

ESTUDO POR RPE DE RADICAIS LIVRES

INDUZIDOS POR RADIAÇÃO X E GAMA

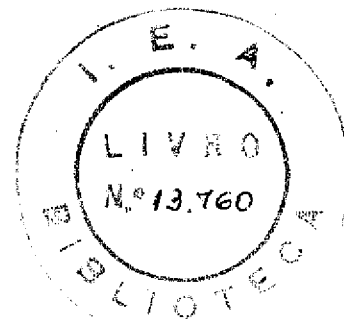
Tese apresentada ao Instituto
de Física da Universidade de
São Paulo para a obtenção do
título de Mestre em Ciências.

AMANDO SIUITI ITO

Quintada, Sadae, Ito

SÃO PAULO

1975



AGRADECIMENTOS

Agradecemos:

Ao Prof.Dr. Sadao Isotani pela orientação e incentivo no decorrer dos trabalhos.

Em especial ao Prof. Pier Raimondo Crippa que durante o período em que permaneceu conosco, em 1973, teve a idéia da realização do trabalho, mantendo sua colaboração mesmo após sua partida.

/ ~*]

\ J_e /Ao Superintendente do Instituto de Energia Atômica, Prof. Dr. Rômulo Ribeiro Pieroni pela oportunidade de pesquisa e facilidades oferecidas, sem as quais este trabalho não poderia ter sido realizado.

•'). Ao Prof. Dr. Shigueo Watanabe pela colaboração e interesse demonstrado durante o desenvolvimento dos trabalhos.

Aos colegas do grupo de Biofísica, pelas discussões constantes e sugestões apresentadas.

' í -

íj . A todos que, direta ou indiretamente colaboraram na execução do presente trabalho.

RESUMO

Estudamos por RPE efeitos de radiações Xe e γ na seguinte série de substâncias: glicina, glicil-glicina, triglicina, poliglicina e colágeno. As irradiações foram feitas a vácuo e temperatura ambiente.

O sinal induzido na glicina é um tripleto enquanto as demais substâncias mostram um dubleto comumente atribuído ao radical formado no carbono α da cadeia peptídica. Todos os materiais irradiados apresentam dependência entre susceptibilidade magnética e temperatura na forma da lei de Curie-Weiss, no intervalo de temperaturas entre 110 K e 300K, à exceção da glicina onde esse intervalo situa-se entre 180 e 300 K.

Medimos os valores de: parâmetro de radiosensibilidade G_r ; constante de desdobramento hiperfino A^{\wedge} ; fator espectroscópico g ; temperatura θ , correspondente à temperatura de Curie do material irradiado.

Interpretamos os dados de G_r , θ e A^{\wedge} referentes à série dos peptídeos assumindo a formação do radical livre no carbono α da cadeia, verificando assim que o elétron desemparelhado apresenta um grau de deslocalização crescente com o aumento de unidades de glicina.

Finalmente, observamos que a temperatura θ é negativa, indicando que a natureza da interação entre os spins desemparelhados é antiferromagnética.

ABSTRACT

The effects of X and Y radiation on glycine, glycyglycine, triglycine, polyglycine and collagen have been studied using EPR spectroscopy. The radiation exposures have been performed under vacuum at room temperature.

All those irradiated substances but glycine show a doublet absorption signal often ascribed to a radical formed on the α carbon of the peptide chain. Glycine shows a triplet induced absorption signal.

The magnetic susceptibility has been found to depend on temperature according to the Curie-Weiss law. Irradiated glycine follows this behaviour from 180 K to 300 K, while the others in the temperature range 110 K - 300 K.

The radiosensitivity parameter G , the hyperfine splitting constant A and the spectroscopic factor g have been determined as well as θ which is the temperature corresponding to the Curie temperature of the irradiated substance.

The results on G , θ and A for all peptides studied here agree with the assumption of radiation induced free radical located at the α carbon of the peptide chain, leading to conclude that the degree of delocalization of the unpaired electron increases for increasing number of glycine units in the peptide.

Finally, from θ negative values obtained, a conclusion has been reached on the antiferromagnetic nature of the interaction of unpaired spins.

I N D I C E

I - INTRODUÇÃO	1
1. Espectroscopia RPE aplicada ao estudo dos efeitos da radiação	2
2. Radicais induzidos em proteínas	3
3. Medidas quantitativas por RPE	5
1. Dependência da Área com a Temperatura	9
5. Objetivos	10
II- ASPECTOS TEÓRICOS DA RPE NO ESTUDO DE RADICAIS LIVRES ..	13
1. Interação hiperfina	13
1a. A hamiltoniana de spin	IH
1b. Interação com o núcleo do átomo de hidrogênio ..	16
2. O comportamento paramagnético dos radicais livres ..	17
3. O parâmetro G_r	19
3a. Determinação do número de spins	20
3b. Método comparativo	20
3c. Influência dos parâmetros instrumentais	22
III-DOSE ABSORVIDA	25
IV- PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	29
1. Amostra padrão	29
1a. Preparação da amostra padrão	29
1b. Medidas com a amostra padrão	31
2. Amostras de peptídeos e o colágeno	31
2a. Preparação das amostras	32
2b. Irradiação e medidas	33
V - CALIBRAÇÃO DO ESPECTRÔMETRO	35
1. Cálculo da área sob a curva de absorção	36
2. Relação área-parâmetros instrumentais	37
2a. Área e potência	37
2b. Área e modulação	37
2c. Área e fator de amplificação	38

3. Relação área-número de spins para o DPPH	39
VI- AMOSTRAS IRRADIADAS	40
1. Calculo das doses absorvidas	40
2. Medida* com temperatura variável e determinação de θ	44
3. Número de spins das amostras. Valor G_r	45
4. Constante de desdobramento hiperfino	47
5. Fator espectroscópico g	49
VII-DISCUSSÃO DOS RESULTADOS E CONCLUSÕES	51
1. Fator espectroscópico g_j	51
2. Desdobramento hiperfino	51
3. Variação do sinal com a temperatura	53
3a. θ sinal da glicina	54
3b. A temperatura θ	55
4. θ valor G_r	56
5. Interpretação conjunta de θ , θ e G_r	57
6. Conclusões	58
7. Sugestões	59
APÊNDICE 1	61
APÊNDICE 2	65
REFERÊNCIAS	68

I - INTRODUÇÃO

Não se conhece organismo vivo que deixe de ser afetado por radiações de altas energias. O reconhecimento biológico **des**se fato, constatado tanto por alterações de estruturas celulares como por mudanças genéticas, é precedido de eventos diversos que se inter-relacionam numa complexa cadeia de fenômenos. A série de eventos que segue à absorção da radiação pela matéria pode, ilustrativamente, ser dividida em tres estágios temporais característicos : (1)

1. O estágio físico da ação da radiação, durante o qual ocorre a transferência de energia da radiação para a matéria. Este processo leva principalmente a excitações moleculares e ionizações. As espécies primárias produzidas são, usualmente, bastante instáveis sofrendo logo a seguir reações secundárias, tanto espontaneamente como por colisões com moléculas vizinhas.

2. O estágio físico-químico, no qual produzem-se espécies secundárias reativas (comumente átomos ou radicais livres) que podem se originar de uma única reação ou podem resultar de uma sucessão complexa de reações. Muitas dessas interações não são observadas em outros ramos da física e da química embora algumas sejam conhecidas na fotoquímica.

3. O estágio químico que se inicia quando o sistema restabelece seu equilíbrio térmico que havia sido alterado pela energia da radiação. Nesta fase as espécies reativas continuam a reagir entre si e com as vizinhanças.

As mudanças moleculares induzidas pela radiação provocam alterações no organismo. Essas alterações, através do estágio biológico, podem levar finalmente ao desenvolvimento de um efeito biológico observável. O tipo e a intensidade do dano dependerão da possibilidade do organismo reparar o defeito ou se

ele, operando sob essas condições perturbadas, tendera a ampliar o dano.

A tabela 1 apresenta, de maneira esquematizada, a sequência de ventos que se segue à absorção de energia, com as ordens da grandeza estimadas de seus tempos de duração ~ (2)

TABELA 1

Tempo (seg.)	Eventos em sólidos à temperatura ambiente
10^{-16}	Excitação ou ionização por partícula rápida carregada
10^{-14}	Recaptura de elétrons por ions "pais"
10^{-13}	Dissociação de ligações químicas
10^{-12}	Relaxação de dielétricos, reorientação da rede
10^{-10}	Reações do tipo radical-radical
10^{-8}	Reações de radicais cinéticos ou excitados
$<10^{-2}$	Situação metaestável

1. Espectroscopia RPE aplicada ao estudo dos efeitos da radiação

Diferentes métodos e técnicas podem ser usadas para seguir-se os vários processos dos estágios citados. Enquanto os processos do estágio físico são virtualmente inacessíveis à investigação experimental, devendo ser estudados por medidas em sistemas modelos, há vários métodos que podem ser utilizados para a obtenção de resultados, tanto qualitativos como quantitativos, no estágio físico-químico.

Nesse contexto, a técnica RPE tem sido extensivamente empregada. Os radicais livres são espécies que contêm elétrons desemparelhados podendo, portanto, ser detectados pela espectrof

copia RPE. Essa detecção é teoricamente possível desde que os radicais tenham meia vida suficientemente longa, estejam presentes em concentrações compatíveis com a sensibilidade do equipamento e não produzam sinais com largura de linha demasiadamente grande⁽³⁾.

Como é característico dos radicais livres, os induzidos pela radiação são também bastante reativos. Entretanto, é possível limitar a razão de reação entre os radicais, diminuindo-se a difusão dos mesmos. Em substâncias biológicas essa diminuição é favorecida com a eliminação da água e por isso a maioria dos estudos por RPE é feita em amostras irradiadas no estado sólido. As espécies que podem ser observadas são as que, por uma razão ou outra, foram aprisionadas na amostra após o aparecimento dos produtos primários da absorção de energia pela matéria.

Nos primeiros estudos de danos de radiação em substâncias biológicas por RPE, Gordy e colaboradores^{4, 5} obtiveram espectros de materiais policristalinos irradiados à temperatura ambiente. Estas pesquisas mostraram que a irradiação de várias espécies biológicas secas (aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos e constituintes, lipídios, hormônios, vitaminas, etc) produz radicais livres estáveis por longos períodos, à temperatura ambiente e possíveis de serem estudados por RPE.

2. Radicais induzidos em proteínas

Estudos sobre a composição e a estrutura das proteínas mostram que essas macromoléculas são formadas por longas cadeias de aminoácidos que se juntam através da ligação peptídica. Por

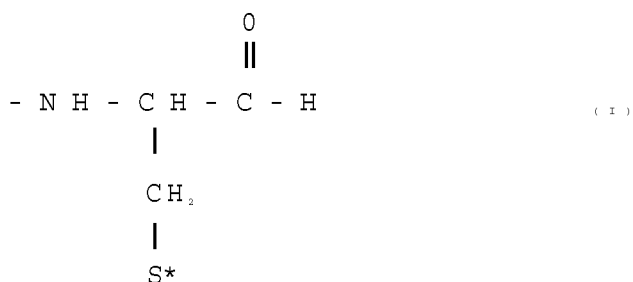
(6)

outro lado Shields e Gordy puderam observar que cada aminoácido irradiado apresenta seu próprio espectro RPE, ou seja, cada aminoácido apresenta um particular radical livre induzido pela radiação. Apesar desse fato, o próprio Gordy, além de

Zimmer e Muller⁽⁹⁾ apontou para a seguinte observação em proteínas irradiadas: o espectro RPE das mesmas não é o padrão complicado que se esperaria se houvesse uma superposição de sinais dos aminoácidos individuais; ao invés disso, o espectro obtido mostra dois tipos principais de ressonância como pode ser apreciado na figura 1.

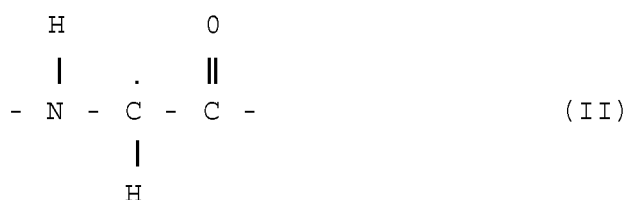
Essa figura é um exemplo típico de um espectro de uma proteína. Foi obtido para uma amostra de lisozima que irradiamos a vácuo e na temperatura ambiente. Observa-se nele a presença de um largo sinal de ressonância e de um dubleto em torno de 3290G.

O primeiro sinal é característico de compostos policristalinos contendo enxofre como cisteína, cistina, cisteamina e outros. Gordy e Shields atribuíram essa ressonância a um tipo de radical onde o elétron não emparelhado localiza-se principalmente no átomo de enxofre do resíduo cisteína:



Trabalhos posteriores, experimentais e teóricos, vieram corroborar essa suposição⁽¹⁰⁾

O sinal dubleto, por suavez, é similar ao encontrado em dipeptídeos como glicil-glicina e acetil-glicina. Atribui-se o sinal desses dipeptídeos ao radical localizado no carbono da ligação peptídica devendo-se o desdobramento da linha à interação com o átomo de hidrogênio:



Considera-se que esse radical seja o responsável pelo

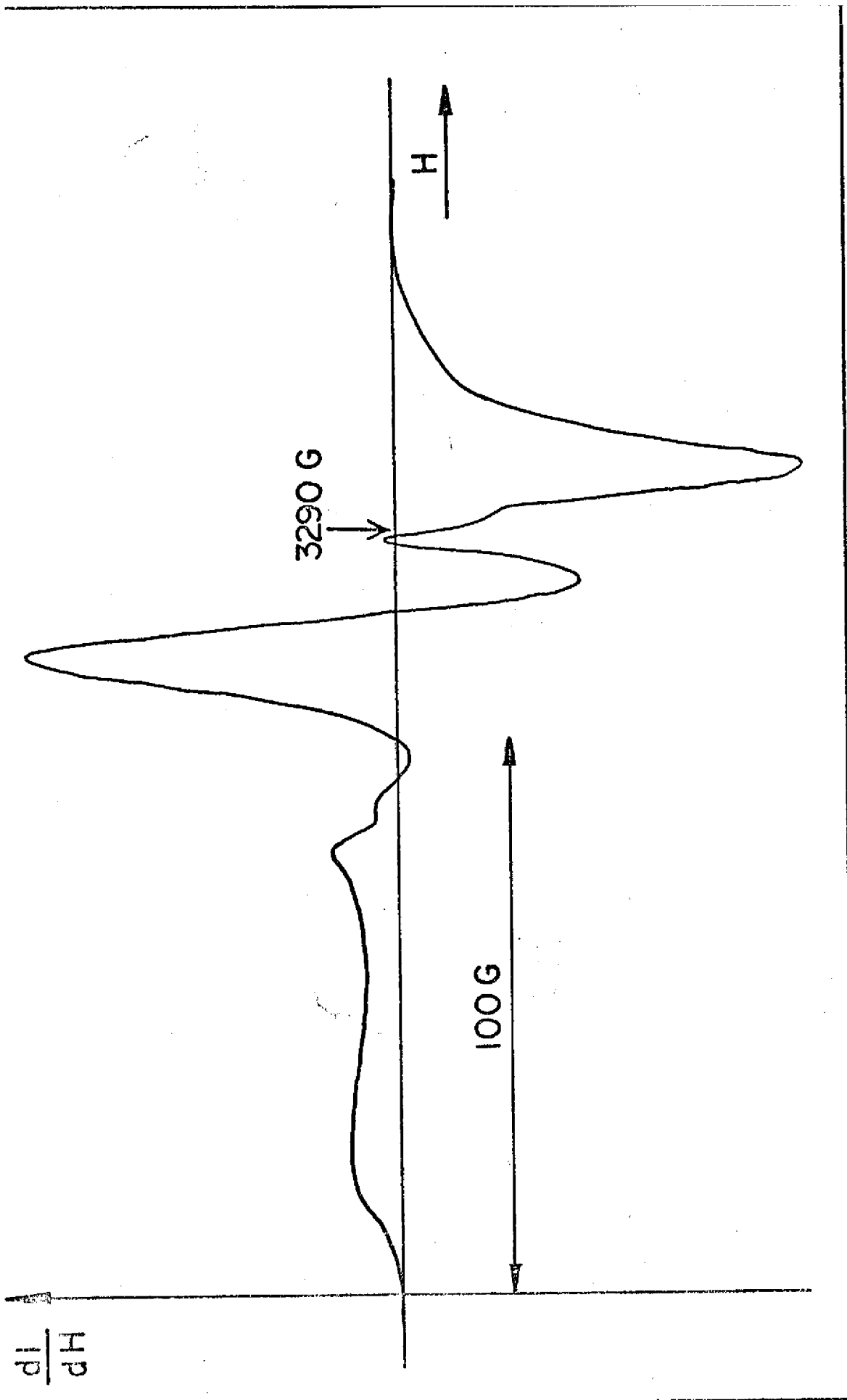


Figure 1

dubleto da proteína ' .

Dessa forma o efeito da radiação sobre as proteínas parece fazer-se sentir principalmente sobre dois dos aminoácidos que a compõem: a cisteína e a glicina. Atualmente apenas o radical (I) é bem conhecido, tanto na sua localização como na sua estrutura eletrônica, enquanto o radical (II) é ainda objeto de discussão (12)

No sentido de se esclarecer essa questão tem se estudado o efeito da radiação em monocristais de moléculas como a glicina e a glicil-glicina ~ . A irradiação a baixas temperaturas e o estudo do cristal em varias orientações dentro do campo magnético aplicado permite a observação de radicais intermediários, além da determinação de constantes de interação hiperfina anisotrópica. Evidencia-se nesses trabalhos que o dubleto da glicil-glicina deve-se principalmente ao radical (II) embora outros núcleos da molécula provoquem desdobramentos adicionais através de interações hiperfinas anisotrópicas.

Estes resultados entretanto não são suficientes para a explicação do dubleto das proteínas. O estudo de sistemas simples como dipeptídeos não pode ser simplesmente estendido a macromoléculas como as proteínas, embora sugira um método de abordagem ao problema que tem se revelado da mais alta produtividade.

3. Medidas Quantitativas por RPE

Além da identificação dos radicais detectados, a espectroscopia RPE permite a determinação quantitativa do número dos radicais presentes na amostra.

(17)

Rotblat e Simons estudaram a produção de radicais em função da dose absorvida numa série de cinco aminoácidos (glicina, a-alanina, valina, ácido aspártico, ácido glutâmico) irra

diados. Verificaram a existência de uma relação linear entre o número de radicais produzidos e a dose absorvida até uma certa dose (20 Mrad para a glicina, 200 Mrad para a α -alanina), acima da qual a produção manteve-se constante.

Esse comportamento pode ser descrito pela equação

$$N = \frac{i}{a} (1 - e^{-aD}) \quad (1)$$

onde N = número de radicais produzidos.

n = razão de produção dos radicais estáveis,

a = razão de recombinação por unidade de dose.

D = dose absorvida.

(9)

Zimmer e Muller indicam conclusões semelhantes partindo de estudos em vários aminoácidos e proteínas irradiados. A saturação na produção de radicais é verificada usualmente a doses acima de 10 rad, tanto em irradiações com raios γ quanto em irradiações com raios α .

Outro fato apontado é que a produção máxima, dada por

$$N_{\max} = \frac{i}{a} \quad (2)$$

situa-se em torno de 10^{18} spins por grama (nos extremos encontram-se a alanina com $2 \cdot 10^{17}$ e a glicilglicina com 10^{20}). Para a explicação dessa saturação foram formuladas hipóteses como a destruição dos radicais estáveis por radicais de vida curta ou a ocorrência de efeitos de aquecimento local que permitam a recombinação de radicais previamente aprisionados (17)

Restringindo-nos à parte não saturada da curva de produção dos radicais dada pela equação (1), podemos determinar um parâmetro quantitativo de grande importância nos estudos radiobiológicos. Este parâmetro é o valor G_i , definido como o número de radicais produzidos em 1 g do material por 100 eV de ener

gia absorvida. Trata-se de uma expressão quantitativa da radiosensibilidade do material, representando um método físico de abordagem a um problema que a radiobiologia costuma expressar através de medidas de inativação de enzimas, ou de frequência de mutação de células.

Ocorre porém que a determinação de G^{\wedge} é normalmente afetada por sérias imprecisões cujas origens remontam a duas fontes principais: uma é a dosimetria da radiação e outra é a própria medida da produção de radicais ⁽¹⁸⁾. Com relação a dosimetria, limitamo-nos a citar que em geral a medida da dose absorvida é feita de maneira indireta, a partir de medidas de exposição. Entram aqui procedimentos elaborados de cálculo dos fatores de conversão em função dos vários tipos de processos primários.

Nossa preocupação principal, relativa à determinação de G_r , concentra-se na medida do número de radicais produzidos.

Mostra-se que para o caso de um sistema de elétrons de semiparelhados a relação entre o número de spins e a potência absorvida pode ser descrita pela equação

$$P_{abs} = \frac{N g \mu_B H A f(v-v_0)}{3.6 \times 10^{21}} \quad (3)$$

onde P_{abs} é a potência absorvida, N o número de spins, g o fator de Lande do elétron livre, μ_B o magneton de Bohr, H o campo externo aplicado, A a amplitude da componente magnética da microonda de excitação, v a frequência dessa microonda, v_0 a frequência de ressonância, $f(v-v_0)$ a função de forma da curva de absorção e h , k e T tem o significado usual.

A equação (3) supõe que o campo magnético aplicado à amostra seja constante e que a energia da microonda varie, variando-se sua frequência v . A integral $\int P_{abs} dv$, que representa a área sob a curva de absorção vale

Portanto, essa área é proporcional ao número de spins presentes na amostra. Na prática a frequência da microonda é mantida constante e faz-se variar a intensidade do campo magnético aplicado à amostra. Dessa forma a integração é efetuada em H , sem que entretanto deixe de valer a proporcionalidade entre a área sob a curva de absorção e o número de centros de ressonância da amostra. Mais ainda, a equação (4) não é completa porque não leva em conta uma série de parâmetros instrumentais que afetam as medidas por RPE. Comentaremos esse problema adiante.

No momento pretendemos enunciar a maneira pela qual a proporcionalidade área-número de spins tem sido empregada, até o presente, para o cálculo do número de radicais da amostra. O método mais empregado é o das medidas comparativas. Contorna-se aqui o problema da dependência dos fatores instrumentais medindo-se a amostra desconhecida e uma amostra com número de spins previamente conhecido, nas mesmas condições experimentais. Calculam-se as respectivas áreas sob as curvas de absorção e, simplificando-se os fatores comuns, estabelece-se que

$$M_x = N_p \frac{A_x}{A_p} \quad (5)$$

onde os índices x e p referem-se à amostra em estudo e à amostra padrão, respectivamente; N é o número de spins e A é a área sob a curva de absorção.

Entretanto essas medidas quantitativas têm recebido reparos uma vez que discordâncias às vezes superiores a 50% foram encontradas comparando-se resultados obtidos por diferentes laboratórios^(2, 3, 19). Este fato foi atribuído a vários fatores: a preparação das amostras, escolha e determinação do número de spins da amostra padrão, cálculo das áreas, além de fatores inerentes

ao próprio equipamento RPE. De qualquer forma, a equação (5) apresenta uma simplificação extrema. Nem sempre é possível a medida do padrão e da amostra desconhecida nas mesmas condições, sendo necessária portanto uma avaliação precisa dos efeitos dos fatores instrumentais nas medidas. Além disso, mais recentemente Crippa e colaboradores^(18,20) chamaram a atenção para outra fonte de erro nesse cálculo: a dependência entre área e temperatura expressa na equação (4). Passaremos ao comentário desse problema.

4• Dependência da Área com a Temperatura

Na dedução da equação (4) está implícito que a amostra comporta-se de maneira tal que a sua susceptibilidade magnética obedece à lei de Curie do paramagnetismo:

$$\frac{C}{T}$$

onde C é a constante de Curie.

Entretanto essa suposição implica em que cada centro de ressonância não interage com os demais. Uma abordagem menos restritiva implica na adoção da hipótese de que o comportamento magnético dos radicais seja tal que a susceptibilidade magnética obedeça a uma lei de Curie-Weiss ou seja,

$$X = \frac{C}{T - \theta} \quad (6)$$

onde θ é a temperatura de Weiss do material, caso a interação entre os spins seja ferromagnética; se for antiferromagnética é a temperatura de Néel.

Nessa situação teríamos, em vez da equação (4), a relação

e a equação (4) representaria a situação em que $\theta = 0$ K.

Porem Crippa e colaboradores²² mostraram, a partir de medidas RPE a varias temperaturas, que amostras comumente utilizadas como padrão possuem valores θ diferentes de zero e bastante distintos entre si: -55 K para o DPPH, -5 K para uma amostra Varian Pitch e 107 K para lignite BM3. As consequências para o calculo de G_r são imediatas: o fato de ter-se desprezado, até o momento, o termo em $(T-\theta)$ levou a valores de G^{\wedge} que devem ser revistos. Em alguns casos o fator de correção devido à inclusão desse termo chegou a ser da ordem de 2 ou 3⁽²¹⁾

Outra observação dos autores citados acima refere-se ao fato de que nem sempre a relação (6) foi observada. Algumas substâncias como lisina, histidina, arginina, tirosina e outras, mostraram uma dependência entre susceptibilidade e temperatura que se desviou completamente da equação (6) impossibilitando inclusive a determinação de θ . Além das consequências que esse fato acarreta no calculo de G_r , levanta-se a questão sobre esse comportamento inesperado.

Essas anomalias têm sido tentativamente explicadas em termos da formação de aglomerados magnéticos pelos elétrons secundários. Os estudos sobre as interações "spin-spin" nessa situação podem servir de base para a explicação do fenômeno. Contudo nada ha de conclusivo até o momento.

5. Objetivos

Do que foi exposto podemos apresentar tres questões principais:

1. O sinal dubleto dar; nroteínas irradiadas e semelhan

te ao da glicil-glicina irradiada a temperatura ambiente. Pode ser atribuída, ao radical (II) sem que esteja ainda esclarecida a sua real localização.

2. Valores G , calculados até o presente sem o concurso da temperatura θ , tanto da substância pesquisada quanto do padrão podem estar afetados de sérios erros.

3. Verificam-se comportamentos anormais dos sinais RPE em função da temperatura para alguns radicais induzidos por radiação em aminoácidos, sem que haja explicação definitiva a respeito.

Dentro desse quadro pretendemos estudar, por RPE, efeitos de radiação X e γ nas seguintes substâncias:

glicina
glicil-glicina
triglicina
poliglicina
colágeno

Nessa série de substâncias temos um aminoácido, a glicina; uma série de peptídeos desse aminoácido, com número crescente de ligações peptídeas; uma proteína, o colágeno, que não contém enxofre. Elas deverão ser estudadas na forma policristalina e irradiadas a vácuo para evitar reações entre radicais livres induzidos e o oxigênio do ar.

Pretendemos:

a) determinação das constantes de desdobramento hiperfino anisotrópico. Essas constantes podem nos dar informações acerca do tipo de radical induzido nas diferentes substâncias.

b) estudo da relação entre área sob a curva de absorção e temperatura para investigação acerca das interações entre radicais.

c) determinação das temperaturas θ e dos valores G ,
corrigidos.

II - ASPECTOS TEÓRICOS DA RPE NO ESTUDO DE RADICAIS LIVRES

A espectroscopia RPE baseia-se no fenômeno de ressonância magnética. Nas condições de ressonância, um material que possui momento magnético resultante não nulo e que está em presença de um campo magnético externo, absorve energia de uma microonda de excitação. Essa absorção ressonante de energia é provocada pela interação entre o momento magnético do material e a componente de campo magnético da microonda. No caso dos radicais livres, a absorção de energia deve-se à presença dos elétrons desemparelhados.

1. Interação Hiperfina

Além do efeito do campo externo aplicado, o elétron desemparelhado pode sentir a presença de campos locais criados pelos núcleos vizinhos que possuam também momentos magnéticos diferentes de zero. Caso esse efeito seja provocado por um núcleo que tenha momento magnético I , ocorre um desdobramento de cada nível eletrônico em $(2I+1)$ níveis.

A aplicação da microonda na frequência de ressonância, induz transições entre os níveis eletrônicos, obedecendo as regras de seleção $\Delta M_s = +1$ e $\Delta M^I = 0$. Aqui M_s e M^I são números quânticos de spin do elétron e do núcleo, respectivamente. Dessa maneira, o espectro RPE da amostra vai constituir-se de $(2I+1)$ componentes.

Para melhor explanação dessa chamada interação hiperfina é conveniente determinarmos os níveis energéticos do elétron a partir da "hamiltoniana de spin".

1a. A hamiltoniana de spin

A hamiltoniana que descreve o elétron sob a ação de um campo magnético externo H e interagindo com um momento magnético nuclear é dada por

$$H = g\mu_B H \cdot S + S \cdot A \cdot I \quad (8)$$

onde μ_B = magneton de Bohr

S = operador de spin do elétron

I = operador de spin do núcleo

g = tensor de desdobramento espectroscópico

A = tensor de interação hiperfina.

O primeiro termo expressa a interação Zeeman do spin do elétron com o campo magnético. Com o momento angular orbital do elétron completamente abafado, o tensor g é isotropico e a contribuição desse termo pode ser escrita

$$H_z = g\mu_B H S_z \quad (9)$$

Os auto valores de S_z aplicado aos auto estados da hamiltoniana são $+\frac{1}{2}$ ou $-\frac{1}{2}$. Os níveis de energia, portanto, são

$$W_s = \frac{1}{2} g \mu_B H \quad (10a)$$

$$- \frac{1}{2} g \mu_B H \quad (10b)$$

O segundo termo da hamiltoniana expressa a interação entre elétron e núcleo e é escrito como soma de uma parte isotropica e outra anisotropica:

$$S \cdot A \cdot I = \left(\frac{1}{3} \text{Tr} A \right) S \cdot I + \text{anisotropic part}$$

sendo γ a razão giromagnética do núcleo, $\psi(0)$ a função de onda do elétron não emparelhado calculado no núcleo e r a distância média entre o elétron não emparelhado e o núcleo.

O primeiro termo dessa hamiltoniana representa a interação hiperfina isotropica e tem sentido apenas quando há uma possibilidade finita de se encontrar o elétron desemparelhado no núcleo com que interage, ou seja, $\langle i | \psi(0) | i \rangle \neq 0$.

O segundo termo da equação (11) dá a hamiltoniana um caráter de dependência espacial. É denominado interação hiperfina dipolar ou interação hiperfina anisotropica, originando-se da interação clássica entre dois dipolos magnéticos. Este termo pode ser escrito

$$H_0 = h \sum T I \quad (12)$$

onde T é um tensor de segunda ordem com traço nulo.

Nessa notação o termo isotropico é escrito

$$H_{iso} = h A_0 \sum I \quad (13)$$

onde A_0 é a chamada constante de acoplamento hiperfino.

A hamiltoniana hiperfina total é representada pela soma das equações (12) e (13). No sistema em que T é diagonal, ou seja, no sistema de eixos principais de T , temos:

$$H_{hf} = h \sum T I + h A_0 \sum I = h S A_0 I = h \hat{S} \begin{pmatrix} T_{xx} + A_0 & 0 & 0 \\ 0 & T_{yy} + A_0 & 0 \\ 0 & 0 & T_{zz} + A_0 \end{pmatrix} \hat{I} \quad (14)$$

Nos casos em que o material que possui o elétron desemparelhado encontra-se em uma solução, ou quando a amostra é poli

crystalina, a média das interações anisotrópicas anula o tensor T e assim operamos apenas com a hamiltoniana da equação (13).

Vamos desenvolver os cálculos para o caso da interação isotrópica com o núcleo do átomo de hidrogênio ou seja, com um próton.

1b. Interação com o núcleo do átomo de hidrogênio

O spin do próton é $1/2$ e assim os estados de spin possíveis para o sistema elétron-próton são:

$$|m_s = \pm 1/2, m_I = \pm 1/2\rangle \quad \text{e} \quad |m_s = \pm 1/2, m_I = \mp 1/2\rangle$$

A equação (13) pode ser expandida em

$$\langle \text{iso} \cdot \mathbf{h} \cdot \mathbf{0} \cdot \langle \mathbf{V}, \mathbf{x}^T \mathbf{x} + \mathbf{y} \rangle \quad (15)$$

Em campos magnéticos elevados, os termos em x e y têm efeito desprezível. A hamiltoniana completa fica

$$H = g\beta H S_z + h A_0 S_z I_z \quad (16)$$

Aplicando-a aos quatro estados de spin obtemos os seguintes níveis de energia:

$$E_{1/2, 1/2} = \mathbf{T}^{g\beta H + \mathbf{T}^{hA_0}} \quad (17a)$$

$$E_{1/2, -1/2} = \mathbf{T}^{-g\beta H - \mathbf{T}^{hA_0}} \quad (17b)$$

$$-1/2, 1/2 = -\mathbf{T}^{\wedge} - \mathbf{T}^{hA_0} \quad (17c)$$

$$E_{-1/2, -1/2} = \mathbf{T}^{g\beta H + \mathbf{T}^{hA_0}} \quad (17d)$$

Devido às regras de seleção $\Delta M_s = \pm 1$ e $\Delta M_I = 0$, duas transições são possíveis:

$$AE_1 = E_{1/2} - E_{1/2} = gBH + \frac{hA_n}{2} \quad (18a)$$

$$AE_2 = E_{-1/2} - E_{-1/2} = ggH - \frac{hA_n}{2} \quad (18b)$$

Na espectroscopia RPE a frequência da microonda de excitação, $h\nu_0$, mantém-se constante, fazendo-se variar o campo H. Assim, devemos encontrar ressonâncias em dois valores de campo magnético:

$$h\nu_0 = gB \pm \frac{hA_n}{2}$$

$$H_c = H_0 \pm \frac{hA_n}{g} \quad (19)$$

onde $A^* = hAg/gg$ é a chamada constante de desdobramento hiperfino e H^0 é o campo de ressonância sem a interação hiperfina.

Da mesma forma

$$AE_2 = h\nu_0 = ggH_2 - \frac{hA_n}{2} \quad (20)$$

$$H_2 = H^0 + \frac{hA_n}{g}$$

Assim sendo, na interação do elétron com um próton observam-se dois sinais de ressonância nos valores de campo H^0 e H_2 , sendo a separação entre os sinais dada por

$$\Delta H = H_2 - H^0 = \frac{hA_n}{g} \quad (21)$$

sendo $A_n = \frac{hA_n}{g} = \frac{8}{3} \sum_i |J_i(0)|^2$

2. Comportamento Paramagnético dos Radicais Livres

Vários radicais livres orgânicos, estáveis e no estado

solido têm sido estudados do ponto de vista da interação entre
(22-24)

os spins não emparelhados

Medidas por RPE mostram que as larguras de linha dos espectros de vários radicais são bastante estreitas. Isso foi atribuído a interações de troca entre spins não emparelhados, que originam o chamado estreitamento por troca. Essa suposição é reforçada por medidas de susceptibilidade magnética a várias temperaturas em que se observa a relação

$$\chi = \frac{C}{T - \theta} \quad (22)$$

onde C é a constante e θ o ponto de Curie.

A espectroscopia RPE oferece a possibilidade de uma observação indireta da dependência entre susceptibilidade e temperatura.

Considerando a susceptibilidade na sua forma complexa

$$\chi = \chi' - i\chi''$$

temos que a relação entre a potência absorvida e a susceptibilidade χ'' dada por

$$P_{abs} = \omega \chi'' H_1^2$$

onde ω é a frequência da microonda e H_1 a amplitude do campo magnético de modulação.

Daí segue-se que a área sob a curva de absorção vale

$$A = \frac{2}{\pi} \int_{-\infty}^{\infty} \chi'' dH \quad (23)$$

onde integramos sobre os valores do campo externo H . Comparando essa expressão com a relação entre a susceptibilidade χ e a absorção ressonante (26)

$$\chi = \frac{1}{T} \int_{-\infty}^{\infty} \chi'' dH \quad (24)$$

verificamos a existência de uma proporcionalidade entre χ

área A.

Incluindo também fatores instrumentais do espectrômetro, podemos definir uma constante de proporcionalidade k e escrever, simplesmente,

$$A = k \cdot X$$

Assim, acompanhando a dependência entre essa área e a temperatura, verificamos indiretamente o comportamento da susceptibilidade magnética. Ou seja, podemos escrever, em lugar de (22), a equação

$$A = \frac{K}{T - \theta}$$

ou, ainda,

$$\frac{1}{A} = \frac{1}{K} (T - \theta) \quad (25)$$

Vemos então que a relação entre o inverso da área e a temperatura segue a equação de uma reta. A intersecção dessa reta com o eixo $1/A$ corresponde à temperatura θ de Curie do radical livre em estudo.

3. O Parâmetro G_r ,

Como foi dito anteriormente, define-se o parâmetro G_r de uma substância como o número de radicais livres induzidos, em 1g da mesma, por 100 eV de energia absorvida.

Como consequência dessa definição temos que o valor G_r pode ser diretamente obtido da curva de produção de radicais livres (em 1 g do material) em função da dose absorvida. Duas precauções são necessárias: a dose absorvida deve estar expressa em unidades de 100 eV e devemos nos restringir à parte não saturada dessa curva a que nos referimos no capítulo I. Guarda

das essas ressalvas, o valor G_p será simplesmente o coeficiente angular da reta que representa a parte não saturada da curva.

Vemos aqui que para a determinação de G_p concorrem duas grandezas: o número de radicais induzidos pela radiação em lg da amostra e a correspondente dose de absorção. Passaremos à descrição do método de obtenção da primeira dessas grandezas e trataremos do problema da dose absorvida no capítulo seguinte.

3a. Determinação do número de spins

Ha duas maneiras pelas quais pode-se obter o número de spins de uma amostra através da espectroscopia RPE: a medida absoluta e a medida por comparação com uma amostra padrão.

No método de medida absoluta é necessário o conhecimento do valor de vários parâmetros do espectrômetro. Yariv e Gordon⁽²⁷⁾ apresentam um método pelo qual essa medida é feita através de determinações do coeficiente de reflexão da cavidade, da frequência de ressonância, do fator Q da cavidade, do volume da amostra. É também necessário um conhecimento a priori da forma da linha e das componentes do tensor g . A alternativa apresentada quando não é aplicável a medida absoluta é o método comparativo.

3b. Método comparativo

É o método mais comumente empregado na espectroscopia RPE, tendo sido por nós adotado. Parte da relação básica entre o número de centros de ressonância e a área sob a curva de absorção mostrada na equação (4), acrescida dos termos referentes ao instrumento. Medindo as amostras desconhecidas e padrão, e cal

culando as respectivas áreas sob as curvas de absorção, podemos escrever a seguinte equação geral (28)

$$j_x = \frac{N}{P} \frac{J_s l}{S_x} \frac{t^{s(s+1)} \hat{P}}{(s(s+1))_x} \frac{/_y \setminus IJL.)}{\setminus n /x} \frac{V v /p}{(T-e)_p} K$$

$$\cdot \frac{V}{V_x} \frac{Q}{x} \frac{f}{x} \frac{H^2}{H_x} \frac{H}{m_x} \frac{F v / P A}{\frac{F}{x} \frac{v}{p^*} / \sim \frac{P}{x} \frac{A}{p}} \quad (26)$$

onde empregamos (T-8) em lugar de T pelas razões expostas no parágrafo anterior. Os índices p e x referem-se, respectivamente, à amostra padrão e à desconhecida. Os demais fatores são:

N = número de spins

g = fator de Lande

S = número quântico de spin

v = volume da amostra

n = fator de "filling"

K = constante do cristal detetor

V = voltagem do cristal detetor

Q = fator de qualidade da cavidade com a amostra

H = razão de varredura do campo

H_s = amplitude de modulação

f = $-\frac{i}{v} - \frac{1}{m} |H_{s,jv}|$ » correção para a não homogeneidade do campo de modulação

po de modulação

F = fator de amplificação do sistema de detecção

v = frequência da microonda

P = potência da microonda

A = área sob a curva de absorção.

Dentre esses fatores, alguns podem ser imediatamente simplificados. O volume padronizado das amostras implica na supressão dos termos em v e n. Como trabalhamos com material sólido

do, de baixa constante dielétrica e, portanto, sofrendo interação desprezível com as componentes de campo elétrico da micro-onda, podemos eliminar o fator f e também o termo em Q . Além disso, se as duas amostras forem radicais livres, a equação (26) independe de g e S , com que podemos escrever

$$N = N_p \frac{(T-8)_p}{(T-6)_p} \cdot \frac{(KV)_x H^2}{(KV)_x H^2} - \frac{H_{n_x}, F v / T h}{H_{n_x} F_x v_p / P_x} \frac{E}{A_p} \quad (27)$$

A relação entre N_x e N_p fica agora dependendo de dois tipos de variáveis, além das áreas A_x e A_p : os termos que dependem de fatores instrumentais e o termo (T-9). Este último aparece, como dissemos, da suposição de que a amostra obedece à lei de Curie-Weiss do paramagnetismo. Ele tem sido deixado de lado nas medidas quantitativas por RPE com as hipóteses de que $\theta=0$ ou $T \gg \theta$. Acreditamos que essa simplificação conduz a erros sérios de maneira que nos propusemos a avaliar o efeito da sua inclusão do método comparativo.

Os parâmetros instrumentais restantes são controlados no decorrer da experiência e suas presenças na equação (27) enfatizam a necessidade de um estudo dos fatores instrumentais que afetam as medidas quantitativas por RPE.

3c. Influência dos parâmetros instrumentais

A dependência que N apresenta dos fatores v , KV e H pode ser eliminada a partir das seguintes considerações:

a) a frequência v , da microonda, é uma característica do espectrômetro que inter-relaciona-se com a geometria da cavidade e do guia de ondas (apêndice 1). Em nossas medidas seu valor situou-se em torno de 9.30 ± 0.02 GHz, sendo esse valor

mantido constante, durante o registro do espectro, através de um controle automático de frequência.

b) os parâmetros referentes ao cristal são ajustados na operação de sintonia entre a microonda incidente e a refletida pela cavidade. Consideramos que os mesmos podem ser cancelados desde que as medidas da amostra padrão e da desconhecida efetuem-se nas condições ótimas de sintonia.

c) se o produto entre a constante de tempo do circuito e a razão de varredura do campo, H , não satisfizer a condição de ser muito menor que 1, poderá haver distorção do espectro (diminuição da amplitude do sinal, alargamento da linha, deslocamento da posição de mudança de sinal da derivada). A razão de varredura é expressa em unidades de largura de linha por unidade de tempo. Pudemos padronizar uma razão de varredura cumprindo a exigência acima e eliminá-la da equação (27).

Com isso podemos escrever que

$$N_x = N_p \frac{(T-8)}{p} \frac{(H \cdot F / \pi P)}{m} \frac{A}{x} \frac{-x}{p} \quad (28)$$

Dada a diversidade de concentrações de spins das diferentes amostras, os espectros das mesmas foram obtidos a diferentes combinações dos três parâmetros restantes. Resta então verificar o comportamento do espectrômetro em relação aos mesmos.

Em princípio a área sob a curva de absorção é proporcional ao produto

m

Procuraremos verificar em nosso trabalho se essa proporcionalidade é seguida. Especial atenção deve ser dedicada ao fator potência da microonda. Ela mede a intensidade da microonda que é enviada à amostra e é justamente a absorção dessa po

tência, por parte da amostra, que dá o sinal detectado por RPE. Ocorre que essa absorção, na condição de ressonância, é proporcional à diferença de população entre os estados possíveis para o elétron. Um valor muito grande da potência de microonda pode aumentar a população do estado superior, diminuindo a diferença de populações, a potência absorvida e, conseqüentemente, o sinal observado. Esse fenômeno é conhecido como saturação.

Nos detectores utilizam-se normalmente cristais em que a corrente retificada é proporcional à raiz quadrada da potência. Dessa forma, a área sob a curva de absorção é proporcional a \sqrt{P} até a potência de saturação. É essencial que as medidas em RPE sejam feitas abaixo da potência de saturação se se pretende a determinação quantitativa do número de spins.

Testamos nosso espectrômetro fazendo uma calibração do mesmo a partir do cálculo da área em função dos três parâmetros acima, em amostras de DPPH.

III - DOSE ABSORVIDA

Ha vários mecanismos através dos quais um foton de raio X ou raio γ pode interagir com a matéria: interação com o átomo via efeito fotoelétrico; interação com elétron do átomo por efeito Compton ou produção de pares; interação com o núcleo por produção de pares, espalhamento elástico ressonante, fotodesintegração ou produção de mesons. As probabilidades para cada um desses processos independentes e competitivos podem ser expressos pelas seções de choque de colisões por átomo, por elétron ou por núcleo no material absorvedor³⁰

Por outro lado, estamos interessados na energia que é absorvida pelo material. Considera-se que essa energia transferida à matéria e aquela que aparece no material como ionização, excitação, aumento da energia química, energia da rede, etc, excluindo-se aquela que resulta em processos nucleares.

A absorção, portanto, constitui-se num processo de duas etapas: primeiro há a conversão da energia do foton em energia cinética dos elétrons secundários e dos pares de elétrons; segundo, ocorre a dissipação dessa energia cinética principalmente por excitação e ionização dos átomos do meio e, em menor escala, por "bremsstrahlung" de colisões de elétrons secundários com núcleos atômicos no absorvedor. Expressa-se essa absorção pelo coeficiente de absorção μ_a em unidades de massa, é escrito

$$\mu_a = \frac{\mu_{pe}}{\rho} + \frac{\mu_{ce}}{\rho} + \frac{\mu_{np}}{\rho} + \frac{\mu_{nn}}{\rho} \quad (29)$$

onde μ_{abs} é o coeficiente de absorção linear (seção de choque total por átomo, multiplicado pelo número de átomos em 1 cm do absorvedor)

ρ é densidade do meio
 σ_j , T e K são seções de choque das interações Compton, fotoelétrica e produção de pares, respectivamente
 f_1 , f_2 e f_3 são fatores adimensionais que representam as frações de energia do foton incidente que são absorvidas por cada tipo de interação.

Para a medida da energia absorvida pela matéria, a ICRU (International Commission of Radiological Units and Measurements) estabeleceu a seguinte convenção (31):

"Dose absorvida de qualquer radiação ionizante é a quantidade de energia que passa para a matéria por partículas ionizantes por unidade de massa do material irradiado no local de interesse. Deve ser expresso em rads. 0 rad é a unidade de dose absorvida e vale 100 ergs por grama".

Ocorre porém que normalmente a dose absorvida não é medida diretamente, mas sim calculada a partir da exposição. Também aqui recorreremos a ICRU que estabeleceu o roentgen como unidade de exposição, definindo o roentgen como:

"Quantidade de radiação X ou γ tal que a emissão corpuscular associada (elétrons gerados por interações de ftons com a matéria) por 0.001293 g de ar (1 cm de ar seco a STP) produz, no ar, íons carregando 1 esu de eletricidade de cada sinal".

Se um ponto no material é circundado por matéria homogênea e exposta uniformemente à radiação até uma distância maior que o alcance máximo dos elétrons secundários, ele encontra-se no chamado equilíbrio carga partícula. Nessa situação, a dose absorvida D , no ponto considerado, relaciona-se com a exposição X através de

$$D = \frac{W}{(e^-/p)_{ar}} (e^-/p)_m X \quad (30)$$

onde W - energia média depositada no ar por par de íons formados.

e = carga eletrônica.

$(\frac{\gamma \text{en}}{\rho})_m$ e $(\frac{\gamma \text{en}}{\rho})^{\wedge}$ = coeficiente de absorção massa-energia para o meio e para o ar, respectivamente.

De acordo com as convenções da ICRU, a dose absorvida é expressa em rads, a exposição em roentgens e γ/e vale 33.7 joules/Coulomb. Dessa maneira reescrevemos a equação (30):

$$D(\text{rad}) = 0.869 \frac{(\frac{\gamma \text{en}}{\rho})_m}{\langle \frac{\gamma \text{en}}{\rho} \rangle_{\text{ar}}} \cdot X \text{ (roentgen)} \quad (31)$$

Os coeficientes $\frac{\gamma \text{en}}{\rho}$ são obtidos dos coeficientes da dos na equação (29). Inicialmente essa equação é recalculada levando-se em conta a energia cinética transferida a partículas carregadas em uma região infinitesimal da amostra, obtendo-se o coeficiente de transferência de energia por massa k/ρ :

$$\frac{Mv}{\rho} = \frac{\sigma_{t1}}{\rho} + \frac{T}{\rho} \left(1 - \frac{B}{hv_0}\right) + \frac{K}{\rho} \left(1 - \frac{2m_e c^2}{hv_0}\right) \quad (32)$$

onde \hat{a} = seção de choque para absorção Compton

B_0 = energia de ligação do elétron ao átomo

$\langle \gamma \rangle$ = produção média de fluorescência

hv_0 = energia do foton

Corrigindo esse coeficiente k/ρ para perdas por "bremsstrahlung" pelos elétrons secundários obtemos o "coeficiente de absorção de energia por massa" empregado na equação (31).

Os valores deste ultimo coeficiente encontram-se tabelados para vários elementos, em função da energia da radiação. No cálculo do coeficiente para o material em estudo, de

termina-se inicialmente a porcentagem em peso de cada elemento presente na substância. Multiplica-se a seguir esse valor pelo coeficiente $\frac{en}{p}$ do elemento correspondente. Por fim somam-se as contribuições de todos os elementos obtendo-se assim o coeficiente do material. Os cálculos estão incluídos no capítulo V.

IV - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

1. Amostra Padrão

Alger^{^^} relaciona uma série de substâncias paramagnéticas cujas concentrações de spins podem ser conhecidas por métodos como titração, pesagem, absorção ótica, etc, e que podem servir como padrão para medidas quantitativas em RPE. Entre elas temos $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, O_2 , DPPH. Esta última substância, o radical livre α , α -difenil (3-picril hidrazil, (DPPH), tem sido a de emprego mais frequente e foi a que adotamos como amostra padrão.

A determinação do número de spins numa amostra de DPPH pode ser feita por simples pesagem. Em média cada molécula da substância possui um elétron desemparelhado localizado no átomo de nitrogênio associado ao radical picril. Com peso molecular 394, 1 mol ou 394 g de DPPH, devera conter cerca de $6.023 \cdot 10^{23}$ spins. Assim, basta 1 mg do material para se ter uma amostra com cerca de 10^{17} spins, valor comumente detectável em RPE.

1a. Preparação da amostra padrão

O número de spins detectáveis por RPE, assim como o número de radicais induzidos por radiação, varia muito, situando-se frequentemente entre 10^{15} e 10^{17} spins. Preparamos diversas amostras de DPPH contendo entre 10^{15} e 10^{17} spins.

A quantidade de DPPH necessária para esse número de spins é da ordem de centésimos de mg o que apresenta 2 problemas: o da pesagem de quantidades dessa ordem de grandeza e o volume reduzido que ocupariam as amostras porventura pesadas, in

validando algumas simplificações da equação (26). Recorremos então à distribuição de DPPH em um meio inerte fazendo a sua diluição em benzeno. De maneira geral o procedimento adotado foi

$$(33)$$

o descrito por Pontuschka

Utilizamos o DPPH cedido pela JEOL LTD, usando-o sem nenhuma purificação adicional. Pesamos 13.1 mg do DPPH com precisão de 0.05 mg em uma balança Metler H35. O número de spins presente nessa massa de DPPH é, portanto, $<2.0 \pm 0.007) \times 10^{19}$ spins. Esse material foi dissolvido, dentro de um balão volumétrico, em 10 ml de benzeno P.A. obtendo-se assim uma solução com concentração de 2×10^{16} spins/ml.

Pipetamos a seguir 0.1 ± 0.01 ml dessa solução sobre uma película de polietileno de 0.038 mm de espessura e aproximadamente 20 mm de diâmetro. Após evaporação do solvente restou sobre o polietileno, DPPH recristalizado em quantidade tal que continha $(2 \pm 0.1) \times 10^6$ spins. Essa película de polietileno foi dobrada e introduzida em um tubo de teflon em cerca de 1.8 mm de diâmetro interno, 2.7 mm de diâmetro externo e 15 mm de comprimento que, colocado em um tubo porta-amostra, ocupou um volume próximo do volume das amostras em estudo.

Por diluições sucessivas da solução inicial pudemos preparar soluções menos concentradas a partir das quais obtivemos amostras com menor número de spins. Na tabela abaixo relacionamos o número de spins das amostras preparadas e os erros avaliados na preparação:

amostra	numero de spins
A	(2 + 0..1) x 10 ¹⁷
B	(1 ± 0..1) x 10 ¹⁷
C	(5 + 0.,2) x 10 ¹⁶
D	(4 + 0.,2) x 10 ¹⁶
E	(2.5 + 0..1) x 10 ¹⁶
F	(2.0 + 0..1) x 10 ¹⁶
G	(2.5 + 0.,5) x 10 ¹⁵
H	(1.0 + 0.,5) x 10 ¹⁵

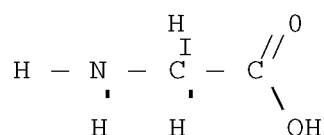
ib. Medidas com a amostra padrão

Registramos os espectros das varias amostras utilizando o espectrômetro **JEOL JESME-3** cujas especificações estão descritas no apêndice **I**. Cada urna das amostras foi medida a diferentes condições de potência, amplitude de modulação e ganho de amplificação, tanto para nos assegurarmos de que operamos abaixo da potência de saturação, como para testarmos as suposições sobre a dependência entre número de spins na amostra e esses parâmetros. Os resultados serão apresentados no capítulo V.

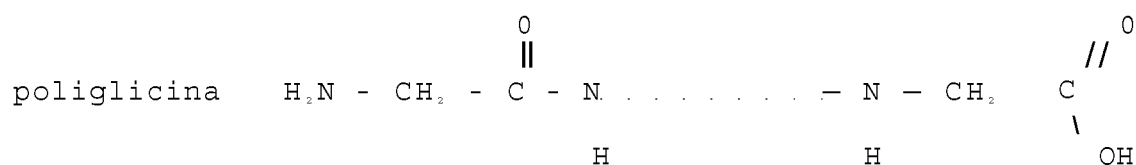
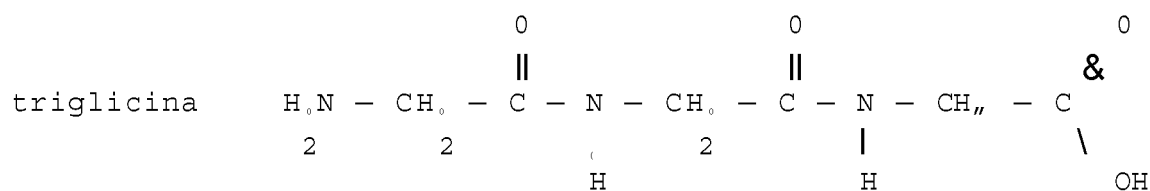
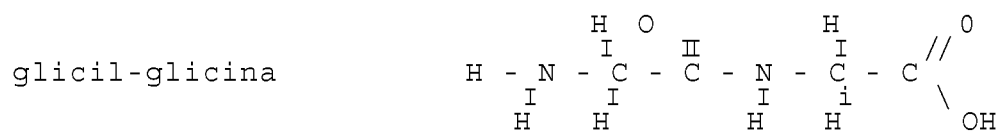
2• Amostras de Peptídeos e o Colágeno

O material que estudamos constou de

a) o aminoácido glicina



b) uma série de peptídeos contendo glicina:



c) uma proteína, o colágeno, que não contém enxofre.

Essas substâncias foram adquiridas da Sigma Chemical Co. e utilizadas sem nenhuma purificação adicional. Encontravam-se todas na forma policristalina, à exceção do colágeno que apresentava-se na forma de fibras.

2a. Preparação das amostras

Inicialmente as substâncias, no estado sólido e secas, foram compactadas. Para tanto quantidades da ordem de 200 mg do material foram trituradas em um almofariz de ágata, colocadas em um molde cilíndrico fabricado pela Perkin-Elmer e comprimidas com uma prensa hidráulica Carver a pressões de até 17 kg/mm (fig. 2a).

A pastilha obtida, com cerca de 1 mm de espessura e 13 mm de diâmetro foi partida em alguns pedaços que, colocados no tubo porta amostras completavam uma coluna de cerca de 15 mm de altura e 3 mm de diâmetro (fig. 2b). A quantidade do material efetivamente utilizado foi pesada em uma balança Metler H35. Essa massa situou-se em média entre 120 mg e 150 mg.

O tubo contendo a amostra foi em seguida submetido ao vácuo de um sistema contendo uma bomba mecânica e uma bomba de difusão. Registramos vacuo abaixo de 10 mm de Hg sendo o tubo, nessa ocasião, selado. A amostra nessas condições estava pronta para irradiação e medição.

2b. Irradiação e medidas

O tubo porta-amostras consta de duas partes, construídas com materiais diferentes. O terço inferior, de cerca de 10 cm, e feito de quartzo e a parte que, contendo a amostra, e introduzida na cavidade de ressonância. O restante do tubo é construído em pirex.

Sabe-se que a irradiação do quartzo cria centros paramagneticos e portanto induz o aparecimento de um sinal detetavel por RPE. Como o material foi irradiado no próprio tubo porta-amostras, procuramos evitar a irradiação da parte em quartzo, expondo a radiação apenas a parte em pirex onde a amostra foi posicionada.

No caso da irradiação com raios γ utilizamos a fonte ^{137}Cs do Instituto de Biociencias e a blindagem da parte do tubo porta-amostras em quartzo foi feita com tijolo de chumbo (fig. 3). Essa fonte emite raios γ com energia 0.662 MeV. Os valores de exposição foram-nos fornecidos pela Coordenadoria de Proteção Radiológica e Dosimetria do Instituto de Energia Atomica.

Para irradiação com raios X utilizamos a fonte GE modelo F, tipo 4, da Coordenadoria de Ciência e Tecnologia dos Materiais do IEA e a blindagem da parte em quartzo foi feita com latão (fig. 4). Essa fonte foi calibrada também pela Coordenadoria de Proteção Radiológica e Dosimetria, em 1974. Operada com

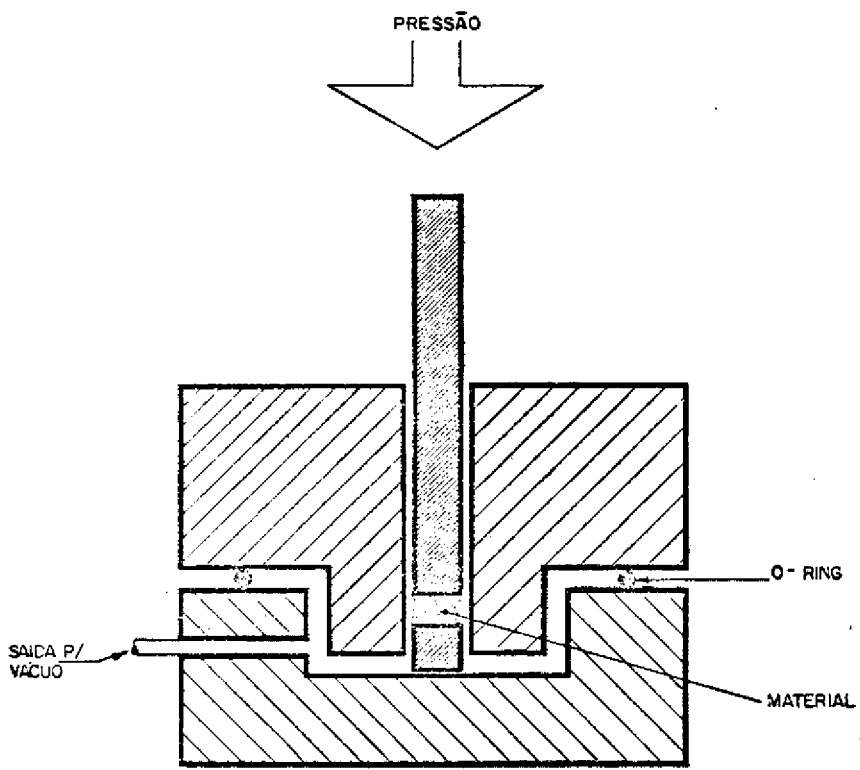


FIGURA 2a

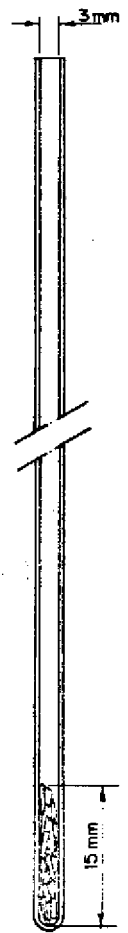


FIGURA 2b

MESA

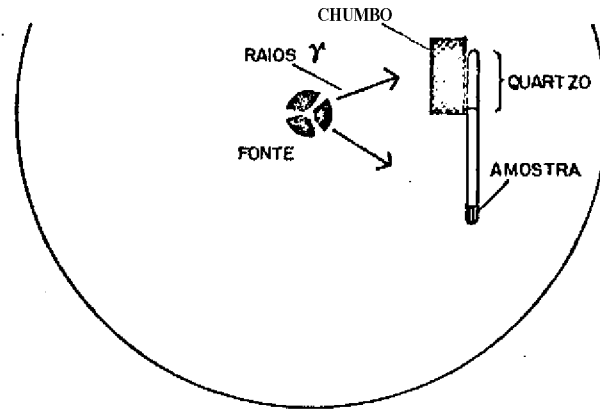


FIGURA 3

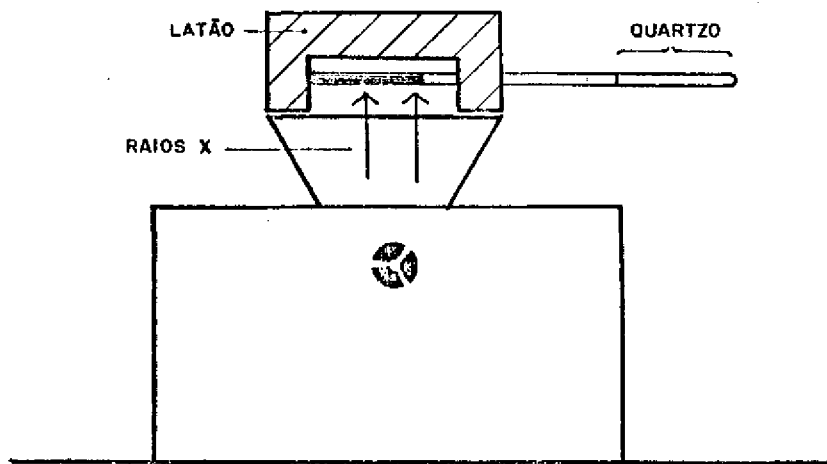


FIGURA 4

corrente de 10 mA e a 65 kV, produz exposição de 18^r/seg, com feixe de energia média de 0.035 MeV.

As amostras foram submetidas a varios valores de exposição a radiação X ou γ , situados entre 20×10^3 e 400×10^3 roentgen. Após cada irradiação a amostra foi medida, à temperatura ambiente, no espectrómetro RPE descrito no apêndice 1.

As medidas' com variação de temperatura foram efetuadas com o concurso do "adaptador para temperatura variável JES-UCT-2AX" e do "controlador de temperatura JES-VT-3A". Estes equipamentos adicionais, descritos também no apêndice 1, permitiram a obtenção de espectros das amostras a temperaturas entre -160°C e temperatura ambiente.

V - CALIBRAÇÃO DO ESPECTRÔMETRO

Apresentamos os resultados referentes as medidas das amostras de DPPH, efetuadas a temperatura ambiente e sob diversas condições de ganho de amplificação, largura de modulação e potência.

A escolha dos valores desses parâmetros obedeceu aos seguintes critérios:

a) o ganho de amplificação foi escolhido de maneira que o sinal, por um lado, não exceda o fundo de escala do registrado e, por outro lado, não seja nem demasiadamente reduzido, nem confundido com o nível de ruído da medida.

b) a largura de modulação foi sempre menor que a largura de linha do sinal. Nessa situação a forma da curva não se modifica e a área sob a curva de absorção deve ser proporcional ao valor da modulação.

c) os valores da potência de microonda estiveram entre 0.6 mW e 4.0 mW. Valores elevados de potência poderiam resultar destituídos de sentido nas medidas comparativas, devido à saturação, tanto do DPPH quanto das demais amostras. Procuramos verificar se nesse intervalo de potência ocorria saturação da amostra padrão.

Mostramos na figura um espectro típico do DPPH, referente à amostra DPPH A. Como nos espectros das demais amostras de DPPH, verificamos uma estrutura hiperfina de cinco linhas, resultante da diluição do DPPH em benzeno. A separação entre o máximo e o mínimo da derivada do sinal central é de 8.0 G.

De cada espectro obtido calculamos a área sob a curva de absorção segundo o método que se segue, e verificamos então

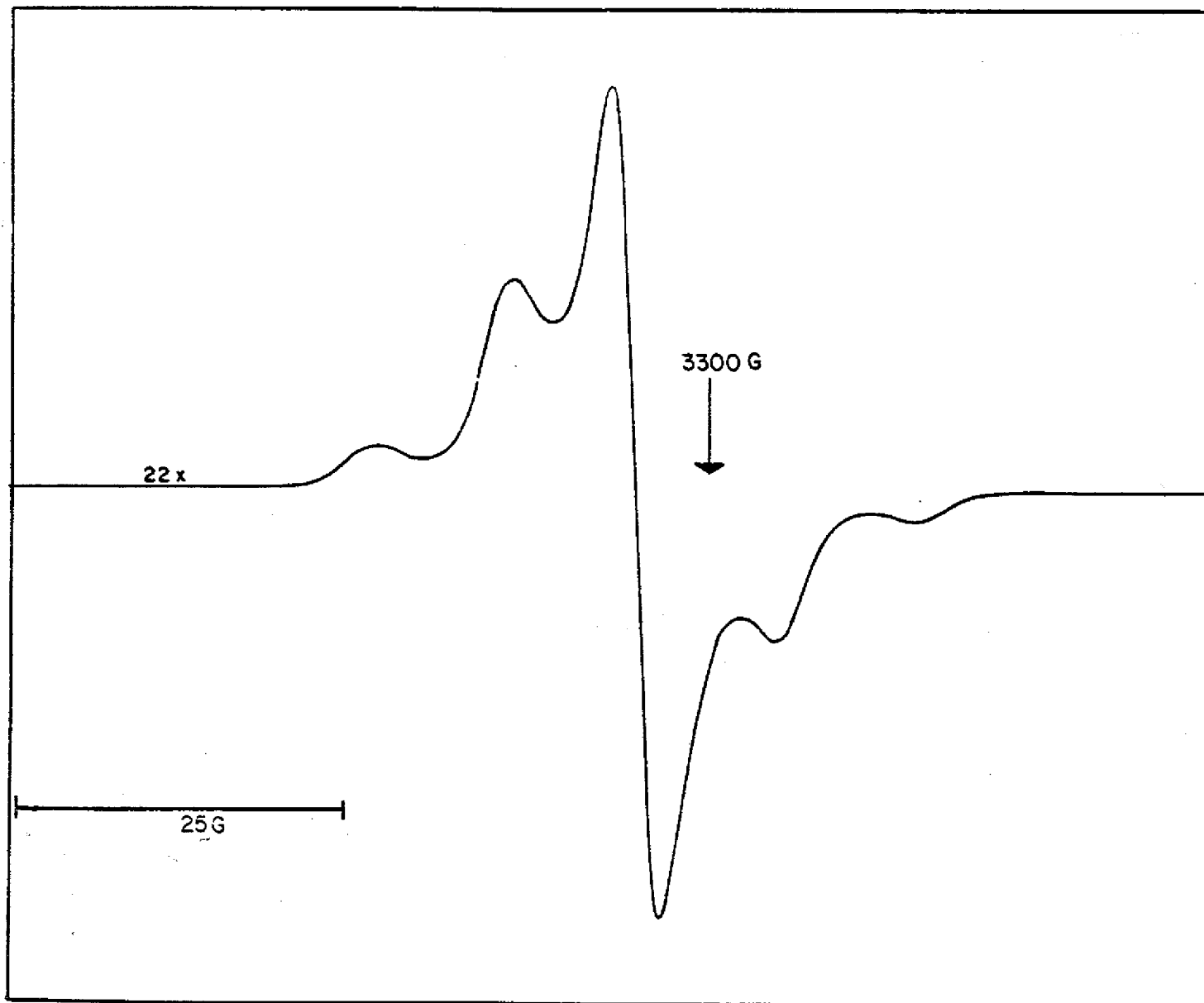


FIGURA 5

a relação entre a área e os parâmetros acima.

1. Cálculo da Área sob a Curva de Absorção

Como o espectro que obtemos é uma aproximação da primeira derivada da curva de absorção, para o cálculo da área sob essa curva é necessário fazer uma dupla integração. Utilizamos (34)

para isso o método numérico desenvolvido por Wyard

Tomamos como ponto de partida o espectro RPE na forma em que é registrado no aparelho. Dividimos o intervalo de campo magnético em que aparece o sinal em n intervalos menores, cada um com comprimento h . Determinamos em seguida, para cada intervalo, o valor y da ordenada no centro do mesmo.

Após uma primeira integração obtemos um polígono que se aproxima da curva de absorção e calculamos, numa segunda integração, a área sob esse polígono. Essa área é uma aproximação da dupla integração desejada e vale

$$A = \frac{1}{2} h^2 \sum_{r=1}^{n-1} (2n - 2r + 1) y_r$$

onde r designa o r -ésimo intervalo em que foi dividido o campo magnético.

Aplicando a esse valor o fator de correção $\frac{h^2}{2} \sum_{r=1}^{n-1} \frac{y_r}{r}$

devido a um possível deslocamento da linha de base durante a medida, ficamos com a seguinte equação

$$A = \frac{h^2}{2} \sum_{r=1}^{n-1} (n - 2r + 1) y_r \quad (33)$$

onde supôs-se que houvesse uma razão constante de deslocamento da linha de base.

Empregamos essa equação (33) para a preparação de um pro

grama de computador com o qual calculamos as áreas sob as curvas de absorção de nossas amostras. O erro médio na utilização dessa formula é de 5% quando o intervalo h é um quarto da largura de linha. Esse erro diminui com a diminuição de h .

2. Relação Área-Parâmetros Instrumentais

2a. Área e potencia

A figura 6 ilustra a dependência entre a área e a raiz quadrada da potência. As áreas são expressas em unidades arbitrárias derivadas das dimensões das subdivisões do papel em que o espectro é registrado. Fica evidenciada, na figura, a proporcionalidade entre as duas grandezas, independentemente do número de spins das amostras. Os resultados apresentados referem-se a tres preparações de DPPH descritas no capítulo IV, denominadas C, D e F com número de spins, respectivamente 5×10^{16} , $2,5 \times 10^{16}$ e 2×10^{16} , conforme indicamos na tabela 2.

Os espectros foram obtidos a valores fixos de modulação (2,0 Gauss) e de fator de amplificação (18,36 e 50 para as amostras C, D e F respectivamente).

A linearidade entre área e raiz quadrada da potência e observada também nas outras concentrações de spin, indicando que nesse intervalo de potência, de 0.6 mW a 4.0 mW, o radical livre DPPH não está saturado.

2b. Área e modulação

Na figura 7 temos os resultados das áreas referentes espectros obtidos a valores de modulação entre 1.25 G e 3.2 G. As amostras apresentadas aqui são as denominadas A e B no

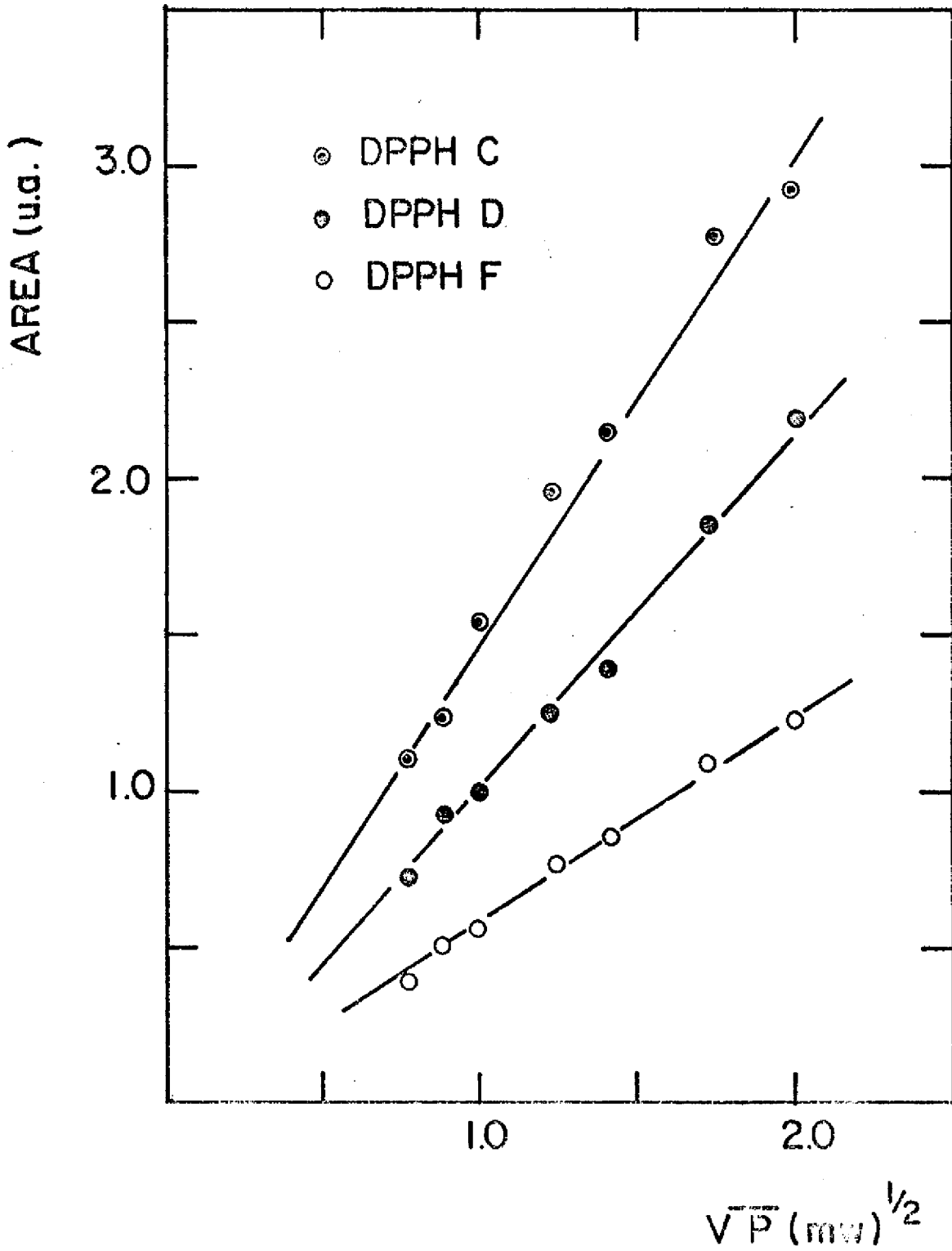


FIGURA 6

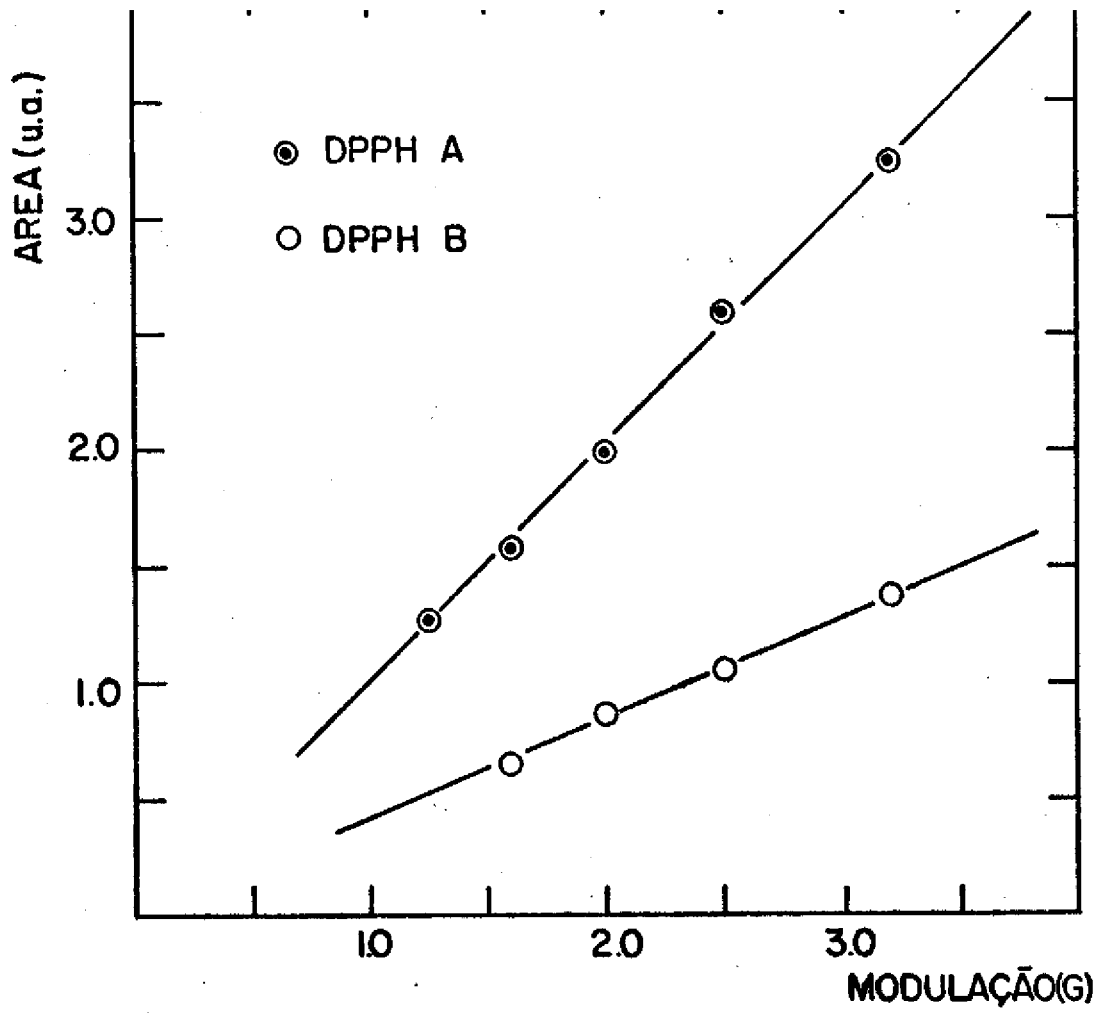


FIGURA 7

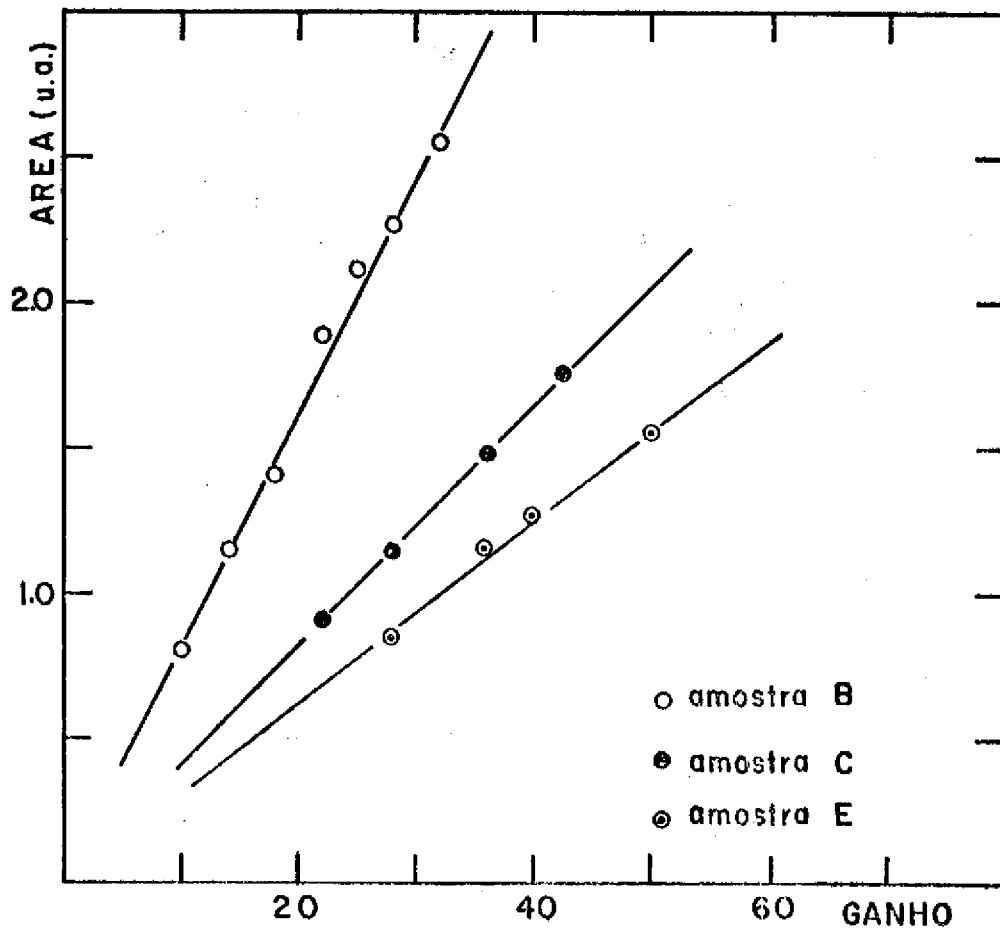


FIGURA 8

pítulo IV, com número de spins, respectivamente 2×10^{17} e 1×10^{17} . As medidas foram feitas a potência fixa (0.6 mW) e fator de amplificação constante (12 para a amostra A e 10 para a amostra B).

Verificamos que a área é proporcional à amplitude de modulação, dentro do intervalo citado, independentemente da concentração de spins da amostra. Além disso, como era de se esperar, a forma dos espectros RPE manteve-se inalterada uma vez que o maior valor da amplitude de modulação foi menor que a largura de linha do sinal.

2c. Área e fator de amplificação

A relação entre a área e o fator de amplificação pode ser observada na figura 8, onde apresentamos os resultados das medidas em tres amostras de DPPH: amostras B, C e E contendo 1×10^{17} , 5×10^{16} e 4×10^{16} spins respectivamente, conforme descrição no capítulo anterior. Estas amostras foram medidas nas seguintes condições:

	B	C	E
potência (mW)	0.6	0.6	0.6
modulação (G)	2.0	2.0	2.0
amplificação	10 a 32	18 a 56	28 a 50

Verificamos que a área é proporcional ao fator de amplificação, a despeito das diferentes concentrações de spin das amostras e dos diferentes intervalos de ganho em que as mesmas foram medidas. Essa proporcionalidade é observada para todas as preparações de DPPH.

3 • Relação Área-Numero de spins para o DPPH

Conforme os resultados que acabamos de apresentar, existe uma proporcionalidade entre a área e a raiz da potência, a largura de modulação e o fator de amplificação. Levando também em conta o número de spins da amostra medida e a dependência entre sua susceptibilidade magnética e a temperatura podemos escrever

$$A \propto \frac{N \sqrt{P} \cdot \mu_m}{T}$$

onde a é uma constante de proporcionalidade. Supondo que várias amostras do mesmo material sejam medidas à mesma temperatura e que possamos determinar as áreas para um dado conjunto de parâmetros, é possível escrever, simplesmente, que

$$A = a' N$$

onde a' engloba todas as constantes de proporcionalidade.

Nas amostras de DPPH determinamos, dentro de uma precisão de 5%, o número de spins nelas contidos. Calculando as áreas sob as curvas de absorção das várias amostras, para um determinado conjunto de parâmetros, pudemos traçar gráficos relacionando a área e número de spins das amostras.

A figura 9 ilustra essa relação para medidas à temperatura ambiente para os seguintes valores de parâmetros:

	potência (mW)	modulação (G)	amplificação
curva 1	0.6	2.0	10
curva 2	1.0	2.0	10
curva 3	2.0	2.0	10

Estas curvas permitiram a determinação do número de spins das amostras estudadas como veremos no capítulo seguinte.

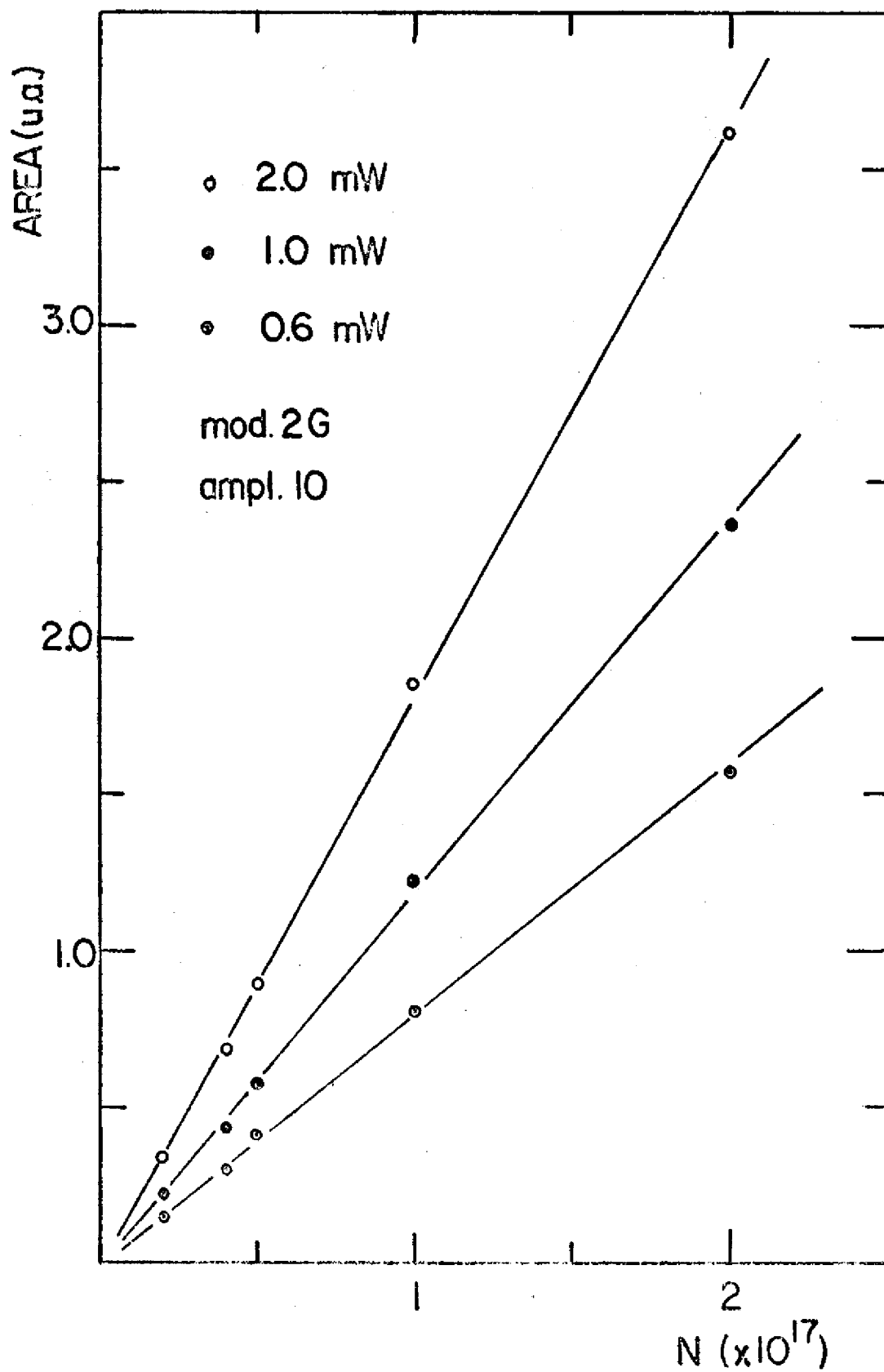


FIGURA 9

VI - AMOSTRAS IRRADIADAS

1. Calculo das Doses Absorvidas

As doses absorvidas por uma dada substância irradiada foram determinadas indiretamente, a partir dos valores de exposição, com o emprego da equação (31). Como vimos no capítulo III, essa conversão depende do coeficiente de absorção de energia por massa da substância irradiada.

Para o calculo desse coeficiente partimos da composição química do material, determinamos as frações em peso de cada elemento nele presente e, conhecendo o coeficiente de cada elemento, empregamos a relação

$$\left(\frac{\mu}{\rho} \right)_{at} = p_1 \left(\frac{\mu}{\rho} \right)_1 + p_2 \left(\frac{\mu}{\rho} \right)_2 + \dots \quad (34)$$

onde os índices 1, 2, ... referem-se aos elementos Z^1, Z^2, \dots . Os símbolos p^i e $(\mu/\rho)^i$ representam, respectivamente, fração em peso e coeficiente de absorção de energia por massa do elemento Z^i .

As substâncias que estudamos contem H, C, N e O nas frações de peso indicadas na tabela 3.

substância	fração em peso dos elementos			
	H	C	N	O
glicina	0.0667	0.320	0.187	0.427
glicil-glicina	0.060	0.363	0.212	0.364
triglicina	0.058	0.381	0.222	0.339
poliglicina	0.053	0.420	0.245	0.283
colágeno	0.063	0.432	0.166	0.339

TABULA 3

Essas frações, para as tres primeiras substâncias, de rivam das respectivas formulas químicas. No caso da poliglicina consideramos que cada molécula continha 105 unidades de glicina, baseados na informação do fabricante de que seu peso molecular era da ordem de 6000. Finalmente, no caso do colágeno, utiliza mos os dados referentes â sua composição em aminoácidos^^ e as fórmulas químicas correspondentes aos mesmos.

Por outro lado, os coeficientes de absorção dos elemen (32) tos considerados encontram-se tabelados em função da energia da radiação. Essa energia, no caso da radiação γ do ^{137}Cs , e 0.662 MeV e os coeficientes de absorção de energia por massa dos elementos citados e do ar são os apresentados na tabela 4.

elemento	coeficientes $\mu_{(en)}^u$, cm^2
H	0.0583
C	0.0293
N	0.0293
O	0.0294
ar	0.0293

TABELA 4

Combinando os dados das tabelas 3 e 4 e empregando a relação (34) obtivemos então os coeficientes para os materiais estudados (tabela 5).

substância	μ_{en}^x p mat.	cm ² g
glicina	0.0311	
glicil-glicina	0.0311	
triglicina	0.0310	
poliglicina	0.0309	
colágeno	0.0312	

TABELA 5

Com esses dados e mais o valor do coeficiente para o ar, pudemos calcular o fator de correção f entre a dose absorvida e a exposição. Da equação (31) temos que esse fator é dado

$$f = 0.869 \frac{(\mu_{en}^x)_{mat.}}{(\mu_{en}^x)_{ar}}$$

e os valores calculados de f são dados na tabela 6.

Devemos ressaltar que nesta tabela temos dois valores f para a glicina. Isto porque ela foi irradiada tanto com raios γ como com raios X. Neste último caso a energia do feixe empregado tem seu valor estimado entre 0,03 e 0.04 MeV. O cálculo de f para essa situação foi similar ao apresentado até aqui, utilizando-se os coeficientes μ_{en}^x/p correspondentes à energia do feixe. O valor $f = 0.819$ corresponde a esse caso enquanto $f = 0.9224$ corresponde ao feixe de raios γ do ¹³⁷Cs-

substância	f
glicina	0.9224
glicil-glicina	0.9220
triglicina	0.9199
poliglicina	0.9156
colágeno	0.9239
glicina	0.819

TABELA 6

A relação dose absorvida - exposição reduz-se dessa forma a

$$D \text{ (rad)} = f X \text{ (roentgen)}$$

Os valores de exposição correspondentes à fonte ¹³⁷Cs que empregamos, foram fornecidos pela Coordenadoria de Proteção Radiológica e Dosimetria do Instituto de Energia Atômica. Essas medidas nos dão a razão de exposição por unidade de tempo em função da distância da amostra à fonte e da data de irradiação. Por exemplo, em 28/10/1974 a 10 cm da fonte, essa razão era 888 Roentgen/hora. Conhecendo o tempo em que a amostra foi exposta à radiação, pudemos calcular o valor da exposição, lembrando que o fator de decaimento da atividade da fonte segue uma lei do tipo

$$\exp \left(-\frac{2.303}{T_i} t \right)$$

137 4

onde T_i é a vida média do ¹³⁷Cs (1.1x10 dias) e T é o tempo que transcorreu entre a calibração e a irradiação.

De posse do valor da exposição e do fator f, calculamos a dose absorvida pelo material, expressa em rads. Essas do

ses situaram-se no intervalo de 20 a 300 krads. O erro avaliado nesse procedimento foi da ordem de 10%.

2. Medidas com Temperatura Variável e a Determinação de 6

As amostras foram irradiadas * temperatura ambiente. Em seguida as mesmas, além do DPPH, foram medidas por RPE a temperaturas entre 110 e 300 K. Pela simples observação da forma do sinal registrado pudemos verificar que:

a) No intervalo de doses absorvidas em que trabalhamos, os espectros RPE da glicil-glicina, triglicina, poliglicina e colágeno são similares **entre si** (figura 10) e a forma do sinal não se modifica nas medidas a diferentes temperaturas (efetuando as medidas a potências abaixo da saturação).

b) Da mesma forma, o sinal do DPPH também não se altera nas medidas a diferentes temperaturas, modificando-se apenas a intensidade do mesmo.

c) O espectro da glicina difere dos espectros dos peptídeos e do colágeno, mostrando um sinal composto de três linhas principais à temperatura ambiente. Esse sinal modifica-se bastante com a temperatura de medida da amostra (figura 11).

Desses espectros obtidos a varias temperaturas entre 110 e 300 K calculamos as respectivas áreas sob a curva de absorção, segundo o método anteriormente descrito. Estudamos então a dependência entre essas áreas e a temperatura.

Conforme a equação (25), o inverso da área (VA)__deve ser proporcional a temperatura T . Verificamos que, dentro do intervalo de temperaturas citado, todas as substâncias, exceto a glicina, obedecem essa relação.

Nas figuras 12a e 12b apresentamos os resultados referentes às substâncias medidas, com exceção da

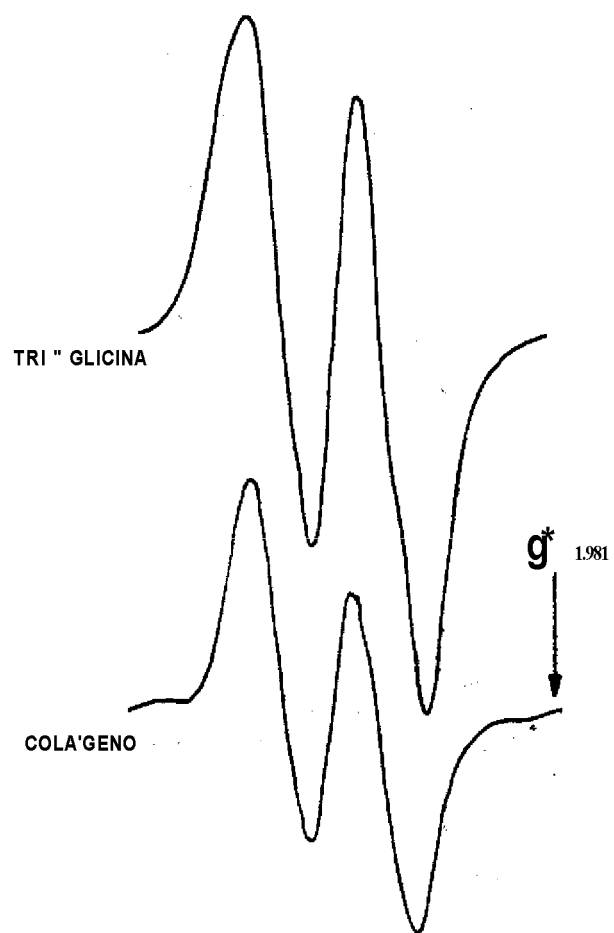
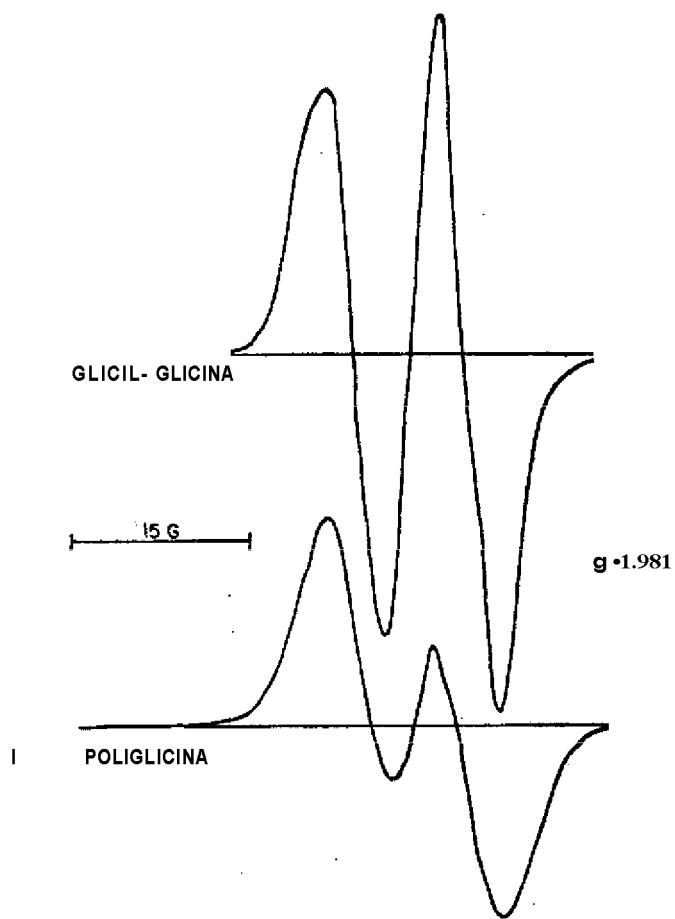


FIGURA 10

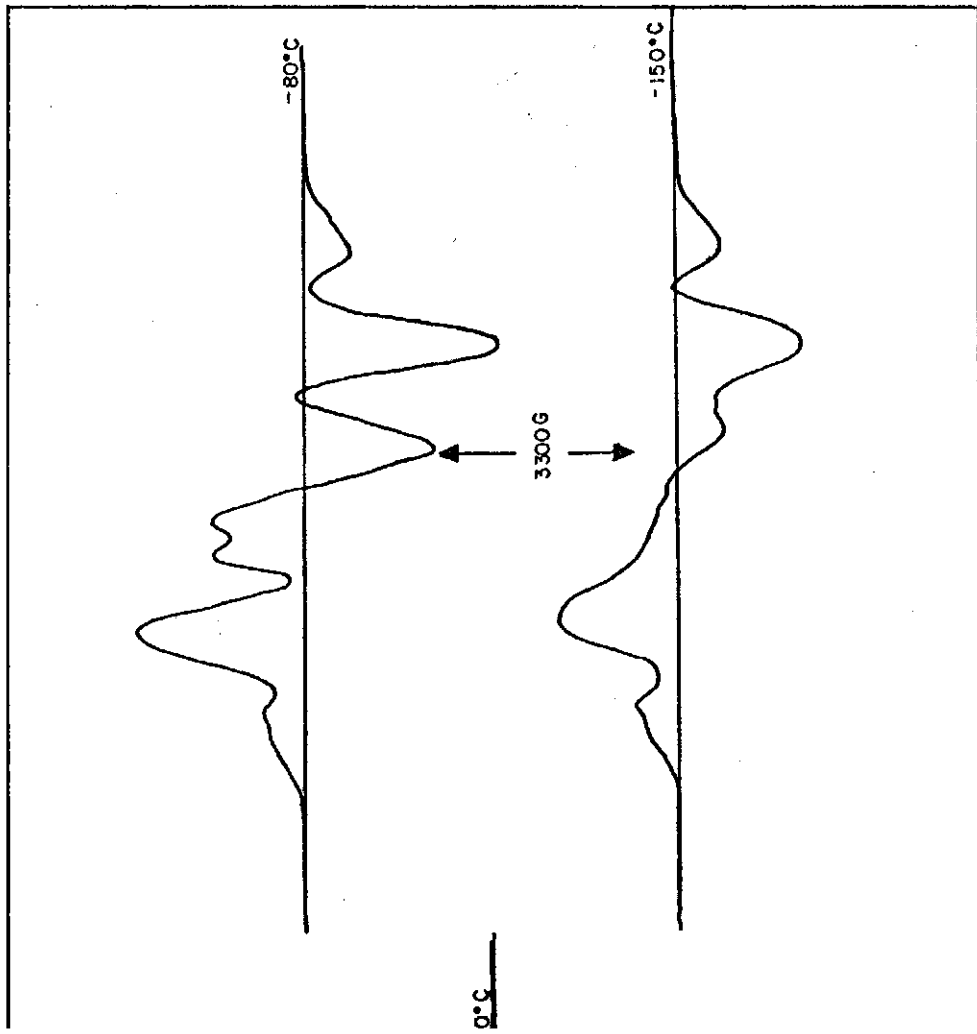


FIGURA 11

glicina. As retas traçadas resultaram de um ajuste dos pontos experimentais com a equação (25) pelo método de mínimos quadrados. Extrapolando os dados obtidos entre 110 e 300 K, determinamos os valores da temperatura θ . Esses valores correspondem à intersecção da reta extrapolada com o eixo T e estão mostrados na tabela 7. O erro avaliado para esses resultados é 5%.

Na figura 12c apresentamos os dados de χ^2/A em função de T para a glicina. O comportamento da curva traçada foge ao previsto pela equação 25. Restringindo-nos à parte da curva entre 190 e 300 K efetuamos a extrapolação para a obtenção do valor θ indicado na tabela 7.

material	temperatura θ (K)
glicina	-32
glicil-glicina	-90
triglicina	-67
poliglicina	-60
colágeno	-12
DPPH	-75

TABELA 7

3. Numero de Spins das amostras. Valor G_s

Das medidas efetuadas à temperatura ambiente calculamos o número de spins presentes na amostra, empregando a equação (28).

Para tanto, calculamos inicialmente a área sob a curva de absorção do espectro, obtido com potência abaixo da potencia

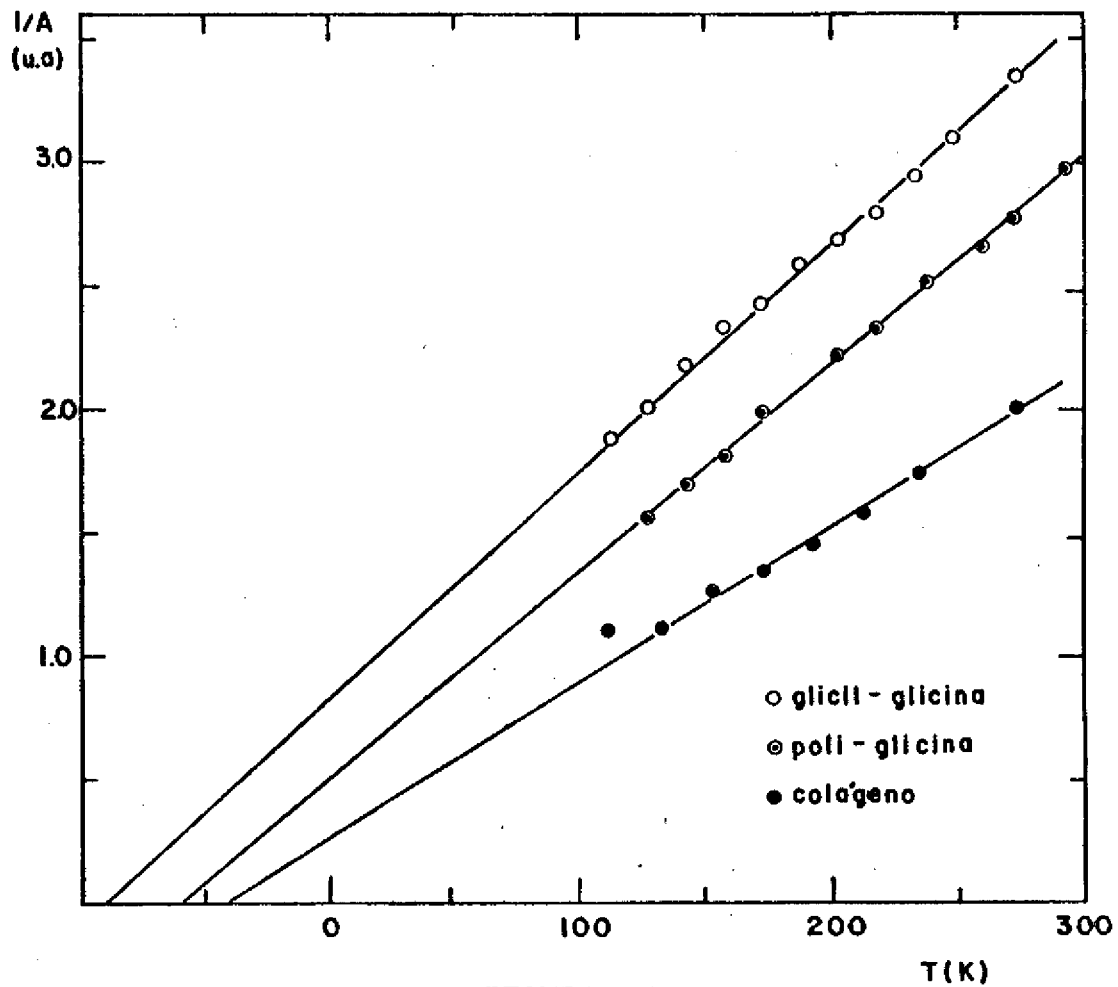


FIGURA 12a

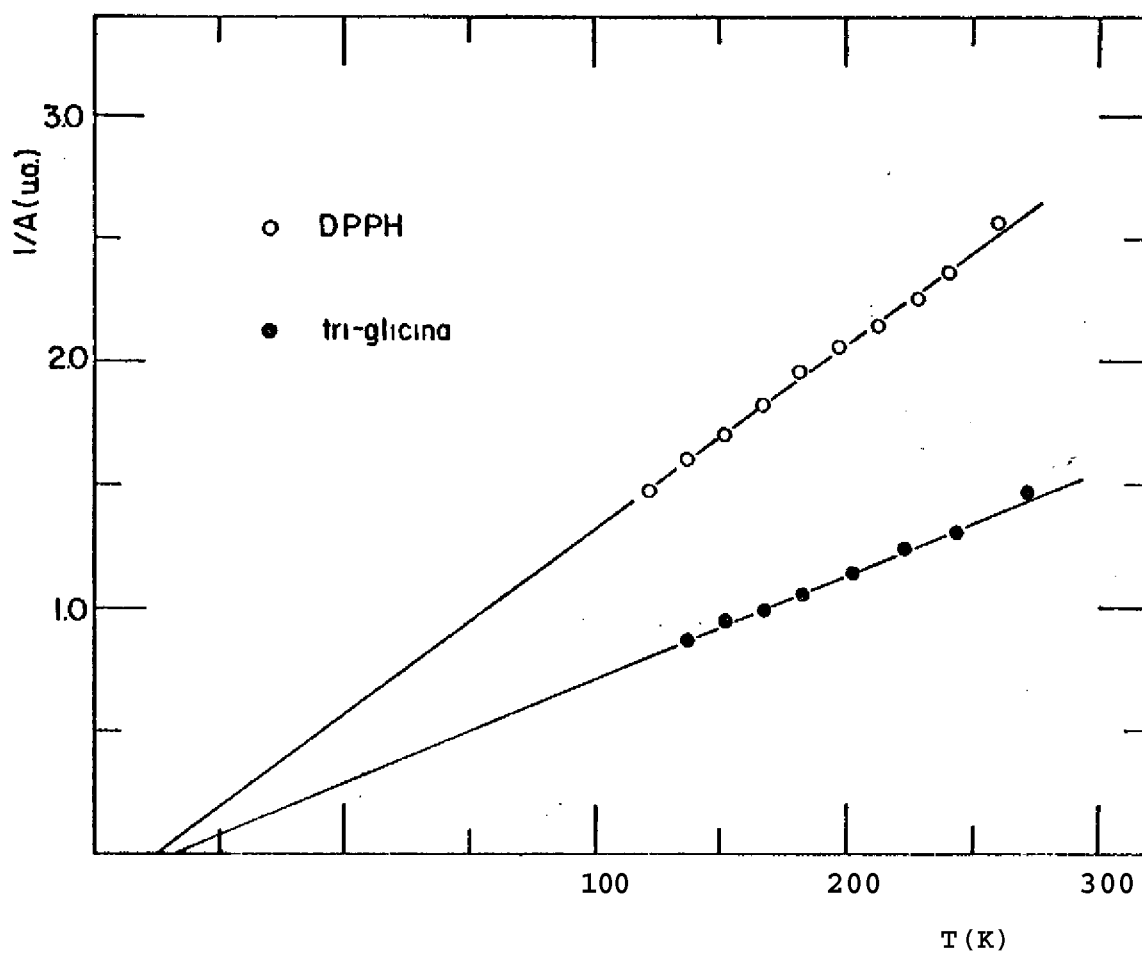


FIGURA 12b

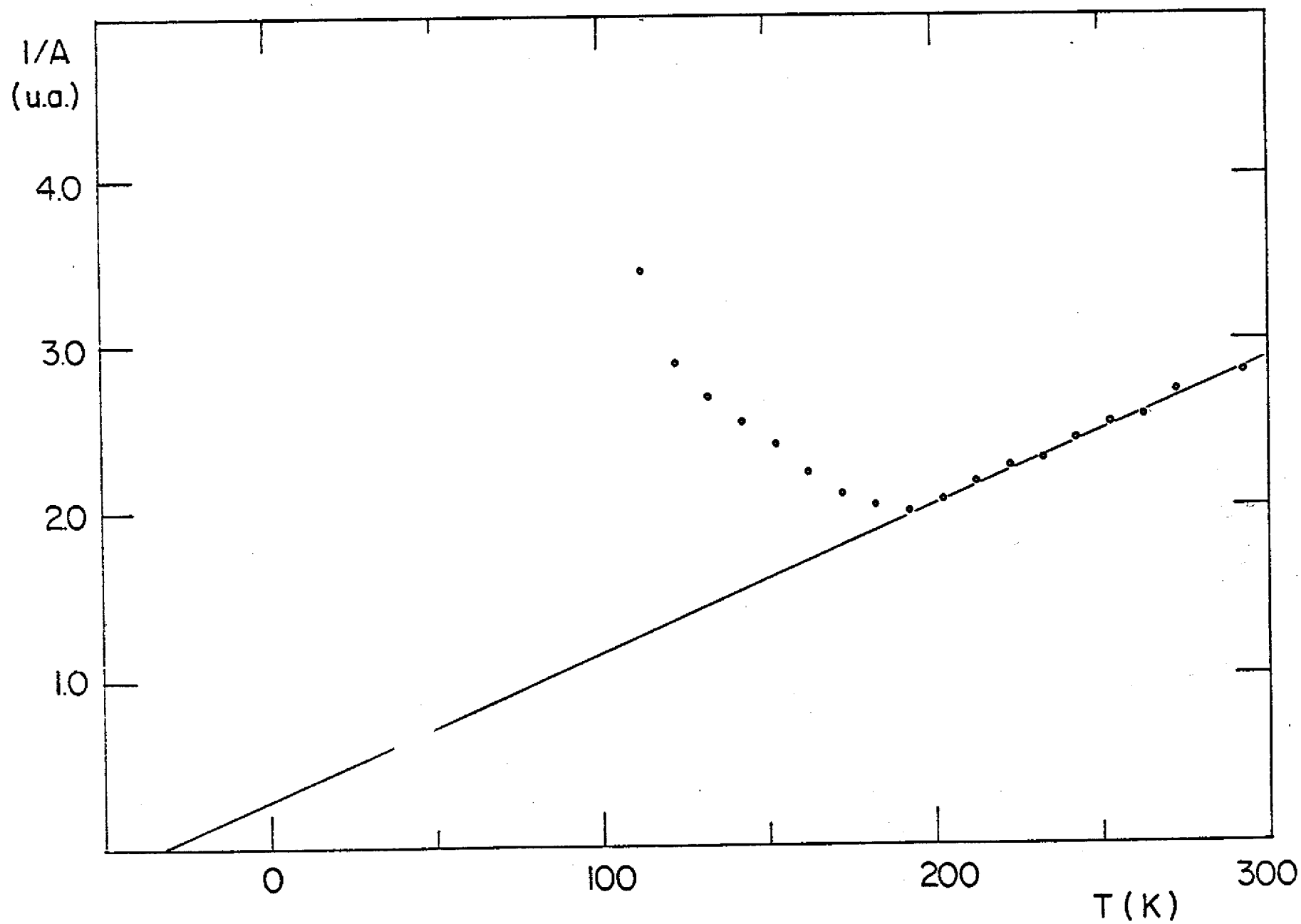


FIGURA 12c

de saturação. Utilizamos-nos em seguida da relação entre número de spins e área sob a curva de absorção obtida para o DPPH, nos_ so material padrão. Efetuamos então a comparação entre essas duas áreas através da equação (28) onde T foi a temperatura ambiente no momento da medida (em torno de 295 K) e θ assumiu os va lores mostrados na tabela 7*

Dessa maneira obtivemos o número de spins presentes nu ma dada massa de substância irradiada, a partir da qual inferi mos o valor correspondente a 1 g do material. Este último va lor corresponde então ao número de radicais que foram estabili^ zados em 1 g do material a um determinado valor de dose absor vida. O erro avaliado no processo é 10%.

Determinados, o número de radicais e a dose absorvida correspondente, obtivemos os pontos do gráfico de produção de ra dicais livres em função da dose. As figuras 13, 14 e 15 ilus tram essa curvas de produção, sendo que as doses estão expressas em rads. Observa-se que as doses empregadas estão abaixo da sa turação e dessa forma podemos calcular o parâmetro G_r , para cada substância, a partir da sua curva de produção de radicais.

O coeficiente angular a_r da reta obtida é expresso em número de radicais em 1 g da substância por rad.

Como o rad vale 100 erg/g, esse coeficiente angular pode ser escrito também em número de radicais por 100 erg. A partir da definição de G_r (número de radicais em 1 g do mate rial por 100 eV de energia absorvida) e da relação entre eV e erg ($1 \text{ eV} = 1.602 \times 10^{-12} \text{ erg}$), temos que, para o cálculo de G_r , basta fazer

onde a_r é o coeficiente angular nas unidades definidas anteri ormente (número de radicais em 1 g da substância, por rad).

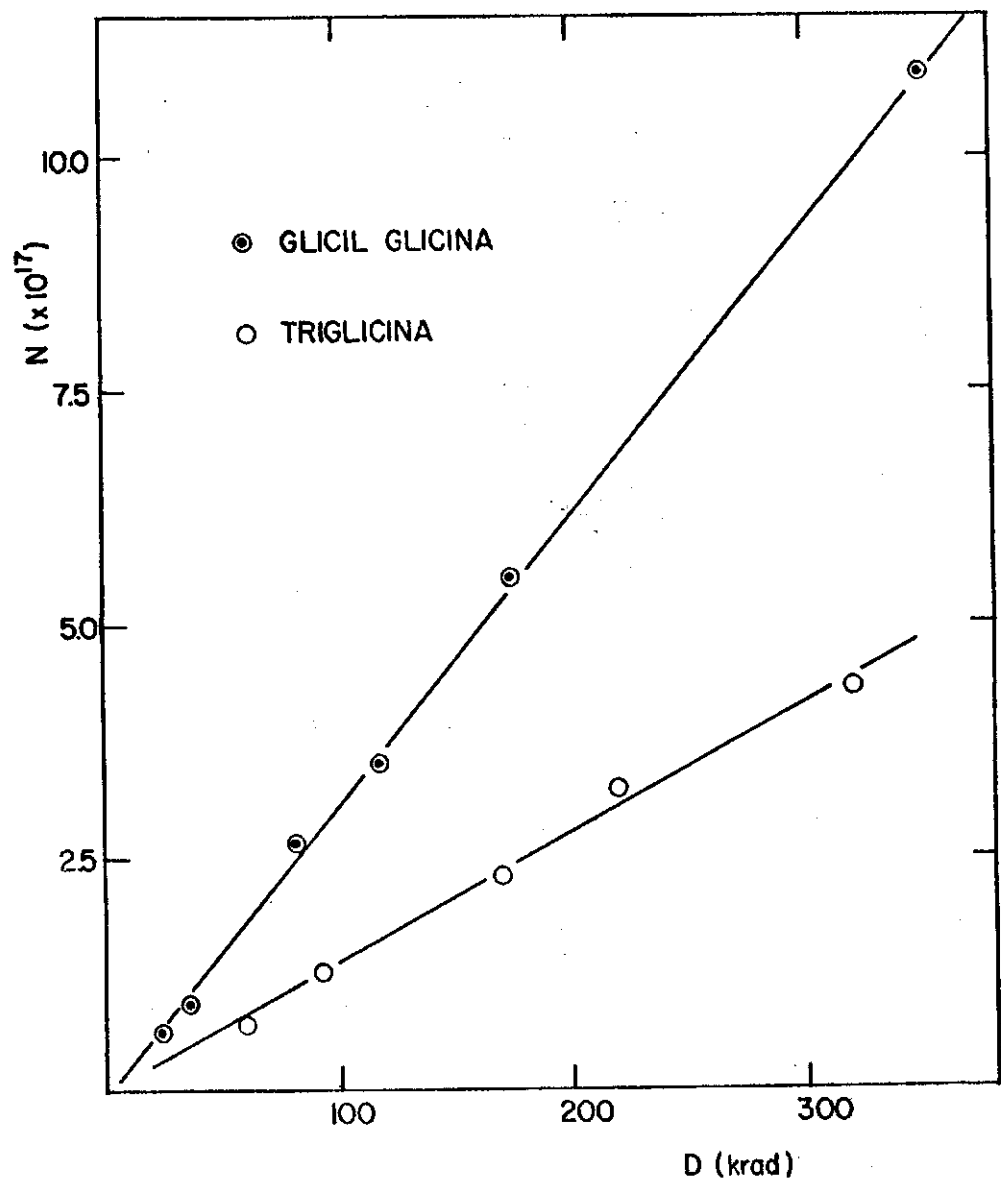


FIGURA 13

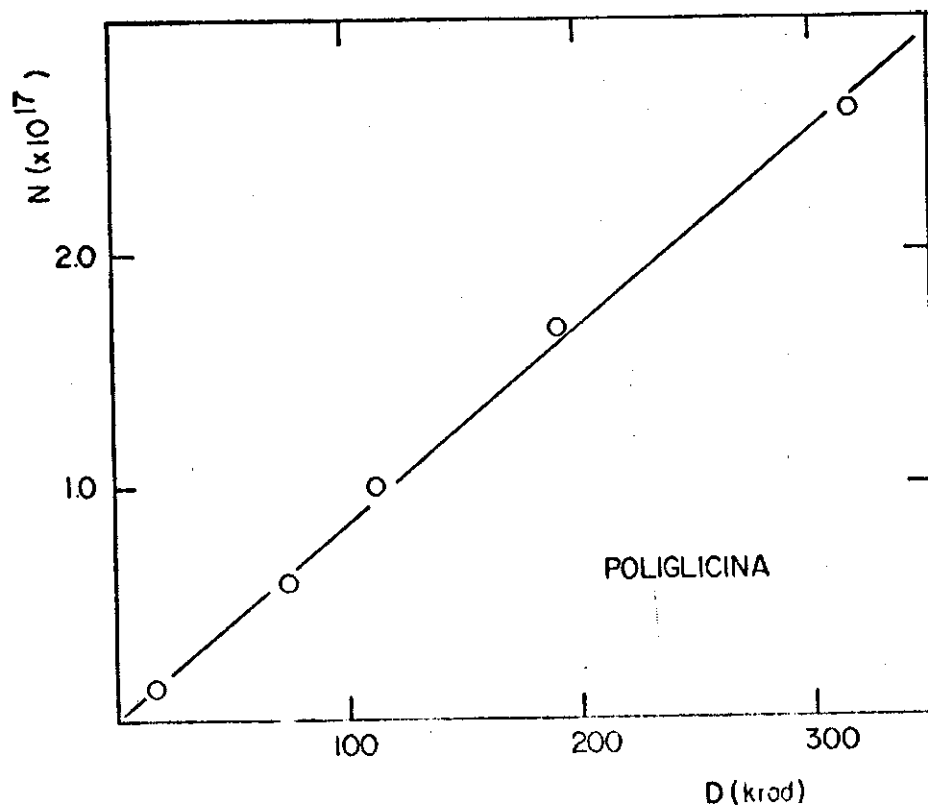
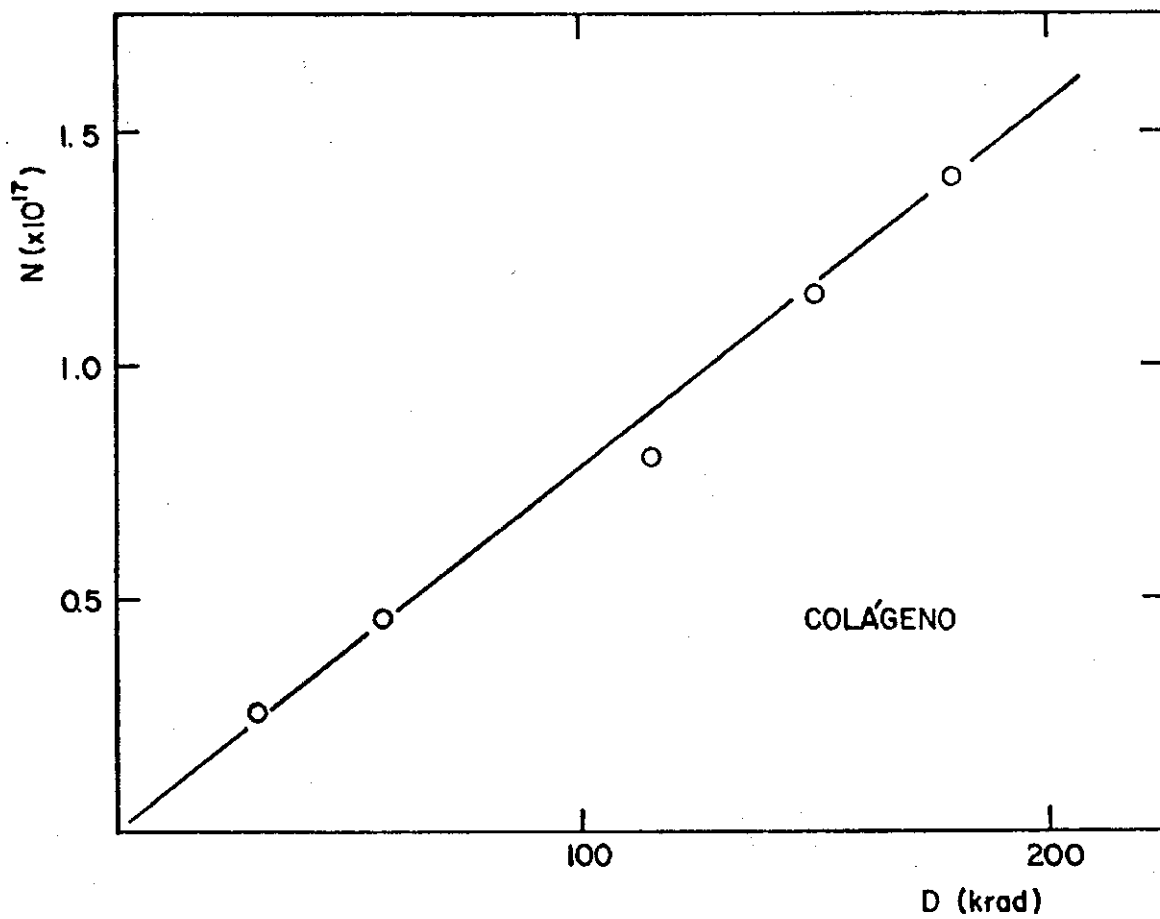


FIGURA 14

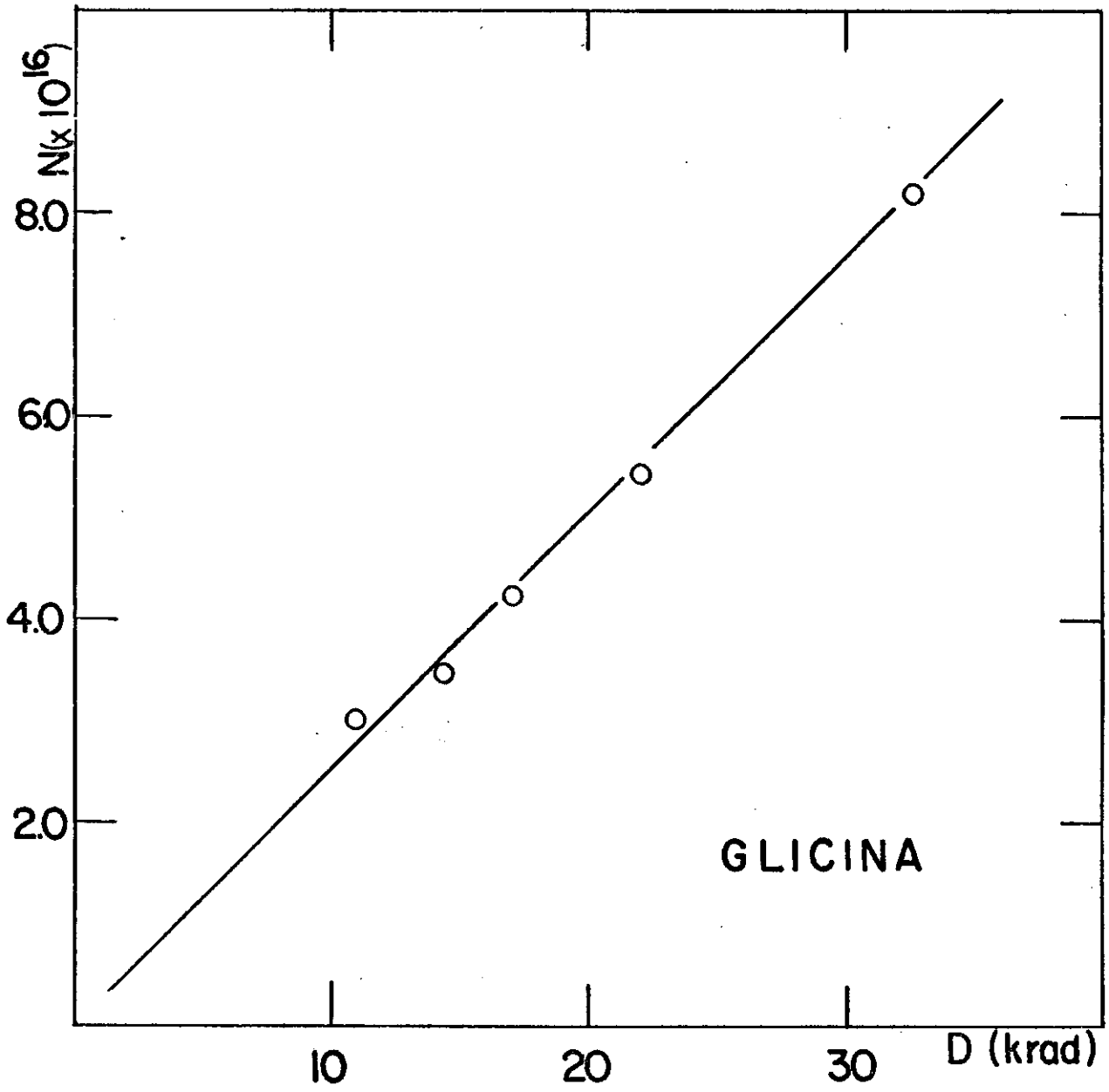


FIGURA 15

Os resultados estão apresentados na tabela 8. Mostra mos também, para comparação, valores G_r calculados a partir da determinação do número de spins sem o concurso do fator 9. Avaliamos em 15% o erro máximo.

substância	$G_r(6)$	$G_r(6=0)$
glicina	3.7	4.2
glicil-glicina	4.9	4.5
triglicina	2.3	2.3
poliglicina	1.3	1.4
colágeno	1.2	1.4

TABELA 8

4. Constante de Desdobramento Hiperfino

Usamos uma amostra de MgO contendo Mn^{++} como padrão de calibração para o campo magnético. O Mn^{++} tem spin nuclear $5/2$ e da interação hiperfina resultam seis linhas de absorção. A quarta linha, contada a partir daquela que corresponde ao menor valor de campo de ressonância, tem $g = 1.981$. Este valor mantém-se praticamente constante a frequências entre 9.20 e 9.40 GHz • Mais ainda, a distância entre o terceiro e o quarto sinal de absorção é de 86.9 G.

A medida simultânea dessa amostra e da amostra pesquisada permite a utilização desses dados para a medida da constante de desdobramento hiperfino e de valores g dos sinais da amostra em estudo. Ilustramos na figura 16 o espectro da glicilglicina irradiada, medida simultaneamente com o padrão de Mn^{++} .

A partir das separações AH^{\wedge} e AH_2 entre os sinais do dubleto e o quarto sinal do Mn , determinamos a constante

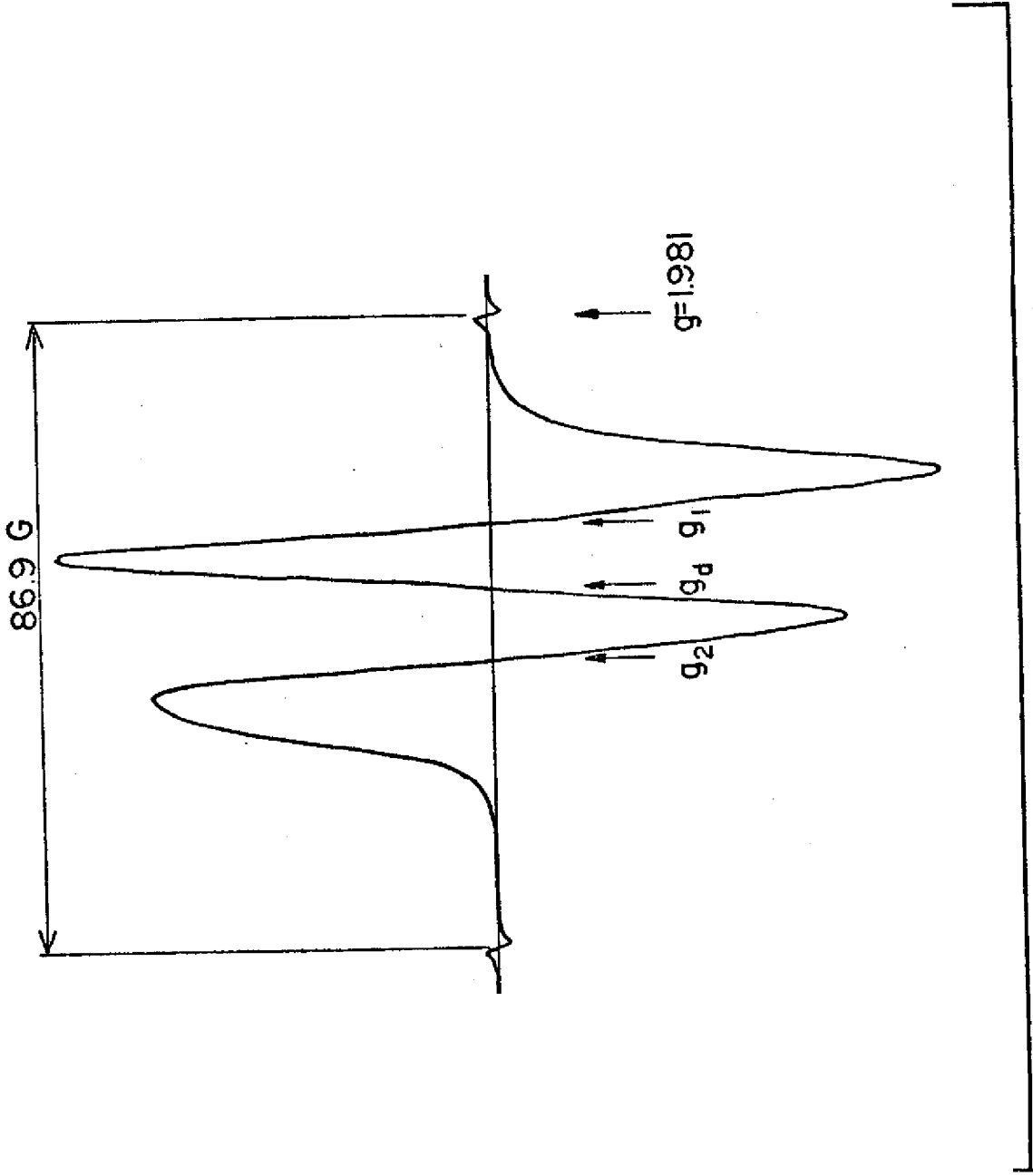


FIGURA 16

de desdobramento hiperfino A^{\wedge} :

$$A_n \text{ r } \mathbf{AH}_2 - \mathbf{AH}_1$$

Os valores de AH^{\wedge} e \mathbf{AH}^{\wedge} foram obtidos tomando-se como referência a distancia de 86.9 G entre o terceiro e o quarto sinal do manganês. Os resultados da determinação da constante de desdobramento hiperfino estão na tabela 9.

substancia	Constante A_n (Gauss)	
	Mn	ajuste
glicil-glicina	18.6 ± 0.2	18.8
triglicina	16.6 ± 0.3	17.0
poliglicina	14.3 ± 0.3	m. 5
colágeno	16.6 ± 0.4	16.2

TABELA 9

Na tabela 9 estão também os resultados que se originaram de um ajuste das curvas experimentais com formas de linha teóricas. Nesse ajuste uma curva de absorção foi inicialmente calculada por integração do espectro obtido experimentalmente. Em seguida essa curva foi comparada com curvas teóricas, lorentzianas ou gaussianas, conforme o apêndice 2.

A figura 17 mostra a curva de absorção da glicil-glicina irradiada, juntamente com o melhor ajuste que resultou da contribuição de duas gaussianas. Os dois picos das gaussianas situam-se em valores de campo magnético correspondentes aos campos de ressonância dos dois sinais, ou seja, em e e \bullet . A diferença entre os valores desses dois parâmetros correspondentes ao melhor ajuste, nos dá a constante de desdobramento hiper

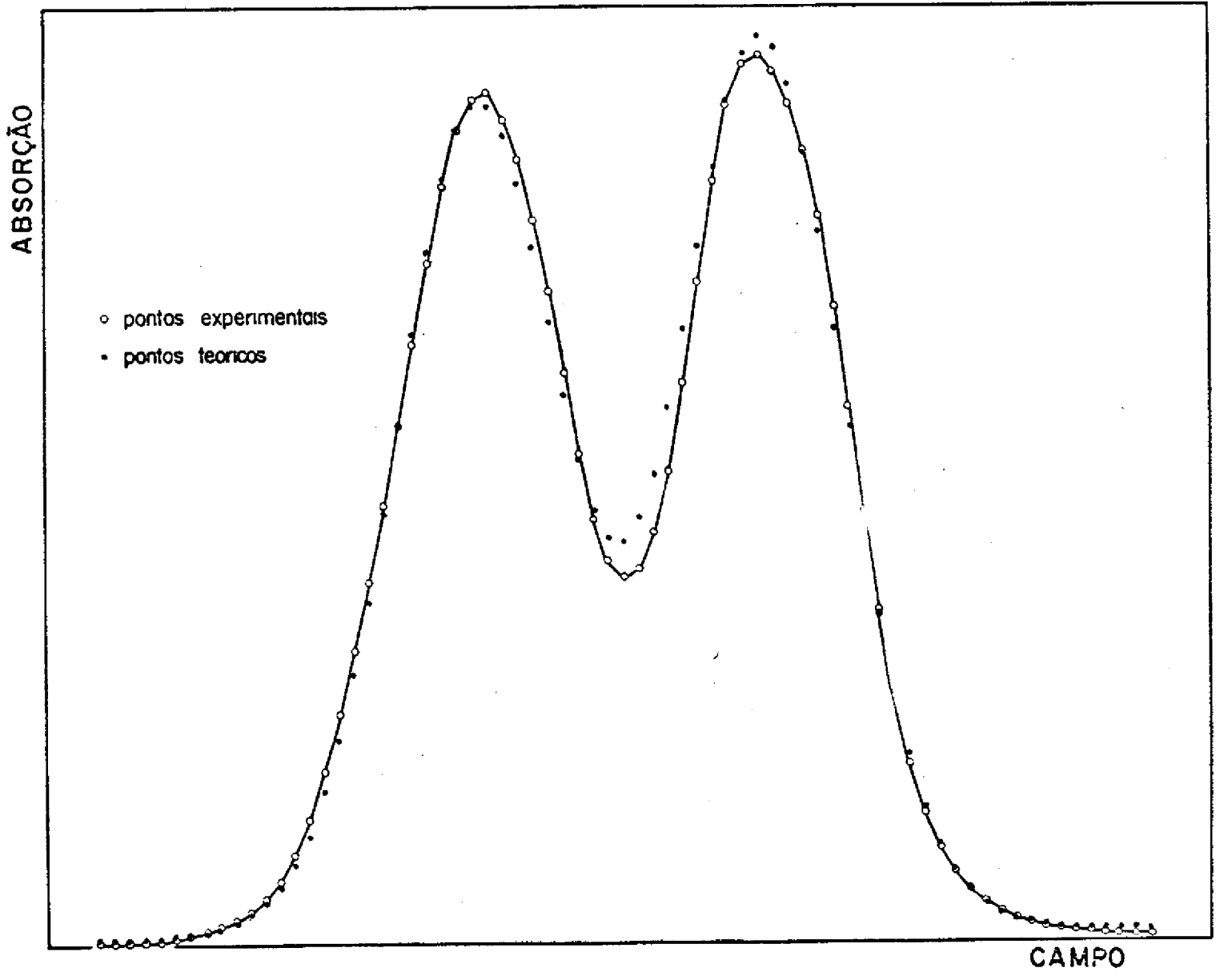


FIGURA 17

fino indicada na tabela 9. Esse ajuste foi feito, não só para a glicil-glicina, mas também para as demais substâncias relacionadas na tabela 9.

5. Fator Espectroscópico g

Os valores de g dos sinais do espectro foram calculados a partir de $g = 1.981$ do quarto sinal de Mn^{2+} , como se segue. Sendo $h\nu$ a energia da microonda, temos, para esse sinal

$$h\nu = g_4 H_0$$

onde H_0 é o campo de ressonância desse sinal.

Para um outro sinal, por exemplo o dubleto cujo campo de ressonância é H_d , podemos escrever

$$h\nu = g_d 8 H_d = g_d p (H_0 - \Delta H_d)$$

onde $\Delta H_d = H_0 - H_d$. Assim

$$g_d = \frac{h\nu}{6 (H_0 - \Delta H_d)} = \frac{h\nu}{6 \Delta H_d}$$

Assumindo 9.30 GHz para a frequência da microonda, temos

$$g_d = \frac{6651}{3357 - \Delta H_d}$$

dessa forma o valor g_d é calculado determinando-se a separação ΔH_d e por procedimento análogo calculamos g^1 e g_2 correspondentes aos sinais 1 e 2, respectivamente. Os resultados obtidos estão na tabela 10.

substância	Sd	Si	£₂
glicil-glicina	2.0033	1.9980	2.0093
triglicina	2.0033	1.9986	2.0086
poliglicina	2.0036	1.9993	2.0079

TABELA 10

Estes resultados têm precisão até a terceira casa decimal.

VII - DISCUSSÃO DOS RESULTADOS E CONCLUSÕES

1. Fator Espectroscópico g^{\wedge}

Como podemos verificar nas figuras 10 e 11, espectros RPE das substâncias que irradiamos à temperatura ambiente mostram que: o radical induzido na glicina resulta num sinal RPE tipo tripleto enquanto nas demais substâncias o sinal é um dubleto.

Com relação a estas últimas, medidas do fator espectroscópico g_a do dubleto resultaram no mesmo valor

$$g_a = 2.0035 \pm 0.0005$$

Este dado concorda com os resultados de Katayama¹² e (32)

Miyagawa que dá $g_a = 2.0032$ para os dubletos observados nos dipeptídeos glicil-glicina e acetil-glicina. Concorda também com valores g_a medidos em proteínas irradiadas, que situam-se em torno de 2.0030^{\wedge} .

Assim, o mesmo tipo de radical parece ser produzido, à temperatura ambiente, pela irradiação dos peptídeos e do colágeno com raios γ .

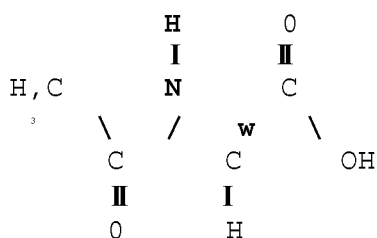
2. Desdobramento Hiperfino

O aparecimento do dubleto pode ser atribuído à interação hiperfina isotrópica entre o elétron desemparelhado e o núcleo de um átomo de hidrogênio. A questão da localização do elétron desemparelhado tem sido mais frequentemente estudada em monocristais de moléculas relativamente simples como acetil-glicina e glicil-glicina.

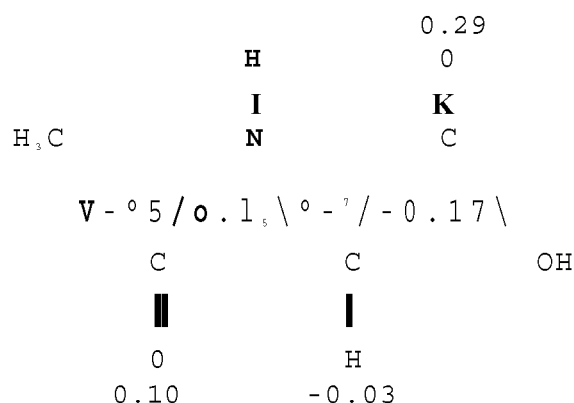
(37)

Saxeb¹ e colaboradores fizeram medidas RPE em mo

nocristais irradiados de acetil-glicina. A estrutura hiperfina observada levou à suposição de que o radical forma-se pela perda de um hidrogênio pelo carbono α (carbono vizinho ao terminal carboxílico):



Assumindo hibridação sp nesse átomo de carbono, os autores citados efetuaram cálculos de orbitais moleculares, obtendo o seguinte mapa de densidade do elétron desemparelhado:



Estes resultados estão em boa concordância com resultados experimentais sobre a constante de desdobramento hiperfino com o próton α . Mostram ainda que a densidade do elétron desemparelhado pode migrar, possibilitando a interação até com prótons β .

(16)

De outra parte, Mel/zf realizou o mesmo tipo de estudo em monocristais de glicil-glicina. A estrutura hiperfina observada pôde ser atribuída também à formação do radical no carbono α da cadeia. Cálculos teóricos de orbitais moleculares baseados na hibridação sp para o carbono levaram a uma densidade de spin capaz de explicar a estrutura hiperfina devido à interação com outros núcleos além da interação com o próton α .

Nosso trabalho foi feito em amostras em pó de maneira que linhas menos intensas de estrutura hiperfina foram encober-

tas, aparecendo apenas o dubleto. Assumindo as conclusões dos trabalhos citados acima, o dubleto resultaria do fato de que a densidade de spin não se localiza exclusivamente no átomo de carbono; com isso, ao mesmo tempo em que essa densidade pode distribuir-se pela cadeia peptídica, pode também interagir como proton ligado ao carbono et.

Reapresentamos aqui os valores que obtivemos para a constante de desdobramento hiperfino.

Substância	A_h (G)
glicil-glicina	18.6 ± 0.2
triglicina	16.6 ± 0.3
poliglicina	14.3 ± 0.3
colágeno	16.6 ± 0.4

Os resultados referentes à glicil-glicina e ao colágeno concordam com os registrados anteriormente^{1,2}.

Observamos por outro lado que, dentro da série dos peptídeos há uma diminuição da constante A_h com o aumento do número de glicinas na cadeia. Como vimos anteriormente

$$A_h = -22 - |k(0)|^2$$

o que significa que $|k(0)|$ está diminuindo no sentido da glicil-glicina para a poliglicina. Dentro da suposição de que a interação hiperfina isotrópica do elétron desemparelhado seja com o proton a , vemos que isto significa uma diminuição da densidade de spin sobre o mesmo. Em outras palavras, a densidade do elétron desemparelhado deve estar menos localizada no proton a e mais distribuída sobre a cadeia.

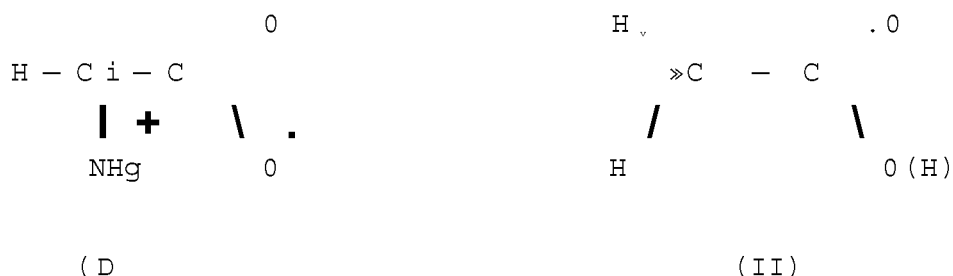
3. Variação do Sinal com a Temperatura

Dois tipos de comportamento nas medidas a temperaturas variáveis foram observadas: enquanto o espectro da glicina modificou-se drasticamente com o abaixamento da temperatura (figura 11), o dubleto dos peptídeos e do colágeno não apresentou alteração na forma da linha, modificando-se apenas a intensidade do sinal.

Essa diferença de comportamento reflete-se também na relação entre área e temperatura: os gráficos que relacionam o inverso da área e a temperatura, (figuras 12a, 12b e 12c) indicam que a susceptibilidade magnética dos peptídeos, do colágeno e do DPPH obedecem a uma lei do tipo Curie-Weiss, no intervalo de 110 a 300 K; no caso da glicina, entretanto, o que se nota é um desvio dessa lei a temperaturas inferiores a 180 K. Estas observações foram feitas também por Crippa⁽²⁰³⁸⁾ em amostras de glicina, glicil-glicina e DPPH.

3a. O sinal da glicina

Estudos de monocristais irradiados da glicina indicam que seu espectro RPE pode ser atribuído a formação de dois radicais⁽¹³⁾



As diferenças entre o espectro que obtivemos à temperatura ambiente e os medidos abaixo de -80°C evidenciam mais de uma contribuição ao espectro (figura 11). Verifica-se claramente que a contribuição relativa dos vários sinais é alterada com a variação da temperatura. Crippa⁽³⁸⁾ indicou que, uma possível

explicação para a relação entre área e temperatura observada para a glicina, talvez fosse uma interação entre os diferentes radicais induzidos pela radiação; tal interação seria similar a verificada em compostos moleculares bi-radicais e discutida por

(39)

Bijl e colaboradores . Entretanto Crippa observou que não existem, até o presente, nem cálculos teóricos nem dados experimentais que permitam estabelecer o número de pares de spin que podem interagir, dentro de uma amostra contendo outros spins que não interagem entre si; dessa maneira não se excluem hipóteses como indução de moléculas bi-radicais, interações entre spins diferentes da interação entre pares, ou ainda, a presença de vários tipos de radicais com diferentes dependências com a temperatura.

Num procedimento tentativo, procuramos fazer um ajuste entre os espectros da glicina e curvas teóricas (apêndice 2). Tentamos individualizar as várias contribuições para o espectro total e acompanhar a variação, com a temperatura, de cada sinal isolado.

O melhor ajuste foi conseguido com curvas gaussianas e a figura 18 ilustra esse ajuste para o espectro da glicina obtido a -60°C . A curva calculada resultou da soma de cinco gaussianas. Dos ajustes dos espectros obtidos a várias temperaturas, verificamos que o sinal central comporta-se diferentemente dos dois sinais laterais que, por sua vez, diferem também dos dois sinais externos menores.

Na figura 19 mostramos o valor **VA** versus temperatura para cada sinal. Apesar dos resultados evidenciarem que o ajuste não foi inteiramente satisfatório, podemos notar uma diferença de comportamento entre os sinais. Não podemos, no momento, apresentar explicações satisfatórias para esse fato.

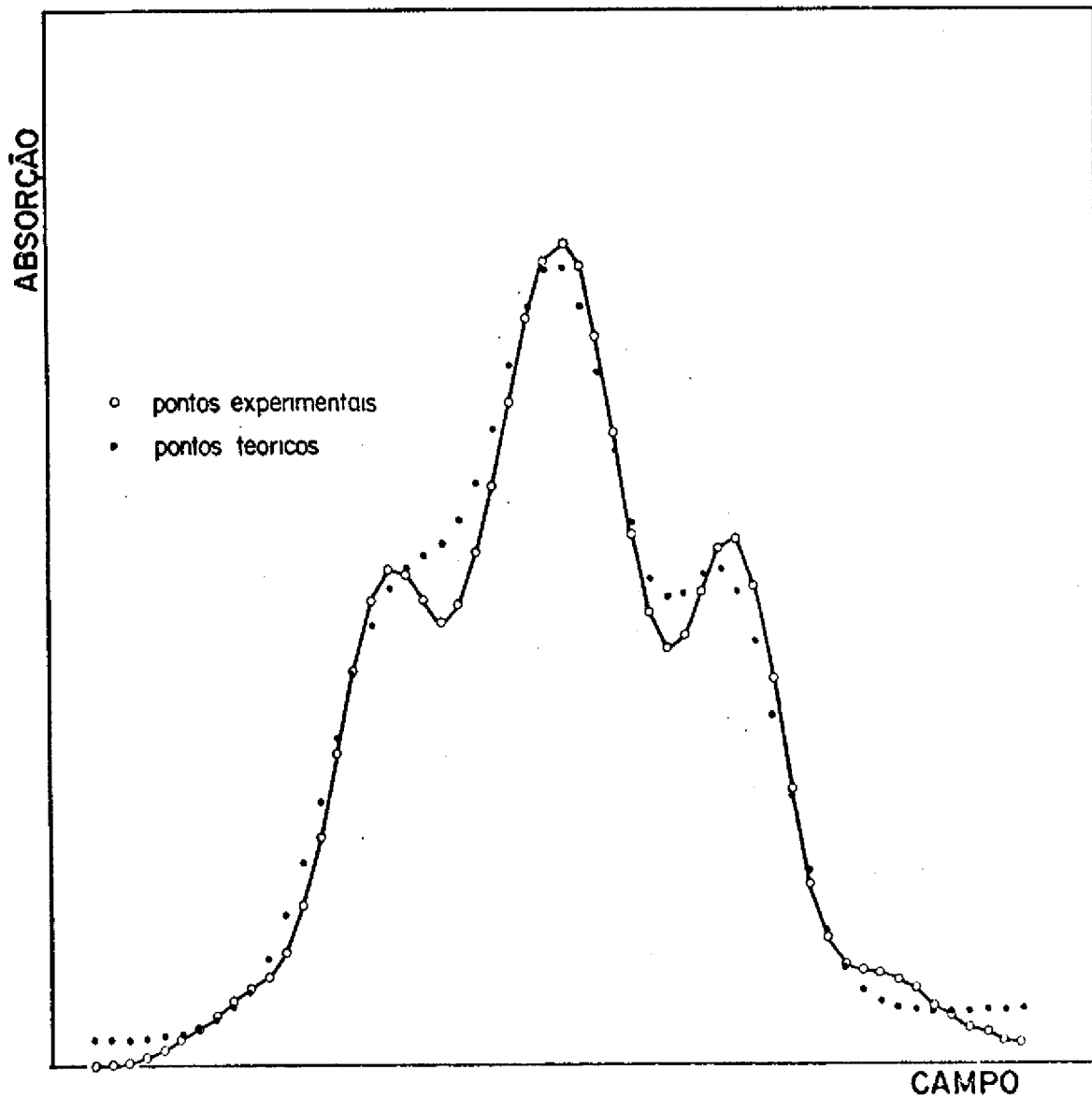
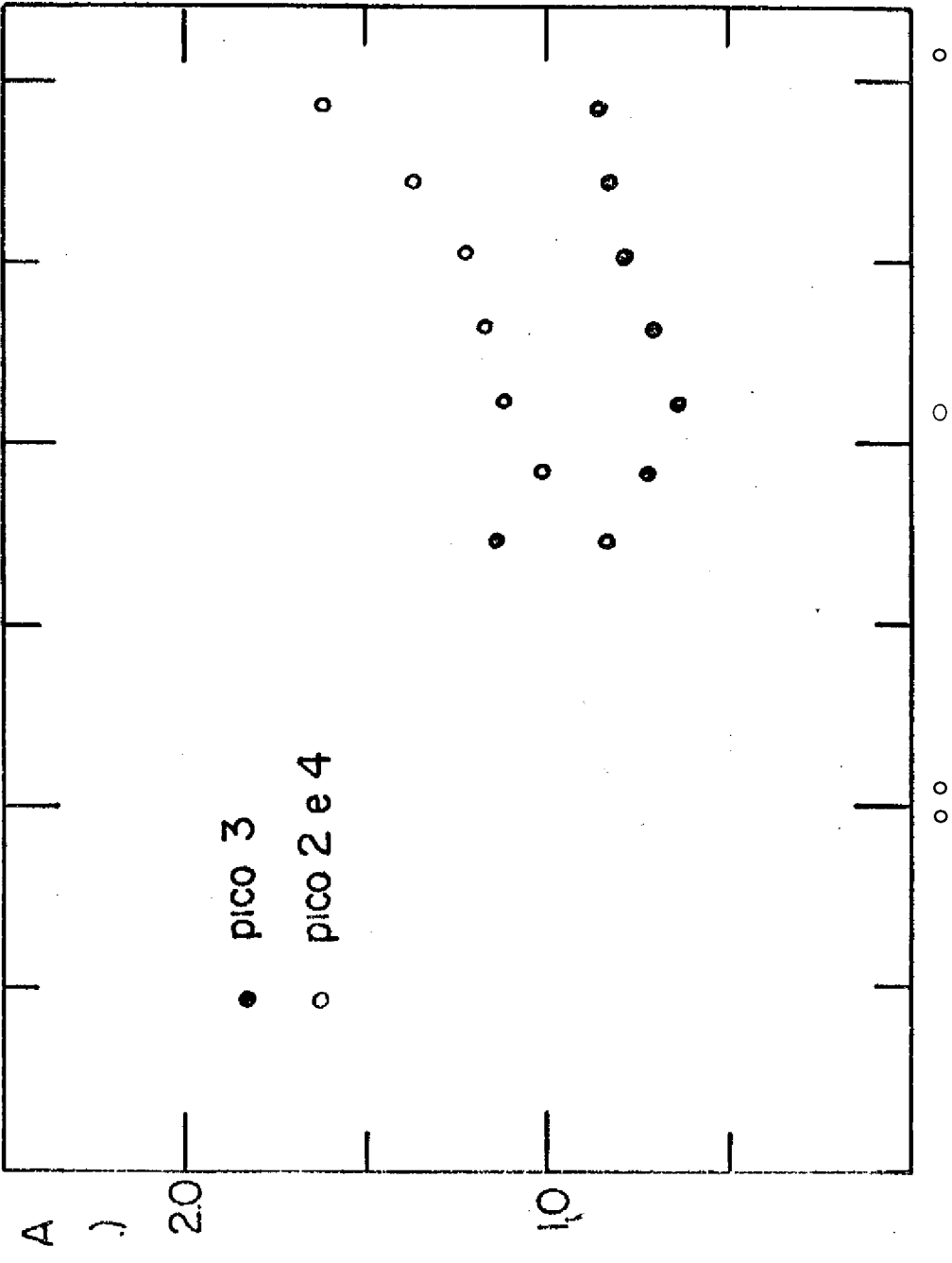


FIGURA 18



EN
 ≤ 5
 PS
 H
 α.

Os valores de χ que determinamos por extrapolação da parte linear dos gráficos χ versus T foram apresentados na tabela 7.

Segundo o mesmo procedimento Crippa registrou os valores χ de -55 K para o DPPH⁽²⁰⁾ e -27.1 K para a glicina (38)

na . A diferença entre o resultado de Crippa para o DPPH e o valor que encontramos (-75 K) pode ser atribuído à presença de

(23)

impurezas, como foi discutido por Edelstein e Duffy e Strandburg^{1*}. O resultado para a glicina encontra-se dentro do erro na extrapolação da reta definida entre 180 e 300 K.

Sabe-se que χ , para um material que obedece à lei de Curie-Weiss, relaciona-se com a integral de exchange J por

$$\chi = - \frac{S(S+1)}{3} \frac{1}{v u} \cdot \frac{1}{k T} - \frac{S(S+1)}{3} \frac{ZJ}{k T}$$

segundo a teoria do campo molecular e na aproximação para os Z vizinhos mais próximos. Portanto, J é proporcional a χ .

Verificamos que nas substâncias estudadas χ e, consequentemente J , são negativos, indicando que a interação é de natureza antiferromagnética. Além disso, χ e também J diminuem com o aumento de unidades de glicina na amostra. Tal fato pode ser devido à presença de um menor número de radicais num dado volume de material.

4. O valor G ,

Mostramos abaixo os valores G , que calculamos, tanto considerando o termo em χ como deixando de leva-lo em conta. Para comparação mostramos os resultados obtidos por outros autores.

substância	valor G_r		
	com correção 6	sem correção 9	outros autores
glicina	3.7	4.2	4.1 (10)
glicil-glicina	4.9	4.5	4.8
triglicina	2.3	2.3	2.6 (12)
poliglicina	1.3	1.4	1.2 (12)
colãgeno	1.2	1.4	1.0-5.0 (13)

Verificamos uma concordância, dentro dos 15% de precisão nas medidas de G_r , entre os valores que calculamos sem a correção devido a 8 os resultados dos outros autores, que também não aplicaram essa correção. Os valores registrados para o (45)

colãgeno por Ten Bosch dependiam da natureza e estrutura da amostra. Nosso resultado, com relação ao colãgeno, foi concordante com o valor referente ao colãgeno originário do tendão

Notamos que a inclusão do termo em 9 não alterou substancialmente o valor G_r . Os fatores de correção foram próximos de 1.0 (entre 1.05, para a glicil-glicina, e 0.9, para a glicina), devido ao fato de que os valores de 9 das substâncias irradiadas não se afastaram muito do valor correspondente ao DP PH.

Os resultados referentes aos peptídeos indicam um decréscimo do G_r da glicil-glicina para a poliglicina. Em outras palavras, a radiosensibilidade dos peptídeos diminui com o aumento de unidades de glicina no composto.

^• Interpretação conjunta de 6, A_n e G_r

Reunimos aqui os vários dados quantitativos que obtive

mos para os peptídeos, para uma análise global dos mesmos

	A_n (G)	δ (K)	G_r
glicil-glicina	18.6	-90	4.9
triglicina	16.6	-67	2.3
poliglicina	14.3	-60	1.3

Vemos que, com o aumento do número de glicinas diminuem, tanto a radiosensibilidade da substância, quanto a interação J entre os radicais (diminuição em δ) e a constante de desdobramento hiperfino.

Estas tres observações são complementares se assumirmos que o elétron desemparelhado, localizado principalmente no carbono α , pode distribuir-se pelos átomos que compõem a cadeia. Essa deslocalização do elétron desemparelhado aumenta com o acréscimo de unidades de glicina, como mostra a diminuição da constante J . Ao mesmo tempo, uma maior facilidade de migração de elétrons ao longo da cadeia pode facilitar a dispersão de energia pela molécula, permitindo o aumento da radioresistência, conforme o observado. Esse aumento implica numa menor produção de radicais livres que, aliada à deslocalização entre os elétrons, diminui o valor de J representativo da interação entre os radicais.

6. Conclusões

Mo presente trabalho determinamos os valores G_r das substâncias estudadas com a inclusão da correção devido ao termo em δ , originado de uma dependência entre susceptibilidade magnética e temperatura na forma da lei de Curie-Weiss. Mas amostras que estudamos, essas correções não foram muito grandes. No

tamos também que os valores de δ são negativos, o que indica que a interação entre os radicais é antiferromagnética.

O estudo que efetuamos com a glicina, ilustra um caso em que comportamentos inesperados da susceptibilidade magnética em função da temperatura podem ocorrer, quando se esta em presença de mais de um tipo de radical induzido por irradiação. Evidencia-se a necessidade de um estudo mais aprofundado acerca da maneira pela qual diferentes radicais estabilizados numa substância, podem interagir entre si.

Dentro do quadro relativo ao dubleto induzido em proteínas, como o colágeno, verificamos que esse mesmo tipo de sinal é apresentado pelos peptídeos de glicina irradiados. A interpretação de nossos resultados é concordante com a suposição de que nessa série de peptídeos o dubleto deve-se a um radical formado no carbono α , cujo elétron desemparelhado apresenta um grau crescente de deslocalização com o aumento da cadeia.

Os resultados acima, entretanto, não podem ser simplesmente extrapolados para a explicação do dano de radiação em proteínas. Devemos nesse caso levar em conta a presença de outros resíduos de aminoácidos bem como, conforme Ten Bosch^{^^}, a estrutura espacial da proteína.

7. Sugestões

Sugerimos que o presente tipo de trabalho estenda-se a outras substâncias de interesse biológico. Que a dependência entre área e temperatura seja acompanhada no sentido da determinação de δ e que seja aplicada, no cálculo de G_r , a correção devida a esse termo. Essa correção no cálculo de G_r é tanto mais importante quanto se pensa na possibilidade de que ocorram comportamentos anormais como o da glicina.

Com relação às hipóteses sobre a deslocalização do elétron desemparelhado, propomos estudos em substâncias reconhecidamente possuidoras de orbitais moleculares π como os aromáticos.

Ao mesmo tempo, outros peptídeos contendo glicina, tais como tetra, pentaglicina e peptídeos de glicina e outros aminoácidos devem ser examinados. Essas pesquisas devem incluir cálculos teóricos de orbitais moleculares bem como outros tipos de procedimentos experimentais como irradiação em monocristais, irradiação a baixas temperaturas e emprego de vários tipos de radiação.

Utilizamos em nosso trabalho o espectrômetro JES-ME-3 produzido comercialmente pela JEOL LTD. e pertencente à Coordenadoria de Ciência e Tecnologia dos Materiais do Instituto de Energia Atômica. Apresentamos aqui uma breve descrição do mesmo e suas características principais, bem como as opções e equipamentos adicionais de que nos servimos no decorrer de nossas experiências.

À maneira de um espectrômetro RPE típico, o aparelho utilizado pode ser apresentado como sendo constituído de 4 sistemas principais: sistema fonte, sistema da cavidade, sistema de modulação e detecção e sistema magnético.

Sistema Fonte:

É o sistema no qual é gerada a onda eletromagnética que vai excitar a amostra previamente disposta em um campo magnético.

O espectrômetro opera na banda X ou seja, a onda, gerada por um klystron, tem frequência da ordem de 9.4 GHz, situando-se portanto na região de microondas.

O klystron é protegido por um isolador que permite a transmissão da microonda mas atenua fortemente quaisquer reflexões na direção contrária à transmissão.

Através de um medidor de ondas mede-se a frequência da microonda e a variação da intensidade do feixe, ou potência da microonda, é medida em miliwatts por um atenuador. A saída do mesmo está entre 0 e 30 dB e a potência máxima da microonda é 200 mW.

A onda propaga-se por um guia de ondas retangular.

Sistema Cavidade:

A cavidade de ressonância empregada, designada por JES-UCX-2, é do tipo de reflexão. É uma cavidade cilíndrica de modo $TE_{g^{10}}$. O acoplamento entre microonda de entrada e de saída é feito por um "T híbrido".

O fator Q mede a capacidade da cavidade de amplificar a intensidade da microonda. Ele é definido como

$$Q = \frac{v}{AV} = \frac{\text{frequência de ressonância da cavidade}}{\text{diferença em frequência entre pontos em que a potência cai à metade}}$$

Sendo o valor de Q máximo quando a frequência de microondas é $\lambda/2$, torna-se importante que a saída do klystron seja precisamente fixa aquela frequência. Isto é conseguido por um controle automático de frequência que mantém a saída do klystron na frequência de ressonância da cavidade.

Para um acoplamento entre a entrada e a saída da microonda a cavidade dispõe ainda de um pequeno orifício, a "iris". Dado o emprego do sistema tipo "T híbrido", outro ajuste é feito por uma agulha refletora que é inserida no guia de ondas.

Sistema de Detecção e Modulação:

O espectrômetro tem como detetor um cristal diodo IN?3 que retifica a microonda convertendo-a em corrente contínua. Quando o campo magnético aproxima-se do valor de ressonância, a absorção de energia pela amostra provoca uma diminuição do Q da cavidade e um conseqüente decréscimo na microonda refletida. É essa variação que é detetada pelo cristal.

Para tornar discernível essa absorção de energia aplica-se um campo magnético de modulação cuja frequência é 100 kHz.

Dessa maneira o sinal resultante que é registrado e a primeira derivada da curva de absorção. A amplitude da modulação varia entre 0.02 e 20 G.

O sinal registrado é o sinal aumentado por um amplificador de banda estreita.

Sistema Magnético:

O campo magnético aplicado à amostra é fornecido por um eletroímã que gera um campo homogêneo entre suas peças polares. Nos 60 mm que separam os polos do eletroímã, a intensidade do campo pode variar entre 500 e 13500 Gauss.

A estabilidade do campo é da ordem de 5 mG sendo que em uso prolongado ela mantém-se em torno de 70 mG/hora. Esta estabilidade é possível pelo fornecimento de energia por uma unidade que consegue gerar uma corrente de excitação altamente estabilizada.

Uma regulação efetiva do campo é assegurada por um elemento de efeito Hall que é parte integrante de uma unidade de varredura linear de campo. Esta unidade permite ainda: varredura rápida de campo; varredura linear sem efeitos de histerese e saturação de fluxo; leitura da intensidade do campo em um mostrador digital e grande intervalo de variação do campo.

Equipamento para Variação de Temperatura:

Variamos a temperatura das amostras fazendo passar um fluxo gasoso pela cavidade. Esse fluxo foi de N₂ evaporado de um dewar contendo N₂ líquido e permitiu uma variação contínua de temperaturas entre 300 K e 110 K.

A cavidade empregada foi a cavidade convencional JES-UCX-2 à qual anexou-se o "adaptador para temperatura variável"

JES-UCT-2AX. Esse adaptador faz a conexão entre o Dewar e a cavidade, dispondo ainda de um termo-par que mede a temperatura nas proximidades da amostra. Consta ainda de um suporte do tubo porta-amostras que, encaixando-se na parte superior da cavidade, permite a saída do ar que circundou a amostra, além de posicionar corretamente o tubo porta-amostras.

A temperatura desejada é alcançada e mantida constante pelo controlador de temperatura JES-VT-3A. Este, controla a potência oferecida à resistência que está mergulhada no N_2 líquido, de acordo com a diferença entre a temperatura detectada pelo termo-par e a temperatura referência pré-estabelecida. Dessa forma assegura-se um fluxo que mantenha a região próxima à amostra na temperatura escolhida, dentro de uma precisão de $\pm 1^\circ C$.

Partimos do espectro RPE da forma como e obtido no espectrômetro. Efetuamos uma integração numérica no mesmo e obtemos então a curva de absorção experimental que é ajustada com formas de linha teóricas.

Supondo a presença de N linhas, cuja superposição dá a curva total de absorção, assumimos que a curva teórica seja dada por

$$K(x) = \sum_{j=1}^N a_j f_j(x-x_0) + a + Bx + \gamma x^2 \quad (2.1)$$

onde $f_j(x-x_0)$ é a função de forma da linha j e que pode ser ou gaussiana, ou lorentziana; a_j é a intensidade máxima dessa linha e a, B e γ são coeficientes dos termos que descrevem o deslocamento da linha de base.

A função lorentziana é escrita

$$f_j(x-x_0) = \frac{a_j}{1 + \left(\frac{x-x_0}{\Delta x_j} \right)^2} \quad (2.2)$$

enquanto a função gaussiana é

$$f_j(x-x_0) = \exp \left[-\ln 2 \left(\frac{x-x_0}{\Delta x_j} \right)^2 \right] \quad (2.3)$$

onde Δx_j corresponde ao máximo da função f_j e Δx_j é a meia altura da curva de absorção.

O ajuste pelo método de mínimos quadrados é aquele em que determinam-se os parâmetros a_j , x_0 , Δx_j , a, B e γ tais que seja mínima a função

Como a curva de absorção é dada em função de M valores da variável x (na curva RPE seriam os M pontos em que foi dividido o intervalo de campo magnético em que aparece o sinal) de vemos escrever

$$F = \sum_{k=1}^M |f(x_k)|^2 \quad \text{a.f.} \quad (x_k - x_0) = \sum_{j=1}^N a_j x_j \quad (2.4)$$

Designando os parâmetros a, B, y, a¹, ..., a^N, x⁰, ..., x^N, Ax₁, Ax₂, ..., Ax_N por p₁, p₂, ..., p_{3N+3} que devemos resolver, para achar o mínimo da função F, é o sistema de equações

$$\frac{\partial F}{\partial p_i} = 0 \quad (i = 1, 2, \dots, 3N+3) \quad (2.5)$$

Expandindo esse conjunto de equações em serie de Taylor em torno de valores iniciais p⁰, p⁰, p⁰ temos

$$\frac{\partial^2 F}{\partial p_i^2} p_i^0 + \sum_{j=1}^{3N+3} \frac{\partial^2 F}{\partial p_i \partial p_j} p_j^0 + \dots = 0 \quad (i = 1, 2, \dots, 3N+3)$$

que pode ser reescrita⁽⁴⁴⁾

$$\sum_{i=1}^{3N+3} \frac{\partial^2 F}{\partial p_i^2} p_i^0 + \sum_{j=1}^{3N+3} \frac{\partial^2 F}{\partial p_i \partial p_j} p_j^0 + \dots = 0 \quad (2.6)$$

onde i = 1, 2, ..., 3N+3 e p⁰ é a função 2.1 em que a variável é x⁰.

As soluções das 3N+3 equações (2.6) para os 3N+3 parâmetros p⁰ é uma segunda aproximação aos valores desejados como soluções das equações (2.5). Esta segunda aproximação deve ocupar o lugar de p⁰ e o processo é repetido até que valores sucessivos de |pⁿ - pⁿ⁻¹| sejam muito próximos de zero.

Por razões de convergência do método, o cálculo dos parâmetros p_i é feito com a seguinte fórmula de recorrência

$$p_i^n = p_i^{n-1} - \tau \frac{\partial F / \partial p_i}{\partial^2 F / \partial p_i^2} \quad (2.7)$$

Nesse processo o valor inicial de τ é 1. A partir dos parâmetros p_i calcula-se a função F . Se o valor desta for maior que o valor F calculado anteriormente, τ é reduzido por um fator 2 e F é recalculado. O processo repete-se até que F atinja um valor limite muito pequeno.

Os valores de p_i nessa situação definem as várias linhas que contribuem para o espectro de absorção.

REFERÊNCIAS

- (1) Dertinger H. e Jung H., "Molecular Radiation Biology", 1970, Springer-Verlag: New York.
- (2) Copeland E.S., "Biological Applications of ESR", 1972, Swartz U.M., Botton J.R. e Borg D.C. eds, Wiley Inters: New York.
- (3) Wyard S.J. e Cook J.B., "Solid State Biophysics", 1969, Wyard S.J. ed., McGraw Hill: New York.
- (4) Gordy W. e Shields H., Radiât. Res., 9, 611 (1958).
- (5) Rexroad H. e Gordy W. , Proc. Nat. Ac ad. Sei., 45 , 256 (1959).
- (6) Shields H. e Gordy W., J. of Phys.Chem., 62, 789 (1958).
- (7) Gordy W., Prüden B. e Snipes W., Proc.Nat.Acad.Sei., 53, 761 (1965).
- (8) McCormick G. e Gordy W., J. of Phys.Chem., G2, 783 (1958).
- (9) Zimmer K.G. e Muller A., "Current Topics in Radiation Research", 1965, pg. 10, Amsterdam: North-Holland Pub.Co..
- (10) Henriksen T., "Solid State Biophysics", 1965, pg. 215, Wyard S.J. ed., McGraw Hill: New York.
- (11) Katayama M. e Gordy W. , J. of Chem.Phys., 35»¹¹⁷ (1961).
- (12) Crippa P.R., comunicação privada, 1974.
- (13) Sinclair J. , J.Chem.Phys. 55, 245 (1971).
- (14) Morishima H., Radiât. Res. 44, 605 (1970).
- (15) Melo T.B., Int. J. Rad. Biol. 20, 557 (1971).
- (16) Melo T.B., Int. J. Rad. Biol. 23, 247 (1973).
- (17) Rotblat J. e Simmons J.A., Phys.Med.Biol. 7, 489 (1963).
- (18) Crippa P.R., Urbinati E. e Veccli A., Atti del Congresso di Cibernetica, 1971, pg. 537 , Baldochi M.e Lenci F., eds., Lito Felici: Pisa.
- (19) Alger R.S. "Electron Paramagnetic Resonance", 1968, Intersc. Publ.: New York.
- (20) Crippa P.R., Urbinatti e: e Veccli A., J. Phys. E.: Sei. Instr. 4, 1071 (1971).
- (21) Crippa P.R., Tedeschi R.A. e Veccli A., Int.J.Rad.Biol. 25, 497 (1974).

- (22) Van Itterbeek A. e Labro M., *Physica* 3_0, 157 (1960).
- (23) Edelstein A.S., *J. of Chem.Phys.* 40, 488 (1964).
- (24) Duffy, Jr. W. e Strandburg D.L., *J. of Chem.Phys.* 4J5, 456 (1967).
- (25) Pake G.E., *Paramagnetic Resonance*, 1962, Benjamin: N.York.
- (26) Schumacher R.T. e Slichter C.P., *Phys.Rev.* 101, 58 (1956).
- (27) Yariv A. e Gordon J.P., *Rev.Sei.Instr.* 2, 462 (1961).
- '(28) Slangen H.J.M., *J.Phys. E: Sei.Instr.* 3, 775 (1970).
- (29) Randolph M.L., "Biological Applications of ESR", 1972 , pg. 121, Swartz H. , Botton J. e Borg D.C. eds. , Wiley-Inters.: New York.
- (30) Evans R.D. "Radiation Dosimetry", vol.1, 1968, Attix F. e Roesch W. eds., Acad. Press: N. York.
- (31) Roesch W.C., "Radiation Dosimetry" vol.1, 1968, Attix F. e Roesch W. eds. , Acad. Press - New York.
- (32) Sinclair W.K., "Radiation Dosimetry" vol.3, 1969. Attix F. Roesch W. e Tochilin, eds., Acad. Press - New York.
- (33) Pontushka, W.M. , Medidas de RPE no ct-NiSO[•]•6H₂O, 1973, Tese se de Mestrado.
- (34) Wyard S.J., *J. of Scient.Instr.* 42, 769 (1965).
- (35) Veis A., "The Macromolecular Chemistry of Gelatin", 1964, Acad. Press: N. York.
- (36) Miyagawa I., Kurita Y. e Gordy W. , *J.Chem.Phys.* 33.» 1599 , (1960).
- (37) Saxebol G., Melo T.B. e Henriksen T., *Rad.Res.* 51 , 31 (1972).
- (38) Crippa P.R., Porati A., Tedeschi R.A. e Vecchi A., *Int. J. Rad. Biol.* 24, 87 (1973).
- (39) Bijl D., Kainer H. e Rose-Innes A.C., *J.Chem.Phys.* 30, 765 (1959).
- (40) Muller A., Schambra P.E., *Int.J.Rad.Biol.* 7_, 587 (1963).
- (41) Konhlein W. e Muller A., *Phys.Med.Biol.* 6, 599 (1962).
- (42) Ten Bosch J.J., *Int.J.Rad.Biol.* 13, 93 (1967).
- (43) Ten Bosch J.J. e Braams R., *Rad.Res.* 26, 544 (1968).
- (44) Rao C.R., "Advanced Statistical Methods in Biometrie

Research", 1952, pg. 165, Wiley Sons, Inc.: N. York.

(45) Watari K., comunicação privada, 1973.