins and model compounds of hemoglobin. *Biochemistry* 26, 3837-3843.

Shibuki, K. (1990). An electrochemical microprobe for detecting nitric oxide release in brain tissue. *Neurosci Res* 9, 69-76.

Si, S.H., Xu, Y.J., Nie, L.H., and Yao, S.Z. (1995). Electrochemical Quartz-Crystal Microbalance Study on Electropolymerization of M-Phenylenediamine - Effects of Aniline and Polyaniline. *Electrochimica Acta* 40, 2715-2721.

Singh, R.J., Hogg, N., Joseph, J., and Kalyanaraman, B. (1995). Photosensitized decomposition of S-nitrosothiols and 2-methyl-2-nitrosopropane. Possible use for site-directed nitric oxide production. *FEBS Lett* 360, 47-51.

Souza, D., Codognoto, L., Malagutti, A.R., Toledo, R.A., Pedrosa, V.A., Oliveira, R.T.S., Mazo, L.H., Avaca, L.A., and Machado, S.A.S. (2004). Voltametria de Onda Quadrada. Segunda Parte: Aplicações. *Quim. Nova* 27, 790-797.

Souza, D., Sergio, A.S., Machado, S.A.S., and Avaca, L.A. (2003). Voltametria de Onda Quadrada. Primeira Parte: Aspectos Teóricos. *Quim. Nova* 26, 81-89.

Stamford, J.A., Crespi, F., and Marsden, C.A. (1992). In Vivo Voltammetric Methods for Monitoring Monoamine Release and Metabolism. In: *Monitoring Neuronal Activity - A Practical Approach*, ed. J.A. Stamford, New York: Oxford University Press, 113-145.

Stamford, J.A., Kruk, Z.L., and Millar, J. (1986). Sub-2nd Striatal Dopamine Release Measured by In Vivo Voltammetry. *Brain Research* 381, 351-355.

Stamford, J.A., P., P., Davidson, C., C.M., J., and Phillips, P.E.M. (1995). Fast Cyclic Voltammetry in Brain Slices. In: *Neuromethods*, vol. 27, ed. R.N. Adams: Humana Press Inc., 81-116.

Stamler, J.S., and Feelish, M. (1996). Biochemistry of Nitric Oxide and Redox-related Species. In: *Methods in Nitric Oxide Research*, ed. J.S. Stamler, NY: John Wiley & Sons Ltd, 19-27.

Stamler, J.S., Lamas, S., and Fang, F.C. (2001). Nitrosylation. the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell* 106, 675-683.

Stingele, R., Wilson, D.A., Traystman, R.J., and Hanley, D.F. (1998). Tyrosine confounds oxidative electrochemical detection of nitric oxide. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 43, H1698-H1704.

Stokes, D.J. (2003). Recent advances in electron imaging, image interpretation and applications: environmental scanning electron microscopy. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series a-Mathematical Physical and Engineering Sciences* 361, 2771-2787.

Taha, Z.H. (2003). Nitric oxide measurements in biological samples. *Talanta* 61, 3-10.

Thompson, R.F. (1993a). 1. *Brain and Neuron*. W.H. Freeman and Company: New York.

Thompson, R.F. (1993b). 11. *Learning, Memory and the Brain*. W.H Freeman and Company: New York.

Trevin, S., Bedioui, F., and Devynck, J. (1996). Electrochemical and spectrophotometric study of the behavior of electropolymerized nickel porphyrin films in the determination of nitric oxide in solution. *Talanta* 43, 303-311.

Tsai, A. (1994). How does NO activate hemeproteins? *FEBS Lett* 341, 141-145.

Vanin, A.F., Liu, X., Samouilov, A., Stukan, R.A., and Zweier, J.L. (2000). Redox properties of iron-dithiocarbamates and their nitrosyl derivatives: implications for their use as traps of nitric oxide in biological systems. *Biochim Biophys Acta* 1474, 365-377.

Wiersma, J.H. (1970). 2,3-Diaminonaphthalene as a Spectrophotometric and Fluorometric Reagent for Determination of Nitrite Ion. *Analytical Letters* 3, 123-&.

Wink, D.A., Beckman, J.S., and Ford, P.C. (1996a). Kinetics of Nitric Oxide Reaction in Liquid and Gas Phase. In: *Methods in Nitric Oxide Research*, ed. J.S. Stamler, NY: John Wiley & Sons Ltd, 29-37.

Wink, D.A., Grisham, M.B., Mitchell, J.B., and Ford, P.C. (1996b). Direct and indirect effects of nitric oxide in chemical reactions relevant to biology. *Methods Enzymol* 268, 12-31.

Wink, D.A., and Mitchell, J.B. (1998). Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 25, 434-456.

Wood, J., and Garthwaite, J. (1994). Models of the diffusional spread of nitric oxide: implications for neural nitric oxide signalling and its pharmacological properties
1. *Neuropharmacology* 33, 1235-1244.

World Precision Instruments, I. (1999). ISO-NO Mark II - Isolated Nitric Oxide Meter and Sensors, Sarasota, 72.

Yao, D.C., Vlessidis, A.G., Evmiridis, N.P., Evangelou, A., Karkabounas, S., and Tsampalas, S. (2002). Luminol chemiluminescence reaction: a new method for monitoring nitric oxide in vivo. *Analytica Chimica Acta* 458, 281-289.

Yermilov, V., Yoshie, Y., Rubio, J., and Ohshima, H. (1996). Effects of carbon dioxide/bicarbonate on induction of DNA single-strand breaks and formation of 8-nitroguanine, 8-oxoguanine and base-propanal mediated by peroxynitrite. *FEBS Lett* 399, 67-70.

Zhang, X.J., Cardosa, L., Broderick, M., Fein, H., and Lin, J. (2000). An integrated nitric oxide sensor based on carbon fiber coated with selective membranes. *Electroanalysis* 12, 1113-1117.

Zhang, X.J., Kislyak, Y., Lin, H., Dickson, A., Cardoso, L., Broderick, M., and Fein, H. (2002). Nanometer size electrode for nitric oxide and S-nitrosothiols measurement. *Electrochemistry Communications* 4, 11-16.

