



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA

CLAUDIANE VITALINO SILVA

**MÉTODO ELETROQUÍMICO PARA DETERMINAÇÃO
DE 4-CLOROANILINA EM ANTISSEPTICOS A BASE DE
CLOREXIDINA.**

UBERLÂNDIA

2019

CLAUDIANE VITALINO SILVA

**MÉTODO ELETROQUÍMICO PARA DETERMINAÇÃO
DE 4-CLOROANILINA EM ANTISSEPTICOS A BASE DE
CLOREXIDINA.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Química da Universidade
Federal de Uberlândia como requisito parcial
para obtenção do título de Bacharel em
Química Industrial.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Alejandro
Abarza Muñoz.

UBERLÂNDIA

2019

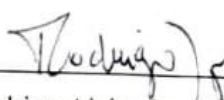
CLAUDIANE VITALINO SILVA

**MÉTODO ELETROQUÍMICO PARA
DETERMINAÇÃO DE 4-CLOROANILINA EM
ANTISSÉPTICOS A BASE DE CLOREXIDINA.**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de Química da
Universidade Federal de Uberlândia
como requisito parcial para obtenção do
título de Bacharel em Química Industrial.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Alejandro
Abarza Muñoz.

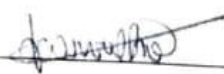
Banca de Avaliação:



Prof. Dr. Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz.
(Orientador)



Prof. Dr. João Flávio da Silveira Petrucci.
(Examinador)



Doutoranda Michelle Miranda Araújo de Carvalho Ribeiro.
(Examinadora)

Uberlândia, 20 de dezembro de 2019.

AGRADECIMENTOS:

A Deus, por ter me permitido chegar até aqui, ter me capacitado, me permitir ter saúde, sabedoria e paciência para vencer cada obstáculo que foi colocado nesses cinco anos de graduação, ter me permitido viver cada vitória, mas principalmente, ter me ensinado a lidar com os fracassos e mesmo assim, continuar tendo perseverança para chegar até o final e vivenciar essa vitória.

Aos meu pais, Erinon e Maria José por todo carinho, amor, paciência e companheirismo desde o meu nascimento até os dias de hoje, por todo apoio desde o começo da graduação até o final, por todas as palavras de incentivo ditas a mim quando eu mesma só pensava em desistir, pelas lágrimas que enxugaram do meu rosto e pela força que me deram, por serem sem sombra de dúvidas os melhores pais que poderia querer. Também gostaria de agradecer a minha irmã Emanuele por todo amor e carinho dedicados a mim nesses anos. Muito obrigada, sem vocês eu não teria chegado até aqui.

Ao meu esposo Fábio pela paciência, carinho e amor dedicados a mim nesses cinco anos de graduação, pelo apoio, força e coragem que me deu durante todos esses anos, sempre me colocando palavras da esperança e de conforto. Muito obrigada pelo amor dedicado a mim e por ser meu parceiro, amigo e marido, sempre me acompanhando nessa trajetória tão desafiante.

A minha querida avó Maria Cecília pelo carinho e amor em cada dia desses cinco anos, pela paciência e amor desde a minha infância até os dias de hoje, pelos dias que a senhora dedicou a mim, cuidando sempre de mim com muito carinho. Muito obrigada.

A minha prima e irmã Amanda pelo amor, carinho, companheirismo, paciência e apoio, obrigada por estar sempre ao meu lado, desde a infância até os dias de hoje, pela dedicação que sempre teve comigo, nos momentos bons e ruins. Muito obrigada

Ao meu orientador Prof. Dr. Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz pela excelente orientação durante todos esses anos de iniciação científica, por todos os ensinamentos transmitidos a mim, por ser além de um excelente orientador, mas também por entender minhas dificuldades não apenas relacionadas a pesquisa, mas também no setor pessoal da minha vida.

A Silvia pela paciência de acompanhar o meu trabalho, pelo tempo dedicado em me ajudar, por ter me auxiliado em tudo que precisava, ter me ensinado, solucionando minhas dúvidas, me ajudado a compreender melhor a pesquisa. Muito obrigada.

Aos meus amigos Érica, Maurício e Brenda pelo companheirismo, amizade e carinho durante esses cinco anos de graduação, obrigada por terem sido os melhores companheiros nessa jornada cheia de desafios, pelas palavras de otimismo, pelas risadas, pelos momentos de

desespero compartilhados e principalmente por terem se tornado não apenas amigos de graduação, mas sim amigos que levarei por toda a minha vida.

Aos membros da banca por terem aceitado meu convite para aperfeiçoarem meu trabalho.

Ao Nupe e ao Instituto de Química pela estrutura oferecida a mim para que eu pudesse realizar meu trabalho.

RESUMO

A utilização de moléculas com o objetivo de eliminar ou evitar a proliferação de microorganismos indesejáveis como bactérias tem sido de grande importância, pois esses microorganismos podem causar danos à saúde humana. Compostos químicos tais como a clorexidina (CRX) têm sido usados na composição de antissépticos, como sabonetes, enxaguatórios bucais. Apesar de ser verificada a alta eficiência desta substância como antisséptico, ela pode dar origem a produtos de degradação, como a 4-cloroanilina (4-CA), o principal subproduto formado, no qual estudos confirmaram seu potencial carcinogênico. Neste trabalho, estão expostos os resultados da determinação das concentrações de 4-cloroanilina em amostras comerciais de sabão de uso hospitalar e enxaguante bucal usando voltametria de onda quadrada (SWV) e eletrodo de diamante dopado com boro. Para a realização do procedimento experimental, utilizaram-se condições otimizadas para a melhor performance do experimento, tais como: a amplitude (60 mV), incremento de potencial (3 mV) e frequência (20 s^{-1}), com o auxílio da técnica de SWV e solução tampão Britton-Robinson (pH 6) $0,1\text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito suporte. A concentração de 4-cloroanilina na amostra de sabão hospitalar foi determinada pelos métodos adição de padrão. Estudos de adição e recuperação foram realizados para confirmar a ausência de efeito de matriz nas amostras analisadas. Os valores de recuperação ficaram na faixa de 100 a 112%. O teor de 4-cloroanilina encontrado na amostra de sabão, fora do prazo de validade, foi de $13,1\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$, enquanto que na amostra de enxaguante bucal, dentro do prazo de validade, não foram encontradas quantidades mensuráveis. O método resultou em um limite de detecção de $0,026\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$, limite de quantificação $0,86\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$, faixa linear entre 1 e $100\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ e DPR 5%.

Palavras-chave: Antisséptico. Voltametria de onda quadrada. Sabão. 4-cloroanilina. Clorexidina. Eletrodo de BDD.

ABSTRACT

The use of molecules in order to eliminate or prevent the proliferation of undesirable microorganisms such as bacteria has been of great importance, as these microorganisms can cause damage to human health. Chemical compounds such as chlorhexidine (CRX) have been used in the composition of antiseptics, such as soaps, mouthwashes. Despite the high efficiency of this substance as an antiseptic, it can give rise to degradation products, such as 4-chloroaniline (4-CA), the main by-product formed, in which studies confirmed its carcinogenic potential. In this work, the results of determining the concentrations of 4-chloroaniline in commercial samples of hospital soap and mouthwash using square wave voltammetry (SWV) and boron doped diamond electrode are exposed. To perform the experimental procedure, optimized conditions were used for the best performance of the experiment, such as: amplitude (60 mV), potential increase (3 mV) and frequency (20 s⁻¹), with the help of the technique of SWV and Britton-Robinson buffer solution (pH 6) 0.1 mol L⁻¹ as support electrolyte. The concentration of 4-chloroaniline in the hospital soap sample was determined by standard addition methods. Addition and recovery studies were performed to confirm the absence of matrix effect in the analyzed samples. The recovery values were in the range of 100 to 112%. The content of 4-chloroaniline found in the soap sample, outside the expiration date, was 13.1 µmol L⁻¹, while in the mouthwash sample, within the expiration date, no measurable quantities were found. The method resulted in a detection limit of 0.026 µmol L⁻¹, quantification limit 0.86 µmol L⁻¹, linear range between 1 and 100 µmol L⁻¹ and 5% DPR.

Keywords: Antiseptic. Square wave voltammetry. Soap. 4-chloroaniline. Chlorhexidine. BDD electrode.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química da Clorexidina.	13
Figura 2: Produtos e subprodutos da clorexidina	15
Figura 3: Fórmula estrutural da 4-cloroanilina.....	16
Figura 4: Os sinais de excitação mais utilizados em técnicas voltamétricas (potencial vs tempo).	23
Figura 5: Potencial vs Tempo em voltametria de onda quadrada.	24
Figura 6: A forma do potencial aplicado e a corrente resultante em voltametria de onda quadrada (corrente vs tempo).	24
Figura 7: Esquema de montagem dos eletrodos referência, auxiliar e trabalho.....	27
Figura 8: Célula utilizada para a realização das análises constituída de ABS (acrilonitrilo butadieno estireno) com capacidade de 10 mL.	31
Figura 9: Esboço da montagem dos eletrodos na célula, em que (c) é a célula eletroquímica, (d) é o eletrodo de trabalho, (e) eletrodo auxiliar e (f) eletrodo de referência .	31
Figura 10: Voltamogramas cíclicos obtidos para 1 mmol L ⁻¹ 4-cloroanilina em BDD sem tratamento (linha preta) e com tratamento catódico (linha vermelha) e anódico (linha azul) em solução tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ , com pH (A) 2, (B) 4 e (C) 6.	33
Figura 11: Estudo de otimização da amplitude (10 a 100 mV) e condições experimentais: 10 µmol L ⁻¹ 4-cloroanilina ; Eletrólito suporte Britton-Robinson (pH 6) 0,1 mol L ⁻¹ ; incremento de potencial 5 mV; Frequência: 20 s ⁻¹	35
Figura 12: Estudo de otimização do incremento de potencial (2 a 10 mV) e condições experimentais: 10 µmol L ⁻¹ 4-cloroanilina ; Eletrólito suporte: Britton-Robinson (pH 6) 0,1 mol L ⁻¹ ; Amplitude: 60 mV ; Frequência: 20 s ⁻¹	36
Figura 13: Estudo de otimização da frequência (8 a 100 s ⁻¹) e condições experimentais: 10 µmol L ⁻¹ 4-cloroanilina ; Eletrólito suporte: Britton-Robinson (pH 6) 0,1 mol L ⁻¹ ; Amplitude: 60 mV ; incremento de potencial: 3 mV	37
Figura 14: Respostas de SWV para concentrações crescentes (1 – 100 µmol L ⁻¹) de 4-cloroanilina na presença 50 µmol L ⁻¹ de clorexidina (CRX).	39
Figura 15: Curva de calibração para concentrações crescentes (1 – 100 µmol L ⁻¹) de 4-cloroanilina na presença 50 µmol L ⁻¹ de CRX.	40
Figura 16: Estudos de repetitividade para a análise de 4-cloroanilina (10 µmol L ⁻¹) em BDD tratado catodicamente utilizando SWV.....	41

Figura 17: Voltamograma obtido para determinação de concentração de 4-cloroanilina em amostra de sabão hospitalar pelo método de adição de padrão, amostra (linha preta) e 3 injeções $15 \mu\text{mol L}^{-1}$ de um estoque de 4-cloroanilina diretamente na célula (linhas vermelha, azul e verde).....42

Figura 18: Curva de calibração obtida pela altura dos picos dos sinais eletroquímicos do voltamograma para o método adição de padrão. 43

Figura 19: Voltamograma obtido para determinação de concentração de 4-cloroanilina em amostra de sabão hospitalar pelo método de adição e recuperação, amostra dopada com $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ (linha preta) e três adições de $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ de solução padrão de 4-cloroanilina.....44

Figura 20: Curva de calibração obtida pela altura dos picos dos sinais eletroquímicos do voltamograma para o método adição e recuperação.....45

Figura 21: Voltamograma obtido para determinação de concentração de 4-cloroanilina em amostra de enxaguante bucal por adição de padrão com quatro adições de solução estoque de 10 mmol L^{-1} de 4-cloroanilina, amostra (linha preta) e realizou-se a 3 adições de $5 \mu\text{mol L}^{-1}$, (linhas vermelha, verde e azul). 46

Figura 22: Curva de calibração obtida pela altura dos picos dos sinais eletroquímicos do voltamograma para o método adição de padrão. 47

Figura 23: Voltamograma obtido para determinação de concentração de 4-cloroanilina em amostra de enxaguante bucal por adição e recuperação, amostra dopada com $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ em 9 ml de eletrólito suporte na célula eletroquímica (linha preta), 3 incrementos de concentração de $5 \mu\text{mol L}^{-1}$, (linha verde, vermelha e azul). 48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados obtidos para as otimizações dos parametros de SWV a serem utilizados para a análise utilizando-se de solução de Britton-Robinson (BR) 0,1 mol L ⁻¹	38
Tabela 2: Resultados das concentrações de 4-cloroanilina na presença de clorexidina pelos metodos adição de padrão e adição e recuperação.....	45
Tabela 3: Resultados das concentrações de 4-cloroanilina na presença de clorexidina pelos metodos adição de padrão e adição e recuperação.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ABS – acrilonitrilo butadieno estireno

BDD – do inglês, *boron doped diamond* – diamante dopado com boro

DPR – desvio padrão relativo.

CRX – Clorexidina

4 – 4-Cloroanilina

HPLC – do inglês, *high performace liquid chromatography* – cromatografia líquida de alto desempenho.

LD – limite de detecção

LQ – limite de quantificação.

SWV – do inglês, *square wave voltammetry* – voltametria de onda quadrada

SUMÁRIO

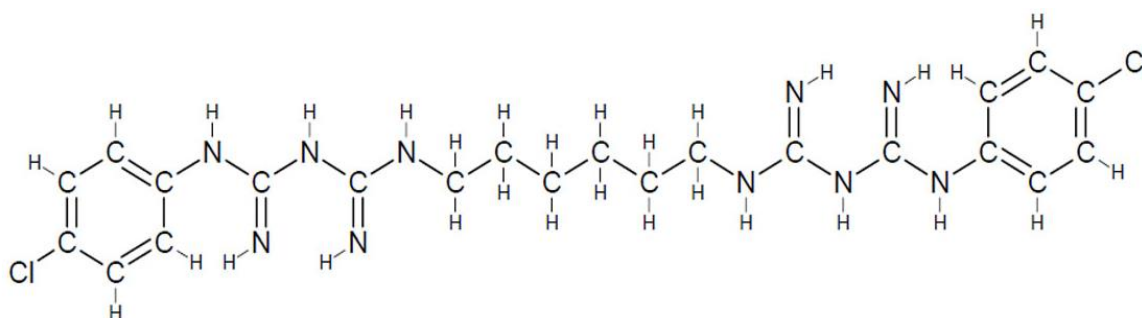
1	INTRODUÇÃO	13
1.1	CLOREXIDINA.....	13
1.2	4- CLOROANILINA	16
1.3	Métodos de análise aplicados à determinação de aminas aromáticas.....	18
1.4	Técnicas eletroanalíticas.....	21
1.4.1	<i>Voltametria de Onda Quadrada.....</i>	<i>22</i>
1.4.2	<i>Eletrodo de Diamante Dopado com Boro (BDD)</i>	<i>26</i>
1.4.3	<i>Eletrodos auxiliar e referência.</i>	<i>27</i>
1.5	Técnicas voltamétricas aplicadas na Indústria.	28
2	Objetivo:.....	29
3	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	30
3.1	Reagentes e soluções	30
3.2	Instrumentação	30
3.2.1	<i>Análises eletroquímicas</i>	<i>32</i>
3.2.2	<i>Procedimento para ativação do eletrodo</i>	<i>32</i>
4	Resultado e Discussões	33
4.1	Aplicação em amostras	41
5	CONCLUSÃO	50
6	REFERÊNCIAS	50

1 INTRODUÇÃO

1.1 CLOREXIDINA

A molécula possui nome IUPAC 1,1-hexametileno-bis- [5- (p-clorofenil) -biguanida] -digluconato, também conhecida como digluconato de clorexidina, possui estabilidade dentro do organismo humano e ao ser utilizada nas dosagens recomendadas não possui toxicidade ao organismo. Sua atuação na eliminação de bactérias se dá na reação das moléculas de clorexidina com as membranas citoplasmáticas das bactérias, levando a liberação do ácido nucleico e ocasionando a morte dos microrganismos. A clorexidina age como uma substância antimicrobiana, que mostra maior efetividade de atuação no controle na eliminação de bactérias patogênicas na mucosa oral (KLUK; PEREIRA, 1984). Os grupos dos sais de clorexidina atuam de forma a evitar ou diminuir os microrganismos presentes. A Figura 1 esboça a estrutura química na fórmula condensada da clorexidina.

Figura 1: Estrutura química da Clorexidina.



Fonte: PUBCHEM, 2008.

A clorexidina, parte positiva do sal digluconato de clorexidina, possui fórmula molecular $C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$ e desempenha um papel importante no combate de microrganismos nocivos à saúde humana, como é o caso do o *Streptococcus Mutans*, o principal causador de doenças dentárias como a cárie (DE SOUZA et al., 2004).

Também se utiliza a molécula em prevenções de contaminações que causam infecções cruzadas, que consistem na transmissão de microrganismos de pessoa para pessoa utilizando-se de mesmos equipamentos, sem as devidas desinfecções adequadas para tais (ZENKNER, 2006) , de modo que a desinfecção desses equipamentos utilizados, como no caso de medicina

odontológica, é de suma importância para garantir a eliminação de microrganismos e evitar assim as infecções cruzadas, assegurando a desinfecção de superfícies para a garantia de uma melhor higienização. Levando-se em consideração a quantidade elevada de superfícies operatórias utilizadas em processos odontológicos, tais objetos precisam ser desinfetados com o auxílio de desinfetantes que atuam com etapas de assepsia bastante efetivas.

Alguns trabalhos destacam a importância do uso da clorexidina como uma substância com capacidade de eliminação de microrganismos de forma satisfatória. (ANDREA MOREIRA JACOBUECCI BAMBACE, 2008) destaca a superioridade de desinfecção de soluções de clorexidina em concentrações de 0,5% a 4% em comparação com álcool 70% gel e líquido em superfícies contaminadas com *Cepas de Streptococcus mutans, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Candida albicans e Klebsiella*, e constatou-se também uma melhor viabilidade econômica das soluções de clorexidina em comparação com o método de desinfecção mais utilizado, o álcool 70%.

Outros estudos mostram também a eficácia da clorexidina na prevenção de pneumonia associada à ventilação mecânica (BERALDO, CAROLINA et al 2008), que consiste em uma infecção bastante frequente nas Unidades de Terapia Intensiva (UTI) na qual antissépticos a base de clorexidina foram utilizados em pacientes submetidos em UTI e notou-se que a inserção de clorexidina levou à eliminação da colonização de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* na região da orofaringe, o que culminou em uma redução de 50% da pneumonia associada a ventilação mecânica.

Tratando-se de assepsia, outros trabalhos mostram o efeito da clorexidina na mucosite induzida por radioterapia em câncer de cabeça e pescoço (LABBATE et al., 2003). A radioterapia em pacientes que possuem neoplasias (que consiste em uma multiplicação anormal e descontrolada em um determinado tecido), especificamente na cabeça e pescoço causam alterações na mucosa oral devido à radiação que atinge também a esses mucos. Para a proteção dessa mucosa, tal estudo verificou o efeito protetor do gluconato de clorexidina na mucosa oral de pacientes submetidos a processos de radioterapia. Determinados grupos de pacientes receberam doses de enxaguante bucal a base de clorexidina em bochechos diários. Os resultados observados foram a diminuição das lesões encontradas na mucosa da boca devido a diminuição da atuação de microrganismos no agravamento dessas lesões.

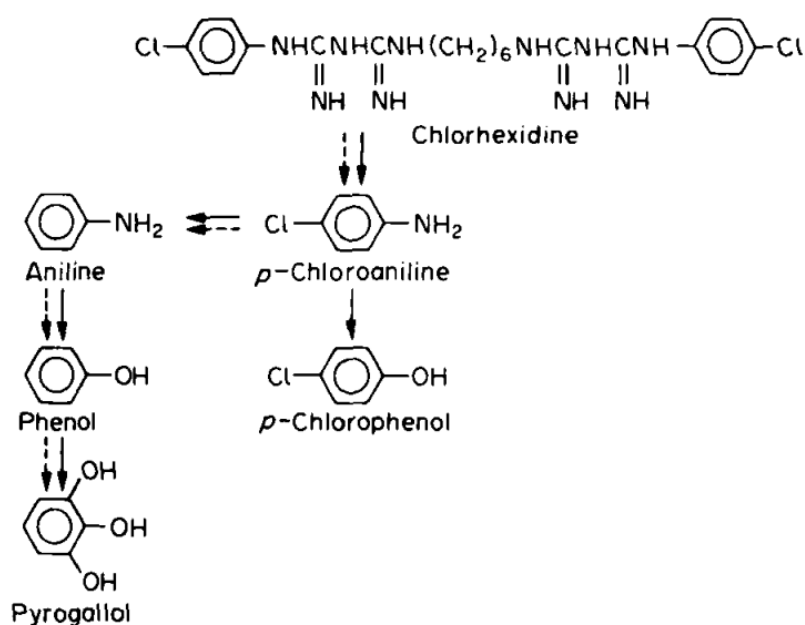
Dessa forma, o composto é alvo de muitos outros estudos, pois a aplicação da molécula em produtos antissépticos resulta em um excelente resultado no combate a microrganismos prejudiciais à saúde humana, de tal modo que a molécula pode ser encontrada em enxaguantes

buciais, sabões, e detergentes para a diminuição da ação desses microrganismos (SILVA et al., 1999).

Apesar dos vários benefícios que o uso de determinadas concentrações de clorexidina em produtos de higiene pessoal, a mesma pode apresentar alguns efeitos colaterais como manchas na superfície dos dentes e seu uso prolongado pode causar alteração no paladar (GOLLY; HLAVICA, 1983). O estudo investigou os efeitos colaterais da clorexidina presente em enxaguantes bucais nas concentrações de 0,1% e 0,2% em determinado grupo de pacientes e mostrou que a clorexidina causou efeitos negativos como o desgaste da placa dentária e inflamação gengival, assim como a alteração da coloração dos dentes.

Outros malefícios são os produtos de degradação da clorexidina, que pode ocorrer por exposição a luz, tais como a 4-cloroanilina, que possui também como produto de degradação o 1-cloro-4-nitrobenzeno (BELOW; LEHAN; KRAMER, 2004). Outros produtos de degradação da clorexidina são o pirogalol, fenol e p-clorofenol (OGASE et al., 1992), no qual foram identificados os produtos e subprodutos da clorexidina utilizando-se catalisadores para aumentar a velocidade da degradação e a quantificação foi realizada com o auxílio de um equipamento de Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC). A Figura 2 esboça os produtos e subprodutos encontrados da degradação da clorexidina.

Figura 2: Produtos e subprodutos da clorexidina

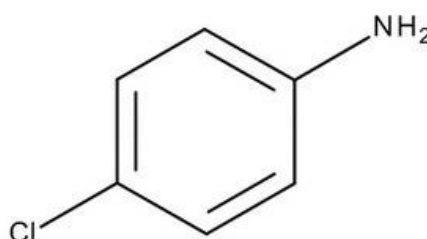


Fonte: OGASE et al 1992.

1.2 4- CLOROANILINA

Dentre os produtos de degradação da clorexidina, a 4-cloroanilina, composto organoclorado que possui fórmula molecular C_6H_5Cl e fórmula estrutural ilustrada na Figura 3, é bastante utilizada na formulação de pesticidas, herbicidas e corantes e apresenta destaque por ser o produto majoritário da degradação da clorexidina em contato com a luz.

Figura 3: Fórmula estrutural da 4-cloroanilina.



Fonte: Sigma-Aldrich, 2008

Estudos verificaram a estabilidade da clorexidina quando exposta a luz, em colírios oftalmológicos com uma concentração de 0,02% de clorexidina (LIN et al., 2015). A concentração de clorexidina se manteve inalterada quando submetida a exposição à luz após seis meses da fabricação do colírio, quando mantido fechado, verificada com o auxílio de um método HPLC e, após aberto, a concentração se manteve em um mês após a fabricação e posterior abertura do produto. Após esses períodos, foi verificada a diminuição da concentração de clorexidina dos produtos, mostrando assim sua possível degradação devido a exposição à luz e o contato com o ar atmosférico.

O estudo *in vitro* com hepatócitos humanos (PIZON et al., 2009) mostrou que ao entrar no organismo humano, seja por via respiratória, ingerido ou em contato cutâneo, esta pode causar doenças como a metemoglobinemia, condição clínica originada pela conversão excessiva da hemoglobina em metahemoglobina, que ocorre quando a hemoglobina é oxidada em uma velocidade maior que a capacidade enzimática normal para a redução da hemoglobina, que a torna incapaz de ligar-se e transportar oxigênio. A metahemoglobina é formada quando o ferro da molécula heme é oxidado do estado ferroso (Fe^{2+}) para o estado férrico (Fe^{3+}).

Outro caso relatado na literatura de intoxicação por 4-cloroanilina e consequentemente, o desenvolvimento de metahemoglobiemia ocorreu após uma gestante com idade de 22 anos ingerir uma mistura de 50 mL de herbicida contendo monolinuron, substância com nome IUPAC 3- (4-clorofenil) -1-metoxi-1-metiluréia, no qual, ao ser metabolizado pelo organismo, gera como principal produto a 4-cloroanilina. A ingestão de tal herbicida levou a paciente ao desenvolvimento de metemoglobiemia devido a presença da 4-cloroanilina como metabólito principal do constituinte do herbicida (YANG et al., 1995).

Os efeitos da 4-cloroanilina sobre a hemoglobina também foram investigados em outros estudos. Em um deles, realizados em coelhos com o sangue recém colhido, as moléculas de hemoglobina foram isoladas e colocadas em contato com soluções contendo concentrações de 0,1% a 5% de 4-cloroanilina e observou-se a oxidação causada na 4-cloroanilina em reações com a hemoglobina contida no sangue. O experimento realizado *in vitro* simulou as condições reacionais dos organismos vivos, incluindo faixa de pH e temperatura e constatou-se que a bioativação de anilinas aromáticas, em destaque a 4-cloroanilina, são favorecidas nos glóbulos vermelhos e, após serem oxidadas, as anilinas tornam-se mutagênicas e carcinógenos potentes. (GOLLY; HLAVICA, 1983).

Outros estudos feitos sobre a toxicidade da 4-cloroanilina mostram que doses de 2 a 18 mg/kg de peso corporal, administradas com uma frequência de 5 dias na semana em um intervalo de tempo referente a seis meses, causaram em um grupo de ratos a ocorrência de doenças como anemia hemolítica e o aumento da metahemoglobina assim como o aparecimento de sarcomas no baço, feocromocitomas nas glândulas suprarrenais, adenomas ou carcinomas hepatocelulares e hemangiossarcomas no fígado. Tal estudo evidência o alto poder cancerígeno deste composto quando em contato com organismos vivos (R.S.CHHABRA; A.C.PETERS, 1991). O desenvolvimento das células cancerígenas se deve ao fato de que a anilina presente na 4-cloroanilina se ligar as proteínas do DNA das células dos ratos envolvidos. Esse processo ainda está sendo estudado para elucidar quais as interações que esta molécula é capaz de provocar no DNA.

Alguns outros trabalhos também destacam o potencial cancerígeno da 4-cloroanilina em seres vivos (WARD; REZNIK; GARNER, 1980). Neste estudo, utilizou-se um grupo de 50 ratos machos inserindo em sua dieta 500 mg/kg de 4-cloroanilina por um intervalo de tempo de 20 dias. Dos 50 ratos do grupo de estudo, 18 desenvolveram lesões no baço, como fibrose parenquimatosa e infiltração gordurosa, também se detectou fribrossarcomas, (tumor maligno com origem nos fibroblastos), osteossarcomas (tumores no tecido conjuntivo) e hemangiossarcomas (tumor maligno nas células endoteliais). Os demais 32 ratos dosados

apresentaram fibrose local e difusa, diferentemente do grupo de controle, que não recebeu o composto químico em sua dieta e não apresentou nenhuma alteração em seu organismo.

Devido aos vários estudos realizados sobre a toxicidade da 4-cloroanilina, principal produto da degradação da clorexidina, a United States Pharmacopeial Convention (USP) estabeleceu um limite menor que 3 ppm para o nível de 4-cloroanilina em soluções que utilizam clorexidina em sua composição. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) também estipula uma dosagem máxima de 4-cloroanilina de 0,03 g/kg em produtos que utilizam clorexidina e ou 4-cloroanilina em sua composição (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA, 2018).

1.3 Métodos de análise aplicados à determinação de aminas aromáticas.

Atualmente, existem muitos estudos para a determinação de aminas aromáticas, pois seu monitoramento é essencial para a saúde humana. Para isso, vários métodos analíticos são utilizados para o controle de qualidade dos produtos que utilizam a clorexidina como agente antisséptico e os mais consolidados, segundo a literatura, são os métodos cromatográficos. (SKOOG, D. A; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A., 5ª edição, 2006).

O uso de técnicas analíticas como a cromatografia possuem a finalidade de separação e/ou purificação de misturas em amostras ou não, no qual os componentes de uma mistura são separados com base nas diferenças de velocidade nas quais são transportados através de uma fase móvel (líquido ou gás), fixo por uma fase estacionária que quando acopladas a detectores como UV/Vis ou detectores de massa podem fornecer informações sobre determinado tipo de substância analisada. (SKOOG, D. A; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A., 5ª edição, 2006).

Para a análise de aminas aromáticas, os métodos mais discutidos pela literatura são a Cromatografia Gasosa (GC) e Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC). A cromatografia gasosa utiliza-se do princípio de vaporização da amostra para ser injetada no topo de uma coluna cromatográfica. A eluição é realizada pelo fluxo de gás inerte que neste caso, atua como fase móvel, transportando o analito de interesse através da coluna. Já a HPLC é a mais utilizada quando se trata de técnicas analíticas de separação, devido a sua alta eficiência, excelente sensibilidade, fácil adaptação para determinação quantitativa de amostras de grande interesse para a indústria. Sua diferença das demais técnicas de cromatografia líquida está no tamanho reduzido das partículas presentes na fase estacionária, o que agrega na técnica as qualidades necessárias para a realização de uma excelente análise (SKOOG, D. A; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A., 5ª edição, 2006). Entretanto, as técnicas analíticas de GC e HPLC

possuem equipamentos com valores bastante elevados, devida a alta complexidade dos equipamentos envolvidos.

Por serem técnicas bastante difundidas e que apresentam bons resultados, alguns trabalhos associando técnicas de microextração líquido-líquido dispersiva combinada com a detecção de comprimento de onda com o auxílio de HPLC foram utilizados na determinação de quatro aminas aromáticas, sendo elas p-toluidina, o-cloroanilina, p-cloroanilina e p-bromoanilina em amostras de água de lagos e rios. A metodologia aplicada obteve bons resultados pelo método proposto e as recuperações relativas ficaram na faixa de 85,4–111,7% e 90,2–101,3%, respectivamente (LIN et al., 2015).

Outros trabalhos utilizaram de técnicas de HPLC com detecção UV para determinar aminas aromáticas formadas após a redução de corantes utilizados em brinquedos de plásticos com o auxílio de Ditionito de Sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) na clivagem redutiva do grupo azo de corantes, liberando assim as aminas formadas por essa reação, que posteriormente foram analisadas pela técnica de HPLC. A produção de diferentes tipos de aminas aromáticas foi relacionada aos diferentes tipos de corantes analisados. (GARRIGÓS et al., 2002).

Outro trabalho também utilizou da HPLC para analisar qualitativamente e quantitativamente as aminas aromáticas de corantes azóicos considerados perigosos pelo alto índice de toxicidade e, por esta razão, foram proibidos em países pertencentes à União Europeia de serem utilizados na indústria têxtil e de produção de azulejos. São eles o Ácido Vermelho 85 e Azul Direto 6 como principais corantes (BIALA, BIELSKO et al 2002). O estudo analisou sete azo-corantes (que possuem o grupo $\text{N}=\text{N}$) no qual a estrutura química possuía aminas aromáticas como a benzidina. As aminas determinadas pelo estudo foram p-fenilenodiamina, anilina e benzidina.

Uma metodologia utilizando HPLC também foi desenvolvida para a determinação de aminas aromáticas em produtos alimentícios ricos em proteínas e que, ao serem processados com o auxílio de calor, podem causar a formação de aminas aromáticas, que por sua vez são prejudiciais à saúde por possuírem alto potencial carcinogênico, fazendo-se necessário o controle dessas espécies nos alimentos. A quantificação dessas aminas nos alimentos nesse estudo se deu inicialmente em uma extração em fase sólida automatizada e posteriormente analisadas por HPLC com detecção UV e os resultados obtidos na determinação de aminas em produtos alimentícios a base de carne animal foram satisfatórios (FAY; ALI; GROSS, 1997).

Utilizando-se outras técnicas para a determinação de anilinas aromáticas, alguns trabalhos utilizam-se de GC com detecção utilizando-se espectrometria de massa (GC-MS) e microextração em fase sólida para determinar quantitativamente derivados da anilina

(*o*-toluidina, *p*-cloroanilina, 2,4-di-cloroanilina, 2,5-dicloroanilina, 3,4-dicloroanilina e 3,5-dicloroanilina) em amostras de água de rios e lagos. O método utilizado se mostrou eficiente para a determinação de anilinas aromáticas, com linearidade no intervalo de 0,05 a 5 mg L⁻¹ e reprodutibilidade com coeficiente de variação de 5% para as amostras de água analisadas, sendo aplicável em amostras reais sem necessidade de etapa de pré-tratamento adicional. (MÜLLER; FATTORE; BENFENATI, 1997).

Ainda utilizando GC-MS, outro estudo permitiu a análise de amostras reais para a determinação de amins aromáticas (WEISS; ANGERER, 2002). Em amostras de urina humana, foi realizada determinação simultânea qualitativa e quantitativa de várias amins aromáticas e compostos nitro com o auxílio deste método, como toluidinas, 4-isopropilanilina, *o*-anisidina, 3- e 4-cloroanilina, 4-bromoanilina, amino-nitrotoluenos, aminodinitrotoluenos, 3,5- e 3,4-dicloroanilina, *a*- e *b*-naftilamina e 4-aminodifenilo. A separação da matriz urinária foi realizada por extração líquido-líquido e com a análise por GC-MS, com limites de detecção dentro da faixa de 0,05 a 2 mg L⁻¹ para as amins aromáticas e compostos nitro e reprodutibilidade de 13,6%, comprovando assim a eficiência do método para se determinar amins aromáticas e compostos nitro em urina humana.

Outro trabalho realizou a determinação simultânea de diaminas (1,3-diaminopropano, putrescina e cadaverina), poliaminas (espermidina e espermina) e das amins aromáticas (*b*-feniletilamina e tiramina) encontradas em vinhos do Porto e sucos de uva. A preparação das amostras foi feita com a extração por par iônico das amins presentes na amostra por meio do reagente de pareamento de íons bis-2-etilhexilfosfato e ácido clorídrico diluído. O extrato clorídrico obtido foi evaporado e as amins foram isoladas com anidrido heptafluorobutírico e analisado por GC-MS. Os dados obtidos pelo método apresentaram boa linearidade, repetibilidade e recuperação para as amins analisadas nas amostras. (RIBEIRO et al., 2016).

Um procedimento utilizando GC combinada com captura de elétrons de íons negativos foi empregado na identificação de 63 amins aromáticas, como anilinas substituídas com cloro e nitro, benzidinas, aminonaftalenos e aminobifenilos, no qual as amins foram derivatizadas pela reação com anidrido heptafluorobutírico. A linearidade da técnica aplicada em amostras de água subterrânea foi satisfatória para todos os compostos analisados e os limites de detecção foram compreendidos entre 0,3 a 66,4 mg L⁻¹ (LONGO; CAVALLARO, 1996).

Para facilitar o processo de determinação de amins aromáticas em amostras de água de rio que recebem efluentes de fábricas de tintas e corantes de alimentos, (JAIN et al., 2013), introduziu em suas estruturas iodo e outros substituintes que promovem a remoção de elétrons para proporcionar uma melhor extração em fase líquida, afim de melhorar a separação por GC.

Tal procedimento forneceu bons resultados para a identificação de aminas aromáticas, com coeficiente de correlação linear de 0,9939 e limite de detecção médio de $25 \mu\text{g L}^{-1}$.

Embora apresentem várias vantagens, tais técnicas possuem algumas desvantagens relacionadas principalmente ao elevado tempo para a geração de resultados satisfatórios e alto custo para seu funcionamento. Uma alternativa para minimizar estes problemas e realizar determinação de aminas aromáticas, como a 4-cloroanilina, de maneira eficiente e com menor custo, consiste na utilização de técnicas eletroanalíticas, na qual suas características permitem estabelecer uma relação direta entre a concentração do analito de interesse e a corrente gerada no processo de eletrólise em célula eletroquímica. As medidas dessas propriedades são obtidas de forma simples, sem a necessidade de utilização de equipamentos com alto valor e de difícil manuseio.

1.4 Técnicas eletroanalíticas

Para se obter análises com um menor custo e que proporcionem de maneira efetiva bons resultados, as técnicas eletroanalíticas ganham bastante destaque, sendo cada vez mais utilizadas e em algumas vezes, consideradas superiores a técnicas bastante conhecidas, como ensaios espectrofotométricos, por possuírem maior sensibilidade, se tratarem de equipamentos portáteis e de fácil manuseio (BURATTI et al., 2008). Tais técnicas fornecem limites de detecção baixos e uma grande quantidade de informações que ajudam a entender eletroquimicamente os sistemas analisados. Os resultados obtidos pelas técnicas eletroanalíticas dependem da superfície eletródica, que devem apresentar boa reprodutibilidade e razão entre sinal/ruído elevada. (SKOOG, D. A; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A., 5ª edição, 2006).

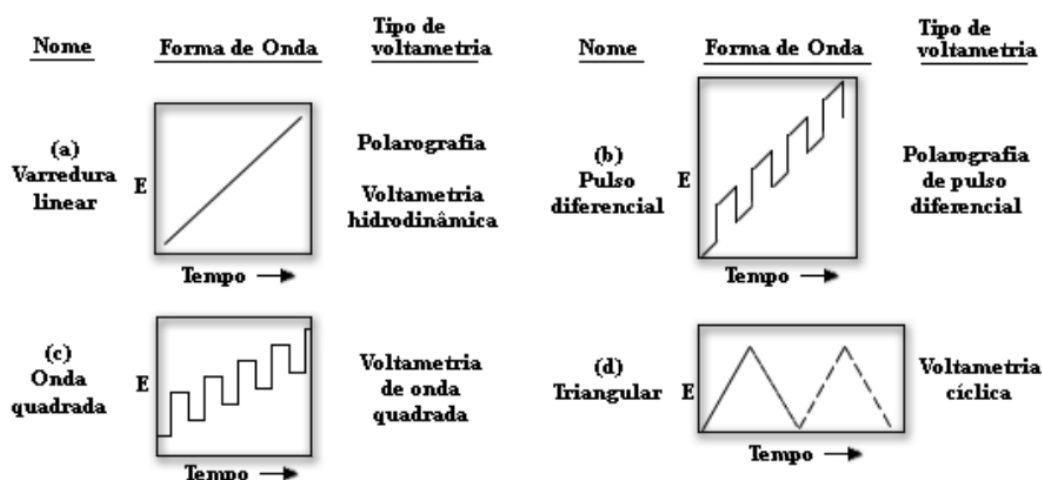
Ainda, as medidas eletroquímicas também permitem a obtenção de parâmetros físico-químicos bastante relevantes para as análises, como descrever o potencial, a taxa de transferência de elétrons, a quantidade de elétrons envolvidos nas reações, entre outras. Para analisar tais parâmetros, o eletrodo de trabalho (que faz contato com o analito, através de um potencial desejado e facilita a transferência de elétrons) necessita de dois fatores: do comportamento redox do analito e das correntes residuais obtidas no intervalo de potencial avaliado. Outros parâmetros a serem avaliados para se utilizar de técnicas eletroanalíticas são a janela de potencial de trabalho, condutividade elétrica, reprodutibilidade da superfície, as propriedades mecânicas, o custo de fabricação, a disponibilidade e toxicidade. (WANG, J et al 3ª edição 1985).

A escolha do material presente no eletrodo de trabalho é de grande importância devido ao fato de que as respostas esperadas para as análises são obtidas por meio das reações redox que ocorrem na superfície ou na interface da solução/eletrodo, de tal forma que o analito estudado pode interagir com superfície do eletrodo ocasionando assim a transferência de elétrons. Contudo a velocidade dessa transferência pode interferir na resposta obtida, pois, se a transferência ocorrer de maneira lenta ou em um valor de potencial que não esteja dentro da janela de potencial do eletrodo utilizado, pode-se ser necessário a modificação da superfície do eletrodo com o objetivo de se melhorar a resposta final, devido as alterações das interações do analito de interesse com a superfície modificada.

1.4.1 Voltametria de Onda Quadrada.

Uma das técnicas utilizadas nesse trabalho é a voltametria de onda quadrada (SWV), uma das técnicas voltamétricas baseadas nos fenômenos que ocorrem na interface entre a superfície do eletrodo de trabalho e a camada fina de solução adjacente a essa superfície. Para cada técnica voltamétrica utilizada, a forma como o potencial varia com o tempo será diferente, e essa diferença possibilita as características de cada técnica voltamétrica. A Figura 3 mostra essas funções de potencial em função do tempo, chamados de sinais de excitação e suas diferentes formas de onda que podem ser aplicadas no eletrodo. Uma delas é a voltametria de onda quadrada, que é uma das técnicas que se utiliza do princípio de voltametria de pulso, que, após a aplicação dos pulsos de potencial a corrente capacitiva se extingue mais rapidamente que a componente faradaica, sendo o sinal analítico mensurado ao final da aplicação. (SKOOG, D. A; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A., 6ª edição, 2006).

Figura 4: Os sinais de excitação mais utilizados em técnicas voltamétricas (potencial vs tempo).

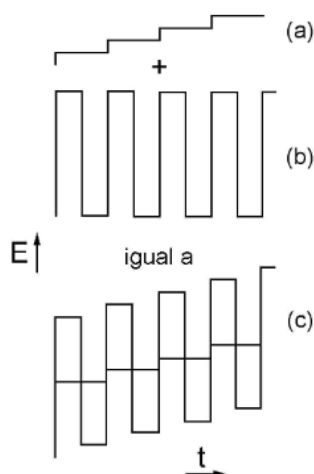


Fonte: Skoog et al (2006, p.518).

Para aumentar a velocidade e a sensibilidade, muitas formas de modulação em potencial são utilizadas, no qual o pico formado é resultado de uma sobreposição do pulso direto da onda quadrada com o início do degrau da rampa e o pulso reverso da onda quadrada se sobrepõe com a metade da etapa da rampa em degraus, formando assim uma rampa de potencial na forma de degraus de uma escada em que cada degrau é caracterizado pela amplitude ΔE s, largura a e período τ é aplicada ao eletrodo de trabalho. (DE SOUZA et al., 2004).

A produção de picos em voltametria de onda quadrada é dada por processos faradaicos e a altura desses picos é equivalente a concentração das espécies eletroativas em questão. Para se obter os sinais eletroanalíticos, as correntes são medidas através dos pulsos diretos e reversos e o sinal final é obtido através da intensidade da corrente resultante, o que proporciona uma boa sensibilidade na medida através da minimização de correntes capacitivas. O sinal obtido é tido como um pico decorrente da sobreposição e possui características específicas como largura, altura e posição das reações redox do sistema analisado (CISZKOWSKA; STOJEK; OSTERYOUNG, 1990). A Figura 5 esboça o emprego do potencial da voltametria de onda quadrada *versus* o tempo.

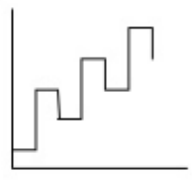
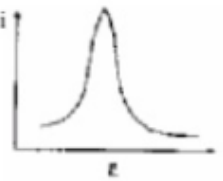
Figura 5: Potencial vs Tempo em voltametria de onda quadrada.



Fonte: Luiz Manoel Aleixo 2004.

Em (b), é mostrada a onda quadrada simétrica formada que coincide sobre a rampa e dá origem aos degraus mostrados em (a), no qual o pulso direto da onda quadrada se inicia juntamente com o início do degrau da rampa, destacado em (c). Tal procedimento distingue a corrente capacitiva por sua diminuição ser mais rápida do que a diminuição da corrente faradaica, utilizando como ponto de referência a corrente obtida perto do final da duração do pulso. (ALEIXO, 2003). A Figura 6 mostra a forma de aplicação do potencial e sua respectiva corrente resultante.

Figura 6: A forma do potencial aplicado e a corrente resultante em voltametria de onda quadrada (corrente vs tempo).

Tipo de voltametria	Sinal de excitação	Corrente resultante
onda quadrada		

Fonte: Adaptada de PUC-Rio 2014

A técnica de SWV permite a obtenção de resultados analíticos de modo bem mais rápido do que outras técnicas de voltametria e os limites de detecção podem ser comparados aos obtidos em técnicas como cromatográficas e espectroscópicas.

Trabalhos publicados utilizam-se da técnica como método alternativo, porém, bastante eficaz para a métodos cromatográficos. (PARHAM; AIBAGHI; GHASEMI, 2008) , utilizou-se de voltametria de onda quadrada para determinar de maneira simultânea as substâncias 2-mercaptobenzotiazol (MBT) e 2-mercaptobezoxazole (MBO), uma classe de compostos utilizados como inibidores de corrosão em amostras de água residual do processo. Tal método obteve excelentes resultados, com limite de detecção na faixa de 7 a 40 $\mu\text{g L}^{-1}$, sendo um método simples, de baixo custo e no qual a amostra não precisou passar por nenhum tipo de pré-tratamento, tornando-a uma boa alternativa para a determinação confiável desses compostos.

Outros trabalhos compararam a eficiência da técnica de Voltametria de Onda Quadrada com técnicas já consagradas, como HPLC. (DOS SANTOS; ABATE; MASINI, 2004) utiliza da técnica eletroanalítica para determinar a concentração de atrazina em águas fluviais utilizando-se de eletrodo de gota pendente de mercúrio. A sensibilidade obtida pela técnica foi de $35,2 \pm 0,4 \mu\text{A mL } \mu\text{g}^{-1}$ e o limite de detecção foi de $2 \mu\text{g}^{-1}$ com faixa linear de 10 a 250 μg^{-1} . Tais resultados foram similares aos obtidos com HPLC, validando assim a técnica eletroanalítica utilizada.

Por, na maioria das vezes, não ser necessário um pré-tratamento na amostra para a realização das análises em SWV, alguns trabalhos utilizam da técnica em amostras de água de rios poluídos para a determinação de picloram, composto químico bastante utilizado em herbicidas. Os limites de detecção obtidos variaram entre 11 (para a água pura) e 39 ppb para uma amostra mais contaminada. Estes valores são suficientemente altos para indicar que a metodologia utilizada é bastante eficaz em análises de traços.

Ainda outros trabalhos utilizaram de SWV para determinar aminas como heptilamina, octilamina, decilamina e aminas aromáticas como a procaína e procainamida, a fim de se estudar transferência iônica facilitada das formas protonadas de três cadeias longas e os resultados obtidos foram comparados com os fornecidos pela técnica de voltametria de varredura linear. (TORRALBA et al., 2014).

Por isso, a técnica de SWV foi utilizada nesse trabalho para a determinação da concentração 4-cloroanilina em amostras de sabão e enxaguante bucal a base de clorexidina. Para a realização das análises, utilizou-se como eletrodo de trabalho o eletrodo de diamante dopado com boro (BDD).

1.4.2 Eletrodo de Diamante Dopado com Boro (BDD)

Ultimamente, eletrodos de diamantes tem ganhado notoriedade no cenário de pesquisas voltadas para aplicações eletroquímicas devido às propriedades exclusivas que o diamante possui, como hibridização sp^3 do carbono, ligações tetraédricas que resultam em alta dureza e resistividade elétrica, resistência a corrosão, boa condutividade térmica e mobilidade de cargas (LUONG; MALE; GLENNON, 2009).

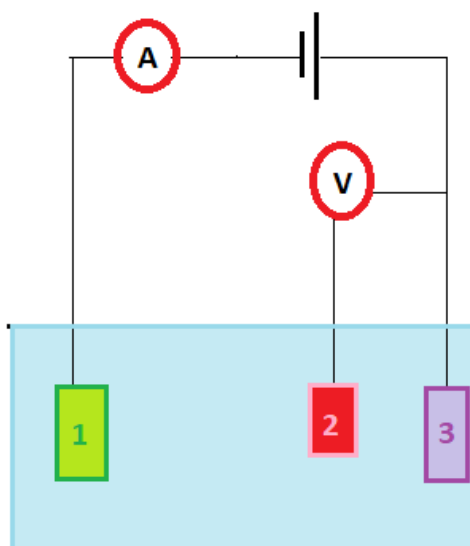
Por outro lado, o mesmo apresenta baixa condutividade, propriedade esta que pode ser modificada por meio do processo de síntese artificial do diamante, como por exemplo por deposição química em fase de vapor (CVD). Nestes casos, faz-se necessário a deposição de determinados compostos na superfície do eletrodo, como o boro, no qual a dopagem é geralmente obtida pela adição de B_2O_3 , ou $B(OCH_3)_3$ no fluxo de gás em uma concentração de 10 a 20000 ppm, o que possibilita ao material possuir características de um semicondutor ou semimetal.

O uso de diamante dopado com boro ganha destaque devido as propriedades que tal eletrodo possui como a ampla janela de potencial em soluções aquosas, a baixa corrente residual, a estabilidade a longo prazo e a baixa sensibilidade ao oxigênio dissolvido em solução. (STROJEK, J.W. et al 1996). Tais propriedades conferem ao BDD excelentes condições em análises eletroquímicas de analitos com altos potenciais de oxidação, sendo utilizado com sucesso em espécies como aminas, cisteínas e espécies contendo enxofre (COMPTON, R.G. et al 2003). Essas propriedades geralmente são afetadas por fatores morfológicos, defeitos nos filmes, a quantidade do dopante utilizado, presença de impurezas, como carbono sp^2 , e terminação da superfície. Tal terminação é gerada com a utilização de tratamentos eletroquímicos que propiciam como resultado a redução da água que produz terminações de hidrogênio, gerando assim a ativação catódica e oxidação da água que produz terminações em oxigênio, levando assim a ativação anódica. (KASAHARA, et al., 2017; KRAFT, 2007). Tais tratamentos ocasionam diferenças na superfície do eletrodo, apresentando características hidrofóbicas pela presença do hidrogênio em suas terminações e hidrofílicas quando em suas terminações possuem a presença de oxigênio (SUN et al., 2012), modificando assim as respostas eletroquímicas dos analitos estudados e influenciando diretamente nos sinais obtidos, podendo assim melhorar as respostas eletroquímicas dos analitos de interesse.

1.4.3 Eletrodos auxiliar e referência.

Para a realização das análises experimentais, além da utilização do eletrodo de trabalho de BDD, utilizam-se também eletrodos auxiliares e de referência. O eletrodo auxiliar serve para equilibrar a corrente utilizada no eletrodo de trabalho e seu material deve ser inerte, de tal modo que este não reaja com a solução suporte e o analito de interesse e em muitos casos, utiliza-se a platina, por ser um material condutor e quimicamente inerte. Já o eletrodo de referência é responsável por fornecer um potencial estável, com o qual o potencial aplicado no eletrodo de trabalho é comparado. Os eletrodos de referências mais comumente utilizados são $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}_{(\text{sat.})}$ (SKOOG, D. A; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A., 6ª edição, 2006). O esquema contido na Figura 7 esboça como é realizado a montagem dos eletrodos de trabalho, referência e auxiliar, no qual (1) é o eletrodo de trabalho, (2) é o eletrodo de referência e (3) é o eletrodo auxiliar.

Figura 7: Esquema de montagem dos eletrodos referência, auxiliar e trabalho.



Fonte: A autora.

Alguns trabalhos mostram como se confeccionar eletrodos e (CARVALHO REINALDO 1997) descreve a construção e mostra o desempenho de eletrodos confeccionados

em laboratório para serem utilizados em técnicas de voltametria, nos quais utiliza-se de materiais baratos, como ponteiros de pipeta e fios de platina, comprovando no estudo o bom funcionamento dos mesmos em análises de técnicas voltaméticas.

1.5 Técnicas voltamétricas aplicadas na Indústria.

Por apresentarem bons resultados, uma variedade de técnicas eletroanalíticas vem sendo utilizadas no âmbito industrial como no controle de qualidade de produtos, processos industriais e em análises biomédicas. Tais técnicas, principalmente a voltametria, têm sido utilizadas para análises de vários tipos de compostos farmacêuticos como fármacos gastrointestinais, antibióticos, cardiovasculares, entre outros.

2 OBJETIVO:

O presente trabalho tem por objetivo determinar as concentrações de 4-cloroanilina (4-CA) em amostras de sabão e enxaguante bucal à base de clorexidina por meio de um método eletroanalítico simples, portátil e de baixo custo, usando a técnica de voltametria de onda quadrada e utilizando-se como eletrodo de trabalho o eletrodo diamante dopado com boro.

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura (resistividade superior a 18 M Ω cm) obtida de um purificador de água Milli-Q (Millipore, EUA). As soluções aquosas estoque de 4-cloroanilina e clorexidina foram preparadas a partir da utilização de cristais em pó das mesmas e água deionizada em concentrações de 10 mmol L⁻¹ (Aldrich).

Os eletrólitos utilizados foram preparados utilizando-se: Ácido sulfúrico – Vetec - (98,0%, m/v), hidróxido de sódio – Synth - (98,0%, m/m), ácido clorídrico - Synth -(37,0%, m/v), ácido acético –Vetec- (99,7%, m/v), acetato de sódio – Vetec- (99,0%, m/m), ácido bórico - Sigma – Aldrich- (99,5% m/m) e ácido fosfórico – Synth- (85,0%, m/v), ácido perclórico –Vetec- (70,0 % m/v) .

Os eletrólitos foram preparados a partir de seus estoques concentrados em concentrações de 0,1 mol L⁻¹ de ácido clorídrico, ácido sulfúrico, ácido perclórico e solução de tampão Britton-Robinson (BR) 0,1 mol L⁻¹ em pH 2 a 6. A amostra utilizada foi sabão hospitalar RIOHEX 2% de diglicona de clorexidina fora do prazo de validade a aproximadamente dois anos e amostra de enxaguante bucal riohex 0,12% dentro do prazo de validade.

3.2 Instrumentação

O estudo foi desenvolvido utilizando-se um potenciostato/galvanostato Ivium (VERTEX, Ivium, Eindhoven, Netherlands), interligado a um computador e operando no modo de análise por voltametria de onda quadrada. O eletrodo de trabalho foi o BDD (diamante dopado com boro) policristalino adquirido na forma de placas (1,0 por 1,0 cm e 1,0 mm de espessura) e 8000 mg L⁻¹ de dopagem com boro. O eletrodo auxiliar foi o fio de platina e como referência um eletrodo miniaturizado de Ag/AgCl/KCl(sat.) (PEDROTTI; ANGNES; GUTZ, 1996) construído no próprio laboratório.

Este procedimento para construção do eletrodo de referência foi realizado através da imersão de um fio de prata em solução de HCl 0,1 mol L⁻¹ e eletrodeposição AgCl através da aplicação de um potencial de +0,3 V por 2 h. (PEDROTTI; ANGNES; GUTZ, 1996). As soluções foram colocadas em uma célula cilíndrica feita no próprio laboratório em ABS (acrilonitrilo butadieno estireno) a partir de uma impressora 3D (GTMax 3D® Core A1 Campinas, Brasil) exposta na Figura 8, com capacidade de 10 mL de volume.

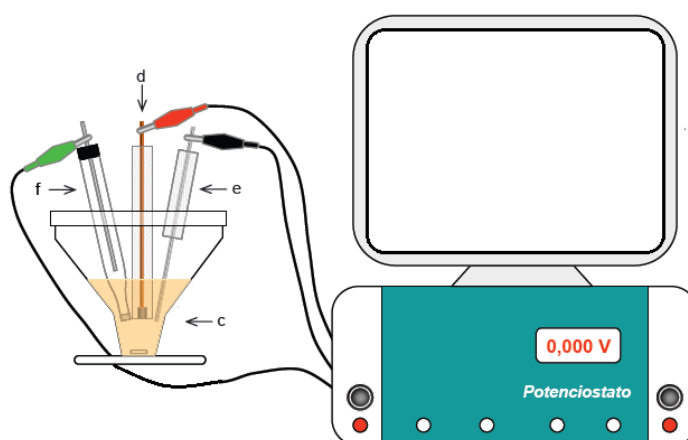
Figura 8: Célula utilizada para a realização das análises constituída de ABS (acrilonitrilo butadieno estireno) com capacidade de 10 mL.



Fonte: A autora.

Os eletrodos auxiliar e de referência são imersos na solução a partir da parte superior da célula, enquanto o eletrodo de BDD é colocado na parte inferior da célula, sob uma placa metálica, ambos os eletrodos são conectados por cabos ao potenciostato conforme ilustrado na Figura 9.

Figura 9: Esboço da montagem dos eletrodos na célula, em que (c) é a célula eletroquímica, (d) é o eletrodo de trabalho, (e) eletrodo auxiliar e (f) eletrodo de referência



Fonte: Wellington Silva 2014.

Na realização do teste de eletrólitos, foram preparadas soluções aquosas de tampão Britton-Robinson (BR) 0,1 mol L⁻¹ na faixa de pH de 2 a 6, e o ajuste de pH foi feito com adições de solução diluída de hidróxido de sódio. Como todos os reagentes apresentam grau analítico, nenhuma etapa de purificação se mostrou necessária.

3.2.1 Análises eletroquímicas

Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando um potenciostato/galvanostato Ivium (VERTEX, Ivium, Eindhoven, Netherlands) interfaceado a um computador pessoal, com software apropriado para a aquisição e tratamento de dados (IviumSoft 2.5). A técnica de voltametria cíclica (CV) a estabilização do eletrodo e a voltametria de onda quadrada (SWV) foi utilizada para as determinações quantitativas de 4-cloroanilina em amostras de sabão e enxaguante bucal a base de clorexidina e também em soluções padrão preparadas. Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas em temperatura ambiente, na presença de oxigênio atmosférico dissolvido.

3.2.2 Procedimento para ativação do eletrodo

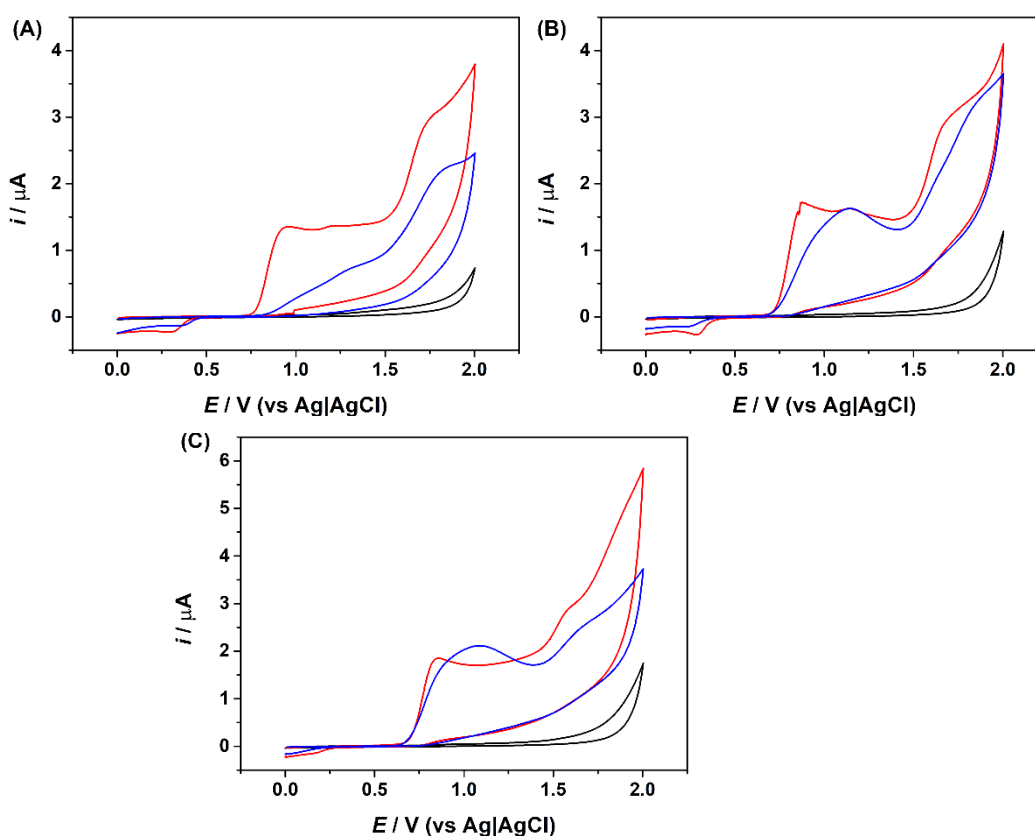
Para avaliar o melhor desempenho do eletrodo de BDD, além de garantir renovação da superfície, dois pré-tratamentos foram realizados e avaliados: catódico e anódico. O tratamento catódico foi realizado em H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹ na faixa catódica de potencial através da aplicação de uma corrente de -0,01 A por 1000 s.

Posteriormente, o eletrodo foi submetido a varreduras de voltametria cíclica (15 ciclos), no intervalo de potencial 0 a 1,5 V e velocidade de varredura de 50 mVs⁻¹, até estabilização da corrente medida. O tratamento anódico foi realizado de maneira análoga, sendo o único diferencial a aplicação de uma corrente de 0,01 A. Após a realização de ambos tratamentos, foram realizados vários ciclos em voltametria cíclica na janela de potencial de 0 a 1,5 V e velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹ até a estabilização do mesmo.

4 RESULTADO E DISCUSSÕES

Para se determinar as concentrações de 4-cloroanilina na presença de clorexidina em amostras de sabão e enxaguante bucal, realizou-se a escolha do eletrólito no qual os sinais eletroanalíticos da 4-cloroanilina fossem favorecidos. As observações realizadas inicialmente indicaram a influência do pré-tratamento catódico e anódico em eletrodo de BDD e o efeito do pH para a oxidação de 4-cloroanilina, sendo demonstradas na Figura 10.

Figura 10: Voltamogramas cíclicos obtidos para 1 mmol L⁻¹ 4-cloroanilina em BDD sem tratamento (linha preta) e com tratamento catódico (linha vermelha) e anódico (linha azul) em solução tampão BR 0,04 mol L⁻¹, com pH (A) 2, (B) 4 e (C) 6.



A Figura 10 indica a influência do pré-tratamento catódico e anódico em eletrodo de BDD e o efeito do pH para a oxidação de 4-cloroanilina. Os tratamentos realizados na superfície

do eletrodo permitem a sua renovação para a obtenção de melhores resultados nas medidas que serão realizadas posteriormente, fornecendo respostas mais reprodutivas para o eletrodo e minimizando problemas de passivação do analito em sua superfície.

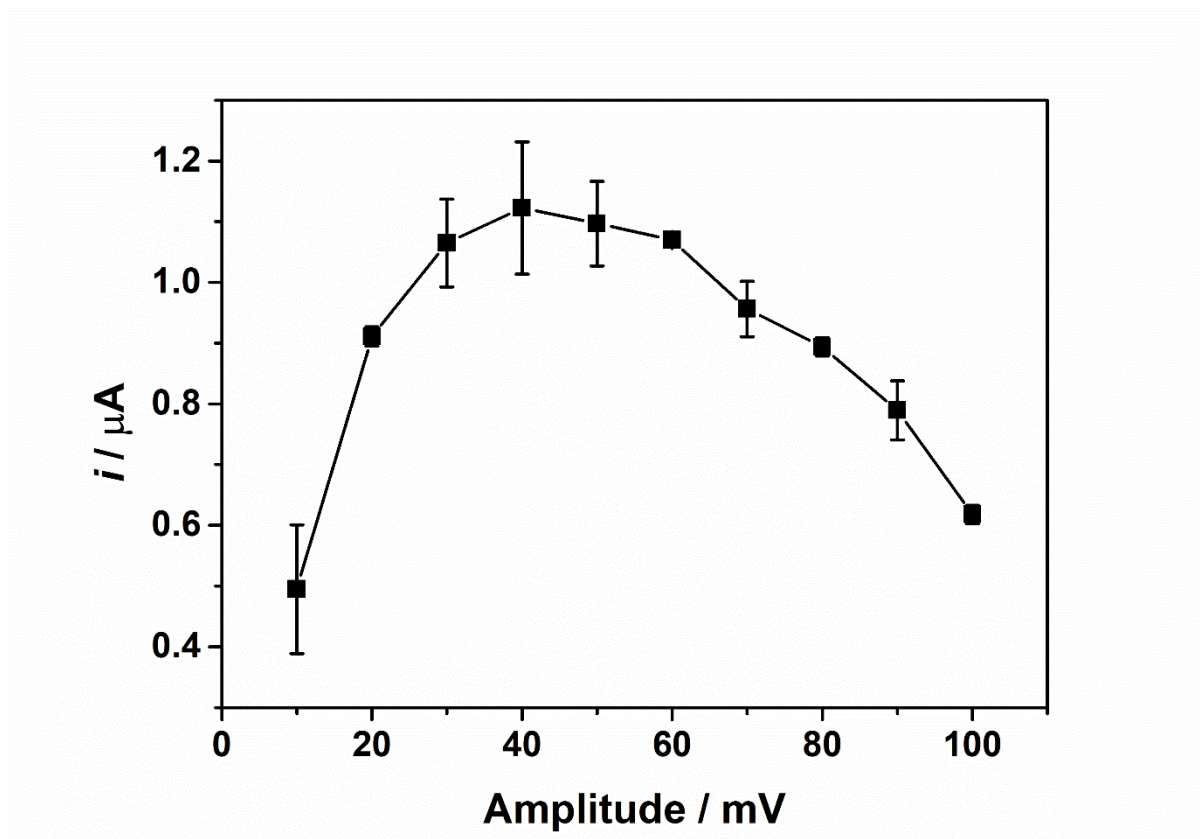
Analisando-se os resultados obtidos para as ativações catódicas e anódicas foi possível observar que os picos de oxidação da 4-cloroanilina se deslocam com a variação de pH do meio tanto para o tratamento anódico como para o tratamento catódico. Além disso, é possível observar um aumento no sinal de oxidação de 4-cloroanilina, principalmente em BDD com tratamento anódico.

Uma possível explicação para este aumento está relacionada com as características da superfície do eletrodo de BDD após cada um dos pré-tratamentos. O tratamento catódico resulta na hidrogenação da superfície do BDD ocasionada pela evolução de hidrogênio resultante da aplicação de potenciais de descarga catódica, fornecendo um caráter hidrofóbico para a superfície. Por outro lado, quando são aplicados potenciais de descarga anódica, a evolução de oxigênio leva à oxigenação da superfície do eletrodo de BDD, o que confere a ela um caráter hidrofílico.

Como pode ser observado na literatura (HUANG et al 2014), descreve-se que ao se aumentar a acidez do meio pela presença de íons H^+ , favorece-se a protonação de grupos que possuem oxigênio na superfície do BDD. Ao ser tratado anodicamente, a superfície do eletrodo se enriquece de grupos oxigenados, possuindo assim caráter hidrofílico, favorecendo a protonação e dificultando a interação do analito com a superfície. Já a superfície tratada catodicamente apresenta apenas grupos hidrogenados e, dessa forma, a presença de íons H^+ no meio não afeta a interação do analito com a superfície, não sendo observadas grandes variações para os diferentes valores de pH estudados.

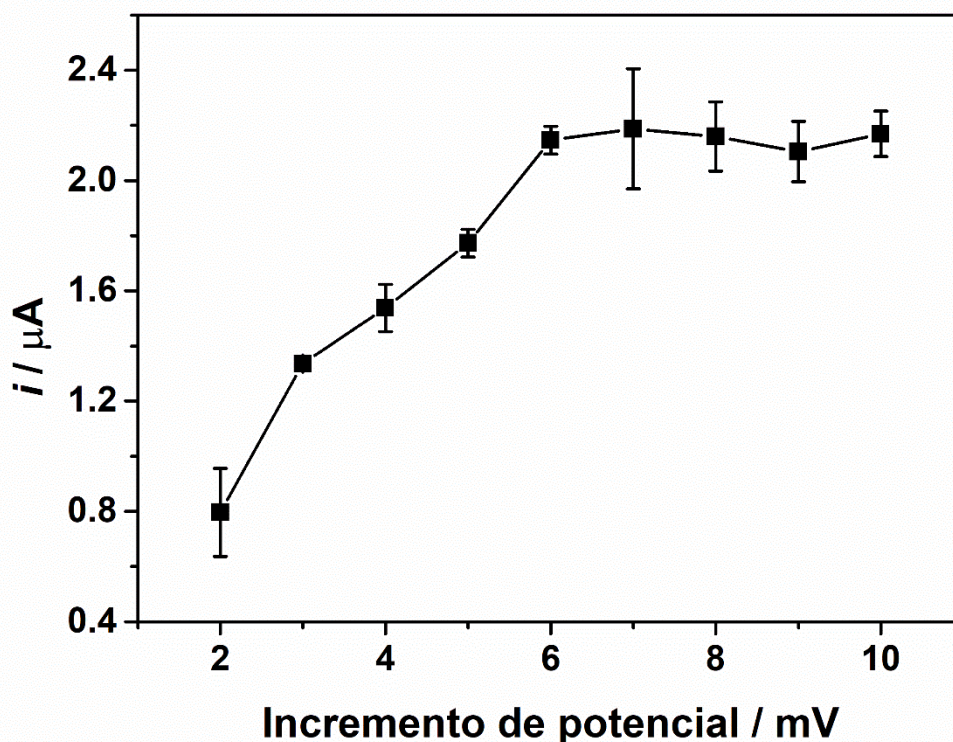
Desta forma, optou-se pela solução eletrolítica com pH 6 e tratamento catódico para o eletrodo de BDD e, na sequência, partiu-se para a otimização dos parâmetros de SWV (amplitude, frequência e incremento de potencial) a serem utilizados para a análise utilizando-se $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de 4-cloroanilina na célula eletroquímica contendo o eletrólito suporte. Fixando-se inicialmente um incremento de potencial de 5 mV e frequência de 20 s^{-1} , o estudo da variação da amplitude foi realizado.

Figura 11: Estudo de otimização da amplitude (10 a 100 mV) e condições experimentais: 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 4-cloroanilina ; Eletrólito suporte Britton-Robinson (pH 6) 0,1 mol L^{-1} ; incremento de potencial 5 mV; Frequência: 20 s^{-1} .



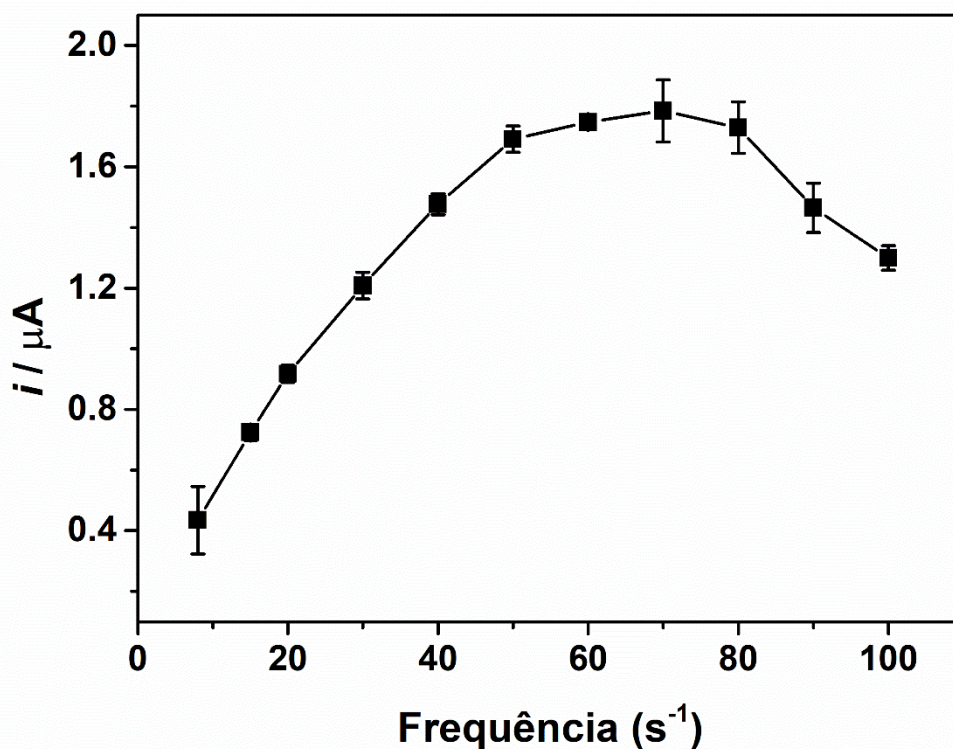
A Figura 11 demonstra os resultados obtidos para a otimização da amplitude. A amplitude dos pulsos de onda quadrada foi avaliada no intervalo de 10 a 100 mV, não sendo possível observar um comportamento linear com relação à altura de pico. A escolha dos parâmetros da técnica foi realizada baseando-se na relação entre maior sinal analítico e menores valores de desvio padrão, uma vez que os experimentos foram realizados em triplicata. Portanto, o valor de 60 mV foi escolhido para a realização dos experimentos posteriores por possuir bom sinal eletroquímico e menor desvio padrão. Na sequência, otimizou-se o incremento de potencial. Os resultados são mostrados na Figura 12.

Figura 12: Estudo de otimização do incremento de potencial (2 a 10 mV) e condições experimentais: $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ 4-cloroanilina ; Eletrólito suporte: Britton-Robinson (pH 6) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; Amplitude: 60 mV ; Frequência: 20 s^{-1} .



Apesar de o sinal eletroquímico na variação do incremento de potencial de 6 mV possuir um bom sinal eletroquímico e um baixo desvio, o valor de 3 mV foi escolhido em função dos voltamogramas obtidos. Em incrementos de potencial acima de 3 mV, observou-se uma flutuação da linha base no eletrodo de BDD, sob as condições utilizadas, que começa a se sobrepor na região de oxidação de 4-cloroanilina, inviabilizando a utilização de incrementos maiores. Após estas otimizações, realizou-se a otimização do parâmetro frequência já com os valores de amplitude e incremento de potencial fixados em 60 mV e 3 mV, respectivamente. Os resultados foram expostos na Figura 13.

Figura 13: Estudo de otimização da frequência (8 a 100 s^{-1}) e condições experimentais: 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 4-cloroanilina ; Eletrólito suporte: Britton-Robinson (pH 6) 0,1 mol L^{-1} ; Amplitude: 60 mV ; incremento de potencial: 3 mV .



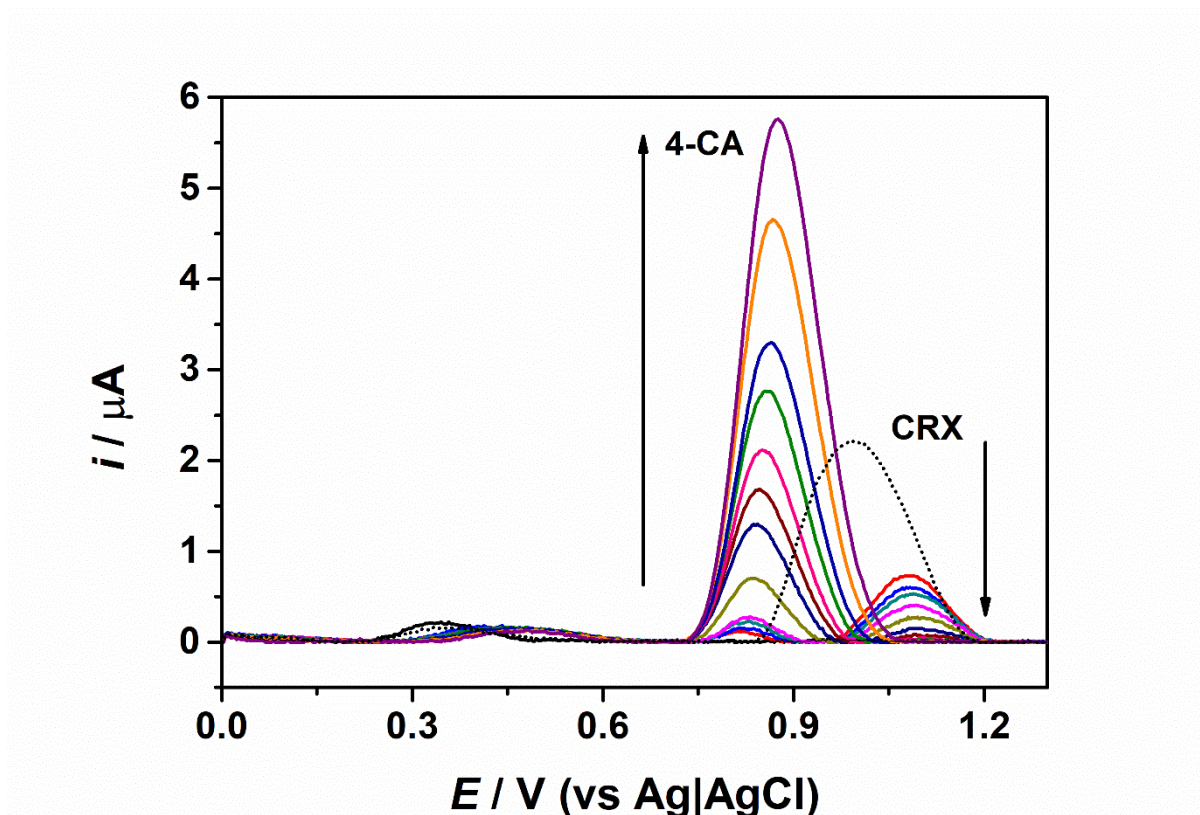
Como pode ser observado, o melhor sinal obtido para a frequência foi 60 s^{-1} , por possuir bom sinal eletroquímico, separação dos picos e um pequeno desvio padrão. A Tabela 1 apresenta o intervalo estudado para cada parâmetro e o valor escolhido considerando-se o melhor sinal e o menor desvio entre as varreduras ($n=3$).

Tabela 1: Dados obtidos para as otimizações dos parâmetros de SWV a serem utilizados para a análise utilizando-se de solução de Britton-Robinson (BR) 0,1 mol L⁻¹.

	Intervalo Estudado	Valor otimizado
Amplitude	10 – 100 mV	60 mV
Incremento de potencial	2 – 10 mV	3 mV
Frequência	8 – 100 s ⁻¹	20 s ⁻¹

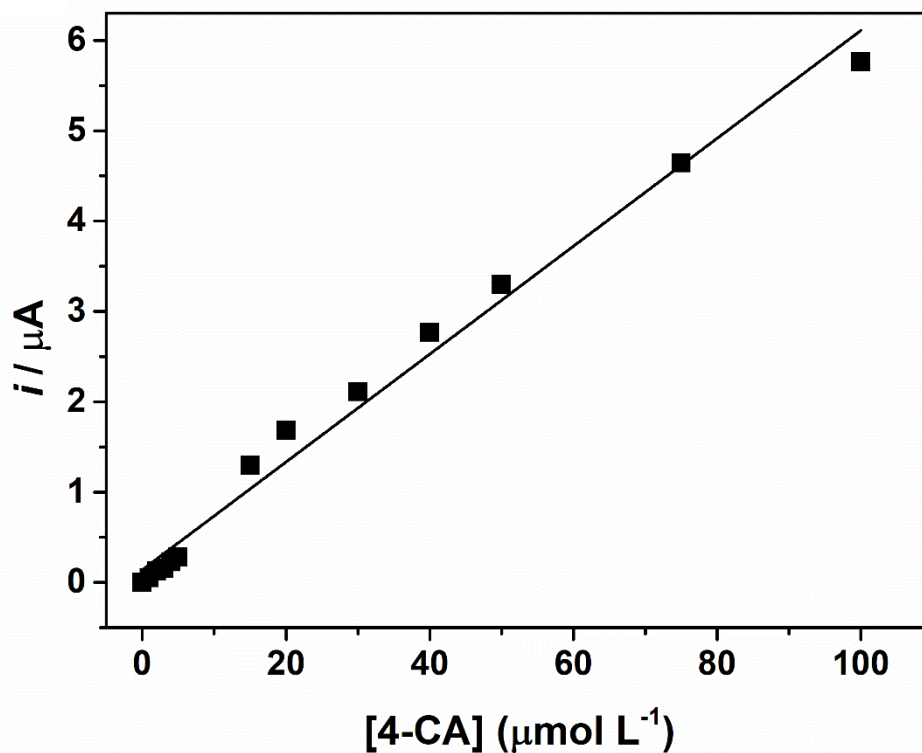
Após as otimizações serem realizadas, colocou-se em uma célula de ABS 10 mL de solução de Britton-Robinson (BR) em pH 6 na concentração de 0,1 mol L⁻¹ e adições crescentes de 4- cloroanilina (1 – 100 µmol L⁻¹) na presença de 50 µmol L⁻¹ de clorexidina. As respostas voltamétricas foram expostas na Figura 14.

Figura 14: Respostas de SWV para concentrações crescentes (1 – 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$) de 4-cloroanilina na presença 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de clorexidina (CRX).



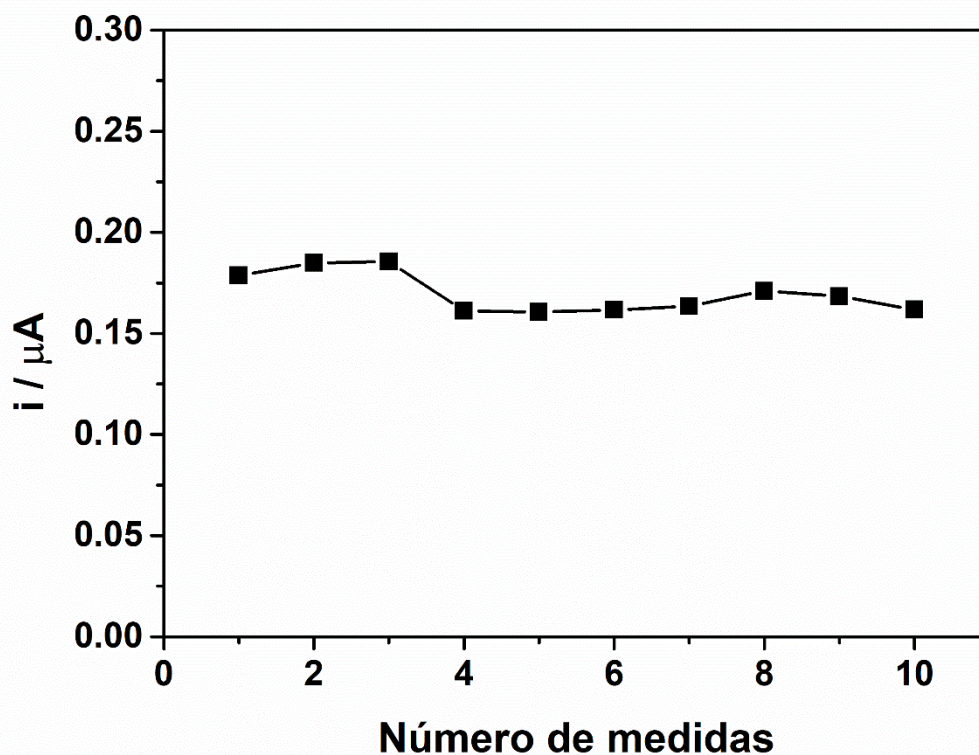
Também se realizou a construção da curva de calibração a partir dos dados das respostas voltamétricas expostas na Figura 14, a curva de calibração exposta na Figura 15 possui correlação linear de 0,996 e inclinação de 0,059 ($\mu\text{A} / \mu\text{mol L}^{-1}$). O limite de detecção foi calculado, obtendo-se um valor de 0,026 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e limite de quantificação 0,086 $\mu\text{mol L}^{-1}$, além de faixa linear de 1 a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Figura 15: Curva de calibração para concentrações crescentes (1 – 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$) de 4-cloroanilina na presença 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de CRX.



A precisão do método também foi avaliada através de varreduras sucessivas ($n=10$) em voltamogramas de onda quadrada com o eletrodo de BDD, utilizando-se uma solução de 4-cloroanilina na concentração de 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, obtendo-se um desvio padrão relativo (DPR) de 5%, considerado aceitável (A. SKOOG, et al p. 121, 2006) conforme demonstrado pelo gráfico da Figura 16.

Figura 16: Estudos de repetitividade para a análise de 4-cloroanilina ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) em BDD tratado catodicamente utilizando SWV.

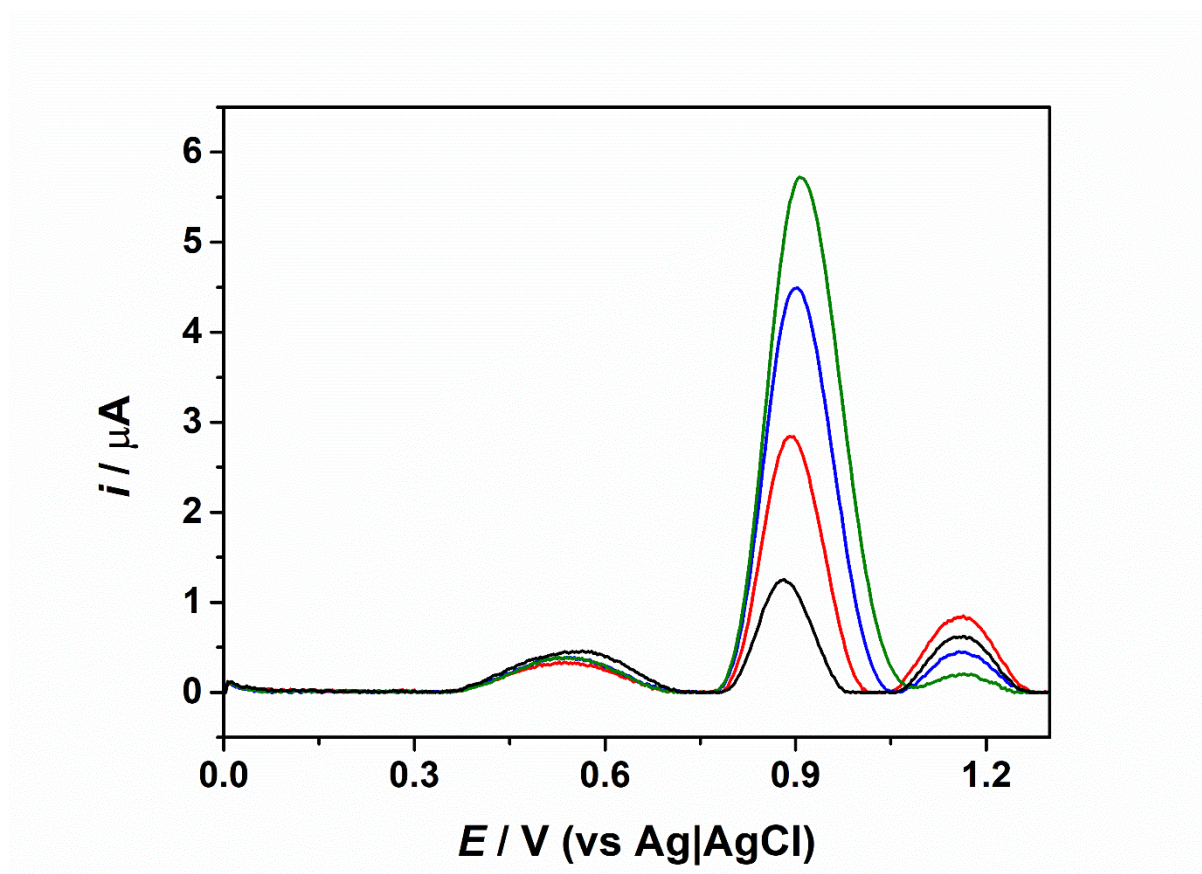


4.1 Aplicação em amostras

Após os estudos iniciais, determinação dos parâmetros da técnica de SWV, construção do voltamograma e curva de calibração, realizou-se a determinação da concentração de 4-cloroanilina nas amostras escolhidas a base de clorexidina. Para isto, nenhuma etapa de pré-tratamento nas amostras foi realizada, uma das vantagens de se utilizar técnicas de voltametria (SOUZA, DJENAINÉ; MACHADO, SERGIO, 2003), sendo necessário apenas uma simples diluição das amostras na célula eletroquímica.

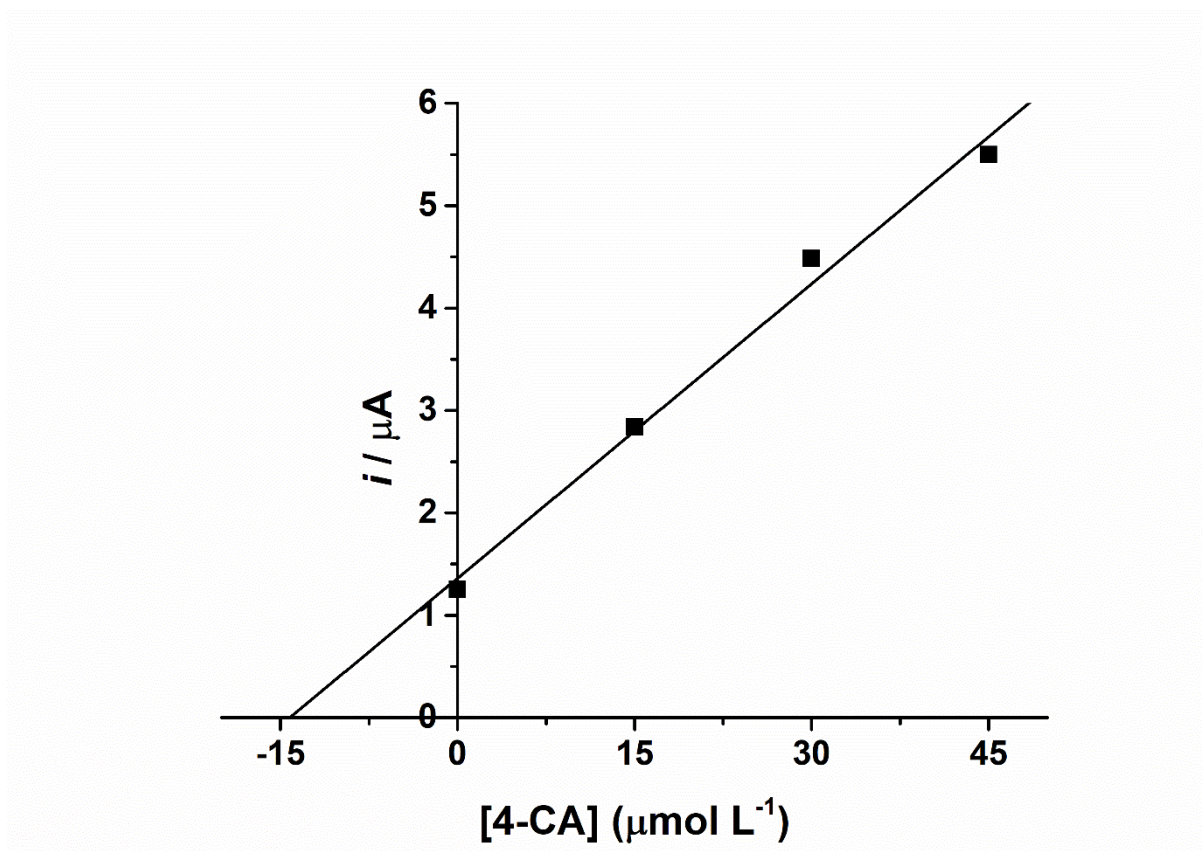
A primeira amostra analisada foi a de sabão hospitalar que continha 2% de clorexidina em sua composição, analisado por meio de adição de padrão. Utilizando-se de uma célula eletroquímica, adicionou-se 9,5 mL de solução tampão Britton-Robinson (BR) 0,1 mol L⁻¹ (pH 6) e 500 µL da amostra (linha preta) e realizou-se a adição de 3 injeções 15 µmol L⁻¹ de um estoque de 4-cloroanilina diretamente na célula (linhas vermelha, azul e verde). O procedimento foi realizado em triplicata e os voltamogramas referente a uma das análises foi exposto na Figura 17.

Figura 17: Voltamograma obtido para determinação de concentração de 4-cloroanilina em amostra de sabão hospitalar pelo método de adição de padrão, amostra (linha preta) e 3 injeções 15 µmol L⁻¹ de um estoque de 4-cloroanilina diretamente na célula (linhas vermelha, azul e verde)



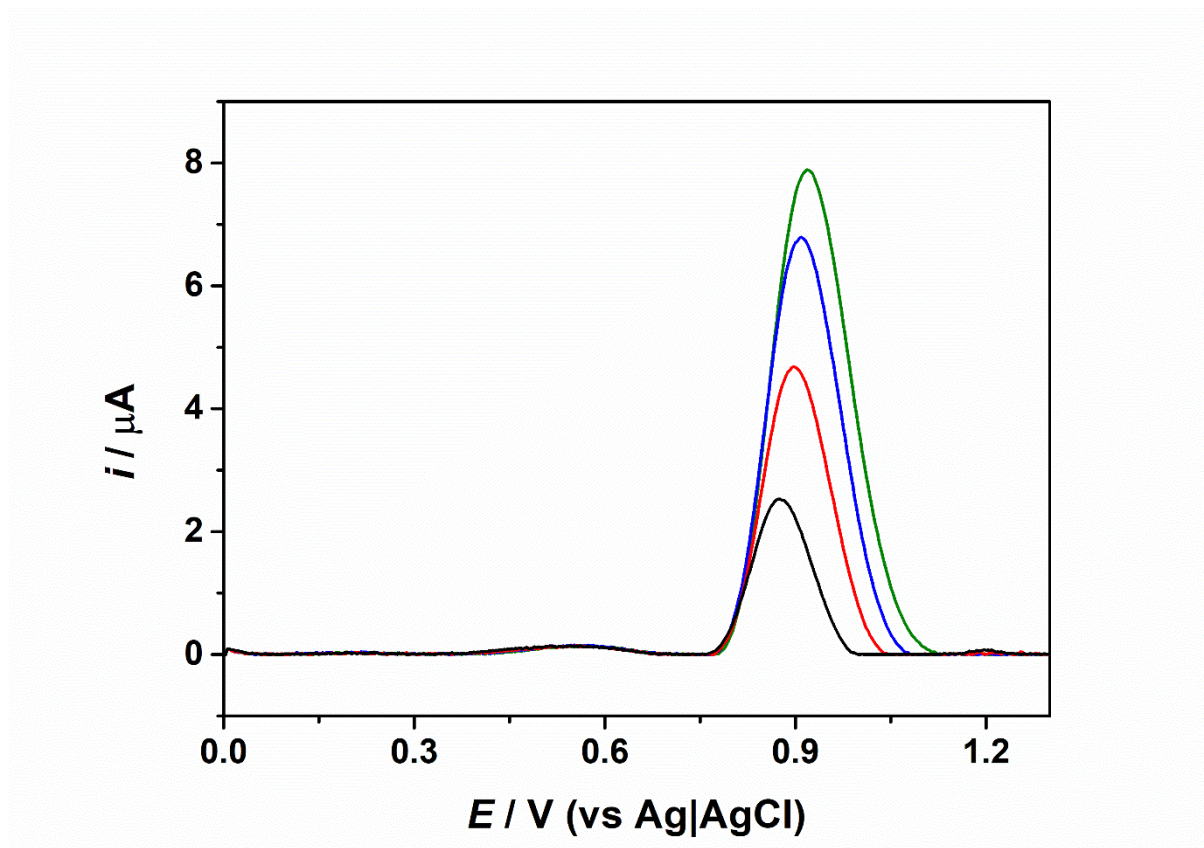
A curva de calibração foi construída para a adição de padrão, apresentando correlação linear de 0,993 e, a partir da regressão linear, determinou-se a concentração de 4-cloroanilina equivalente a 13,1 µmol L⁻¹. A curva foi exposta na Figura 18

Figura 18: Curva de calibração obtida pela altura dos picos dos sinais eletroquímicos do voltamograma para o método adição de padrão.



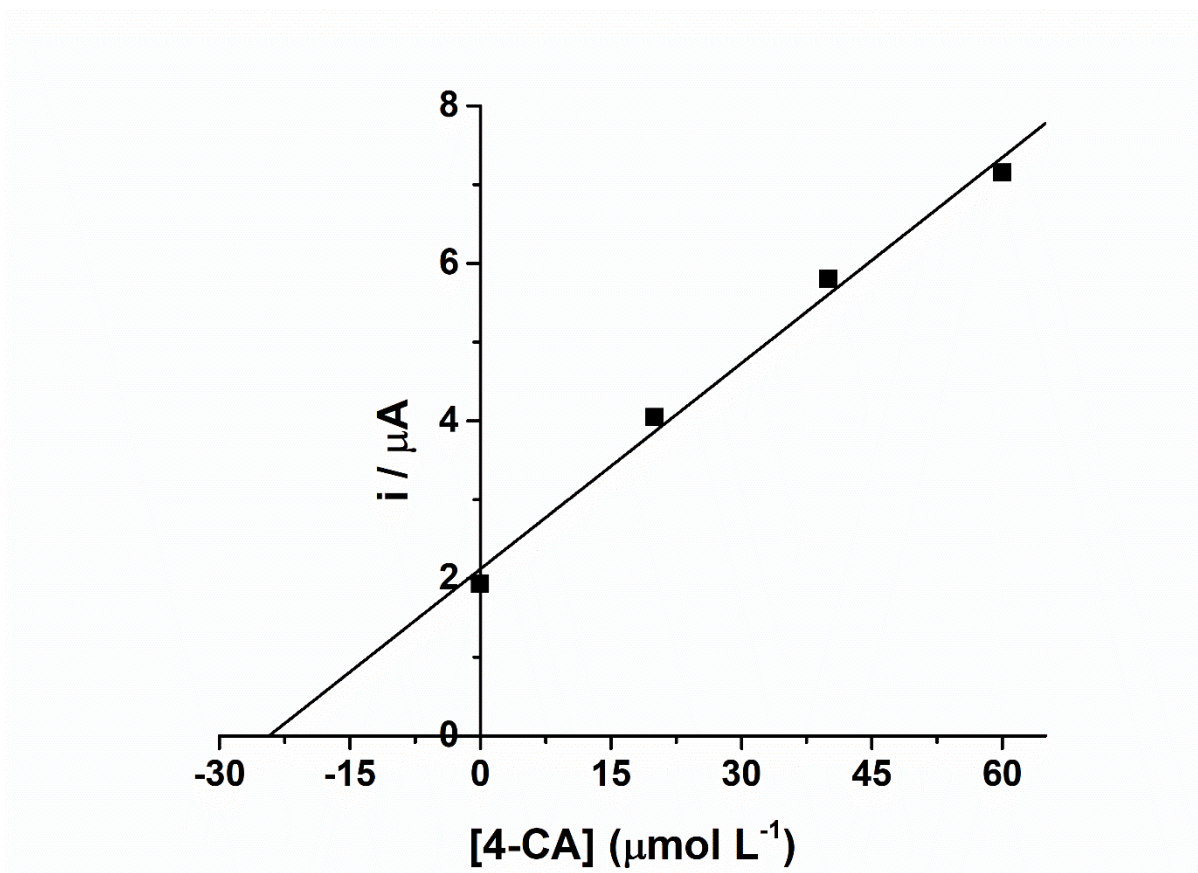
O estudo de recuperação também foi realizado adicionando-se na célula eletroquímica (volume de 10 mL), 500 μL de amostra dopada com 10 $\mu mol L^{-1}$ (linha preta) e foram realizadas três adições de 20 $\mu mol L^{-1}$ de solução padrão de 4-cloroanilina. O voltamograma obtido foi exposto na Figura 19.

Figura 19: Voltamograma obtido para determinação de concentração de 4-cloroanilina em amostra de sabão hospitalar pelo método de adição e recuperação, amostra dopada com $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ (linha preta) e três adições de $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ de solução padrão de 4-cloroanilina.



Para se determinar a concentração de 4-cloroanilina na amostra de sabão, realizou-se a construção da curva de calibração a partir da altura dos picos dos sinais eletroquímicos obtidos no voltamograma e a curva possuiu correlação linear de 0,995. As medidas foram realizadas em triplicata e os desvios devidamente calculados, a Figura 20 expressa esse resultado.

Figura 20: Curva de calibração obtida pela altura dos picos dos sinais eletroquímicos do voltamograma para o método adição e recuperação.



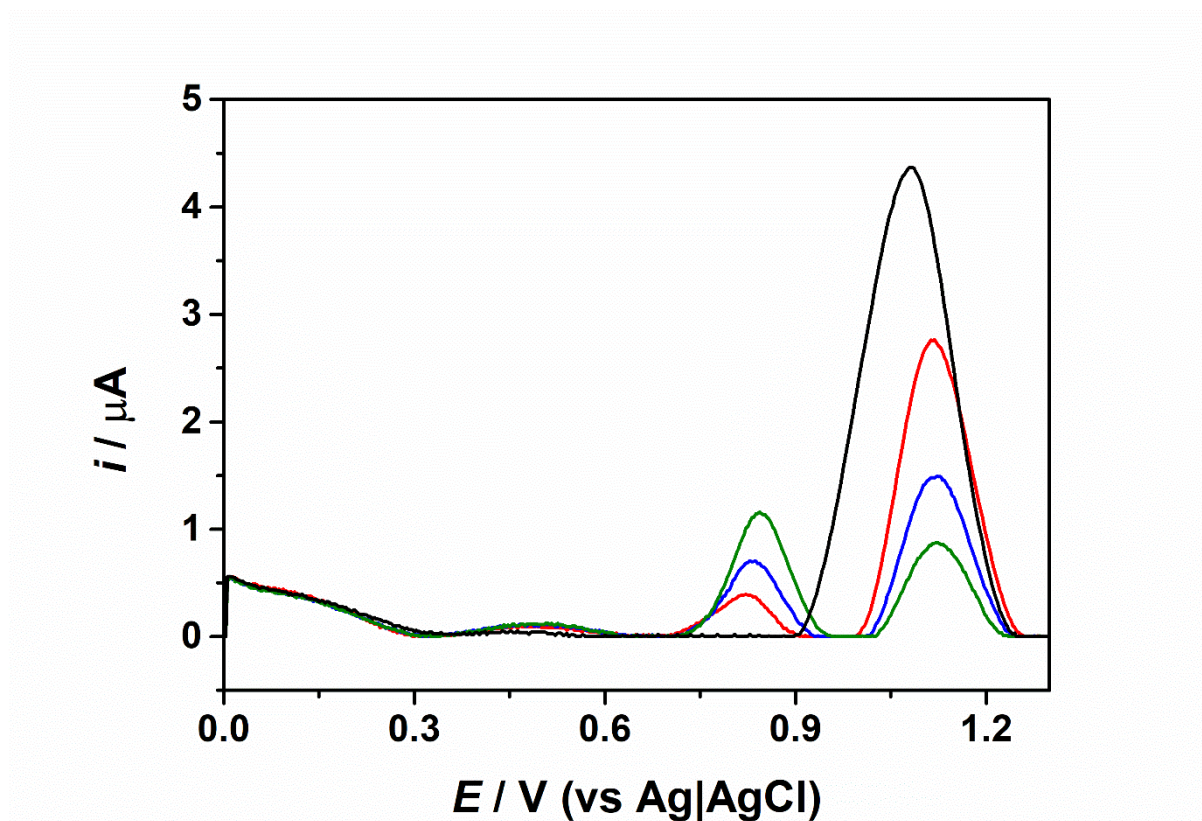
A concentração encontrada para este procedimento foi de $23,2 \mu\text{mol L}^{-1}$, que representa uma recuperação de 100%, evidenciando que o método apresenta resultados satisfatórios para a determinação da concentração de 4-cloroanilina neste tipo de amostra, o que valida o método de voltametria de onda quadrada utilizando-se do eletrodo de diamante dopado com boro para a determinação da concentração de 4-cloroanilina na presença de clorexidina.

Tabela 2: Resultados das concentrações de 4-cloroanilina em amostra contendo clorexidina pura e após adição usando método de adição de padrão.

	Concentração $\mu\text{mol L}^{-1}$
Amostra pura	$13,1 \pm 0,6$
Amostra fortificada com $10 \mu\text{mol L}^{-1}$	$23,3 \pm 0,6$

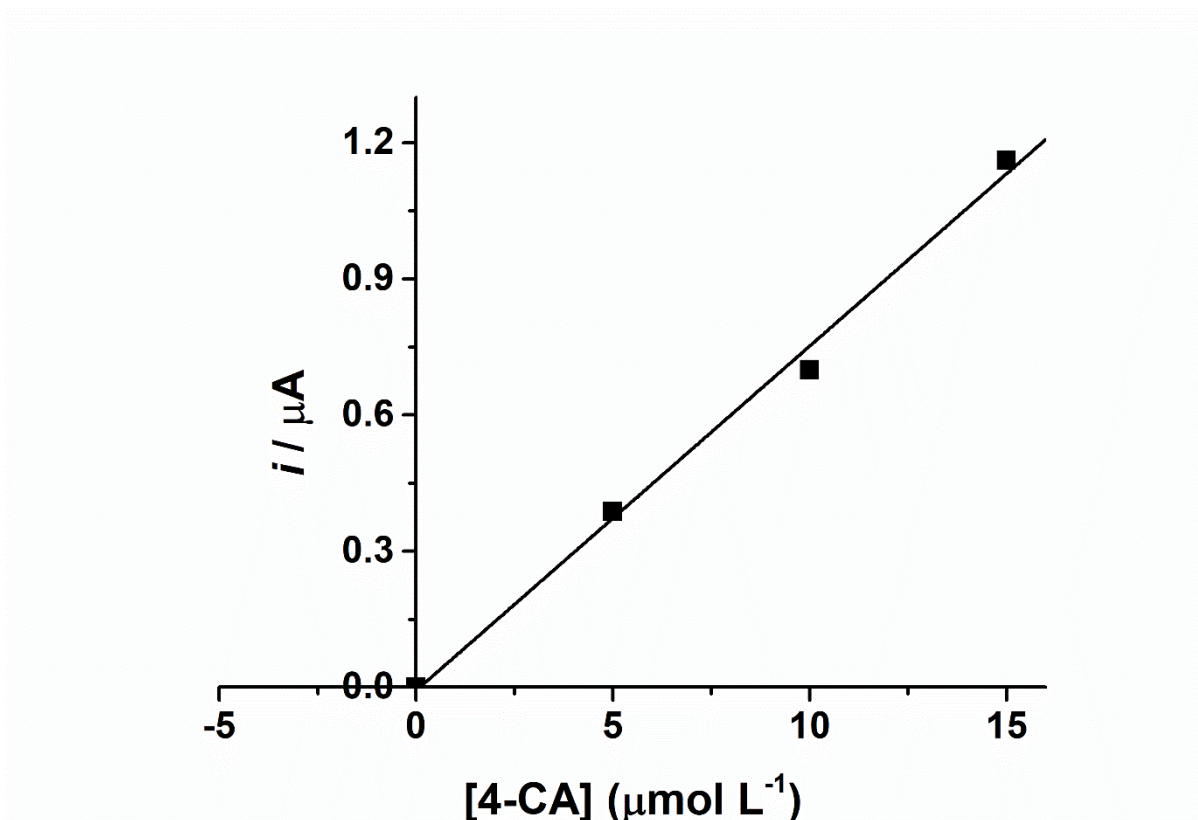
A segunda amostra analisada foi a de enxaguante bucal (RIOHEX 0,12% de diglicona de clorexidina) por meio de adição de padrão. Utilizando-se de uma célula eletroquímica, adicionou-se 9 mL de solução de Britton-Robinson (BR) 0,1 mol L⁻¹ pH 6 e 1 mL da amostra (linha preta) e realizou-se a 3 adições de 5 µmol L⁻¹. O procedimento foi realizado em triplicata e o voltamograma obtido foi exposto na Figura 21.

Figura 21: Voltamograma obtido para determinação de concentração de 4-cloroanilina em amostra de enxaguante bucal por adição de padrão com quatro adições de solução estoque de 10 mmol L⁻¹ de 4-cloroanilina, amostra (linha preta) e realizou-se a 3 adições de 5 µmol L⁻¹, (linhas vermelha, verde e azul).



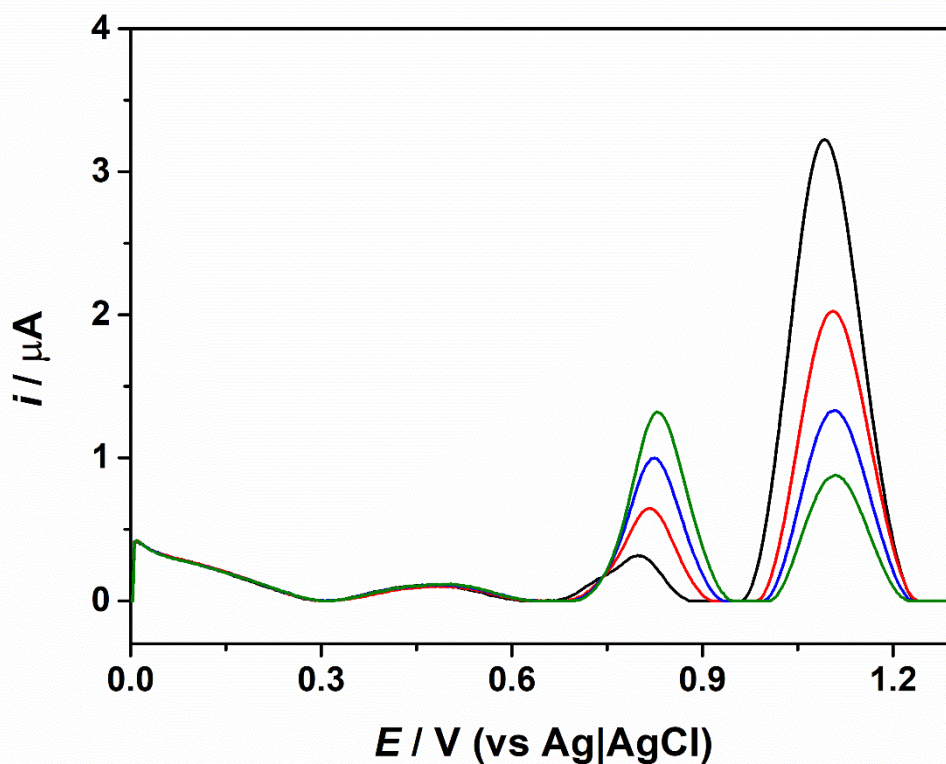
Em seguida, construiu-se também a curva de calibração, obtida através da altura dos picos referentes aos sinais eletroquímicos obtidos no voltamograma para a adição de padrão e os resultados estão apresentados na Figura 22.

Figura 22: Curva de calibração obtida pela altura dos picos dos sinais eletroquímicos do voltamograma para o método adição de padrão.



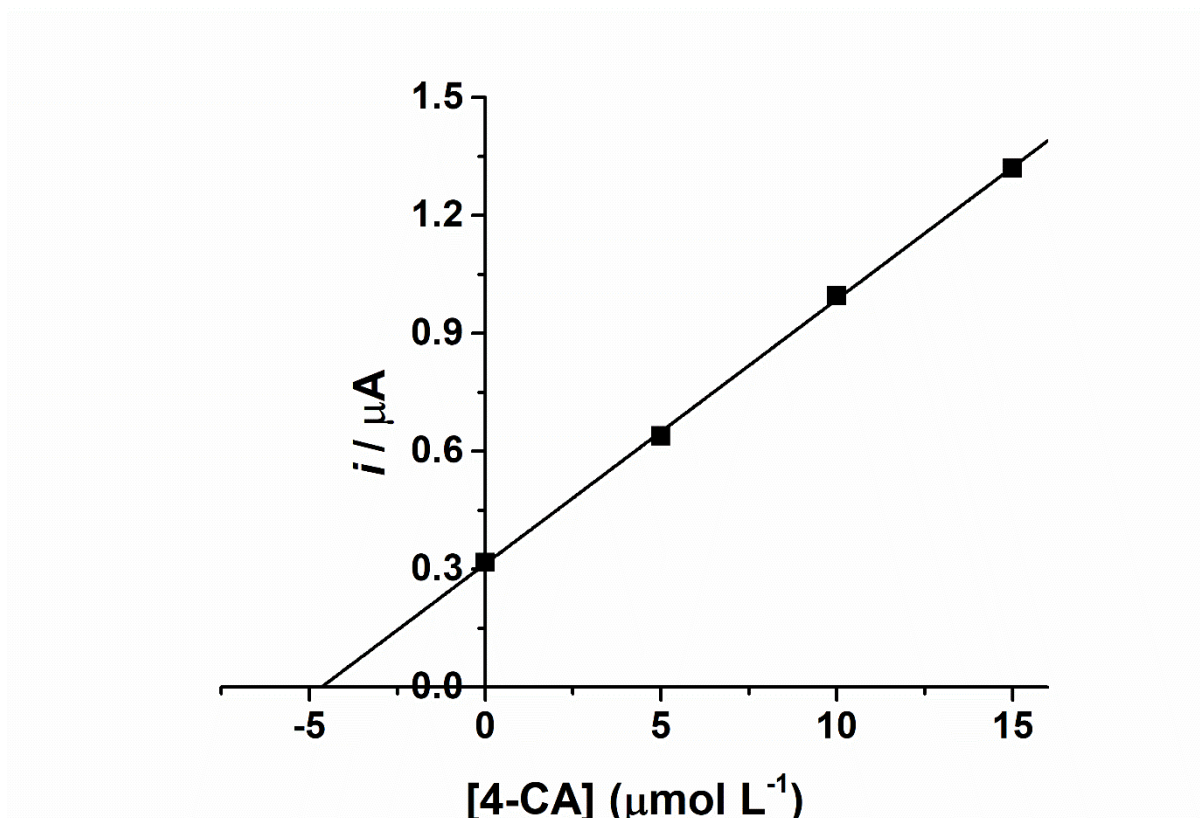
A curva obtida possuiu correlação linear de 0,996 e foi possível observar que não havia quantidades de 4-cloroanilina mensuráveis na amostra (abaixo do LD). Em seguida, o estudo de adição e recuperação foi realizado com adição de 1 mL de amostra dopada com $5 \mu mol L^{-1}$ em 9 mL de eletrólito suporte na célula eletroquímica (linha preta). Em seguida, adicionou-se 3 incrementos de concentração de $5 \mu mol L^{-1}$ na célula e os resultados estão apresentados na Figura 23.

Figura 23: Voltamograma obtido para determinação de concentração de 4-cloroanilina em amostra de enxaguante bucal por adição e recuperação, amostra dopada com $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ em 9 ml de eletrólito suporte na célula eletroquímica (linha preta), 3 incrementos de concentração de $5 \mu\text{mol L}^{-1}$, (linha verde, vermelha e azul).



A curva de calibração construída através da altura dos picos referentes aos sinais eletroquímicos obtidos no voltamograma para a adição de padrão está exposta na Figura 24.

Figura 24: Curva de calibração obtida pela altura dos picos dos sinais eletroquímicos do voltamograma para o método adição de padrão.



Os resultados se mostraram satisfatórios e uma correlação linear de 0,991 foi obtida. A quantificação de 4-cloroanilina foi realizada com um valor estimado em $5,6 \mu mol L^{-1}$, o que representa uma recuperação de 112%. Os resultados são apresentados na Tabela 3, validando o método de voltametria de onda quadrada utilizando-se do eletrodo de diamante dopado com boro para a determinação da concentração de 4-cloroanilina na presença de clorexidina.

Tabela 3: Resultados das concentrações de 4-cloroanilina em amostras contendo clorexidina pura e após adição usando método de adição de padrão.

	Concentração $\mu mol L^{-1}$
Amostra pura	< LD
Amostra fortificada com $5 \mu mol L^{-1}$	$5,6 \pm 0,8$

5 CONCLUSÃO

Conclui-se através desse trabalho que o método eletroquímico SWV proposto para a determinação de 4-cloroanilina em amostras de sabão e enxaguante bucal a base de clorexidina pode atuar como um substituto aos métodos cromatográficos já existentes e utilizados como métodos oficiais, uma vez que o método resultou em um limite de detecção de $0,026 \mu\text{mol L}^{-1}$, limite de quantificação $0,86 \mu\text{mol L}^{-1}$, faixa linear entre 1 e $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ e DPR 5%.

De acordo com os experimentos realizados e os resultados obtidos para se determinar a concentração de 4-cloroanilina em amostra de sabão hospitalar e enxaguante bucal, pode-se concluir que a técnica eletroanalítica de SWV utilizando-se de eletrodo de diamante dopado com boro se mostrou robusta, possuindo resultados reprodutíveis e podendo assim ser comparados aos resultados obtidos por técnicas de cromatografia já consolidadas na literatura.

A metodologia se mostrou bastante simples, uma vez que a análise das amostras pela técnica de SWV com eletrodo de diamante dopado com boro não necessitou de nenhum pré-tratamento, apenas de uma simples diluição, sendo assim minimizado o uso de possíveis reagentes para essa etapa, portanto o processo simples e de menor custo quando comparados as técnicas cromatográficas.

Foi possível determinar a concentração da 4-cloroanilina em duas amostras a base de clorexidina em diferentes concentrações, com resultados coerentes e satisfatórios. Observou-se bons valores de desvio e correlação linear entre os pontos da curva, obtendo-se assim valores precisos de concentração de 4-cloroanilina em ambas as amostras testadas pela técnica voltamétrica.

6 REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). Resolução nº 04, de 24 de novembro de 1988. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 19 de dez. de 1988. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/391619/04_cns.pdf/a85ab159-9cc5-41b8-9ee1-512af02d1a10>.

ALMEIDA, T. S. S. et al. Eletrocatalise das reações de oxidação de hidrogênio e de redução de oxigênio. *Journal of Power Sources*, v. 36, n. 1, p. 33–41, 2007.

ALEIXO, L. M. Voltametria: Conceitos e Técnicas | Chemkeys Português. **Apostila**, n. li, p. 40, 2003.

ANDREA MOREIRA JACOBUECCI BAMBACE, É. Eficácia De Soluções Aquosas De Clorexidina Para Desinfecção De Superfícies. **Revista Biociências**, v. 9, n. 2, p. 73–81, 2008.

BELOW, H.; LEHAN, N.; KRAMER, A. HPLC determination of the antiseptic agent chlorhexidine and its degradation products 4-chloroaniline and 1-chloro-4-nitrobenzene in serum and urine. **Microchimica Acta**, v. 146, n. 2, p. 129–135, 2004.

CISZKOWSKA, M.; STOJEK, Z.; OSTERYOUNG, J. Pulse Voltammetric Techniques at Microelectrodes in Pure Solvents. **Analytical Chemistry**, v. 62, n. 4, p. 349–353, 1990.

COBB, S. J.; AYRES, Z. J.; MACPHERSON, J. V. Boron doped diamond: a designer electrode material for the twenty-first century. *Annual Review of Analytical Chemistry*, v. 11, n. 1, p. 463–484, 2018.

DE SOUZA, D. et al. Voltametria de onda quadrada. Segunda parte: Aplicações. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 790–797, 2004.

DE FÁTIMA BRITO SOUZA, M. Eletrodos quimicamente modificados aplicados à eletroanálise: Uma breve abordagem. *Química Nova*, v. 20, n. 2, p. 191–195, 1997.

DOS SANTOS, L. B. O.; ABATE, G.; MASINI, J. C. Determination of atrazine using square wave voltammetry with the Hanging Mercury Drop Electrode (HMDE). **Talanta**, v. 62, n. 4, p. 667–674, 2004.

DE SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: Aspectos teóricos. *Química Nova*, v. 26, n. 1, p. 81–89, 2003.

DEJMKOVA, H. et al. Determination of total phenols in foods by boron doped diamond electrode. *Electroanalysis*, v. 21, n. 9, p. 1014–1018, 2009.

FAY, L. B.; ALI, S.; GROSS, G. A. Determination of heterocyclic aromatic amines in food products: Automation of the sample preparation method prior to HPLC and HPLC-MS quantification. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 376, n. 1–2, p. 29–35, 1997.

GARRIGÓS, M. C. et al. Determination of aromatic amines formed from azo colorants in toy products. **Journal of Chromatography A**, v. 976, n. 1–2, p. 309–317, 2002.

GOLLY, I.; HLAVICA, P. Preparation of oxyhemoglobin and α - and β -sub- Measurement of N-oxygenating activity . *The*. v. 760, p. 69–76, 1983.

GOETING, C. Electrochemically induced surface modifications of boron-doped diamond electrodes: an X-ray photoelectron spectroscopy study. *Diamond and Related Materials*, v. 9, n. 3–6, p. 390–396, 2000.

JAIN, A. et al. Conversion to isothiocyanates via dithiocarbamates for the determination of aromatic primary amines by headspace-solid phase microextraction and gas chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 801, p. 48–58, 2013.

KLUK, E.; PEREIRA, N. ³ Andrea Malluf Dabul de MELLO ⁴ Fabiano Augusto Sfier de MELLO p. 7–13, 1984.

LABBATE, R. et al. V69N3a09. v. 69, n. 3, p. 349–354, 2003.

LIN, S. C. et al. Formulation and stability of an extemporaneous 0.02% chlorhexidine digluconate ophthalmic solution. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 114, n. 12, p. 1162–1169, 2015.

LONGO, M.; CAVALLARO, A. Determination of aromatic amines at trace levels by derivatization with heptafluorobutyric anhydride and gas chromatography-electron-capture negative-ion chemical ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 753, n. 1, p. 91–100, 1996.

LUONG, J. H. T.; MALE, K. B.; GLENNON, J. D. Boron-doped diamond electrode: Synthesis, characterization, functionalization and analytical applications. **Analyst**, v. 134, n. 10, p. 1965–1979, 2009.

MÜLLER, L.; FATTORE, E.; BENFENATI, E. Determination of aromatic amines by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry in water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 791, n. 1–2, p. 221–230, 1997.

OGASE, H. et al. Identification and quantitative analysis of degradation products of chlorhexidine with chlorhexidine-resistant bacteria with three-dimensional high performance liquid chromatography. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 73, n. 1, p. 71–78, 1992.

PARHAM, H.; AIBAGHI, B.; GHASEMI, J. Simultaneous square wave voltammetric determination of 2-mercaptobenzothiazole and 2-mercaptobenzoxazole by partial least squares method in water samples. **Journal of Hazardous Materials**, v. 151, n. 2–3, p. 636–641, 2008.

PIZON, A. F. et al. Toxicology laboratory analysis and human exposure to p-chloroaniline chloroaniline A.F. Pizon et al. **Clinical Toxicology**, v. 47, n. 2, p. 132–136, 2009.

RIBEIRO, J. A. et al. Electrochemical sensors and biosensors for determination of catecholamine neurotransmitters: A review. **Talanta**, v. 160, p. 653–679, 2016.

SILVA, L. L. G. DA et al. Crescimento de diamante dopado com Boro para eletrodos de uso em eletroquímica. **Materials Research**, v. 2, n. 2, p. 99–103, 1999.

SKOOG D.A., West, D.M. e Holler, J.F., "Fundamentals of Analytical Chemistry", 6ª ed., Saunders College Publishing, 2006, Philadelphia.

SUN, X. M. et al. Development of a vortex-assisted ionic liquid microextraction method for the determination of aromatic amines in environmental water samples. **Analytical Methods**, v. 4, n. 7, p. 2074–2080, 2012.

TORRALBA, E. et al. Facilitated ion transfer of protonated primary organic amines studied by square wave voltammetry and chronoamperometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 826, n. 1, p. 12–20, 2014.

WARD, J. M.; REZNIK, G.; GARNER, F. M. Proliferative lesions of the spleen in male F344 rats fed diets containing P-chloroaniline. **Veterinary Pathology**, v. 17, n. 2, p. 200–205, 1980.

WEISS, T.; ANGERER, J. Simultaneous determination of various aromatic amines and metabolites of aromatic nitro compounds in urine for low level exposure using gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 778, n. 1–2, p. 179–192, 2002.

YANG, C. C. et al. Metobromuron/metolachlor ingestion with late onset methemoglobinemia in a pregnant woman successfully treated with methylene blue. **Clinical Toxicology**, v. 33, n. 6, p. 713–716, 1995.

ZENKNER, C. L. Infecção Cruzada Em Odontologia: Riscos E Diretrizes. **Revista de Endodontia Pesquisa e Ensino On Line**, v. 2, n. 3, p. 1–7, 2006.