

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

JÚLIA CRISTINA MARTINS QUEIROZ

MÉTODO ELETROQUÍMICO PARA DETERMINAÇÃO DE PERÓXIDO DE
HIDROGÊNIO USANDO SENSOR FABRICADO POR IMPRESSÃO 3D

UBERLÂNDIA

2020

JÚLIA CRISTINA MARTINS QUEIROZ

MÉTODO ELETROQUÍMICO PARA DETERMINAÇÃO DE PERÓXIDO DE
HIDROGÊNIO USANDO SENSOR FABRICADO POR IMPRESSÃO 3D

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Instituto de Química da Universidade Federal de
Uberlândia como requisito parcial para a obtenção
do título de bacharel em Química Industrial

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Alejandro Abarza
Muñoz.

Coorientadora: Msc. Ana Paula de Lima

UBERLÂNDIA

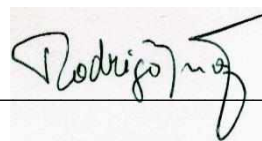
2020

JÚLIA CRISTINA MARTINS QUEIROZ

**MÉTODO ELETROQUÍMICO PARA DETERMINAÇÃO DE PERÓXIDO DE
HIDROGÊNIO USANDO SENSOR FABRICADO POR IMPRESSÃO 3D**

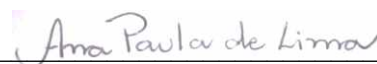
Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Instituto de Química da Universidade Federal de
Uberlândia como requisito parcial para a obtenção
do título de bacharel em Química Industrial

Uberlândia, 16 de dezembro de 2020



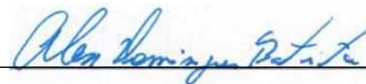
Prof. Dr. Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz

(Orientador)



Msc. Ana Paula de Lima

(Coorientadora)



Prof. Dr. Alex Domingues Batista.

(Examinador)



Prof. Dr. Jhonys Machado de Freitas

(Examinador)

AGRADECIMENTOS

- ✚ Primeiramente aos meus pais, minha mãe Ednéa Régis e meu pai Célio Queiroz, que desde pequena me ajudaram incondicionalmente, me dando o apoio necessário para chegar até aqui.
- ✚ Ao Henrique Queiroz que além de irmão sempre foi meu melhor amigo, me aconselhando nas minhas decisões.
- ✚ Aos meus amigos de classe, em especial Pablo Roberto, Paula Nunes e Lucas Bonelli.
- ✚ A Ana Luiza Cunha minha melhor amiga que esteve comigo em todos os momentos, sendo bons ou ruins, que sempre que eu desanimava, foi o meu incentivo para continuar até o fim.
- ✚ Aos meus amigos que tive o prazer do conhecer dentro da UFU, Ana Laura, Camila Romão, Vivian Silva.
- ✚ Aos Professores Alex Batista, Sidnei Gonçalves e Waldomiro Borges, que além de professores foram amigos.
- ✚ Ao professor Rodrigo Munoz que sempre que foi necessário me orientou da melhor forma possível, se tornando exemplo do profissional que quero ser no futuro.
- ✚ Aos meus companheiros do NUPE, Ana Paula, Jhonys Machado, Thiago Oliveira, Jian Pereira, Silvia Vaz que se puseram presentes para ajudar e ensinar quando estava no laboratório.
- ✚ Aos membros da banca por aceitarem o convite e contribuírem para o aprimoramento do trabalho.
- ✚ À Universidade Federal de Uberlândia e Instituto de Química pelo o espaço físico e materiais concedidos
- ✚ E a todos que mesmo não citados aqui contribuíram de alguma forma na minha jornada.

RESUMO

A impressão 3D está recebendo grande interesse na área de eletroquímica. As vantagens desta incluem o fácil design de novos materiais, a rápida criação de protótipos e a redução de desperdícios, uma vez que o material usado para impressão é racionalizado. Usando filamentos disponíveis comercialmente feitos de ácido polilático/grafeno condutor (G-PLA), foram impressos eletrodos que foram modificados com $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$, conhecido como ótimo electrocatalisador da reação de redução electroquímica de H_2O_2 . O electrodo 3D modificado foi aplicado com sucesso para a determinação de resíduos de H_2O_2 em leite e também para análise de enxaguantes bucais que possuem H_2O_2 como agente branqueador. As análises foram feitas empregando detecção amperométrica em um sistema de análise por injeção em batelada (BIA). Foram realizadas as otimizações para o sistema no qual as respostas obtidas foram reprodutíveis e estáveis, com desvio padrão relativo de 4,23 % ($n = 10$), elevada frequência analítica (87 h^{-1}), baixo limite de detecção $0,111 \mu\text{mol L}^{-1}$, valores de recuperação para as amostras analisadas acima de 97%, além de boa precisão e exatidão.

Palavra-chave: Electrodo de grafeno impresso em 3D, electrodeposição, azul da Prússia, electrocatálise, detecção de H_2O_2

ABSTRACT

3D printing is receiving great interest in the field of electrochemistry. The advantages of this include the easy design of new materials, the rapid creation of prototypes and the reduction of waste, since the material used for printing is rationalized. Using commercially available filaments made of polylactic acid / conductive graphene (G-PLA), electrodes were printed which were modified with $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$, known as an excellent electrocatalyst for the electrochemical reduction reaction of H_2O_2 . The modified 3D electrode was successfully applied for the determination of H_2O_2 residues in milk and also for the analysis of mouthwashes that have H_2O_2 as a bleaching agent. The analyses were performed using amperometric detection in a batch injection analysis system (BIA). Optimizations were performed for the system in which the responses obtained were reproducible and stable, with a relative standard deviation of 4.23% ($n = 10$), high analytical frequency (87 h^{-1}), low detection limit $0.111 \mu\text{mol L}^{-1}$, recovery values for the samples analyzed above 97%, in addition to good precision and accuracy.

Keywords: 3D printed graphene electrode, electrodeposition, Prussian blue, electrocatalysis, H_2O_2 detection

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fórmula estrutural do peróxido de hidrogênio

Figura 2: Estrutura do Azul da Prússia

Figura 3 - Sistema BIA com detecção eletroquímica. a) corpo da célula; b) tampa superior; c) tampa inferior; d) eletrodo de trabalho (ET); e) eletrodo de referência (ER); f) ponteira de micropipeta para injeção; g) eletrodo auxiliar (EA); h) solução de eletrólito suporte.

Figura 4: Comparação entre (A) manufatura subtrativa e (B) aditiva.

Figura 5: Componentes da célula: (a) Eletrodo de trabalho; (b) Eletrodo de referência; (c) Eletrodo auxiliar; (d) Ponteira da micropipeta eletrônica.

Figura 6: Componentes da Micropipeta: (a) Micropipeta eletrônica (Eppendorf Multipette tream®); (b) ponteira em forma de seringa (volume total: 1 mL).

Figura 7: Voltamograma hidrodinâmico obtido através da representação gráfica dos valores de corrente de pico (média de 3 injeções) de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de H_2O_2 em função dos potenciais aplicados para o 3DGrE/PB. Eletrólito: tampão fosfato (pH = 7,4) / $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ KCl, volume de injeção de $100 \mu\text{L}$ e velocidade de injeção de $277 \mu\text{L s}^{-1}$.

Figura 8: Estudo da velocidade de injeção no sistema BIA, utilizando o 3DGrE/PB, empregando as velocidades de injeções de 17, 33, 49, 78, 164, 213, 277 e $370 \mu\text{L s}^{-1}$ para injeções em triplicata da solução contendo $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de solução de tampão fosfato (pH = 7.4); Potencial de trabalho: 0,0 V, volume de injeção de $100 \mu\text{L}$.

Figura 9: Estudo do volume injetado no sistema BIA utilizando 3DGrE/PB, cada volume de 10, 30, 50, 75, 100 e $200 \mu\text{L}$ foram injetados em triplicata, sistema com agitação. Potencial de trabalho: 0,0 V, velocidade de injeção: $277 \mu\text{L s}^{-1}$.

Figura 10: Estudo do volume injetado no sistema BIA utilizando 3DGrE/PB, cada volume de 10, 30, 50, 75, 100 e $200 \mu\text{L}$ foram injetados em triplicata, sistema com agitação. Potencial de trabalho: 0,0 V, velocidade de injeção: $277 \mu\text{L s}^{-1}$.

Figura 11: Amperogramas obtidos em BIA, utilizando 3DGrE/PB de injeções de amostras puras (A0 e B0) e respectivas adições de $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ (A1, B1), $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ (A2, B2) e 100

$\mu\text{mol L}^{-1}$ (B3) de peróxido de hidrogênio. Injeções de soluções padrão de peróxido de hidrogênio (a - h) 1 - $250 \mu\text{mol L}^{-1}$ em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de PBS (pH = 7) / $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ KCl. Potencial: 0,0 V, volume de injeção: $100 \mu\text{L}$; velocidade de injeção: $277 \mu\text{L s}^{-1}$.

Figura 12: Amperograma obtido no sistema BIA, usando eletrodo 3DGrE/PB para injeções em triplicata de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de peróxido de hidrogênio, dopamina (DP), ácido ascórbico (AA) e ácido úrico (AU), respectivamente. Eletrólito $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ tampão fosfato (pH = 7)/ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ KCl, potencial aplicado: 0,0 V, volume de injeção: $100 \mu\text{L}$; velocidade de injeção $277 \mu\text{L s}^{-1}$.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros analíticos obtidos a partir de curvas de calibração amperométrica para peróxido de hidrogênio no sistema BIA usando eletrodo 3DGrE / PB.

Tabela 2: Concentrações de peróxido de hidrogênio obtidas no sistema BIA, valores de recuperação das amostras fortificadas e respectivos desvios-padrão (n = 3).

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

- 3DGrE / PB** –do inglês, *3D Printed Graphene Electrodes Modified with Prussian Blue* – Eletrodos de grafeno impressos em 3D modificados com azul da Prússia
- ABS** – do inglês, *acrylonitrile-butadiene-styrene* – acrilonitrila-butadieno-estireno
- BIA** – do inglês, *batch injection analysis* – Análise por injeção em batelada
- FDM** – do inglês, *fused deposition modelling* – Modelagem por deposição fundida
- LOD** – do inglês, *limit of detection* – Limite de detecção
- LOQ** – do inglês, *limit of quantitation* – limite de quantificação
- PB** – do inglês, *Prussian blue* – Azul da Prússia
- PBS** – do inglês, *phosphate buffered saline* – Tampão fosfato-salino
- PLA** – do inglês, *poly lactic acid* – ácido polilático (PLA)
- RSD** – do inglês, *relative standard deviation* – Desvio padrão relativo
- SLM** – do inglês, *selective laser melting* – fusão a laser seletiva

SUMÁRIO

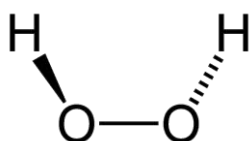
1. INTRODUÇÃO	
1.1. Peróxido de Hidrogênio	12
1.2. Azul da Prússia	13
1.3. Sistema Eletroquímico	14
1.3.1. Análise por injeção em batelada (BIA)	14
1.4. Eletrodos impressos em 3D	15
2. OBJETIVO	17
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	17
3.1. Reagentes e Soluções	17
3.2. Preparo dos Eletrodos	18
3.3. Instrumentação	18
3.3.1. Sistema BIA	18
3.4. Medidas Eletroquímicas	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1. Resultados obtidos utilizando o sistema BIA	21
5. CONCLUSÃO	28
REFERÊNCIAS	29

1. INTRODUÇÃO

1.1. Peróxido de Hidrogênio

O Peróxido de hidrogênio é um líquido incolor que em solução aquosa é conhecido comercialmente como água oxigenada, possui fórmula molecular H_2O_2 (estrutura mostrada na figura 1), foi descoberto em 1818 e está disponível comercialmente desde o século XIX. É uma importante molécula a ser determinada, pois é utilizada em diversas aplicações, como em processos oxidativos avançados para degradação de poluentes, agente branqueador nas indústrias de papel e celulose, têxteis, produtos de higiene bucal. A determinação de H_2O_2 tem despertado grande interesse em vários campos como alimentar, ambiental, forense, medicinal e farmacêutica. ^[1]

Figura 1: Fórmula estrutural do peróxido de hidrogênio



Fonte: Próprio Autor

O H_2O_2 por apresentar propriedades bactericidas, tem sido utilizado para preservar leite cru, quando em contato com o leite, a degradação do peróxido de hidrogênio irá promover a oxidação da espécie química denominada tiocianato (SCN^-) um componente natural do leite, formando hipotiocianato ($SCNO^-$), que possui propriedades antibacterianas ou inibidoras ^[2], sendo assim usado com o objetivo de prolongar a vida útil do leite. Entretanto no Brasil a adição de H_2O_2 no leite em qualquer concentração não é permitida pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), sendo considerado adulterado ^[3], o excesso pode interferir no valor nutricional do leite, podendo formar substâncias tóxicas causando problemas graves gastrointestinais.^[4]

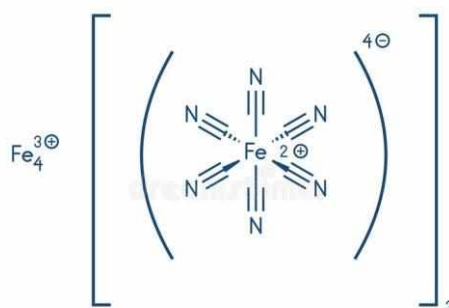
Inúmeros métodos foram desenvolvidos para a determinação de H_2O_2 , como fluorescência, ^[5] quimiluminescência ^[6] e espectrofotometria. ^[7] No entanto, esses métodos são geralmente exigem de equipamentos caros e têm uma vida útil curta, limitada a condições especiais de preservação das enzimas incorporadas ao biossensor. Dessa foram as

determinações eletroquímicas tornaram-se mais atrativas, principalmente por proporcionar determinações de forma rápida, além de serem de baixo custo, quando comparadas às técnicas citadas anteriormente. Nos últimos dez anos, as pessoas se interessaram pelo desenvolvimento de sensores eletroquímicos, que podem catalisar a oxidação e redução do peróxido de hidrogênio, facilitando a sua determinação.

O Azul Prússia (PB, do inglês, *prussian blue*) se tornou o eletrocatalisador mais comumente usado em sistemas de detecção não enzimática. Comparado com eletrodos metálicos, PB pode atingir baixo potencial e redução eletroquímica com interferência mínima de H_2O_2 em um ambiente contendo oxigênio.^[8] Eletrodos à base de metal (Pt, Au, Ag ou Cu) são afetados pela redução de oxigênio, então H_2O_2 pode ser detectado por oxidação. Neste último caso, o sistema sofre interferência de outras substâncias eletroativas comumente encontradas em meios biológicos (como dopamina e ácido ascórbico, etc.) que geralmente são eletroquimicamente oxidadas em potenciais próximos ao H_2O_2 dependendo do eletrodo utilizado. Portanto, os sensores eletroquímicos baseados em PB se tornam a melhor escolha para detecção eletroquímica de H_2O_2 .^[9]

1.2. Azul da Prússia

O Azul da Prússia é um composto químico descoberto no século XVIII, em 1704 em Berlim, por Diesbach^[10], a nomenclatura do azul da prússia é hexacianoferrato de ferro (FeHCF). O azul da prússia possui núcleos metálicos de ferro (II) e ferro (III) alternadamente distribuídos, sendo intercalados por ligantes cianos, de modo que cada centro atômico de ferro está coordenado a seis grupos ciano. A Figura 4 a seguir é uma representação da estrutura da molécula de azul da prússia, mostrando os sítios de coordenação e complexação.^[11]

Figura 2: Estrutura do Azul da Prússia.

Fonte: Dreamstime. ^[12]

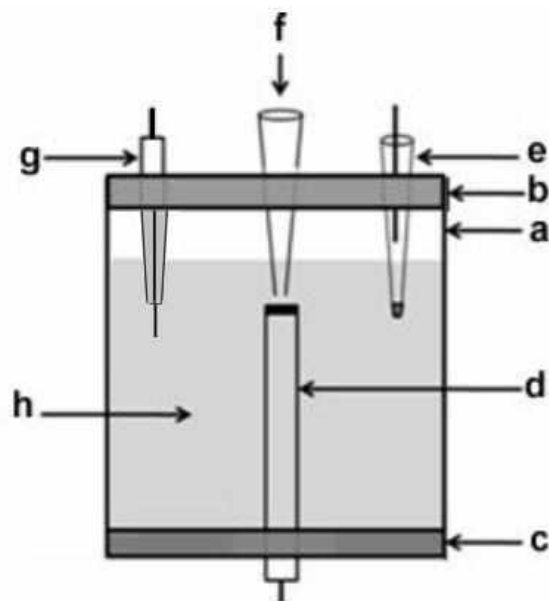
Um estudo realizado por Neff ^[13], nos mostra que o Azul da Prússia forma camadas eletroativas após deposição eletroquímica ou química no eletrodo, a partir dessa evidência uma nova área de estudo surgiu sobre esse composto. Os filmes de $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ apresentam transição redox e baixo potencial e acentuado efeito catalítico ^[14], comparado com outros tipos de electrocatalisadores com por exemplo a enzima peroxidase. Ele é considerado barato, sendo utilizado para a determinação de H_2O_2 como será mostrado no decorrer do trabalho. Para realizar todas as análises no trabalho foi empregado o sistema BIA.

1.3. Sistema eletroquímico

1.3.1. Análise por Injeção em Batelada (BIA)

Análise por injeção em batelada (BIA, do inglês, *Batch Injection Analysis*), foi apresentado pela primeira vez em 1991. ^[15] Onde o sistema consiste na injeção de pequenos volumes de amostra, utilizando uma micropipeta posicionada no arranjo 'wall jet' em que a injeção é feita diretamente na superfície do eletrodo de trabalho (ET) imerso em um grande volume de solução inerte. ^[15] A Figura 2 apresenta o esquema da célula BIA.

Figura 3: Sistema BIA com detecção eletroquímica. a) corpo da célula; b) tampa superior; c) tampa inferior; d) eletrodo de trabalho (ET); e) eletrodo de referência (ER); f) ponteira de micropipeta para injeção; g) eletrodo auxiliar (EA); h) solução de eletrólito suporte.



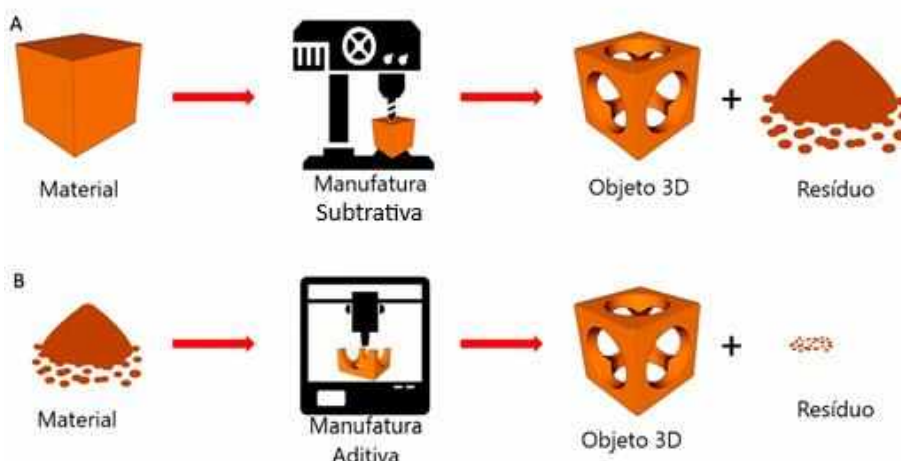
Fonte: Montes, 2014. ^[1]

A análise por injeção em batelada (BIA) é um método de transporte daquilo que se está analisando que proporciona rápida análise, boa repetibilidade e sensibilidade, uso de menor quantidades de amostra e reagente. Uma característica do sistema BIA é a redução de contaminação do eletrodo de trabalho pois o analito fica um menor tempo em contato com o mesmo, podendo-se fazer uma maior quantidade de análises seguidas sem ser necessário fazer a troca do sistema. ^[16] É usado uma micropipeta eletrônica, que é versátil e portátil, e que garante uma alta reprodutibilidade por ser um instrumento programável, ^[17] o sistema BIA tem no seu aparato uma célula que foi impressa em uma impressora 3D de fácil manuseamento que possui orifícios para inserir os eletrodos sem necessidade de suportes adicionais. O sistema BIA por possuir diversas vantagens se tornou uma técnica bastante promissora.

1.4. Eletrodos impressos em 3D

Os eletrodos utilizados foram impressos em uma impressora 3D, essa tecnologia de manufatura aditiva é uma ferramenta útil por ser de baixo custo, apresentar baixa quantidade de resíduo e prototipagem rápida, sendo mais vantajosa comparada com a técnica de manufatura subtrativa que gera mais resíduo, como mostrado na Figura 4.

Figura 4: Comparação entre (A) manufatura subtrativa e (B) aditiva.



Fonte: Adaptada de (Santos, 2019) ^[18]

Existem dois tipos de técnicas de impressão 3D, sendo elas a fusão a laser seletiva (SLM) e a modelagem por deposição fundida (FDM), ^[19] foi utilizada no trabalho a FDM que é uma técnica de baixo custo e de fácil operação, sendo usada para matérias termoplásticas. A técnica consiste inicialmente de um modelo virtual do projeto de interesse que é convertido para um formato lido pelo software 3D, usando um computador, e encaminhado para a extrusora que inicia o processo de fundir materiais poliméricos, e em seguida força o material através de uma matriz adquirindo a forma pré-determinada pela forma da matriz projetada para a peça. ^[20] Por oferecer diversas vantagens, a impressão FDM - 3D se tornou popular, disseminando facilmente no mercado. Sendo usada na área de eletroquímica, para fabricação de células eletroquímicas ^[21] e eletrodos incorporando grafeno em matrizes de ácido polilático (PLA) e em acrilonitrila-butadieno-estireno (ABS) formando, assim, um o filamento condutor com aplicação de detecção e energia. ^[18]

Figura 5: Eletrodo impresso 3D incorporado com grafeno



Fonte: Katic, 2019. ^[22]

2. OBJETIVO

O trabalho tem como objetivo realizar a determinação de peróxido de hidrogênio em amostras de leite e em enxaguante bucal, empregando o sistema de análise BIA, fazendo uso do eletrodo de grafeno impresso em 3D modificado com azul da Prússia.

2.1. Objetivos específicos

- Modificar o eletrodo de PLA/grafeno impresso em 3D com azul da Prússia;
- Determinar o potencial que será aplicado para a determinação de peróxido de hidrogênio nas amostras;
- Fazer o estudo dos parâmetros do sistema BIA, volume e velocidade de injeção;
- Avaliar a faixa linear para o peróxido de hidrogênio, assim como limites de detecção e quantificação, sensibilidade analítica e precisão;
- Determinar a quantidade de peróxido de hidrogênio presente em duas diferentes amostras, sendo uma destas de enxaguante bucal e uma amostra de leite.

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1. Reagentes e Soluções

A água deionizada de alta pureza (resistividade superior a 18 M Ω cm) obtida do sistema de purificação de água Milli Q (Millipore, Bedford, MA, USA), foi utilizada para o preparo de todas as soluções. Peróxido de hidrogênio, Cloreto de ferro (III), obtidos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil) e Ferricianeto de potássio advindo de Proquímios (Rio de Janeiro, Brasil). Para o tampão fosfato foi utilizado ácido fosfórico de Reagen (Rio de Janeiro, Brasil), com pHs ajustados com soluções diluídas de hidróxido de sódio de Dinâmica (Diadema, Brasil). Foi

utilizado HCl e KCl fornecidos pela Synth (Diadema, Brasil) para o preparo das soluções nas concentrações de 0,01 e 0,1 mol L⁻¹.

A amostra de leite e enxaguante bucal foram obtidas a partir de comércios locais e posteriormente diluídas na solução tampão fosfato.

3.2. Preparo dos Eletrodos

Utilizou-se uma célula eletroquímica com três eletrodos distintos para as determinações. Um fio de platina, utilizado como eletrodo auxiliar ou contra eletrodo; um eletrodo miniaturizado de Ag/AgCl/KCl 3 mol L⁻¹ como eletrodo de referência. [23] Os eletrodos impressos em 3D foram obtidos usando uma impressora tipo FDM usando filamento PLA contendo grafeno (Black Magic, Reino Unido). Após impressão, o eletrodo foi tratado por aplicação de +1,8 V por 900s seguido por -1,8 V por 50 s para expor as partículas de grafeno. A eletrodeposição de azul da Prússia foi feita aplicando +0,4 V por 600 s em solução contendo 1.0 mmol L⁻¹ [Fe(CN)₆]³⁻, 1 mmol L⁻¹ FeCl₃, 0,01 mol L⁻¹ HCl e 0,1 mol L⁻¹ KCl. A eletrodeposição do filme de azul da prússia foi realizado aplicando a técnica de amperometria baseada no método proposto por Karyakin. [24,25]

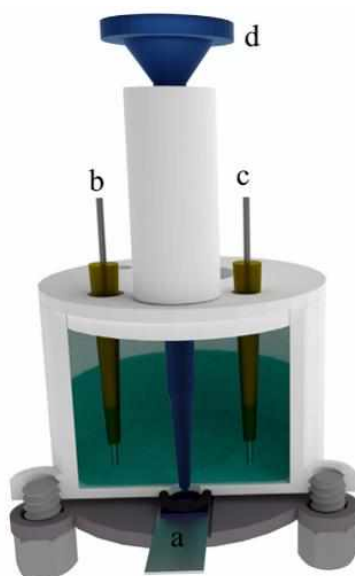
Após a eletrodeposição do azul da prússia no eletrodo, o mesmo foi colocado em uma estufa a 60°C por 1 hora, após retirado da estufa esperou-se o eletrodo atingir a temperatura ambiente (25°C). E por fim o eletrodo foi ativado utilizando a técnica de voltametria cíclica (25 ciclos), fixando-se os seguintes parâmetros de -0,2 a 0,6 V em uma solução de HCl 0,1 mol L⁻¹ contendo 0.1 mol L⁻¹ KCl, com velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹. Após isto, o eletrodo foi acoplado ao sistema de BIA para as medidas amperométricas sob agitação constante da solução eletrolítica.

3.3. Instrumentação

3.3.1. Sistema BIA

Nos estudos com o sistema BIA, foi utilizada uma célula construída no próprio laboratório. [26] O aparato que foi usado para as determinações encontra-se esquematizado na Figura 5.

Figura 5: Componentes da célula: (a) Eletrodo de trabalho; (b) Eletrodo de referência; (c) Eletrodo auxiliar; (d) Ponteira da micropipeta eletrônica.

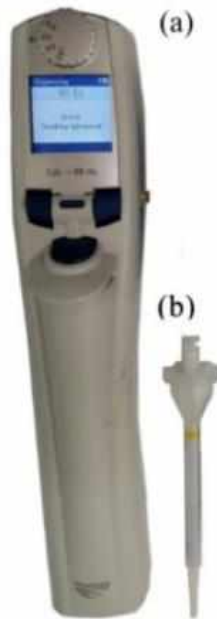


(Fonte: Rocha, 2020) [27]

Na técnica utilizada é realizada a injeção diretamente na superfície do eletrodo de trabalho (ET) da solução de análise, essa configuração é chamada de '*wall jet*', esse processo acontece dentro de uma célula eletroquímica que possui uma grande quantidade de eletrólito suporte inerte. O eletrodo de trabalho é colocado de forma em que a direção fique oposta à injeção, se encontrando em posição diferente do que é usado normalmente nas células eletroquímicas. Podem ser usadas dois tipos de micropipetas para realizar as análises, sendo a micropipeta convencional e a micropipeta eletrônica. Neste trabalho foi usado a micropipeta eletrônica. [28]

Uma pipeta eletrônica (Eppendorf Multipette stream) foi usada para injeção. A ponta da pipeta foi colocada a uma distância fixa de 2,0 mm da superfície do eletrodo de trabalho. A Figura 6 a seguir apresenta a micropipeta eletrônica e a ponteira.

Figura 6: Componentes da Micropipeta: (a) Micropipeta eletrônica (Eppendorf Multipette stream®); (b) ponteira em forma de seringa (volume total: 1 mL).



(Fonte: Oliveira, 2019) ^[29]

As análises foram realizadas com a micropipeta eletrônica, pois ela oferece mais precisão que a micropipeta convencional, já que o volume e velocidade de injeção são programadas eletronicamente. A célula eletroquímica possui 3 orifícios na tampa da célula, onde no orifício central a ponta de micropipeta é alojada, na direção oposta ao eletrodo de trabalho fixo, para que as injeções realizadas sejam na mesma distância entre a ponta e superfície do eletrodo, nos demais orifícios da célula são colocados o ER e EA. E para finalizar é adicionado à solução de eletrólito suporte suficiente para que haja contato entre os três eletrodos. ^[30]

3.4. Medidas Eletroquímicas

Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas empregando um potenciostato μ AUTOLAB tipo III (Eco Chemie, Utrecht, The Netherlands – Metrohm®) conectado a um computador e controlado por meio do software NOVA 1.11, todos os dados foram tratados utilizando softwares Microsoft Office Excel 365 e Origin Pro 7.

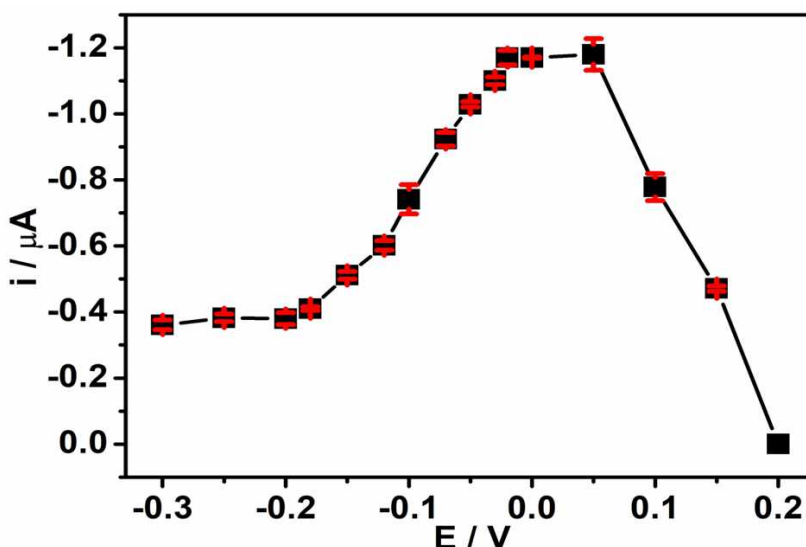
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.1. Resultados obtidos utilizando o Sistema BIA

Os experimentos iniciais usando detecção amperométrica com o sistema BIA mostrou a necessidade de agitar a solução eletrolítica dentro da célula para um restabelecimento mais rápido da corrente de linha de base após uma injeção de solução padrão de H_2O_2 . Com isso, todos os experimentos realizados foram sob agitação constante da solução eletrolítica. O eletrólito suporte utilizado foi o tampão fosfato ($\text{pH} = 7.4$) contendo $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$, a escolha do mesmo foi baseada em trabalhos anteriores. ^[1]

O primeiro estudo realizado foi de seleção do potencial a ser aplicado em todas as análises, para esse estudo as injeções foram feitas em triplicada de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de H_2O_2 em diferentes potenciais (de $+0,2$ a $-0,3 \text{ V vs. Ag/AgCl}$). A Figura 7 apresenta os valores de corrente de pico que foram obtidos pela média das três injeções para o 3DGrE / PB, obtidos na faixa de -0.3 a 0.2 V .

Figura 7: Voltamograma hidrodinâmico obtido através da representação gráfica dos valores de corrente de pico (média de 3 injeções) de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de H_2O_2 em função dos potenciais aplicados para o 3DGrE/PB. Eletrólito: tampão fosfato ($\text{pH} = 7.4$) / $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$, volume de injeção de $100 \mu\text{L}$ e velocidade de injeção de $277 \mu\text{L s}^{-1}$.



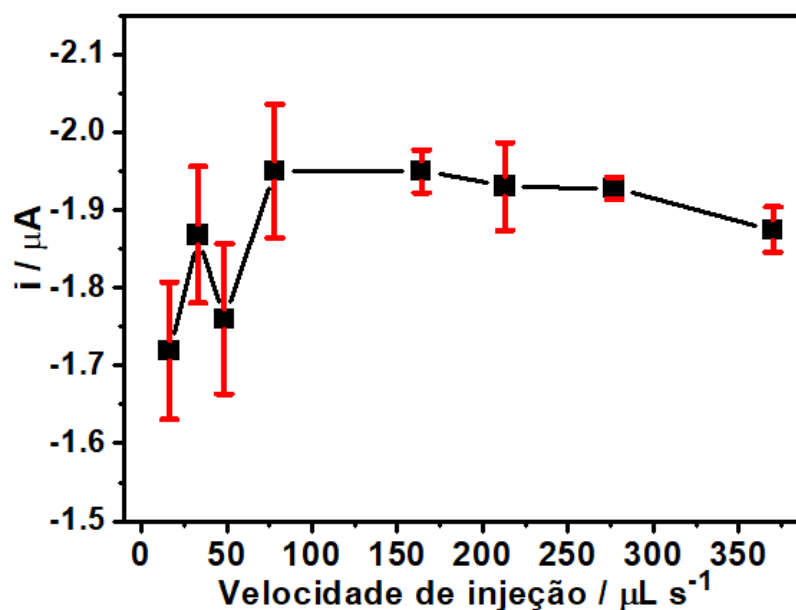
Baseado nas respostas de corrente obtidas em diferentes potenciais aplicados, representados pelo voltamograma hidrodinâmico, a Figura 7 apresenta os maiores valores de corrente entre -0,05 e + 0,05 V, devido à atividade catalítica do AP. As respostas mais baixas obtidas nos potenciais mais negativos podem ter ocorrido pela presença de oxigênio dissolvido, que também responde ao eletrodo. Portanto o potencial que foi fixado nas demais medidas amperométricas foi o de 0,0 V, onde é verificada uma interferência mínima.

As otimizações seguintes, velocidade e volume de injeção correspondem aos parâmetros do sistema BIA que estão relacionados de forma direta à pipeta eletrônica que foi o principal instrumento utilizado. O volume injetado e a velocidade de injeção são programadas na própria pipeta eletrônica, tornando então esse estudo necessário.

A velocidade de injeção é a velocidade em que a solução entra em contato com a superfície do eletrodo de trabalho, e o volume do analito na velocidade determinada. Foi selecionado 8 velocidades de injeção sendo elas 17, 33, 49, 78, 164, 213, 277 e 370 $\mu\text{L s}^{-1}$,^[22] e foram avaliados em função da resposta amperométrica do analito.

A Figura 8 apresenta os resultados que foram obtidos pelo estudo da velocidade de injeção, mostrando a média de corrente obtida para cada uma.

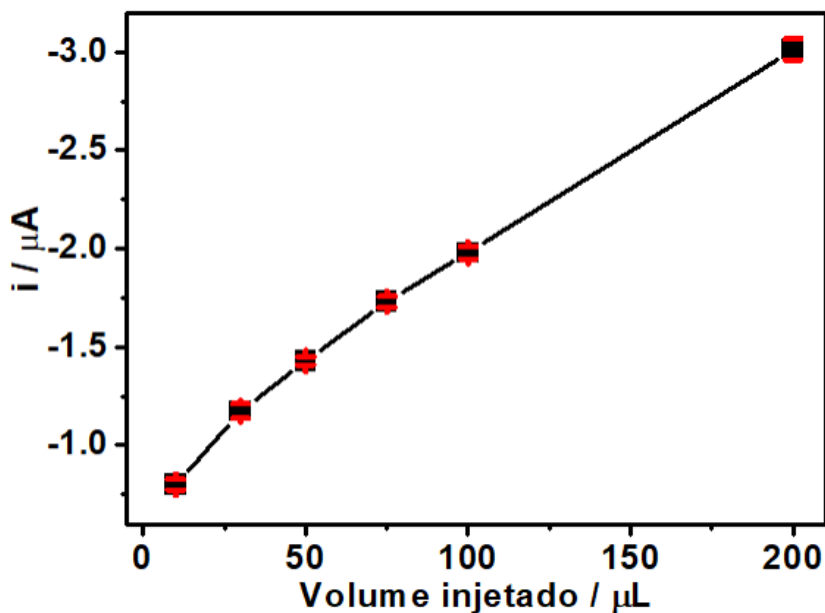
Figura 8: Estudo da velocidade de injeção no sistema BIA, utilizando o 3DGrE/PB, empregando as velocidades de injeções de 17, 33, 49, 78, 164, 213, 277 e 370 $\mu\text{L s}^{-1}$ para injeções em triplicata da solução contendo 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de solução de tampão fosfato (pH = 7.4); Potencial de trabalho: 0,0 V, volume de injeção de 100 μL .



De acordo com a Figura 8 pode-se notar diferentes valores de corrente para cada velocidade, nas velocidades mais baixas observa-se a alta variação de corrente. Os critérios usados para a escolha da velocidade são menores variações de corrente e maiores correntes de pico, adotando esses critérios foi escolhido a velocidade de $277 \mu\text{L s}^{-1}$ que apresentou a melhor resposta, sendo assim usada nos experimentos posteriores.

Outro parâmetro analisado foi o de volume injetado, os volumes utilizados foram os de 10, 30, 50, 75, 100 e 200 μL . A velocidade de injeção foi fixada em $277 \mu\text{L s}^{-1}$ com o potencial de trabalho em 0,0 V. Foi injetada $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de H_2O_2 , segue os resultados na Figura 9.

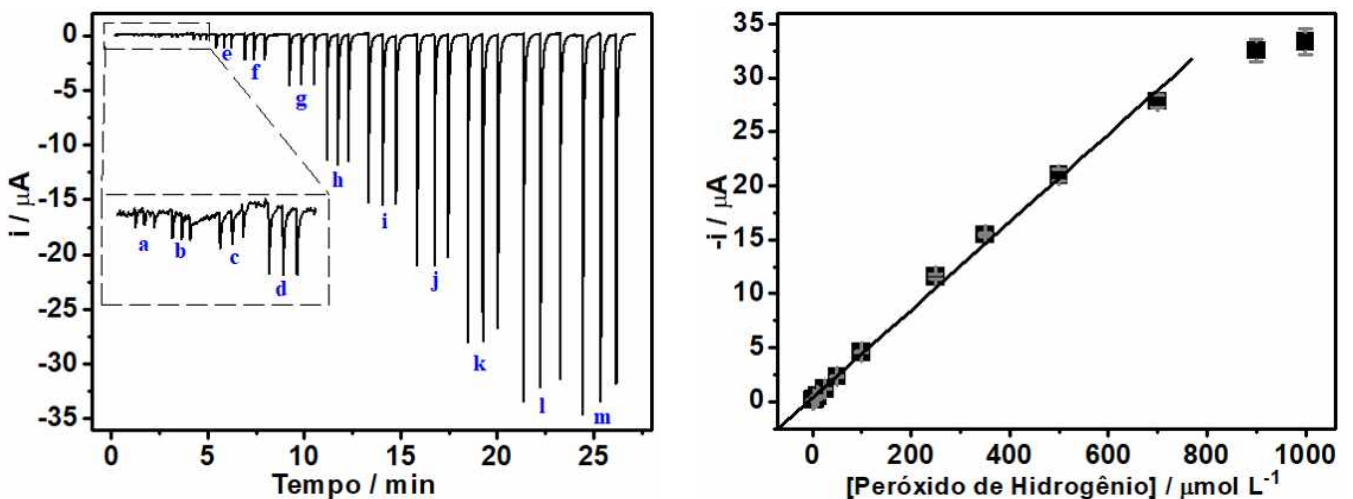
Figura 9: Estudo do volume injetado no sistema BIA utilizando 3DGrE/PB, cada volume de 10, 30, 50, 75, 100 e 200 μL foram injetados em triplicata, sistema com agitação. Potencial de trabalho: 0,0 V, velocidade de injeção: $277 \mu\text{L s}^{-1}$.



Na Figura 9, mostra que os volumes de injeção, apresentam diferentes comportamentos e que a resposta aumentou conforme o volume de injeção aumenta, isso ocorre devido à maior quantidade de H_2O_2 está sendo reduzido no eletrodo 3DGrE/PB. O 200 μL forneceu uma resposta de corrente mais alta, contudo a injeção de volume selecionada foi a de 100 μL pois obteve a resposta mais rápida (o tempo de resposta foi reduzido de $21 \pm 2 \text{ s}$ para $16 \pm 2 \text{ s}$ ($n = 3$)).

No estudo seguinte foi a construção de uma curva analítica a partir das injeções em triplicada de solução padrão de H_2O_2 1 – 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em 0,1 mol L^{-1} de PBS (pH = 7,4) / 0,1 mol L^{-1} KCl. A partir dos resultados foi construída uma curva analítica que esta apresentada na Figura 10.

Figura 10: (A) Respostas amperométricas obtidas em BIA, usando 3DGrE / PB, para injeções em triplicata de solução padrão de peróxido de hidrogênio 1– 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (a - m) em 0,1 mol L^{-1} PBS (pH = 7,4) / 0,1 mol L^{-1} KCl. Potencial: 0,0 V vs Ag / AgCl; volume de injeção: 100 μL ; velocidade de injeção: 277 $\mu\text{L s}^{-1}$. (B) Curva de calibração correspondente e em destaque a faixa linear obtida (1–700 $\mu\text{mol L}^{-1}$).



A Figura 10 apresenta as respostas amperométricas obtidas pelas injeções realizadas em triplicada das soluções padrões de peróxido de hidrogênio de 1 a 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e a curva de calibração correspondente. É possível observar que a linearidade obtida foi de 1 a 700 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com $R = 0,9982$. Para a concentração de 700 $\mu\text{mol L}^{-1}$, último ponto da linearidade, é possível notar no amperograma que há uma queda visível da primeira até a terceira injeção. Para as demais concentrações ocorre também a queda nos sinais de corrente para as três injeções, o que resultou na queda nos valores finais de corrente (média dos valores obtidos) para essas concentrações, sendo assim os valores de corrente obtidos não foram o suficiente para que esses pontos fizessem parte da faixa linear de trabalho, sendo somente até o ponto de 700 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os valores de limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), sensibilidade (inclinação) e frequência analítica (AF) foram obtidos a partir dessa curva e estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Parâmetros analíticos obtidos a partir de curvas de calibração amperométrica para peróxido de hidrogênio no sistema BIA usando eletrodo 3DGrE / PB.

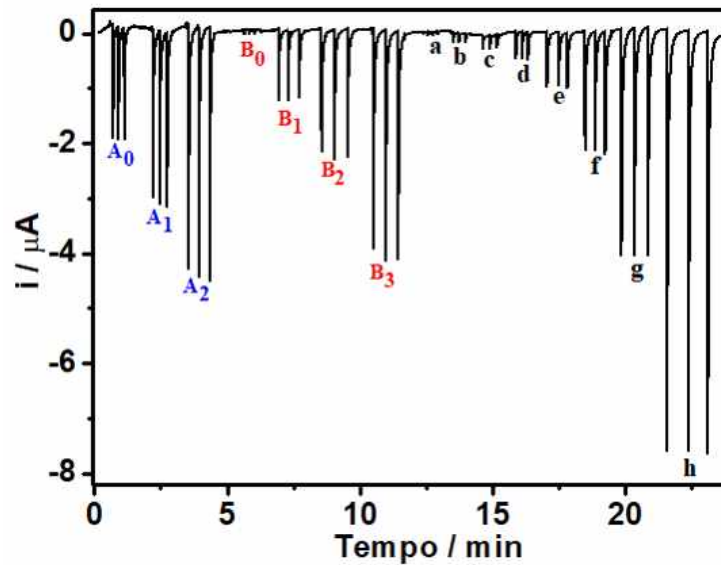
Eletrodo	Faixa Linear $\mu\text{mol L}^{-1}$	Sensibilidade $\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$	R	LOD $\mu\text{mol L}^{-1}$	LOQ $\mu\text{mol L}^{-1}$	RSD (%)	AF (h^{-1})
3DGrE / PB	1 - 700	0,0407	0,9982	0,111	0,371	4,23	87

RSD: Obtido pelo estudo de diferentes eletrodos ($n = 3$), desvio dos valores de corrente de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ das curvas analíticas.

A precisão eletrodo foi considerada com base no valor de desvio padrão relativo (RSD) da corrente para $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de H_2O_2 obtido em três eletrodos diferentes. O valor baixo RSD ($<5\%$) mostra uma alta precisão do método. Foi obtida uma ampla faixa linear para detecção de H_2O_2 com um valor LOD submicromolar, que é importante para realizar a detecção de resíduos de H_2O_2 em amostras de alimentos ou produtos de higiene. Após a escolha das condições para a análise amperométrica para a detecção de H_2O_2 usando o sistema BIA, foram analisadas duas amostras, sendo a primeira de enxaguante bucal, seguida da amostra de leite, foram feitas diluições simples usando um eletrólito suporte. A primeira amostra inclui H_2O_2 como agente clareador para clareamento dentário enquanto a segunda amostra pode conter resíduos de H_2O_2 oriundo de processos durante a produção, transporte e armazenamento do leite. Para avaliar a exatidão do sensor proposto, ambas as amostras foram fortificadas e analisadas.

A Figura 11 mostra o amperograma que foi obtido a partir do sistema BIA, onde foi feita a injeção das amostras puras e com a adição de valores de 25, 50 e $100 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Figura 11: Amperogramas obtidos em BIA, utilizando 3DGrE / PB de injeções de amostras puras (A0 e B0) e respectivas adições de 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (A1, B1), 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (A2, B2) e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (B3) de peróxido de hidrogênio. Injeções de soluções padrão de peróxido de hidrogênio (a - h) 1 - 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em 0,1 mol L^{-1} de PBS (pH = 7) / 0,1 mol L^{-1} KCl. Potencial: 0,0 V, volume de injeção: 100 μL ; velocidade de injeção: 277 $\mu\text{L s}^{-1}$.



A Tabela 2 mostra os valores de concentração encontrados em ambas as amostras no sistema BIA, as amostras foram fortificadas e analisadas e calculado valor de recuperação usado para estimar a exatidão do sensor.

Tabela 2: Concentrações de peróxido de hidrogênio obtidas no sistema BIA, valores de recuperação das amostras fortificadas e seus respectivos desvios-padrão (n = 3).

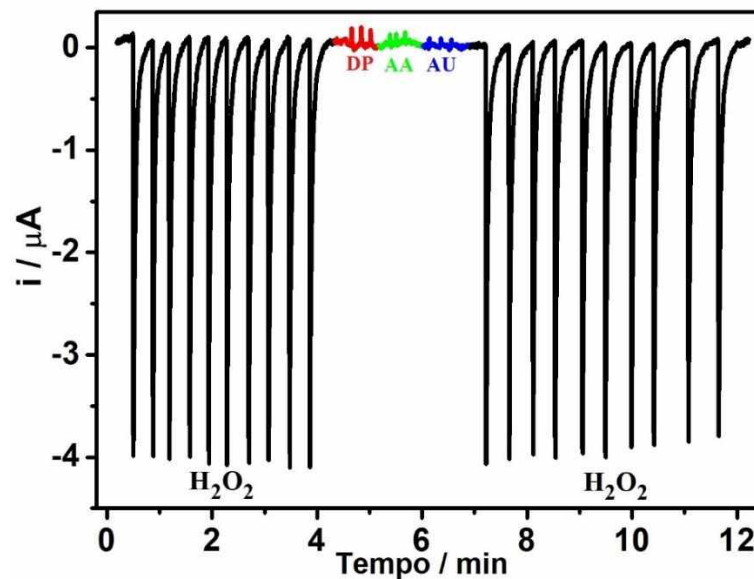
Amostras	Encontrado (mmol L^{-1})	H_2O_2 fortificado (mmol L^{-1})	Obtido (mmol L^{-1})	Recuperação (%)
Enxaguante Bucal	< LD	12,7	$13,3 \pm 0,8$	105 ± 6
		25,4	$30,5 \pm 1,2$	120 ± 4
		0,25	$0,29 \pm 0,01$	112 ± 3
Leite	$0,010 \pm 0,002^*$	0,50	$0,54 \pm 0,02$	106 ± 4
		1,0	$0,98 \pm 0,03$	97 ± 3

*Valores considerando o fator de diluição

Os resultados na Tabela 2 mostram valores de recuperação entre 97 e 120%, indicando boa uma exatidão do sensor para determinação de H_2O_2 em ambas as amostras. Também é possível observar na amostra de leite uma quantidade micromolar de H_2O_2 que indica a presença de resíduos de H_2O_2 . A amostra de enxaguante bucal apresentou um valor dentro da concentração limite de H_2O_2 adicionada a este tipo de produto que é de 3%.^[31]

Para observar uma possível interferência da dopamina (DA), ácido ascórbico (AA) e ácido úrico (UA) no 3DGrE / PB, foi realizada uma medição amperométrica com injeções em triplicata de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ H_2O_2 , seguido por $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ DA, $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ AA, $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ UA e $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ H_2O_2 apresentadas na Figura 12.

Figura 12: Amperograma obtido no sistema BIA, usando eletrodo 3DGrE / PB para injeções em triplicata de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de peróxido de hidrogênio, dopamina (DP), ácido ascórbico (AA) e ácido úrico (AU), respectivamente. Eletrólito $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ tampão fosfato (pH = 7) / $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ KCl, potencial aplicado: $0,0 \text{ V}$, volume de injeção: $100 \mu\text{L}$; velocidade de injeção $277 \mu\text{L s}^{-1}$.



Levando em conta a análise de amostras biológicas do sensor proposto juntamente com o sistema BIA, o estudo de interferência de dopamina, ácido ascórbico e ácido úrico nas medidas amperométricas foram avaliadas. A Figura 12 apresenta o resultado, no qual o sinal de corrente apresentado por essas moléculas pode ser desprezado, pois, não apresentam baixo sinal de corrente na redução, não interferindo nas análises de determinação do peróxido, já que o mesmo apresenta somente sinais de redução no potencial estudado.

5. CONCLUSÃO

Os valores de recuperação obtidos foram na faixa de 97% e 120% para a determinação de H_2O_2 em amostras reais de leite e enxaguante bucal. O eletrodo impresso em 3D e modificado com azul da Prússia mostrou-se bastante estável, reprodutível, sensível e seletivo para a determinação de H_2O_2 nas amostras complexas. A combinação do eletrodo impresso em 3D com o sistema BIA permitiu rapidez de análise e alta sensibilidade. O sistema analítico completo pode ser empregado para identificar adulteração de leite e no controle de qualidade de produtos farmacêuticos que contenham H_2O_2 .

REFERÊNCIAS

1. SILVA, Rodrigo Amorim Bezerra da et al. Determinação de peróxido de hidrogênio em antisséptico bucal usando um microdispositivo contendo partículas de Azul da Prússia. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 34, n. 6, p. 987-991, 2011.
2. Aune, T. M., and E. L. Thomas. 1977. Accumulation of hypothiocyanite ion during peroxidase-catalyzed oxidation of thiocyanate ion. *Eur. J. Biochem.* 80:209-214.
3. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 30.691 de 29/03/1952 e alterado pela última vez pelo Decreto nº 6.385, de 27 de fevereiro de 2008. Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal - RIISPOA. Diário Oficial [da] União, Brasília, DF, 27 fev. 2008. Seção 1, p. 10785
4. <https://cetesb.sp.gov.br/laboratorios/wp-content/uploads/sites/24/2018/06/Peroxido-hidrogenio.pdf>
5. Luo, F., Yin, J., Gao, F. et al. A non-enzyme hydrogen peroxide sensor based on core/shell silica nanoparticles using synchronous fluorescence spectroscopy. *Microchim Acta* 165, 23 (2009).
6. Shengmin Lu, Jun Song, Leslie Campbell-Palmer, A modified chemiluminescence method for hydrogen peroxide determination in apple fruit tissues, *Scientia Horticulturae*, Volume 120, Issue 3, 2009, Pages 336-341, ISSN 0304-4238.
7. Sunil, Kenchaiah & Narayana, Badiadka. (2008). Spectrophotometric Determination of Hydrogen Peroxide in Water and Cream Sample. *Bulletin of environmental contamination and toxicology.* 81. 422-6.
8. Daniel Rojas, Flavio Della Pelle, Michele Del Carlo, Michele d'Angelo, Reyes Dominguez-Benot, Annamaria Cimini, Alberto Escarpa, Dario Compagnone, Electrodeposited Prussian Blue on carbon black modified disposable electrodes for direct enzyme-free H₂O₂ sensing in a Parkinson's disease in vitro model, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 275, 2018, Pages 402-408, ISSN 0925-4005.
9. Karyakin, Arkady. (2017). Advances of Prussian Blue and its analogues in (bio)sensors. *Current Opinion in Electrochemistry.* 5. 10.1016/j.coelec.2017.07.006.
10. MONK, P. M. S., MORTIMER, R. J., ROSSEINSKY, D. R. *Electrochromism, fundamentals and applications.* Weinheim: VCH, 1955.
11. ASSIS, Lucas Marinho Nobrega de. Dispositivos eletrocromicos com azul da Prússia e eletrólitos sólidos poliméricos. 2016. Tese (Doutorado em Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidad de São Paulo, São Carlos, 2016

12. <https://pt.dreamstime.com/>
13. Neff, V. "Electrochemical Oxidation and Reduction of Thin Films of Prussian Blue." *Journal of The Electrochemical Society* 125 (1978): 886-887.
14. IVAMA, Viviane Midori. Desenvolvimento de eletrodos de pasta de carbono modificados com filmes de azul da prússia. 2003. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Instituto de Química, Universidad de São Paulo, São Paulo, 2003.
15. WANG, J., TAHA, Z. Batch injection analysis. **Analytical Chemistry**, v. 63, n. 10, p. 1053-1056, 1991.
16. QUINTINO, M. S. M., ANGNES, L. Batch injection analysis: An almost unexplored powerful tool. **Electroanalysis**, v. 16, n. 7, p. 513-523, 2004.
17. SANTOS, W. T. P., GIMENES, D. T., E. M., RICHTER, ANGNES, L. Análise por Injeção em Fluxo com Detecção Amperométrica de Múltiplos Pulsos: Potencialidades e Aplicações. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1753-1761, 2011.
18. SANTOS, Pâmyla Layene dos. Electrocatalytic properties of conventional and 3D-printed modified electrodes with graphene and its composites: electroanalytical and energy conversion applications. 2019
19. J.-Y. Lee, J. An, C.K. Chua, Fundamentals and applications of 3D printing for novel materials, *Appl. Mater. Today*. 7 (2017) 120–133.
20. X. Wei, D. Li, W. Jiang, Z. Gu, X. Wang, Z. Zhang, Z. Sun, 3D Printable Graphene Composite, *Sci. Rep.* 5 (2015) 11181.
21. R.M. Cardoso, D.M.H. Mendonça, W.P. Silva, M.N.T. Silva, E. Nossol, R.A.B. da Silva, E.M. Richter, R.A.A. Muñoz, 3D printing for electroanalysis: From multiuse electrochemical cells to sensors, *Anal. Chim. Acta.* (2018).
22. Katic V, Dos Santos PL, Dos Santos MF, et al: 3D printed graphene electrodes modified with Prussian blue: emerging electrochemical sensing platform for peroxide detection, *ACS Appl Mater Interfaces* 11:35068–35078, 2019.
23. PEDROTTI, J.J., ANGNES, L., and GUTZ, I.G.R. Miniaturized reference electrodes with microporous polymer junctions. **Electroanalysis**, v. 8, n.7, p. 673-675, 1996.
24. Karyakin, A.; Karyakina, E.; Gorton, L. Prussian-Blue-Based Amperometric Biosensors in Flow-Injection Analysis. *Talanta* 1996, 43 (9), 1597–1606.
25. Karyakin, A. A.; Karyakina, E. E.; Gorton, L. The Electrocatalytic Activity of Prussian Blue in Hydrogen Peroxide Reduction Studied Using a Wall-Jet Electrode with Continuous Flow. *J. Electroanal. Chem.* 1998, 456 (1–2), 97–104.

26. Cardoso, R. M.; Mendonça, D. M. H.; Silva, W. P.; Silva, M. N. T.; Nossol, E.; da Silva, R. A. B.; Richter, E. M.; Muñoz, R. A. A. 3D Printing for Electroanalysis: From Multiuse Electrochemical Cells to Sensors. *Anal. Chim. Acta* 2018, 1033, 49–57.
27. ROCHA, Diego Pessoa. Desenvolvimento e caracterização de eletrodos modificados com materiais nano-estruturados de carbono. 2020. 126 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2020.
28. WANG, J., CHEN, L., ANGNES, L., TIAN, B. M. Computerized pipettes with programmable dispensation for batch injection-analysis. *Analytica Chimica Acta*, v. 267, n. 1, p. 171-177, 1992.
29. OLIVEIRA, Thiago da Costa. Determinação de escopolamina em bebidas e urina empregando voltametria de onda quadrada e eletroforese capilar. 2019. 189 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019.
30. SILVA, R. A. B. **Caracterizações e aplicações analíticas de eletrodos compósitos modificados com Azul da Prússia e determinações simultâneas em sistemas de análise por injeção em batelada empregando somente um eletrodo de trabalho.** 2012. Dissertação (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2012.
31. <http://www.anfarmag.com.br/ler-comunicado/uso-de-enxaguatorio-bucal-contendo-peroxido-de-hidrogenio-a-1-em-consultorio-odontologico>