UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Departamento de Química Fundamental
Área de Química Analítica

ESTUDOS ELETROQUÍMICOS ENVOLVENDO
DIFERENTES COMPLEXOS DE AMIN-RUTÊNIO E
O LIGANTE NO.DESENVOLVIMENTO DE
ELETRODO MODIFICADO PARA ANÁLISE DE
ÓXIDO NÍTRICO.

Vânia Mori
Tese de Doutorado

Prof. Dr. Mauro Bertotti
Orientador

São Paulo
2003

BIBLIOTECA

★ 20489 ★

INSTITUTO DE QUÍMICA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Mori, Vânia

M854es Estudos eletroquímicos envolvendo diferentes complexos de amin-rutênio e o ligante no desenvolvimento de eletrodo modificado para análise de óxido nítrico / Vânia Mori. -- São Paulo, 2003.
141p.

Tese (doutorado) – Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Bertotti, Mauro

1. Eletroquímica 2. Óxido nítrico : Química inorgânica
3. Rutênio : Complexo : Química inorgânica 4. Eletrodo : Físico-Química I. T. II. Bertotti, Mauro, orientador.

541.37 CDD

B I B L I O T E C A
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

**“Estudos eletroquímicos envolvendo
diferente complexos de amin - rutênio e o
ligante NO. Desenvolvimento de eletrodo
modificado para análise de óxido nítrico”**

VÂNIA MORI

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Química – Área: Química Analítica.

Aprovada por:

Prof. Dr. MAURO BERTOTTI
IQ – USP
(Orientador e Presidente)

Prof. Dr. IVANO GEBHARDT ROLF GUTZ
IQ – USP

Prof. Dr. JORGE CESAR MASINI
IQ – USP

Prof. Dr. EDER TADEU GOMES CAVALHEIRO
IQSC – USP

Profa. Dra. MARIA VALNICE BOLDRIN ZANONI
IQ – UNESP - Araraquara

SÃO PAULO
19 DE MAIO 2003.

*Ao meu pai ,
que mesmo não estando presente, sempre esteve ao meu lado.*

Dedico

*A minha mãe, pelo apoio e incentivo nos momentos mais
difíceis.*

“Mais importante que a felicidade, é a alegria de simplesmente estar vivo, de estar aqui na Terra para esta aventura efêmera”.

(Pascal Bruckner)

Marco Antônio,
obrigada, pelo seu amor, amizade, pela força que você me
dá, pela alegria que sinto quando estou com você, pela
compreensão que você teve todo esse tempo por mim e por
toda ajuda nesse trabalho.

*O meu agradecimento ao Prof. Mauro pela orientação,
transmitindo não apenas seus conhecimentos, mas também
sua dedicação com a pesquisa e pela amizade todos esses
anos.*

Agradecimentos

Ao professor Douglas da USP-São Carlos, pela amizade e valiosas discussões.

Aos professores Lúcio, Claudimir e Gutz por ajudarem no desenvolvimento desse trabalho.

Ao professor Tokoro, pelas valiosas conversas.

Ao Instituto de Química -USP, que como um todo me recebeu muito bem.

Ao grupo do laboratório:

Audrei, Denise, Thiago, Tiago, Fernanda, Alexandra, Luis e Zé Roberto.

Aos professores e funcionários do Departamento de Química pelas condições de trabalho.

Ao pessoal da USP-São Carlos, pelas discussões e síntese dos compostos.

As amigas Carol e Bianca pela força nos momentos precisos e todos esses anos de amizade.

Aos meus amigos, que de alguma forma sempre me ajudaram a superar os maus momentos e apreciar os bons.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa de doutorado e auxílios concedidos.

ÍNDICE

Resumo.....	i
Abstract.....	iii
Lista de Abreviaturas e Estruturas.....	iv

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

1.1- A molécula de óxido nítrico.....	1
1.2- A Importância biológica do NO.....	3
1.3- Características químicas do rutênio.....	6
1.4- Complexos de rutênio coordenados com NO.....	8
1.5- Complexos de rutênio coordenados com SO_4^{-2}	11
1.6- Óxidos de Molibdênio.....	12
1.7- Técnicas Eletroquímicas	
1.7.1- Cronoamperometria.....	14
1.7.2- Cronoamperometria de duplo degrau de potencial.....	16
1.8- Eletrodos modificados.....	20
1.8.1- Preparação de Eletrodos quimicamente modificados.....	24

CAPÍTULO 2 - PARTE EXPERIMENTAL

2.1- Equipamentos	
2.1.1- Potenciostatos.....	27
2.1.2- Espectrofotômetro.....	28
2.1.3- Infravermelho.....	28

2.2-Construção dos Microeletrodos.....	28
2.3-Gás NO	
2.3.1- Aparelhagem para gerar o gás.....	30
2.3.2- Cilindro do gás NO.....	30
2.4- Determinação volumétrica do NO.....	31
2.5 - Experimentos coulométricos.....	32
2.6- Determinação das constantes de velocidade dos complexos de tetra Amin-rutênio com eletrodo rotativo de disco-anel.....	32
2.7- Soluções	
2.7.1- Solução tampão (pH~7,4).....	33
2.7.2- Solução para modificar o eletrodos de ouro com complexos do tipo $\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{LSSLRu}(\text{NH}_3)_5$ e $\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{LSSL}$	33
2.7.3- Soluções para modificar o eletrodo de carbono vítreo com filme de óxido molibdênio.....	33
2.7.4- Soluções para modificar o eletrodo de platina com xerogel e compostos tetra Amin rutênio.....	34
2.8- Eletrodos modificados	
2.8.1 - Eletrodo de pasta de carbono com 4 - PVP (poli vinil piridina).....	34
2.8.2- Eletrodo de pasta de carbono quimicamente modificado.....	34
2.8.3- Eletrodo modificado com filme misto de óxido de molibdênio e compostos tetra Amin rutênio.....	35
2.9- Amostras de albumina bovina (ABS).....	35

CAPÍTULO 3-RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1- Gás NO

3.1.1- Solução saturada de NO.....36

3.1.2- Padronização da solução de NO

3.1.2.1- Estudos espectrofotométricos da solução saturada de NO.....38

3.1.2.2- Estudo realizado com infravermelho na solução saturada com NO.....40

3.1.2.3- Padronização de soluções de óxido nítrico por cronoamperometria utilizando microeletrodo de disco de platina

3.1.2.3.1- Estudos Eletroquímicos Preliminares com Microeletrodos.....41

3.1.2.3.2- Oxidação eletroquímica do óxido nítrico.....45

3.1.2.3.3- Determinação eletroquímica da concentração de NO em solução saturada.....49

3.1.2.3.4- Determinação da concentração da solução de NO saturada com o gás do cilindro.....52

3.2- Estudos eletroquímicos dos complexos trans - $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_2\text{LL}']^{n+}$

3.2.1- Complexos de rutênio coordenados com SO_454

3.2.1.1- Determinação das constantes de velocidades por cronoamperometria de duplo degrau de potencial.....56

3.2.1.2- Determinação das constantes de velocidades por voltametria com eletrodo rotativo de disco-anel.....58

3.2.2- Complexos de rutênio coordenados com NO.....	65
3.2.2.1- Determinação das constantes de velocidades por cronoamperometria de duplo degrau de potencial.....	67
3.2.2.2- Estudos relacionados com o número de elétrons envolvidos na redução do NO.....	68
3.2.2.3- Determinação das constantes de velocidades por voltametria com eletrodo rotativo de disco-anel.....	74
3.3- Eletrodos modificados	
3.3.1- Estudos preliminares para Imobilização dos complexos de rutênio na superfície de eletrodos sólidos.....	77
3.3.2.- Modificação do eletrodo com complexos binucleares e mononucleares e estudos eletroquímicos.....	79
3.3.2.1- Eletrodo modificado com complexo mononuclear na solução de NO.....	84
3.3.3- Eletrodo de pasta de carbono quimicamente modificado com sílica SF-AEATS/Ru(III)-EDTA.....	86
3.3.4- Eletrodos de platina modificados com xerogels de oxido bentonita- vanadium (V) e complexos trans-[Ru(NH ₃) ₄ L ₁ L ₂] ⁺ⁿ	90
3.3.5- Modificação do eletrodo de carbono vítreo com óxido de molibdênio.....	94
3.3.5.1- Estudos envolvendo a oxidação da molécula de NO no eletrodo modificado.....	95
3.3.6- Eletrodos de ouro modificados com oxido de molibdênio e complexos trans-[Ru(NH ₃) ₄ L ₁ L ₂] ⁺ⁿ (filme misto).....	102

3.3.6.1- Estudos eletroquímicos envolvendo o eletrodo de ouro com filme misto e a molécula de NO.....	109
3.3.6.2- Curva analítica do NO com eletrodo de ouro modificado com filme de Ru-O-MoO ₂	116
3.3.6.3- Microeletrodo de ouro modificado com filme de Ru-O-MoO ₂	119
3.3.6.3- Curva analítica do NO com microeletrodo de ouro modificado com filme de Ru-O-MoO ₂	120
3.3.6.4- Análise da produção de óxido nítrico em albumina bovina com adição de peróxidonitrito na presença de tempol.....	122

CAPÍTULO 4-CONCLUSÕES

4- CONCLUSÕES.....	125
--------------------	-----

CAPÍTULO 5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

5-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	130
- CURRICULUM VITAE.....	138

RESUMO

* Neste trabalho foram realizados estudos eletroquímicos com complexos de rutênio do tipo *trans*-[Ru(NH₃)₄L₁L₂]ⁿ⁺, aos quais se coordenam ligantes apropriados visando à modelagem de estruturas capazes de atuar como "captadoras" de NO.

A síntese e caracterização desses complexos foram feitas pelo grupo de pesquisa do Professor Dr. Douglas Wagner Franco, IQSC-USP.

Estes complexos foram adequadamente imobilizados em eletrodos e microeletrodos de ouro com filme de óxido de molibdênio. Com isso, foi desenvolvido um sensor eletroquímico para NO em solução aquosa de tampão fosfato, simulando o pH fisiológico (pH ~7,4).

Os eletrodos modificados foram empregados na quantificação de NO em amostras de albumina bovina com peroxidonitrito na presença de tempol, verificando-se a produção de NO nesse meio. Essas amostras foram fornecidas pela Professora Dr.^a Ohara Augusto, IQ-USP São Paulo .

Os estudos referentes os complexos de rutênio visaram principalmente à determinação da velocidade de liberação do NO desses complexos, através do mecanismo EC. Para isso, utilizaram-se duas técnicas eletroquímicas, cronoamperometria de duplo degrau de potencial e voltametria com eletrodo rotativo de disco-anel. Além dos complexos coordenados com o ligante NO foram estudados complexos coordenados com o ligante sulfato. Os resultados obtidos pelas duas técnicas eletroquímicas foram concordantes, e estavam de acordo com o esperado, mediante aos estudos prévios realizados pelo grupo do Professor Dr. Douglas Wagner Franco. As constantes de velocidades encontradas situaram-se

na faixa de 10 a 10^{-3} s^{-1} . Essas variações estão relacionadas com as propriedades químicas de cada ligante.

Outro estudo eletroquímico realizado com a molécula de óxido nítrico em solução de tampão fosfato (pH $\sim 7,4$) foi feito no intuito de determinar a concentração exata de uma solução saturada de NO. Para isso, utilizou-se a técnica de cronamperometria, com eletrodo de trabalho um microeletrodo de platina de raio igual a $25 \mu\text{m}$. A concentração da solução saturada de NO, foi de $(2,1 \pm 0,3) \text{ mmolL}^{-1}$. Os resultados da concentração foram confirmados pelo método clássico titulação volumétrica, no qual obteve-se o valor da concentração de $(1,95 \pm 0,02) \text{ mmolL}^{-1}$. Esses resultados estão de acordo com resultados descritos na literatura.

ABSTRACT

The *trans*-[Ru(NH₃)₄NOL]³⁺ (L = 4-NH₂py, Him, L-hist, 4-pic, py, 4-Clpy, nia, isn, 4-CNpy and pz) complexes were electrochemically investigated by using double potential step chronoamperometry and rotating ring-disc electrode voltammetry. Values for the rate of NO substitution by water molecule ranged from 0.02 s⁻¹ (4-pic) to 0.34 s⁻¹ (pz) at 25°C.

Gold surfaces were modified with an electrochemically deposited layer of non-stoichiometric molybdenum oxides. At these surfaces, *trans*-[Ru(III)(NH₃)₄(4pic)SO₄]⁺ complex was incorporated in a controlled way by cycling consecutively the potential in the range +0.50 to -0.25 V at pH ~ 3.

Very reproducible voltammetric curves corresponding to the electrochemical process of the ruthenium complex were obtained, confirming the immobilisation of the material into the molybdenum oxide film. The anodic oxidation of nitric oxide at physiological pH ~7.4 in phosphate buffer was investigated at the modified electrode containing the molybdenum oxide + *trans*-[Ru(III)(NH₃)₄(4pic)SO₄]⁺ complex and an enhancement in the current response was observed compared to the signal at a bare electrode. The rate for NO electrochemical oxidation was dependent on the amount of catalytic ruthenium sites dispersed into the molybdenum oxide film, suggesting the participation of the metallic ion in an out-sphere mechanism. A linear relationship between current signals measured by square wave voltammetry and NO concentration was obtained in the 0 to 10 µM range. The applicability of the modified electrode as a sensor for real-time NO monitoring was also demonstrated.

Lista de Abreviaturas e Estruturas

Nome (Abreviatura)	Estrutura
Piridina (py)
4-picolina (4-pic)
4-Cloropiirdina (4-Clpy)
4-Aminopiridina (4-NH ₂ py)
4-Cianopiridina (4-CNpy)
Pirazina (pz)
Nicotinamida (nia)
Isonicotinamida (isn)
Imidazol (Him)
L-histidina (L-hist)

- TEMPOL: 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-N-oxil

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1.1- A molécula de óxido nítrico

O óxido nítrico é um gás incolor à temperatura e pressão ambiente e apresenta pontos de ebulição e de fusão de $-151,7^{\circ}\text{C}$ e $-163,6^{\circ}\text{C}$, respectivamente. É solúvel em água, benzeno e metanol, sendo uma espécie química que está presente nas células da maioria dos seres vivos.

Devido à sua solubilidade, este gás tende a se difundir facilmente do meio aquoso para o orgânico, tal como de fato deve ser seu comportamento nos seres vivos, fluindo das membranas biológicas ao interior hidrofóbico das proteínas.

O óxido nítrico (NO) é formado na atmosfera, a partir do oxigênio e do nitrogênio, durante as tempestades de raios⁽¹⁻³⁾. Também se encontra na chuva ácida e na mistura de fumaça e neblina, resultantes da poluição ambiental - razão por que sempre foi visto com desprezo pelos cientistas⁽¹⁻³⁾.

Depois das descobertas de Furchgott, Murad e Ignarro, porém, esse desprezo se transformou num interesse que provocou uma corrida científica em busca das possibilidades de aplicação do novo conhecimento na medicina e áreas correlatas. A literatura especializada conta hoje mais de milhares de trabalhos cujo objeto de investigação é o óxido nítrico⁽⁴⁻⁶⁾.

As pesquisas mostraram que o óxido nítrico é um potente dilatador dos vasos sanguíneos — daí sua importância para o controle da pressão arterial. Como é um gás, ele se difunde facilmente pelo sangue, impedindo a coagulação e

evitando assim as trombozes. A substância também impede a formação de placas de gordura, que causam a diminuição do calibre das artérias coronárias e dificultam a passagem do sangue⁽⁴⁻⁶⁾. O gás está presente ainda em antiinflamatórios sintetizados recentemente, pois ele é útil também para combater a formação de úlceras gástricas⁽⁷⁻⁹⁾.

Um resultado das pesquisas sobre o óxido nítrico foi o desenvolvimento do Viagra, o remédio contra a impotência sexual que age fazendo com que os vasos sangüíneos relaxem e permitam a passagem do sangue — condição essencial para que ocorra a ereção.

1.2- A Importância biológica do NO

O NO induz as células brancas a destruir as células tumorais e bacterianas, e permite que neurotransmissores dilatam os vasos. Sua meia-vida é curta, de 6-10 seg; pela reação com O_2 e água é excretado via renal, como nitrito e nitrato.

O NO é aproximadamente tão reativo quanto o O_2 , mas ele age como um finalizador de cadeia e se une rapidamente a metais. O NO é removido por difusão em eritrócitos, onde ele lentamente se une à hemoglobina para produzir metahemoglobina, que se une prontamente ao O^{2-} , produzindo peroxinitrito ($O-N-O^{2-}$), um intermediário altamente reativo e tóxico⁽⁵⁾.

O óxido nítrico (NO) é um mediador endógeno de numerosos processos fisiológicos, destacando-se a sua participação no mecanismo de controle de pressão arterial, dos impulsos nervosos e do sistema biológico^(7,8).

Ao contrário de muitos mediadores biológicos, as propriedades do NO *in vivo* são determinadas pela sua química singular e sua habilidade em se difundir livremente no meio fisiológico, bem como pela facilidade com que forma complexos com os íons Fe(II) presentes nas proteínas^(9,10).

O NO pode apresentar numerosas reações, e estas muitas vezes resultam na formação de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio (ERNO). Na tentativa de determinar a pertinência destas diversas reações para sistemas biológicos, tem-se desenvolvido a química biológica do óxido nítrico⁽⁸⁾.

O esquema a seguir classifica as reações químicas do NO em duas categorias básicas de efeitos diretos e indiretos⁽¹¹⁾.

Esquema 1: Efeitos biológicos diretos e indiretos do NO⁽¹¹⁾.

Reações químicas diretas são aquelas em que o NO interage diretamente com o alvo biológico. Essas reações geralmente são rápidas e majoritárias dos efeitos do NO *in vivo*. Inversamente o efeito indireto envolve outras espécies reativas de nitrogênio e oxigênio (ERNO), geralmente derivados das reações entre NO e O₂ ou superóxidos (O₂⁻). Efeito indireto requer concentrações de NO muito mais altas que o efeito direto. Portanto, o NO produzido em baixas concentrações por um curto período de tempo mediará principalmente efeitos diretos, enquanto que efeitos indiretos ocorrerão em regiões onde concentrações maiores de NO são sustentadas por prolongados períodos de tempo.

O entendimento da atuação do NO no organismo tem implicações diretas* na prevenção e tratamento de diversas enfermidades como câncer, doenças cardiovasculares, diabetes, artrites e impotência.

Todavia, ocorre que as elevadas concentrações de NO existentes em * situação de choque séptico promovem um indesejável efeito vasodilatador^(5-6,12-14) nas paredes dos vasos, permitindo a passagem de fluidos vitais para os tecidos, conduzindo ao inchaço e à queda de pressão sangüínea e, conseqüentemente, promovendo sério risco de vida.

Se nestas circunstâncias, concentrações elevadas de NO são * indesejáveis, o mesmo não ocorre em caso de infarto, quando é necessário um aumento imediato da concentração de NO para promover a vasodilatação^(6,12-16).

Portanto, torna-se evidente a importância de fármacos que possam auxiliar no controle do teor de NO *in situ*, quer agindo como vasodilatadores (liberadores de NO), ou como vasos constritores (captadores de NO).

Este conhecimento poderá permitir a utilização de centros metálicos para ativar o NO via coordenação*. Neste sentido, diversos complexos do tipo *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄L]ⁿ⁺ já foram sintetizados e estudados pelo Prof. Dr Douglas Wagner Franco, e seus colaboradores no IQSC-USP⁽¹⁷⁻²¹⁾.

1.3- Considerações sobre a química do rutênio

Desde a descoberta do papel do óxido nítrico (NO) em processos biológicos⁽²¹⁾, há consideráveis esforços para desenvolver compostos capazes de agir como carregadores de NO. Compostos coordenados contendo o centro metálico como ferro, rutênio e ósmio, os quais pertencem à mesma família da tabela periódica, são bons modelos para carregadores de NO⁽²¹⁾.

A química dos metais de transição está intimamente relacionada aos seus diferentes estados de oxidação. O rutênio é um bom modelo para diversos estudos, devido à diversidade de estruturas e ligações, e de seus múltiplos estados de oxidação; este metal pode apresentar até dez estados de oxidação, que variam do estado -II até +VIII (com exceção do -I); os estados de oxidação mais comuns são o +II e +III⁽²²⁾.

Tanto no estado de oxidação II como III, os complexos de Ru apresentam-se bastante inertes em relação à troca de ligantes enquanto a mudança nos estados de oxidação $\text{Ru}^{(\text{II})/(\text{III})}$ e $\text{Ru}^{(\text{III})/(\text{II})}$, é bastante simples, sendo utilizada na síntese de complexos nesses dois estados de oxidação.

As aminas de rutênio(II), a partir da década de 60, foram estudadas mais intensamente⁽²³⁻³³⁾, tendo sido o fato de poder comparar os complexos de rutênio com similares análogos de Co(III) e Rh(III) o principal interesse inicial do estudo. O Ru(II) tem sua densidade eletrônica aumentada devido à doação de elétrons do ligante para o metal na formação da ligação sigma. Estes complexos não deveriam ser estáveis se o metal não possuisse o mecanismo de ligação reversa "back-bonding", capaz de diminuir sua densidade eletrônica, mecanismo este sugerido por Nyholm e Taube⁽³⁴⁾. O mecanismo de ligação

reversa foi justificado após Allen e Senoff⁽³⁵⁾ terem isolado o primeiro íon complexo de Ru(II) com ligantes insaturados.

Aminas de rutênio do tipo *trans*-[Ru(NH₃)₅N₂]²⁺, e uma série de íons complexos de Ru(II) com ligantes insaturados também foram obtidos e justificados pela ligação reversa.

Aminas de rutênio tipo *trans*-[Ru(NH₃)₄LL']ⁿ⁺ são particularmente interessantes desde que sejam solúveis em água e sua reatividade e síntese sejam bem conhecidas. Em geral, esses compostos são robustos em solução aquosa, mas são facilmente ativados para liberar NO através de fotoquímica ou redução química.

Sob condições experimentais apropriadas, a reatividade dessa classe de compostos deveria ser ditada principalmente pela distribuição eletrônica ao longo do eixo L-Ru-NO. Portanto, propriedades tais como o potencial redox (NO⁺/NO⁰) e a labilidade do ligante NO⁰ podem ser controlados pela criteriosa escolha do ligante L⁽³⁶⁾.

Sendo assim, um estudo sistemático de íons complexos *trans*-[Ru^{II}(NO⁺)(NH₃)₄L]³⁺, permite que haja uma melhor compreensão sobre a reatividade térmica, fotoquímica e eletroquímica dos ligantes NO⁺ e NO⁰.

1.4- Complexos de rutênio coordenados com NO

Existem vasodilatadores bem conhecidos como a nitroglicerina e o nitroprussiato de sódio, os quais entretanto apresentam sérios inconvenientes. A nitroglicerina⁽⁵⁾ é pouco tolerada pelos pacientes e o nitroprussiato de sódio, ativado por redução intracelular por liberar três íons CN^- por cada molécula de NO, necessita que sua administração seja efetuada de forma extremamente controlada^(6,37). Recentemente⁽³⁷⁻⁴⁰⁾ nitrosotióis RSNO derivados de glutathione, terc-butiltiol e trifenilmetiltiol, têm despertado interesse como possíveis liberadores de NO *in vivo*.

É crescente o emprego de complexos metálicos como fármacos^(4,5,41,42). Por exemplo, recentemente a Johnson & Matthey^(37,41) divulgou estarem em fase de testes clínicos complexos de rutênio^(37,41) com ligantes amino-carboxílicos tipo HEDTA, os quais apresentam propriedades vasoconstritoras. Sistemas semelhantes encontram-se estudos em Laboratórios Universitários^(43,44).

A modelagem de novos fármacos que possam auxiliar como "tampões de NO", bem como no desenho de catalisadores que possam auxiliar a remover o NO dos gases de escape de motores de combustão, exige conhecimento de como controlar a reatividade da molécula de NO em determinado centro metálico.

As aminas de rutênio (II) e (III) são inertes^(45,46), com respeito a reações de substituição, e a interconversão dos estados de oxidação do centro metálico, II e III, é termodinamicamente e cineticamente favorável, ocorrendo sem alterações na esfera de coordenação. Assim, a síntese e a purificação de complexos do tipo *trans*- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{L}(\text{NO})]^{3+/2+}$ torna-se acessível, possibilitando o estudo de suas propriedades. As aminas, ligantes inertes, encontram-se no plano equatorial e o extenso conhecimento

acumulado⁽⁴⁵⁻⁵⁰⁾ em compostos do tipo $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{L}_1\text{L}_2]^{\text{n}+}$ demonstra que as propriedades dos ligantes L_1 e L_2 , em posição *trans* na esfera de coordenação, são basicamente dependentes da interação $\text{L}_1 - \text{L}_2$, via o centro metálico. Em outras palavras, variando-se L_1 , podem-se estudar os efeitos desta variação sobre as propriedades de $\text{L}_2 = \text{NO}$.

Outro fato não menos importante, para esses compostos, é a baixa toxicidade demonstrada por aminas de rutênio^(42,51). Assim, por exemplo, os complexos de rutênio $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{imN}]\text{Cl}_2$ e $[\text{RuCl}_3(\text{NH}_3)_3]$ apresentam baixa toxicidade possuindo inclusive uso farmacológico^(6,42). Testes de toxicidade em cultura de células para uma ampla gama de compostos tipo $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{L}(\text{NO})]\text{X}_3$, onde $\text{X} = \text{PF}_6^-$ e BF_4^- , $\text{L} = \text{isn}$, nic , 4 pic , py , pz , L-hist , imN , $\text{P}(\text{OEt})_3$, $\text{P}(\text{Ome})_3$ conduziram⁽⁵¹⁾ a valores de IC-50 inferiores e/ou comparáveis à maioria dos fármacos disponíveis no mercado. Acrescente-se a isto o fato de soluções aquosas dos compostos $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{L}(\text{NO})]\text{PF}_6)_3$; $\text{L} = \text{pz}$, isn , nic , imN e L-hist não demonstrarem sinal de decomposição por período de 15 dias^(52,53).

Cálculos quânticos *ab initio* (DFT)⁽⁵²⁾ no sistema $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{pz}(\text{NO})]^{3+/2+}$ e a análise dos produtos da redução química e eletroquímica dos íons $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{P}(\text{OEt})_3(\text{NO})]^{3+}$ ⁽⁵⁴⁾, $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{pz}(\text{NO})]^{3+}$ ⁽⁵²⁾, $[\text{Ru HEDTA NO}]^{2+}$ ⁽⁵⁵⁾ e $[\text{Ru cyclam}(\text{NO})\text{Cl}]^{2+}$ ⁽⁵⁶⁾, indicam que o centro metálico de Ru(II) , nestes compostos, não sofre oxidação a Ru(III) em potenciais de até +1,4 V (*versus* ECS) e que a adição de 1 elétron a estes íons conduz à redução do ligante NO^+ a NO^0 , com dissociação posterior da molécula neutra do complexo de rutênio⁽⁴⁷⁾:

Torna-se, portanto, de interesse, o conhecimento das constantes de velocidade específica para a reação⁽⁴⁷⁾:

Os valores de k_{-1} , em casos favoráveis, poderão vir a serem determinados por vias eletroquímicas. Esses valores de k_{-1} deverão ser extremamente úteis na modelagem de potenciais fármacos. Assim, os compostos que liberarem NO mais rapidamente serão bons modelos^(6,54) de fármacos vasodilatadores. Os aquo ou cloro complexos, $\textit{trans}\text{-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{L}(\text{X})]^{n+}$, $\text{X} = \text{H}_2\text{O}$ ou Cl^- , correspondentes ao $\textit{trans}\text{-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{L}(\text{NO})]^{2+}$ em que dissociações do ligante NO ocorrem lentamente, serão potencialmente bons candidatos a captadores^(56,57) de NO, sendo portanto, vasoconstritores.

1.5-Complexos de rutênio coordenados com SO_4^{2-}

A oxidação de SO_2 a SO_4^{2-} , catalisada por complexos de metal de transição, é uma reação importante para o controle ambiental do SO_2 ^(58,59). Entretanto, o conhecimento do comportamento do sulfato como um ligante é de uma relevância considerável. O centro metálico rutênio(II)/aminas tem uma ligação muito forte⁽⁶⁰⁾ com SO_2 , HSO_3^- e SO_3^{2-} , mas tem pouca afinidade por SO_4^{2-} . Conseqüentemente, o Ru(III) exibe um centro com forte afinidade por SO_4^{2-} . Com isso, complexos de sulfatos são usados como intermediários⁽⁶⁰⁾ na preparação de complexos de trans- $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_4\text{LL}']^{\text{II}}$ ($\text{L}=\text{L}'$, $\text{L} \neq \text{L}'$), onde um dos ligantes pode ser a molécula de óxido nítrico.

Os ligantes NH_3 em tetraaminrutênio são ligantes inertes em relação à reação de substituição⁽⁶¹⁾, então complexos trans- $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_4\text{LL}']^{\text{II}}$ são bons modelos para estudar as propriedades químicas de L e L', em função do estado de oxidação do centro metálico.

1.6-Óxidos de Molibdênio

A redução eletroquímica da espécie Mo(VI) pode conduzir à formação de filmes com importantes propriedades electrocrômicas e vários estudos têm comparado os materiais obtidos eletroquimicamente, com aqueles preparados pelo método clássico, que envolve a deposição do sólido por evaporação a vácuo, obtendo-se resultados bastante satisfatórios⁽⁶²⁾. Tais investigações têm conduzido a pesquisas paralelas, as quais envolvem a modificação de eletrodos sólidos por deposição eletroquímica de óxidos de metais com estado de oxidação misto⁽⁶³⁾.

Este campo de pesquisa apresenta interesse crescente em eletroanalítica uma vez que estes compostos podem atuar efetivamente na transferência de elétrons para substratos cujos processos de redução são irreversíveis em superfícies não modificadas⁽⁶⁴⁾.

Os filmes apresentam alterações físicas e químicas em função do potencial, algumas delas particularmente importantes em processos de redução eletroquímica, nos quais átomos de oxigênio são abstraídos de substratos como iodato e bromato⁽⁶⁵⁾. No que tange aos óxidos de molibdênio, duas classes diferentes têm sido caracterizadas: os "bronzes" de molibdênio, H_xMoO_3 , em que há inserção de átomos de hidrogênio no material inicial e os óxidos reduzidos, MoO_{3-x} , nos quais os compostos não estequiométricos são formados⁽⁶⁶⁾.

A deposição de filmes de molibdênio a partir de soluções de Mo(VI) em meio ácido conduz a filmes com características bastante peculiares, no que concerne à atividade catalítica perante a redução de oxiânions como bromato⁽⁶⁷⁾ e iodato⁽⁶⁸⁾.

As espécies de Mo(VI) apresentam comportamentos químico e eletroquímico bastante complexos em solução, altamente dependentes do pH e da concentração, com inúmeros equilíbrios de polimerização⁽⁶⁹⁾ e versatilidade em aplicações⁽⁶⁸⁾. Bronzes de molibdênio e de tungstênio, na forma de cristais, têm sido usados como sensores eficientes para pH em titulações⁽⁷⁰⁾, após imobilização física na superfície de eletrodos. Estudos anteriores demonstraram a possibilidade de modificação de eletrodo de carbono vítreo por procedimentos voltamétricos sucessivos, conduzindo à formação de um filme de bronzes ou óxidos não-estequiométricos de molibdênio na superfície⁽⁶⁸⁾.

Eletrodos eletroquimicamente modificados por óxidos de molibdênio como sensores-testes em potenciais suficientemente positivos para ocorrência de processo anódico, podem ser utilizados para verificar o processo eletroquímico da molécula de NO em solução.

1.7- Técnicas Eletroquímicas

1.7.1- *Cronoamperometria*

A cronoamperometria é uma técnica eletroquímica que estuda a variação da resposta da corrente com o tempo sob potencial controlado. Sua aplicação ocorre principalmente nos estudos que envolvem processos de adsorção de espécies eletroativas na interface eletrodo/solução. Conforme o esquema da Figura 1, a corrente resultante se deve a um degrau de potencial onde não ocorre reação no eletrodo, até um potencial correspondendo à corrente limitada pelo transporte de massa, num sistema simples $O + ne^- \rightarrow R$, onde só O ou R estão inicialmente presentes⁽⁷¹⁾.

Figura 1. Degrâu de potencial para obter uma corrente limitada por difusão das espécies eletroativas⁽⁷¹⁾

Neste sistema, à corrente de origem faradaica, I_f , ocorre somente pela transferência de elétrons e no eletrodo planar a corrente é expressa pela equação de Cottrell⁽⁷²⁾.

$$I_{f(t)} = \frac{nFAD^{1/2}c_{\infty}}{(\pi t)^{1/2}} \quad (3)$$

Contudo, quando se varia o potencial, a dupla camada é carregada, dando lugar à corrente capacitiva, I_c . A curva $I-t$ resultante (cronoamperograma) está esquematicamente representada na Figura 2. A corrente capacitiva, I_c tende a cair a zero em menos de $50 \mu s$ e assim pode ser negligenciada para tempos maiores.

Figura 2. Evolução da corrente com o tempo ao aplicar-se um degrau de potencial a um eletrodo estacionário. I_c é a corrente capacitiva⁽⁷¹⁾.

Quando um processo de transferência de elétrons é rápido, e $50 \mu s$ é um tempo muito longo, recomenda-se o uso de um microeletrodo⁽⁷¹⁾. Para um degrau de potencial, ΔE , aplicado a um elemento RC em série, obtemos a seguinte equação⁽⁷¹⁾:

$$I_c = \frac{\Delta E}{R} \exp(-t / RC) \quad (4)$$

Na célula eletroquímica, R é a resistência da solução, R_Ω , independe da área do eletrodo, e C é a capacitância da dupla camada, C_d , depende diretamente da área do eletrodo. Assim, I_c é exponencialmente proporcional ao tempo. Uma vez que I_f é proporcional à área do eletrodo, como mostra a Figura 1, a razão I_f/I_c aumenta com a diminuição da área do eletrodo⁽⁷¹⁾.

1.7.2- Cronoamperometria de duplo degrau de potencial

Nessa técnica, o potencial é alterado entre dois valores, às vezes repetidamente, Figura 3. O segundo degrau inverte a reação do eletrodo. Considera-se o degrau inicial, um potencial onde não ocorre reação no eletrodo até um valor correspondente à corrente - limite de redução (somente a espécie O está inicialmente presente na solução); para $t = \tau$, o potencial regressa ao seu valor inicial e ocorre a oxidação de R que foi produzido na superfície de eletrodo. As equações para um eletrodo plano são⁽⁷¹⁾:

$$0 < t < \tau \quad I = -nFAD_o^{1/2}[O]_\infty / (\pi t)^{1/2} \quad (5)$$

$$t > \tau \quad I = nFAD_o^{1/2}[O]_\infty \{ [\pi(t-\tau)]^{-1/2} - (\pi t)^{-1/2} \} \quad (6)$$

A expressão (6) mostra que se obtém uma resposta de Cottrell convencional para uma oxidação, sobreposta à continuação do perfil da reação de redução. Foram derivadas expressões para o controle cinético num dos dois degraus e em ambos os degraus^(73,74).

Figura 3. Degrau de duplo potencial. (a) Variação de E com t ; (b) Variação esquemática de I com t ⁽⁷¹⁾.

Existem várias aplicações para essa técnica, como por exemplo, se o produto da reação inicial é consumido em solução por reações homogêneas, a análise da corrente de reoxidação mostrará a sua extensão e talvez a sua cinética. No caso de O ser reduzido para R e também para outras espécies a reoxidação de R dará informação sobre o par O/R . Se R for instável, nas condições onde o tempo de vida é significativamente maior que τ , então a

formação de R *in situ* e o estudo de sua reoxidação podem conduzir ao cálculo da velocidade de decaimento de R.

Quando a reação é controlada somente pelo processo de difusão, pela técnica de duplo degrau de potencial pode-se calcular a razão entre I_a/I_c , no qual as correntes I_a e I_c , estão representadas na curva de corrente *versus* tempo na Figura 3b, onde $t=t_f$ corresponde à corrente I_a e t_r a I_c , e $t_f = t_r - \tau$, então a razão entre as equações (5) e (6) podem ser escritas como⁽⁷⁵⁾:

Onde θ é $(t - \tau) / \tau$

$$\frac{I_a}{I_c} = 1 - \left(\frac{\theta}{1 - \theta} \right)^{1/2} \quad (7)$$

A Figura 4 mostra curvas de trabalho preparadas pela dependência da razão da corrente em função de $k\tau$ para vários tempos θ . Os valores de k (constante se velocidade) resultam diretamente do uso dessas curvas e de valores experimentais de I_a/I_c .

Figura 4: Curvas de trabalho de cronoamperometria de duplo degrau de potencial para o cálculo das constantes de velocidade⁽⁷⁶⁾.

1.8-Eletrodos modificados

A alteração intencional das características da superfície de um eletrodo, pela imobilização de um agente adequado, faz com que um sensor ofereça maiores recursos para determinações eletroanalíticas. A habilidade de manipular as propriedades dos eletrodos pode levar a uma variedade de efeitos atrativos dentre os quais a eletrocatalise, a prevenção de envenenamento da superfície, a seletividade e a pré-concentração⁽⁷⁷⁻⁸⁰⁾.

Os primeiros trabalhos envolvendo a preparação de eletrodos com superfícies modificadas surgiram no início da década de 70. Até então só eram utilizados eletrodos de materiais dito "inertes" tais como carbono, ouro, platina e mercúrio⁽⁸⁰⁾.

A preparação e utilização de EQMs (eletrodos quimicamente modificados) têm se expandido de forma bastante acentuada. Além da eletroanálise, que tem se destacado como uma das áreas mais ativas neste campo, os EQMs têm sido utilizados para outros fins não analíticos, incluindo estudos básicos de eletrocatalise, de cinética de transferência de elétrons, de permeação de membranas, síntese eletroorgânica e fotoeletroquímica⁽⁸⁰⁾.

A grande maioria das aplicações analíticas de EQMs envolve técnicas voltamétricas ou amperométricas. Entretanto também são descritos na literatura alguns casos de aplicações de EQMs como eletrodos íons seletivos⁽⁸⁰⁾.

Do ponto de vista analítico a sensibilidade e ou a seletividade de uma determinação deve aumentar com a utilização de um EQM para que

seu uso seja justificado. Isto pode ser obtido por meio de um ou mais dos seguintes fenômenos: pré-concentração, eletrocatalise e exclusão de interferentes. Em geral a obtenção de sensibilidades mais altas ocorre por pré-concentração da espécie de interesse ou por eletrocatalise, sendo que a aplicação de qualquer destes princípios resulta em inerente aumento da seletividade. Ganhos adicionais podem ser alcançados pela utilização de recobrimento com membranas poliméricas que bloqueiam o acesso de espécies interferentes à superfície do eletrodo⁽⁸⁰⁾.

❖ *Eletrocatalise*

Como em qualquer processo catalítico o objetivo da eletrocatalise é reduzir a energia de ativação da reação, no caso de uma reação envolvendo a transferência de elétrons. A redução ou oxidação de um substrato que apresenta uma cinética de transferência de elétrons lenta, na superfície do eletrodo, é medida por um sistema redox que pode trocar elétrons mais rapidamente com o eletrodo e o substrato nessa ordem (processo EC: eletroquímico - químico) ou na ordem inversa (processo CE: químico - eletroquímico), reduzindo o sobrepotencial de ativação. O sobrepotencial de ativação é o potencial adicional a E^0 , necessário para vencer a barreira da energia de ativação de uma dada eletrólise em um dado eletrodo, e manter a reação em uma dada velocidade. A redução do sobrepotencial de ativação aumenta a seletividade da medida porque permite a aplicação de potenciais de operação mais baixos, e a especificidade é inversamente relacionada à magnitude do potencial aplicado. Isto porque assim fica reduzida, ou mesmo eliminada, a possibilidade de que os potenciais de eletrólise de outras espécies presentes sejam atingidos⁽⁸⁰⁾.

Na Figura 5 está representada a interface eletrodo/solução para um eletrodo quimicamente modificado. A espécie eletroativa oxidada (Ox) recebe um elétron da superfície do eletrodo quando é aplicado um potencial, sendo reduzida a Red. Quando a varredura é invertida a espécie é novamente oxidada⁽⁸¹⁾.

Figura 5: Interface eletrodo solução para eletrodo quimicamente modificado.

❖ Pré - concentração

A sensibilidade das técnicas voltamétricas e amperométricas é diretamente relacionada à razão corrente faradaica (I_f) / corrente capacitiva (I_c). Os métodos que incluem uma etapa inicial de pré - concentração do analito, possibilitam um aumento na componente faradaica da corrente e, portanto, elevam a sensibilidade da técnica voltamétrica utilizada. Em geral a concentração da espécie acumulada é de 10 a 1000 vezes maior na superfície do eletrodo do que originalmente em solução⁽⁸⁰⁾.

A forma convencional de pré - concentração, principalmente para íons metálicos, é a eletrodeposição, mas sua aplicação em amostras reais é muitas

vezes limitada, ou pela presença de interferentes que são eletrodepositados juntamente com a espécie alvo, ou por ser o potencial de redução do íon de interesse muito negativo⁽⁸⁰⁾.

Em um EQM o fenômeno de pré - concentração envolve uma interação química (complexação, troca iônica, ligação covalente), entre a espécie a ser pré - concentrada e um agente modificador e, imobilizador a superfície do eletrodo⁽⁸⁰⁾.

Em eletrodos de pasta de carbono a pré-concentração pode ser decorrência de um fenômeno de partição. Esses eletrodos começaram a serem usados como EQMs na década de 70, modificados por adsorção de espécies eletroativas envolvendo ligações covalentes entre estas espécies e grupos de superfície do eletrodo ou ainda com as espécies eletroativas incorporadas na pasta e não diretamente ligados aos carbonos^(55,82,83).

❖ *Exclusão de interferentes*

A ação de interferentes, inibindo ou mascarando a resposta eletroquímica da espécie de interesse, pode ser devida aos seguintes fenômenos: passivação, competição do interferente com a espécie de interesse e eletrólise do interferente⁽⁸⁰⁾.

Uma maneira de promover exclusão, por meio físicos, é recobrir a superfície do eletrodo com uma membrana polimérica que possa, com base na carga e/ou tamanho bloquear o acesso do interferente, sendo permeável a espécies de interesse. Assim apenas esta chega até a superfície do eletrodo. Filmes tais como acetato de celulose ou Nafion, têm sido utilizados para este fim. Outra maneira de excluir interferentes, também fundamentada em interações eletrostáticas, é através da formação de monocamadas auto-arranjadas, que sejam seletivas⁽⁸⁰⁾.

1.8.1- Preparação de Eletrodos quimicamente modificados⁽⁸⁰⁾

❖ *Substrato Base*

A escolha do material do eletrodo a ser modificado, é muito importante na preparação de EQM. Este substrato deve apresentar características eletroquímicas apropriadas e também ser adequado para o método de imobilização selecionado. Entre os materiais convencionais estão: ouro, platina, carbono vítreo, mercúrio na forma de filme e pasta de carbono. Carbono vítreo reticulado, fibras de carbono, material plástico condutor e vidros condutores, estão incluídos entre os substratos menos usados.

❖ *Métodos de Imobilização do modificador*

➤ **Adsorção**

Adsorção, ou mais apropriadamente quimissorção, foi o processo pioneiro e é a maneira mais simples de fixar um modificador ao substrato do eletrodo base. Consiste na dissolução do agente modificador em um solvente apropriado, e na exposição, em geral por imersão, do eletrodo a esta solução.

Embora simples, esta técnica apresenta a desvantagem de produzir EQMs com no máximo uma monocamada do modificador imobilizado, o que limita a faixa de resposta linear. Além disso, sendo-se o fenômeno de adsorção um processo de equilíbrio, inevitavelmente ocorrerá desorção do modificador para o meio, durante a sua utilização, o que redundará em perda de reprodutibilidade, reduzindo, portanto, a vida útil do EQM assim preparado.

➤ **Formação de compósitos**

Um compósito é uma mistura de componentes, portanto outra forma de preparar um EQM é simplesmente misturar o agente modificador com o substrato do eletrodo. Esta técnica é adequada para modificar eletrodos à base de carbono em pó (grafite, negro de carbono, etc.), tais como: eletrodo de pasta de carbono, de grafite-epóxi, "screen - printed" e pastilhas.

➤ **Formação de ligação covalente**

O modificador pode também ser ligado covalentemente ao substrato do eletrodo. São empregadas, por exemplo, reações de silanização, envolvendo organosilanos e óxidos presentes à superfície do eletrodo. A maioria dos eletrodos metálicos, quando oxidados em meio ácido, é recoberta com uma fina camada de óxido, bastante reativa em relação a silanos. Portanto, um metal após ser oxidado pode ser silanizado e posteriormente reagir com uma molécula, contendo o grupo funcional que se queira imobilizar. O silano atuará como um tipo de ponte para fixar um grupo funcional específico à superfície do eletrodo.

Os eletrodos modificados via ligação covalente são mais estáveis em relação aos obtidos pelos demais métodos, entretanto são mais difíceis de preparar. Da mesma forma que a modificação por adsorção, esta metodologia também gera coberturas com no máximo uma monocamada imobilizada.

O recobrimento de eletrodos com filmes poliméricos deve ser feito com filmes condutores ou permeáveis ao eletrólito de suporte e à espécie de interesse. Dependendo da aplicação pode ser escolhido um polímero eletroativo (se o objetivo é uma catálise), quimicamente ativo (com propriedades de ligante ou de trocador iônico para pré-concentração), ou inerte (apenas exclusão de interesse). Os filmes eletroativos se subdividem em duas categorias principais,

dependendo de como o centro redox é imobilizado: polímero redox, se o centro redox é parte do esqueleto polimérico; e polímeros de troca iônica se o componente redox ativo é um contra-íon de um filme poli-iônico como polivinilpiridina ou Nafion.

CAPÍTULO 2

PARTE EXPERIMENTAL

2.1- Equipamentos

2.1.1- *Potenciostatos*

Os estudos voltamétricos e cronoamperométricos foram realizados em três equipamentos: um sistema constituído por Potenciostato BAS modelo CV-27, Amplificador de sinal BAS modelo PA-1, Gaiola de Faraday BAS modelo Stand C2 e registrador RXY BAS; Potenciostato da EG & G Princeton Applied Research modelo 273 A, interfaciado a computador 486 no qual está instalado o software M270 e bipotenciostato da AUTOLAB PGSTAT 30 (ECO CHEMIE) com gaiola de Faraday e interfaciado a computador PENTIUM III da DELL, no qual está instalada uma placa e um software GPES versão 4,8.

- *Célula eletroquímica*

Para as análises das soluções de NO construiu-se uma célula eletroquímica totalmente vedada (convencional de três eletrodos: eletrodo de trabalho disco de platina ou carbono vítreo, eletrodo de referência de Ag/AgCl saturado em KCl 3mol L⁻¹ e eletrodo auxiliar fio de platina) de acrílico, impedindo-se a entrada do gás oxigênio. A célula tem capacidade de 3 mL. Para as amostras de ABS (albumina bovina) a capacidade da célula é de 500 µL.

2.1.2- *Espectrofotômetro*

Os testes para NO através do método de Griess foram realizados em espectrofotômetro Hitachi modelo U - 2001.

2.1.3- *Infravermelho*

Espectros de infravermelho foram obtidos no equipamento FT-IR Spectrum BX (Perkin Elmer) utilizando-se uma célula de Refletância Total Atenuada (ATR) constituída de seleneto de zinco e diamante com 9 reflexões (DuraSamplIR) e FTIR 8300 acoplado a microscópio AIM 8800 da Shimadzu.

2.2- Construção dos Microeletrodos

Os microeletrodos de platina e ouro com diâmetros de 10, 25, 50 e 100 μm foram construídos enrolando-se as microfibras de platina ou ouro (Alfa AESAR e Goodfellow) em fios de Ni/Cr. Esses foram então introduzidos em um tubo de vidro (formato de uma pipeta de Pasteur) e selados por meio de aquecimento em bico de Bunsen. Após a selagem, introduziu-se cola de prata a fim de melhorar o contato elétrico entre as microfibras de platina e o fio de Ni/Cr e fechou-se a parte de cima do tubo de vidro com cola Araldite. Em seguida, os microeletrodos foram lixados com uma lixa de 400 mesh e posteriormente polidos com suspensão de alumina 0,3 μm . A Figura 1 mostra esquematicamente um microeletrodo construído pelo processo acima descrito.

Figura 6: Esboço da construção do microeletrodo.

A determinação do raio efetivo de um microeletrodo pode ser efetuada com base na equação que relaciona a corrente limite com o raio do microeletrodo. Tal procedimento foi empregado com o microeletrodo de raio nominal igual a $25\ \mu\text{m}$ e para tanto registraram-se voltamogramas de soluções de ferrocianeto em várias concentrações (1, 2, 3, 4 e $5\ \text{mmol L}^{-1}$) em KCl $1\ \text{mol L}^{-1}$. Com os dados da corrente limite de cada voltamograma obteve-se o gráfico de corrente limite em função da concentração das soluções de ferrocianeto. Sendo o coeficiente angular da reta igual a I_L / C e usando $D = 6,3 \times 10^{-6}\ \text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1(84)}$, pôde-se calcular o raio determinado do microeletrodo, igual a $(24,9 \pm 0,03)\ \mu\text{m}$.

2.3- Gás NO

2.3.1- *Aparelhagem para gerar o gás*

Para gerar o gás NO através da reação entre ácido nítrico e cobre, foi montada uma aparelhagem conforme mostra a Figura 7:

Figura 7. Representação da aparelhagem usada para gerar o gás NO.

2.3.2- *Cilindro do gás NO*

Com a finalidade de diminuir o tempo de preparo das soluções de NO, foi adquirido um cilindro do gás da Air Liquide do Brasil, com 99,9% de pureza. As

soluções de NO preparadas com o gás do cilindro, apresentaram resultados muito próximos das soluções nas quais o gás era gerado com a aparelhagem da Figura 7.

Figura 8: Representação do sistema utilizado para preparar solução de NO, a partir do cilindro do gás NO com 99,9% de pureza.

2.4- Determinação volumétrica do NO

Com a finalidade de comparar os resultados obtidos por cronoamperometria na determinação da concentração da solução saturada de NO, foi empregado um procedimento clássico envolvendo a oxidação química do NO. Para isso, o NO foi borbulhado em 10 ml do tampão fosfato ($\text{pH} \sim 7,4$) dentro de uma bureta (20 ml). Após 30 minutos de borbulhamento, essa solução foi adicionada a uma quantidade conhecida de solução de KMnO_4 acidificada e previamente padronizada. De acordo com a literatura o NO é quantitativamente oxidado a nitrato⁽⁸⁵⁾, e o excesso de KMnO_4 foi titulado com uma solução

acidificada de ferro(II), previamente padronizada, e o ponto final da titulação foi determinado por potenciometria.

2.5 - Experimentos coulométricos

Nos experimentos coulométricos foi utilizado como eletrodo de trabalho um poço de mercúrio, sendo que o contato elétrico foi feito através de um fio de platina. Durante os experimentos, o poço de mercúrio foi agitado com uma barra magnética e borbulhado gás Argônio na solução, para impedir a interferência de oxigênio.

2.6- Determinação das constantes de velocidade dos complexos de tetra Amin-rutênio com eletrodo rotativo de disco-anel

No estudo das constantes foi utilizado o mesmo bipotenciostado descrito no item 2.1.1. A este equipamento foi acoplado um módulo para rotação do eletrodo AFMT29T S/N 8486 da PINE, com eletrodo de disco-anel de carbono vítreo com os seguintes raios: $r_{\text{disco}} = 0,56 \text{ cm}$; $r_{\text{anel interno}} = 0,62 \text{ cm}$ e $r_{\text{anel externo}} = 0,79 \text{ cm}$. A temperatura dos experimentos foi ajustada utilizando-se um termostato da Ética, modelo CDC-49.

2.7- Soluções

2.7.1- *Solução tampão (pH~7,4)*

O gás NO gerado através da aparelhagem representados nas Figuras 7 e 8, foi borbulhado até saturação em uma solução de tampão fosfato (pH ~7,4). Essa solução foi preparada com 100 mL de H_2KPO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e 50 mL de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

2.7.2- *Solução para modificar o eletrodo de ouro com complexos do tipo $\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{LSSLRu}(\text{NH}_3)_5$ e $\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{LSSL}$*

A solução para modificar o eletrodo foi preparada com 1 mmol L^{-1} do composto em acetonitrila 70%, etanol 20% e água 10%. A solução foi borbulhada com gás argônio por 10 minutos.

2.7.3- *Soluções para modificar o eletrodo de carbono vítreo com filme de óxido molibdênio*

As soluções de Mo(VI) foram preparadas por dissolução do sal Na_2MoO_4 em água desionizada. Para os experimentos eletroquímicos envolvendo a deposição da camada de óxido de molibdênio, foi borbulhado o gás argônio nas soluções, durante 15 minutos.

2.7.4 - Soluções para modificar o eletrodo de platina com xerogel e compostos tetra Amin rutênio

As soluções para modificar o eletrodo de platina recoberto com xerogel (sintetizado pelo grupo do Prof. Dr. Henrique Toma IQ/USP) foram preparadas com a adição de 1 mg do composto *trans*-[Ru(NH₃)₄(4-pic)NO]⁺³ em 1 mol L⁻¹ de LiClO₄ e borbulhou-se argônio por 20 minutos.

2.8- Eletrodos modificados

2.8.1 - Eletrodo de pasta de carbono com 4 - PVP (poli vinil piridina)

Com a finalidade de imobilizar os complexos de rutênio no eletrodo, preparou-se o eletrodo de pasta de carbono com 4 - PVP, misturando-se 0,2 g de pó de grafite, 0,1 g de Nujol e 0,08 g de 4 - PVP. Essa mistura foi prensada num tubo de acrílico que tinha como contato um fio de cobre.

2.8.2- Eletrodo de pasta de carbono quimicamente modificado

O EQM utilizado foi um eletrodo de pasta de carbono obtido através da mistura de 40 mg de sílica funcionalizada SF-AEATS ([3-(2-aminoetil)aminopropil]trimetoxissilano) com complexo de Ru(III)-EDTA e 20 mg de grafite (Aldrich, previamente seco em estufa, a 150^o C, por 4 horas) e uma gota de nujol. A pasta resultante foi acondicionada na

extremidade de um tubo de vidro de 5 mm de diâmetro interno, a qual contém um fio de cobre de 2 mm de profundidade para receber a pasta.

2.8.3- Eletrodo modificado com filme misto de óxido de molibdênio e compostos tetra Amin rutênio

As soluções de Mo(VI) foram preparadas por dissolução do sal Na_2MoO_4 em água desionizada (10 mM). Para os experimentos eletroquímicos envolvendo a deposição da camada de óxido de molibdênio, foi borbulhado o gás Argônio nas soluções durante 15 minutos. O eletrólito de suporte utilizado para modificar o eletrodo de ouro de tamanho convencional e microeletrodo de ouro (25 μm) foi uma solução de ($\text{Na}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{SO}_4$) pH~3. A formação do filme misto foi feita nessa solução (pH~ 3) desaerada.

2.9- Amostras de Albumina Bovina (ABS)

As amostras de albumina bovina (ABS) foram preparadas e cedidas pelo grupo de pesquisa da Professora Dr^a Ohara Augusto, IQ-USP.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1- O gás NO

3.1.1- *Solução saturada de NO*

Para saturar uma solução com NO é preciso borbulhar o gás durante 30 minutos na ausência total de oxigênio. Tal fato se deve à rápida reação do NO com oxigênio, formando-se NO_2^- ⁽⁸⁶⁾.

A maneira mais simples de preparar uma solução saturada seria através do uso de um cilindro de NO com borbulhamento do gás na solução desoxigenada. Devido à demora na entrega da válvula de inox utilizada no cilindro NO, a princípio optou-se por gerar quimicamente o gás NO. Para tanto, montou-se uma aparelhagem conforme representa a Figura 8.

Para gerar o gás testaram-se dois tipos de reações. A primeira delas foi a reação de nitrito de sódio com ácido sulfúrico, conforme mostra a equação abaixo:

Para isso foram colocados 50 g do sal de nitrito no balão onde ocorre a reação e no balão de adição foram colocados 125 mL de H_2SO_4 6 mol L^{-1} . A solução de NaOH 5 mol L^{-1} foi utilizada, pois eventuais traços de NO_2 formados

juntamente com o NO ficariam retidos na forma de nitrato na solução de NaOH segundo a equação abaixo:⁽⁸⁷⁾

Todo o sistema foi borbulhado com o gás argônio para remover o oxigênio presente, pois o NO na presença de O_2 forma NO_2 que eventualmente pode formar nitrito segundo as reações abaixo⁽⁸⁸⁾:

Nesse sistema observou-se que a reação ocorria com cinética rápida, formando-se NO_2 o qual deixava a atmosfera do balão de reação com coloração marrom, característica deste gás. Para resolver esse problema, tentou-se borbulhar o gás argônio por um tempo maior na tentativa de eliminar suposto oxigênio que ainda poderia estar presente no sistema, e mesmo assim continuou-se observando uma grande quantidade do gás NO_2 . Então, essa possibilidade de reação foi descartada.

O outro tipo de reação testada foi entre raspas de cobre metálico e ácido nítrico, que foi a escolhida para gerar o gás NO nesse trabalho. Essa reação possui uma cinética mais lenta, não apresentando grande formação de NO_2 . Para isso colocaram-se algumas raspas de cobre no balão de reação e no balão de adição HNO_3 ($d = 1,2 \text{ g / cm}^3$). Após todo o sistema ser borbulhado com argônio

por 30 minutos adicionou-se o ácido nítrico às raspas de cobre sob agitação. A reação de formação do gás NO pode ser verificada segundo a equação abaixo:

O gás NO formado foi borbulhado durante 30 minutos a fim de saturar a solução de tampão fosfato pH~7,4.

3.1.2- *Padronização da solução de NO*

3.1.2.1- *Estudos espectrofotométricos da solução saturada de NO*

Para padronizar a solução com NO foram feitos alguns testes espectrofotométricos utilizando-se o reagente de Griess (Solução de Sulfanilamida: Dissolveram-se 0,5 g de sulfanilamida em 100 ml de HCl a 20% (v/v) e solução de de N - (1 - naftil) Etilenodiamina Dihidrocloreto: Dissolveram-se 0,3 g do reagente sólido em 100 ml de HCl 1% (v/v)). A molécula de NO reage com esse reagente formando um complexo de coloração laranja. A solução de NO foi analisada no espectrofotômetro no intervalo de comprimento de onda de 500 a 700 nm. Os resultados obtidos foram discordantes com os da literatura⁽⁸⁸⁾, devido à dificuldade de se deixar a célula do espectrofotômetro totalmente isenta de O₂. Conseqüentemente o NO sofreu oxidação gerando preferencialmente NO₂ e NO₂⁻ e com isso, houve diminuição na concentração da espécie NO em solução ocasionando baixo rendimento na reação com o reagente de Griess, o qual formou preferencialmente um complexo de coloração violeta com o nitrito cujo espectro é mostrado na Figura 9.

Os resultados da Figura 9A são referentes à uma solução saturada de NO que deveria ter concentração próxima a 2 mmol L^{-1} e comparando com os resultados da Figura 9B, que está numa faixa de concentração de 1 a $40 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, foi obtida uma absorbância inferior ao esperado. Outro fato que pode ser observado na Figura 9A é o deslocamento de $\lambda_{\text{máx}}$, para uma região de maior comprimento de onda, em relação ao que era esperado na Figura 9B.

Figura 9: Espectros de absorção: (A) solução tampão fosfato ($\text{pH} \sim 7,4$) saturada com NO, dados experimental e (B) dados da literatura⁽⁸⁸⁾, curva analítica da solução de NO em tampão fosfato ($\text{pH} \sim 7,4$) na faixa de concentração de 1 a $40 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$.

3.1.2.2- Estudo realizado com espectrofotometria no infravermelho na solução saturada com NO

Outro teste feito na tentativa de caracterizar a presença de NO foi registrar o espectro de infravermelho usando-se uma célula de diamante. A molécula de NO apresenta bandas características na região de $1680\sim 1610\text{ cm}^{-1}$ e em $970\sim 950\text{ cm}^{-1}$ ⁽⁸⁸⁾.

A Figura 10 mostra um espectro de infravermelho da solução de NO e neste caso, observou-se a presença de uma banda característica em $1636,4\text{ cm}^{-1}$ comprovando com isso, a presença da molécula de NO na solução preparada.

Bandas nas regiões de 1167 cm^{-1} e 997 cm^{-1} de baixa intensidade estão relacionadas com a presença de nitrito na solução. Isso se deve ao mesmo problema ocorrido com a análise espectrofotométrica no visível, ou seja, a célula não permitia a vedação completa para que a solução ficasse isenta de O_2 .

Figura 10: Espectro de infravermelho da solução de tampão fosfato ($\text{pH}\sim 7,4$) saturada com gás NO.

3.1.2.3- Padronização de soluções de óxido nítrico por cronoamperometria utilizando microeletrodo de disco de platina

3.1.2.3.1- Estudos Eletroquímicos Preliminares com Microeletrodos

- Estudos Voltamétricos

Os microeletrodos construídos foram testados em solução de ferrocianeto $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ contendo KCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ a fim de verificar seu bom funcionamento. A Figura 11 mostra o voltamograma do microeletrodo de $25 \mu\text{m}$ em solução de ferrocianeto:

Figura 11: Voltamograma da solução de ferrocianeto 4 mol L^{-1} em KCl 1 mol L^{-1} , com microeletrodo de platina ($r = 25 \mu\text{m}$). $V = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

Com os registros dos voltamogramas da solução de ferrocianeto, podem-se comparar os resultados teóricos com os experimentais através da equação que relaciona a corrente limite de estado estacionário (I_L) com os parâmetros experimentais:

$$I_L = 4nFDCa \quad (15)$$

Na qual:

n = número de elétrons ($1 e^-$)

F = 96500 C

C = concentração ($\text{mmol L}^{-1} \times 10^{-6}$)

a = raio do microeletrodo (cm)

I_L = corrente limite no estado estacionário (A)

Durante a varredura de potenciais na faixa de 0 a + 500 mV, observou-se processo de oxidação anódica de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, conforme mostrado na equação abaixo:

A Figura 12 apresenta voltamogramas obtidos com microeletrodo de platina ($r = 25 \mu\text{m}$), trabalhando-se com soluções de diferentes concentrações da espécie eletroativa; neste caso foram registrados 5 voltamogramas para cada solução.

Os voltamogramas obtidos com velocidades relativamente lentas de 5 mV s^{-1} concordam perfeitamente com as previsões teóricas no sentido de que o fluxo intenso de material ocasionado pelo processo de difusão radial conduz a curvas $I \times E$ com formato sigmoidal. Neste caso, não são observados o empobrecimento do material eletroativo na camada de difusão nem o componente catódico, uma vez que o material gerado eletroquimicamente ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$) é rapidamente removido da camada de difusão. Também constata-se no gráfico da

Figura 12 que a corrente limite é proporcional à concentração da espécie eletroativa, conforme prediz a Equação 15.

Figura 12: a) Voltamogramas das soluções de ferrocianeto em KCl 1 mol L⁻¹: 0 (A); 1,0 (B); 2,0 (C); 3,0 (D); 4,0 (E) e 5,0 (F) mmol L⁻¹ de [Fe(CN₆)]⁴⁺ com microeletrodo de platina ($r = 25 \mu\text{m}$). Em b) gráfico da dependência de corrente limite em função da concentração de ferrocianeto ($V = 5 \text{ mV s}^{-1}$).

Com os resultados da equação da reta ($I(\text{nA}) = 0,586 + 6,318C_{[\text{Fe}(\text{CN}_6)]^{4-}}(\text{mmol L}^{-1})$, $R = 0,999$) do gráfico da Figura 12b pode-se calcular o valor exato do raio do microeletrodo, que foi de $(24,90 \pm 0,03) \mu\text{m}$, assumindo $D = 6,32 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ⁽⁸⁴⁾.

- Estudos cronoamperométricos

Com o microeletrodo de $r = 24,9 \mu\text{m}$ foram realizados estudos cronoamperométricos com o objetivo de confirmar a viabilidade de método proposto na literatura⁽⁸⁴⁾ para o cálculo independente da concentração da espécie eletroativa e seu coeficiente de difusão. O cronoamperograma referente a uma

solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, cujo comportamento eletroquímico reversível é bem conhecido na literatura, está representado na Figura 13.

Figura 13: Cronoamperograma da solução de ferrocianeto 20 mmol L^{-1} em $\text{KCl } 1 \text{ mol L}^{-1}$ com microeletrodo ($r = 24,9 \text{ }\mu\text{m}$). Pulso de potencial: 0 a +500 mV.

Segundo a literatura⁽⁸⁴⁾, através dos cronoamperogramas registrados em tempos longos pode-se plotar um gráfico que relaciona $I_d(t)/I_{d,ss}$ com $t^{-1/2}$ (Figura 14), e com base no valor do coeficiente angular da reta calcula-se o coeficiente de difusão empregando a equação 17:

$$I_d(t)/I_{d,ss} = 1 + (2/\pi^{3/2})\alpha(Dt)^{-1/2} \quad (17),$$

Na qual: $I_d(t)$ = corrente limite no tempo t

$I_{d,s}$ = corrente limite na estado estacionário

Figura 14: Gráfico referente à Figura 13 que relaciona $I_d(t)/I_{d,ss}$ com $t^{-1/2}$.

A equação da reta obtida foi $I_d(t)/I_{d,ss} = 0,93 + 0,35 t^{-1/2}$. Com esses dados o coeficiente de difusão calculado foi $(6,5 \pm 0,9) \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$, muito próximo ao da literatura que é $6,32 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, confirmando assim, o bom funcionamento do microeletrodo. Estes experimentos também comprovam que o procedimento empregado constitui-se em alternativa viável para a determinação da concentração da solução estoque de NO após a determinação do coeficiente de difusão com base no valor de $I_{d,ss}$ (Equação 15)

3.1.2.3.2- Oxidação eletroquímica do óxido nítrico

O comportamento eletroquímico do NO foi estudado na superfície de platina, ouro e mercúrio^(89,90). Dependendo das condições experimentais, a redução eletroquímica do NO pode levar até NH_3 ou a outros compostos intermediários, mas o sinal de corrente não pode ser usado como sinal analítico,

pois o oxigênio presente nos fluidos biológicos é uma espécie interferente. Por outro lado, existe a oxidação do NO envolvendo 1 elétron no primeiro passo, levando à formação do intermediário NO^+ por volta de +0,8 V (it. SCE) de acordo com a seguinte equação.

A formação do intermediário nitrosila NO^+ somente ocorre em alta concentração de próton e baixa atividade da água; o ácido nitroso torna-se a espécie predominante em soluções relativamente diluídas^(91,92)

Portanto, a principal reação no eletrodo na oxidação anódica do NO em tampão fosfato (pH~7,4) pode ser descrita segundo a equação abaixo.

Um procedimento comum para análise do NO sem interferência de nitrito ou outros ânions presentes em amostras biológicas envolve o uso de Náfon como uma membrana seletiva⁽⁹³⁾. A membrana de Náfon impede a passagem e conseqüente oxidação do nitrito, que pode ser formado durante a preparação da solução saturada de NO. Essa camada tem que ser de espessura relativamente fina para que não impeça o transporte do NO à superfície de eletrodo, diminuindo com isso o sinal de corrente da oxidação do NO⁽⁹⁴⁾.

A presença de nitrito na solução de NO leva a resultados errôneos, pois o potencial de oxidação do nitrito é muito próximo ao do NO. Então, foram feitos vários testes de preparo da solução de NO até que a aparelhagem utilizada para gerar o gás NO (Figura 7), fosse otimizada de modo que não ocorresse a presença do nitrito na solução saturada de NO. Isso pôde ser comprovado pela análise da Figura 15, na qual voltamogramas da solução de NO que foram registrados antes e depois de remover a espécie da solução por borbulhamento de argônio, são representados.

Figura 15. Voltamogramas com microeletrodo de platina (raio = 25 μm) para a solução de tampão fosfato (pH~7,4) (A) e uma solução saturada de NO no mesmo eletrólito (B). O voltamograma (C) foi registrado após borbulhar argônio na solução (C) por 15 minutos. $V = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

O resultado do voltamograma (15C) coincide com o voltamograma do eletrólito de suporte e com isso, verificou-se que o nitrito não estava presente na solução. Esses experimentos confirmam que a única espécie presente na solução responsável pelo sinal apresentado no voltamograma da Figura 14B é a molécula de NO.

Para verificar se a oxidação anódica do NO na superfície da platina é controlada por difusão, foram registrados voltamogramas da solução saturada de NO com microeletrodos de disco de platina com diferentes raios ($r = 5; 12,5; 25$ e $50 \mu\text{m}$), como pode ser verificado na Figura 16a.

O gráfico, da Figura 16b mostra a corrente limite no estado estacionário em função do raio do microeletrodo ($I(\text{nA}) = -0,5 + 1,2 r (\mu\text{m})$, $r^2 = 0,999$), podendo ser observado que nestas condições de trabalho, a oxidação do NO é controlada somente por difusão.

Figura 16. a) Voltamogramas da solução saturada de NO em tampão fosfato ($\text{pH} \sim 7,4$), com microeletrodo de platina de diferentes raios: (B) 5; (C) 12,5; (D) 25 e (E) 50 μm . (A) eletrólito de suporte (tampão fosfato, $\text{pH} \sim 7,4$). $V = 5 \text{ mVs}^{-1}$. Em b), gráfico de dependência da corrente limite (medida em + 0,9 V) com o raio do microeletrodo.

3.1.2.3.3- Determinação eletroquímica da concentração de NO em solução saturada

A solução de NO foi preparada diretamente na célula eletroquímica, (Figura 7 na parte experimental) e os experimentos cronoamperométricos foram registrados durante degrau de potencial de + 0,200 para + 0,900 V.

A Figura 17 mostra o cronoamperograma da solução de NO saturada e o do tampão fosfato, que foi subtraído da curva $i \times t$ do NO para a realização dos cálculos.

Figura 17: Cronoamperogramas: solução de NO em tampão fosfato pH~7,4 (A) e solução de tampão fosfato pH~7,4 (B). Microeletrodo de Pt ($r = 24,9 \mu\text{m}$). Pulso de potencial: +0,20 a +0,9 V.

Com os resultados da Figura 17, obteve-se o gráfico que relaciona $I_d(t)/I_{d,ss}$ com $t^{-1/2}$ (Figura 18), a fim de calcular o coeficiente de difusão do

NO no meio de tampão fosfato (pH~7,4). Com isso, obteve-se uma reta $I_t/I_{ss} = 0,97 + 0,26 t^{-1/2}$, $r^2 = 0,997$. Com a Equação 21 que relaciona o coeficiente angular da reta com o coeficiente de difusão, obteve-se $D = (1,2 \pm 0,1) \times 10^{-5} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$.

$$(I_d(t)/I_{d,ss})/t^{-1/2} = 1 + (2/\pi^{3/2})\alpha(D)^{-1/2} \quad (21)$$

Figura 18. Gráfico referente à Figura 17 que relaciona $I_d(t)/I_{d,ss}$ com $t^{-1/2}$.

Este resultado foi comparado com o descrito por Dutta e Landolt⁽⁹⁵⁾, no qual preparou-se uma solução saturada de NO em 4 mol L⁻¹ de ácido sulfúrico. A fim de comparar esse resultado com o obtido pelo método proposto, o valor do coeficiente de difusão foi apropriadamente corrigido em relação ao tampão fosfato, levando-se em conta a razão dos valores de viscosidade de ambos eletrólitos de suporte. Assim, o valor obtido foi de $1,5 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$, que está próximo do valor encontrado nos experimentos de cronoamperometria.

A corrente limite em processos governados por transporte de massa para o microeletrodo é descrita pela seguinte equação:⁽⁹⁶⁾

$$I_L = 4nFDCr \quad (15)$$

Então, a corrente no estado estacionário foi medida no cronoamperograma da Figura 17 e usando-se o coeficiente de difusão calculado pelo método proposto ($D = (1,2 \pm 0,1) \times 10^{-5} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$) e raio do microeletrodo de $24,9 \text{ }\mu\text{m}$, segundo a Equação (15) a concentração da solução saturada de NO encontrada foi de $(2,1 \pm 0,3) \text{ mmol L}^{-1}$.

Entretanto, o valor encontrado pela técnica eletroquímica está muito próximo dos descritos na literatura, que estão por volta de 2 mmol L^{-1} em água a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ⁽⁹⁷⁾ e $22 \text{ }^\circ\text{C}$ ⁽⁹⁸⁾. Na temperatura $25 \text{ }^\circ\text{C}$, a concentração de NO em solução de tampão fosfato ($\text{pH} \sim 7,4$) o valor encontrado para solução saturada foi de $1,8 \text{ mmol L}^{-1}$ ⁽⁹⁹⁾.

A concentração da solução tampão saturada de NO foi checada por titulação volumétrica de acordo com o método descrito na parte experimental.

O resultado obtido, $(1,95 \pm 0,02) \text{ mmol L}^{-1}$, mostrou-se concordante com o valor encontrado pelo método proposto. Desta forma, os resultados descritos confirmam que a técnica cronoamperométrica pode ser usada para determinar o coeficiente de difusão e concentração de espécies eletroativas, desde que o número de elétrons transferidos seja conhecido, o processo seja governado por difusão e a área do eletrodo seja conhecida.

3.1.2.3.4- Determinação da concentração da solução de NO saturada com o gás do cilindro

A solução saturada de NO com o gás do cilindro foi preparada conforme o esquema da Figura 8, descrito na parte experimental. O gás foi borbulhado durante 15 minutos, após a solução tampão ser desoxigenada com argônio por 30 minutos. A Figura 19 mostra o voltamograma da solução saturada de NO e o voltamograma dessa solução após remover o NO da solução com gás argônio por 20 minutos.

Figura 19. Voltamogramas com microeletrodo de platina (raio = $24,9 \mu\text{m}$) para a solução de tampão fosfato (pH~7,4) (A) e uma solução saturada de NO no mesmo eletrólito (B). O voltamograma (C) foi registrado após borbulhar argônio na solução (C) por 20 minutos. $V = 5 \text{ mV/s}$.

O resultado do voltamograma (19C) mostra que a única espécie eletroativa presente na solução era o NO. Com a corrente limite do voltamograma (19B),

calculou-se a concentração da solução saturada com o NO do cilindro, utilizando a Equação (15) e o coeficiente de difusão obtido pelo método cronamperométrico.

O valor da concentração calculado foi de $2,2 \text{ mmol L}^{-1}$, o que está compatível com a concentração do $[\text{NO}] = 2,1 \text{ mmol L}^{-1}$, determinada para a solução saturada obtida a partir do esquema mostrado anteriormente na Figura 7 (parte experimental).

3.2- Estudos eletroquímicos dos complexos trans - $[\text{Ru}(\text{NH}_3)\text{LL}]^{n+}$

3.2.1- Complexos de rutênio coordenados com o ligante sulfato

Os experimentos eletroquímicos dos complexos de rutênio coordenados à molécula de SO_4^{2-} foram realizados com vários complexos, nos quais o segundo ligante eram moléculas orgânicas do tipo: 4- NH_2py , him, L-hist, 4-pic, py, 4-Clpy, nia, isn, 4-CNpy e pyz. Os registros voltamétricos e cronoamperométricos desses complexos foram realizados em ácido trifluoracético ($\text{pH} \sim 2$), como eletrólito de suporte.

Os registros dos voltamogramas da Figura 20 mostram que em velocidades de varreduras inferiores a 200 mV s^{-1} à temperatura de 25°C , a velocidade de saída do ligante SO_4^{2-} (formando o aquo-complexo) é muito alta, portanto não ocorre a oxidação da espécie Ru(II)SO_4 .

Figura 20: Voltamogramas da solução de $\text{trans-}[\text{RuSO}_4(\text{NH}_3)_4\text{isn}]^{+3}$ ($1,8 \text{ mmol L}^{-1}$), em CF_3COOH ($\text{pH} \sim 2,0$) a 25°C , em velocidades de varredura de 200, 300, 400 e 500 mV/s . Eletrodo de carbono vítreo ($r = 1,5 \text{ mm}$).

Todos os voltamogramas dos complexos de sulfato exibem um comportamento geral, que pode ser explicado através das equações abaixo, que representam comportamento típico de mecanismo EC⁽¹⁰⁰⁾

Nos voltamogramas da Figura 20, registrados com velocidades de varredura variando de 200 a 500 mV s⁻¹, pode-se verificar a presença da onda referente ao processo de redução do Ru(III) a Ru(II) tendo o ânion SO₄²⁻ como ligante (20A). A onda 20B corresponde, ao processo de oxidação do aquo-complexo. Nessas condições, não foi possível determinar as constantes de velocidade, pois não ocorre a oxidação do Ru(II) a Ru(III) tendo o ânion SO₄²⁻ como ligante. Este processo só corre em velocidades de varreduras acima de 500 mV s⁻¹, como pode ser visto no voltamograma da Figura 21.

Figura 21: Voltamograma da solução de $\text{trans-}[\text{RuSO}_4(\text{NH}_3)_4\text{isn}]^{+3}$ ($1,8 \text{ mmol L}^{-1}$), em CF_3COOH ($\text{pH} \sim 2,0$) a 25°C , em velocidade de varredura de 800 mV s^{-1} . Eletrodo de carbono vítreo ($r = 1,5 \text{ mm}$)

3.2.1.1-Determinação das constantes de velocidades por cronoamperometria de duplo degrau de potencial

Na determinação da constante de velocidade da etapa química com a técnica de cronoamperometria de duplo degrau de potencial, os potenciais limite foram determinados de acordo com as ondas de redução e oxidação nos voltamogramas de cada complexo. Monitorou-se então a variação da corrente durante os processos catódico e anódico, conforme mostram os registros cronoamperométricos da Figura 22.

Figura 22. Cronoamperograma de duplo degrau de potencial do complexo (A) $[Ru(NH_3)_4L SO_4]^{3+}$ ($L = 4\text{-pic}$), em (B) CF_3COOH ($pH \sim 2$). Potenciais limite = $+0,10 V$ e $-0,20V$.

Os cálculos das constantes de velocidade foram feitos com base em curvas de trabalho descritas na literatura (Item 1.7.2 da introdução).

Os experimentos cronoamperométricos de duplo degrau de potencial para esses complexos à temperatura de $25^\circ C$, foram realizados em intervalos de tempo muito curtos, menores que $0,05s$ para cada degrau de potencial aplicado. A Tabela 1 apresenta os valores das constantes obtidos nessas condições.

TABELA 1: Constantes de velocidades específicas (k_{sulfato}) para os íons complexos *trans* - $[\text{Ru SO}_4(\text{NH}_3)_4\text{L}]^{+/-0}$ em $(25,0 \pm 0,2)^\circ\text{C}$, para reação:

LIGANTE	$k_{\text{sulfato}} / \text{s}^{-1}$
4-NH ₂ py	16,9
Him	16,3
L-hist	11,0
4-pic	7,5
py	4,0
4-Clpy	2,5
nia	5,5
isn	15,7
4-CNpy	4,8
pz	20,0

3.2.1.2-Determinação das constantes de velocidades por voltametria com eletrodo rotativo de disco-anel

Os estudos voltamétricos com eletrodo rotativo de disco-anel, foram realizados com a finalidade de calcular as constantes de velocidade dos complexos *trans*- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{L}_1\text{L}_2]^{n+}$ (em que $\text{L}_2 = \text{NO}$ ou SO_4^{2-}), através dos

processos descritos na literatura⁽¹⁰¹⁾, e comparar, assim, com os resultados obtidos pela técnica de cronoamperometria de duplo degrau de potencial.

Antes da realização dos experimentos com os complexos de rutênio, procedeu-se a uma etapa de otimização do bipotenciostato e seu módulo rotativo, utilizando-se para isso, um sistema eletroquimicamente bem conhecido: o par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-} / [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$.

Figura 23. Voltamogramas com eletrodo rotativo disco-anel em solução 1 mmol L^{-1} em $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ em $\text{KCl } 1 \text{ mol L}^{-1}$. No disco, com voltametria cíclica e velocidade de varredura de 20 mV s^{-1} : 4900 (A), 3600 (B), 2500 (C), 1600 (D), 900 (E), 400 (F) e 100 (G) rpm. No anel, potencial mantido fixo em $+0,5 \text{ V}$: A' - G'.

Conforme o esperado, no eletrodo rotativo disco-anel, obteve-se o sinal de oxidação do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ no disco (voltamogramas em preto 23A a 23 G) e de redução do produto eletroquimicamente gerado ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$) no anel (voltamogramas em vermelho, Figuras 23A' - G'). Ambos os sinais de corrente são registrados ao mesmo tempo e para altas velocidades de rotação, os sinais

de corrente tanto no disco, quanto no anel, se intensificam devido ao aumento da convecção da solução. Os estudos foram feitos em diferentes velocidades de rotação (100, 400, 900, 1600, 2500, 3600 e 4900 rpm), a fim de se avaliar o comportamento do eletrodo frente a um sistema reversível, e de se calcular seu "fator de coleta" para cada uma dessas velocidades, que devem ser iguais no caso de mecanismo controlado pelo transporte de massa.

Figura 24. Dependência das correntes de pico (I_p) com a raiz quadrada das velocidades de rotação do eletrodo para a oxidação do $[Fe(CN)_6]^{4+}$ no disco (A) e a redução do $[Fe(CN)_6]^{3+}$ no anel (B).

Nos processos reversíveis de eletrodo, controlados pelo transporte de massa, o sinal de corrente de pico deve variar linearmente com a raiz quadrada da frequência de angular, como de fato acontece e se observa na Figura 24. Isso ocorre tanto para a oxidação do $[Fe(CN)_6]^{4+}$ no disco, quanto para a redução do $[Fe(CN)_6]^{3+}$ no anel. As razões entre as correntes de pico no disco e

no anel (fatores de coleta) nas diferentes velocidades foram muito próximos entre si e então na ordem de 0,38.

Para os complexos de rutênio coordenados com o ligante sulfato os estudos voltamétricos com eletrodo rotativo de disco-anel foram feitos com velocidade máxima de 20 mV s^{-1} . Nessa velocidade, na temperatura ambiente, não foi possível calcular a constante de velocidade conforme foi mostrado no item anterior. Com isso, os experimentos para esses complexos foram feitos usando o eletrodo de disco-anel com a célula termostatizada à 4°C , pois nessa condição a velocidade de formação do aquo-complexo é mais lenta.

A Figura 25 mostra os voltamogramas do eletrodo rotativo disco-anel em velocidades de rotação de 100, 400, 900, 1600, 2500, 3600 e 4900 rpm de uma solução de *trans*- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(4\text{-pic})\text{SO}_4]^{3+}$, em CF_3COOH ($\mu = 0,10 \text{ mmol L}^{-1}$), à $T = 4^{\circ}\text{C}$.

Figura 25: Voltamogramas com eletrodo rotativo de disco-anel em solução $1,3 \text{ mmol L}^{-1}$ de $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(4\text{-pic})\text{SO}_4]^{3+}$, em CF_3COOH ($\mu = 0,10 \text{ mol L}^{-1}$). No disco voltametria cíclica, $V = 20 \text{ mV s}^{-1}$, velocidade de rotação: 100 G, 400 F, 900 E, 1600 D, 2500 C, 3600 B e 4900 A rpm. No anel potencial mantido fixo em 0,02 V. de A' a G'. $T = 4^\circ\text{C}$.

Com os valores de corrente obtidos nos voltamogramas da Figura 25, construiu-se um gráfico da razão $I_{\text{anel}} / I_{\text{disco}}$ em função do inverso da velocidade de rotação em radianos, Figura 26.

Figura 26: Gráfico que relaciona I_{anel} / I_{disco} em função do inverso da velocidade de rotação em radianos, de uma solução de $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(4\text{-pic})\text{SO}_4]\text{P}^+$, em CF_3COOH $\text{pH} \sim 2,0$ ($\mu = 0,10 \text{ mol L}^{-1}$). $T = 4^\circ \text{C}$.

De acordo com a literatura⁽¹⁰¹⁾, é possível relacionar os dados do gráfico da Figura 26 com a constante de velocidade, através da equação descrita abaixo:

$$\text{Coeficiente angular} = k D^{-1/3} \eta^{1/3} (0,51)^{-2/3} \quad (24)$$

Na qual:

k = constante de velocidade

D = coeficiente difusão

η = viscosidade do meio

Os coeficientes de difusão (D) dos complexos foram calculados através de experimentos voltamétricos com microeletrodo de platina. Com a equação característica para microeletrodo, pode-se calcular o D , sabendo-se o raio

exato do microeletrodo ($r = 24,9 \mu\text{m}$) e a concentração da espécie no meio de CF_3COOH ($\mu = 0,10 \text{ mol/L}^{-1}$) à 4°C .

$$I_L = 4nFDCr \quad (15)$$

O coeficiente de difusão para $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(4\text{-pic})\text{SO}_4]^{3+}$ encontrado foi de $3,4 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. Esse valor foi usado para todos os complexos, pois a variação de D entre os complexos é mínima.

A viscosidade da solução foi determinada através do viscosímetro da Brookfield Engineering Labs, Inc. Modelo LVDV 3, e o valor médio obtido para CF_3COOH ($\mu = 0,10 \text{ mol L}^{-1}$) à 4°C foi de $0,26 \times 10^{-3} \text{ P}$.

Os valores das constantes calculados, foram comparados com os valores encontrados por cronoamperometria de duplo degrau de potencial à 4°C . Resultados apresentados na Tabela 2 abaixo.

Tabela 2: Constantes de velocidades específicas (k_{sulfato}) para os íons complexos $\text{trans-}[\text{Ru SO}_4(\text{NH}_3)_4\text{L}]^{+/0}$ em $(4 \pm 0,2)^\circ\text{C}$, para reação:

LIGANTE	$k_{\text{sulfato}} / \text{s}^{-1}$ disco-anel	$k_{\text{sulfato}} / \text{s}^{-1}$ cronoamperometria
4-pic	1,8	1,5
py	1,0	0,9
nia	2,4	2,6
pz	4,5	4,8

Os resultados apresentados na Tabela 2 acima mostram uma concordância significativa dos valores de k entre as duas técnicas.

3.2.2- Complexos de rutênio coordenados com NO

A redução dos complexos de rutênio contendo NO conforme a Equação (25), leva numa primeira etapa à formação de molécula em que o NO aparece com a carga formal zero.

Nesta condição, a substituição do NO por moléculas do solvente é termodinamicamente favorável e o processo representado pela Equação 26 ocorre com cinética dependente da natureza do outro ligante alojado no composto de rutênio.

Estudos preliminares empregando-se voltametria cíclica confirmaram estas afirmações. Os voltamogramas cíclicos do composto *trans*-[Ru(NH₃)₄4-Pic NO]³⁺ registrados a 5 mV s⁻¹ apresentam E_{pc} = -0,20 V e E_{pa} = - 0,15 V. Aumentando-se a velocidade de varredura até 100 mV s⁻¹ observou-se a diminuição na razão I_A / I_B em razão da menor dissociação da molécula de NO formada no processo eletroquímico (Figura 27) relativo à redução da espécie NO⁺ coordenada ao centro metálico. A formação do aquo-complexo é favorecida em velocidades de varredura inferiores a 100 mV s⁻¹ à temperatura de 25°C.

A Figura 27 mostra os voltamogramas do complexo *trans* - $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(4\text{-pic})\text{NO}]^{3+}$ em várias velocidades de varredura.

Figura 27: Voltamograma da solução de *trans* - $[\text{RuNO}(\text{NH}_3)_4(4\text{-pic})]^{+3}$ ($1,2 \text{ mmol L}^{-1}$), em CF_3COOH ($\text{pH} \sim 2,0$) a 25°C , em velocidades de varredura de 100, 50, 20 e 10 mV/s . Eletrodo de carbono vítreo ($r = 1,5 \text{ mm}$). Em anexo, voltamograma do aquo-complexo.

Os voltamogramas da Figura 27 mostram o par de ondas redox, (ondas A e B), referentes às espécies Ru(III)/Ru(II) com o ligante NO. A onda C mostra o processo de oxidação do aquo-complexo formado, onde esse processo ocorre em velocidades de varreduras inferiores a 100 mV s^{-1} . O anexo da Figura 27, mostra o voltamograma do complexo *trans* - $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(4\text{-pic})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$.

3.2.2.1- Determinação das constantes de velocidades por cronoamperometria de duplo degrau de potencial

Os estudos voltamétricos e cronoamperométricos para os complexos tetraaminrutênio coordenados com a molécula de óxido nítrico foram efetuados da mesma forma que os complexos coordenados com a molécula de sulfato. A Tabela 3 mostra os resultados obtidos para as constantes de velocidades desses complexos.

Tabela 3. Valores das constantes de velocidade (k_{NO}) para os íons complexos $trans-[RuNONH_3)_4(L)]^{+0}$. $*k_{NO}/s^{-1}$ T = $(25,0 \pm 0,2)^{\circ}C$, pH ~ 2,0 (CF_3COOH).

LIGANTE	k_{NO} / s^{-1}
H ₂ O	0,04
Him	0,16
L-hist	0,14
4-pic	0,09
py	0,06
4-Clpy	0,03
nia	0,025
isn	0,043
ImC	4,0
pz	0,34

A diferença entre os valores de $k_{(NO)}$ para cada complexo está relacionada com a estrutura do ligante, por exemplo, o ligante picolina possui uma estrutura capaz de doar elétrons mais facilmente que a piridina, favorecendo com isso a substituição do ligante NO por uma molécula de água. Sendo assim, o complexo com o ligante picolina, apresenta um valor de k maior ($0,09\text{ s}^{-1}$), em relação ao complexo com o ligante piridina ($0,06\text{ s}^{-1}$).

3.2.2.2- Estudos relacionados com o número de elétrons envolvidos na redução do NO

Com a finalidade de estudar o número de elétrons envolvidos na redução do NO coordenado aos complexos de rutênio, foram feitos vários experimentos coulométricos utilizando-se uma célula eletroquímica com um eletrodo de trabalho do tipo "poço de mercúrio". O número de elétrons envolvido na redução do NO pode ser calculado através da carga gerada nesse processo mantendo-se o potencial de redução fixo.

Para verificar o bom funcionamento da célula eletroquímica foi feito um estudo envolvendo o íon Cd^{2+} , espécie cujo processo eletródico é bastante esclarecido na literatura⁽¹⁰³⁾. Nesse estudo foram utilizados 20 ml de uma solução de $CdSO_4$ $1,0\text{ mmol L}^{-1}$.

Na Figura 28 podem ser verificados os polarogramas sucessivos da solução (20 mL) de $CdSO_4$ ($1,025\text{ mmol L}^{-1}$), obtidos a cada 10 minutos de redução por coulometria, num potencial fixo de $-0,65\text{ V}$.

A quantidade total de carga foi obtida através da integração da corrente ao final de cada etapa coulométrica. O valor da carga resultou em

4,09 C. Com isto, pode-se calcular a quantidade de elétrons envolvidos no processo de redução como sendo igual a dois.

Figura 28. Polarogramas de uma solução de CdSO_4 $1,025 \text{ mmol L}^{-1}$, registrados sucessivamente a cada etapa do experimento coulométrico a $E = -0,65 \text{ V}$. $T_{\text{redução}}$ de cada etapa foi de 10 minutos.

Os estudos preliminares envolvendo os complexos foram iniciados pelo *trans*- $[\text{RuNO}(\text{NH}_3)_4(4\text{-pic})]\text{BF}_4$. O primeiro objetivo foi verificar o comportamento do complexo no eletrodo de Hg e para isto, foi registrado um voltamograma como mostra a Figura 29.

Figura 29. (A) Voltamograma da solução de *trans* - $[\text{RuNO}(\text{NH}_3)_4(4\text{-pic})]^{2+}$ ($1,0 \text{ mmol L}^{-1}$), em CH_3COOH ($\text{pH} \sim 2$) e (B) eletrólito suporte. Eletrodo de gota pendente de Hg. $V = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Na Figura 29 observa-se a presença de duas ondas de redução (29a) e (29b). A onda 29a representa a redução do NO^+ coordenado ao rutênio e a 29c a oxidação do rutênio formando o aquo-complexo. A onda 29b deve estar relacionada com a redução da molécula de NO^0 a um dos seus intermediários até chegar ao processo final que seria a redução até NH_3 . Essa relação pode ser observada registrando-se voltamogramas do complexo em várias velocidades de varredura. O gráfico da Figura 30 mostra que a razão entre I_b/I_a em função da velocidade de varredura diminui conforme a velocidade aumenta. Esse fato está relacionado com a quantidade da espécie NO^0 formada na superfície do eletrodo devido ao processo de redução do NO^+ do complexo. Em velocidades baixas a concentração da espécie NO^0 (formada na reação de substituição) na superfície do eletrodo é maior do que em velocidades altas, de

forma que uma maior quantidade de NO^0 pode se reduzir; como consequência, I_b/I_a aumenta. Esse mesmo processo já havia sido verificado no eletrodo de carbono vítreo.

Figura 30. Gráfico que relaciona a velocidade de varredura e a razão entre a I_p da redução NO^+ a NO^0 (I_a) e I_p da redução de NO^0 (I_b) para solução de $\text{trans-[Ru(NH}_3)_4\text{-picNO]}^{3+}$ em CF_3COOH ($\text{pH} \sim 2$). Eletrodo de gota de Hg. Voltamogramas obtidos na faixa de potencial +0,10 a -0,6 V.

Para verificar a quantidade de elétrons envolvidos na primeira onda de redução do NO, foi utilizado o mesmo procedimento descrito para o processo de redução do cádmio. Para isso foram registrados polarogramas de uma solução do complexo $\text{trans-[Ru(NH}_3)_4\text{-pic NO]}^{3+}$ ($n = 1,8579 \times 10^{-5}$ mol) em CF_3COOH ($\text{pH} \sim 2$), antes e depois de cada etapa da coulometria, Figura 31.

Figura 31. Polarogramas sucessivos da solução $trans-[Ru(NH_3)_4\text{-pic NO}]^{3+}$ $1,3 \text{ mmol L}^{-1}$ em CF_3COOH (pH ~ 2), após diferentes etapas da coulometria. Branco (-).

Nos experimentos de coulometria foi aplicado potencial de $-0,30 \text{ V}$ durante 20 minutos e o tempo final da reação foi de 180 minutos. A quantidade de carga envolvida no final do processo foi $2,06 \text{ C}$, com isso o número de elétrons encontrado foi de 1,13. Esse valor está coerente com o processo de redução do NO^+ no complexo como mostra a equação (28).

As reações abaixo mostram a formação do aquo-complexo após o processo de redução. Quando todo material foi reduzido na célula só haverá a espécie aquo. Para verificar se somente havia essa espécie em solução foi registrado o seu espectro na região do UV, como mostra a Figura 32.

Figura 32. Espectro da solução $\text{trans- [Ru(NH}_3)_4\text{4-pic NO]}^{2+}$ em CF_3COOH ($\text{pH} \sim 2$), após os experimentos de coulometria onde a espécie foi reduzida.

O espectro da Figura 32 mostra uma onda de absorção em 320 nm, que é característica da forma aquo do complexo e similar ao descrito na literatura⁽¹⁰²⁾.

3.2.2.3-Determinação das constantes de velocidades por voltametria com eletrodo rotativo de disco-anel

Os complexos coordenados com a molécula de NO à temperatura de 25°C apresentam uma cinética lenta para formação do aquo-complexo. Em função disso, nos estudos dos cálculos das constantes com eletrodo rotativo de disco-anel a temperatura foi elevada até 40°C, quando ocorre aumento da velocidade de reação. Isso pode ser verificado no voltamograma (Figura 33), de uma solução de *trans*-[Ru(NH₃)₄(4-pic)NO]³⁺, em CF₃COOH.

Figura 33: Voltamogramas da solução de *trans*-[RuNO(NH₃)₄(4-pic)]³⁺ (0,5 mmol L⁻¹), em CF₃COOH (pH~2,0) a 40°C, em velocidade de varredura de 20 mV s⁻¹. Eletrodo de carbono vítreo (r = 1,5 mm).

A Figura 33 mostra dois voltamogramas consecutivos, onde a onda de redução do aquo-complexo aparece apenas na segunda varredura, mostrando com isso a substituição do ligante NO pela H_2O .

Com esses complexos foram feitos os mesmos estudos de cálculos de k com o eletrodo rotativo, conforme já demonstrado anteriormente para os complexos com o ligante SO_4^{2-} .

A Figura 34, mostra os voltamogramas com eletrodo rotativo de disco-anel na solução de $trans-[RuNO(NH_3)_4(4-pic)]^{3+}$ em CF_3COOH ($pH \sim 2,0$) à $40^\circ C$.

Figura 34: Voltamogramas com eletrodo rotativo de disco-anel em solução $0,9 \text{ mol L}^{-1}$ de $trans-[Ru(NH_3)_4(4-pic)NO]^{3+}$, em CF_3COOH $pH \sim 2,0$ ($\mu = 0,10 \text{ mol L}^{-1}$). No disco voltametria cíclica, $V = 20 \text{ mV s}^{-1}$, velocidade de rotação: 400 (F), 900 (E), 1600 (D), 2500 (C), 3600 (B) e 4900 (A). No anel potencial mantido fixo em $+0 \text{ V}$ e A a F. $T = 40^\circ C$.

O valor do coeficiente de difusão para esses complexos a 40°C, foi de $3,12 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ e a viscosidade foi $0,12 \times 10^{-3} \text{ P}$.

A Tabela 4 mostra os resultados das constantes por esse método e pelo método de cronoamperometria de duplo degrau de potencial. Como pode-se verificar, os resultados apresentados mostram-se concordantes com os valores de k obtidos pelas duas técnicas.

Tabela 4: Constantes de velocidades específicas (k_{NO}) para os íons complexos *trans* - $[\text{Ru NO}(\text{NH}_3)_4\text{L}]^{+/0}$ em $(40 \pm 0,2)^\circ\text{C}$, para reação:

LIGANTE	$k_{\text{NO}} / \text{s}^{-1}$ disco-anel	$k_{\text{NO}} / \text{s}^{-1}$ cronoamperometria
4-pic	2,3	2,2
py	2,1	1,9
nia	1,9	1,7

3.3- Eletrodos modificados

3.3.1- Estudos preliminares para Imobilização dos complexos de rutênio na superfície de eletrodos sólidos

A imobilização de complexos de rutênio na superfície de eletrodos sólidos tem como finalidade capturar a molécula de NO em soluções e amostras biológicas, a intensificação do sinal analítico, e a minimização dos problemas associados a interferências na resposta eletroquímica originada eventualmente por proteínas e certos ânions (ascorbato, nitrito, nitrato, etc) existentes no plasma sanguíneo.

A primeira tentativa de imobilização foi feita através da silanização do microeletrodo de platina ($r = 25 \mu\text{m}$) com $\text{Si}(\text{OEt})_4$. Para isso, numa primeira etapa, oxidou-se a superfície da platina em solução de H_2SO_4 1 mol L^{-1} aplicando um potencial de 2V. A camada de óxido de platina formada, por ser muito fina, não apresenta vida útil suficiente para silanizar o eletrodo. Sendo assim, uma nova tentativa foi realizada e consistiu no preparo de um eletrodo de pasta de carbono com polímero 4 - PVP. Para verificar o funcionamento desse eletrodo foi registrado um voltamograma de uma solução de ferrocianeto 1 mmol L^{-1} . Verificou-se com isso, que o eletrodo apresentou-se em boas condições de trabalho.

A imobilização do complexo foi feita através de pré-concentração em sistema aberto, deixando o eletrodo em solução de *trans*- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{-pic SO}_4]^{3+}$ em CF_3COOH ($\text{pH} \sim 2$) por 2 horas. Após esse período foi registrado o voltamograma do eletrodo em eletrólito suporte. Conforme pode ser visto na Figura 35, o sinal do complexo aparece apenas na primeira varredura

(Figura 35A), sendo removido do eletrodo nas varreduras posteriores (Figuras 35B e 35C).

Em consequência disso, optamos por não utilizar esse tipo de eletrodo em estudos posteriores com a molécula de NO.

Figura 35. Voltamogramas do eletrodo de pasta de carbono com PVP ($r = 0,75$ mm) em solução de eletrólito suporte CF_3COOH ($\text{pH} \sim 2$) (C) antes da pré - concentração, (A) primeira varredura após a pré - concentração em solução $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{-pic SO}_4]^{3+}$ em CF_3COOH ($\text{pH} \sim 2$) por 2 horas e (B) Segunda varredura idem (A). $V = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

3.3.2.- Modificação do eletrodo com complexos binucleares e mononucleares e estudos eletroquímicos

Esses tipos de complexos podem ser binucleares com dois centros metálicos simétricos ligados pela ligação S-S e complexo mononuclear, como ocorre a presença de apenas um centro metálico. O outro ligante da ligação S-S é uma piridina. A Figura 36 mostra as estruturas dos complexos mono e binucleares.

Figura 36: Estruturas dos complexos de rutênio: mononuclear (A) e binuclear (B).

Dados descritos na literatura⁽¹⁰⁴⁾ sobre estudos de complexos com ligante pySSpy, indicam que a ligação S-S não é facilmente reduzida após estar coordenada aos centros metálicos: $[\text{Ru}(\text{CN})_5]^{3-}$, $[\text{Fe}(\text{CN})_5]^{3-}$ e $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5]^{2+}$.

Algumas tentativas com o intuito de quebrar essa ponte foram feitas, pois o ligante pySH, ao contrário da espécie pySSpy, quando coordenado a centros metálicos possui uma grande afinidade com ouro, e a adsorção é espontânea sobre a superfície metálica. Como já era esperado, essa tentativa não foi bem sucedida. Então, através de estudos da literatura^(105,106), verificou-se a existência de alguns compostos similares ao desse trabalho, onde a ligação na superfície do ouro é feita através dos elétrons livres dos átomos de enxofre, como mostra a Figura 37.

Figura 37: Esquema da modificação de eletrodo de Au com compostos que possuem ligações do tipo S-S.⁽¹⁰⁵⁾

A modificação foi feita ativando-se a superfície do ouro em solução de H_2SO_4 1 mol L^{-1} por 5 minutos, com varreduras de potencial de +1,7 a -0,2 V a 10 mV s^{-1} (300 ciclos). Após a ativação o eletrodo foi imerso por duas horas em solução 1 mmol L^{-1} do monocomplexo em acetonitrila 70%/ etanol 20%/ água

10%. A seguir, o eletrodo foi colocado em solução de CF_3COOH pH~2,0 ($\mu = 0,10 \text{ mol L}^{-1}$) e foram registrados os voltamogramas em várias velocidades de varredura (Figura 38)

Figura 38: Voltamogramas obtidos em várias velocidades de varredura usando-se eletrodo de Au modificado com complexo mononuclear, em solução de CF_3COOH pH~2,0 ($\mu = 0,10 \text{ mol L}^{-1}$).

Na Figura 38, verifica-se que quanto maior a velocidade de varredura maior o valor da intensidade de corrente. Utilizando-se os valores da variação da corrente de pico anódico em função da velocidade de varredura foi construído um gráfico (Figura 39), notando-se um aumento linear de corrente à medida que se aumenta a velocidade de varredura. Observou-se também que não ocorre perda significativa da material absorvido na superfície do eletrodo.

Figura 39: Dependência da corrente de pico anódica em função da velocidade de varredura, para o complexo mononuclear.

A quantidade de agente modificador foi avaliada medindo-se a carga referente ao componente anódico do voltamograma registrado a $50 mV s^{-1}$. A expressão para calcular o excesso superficial (Γ) é dada por⁽¹⁰⁷⁾:

$$\Gamma = Q / nFA \quad (31)$$

onde;

Q = carga envolvida no processo

n = número de elétrons envolvido no processo

F = constante de Faraday

A = área superficial do eletrodo

O valor de Q foi de $1,98 \times 10^{-6} \text{ C}$, a área do eletrodo igual a $0,071 \text{ cm}^2$ e considerando o número de elétrons envolvido no processo $n = 1$ o resultado estimado foi $\Gamma = 2,80 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$, com isso tem-se aproximadamente 3 monocamadas.

A modificação do eletrodo com o complexo binuclear foi realizada com o mesmo procedimento do complexo mononuclear. Os voltamogramas da Figura 40 mostram que na primeira varredura de potencial ocorre a presença de dois pares de ondas redox, referentes aos dois centros metálicos do complexo, os quais não são mais observados nas varreduras seguintes. Verifica-se desta forma, que o complexo não é estável na superfície do eletrodo.

Figura 40: voltamogramas consecutivos do eletrodo de Au modificado com complexo binuclear, em solução de CF_3COOH pH~2,0 ($\mu = 0,10 \text{ mol / L}$). $E = 200 \text{ mV s}^{-1}$.

Em virtude desses resultados obtidos na Figura 40, a modificação do eletrodo com o complexo binuclear foi descartada.

3.3.2.1- Eletrodo modificado com complexo mononuclear na solução de NO

Com o eletrodo de ouro modificado com o complexo mononuclear foram realizados alguns ensaios na solução de NO em tampão fosfato (pH~7,4). O eletrodo modificado foi imerso em tampão e registrado o voltamograma. Observou-se, que nessas condições, o complexo não apresenta um comportamento bem definido como na solução de pH~2,0, como mostra a Figura 41.

Figura 41. Voltamogramas da solução tampão fosfato, pH~7,4: eletrodo do ouro modificado com complexo mononuclear (A) e eletrodo de ouro polido (B). $V = 100 \text{ mV/s}$. $T = 25^\circ\text{C}$.

Os ensaios efetuados com o eletrodo modificado na presença da espécie NO em tampão fosfato não apresentaram resultados satisfatórios e isso pode ser verificado nos voltamogramas da Figura 42.

Figura 42: Voltamogramas: solução tampão fosfato, pH~7,4: eletrodo do ouro modificado com complexo mononuclear (A) e eletrodo de ouro polido (B). Solução de NO em tampão fosfato, pH~7,4: eletrodo do ouro modificado com complexo mononuclear (C) e eletrodo de ouro polido (D). $V = 100 \text{ mV} / \text{s}$. $T = 25^\circ \text{C}$.

No voltamograma do eletrodo modificado obtido na presença do analito (Figura 42C) não foi observada a onda do complexo, e o sinal de corrente de oxidação da espécie NO comparado com o eletrodo de ouro polido na solução de NO (Figura 42D), não mostrou variação perceptível.

Em potenciais muito positivos ocorre a dessorção do complexo devido à oxidação da superfície do ouro. Além disso, a ligação dos compostos em questão no eletrodo de ouro foi feita pela premissa de que a ligação deveria

ocorrer através dos pares de elétrons não ligantes disponíveis dos dois átomos de enxofre da ponte -S-S-. Pelos experimentos eletroquímicos realizados pode-se observar que essa ligação era fraca, pois a perda de material adsorvido na superfície do eletrodo foi significativa, como mostram os voltamogramas da Figura 42. Com isso, a possibilidade de usar esse tipo de complexo imobilizado na superfície de ouro para favorecer o processo de oxidação anódica do NO foi descartada.

3.3.3- Eletrodo de pasta de carbono quimicamente modificado com sílica SF-AEATS/Ru(III)-EDTA

O eletrodo de carbono quimicamente modificado foi preparado conforme descrito na parte experimental (2.8.2). Estudo eletroquímico do complexo $\text{H}[\text{RuCl}_2(\text{H}_2\text{EDTA})] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ imobilizado sobre a superfície da SF-AEATS descrito na literatura⁽¹⁰⁸⁾, apresenta resposta eletroquímica no intervalo de potencial de 0,8 a -0,8 V em eletrólito NaCF_3COO ($\mu = 0,2 \text{ mol / L}$), Figura 43.

Figura 43: Voltamogramas cíclicos das sílicas SF-AEATS (A) e SF-AEATS/Ru(III)-EDTA (B), 20 mV/s, $\mu = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$ em NaCF_3COO , à 25°C .

Os estudos voltamétricos obtidos em tampão fosfato (pH~7,4), mostraram respostas concordantes com os resultados apresentados na literatura⁽¹⁰⁸⁾ (Figura 43) como mostra a Figura 44.

Figura 44: Voltamogramas em tampão fosfato (pH~7,4): eletrodo de pasta de carbono (A) e eletrodo de pasta de carbono modificado com SF-AEATS/Ru(III)-EDTA (B), 100 mV/s, à 25°C.

O formato do voltamograma da Figura 44B apresenta-se um pouco distorcido em relação ao da Figura 43B. Isso se deve ao comportamento eletroquímico do complexo imobilizado na sílica em função do pH, às interações repulsivas entre os íons na superfície do material e à resistência do eletrodo, já que a sílica não é condutora⁽¹⁰⁹⁾.

Para verificar a atuação do eletrodo de pasta de carbono modificado com a sílica no processo de eletrooxidação do óxido nítrico, foi feito um estudo eletroquímico com o eletrodo de pasta de carbono modificado com a sílica, o qual foi comparado com o eletrodo construído apenas com pasta de carbono, em solução de NO (pH~7,4).

Os voltamogramas cíclicos da solução de NO (pH~7,4), na faixa de potencial -0,5 a 1 V, utilizando como eletrodo de trabalho os eletrodos de

pasta de carbono com a sílica e sem a sílica são mostrados na Figura 45. Como pode ser observado, o voltamograma da Figura 45D não demonstrou aumento significativo na intensidade de corrente de oxidação do NO em relação ao eletrodo de pasta de carbono (45C). A relação entre os sinais de correntes do eletrodo modificado com a sílica no eletrólito de suporte (45B) e em solução de NO (45D) é praticamente igual à relação dos sinais do eletrodo de pasta de carbono no eletrólito de suporte (45A) e na solução de NO (45C).

Figura 45: Voltamogramas: solução tampão fosfato (pH~7,4): eletrodo de pasta de carbono (A) e eletrodo de pasta de carbono modificado com SF-AEATS/Ru(III)-EDTA (B); solução de NO em tampão fosfato (pH~7,4): eletrodo de pasta de carbono (C) e eletrodo de pasta de carbono modificado com SF-AEATS/Ru(III)-EDTA (D) 100 mV s^{-1} , à 25°C .

Em função dos resultados obtidos na Figura 45, o uso do eletrodo de pasta de carbono modificado na presença do analito NO não mostrou vantagens

em relação ao eletrodo não modificado e além disso, o objetivo do trabalho é modificar um microeletrodo, o que não seria possível ser feito com a sílica modificada. Com isso, as utilizações desse tipo de eletrodo foram descartadas dos nossos estudos.

3.3.4- Eletrodo de platina modificado com xerogel de óxido bentonita-vanádio (V) e complexos $trans-[Ru(NH_3)_4L_1L_2]^{+n}$

Para imobilizar os complexos $trans-[Ru(NH_3)_4L_1L_2]^{+n}$ no eletrodo de platina, foi utilizado um "xerogel" de óxido de bentonita-vanadium(V)⁽¹¹⁰⁾. A superfície da platina foi recoberta com o xerogel e esse foi estabilizado em solução de $LiClO_4$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, com varreduras de potenciais de 50 mV s^{-1} na faixa de potencial de $0,5$ a $-0,5 \text{ V}$ (5 ciclos). Após a estabilização do xerogel, o eletrodo foi modificado adicionando-se 1 mg do complexo $trans-[Ru(NH_3)_4(4-pic)NO]^{+3}$ na solução de $LiClO_4$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Para verificar a imobilização do complexo novos voltamogramas foram obtidos com varreduras de potenciais (10 ciclos) na faixa eletroativa do complexo. ($0,8$ a $-0,6 \text{ V}$) a 50 mV s^{-1} , (Figura 46).

Figura 46: Voltamogramas consecutivos do eletrodo de platina recoberto com xerogel, na solução de $\text{trans-[Ru(NH}_3)_4(4\text{-pic)NO]}^3$ em LiClO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. $V = 50 \text{ mV s}^{-1}$. Em anexo voltamograma da solução de $\text{trans-[Ru(NH}_3)_4(4\text{-pic)NO]}^3$ em LiClO_4 1 mol L^{-1} , $V = 50 \text{ mV s}^{-1}$ com eletrodo de Pt.

Os voltamogramas da Figura 46, mostram um aumento no sinal da corrente de um ciclo para outro, indicando que o complexo está sendo adsorvido pelo xerogel. Para confirmar essa adsorção o eletrodo foi imerso em solução de LiClO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, e a seguir um novo voltamograma foi obtido confirmando a presença do complexo no eletrodo, pela presença das ondas catódica e anódica de meia-onda em torno de $-0,4$ a $-0,35 \text{ V}$ (Figura 46).

Figura 47: Voltamograma do eletrodo de platina recoberto de xerogel com $trans-[Ru(NH_3)_4(4-pic)NO]^+3$ adsorvido em $LiClO_4$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. $V = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

O eletrodo de Pt modificado foi então testado em uma solução tampão fosfato de $pH \sim 7,4$ visando sua aplicação futura em análise de NO em fluidos biológicos. Pelo voltamograma apresentado na Figura 48 é possível observar o alargamento das ondas características do complexo $trans-[Ru(NH_3)_4(4-pic)NO]^+3$ e também um alargamento dos seus potenciais de meia-onda.

Posteriormente, na tentativa de se obter um voltamograma no tampão fosfato, ocorreu o desprendimento do xerogel da superfície da Pt, já na primeira varredura de potencial.

Uma possível explicação para a instabilidade de gel no tampão fosfato pode ser dada devido à composição do gel que é formado a partir do ácido vanadílico ($H_xV_2O_7 \cdot nH_2O$, $x \sim 0,4$). Supõe-se que tenha ocorrido a hidrólise dos sítios ácidos do gel (que são responsáveis pela adsorção), no tampão

composto de KH_2PO_4 e NaOH , levando assim, a uma mudança na tensão interfacial sólido/líquido e sólido/sólido. A tensão interfacial é responsável pela adsorção do gel na superfície da platina (comunicação pessoal^{*}).

Figura 48: Voltamograma do eletrodo de platina recoberto de xerogel com $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(4\text{-pic})\text{NO}]^3$ adsorvido em tampão fosfato ($\text{pH} \sim 7,4$). $V = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

^{*} Dr. Fauze Jacó Anaissi, IQ-USP.

3.3.5- Modificação do eletrodo de carbono vítreo com óxido de molibdênio

Nessa nova etapa de trabalho o processo de modificação do eletrodo foi realizado através de procedimentos voltamétricos sucessivos com dez ciclos, entre os potenciais +0,2V e -0,8V, em solução de Mo(VI) com pH controlado.

Figura 49. Voltamogramas ciclos sucessivos obtidos com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} em solução 1 mmol L^{-1} em Na_2MoO_4 e 50 mmol L^{-1} em Na_2SO_4 , pH ~ 3 .

A Figura 49 ilustra a formação do filme da espécie de Mo sobre o eletrodo com dez ciclos sucessivos em pH ~ 3 . Pode-se observar o crescimento gradativo da corrente a cada ciclo. Uma vez reduzido, o MoI proveniente da solução permanece imobilizado na superfície do eletrodo possivelmente por efeito de redução da solubilidade. Sua reoxidação eletroquímica deve conduzir a uma espécie diferente da existente em solução, também pouco solúvel, permanecendo em superfície e incrementando o componente catódico no ciclo

subseqüente. Segundo Dong⁽⁶⁹⁾, a formação de filme deve ocorrer através da geração de uma espécie reduzida e não estequiométrica de Mo.

O eletrodo assim modificado, quando em solução de eletrólito suporte a pH controlado apresenta o comportamento voltamétrico no primeiro ciclo igual ao obtido no último ciclo de modificação. Em procedimentos voltamétricos sucessivos ocorre decréscimo no sinal de corrente (tanto catódico quanto anódico), estabilizando-se entre o quarto e o décimo ciclo com valores da ordem de 85-90% daqueles obtidos no primeiro ciclo. Desse modo, a modificação do eletrodo envolve também uma etapa de estabilização mediante a realização de dez ciclos voltamétricos em eletrólito suporte em pH ~3,0 para evitar a solubilização do óxido em meios mais ácidos.

3.3.5.1- Estudos envolvendo a oxidação da molécula de NO no eletrodo modificado

O comportamento eletroquímico do filme está mais bem caracterizado em meio ácido com valores de pH superiores a 2,0, nos quais evita-se a solubilização do filme. Como teste preliminar para utilização do eletrodo modificado para estudos com NO, foi verificada sua eletroatividade em pH fisiológico.

Figura 50: Voltamogramas obtidos com eletrodo modificado com filme de molibdênio, com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , em diferentes soluções. A = solução tampão pH ~7,4; B = solução pH ~3,0.

A Figura 50 apresenta os voltamogramas obtidos em soluções a pH ~3,0 (50A) e pH ~7,4 (50B) com eletrodo modificado pelo filme de óxidos de molibdênio.

O filme passa por processo eletroquímico reversível em ambos os pH, com intensidades de corrente catódica e anódica bastante semelhantes nos dois meios, demonstrando que não ocorre "desativação" por protonação ou desprotonação de seus sítios. O aumento do pH da solução desloca o potencial de pico catódico para valores mais negativos, pois o processo eletroquímico envolve o consumo de H^+ ⁽¹¹¹⁾.

Dong e colaboradores⁽¹¹²⁾ relataram que a porosidade e a morfologia do filme de molibdênio são alteradas ao se elevar o pH do meio em que se encontram, indicando a ocorrência de rearranjos moleculares em determinados

sítios, observáveis por microscopia de força atômica. Tal fato não alteraria seu caráter isolante quando polarizados em potenciais positivos.

O filme de óxidos de molibdênio deve ser capaz de facilitar a ocorrência de oxidação do NO por processos que não envolvem a transferência eletrônica direta pelo filme.

Com a técnica de preparação de NO desenvolvida a partir de reação entre HNO_3 diluído e cobre metálico em ambiente desoxigenado, foram realizados alguns estudos a fim de se identificar a dinâmica de outros mecanismos de interação entre os sítios catalítica ou fisicamente ativos.

Figura 51. Voltamogramas obtidos com velocidade de varredura de 20 mV s^{-1} com eletrodo polido (B) e modificado (A, C, D), em tampão pH $\sim 7,4$ na ausência (A) e presença (B, C, D) de NO (saturada). O voltamograma C foi obtido mantendo-se o eletrodo modificado na solução durante a geração de NO (~ 30 minutos). O voltamograma D foi registrado imediatamente após injetar-se a solução previamente saturada de NO na célula desoxigenada contendo o eletrodo modificado.

A Figura 51 mostra o voltamograma obtido com eletrodo sólido de carbono vítreo polido, em solução tampão pH $\sim 7,4$, saturada em NO (51B). Verifica-se a existência de componente anódico de corrente com E_p ao redor de +850 mV, característico de processo irreversível de oxidação. Em pH $\sim 7,4$ o filme não apresenta eletroatividade na faixa de +500 mV a + 1000 mV, o que pode ser percebido pela Figura 51A, obtida com eletrodo modificado e na ausência de NO.

Como a célula eletroquímica precisava estar bem vedada para impedir a entrada de oxigênio, pois o O_2 oxida facilmente o NO formando-se NO_2 e nitrito, o eletrodo de trabalho foi colado a ela antes de iniciar-se o processo de geração de NO. Por isso, o resultado de 51C poderia conter um componente devido à passagem de NO gasoso por sua superfície, de forma que se obteve também o voltamograma 51D para efeito de comparação.

O processo de oxidação do NO não é antecipado ou postergado pela modificação do eletrodo por óxidos de molibdênio, podendo-se observar nos voltamogramas 51C e 51D a permanência de E_p ao redor de +850 mV, não se tratando de um caso direto de eletrocatalise. O processo anódico do NO no eletrodo modificado acontece varrendo-se ou não a faixa de potencial negativa previamente à faixa positiva, inexistindo efeitos de "ativação"⁽¹¹³⁾.

A presença do filme intensifica drasticamente o componente anódico de corrente observado, sobretudo no eletrodo mantido por mais tempo na presença de NO (51C). O eletrodo modificado deve ser capaz de trapear, ou reter quimicamente o íon NO^+ gerado no primeiro passo de oxidação do NO, mas a diferença existente entre as Figuras 51C e 51D deve ser ocasionada por algum fenômeno que toma lugar antes de iniciar o processo eletroquímico propriamente dito.

Figura 52: Voltamogramas obtidos em solução tampão pH ~7,4. A = eletrodo modificado e B = eletrodo modificado, mantido em solução borbulhada com NO por trinta minutos e posteriormente por argônio por igual período de tempo.

A Figura 52 apresenta resultados de estudos voltamétricos realizados em solução tampão pH ~7,4 com eletrodo modificado tendo (52B) ou não (52A) sido exposto à presença de óxido nítrico previamente aos procedimentos eletroquímicos. Nota-se que a exposição do eletrodo modificado à presença de NO gera alterações permanentes, manifestadas pelo aparecimento de um componente anódico com E_p ao redor de +900 mV (51B), característico do mesmo processo ocorrido em solução contendo NO. Pode-se concluir que tal alteração seja referente à adsorção do NO no filme que age, portanto, como um pré - concentrador desse substrato em seus sítios.

Pode-se propor como mecanismo do processo global que o NO penetre no filme sofrendo a perda de um elétron na superfície de carbono vítreo do eletrodo polarizado, gerando o íon NO^+ . Este, por sua vez, interage com o filme

formando um intermediário lábil, como no esquema abaixo, no qual o óxido de molibdênio atua como um sítio doador de átomos de oxigênio. A etapa limitante envolve a quebra da ligação Mo-O, conduzindo a um nitrocomposto mais oxigenado.

A adsorção física como uma pré-concentração do NO favorece o processo global retendo as moléculas do analito mais próximas à superfície de carbono vítreo do eletrodo. Nela, as moléculas de NO passarão pelo processo eletroquímico gerando NO^+ que pode prosseguir reagindo com o filme, e dele abstraindo oxigênio, ou reagindo com a água, gerando maior quantidade de nitrito na superfície do carbono vítreo. Por sua vez, o nitrito gerado intensifica também o sinal, uma vez que não necessitará penetrar o filme. Como nos casos típicos de adsorção de substrato que passa por processo eletroquímico irreversível, o sinal de corrente deve diminuir em ciclos sequenciais de potencial em razão do consumo do material eletroativo.

Figura 53. Voltamogramas cíclicos obtidos em uma sucessão ininterrupta de dez experimentos com eletrodo modificado, exposto ao NO durante 30 minutos e velocidade de varredura = 20 mV s^{-1} em solução tampão pH $\sim 7,4$. A = saturada com NO, B = saturada com NO e posteriormente purgada com argônio.

A Figura 53 apresenta os voltamogramas obtidos seqüencialmente e sem interrupção com eletrodo modificado exposto ao NO por trinta minutos até a saturação da solução, sem (53A) e com (53B) purga do óxido nítrico pelo borbulhamento de argônio previamente aos experimentos voltamétricos.

Em 53A nota-se uma significativa queda nos sinais de corrente nos primeiros ciclos, estabilizando-se em aproximadamente 70 % do valor original após o quinto ciclo. Na ausência de NO em solução (53B), a queda no sinal de corrente se apresenta proporcionalmente mais intensa, atingindo 50 % do valor original no décimo ciclo de potencial, devido ao consumo do material imobilizado não passível de reposição pela solução.

Nesse caso, a queda no sinal de corrente deve continuar até atingir-se o zero (ou sinal do branco), o que ocorreria com menor número de ciclagens se fosse aplicada uma programação com menor velocidade de varredura de potencial, o que esgotaria mais facilmente o material adsorvido.

Vale ressaltar que os experimentos foram realizados varrendo-se faixas negativas de potencial posteriormente e repetindo-se o experimento acima relatado sem sucesso na ativação do filme. Comprova-se, desse modo, a desativação do filme pela aplicação de potenciais positivos proposta por Dong⁽¹¹⁴⁾.

3.3.6- Eletrodos de ouro modificados com oxido de molibdênio e complexos $trans\text{-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{L}_1\text{L}_2]^{+n}$ (filme misto)

Nesta etapa de trabalho, foi feita a substituição do eletrodo de carbono vítreo pelo eletrodo de ouro, devido à facilidade de fabricação de microeletrodos de Au de diferentes raios.

Para verificar a viabilidade do uso do eletrodo de ouro em relação ao eletrodo de carbono vítreo, foram realizados experimentos com voltametria cíclica para ambos os eletrodos, modificados com filme de óxido de molibdênio.

Conforme os voltamogramas cíclicos da Figura 54, foi possível verificar que há diferença significativa entre a intensidade de corrente de pico entre os eletrodos. Por outro lado, não ocorreu deslocamento do par de ondas redox no potencial correspondente ao pH do meio (pH ~3). Portanto, apesar da diferença de intensidade de corrente, o filme em ambos eletrodos tem as mesmas propriedades, viabilizando com isso, o uso do eletrodo de ouro em substituição do eletrodo de carbono vítreo.

Figura 54: Voltamogramas de eletrodos de carbono vítreo (A) e ouro (B), modificados com filme de óxido de molibdênio em eletrólito Na_2SO_4 / H_2SO_4 (pH~3).

O eletrodo de ouro modificado com filme misto e a interação com a molécula de NO foram avaliados modificando-se o eletrodo de ouro com filme do óxido de molibdênio e o composto $trans-[Ru(NH_3)_4(4-pic)SO_4]^+{}^3$. Para isso, fez-se uso da técnica de voltametria cíclica, aplicando-se vários ciclos consecutivos na faixa de potencial onde o composto é eletroativo (+0,5 a -0,25 V). A Figura 55 mostra a modificação do eletrodo de ouro contendo filme de MoO_3 na solução do complexo.

Figura 55: Voltamogramas consecutivos do eletrodo de ouro contendo o filme de MoO_3 em solução de $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(4\text{-pic})\text{SO}_4]\text{J}^3$. Eletrólito suporte: $\text{Na}_2\text{SO}_4 / \text{H}_2\text{SO}_4$ ($\text{pH} \sim 3$). Faixa de potencial: +0,5 a -0,25 V. $V = 50 \text{ mV s}^{-1}$. 60 ciclos.

Nos voltamogramas da Figura 55, observa-se que ocorre um acréscimo nas correntes de pico nos processos de redução e oxidação do composto de um ciclo para o outro. Isso mostra a ocorrência de adsorção do material na superfície do eletrodo.

A essa superfície foi adicionada uma camada de material polimérico (Náfion) com a finalidade de melhorar a estabilidade do eletrodo e também eliminar problemas com espécies interferentes aniônicas tais como, ascorbato e nitrito que estão comumente presentes em alguns sistemas biológicos e diante do interesse da aplicação do eletrodo como sensor de NO, a estabilidade do eletrodo foi testada em solução de tampão fosfato $\text{pH} \sim 7,4$. Verificou-se com isso que não houve perda significativa de material nos

experimentos voltamétricos após a aplicação de 10 ciclos consecutivos (Figura 56).

Figura 56: Voltamogramas do eletrodo de ouro com filme misto em tampão fosfato pH~7,4. Faixa de potencial +0,5 à -0,25 V. $V = 50\text{mV s}^{-1}$. 10 ciclos.

Comparando-se os dados da Figura 56 com o voltamograma do composto $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(4\text{-pic})\text{SO}_4]^{+3}$ em solução de tampão fosfato pH~7,4 (Figura 57), observa-se que não ocorre diferença evidente entre os valores de potenciais de picos anódico e catódico do composto.

Figura 57: Voltamograma da solução de $trans-[Ru(NH_3)_4(4-pic)SO_4]^+$ $1,3 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão fosfato pH~7,4 com eletrodo de ouro. $V = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Foi suposto que uma hipótese mais provável para a interação entre o filme de MoO_3 e o complexo de Ru(II)-sulfato deveria ocorrer através da substituição do ligante aquo (formado segundo as equações 32 e 33) pelo átomo de oxigênio do filme de óxido de molibdênio na superfície do eletrodo, como mostra a equação abaixo (equação 34):

Resultados similares foram obtidos com a imobilização de complexos $[Ru(NH_3)_5Cl]^{2+}$ e $[Ru(NH_3)_5OH_2]^{2+}$ sobre a superfície de sílica gel com óxido de Ti(IV)⁽¹¹⁵⁾. Neste caso, o complexo foi imobilizado na superfície do eletrodo

devido à interação entre o centro metálico e o átomo de oxigênio do óxido de Ti(IV) que é um filme similar ao MoO_3 usado no presente trabalho.

A fim de confirmar que a imobilização do complexo Ru(III)-sulfato envolve a formação de uma ponte de oxigênio com o MoO_3 , experimentos similares foram realizados usando o complexo $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$. Entretanto, os resultados obtidos mostraram que o complexo $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ não foi imobilizado na superfície do eletrodo e nesse caso, pode-se concluir que o ligante NH_3 do complexo nos estados de oxidação II e III, não é substituído pelo átomo de oxigênio do MoO_3 .

Estudos referentes ao comportamento eletroquímico do filme misto em eletrólito suporte, tampão fosfato (pH~7,4), foram realizados com voltametria cíclica com varreduras de potencial na faixa de +0,45 a -0,3 V variando-se a velocidade de varredura entre 10 a 500 mV s^{-1} .

Na Figura 58 verifica-se que, quanto maior a velocidade de varredura, maior o valor da intensidade de corrente. Construindo-se o gráfico de corrente de pico catódica em função da velocidade de varredura (Figura 59), têm-se uma reta cuja equação é $I_{pc}(\mu\text{A}) = 0,015v (\text{mV s}^{-1}) + 0,3$. O coeficiente de correlação linear para esta reta foi igual a $r = 0,998$, verificando-se com isso que a resposta eletroquímica é devido ao material adsorvido na superfície do eletrodo.

A quantidade de agente modificador foi avaliada medindo-se a carga referente ao componente catódico do voltamograma registrado a 50 mV s^{-1} . O excesso superficial (Γ) é dado pela equação 31⁽¹⁰⁷⁾.

O valor de Q foi de $3,5 \times 10^{-6}$ C, a área do eletrodo 0,071 cm^2 . Considerando o número de elétrons envolvido no processo como sendo $n = 1$ o

resultado estimado foi $\Gamma = 5,1 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$, com isso tem-se aproximadamente 5 monocamadas aderidas sobre a superfície do eletrodo.

Figura 58: Voltamogramas do eletrodo de Au modificado com filme misto em solução de tampão fosfato (pH~7,4), com várias velocidades de varreduras: 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 e 500 mV s^{-1} .

Figura 59: Gráfico de corrente versus a velocidade de varredura obtido com os resultados dos voltamogramas da Figura 58.

3.3.6.1- Estudos eletroquímicos envolvendo o eletrodo de ouro com filme misto e a molécula de NO.

A finalidade desses estudos foi de verificar se a quantidade de complexo de rutênio imobilizado na superfície do eletrodo estava relacionado com o processo de oxidação do óxido nítrico. Para isso, foram feitas modificações do eletrodo com o filme de MoO_3 em diferentes quantidades de ciclos em solução do complexo $\text{trans-[Ru(NH}_3)_4(4\text{-pic)SO}_4]^+3$, 10, 20, 30 e 60 ciclos a 50mV s^{-1} (Figura 55). Após a modificação, registraram-se voltamogramas com esses eletrodos em solução saturada de NO ($\sim 1,9\text{ mmol L}^{-1}$).

Figura 60: Voltamogramas da solução saturada de NO (PBS, pH ~7,4) com o eletrodo de ouro (a), eletrodo modificado com óxido de molibdênio (b) e com eletrodo de ouro modificado com o filme de Ru-MoO₃ que foi preparado com diversos ciclos de potenciais na solução contendo o complexo de rutênio: 10 (c), 20 (d), 30 (e) e 60 ciclos de potenciais (f). $V = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Os voltamogramas obtidos na Figura 60a e 60b apresentam uma diferença menor nas intensidades de correntes em relação com os voltamogramas da Figura 51B e 51C. Uma explicação para esse fato está relacionado com a diferença de intensidade de corrente observada na resposta do filme de óxido de molibdênio, entre os eletrodos de ouro e carbono vítreo (Figura 54).

Nos voltamogramas da Figura 60 podem ser observados dois processos eletroquímicos significativos. O primeiro é a participação do complexo de rutênio no processo de oxidação do NO em solução, dessa forma, quanto maior a quantidade no complexo adsorvido sobre a superfície do eletrodo maior a

corrente de oxidação do óxido nítrico. No segundo processo, têm-se um par de picos por volta de +0,2 V, que pode ser atribuído a um processo de atração eletrostática do NO com o complexo de rutênio e não à ligação do centro metálico do complexo com a molécula de NO.

Se comparados os voltamogramas com o eletrodo misto (Ru-O-MoO₂) em solução de NO livre em pH~7,4, (Figura 60 c-f) com o voltamograma do eletrodo de filme misto em solução de eletrólito de suporte, tampão fosfato (pH~7,4) (Figura 56), pode-se verificar que ocorre um deslocamento para região mais positiva de potencial quando o eletrodo está imerso em solução contendo NO.

No intuito de entender a interação das espécies do complexo de rutênio e NO, foram realizados experimentos com as espécies em solução de tampão fosfato (pH~7,4). Primeiramente, registrou-se o voltamograma da solução do complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(4-pic)SO₄]⁺³ (Figura 61A) e em seguida, foi borbulhado NO por 10 minutos nesta solução. Após o borbulhamento registrou-se novamente o voltamograma dessa solução (Figura 60B). Nesse caso, foi observado outro processo redox com E_{pc}= -0.25 V e E_{pa} = -0.18 V.

Estes potenciais correspondem à troca de ligante sulfato pelo ligante NO, no complexo *trans*-[Ru(III)(NH₃)₄-NO-4pic]³⁺. Demonstrando com isso, que o ligante NO estabiliza mais o íon central Ru(II), em relação ao íon Ru(III), devido ao deslocamento do potencial redox para região de potencial mais negativo.

Figura 61: Voltamogramas de uma solução $1,3 \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{trans-[Ru(III)(NH}_3)_4(4\text{pic)SO}_4]$ em tampão fosfato ($\text{pH} \sim 7,4$), antes (A) e depois (B) de borbulhar NO por 10 minutos. $V = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

Outros experimentos com o eletrodo modificado com o filme de Ru-O-MoO₂ foram realizados focando o perfil do processo redox Ru(II)/Ru(III) em solução de tampão fosfato ($\text{pH} \sim 7,4$) sem e com a presença de NO. Na Figura 62, o voltamograma apresenta o processo eletroquímico do par redox Ru(II)/Ru(III) do complexo imobilizado no filme de MoO₃. O par redox desse processo está na região de potencial que varia entre 0 e -0,1V, e está de acordo com os voltamogramas apresentados na Figura 56, em que os experimentos foram realizados em condições experimentais similares. Então, o NO foi borbulhado na solução de eletrólito e um novo voltamograma foi registrado (Figura 62b). Novamente, ocorreu um deslocamento do potencial de pico para regiões mais positivas, indicando alguma interação entre o centro metálico e o NO.

Quando, o NO foi removido da solução através do borbulhamento de argônio, outro voltamograma foi registrado (Figura 62c) e obteve-se um voltamograma com o perfil parecido ao voltamograma 62a. Entretanto, desde que o par de potenciais redox Ru(III)/Ru(II) retorne ao valor inicial quando o NO é removido da solução, a interação química entre Ru e NO na superfície do eletrodo não é a mesma que a observada quando as espécies $\text{trans-[Ru(NH}_3)_4(4\text{-pic)SO}_4]^+{}^3$ e NO estão presentes em solução.

Figura 62: Voltamogramas registrados em solução de tampão fosfato (pH~7,4) com eletrodo modificado com filme de Ru-MoO₃ antes (a) e depois da adição de NO (b), concentração final da solução 0,7 mmol L⁻¹. Voltamograma c foi registrado após borbulhar Ar. V= 50 mV s⁻¹.

Como a ligação entre Ru-NO é forte, ela não poderia ser quebrada pela simples remoção do NO da solução. Sendo assim, o NO não é coordenado no complexo de rutênio na superfície do eletrodo. Este fato foi confirmado

através dos registros de espectros de infravermelho do filme de Ru-O-MoO₂ antes (Figura 63a) e depois da exposição do eletrodo em solução saturada de NO (Figura 63b).

Figura 63: Espectros de IR da superfície do eletrodo de ouro modificado com filme de Ru-O-MoO₂ antes (a) e depois da exposição em solução saturada de NO (b).

Comparando-se os espectros da Figura 63a com a 63b não se observam bandas na região de 1900 cm⁻¹, característica da espécie NO, comprovando que não ocorre coordenação do NO no complexo. Por outro lado, a existência de bandas características das espécies NH₃ (1620, 1304 e 824 cm⁻¹) e CH (1087,8 cm⁻¹) confirmam a imobilização do complexo *trans*-[Ru(III)(NH₃)₄(4pic)SO₄]⁺ no filme de MoO₃. A diferença entre a intensidade de sinal de transmitância entre as Figuras 63a e 63b deve-se ao aumento na sensibilidade do equipamento, a fim de observar a ocorrência da banda de estiramento do NO.

A dependência da corrente limite de oxidação do NO em solução de tampão fosfato (pH~7,4) sobre o eletrodo modificado foi estudada através de varreduras de potenciais com variação de velocidade de 10 a 300 mV/s. A Figura 64 mostra esses voltamogramas.

Figura 64: Voltamogramas do eletrodo de Au modificado com filme misto em solução de NO (pH~7,4), com várias velocidades de varreduras: 10(a), 25(b), 50(c), 100(d), 200(e) e 300(f) mV s^{-1} .

Pela análise dos voltamogramas da Figura 64, observou-se que a intensidade de corrente no processo de oxidação do NO está aumentando proporcionalmente com o aumento da raiz quadrada da velocidade de varredura. O gráfico representado na Figura 65, cuja equação da reta é $I_{pc}(\mu\text{A}) = 2,24 v^{1/2} (\text{mV/s})^{1/2} + 0,16$ e o coeficiente de correlação linear é igual a 0,998, indica dessa forma que o processo eletroquímico que ocorre é controlado pelo transporte de massa.

Figura 65: Gráfico de corrente versus a velocidade de varredura obtido com os resultados dos voltamogramas da Figura 64.

3.3.6.2- Curva analítica do NO com eletrodo de ouro modificado com filme de Ru-O-MoO₂

A resposta do eletrodo modificado com o aumento da concentração de NO foi verificada através da técnica de voltametria de onda quadrada, adicionando-se alíquotas de solução de NO a um volume de tampão fosfato (pH~7,4). A faixa de concentração variou de 0 e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 66).

Figura 66: Curvas voltamétricas de onda quadrada registradas com eletrodo modificado com filme de Ru-O-MoO₂ antes (a) e depois da adição de NO na solução de tampão fosfato (pH~7,4), obtendo-se as seguintes concentrações: 1 (b), 2 (c), 3 (d), 4 (e), 5 (f), 6 (g), 7 (h), 8 μmol L⁻¹ (i). Parâmetros: $V = 40 \text{ mV s}^{-1}$, frequência = 10 Hz e amplitude = 19,5 mV.

Uma relação de linearidade entre os picos de correntes e a concentração das soluções de NO pode ser verificada através do gráfico da Figura 67. A equação da reta para curva analítica é: $I(\mu\text{A}) = 0,031C_{\text{NO}}(\mu\text{M}) + 0,011$ e o coeficiente de correlação linear foi calculado em $r = 0,996$. A estimativa do desvio-padrão foi igual a $s = 0,00278$. Quanto à sensibilidade analítica o limite de detecção foi obtido calculando-se três vezes o desvio padrão do branco, $3s$.

O sinal do branco e o desvio-padrão foram calculados pela média aritmética de sete medidas voltamétricas, assim como o sinal correspondente à concentração do analito. Sendo assim, o limite detecção calculado para o método foi de $\sim 0,35 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Para verificar a repetibilidade dos voltamogramas foram realizadas 23 medições voltamétricas de uma solução de NO na concentração de $0,9 \text{ mmol L}^{-1}$ e a variação na altura dos picos foi de apenas 2%. A boa repetibilidade é um indício de que a concentração de NO na solução não sofre depreciação e boa resposta do eletrodo.

Figura 67: Curva analítica para NO com variação da concentração entre 0 e $10 \mu\text{mol L}^{-1}$, com eletrodo de Au modificado com filme de Ru-O-MoO₂, dados referente aos voltamogramas da Figura 66. $E = +0,75 \text{ V}$.

A Figura 67 mostra que o sinal da corrente aumenta proporcionalmente ao aumento da concentração do NO em solução, o que comprova que não ocorre acúmulo do analito sobre a superfície do eletrodo modificado com filme de Ru-O-MoO₂. Isto é uma característica muito importante do eletrodo modificado, já que a proposta é de usá-lo como sensor analítico em amostras biológicas.

3.3.6.3- Microeletrodo de ouro modificado com filme de Ru-O-MoO₂

O microeletrodo de fibra de ouro de raio 12,5 μm foi modificado com filme de Ru-O-MoO₂ da mesma forma que a descrita para o eletrodo de tamanho convencional. A Figura 68 mostra a modificação com o filme de MoO₃ em pH~3.

Figura 68: Ciclos voltamétricos sucessivos obtidos com velocidade de varredura de 50 mV/sem solução 1 mmol L⁻¹ em Na₂MoO₄ e 50 mmol L⁻¹ em Na₂SO₄, pH ~3.

A Figura 69 mostra a modificação do microeletrodo com filme de MoO₃ em solução de 1,2 mmol L⁻¹ do complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(4-pic)SO₄]⁺³ em pH~3. A resposta para o microeletrodo é muito semelhante à do eletrodo de tamanho convencional. Observa-se o aumento de corrente a cada ciclo devido à adsorção do material na superfície do eletrodo.

Figura 69: Voltamogramas consecutivos do microeletrodo de ouro contendo o filme de MoO_3 em solução de $\text{trans-[Ru(NH}_3)_4(4\text{-pic)SO}_4\text{]}^3$, pH ~ 3 . Faixa de potencial +0,5 à -0,25 V. $V = 50\text{mV s}^{-1}$. 60 ciclos.

3.3.6.3- Curva analítica do NO com microeletrodo de ouro modificado com filme de Ru-O-MoO₂

A curva analítica para o NO com microeletrodo modificado com filme misto de Ru-O-MoO₂ foi construída na faixa de concentração de 0 a 6 $\mu\text{mol L}^{-1}$, adicionando-se alíquotas de solução de NO em tampão fosfato pH $\sim 7,4$. Neste caso, a técnica eletroquímica utilizada foi amperometria de múltiplos pulsos de potenciais, por ser uma técnica de maior sensibilidade e muito utilizada ultimamente com microeletrodo. A Figura 70 mostra o amperograma dos sinais de correntes referentes às soluções de NO com o microeletrodo modificado com filme de Ru-O-MoO₂, o potencial aplicado no qual foi obtido o melhor sinal de corrente foi de +0,75 V.

Figura 70: Amperometria de múltiplos pulsos de potenciais registradas com microeletrodo modificado com filme MoO_3 (A) e filme de Ru-O-MoO_2 , antes (a) e depois da adição de NO na solução de tampão fosfato (pH $\sim 7,4$), obtendo-se as seguintes concentrações: 1,0 (b); 1,9 (c); 2,8 (d); 3,7 (e); 4,5 (f); 5,3 (g) e 6,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (h). $E = +0,75 \text{ V}$.

Com os resultados da Figura 70, pode-se construir uma curva analítica com resposta linear entre as correntes e a concentração das soluções de NO como mostra o gráfico da Figura 71, onde se tem uma reta, $I(\mu\text{A}) = 1,74 C_{\text{NO}}(\mu\text{M}) - 0,184$, cujo coeficiente de correlação linear foi da ordem de 0,997.

Figura 71: Curva analítica para NO com variação da concentração entre 0 e 6 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com eletrodo de Au modificado com filme de Ru-O-MoO₂, dados referente aos amperogramas da Figura 70.

O limite de detecção do método usando-se microeletrodo de raio 12,5 μm para soluções de NO foi de $\sim 0,24 \mu\text{mol L}^{-1}$, limite esse calculado como o sinal correspondente a 3 vezes o desvio padrão do ruído da linha de base.

3.3.6.4- Análise da produção de óxido nítrico em albumina bovina com adição de peróxidonitrito na presença de tempol

A fim de verificar o funcionamento do sensor para o monitoramento da produção de NO em tempo real em amostras biológicas, foram realizados experimentos em soluções de albumina bovina (pH $\sim$ 7,4) com adição de peroxidonitrito na presença de tempol e CO₂, quando ocorre a produção de NO.

Na literatura⁽¹¹⁶⁾ tem sido estabelecido que as seqüências de reações radicalares envolvendo tempol e radicais formados a partir do peroxidonitrito e carbonato, tem como produto final o NO⁽¹¹⁶⁾. A resposta à injeção de peroxidonitrito à solução contendo tampão fosfato (pH~7,4), tempol e CO₂ são rápidas e conseqüente formação do NO (Figura 72A). Esse mesmo experimento foi realizado na solução contendo albumina bovina (Figura 72B) e nesse caso, a curva decaiu. Uma explicação plausível para isso se deve ao fato do NO produzido na reação ser consumido pela proteína.

Figura 72: Curva amperométrica com eletrodo de Au modificado com filme de Ru-O-MoO₂ em soluções de tampão fosfato (pH~7,4), CO₂, peroxidonitrito e tempol na ausência (A) e presença (B) de albumina bovina. E = +0,75 V.

O efeito da camada de náfion no eletrodo minimiza a resposta do nitrito formado como produto da decomposição do peroxidonitrito. Este fato foi confirmado pelo monitoramento da resposta de corrente em soluções

contendo peroxidonitrito decomposto (nitrato e nitrito), CO_2 , e tampão fosfato. Não ocorreu nenhum sinal diferente com relação ao sinal do branco (tampão fosfato, pH~7,4), comprovando que os sinais obtidos na Figura 72 são decorrentes apenas do NO produzido na reação.

Na tentativa de quantificar o teor de NO produzido pelo peroxidonitrito com tempol na presença de albumina bovina nesse experimento, foram feitas adições de alíquotas (50 μ L) de solução de NO de concentração conhecida, em 250 μ L de albumina tamponada (pH~7,4). Entretanto, após a 3ª adição da alíquota, houve a coagulação da proteína devido à alteração na força iônica da solução.

Uma possibilidade para resolver este inconveniente seria diminuir a concentração do tampão, de forma que não altere a sua função tamponante. Sugere-se inclusive, combinar tampão fosfato e bicarbonato simulando o tampão real em fluidos sanguíneos.

CAPÍTULO 4

CONCLUSÕES GERAIS

A superfície do eletrodo de ouro modificada com filme de MoO_3 pode ser usada na imobilização dos complexos de *trans*- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{L}_1\text{L}_2]^n+$ com relativa facilidade formando um filme misto de Ru-O-MoO_2 , para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos para determinar a molécula de óxido nítrico.

Os resultados apresentados neste trabalho demonstram que a modificação da superfície do eletrodo de ouro, com o filme misto e uma fina camada de Nafion, proporcionou um aumento na intensidade de corrente anódica associada com a oxidação da molécula de NO, em solução de tampão fosfato cujo pH esteve próximo do pH fisiológico (pH ~7,4).

A etapa inicial dos estudos foi marcada pela necessidade de se preparar e de se determinar a concentração exata das soluções saturadas de óxido nítrico. A concentração de NO nessas soluções foi determinada com sucesso utilizando-se um microeletrodo de platina na técnica de cronoamperometria.

Nas soluções saturadas com o gás NO, o valor médio para a concentração de NO encontrado foi de $(2,1 \pm 0,3) \text{ mmol L}^{-1}$. Este valor de concentração foi comparado com o valor de concentração encontrado pelo método clássico para se determinar NO (titulação volumétrica). Por esta técnica de titulação o valor encontrado foi de $(1,95 \pm 0,02) \text{ mmol L}^{-1}$, ou seja, próximo do valor obtido amperometricamente.

A eficiência do uso do microeletrodo de Pt para se determinar a concentração de NO em uma solução saturada foi verificada após a

determinação do coeficiente de difusão pela técnica de cronoamperometria. O coeficiente de difusão encontrado foi $D = (1,2 \pm 0,1) \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, valor este muito próximo ao citado na literatura em relação à concentração de NO na solução saturada ($2,1 \text{ mmol L}^{-1}$).

Os compostos utilizados para modificar o eletrodo foram os complexos de rutênio de tipo *trans*- $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{L}_1\text{L}_2]^{n+}$, onde $\text{L}_1 = \text{SO}_4^{-2}$ ou H_2O e $\text{L}_2 = 4\text{-NH}_2\text{py}$, Him, L-hist, 4-pic, py, 4-Clpy, nia, isn, 4-CNpy e pz.

Através de experimentos coulométricos utilizando-se como eletrodo de trabalho um "poço de mercúrio", pôde-se calcular o número de elétrons envolvidos na primeira etapa de redução do ligante NO^+ nos complexos de rutênio. A quantidade de elétrons encontrada foi igual a 1,13, ou seja, $n \cong 1$ conforme o resultado previsto.

Nos estudos dos complexos de rutênio usando as técnicas de cronoamperometria de duplo degrau de potencial e voltametria com eletrodo rotativo de disco anel, (tanto com ligante sulfato como com óxido nítrico), foi possível determinar e verificar que as constantes de velocidade se encontram na ordem de grandeza de 10^{-3} a 10 s^{-1} .

As diferenças nas constantes estão relacionadas com a estrutura dos ligantes coordenados em posição *trans* com o ânion sulfato ou o NO, de modo que algumas estruturas podem doar elétrons mais facilmente ao centro metálico do complexo facilitando a substituição do ligante NO ou do sulfato por uma molécula de água.

Com relação à modificação dos eletrodos com os complexos de rutênio para análise da molécula de óxido nítrico em solução, foram realizadas algumas tentativas e a que proporcionou os melhores resultados foi o da formação de

filme misto com os complexos e óxido de molibdênio sobre a superfície do eletrodo.

Com esse tipo de eletrodo, obtiveram-se resultados muito relevantes em relação ao aumento de sinal de corrente de oxidação da molécula de NO, comparado aos resultados com o eletrodo não modificado.

A oxidação do NO é facilitada quando os experimentos são realizados na superfície de eletrodos modificados com filme de Ru-O-MoO₂ e uma fina camada de Náfon. Verificou-se que a resposta eletroquímica do NO aumenta conforme o aumento de complexo de tetraamim rutênio sulfato no filme de molibdênio. Através de estudos eletroquímicos e espectrofotométricos no infravermelho, confirmou-se que não ocorre a coordenação do NO no complexo que está imobilizado no filme de MoO₃.

A dependência da corrente limite, foi estudada por voltametria cíclica com varreduras de potenciais variando a velocidade de 10 a 300 mV s⁻¹. Observou-se que a corrente aumenta no processo de oxidação do NO proporcionalmente com $v^{1/2}$. Dessa forma, pôde-se concluir que o processo eletroquímico que ocorre é controlado por transporte de massa.

A funcionalidade desse eletrodo foi testada por voltametria de onda quadrada para se determinar o NO em soluções de pH~7,4 na faixa de concentração de 0 a 8 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Obteve-se assim, uma curva analítica com coeficiente de correlação linear da ordem de 0,996.

Verificou-se também que o limite de detecção foi de $\sim 0,35 \mu\text{mol L}^{-1}$, e a repetibilidade dos voltamogramas para N = 23 medições voltamétricas numa solução de NO na concentração de 0,9 mmol L⁻¹ foi de apenas 2% na variação da altura dos picos.

Para verificar a possibilidade de se trabalhar com microeletrodos modificados com filme misto em determinações analíticas de NO, utilizou-se a técnica de amperometria de múltiplos pulsos de potenciais, por ser uma técnica de maior sensibilidade e atualmente, muito utilizada em determinações analíticas com microeletrodos. A curva de calibração obtida apresentou boa linearidade e o coeficiente de correlação linear calculado foi da ordem de 0,997 para uma faixa de concentração de NO de 0 a 6,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$. O limite de detecção estimado foi da ordem de $\sim 0,24 \mu\text{mol L}^{-1}$ e o raio do microeletrodo foi igual a 12,5 μm .

Conclui-se portanto, que é viável utilizar a amperometria de múltiplos pulsos de potencial com microeletrodo modificado com filme misto. Mais importante, o método pode ser melhorado de forma a proporcionar um aumento na sensibilidade analítica, muito embora, seu limite de detecção já proporcione a sua aplicação em algumas amostras biológicas com concentrações na faixa sub-micromolar.

A fim de verificar o funcionamento do sensor de NO em amostras biológicas, foi feito o monitoramento da produção de NO em tempo real para uma solução de albumina bovina (pH $\sim$ 7,4) com adição de peroxidonitrito na presença de tempol. Verificou-se assim, a conseqüente formação de NO pela adição dos reagentes e o consumo de NO pela proteína bovina (albumina).

Constatou-se também que o uso da camada de Náfon no eletrodo minimiza a ação interferente do nitrito formado como sub-produto da decomposição do peroxidonitrito, possibilitando assim a diferenciação do sinal analítico do NO em relação ao do nitrito.

Com a finalidade de aplicação analítica para quantificar o teor de NO na reação do peroxidonitrito com tempol na presença de albumina bovina fez-se

um experimento de forma preliminar a fim de se obter uma curva de calibração a partir de adições de alíquotas de solução de NO com concentração conhecida.

No entanto, verificou-se a impossibilidade da obtenção da curva analítica devido à coagulação da albumina e conseqüentemente sua aderência na superfície do eletrodo modificado. Este inconveniente não afasta a possibilidade de aplicação do eletrodo neste tipo de amostra, podendo inclusive, ser utilizado em outras matrizes biológicas.

Conclui-se portanto, que a modificação de eletrodo e microeletrodo de ouro (Au) com filme misto proporcionou o seu uso com sensor de NO em soluções aquosas tamponadas simulando o pH fisiológico, abrindo perspectivas à aplicação dos dois tipos de eletrodos em determinações de óxido nítrico em matrizes biológicas.

CAPÍTULO 5

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Thiemens, M. H. e Trogler, W. C., *Science*, **1991**, 251, 932.
2. *Reduction of Nitrogen Oxide Emissions, ACS Symposium Ser.*, 587, Eds. U.S. Ozhon, S.K. Agarwal e G. Marcelin, Am. Chem. Soc., Washington D.C., **1995**.
3. Ritcher-Addo, G. B. e Legzdins, P., *Metal Nitrosyls*, Oxford University Press, **1992**.
4. *Methods in Nitric Oxide Research*, M. Feelisch e J. S. Stamler, Eds. John Wiley & Sons, Great Britain, **1996**.
5. *Nitric Oxide*, in *Methods of Enzymology*, Lester Packer Ed. Academic Press, New York, **1996**, vol. 268.
6. Clarke, M. J. e Gaul, J. B., *Structure and Bonding*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, **1993**, vol. 81, 144.
7. Moncada, S.; Palmer, R.M.; Higgs, E.A., *Pharmacol.Rev.*, **1991**, 43, 109.
8. Ignarro, L. J.; *Nitric Oxide Biology and Pathobiology*, Academic Press, **2000**, capítulos 1 e 2, e todas referências nela citadas.
9. Butler, A. R.; Willians, D. L.H., *Chem. Soc. Rev.*, **1993**, 233.
10. Hoshina, M.; Laverman, L.; Ford, P.C., *Coord.Chem.Rev.*, **1999**, 198, 75.
11. Wink, D.A.; Mitchell, J.B., *Free. Rad. Biol. & Med.*, **1998**, 25, 434.
12. Fricker, S. P., *Platinum Metals Ver.*, **1995**, 39, 150.
13. Kosholand, D. E. Jr, *Science*, **1992**, 258, 1861.
14. Fukuto, J. M. e Ignarro, L. J., *Acc. Chem. Res.*, **1997**, 30, 149.

15. Reglinski, J., Butler, A. R. e C. Glidewell, *Appl. Organ. Chem.*, **1994**, 8, 25.
16. Aisaka, S., Gross, S. S., Griffith, O. W. e Levi, R., *Biochem. Biophys. Res. Commun*, **1989**, 160, 881.
17. Borges, S.D.S.; Davanzo, C.U.; Castellano, E.E.; Z-Schpector, J.; Silva, S.C; Franco, D.W.; *Inorg. Chem.*, **1998**, 37, 2670.
18. Tonetto, A. M., "Síntese, Caracterização e Propriedades Químicas de *trans*-tetraaminas de Rutênio com o Ligante Nitrosilo e Ligantes π -Receptores", *Dissertação de Mestrado*, FFCLRP-USP, Ribeirão Preto, **2001**.
19. Ferro, A.A., "Síntese Caracterização e Reatividade Química e Fotoquímica de Aminas de Rutênio (*trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄L](BF₄)₃ (L = pz, 4-acpy, imN ou L-hist) e *trans*-[Ru(NO)(cyclam)₄L](PF₆)₂ (cyclam = 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano))", *Tese de Doutorado*, FFCLRP-USP, Ribeirão Preto, **2000**.
20. Gomes, M.G., "Síntese, Espectroscopia, Eletroquímica e Reatividade de Compostos Cis e Trans Tetraaminnitrosilrutênio(II)", *Tese de Doutorado*, IQSC-USP, São Carlos, **1995**.
21. Torsoni, A.S.; Barros, B.F.; Toledo, J.C.Jr; Haun, M.; Krieger, M.H.; Tfouni, Franco, D.W.; *Nitric Oxide*, **2002**, 6, 247.
22. Ghosh, B.K.; Chakravorty, A., "Electrochemistry Studies of Ruthenium Compounds. Part I. Ligand Oxidation levels" *Coord. Chem. Rev.*, **1989**, 95(1), 239-294.
23. Seddon, E.A.; Seddon, K.R., "The chemistry of Ruthenium" Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam, **1984**.
24. Taube, H.; Endicott, J.F.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1962**, 84, 4984.
25. Taube, H.; Endicott, J.F.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1965**, 4, 437.

- 26.Ford, P.C., *Coord. Chem. Rev.*, **1970**, 5, 75.
- 27.Ford, P.C., Kuempel, J.F.; Taube, H.; *Inorg. Chem.*, **1968**, 7, 1976.
- 28.Ford, P.C., Sutton, C.; *Inorg. Chem.*, **1969**, 8, 1544.
- 29.Meyer, T.J.; Taube, H.; *Inorg. Chem.*, **1968**, 7, 2395.
- 30.a- Toma, H.E. - Tese de doutoramento, Instituto de Química da ESP São Paulo **1974**.
31. b. Toma, H.E. and Malin, J.M.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1972**, 94, 4039.
- 32.Franco, D.W.; *Inorg. Chim. Acta*, **1981**, 48, 1.
- 33.Creutz, C.; Chou, M.H., *Inorg. Chem.*, **1987**, 26, 2995.
- 34.Nyholm, R. S.; Tobe, M. L. *Adv. Inorg. Chem.*, **1963**, 5, 1.
- 35.Allen, A. D.; Senoff, C. V., *Chem. Commun.*, **1965**, 43, 888.
36. Krieger, M. H.; Tfouni, e.; McGarvey, B. R.; Franco, D. W., *Coord. Chem. Rev.*, in press.
- 37.Fricker, S. F., Slade, E., Powell, N. A., Vayghn, O. J., Henderson, G. R., Murrer, B. A., Megron, L. L., Bisland, S. K. e F. W. Flitney, *Br. J. Pharmacol.*, **1997**, 122, 1441.
- 38.Iganarro, L. J., Hippton, H., Edwards, J. C., Baricos, W. H., Hyman, A. L., Kadowitz, P. J. e Gneettler, C. A., *J. Pharmacol. Exp. Techn.*, **1981**, 218, 739.
- 39.*Reduction of Nitrogen Oxide Emissions*, ACS Symposium Ser., 587, Eds. U. S. Ozhon, S. K. Agarwal e G. Marcelin, *Am. Chem. Soc.*, Washington D. C., **1995**.
- 40.Thiemens, M. H. e Trogler, W. C., *Science*, **1991**, 251, 932.
- 41.Fricker, S. P., *Platinum Metals Ver.*, **1995**, 39, 150.
- 42.*Platinum and other metal coordination Compounds in Cancer Chemotherapy*, M. Nicolini, Ed.; Martins Nijhoff, Boston, MA. **1987**.

- 43.Chen, Ya e Shepherd, R. E., *J. Inorg. Biochem.*, **1997**, 183.
- 44.Ckarke, M. J., Tfouni, E. e Franco, D. W., manuscrito em preparação.
- 45.Ford, P. C., *Coord. Chem. Rev.*, **1970**, 5, 75.
- 46.Taube, H., *Comments Inorg. Chem.*, **1981**, 1, 17 e referências citadas.
- 47.Franco, D. W. e Taube, H., *Inorg. Chem.* **1978**, 17, 571
- 48.Franco, D. W., *Coord. Chem. Rev.*, **1992**, 119, 199 e referências citadas
- 49.Isied, S. S. e Taube, H., *Inorg. Chem.*, **1974**, 13, 1545.
- 50.Nascimento, J. C. F., Lima, B. S. N. e Franco, D. W., *Polyhedron*, **1996**, 15, 1965.
- 51.Rodriguez, J. A., Souza-Torsoni, A., Franco, D. W. e Haun, M., XXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular-SBBQ, Caxambú, MG, 3-6 de maio, **1997**, S-32.
- 52.Gomes, M. G., Davanzo, C. U., Silva, S. C., Lopes, L. G. F., Santos, P. S. e Franco, D. W., *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 000, **1998**.
- 53.Borges, S. S. S., . Davanzo, C. U, Castellano, E. E., Z-Scheptor, J., Silva, S. C. e Franco, D. W., *Inorg. Chem.*, em fase de revisão.
- 54.Lopes, L. G. F., Davanzo, C. U., Castellano, E. E., Z-Scheptor, J., Ferreira, A. G., Clarke, M. J., Wierazko, A. e Franco, D. W., *Inorg. Chem.*, em fase de revisão.
55. Murray, R. W., *Electroanalytical Chemistry*, Ed. Bard, A.J., Marcel Dekker, INC. **1984**, 13, New York, 191.
- 56.Ferro, A. A., Vasconcellos, L. C. G., Franco, D. W. e Tfouni, E., *20 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Poços de Caldas, MG, **1997**.
- 57.Guidorzi, A. P. B., Lopes, L. G. F. e Franco, D. W., *20 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Poços de Caldas, MG, **1997**.

58. Dunn, J. P., Stenger, H. G. Jr. e Watchs, I. E.. *Catalysis Today*, **1999**, 51, 301.
59. Cook, C. D., Jahaul, G. S., *J. Am. Chem. Soc.* , **1967**, 89, 3066.
60. (a) Taube, H., *Surv Prog Chem.* , **1973**, 6, 1. (b) Taube, H., Comments Inorg. Chem., **1981**, 1, 17. (c) P. C. Ford. *Coord. Chem. Rev.*, **1970**, 5, 75. (d) Kuehn, C. G., Isied, S. S, *Prog. Inorg Chem.* , **1980**, 27, 1048.
61. Shuk, P., Ramanujachary, K. V. e Greenblatt, M., *Electrochim. Acta*, **1996**, 41, 2055.
62. Laperrière, G., Larvie, M.A. e Bélanger, D., *J. Electrochem. Soc.*, **1996**, 143, 3109.
63. Kulesza, P.J. e Faulkner, R., *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, 110, 4905.
64. Cox, J.A., Jaworski, R.K. e Kulesza, P.J., *Electroanalysis.*, **1991**, 3, 869.
65. Kosminsky, L. e Bertotti, M., *J. Electroanal. Chem.*, **1999**, 471, 37.
66. Baoxing, W. e Shaojum, D., *J. Electroanal. Chem.*, **1994**, 379, 207.
67. Bertotti, M. e Pletcher, D., *Electroanalysis.*, **1996**, 8, 1105.
68. Kosminsky, L. e Bertotti, M., *Electroanalysis.*, **1999**, 11, 8, 1.
69. Wang, B. e Dong, S., *J. Electroanal. Chem.*, **1994**, 370, 141.
70. Shuk, P., Ramanujachary, K. V. e Greenblatt, M., *Electrochim. Acta*, **1996**, 41, 2055.
71. Brett, A. M. O. e Brett, C. M. A., *ELECTROQUÍMICA Princípios, Métodos, e Aplicações*, Oxford University Press, **1993**.
72. Cottrell, F. G., *Z. Physik. Chem.*, **1902**, 42, 385.
73. Smit, N. M. e Wijnen, D., *Rec. Trav. Chim.*, **1960**, 79, 5.
74. Kimmerle, F. e Chevalet, J., *J. Electroanal. Chem.*, **1969**, 21, 237.

75. *Physical Methods of chemistry, Electrochemical Methods*, B.W., Rossitet and J.F., Hamilton, Jhon Wiley & Sons, 2ª ed., New York, **1986**, Vol. II, 536.
76. Schwarz, W.M. e Shain, I., *J. Phys. Chem.*, **1965**, 69, 30.
77. Abrüna, H.D., *Coord. Chem. Ver.*, **1988**, 86, 135.
78. Merz, A., *Topics in Current Chemistry*, Ed. Steckhan, E.; Springer-Verlag Berlin Heidelberg, **1990**, 152, 49.
79. McCreery, *Electroanalytical Chemistry*, Ed. Bard, A.J., Marcel Dekker, INC. **1991**, 17, New York, 221.
80. Souza, M.F.B., *Química Nova*, **1997**, 20, 191.
81. Murray, R.W., *Am. Chem. Soc.*, **1980**, 13, 135.
82. Prado, L.L.L., *Novos Sensores Químicos Preparados com Sílica Gel Modificada com o Íon Piridínio*, Tese de Doutorado, Instituto de Química, UNICAMP, **1995**.
83. Adams, R.N., *Anal. Chem.*, **1958**, 30, 1576.
84. Denuault, G., Mirkin, M. V. e Bard, A., J., *J. Electroanal. Chem.*, **1991**, 308, 27.
85. Lantoine, F., Trévin, S., Bedioui, F. e Devynck, J., *J. Electroanal. Chem.*, **1995**, 392, 85.
86. West, R. C. (ed), *"CRC Handbook of Chemistry and Physics"*, 70th Ed., p. B-111. CRC Press, Boca Ratn, Florida, **1989**.
87. *Methods in Nitric Oxide Research*, M. Feelisch e J. S. Stamler, Eds. John Wiley & Sons, Great Britain, **1996**.
88. *Nitric Oxide*, in *Methods of Enzymology*, Lester Packer Ed. Academic Press, New York, **1996**, vol. 268.
89. Ehman, D.L., Sawyer, D.T., *J. Electroanal. Chem.*, **1968**, 16, 541

90. Hara, K., Kamata, M., Sonoyama, N. e Sakata, T., *J. Electroanal. Chem.*, **1998**, 451, 181.
91. Ambar, M. e Taube, H., *J. Am. Chem. Soc.*, **1954**, 76, 6243.
92. Turney, T.A. e Wright, G.A., *Chem. Rev.*, **1959**, 59, 497.
93. Malinski, T. e Taha, Z., *Nature*, **1992**, 358, 676.
94. Ciszewski, A., Milczarek, G., Kubaszewski, E. e Lozynski, M., *Electroanalysis*, **1998**, 10, 628.
95. Dutta, D. e Landolt, D., *J. Electrochem. Soc.*, **1972**, 119, 1320.
96. Wightman, M., Wipf, D.O., in: *Electroanalytical Chemistry*, vol. 15 (Ed: A.J. Bard) Marcel Dekker, New York, **1989**.
97. Linke, W.F., in *Solubilities: Inorganic and Metal Organic Compounds*, ACS, vol II, Washington, 4th ed., **1965**.
98. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, ed. L.H. Gevantman, CRC Press, Boca Raton, FL, 76th ed., **1995**.
99. *Solubility Data Serie: Oxides of Nitrogen*, ed. C.L. Young, vol 8, Pergamon Press, Oxford, **1982**.
100. Bard, A.J. e Faulkner, L.R., *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, Wiley, New York, **1980**, cap. 5.
101. Prater, K.B, Bard, A.J, *J. Electrochem. Soc. Electrochemical Science*, **1970**, 117, 3, 335.
102. Gomes, M.G., Davanzo, C. U., Silva, C. S., Lopes, L.G.F., Santos, P.S. e Franco, D.W., , *J. Chem. Soc., Dalton Trans*, **1998**, 601.
103. *Electroanalytical Chemistry*, J.J., Lingane, John Wiley & Sons, 2^a ed., New York, **1958**, 237.

104. Diógenes, I.C.N., *Utilização de Adsorbatos Inorgânicos no Estudo de Reações de Transferência de Elétrons Heterogênea*, Tese de Doutorado, Instituto de Química, de São Carlos / USP-, **2000**.
105. Pingang, H., Jiannong, Y., *Talanta*, **1997**, 44, 885.
106. Moreira, I.S., Lima, E.C., Franco, D.W., *Inorg. Chim. Acta*, **1998**, 267, 93.
107. Azevedo, C.M.N., *Desenvolvimento de Eletrodos Modificados e Métodos Analíticos*, Tese de Doutorado, Instituto de Química, USP, **1999**.
108. Zanichelli, P.FG., *Estudo Eletroquímico e Espectrofotométrico de Novos Fosfito-Complexos de Ru(II)/(III)-EDTA Livre e Acorado em Sílica Gel*, Dissertação de Mestrado, **2000**, Universidade Estadual de Maringá.
109. Kubota, L.T., Gusshikem, Y., *J. Electroanal. Chem.*, **1992**, 337, 165.
110. Anaissi, F.J., Toma, H.E., *Materials Research Bulletin*, **2001**, 36, 289.
111. Wang, B., Dong, S., *J. Electroanal. Chem.* **1994**, 379, 207.
112. Liu, S., Zhang, Q., Wang, E. e Dong, S., *Electrochem. Commun.* **1999**, 1, 365.
113. Denisevich, P., Willman, K.W. e Murray, R.W., *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 4727.
114. Wang, B., Liu, X.-Y. e Dong, S., *J. Electroanal. Chem.* **1997**, **435**, 23.
115. Carmo; D.R.; Filho, U.P.R; Gushiken,Y.; Franco, D.W.; *Polyhedron*, **2000**, 19, 277.
116. Bonini, M.G.; Mason, R.P.; Augusto, O.; *Chem. Res. Toxicol.* **2002**. 15, 506.