

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS

PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Gustavo Chevitaese Azevedo

**Determinação amperométrica de peróxido de hidrogênio em amostras de mel e gel para
clareamento dentário usando eletrodo de diamante dopado com boro**

Juiz de Fora

2014

Gustavo Chevitaese Azevedo

**Determinação amperométrica de peróxido de hidrogênio em amostras de mel e gel para
clareamento dentário usando eletrodo de diamante dopado com boro**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial a obtenção do grau de Mestre em Química. Área de concentração: Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Renato Camargo Matos

Juiz de Fora

2014

*Dedico à minha família,
especialmente minha Mãe Fátima
e meu Pai Newton.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por minha vida.

À minha família: minha mãe Fátima por todo apoio nas horas de aperto e por ter me auxiliado em toda minha formação, ao meu pai por todo o conhecimento passado à mim e a minha irmã pelos momentos de descontração. À minha segunda mãe, Tezinha, pelos anos de vida dedicados a cuidar de mim, e ao meu irmão adquirido Daniel, “Sangue Bom”, por todo o amor e alegria.

À minha noiva Karol, por me acompanhar durante tantos anos e me conceder apoio, mesmo sem saber do que se tratava, EU TE AMO.

À minha outra família e família da Karol: Dona Maria, Edna, Beth, Lena, Iraima, Rosinha, Bóris e Yuri “baby”, por terem me acolhido tão bem todos esses anos e estarem sempre me incentivando.

Ao professor e amigo Renato pela enorme paciência e dedicação. Atribuo a ele a oportunidade de ter descoberto a química analítica e a evolução científica e pessoal pela qual passei.

Aos professores Rafael e Marcone pelas importantes sugestões durante a qualificação e por todos os ensinamentos.

À banca examinadora, composta pelos professores Rômulo Franchini e Denise Lowinsohn, pelas contribuições concedidas que, sem dúvida, engrandecem o trabalho.

Aos colegas de laboratório, Mellina, Marcos, Aparecida, Rafaela, Ângela, Fausto, Cíntia, Gláucio, Daniel, Thalles, Raiane, Roberto, Fernanda, Pâmella, Naira, Thaís T., Thaís F. e Thaís D., Yara, Alessandra, Andressa pelos bons momentos compartilhados, por todas as músicas tocadas e pelos vários cafezinhos.

Aos muitos amigos adquiridos durante o trajeto, especialmente Carol, Wesley, Leandra, Daniel e Thalles pelos momentos compartilhados, segredos trocados e pela amizade.

À FAPEMIG, CNPq e CAPES, pelo apoio financeiro.

“O caminho não está pronto, mas
É preciso sempre caminhar muito mais
O caminho se mostra enquanto persistente
Caminhar sempre pra frente.
O Rappa”

RESUMO

A utilização dos eletrodos à base de carbono já está bem descrita para alguns materiais, entretanto o desenvolvimento tecnológico vem trazendo ao mercado novos materiais como o eletrodo de filme de diamante dopado com boro (DDB). Este material possui diversas propriedades que o tornam excelentes em aplicações eletroanalíticas, dentre elas na determinação de peróxido de hidrogênio. A determinação de H_2O_2 pode ser realizada por diferentes técnicas, incluindo a amperometria, a espectrofotometria e a quimiluminescência. Neste contexto o objetivo do trabalho foi desenvolver uma célula eletroquímica para adaptar o eletrodo de DDB e também uma metodologia envolvendo análise por injeção em fluxo para a determinação amperométrica de H_2O_2 em amostras de gel de clareamento dentário e mel, sob o eletrodo de filme de diamante dopado com boro. Diferentes parâmetros foram avaliados para a obtenção de melhores condições de análise, dentre eles destacam-se o fluxo de eletrólito de $2,8 \text{ mL min}^{-1}$, a alça de amostragem de $175 \text{ }\mu\text{L}$ ($28,5 \text{ cm}$), o percurso analítico de 25 cm ($59 \text{ }\mu\text{L}$) para o gel e 5 cm ($31 \text{ }\mu\text{L}$) para o mel e o potencial aplicado de $0,6 \text{ V}$. O método proposto apresentou resultados adequados em termos de precisão ($\text{DPR} < 10 \%$), a exatidão foi confirmada, para a análise dos geis, através de estudos de adição e recuperação com resultados entre 74 e 107% . O mesmo foi comparado ao método espectrofotométrico já existente e apresentou uma excelente concordância, com o mínimo de perda de exatidão ou precisão, com o benefício de uma expressiva diminuição no uso de enzima no caso da análise de mel (90% a menos) e totalmente eliminado o uso nas amostras de gel, tornando o método mais barato que o espectrofotométrico. O método foi então aplicado à análise de amostras de gel de clareamento do mercado local e amostras de mel adquiridas em diferentes cidades da região. Com relação aos resultados obtidos os geis de clareamento apresentaram um valor médio de concentração de $2,39 \%$ m/m, os limites de detecção e quantificação foram $1,06$ e $3,54 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$,

respectivamente. Para o mel foram obtidos valores de concentração médios de $25,8 \mu\text{g g}^{-1}$, os limite de detecção e quantificação foram $0,78$ e $2,59 \mu\text{g g}^{-1}$ respectivamente.

Palavras-chave: Gel de clareamento. Mel. Eletrodo de diamante dopado com boro. Peróxido de hidrogênio.

ABSTRACT

The use of carbon based electrodes is well described for some materials, however technological development has brought to market new materials such as boron doped diamond film electrode. This material has several properties that make it excellent for electroanalytical applications, among them the determination of hydrogen peroxide. The determination of H₂O₂ can be accomplished by various techniques, including amperometry, spectrophotometry and chemiluminescence. In this context, the aim of this work was to develop an electrochemical cell and a methodology based on an amperometric determination of hydrogen peroxide in whitening gel and honey samples under the boron doped diamond electrode using flow injection analysis. Different parameters were evaluated to obtain the best conditions of analysis, among them the flow of electrolyte of 2.8 mL min⁻¹, the loop sampling 175 μL (28.5 cm), the analytical length of 159 μL (25 cm) to the gel and 31 μL (5 cm) to honey and an applied potential of 0.6 V. The proposed method was suitable in terms of precision (RSD < 10 %) results, the accuracy was confirmed in the analysis of the gels through the addition and recovery studies with results between 74 and 107 %. The proposed method was compared to the spectrophotometric method established and showed an excellent agreement, without loss of accuracy or precision, but with the benefit of a significant reduction in the use of enzyme in honey analysis (90 % less) and not use of enzymes for the analysis of whitening gel, making it cheaper than the spectrophotometric method. The method was then applied to the analysis of tooth whitening gels and honey samples of the local market acquired in different cities of the region. Regarding the results of whitening gels showed a medium concentration value of 2.39 % m/m, the limits of detection and quantification were 1.06 and 3.54 μmol L⁻¹ respectively. For honey samples, a mean concentration value of 25.8 μg g⁻¹ were obtained, the detection and quantification limits were 0.78 and 2.59 μg g⁻¹ respectively.

Keywords: Whitening gel, honey, boron doped diamond electrode, hydrogen peroxide.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Estruturas químicas dos compostos mais utilizados como agentes clareadores em geis para clareamento dentário, peróxido de hidrogênio (A) e peróxido de carbamida (B). _____ 19
- Figura 2 – Esquema simplificado do processo de produção do filme de DDB (adaptada de MAY, P. W., 2000) _____ 29
- Figura 3 – Voltamogramas cíclicos de uma solução 0,1 mol L⁻¹ de H₂SO₄ sob diferentes eletrodos. _____ 30
- Figura 4 - Imagem da placa de silício com o filme de DDB como foi recebida (A) e do primeiro eletrodo, construído em acrílico (B). _____ 34
- Figura 5 - Segundo eletrodo construído e testado, com a utilização de placa de circuito impresso e cola de prata para estabelecer o contato elétrico entre a placa com o filme de DDB e o cobre utilizado nas trilhas do circuito. _____ 35
- Figura 6 - Representação esquemática e vista superior da célula eletroquímica utilizada no trabalho de determinação de peróxido em gel de clareamento. Corpo da célula (A), cavidade para a barra magnética de agitação (B), O-ring de borracha para vedação e isolamento da área geométrica exposta do eletrodo (C), eletrodo de DDB (D), placa de cobre (E), parafusos para fixação (F). (HONÓRIO, G. G. et al., 2014) _____ 36
- Figura 7 - Célula desmontada e seus componentes: Corpo da célula em PTFE (A), placa de cobre (B), placa de silício com o filme de DDB (C), e O-ring de vedação (D). _____ 37
- Figura 8 - Vista superior em detalhe da célula miniaturizada construída em acrílico sem o reator acoplado, mostrando a área exposta do eletrodo de DDB (A) e os eletrodos de referência (B) e auxiliar (C). _____ 38
- Figura 9 - Peças do reator tubular contendo a resina com enzima imobilizada (A), reator montado (B), reator acoplado à célula (C), montagem experimental com dois reatores (D) _ 39

- Figura 10 - Microcélula eletroquímica desenvolvida, aplicada em conjunto com o cromatógrafo líquido, adaptada à saída do detector espectrofotométrico do aparelho. _____ 40
- Figura 11 - Diagrama da montagem do sistema de análise em fluxo com detecção amperométrica para a análise de gel de clareamento dentário. Reservatório para o eletrólito 500 mL (A), bomba peristáltica (B), tubo contendo a amostra 10 mL(C), alça de amostragem 175 μ L (D), válvula de injeção manual (E), célula eletroquímica (F), potenciostato (G), descarte de solução (H), computador (I). _____ 42
- Figura 12 - Diagrama esquemático do sistema FIA empregado para a análise de peróxido de hidrogênio em mel. Reservatório para o eletrólito 500 mL (A), bomba peristáltica (B), tubo contendo a amostra 10 mL (C), alça de amostragem 175 μ L(D), válvula de injeção manual (E), célula eletroquímica (F), potenciostato (G), descarte de solução (H), computador (I), válvulas de três vias para direcionar o fluxo (V1 e V2), reatores enzimáticos com e sem a enzima imobilizada, respectivamente (R1 e R2). _____ 43
- Figura 13 - Voltamogramas cíclicos obtidos para soluções contendo tampão fosfato pH 7,00 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e adições de 1 e 2 mmol L^{-1} de H_2O_2 nos eletrodos de DDB, carbono vítreo, ouro e platina vs $\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{sat})}$. _____ 49
- Figura 14 - Densidade de corrente para uma concentração de peróxido de 2 mmol L^{-1} , para comparação entre os diferentes eletrodos disponíveis no laboratório de pesquisa, evidenciando uma melhor resposta para o eletrodo de DDB frente aos demais. _____ 50
- Figura 15 - Amperograma obtido para solução contendo tampão fosfato pH 7 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e sucessivas adições de H_2O_2 (0,76; 0,97; 1,18; 1,39 e 1,60 mmol L^{-1}) na célula eletroquímica utilizando o eletrodo de DDB como eletrodo de trabalho vs $\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{sat})}$ (A). Curva analítica obtida para o experimento (B). _____ 51

- Figura 16 - Amperograma obtido para solução contendo tampão fosfato pH 7,00 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e sucessivas adições de H_2O_2 (1,0; 2,1; 3,1; 4,2 e $6,2 \text{ mmol L}^{-1}$) na célula eletroquímica (A). Curvas analíticas utilizando o eletrodo de DDB (B). _____ 52
- Figura 17 - Amperograma para injeções em triplicata de $150 \text{ }\mu\text{L}$ de uma solução padrão de peróxido de hidrogênio $16 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$, variando a vazão do eletrólito suporte (tampão fosfato pH 7,00) de $2,80 \text{ mL min}^{-1}$ a $1,35 \text{ mL min}^{-1}$. _____ 53
- Figura 18 - Gráfico de largura do sinal vs vazão (A) e corrente de pico vs vazão (B) para avaliação do sistema FIA, as condições são as mesmas das descritas na figura 17. _____ 54
- Figura 19 - Amperograma para quatro injeções consecutivas de $150\mu\text{L}$ de uma solução padrão de peróxido de hidrogênio à uma concentração de $16 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$, em tampão fosfato pH 7,00, variando o percurso analítico de 20,5 a 38,5 cm (A). Gráfico da relação entre o percurso analítico e a largura do sinal para o experimento (B). _____ 56
- Figura 20 - Amperograma para injeções em triplicata de uma solução padrão de peróxido de hidrogênio à uma concentração de $16 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato pH 7,00 à uma vazão constante de $2,80 \text{ mL min}^{-1}$, variando o volume da alça de amostragem de 50 a $250 \text{ }\mu\text{L}$ (A). Efeito do volume da alça de amostragem na largura do sinal obtido (B). _____ 58
- Figura 21 - Amperograma para 5 injeções consecutivas de peróxido de hidrogênio em tampão fosfato pH 7,00 à uma vazão constante de $2,80 \text{ mL min}^{-1}$ com volume de injeção de $175 \text{ }\mu\text{L}$ e concentração de H_2O_2 de 6,3; 8,2; 10,2; 19,5; 40,9; 60,2; 77,5; 100,0; 198,0; 400,0; 600,0; e $800,0 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$. _____ 59
- Figura 22 - Amperograma para o estudo de repetitividade com 10 injeções consecutivas de peróxido de hidrogênio em tampão fosfato pH 7,00 à uma vazão constante de $2,80 \text{ mL min}^{-1}$ com volume de injeção de $175 \text{ }\mu\text{L}$ e concentração de H_2O_2 de $19,5 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$. _____ 60

Figura 23 - Voltamograma cíclico obtido para solução contendo tampão fosfato pH 7,00 (0,1 mol L⁻¹) e adições de 1, 2 e 3 mmol L⁻¹ de ureia, seguido da adição de 2 mmol L⁻¹ de H₂O₂ na célula eletroquímica utilizando o eletrodo de DDB como eletrodo de trabalho vs Ag/AgCl_(sat).

61

Figura 24 - Amperograma para injeções da curva analítica, amostra e soluções fortificadas em tampão fosfato pH 7,00 à uma vazão constante de 2,80 mL min⁻¹ com volume de injeção de 175 µL (A). Curva analítica para o experimento, $I(A) = 2,6 \times 10^{-2} \times [H_2O_2] \text{ (mol L}^{-1}\text{)} + 8,6 \times 10^{-8}$ e $r = 0,9996$. As concentrações de H₂O₂ da curva analítica (A) foram 9,80; 14,6; 19,5; 29,2; 8,8; 58,0; 77,1; 95,9 µmol L⁻¹, B, E, H são as replicatas das amostras, C, F, I e D, G, J são as amostras fortificadas nos níveis baixo e alto, respectivamente (B).

63

Figura 25 - Reação de formação da antipiril-quinonimina a partir da 4-aminoantipirina, fenol e peróxido de hidrogênio

65

Figura 26 - Correlação de Pearson entre o método espectrofotométrico e o método amperométrico desenvolvido, indicando uma concordância para as diferentes medidas realizadas na análise dos geis de clareamento.

67

Figura 27 - Amperograma para injeções de três curvas de adição de padrão para a análise de mel, amostra (A), amostra com 10 U de peroxidase (G) e soluções com 8,67; 17,8; 23,9; 32,0; 48,1 µmol L⁻¹ de peróxido de hidrogênio (B-F), nas condições descritas na tabela 3.

68

Figura 28 - Teste de Tukey evidenciando principalmente a diferença significativa entre a sensibilidade da curva de adição de padrão para a amostra de Caxambu-MG (1) e as demais curvas (2-7).

70

Figura 29 - Correlação entre o método espectrofotométrico e o método amperométrico desenvolvido, indicando uma concordância para as diferentes medidas realizadas na análise dos meis.

73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplos de técnicas não eletroquímicas para determinação de peróxido de hidrogênio. _____	24
Tabela 2 - Características das amostras de mel. _____	44
Tabela 3 - Melhores condições para a análise de peróxido em gel de clareamento e mel. ____	62
Tabela 4 - Valores de concentração e recuperação encontrados para as amostras de gel de clareamento dentário. _____	64
Tabela 5 - Comparação dos valores de concentração de peróxido obtidos para os geis de clareamento por métodos diferentes. _____	66
Tabela 6 - Valores de concentração, sensibilidade e correlação linear encontrados para as amostras de mel. _____	69
Tabela 7 - Comparação dos valores de concentração de peróxido obtidos para os geis por métodos diferentes. _____	72

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANVISA	Agência nacional de vigilância Sanitária
CENA	Centro de Energia Nuclear na Agricultura
CVD	Deposição química a partir da fase vapor (do inglês “chemical vapour deposition”)
DDB	Diamante dopado com boro
DFT	Teoria do funcional da densidade (do inglês “density functional theory”)
DPR, RSD	Desvio padrão relativo (do inglês “relative standard deviation”)
E	Potencial
EA	Eletrodo auxiliar
ER	Eletrodo de referência
ET	Eletrodo de trabalho
I	Corrente
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Nylon®	Poliamida
PMMA	Polimetil-metacrilato
PTFE	Politetrafluoretileno
r	Coefficiente de correlação linear ou de Pearson

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	18
1.1.	GEL DE CLAREAMENTO.....	18
1.2.	MEL.....	20
1.3.	DETERMINAÇÃO DE H ₂ O ₂	23
1.4.	ENZIMAS	26
1.5.	TÉCNICAS ELETROANALÍTICAS	27
1.6.	ELETRODO DE DIAMANTE DOPADO COM BORO	28
2.	OBJETIVOS	32
2.1.	OBJETIVO GERAL.....	32
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
3.	PARTE EXPERIMENTAL	33
3.1.	MATERIAIS E REAGENTES	33
3.2.	INSTRUMENTAÇÃO.....	33
3.3.	ELETRODOS E CÉLULA ELETROQUÍMICA.....	34
3.4.	SISTEMA DE ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO.....	41
3.4.1.	Gel de clareamento	41
3.4.2.	Mel	42
3.5.	AMOSTRAS	44
3.5.1.	Gel de clareamento	44
3.5.2.	Mel	44
3.6.	METODOLOGIA ANALÍTICA.....	44
3.6.1.	Determinação diferencial de peróxido	44
3.6.2.	Condições experimentais testadas	45

3.6.2.1.	<i>Estudo voltamétrico de H₂O₂ em diferentes eletrodos</i>	45
3.6.2.2.	<i>Estudo amperométrico do H₂O₂</i>	46
3.6.2.3.	<i>Estudo do pH do tampão fosfato</i>	46
3.6.2.4.	<i>Estudo da vazão do sistema FIA</i>	46
3.6.2.5.	<i>Estudo do percurso analítico</i>	46
3.6.2.6.	<i>Estudo do volume de injeção</i>	46
3.6.2.7.	<i>Influência da ureia na determinação de H₂O₂ em gel de clareamento</i>	47
3.6.2.8.	<i>Quantificação de H₂O₂ nas amostras de gel de clareamento</i>	47
3.6.2.9.	<i>Quantificação de H₂O₂ nas amostras de mel</i>	47
3.6.2.10.	<i>Condições analíticas para o método espectrofotométrico</i>	47
3.6.2.11.	<i>Exatidão do método</i>	47
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	49
4.1.	ESTUDO VOLTAMÉTRICO DE H ₂ O ₂ EM DIFERENTES ELETRODOS	49
4.2.	ESTUDO AMPEROMÉTRICO DO H ₂ O ₂	51
4.3.	ESTUDO DO PH DO TAMPÃO	52
4.4.	ESTUDO DA VAZÃO DO SISTEMA FIA	53
4.5.	ESTUDO DO PERCURSO ANALÍTICO	55
4.6.	ESTUDO DO VOLUME DE INJEÇÃO	57
4.8.	FAIXA LINEAR DE TRABALHO	59
4.9.	REPETITIVIDADE	60
4.10.	INFLUÊNCIA DA UREIA NA DETERMINAÇÃO DE H ₂ O ₂ EM GEL DE CLAREAMENTO	61
4.11.	CONDIÇÕES OTIMIZADAS	62
4.12.	QUANTIFICAÇÃO DOS TEORES DE H ₂ O ₂ EM GEL DE CLAREAMENTO DENTÁRIO	62

4.13.	COMPARAÇÃO DO MÉTODO AMPEROMÉTRICO COM O MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO ENZIMÁTICO PARA AS AMOSTRAS DE GEL DE CLAREAMENTO	65
4.14.	QUANTIFICAÇÃO DOS TEORES DE H ₂ O ₂ EM MEL.	67
4.15.	COMPARAÇÃO DO MÉTODO AMPEROMÉTRICO COM O MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO ENZIMÁTICO PARA AS AMOSTRAS DE MEL	71
5.1.	CONCLUSÕES.....	74
5.2.	PERSPECTIVAS	75
6.	REFERÊNCIAS	77

1. INTRODUÇÃO

1.1. GEL DE CLAREAMENTO

A boa aparência é uma busca comum da maioria dos indivíduos nos dias atuais, ela está relacionada não apenas ao corpo, cabelos ou a educação, mas também está associada ao sorriso. Assim, dentes escurecidos ou amarelados interferem no sorriso e podem provocar perda da autoestima, seja em âmbito profissional ou afetivo, além de indicar a falta de cuidados com a saúde bucal.

O processo de escurecimento dental foi classificado por Watts como intrínseco ou extrínseco. (Watts, 2001) Os fatores intrínsecos são aqueles adquiridos por doenças metabólicas, genéticas, por traumas (fraturas) ou administração de fármacos com tetraciclina durante a formação do feto na gestação (ou mesmo após o nascimento), e está relacionado ainda com o escurecimento natural devido à formação da dentina secundária ao longo dos anos, dentre outros. (Watts, 2001; Joiner, 2004) Os fatores extrínsecos são aqueles adquiridos através dos hábitos alimentares ou vícios como o cigarro. As manchas podem ser classificadas com relação à origem dos pigmentos em metálicas e não metálicas. A primeira delas está associada à exposição a íons ferro (suplementos alimentares), cobre (exposição ocupacional), permanganato (enxaguantes bucais), ou mesmos sais como nitrato de prata ou fluoreto de estanho, às vezes usados em procedimentos odontológicos. (Watts, 2001)

As manchas não metálicas são associadas ao uso de tabaco, de enxaguantes bucais, à ingestão de alimentos e bebidas contendo corantes, como café, refrigerantes à base de cola, vinho tinto, molho de soja, beterraba, acúmulo de placa bacteriana ou depósitos de tártaro. (Watts, 2001)

Para contornar os efeitos indesejáveis dos dentes escurecidos foram desenvolvidos vários métodos de clareamento dentário como a limpeza profissional por raspagem, polimento para remover tártaro e manchas, utilização de dentifrícios branqueadores e a utilização de gel para clareamento. (Joiner, 2006) A limpeza, o polimento e a utilização de dentifrícios comumente consistem em utilizar materiais abrasivos, que atuam mecanicamente para a remoção das manchas. Já o modo como age o gel clareador é variado e complexo e não está bem descrito. Os pigmentos das manchas são geralmente moléculas com cadeias carbônicas longas com duplas conjugadas e grupamentos fenil e carbonila, que comumente apresentam cores na região do visível, devido ao seu espectro de absorção. Estas duplas ligações são oxidadas por radicais $\text{OH}\cdot$ e $\text{OOH}\cdot$, gerando produtos menores, que em geral não absorvem

radiação no visível e são, portanto, mais claros ou incolores, e tornam a aparência dos dentes mais bonita. (Young et al., 2012; Baratieri et al., 2001)

Existem dois métodos de aplicação dos geis de clareamento, o primeiro deles é o clareamento em consultório, sob supervisão do dentista, e o segundo é conhecido como clareamento caseiro, no qual é confeccionada uma moldeira pelo dentista e a aplicação do gel é feita na própria residência do paciente. Os clareadores mais aceitos e empregados na atualidade são os peróxidos de hidrogênio e de carbamida (Figura 1). (Baratieri et al., 2004; Lima, 2006; Baratieri et al., 2001).

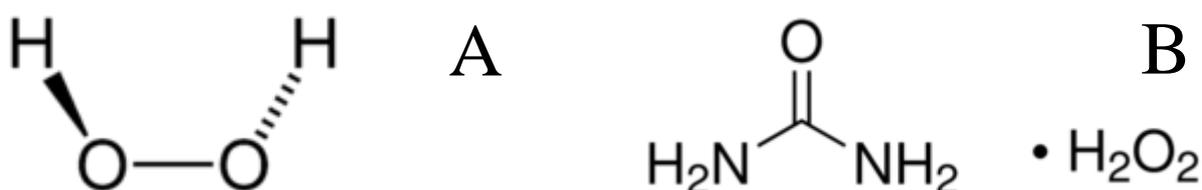


Figura 1 - Estruturas químicas dos compostos mais utilizados como agentes clareadores em geis para clareamento dentário, peróxido de hidrogênio (A) e peróxido de carbamida (B).

O material pode ser comprado pela internet ou em lojas especializadas e é vendido em vários níveis de concentração geralmente entre 3 e 35 % (v/v) dependendo do agente clareador. Os clareadores dentais não têm venda restrita no Brasil, desde que sejam registrados pela ANVISA. São considerados cosméticos e não medicamento, segundo a resolução - RDC Nº 211, DE 14 DE JULHO DE 2005, (ANVISA, 2005) que estabelece a definição e a classificação dos produtos de higiene pessoal e cosméticos, o anexo I da resolução descreve da seguinte forma:

Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes, são preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano, pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externos, dentes e membranas mucosas da cavidade oral, com o objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência e ou corrigir odores corporais e ou protegê-los ou mantê-los em bom estado.

Isso tem levado a uma utilização abusiva e sem precaução, sem que o paciente tome ciência dos efeitos adversos possíveis.

A técnica realizada em consultório geralmente utiliza o peróxido de hidrogênio em concentrações elevadas, variando de 25 a 38 % v/v (Li, 2011) O acompanhamento do dentista inclui a proteção dos tecidos moles por barreira gengival, aplicação de dessensibilizante e aplicações mais curtas do produto com duração de 30 até 45 minutos. (Marshall, Cancro e Fischman, 1995)

A técnica de clareamento caseira foi desenvolvida e aplicada pela primeira vez por Haywood e Heymann em 1989 (Haywood Vb, 1989) e consistia na aplicação do gel à base de peróxido de carbamida a 10 % (m/m), numa moldeira por até 8 horas por noite, durante o sono. A técnica original sofreu poucas modificações e passou a incluir a utilização do gel à base de peróxido de hidrogênio com concentrações variando de 3 % a 7,5 % (Joiner, G. e Y., 2004; Schemehorn, González-Cabezas e Joiner, 2004; Li, 2011) e também o gel contendo peróxido de carbamida em níveis que variam de 16 % a 22 %. (Joiner, 2007; Ontiveros, Eldiwany e Paravina, 2012)

Independentemente da técnica escolhida, existem efeitos colaterais geralmente temporários, como o aparecimento de sensibilidade dentária e irritação gengival. Outro problema encontrado é a perda da estrutura dentária, uma vez que a partir de certo ponto, os pigmentos não são mais clareados, e o agente passa a oxidar e desnaturar proteínas da matriz do esmalte (Antón, Lima e De Araújo, 2009; Sato et al., 2013).

1.2. MEL

O Brasil é reconhecido por possuir uma flora extensa e diversificada bem como um clima igualmente variável, tal fato possibilita a produção de mel durante o ano todo, diferentemente de outros países onde se colhe mel uma vez por ano apenas. Mesmo com uma apicultura relativamente desenvolvida no Brasil, pouco se sabe sobre a composição e características e potencialidades do mel brasileiro, ainda é necessário desenvolver e direcionar pesquisas capazes de esclarecer a composição do mel brasileiro.

O mel é apreciado por seu sabor, consistência e odor característicos e também por conter um grande valor nutritivo, reflexo do alto teor de açúcares imediatamente absorvíveis pelo organismo. Ele exerce ainda um papel importante na gastronomia, substituindo o açúcar refinado obtido da cana-de-açúcar, muitas vezes agregando valor ao produto final.

O mel é definido como sendo um produto alimentício produzido pelas abelhas melíferas, a partir do néctar das flores ou das secreções procedentes de partes vivas das plantas que as abelhas recolhem, transformam, combinam com substâncias específicas próprias, armazenam e deixam madurar nos favos da colmeia. (Campos et al., 2003; Marchini, Moreti e Otsuk, 2005; Brasil, 2000).

O processo de produção do mel começa quando as abelhas melíferas colhem o néctar de uma planta (basicamente composto de açúcares, água e óleos aromáticos das plantas de origem). O néctar é então transportado até as colmeias onde as abelhas operárias ajudam a evaporar a água presente (70 %), para isso elas engolem e regurgitam o néctar continuamente e também batem as asas sobre os favos para acelerar a remoção da água, deixando o mel com um teor de 20 % de água. A umidade do mel é um fator importante para a qualidade do mesmo, contribuindo para manter a estabilidade, cristalização e viscosidade. Durante a etapa de desidratação do néctar as abelhas incorporam a enzima invertase, que transforma a sacarose em glicose e frutose.

A composição do mel, como a de qualquer produto de origem natural é bastante variável, mas seu peso seco é composto por aproximadamente 95 % de carboidratos. Ele contém também mais de 180 outras substâncias, incluindo aminoácidos, vitaminas, minerais, óleos aromáticos e enzimas, além de apresentar um pH próximo de 3,9. (Alvarez-Suarez et al., 2010)

O mel pode ser classificado quanto a sua origem por monofloral ou multifloral, tal classificação remete ao tipo de planta onde é colhido o pólen. Também pode ser classificado quanto ao tipo de processamento como prensado, escorrido ou centrifugado, e também quanto a apresentação: em favos, com pedaços de favo ou cristalizado dentre outras. (Brasil, 2000)

O mel, devido às suas qualidades adstringentes e suavizantes, é também utilizado com finalidade cosmética, seja aplicado diretamente sobre o rosto, em máscaras nutritivas caseiras, seja na indústria de cosméticos, para fabricação de cremes hidratantes, máscaras e tônicos faciais.

Apesar de ser definido como um produto alimentício, muitos estudos demonstram o seu potencial terapêutico como por exemplo ação bactericida (Mandal et al., 2010; Mandal e Mandal, 2011; Moussa et al., 2012) e ação cicatrizante (Al-Waili, Salom e Al-Ghamdi, 2011; Al-Waili et al., 2011; Lee, Sinno e Khachemoune, 2011). Suas propriedades antibacterianas são conhecidas há mais de um século e embora seja usado com finalidade terapêutica desde os tempos mais antigos, esta utilização não tinha o conhecimento de suas propriedades, era apenas aproveitado como um remédio efetivo (Mandal e Mandal, 2011). Atualmente, estudos

comprovam a atividade antibacteriana do mel, seja inibindo o crescimento de um largo espectro de bactérias (ação bacteriostática) e até mesmo causando a morte delas (ação bactericida). (Mandal e Mandal, 2011)

Existem fatores físicos que tornam o mel um antimicrobiano eficaz, onde se destacam a alta osmolaridade e viscosidade, e também fatores químicos como a acidez, a presença de peróxido de hidrogênio e compostos fenólicos. (Weston, 2000; Mandal e Mandal, 2011) Como já foi descrito, para produzir o mel as abelhas secretam enzimas como a invertase, responsável pela formação da glicose e frutose e a glucose oxidase, que gera ácido glucônico e peróxido de hidrogênio (equação 1), esta enzima permanece ativa mesmo após o processamento do mel, fato este que contribui para a formação de ácido glucônico e peróxido de hidrogênio durante toda a “vida de prateleira”. A maior atividade antimicrobiana do mel é frequentemente atribuída à geração do peróxido de hidrogênio (White, 1963; Mandal e Mandal, 2011) As determinações de H₂O₂ são comumente realizadas utilizando-se métodos enzimáticos envolvendo principalmente a catalase e a peroxidase. (Mattos, 2003)



A presença do ácido glucônico e do peróxido são fatores importantes na manutenção de um meio ácido, que impede o crescimento de bactérias q degradem o mel ou inutilizem o produto final, isso o torna capaz de proteger a colmeia contra a decomposição bacteriana. A presença de carboidratos e o baixo teor de água elevam a viscosidade do mel e também a sua osmolaridade. Conforme apresentado, existe um efeito sinérgico entre os fatores físicos e químicos para o efeito antimicrobiano do mel.

Todos estes aspectos nutricionais e medicinais agregam valor ao mel e também o tornam muitas vezes alvo de adulterações. No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) lista vários parâmetros físico-químicos para o controle de qualidade do mel na Normativa 11 de 20 de outubro de 2000, dentre eles podem ser destacados o teor de açúcares redutores, umidade, sacarose aparente, acidez, presença de minerais, viscosidade, pH, condutividade entre outros. (Brasil, 2000)

1.3. DETERMINAÇÃO DE H₂O₂

O peróxido de hidrogênio é um agente oxidante muito comum para aplicações analíticas, principalmente envolvendo processos de digestão por via úmida. Essa capacidade oxidante associada ao peróxido é atraente também em outros processos, como os processos oxidativos avançados (Del Moro, G., 2013; Toor, R.; Mohseni, M., 2007) e para tratamento de efluentes (AZABOU, S. et al., 2010).

O peróxido de hidrogênio tem ainda aplicações diversas, como por exemplo em cosméticos, alimentos e em soluções para limpeza de lentes de contato. Ele é muitas vezes adicionado ao leite devido aos seus efeitos antibacterianos, o mesmo ocorre para a aplicação em lentes de contato. O composto também ocorre naturalmente em azeites e é um dos indicadores da qualidade do mesmo segundo o MAPA, na Normativa nº 1 de 30 de janeiro de 2012 (Brasil, 2012). É ainda utilizado no cotidiano em descolorantes para pelos e para limpeza de ferimentos. Existem diversos métodos para a determinação de peróxido, como descrito por Mattos e colaboradores em uma revisão sobre o tema, dentre os métodos abordados pelo pesquisador estão a volumetria, a espectrofotometria, a quimiluminescência, a fluorimetria, a cromatografia e também através dos métodos eletroquímicos. (Mattos, I.L. et al, 2003)

Entretanto não foi descrita a aplicação de nenhum dos métodos a amostras de gel de clareamento, nem se aborda o uso do eletrodo de diamante dopado com boro (DDB) para as determinações de peróxido no trabalho citado. A tabela 1, adaptada (Mattos, 2003), resume as diferentes técnicas utilizadas para a determinação de peróxido de hidrogênio, em diferentes áreas de aplicação, envolvendo métodos não eletroquímicos.

Em duas oportunidades Matos e colaboradores (Matos, Pedrotti e Angnes, 2001; Matos et al., 2006) monitoraram a concentração de peróxido em água de chuva utilizando peroxidase imobilizada em resina trocadora iônica, com detecção espectrofotométrica e amperométrica. Woo e colaboradores realizaram a determinação de peróxido de hidrogênio em gel clareador utilizando um espectrômetro de infravermelho portátil, entretanto os resultados são aparentemente mais qualitativos (Woo e Kim, 2004). Hu e colaboradores (Hu et al., 2012) realizaram a quantificação indireta de peróxido em efluentes do processo de clareamento da celulose, através da cromatografia gasosa com detector de condutividade térmica, usando como base a reação do peróxido com o permanganato para formação de O₂ coletado no *headspace*.

Um trabalho recente (Zhang, W., Ma, D., Du, J., 2014) descreve a utilização de um método de detecção por fluorescência, utilizando nanoclusters de Cu modeladas em

polietilenoimina, neste processo o peróxido age sobre as nanopartículas e inibe a fluorescência, permitindo a detecção de até $0,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ de peróxido em soro humano.

Tabela 1 - Exemplos de técnicas não eletroquímicas para determinação de peróxido de hidrogênio.

Técnica	Considerações da detecção	Intervalo linear	Limite de detecção	Aplicação
Q	Luminol e Co(II)	$3,5 - 71 \mu\text{mol L}^{-1}$	-	Água de Chuva
Q	Luminol e peroxidase	$0,1 - 3 \text{ mmol L}^{-1}$	$0,67 \text{ mmol L}^{-1}$	Detergente (Lentes de contato)
UV-vis	Ácido p-hidroxifenilacético e peroxidase	$1 - 194 \mu\text{mol L}^{-1}$	-	Ar atmosférico
UV-vis	Fenol e peroxidase	$2 - 100 \mu\text{mol L}^{-1}$	$0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$	Água de Chuva
F	Ácido p-hidroxifenilpropiónico e peroxidase	$1 - 3,6 \mu\text{mol L}^{-1}$	13 nmol L^{-1}	Clínica
F	Ácido p-hidroxifenilpropiónico e peroxidase	$1,5 - 29 \mu\text{mol L}^{-1}$	$1,5 \mu\text{mol L}^{-1}$	Ambiental

Q - quimiluminescência; UV-vis - espectrofotometria UV-visível; F – fluorescência.

Fonte: Adaptado de (Mattos I.L., 2003)

Apesar de sensíveis, os métodos não eletroquímicos envolvem muitas vezes reagentes caros e um tempo grande para execução das análises, bem como equipamentos de alto custo. Por outro lado, as técnicas eletroquímicas apresentam uma grande simplicidade de execução e uma potencialidade na determinação de peróxido, seu baixo custo, sensibilidade e bons resultados são portanto bastante atrativos

Dentre os trabalhos envolvendo o uso de técnicas eletroanalíticas, destacam-se o uso de eletrodos modificados ou também a construção de biossensores, poucos trabalhos descrevem o uso de eletrodos limpos. Westbroek e colaboradores desenvolveram um trabalho com estudos de impedância e voltametria cíclica sob o eletrodo de ouro com limites de detecção da ordem de $0,2 \%$ (v/v) (Westbroek et al., 2007). Ndagili e colaboradores propuseram um biossensor baseado em uma modificação complexa em eletrodos de carbono vítreo (carbono

vítreo/polianilina–polivinil sulfonato/albumina de soro bovino/peroxidase/gluteraldeído) e alcançaram limites de detecção da ordem de $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ utilizando a amperometria. (Ndangili et al., 2010)

Diversos trabalhos descrevem o uso do filme de azul da prússia para a detecção de peróxido. Um trabalho desenvolvido por Pournaghi-Azar mostrou a utilidade de um eletrodo de alumínio recoberto com paládio modificado com um filme de azul da prússia na determinação amperométrica de peróxido em amostras de saliva de pacientes em tratamento de clareamento dental, tendo atingindo um limite de detecção da ordem de $4 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Pournaghi-Azar, Ahour e Pournaghi-Azar, 2010). O trabalho de Karyakin e colaboradores descreve o uso do eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de azul da prússia e detecção amperométrica com limites de detecção que chegam a alcançar $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Karyakin, Karyakina e Gorton, 1996). Outro trabalho, desenvolvido por pesquisadores da universidade federal do Paraná (Husmann, S. et al. 2014) envolveu a construção de um eletrodo de pasta de nanotubos de carbono, no qual foi sintetizado eletroquimicamente o filme de azul da prússia, através da voltametria cíclica, no experimento o eletrodo foi submetido a 500 ciclos voltamétricos entre $-0,3$ e $1,2 \text{ V}$ (vs $\text{Ag}/\text{AgCl}_{\text{sat}}$) à 50 mV s^{-1} para a formação do composto. Apesar de demorado o procedimento permitiu uma boa estabilidade, uma vez que o eletrodo apresentou uma boa resposta mesmo após 55 dias de uso, com limites de detecção que alcançaram $4,74 \text{ nmol L}^{-1}$.

Outros tipos de modificação foram exploradas como por exemplo um método envolvendo uma modificação de um eletrodo de carbono vítreo com hexacianoferrato de cobalto(II) que apresentou limites de detecção da ordem de $62,5 \text{ nmol L}^{-1}$ (Lin, M.S., Jan, B.I., 1997). Eletrodos de pasta de prata foram modificadas com uma combinação de surfactante e de cloreto de potássio (KCl), o que resultou num catalizador adequado para a detecção de peróxido de hidrogênio a níveis que chegam a $1 \mu\text{mol L}^{-1}$. (Gonzalez-Macia, L. et al., 2011). O comportamento de eletrodos de carbono vítreo modificados com grafeno/náfion/índigo I/Au foi estudado por pesquisadores chineses, e apresentaram resposta linear na faixa de $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ a 5 mmol L^{-1} entretanto a modificação apresenta dificuldades de execução e uma considerável complexidade de construção. (Zhang, Y. et al., 2013)

Fang e colaboradores recentemente relataram a construção de um biosensor para peróxido de hidrogênio baseado na imobilização da enzima peroxidase em um polímero condutor, a polianilina, detectando concentrações tão baixas quanto $0,7 \text{ nmol L}^{-1}$, entretanto a partir de $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ o sensor fica saturado e um processo de inibição ocorre. O autor relata

ainda uma facilidade de construção, com baixo custo podendo ser até descartável. (Fang, K.C. et al.,2014)

Outra área do conhecimento químico, a química teórica, também despertou interesse com estudos acerca da detecção de peróxido, estudos utilizando a teoria do funcional da densidade, do inglês *density functional theory* (DFT), revelaram os efeitos eletrônicos da presença do peróxido na superfície do grafino, e mostram que o material se torna um semicondutor do tipo n com a presença de peróxido adsorvido, os resultados revelaram ainda a potencialidade do grafino para a determinação do analito. (Majidi, R.; Karami, A.R., 2013)

1.4. ENZIMAS

Enzimas são macromoléculas, na sua maioria de natureza proteica, que funcionam como biocatalisadores, aumentando as taxas de reação. Em geral, uma enzima catalisa apenas um tipo de reação (especificidade de reação) e opera em apenas um tipo de substrato (especificidade do substrato). Moléculas do substrato são atacadas no mesmo local (regiospecificidade) e apenas um, ou preferencialmente um, dos enantiômeros de substratos quirais ou de misturas racêmicas é atacada (estereospecificidade). (IUPAC,2014; BURTIS, C., GEARY, T. ,2009)

Toda enzima possui um centro ativo, ponto de adsorção que são os locais eficazes para a reação catalítica com um determinado substrato. (IUPAC,2014) Este centro ativo é geralmente constituído de alguns resíduos de aminoácidos da cadeia proteica (apoenzima) e de um grupo não proteico, que pode ser um ou mais íons metálicos denominados cofatores ou outras moléculas orgânicas denominadas coenzimas, sendo que algumas enzimas dependem de ambos. O complexo cataliticamente ativo enzima-cofator é denominado holoenzima. (IUPAC, 2014)

A nomenclatura enzimática recomendada atualmente classifica as enzimas em 6 grupos oxidoreduases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases. O nome sistemático das enzimas, não só mostra o tipo de reação catalisada como também descreve o tipo de substrato e outras informações importantes a respeito da enzima. (Boyce S., Tipton K.F., 2005).

Conforme destacado por Cass, desde o desenvolvimento do primeiro sensor enzimático para glicose descrito por Clark em 1962, vem crescendo o interesse e a aplicação dos sensores à base de enzimas na análise de uma variedade de substratos. (Cass, 1990) Estas aplicações envolvem enzimas que catalisam reações redox e cujo progresso da reação é

controlado pela formação de um produto ou até mesmo pelo consumo de um determinado analito. Assim, se o produto de uma reação enzimática for eletroativo sua concentração pode ser monitorada diretamente. As enzimas tipicamente usadas são as oxidoredutases, mas as enzimas hidrolíticas, tais como as fosfatases alcalinas também podem ser utilizadas desde que produzam substâncias eletroativas. O sistema mais comum que envolve o uso de enzimas é o monitoramento do consumo de oxigênio no sistema ou o a geração enzimática de peróxido de hidrogênio (Fernandes, Neto e Kubota, 1998).

A seletividade das enzimas e a sua capacidade de catalisar reações de substratos com baixas concentrações são de grande uso na análise química. As enzimas podem ser utilizadas livres em solução, agregadas a outras substâncias ou ainda aderida a suportes (imobilizadas). Neste contexto a imobilização de enzimas tem se revelado particularmente valiosa, porque permite que as enzimas sejam facilmente reutilizadas além de ajudar a evitar a contaminação do substrato com a enzima, diminuindo os custos de purificação. Estes benefícios as tornaram altamente aplicáveis a uma gama de procedimentos analíticos, incluindo a análise por injeção em fluxo ou em batelada. Diversos métodos são descritos na literatura para imobilização de enzimas, desde a imobilização na superfície de um eletrodo até a imobilização sobre diferentes suportes. (Sassolas, Blum e Leca-Bouvier, 2012) Além disso, cada método possui suas peculiaridades que afetam a atividade enzimática, a estabilidade, a reprodutibilidade, a sensibilidade entre outros fatores. Uma vez que um método analítico está intimamente ligado a estes fatores descritos, muitos estudos têm sido desenvolvidos para garantir a construção de biossensores que cumpram todos estes requisitos. (Sassolas, Blum e Leca-Bouvier, 2012).

1.5. TÉCNICAS ELETROANALÍTICAS

A voltametria cíclica é uma técnica eletroquímica interfacial sem agitação que envolve a aplicação de um potencial elétrico entre um eletrodo de trabalho estacionário (ET) e um eletrodo de referência (ER), de potencial constante. O potencial (E) é variado segundo uma onda triangular, atingindo um valor limite (potencial de inversão) e retornando ao potencial inicial. A corrente que flui pelo sistema (I) é medida constantemente entre os eletrodos auxiliar (EA) e de trabalho e é registrada num voltamograma cíclico (uma curva de $I \times E$). A análise do voltamograma cíclico permite definir a região de potencial onde as reações e os processos de oxidação/redução ocorrem para um determinado analito. Além disto, é possível estudar a

reversibilidade de sistemas químicos, o número de elétrons envolvidos na reação e também estudar a possibilidade de formação de espécies intermediárias.

A amperometria, assim como a voltametria cíclica, também é uma técnica interfacial, que envolve a aplicação de um potencial entre os eletrodos de trabalho e referência. Entretanto, diferentemente da voltametria cíclica, na amperometria o potencial é mantido constante durante a eletrólise. A escolha do potencial envolve geralmente estudos exploratórios, para avaliação do potencial que apresenta a melhor resposta, tais estudos são feitos por meio da voltametria cíclica. A amperometria é aplicada nos mais diversos sistemas, entre eles na cromatografia e eletroforese capilar. O grande atrativo da técnica é a elevada detectabilidade e o monitoramento de baixas correntes, uma vez que a corrente capacitiva (corrente devida a processos que não envolvem transferência de carga entre o eletrodo e os analitos de interesse) é muito menor do que aquela envolvendo eletrólise (corrente faradaica). (Skoog D.A et al., 2006)

1.6. ELETRODO DE DIAMANTE DOPADO COM BORO

As respostas de um método eletroquímico estão intimamente relacionadas ao material do eletrodo de trabalho utilizado, uma vez que as reações de transferência de elétrons que ocorrem na interface eletrodo-solução podem ser facilitadas ou dificultadas alterando-se o eletrodo de trabalho. Neste contexto, os eletrodos de diamante dopado com boro (DDB) se destacaram nos últimos anos por apresentarem um número importante de propriedades eletroquímicas atrativas, superiores em alguns casos daquelas de outros eletrodos à base de carbono, eles têm sido utilizados em várias aplicações como, por exemplo, na determinação de metais pesados (Xu et al., 1997), determinação de mioglobina e hemoglobina por meio da voltametria cíclica (Zhang e Oyama, 2004), determinação simultânea de triptofan e tirosina (Zhao, Qi e Tian, 2006) e na determinação de resíduos de pesticidas como 4-nitrofenol (Pedrosa, Valber De A., Codognoto, Lúcia e Avaca, Luis Alberto, 2003) e 4-clorofenol (Pedrosa, Valber De Albuquerque, Codognoto, Lúcia e Avaca, Luis Alberto, 2003), entretanto até este momento foi pouco explorado o seu uso na determinação de peróxido de hidrogênio.

O desenvolvimento de eletrodos de DDB foi possível graças ao desenvolvimento de técnicas para a fabricação de filmes de diamante, que só foi possível com o advento tecnológico recente. A técnica de deposição química a partir da fase vapor, do inglês “chemical vapour deposition”, CVD é a técnica mais popular para a deposição de filmes de DDB sob baixas pressões. (Srikanth e Jiang, 2011)

A técnica de CVD consiste em aquecer um filamento de um metal refratário, geralmente tungstênio, até uma temperatura entre 2200 e 2800 °C. Uma mistura de metano e hidrogênio é então passada pelo filamento e uma etapa de pirólise acontece, com a deposição do diamante no substrato escolhido, que se encontra a uma temperatura próxima de 750 °C. (Figura 2) (Srikanth e Jiang, 2011) A inclusão do dopante na linha de passagem do gás H₂ é uma das formas de induzir a dopagem do diamante.

A dopagem do diamante se faz necessária para aplicações analíticas, já que o diamante puro não apresenta propriedades eletroquímicas interessantes. Para que sejam obtidos filmes semicondutores, vários agentes dopantes principalmente contendo boro podem ser aplicados dependendo da metodologia utilizada, alguns deles são o diborano (B₂H₆), o trimetil boro ou ainda boratos orgânicos. Quando o agente dopante é incluído em baixas concentrações, o diamante apresenta um comportamento de um semicondutor do tipo p (Quiroz e Bandala, 2011) Neste caso os átomos de boro substituem os átomos de carbono na estrutura cristalina e se liga aos átomos de carbono com hibridação sp³. Como o boro possui um elétron a menos em sua estrutura, uma deficiência eletrônica é gerada, o resultado é a obtenção de um semicondutor que possui em sua estrutura lacunas, que permitem a passagem de carga pela estrutura cristalina. Já quando o boro é adicionado em grandes concentrações (10²⁰ a 10²¹ cm⁻³) o diamante se comporta como um semimetal apresentando baixa resistência. (Quiroz e Bandala, 2011)

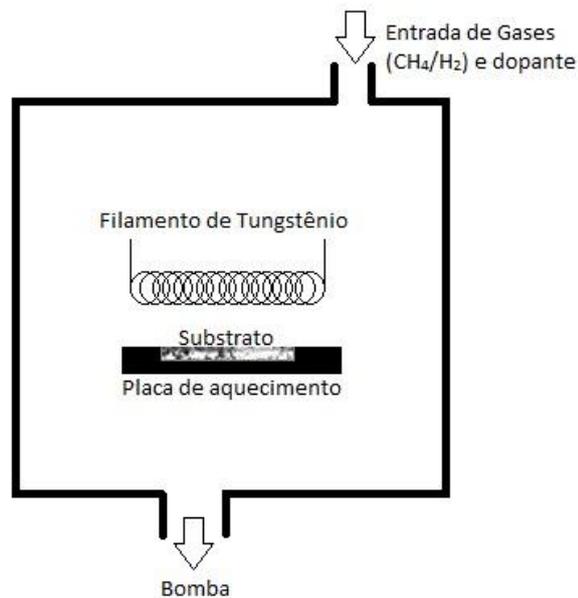


Figura 2 – Esquema simplificado do processo de produção do filme de DDB (adaptada de MAY, P. W., 2000)

O eletrodo de DDB possui características únicas, a principal delas e talvez a mais explorada é a sua janela de potencial, de aproximadamente 3 V, podendo ser até maior. Enquanto os eletrodos convencionais como os metálicos e carbono vítreo possuem faixas mais estreitas. (Figura 3).

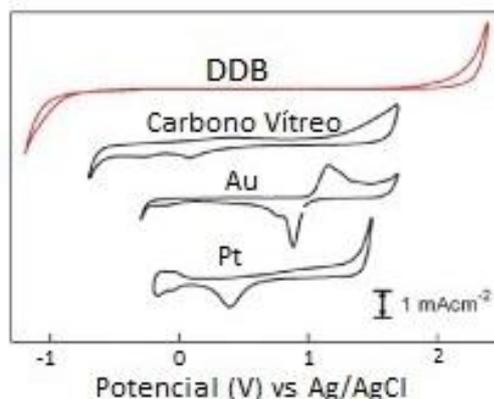


Figura 3 – Voltamogramas cíclicos de uma solução 0,1 mol L⁻¹ de H₂SO₄ sob diferentes eletrodos.

O eletrodo ainda agrega características de grande eletroatividade em água, que juntamente com a janela de potencial existente, permite o estudo de espécies difíceis de reduzir ou oxidar, além de produzir uma baixa corrente de fundo (do inglês “background”) quando comparado ao eletrodo de carbono vítreo, ou a qualquer outro eletrodo de carbono. (Granger, M.C. et al., 1999).

A robustez química e mecânica do diamante o torna adequado para trabalhar em meio corrosivo, além de sua resistência a ultrassom (Chen et al., 1997; Declements e Swain, 1997). Apresenta ainda uma cinética favorável à transferência eletrônica e inércia da superfície, o que resulta em alta resistência à desativação. Além disso o eletrodo em si tem se mostrado resistente ao envenenamento, e pode ser reutilizado várias vezes (Langeloth, Chiku e Einaga, 2010).

Durante o processo de obtenção dos filmes de DDB o gás hidrogênio é utilizado em excesso no reator, por este motivo os eletrodos recém fabricados possuem terminações hidrogênio superficiais. A alteração da superfície leva a consideráveis alterações no comportamento eletroquímico do eletrodo de DDB (Medeiros, R.A. et al., 2008). O processo de pré tratamento do eletrodo de DDB é um tema que culminou com o desenvolvimento de muitos trabalhos, isto porque os resultados obtidos para cada tratamento são definitivos para o sucesso de uma determinação analítica (Salazar-Banda et al., 2006). De uma maneira geral, as

propriedades eletroquímicas dos eletrodos de DDB são bastante sensíveis à terminação superficial. A superfície dos eletrodos de DDB podem ser terminadas em hidrogênio e oxigênio, as terminações hidrogênio são obtidas quando o eletrodo é tratado catodicamente, ou quando é recém preparado, já as terminações oxigênio são atingidas quando o eletrodo é exposto a um plasma de oxigênio ou após um tratamento anódico. Eletrodos pré tratados catodicamente podem sofrer alterações nas suas terminações com inclusão de terminações oxigênio através do ar atmosférico, conforme reportado por Salazar-Banda et al. (2006), entretanto um novo pré tratamento catódico reestabelece as terminações hidrogênio.

Os procedimentos eletroquímicos de ativação ou pré tratamento, são feitos sob condições controladas de potencial ou corrente, tanto para região anódica quanto para a catódica. Comumente são aplicadas condições drásticas, onde são aplicados potenciais da ordem de -3,0 V ou densidades de corrente da ordem de 1 A cm⁻².

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O principal objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de uma célula eletroquímica e o desenvolvimento de uma metodologia analítica para a determinação de peróxido de hidrogênio em amostras mel e gel para clareamento dentário usando a análise por injeção em fluxo e a detecção amperométrica com o eletrodo de DDB.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Construção de duas células eletroquímicas, uma convencional e outra miniaturizada, para adaptação do eletrodo DDB

Aplicação das células desenvolvidas para análises em regime estacionário e no sistema de análise por injeção em fluxo.

Comparação entre os resultados amperométricos obtidos com o eletrodo de DDB e os determinados espectrofotometricamente.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. MATERIAIS E REAGENTES

Todas as soluções foram preparadas com água ultra pura (Milli-Q), com resistividade igual a 18 MΩ.cm, sendo esta utilizada para a limpeza de toda vidraria empregada. Fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄) e fosfato de potássio dibásico (K₂HPO₄) (Vetec) foram utilizados para o preparo das soluções tampão. O ajuste de pH, quando necessário foi feito com solução alcalina preparada a partir de KOH (Vetec). As soluções de H₂O₂ foram preparadas a partir da diluição apropriada da solução de H₂O₂ à 30 % m/m (Vetec), sendo preparadas imediatamente antes das análises. Uma solução saturada de KCl (Vetec) foi utilizada para a confecção do eletrodo de referência.

4-aminoantipirina (Sigma-Aldrich – St. Louis, MO, USA), fenol (Vetec) e peroxidase EC 1.11.1.7 - Horseradish 115 U mg⁻¹ (Seppim, França) foram utilizados para as determinações espectrofotométricas à 510 nm.

Para a confecção das células eletroquímicas foram utilizados tarugos de Acrílico® (Polimetil-metacrilato – PMMA), Teflon® (Politetrafluoretileno – PTFE) e Nylon® (Poliamida) adquiridos no comércio local.

3.2. INSTRUMENTAÇÃO

Para a realização de todas as medidas eletroquímicas foi utilizado um potenciostato µAutolab Type III (EcoChemie, Utrecht, Holanda) ligado a um computador. A aquisição e tratamento dos dados foram realizados pelos softwares GPES 4.9 e NOVA 1.8. As medidas espectrofotométricas foram obtidas utilizando um espectrofotômetro Analyser 850M.

O sistema de análise por injeção em fluxo consiste de uma válvula de acrílico, uma bomba peristáltica (ISMATEC, Alemanha), e uma célula eletroquímica. Os detalhes sobre a montagem do sistema serão tratados no item 3.4.

As medidas de pH foram feitas utilizando um potenciômetro (Digimed DM 20, Brasil) com um eletrodo combinado de vidro.

Todas as medidas foram realizadas em ambiente com a temperatura controlada em 19 °C.

3.3. ELETRODOS E CÉLULA ELETROQUÍMICA

Foram realizadas três tentativas de construção dos eletrodos e estabelecimento de contato elétrico entre o potenciostato e o suporte de silício do filme de DDB. A Figura 4 mostra a placa de silício com filme de DDB como foi recebida (A) e o primeiro eletrodo construído no laboratório (B). Nesta primeira construção, o acrílico foi usinado em torno convencional, no formato cilíndrico com um furo central, por onde foi inserido um fio de cobre, o contato elétrico entre a placa e o fio de cobre foi estabelecido com cola de prata. Este primeiro eletrodo apresentou-se útil, entretanto as análises foram pouco reprodutíveis e a manipulação do eletrodo necessitava um cuidado especial para não danificar a superfície do filme de DDB, além disto, ocorreu um problema de isolamento da área exposta do eletrodo, tornando o processo demorado pela necessidade de um tempo de 24 h para secagem da borracha de silicone.

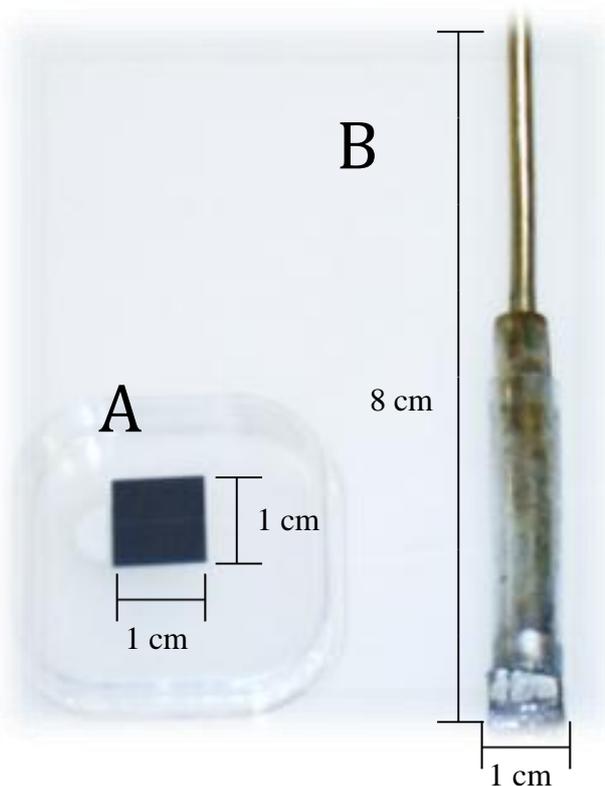


Figura 4 - Imagem da placa de silício com o filme de DDB como foi recebida (A) e do primeiro eletrodo, construído em acrílico (B).

O segundo tipo de eletrodo foi construído em placa de circuito impresso (Figura 5). As placas de silício contendo o filme de DDB foram coladas no circuito impresso com cola de prata para o estabelecimento de contato elétrico. Foi possível trabalhar por alguns dias com o

eletrodo, entretanto também era necessário isolar a área exposta com borracha de silicone para a realização das análises e esta operação era pouco reprodutível, com vida útil baixa.



Figura 5 - Segundo eletrodo construído e testado, com a utilização de placa de circuito impresso e cola de prata para estabelecer o contato elétrico entre a placa com o filme de DDB e o cobre utilizado nas trilhas do circuito.

O terceiro sistema foi construído diretamente na célula eletroquímica com o eletrodo ligado ao corpo da célula (Figura 6), esta foi primeiramente desenvolvida em Nylon® e em seguida foi construída em PTFE com capacidade para 15 mL e adaptada com uma saída lateral para as análises em fluxo. A escolha inicial do Nylon® foi feita para a é mais barato. A Figura 6 ainda mostra a representação esquemática da célula eletroquímica desenvolvida, o compartimento indicado por (B) é destinado à barra magnética, para que esta não toque a superfície do eletrodo de DDB.

Esta última tentativa mostrou-se bastante robusta, com grande facilidade de montagem, manipulação e respostas bastante reprodutíveis, uma vez que a área exposta do eletrodo é determinada por um anel de borracha do tipo *o-ring* (C), de tamanho fixo e o eletrodo (D) fica em contato direto com uma placa de cobre (E), fixada ao corpo da célula (A) por meio de parafusos (F), ou seja, sem o uso de cola de prata para o estabelecimento do contato elétrico, o que reduziu custos e melhorou a resposta do sistema. Esta célula foi utilizada nas determinações de peróxido em gel de clareamento.

A célula descrita foi utilizada inclusive na determinação de metais traço em mel, através da voltametria de pulso diferencial com redissolução anódica, e reportada pelo grupo. (HONÓRIO, G. G. et al.,2014)

Os componentes para a montagem da célula podem ser visualizados com maior detalhe na Figura 7, onde é mostrada a célula desenvolvida em PTFE, com seus componentes separados.

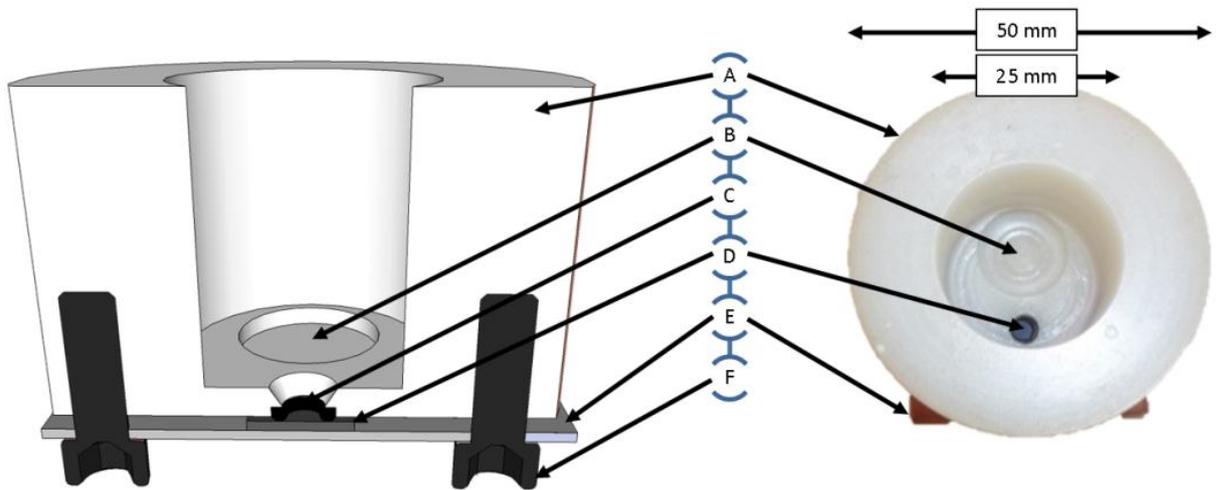


Figura 6 - Representação esquemática e vista superior da célula eletroquímica utilizada no trabalho de determinação de peróxido em gel de clareamento. Corpo da célula (A), cavidade para a barra magnética de agitação (B), O-ring de borracha para vedação e isolamento da área geométrica exposta do eletrodo (C), eletrodo de DDB (D), placa de cobre (E), parafusos para fixação (F). (HONÓRIO, G. G. et al.,2014)

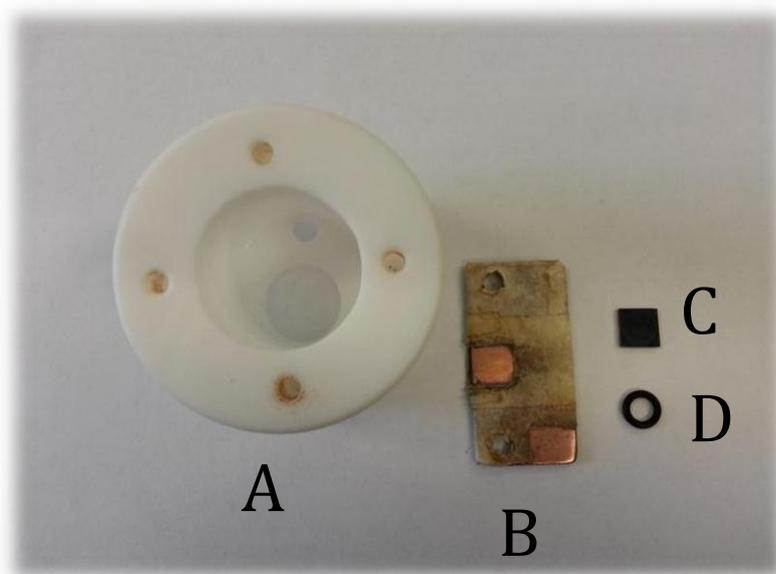


Figura 7 - Célula desmontada e seus componentes: Corpo da célula em PTFE (A), placa de cobre (B), placa de silício com o filme de DDB (C), e O-ring de vedação (D).

A necessidade inicial de se trabalhar com o reator enzimático na segunda fase do trabalho levou à construção de um novo tipo de célula, a mesma foi construída tanto em acrílico quanto em PTFE, em formato miniaturizado, com volume menor que 300 μL (Figura 8) para adaptação do reator enzimático desenvolvido em conjunto com a célula (Figura 9).

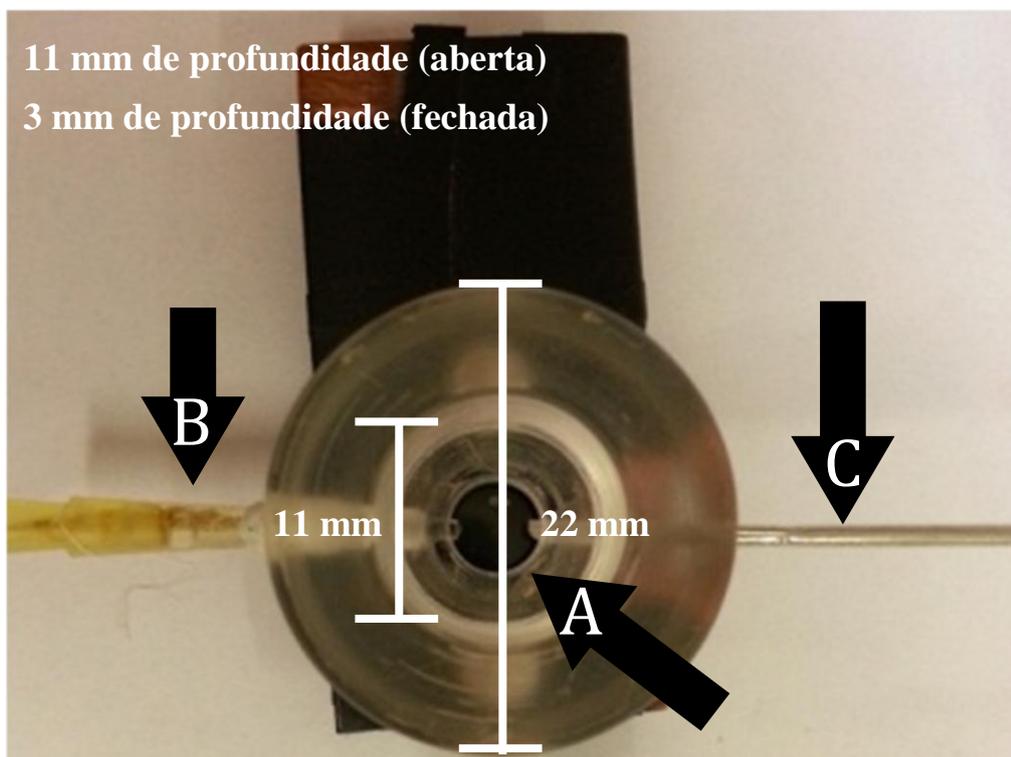


Figura 8 - Vista superior em detalhe da célula miniaturizada construída em acrílico sem o reator acoplado, mostrando a área exposta do eletrodo de DDB (A) e os eletrodos de referência (B) e auxiliar (C).

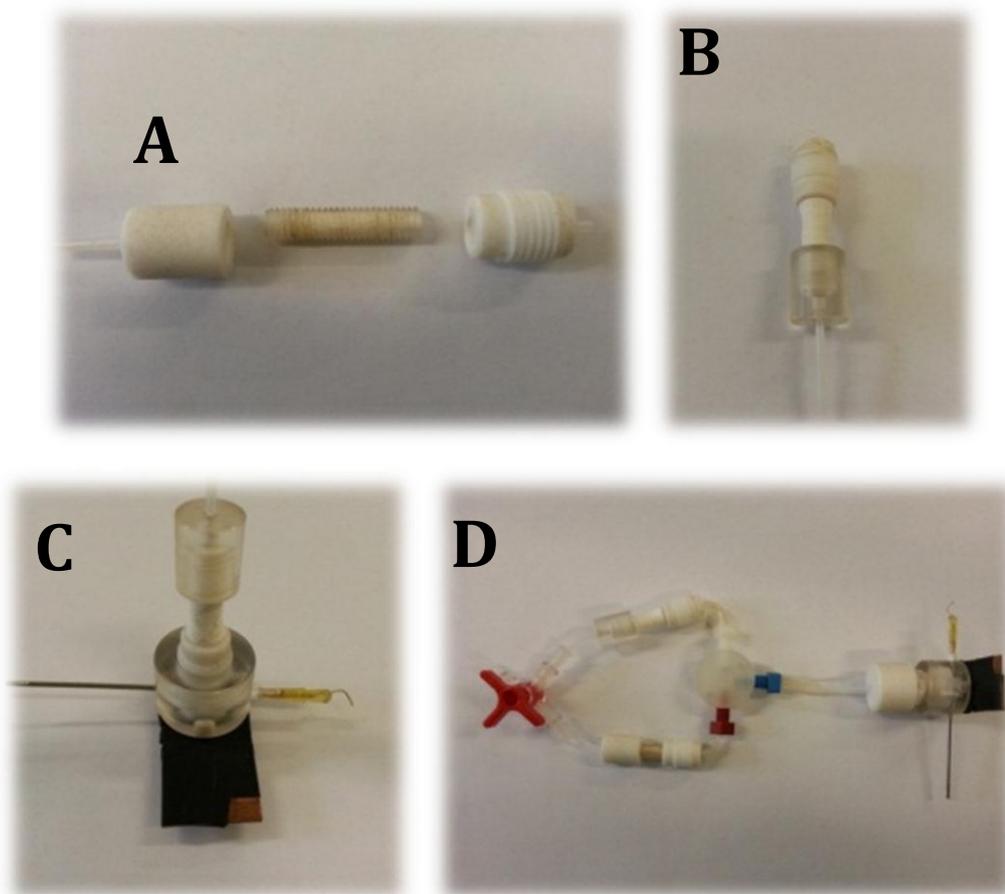


Figura 9 - Peças do reator tubular contendo a resina com enzima imobilizada (A), reator montado (B), reator acoplado à célula (C), montagem experimental com dois reatores (D)

Esta célula foi utilizada para a determinação de peróxido em mel.

A nova célula permite também a utilização conjunta com o cromatógrafo líquido, uma vez que se adapta facilmente à saída da coluna cromatográfica. Seu uso está sendo explorado a grupo de pesquisa, tendo sido inclusive testada para detecção de compostos fenólicos (Figura 10).



Figura 10 - Microcélula eletroquímica desenvolvida, aplicada em conjunto com o cromatógrafo líquido, adaptada à saída do detector espectrofotométrico do aparelho.

O eletrodo de referência miniaturizado de $\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{sat})}$ foi construído no próprio laboratório, através da inserção de um fio de prata no interior de uma ponta de micropipeta de $200\ \mu\text{L}$, preenchida com uma solução saturada de KCl (Pedrotti, Angnes e Gutz, 1996). Um eletrodo de platina foi utilizado como eletrodo auxiliar nas medidas de voltametria cíclica e um eletrodo constituído por uma seringa de injeção de aço foi utilizado como eletrodo auxiliar nas medidas em fluxo.

3.4. SISTEMA DE ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO

A técnica de análise por injeção em fluxo inicialmente desenvolvida por Ruzicka e Hansen (Ruzicka e Hansen, 1975) é bastante popular em química analítica e é utilizada com diversos sistemas de detecção, especialmente em eletroquímica. (Bakircioglu, D.; Topraksever, N.; Kurtulus, Y. B., 2014, Khataee, A. R. et al., 2014, Ye, J. et al., 2014, Thangaraj, R. et al., 2014)

O sistema de análise consiste, em sua versão mais simplista de um sistema para propulsão de um fluido carreador, uma válvula para a introdução da amostra e um sistema de detecção. Para a propulsão do eletrólito podem ser utilizadas bombas peristálticas, bombas do tipo seringa ou ainda soluções de baixo custo como a gravidade ou bombas de aquário. (Prados-Rosales, Luque-García e Luque De Castro, 2002; De Abreu Franchini et al., 2008; Zhou et al., 2013) Para a injeção do fluido carreador, neste caso um eletrólito suporte, são utilizadas principalmente válvulas rotatórias ou do tipo barra deslizante desenvolvido por pesquisadores do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP) (Bergamin F, Reis e Zagatto, 1978). Após a injeção da amostra no fluxo carreador ocorre uma dispersão intrínseca do analito devido à difusão do mesmo pela existência de um gradiente de concentração ou pelo sistema de convecção, já que o fluxo laminar faz com que o fluido tenha maior velocidade no centro do tubo e menor próximo às paredes. O sistema de detecção pode ser espectrofotométrico (Fernandes, Neto e Kubota, 1998; Matos et al., 2006b), fluorimétrico (Linares, De Castro e Valcarcel, 1986), por espectrometria de absorção atômica (Attiyat e Christian, 1984) e especialmente eletroquímico. (Cox e Lewinski, 1993; Mizutani e Yabuki, 1994; Karyakin, Karyakina e Gorton, 1996; Fernández-Abedul e Costa-Garcia, 1997; Granger, Michael C. et al., 1999; Westbroek, Temmerman e Kiekens, 1999; Wang et al., 2003)

3.4.1. Gel de clareamento

Nesta etapa do trabalho foi utilizado um sistema monocal (Figura 11) e as soluções tampão foram propelidas utilizando uma bomba peristáltica. Tubos de PTFE de 0,5 mm de diâmetro interno foram usados para montar o sistema. A célula eletroquímica de PTFE (Figura 6) foi utilizada para a realização das análises. Um potenciostato operando no sistema amperométrico foi utilizado para medidas eletroquímicas.

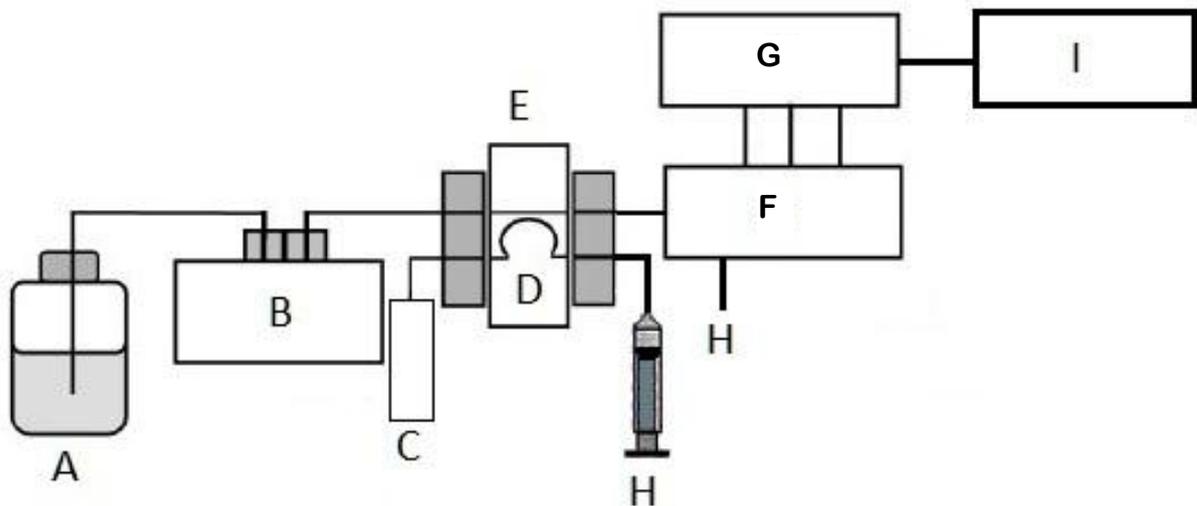


Figura 11 - Diagrama da montagem do sistema de análise em fluxo com detecção amperométrica para a análise de gel de clareamento dentário. Reservatório para o eletrólito 500 mL (A), bomba peristáltica (B), tubo contendo a amostra 10 mL (C), alça de amostragem 175 μ L (D), válvula de injeção manual (E), célula eletroquímica (F), potenciostato (G), descarte de solução (H), computador (I).

3.4.2. Mel

A primeira tentativa de determinação do peróxido de hidrogênio nas amostras de mel envolveu o uso de um sistema em fluxo composto de dois canais (Figura 12). As soluções tampão foram propelidas por pressurização, utilizando uma bomba peristáltica. Tubos de teflon de 0,5 mm de diâmetro interno foram usados para montar o sistema. Um potenciostato operando no sistema amperométrico foi utilizado para medidas no sistema FIA. O sistema era constituído de uma bomba peristáltica, uma válvula de injeção, uma torneira para direcionamento do fluxo, um reator tubular (3 mm de diâmetro e 2,2 cm de comprimento) com a enzima imobilizada na resina de troca iônica (Figura 9 (A)), um outro reator contendo apenas a resina com gluteraldeído e uma microcélula eletroquímica (Figura 8) para detecção e um computador.

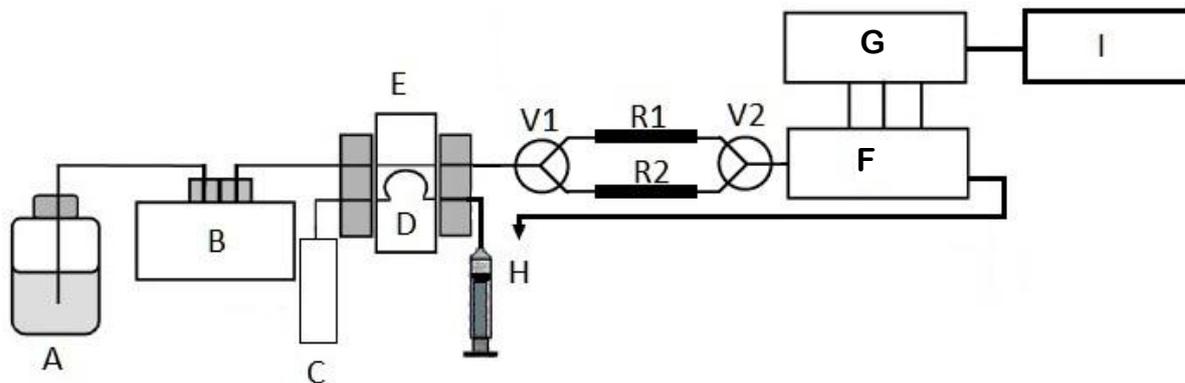


Figura 12 - Diagrama esquemático do sistema FIA empregado para a análise de peróxido de hidrogênio em mel. Reservatório para o eletrólito 500 mL (A), bomba peristáltica (B), tubo contendo a amostra 10 mL (C), alça de amostragem 175 μ L(D), válvula de injeção manual (E), célula eletroquímica (F), potenciostato (G), descarte de solução (H), computador (I), válvulas de três vias para direcionar o fluxo (V1 e V2), reatores enzimáticos com e sem a enzima imobilizada, respectivamente (R1 e R2).

Neste primeiro arranjo experimental houve perda de analito devido à vazamentos no sistema, uma vez que o reator proporciona um aumento na pressão do sistema, o uso de válvulas manuais dificulta a obtenção de sinais livres de ruídos uma vez que ao movimentar a válvula ocorre uma perturbação, tal fato poderia ser corrigido usando válvulas automáticas temporizáveis, em uma outra oportunidade.

Para contornar os efeitos das perturbações e diminuir a incidência de vazamentos, foi utilizado um segundo arranjo, que consistiu de um sistema com apenas um canal e o reator era trocado durante a análise, entretanto os resultados obtidos com o reator não se apresentaram satisfatórios como já foi demonstrado em trabalhos anteriores (Franchini, R. A. D. et al.,2007; Matos, R. C.; Pedrotti, J. J.; Angnes, L., 2001; de Abreu Franchini, R. A. et al.,2008). Foram feitos alguns testes alterando-se o comprimento do reator, e também foi avaliada a diminuição da vazão, apesar de terem sido obtidos resultados melhores a conversão chegou até próximo de 80 %, além disso houve perda de sensibilidade no método, uma vez que o sinal apresentava grande dispersão. Após diversas modificações do método de imobilização não foi atingida uma condição ideal para utilização dos reatores com a enzima. Portanto, uma alternativa encontrada foi utilização da enzima diretamente na amostra, para que a reação com o peróxido fosse catalisada, desta forma bons resultados foram obtidos, com o consumo total do peróxido em um tempo curto.

3.5. AMOSTRAS

3.5.1. Gel de clareamento

Foram selecionadas oito amostras de geis de clareamento dental, sendo 4 disponíveis na forma industrializada e outras 4 adquiridas em farmácias magistrais diferentes. A Tanto as amostras de geis comerciais (4 amostras) como as disponíveis em farmácias de manipulação (4 amostras) foram utilizadas. Todas as amostras foram acondicionadas em geladeira a uma temperatura de 5 °C e utilizadas no momento da análise.

3.5.2. Mel

Foram adquiridas junto ao comércio local, 7 amostras de mel. A origem geográfica/botânica das mesmas estão relacionadas na tabela 2.

Tabela 2 - Características das amostras de mel.

Origem Geográfica	Origem Botânica
Aquiraz – CE	Silvestre
Paulo Afonso – BA	Silvestre
Caxambu – MG	Silvestre
Poços de Caldas – MG	Eucalipto
Santa Bárbara - MG	Silvestre
Itapira - MG	Laranjeira
Barretos – SP	Silvestre

3.6. METODOLOGIA ANALÍTICA

3.6.1. Determinação diferencial de peróxido

Para a obtenção da concentração de peróxido nas amostras de mel, uma determinação diferencial foi utilizada. Tal determinação foi utilizada porque permite a identificação do sinal dos interferentes presentes na amostra, e portanto a distinção do mesmo daquele referente ao H₂O₂ presente. A determinação diferencial requer no mínimo duas medidas: Em um primeiro momento a amostra é injetada no sistema em fluxo sendo obtido um

pico de corrente referente ao H₂O₂ presente na amostra somado ao sinal dos interferentes presentes (i_{a+i}), em seguida a amostra é adicionada de padrão em um nível e injetada novamente, o sinal obtido se refere a corrente de oxidação do H₂O₂ presente na amostra somado ao sinal do H₂O₂ presente no padrão adicionado e também ao sinal dos interferentes (i_{a+i+p1}). O mesmo ocorre para mais 4 adições de solução padrão de H₂O₂. A última medida é feita com a adição da enzima peroxidase na amostra de mel. A peroxidase presente catalisa a reação para a decomposição do H₂O₂, deixando em solução portanto apenas os interferentes (i_i). Matematicamente temos:

$$i_a = i_{a+i} - i_i$$

$$i_{a+p1} = i_{a+i+p1} - i_i$$

A curva de adição de padrão é construída através do mesmo processo, sendo descontado o sinal de corrente dos interferentes para cada ponto da curva (i_{a+p1} a i_{a+p5}). As análises foram realizadas utilizando a microcélula eletroquímica, conforme ilustrado na figura 8.

3.6.2. Condições experimentais testadas

3.6.2.1. Ativação do eletrodo de DDB

Para a realização deste trabalho foi utilizada uma ativação catódica em meio de H₂SO₄ à 3 mol L⁻¹ por um curto período de tempo, apenas 340 segundos sob um potencial de -2,9 V, uma vez por dia, antes do início dos experimentos. Após o término dos experimentos a célula era preenchida com ácido sulfúrico 0,5 mol L⁻¹, para conservar o eletrodo.

Para a limpeza do eletrodo, que era realizada uma vez a cada semana ou após uma perda de sensibilidade. Utilizou-se uma ativação anódica longa, onde foi aplicada uma corrente de 0,1 A por 2000 segundos, em seguida o eletrodo era tratado com a ativação catódica descrita anteriormente.

3.6.2.2. Estudo voltamétrico de H₂O₂ em diferentes eletrodos

As análises foram realizadas por voltametria cíclica com potencial variando de 0,0 a 1,0 V com velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹ utilizando soluções padrão de H₂O₂ 1 e 2

mmol L⁻¹ em tampão fosfato pH 7,00. Foram utilizados como eletrodos de trabalho: ouro, platina, carbono vítreo (CV) e DDB.

3.6.2.3. *Estudo amperométrico do H₂O₂*

O estudo amperométrico foi conduzido em tampão fosfato pH 7,00 para verificar a linearidade da resposta na determinação de peróxido em concentrações relativamente elevadas (0,8 a 1,6 mmol L⁻¹) e para definir o seu comportamento eletroquímico no eletrodo de DDB. O potencial aplicado foi de 0,6 V, utilizado em todos os estudos de otimização na determinação amperométrica de H₂O₂, tal fato se justifica através do valor máximo de corrente no voltamograma cíclico, indicado por sua primeira derivada.

3.6.2.4. *Estudo do pH do tampão fosfato*

A influência do pH foi avaliada através da célula apresentada na Figura 6. As curvas analíticas para soluções contendo tampão fosfato em diferentes valores de pH (6,4; 6,6; 6,8; 7,0; 7,2 e 7,4) utilizando o eletrodo de DDB como eletrodo de trabalho vs Ag/AgCl_(sat) foram feitas a partir de sucessivas adições de H₂O₂ (1,0; 2,1; 3,1; 4,2 e 6,2 mmol L⁻¹) na célula eletroquímica.

3.6.2.5. *Estudo da vazão do sistema FIA*

Tal estudo foi realizado pelo acompanhamento dos sinais obtidos pelas injeções sucessivas de 150 µL de peróxido 16 µmol L⁻¹ com vazões do eletrólito suporte (tampão fosfato) variando de 1,35 a 2,80 mL min⁻¹.

3.6.2.6. *Estudo do percurso analítico*

Para avaliar o efeito do comprimento do percurso analítico foi feito um estudo com as seguintes condições experimentais: vazão do eletrólito suporte (2,80 mL min⁻¹), volume da alça de amostragem (150 µL), concentração do padrão (16 µmol L⁻¹), tendo sido variado apenas o comprimento do percurso analítico entre 20,5 e 38,5 cm.

3.6.2.7. *Estudo do volume de injeção*

A avaliação do volume da alça de amostragem foi realizada pelo acompanhamento dos sinais obtidos para injeções sucessivas de peróxido $16 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato, com vazão de $2,80 \text{ mL min}^{-1}$, percurso analítico de 25 cm e alças de amostragem variando de $50 \mu\text{L}$ a $250 \mu\text{L}$ (8 a 34,5 cm).

3.6.2.8. *Influência da ureia na determinação de H_2O_2 em gel de clareamento*

O estudo voltamétrico da ureia foi conduzido na célula desenvolvida em PTFE, contendo o eletrólito suporte tampão fosfato pH 7,00 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), na faixa de 0,0 a 1,0 V, com uma velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . Sucessivas adições de ureia (concentrações de 1, 2 e 3 mmol L^{-1}) foram utilizadas para verificar possíveis interferências.

3.6.2.9. *Quantificação de H_2O_2 nas amostras de gel de clareamento*

Para as análises, aproximadamente 110 mg dos geis foram pesados e diluídos em balão volumétrico de 10,00 mL. Em seguida, uma alíquota de $20 \mu\text{L}$ de amostra foi diluída para 10,00 mL e injetada no sistema FIA.

3.6.2.10. *Quantificação de H_2O_2 nas amostras de mel*

Para as análises, aproximadamente 5 g de mel foram pesados e diluídos em balão volumétrico de 50,00 mL. Em seguida uma alíquota de 2,00 mL era diluída para 10,00 mL e injetada no sistema FIA. Uma nova alíquota de 2,00 mL era diluída e acrescentada de padrão de peróxido de hidrogênio e então diluída para 10,00 mL, o mesmo foi feito com mais 4 níveis de padrão. Para a amostra onde foi adicionada a enzima peroxidase, uma alíquota de 2,00 mL foi tomada e a ela foram adicionadas 10 U enzimáticas, em seguida a mesma foi diluída para 10,00 mL e injetada.

3.6.2.11. *Condições analíticas para o método espectrofotométrico*

O procedimento para a determinação espectrofotométrica consiste na adição de fenol, 4-aminoantipirina e peroxidase em um tubo onde então é adicionado a amostra contendo peróxido de hidrogênio, a curva foi construída adicionando-se padrões de peróxido na faixa de 9 a $95 \mu\text{mol L}^{-1}$. As concentrações de fenol, 4-aminoantipirina e peroxidase utilizadas foram $1,27 \text{ mmol L}^{-1}$, $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ e $1,4 \text{ U.mL}^{-1}$ respectivamente.

3.6.2.12. *Exatidão do método*

Para os estudos de exatidão utilizando testes de adição e recuperação do analito, foram preparadas soluções fortificadas em dois níveis, as fortificações foram realizadas após a pesagem do gel. Em seguida, a solução era diluída para 10 mL, então uma alíquota de 10 μ L foi diluída para 10,00 mL e injetada no sistema FIA, as concentrações finais de peróxido nas soluções fortificadas nos níveis baixo e alto foram 48 e 68 μ mol L⁻¹ respectivamente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. ESTUDO VOLTAMÉTRICO DE H_2O_2 EM DIFERENTES ELETRODOS

Afim de se avaliar o comportamento eletroquímico do peróxido nos diferentes eletrodos de trabalho disponíveis no laboratório, foram realizados experimentos de voltametria cíclica utilizando concentrações de 1 e 2 mmol L^{-1} para os seguintes eletrodos de trabalho: diamante dopado com boro, carbono vítreo, ouro e platina. As análises foram realizadas conforme as condições descritas no item 3.6.2.1. Os voltamogramas individuais e o voltamograma para densidade de corrente estão representados nas figuras 13 e 14 respectivamente.

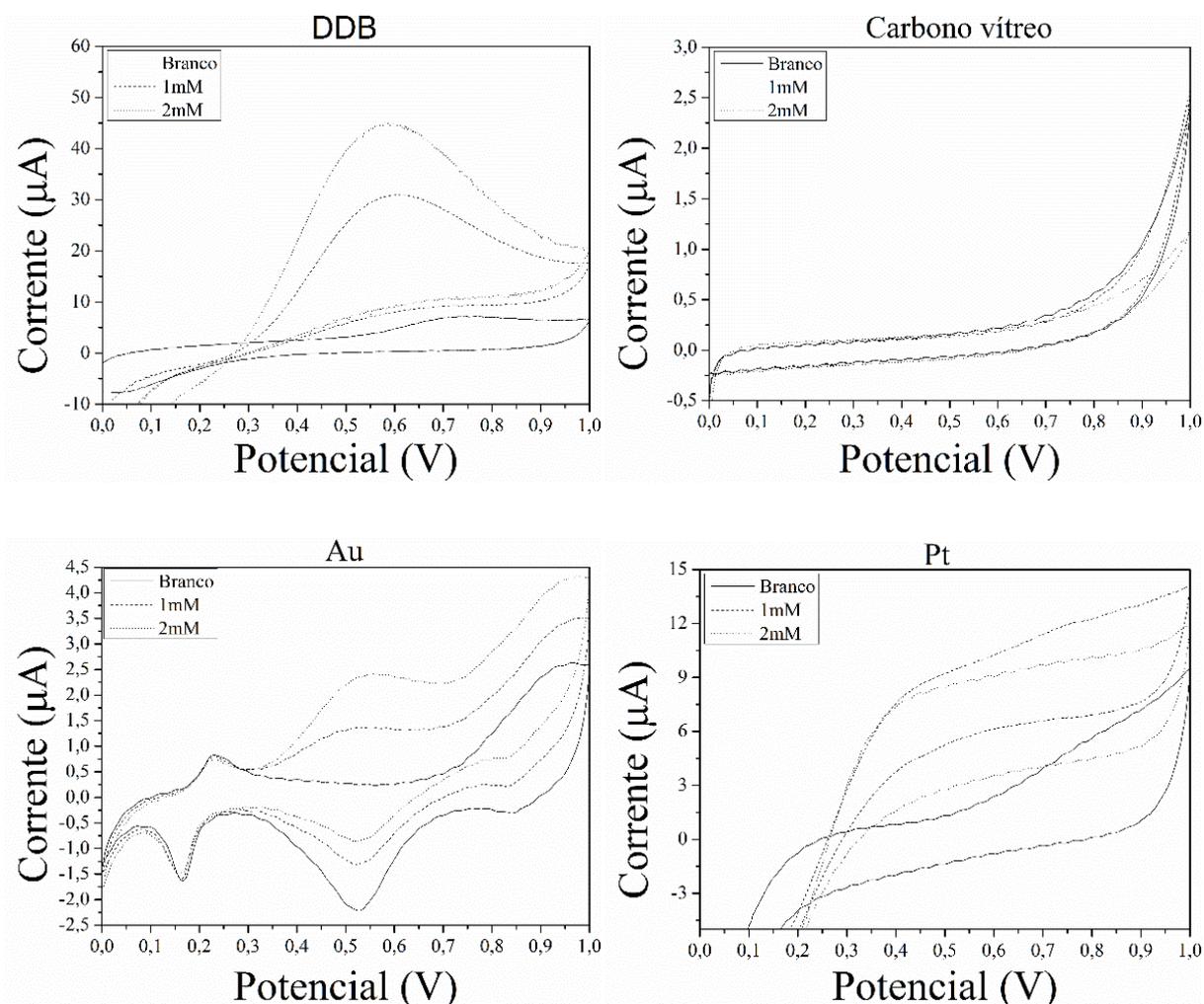


Figura 13 - Voltamogramas cíclicos obtidos para soluções contendo tampão fosfato pH 7,00 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e adições de 1 e 2 mmol L^{-1} de H_2O_2 nos eletrodos de DDB, carbono vítreo, ouro e platina vs $\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{sat})}$.

A análise dos voltamogramas cíclicos (Figura 13) permitiu concluir sobre a potencialidade da aplicação do eletrodo de DDB em relação aos demais na determinação de peróxido. É possível definir um sinal de oxidação de peróxido de hidrogênio num potencial próximo de 0,6 V *vs* Ag/AgCl_{sat} nos eletrodos de DDB, platina e ouro, enquanto que para o eletrodo de CV não foram verificados sinais de corrente consideráveis. Para que fosse avaliada a capacidade do eletrodo de DDB frente aos demais na determinação do peróxido, foi realizada a correção das correntes obtidas nos voltamogramas em termos das diferentes áreas dos eletrodos, uma vez que cada um possui uma área geométrica diferente e isso altera a sensibilidade do eletrodo. A comparação das densidades de corrente de pico anódica dos eletrodos (Figura 14) indica uma sensibilidade superior do DDB frente aos demais, uma vez que a magnitude da corrente de pico para o eletrodo de DDB (0,23 mA cm⁻²) foi maior do que para os demais eletrodos (0,13 mA cm⁻² para Au e 0,11 mA cm⁻² para Pt).

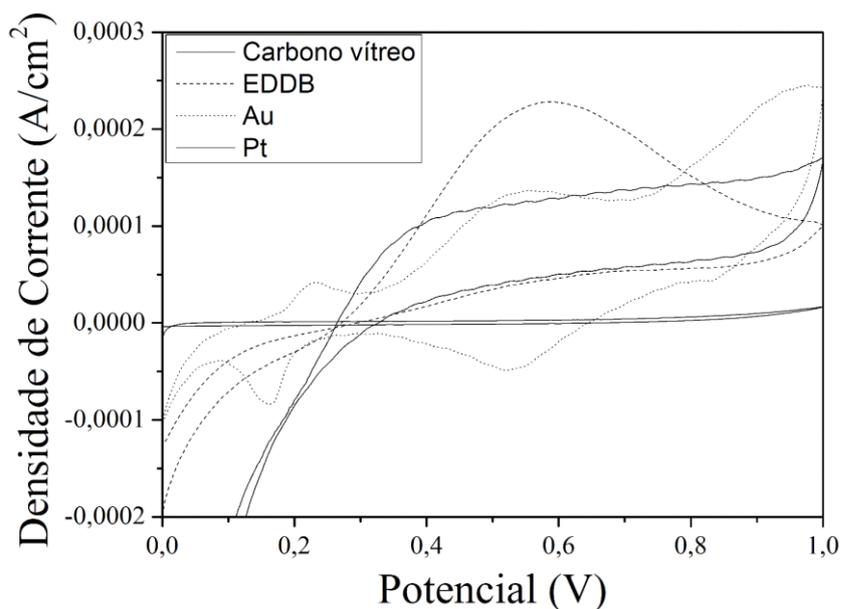


Figura 14 - Densidade de corrente para uma concentração de peróxido de 2 mmol L⁻¹, para comparação entre os diferentes eletrodos disponíveis no laboratório de pesquisa, evidenciando uma melhor resposta para o eletrodo de DDB frente aos demais.

4.2. ESTUDO AMPEROMÉTRICO DO H₂O₂

Com o propósito de se verificar a linearidade da resposta do peróxido em concentrações relativamente elevadas e iniciar o estudo do comportamento amperométrico do peróxido sob o eletrodo de DDB foram realizados experimentos no potencial de 0,6 V, obtido através da primeira derivada do voltamograma cíclico realizando-se adições sucessivas de peróxido na célula eletroquímica desenvolvida. As concentrações de peróxido variaram conforme descrito no item 3.6.2.2. A figura 15 mostra o amperograma obtido e a curva de calibração para o experimento.

A partir do amperograma (Figura 15-A) foi possível observar que a adição de peróxido próximo ao eletrodo causa um súbito aumento de corrente, que tende a se estabilizar devido ao transporte de massa por convecção proveniente da agitação do sistema e consequente homogeneização. Na região onde a corrente cai e permanece estável foi feita a medida do sinal de corrente, e o registro foi feito na curva de calibração em função da concentração de peróxido adicionada. A curva analítica apresentada na Figura 15-B apresentou boa correlação linear ($r = 0,995$) e a seguinte equação: $I(A) = 5,97 \times 10^{-4} x [H_2O_2] (mmol.L^{-1}) + 5,54 \times 10^{-7}$. O resultado demonstra uma resposta rápida (visto o aumento da corrente quando o padrão é adicionado) e uma linearidade considerável para a resposta do eletrodo de DDB.

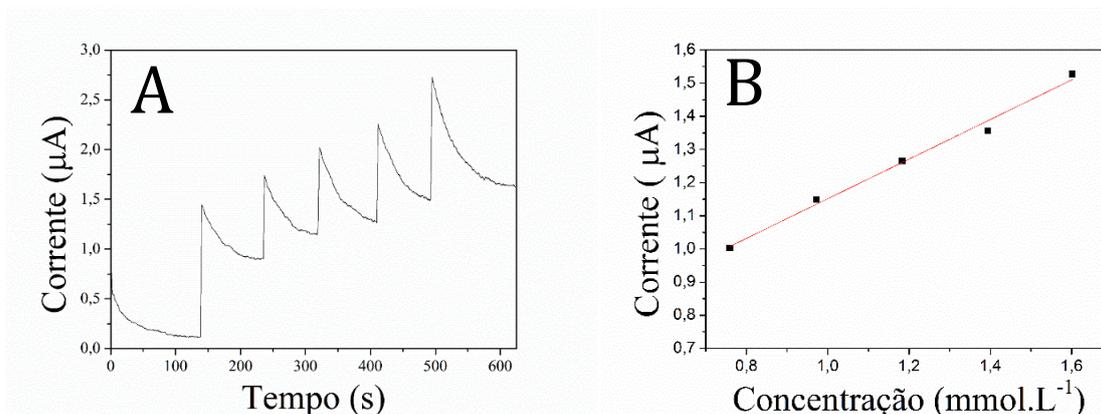


Figura 15 - Amperograma obtido para solução contendo tampão fosfato pH 7 (0,1 mol L⁻¹) e sucessivas adições de H₂O₂ (0,76; 0,97; 1,18; 1,39 e 1,60 mmol L⁻¹) na célula eletroquímica utilizando o eletrodo de DDB como eletrodo de trabalho vs Ag/AgCl_(sat) (A). Curva analítica obtida para o experimento (B).

4.3. ESTUDO DO PH DO TAMPÃO

Com a finalidade de se avaliar a influência do meio foi conduzido um estudo para investigar qual o pH do tampão fosfato a ser utilizado nas determinações de peróxido de hidrogênio com o eletrodo de DDB. As curvas analíticas mostradas na figura 16-B foram obtidas utilizando as condições experimentais descritas no item 3.5.2.4. A análise das curvas permite identificar uma diferente sensibilidade em função do pH, sendo que ela é maior próximo a um pH 7,00 e portanto estabeleceu-se que este seria o valor para as análises envolvendo o gel de clareamento.

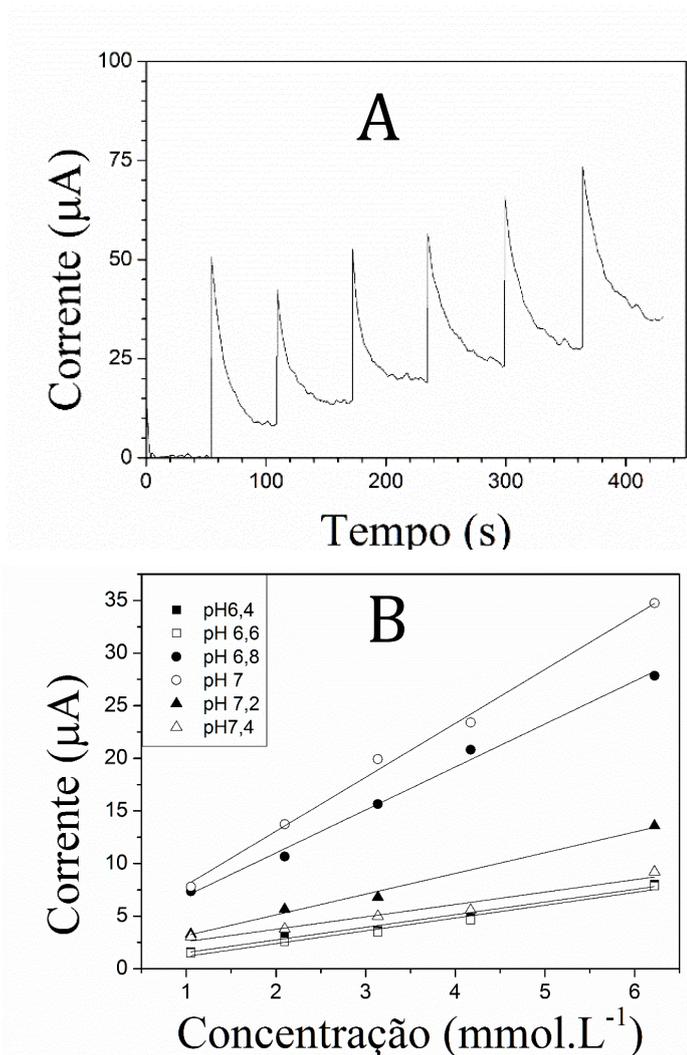


Figura 16 - Amperograma obtido para solução contendo tampão fosfato pH 7,00 (0,1 mol L⁻¹) e sucessivas adições de H₂O₂ (1,0; 2,1; 3,1; 4,2 e 6,2 mmol L⁻¹) na célula eletroquímica (A). Curvas analíticas utilizando o eletrodo de DDB (B).

4.4. ESTUDO DA VAZÃO DO SISTEMA FIA

A vazão é um importante parâmetro em sistemas de análise por injeção em fluxo porque está relacionado à dispersão da amostra e conseqüentemente ao perfil do sinal obtido, e conseqüentemente com a qualidade da análise de uma maneira geral. A figura 17 mostra um amperograma que descreve o efeito da vazão do eletrólito suporte sobre a resposta amperométrica, tal estudo foi realizado pelo acompanhamento dos sinais obtidos pelas injeções sucessivas de 150 μL de peróxido $16 \mu\text{mol L}^{-1}$ com vazões variando de 1,35 a 2,80 mL min^{-1} . É possível perceber um aumento da corrente transiente com o aumento da vazão, entretanto este incremento de corrente passa a ser menos significativo após 2,40 mL min^{-1} . As limitações da bomba permitiram o estudo até a vazão de 2,8 mL min^{-1} .

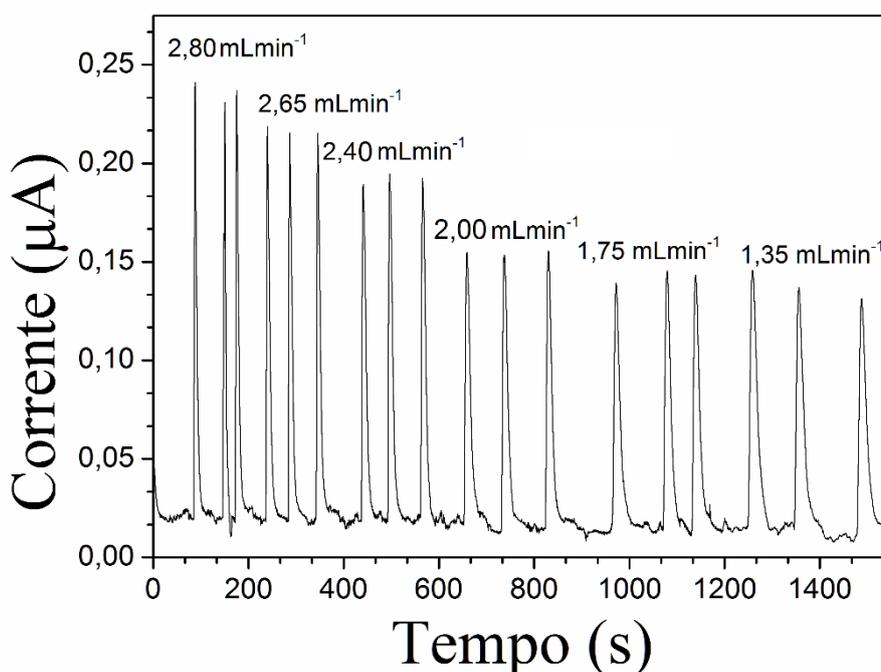


Figura 17 - Amperograma para injeções em triplicata de 150 μL de uma solução padrão de peróxido de hidrogênio $16 \mu\text{mol L}^{-1}$, variando a vazão do eletrólito suporte (tampão fosfato pH 7,00) de 2,80 mL min^{-1} a 1,35 mL min^{-1} .

Outro ponto que merece destaque é a avaliação das medidas de largura à meia altura dos sinais obtidos. A partir da figura 18-A é possível perceber que os picos para vazões baixas são mais largos do que aqueles em vazões elevadas. Isto também pode ser visualizado na figura 18-B onde os sinais de corrente são maiores com o aumento da vazão, e ocorre porque a

dispersão é maior em pequenas vazões do eletrólito. Desta forma estabeleceu-se o valor de vazão máximo estudado ($2,80 \text{ mL min}^{-1}$) para as determinações de peróxido como condição ótima para as análises.

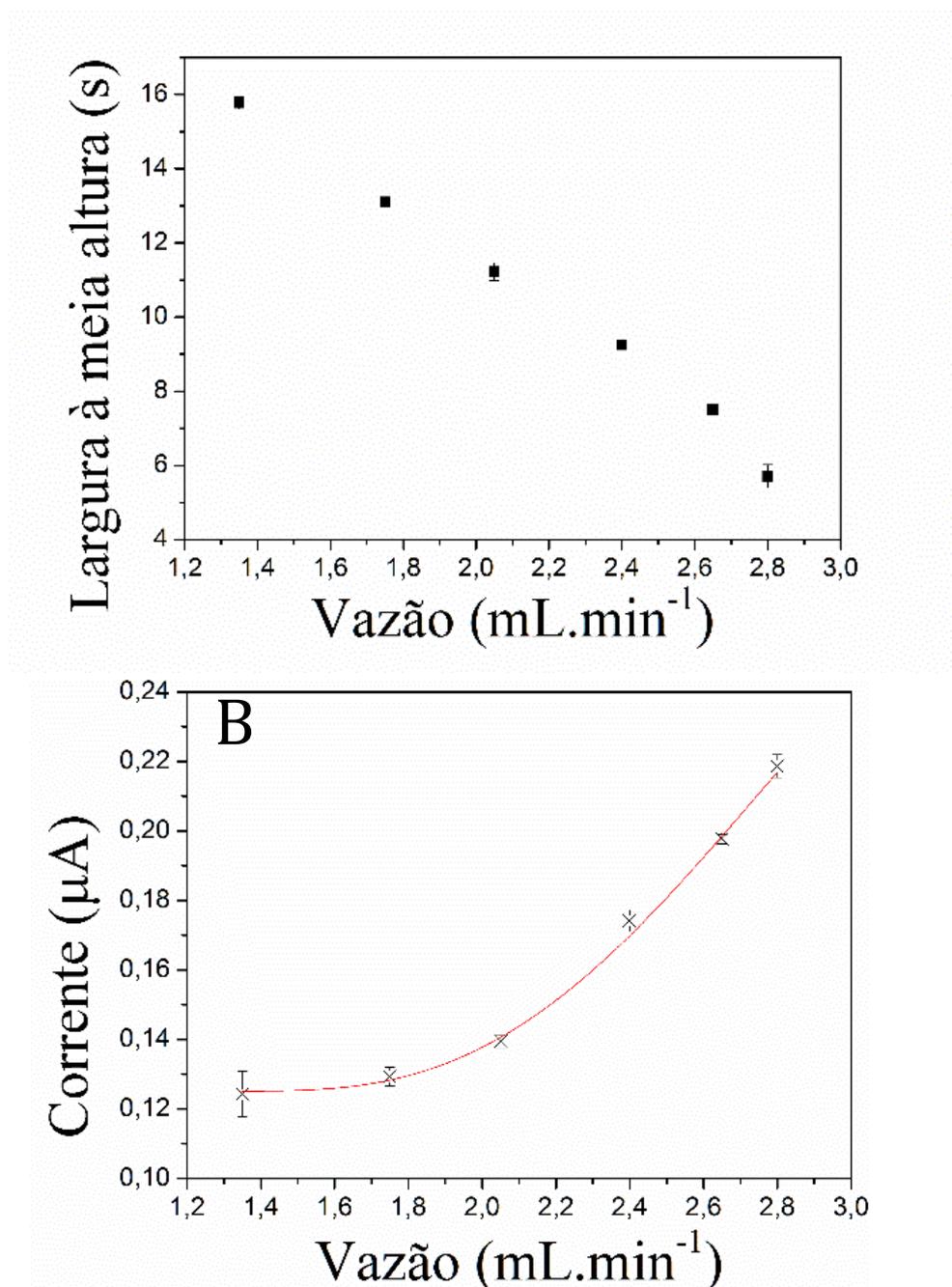


Figura 18 - Gráfico de largura do sinal vs vazão (A) e corrente de pico vs vazão (B) para avaliação do sistema FIA, as condições são as mesmas das descritas na figura 17.

4.5. ESTUDO DO PERCURSO ANALÍTICO

Assim como a vazão, o comprimento do percurso analítico também apresenta grande influência na dispersão de um sistema de análise em fluxo. Para avaliar o efeito do comprimento do percurso analítico foi feito um estudo fixando as seguintes condições experimentais: Vazão do eletrólito suporte ($2,80 \text{ mL min}^{-1}$), volume da alça de amostragem ($150 \text{ }\mu\text{L}$) e concentração do padrão ($16 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$), sendo variado apenas o comprimento do percurso analítico, que compreende a distância da válvula de injeção até a saída do fluxo na superfície do eletrodo.

A figura 19-A abaixo mostra o amperograma obtido variando o comprimento do percurso. É possível perceber que existe uma diluição da amostra durante o percurso para comprimentos maiores, o que reflete num sinal de menor intensidade e mais alargado, o que pode ser visto a partir do gráfico de largura do pico *vs* comprimento do percurso (Figura 19-B). Apesar de a melhor condição ser aquela com menor comprimento, não foi possível trabalhar muito tempo com a mesma por limitações físicas, portanto assumiu-se o comprimento de 25 cm para os experimentos futuros.

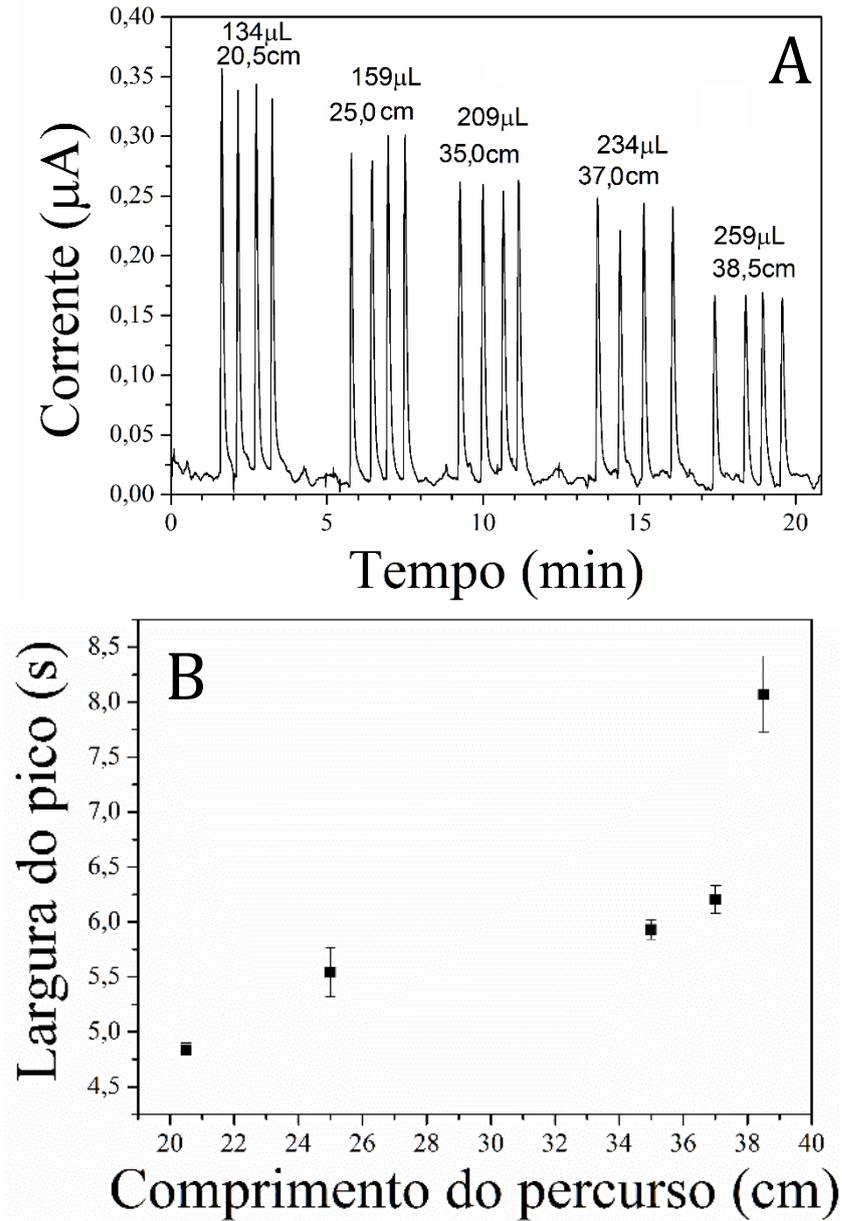


Figura 19 - Amperograma para quatro injeções consecutivas de $150\mu\text{L}$ de uma solução padrão de peróxido de hidrogênio à uma concentração de $16\mu\text{mol L}^{-1}$, em tampão fosfato pH 7,00, variando o percurso analítico de 20,5 a 38,5 cm (A). Gráfico da relação entre o percurso analítico e a largura do sinal para o experimento (B).

4.6. ESTUDO DO VOLUME DE INJEÇÃO

A sensibilidade de um método de análise por injeção em fluxo está intimamente relacionado à quantidade de amostra injetada, também o tempo de residência é afetado quando se altera o volume injetado, podendo diminuir a frequência analítica caso seja muito grande ou aumentar a frequência analítica caso contrário. A dispersão tem um papel importante também neste caso, pequenos volumes de amostra geram zonas de dispersão que podem se estender por toda a zona da amostra e isso tem um grande efeito na diluição e conseqüentemente na resposta do sistema, por isso é importante considerar essa variável em sistemas de análise por injeção em fluxo.

A figura 20-A mostra o amperograma que descreve o efeito do volume da alça de amostragem sobre a resposta amperométrica, tal estudo foi realizado pelo acompanhamento dos sinais obtidos pelas injeções sucessivas de peróxido $16 \mu\text{mol L}^{-1}$ com vazão de $2,80 \text{ mL min}^{-1}$ e alças de amostragem variando de $50 \mu\text{L}$ a $250 \mu\text{L}$ (8,0 a 34,5 cm).

O amperograma mostra um aumento dos sinais transientes até um volume de $175 \mu\text{L}$, em seguida não há um ganho significativo de corrente, havendo apenas uma contribuição para o alargamento do sinal, conforme mostrado no gráfico (Figura 20-B), portanto para as análises que se seguiram foi utilizado o volume de $175 \mu\text{L}$, o equivalente a 28,5 cm de comprimento de alça.

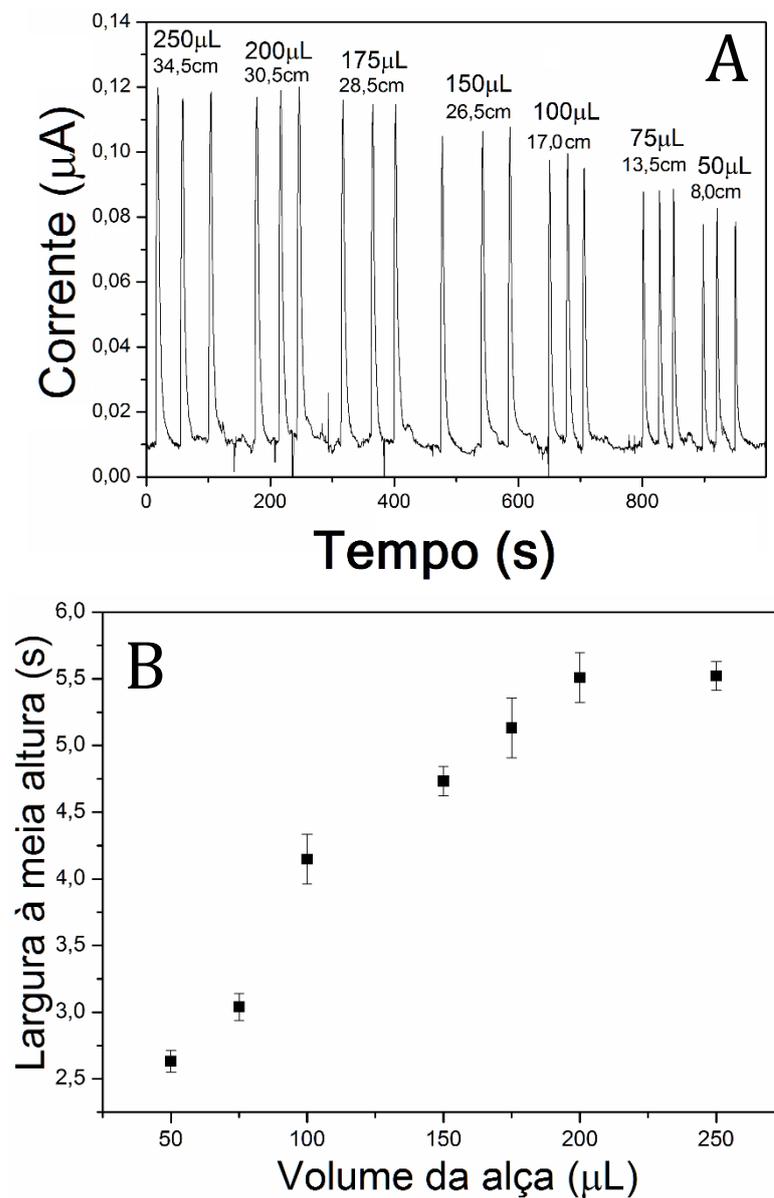


Figura 20 - Amperograma para injeções em triplicata de uma solução padrão de peróxido de hidrogênio à uma concentração de $16 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato pH 7,00 à uma vazão constante de $2,80 \text{ mL min}^{-1}$, variando o volume da alça de amostragem de 50 a 250 μL (A). Efeito do volume da alça de amostragem na largura do sinal obtido (B).

4.8. FAIXA LINEAR DE TRABALHO

A curva analítica foi obtida para avaliar a linearidade do método para baixos níveis de concentração de peróxido de hidrogênio. A figura 21 mostra o amperograma obtido para concentrações de peróxido variando de 6,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ a 800,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, as faixas de concentrações na qual a sensibilidade pode ser considerada constante foram estudadas encontrando-se 2 distintas e subsequentes. É possível observar no detalhe que a primeira varia de 6,3 a 100,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e a segunda varia de 100,0 a 800,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

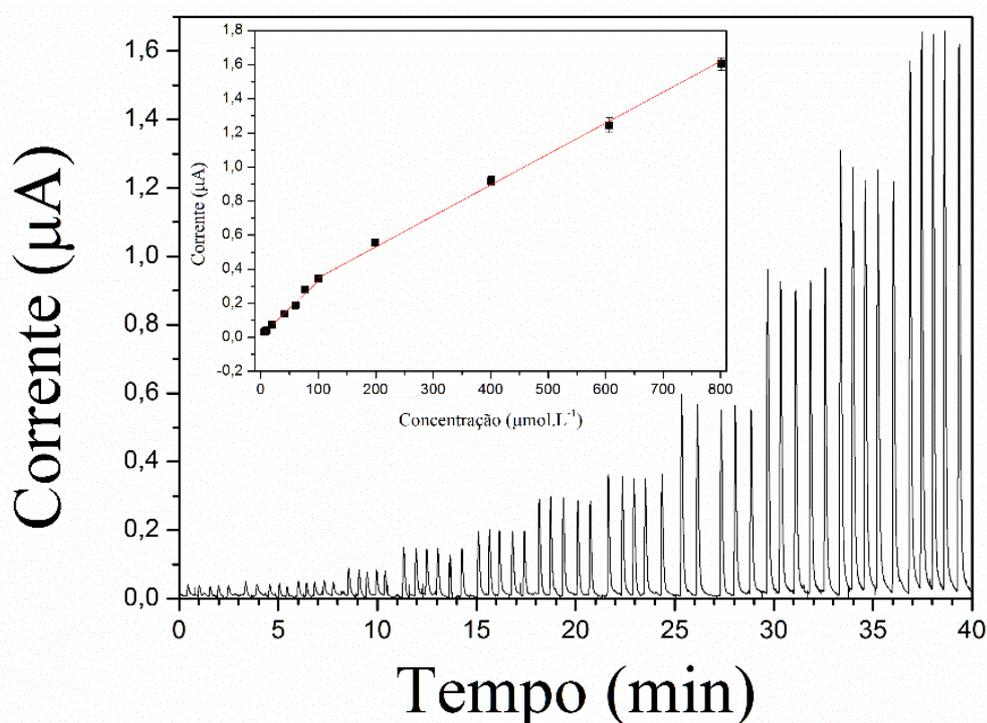


Figura 21 - Amperograma para 5 injeções consecutivas de peróxido de hidrogênio em tampão fosfato pH 7,00 à uma vazão constante de 2,80 mL min^{-1} com volume de injeção de 175 μL e concentração de H_2O_2 de 6,3; 8,2; 10,2; 19,5; 40,9; 60,2; 77,5; 100,0; 198,0; 400,0; 600,0; e 800,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

As equações para as curvas apresentadas são $I(\mu\text{A}) = 3,37 \times 10^{-3} \times [\text{H}_2\text{O}_2] + 5,60 \times 10^{-9}$ com uma correlação linear de 0,995 para a primeira faixa e $I(\mu\text{A}) = 1,77 \times 10^{-3} \times [\text{H}_2\text{O}_2] + 1,90 \times 10^{-7}$ com correlação linear de 0,999 para a segunda.

4.9. REPETITIVIDADE

Com o intuito de avaliar a variabilidade inerente às medidas em um sistema para utilizações consecutivas de uma válvula de injeção com um mesmo padrão, foi realizado o estudo de repetitividade.

Tal estudo foi conduzido através da medida da corrente de 10 injeções consecutivas de padrão e através do cálculo do desvio padrão relativo. O amperograma da figura 22 mostra o comportamento do eletrodo frente às injeções de peróxido de hidrogênio $19,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ com as condições atingidas, o desvio padrão relativo (DPR) existente nas medidas foi de 1,1 %, o que indica uma boa repetitividade das injeções para o nível de concentração considerado.

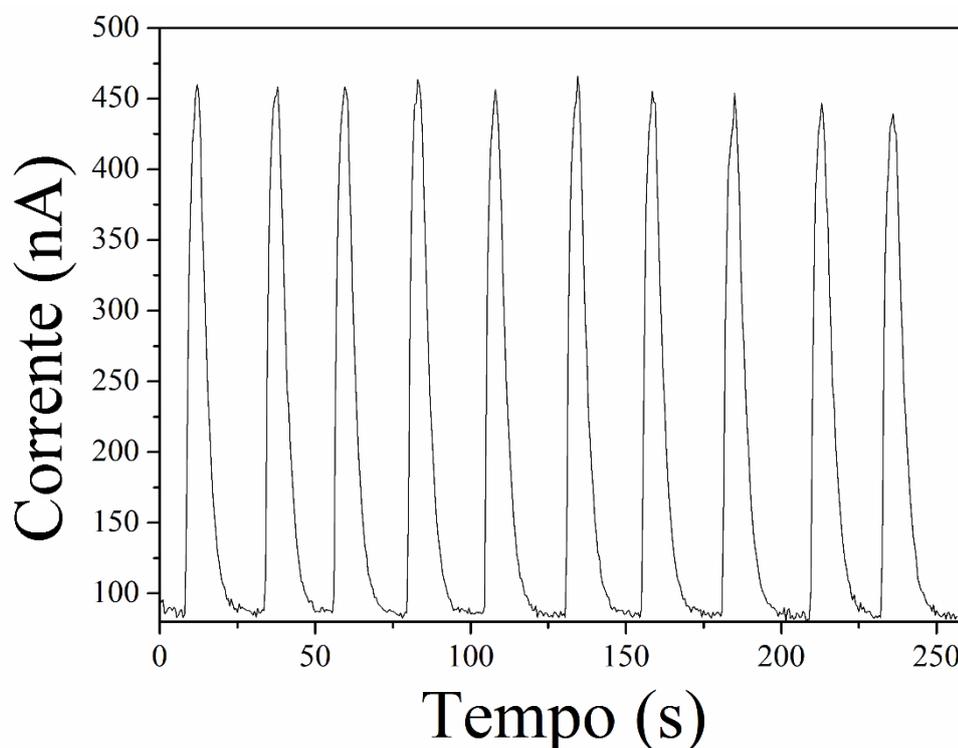


Figura 22 - Amperograma para o estudo de repetitividade com 10 injeções consecutivas de peróxido de hidrogênio em tampão fosfato pH 7,00 à uma vazão constante de $2,80 \text{ mL min}^{-1}$ com volume de injeção de $175 \mu\text{L}$ e concentração de H_2O_2 de $19,5 \mu\text{mol L}^{-1}$.

4.10. INFLUÊNCIA DA UREIA NA DETERMINAÇÃO DE H₂O₂ EM GEL DE CLAREAMENTO

Como já foi mencionado, o gel de clareamento dentário pode possuir em sua composição o peróxido de carbamida, que é um aduto entre o peróxido de hidrogênio e a ureia. Portanto, com o intuito de investigar a possível resposta deste último composto frente à determinação do peróxido foi feito um estudo exploratório utilizando a voltametria cíclica para tal. A figura 23 mostra o voltamograma cíclico obtido para a avaliação da interferência da ureia, utilizando as seguintes condições: eletrólito suporte tampão fosfato pH 7,00 (0,1 mol L⁻¹), sucessivas adições de ureia (concentrações de 1, 2 e 3 mmol L⁻¹) e velocidade de varredura de 50 mV.s⁻¹. O sinal referente à adição de peróxido de hidrogênio também é mostrado e demonstra que não existe interferência significativa da ureia na determinação de H₂O₂, desta forma foi possível demonstrar que é possível realizar a determinação do peróxido de hidrogênio presente no aduto com a ureia sem que esta interfira na determinação do mesmo.

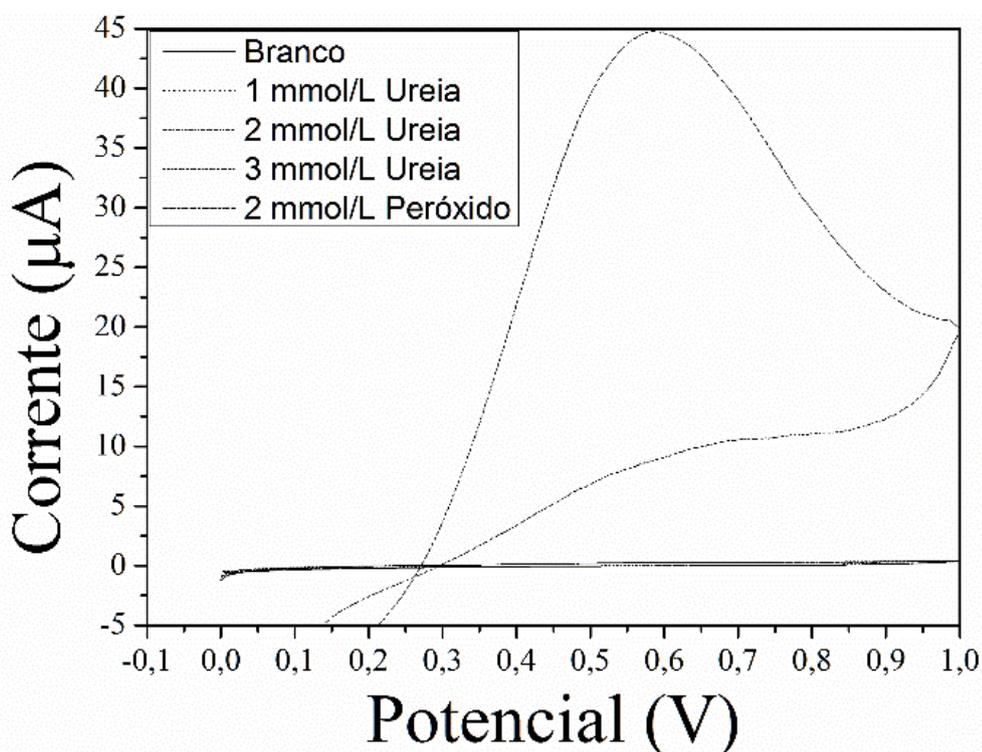


Figura 23 - Voltamograma cíclico obtido para solução contendo tampão fosfato pH 7,00 (0,1 mol L⁻¹) e adições de 1, 2 e 3 mmol L⁻¹ de ureia, seguido da adição de 2 mmol L⁻¹ de H₂O₂ na célula eletroquímica utilizando o eletrodo de DDB como eletrodo de trabalho vs Ag/AgCl_(sat).

4.11. CONDIÇÕES OTIMIZADAS

As condições otimizadas em cada um dos experimentos descritos nos itens anteriores estão resumidas na tabela 3, tais condições foram utilizadas nos procedimentos de análise dos geis de clareamento e também para o mel.

Tabela 3 - Melhores condições para a análise de peróxido em gel de clareamento e mel.

Parâmetro	Valor
Potencial (vs Ag/AgCl_{sat})	0,6 V
Eletrólito suporte	Tampão Fosfato pH 7,00
Vazão do eletrólito	2,80 mL min ⁻¹
Percorso analítico	25 cm (159µL)
Alça de amostragem	28,5 cm (175µL)

4.12. QUANTIFICAÇÃO DOS TEORES DE H₂O₂ EM GEL DE CLAREAMENTO DENTÁRIO

Após terem sido estabelecidas as condições analíticas para a realização das análises, e tendo sido avaliado o comportamento eletroquímico da ureia, foi possível aplicar o método para as determinações de peróxido no gel de clareamento dentário.

Para a quantificação dos níveis de peróxido nos geis de clareamento foi realizada a análise por injeção em fluxo das amostras conforme o procedimento descrito em 3.6.2.8, com as melhores condições estabelecidas (Tabela 3).

A figura 24 mostra o amperograma (a) e a curva analítica (b) para uma amostra de gel de clareamento vendida em Juiz de Fora, as concentrações da curva variaram de 9,77 a 95,9 µmol L⁻¹. Cada amostra foi analisada em triplicata (B, E, H) e cada réplica foi analisada em triplicata com 3 injeções cada, o mesmo foi feito com as soluções fortificadas para o estudo de recuperação (C, D, F, G, I, J).

Os estudos de adição e recuperação foram realizados em dois níveis sendo o nível baixo (nb) 48,7 µmol L⁻¹ e o nível alto (na) de 68,2 µmol L⁻¹ respectivamente. Os valores de recuperação são mostrados na tabela 4, assim como os valores de concentração obtidos para os geis.

Os limites de detecção e quantificação estabelecidos para a curva mostrada na figura 24-b foram 1,06 e 3,54 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, obtidos através das equações: $LD = 3 \times S_b \times a^{-1}$ e $LQ = 10 \times S_b \times a^{-1}$. Onde S_b é o desvio padrão do coeficiente linear da curva analítica e a é o coeficiente angular da mesma curva.

A utilização do sistema de análise por injeção em fluxo permitiu uma boa frequência analítica (63 injeções/hora), com resultados confiáveis e reprodutíveis.

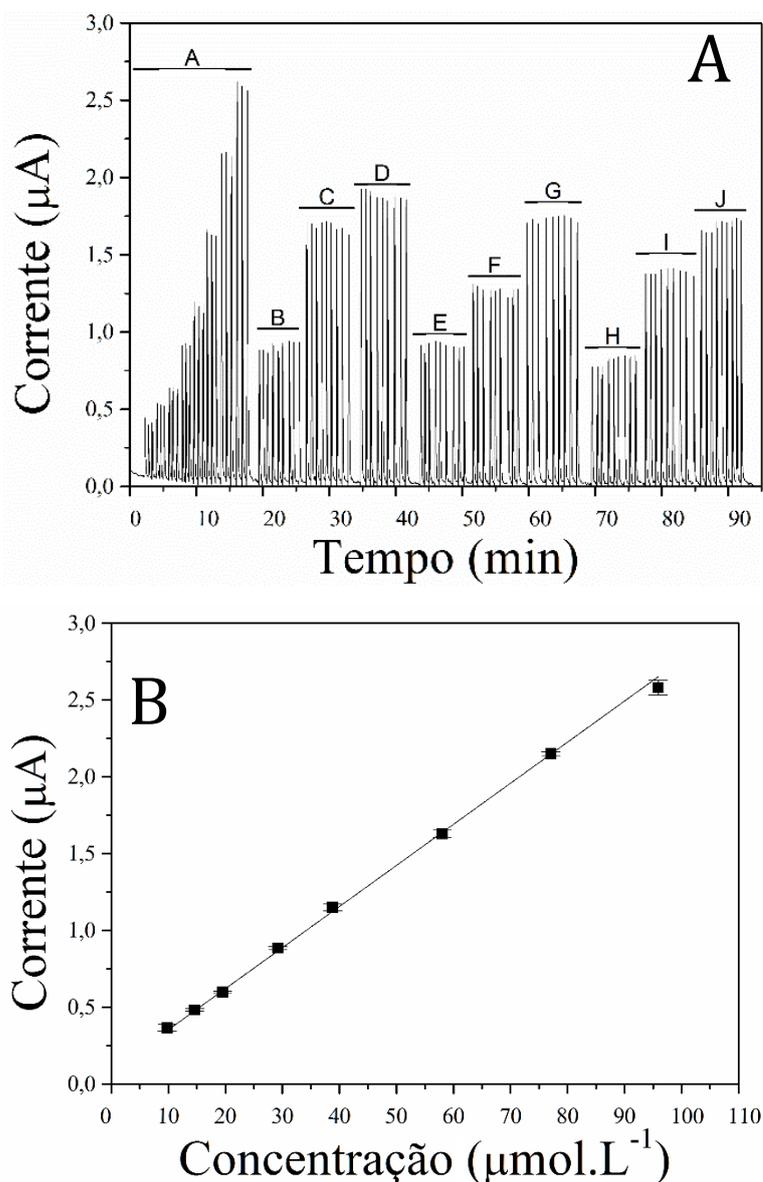


Figura 24 - Amperograma para injeções da curva analítica, amostra e soluções fortificadas em tampão fosfato pH 7,00 à uma vazão constante de 2,80 mL min^{-1} com volume de injeção de 175 μL (A). Curva analítica para o experimento, $I(A) = 2,6 \times 10^{-2} \times [\text{H}_2\text{O}_2] (\text{mol L}^{-1}) + 8,6 \times 10^{-8}$ e $r = 0,9996$. As concentrações de H_2O_2 da curva analítica (A) foram 9,80; 14,6;

19,5; 29,2; 8,8; 58,0; 77,1; 95,9 $\mu\text{mol L}^{-1}$, B, E, H são as replicatas das amostras, C, F, I e D, G, J são as amostras fortificadas nos níveis baixo e alto, respectivamente (B).

Tabela 4 - Valores de concentração e recuperação encontrados para as amostras de gel de clareamento dentário.

Origem	[H₂O₂] (%m/m)	DPR(%)	% recuperação (nb)	% recuperação (na)
Farmácia 1	2,87	2,25	83	101
Farmácia 2	1,24	5,96	93	107
Farmácia 3	1,29	3,66	81	79
Farmácia 4	3,72	2,64	91	74
Marca 1	1,70	2,27	85	75
Marca 2	4,56	2,94	97	77
Marca 3	1,77	1,98	103	89
Marca 4	1,94	0,10	107	89

É possível notar a partir da tabela 4, que os valores de concentração de peróxido de hidrogênio apresentam grandes variações dentre as diferentes procedências, entretanto todos apresentam valores inferiores àqueles apresentados nos rótulos dos produtos (todos acima de 6%). Com relação aos DPR todos se encontraram abaixo de 6 % indicando uma boa precisão, no nível de concentração avaliado.

A partir dos valores de recuperação obtidos pode-se perceber alguns valores baixos como os do intervalo entre 74 - 77 % para o nível alto de fortificação. Estes valores indicam uma possível perda do analito por decomposição térmica para formação de O₂ e H₂O, apesar de todos os cuidados tomados como o controle da temperatura ambiente, este fato portanto acaba refletindo em baixos valores de recuperação. Com relação aos demais podem ser considerados aceitáveis dentro do coeficiente de variância estabelecido pelo valor de Horwitz (22,00 %), calculado a partir do limite de quantificação da curva analítica. Este valor estima o coeficiente de variância para o nível de concentração estudado. O valor pode ser obtido através da equação

$$CV = 2^{(1-0,5 \log(C))}$$

Onde CV é o coeficiente de variância previsto para a faixa de concentração avaliada e C é a concentração expressa em g/g.

4.13. COMPARAÇÃO DO MÉTODO AMPEROMÉTRICO COM O MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO ENZIMÁTICO PARA AS AMOSTRAS DE GEL DE CLAREAMENTO

Com o intuito de confirmar a exatidão da metodologia proposta foi realizada uma comparação com o método espectrofotométrico enzimático já existente. O método enzimático é baseado na reação do H_2O_2 com a 4-aminoantipirina na presença de fenol, a enzima peroxidase atua catalisando a reação, para a formação de antipiril-quinonimina, segundo a reação abaixo (Figura 25). (ALLAIN, C. C. et al., 1974).

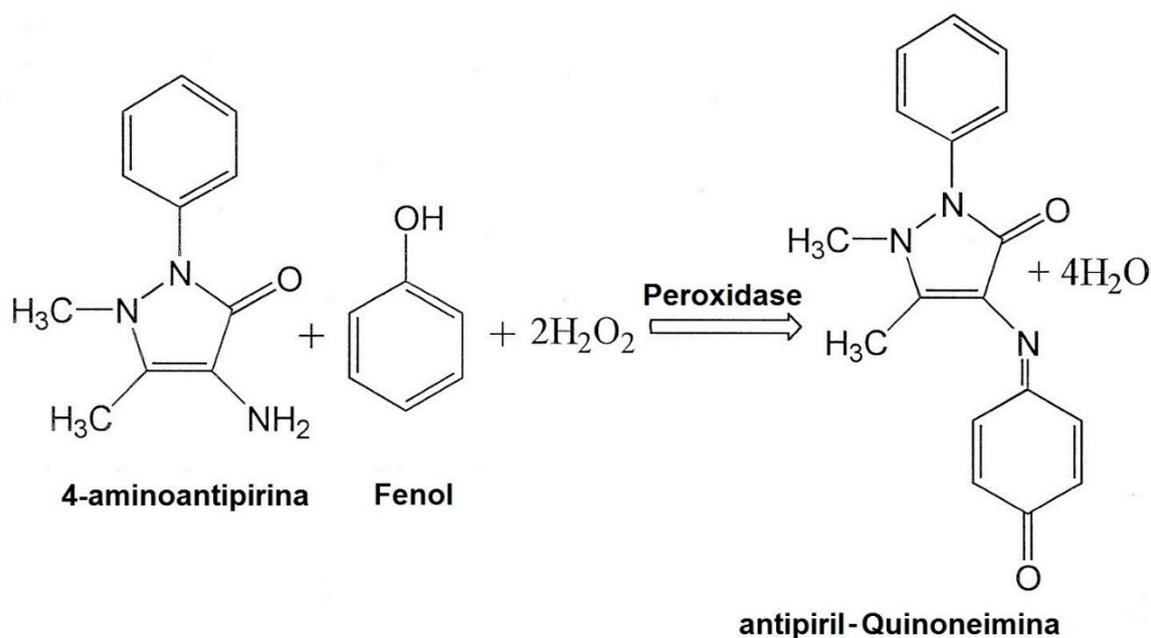


Figura 25 - Reação de formação da antipiril-quinonimina a partir da 4-aminoantipirina, fenol e peróxido de hidrogênio

As concentrações utilizadas de fenol, 4-aminoantipirina e peroxidase foram $1,27 \text{ mmol L}^{-1}$, $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ e $1,4 \text{ U.mL}^{-1}$ respectivamente. As curvas espectrofotométricas foram construídas em um espectrofotômetro e os resultados das medidas são apresentados na tabela 5. As condições para o método amperométrico utilizado foram aquelas descritas na tabela 3.

Para a comparação foi feita a reanálise das amostras entretanto, simultaneamente nos dois métodos, e os resultados foram comparados através dos testes F e t, a comparação das

variâncias (teste F) permite a verificação da diferença entre as precisões dos dois métodos, enquanto o teste t permite avaliar a diferença entre as médias de concentração obtidas através dos dois métodos, nos dois casos o valor calculado para os parâmetros foram menores que os valores tabelados (Tabela 5), isto indica que num nível de 95 % os dois métodos são igualmente precisos e que os mesmos não apresentaram diferenças significativas entre as médias das medidas para as amostras, indicando também uma ausência de erros sistemáticos.

Os DPR obtidos também podem ser considerados satisfatórios uma vez que são menores que 10 % (tabela 5), e com poucas variações entre as diferentes amostras, é possível perceber também que não há uma perda de precisão ao mudar do método espectrofotométrico para o amperométrico, entretanto no método amperométrico não foi feito o uso de enzima para a determinação, reduzindo o custo com este reagente.

Tabela 5 - Comparação dos valores de concentração de peróxido obtidos para os geis de clareamento por métodos diferentes.

Origem amostra	Espectrofotométrico		Amperométrico		Teste F (95 % conf.) F _{tab} =7,70
	Média (% m/m)	DPR	Média (% m/m)	DPR	
Farmácia 1	4,39	1 %	4,20	3 %	5,88
Farmácia 2	3,72	5 %	3,62	3 %	0,69
Farmácia 3	1,50	4 %	1,58	6 %	1,34
Farmácia 4	1,49	4 %	1,43	6 %	0,95
Marca 1	1,84	5 %	1,89	6 %	0,34
Marca 2	4,66	10 %	4,61	9 %	0,02
Marca 3	3,60	6 %	3,69	5 %	0,31
Marca 4	2,66	8 %	2,98	9 %	2,70

Teste t à 95 % de confiança: $t_{calc} = 0,3$; $t_{tab} = 2,36$

A concordância entre os métodos também pode ser visualizada através do gráfico de correlação de Pearson entre os resultados obtidos através dos mesmos (Figura 25), a correlação expressa em termos do coeficiente de correlação de Pearson foi de 0,993, indicando uma concordância muito forte entre resultados dos métodos amperométrico e espectrofotométrico.

O valor do coeficiente angular da reta da figura 26, expressa a razão entre as concentrações obtidas através dos dois métodos e tem o valor de $0,951 \pm 0,045$, neste sentido se o valor é próximo da unidade, pode-se inferir que os métodos apresentam resultados

semelhantes, fato este que contribui para a validação dos resultados obtidos pelo método amperométrico.

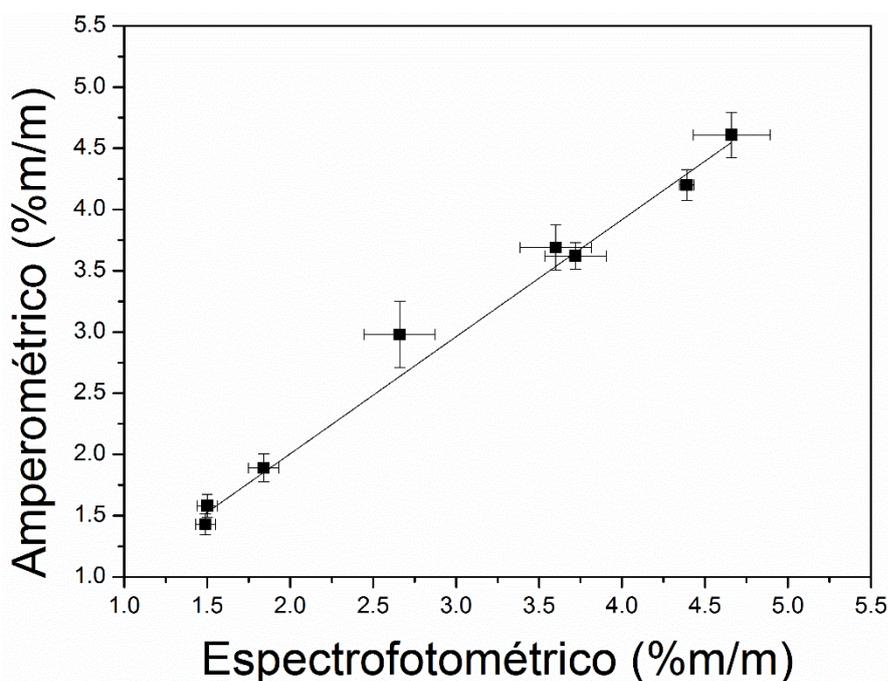


Figura 26 - Correlação de Pearson entre o método espectrofotométrico e o método amperométrico desenvolvido, indicando uma concordância para as diferentes medidas realizadas na análise dos geis de clareamento.

4.14. QUANTIFICAÇÃO DOS TEORES DE H_2O_2 EM MEL.

Após terem sido estabelecidas as condições analíticas para a realização das análises através da curva analítica, foi então explorada a construção de uma curva de adição de padrão para a quantificação dos níveis de peróxido nos meis com o uso da enzima peroxidase.

Com relação a seletividade do método, pode-se destacar que ela é garantida pela adição da enzima, porque uma vez que não é eletroativa não interfere nos experimentos, apenas age catalisando a reação do peróxido presente deixando apenas os interferentes, que podem então ser monitorados.

Foi realizada a análise por injeção em fluxo das amostras, preparadas conforme o procedimento descrito em 3.6.2.9, com as melhores condições estabelecidas (Tabela 3). A

utilização do sistema de análise por injeção em fluxo permitiu uma boa frequência analítica (57 injeções/hora), com resultados confiáveis e reprodutíveis.

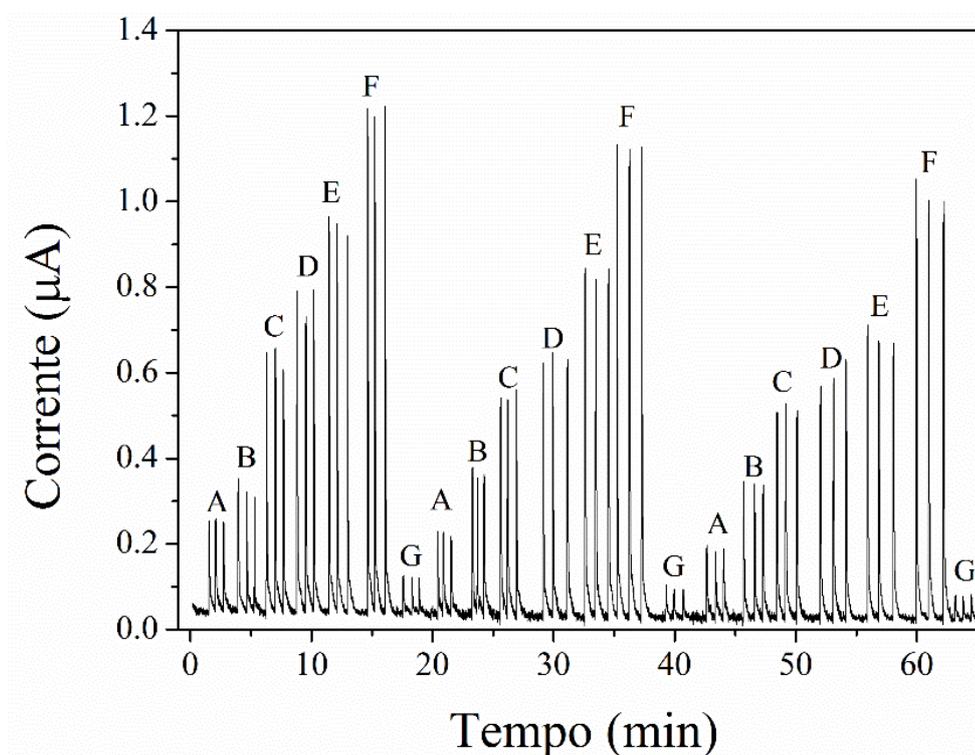


Figura 27 - Amperograma para injeções de três curvas de adição de padrão para a análise de mel, amostra (A), amostra com 10 U de peroxidase (G) e soluções com 8,67; 17,8; 23,9; 32,0; 48,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de peróxido de hidrogênio (B-F), nas condições descritas na tabela 3.

A figura 27 mostra o amperograma para a curva de adição de padrão para uma amostra de mel, as concentrações de padrão adicionado variaram de 8,67 a 48,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (B-F). Cada amostra foi analisada em triplicata (A), sendo injetada três vezes em cada nível, em seguida a amostra adicionada de 10 U de peroxidase foi injetada três vezes (G).

A tabela 6 mostra os resultados das análises, e os parâmetros da validação para os vários meios deste estudo.

Tabela 6 - Valores de concentração, sensibilidade e correlação linear encontrados para as amostras de mel.

Amostra	[H₂O₂] média (µg g⁻¹)	DPR (%)	r	Sensibilidade x 10⁻² (A g µg⁻¹)
Caxambu (1)	7,73	2,3	1,000	2,84
Paulo Afonso (2)	63,3	4,8	0,994	1,58
Aquiraz (3)	31,2	6,4	0,998	1,18
Barretos (4)	11,0	3,5	0,999	1,77
Itapira (5)	12,7	10,5	0,998	1,61
Poços de Caldas (6)	17,5	9,1	0,999	1,36
Santa Bárbara (7)	37,1	9,3	0,999	2,22

Os valores de concentração obtidos para os diferentes tipos de mel expressam a variabilidade da ocorrência do peróxido em produtos naturais, não é possível portanto estabelecer uma correlação entre o tipo de planta e a concentração de peróxido existente, isto porque vários são os fatores que influenciam nesta concentração, entretanto percebe-se que os valores de concentração são baixos e é realmente necessário o uso de uma metodologia sensível o bastante para detectar os níveis de concentração apresentados. Os DPR encontrados apresentam-se compatíveis com o nível de concentração estudado, estando abaixo de 10,5 %

É importante destacar que, de uma maneira geral as curvas apresentaram uma sensibilidade aproximada (Tabela 6), sendo então, um possível indicativo de uma robustez no método uma vez que as amostras de mel são de diferentes origens botânicas/ geográficas. Afim de verificar a real existência de diferença entre as sensibilidades foi realizada uma comparação através do teste F, o valor de F calculado (20,46) é maior do que o F tabelado (2,85), indicando que existe diferença entre os grupos de medidas, entretanto o teste não especifica qual ou quais os conjuntos de dados são diferentes dos demais, neste contexto, uma forma criteriosa de estabelecer quais são os grupos de valores que diferem, é através do teste de Tukey, a figura 28 mostra o resultado do teste. O teste é baseado na comparação dos intervalos de confiança das sensibilidades das curvas para cada uma das amostras e expressam a diferença entre as amostras (fatores). O fato de o intervalo de confiança conter o zero indica que os valores tem diferenças próximas a zero, ou seja não são divergentes à 95 % de confiança, a figura 28 indica com clareza que a amostra de Caxambu-MG (indicada por 1 na figura 28, conforme descrito na

tabela 6) está realmente discordante das demais (2-7), outro caso isolado ocorre entre as amostras de Poços de Caldas (6) e Santa Bárbara (7), por outro lado as outras sensibilidades indicam uma concordância a 95 % de confiança entre as diferentes curvas de adição de padrão estabelecidas. Este fato confirma a reprodutibilidade das análises, uma vez que sob diferentes condições os resultados são concordantes de uma maneira geral, portanto pode-se considerar que a amostra Caxambu é um caso atípico, onde foi constatada uma diferença com relação as demais amostras.

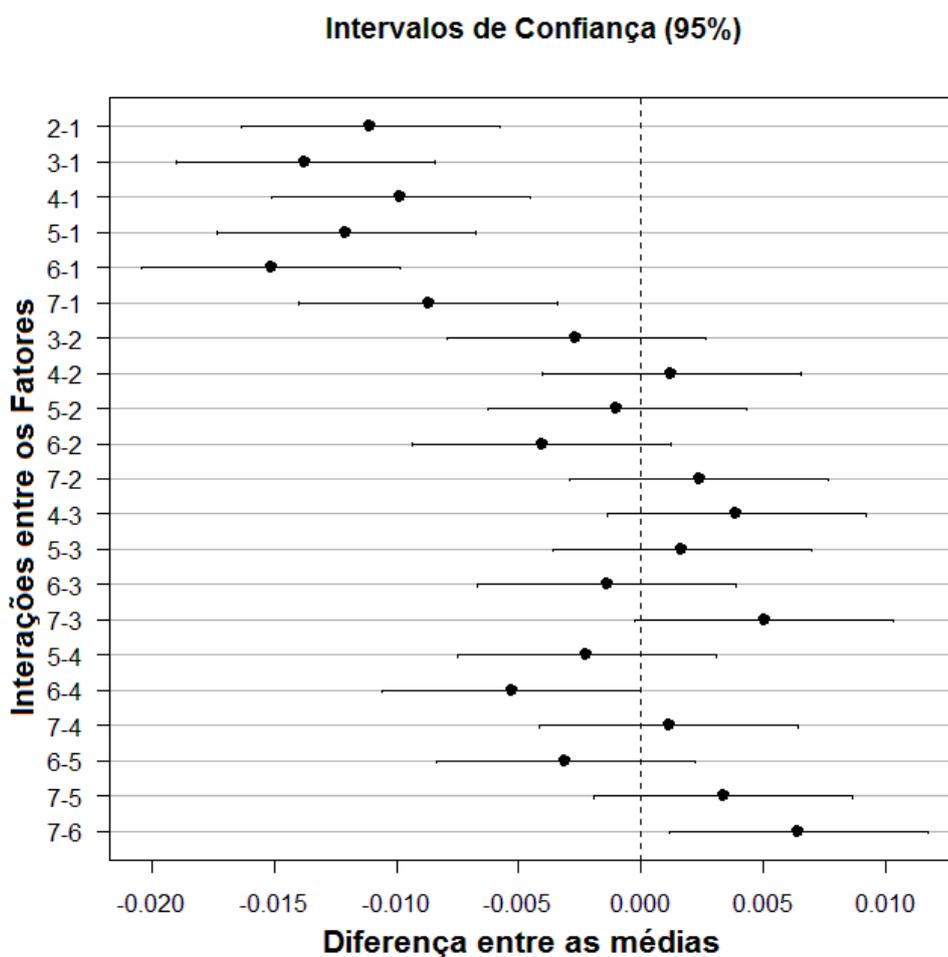


Figura 28 - Teste de Tukey evidenciando principalmente a diferença significativa entre a sensibilidade da curva de adição de padrão para a amostra de Caxambu-MG (1) e as demais curvas (2-7).

Foram então estabelecidos os valores de limites de detecção e quantificação médios para a análise do mel, sendo eles 2,46 e 8,22 $\mu\text{g g}^{-1}$ respectivamente.

4.15. COMPARAÇÃO DO MÉTODO AMPEROMÉTRICO COM O MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO ENZIMÁTICO PARA AS AMOSTRAS DE MEL

Conforme descrito no item 4.11, o método espectrofotométrico enzimático foi utilizado para comparar a metodologia amperométrica e validar os resultados obtidos pela mesma, para tanto foi feita a análise simultânea nos dois métodos e os resultados foram comparados através dos testes F e t, nos dois casos o valor calculado para os parâmetros foram menores que os valores tabelados (Tabela 7), isto indica que num nível de 95 % os dois métodos são aproximadamente precisos e que os mesmos não apresentaram diferenças significativas entre as médias das medidas para as amostras.

A análise dos DPR obtidos nas análises permite confirmar a precisão dos mesmos, sendo que ambos apresentaram valores próximos, indicando que não há uma perda de precisão ao usar o método amperométrico, entretanto quando avaliamos o uso de enzima por cada um dos métodos percebe-se uma redução de até 90 % no uso de enzima, uma vez que no método amperométrico cerca de 30 U são utilizadas por análise, enquanto cerca de 300 U são utilizadas no procedimento espectrofotométrico.

A concordância entre os dois métodos pode ainda ser observada a partir do gráfico de correlação de Person entre os métodos, exibido na figura 29. Os coeficientes angular e linear foram muito próximos de 1 e zero, respectivamente, tendo sido encontrados intervalos de confiança de $(1,016 \pm 0,044)$ e $(-1,316 \pm 2,242)$, respectivamente, para um nível de confiança de 95 %, com um coeficiente de correlação de Pearson de 0,995. Com base nestes resultados pode-se afirmar que nenhuma diferença significativa entre os métodos foi observada.

Tabela 7 - Comparação dos valores de concentração de peróxido obtidos para os meios por métodos diferentes.

Amostra	Amperométrico		Espectrofotométrico		Teste F (95% conf.) $F_{\text{tab}} = 7,70$
	$[\text{H}_2\text{O}_2]$ média ($\mu\text{g/g}$)	DPR	$[\text{H}_2\text{O}_2]$ média ($\mu\text{g/g}$)	DPR	
Caxambu	33,1	2,8 %	32,5	5,4 %	0,27
Paulo Afonso	54,4	5,6 %	52,4	4,7 %	0,79
Aquiraz	64,2	1,7 %	61,6	2,6 %	5,46
Barretos	64,2	2,1 %	66,9	2,0 %	6,07
Itapira	39,4	1,0 %	38,1	2,7 %	4,24
Poços de Caldas	20,5	3,0 %	20,1	4,5 %	0,35
Santa Bárbara	64,7	4,5 %	65,2	2,6 %	0,09

Teste t à 95 % de confiança: $t_{\text{calc}} = 0,63$; $t_{\text{tab}} = 2,36$

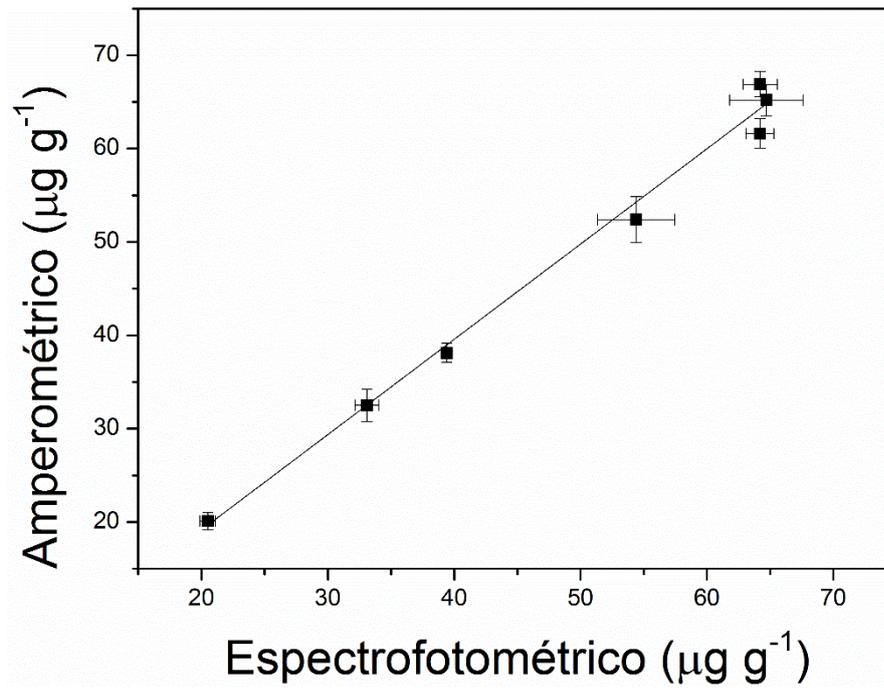


Figura 29 - Correlação entre o método espectrofotométrico e o método amperométrico desenvolvido, indicando uma concordância para as diferentes medidas realizadas na análise dos meis.

5.1. CONCLUSÕES

As células eletroquímicas desenvolvidas como suporte para utilização do eletrodo de DDB apresentaram-se robustas, pois permitiram a utilização tanto em fluxo quanto em condições estacionárias, tendo sido aplicada inclusive na determinação de Pb, Cd, Zn e Cu por voltametria de pulso diferencial (Honório G.G., Azevedo, G.C. et al.).

Os eletrodos de diamante dopado com boro utilizados neste trabalho se mostraram excelentes na determinação de peróxido de hidrogênio, tanto em condições estacionárias, mas principalmente associado à análise por injeção em fluxo. O procedimento de ativação do eletrodo utilizado foi capaz de conferir ao mesmo uma alta reprodutibilidade, bem como uma excelente sensibilidade, uma vez que concentrações tão baixas quanto $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ puderam ser detectadas sem a necessidade de modificações da superfície do eletrodo com metais ou enzimas.

O trabalho demonstrou uma metodologia simples e rápida para a determinação de baixos teores de peróxido de hidrogênio. Tal método foi avaliado com relação ao comportamento voltamétrico do H_2O_2 sob diferentes eletrodos, mostrando que as respostas para o eletrodo de DDB são superiores às obtidas com outros eletrodos tradicionais descritos na literatura. Foi estudada a possível interferência da ureia, e constatado que a mesma não influenciou nas determinações. Outros parâmetros foram investigados como: o pH para a realização das determinações e os parâmetros da análise por injeção em fluxo (alça de amostragem, vazão, comprimento do percurso analítico), obtendo-se as melhores condições para as análises.

Inicialmente para a determinação de H_2O_2 em meios foi proposta a construção de reatores para a imobilização de enzimas. Os reatores foram devidamente construídos e foi possível a sua utilização para a otimização do método (nesta etapa apenas os reatores contendo a resina foram utilizados), entretanto o processo de imobilização enzimática no suporte escolhido (resina Amberlite IRA-743) não apresentou a estabilidade esperada, conforme relatado em trabalhos anteriores (Franchini, R. A. D. et al., 2007; Matos, R. C.; Pedrotti, J. J.; Angnes, L., 2001; de Abreu Franchini, R. A. et al., 2008), o que contribuiu para a não utilização dos reatores enzimáticos. Neste sentido foi então seguida a condição estabelecida e validada para a determinação nos géis, entretanto com o uso da enzima livre em solução para a eliminação de interferentes. Bons resultados foram alcançados demonstrando que o método

desenvolvido pode ser aplicado utilizando tanto uma curva analítica (para os geis de clareamento) quanto uma curva de adição de padrão (para os meis).

Em relação a determinação amperométrica, uma vez estabelecida a faixa linear de trabalho, foram realizados testes de adição e recuperação do analito a fim de confirmar a exatidão da metodologia proposta, o sistema de análise foi ainda avaliado com relação à repetitividade das injeções, e comparado com o método espectrofotométrico já estabelecido. Neste contexto foram realizados testes estatísticos que confirmaram a validade da metodologia proposta, o novo método apresentou como benefício, a redução do uso de enzima por análise, que chegou a 90 % no caso dos meis e 100 % no caso dos geis de clareamento, tal fato reduz os custos de análise consideravelmente, uma vez que as enzimas são o fator limitante do preço envolvido na análise.

Com relação aos teores de peróxido obtidos pode-se observar no caso dos geis, que as concentrações encontraram-se abaixo do estabelecido nos rótulos, entretanto maiores estudos se fazem necessários para investigar se existe uma variação da concentração ao longo do tempo, uma vez que se trata de um produto que permanece durante horas (de 3 a 8 horas) na cavidade oral do paciente. Todavia, os resultados foram concordantes com os obtidos pelo método espectrofotométrico.

Não é possível estabelecer valores limite ou mínimos para as concentrações de H_2O_2 no mel, uma vez que se trata de um produto natural, entretanto pode-se destacar que as concentrações são bastante variáveis, contudo a resposta do método não varia consideravelmente para os diversos tipos de mel analisados. Sendo que os resultados foram comparáveis aos obtidos com o método espectrofotométrico.

5.2. PERSPECTIVAS

- Em trabalhos paralelos foi testada a célula em conjunto com um cromatógrafo líquido e os resultados foram bastante promissores (figura 10), evidenciando a potencialidade da aplicação da microcélula desenvolvida neste projeto como detector em sistemas de separação, que ampliam as possibilidades de aplicação do sistema de separação para espécies eletroativas não detectáveis na região do UV-Vis, sendo um possível campo a ser explorado pelo grupo de pesquisa.
- Maiores estudos se fazem necessários a fim de obter informações sobre as concentrações de peróxido existentes na saliva dos pacientes durante o processo de aplicação do gel de

clareamento dentário, neste contexto, o controle ajudaria a estabelecer um tempo “ideal” para a aplicação do gel, uma vez que seria possível investigar as taxas de liberação de peróxido ao longo do tempo.

- O método amperométrico desenvolvido também pode ser aplicado em outros tipos de amostras para investigar a presença de peróxido, como em soluções para limpeza de lentes de contato ou ainda em enxaguantes bucais, fato que contribuiria para avaliar a robustez do método quando aplicado em diferentes matrizes

6. REFERÊNCIAS

ALLAIN, C. C. et al.. Enzymatic determination of total serum cholesterol. **Clinical Chemistry**, v. 20, n. 4, p. 470-5, Apr 1974. ISSN 0009-9147. Acesso em 22/04/2012

AL-WAILI, N. S.; SALOM, K.; AL-GHAMDI, A. A. Honey for Wound Healing, Ulcers, and Burns; Data Supporting Its Use in Clinical Practice. **The scientific world journal**, v. 11, p. 766-787, 2011. ISSN 1537-744X. Disponível em: [ISI://WOS:000289307700005](http://www.isinet.com/ISI/WOS:000289307700005) . Acesso em 22/04/2012

AL-WAILI, N. S. et al.. Honey and Microbial Infections: A Review Supporting the Use of Honey for Microbial Control. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 10, p. 1079-1096, Oct 2011. ISSN 1096-620X. Disponível em: [ISI://WOS:000295950000002](http://www.isinet.com/ISI/WOS:000295950000002) . Acesso em 23/04/2012

ALVAREZ-SUAREZ, J. et al.. Contribution of honey in nutrition and human health: a review. **Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism**, v. 3, n. 1, p. 15-23, 2010. ISSN 1973-798X. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s12349-009-0051-6> . Acesso em 29/05/2012

ANTÓN, A. R. S.; LIMA, M. J. P.; DE ARAÚJO, R. P. C. Dentifrício peróxido de hidrogênio: ação clareadora? **Revista Odonto Ciência**, v. 24, p. 161-167, 2009. ISSN 01029460. Disponível em: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=ddh&AN=47222975&lang=pt-br&site=ehost-live> . Acesso em 22/05/2012

ATTIYAT, A. S.; CHRISTIAN, G. D. Flow injection analysis-atomic absorption determination of serum zinc. **Clinica Chimica Acta**, v. 137, n. 2, p. 151-157, 1984. ISSN 0009-8981. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/000989818490175X> . Acesso em 15/8/2012

AZABOU, S. et al. A compact process for the treatment of olive mill wastewater by combining wet hydrogen peroxide catalytic oxidation and biological techniques. **Journal of Hazardous Materials**, v. 183, n. 1-3, p. 62-69, 2010. ISSN 0304-3894. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389410008575> >. Acesso em 18/09/2012

BAKIRCIOGLU, D.; TOPRAKSEVER, N.; KURTULUS, Y. B. Determination of zinc in edible oils by flow injection FAAS after extraction induced by emulsion breaking procedure. **Food Chemistry**, v. 151, n. 0, p. 219-224, 2014. ISSN 0308-8146. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814613017032> >. Acesso em 22/02/2014

BARATIERI, L. et al.. **Odontologia Restauradora: Fundamentos e Possibilidades**. São Paulo: Editora Santos, 2001. Acesso em 22/05/2012

BARATIERI, L. et al.. **Clareamento Dental**. 3. ed. São Paulo: Editora Santos, 2004. Acesso em 22/05/2012

BERGAMIN F, H.; REIS, B. F.; ZAGATTO, E. A. G. A new device for improving sensitivity and stabilization in flow-injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 97, n. 2, p. 427-431,

1978. ISSN 0003-2670. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267001934555> . Acesso em 29/06/2012

BOYCE, S.; TIPTON, K. F. **Enzyme Classification and Nomenclature**. In: (Ed.). eLS: John Wiley & Sons, Ltd, 2001. ISBN 9780470015902. Acesso em 17/12/2012

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel**. Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000. Publicada no DOU em 23 de outubro de 2000 Acesso em 22/01/2013

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Regulamento Técnico do Azeite de Oliva e do Óleo de Bagaço de Oliva**. Instrução Normativa nº 1, de 30 de janeiro de 2012. Publicada no DOU em 01 de fevereiro de 2012. Acesso em 02/04/2013

BRETT, C. M. A. Electroanalytical Techniques for the Future: The Challenges of Miniaturization and of Real-Time Measurements. **Electroanalysis**, v. 11, n. 14, p. 1013-1016, 1999. ISSN 1521-4109. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4109\(199910\)11:141013::AID-ELAN10133.0.CO](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1521-4109(199910)11:141013::AID-ELAN10133.0.CO) . Acesso em 21/011/2013

BURTIS, C., GEARY, T. (2009). Glossary of bioanalytical nomenclature - Part 1: General terminology, body fluids, enzymology, immunology (IUPAC Recommendations 1994). **Pure and Applied Chemistry**, 66(12), pp. 2419-2604. from doi:10.1351/pac199466122587. Acesso em 9/4/2014

CAMPOS, G. et al.. Classificação do mel em floral ou mel de melato. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 23, p. 1-5, 2003. ISSN 0101-2061. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612003000100002&nrm=iso. Acesso em 26/09/2013

CASS, A. E. G., Ed. **Biosensors, A Practical Approach**. Oxford: Oxford University Press. 1990. Acesso em 23/010/2013

CATTRALL, R. W. **Chemical Sensors**. New York: Oxford Science Publications, 1997. Acesso em 23/10/2013

CHEN, Q. et al.. Morphological and Microstructural Stability of Boron-Doped Diamond Thin Film Electrodes in an Acidic Chloride Medium at High Anodic Current Densities. **Journal of the Electrochemical Society**, v. 144, n. 11, p. 3806-3812, 1997. Disponível em: <http://jes.ecsdl.org/content/144/11/3806.abstract>. Acesso em 14/09/2013

COX, J. A.; LEWINSKI, K. Flow-injection amperometric determination of hydrogen-peroxide by oxidation at an iridium oxide electrode. **Talanta**, v. 40, p. 1911-1915, 1993. Acesso em 28/03/2013

DE ABREU FRANCHINI, R. A. et al.. Differential amperometric determination of hydrogen peroxide in honeys using flow-injection analysis with enzymatic reactor. **Talanta**, v. 75, n. 1, p. 301-306, 2008. ISSN 0039-9140. Disponível em: ISI://WOS:000254597000045 Acesso em 23/05/2012

DECLLEMENTS, R.; SWAIN, G. M. The Formation and Electrochemical Activity of Microporous Diamond Thin Film Electrodes in Concentrated KOH. **Journal of the Electrochemical Society**, v. 144, p.856-866, 1997. Acesso em 24/06/2012

DEL MORO, G. et al. Comparison of UV/H₂O₂ based AOP as an end treatment or integrated with biological degradation for treating landfill leachates. **Chemical Engineering Journal**, v. 218, n. 0, p. 133-137. ISSN 1385-8947. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1385894713000247> >. Acesso em 15/02/2013

FERNANDES, J. C. B.; NETO, G. D.; KUBOTA, L. T. Use of column with modified silica for interfering retention in a FIA spectrophotometric method for direct determination of vitamin C in medicine. **Analytica Chimica Acta**, v. 366, p. 11-22, 1998. Acesso em 30/05/2012

FERNÁNDEZ-ABEDUL, M. T.; COSTA-GARCIA, A. Flow injection analysis with amperometric detection of naltrexone in pharmaceuticals. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 16, n. 1, p. 15-19, 1997. ISSN 0731-7085. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708596019620> . Acesso em 12/08/2012

FRITZ, J. S.; SCHENK, G. H. **Quantitative Analytical Chemistry**. 5th. New Jersey: 1987. Acesso em 10/04/2013

GONZALEZ-MACIA, L. et al.. Enhanced electrochemical reduction of hydrogen peroxide on silver paste electrodes modified with surfactant and salt. **Electrochimica Acta**, v. 56, n. 11, p. 4146-4153, 2011. ISSN 0013-4686. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013468611001824> >. Acesso em 14/7/2013

GRANGER, M. C. et al.. Polycrystalline diamond electrodes: basic properties and applications as amperometric detectors in flow injection analysis and liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 397, n. 1-3, p. 145-161, 1999. ISSN 0003-2670. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267099004006> . Acesso em 17/09/2013

HANNIG, C. et al.. Recovery of peroxides in saliva during home bleaching – influence of smoking. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 33, n. 7, p. 533-541, 2006. ISSN 1365-2842. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2842.2005.01579.x> . Acesso em 13/04/2013

HANNIG, C. et al.. Determination of peroxides in saliva—kinetics of peroxide release into saliva during home-bleaching with Whitestrips® and Vivastyle®. **Archives of Oral Biology**, v. 48, n. 8, p. 559-566, 2003. ISSN 0003-9969. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000399690300102X>. Acesso em 7/11/2012

HAYWOOD VB, H. H. Nightguard vital bleaching. **Quintessence International**, n. 20, p. 173-176, 1989. Acesso em 7/12/2012

HONÓRIO, G. G. et al.. Use of boron-doped diamond electrode pre-treated cathodically for the determination of trace metals in honey by differential pulse voltammetry. **Food Control**, v. 36,

n. 1, p. 42-48, 2014. ISSN 0956-7135. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713513003964> >. Acesso em 13/02/2014

HU, H.-C.; JIN, H.-J.; CHAI, X.-S. Rapid determination of hydrogen peroxide in pulp bleaching effluents by headspace gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1235, n. 0, p. 182-184, 2012. ISSN 0021-9673. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967312003755> . Acesso em 13/02/2013

HUSMANN, S.; NOSSOL, E.; ZARBIN, A. J. G. Carbon nanotube/Prussian blue paste electrodes: Characterization and study of key parameters for application as sensors for determination of low concentration of hydrogen peroxide. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 192, n. 0, p. 782-790, 3/1/ 2014. ISSN 0925-4005. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925400513012604> >. Acesso em 13/02/2013

IUPAC. **Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book")**. Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). XML on-line corrected version: <http://goldbook.iupac.org> (2006-) created by M. Nic, J. Jirat, B. Kosata; updates compiled by A. Jenkins. ISBN 0-9678550-9-8. doi:10.1351/goldbook. Última atualização: 24-02-2014. Acesso em 24/02/2014

JOINER, A. Tooth colour: a review of the literature. **Journal of Dentistry**, v. 32, Supplement, n. 0, p. 3-12, 2004. ISSN 0300-5712. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300571203001751> . Acesso em 22/05/2013

JOINER, A. The bleaching of teeth: A review of the literature. **Journal of Dentistry**, v. 34, n. 7, p. 412-419, 2006. ISSN 03005712. Acesso em 12/05/2013

JOINER, A. Review of the effects of peroxide on enamel and dentine properties. **Journal of Dentistry**, v. 35, n. 12, p. 889-896, 2007. ISSN 03005712. Acesso em 19/09/2013

JOINER, A.; THAKKER, G.; COOPER, Y. Evaluation of a 6 % hydrogen peroxide tooth whitening gel on enamel and dentine microhardness in vitro. **Journal of Dentistry**, v. 32, p. 27-34, 2004. ISSN 03005712. Acesso em 28/09/2013

KARYAKIN, A. A.; KARYAKINA, E. E.; GORTON, L. Prussian-Blue-based amperometric biosensors in flow-injection analysis. **Talanta**, v. 43, n. 9, p. 1597-1606, 1996. ISSN 0039-9140. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0039914096019091>. Acesso em 16/07/2013

KRAFT, A. Doped Diamond: A compact Review on a New, Versatile Electrode Material. **Internal Journal of Electrochemical Science**, v. 2, p. 355-385, 2007. Acesso em 16/7/2012

LANGELOTH, M.; CHIKU, M.; EINAGA, Y. Anodic stripping voltammetry of zinc at boron-doped diamond electrodes in ammonia buffer solution. **Electrochimica Acta**, v. 55, n. 8, p. 2824-2828, 2010. ISSN 0013-4686. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013468610000460> . Acesso em 18/07/2012

LEE, D. S.; SINNO, S.; KHACHEMOUNE, A. Honey and Wound Healing An Overview. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 12, n. 3, p. 181-190, 2011. ISSN 1175-0561. Disponível em: [ISI://WOS:000291277800005](http://www.isinet.com/ISI/WOS:000291277800005) . Acesso em 19/07/2012

LI, Y. Safety Controversies in Tooth Bleaching. **Dental Clinics of North America**, v. 55, n. 2, p. 255-263, 2011. ISSN 00118532. Acesso em 15/07/2012

LIMA, M. P. **Eficácia da ação clareadora do peróxido de hidrogênio a 35 % sobre o esmalte dental humano – estudo in vitro**. 2006. (Mestrado). Faculdade de Odontologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador. Acesso em 1/09/2012

LIN, M. S.; JAN, B. I. Determination of hydrogen peroxide by utilizing a cobalt(II)hexacyanoferrate-modified glassy carbon electrode as a chemical sensor. **Electroanalysis**, v. 9, n. 4, p. 340-344, 1997. ISSN 1521-4109. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/elan.1140090416> >. Acesso em 19/08/2012

LINARES, P.; DE CASTRO, M. D. L.; VALCARCEL, M. Fluorimetric differential-kinetic determination of silicate and phosphate in waters by flow-injection analysis. **Talanta**, v. 33, n. 11, p. 889-893, 1986. ISSN 0039-9140. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0039914086802181> . Acesso em 19/12/2012

MANDAL, M. D.; MANDAL, S. Honey: its medicinal property and antibacterial activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, n. 2, p. 154-160, 2011. ISSN 2221-1691. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2221169111600166> . Acesso em 20/12/2012

MANDAL, S. et al.. Antibacterial activity of honey against clinical isolates of Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa and Salmonella enterica serovar Typhi. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 3, n. 12, p. 961-964, Dec 2010. ISSN 1995-7645. Disponível em: [ISI://WOS:000287639000009](http://www.isinet.com/ISI/WOS:000287639000009) . Acesso em 24/10/2013

MARCHINI, L. C.; MORETI, A. C. D. C. C.; OTSUK, I. P. Análise de agrupamento, com base na composição físico-química, de amostras de mel produzidos por Apis mellifera L. no Estado de São Paulo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 25, p. 8-17 2005. Acesso em 23/11/2013

MARSHALL, M. V.; CANCRO, L. P.; FISCHMAN, S. L. Hydrogen Peroxide: A Review of Its Use in Dentistry. **Journal of Periodontology**, v. 66, n. 9, p. 786-796, 1995. ISSN 0022-3492. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1902/jop.1995.66.9.786> . Acesso em: 14/06/2012

MATOS, R. C. et al.. Peroxidase immobilized on Amberlite IRA-743 resin for on-line spectrophotometric detection of hydrogen peroxide in rainwater **Talanta**, v. 69, n. 5, p.1208-1214, 2006a. Acesso em 15/06/2012

MATOS, R. C.; PEDROTTI, J. J.; ANGNES, L. Flow-injection system with enzyme reactor for differential amperometric determination of hydrogen peroxide in rainwater. **Analytica Chimica Acta**, v. 431, p. 73-79, 2001. Acesso em 17/09/2012

MATTOS I.L.DE , S. K. A., BRAZ, A.D., FERNANDES J.R. Peróxido de Hidrogênio - Importância e determinação. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 8, 2003. Acesso em 1/06/2012

MAY, P. W. Diamond thin films: a 21st-century material. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 358, n. 1766, p. 473-495, January 15, 2000. Disponível em: < <http://rsta.royalsocietypublishing.org/content/358/1766/473.abstract> >. Acesso em 21/05/2012

MEDEIROS, R. A. et al.. Simultaneous square-wave voltammetric determination of aspartame and cyclamate using a boron-doped diamond electrode. **Talanta**, v. 76, n. 3, p. 685-689, 7/30/2008. ISSN 0039-9140. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914008002749> >. 21/07/2013

MIZUTANI, F.; YABUKI, S. Flow injection analysis for glucose using an amperometric enzyme electrode based on lipid-modified glucose oxidase as the detector. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 9, n. 6, p. 411-414, 1994. ISSN 0956-5663. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0956566394900280> . Acesso em 11/07/2012

MOSBACH, K., Ed. **Methods in Enzymology**. New York: Academic Press, p.137ed. 1988. Acesso em 26/06/2012

MOUSSA, A. et al.. Antibacterial activity of various honey types of Algeria against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 5, n. 10, p. 773-776, Oct 2012. ISSN 1995-7645. Disponível em: [ISI://WOS:000310414600003](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1875287512000003) . Acesso em 31/03/2013

NDANGILI, P. M. et al.. Ferrocenium hexafluorophosphate-induced nanofibrillarity of polyaniline-polyvinyl sulfonate electropolymer and application in an amperometric enzyme biosensor. **Electrochimica Acta**, v. 55, n. 14, p. 4267-4273, 2010. ISSN 0013-4686. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013468609005933> . Acesso em 1/04/2013

ONTIVEROS, J. C.; ELDIWANY, M. S.; PARAVINA, R. Clinical effectiveness and sensitivity with overnight use of 22 % carbamide peroxide gel. **Journal of Dentistry**, v. 40, Supplement 2, n. 0, p. e17-e24, 2012. ISSN 0300-5712. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300571212002278> . Acesso em 12/08/2013

PALMER, T., Ed. **Understanding Enzymes**. New York: John Wiley & Sonsed. 1985. Acesso em 13/09/2013

PEDROSA, V. D. A.; CODOGNOTO, L.; AVACA, L. A. Determinação voltamétrica de 4-clorofenol sobre o eletrodo de diamante dopado com boro utilizando a voltametria de onda quadrada. **Química Nova**, v. 26, p. 844-849, 2003. ISSN 0100-4042. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-0422003000600012&nrm=iso Acesso em 4/12/2012

PEDROSA, V. D. A.; CODOGNOTO, L.; AVACA, L. A.. Electroanalytical determination of 4-nitrophenol by square wave voltammetry on diamond electrodes. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, p. 530-535, 2003. ISSN 0103-5053. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-0532003000400007&nrm=iso

Acesso em 5/12/2012

PEDROTTI, J. J.; ANGNES, L.; GUTZ, I. G. R. Miniaturized reference electrodes with microporous polymer junctions. **Electroanalysis**, v. 8, n. 7, p. 673-675, 1996. ISSN 1521-4109. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/elan.1140080713> . Acesso em 19/08/2012

POURNAGHI-AZAR, M. H.; AHOOR, F.; POURNAGHI-AZAR, F. Simple and rapid amperometric monitoring of hydrogen peroxide in salivary samples of dentistry patients exploiting its electro-reduction on the modified/palladized aluminum electrode as an improved electrocatalyst. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 145, n. 1, p. 334-339, 2010. ISSN 0925-4005. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925400509009563> . Acesso em 3/10/2012

PRADOS-ROSALES, R. C.; LUQUE-GARCÍA, J. L.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Propelling devices: the heart of flow injection approaches. **Analytica Chimica Acta**, v. 461, n. 2, p. 169-180, 2002. ISSN 0003-2670. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267002002787> . Acesso em 9/11/2012

PRINCE, N. C.; S.LEWIS, Eds. **Fundamentals of Enzymology**. Oxford: Oxford Science Publications, 2nd ed. 1989. Acesso em 4/3/2013

QUIROZ, M. A.; BANDALA, E. R. Types of Conducting Diamond Materials and their Properties. In: (Ed.). **Synthetic Diamond Films**: John Wiley & Sons, Inc., 2011. p.57-75. ISBN 9781118062364. Acesso em 13/5/2012

RUZICKA, J.; HANSEN, E. H. Flow injection analyses- Part I. A new concept of fast continuous flow analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 78, p. 145-157, 1975. Acesso em 14/05/2012

SASSOLAS, A.; BLUM, L. J.; LECA-BOUVIER, B. D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 489-511, 2012. ISSN 0734-9750. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S073497501100156X>. Acesso em 5/09/2012

SATO, C. et al. Tooth Bleaching Increases Dentinal Protease Activity. **Journal of Dental Research**, v. 92, n. 2, p. 187-192, 2013. Disponível em: <http://jdr.sagepub.com/content/92/2/187.abstract> . Acesso em 14/01/2014

SCHEMEHORN, B.; GONZÁLEZ-CABEZAS, C.; JOINER, A. A SEM evaluation of a 6 % hydrogen peroxide tooth whitening gel on dental materials in vitro. **Journal of Dentistry**, v. 32, p. 35-39, 2004. ISSN 03005712. Acesso em 09/06/2012

SKOOG, WEST, HOLLER, CROUCH, Fundamentos de Química Analítica, Tradução da 8ª Edição norte-americana, Editora Thomson, São Paulo-SP, 2006. Acesso em 07/08/2012

SRIKANTH, V. V. S. S.; JIANG, X. Synthesis of Diamond Films. In: (Ed.). **Synthetic Diamond Films**: John Wiley & Sons, Inc., 2011. p.21-55. ISBN 9781118062364. Acesso em 12/05/2012

STRYER, L. W. H., Ed. **Biochemistry**. New York: Freeman and Company, p. 181ed. 1995. Acesso em 17/09/2012

TOOR, R.; MOHSENI, M. UV-H₂O₂ based AOP and its integration with biological activated carbon treatment for DBP reduction in drinking water. **Chemosphere**, v. 66, n. 11, p. 2087-2095, 2007. ISSN 0045-6535. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653506012525> >. Acesso em 27/08/2012

WANG, G. et al.. Amperometric hydrogen peroxide biosensor with sol-gel-chitosan network-like film as immobilization matrix. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 18, p. 335-343, 2003. Acesso em 19/05/2012

WATTS, A. Tooth discolouration and staining: A review of the literature. **British Dental Journal**, v. 190, n. 6, p. 309-316, 2001. ISSN 00070610 (ISSN). Disponível em: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0035942074&partnerID=40&md5=8aa5b0f81d0a5904caefb41ab95ae920> . Acesso em 05/05/2012

WESTBROEK, P. et al.. Voltammetric detection of hydrogen peroxide in teeth whitening gels. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 124, n. 2, p. 317-322, 2007. ISSN 09254005. Acesso em 17/05/2012

WESTBROEK, P.; TEMMERMAN, E.; KIEKENS, P. Measurement and control of hydrogen peroxide concentration in alkaline solution by means of amperometric sensor system. **Analytica Chimica Acta**, v. 385, p. 423-428, 1999. Acesso em 18/10/2012

WESTON, R. J. The contribution of catalase and other natural products to the antibacterial activity of honey: a review. **Food Chemistry**, v. 71, n. 2, p. 235-239, Nov 1 2000. ISSN 0308-8146. Disponível em: ISI://WOS:000089542200012 . Acesso em 13/05/2012

WHITAKER, J. R., Ed. **Principles of Enzymology for Food Sciences**. New York: Marcel Dekkered. 1972. Acesso em 13/05/2012

WHITE, J. W. & SUBERS, M.H. & SHEPARTZ, A.I. The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose oxidase system. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.73, p. 57-70, 1963. Acesso em 23/7/2012

WOO, Y.-A.; KIM, H.-J. Rapid determination of hydrogen peroxide in whitening patches for teeth using a new portable near-infrared spectrometer. **Microchemical Journal**, v. 78, n. 2, p. 167-173, 2004. ISSN 0026-265X. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0026265X04000797>. Acesso em 13/08/2012

XU, J. et al.. Peer Reviewed: Boron-Doped Diamond Thin-Film Electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 69, n. 19, p. 591A-597A, 1997. ISSN 0003-2700. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/ac971791z> . Acesso em 10/08/2012

YOUNG, N. et al.. A study of hydrogen peroxide chemistry and photochemistry in tea stain solution with relevance to clinical tooth whitening. **Journal of Dentistry**, v. 40, Supplement 2, n. 0, p. e11-e16, 2012. ISSN 0300-5712. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300571212002035>. Acesso em 13/08/2012

ZHANG, J.; OYAMA, M. Electroanalysis of myoglobin and hemoglobin with a boron-doped diamond electrode. **Microchemical Journal**, v. 78, n. 2, p. 217-222, 2004. ISSN 0026-265X. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0026265X04001213> . Acesso em 13/12/2012

ZHANG, W.; MA, D.; DU, J. Prussian blue nanoparticles as peroxidase mimetics for sensitive colorimetric detection of hydrogen peroxide and glucose. **Talanta**, v. 120, n. 0, p. 362-367, 2014. ISSN 0039-9140. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914013010102> . Acesso em 15/01/2013

ZHANG, Y. et al.. Electrochemical behavior of graphene/Nafion/Azure I/Au nanoparticles composites modified glass carbon electrode and its application as nonenzymatic hydrogen peroxide sensor. **Electrochimica Acta**, v. 90, n. 0, p. 550-555, 2013. ISSN 0013-4686. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013468612020270> >. Acesso em 03/03/2013

ZHAO, G.; QI, Y.; TIAN, Y. Simultaneous and Direct Determination of Tryptophan and Tyrosine at Boron-Doped Diamond Electrode. **Electroanalysis**, v. 18, n. 8, p. 830-834, 2006. ISSN 1521-4109. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/elan.200503455>. Acesso em 6/09/2012

ZHOU, C. et al.. A gravity-induced flow injection system for surface plasmon resonance biosensor. **Talanta**, v. 112, n. 0, p. 95-100, 2013. ISSN 0039-9140. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914013001860>. Acesso em 6/6/2012