Jaqueline Pires Ruiz

Desenvolvimento e caracterização de eletrodos baseados em nanotubos de carbono de paredes múltiplas decorados com nanopartículas de ouro para detecção de NO

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Sergio Antonio Spinola Machado

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em
acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

**São Carlos,
2013**

“Somos gratos pela curiosidade e engenhosidade dos químicos que nos precederam. Sem seus esforços, nunca teríamos experimentado o entendimento e a fascinação que constituem a alegria da química.”

PENNY LE COUTEUR / JAY BURRESON

Agradecimentos

A Deus pela vida, pela coragem e pela força para nunca desistir;

Aos meus pais, Sonia e Benjamim, pela amizade, pelo apoio, por cada ensinamento e por me mostrarem que a educação era o bem mais valioso que eu poderia herdar;

Ao meu namorado Renato por todo o apoio, ajuda, compreensão e carinho durante todos esses anos e os que ainda virão;

Ao Prof. Dr. Sergio A. Spinola Machado, por toda atenção e paciência durante essa orientação. Pela recepção no grupo GMEME com plenos recursos para o desenvolvimento deste projeto, além da confiança a qual espero um dia poder retribuir;

Ao técnico João Tiengo, pelos intermináveis trabalhos na oficina, além da disponibilidade em ajudar em tudo o que fosse necessário;

Ao Dr. Marcelo Luiz Calegaro por toda a ajuda principalmente com as análises de Raio-X;

Ao professor Doutor Antônio Ricardo Zanatta do IFSC- USP pelas as medidas de Raman;

À Profª Drª Ivani Aparecida Carlos, amiga e orientadora de Iniciação Científica, que fez com que eu me apaixonasse pela pesquisa. Além de todos os professores que passaram por minha vida e contribuíram para o meu crescimento;

Aos meus queridos amigos químicos (Lari, Alexandre, Yara, Wânia, Lu, Paula(s)...) que conheci na graduação e espero que todos alcancem seus objetivos;

Às amigas Sara, Milena, Raquel, Claudia por me entenderem!

A todos do GMEME pela amizade e por estarem sempre dispostos ajudar, fazendo do grupo uma segunda família;

Obrigada!

"Você entende a relatividade quando vê que duas horas próximo a sua namorada parecem um minuto. Ponha sua mão num forno quente por um minuto, e isto lhe parecerá duas horas. Isto é relatividade."

ALBERT EINSTEIN

Resumo

O óxido nítrico além de poluidor ambiental, também desempenha diversas funções no organismo, por exemplo, trata-se de uma molécula sinalizadora em diversos processos metabólicos. Por causa disso, a detecção de NO é uma importante ferramenta para a medicina. Assim, existe um significativo interesse tanto da indústria como da medicina no desenvolvimento de novos materiais que possam detectar óxido nítrico. Os Nanotubos de Carbono de Paredes Múltiplas, intensivamente explorados desde sua descoberta em 1991, são considerados promissores em diversas aplicações devido a sua estrutura única e a possibilidade de realizar modificações as quais influenciam suas propriedades físicas e químicas. Já o ouro, conhecido por sua baixa atividade catalítica quando utilizado na forma cristalina, começou a ter seu poder catalítico explorado a partir de 1985, quando descobriu-se que, se utilizado na forma de pequenas partículas, este comporta-se mais como átomos individuais e torna-se mais catalítico que o ouro cristalino. Assim, o objetivo deste trabalho foi promover a funcionalização dos nanotubos de carbono, o que pode ser confirmado por MEV, FTIR e RAMAN, e, a partir dos grupos funcionais gerados, ancorar nanopartículas de ouro em suas paredes, a fim de otimizar as propriedades catalíticas do material. O material gerado foi caracterizado morfológicamente e estruturalmente por MEV-FEG, EDX, Raio-X, RAMAN e UV-vis. Já a caracterização eletroquímica foi feita por voltametria cíclica frente ao $K_4[Fe(CN)_6]$, com o qual foi possível mostrar um aumento na densidade de corrente de pico, o deslocamento do potencial de pico para valores menos positivos e também a diminuição do sobrepotencial, quando comparados o sensor Náfon®/AuNP/MWCNT/GC com o Náfon®/GC, Náfon®/MWCNT/GC e Náfon®/Ouro. O eletrodo proposto foi utilizado na determinação de Óxido Nítrico, em tampão PBS pH 4,4, utilizando a técnica de voltametria de pulso diferencial. A metodologia proposta apresentou um limite de detecção de $2,4 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ e um limite de quantificação de $7,9 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$. Assim, este trabalho mostrou a potencialidade de utilização do eletrodo Náfon®/AuNP/MWCNT/GC como sensor eletroquímico para detecção e quantificação de óxido nítrico.

PALAVRAS-CHAVE: sensor, nanotubos, nanopartículas de ouro, óxido nítrico.

Abstract

Nitric oxide (NO) is an environmental pollutant, which also plays several roles in the body, for example, as a signaling molecule for many metabolic processes. Because this, detecting NO is an important tool in medicine. As a result, there was significant interest in both industry and medicine in developing new materials that can detect NO. Multiwall carbon nanotubes, that have been intensively explored since its discovery in 1991, are considered promising in many applications due to its unique structure and because it can be easily modified in order to tuning their physical and chemical properties. But the interest in using gold as the catalytic material appeared only in 1985, when was discovered that small particles form of gold behaves as individual atoms and it are more catalytic than crystalline gold. In this way, the objectives of this study were promoted the functionalization of carbon nanotubes - which could be confirmed by SEM, FTIR, Raman – and, with the functional groups generated, anchoring gold nanoparticles in their walls, in order to improve the catalytic properties of such material. The developed material was morphologically and structurally characterized by FEG-SEM, EDX, X-ray, Raman and UV-vis. As well, the electrochemical characterization was performed by cyclic voltammetry in $K_4[Fe(CN)_6]$ solution. When Nafion®/AuNP/MWCNT/GC sensor was compared with Nafion®/GC, Nafion®/MWCNT/GC and Nafion®/Gold, it shows an increase in current density peak, the peak potential displacement to less positive values and also decreased potential difference between the cathodic and anodic peak. The proposed electrode was used in the determination of nitric oxide in PBS buffer pH 4.4, which showed a detection limit of $2,4 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ and a quantification limit of $7,9 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ using the differential pulse voltammetry. Thus, this study demonstrated the potential use of Nafion®/AuNP/MWCNT/GC electrode as an electrochemical sensor in the nitric oxide detection and quantification.

KEYWORDS: sensor, nanotube, gold nanoparticle, nitric oxide.

Lista de ilustrações

Figura 1: Diferentes formas de materiais baseados em carbono.	15
Figura 2: (a) Como os vetores a_1 e a_2 podem ser utilizados para descrever o enrolamento da folha de grafite; tubos do tipo (b) cadeira, (c) zigzag e (d) quirais.	16
Figura 3: Representação dos (A) SWCNT (B) DWCNT (C) MWCNT.....	17
Figura 4: Micrografias mostrando o diâmetro dos nanotubos: CNTs alinhados com (a) 40-50 nm e (b) 200-300 nm.	18
Figura 5: Esquema do processo de ancoramento das AuNP por interação eletrostática.....	22
Figura 6: Desenho esquemático da síntese AuNP/MWCNT. (1) Pré-mistura utilizando ultrassom. (2) adição do HAuCl_4 . (3) Os átomos de Au reduzidos agem como uma semente para outros átomos de Au. (4) AuNP depositados no MWCNT.	24
Figura 7: Detecção de NO por Quimiluminescência.....	28
Figura 8: Esquema ilustrativo da cela utilizada nos estudos eletroquímicos.....	37
Figura 9: Imagens de MEV dos MWCNT (a) sem tratamento prévio, (b) Submetidos ao tratamento com HNO_3 3M (c) Submetidos ao tratamento com HCl 5 mol L^{-1} , (d) Submetidos ao tratamento térmico.....	42
Figura 10: Espectros Raman dos nanotubos antes da funcionalização (MWCNTsf) e após a funcionalização (MWCNTf).....	44
Figura 11: Espectros de FTIR dos nanotubos de carbono antes do processo de funcionalização (--- MWCNTsf) e após a funcionalização (---MWCNTf)	45
Figura 12: Espectros de EDX das sínteses de AuNP utilizando sonda ultrassônica a (a) 30% e (b) 100%	46
Figura 13: Imagens de MEV-FEG das sínteses de AuNP utilizando sonda ultrassônica a (a) 30% e (b) 100%.....	47
Figura 14: Perfil voltamétrico das sínteses de AuNP/MWCNT utilizando (---) na s1 ultrassom a 30% e (---) na s2 ultrassom a 100%.....	48
Figura 15: (a) Espectro de UV-vis do sobrenadante das sínteses (---) s2 e (---) s3. Fotos digitais dos sobrenadantes das sínteses (b) s2 e (c) s3.....	49
Figura 16: Espectros de EDX das sínteses de AuNP/MWCNT utilizando (a) $1,55 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e (b) $1,55 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	50
Figura 17: Imagens de MEV-FEG das sínteses de AuNP/MWCNT utilizando (a) $1,55 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (s2) e (b) $1,55 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (s3) de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	51

Figura 18: Perfil voltamétrico das sínteses de Náfion®/AuNP/MWCNT/GC utilizando (---) na s2 $1,55 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3$ e (---) na s3 $1,55 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3$ em H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$	53
Figura 19: DPV na presença de $6,75 \mu\text{mol L}^{-1}$ de NO, em tampão PBS pH 4,4, utilizando o eletrodo Náfion®/AuNP/MWCNT/GC recém preparado (---), e após a ativação (---).	54
Figura 20: Eletrodos de Náfion®/AuNP/MWCNT/GC submetidos aos pré-tratamentos 1(---), 2(---) e 3(---) em H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $v = 100 \text{ mVs}^{-1}$	55
Figura 21: Comparação das CV do eletrodo Náfion®/AuNP/MWCNTs2/GC quando submetidos a ativação em meios diferentes, em H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (---) ou PBS pH 4,4 (---), na presença de 1 mmol L^{-1} de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, $v = 100 \text{ mVs}^{-1}$	56
Figura 22: Comparação das sínteses Náfion®/AuNP/MWCNT/GC s1 (---), s2 (---) e s3 (---) na presença de 1 mmol L^{-1} de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ em meio de H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$	57
Figura 23: Comparação das sínteses Náfion®/AuNP/MWCNT/GC s1 (---), s2 (---) e s3 (---) na presença de $9,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ NO em tampão PBS pH 4,4.	58
Figura 24: Imagem de MEV-FEG (a) MWCNT funcionalizados e (b) AuNP/MWCNTs2	60
Figura 25: Voltametria cíclica em H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ utilizando como eletrodo de trabalho Náfion®/AuNP/MWCNTs2/GC (---) ou Náfion®/MWCNTf/GC (---)	61
Figura 26: Difrátogramas de raio-X do (a) MWCNTf e (b) AuNP/MWCNT s262	
Figura 27: Análise de RAMAN das amostras de AuNP/MWCNT s2 (---) e MWCNT funcionalizado (---)	63
Figura 28: Voltametrias cíclicas na presença de 1 mmol L^{-1} de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, em H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ dos eletrodos: (---) Náfion®/GC, (---) Náfion®/Ouro, (---) Náfion®/MWCNTf/GC, (---) Náfion®/AuNP/MWCNTs2/GC	64
Figura 29: Voltamogramas obtidos com o mesmo eletrodo em dias diferentes, na presença de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. (b) Densidades de corrente de pico faradaicas em função do tempo de estocagem.....	65
Figura 30: Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodos recém preparados na presença de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$	66
Figura 31: Voltametria cíclica em tampão PBS pH 4,4, na ausência (---) e presença (---) de $9,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de NO.	67

Figura 32: Variação da velocidade de varredura, de 50 a 400 mV s ⁻¹ , na presença de 9,0x10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ de NO em tampão PBS pH 4,4.	68
Figura 33: DPV Variando o pH do tampão PBS, em uma faixa de 2 a 8, na presença de 9,0x10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ de NO utilizando os parâmetros: mt = 0,02s it = 0,1 sp = 0,002 ma = 0,05	69
Figura 34: Variação do <i>interval time</i> de 0,1 s a 0,5 s, fixando o <i>step potential</i> em 0,005 V, o <i>modulation time</i> = 0,05 s e <i>modulation amplitude</i> = 0,1 V	70
Figura 35: Variação do <i>modulation amplitude</i> de 0,01 V a 0,05 V, fixando <i>step potential</i> = 0,005 V, <i>modulation time</i> = 0,01 s e <i>interval time</i> = 0,5 s	70
Figura 36: Variação do <i>modulation time</i> de 0,01 s a 0,05 s fixando <i>step potential</i> = 0,005 V, <i>interval time</i> = 0,5 s e <i>modulation amplitude</i> = 0,1 V	71
Figura 37: Voltamogramas de DPV utilizando o eletrodo de GC modificado com AuNP/MWCNT, na presença de 0; 2,5; 4,5; 6,75; 9; 11,25; 13,5; 15,75; 18; 20,25; 22,5 µmol L ⁻¹ de NO, realizadas em triplicata (a,b,c), e as curvas analíticas de I _p versus [NO] com a aproximação linear da média destas (d).	72
Figura 39: Voltamogramas de DPV utilizando o eletrodo de GC modificado com AuNP/MWCNT, na presença de 188,4; 169,56; 150,72; 131,88; 113,04; 94,2; 75,36; 56,52; 37,68; 18,84; 0 µmol L ⁻¹ de NO ₂ ⁻ , realizadas em triplicata (a,b,c), e as curvas analíticas de I _p versus [NO ₂ ⁻] com a aproximação linear da média destas (d).	74

Lista de tabelas

Tabela 1: Quantidades de F _E NO para o diagnóstico de sintomas respiratórios crônicos.....	27
Tabela 2: Principais metodologias para determinação de NO revisadas neste trabalho.	31
Tabela 3: Reagentes utilizados no presente trabalho.	33
Tabela 4: Composição das soluções tampão PBS, para o preparo de 200 mL de solução aquosa.	34
Tabela 5 : Sínteses realizadas.	40
Tabela 6: Valores das bandas D, G e D normalizada para os nanotubos antes do processo de funcionalização (MWCNTsf) e após o processo (MWCNTf).....	44
Tabela 7: Sumarização da caracterização das sínteses s1, s2 e s3.....	59

Lista de abreviaturas e siglas

MWCNT	Nanotubo de carbono de paredes múltiplas
MWCNTf	MWCNT funcionalizado
S1	Síntese 1
S2	Síntese 2
S3	Síntese 3
AuNP	Nanopartícula de ouro
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
FEG	Canhão de elétrons
EDX	Energia dispersiva de Raio-X
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier GC
	Carbono vítreo
CV	Voltametria cíclica
DPV	Voltametria de pulso diferencial
i	Corrente
I	Densidade de corrente
E (V)	Potencial (volts)
I _{PA}	densidade de corrente do pico anódico
PBS	Solução tampão fosfato
mt	Modulation time
it	Interval time
sp	Step potential
ma	Modulation amplitude

Sumário

1	Introdução.....	14
1.1	Nanotubos de carbono	15
1.2	Nanotubos de Carbono Modificados	19
1.3	Nanopartículas de Ouro	21
1.4	Óxido Nítrico	26
1.4.1	Propriedades químicas ⁵³	26
1.4.2	Importância do em sistemas biológicos.....	26
1.4.3	Determinação de Óxido Nítrico.....	28
1.4.4	Estado da arte da determinação eletroquímica do óxido nítrico.....	30
2	Objetivos	32
3	Experimental	33
3.1	Reagentes	33
3.2	Soluções	33
3.3	Metodologias	35
3.3.1	Microscopia Eletrônica de Varredura/Energia dispersiva de raio-X35	
3.3.2	Difração de Raio-X.....	36
3.3.3	Espectrometria Raman.....	36
3.3.4	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier	36
3.3.5	Espectrometria de Absorção Molecular no Ultravioleta-visível	37
3.3.6	Eletrodos e Sistema Eletroquímico.....	37
3.4	Purificação e Funcionalização dos MWCNTs.....	39
3.5	Decoração dos MWCNTs com Nanopartículas de Ouro	39
3.6	Preparação das suspensões AuNP/MWCNT e MWCNT	40
3.7	Preparação dos eletrodos de trabalho.....	40
4	Resultados e discussão	40
4.1	Purificação e funcionalização dos MWCNT	41

4.1.1	Caracterização morfológica e estrutural	41
4.2	Síntese das Nanopartículas de Ouro sobre os Nanotubos de Carbono .	45
4.2.1	Efeito da intensidade do ultrassom na síntese das AuNP/MWCNT	46
4.2.2	Efeito da concentração de Citrato de Sódio na síntese das AuNP/MWCNT	48
4.2.3	Pré-tratamento dos Eletrodos.....	53
4.2.4	Comparação das sínteses frente ao par redox $\text{Fe}(\text{CN})_3^{-3/-4}$	57
4.2.5	Comparação das sínteses frente ao NO	58
4.3	Comparação entre AuNP/MWCNTs2 e MWCNT	60
4.3.1	Comparação dos eletrodos frente ao par redox $\text{Fe}(\text{CN})_3^{-3/-4}$	63
4.3.2	Reprodutibilidade	65
4.4	Determinação de Óxido Nítrico	66
4.4.1	Teste de pH.....	68
4.4.2	Otimização dos parâmetros da DPV	69
4.4.3	Curva Analítica para o óxido nítrico	71
4.4.4	Influência do Náfion	72
5	Considerações finais.....	75

1 Introdução

O óxido nítrico (NO), substância de estudo neste trabalho, além de ser um conhecido poluidor ambiental, por ser gerado em processos de combustão, é biologicamente importante, pois desempenha diversas funções no organismo, podendo ser utilizada como molécula sinalizadora de diversos processos metabólicos, assim como em medicamentos.

Trata-se de uma linha tênue que separa o NO como uma substância tóxica do NO terapêutico. Este é capaz de causar irritação das mucosas, dor de cabeça, sufocamento, vertigem, edema pulmonar, queimaduras, forte vermelhidão dos olhos, conjuntivite e opacificação dos olhos.

NO também pode ser utilizado como um importante medicamento, ministrado diretamente na forma de gás por pacientes com hipertensão pulmonar grave¹, ou através de medicamentos geradores de NO, como o VIAGRA®, usados por homens com disfunção erétil, o NIPRIDE®, utilizado na redução imediata da pressão sanguínea e o AnimalNitro®, utilizado como suplemento por praticantes de musculação por aumentar o fluxo sanguíneo nos músculos, aumentando a contração muscular e deixando o músculo dilatado.

Assim, a quantificação de NO de maneira rápida, sensível e confiável é de grande importância prática tanto nas indústrias quanto na medicina. Hoje, está disponível no mercado o Sievers Nitric Oxide Analyzer (NOA 280i)®, um determinador total de NO (NO, nitrito, nitrato e nitrotióis) para amostras líquidas e gasosas, baseado em quimiluminescência, com a desvantagem de possuir 16 kg, ter a necessidade de um equipamento de vácuo com mais 21,5 kg, e possuir um custo alto de aquisição e manutenção². Outro equipamento é o NIOX-MINO®, também baseado em quimiluminescência o qual, ao contrário do anterior, é portátil. No entanto, necessita que o ar seja exalado em fluxo constante durante 6 s além possuir um tempo limitado de uso, fato que o encarece ainda mais³. Neste contexto, o uso de métodos eletroanalíticos aparece como a possibilidade de desenvolver um sensor alternativo aos presentes no mercado.

As vantagens dos métodos eletroquímicos incluem seletividade entre espécies eletroativas, alta sensibilidade, janela de detecção linear ampla, instrumentação portátil e

de baixo custo, além da possibilidade de explorar diferentes materiais de eletrodos com diferentes aplicabilidades⁴.

Neste trabalho foram exploradas as propriedades dos nanotubos de carbono, material largamente explorado atualmente, associados com as propriedades das nanopartículas de ouro, também largamente exploradas atualmente em diversas áreas.

A seguir, são discutidas as propriedades e aplicabilidade de ambos os materiais além do efeito sinérgico desta combinação.

1.1 Nanotubos de carbono

Eletrodos de carbono são largamente utilizados em eletroanálises por apresentarem baixas correntes de fundo, amplas janelas de potencial, baixo custo, serem quimicamente inertes e adequados para detecção de diversas espécies⁵. Vários tipos de carbono adequados para determinações eletro-analíticas estão disponíveis, tais como diamante, carbono vítreo, grafite, carbono pirolítico, fulereno e os recentemente descoberto, nanotubo de carbono (CNT, do inglês *carbon nanotube*), o qual apresenta diferentes propriedades devido às suas diferentes estruturas⁶, Figura 1.

Figura 1: Diferentes formas de materiais baseados em carbono.

FONTE: LAU, A. K.-T.; HUI, D. The revolutionary creation of new advanced materials—carbon nanotube composites. **Composites Part B: Engineering**, v. 33, n. 4, p. 263-277, 2002.

Em novembro de 1991, Sumio Iijima⁷ reportou a produção de uma nova estrutura finita de carbonos consistindo de tubos tipo agulha, de tamanho nanométrico, produzidos pelo método de evaporação arc-discharge. Desde então, os hoje conhecidos como nanotubos de carbono, vêm sendo foco de inúmeras investigações devido a características

eletrônicas interessantes, já que podem ser metálicos ou semi-condutores dependendo de sua estrutura e também, por exibirem propriedades mecânicas e térmicas excelentes⁸. Os CNTs são compostos de carbono com hibridização sp^2 , organizados de modo hexagonal, formando tubos de alguns nanômetros de diâmetro e alguns microns de comprimento⁹, apresentando as extremidades frequentemente fechadas. Devido às ligações covalentes formadas entre os átomos de carbono individuais, os CNTs são rígidos e potencialmente mais fortes que qualquer outro material conhecido¹⁰. Além dessas propriedades mecânicas e eletrônicas incríveis, os CNTs possuem interiores ocos bem definidos e biocompatibilidade com sistemas vivos¹⁰.

Estruturalmente, os CNTs podem ser descritos como folhas de grafeno enroladas sendo que, o modo que essa folha é enrolada afeta suas propriedades eletrônicas. Em geral, para descrever o modo que a folha foi enrolada utilizam-se vetores de posição (m,n) e, dependendo do vetor utilizado, obtém-se CNTs quirais, em cadeira ou zig-zag¹¹ (figura 2).

Figura 2: (a) Como os vetores a_1 e a_2 podem ser utilizados para descrever o enrolamento da folha de grafite; tubos do tipo (b) cadeira, (c) zigzag e (d) quiral.

FONTE: DAI, H. Carbon Nanotubes: Synthesis, Integration, and Properties. **Accounts of Chemical Research**, v. 35, n. 12, p. 1035-1044, 2002

Os CNTs existem em três formas básicas (figura 3)¹², nanotubos de carbono de parede única (SWCNTs, do inglês *single wall carbon nanotubes*), parede dupla (DWCNTs, do inglês *Double wall carbon nanotubes*) e os de paredes múltiplas (MWCNTs, do inglês *multi wall carbon nanotubes*), onde os planos concêntricos cilíndricos interagem uns com os outros através de forças de Van der Waals¹³.

Figura 3: Representação dos (A) SWCNT (B) DWCNT (C) MWCNT

FONTE: SHEN, C.; BROZENA, A. H.; WANG, Y. Double-walled carbon nanotubes: Challenges and opportunities. **Nanoscale**, v. 3, n. 2, p. 503-518, 2011.

Atualmente, CNTs são produzidos por diferentes técnicas, dentre elas a Deposição de vapor químico (CVD, do inglês *chemical vapor deposition*) incluindo o processo de deposição de monóxido de carbono à alta pressão (HiPco, do inglês *hight-pressure carbon monoxide*), *Arc discharge* e erosão a laser.¹⁰

Arc discharge e erosão a laser possuem a desvantagem de envolver temperaturas maiores ou iguais a 3000°C, o que limita a quantidade de CNTs produzida, também os métodos de evaporação geram grandes quantidades de carbono em formas não desejáveis e espécies metálicas, e finalmente não permitem o controle dos aspectos geométricos dos CNTs¹⁴.

Já pelo método CVD, os CNT crescem sobre partículas de catalisadores metálicos utilizando hidrocarbonetos gasosos como fonte de átomos de carbono, o que possibilita a utilização de temperaturas relativamente baixas (500-1000°C)¹¹. Uma característica única da CVD é a obtenção de arranjos alinhados de CNTs com diâmetros e comprimento controlados, tal como observado na figura 4¹⁵.

Figura 4: Micrografias mostrando o diâmetro dos nanotubos: CNTs alinhados com (a) 40-50 nm e (b) 200-300 nm.

Fonte: THOSTENSON, E. T.; REN, Z.; CHOU, T.-W. Advances in the science and technology of carbon nanotubes and their composites: a review. **Composites Science and Technology**, v. 61, n. 13, p. 1899-1912, 2001.

Independente da metodologia empregada, a produção de CNTs sempre gera quantidades significantes de impurezas, tais como carbono amorfo, partículas catalisadoras e fulerenos, as quais devem ser eliminadas já que interferem nas propriedades dos CNTs¹⁶, com isso, diversas metodologias de purificação dos CNTs vêm sendo intensivamente exploradas.

Essa purificação pode ser realizada de modo brando, utilizando, por exemplo, multiplos ciclos de centrifugação, metodologia que purifica os SWCNT sem encurtá-los ou oxidá-los, no entanto, os CNTs continuam insolúveis devido às fortes interações de Van der Waals o que faz com que os mesmos agreguem-se. Com isso, ao utilizar metodologias brandas de purificação, uma segunda etapa para melhorar a solubilidade dos CNTs torna-se necessária, tal como a utilização de surfactantes¹⁶.

Também podem ser utilizadas rotas oxidantes de purificação, as quais normalmente envolvem ácidos fortemente oxidantes como HNO_3 , podendo ser realizado por exemplo sob refluxo^{17,18} ou sob agitação ultrassônica e temperatura ambiente⁵. Também é comum a utilização de uma mistura de ácidos, $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$ (1V:3V) em temperatura ambiente^{19,20}, sob aquecimento²¹ ou sob agitação ultrassônica em temperatura ambiente²².

No entanto, Rosca, I. D. *et al.*¹⁷ reportam que a oxidação dos MWCNTs em ácido nítrico leva a uma perda de CNTs sendo que, após uma exposição de 24 a 48 horas, há uma perda significativa de 60-90%. Assim, a fim de sanar esse problema, Delpeux, S. *et al.*²³ utilizaram um tratamento envolvendo duas etapas, sendo utilizado na primeira etapa HNO_3 concentrado e em ebulição a fim de abrir as extremidades dos nanotubos, seguido de um tratamento térmico com fluxo de CO_2 para eliminar os carbonos

desordenados produzidos pelo primeiro tratamento. Do mesmo modo, Chen, X. H. *et al.*²⁴ propuseram um tratamento não destrutivo em três etapas, iniciando por um refluxo em HNO_3 3 mol L^{-1} para dissolver partículas metálicas e carbono amorfo, seguida pelo tratamento em HCl 5 mol L^{-1} o qual promove rupturas nas paredes laterais e nas extremidades dos MWCNTs e por fim o tratamento térmico a fim de eliminar o carbono em formas não-desejadas produzido pelos tratamentos anteriores.

1.2 Nanotubos de Carbono Modificados

Utilizar MWCNTs em diversas aplicações tecnológicas é considerado promissor devido a sua estrutura única e a possibilidade de realizar modificações as quais influenciam suas propriedades físicas e químicas¹³. Os tratamentos oxidantes citados, além de purificar os CNTs, promovem a ruptura das extremidades e geram defeitos nas paredes laterais os quais são estabilizados por ligações $-\text{COOH}$ e $-\text{OH}$, isto torna os CNTs mais reativos e solúveis²⁵. Através desta funcionalização, é possível realizar o ancoramento de diferentes materiais, o que permite a otimização das propriedades dos CNTs tornando-os promissores em diversas aplicações tecnológicas.

Meng, Z. *et al.*²⁶ modificaram o eletrodo de MWCNT suportado em GC com óxido de Cobalto para a detecção amperiométrica de nitrito obtendo um eletrodo com boa estabilidade de estoque, reprodutibilidade e seletividade.

Motivados pela prosperidade do uso de CNTs na fabricação de biosensores, Chen, R. J. *et al.*²⁷ realizaram a funcionalização não-covalente dos SWCNT o que permitiu a imobilização de proteínas e biomoléculas menores com um alto grau de controle e especificidade. Cao, L. *et al.*²⁸ também reportam a funcionalização dos MWCNT com uma posterior modificação utilizando a fitalocianina com óxido de titânio, aumentando a fotossensibilidade do material, levando à produção de dispositivos fotocondutores.

Devido ao fato de compostos de CNT modificados com polímeros condutores apresentarem tanto as propriedades características de cada um dos componentes quanto novas propriedades devidas ao efeito sinérgico desta nova combinação, Guo, M. L. *et al.*²⁹ desenvolveram um eletrodo de MWCNT modificado com polianilina o qual apresentou uma melhora na propriedade eletrocatalítica durante a redução de nitrito, propriedade não observada na polianilina ou MWCNTs isoladamente.

Nanopartículas de metais nobres vêm sendo utilizadas como sensores eletroquímicos devido a suas propriedades, tais como uma extraordinária condutividade,

alta razão superfície/volume, e biocompatibilidade, sendo que, para aprimorar essas propriedades, a combinação com outros materiais está sendo largamente utilizada³⁰. Vairavapandian, D. *et al.*¹⁶ afirmam que, a alta área superficial dos CNTs torna-o um candidato ideal para ser utilizado como suporte para nanopartículas metálicas, além do mais, CNTs modificados com nanopartículas metálicas têm apresentado um aumento nas propriedades de detecção e eficiência eletrocatalítica.

A fim de explorar a alta atividade catalítica dos CNTs Li, W. *et al.*³¹ realizaram a síntese de nanopartículas de platina suportadas em MWCNT ou carbono preto XC-72 e, quando aplicados como cátodo em células combustíveis, o Pt/MWCNT apresentou uma atividade catalítica significativamente maior. Também, Kang, X. *et al.*³² reportam a utilização de nanoclusters de cobre para modificar eletrodos de MWCNT na produção de um sensor de glicose não-enzimático, o qual apresentou alta sensibilidade e estabilidade, rápida resposta e uma atividade eletrocatalítica sinérgica combinando nanoclusters com os CNTs.

Outra possibilidade é explorar as propriedades sinérgicas através da interação dos CNT, nanopartículas e outros componentes, como foi o caso do trabalho reportado por Xiao, F. *et al.*³³ no qual realizam a eletrodeposição ultrassônica de nanopartículas de prata e de ouro em um eletrodo de GC modificado com MWCNTs e líquido iônico (IL, do inglês *ionic liquid*). Os eletrodos foram utilizados na determinação de nitrito, obtendo-se um aumento de corrente de pico de oxidação na seguinte ordem: GC < IL/GC < MWCNT/GC < MWCNT-IL/GC < Au-Pt/GC < Au-Pt/IL/GC < Au-Pt/MWCNT/GC < Au/MWCNT-IL/GC < Pt/MWCNT-IL/GC < Au-Pt/MWCNT-IL/GC.

Dentre as inúmeras possibilidades de combinações entre nanomateriais, compósitos de ouro e nanotubo de carbono despertam um interesse em particular devido a sua fácil preparação e uma larga gama de aplicações.

1.3 Nanopartículas de Ouro

Observou-se um grande crescimento no interesse do poder catalítico do ouro iniciando por volta de 1985, no entanto, essa propriedade só apresenta-se sob circunstâncias específicas. A utilização do ouro como catalisador não parecia possível já que seu poder de quimiossorção era muito baixo, no entanto, quando utiliza-se pequenas partículas de ouro sobre um suporte reativo, o ouro passa a se comportar mais como átomos individuais, explicando como o ouro pode ser utilizado como um catalisador.³⁴

Faraday, M.³⁵ foi o primeiro a reportar, em 1857, a produção de partículas de ouro e seu comportamento frente à luz polarizada comparando-as com uma folha de ouro. Através da alteração dos agentes redutores observou a alteração da cor da solução formada evidenciando a alteração do tamanho das partículas formadas.

Segundo Turkevich, J.³⁶, a preparação de soluções coloidais de ouro pode ser feita por basicamente duas metodologias: a desintegração de fios de ouro metálico utilizando arco elétrico ou então pela redução do sal de ouro utilizando agentes redutores ou radiação. Entretanto, a redução do ácido cloroáurico utilizando citrato de sódio a 100°C, destacou-se por apresentar excelente estabilidade e uniformidade no tamanho das partículas.

Atualmente, a preparação de nanopartículas de ouro, AuNPs (do inglês, gold (Au) nanoparticles), geralmente envolve a redução do ácido tetracloroáurico (HAuCl_4) utilizando agentes redutores ou eletrodeposição. Suspensões monodispersas de ouro foram produzidas por Frens, G.³⁷ utilizando 50 ml de uma solução de HAuCl_4 1% (m/m), a qual é aquecida até entrar em ebulição, quando então é adicionado o citrato de sódio 0,01%. A reação completa-se após cerca de 5 min, sendo que, o prolongamento desse tempo de aquecimento não altera a suspensão de ouro produzida. Foram feitos estudos com relação a quantidade de citrato, mostrando que a quantidade deste na reação altera substancialmente o tamanho das partículas de ouro produzida, variando de uma solução laranja com tamanho de partícula de 16 nm (1,0 ml de citrato 0,01% m/m) até uma solução violeta com tamanho de partícula de 147 nm (0,16 mL de citrato 0,01% m/m).

Goia, D. e Matijević, E.³⁸ propuseram uma metodologia utilizando uma solução aquosa de HAuCl_4 , ácido hidrocloreto ou hidróxido de sódio, e ácido ascórbico como agente redutor obtendo partículas esféricas com diâmetro variando de 80 nm a 5 μm .

As AuNPs podem ser usadas para diversas aplicações, contudo, quando estas são utilizadas em eletroanálises, normalmente encontram-se suportadas em outros materiais

condutores ou semicondutores, tal como os CNTs. Sendo que, para a produção do material nanohíbrido AuNPs/CNTs, as nanopartículas podem ser produzidas separadamente para posterior ancoramento ao CNTs ou então reduzidas diretamente em suas paredes.

Quando o primeiro método é escolhido, algumas opções de ancoramento são possíveis, como por exemplo, Hu, G. *et al.*³⁹ produziram o AuNP/LC/GCE através da modificação do GC com L-cisteína (LC) e imergindo-o posteriormente em uma solução coloidal de AuNP, obtendo uma superfície igualmente recoberta pelas AuNPs. O eletrodo produzido foi utilizado na determinação simultânea de ácido úrico e ácido ascórbico em urina com uma separação de 0,306 V entre os potenciais de oxidação, podendo, portanto, ser aplicado em testes clínicos de rotina.

Jiang, K. *et al.*⁴⁰ decoraram a superfície de CNTs funcionalizados modificando-a primeiramente com um polieletrólito catiônico e, quando misturado com o colóide de ouro, as GNPs carregadas negativamente ficam ancoradas devido a interação eletrostática, tal como esquematizado na figura 5.

Figura 5: Esquema do processo de ancoramento das AuNP por interação eletrostática.

FONTE: JIANG, K.; EITAN, A.; SCHADLER, L. S.; AJAYAN, P. M.; SIEGEL, R. W.; GROBERT, N.; MAYNE, M.; REYES-REYES, M.; TERRONES, H.; TERRONES, M. Selective Attachment of Gold Nanoparticles to Nitrogen-Doped Carbon Nanotubes. *Nano Letters*, v. 3, n. 3, p. 275-277, 2003.

Manso, J. *et al.*⁴¹ primeiramente prepararam uma solução coloidal de ouro utilizando citrato de sódio como redutor, obtendo partículas de 16 ± 2 nm. Esta solução foi misturada a mão, por 10 min, com os MWCNTs e a água foi evaporada com fluxo de

N₂. Posteriormente, adicionaram glicose oxidase e Teflon®, obtendo o eletrodo GOx-Au-CNT-Teflon. O eletrodo preparado apresentou uma significativa melhora na determinação de H₂O₂, quando comparado com outros eletrodos de carbono.

Shi, Y. *et al.*⁴² primeiramente produziram uma solução coloidal de ouro utilizando 0,5 mL de HAuCl₄ 0,01 mol L⁻¹, 0,05 mL de citrato de sódio 0,01 mol L⁻¹ e 0,6 mL de NaBH₄ 0,1 mol L⁻¹. E, para o ancoramento das NPAu produzidas, os CNTs foram adicionados a 10 mL da solução coloidal de ouro, em seguida, sob intensa agitação e ultrassom por 10 min, uma pequena quantidade de etanol foi adicionada a fim de reduzir a tensão interfacial entre os CNTs e a solução aquosa de AuNP. Após 10 h adicionais de agitação, separou-se os AuNP/CNTs por centrifugação, obtendo-se CNT uniformemente decorados com NPAu.

Também é possível realizar o procedimento *in situ*, reduzindo as AuNP diretamente na parede dos CNTs. Por exemplo, Zhang, R. e Wang, X.⁴³ sintetizaram AuNP/CNT suspendendo 1,0 mg de MWCNTs (purificados por tratamento ácido) em 1 mL de HAuCl₄ 1% (m/m), em seguida essa solução foi diluída para 100 mL, agitada e aquecida até entrar em ebulição. Então, adicionaram o citrato de sódio, e com 5 a 10 min de reação, a solução não altera mais sua coloração, indicando que as nanopartículas já foram formadas. O agente redutor utilizado foi o citrato de sódio, já que, através da alteração de sua quantidade, facilmente altera-se o tamanho da AuNP produzida, sendo que, obtiveram um tamanho médio de 22 nm, quando 1,5 mL da solução de citrato de sódio foi utilizada e esse valor diminuiu para 15 nm quando 4 mL de citrato de sódio foram adicionadas.

Jiang, L. e Gao, L.⁴⁴ produziram AuNP diretamente nos CNTs (previamente submetidos a um tratamento térmico de 600 °C por 3 h, sob atmosfera de NH₃), misturando-os primeiramente com uma solução de ácido cítrico (agitação ultrassônica por 3-5 min para enfraquecer as agregações) e em seguida adicionando-se a solução de HAuCl₄ (sob agitação e a 70°C), obtendo-se um recobrimento homogêneo dos CNTs com as AuNP. No entanto, quando os CNTs foram misturados diretamente com ácido cítrico e HAuCl₄ obteve-se um recobrimento não-homogêneo dos CNTs. Assim, os autores sugerem que o ácido cítrico forma uma camada adsorvida em torno das paredes dos CNTs e, *in situ*, reduz o HAuCl₄ para produzir as AuNP diretamente em suas paredes, portanto, o ácido cítrico, além de agente redutor, atua como dispersante modificando o CNT.

Zanella, R. *et al.*⁴⁵ também utilizaram como agente redutor o ácido cítrico, reduzindo o HAuCl₄ diretamente nas paredes dos MWCNTs (previamente

funcionalizados com tiols alifáticos bifuncionais), no entanto, o procedimento foi realizado em temperatura ambiente sob agitação ultrassônica, obtendo-se partículas da ordem de 1,7 nm dispersas nas paredes laterais do MWCNT.

Também é possível utilizar o dodecilsulfato de sódio (SDS) como agente dispersante, e o borohidreto de sódio (NaBH_4) como agente redutor, neste caso, Alexeyeva, N. *et al.* ⁴⁶ primeiramente misturaram os 1,0 mg de MWCNTs (previamente tratados com 1 HNO_3 : 1 H_2SO_4) com 1 mL de SDS 1% (m/m), e, em seguida, adicionaram uma 30 μL solução de HAuCl_4 1% (m/m) sob agitação vigorosa, por fim, adicionaram 30 μL de NaBH_4 0,75% (m/m). No entanto, o número de AuNP ancoradas no MWCNT foi relativamente baixa.

Zhang, R. *et al.* ⁴⁷ decoraram os MWCNTs com AuNP realizando primeiramente a mistura dos MWCNTs com citrato de sódio 1% (m/m), a qual foi submetida a tratamento ultrasônico por 5 min a fim de formar um recobrimento de citrato em torno no nanotubo. Essa solução foi suspensa em 96 mL de água bi-destilada, e então, agitada e aquecida até entrar em ebulição. Em seguida, uma solução de HAuCl_4 1% foi adicionado ao sistema e mantida sob aquecimento por 5 min. Estudos com relação às quantidades de reagentes levaram à determinação das quantidades ideais para a obtenção de uma alta densidade de AuNP recobrindo os MWCNTs (3 mg de MWCNT, 4,0 mL de citrato de sódio 1% (m/m), 0,5 mL de HAuCl_4 1% (m/m) em um volume total de 100 mL), tal como esquematizado na figura 6.

Figura 6: Desenho esquemático da síntese AuNP/MWCNT. (1) Pré-mistura utilizando ultrassom. (2) adição do HAuCl_4 . (3) Os átomos de Au reduzidos agem como uma semente para outros átomos de Au. (4) AuNP depositados no MWCNT.

FONTE: ZHANG, R.; HUMMELGARD; MAGNUS; OLIN; HAKAN. Simple and efficient gold nanoparticles deposition on carbon nanotubes with controllable particle sizes. Amsterdam, PAYS-BAS: Elsevier, 2009. 5 p.

Outro método de produção de AuNP diretamente nas paredes dos CNTs foi reportado por Norouzi, P. *et al.* ⁴⁸ no qual produziram AuNP por eletrodeposição aplicando um potencial de -0,2 V por 200 s em um eletrodo de GC modificado com

MWCNT, o procedimento foi realizado em uma solução $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de HAuCl_4 em $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ de Na_2SO_4 obtendo AuNP com um diâmetro de 20 a 30 nm e distribuição simétrica.

Zhang, Y. *et al.* ¹⁸ também realizaram a deposição eletroquímica das AuNP sobre um eletrodo de GC modificado com CNTs utilizando a voltametria cíclica, para isso, 15 ciclos foram realizados entre os potenciais $-0,2 \text{ V}$ e $1,0 \text{ V}$, a uma velocidade de 50 mV s^{-1} , em uma solução contendo $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de HAuCl_4 em H_2SO_4 $0,2 \text{ mol L}^{-1}$. O método utilizado apresentou um limite de detecção de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ na determinação de pesticidas organofosforados utilizando voltametria linear, e pode ser aplicado em amostras reais.

CNTs recobertos com AuNP estão sendo utilizados para a determinação de diversos outros analitos, por exemplo, Xiao, L. *et al.* ⁴⁹ utilizaram o eletrodo de GC modificado com AuNP/MWCNT, o qual foi produzido por redução *in situ* do HAuCl_4 utilizando NaBH_4 como agente redutor, na detecção de arsênio (III), um poluente de águas altamente tóxico. O eletrodo mostrou-se superior aos eletrodos de macrodisco de ouro e MWCNT, apresentando uma alta sensibilidade e um limite de detecção abaixo do determinado pela *World Health Organization*.

AuNP e CNTs foram utilizados por Chauhan, N. e Pundir, C. S. ⁵⁰ no desenvolvimento de um sensor para ácido úrico modificando um eletrodo de fio de ouro com MWCNT, AuNP e a enzima uricase, obtendo um biosensor amperométrico com um limite de detecção de $0,01 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Naruse, J. *et al.* ⁵¹ utilizaram MWCNTs funcionalizados imobilizados em uma folha de carbono como suporte para as AuNP. Para isso, as AuNP (previamente preparadas e suspensas em hexano) foram gotejadas sobre f-MWCNT/C e o sistema foi submetido a um tratamento térmico (400°C por 2h) obtendo-se o eletrodo AuNP/f-MWCNT/C o qual foi utilizado com sucesso na oxidação de monossacarídeos em células bio-combustíveis.

Ma, J. C. e Zhang, W. D. ⁵² reportam o desenvolvimento de um sensor para metilparation utilizando um eletrodo de MWCNT alinhados verticalmente sobre tântalo, recobertos com AuNPs. O eletrodo possui um limite de detecção de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ e uma sensibilidade 4,5 vezes maior quando comparada com o eletrodo plano de MWCNT.

1.4 Óxido Nítrico

1.4.1 Propriedades químicas⁵³

O NO, quando gás é incolor, e quando sólido ou líquido é azul, pode ser produzido por várias reações envolvendo nitritos (1) ou ácido nítrico (2), sendo que, comercialmente, usualmente é obtido pela oxidação catalítica da amônia.

O NO reage instantaneamente com O₂ formando o dióxido nitrogênio, de coloração marrom e altamente reativo (3):

O NO é termodinamicamente instável a 25°C e 1 atm e possui elétrons π^* desemparelhados tornando-o uma molécula paramagnética. O elétron π^* é facilmente perdido formando o íon NO⁺, o qual reage facilmente com água (4):

1.4.2 Importância do em sistemas biológicos

Inicialmente conhecido apenas como um importante poluidor do ar, já que processos de combustão geram NO o qual é convertido a HNO₃, um dos responsáveis pela chuva ácida, que causa sérios danos à saúde humana, agricultura e construções. Assim, a determinação da quantidade de NO era limitada ao interesse industrial pois, a esta pode ser controlada através da otimização da fornalha durante os procedimentos industriais.⁵⁴

Hoje, o NO tem sido pesquisado em vários ramos da ciência pois passou a receber uma atenção especial quando foi descoberto sua ação potente como vaso dilatador em 1987.⁵⁵ Também foi reconhecido como a “Molécula do Ano” pela revista Science de 1992⁵⁶ e, em 1998, o prêmio Nobel em Fisiologia e Medicina contemplou Louis J.

Ignarro, Robert F. Furchgott e Ferid Murad pela descoberta do NO como um mediador biológico produzido pelas células mamárias^{55,57}.

Nas plantas, o NO possui influência no crescimento, desenvolvimento, na fotossíntese e quantidade de clorofila, podendo ser um indutor de estresse ou então ter ação protetora, dependendo de sua quantidade.⁵⁷ Assim, por ser considerada uma molécula sinalizadora, a detecção de NO em plantas é corriqueira em laboratórios de pesquisa.⁵⁸

No organismo, o NO é gerado pela enzima NOS (do inglês, *nitric oxide syntase*) por uma oxidação de 5 elétrons do aminoácido L-arginina a L-citrulina gerando 1 equivalente de NO⁵⁹ e tem as funções de controlar a pressão sanguínea devido à ação vasodilatadora, ter função na resposta imune do organismo, ser o principal bioquímico no desempenho sexual masculino e na memória de longo prazo⁵⁶, previne a agregação plaquetária, inibe a adesão de monócitos e neutrófilos no endotélio vascular (o que gera a aterosclerose) e tem efeito antioxidativo.⁶⁰

Devido a suas várias funções, anomalias nas quantidades de NO no organismo estão diretamente relacionadas com algumas doenças, tais como arterioesclerose, hipertensão, isquemia cerebral, neurodegradação, artrite, asma e infecção de intestino.⁶¹

Tabela 1: Quantidades de F_ENO para o diagnóstico de sintomas respiratórios crônicos.

F _E NO (ppb)	Classificação	Inflamação das vias aéreas	Doenças a serem consideradas	
			ADULTOS	CRIANÇAS
5 a 25	Baixa < 20 ppb em crianças < 25 ppb em adultos	Improvável	<ul style="list-style-type: none"> • Asma neutrofílica • Hiper-ventilação • Rinosinusite • Refluxo • Doença cardíaca 	<ul style="list-style-type: none"> • Bronquite de ferrugem • Refluxo • Fibrose cística • imunodeficiências
30 a 45	Intermediário	Presente mas mediano	• Basear a interpretação apenas nas apresentações clínicas	
50 a 65 Ou maior	Alto	Significante	<ul style="list-style-type: none"> • Asma atópica • Bronquite eosinofílica • Síndrome de Churg-Strauss • Terá uma resposta positiva se utilizar esteróides 	<ul style="list-style-type: none"> • Asma • Terá uma resposta positiva se utilizar esteróides

FONTE: Adaptado de TAYLOR, D.; PIJNENBURG, M.; SMITH, A.; JONGSTE, J. Exhaled nitric oxide measurements: clinical application and interpretation. Thorax, v. 61, n. 9, p. 817-827, 2006.

Em mamíferos, medidas da quantidade de NO exalado (F_ENO) na prática clínica são de grande importância, pois permite distinguir inflamações das vias aéreas determinando a intervenção medicamentosa a ser utilizada. Dentre as doenças passíveis

de diagnóstico por essa medida encontram-se a asma, fibrose cística, discinesia ciliar primária e em transplantes de pulmão. Na Tabela 1 encontram-se os níveis de $F_{\text{E}}\text{NO}$ relacionado com o diagnóstico de doenças.⁶²

1.4.3 Determinação de Óxido Nítrico

A molécula de NO mostrou ser de grande interesse em diversas áreas, podendo ser benéfica ou perigosa, dependendo de sua concentração, assim, um método confiável e de rápida detecção torna-se muito importante. No entanto, por se difundir rapidamente, ser altamente reativa e possuir um pequeno tempo de meia vida, a detecção de NO de maneira confiável é um desafio.⁵⁹

As técnicas mais comuns desenvolvidas para a determinação de NO são quimioluminescência, espectroscopia no UV-vis, fluorescência, espectroscopia de ressonância paramagnética de elétrons e eletroquímica.

Na técnica de quimioluminescência, o NO é transportado por um gás inerte até a cela de reação onde reage com O_3 gerando NO_2^* no estado excitado. O posterior decaimento do NO_2^* resulta na emissão de um fóton na faixa de 600-875 nm (Figura 7), os custos gerados por um equipamento específico é a desvantagem apresentada pela técnica.⁵⁹

Figura 7: Detecção de NO por Quimioluminescência.

FONTE: Adaptado de CONESKI, P. N.; SCHOENFISCH, M. H. Nitric oxide release: Part III. Measurement and reporting. **Chem. Soc. Rev.**, 2012.

Outro método para a determinação de NO consiste na reação do mesmo com oxi-hemoglobina produzindo meta-hemoglobina e nitrito (a oxi-hemoglobina apresenta uma banda de absorção em 415-421 nm e a metemoglobina em 401 nm). No entanto, a

oxigenação da hemoglobina necessita de equipamentos específicos, além do método estar sujeito a interferências de outras espécies oxigenadas. O corante fluorescente diaminofluoresceína também é largamente utilizado para a determinação de NO, contudo, necessita de reagentes específicos e um microscópio de fluorescência.⁵⁸

Um método indireto utilizado é o reagente de Griess, nesta técnica o NO deve ser convertido a nitrito e submetido a reações com reagentes específicos, gerando um composto com absorvância em 540 nm, no entanto, apesar de haver kits comerciais a preço acessível, sua sensibilidade é muito baixa, $0,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.⁵⁸

A ressonância paramagnética eletrônica também pode ser utilizada na determinação de NO, já que é baseada na observação de elétrons desemparelhados em campos magnéticos nos quais a região de microondas exibe ressonância entre as orientações paralelas e anti-paralelas das orientações dos spins. O limite de detecção desta técnica é da ordem de pmol L^{-1} , no entanto, a amostra necessita de um tratamento químico para dar longevidade ao radical NO· além da necessidade de um espectrometro de ressonância paramagnética eletrônica.⁵⁸

Em contraste com as demais técnicas, a detecção eletroquímica trata-se da única que permite a detecção direta, em tempo real e *in vivo*.⁶³ Além do mais, as técnicas eletroquímicas permitem uma boa seletividade com relação aos principais interferentes, boa sensibilidade, rápida resposta, possibilidade de miniaturização, instrumentação mais barata e fácil manipulação.

Bedioui, F. *et al.*⁶³ afirmam que as propriedades redox do NO dependem do tipo do eletrodo e do pH do meio e que o NO sofre redução de 1 elétron sob condições catódicas medianas (-0,5 a -1,4 V versus Ag/AgCl), formando o íon nitrosil:

Já em potenciais positivos (aproximadamente 0,8 V versus Ag/AgCl), o NO sofre oxidação através de um mecanismo de 3 elétrons:⁶³

A eletrorredução é menos afetada por espécies interferentes, no entanto sua resposta é diminuída no pH fisiológico. Já a eletrooxidação apesar de sensibilidade aumentada no pH fisiológico, é mais afetada por um grande número de espécies biológicas (por exemplo, CO, acetoaminofeno, nitrito, dopamina).⁵⁹

1.4.4 Estado da arte da determinação eletroquímica do óxido nítrico

Fei, J. J. *et al.*⁶⁴ reportam a produção de um sensor amperométrico de NO baseado em um complexo de ósmio e polímero redox, o qual recobre um eletrodo de GC modificado com SWCNT. Os resultados experimentais sugerem um atividade catalítica do filme produzido na eletro-oxidação de NO, com um limite de detecção de $5,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ na detecção amperométrica de NO. A utilização do Náfon® mostrou-se eficiente na eliminação de nitrito como interferente na determinação do NO em meio PBS pH 7,4.

Wang, F. *et al.*⁶⁵ depositaram nanopartículas de óxido de níquel sobre MWCNTs obtendo um sensor com excelente atividade catalítica o qual foi utilizado para o monitoramento amperométrico de NO em rim de ratos medicados com nitroprussiato de sódio (uma droga que aumenta o diâmetro dos vasos sanguíneos reduzindo a pressão arterial, cujo mecanismo de ação em nível celular consiste na decomposição de sua molécula em NO⁶⁶). O eletrodo proposto foi recoberto com uma quantidade otimizada de Náfon® (1,0 µL a 0,5%) para a maior resposta possível para o NO e a menor resposta possível para o nitrito, com a qual a resposta de NO diminuiu para 87% no entanto, a determinação de nitrito é diminuída para 8% em PBS pH 7,4. Esse sensor apresentou uma resposta amperométrica com um limite de detecção de $2,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$.

Ng, S. R. *et al.*⁶⁷ desenvolveram um nanocompósito em gel composto por grafeno tridimensional e líquido iônico para a determinação de NO, com uma sensibilidade de $11,2 \text{ µmol L}^{-1}$ e limite de detecção de 16 nmol L^{-1} . O eletrodo foi recoberto com 5µL de Náfon® 10% a fim de eliminar as interferências de espécies tais como nitrito e ácido ascórbico além de evitar a lixiviação do líquido iônico.

Wang, F. *et al.*⁶⁸ utilizaram um eletrodo de GC modificado com AuNP e quitosana na determinação de NO com um limite de detecção de $7,2 \text{ nmol L}^{-1}$, em rins de ratos e no medicamento anti-hipertensivo nitroprussiato de sódio, que no corpo é rapidamente quebrado gerando NO.

Maklin, J. *et al.*⁶⁹ modificaram eletrodos impressos de ouro com CNTs funcionalizados obtendo um sensor de gás NO. A alteração na resistência do eletrodo é

investigada após a exposição ao NO, obtendo uma resposta linear na faixa de 1 nA a 20 mA.

Yu, A. M. *et al.*⁷⁰ realizaram estudos com eletrodos de ITO e quartzo modificados com MWCNT, polieletrólito e AuNP, mostrando que o filme combinado com MWCNT e AuNP possuem um excelente efeito eletrocatalítico na oxidação de NO. O eletrodo foi utilizado na detecção voltamétrica de NaNO₂, indicando a possibilidade de utilização do eletrodo na detecção de NO já que, segundo os autores, o nitrito em meio ácido (PBS pH 2,0) gerou NO livre em solução.

Malinski, T. e Taha, Z.⁷¹ utilizaram um eletrodo de fibra de carbono recoberto com polímero de porfirina e náfion®, em meio tampão fosfato pH 7,4 para a determinação de NO, o qual apresentou um limite de detecção de 20 nmol L⁻¹ com a técnica de DPV.

Chen, Z. *et al.*⁷² desenvolveram um sensor eletroquímico de MWCNT/quitosana/AuNP recoberto com 2 µL de Náfion® 0,5% para a determinação de NO. A corrente amperométrica obtida foi proporcional à quantidade de NO em um amplo intervalo de concentrações com um limite de detecção de 7,6x10⁻⁹ mol L⁻¹.

Wu, F. H. *et al.*⁷³ utilizaram MWCNT e 10 µL de Náfion® 0,5% para modificar um eletrodo de carbono vítreo, o qual foi utilizado na determinação de NO em meio tampão PBS pH 7, obtendo um limite de detecção de 8,0x10⁻⁸ M.

Li, C. M. *et al.*⁷⁴ realizaram a determinação de NO com uma sensibilidade de 43,6 µA mM⁻¹ em um microeletrodo em gel de SWCNT e líquido iônico recoberto com Náfion®.

As principais metodologias utilizadas para a determinação de NO estão sumarizadas na tabela 2.

Tabela 2: Principais metodologias para determinação de NO revisadas neste trabalho.

REFERÊNCIA	ELETRODO MODIFICADO	LIMITE DE DETECÇÃO
⁷⁵	Cyt c/PIL-Gr/BPG	7.0x10 ⁻⁷ mol·L ⁻¹
⁷²	Nafion/MWCNT-CS-AuNP/GCE	7.60x10 ⁻⁹ mol·L ⁻¹
⁶⁴	(PVP-Os-EA/SWCNT/GCE	5.0x10 ⁻⁸ mol·L ⁻¹
⁶⁵	GCE/MWNTs-CS-NiO	20.0 x10 ⁻⁹ mol·L ⁻¹
⁶⁷	3-D Gr/ HMIMPF ₆	16 x10 ⁻⁹ mol·L ⁻¹
⁶⁸	AuNP-CS/ GCE	7.20 x10 ⁻⁹ mol·L ⁻¹
⁷³	Náfion®/MWCNT/GC	8.0x10 ⁻⁸ mol·L ⁻¹

Cyt c – citocromo c; PIL – Líquido iônico polimerizado (do inglês, Polymerized ionic liquid); Gr – Grafeno; BPG – grafite plano basal (do inglês, basal plane grafite); CS – quitosana (do inglês, chitosan); Os – Osmio; PVP - poli(4-vinilpiridina); EA - 2-bromoetilamina ; HMIMPF₆ - 1-hexil-3-metilimidazólio hexafluorofosfato

Este trabalho utiliza MWCNT, previamente tratados, decorados com AuNP e, devido ao fato de muitas propriedades das nanopartículas serem fortemente influenciadas pelo tamanho da mesma, optou-se por utilizar uma síntese utilizando citrato uma vez que o mesmo permite a produção de AuNP com diversos diâmetros e com considerável facilidade, bastando alterar a quantidade de citrato na solução^{37,43,47}. Três sínteses diferentes foram feitas e caracterizadas morfológica e eletroquimicamente frente ao par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$, cujas propriedades eletroquímicas já foram exaustivamente exploradas na literatura. A síntese que apresentou os melhores resultados foi então aplicada na determinação eletroquímica de óxido nítrico.

2 Objetivos

Os objetivos gerais deste trabalho foram o desenvolvimento de um sensor eletroquímico baseado em nanotubos de carbono de paredes múltiplas, ornamentados com nanopartículas de ouro para a determinação de óxido nítrico, envolvendo os seguintes objetivos específicos:

- Funcionalização e caracterização estrutural e morfológica do MWCNT;
- Sínteses e caracterização estrutural e morfológica das nanopartículas de ouro ancoradas em MWCNT (nomeadas de AuNP/MWCNT)
- Caracterização eletroquímica das sínteses desenvolvidas;
- Determinação da melhor síntese para a determinação de óxido nítrico;
- Desenvolvimento de uma metodologia de determinação de óxido nítrico utilizando o eletrodo de carbono vítreo modificado com AuNP/MWCNT;
- Avaliação da influência do interferente nitrito na determinação eletroquímica de NO utilizando o eletrodo proposto.

3 Experimental

3.1 Reagentes

Os reagentes utilizados neste trabalho foram de pureza analítica e encontram-se listados na Tabela 3:

Tabela 3: Reagentes utilizados no presente trabalho.

REAGENTE	PROCEDÊNCIA	FÓRMULA	TEOR (%)
MWCNT (d = 110-170 nm comprimento = 5-9µm)	Sigma-Aldrich	-	90%
Isopropanol	Merck	C ₃ H ₇ OH	99%
Ácido Nítrico	Merck	HNO ₃	65%
Ácido Clorídrico	Synth	HCl	36,8-38%
Ácido tetracloroaurico trihidratado	Sigma	HAuCl ₄ .3H ₂ O	99%
Ácido Sulfúrico	Calecon	H ₂ SO ₄	95-98%
Hexacianoferrato de Potássio	Merck	K ₄ [Fe(CN) ₆]	P.A.
Fosfato de Potássio monobásico	Merck	KH ₂ PO ₄	P.A.
Nitrogênio	White Martins	N ₂	99,9%
Ácido fosfórico	Mallinckrodt	H ₃ PO ₄	85%
Fosfato de Sódio dibásico	Merck	Na ₂ HPO ₄	P.A.
Citrato de sódio	Reagen	C ₆ H ₅ O ₇ Na ₃	P.A.
Nitrito de Sódio	Sigma Aldrich	NaNO ₂	P.A.
Hidróxido de Sódio	Merck	NaOH	P.A.

3.2 Soluções

Todos os procedimentos realizados utilizaram água purificada pelo sistema Milli-Q da Millipore, (resistividade $\geq 18\text{M } \Omega \text{ cm}^{-1}$). Para as medidas eletroquímicas utilizou-se como eletrólito suporte H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e tampão PBS, os quais foram previamente desaerados por 1 minuto com gás N_2 a fim de evitar interferências no O_2 nas medidas eletroquímicas e evitar que o NO reaja com o O_2 da solução, seguindo a reação (3). Os experimentos foram realizados em banho de gelo (4°C) a fim de evitar a volatilização do NO.

As soluções estoques aquosas de ouro ou citrato a 1% m/m foram preparadas utilizando 10 g L^{-1} de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ou $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$

As soluções tampão PBS em diversos pH foram preparadas segundo as concentrações da Tabela 4.

Tabela 4: Composição das soluções tampão PBS, para o preparo de 200 mL de solução aquosa.

pH	H_3PO_4 (mL)	$\text{K H}_2\text{PO}_4$ (g)	Na_2HPO_4 (g)
2,00	0,99	5,44	-
3,00	0,27	5,44	-
4,18	-	5,54	-
5,05	-	5,168	0,0858
6,00	-	3,68	0,805
7,00	-	0,942	1,57
8,00	-	0,122	1,86

A solução saturada padrão de NO foi preparada baseada nos procedimentos relatados na literatura^{67,76,77}, pelo gotejamento de H_2SO_4 de um funil de separação para um kitassato contendo NaNO_2 . O NO provém da reação entre H_2SO_4 e NaNO_2 , que fornece espécies NO_x gasosas como produto. Esse gás passa por uma solução saturada de NaOH que permite que apenas o gás NO seja obtido e, finalmente, é lavado em água Milli-Q (Millipore, Inc.). O NO obtido é coletado em um recipiente escuro selado contendo tampão PBS pH 4,4, previamente desaerado por 30 minutos com N_2 . A saturação da solução ocorre em 30 minutos. Essa solução saturada é feita fresca, no dia do experimento, sendo mantida em um recipiente escuro, vedado por um embolo de

borracha, com um *headspace* composto apenas por NO e em banho de gelo durante sua utilização, experimentos testes mostraram que sua concentração não se altera durante o dia de trabalho. A concentração da solução saturada de NO foi adotada como sendo é de $1,8 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, como recomendado pela literatura^{66,67,77} a qual determina que essa concentração não se altera em uma faixa de pH de 2 - 13⁷⁷. Para a preparação das soluções de NO diluídas, adicionou-se alíquotas de 10 µL de solução estoque de NO utilizando uma micropipeta com uma agulha adaptada à extremidade da ponteira para perfurar o embolo de borracha. O volume dessa célula foi de 8 mL de PBS pH 4,4. Essa solução também foi mantida sob refrigeração em torno de 4 °C durante sua utilização.

Todas as pesagens foram feitas utilizando-se uma balança Mettler Toledo AB135-S.

3.3 Metodologias

3.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura/Energia dispersiva de raio-X

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) trata-se da ferramenta mais utilizada para caracterizar a morfologia e dimensão dos MWCNTs já que possui a vantagem de ser uma técnica de simples execução e não necessitar de uma etapa de preparo de amostra trabalhoso. A imagem observada por essa técnica é proveniente do contraste do feixe de elétrons e a superfície da amostra, e varia de acordo com o número de elétrons emitidos pela mesma. Essa variação pode ocorrer devido à topografia, composição e voltagem da amostra.

As imagens de MEV dos MWCNT foram feitas utilizando o equipamento Zeiss-Leica/440, com filamento de tungstênio como fonte de elétrons, da Central de Análises Químicas do IQSC-USP. Enquanto as imagens de MEV dos MWCNTs modificados com nanopartículas de ouro utilizou-se o MEV Philips XL-30 FEG do Laboratório de Caracterização Estrutural do Departamento de Engenharia de Materiais da UFSCar.

O Zeiss-Leica/440 possui um detector de Energia dispersiva de Raio-X, EDX, (do inglês, *energy dispersive X-ray*) o qual foi utilizado para as microanálises químicas qualitativas e quantitativas da amostra. Essa técnica baseia-se na interação do feixe de elétrons com a amostra gera raios-X os quais permitem a identificação dos átomos com os quais os elétrons interagiram. Os raios-X são distribuídos em um espectro por ordem de energia, dando como resposta o espectro de energia dispersiva.

Todas as amostras foram preparadas gotejando uma suspensão de MWCNT ou AuNP/MWCNT em isopropanol, as quais foram secas com fluxo de N₂. Diversas gotas foram adicionadas até que todo o porta amostra de titânio estivesse recoberto com o filme.

3.3.2 Difração de Raio-X

Análise estrutural das amostras foram feitas pela técnica de Difração de Raio-X no Grupo de Cristalografia do IFSC-USP e os dados foram tratados utilizando o programa *Crystallographica Search-Match Version 2, 1, 1, 1 Copyright © 1996-2004, Oxford Cryosystems*.

A Difração de Raio-X trata-se de uma técnica importante na caracterização microestrutural de materiais cristalinos, pois permite a determinação da composição química e da estrutura cristalina da amostra. Para a análise utilizou-se a amostra na forma de pó e foi feita uma varredura de 5 a 100° 2 Θ , obtendo-se uma difratograma da intensidade do feixe difratado em função dos ângulos de difração 2 Θ .

3.3.3 Espectrometria Raman

Para avaliar o processo de funcionalização e ancoramento das nanopartículas de ouro nos MWCNTs foi utilizada a espectrometria Raman. Os espectros Raman foram feitos no Instituto de Física de São Carlos-USP, utilizando o equipamento Renishaw RM2000 acoplado a um microscópio ótico com resolução espacial da ordem de $\sim 1 \mu\text{m}^2$. Os espectros foram obtidos excitando a amostra com um laser de radiação monocromática em 488 nm e a radiação espalhada foi medida.

3.3.4 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

A Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR, do inglês *Fourier Transform Infrared*) foi utilizada para investigar de maneira qualitativa, a etapa de funcionalização dos MWCNTs. Para esse fim utilizou-se o equipamento Bomem/MB-102, da Central de Análises Químicas do IQSC-USP, e os espectros foram obtidos utilizando uma dispersão do pó finamente pulverizado em óleo de hidrocarboneto pesado (Nujol), sendo a dispersão obtida examinada como um filme entre placas salinas planas.

A radiação infravermelha não possui energia suficiente para promover transições eletrônicas, portanto, essa técnica está restrita a espécies moleculares que possuem diferenças energéticas entre os estados vibracionais e rotacionais. Como os grupos funcionais que aparecem após a funcionalização dos MWCNT absorvem radiação infravermelha em frequências conhecidas (por exemplo, O-H, C=O), a técnica é utilizada para averiguar se o processo de funcionalização foi efetivo.

3.3.5 Espectrometria de Absorção Molecular no Ultravioleta-visível

Muitos íons de metais de transição absorvem na região ultravioleta ou visível do espectro. Para o caso das nanopartículas de ouro, o comprimento de onda em que ocorre a absorção depende do tamanho da nanopartícula caracterizando as diferentes sínteses. Os espectros de UV-vis foram obtidos com o espectrofotômetro Jasco V-630.

3.3.6 Eletrodos e Sistema Eletroquímico

As medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando um potenciostato/galvanostato Metrohm, modelo Autolab – PGSTAT 302, conectado a um microcomputador com o software GPES.

Também utilizou-se uma cela de vidro, com capacidade de 40 mL com uma tampa de Teflon® com orifícios para borbulhar N₂, e para outros 3 eletrodos. Sendo uma folha de platina com 0,25 cm² utilizada como contra-eletródo e Ag/AgCl (KCl saturado) como eletródo referência. E, como eletrodos de trabalho, utilizou-se carbono vítreo (GC, do inglês *glass carbon*) com 3 mm de diâmetro, com e sem modificação, e ouro cristalino, com 2 mm de diâmetro, ambos embutidos em um suporte de Teflon®.

Figura 8: Esquema ilustrativo da cela utilizada nos estudos eletroquímicos.

3.3.6.1 Voltametria Cíclica

O estudo do comportamento eletroquímico dos eletrodos foi realizado utilizando a técnica de voltametria cíclica (CV, do inglês Cyclic Voltammetry), uma técnica largamente utilizada para a aquisição de informações qualitativas a cerca das reações eletroquímicas. Para isso, foi feito uma varredura linear do potencial de um eletrodo de trabalho estacionário em uma solução sem agitação.

3.3.6.2 Voltametria de Pulso Diferencial

Utilizou-se a voltametria de pulso diferencial (DPV, do inglês Differential-Pulse Voltammetry) para medir a quantidade de analito presente na solução. Em voltametria de pulso diferencial, pulsos de magnitude constante são sobrepostos a uma rampa linear potencial que é aplicada ao eletrodo de trabalho. A corrente é amostrada duas vezes, imediatamente antes da aplicação do pulso e novamente no final da vida de pulso (após aproximadamente 40 ms quando a corrente de carga decaiu). A primeira corrente é instrumentalmente subtraída da segunda, e esta diferença de corrente [$\Delta i = i(t_2) - i(t_1)$] é plotada em função do potencial aplicado. O voltamograma de pulso diferencial resultante consiste de picos de corrente, cuja altura é diretamente proporcional à concentração dos analitos correspondentes ⁴.

3.3.6.3 Cronoamperometria

Os eletrodos utilizados neste trabalho foram submetidos a um tratamento prévio a fim de ativar sua superfície do eletrodo, além de obter-se uma superfície reprodutiva e com um maior número de centros ativos. Para isso foram aplicados pulsos de potenciais por um determinado tempo utilizando a cronoamperometria, técnica cuja base é a medida da resposta de corrente quando se aplica um potencial.

3.4 Purificação e Funcionalização dos MWCNTs

Primeiramente, 200mg de MWCNT foram colocados em refluxo, sob agitação, por 24 horas, em uma solução de ácido nítrico a uma concentração de 3 mol L⁻¹ e em seguida filtrados a vácuo, lavados com água ultrapura e suspensos em HCl 5 mol L⁻¹.

Em uma segunda etapa, a solução foi colocada em refluxo, sob agitação por 6 horas. Em seguida, os MWCNT foram novamente filtrados a vácuo, lavados com água ultrapura até pH neutro.

Como terceiro e último tratamento, foi feito a calcinação dos MWCNT em atmosfera estática, a 510°C por 60 minutos, obtendo-se o material puro. A temperatura utilizada foi a mesma que Chen, X. H. *et al.*²⁴ determinaram como ideal através da técnica TGA.

3.5 Decoração dos MWCNTs com Nanopartículas de Ouro

Após a etapa de pré-tratamento, os MWCNTs foram decorados com nanopartículas de ouro (AuNP) seguindo o procedimento descrito por Zhang, R. *et al.*⁴⁷.

Em uma etapa de pré-dispersão, 3 mg de MWCNT submetidos ao tratamento anterior foram misturados com 4,0 mL de uma solução aquosa de citrato (1,0% m/m) e a mistura foi submetida a tratamento ultrassônico (30 ou 100% da capacidade do equipamento) por 5 min. Após essa pré-dispersão, a suspensão obtida foi misturada a 96,0 mL de água ultrapura. A suspensão diluída foi aquecida, sob agitação, até entrar em ebulição.

Iniciada a ebulição, adicionou-se 0,5 mL de uma solução aquosa de HAuCl₄ (1,0 ou 0,1% m/m), e o sistema foi mantido sob agitação e ebulição por 5 min. Durante a reação, a coloração da solução altera-se de incolor com partículas pretas em suspensão, para vermelho com partículas pretas em suspensão, indicando a formação de

nanopartículas de ouro. As alterações feitas na síntese a fim de verificar a influência do tratamento ultrassônico e da quantidade de citrato estão listadas na tabela 4.

Tabela 5 : Sínteses realizadas.

	SÍNTESE 1 (s1)	SÍNTESE 2 (s2)	SÍNTESE 3 (s3)
TRATAMENTO ULTRASSÔNICO	30% da potência do equipamento	100% da potência do equipamento	100% da potência do equipamento
QUANTIDADE DE CITRATO % massa/massa	1,0%	1,0%	0,1%

Após a síntese, a solução obtida foi deixada esfriar em temperatura ambiente e posteriormente centrifugada a 5400 rpm e foi seco em estufa a 70°C.

3.6 Preparação das suspensões AuNP/MWCNT e MWCNT

Os materiais obtidos AuNP/MWCNT s1, AuNP/MWCNT s2, AuNP/MWCNT s3, MWCNT foram suspensos em isopropanol em uma concentração de 1 mg mL⁻¹. Essa suspensão foi submetida a banho ultrassônico durante 60 min a fim de obter-se uma solução homogênea.

3.7 Preparação dos eletrodos de trabalho

O eletrodo de carbono vítreo de 3 mm de diâmetro foi polido em lixa 4000 e colocado em banho ultrassônico em etanol (5 min) e em água (5 min).

Após ser seco com fluxo de N₂, 5 gotas de 5 µL das suspensões foram colocadas sobre o eletrodo e secos com fluxo de N₂.

Frequentemente é reportado nos artigos ^{64,67,7174} a utilização do Náfon® a fim de evitar a interferência do nitrito nas medidas de NO. Assim, seguindo o procedimento Wang, *et. al* ⁶⁵, os eletrodos foram recobertos com 1,0 µL de Náfon® 0,5% a fim de evitar a interferências ânions e evitar a lixiviação do recobrimento dos eletrodos.

4 Resultados e discussão

4.1 Purificação e funcionalização dos MWCNT

Os MWCNTs contêm impurezas de carbono amorfo, partículas de grafite e metais catalisadores, portanto, necessita de tratamento prévio de purificação. Além do mais, para fins eletroanalíticos, esse material precisa ser um bom condutor, isso é possível através da funcionalização ácida dos nanotubos que insere grupos funcionais nas laterais e extremidades dos nanotubos. Neste trabalho foi realizado um tratamento de três etapas proposto por ^{Chen, X. H. *et al.* 24} a fim de purificar e funcionalizar os MWCNTs, uma vez que este apresentou-se eficiente e menos drástico que a maioria das outras metodologias.

4.1.1 Caracterização morfológica e estrutural

A imagem feita por MEV (figura 9a), mostra que o material cru possui MWCNT e aglomerados de materiais não tubulares e, pode-se observar as extremidades dos nanotubos fechadas. Após a primeira etapa de tratamento com HNO₃, observa-se (figura 9b) que grande parte das impurezas foram eliminadas. Isso decorre do fato do HNO₃ ser altamente oxidante, tornando-o hábil a dissolver partículas metálicas e remover carbono amorfo por oxidação. Com a segunda etapa do tratamento utilizando HCl, pode-se observar defeitos nos MWCNT provocados pelo tratamento ácido, (figura 9c), tais como, camadas externas abertas, extremidades desimpedidas e MWCNT mais finos. Após a calcinação dos MWCNT, obteve-se o material puro utilizado nas demais etapas deste trabalho. Nas imagens (figura 9d) observa-se que após calcinação final, os aglomerados de carbono amorfo e as camadas externas danificadas dos MWCNTs diminuíram. Essa etapa é baseada no fato de que os MWCNT e os carbonos amorfos possuem temperaturas de oxidação diferentes já que os MWCNT possuem ligações do tipo sp² e, portanto possuem temperaturas de oxidação mais altas que o carbono amorfo.

Os defeitos no material final são necessários para que haja grupos funcionais ácidos, o que aumenta o poder catalítico dos nanotubos e facilita o posterior ancoramento das nanopartículas de ouro.

Figura 9: Imagens de MEV dos MWCNT (a) sem tratamento prévio, (b) Submetidos ao tratamento com HNO_3 3M (c) Submetidos ao tratamento com HCl 5 mol L^{-1} , (d) Submetidos ao tratamento térmico.

(a)

(b)

(c)

(d)

A técnica de Raman foi utilizada para estimar a concentração de defeitos após a funcionalização dos MWCNTs. Para isso, comparou-se a intensidade da banda D nos espectros, a qual aparece em torno de 1300 cm^{-1} . Segundo Maultzsch, J. *et al.*⁷⁸, a intensidade da banda D deve ser normalizada em relação ao modo de alta energia, chamado de banda G (em torno de 1600 cm^{-1}) assumindo que, (i) o modo de alta energia é independente da concentração de defeitos e (ii) a intensidade da razão independe de qualquer outros efeitos. Para normalizar a banda D, seu valor foi dividido pelo valor da

banda G, obtendo-se o valor da banda D normalizada. Os espectros obtidos e as bandas D normalizadas encontram-se na figura 10 e tabela 5, respectivamente.

Como a Banda D normalizada está diretamente ligada aos defeitos estruturais dos MWCNTs analisados, o fato desta apresentar um pequeno aumento nos MWCNT submetidos ao pré-tratamento quando comparado com a análise dos MWCNT antes do pré-tratamento, é um indício de que os defeitos estruturais aumentaram após o processo de funcionalização e, portanto, a mesma foi realizada com sucesso.

Figura 10: Espectros Raman dos nanotubos antes da funcionalização (MWCNTsf) e após a funcionalização (MWCNTf).

Tabela 6: Valores das bandas D, G e D normalizada para os nanotubos antes do processo de funcionalização (MWCNTsf) e após o processo (MWCNTf).

	MWCNT sf	MWCNT f
Banda D	108,4 cm ⁻¹	146,1 cm ⁻¹
Banda G	1023,8 cm ⁻¹	1310,7 cm ⁻¹
Banda D norm.	0,106	0,111

Outro indício de que o tratamento realizado promoveu a funcionalização dos MWCNTs foi obtido pela análise por FTIR (figura 11).

Figura 11: Espectros de FTIR dos nanotubos de carbono antes do processo de funcionalização (--- MWCNTsf) e após a funcionalização (---MWCNTf)

A banda em 3317 cm⁻¹, que aparece exclusivamente no espectro do MWCNT funcionalizado, é devido ao estiramento do grupo hidroxila (-OH), enquanto a banda em 1617 cm⁻¹ é característica da carbonila (C=O). Já as bandas 2970-2840 cm⁻¹, 2395-2291 cm⁻¹, 1473 cm⁻¹ e 1378 cm⁻¹, são características do Nujol, usado como meio dispersante para a análise. O aparecimento desses grupos funcionais é devido ao tratamento oxidante a que foi submetido os MWCNTs, sendo estes localizados nas extremidades abertas e nos defeitos estruturais que puderam ser observados após o tratamento. A adição desses grupos auxiliam na homogeneização da amostra e no posterior ancoramento das AuNP nas paredes dos MWCNT.

4.2 Síntese das Nanopartículas de Ouro sobre os Nanotubos de Carbono

Após a funcionalização dos MWCNTs, passou-se para a etapa de síntese das nanopartículas de ouro para a qual foi utilizado HAuCl₄ como fonte de ouro e o citrato de sódio, Na₃C₆H₅O₇, como agente redutor e dispersante.

4.2.1 Efeito da intensidade do ultrassom na síntese das AuNP/MWCNT

A primeira etapa na decoração dos MWCNTs com nanopartículas de ouro consistiu na dispersão de 3,0 mg de MWCNTs funcionalizados em 4,0 mL de uma solução de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ utilizando ultrassom por 5 min.

A fim de determinar a influência desta etapa, duas sínteses foram realizadas utilizando a sonda ultrassônica a 30% e 100% de sua potência, tais sínteses foram nomeadas como s1 e s2, respectivamente (tabela 4). As demais condições experimentais foram mantidas, $1,27 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $1,55 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, 3,0 mg de MWCNT funcionalizados em 100 mL de meio reacional aquoso.

Nenhuma alteração visual pôde ser observada durante a síntese, assim, a fim de avaliar as alterações ocorridas, determinou-se a composição química das sínteses por EDX (figura 12). Análise por EDX da síntese de NPAu/MWCNT utilizando sonda ultrassônica a 30%, (figura 12a) indicou uma porcentagem média de ouro (n=3) de 2,3% com relação ao carbono. Já a síntese utilizando sonda ultrassônica a 100%, (figura 12b) gerou uma porcentagem média de ouro (n=3) de 8,4% com relação ao carbono.

Figura 12: Espectros de EDX das sínteses de AuNP utilizando sonda ultrassônica a (a) 30% e (b) 100%

Acredita-se que a utilização do ultrassom mais intenso faz com que os MWCNTs fiquem mais dispersos e completamente envolvidos pelo agente redutor $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, auxiliando no ancoramento das AuNP formadas, obtendo-se, assim, uma maior razão de ouro em relação ao carbono (figura 13).

A caracterização estrutural foi realizada utilizando-se a técnica de MEV-FEG, na qual é possível observar grandes diferenças entre as sínteses.

Na s1 (figura 13a) observa-se uma grande variedade nos tamanhos das AuNP, variando de aglomerados com cerca de 70 nm e partículas individuais com 22 nm, observa-se também um recobrimento não uniforme dos MWCNTs.

Já na s2, (figura 13b) apesar de apresentar alguns pequenos aglomerados, as esferas de AuNP são facilmente identificadas e possuem um tamanho médio de 20 nm, além do mais, mostram-se mais uniformemente distribuídas nas paredes dos MWCNTs.

Em ambos os casos, observa-se um ancoramento preferencial nas extremidades dos MWCNTs e na camada externa danificada, confirmando que os grupos funcionais gerados na primeira etapa de purificação e funcionalização dos MWCNTs auxiliam no ancoramento das AuNP.

Figura 13: Imagens de MEV-FEG das sínteses de AuNP utilizando sonda ultrassônica a (a) 30% e (b) 100%

Para um estudo eletroanalítico dos eletrodos preparados com as sínteses, realizou-se voltametrias cíclicas, em meio de H_2SO_4 0,1 mol L^{-1} , com uma velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} , utilizando-se eletrodos de GC modificados com AuNP/MWCNT s1 ou s2,

os quais foram submetidos ao pré-tratamento descrito em 4.2.3. Os voltamogramas obtidos (figura 14) apresentam um perfil característico do ouro, com um processo de oxidação pouco definido em torno de 1,0 V e um processo de redução bem definido em 0,85 V para o eletrodo AuNP/MWCNT s2, enquanto para o eletrodo AuNP/MWCNT s1, observa-se apenas um processo de redução em 0,75 V.

A integração do pico de redução do óxido de ouro em uma varredura catódica é um método comumente utilizado como indicativo da área superficial microscópica do ouro e se baseia na quimissorção de oxigênio na superfície do ouro durante uma varredura positiva de potenciais. O eletrodo modificado com a síntese s1 possui um pico de redução com uma área de $7,5 \times 10^{-5} \text{ V mA cm}^{-2}$, enquanto o modificado com a síntese s2 possui uma área $1,0 \times 10^{-4} \text{ V mA cm}^{-2}$, o que indica uma maior quantidade de óxido formado neste e, portanto, uma maior área superficial de ouro exposta presente na s2, coerente com os resultados de MEV-FEG e EDX apresentados anteriormente.

Figura 14: Perfil voltamétrico das sínteses de AuNP/MWCNT utilizando (---) na s1 ultrassom a 30% e (---) na s2 ultrassom a 100%

4.2.2 Efeito da concentração de Citrato de Sódio na síntese das AuNP/MWCNT

Também foi estudado o efeito da quantidade de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ na síntese das AuNP suportadas em MWCNT. Para isso, alterou-se apenas a concentração deste, sendo as demais condições experimentais mantidas constantes ($1,27 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 3,0 mg de MWCNT e sonda ultrassônica a 100% da potência máxima).

Assim, as sínteses nomeadas como s2 e s3 foram realizadas utilizando $1,55 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,55 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, respectivamente (tabela 4).

Durante o procedimento, já foi possível visualizar diferenças entre as sínteses, pois o sobrenadante da síntese s2 apresentou uma coloração vermelha enquanto o da síntese s3 apresentou uma coloração roxa. Segundo Frens, G.³⁷, suspensões de ouro com partículas com 24,5 e 41,0 nm de diâmetro apresentam coloração vermelha, enquanto as com partículas de 97,5 e 147,0 nm de diâmetro apresentam coloração roxa.

Após a centrifugação e secagem dos AuNP/MWCNT, uma parte das nanopartículas geradas não ficam ancoradas nos MWCNTs e ainda continuam no meio reacional. Esse sobrenadante foi caracterizado por espectrometria de absorção molecular no ultravioleta-visível com uma varredura de 400 a 700 nm e o espectro obtido está representado na Figura 15a juntamente com a foto digital dos dois sobrenadantes (figura 15b/c).

Segundo Ferning, D.G. *et al.*⁷⁹ as funções óticas do ouro são dependentes do tamanho de suas partículas e que partículas com aproximadamente 20 nm de diâmetro apresenta absorção no UV-Vis em aproximadamente 525 nm, coerente com a síntese s2, e essa banda se desloca para valores maiores de comprimento de onda com o aumento do diâmetro da partícula, sendo a banda em torno de 545 nm, apresentada pela síntese s3, característica de partículas com aproximadamente 70-80 nm de diâmetro. No entanto, como a síntese s3 apresentou uma banda alargada, provavelmente apresenta partículas livres de diâmetro variado, porém maiores que os apresentados pela s2.

Figura 15: (a) Espectro de UV-vis do sobrenadante das sínteses (---) s2 e (---) s3. Fotos digitais dos sobrenadantes das sínteses (b) s2 e (c) s3.

A microanálise da amostra s2 por EDX indicou uma porcentagem média de ouro (n=3) de 8,4% com relação ao carbono (figura 16a), enquanto a amostra s3 gerou uma porcentagem média de ouro (n=3) de 18,6% com relação ao carbono (figura 16b). Assim, mesmo com uma quantidade menor de agente redutor na síntese s3, uma maior quantidade de ouro foi reduzida, mostrando que a diferença entre a quantidade de AuNP formada está ligada principalmente à função do citrato como dispersante, uma vez que, estando presente uma menor quantidade de citrato, existe um espaço maior entre as moléculas de ouro, permitindo que as nanopartículas cresçam mais.

Figura 16: Espectros de EDX das sínteses de AuNP/MWCNT utilizando (a) $1,55 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e (b) $1,55 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$

Procedeu-se então com a análise estrutural das sínteses através da técnica de MEV-FEG (figura 17), com a qual é possível observar grandes diferenças entre as duas sínteses.

Figura 17: Imagens de MEV-FEG das sínteses de AuNP/MWCNT utilizando (a) $1,55 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (s2) e (b) $1,55 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (s3) de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$

Ambas as sínteses apresentam partículas bem distribuídas nas paredes laterais e extremidades dos MWCNT, no entanto, a síntese s3 (figura 17 b) apresentou partículas com um tamanho médio de 45 nm de diâmetro, o dobro do tamanho das AuNPs geradas pela síntese s2, a qual apresentou um tamanho médio de 20 nm. Observa-se também em s3 uma aglomeração de AuNP, com 213 nm de diâmetro, mostrando o ancoramento preferencial destas nas extremidades abertas, devido ao grande número de grupos funcionais presentes nesta região.

Pode-se observar uma correlação entre a quantidade $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ e o tamanho das nanopartículas, conforme assinalado no trabalho de Frens, G.³⁷, no qual foi proposto que o tamanho das nanopartículas de ouro é inversamente proporcional à quantidade de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ utilizado na síntese, indicando um mecanismo de crescimento através de um processo de nucleação rápido, seguido pelo crescimento controlado por difusão.

O pH da solução também deve ser considerado nesta discussão, já que o $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, quando hidrolisado, forma uma base forte e um ácido fraco, o que altera o pH final da solução, dependendo de sua concentração. Além do mais, Peng, X *et al*⁸⁰ mostrou em seu trabalho que nem sempre o mecanismo proposto por Frens, G é válido,

sendo o mecanismo de crescimento das nanopartículas de ouro dependente do pH do meio. Assim pode-se assegurar que na faixa de pH de 6,5 a 7,7, o mecanismo proposto é válido e adequado para descrever o presente trabalho.

Neste trabalho foram utilizadas duas concentrações de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, $1,55 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,55 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, as quais possuem pH 7,70 e 7,50 respectivamente. Sendo que, a primeira solução levou à produção de partículas com 20 nm de diâmetro e a segunda com 45 nm. Com isso, a diferença de tamanho nas nanopartículas sintetizadas neste trabalho pode ser explicada pelo fato de que, com o aumento da concentração do agente redutor, há um aumento a quantidade de núcleos de crescimento gerados inicialmente e após esta rápida etapa de nucleação, o número de nanocristais permanece constante e passa-se para uma etapa de crescimento controlado por difusão. Assim, quando utilizado $1,55 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, um maior número de núcleos de crescimento são gerados, obtendo-se como produto final um maior número de AuNP com um menor tamanho. Enquanto, quando utilizados $1,55 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, um menor número de núcleos são formados, os quais crescem mais durante a segunda etapa, com isso obtém-se um menor número de AuNP e com um maior diâmetro.

Também foi realizado um estudo eletroanalítico das sínteses, utilizando a voltametria cíclica, em meio de H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, com uma velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} , utilizando-se eletrodos de GC modificados com AuNP/MWCNT s2 e s3, os quais foram submetidos ao pré-tratamento descrito em 4.2.3. Os voltamogramas obtidos (figura 18) apresentam um perfil característico do ouro, com um processo de oxidação pouco definido em 1,3 V e um processo de redução bem definido em 0,85 V, para ambos os eletrodos. O eletrodo modificado com a síntese s2 possui um pico de redução com uma área de $1,0 \times 10^{-4} \text{ V mA cm}^{-2}$ enquanto o modificado com a síntese s3 possui uma área $5,3 \times 10^{-5} \text{ V mA cm}^{-2}$ o que indica uma maior quantidade de óxido formado em s2 e, portanto, uma maior área superficial de ouro exposta.

Figura 18: Perfil voltamétrico das sínteses de Náfion®/AuNP/MWCNT/GC utilizando (---) na s2 $1,55 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3$ e (---) na s3 $1,55 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3$ em H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$

4.2.3 Pré-tratamento dos Eletrodos

Problemas com a reprodutibilidade na resposta eletroanalítica dos eletrodos AuNP/MWCNT sobre GC, e a observação de que, eletrodos utilizados anteriormente apresentavam uma resposta de corrente de pico maior do que os recém preparados, indicaram a necessidade de um tratamento eletroquímico prévio, a fim de obter-se uma superfície reprodutiva e com um maior número de centros ativos. Determinando um pré-tratamento adequado e igual para todos os eletrodos espera-se um comportamento mais reprodutivo do eletrodo proposto.

A fim de mostrar a importância da ativação dos eletrodos, o comportamento do eletrodo de GC modificado com Náfion®/AuNP/MWCNT/GC, antes e após a ativação, foi estudado por DPV na presença de $6,75 \mu\text{mol L}^{-1}$ de NO. O experimento foi realizado em tampão PBS pH 4,4, utilizando o eletrodo de GC modificado com AuNP/MWCNT recém preparado e o mesmo eletrodo após ser submetido a diversas voltametrias cíclicas até a obtenção de um voltamograma estável (em H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, eletrodo ciclado de -0,5 V a 1,8 V, a 100 mVs^{-1}). Na figura 19 podemos observar que o eletrodo recém preparado (---) não apresenta nenhum pico de oxidação, no entanto, o mesmo eletrodo, após ser submetido à ativação descrita (---), passou a apresentar um processo oxidação com um $E_p = 0,75\text{V}$ e $I_p = 0,014 \text{ mA cm}^{-2}$.

Figura 19: DPV na presença de $6,75 \mu\text{mol L}^{-1}$ de NO, em tampão PBS pH 4,4, utilizando o eletrodo Náfion®/AuNP/MWCNT/GC recém preparado (---), e após a ativação (---).

Um procedimento semelhante foi observado em outros artigos, no entanto, estes não mostram o efeito do mesmo na resposta do eletrodo. Por exemplo, o eletrodo de AuNP/poli 3-metil tiofeno/GCE foi submetido a um tratamento no qual foi ciclado 10 vezes, de 0 V a 0,7 V e de -0,2 V a 0,5 V, a 100 mVs^{-1} , até a obtenção de um voltamograma estável (eletrólito: pH 7, 1 mol L^{-1} PBS, $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ KCl).⁸¹ Também, Hoogvliet, J. C. *et al.*⁸² fizeram um estudo com relação a um pré-tratamento eletroquímico de eletrodos de ouro policristalino, no qual eram utilizados uma sequência de três pulsos de potenciais em tampão PBS pH 7,4, sendo que a sequência de +1,6/0,0/-0,8 V, com a duração de 100 s cada, foi a mais efetiva na produção de uma área superficial reprodutiva. Assim, testes de pré-tratamento foram realizados para se determinar qual resultaria em uma melhor resposta de eletrodo.

Primeiramente avaliou-se a metodologia de Huang, X. *et al.*⁸¹, nomeado de pré-tratamento 1 (PT1), na qual o eletrodo foi submetido a 10 ciclos, de 0 V a 0,7 V e, em seguida, de -0,2 V a 0,5 V, até a apresentação de um voltamograma estável. O procedimento foi realizado em H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a uma velocidade de 100 mV s^{-1} .

A segunda metodologia avaliada foi proposta por Hoogvliet, J. C. *et al.*⁸², pré-tratamento 2 (PT 2), na qual o eletrodo foi submetido a uma sequência de 3 pulsos de potenciais (+1,6 V/0,0 V/-0,8 V) com a duração de 100 s cada, em H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ sob agitação magnética constante.

Como terceiro pré-tratamento (PT 3), também utilizou-se uma sequência de três pulsos de potenciais, no entanto, o pulso de potencial positivo utilizado foi +1,8 V. Valores mais negativos para o pulso de potencial negativo levaram a um intenso desprendimento de H_2 , danificando o eletrodo, portanto, apenas o pulso positivo foi variado.

Figura 20: Eletrodos de Náfion®/AuNP/MWCNT/GC submetidos aos pré-tratamentos 1(---), 2(- - -) e 3(- - -) em H_2SO_4 0,1 mol L^{-1} , $v = 100$ mVs $^{-1}$

A figura 20 apresenta comparação das voltametrias cíclicas utilizando o eletrodo de GC modificado com AuNP/MWCNTs2, após ser submetido às três ativações descritas anteriormente, na presença de 1 mmol L^{-1} de $K_4[Fe(CN)_6]$, em H_2SO_4 0,1 mol L^{-1} , a uma velocidade de 100 mV s^{-1} . O pré-tratamento nomeado de 3 foi o que apresentou as maiores correntes de pico anódica e catódica e, portanto, foi adotado para as demais análises.

Também foi feito um estudo da influência do eletrólito, no qual foram investigados tampão PBS pH 4,4 e o H_2SO_4 0,1 mol L^{-1} e os resultados obtidos encontram-se na figura 21.

Figura 21: Comparação das CV do eletrodo Náfion®/AuNP/MWCNTs2/GC quando submetidos a ativação em meios diferentes, em H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹(---) ou PBS pH 4,4 (- - -), na presença de 1 mmol L⁻¹ de K₄[Fe(CN)₆], v = 100 mVs⁻¹

O eletrodo Náfion®/AuNP/MWCNTs2/GC foi submetido ao pré-tratamento cujo estudo anterior mostrou ser o mais eficiente, em tampão PBS pH 4,4 (- - -) e em H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹ (---). A eficiência do pré tratamento foi testada por CV na presença de 1 mmol L⁻¹ de K₄[Fe(CN)₆], em H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹, a uma velocidade de 100 mVs⁻¹. Observa-se um aumento de 32% na corrente de pico quando a ativação é realizada em meio de H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹.

Assim, nas demais medidas, adotou-se como pré-tratamento a aplicação de uma sequência de três pulsos de potenciais, um na região de desprendimento de oxigênio (1,8 V), outro em uma região em que não ocorre nenhum processo (0 V), e o último na região de desprendimento de hidrogênio (-0,8 V), com uma duração de 100 s cada, e em meio de H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹, a fim de ativar a superfície do eletrodo para os demais estudos.

Também é reportado por Alwarappan, S. *et al.*⁸³ a influência do pré-tratamento (+1,6V por 600s e -1,2V por 300s, em PBS pH 7,2) dos eletrodos de SWCNT/GCE na determinação de dopamina, sendo que, a melhora no sinal foi atribuída às camadas carregadas negativamente no eletrodo pré-tratado. Sendo assim, o mesmo pré tratamento utilizado para os eletrodos Náfion®/AuNP/MWCNT/GC também foi utilizado para o eletrodo MWCNT/GC.

Em todos os voltamogramas observou-se um aumento na corrente capacitiva, esse aumento é devido ao Náfion® utilizado na preparação dos eletrodos, o que deixa uma camada carregada negativamente neste, a qual é aumentada com o pré-tratamento do

eletrodo, o que explica o aumento da corrente capacitiva após o pré-tratamento do eletrodo. No entanto, a utilização do mesmo mostrou-se indispensável um vez que impediu a lixiviação das AuNP e também a danificação do eletrodo, fatos estes observados em experimentos nos quais o náfion não era utilizado.

4.2.4 Comparação das sínteses frente ao par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$

Determinado o pré-tratamento a qual os eletrodos seriam submetidos, passou-se para a etapa de caracterização eletroquímica das sínteses frente o par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ cujo o comportamento eletroquímico já é conhecido, sendo os resultados apresentados na figura 22.

Figura 22: Comparação das sínteses Náfion®/AuNP/MWCNT/GC s1 (---), s2 (---) e s3 (---) na presença de 1 mmol L^{-1} de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ em meio de H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$

Para esse estudo, realizou-se voltametrias cíclicas utilizando como eletrodo de trabalho GC modificado com AuNP/MWCNT s1, s2 ou s3 (os quais foram previamente submetidos ao pré-tratamento determinado anteriormente), em meio de H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ realizando varreduras de $0,00 \text{ V}$ a $0,75 \text{ V}$ a uma velocidade de 100 mV s^{-1} na presença de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, obtendo-se os voltamogramas da figura 22. Os três eletrodos apresentaram um pico catódico e um pico anódico posicionados aproximadamente no mesmo potencial, no entanto grandes alterações na densidade de corrente de pico são observadas. O eletrodo modificado com a síntese s2 apresentou o

melhor desempenho, com uma $I_{PA} = 0,44 \text{ mA cm}^{-2}$, seguida pela s1, com uma $I_{PA} = 0,30 \text{ mA cm}^{-2}$ e a s3 com o pior desempenho, apresentando um $I_{PA} = 0,20 \text{ mA cm}^{-2}$.

4.2.5 Comparação das sínteses frente ao NO

As três sínteses também foram comparadas frente ao NO, o analito de interesse deste trabalho. O estudo foi realizado utilizando a voltametria linear com uma velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} , em tampão PBS pH 4,4 na presença de $9,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de NO, utilizando como eletrodo de trabalho o GC modificado com as sínteses AuNP/MWCNT s1,s2 ou s3, sendo os resultados obtidos mostrados na figura 23.

Figura 23: Comparação das sínteses Náfon®/AuNP/MWCNT/GC s1 (---), s2 (---) e s3 (---) na presença de $9,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ NO em tampão PBS pH 4,4.

Os três eletrodos apresentaram um pico de oxidação em 0,84 V, no entanto, observa-se para o eletrodo modificado com a síntese s2, um $I_{PA} = 0,36 \text{ mA cm}^{-2}$, seguida pela s1, com um $I_{PA} = 0,27 \text{ mA cm}^{-2}$ e a s3 com o pior desempenho, apresentando um $I_{PA} = 0,19 \text{ mA cm}^{-2}$.

Tabela 7: Sumarização da caracterização das sínteses s1, s2 e s3

	Síntese s1	Síntese s2	Síntese s3
Intensidade da sonda ultrassônica	30%	100%	100%
[Na₃C₆H₅O₇] / mol L⁻¹	1,55 x10 ⁻³	1,55 x10 ⁻³	1,55 x10 ⁻⁴
Porcentagem de Au em relação ao C / %	2,3	8,4	18,6
Diâmetro / nm	22 – 70	20	45 – 213
pH da solução de Na₃C₆H₅O₇	7,70	7,70	7,50
I_{PA} / mA cm⁻² (em 1,0x10⁻³ mol L⁻¹ de K₄[Fe(CN)₆])	0,30	0,44	0,20
I_{PA} / mA cm⁻² (em 9,0x10⁻⁶ mol L⁻¹ de NO)	0,27	0,36	0,19
Área de pico de redução do ouro / V mA cm⁻²	7,5x10 ⁻⁵	1,0 x10 ⁻⁴	5,3x10 ⁻⁵

Os resultados obtidos durante a caracterização das três sínteses realizadas estão sumarizados na tabela 7, na qual podemos observar que a síntese que apresentou melhor desempenho tanto frente ao K₄[Fe(CN)₆] quanto ao NO foi a síntese s2, a qual utilizou uma maior quantidade de agente redutor e maior intensidade da sonda ultrassônica. A s2 levou à síntese de um produto final com uma quantidade de ouro intermediária, no entanto, apresentando a melhor homogeneidade tanto no tamanho quanto na distribuição. Além do mais, por possuir um maior número de nanopartículas com um diâmetro menor, a s2 foi a que apresentou uma maior área superficial exposta, acarretando em uma maior resposta de densidade de corrente.

4.3 Comparação entre AuNP/MWCNTs2 e MWCNT

A síntese s2 foi a que apresentou melhores respostas na oxidação do óxido nítrico e frente ao par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3} / [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4}$, sendo, portanto, a escolhida para ser explorada nas demais análises.

Comparando-se as imagens de MEV-FEG do MWCNTf e da AuNP/MWCNT s2, Figura 24, observa-se que as esferas, de tamanho e distribuição uniformes, estão ausentes na imagem do MWCNTf (figura 24a), aparecendo nas paredes do MWCNT após o processo de sínteses das AuNP, o que indica que as mesmas são compostas de ouro e que a síntese foi realizada com sucesso.

Figura 24: Imagem de MEV-FEG (a) MWCNT funcionalizados e (b) AuNP/MWCNTs2

Para uma comparação eletroquímica dos eletrodos modificados com MWCNTf (- --) e com AuNP/MWCNT s2 (---), realizou-se uma voltametria cíclica, em meio de H_2SO_4

0,1 mol L⁻¹, com uma velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹, na qual os eletrodos os quais foram ciclados até a obtenção de um voltamograma estável (figura 25).

O voltamograma obtido para o AuNP/MWCNT s2 (---) apresenta um perfil característico do ouro, com um processo de oxidação em 1,1 V e um processo em 0,8 V atribuído à redução do óxido de ouro. Enquanto que para o eletrodo modificado com MWCNTf (---), nenhum processo de redução ou oxidação pode ser observado.

Figura 25: Voltametria cíclica em H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ utilizando como eletrodo de trabalho Náfion®/AuNP/MWCNTs2/GC (---) ou Náfion®/MWCNTf/GC (---)

A análise estrutural das amostras foi feita utilizando-se a técnica de Difração de Raio-X no formato de pó. O difratograma da figura 26a é referente à amostra de MWCNT antes da síntese, apresentando picos apenas referentes ao carbono (002), (101) e (004). Já o difratograma da figura 26b é referente à amostra AuNP/MWCNTs2 e apresenta os picos (111), (200), (222), ausentes na amostra de MWCNT, e que são característicos do ouro, além dos picos característicos do carbono. O pico (311), que aparece nas duas análises, é característico tanto do carbono quanto do ouro. Assim, essa análise é um indicativo de que a síntese foi realizada com sucesso.

Figura 26: Difratomogramas de raio-X do (a) MWCNTf e (b) AuNP/MWCNT s2

As amostras também foram submetidas à análise por espectroscopia Raman, cujos espectros encontram-se na figura 27. Como já foi dito anteriormente, a banda D pode ser associada aos defeitos estruturais presentes na amostra de MWCNT. No entanto, é necessária uma normalização em relação à banda G, para uma correta comparação. Quando comparados os dois espectros, banda D normalizada da amostra AuNP/MWCNT s2 possui um intensidade de 0,178, maior do que a apresentada pela amostra de MWCNT, com uma intensidade de 0,111, o que mostra um aumento na concentração de defeitos dos MWCNTs, provavelmente relacionados às NPAu ancoradas nas paredes dos MWCNTs.

Figura 27: Análise de RAMAN das amostras de AuNP/MWCNT s2 (---) e MWCNT funcionalizado (---)

4.3.1 Comparação dos eletrodos frente ao par redox $\text{Fe}(\text{CN})_3^{-3/-4}$

Foi realizado um estudo eletroanalítico na presença de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, em H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Para esse estudo realizou-se uma voltametria cíclica de 0,00 V a 0,75 V, a uma velocidade de 100 mV s^{-1} , utilizando como eletrodo de trabalho o (---) GC, (---) Ouro Cristalino, (---) GC modificado com MWCNT funcionalizado e (---) GC modificado com AuNP/MWCNT s2, sendo que todos os eletrodos foram recobertos com 5 μL de Náfon® 0,1% e submetidos ao mesmo pré-tratamento descrito em 4.2.3. Os voltamogramas obtidos encontram-se na figura 28.

Figura 28: Voltametrias cíclicas na presença de 1 mmol L^{-1} de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, em H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ dos eletrodos: (---) Náfon®/GC, (---) Náfon®/Ouro, (---) Náfon®/MWCNTf/GC, (---) Náfon®/AuNP/MWCNTs2/GC

Pode-se observar um efeito sinérgico na combinação dos MWCNT com as AuNP já que, quando utilizados os eletrodos de (---) ouro cristalino ou (---) MWCNT, as densidades de corrente apresentadas são $0,15 \text{ mA cm}^{-2}$ e $0,37 \text{ mA cm}^{-2}$ respectivamente, foram menores do que as apresentadas pelo eletrodo modificado com (---) AuNP/MWCNT s2, o qual apresentou uma densidade de corrente de $0,44 \text{ mA cm}^{-2}$, além do mais, a modificação do eletrodo de GC com o AuNP/MWCNTs2 também é plenamente justificado por um aumento de densidade de corrente de 550%.

Também foi observado um efeito catalítico desta modificação no processo redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3/4}$, observando-se o deslocamento do potencial de pico anódico do AuNP/MWCNTs2 para valores menos positivos, quando comparados com os demais eletrodos utilizados, tal como pode ser visto na figura 28.

A diminuição entre a diferença de potenciais dos picos catódico e anódico (sobrepotencial) também ficou evidente ao compara-se o AuNP/MWCNTs2 com os demais eletrodos, variando de um comportamento irreversível apresentado pelo Náfon/GC até uma diferença de $0,13 \text{ V}$ apresentada pelo eletrodo AuNP/MWCNTs2.

4.3.2 Reprodutibilidade

A fim de avaliar a reprodutibilidade do eletrodo proposto, realizou-se os testes *inter-day* e *intra-day* recomendados pela IUPAC.

Para o teste *inter-day*, foram realizadas voltametrias cíclicas de 0,00 V a 0,75 V, a uma velocidade de 100 mV s^{-1} na presença de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, em H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. O teste foi feito em dias diferentes, sempre utilizando o mesmo eletrodo, o qual foi estocado em temperatura ambiente em contato com o ar. Antes de cada medida, realizou-se a ativação da superfície pela metodologia descrita em 4.2.3. Os voltamogramas obtidos estão representados na figura 29.

Figura 29: Voltamogramas obtidos com o mesmo eletrodo em dias diferentes, na presença de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. (b) Densidades de corrente de pico faradaicas em função do tempo de estocagem.

Observa-se uma queda para 82,2% da corrente faradaica inicial após estocagem de 2 dias e para 71,6% após estocagem de 6 dias, sendo que, após 7 dias, a densidade corrente foi a mesma da medida anterior. O problema observado está na necessidade de

realizar uma ativação após cada período de estoque e, a cada reativação, uma maior corrente capacitiva ser obtida.

Já no teste *intra-day*, foram realizadas voltametrias cíclicas de 0,00 V a 0,75 V, a uma velocidade de 100 mV s^{-1} na presença de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, em H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. O teste foi feito no mesmo dia, no entanto, foram utilizados eletrodos recém preparados para cada medida. Antes de cada medida, realizou-se a ativação da superfície pela metodologia descrita em 4.2.3. Os voltamogramas obtidos estão representados na figura 30. Os eletrodos apresentaram uma densidade de corrente média de $2,98 \times 10^{-4} \text{ mA cm}^{-2}$, com um desvio padrão de $1,04 \times 10^{-5}$ e uma porcentagem média de erro de 2,3%.

Figura 30: Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodos recém preparados na presença de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.

4.4 Determinação de Óxido Nítrico

O eletrodo proposto foi estudado por voltametria cíclica em tampão PBS pH 4,4, na ausência e presença de $9,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de NO.

Figura 31: Voltametria cíclica em tampão PBS pH 4,4, na ausência (---) e presença (---) de $9,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de NO.

Os voltamogramas da figura 31 indicam que a oxidação do óxido nítrico no eletrodo proposto é totalmente irreversível, apresentando um pico de oxidação em 0,85 V vs Ag/AgCl. Também, não é observado nenhum pico redox definido no branco, dentro da janela de potencial utilizada, assim, o eletrodo produzido possui uma ampla janela de potencial aplicável à determinação do NO.

Também foi realizado um estudo de variação de velocidade de varredura no intervalo de 50 a 400 mV s^{-1} , na presença de $9,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de NO em tampão PBS pH 4,4 foi realizado e os voltamogramas obtidos são mostrados na figura 32 com um insert que mostra o comportamento da corrente de pico versus a raiz quadrada da velocidade de varredura.

O comportamento linear do I_p com $v^{1/2}$, descrito pela equação $I_p (\text{mA}) = -0,046 + 0,019 v (\text{mV s}^{-1})$, com $r = 0,99341$ indica um comportamento de eletrodo planar, sob controle difusional. Como é esperado, o potencial de pico desloca para valores mais positivos com o aumento da varredura devido à reação irreversível do NO.⁶⁷

Figura 32: Variação da velocidade de varredura, de 50 a 400 mV s^{-1} , na presença de $9,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de NO em tampão PBS pH 4,4.

4.4.1 Teste de pH

Realizou-se um estudo da influência do pH do eletrólito na determinação de NO, no qual variou-se o pH do tampão PBS em uma faixa de 2 a 8, na presença de $9,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de NO e os resultados obtidos encontram-se na figura 33.

Observa-se variações na densidade de corrente de pico e/ou potencial de pico com a alteração do pH não se comporta linearmente no entanto, o pH 4,4 claramente favorece a determinação do NO nas condições propostas, assim, adotou-se o tampão PBS com pH 4,4, nas demais análises deste trabalho.

Figura 33: DPV Variando o pH do tampão PBS, em uma faixa de 2 a 8, na presença de $9,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de NO utilizando os parâmetros: $mt = 0,02\text{s}$ $it = 0,1$ $sp = 0,002$ $ma = 0,05$

4.4.2 Otimização dos parâmetros da DPV

O efeito dos parâmetros experimentais da DPV na presença de $9,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de NO em tampão PBS pH 4,4 foi estudado a fim de maximizar o sinal analítico utilizando o eletrodo de GC modificado com AuNP/MWCNTs2.

Primeiramente, realizou-se a variação do *interval time* de 0,1 s a 0,5 s, fixando o *step potential* em 0,005 V, o *modulation time* = 0,05 s e *modulation amplitude* = 0,1V. Os resultados obtidos encontram-se na figura 34, na qual podemos notar uma pequena variação na densidade de corrente para valores superiores a 0,1s, adotou-se então o valor de 0,5 s, o qual apresentou a maior densidade de corrente.

Figura 34: Variação do *interval time* de 0,1 s a 0,5 s, fixando o *step potential* em 0,005 V, o *modulation time* = 0,05 s e *modulation amplitude* = 0,1 V

Também foi estudado o efeito da *modulation amplitude*, variando-a de 0,01 V a 0,10 V, fixando *step potential* em 0,005 V, *modulation time* em 0,01 s e *interval time* em 0,5 s.

Figura 35: Variação do *modulation amplitude* de 0,01 V a 0,05 V, fixando *step potential* = 0,005 V, *modulation time* = 0,01 s e *interval time* = 0,5 s

Observa-se na figura 35 que o aumento na *modulation amplitude* leva a um aumento na densidade de corrente e um deslocamento do potencial de pico para valores menos positivos. Assim, adotou-se como valor ideal 0,1 V, o qual apresentou a maior densidade de corrente de pico e o menor potencial de pico.

O último parâmetro a ser avaliado foi o *modulation time*, o qual foi estudado em um intervalo de 0,01 s a 0,05 s, fixando *step potential* em 0,005 V, *interval time* em 0,5 e o *modulation amplitude* em 0,1 V. Os resultados obtidos encontram-se na figura 36, na qual podemos notar penas alterações na resposta de densidade de corrente de pico, adotou-se então o valor de 0,03 s, o qual apresenta um pequeno aumento na I_p .

Figura 36: Variação do *modulation time* de 0,01 s a 0,05 s fixando *step potential* = 0,005 V, *interval time* = 0,5 s e *modulation amplitude* = 0,1 V

Assim, os parâmetros foram ajustados para: *interval time* = 0,5 s, *modulation amplitude* = 0,1 V, *modulation time* de 0,03 s e *step potential* = 0,02 V (para uma velocidade de 10 mVs⁻¹)

4.4.3 Curva Analítica para o óxido nítrico

Após a otimização dos parâmetros experimentais, foi realizada a calibração analítica do eletrodo proposto através de uma curva de calibração com 10 adições de uma solução estoque de NO, em uma faixa linear de concentrações variando de $2,25 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ a $22,5 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, figura 37. A análise foi feita em triplicata, sendo que uma média dos valores foi utilizada para os demais cálculos.

Figura 37: Voltamogramas de DPV utilizando o eletrodo de GC modificado com AuNP/MWCNT, na presença de 0; 2,5; 4,5; 6,75; 9; 11,25; 13,5; 15,75; 18; 20,25; 22,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de NO, realizadas em triplicata (a,b,c), e as curvas analíticas de I_p versus [NO] com a aproximação linear da média destas (d).

Plotou-se o gráfico para a média aritmética das densidades de corrente, I_p encontrados em função da concentração de NO. O ajuste da curva foi feito pelo método dos mínimos quadrados fornecendo os valores dos coeficientes lineares e angulares da equação de reta (10), com um coeficiente de correlação de 0,99919.

4.4.4 Influência do Náfon

A fim de testar eficiência da cobertura de Náfon® na eliminação do interferente NO_2^- , realizou-se, em tampão PBS pH 4,4, uma curva analítica em triplicata através de 10 adições de uma solução estoque de NO_2^- , variando a concentração total de $18,84 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ a $188,4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, figura 39.

O ajuste da curva foi feito pelo método dos mínimos quadrados fornecendo os valores dos coeficientes lineares e angulares da equação de reta (11), com um coeficiente de correlação de 0,99709.

$$I_p \text{ (A)} = 3,48 \times 10^{-6} + 1,68 [\text{NO}_2^- \text{ (mol L}^{-1})] \quad (9)$$

$$I_p \text{ (A cm}^{-2}\text{)} = 1,03 \times 10^{-6} + 12,96 \times ([\text{NO}] \text{ mol L}^{-1}) \quad (10)$$

O eletrodo apresentou uma sensibilidade de $12,96 \text{ A cm}^{-2} / \text{mol L}^{-1}$, parâmetro que expressa a variação do I_p em função da concentração do NO e é dado pela inclinação da curva

O limite de detecção (LD), definido como a menor quantidade de analito que pode ser distinguida de zero com uma certeza estatística razoável. Obteve-se um $\text{LD} = 2,4 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ o qual foi calculado medindo-se a I_p para sete amostras de banco e aplicando a seguinte fórmula:

$$\text{LD} = 3 (S_B / a) = 2,4 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$$

sendo:

$$S_B = 1,03 \times 10^{-9} \text{ A cm}^{-2} \text{ (média dos valores dos brancos da amostra);}$$

$$a = \text{sensibilidade} = 12,96 \text{ A cm}^{-2} / \text{mol L}^{-1}$$

Também foi determinado o limite de quantificação (LQ), definido como a menor quantidade de analito que pode ser quantificada dentro dos limites de precisão e exatidão. Obteve-se $\text{LQ} = 7,9 \times 10^{-10} \text{ A cm}^{-2}$, utilizando a seguinte fórmula.⁸⁴

$$\text{LQ} = 10 (S_B / a) = 7,9 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$$

sendo:

$$S_B = 1,03 \times 10^{-9} \text{ A cm}^{-2} \text{ (média dos valores dos brancos da amostra);}$$

$$a = \text{sensibilidade} = 12,96 \text{ A cm}^{-2} / \text{mol L}^{-1}$$

O eletrodo apresentou uma sensibilidade de $1,68 \text{ A cm}^{-2} / \text{mol L}^{-1}$ parâmetro, esse valor foi 7,7 vezes menor do que a sensibilidade apresentada para a detecção de NO.

Figura 38: Voltamogramas de DPV utilizando o eletrodo de GC modificado com AuNP/MWCNT, na presença de 188,4; 169,56; 150,72; 131,88; 113,04; 94,2; 75,36; 56,52; 37,68; 18,84; 0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de NO_2^- , realizadas em triplicata (a,b,c), e as curvas analíticas de I_p versus $[\text{NO}_2^-]$ com a aproximação linear da média destas (d).

O limite de detecção (LD), foi calculado medindo-se a I_p para sete amostras de banco e aplicando a seguinte fórmula:

$$\text{LD} = 3 (S_B / a) = 2,7 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$$

sendo:

$$S_B = 1,53 \times 10^{-7} \text{ A cm}^{-2} \text{ (média dos valores dos brancos da amostra);}$$

$$a = \text{sensibilidade} = 1,68 \text{ A cm}^{-2} / \text{mol L}^{-1}$$

Também foi determinado o limite de quantificação (LQ), ², utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{LQ} = 10 (S_B / a) = 9,1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$$

sendo:

$S_B = 1,53 \times 10^{-7} \text{ A cm}^{-2}$ (média dos valores dos brancos da amostra);

$a = \text{sensibilidade} = 1,68 \text{ A cm}^{-2} / \text{mol L}^{-1}$

Foi possível realizar a detecção de NO_2^- com a metodologia proposta, com um LD de $2,7 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e um LQ de $9,1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, o que mostra que o Náfion® não é capaz de eliminar o interferente nas condições utilizadas neste trabalho. No entanto, uma sensibilidade 7,71 vezes menor é obtida da detecção de NO_2^- quando comparada com NO. Também, os LD e LQ foram 1000 vezes maiores para o NO_2^- quando comparados com o NO. Assim, mesmo que a metodologia proposta não elimine completamente a influência do nitrito, esta pode ser utilizada com a devida cautela, devido às grandes diferenças observadas na sensibilidade, LD e LQ.

Acredita-se que o Náfion® não foi eficiente na eliminação da interferência do nitrito devido ao pH ácido utilizado neste trabalho, enquanto nos artigos citados todos utilizaram meios com pH próximos a neutralidade. E, segundo Knight, A. R. *et al.*⁷⁰, o nitrito em meio ácido (PBS pH 2,0) gera NO livre em solução, portanto, uma pequena quantidade de NO pode ter sido gerada, devido à quantidade de H^+ presente na solução, o qual foi detectado pelo eletrodo.

5 Conclusão

A funcionalização dos MWCNTs foi realizada com sucesso, já que puderam ser observados defeitos estruturais nestes após o processo através da caracterização por MEV. Essa funcionalização também foi confirmada através da espectrometria Raman, na qual se observou o aumento da banda D-normalizada após a funcionalização, indicando um aumento nos defeitos estruturais nos MWCNTs. Além do mais, obteve-se a confirmação por FTIR, com o aparecimento das bandas características do grupo hidroxila (3317 cm^{-1}) e a banda característica da carbonila (1617 cm^{-1}).

Três diferentes procedimentos de sínteses de nanopartículas de ouro foram testadas, variando-se os parâmetros de intensidade de ultrassom e quantidade de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, sendo a síntese com $1,27 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 3,0 mg de MWCNT e sonda ultrassônica a 100% de sua potência a que apresentou os melhores resultados tanto frente ao $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ quanto ao NO. Os resultados de EDX mostram um produto final com uma quantidade de ouro intermediária quando comparado com as demais sínteses, no entanto, pode ser observado nas imagens de MEV-FEG que essa síntese

apresentou melhor homogeneidade tanto no tamanho quanto na distribuição. Além do mais, por possuir um maior número de nanopartículas com um diâmetro menor, apresenta uma maior área superficial exposta, acarretando em uma maior resposta de densidade de corrente, fato confirmado com os testes eletroanalíticos.

O eletrodo proposto, foi utilizado na determinação de NO, em tampão PBS pH 4,4, o qual apresentou um limite de detecção de $2,4 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ e um limite de quantificação de $7,9 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$.

Também foi avaliada a influência do interferente nitrito na determinação eletroquímica de NO. Foi possível realizar a detecção de NO_2^- com a metodologia proposta, com um LD de $2,7 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e um LQ de $1,53 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, o que mostra que o Náfion® não é capaz de eliminar o interferente nas condições utilizadas neste trabalho. No entanto, uma sensibilidade 7,71 vezes menor é obtida da detecção de NO_2^- quando comparada com NO. Também, os LD e LQ foram 1000 vezes maiores para o NO_2^- quando comparados com o NO. Assim, mesmo que a metodologia proposta não elimine completamente a influência do nitrito, esta pode ser utilizada com a devida cautela, devido às grandes diferenças observadas na sensibilidade, LD e LQ.

Contudo, mesmo com os problemas de aumento de corrente capacitiva nas medidas, o uso do Náfion® ainda é válido, pois evitou a lixiviação e danificação do filme de AuNP/MWCNT e diminuiu a detecção de NO_2^- .

Assim, este trabalho mostra a potencialidade de utilização do eletrodo Náfion®/AuNP/MWCNT/GC como sensores para detecção e quantificação de óxido nítrico utilizando a metodologia proposta.

6 Perspectivas futuras

A autora deste trabalho continuará realizando pós-graduação, dando início às atividades do doutorado ainda no início de 2013. Sendo que, em trabalhos futuros, pretende-se explorar o potencial do eletrodo desenvolvido neste trabalho frente a outros analitos.

Referências

- ¹ GURGUEIRA, G. L.; CARVALHO, W. B. D. Óxido nítrico inalatório: considerações sobre sua aplicação clínica. **Jornal de Pneumologia**, v. 29, p. 325-331, 2003.
- ² Sievers Nitric Oxide Analyzer Overview. Disponível em: <
<http://www.geinstruments.com/products-and-services/nitric-oxide-analyzer>>. Acesso em: 30/07/2012.
- ³ KAPANDE, K. M.; MCCONAGHY, L. A.; DOUGLAS, I.; MCKENNA, S.; HUGHES, J. L.; MCCANCE, D. R.; ENNIS, M.; SHIELDS, M. D. Comparative repeatability of two handheld fractional exhaled nitric oxide monitors. **Pediatr Pulmonol**, v. 47, n. 6, p. 546-50, 2012.
- ⁴ WANG, J. **Analytical electrochemistry**. Wiley-VCH, 2006. ISBN 9780471678793.
- ⁵ VALENTINI, F.; AMINE, A.; ORLANDUCCI, S.; TERRANOVA, M. L.; PALLESCHI, G. Carbon Nanotube Purification: Preparation and Characterization of Carbon Nanotube Paste Electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 20, p. 5413-5421, 2003.
- ⁶ LAU, A. K.-T.; HUI, D. The revolutionary creation of new advanced materials—carbon nanotube composites. **Composites Part B: Engineering**, v. 33, n. 4, p. 263-277, 2002.
- ⁷ IJIMA, S. Helical Microtubules of Graphitic Carbon. **Nature**, v. 354, n. 6348, p. 56-58, 1991.
- ⁸ LIN, T.; BAJPAI, V.; JI, T.; DAI, L. Chemistry of Carbon Nanotubes. **Australian Journal of Chemistry**, v. 56, n. 7, p. 635-651, 2003.
- ⁹ RIVAS, G. A.; RUBIANES, M. D.; RODRÍGUEZ, M. C.; FERREYRA, N. F.; LUQUE, G. L.; PEDANO, M. L.; MISCORIA, S. A.; PARRADO, C. Carbon nanotubes for electrochemical biosensing. **Talanta**, v. 74, n. 3, p. 291-307, 2007.
- ¹⁰ HOU, P.-X.; LIU, C.; CHENG, H.-M. Purification of carbon nanotubes. **Carbon**, v. 46, n. 15, p. 2003-2025, 2008.
- ¹¹ DAI, H. Carbon Nanotubes: Synthesis, Integration, and Properties. **Accounts of Chemical Research**, v. 35, n. 12, p. 1035-1044, 2002.
- ¹² SHEN, C.; BROZENA, A. H.; WANG, Y. Double-walled carbon nanotubes: Challenges and opportunities. **Nanoscale**, v. 3, n. 2, p. 503-518, 2011.
- ¹³ STOBINSKI, L.; LESIAK, B.; KÖVÉR, L.; TÓTH, J.; BINIAK, S.; TRYKOWSKI, G.; JUDEK, J. Multiwall carbon nanotubes purification and oxidation by nitric acid studied by the FTIR and electron spectroscopy methods. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 501, n. 1, p. 77-84, 2010.
- ¹⁴ CASSELL, A. M.; RAYMAKERS, J. A.; KONG, J.; DAI, H. Large Scale CVD Synthesis of Single-Walled Carbon Nanotubes. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 103, n. 31, p. 6484-6492, 1999.

- 15 THOSTENSON, E. T.;REN, Z..CHOU, T.-W. Advances in the science and technology of carbon nanotubes and their composites: a review. **Composites Science and Technology**, v. 61, n. 13, p. 1899-1912, 2001.
- 16 VAIRAVAPANDIAN, D.;VICHCHULADA, P..LAY, M. D. Preparation and modification of carbon nanotubes: Review of recent advances and applications in catalysis and sensing. **Analytica Chimica Acta**, v. 626, n. 2, p. 119-129, 2008.
- 17 ROSCA, I. D.;WATARI, F.;UO, M..AKASAKA, T. Oxidation of multiwalled carbon nanotubes by nitric acid. **Carbon**, v. 43, n. 15, p. 3124-3131, 2005.
- 18 ZHANG, Y.;KANG, T.-F.;WAN, Y.-W..CHEN, S.-Y. Gold nanoparticles-carbon nanotubes modified sensor for electrochemical determination of organophosphate pesticides. **Microchimica Acta**, v. 165, n. 3, p. 307-311, 2009.
- 19 MORAES, F. C.;CABRAL, M. F.;MASCARO, L. H..MACHADO, S. A. S. The electrochemical effect of acid functionalisation of carbon nanotubes to be used in sensors development. **Surface Science**, v. 605, n. 3-4, p. 435-440, 2011.
- 20 EITAN, A.;JIANG, K.;DUKES, D.;ANDREWS, R..SCHADLER, L. S. Surface Modification of Multiwalled Carbon Nanotubes: Toward the Tailoring of the Interface in Polymer Composites. **Chemistry of Materials**, v. 15, n. 16, p. 3198-3201, 2003.
- 21 GOJNY, F. H.;NASTALCZYK, J.;ROSLANIEC, Z..SCHULTE, K. Surface modified multi-walled carbon nanotubes in CNT/epoxy-composites. **Chemical Physics Letters**, v. 370, n. 5-6, p. 820-824, 2003.
- 22 KIM, B..SIGMUND, W. M. Functionalized Multiwall Carbon Nanotube/Gold Nanoparticle Composites. **Langmuir**, v. 20, n. 19, p. 8239-8242, 2004.
- 23 DELPEUX, S.;SZOSTAK, K.;FRACKOWIAK, E..BÉGUIN, F. An efficient two-step process for producing opened multi-walled carbon nanotubes of high purity. **Chemical Physics Letters**, v. 404, n. 4-6, p. 374-378, 2005.
- 24 CHEN, X. H.;CHEN, C. S.;CHEN, Q.;CHENG, F. Q.;ZHANG, G..CHEN, Z. Z. Non-destructive purification of multi-walled carbon nanotubes produced by catalyzed CVD. **Materials Letters**, v. 57, n. 3, p. 734-738, 2002.
- 25 OKPALUGO, T. I. T.;PAPAKONSTANTINOU, P.;MURPHY, H.;MCLAUGHLIN, J..BROWN, N. M. D. High resolution XPS characterization of chemical functionalised MWCNTs and SWCNTs. **Carbon**, v. 43, n. 1, p. 153-161, 2005.
- 26 MENG, Z.;LIU, B.;ZHENG, J.;SHENG, Q..ZHANG, H. Electrodeposition of cobalt oxide nanoparticles on carbon nanotubes, and their electrocatalytic properties for nitrite electrooxidation. **Microchimica Acta**, v. 175, n. 3-4, p. 251-257, 2011.
- 27 CHEN, R. J.;ZHANG, Y.;WANG, D..DAI, H. Noncovalent Sidewall Functionalization of Single-Walled Carbon Nanotubes for Protein Immobilization. **Journal of the American Chemical Society**, v. 123, n. 16, p. 3838-3839, 2001.
- 28 CAO, L.;CHEN, H.;WANG, M.;SUN, J.;ZHANG, X..KONG, F. Photoconductivity Study of Modified Carbon Nanotube/Oxotitanium Phthalocyanine Composites. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 106, n. 35, p. 8971-8975, 2002.

- 29 GUO, M. L.;CHEN, J. H.;LI, J.;TAO, B..YAO, S. Z. Fabrication of polyaniline/carbon nanotube composite modified electrode and its electrocatalytic property to the reduction of nitrite. **Analytica Chimica Acta**, v. 532, n. 1, p. 71-77, 2005.
- 30 WANG, J. Electrochemical biosensing based on noble metal nanoparticles. **Microchimica Acta**, v. 177, n. 3, p. 245-270, 2012.
- 31 LI, W.;LIANG, C.;ZHOU, W.;QIU, J.;ZHOU;SUN, G..XIN, Q. Preparation and Characterization of Multiwalled Carbon Nanotube-Supported Platinum for Cathode Catalysts of Direct Methanol Fuel Cells. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 107, n. 26, p. 6292-6299, 2003.
- 32 KANG, X.;MAI, Z.;ZOU, X.;CAI, P..MO, J. A sensitive nonenzymatic glucose sensor in alkaline media with a copper nanocluster/multiwall carbon nanotube-modified glassy carbon electrode. **Analytical Biochemistry**, v. 363, n. 1, p. 143-150, 2007.
- 33 XIAO, F.;MO, Z.;ZHAO, F..ZENG, B. Ultrasonic-electrodeposition of gold-platinum alloy nanoparticles on multi-walled carbon nanotubes - ionic liquid composite film and their electrocatalysis towards the oxidation of nitrite. **Electrochemistry Communications**, v. 10, n. 11, p. 1740-1743, 2008.
- 34 BOND, G. Gold: A relatively new catalyst. **Gold Bulletin**, v. 34, n. 4, p. 117-119, 2001.
- 35 FARADAY, M. The Bakerian Lecture: Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v. 147, n. ArticleType: research-article / Full publication date: 1857 /, p. 145-181, 1857.
- 36 TURKEVICH, J. Colloidal gold. Part I. **Gold Bulletin**, v. 18, n. 3, p. 86-91, 1985.
- 37 FRENS, G. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. **NATURE PHYSICAL SCIENCE**, v. 241, n. 1, p. 3, 1973.
- 38 GOIA, D..MATIJEVIĆ, E. Tailoring the particle size of monodispersed colloidal gold. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 146, n. 1–3, p. 139-152, 1999.
- 39 HU, G.;MA, Y.;GUO, Y..SHAO, S. Electrocatalytic oxidation and simultaneous determination of uric acid and ascorbic acid on the gold nanoparticles-modified glassy carbon electrode. **Electrochimica Acta**, v. 53, n. 22, p. 6610-6615, 2008.
- 40 JIANG, K.;EITAN, A.;SCHADLER, L. S.;AJAYAN, P. M.;SIEGEL, R. W.;GROBERT, N.;MAYNE, M.;REYES-REYES, M.;TERRONES, H..TERRONES, M. Selective Attachment of Gold Nanoparticles to Nitrogen-Doped Carbon Nanotubes. **Nano Letters**, v. 3, n. 3, p. 275-277, 2003.
- 41 MANSO, J.;MENA, M.;YANEZ-SEDENO, P..PINGARRON, J. Electrochemical biosensors based on colloidal gold–carbon nanotubes composite electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 603, n. 1, p. 1-7, 2007.

- 42 SHI, Y.;YANG, R..YUET, P. K. Easy decoration of carbon nanotubes with well dispersed gold nanoparticles and the use of the material as an electrocatalyst. **Carbon**, v. 47, n. 4, p. 1146-1151, 2009.
- 43 ZHANG, R..WANG, X. One Step Synthesis of Multiwalled Carbon Nanotube/Gold Nanocomposites for Enhancing Electrochemical Response. **Chemistry of Materials**, v. 19, n. 5, p. 976-978, 2007.
- 44 JIANG, L..GAO, L. Modified carbon nanotubes: an effective way to selective attachment of gold nanoparticles. **Carbon**, v. 41, n. 15, p. 2923-2929, 2003.
- 45 ZANELLA, R.;BASIUK, E. V.;SANTIAGO, P.;BASIUK, V. A.;MIRELES, E.;PUENTE-LEE, I..SANIGER, J. M. Deposition of Gold Nanoparticles onto Thiol-Functionalized Multiwalled Carbon Nanotubes. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, n. 34, p. 16290-16295, 2005.
- 46 ALEXEYEVA, N.;LAAKSONEN, T.;KONTTURI, K.;MIRKHALAF, F.;SCHIFFRIN, D. J..TAMMEVESKI, K. Oxygen reduction on gold nanoparticle/multi-walled carbon nanotubes modified glassy carbon electrodes in acid solution. **Electrochemistry Communications**, v. 8, n. 9, p. 1475-1480, 2006.
- 47 ZHANG, R.;HUMMELGÅRD, M..OLIN, H. Simple and efficient gold nanoparticles deposition on carbon nanotubes with controllable particle sizes. **Materials Science and Engineering B**, v. 158, n. 1-3, p. 5, 2009.
- 48 NOROUZI, P.;FARIDBOD, F.;LARIJANI, B..GANJALI, M. R. Glucose Biosensor Based on MWCNTs-Gold Nanoparticles in a Nafion Film on the Glassy Carbon Electrode Using Flow Injection FFT Continuous Cyclic Voltammetry. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 5, n. 9, p. 1213-1224, 2010.
- 49 XIAO, L.;WILDGOOSE, G. G..COMPTON, R. G. Sensitive electrochemical detection of arsenic (III) using gold nanoparticle modified carbon nanotubes via anodic stripping voltammetry. **Analytica Chimica Acta**, v. 620, n. 1-2, p. 44-49, 2008.
- 50 CHAUHAN, N..PUNDIR, C. S. An amperometric uric acid biosensor based on multiwalled carbon nanotube-gold nanoparticle composite. **Analytical Biochemistry**, v. 413, n. 2, p. 97-103, 2011.
- 51 NARUSE, J.;HOA, L. Q.;SUGANO, Y.;IKEUCHI, T.;YOSHIKAWA, H.;SAITO, M..TAMIYA, E. Development of biofuel cells based on gold nanoparticle decorated multi-walled carbon nanotubes. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 30, n. 1, p. 204-210, 2011.
- 52 MA, J. C..ZHANG, W. D. Gold nanoparticle-coated multiwall carbon nanotube-modified electrode for electrochemical determination of methyl parathion. **Microchimica Acta**, v. 175, n. 3-4, p. 309-314, 2011.
- 53 COTTON, F. A..WILKINSON, G. **Advanced inorganic chemistry: a comprehensive text**. Interscience Publishers, 1966.
- 54 ZHANG, Y. G.;SOMESFALEAN, G.;GUO, W.;WANG, H. S.;WU, S. H.;QIN, Y. K..ZHANG, Z. G. An optical system for measuring nitric oxide using spectral

- separation techniques. **Applied Physics B-Lasers and Optics**, v. 107, n. 2, p. 435-440, 2012.
- 55 HAYAT, S.;HASAN, S. A.;MORI, M.;FARIDUDDIN, Q..AHMAD, A. **Nitric oxide: chemistry, biosynthesis, and physiological role.** Wiley Online Library, 2009. ISBN 3527629130.
- 56 JASNY, B.;KELNER, K. L.;MILLER, L. J.;SZUROMI, P. D.;VOSS, D. F.;KIBERSTIS, P. A.;PARKS, S..RAY, L. B. Editorial Staff Assistant Managing Editor: Dawn Bennett. **Science**, v. 258, p. 1861, 1992.
- 57 POPOVA, L..TUAN, T. NITRIC OXIDE IN PLANTS: PROPERTIES, BIOSYNTHESIS AND PHYSIOLOGICAL FUNCTIONS. **Iranian Journal of Science & Technology**, v. 34, n. A3, 2010.
- 58 MUR, L. A. J.;MANDON, J.;CRISTESCU, S. M.;HARREN, F. J. M..PRATS, E. Methods of nitric oxide detection in plants: A commentary. **Plant Science**, v. 181, n. 5, p. 509-519, 2011.
- 59 CONESKI, P. N..SCHOENFISCH, M. H. Nitric oxide release: Part III. Measurement and reporting. **Chem. Soc. Rev.**, 2012.
- 60 DUSSE, L.;VIEIRA, L. M..CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. **J Bras Patol Med Lab**, v. 39, n. 4, p. 435-50, 2003.
- 61 MONCADA, S..HIGGS, A. Nitric oxide: role in human disease. **eLS**, 2001.
- 62 TAYLOR, D.;PIJNENBURG, M.;SMITH, A..JONGSTE, J. Exhaled nitric oxide measurements: clinical application and interpretation. **Thorax**, v. 61, n. 9, p. 817-827, 2006.
- 63 BEDIQUI, F.;QUINTON, D.;GRIVEAU, S..NYOKONG, T. Designing molecular materials and strategies for the electrochemical detection of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite in biological systems. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 12, n. 34, p. 9976-9988, 2010.
- 64 FEI, J. J.;HU, S. S..SHIU, K. K. Amperometric determination of nitric oxide at a carbon nanotube modified electrode with redox polymer coating. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 15, n. 3, p. 519-523, 2011.
- 65 WANG, F.;CHEN, X..CHEN, Z. Eletrodeposited nickel oxide on a film of carbon nanotubes for monitoring nitric oxide release from rat kidney and drug samples. **Microchimica Acta**, v. 173, n. 1, p. 65-72, 2011.
- 66 DA FONSECA, J. C. L. Drogas vasoativas-Uso racional. **Rev SOCERJ**, v. 14, n. 2, p. 49, 2001.
- 67 NG, S. R.;GUO, C. X..LI, C. M. Highly Sensitive Nitric Oxide Sensing Using Three-Dimensional Graphene/Ionic Liquid Nanocomposite. **Electroanalysis**, v. 23, n. 2, p. 442-448, 2011.

- 68 WANG, F.;DENG, X. C.;WANG, W..CHEN, Z. L. Nitric oxide measurement in biological and pharmaceutical samples by an electrochemical sensor. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 15, n. 4, p. 829-836, 2011.
- 69 MAKLIN, J.;MUSTONEN, T.;KORDAS, K.;SAUKKO, S.;TOTH, G..VAHAKANGAS, J. Nitric oxide gas sensors with functionalized carbon nanotubes. **Physica Status Solidi B-Basic Solid State Physics**, v. 244, n. 11, p. 4298-4302, 2007.
- 70 YU, A. M.;ZHANG, X.;ZHANG, H. L.;HAN, D. Y..KNIGHT, A. R. Preparation and electrochemical properties of gold nanoparticles containing carbon nanotubes-polyelectrolyte multilayer thin films. **Electrochimica Acta**, v. 56, n. 25, p. 9015-9019, 2011.
- 71 MALINSKI, T..TAHA, Z. Nitric oxide release from a single cell measured in situ by a porphyrinic-based microsensor. **Nature**, v. 358, n. 6388, p. 676-678, 1992.
- 72 DENG, X. C.;WANG, F..CHEN, Z. L. A novel electrochemical sensor based on nano-structured film electrode for monitoring nitric oxide in living tissues. **Talanta**, v. 82, n. 4, p. 1218-1224, 2010.
- 73 WU, F. H.;ZHAO, G. C..WEI, X. W. Electrocatalytic oxidation of nitric oxide at multi-walled carbon nanotubes modified electrode. **Electrochemistry Communications**, v. 4, n. 9, p. 690-694, 2002.
- 74 LI, C. M.;ZANG, J. F.;ZHAN, D. P.;CHEN, W.;SUN, C. Q.;TEO, A. L.;CHUA, Y. T.;LEE, V. S..MOOCHHALA, S. M. Electrochemical detection of nitric oxide on a SWCNT/RTIL composite gel microelectrode. **Electroanalysis**, v. 18, n. 7, p. 713-718, 2006.
- 75 CHEN, H..ZHAO, G. Nanocomposite of polymerized ionic liquid and graphene used as modifier for direct electrochemistry of cytochrome c and nitric oxide biosensing. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 16, n. 10, p. 3289-3297, 2012.
- 76 IGNARRO, L. J. **Nitric Oxide: Biology and Pathobiology**. Academic Press, 2000. ISBN 9780123704207.
- 77 BUTLER, A. R..WILLIAMS, D. L. H. The physiological role of nitric oxide. **Chemical Society Reviews**, v. 22, n. 4, p. 233-241, 1993.
- 78 MAULTZSCH, J.;REICH, S.;THOMSEN, C.;CZERW, R.;CARROLL, D. L.;VIEIRA, S. M. C.;BIRKETT, P. R..REGO, C. A. Raman characterization of boron-doped multiwalled carbon nanotubes. **Applied Physics Letters**, v. 81, n. 14, p. 3, 2002.
- 79 HAISS, W.;THANH, N. T. K.;AVEYARD, J..FERNIG, D. G. Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 11, p. 4215-4221, 2007.
- 80 JI, X.;SONG, X.;LI, J.;BAI, Y.;YANG, W..PENG, X. Size control of gold nanocrystals in citrate reduction : The third role of citrate. **Journal of American Chemical Society**, v. 129, n. 45, p. 10, 2007.

- ⁸¹ HUANG, X.;LI, Y.;CHEN, Y..WANG, L. Electrochemical determination of nitrite and iodate by use of gold nanoparticles/poly(3-methylthiophene) composites coated glassy carbon electrode. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 134, n. 2, p. 780-786, 2008.
- ⁸² HOOGVLIET, J. C.;DIJKSMA, M.;KAMP, B..VAN BENNEKOM, W. P. Electrochemical Pretreatment of Polycrystalline Gold Electrodes To Produce a Reproducible Surface Roughness for Self-Assembly: A Study in Phosphate Buffer pH 7.4. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 9, p. 2016-2021, 2000.
- ⁸³ ALWARAPPAN, S.;LIU, G..LI, C.-Z. Simultaneous detection of dopamine, ascorbic acid, and uric acid at electrochemically pretreated carbon nanotube biosensors. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 6, n. 1, p. 52-57, 2010.
- ⁸⁴ **INMETRO. ORIENTAÇÃO SOBRE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS DE ENSAIOS QUÍMICOS** março de 2003.