UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química

POLLYANA SOUZA CASTRO

**Desenvolvimento de microssensores eletroquímicos e
aplicações no estudo de processos dinâmicos
interfaciais utilizando Microscopia Eletroquímica de
Varredura**

Versão corrigida da Tese conforme Resolução CoPgr 5890

O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

23/11/2015

POLLYANA SOUZA CASTRO

Desenvolvimento de microssensores eletroquímicos e
aplicações no estudo de processos dinâmicos
interfaciais utilizando Microscopia Eletroquímica de
Varredura

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do Título de
Doutor em Ciências (Química)*

Orientador: Prof. Dr. Mauro Bertotti

São Paulo

2015

“Você só vive uma vez, mas se souber viver bem, uma vez será o suficiente.”

Joe E. Lewis

“A vida é construída nos sonhos e concretizada no Amor.”

Francisco Cândido Xavier

*Aos meus queridos pais Rita e Jaime pelo
apoio incondicional mesmo com toda distância.
À minha irmã Patrícia e ao meu sobrinho lindo Arthur.
Amo vocês!*

DEDICO

*Ao Professor Mauro Bertotti pelo incentivo,
confiança, paciência, amizade e ensinamentos.*

DEDICO

Agradecimentos

Aos meus pais por todo esforço e dedicação. Mãe, obrigada pela amizade e pelos conselhos. Obrigada por sempre me escutar e por ter me ensinado a ser uma pessoa de pulso igual a você. Pai, obrigada por sempre acreditar nos meus sonhos e me apoiar em todas as minhas decisões. Estaremos sempre juntos lutando por uma vida melhor com muito amor e muita saúde.

À minha irmã Paty por todos os momentos vividos e por todo aprendizado que me proporcionou. Crescemos juntas e juntas sempre estaremos. Obrigada pelo presente mais valioso, o Arthur.

Aos meus tios, primos de SJN, Rio e Juiz de Fora e a todos os agregados da minha família gigante. Agradeço ao meu padrinho Sergio Murilo por ser meu pai, meu amigo e companheiro de viagens. Em especial agradeço a minha Primona Márcia e agora Doutora em química pela amizade e companheirismo nestes 10 anos de estudo e dedicação a ciência e a química.

Ao Prof. Dr. Mauro Bertotti por ser uma pessoa brilhante e um orientador sempre presente na minha vida acadêmica. Obrigada pelo apoio e compreensão principalmente neste último ano.

Ao Prof. Dr. Ivano Gutz e ao Prof. Dr. Roberto Torresi por participarem do meu exame de qualificação e contribuir com este trabalho.

Aos Professores do Instituto de Química pela formação sólida durante a pós-graduação. Em especial gostaria de agradecer à Prof^ª Silvia Agostinho pelo aprendizado durante a disciplina de pós-graduação, à Prof^ª Denise Petri pela colaboração no trabalho com as membranas, ao Professor Lúcio Agnes pela utilização dos recursos de seu laboratório e a Professora Silvia Serrano.

Aos funcionários do Instituto de Química pela dedicação e amizade. Em especial agradeço à minha cuidadora Cristina Rodrigues, Nívea e Lúcia.

Aos Professores Patrick Unwin e Julie Macpherson pelo ano intenso de trabalho e diversão na Warwick University durante o estágio de sanduíche. Obrigada pela oportunidade única em vida.

Aos amigos do laboratório LSEME (Ana, Luiza, Carla, Alex, Gabriel, Aline, Anand, Lucas e Alan) e todos os outros que passaram por lá durante o tempo de pós-graduação. Agradeço também a todos os colegas do IQ-USP em especial a Fabis, Othon, Rafinha, Rafão e Fernando.

Aos Professores da Universidade Federal de Juiz de Fora por terem contribuído com a minha formação. Em especial agradeço ao Prof. Dr. Renato Camargo Matos pela iniciação científica e o primeiro contato com a eletroquímica.

Aos amigos da Warwick University pelo ano intenso e prazeroso. Em especial gostaria de agradecer à Rehab Al Brotos, Binoy Nadappuram, Robert Lazenby, Aleix Guell e Dmitry Momotenko pelos valiosos ensinamentos. Também gostaria de agradecer às minhas queridas amigas Maria Adobes Vidal, Faduma Maddar, Sze-yin Tan, Emma Ravenhill e Minkyung Kang (seremos para sempre #FYG).

Aos amigos de sempre Sabrina, Maryane, Del, Gy, Rapha, Luana e Luís. Cada um de vocês sabe do carinho especial que sinto e a gratidão pela amizade que construímos.

Agradeço aos amigos de república desses últimos 3 anos Diego, Ricardo, Jota, Renatinha e Nacho Dias.

A todos que, de alguma maneira, contribuíram para realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de doutorado sanduíche pelo programa Ciências sem Fronteiras e à Fundação de Amparo à Pesquisa Científica de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro.

Muito Obrigada!

Resumo

Castro, P. S. “Desenvolvimento de microssensores eletroquímicos e aplicações no estudo de processos dinâmicos interfaciais utilizando Microscopia Eletroquímica de Varredura”. 2015. 194p. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

O trabalho descrito nesta tese mostra de forma detalhada a fabricação e caracterização de diferentes microssensores eletroquímicos os quais têm sido recentemente utilizados como sondas em grupo de técnicas conhecida como *Scanning Electrochemical Probe Microscopy* (SEPM). Desta forma, a caracterização de superfícies pode ser feita explorando diferentes fenômenos interfaciais relevantes à Ciência. Neste sentido, as interfaces de materiais cristalinos como hidroxiapatita (materiais dentários) e calcita foram o foco de estudo neste trabalho. Assim, diferentes técnicas SEPM foram exploradas no sentido de se obter informações relevantes relacionadas aos processos dentários, como a erosão ácida e hipersensibilidade. Inicialmente, microeletrodos de platina foram desenvolvidos empregando uma metodologia convencional na qual são utilizados microfibras encapsuladas em capilares de vidro. *Scanning Electrochemical Microscopy* (SECM) no modo amperométrico foi utilizada para obtenção de informações com relação às alterações de topografia do esmalte dentário causadas pelo contato com substâncias ácidas. Adicionalmente, SECM foi empregada no estudo do transporte de espécies eletroativas em amostras de dentina e investigações relacionadas ao bloqueio dos túbulos empregando-se cremes dentais comerciais foram realizadas. A permeação de peróxido de hidrogênio pela dentina também foi estudada. Os resultados de SECM foram comparados com imagens SEM obtidas nas mesmas condições experimentais. Microeletrodos de membrana ionófora íon-seletiva (*Ion Selective Microelectrodes*-ISMEs) sensíveis a íons cálcio também foram desenvolvidos e caracterizados, com subsequente aplicação em SECM no modo potenciométrico. A dissolução ácida de esmalte bovino (erosão dentária) foi investigada em diferentes valores de pH (2,5; 4,5; 6,8). Além disso, o transporte de íons cálcio através de membranas porosas sintéticas foi avaliado a uma distância tip/substrato de 300µm. Alterações no fluxo de íons cálcio foram correlacionadas em experimentos realizados na presença e ausência de campos magnéticos gerados por nanopartículas de magnetita incorporadas à membrana porosa. Microcristais de calcita facilmente sintetizados pelo método de precipitação foram utilizados como superfície modelo para investigações interfaciais, cujos resultados podem ser correlacionados aos materiais dentários. Desta forma, nanopipetas de vidro preenchidas com eletrólito suporte foram fabricadas e utilizadas como sonda em *Scanning Ion Conductance Microscopy* (SICM). O mapeamento topográfico de alta resolução espacial da superfície de um microcristal de calcita foi obtido utilizando o modo de varredura *hopping mode*. Adicionalmente, sondas multifuncionais ISME-SICM também foram desenvolvidas e caracterizadas para investigações simultâneas com relação às alterações topográficas e quantificação de íons cálcio sobre a superfície de um microcristal de calcita. A adição de reagentes ácidos no canal SICM promoveu a dissolução da superfície do microcristal, sendo obtidos dados cinéticos de dissolução. Investigações em meio neutro também foram realizadas utilizando a sonda ISME-SICM. Os resultados experimentais obtidos também foram comparados com aqueles oriundos de simulação computacional.

Palavras chave: SECM, sensores eletroquímicos, fabricação de microsensores, dissolução ácida, hipersensibilidade dentária, transporte por membranas, sondas multifuncionais

Abstract

Castro, P. S. **“Development of microprobes and applications on interfacial dynamics processes using Scanning Electrochemical Microscopy”**. 2015. 194p. Ph.D Thesis. Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

The study reported in this thesis shows in details the fabrication and characterization of different electrochemical microsensors which have been employed as probes in SEPM. Thus, the characterization of surfaces can be performed by exploiting different interfacial phenomena that are relevant to life sciences. In this sense, the interfaces of crystalline materials such as hydroxyapatite (dental materials) and calcite were the focus of this study. Thus, different SEPM techniques were explored in order to obtain relevant information related to dental materials processes such as acid erosion and hypersensitivity. Initially, platinum microelectrodes were developed employing conventional methodology that utilizes microfibers encapsulated in glass capillaries. Amperometric SECM mode was used to obtain information regarding the topography changes of tooth enamel caused by contact with acid chemicals. In addition, SECM was used to study the transport of electroactive species in dentin samples. Investigations related to the treatment of dental hypersensitivity and dental whitening were also evaluated. SECM results were compared with SEM images obtained under the same experimental conditions. Ion-selective microelectrode (ISME) based on the ionophore membrane sensitive to calcium ions were also developed and characterized followed by application in SECM potentiometric mode. The acid dissolution of bovine enamel (dental erosion) was investigated at different pH values (2.5; 4.5; 6.8). In addition, the transport of calcium ions through synthetic porous membranes was evaluated at a tip/substrate distance of 300 μ m. Changes in calcium ion flux were studied in the presence and absence of magnetic fields generated by magnetite nanoparticles incorporated into the porous membrane. Calcite microcrystals easily synthesized by precipitation method were used as a model of an interfacial surface for investigations which can be correlated to the dental materials. Thus, glass nanopipette filled with supporting electrolyte was fabricated and used as SICM probe. The high resolution topographic mapping of the calcite microcrystal was obtained using hopping mode. Additionally, ISME-SICM multifunction probes were developed and characterized for simultaneous investigations related to the topographical changes and quantification of local calcium ions on the surface of a calcite microcrystal. The addition of acidic reagents in the SICM channel promoted the dissolution of the microcrystal surface and dissolution kinetic data were obtained. Investigations in neutral medium were also studied using the ISME-SICM multifunctional probe. The experimental results were also compared with those obtained by computer simulation.

Keywords: SECM, Electrochemical sensors, acid dissolution, dental hypersensitivity, membrane transport, multifunctional probes.

Lista de Figuras

Figura 1.1 - Perfil de difusão em dois processos dinâmicos complexos distintos a) dissolução de um cristal em solução aquosa e b) fluxo/transporte de substâncias através de membranas.

Figura 1.2 - Representação esquemática (sem escala) dos modos de varredura altura constante e distância constante, ambos empregados em SECM.

Figura 1.3 - Diferentes sensores eletroquímicos frequentemente utilizados em SEPM. SECM: microeletrodo em solução eletrolítica. SECCM: menisco formado entre o capilar duplo contendo solução eletrolítica e o substrato, SECM-SICM: sonda multifuncional em solução eletrolítica.

Figura 1.4 - Representação esquemática do equipamento SECM utilizado nos experimentos descritos na tese. LSEME- Laboratório de Sensores Eletroquímicos e Métodos Eletroanalíticos.

Figura 1.5 - Sistemas usualmente investigados utilizando SECM no modo amperométrico e sua referente resposta de corrente sobre influência de diferentes substratos.

Figura 1.6 - Representação esquemática das etapas do processo de fabricação de microeletrodos de disco utilizando o equipamento Micropipette Puller para aplicações em SECM.

Figura 1.7 - Comportamento da corrente monitorada pelo microeletrodo quando o mesmo está a uma distância infinita do substrato (A), quando está próximo de um substrato condutor (B) e quando está próximo de um substrato isolante (C).

Figura 1.8 – Curvas de aproximação teóricas e experimentais para Positive Feedback e Negative Feedback obtidos em substrato condutor e isolante, respectivamente.

Figura 1.9 - Representação esquemática do parâmetro RG.

Figura 1.10 - Curvas de aproximação teóricas para Negative Feedback utilizando diferentes valores de RG

Figura 1.11 - Representação esquemática da estrutura do dente.

Figura 1.12 - Imagem de umas das faces da amostra de dentina usada nos experimentos de permeação utilizando SECM.

Figura 1.13 - Imagem da amostra de dentina para experimentos SEM. Região em destaque a qual foi mapeada por SEM.

Figura 1.14 - Representação esquemática da preparação da amostra de dente bovino (esmalte dentário) para os experimentos SECM relacionado às alterações topográficas da superfície.

Figura 1.15 - Imagem da célula eletroquímica fabricada em PMMA. Compartimento doador com entrada e saída de solução (A) e compartimento aceitor com volume total de 3 mL (B).

Figura 1.16 - Representação esquemática do experimento SECM de permeação de espécies eletroativas através de dentina. Compartimento doador (A) e compartimento aceitor (B) de espécies eletroativas.

Figura 1.17 - Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de $K_3[Fe(CN)_6]$ 15 mmol L^{-1} + KCl 100 mmol L^{-1} utilizando microeletrodos de Pt (A) $r = 3,5 \text{ }\mu\text{m}$ e (B) $r = 10 \text{ }\mu\text{m}$. ($D = 7,6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$).

Figura 1.18 - Imagens SEM de amostras de dentina antes (A) e após (B) o tratamento de limpeza em EDTA.

Figura 1.19 - Permeação de $K_3[Fe(CN)_6]$ através de dentina utilizando microeletrodo Pt ($r = 3,5 \mu m$, $RG = 15,2$; $d = 50 \mu m$ e $E_{tip} = -0,1 V$) Altura do reservatório (H) 5 cm, 10 cm e 20 cm. Solução doadora $K_3[Fe(CN)_6]$ $100 mmol L^{-1}$ + KCl $100 mmol L^{-1}$ e solução receptora KCl $100 mmol L^{-1}$.

Figura 1.20- Representação esquemática da obliteração dos túbulos dentários após o uso de produtos comerciais que precipitam na interface dentina/saliva.

Figura 1.21 - Imagens SECM da permeação de $K_3[Fe(CN)_6]$ através dentina utilizando microeletrodo de Pt ($r = 3,5 \mu m$, $RG = 15,2$ $d = 10 \mu m$, $E_{tip} = -0,1 V$, e $v_{step} = 10 \mu m s^{-1}$). (A) antes e (B) após utilização de creme dental contendo arginina. Solução doadora $K_3[Fe(CN)_6]$ $100 mmol L^{-1}$ + KCl $100 mmol L^{-1}$ e solução aceptora KCl $100 mmol L^{-1}$.

Figura 1.22 - Imagens SEM da superfície de dentina submetidas ao tratamento com creme dental convencional (A), creme dental contendo arginina (B) e creme dental contendo acetato de estrôncio (C). Em A₁, B₁ e C₁ amostras controle, A₂, B₂ e C₂ primeira aplicação de cada produto, A₃, B₃ e C₃ segunda aplicação de cada produto.

Figura 1.23 - Imagens SEM da superfície de dentina submetidas ao tratamento com creme dental convencional (A), creme dental contendo arginina (B) e creme dental contendo acetato de estrôncio (C). Em A₁, B₁ e C₁ amostras controle, em A₂, B₂ e C₂ primeira aplicação de cada produto + desafio erosivo em refrigerante de cola, em A₃, B₃ e C₃ segunda aplicação de cada produto + desafio erosivo em refrigerante de cola.

Figura 1.24 - Imagens SEM da superfície de dentina submetidas ao tratamento com creme dental contendo arginina + desafio erosivo (A) e creme dental contendo acetato de estrôncio + desafio erosivo (B).

Figura 1.25 - Curva de aproximação obtida em solução de $K_3[Fe(CN)_6]$ $15 mmol L^{-1}$ + KCl $100 mmol L^{-1}$ utilizando microeletrodo de Pt ($r = 10 \mu m$, $RG = 10,2$, $E_{tip} = -0,1 V$, $v_{app} = 1 \mu m s^{-1}$) sobre área de referência (superfície de esmalte polido) (---) curva experimental, (—) curva de aproximação teórica (negative feedback). L = razão entre distância tip-substrato e raio do microeletrodo.

Figura 1.26 - Imagens topográficas SECM obtidas em solução de $K_3[Fe(CN)_6]$ $15 mmol L^{-1}$ + KCl $100 mmol L^{-1}$ utilizando microeletrodo de Pt ($r = 10 \mu m$, $RG = 10,2$; $E_{tip} = -0,1 V$ $d = 5 \mu m$ e $v_{step} = 20 \mu m s^{-1}$) sobre superfície de esmalte dentário após contato com (A) água mineral (experimento controle), (B) solução de ácido cítrico $20 mmol L^{-1}$ pH 2,2 e (C) solução de ácido clorídrico $80 mmol L^{-1}$ pH 1,2.

Figura 1.27 - Voltamogramas cíclicos utilizando microeletrodo Pt ($r = 5 \mu m$, $RG = 10,2$ e $v = 50 mV s^{-1}$). (—) solução controle KCl $100 mmol L^{-1}$, (—) solução de H_2O_2 $10 mmol L^{-1}$ + KCl $100 mmol L^{-1}$.

Figura 1.28 - Amperograma para adições sucessivas de H_2O_2 em solução de KCl $100 mmol L^{-1}$ e correlação linear entre concentração e corrente na faixa de 0,05 a 0,5 $mmol L^{-1}$. $E_{tip} = 0,9 V$

Figura 1.29 – Permeação de H_2O_2 através de esmalte/dentina utilizando microeletrodo Pt ($r = 5 \mu m$ e $d = 50 \mu m$) (—) primeira aplicação, (—) segunda aplicação, (—) terceira aplicação e (—) permeação controle utilizando solução de KCl $100 mmol L^{-1}$. Solução doadora H_2O_2 $9,8 mmol L^{-1}$ + KCl $100 mmol L^{-1}$ e solução receptora de KCl $100 mmol L^{-1}$.

Figura 1.30 - Imagens SEM da superfície de dentina sem tratamento (A), após primeira sessão (B), após segunda sessão (C) e após terceira sessão (D) de clareamento dentário utilizando H_2O_2 $9,8 mmol L^{-1}$ durante 1 h.

Figura 2.1 – Representação esquemática do potencial desenvolvido entre dois compartimentos contendo duas soluções separadas por uma membrana semipermeável

Figura 2.2 - Estrutura do ionóforo ETH 1001 utilizado no desenvolvimento dos sensores ISME para detecção de íons cálcio.

Figura 2.3 - Representação esquemática (sem escala) de um típico ISME, contendo a membrana ionófora, a solução de referência interna e um eletrodo $\text{Ag}|\text{AgCl}$.

Figura 2.4 - Imagem SEM de uma membrana de xantana preparada utilizando-se ácido cítrico durante a etapa de reticulação.

Figura 2.5 – Representação esquemática dos experimentos de permeação de íons cálcio através de filmes poliméricos e investigação da influência de campos magnéticos externos. O eletrodo de referência foi omitido

Figura 2.6 - Imagens SEM mostrando em (a) a ponta de uma micropipeta afinada no puxador a laser formando uma abertura com raio interno (r_1) = $1,5\ \mu\text{m}$ e em (b) vista lateral mostrando a forma cônica da micropipeta.

Figura 2.7 - Representação esquemática da superfície do vidro borossilicato mostrando os grupos hidroxila expostos após condicionamento ácido.

Figura 2.8 - Reação entre os vapores de $(\text{CH}_3)_2\text{SiCl}_2$ e grupos hidroxila na superfície interna do micropipeta de vidro.

Figura 2.9 - Reação entre os vapores de TMSDMA e grupos hidroxila na superfície interna do micropipeta de vidro.

Figura 2.10 - Imagem óptica da ponta do microsensor ISME, mostrando com detalhe a interface membrana ionófora/ solução de referência interna CaCl_2 $100\ \text{mmol L}^{-1}$.

Figura 2.11 – Curvas de calibração de um microsensor ISME mostrando seu comportamento nernstiano

Figura 2.12 – Estabilidade do microsensor ISME: Medida de potencial de circuito aberto (vs. $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{KCl}_{(\text{sat})}$) em solução de CaCl_2 $1\ \text{mmol L}^{-1}$ + KCl $100\ \text{mmol L}^{-1}$, pH = 6,8.

Figura 2.13: Posicionamento do microsensor ISME sobre superfície de esmalte dentário. Em a, aproximação utilizando motor de passo com microsensor muito próximo à superfície e em b microsensor a $300\ \mu\text{m}$ de distância da superfície.

Figura 2.14: Exemplo de erosão dentária causada pelo consumo excessivo de refrigerante de cola.

Figura 2.15 - Dissolução ácida do esmalte dentário utilizando o microsensor ISME ($r_1 = 1,5\ \mu\text{m}$). (—) controle em solução de KCl $100\ \text{mmol L}^{-1}$ pH 6,7; (—) monitoramento da concentração de íons cálcio sobre superfície de esmalte dentário em solução de KCl $100\ \text{mmol L}^{-1}$ pH 6,7, (—) monitoramento da concentração de íons cálcio sobre superfície de esmalte dentário em solução de KCl $100\ \text{mmol L}^{-1}$ + HCl $0,1\ \text{mmol L}^{-1}$ pH 4,0; (—) monitoramento da concentração de íons Ca^{2+} sobre superfície de esmalte dentário em solução de KCl $100\ \text{mmol L}^{-1}$ + HCl $5\ \text{mmol L}^{-1}$ pH 2,5. $300\ \mu\text{m}$)

Figura 2.16 – Permeação de íons Cálcio através de membranas sintéticas utilizando ISME ($d = 300\ \mu\text{m}$). (a) sem ESMF e (b) com ESMF. (—) membrana neutra, (—) membrana de xantana e (—) membrana de xantana/magnetita.

Figura 3.1 - Representação esquemática do aparato instrumental utilizado em SICM.

Figura 3.2 - Geometria 2D de uma nanopipeta de vidro utilizada em SICM

Figura 3.3: Modos de varredura em SICM: a) sem modulação de distância tip/substrato (i_{DC}). b) com modulação de distância tip/substrato (i_{DC})

Figura 3.4 - Curva de aproximação teórica SICM.

Figura 3.5 - Modo de varredura Hopping Mode usualmente utilizado em SICM.

Figura 3.6 - Modo de varredura Hopping Mode frequentemente empregado no mapeamento de superfícies utilizando SICM.

Figura 3.7 - Imagem SEM mostrando a ponta de um nanossensor SICM afinado no puxador a laser formando uma abertura com raio interno (r_1) = 200 nm.

Figura 3.8 - Curvas de aproximação utilizando sonda SICM ($r_1 = 200$ nm, $v_{app} = 2 \mu\text{m s}^{-1}$, $E_{DC} = 0,1$ V) em solução de KCl 100 mmol L⁻¹ pH = 6,8.

Figura 3.9 - Modo de varredura hopping mode com modulação da distância utilizado em SICM

Figura 3.10 - (a) Micrografia óptica de um microcristal de calcita, (b) Imagem topográfica SICM, (c) imagem topográfica (shading_interp no programa MatLAB) ($r_1 = 200$ nm, $v_{app} = 1,5 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$, $-Z_{app} = 10 \mu\text{m}$, $-v_{app} = 1,5 \mu\text{m s}^{-1}$, $\text{Step}_{x,y} = 2 \mu\text{m}$).

Figura 4.1 - Representação esquemática de um sensor multifuncional SECM-SICM para detecção simultânea da topografia e reatividade eletroquímica da superfície

Figura 4.2 - (a) Representação esquemática do sensor multifuncional ISME-SICM e parte do circuito elétrico utilizado. b) Representação esquemática do sensor ISME-SICM empregando contato elétrico convencional. c) Micrografia óptica de um típico sensor ISME-SICM empregando contato elétrico líquido. d) Representação esquemática do sensor ISME-SICM empregando contato elétrico sólido. e) Micrografia óptica de um sensor ISME-SICM empregando contato elétrico sólido.

Figura 4.3 - Capilares de vidro produzidos em diferentes configurações

Figura 4.4 - Imagem SEM de um típico capilar duplo de vidro com dois canais semielípticos separados por um septo de vidro. Diâmetro total da sonda multifuncional ISME-SICM $d_i = 1,3 \mu\text{m}$.

Figura 4.5 - Sensor ISME-SICM utilizando contato elétrico convencional. a) Curva de calibração obtida durante 3 dias consecutivos. b) Estabilidade do sensor em solução de CaCl_2 0,1 mmol L⁻¹ + KCl 100 mmol L⁻¹ pH 6,8 ($\text{pCa}^{2+} = 4$). c) Curvas de calibração para íons Ca^{2+} em solução de KCl 100 mmol L⁻¹ pH 6,8 aplicando diferentes potenciais no canal SICM. Diâmetro da sonda ISME-SICM $d_i = 1,3 \mu\text{m}$

Figura 4.6 - Preparação do contato elétrico sólido. a) Voltamogramas cíclicos registrados durante a eletropolimerização de EDOT sobre microfibras de carbono b) Voltamogramas cíclicos registrados durante a dopagem de PEDOT em líquido iônico BMIM⁺ PF₆⁻, c) Voltamogramas cíclicos de PEDOT dopado em solução KCl 0,1 mol L⁻¹. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. d) Micrografia óptica de uma microfibras de carbono revestida com PEDOT.

Figura 4.7 - Eletropolimerização de EDOT sobre microfibras de carbono em líquido iônico.

Figura 4.8 - Curva de calibração usando sensor multifuncional ISME-SICM com contato elétrico sólido PEDOT em soluções de CaCl_2 , entre 0,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 10 mmol L⁻¹ ($\text{pCa}^{2+} = 7$ e $\text{pCa}^{2+} = 2$,

respectivamente) em solução de KCl 100 mmol L⁻¹ pH 6,8. Inset: estabilidade potenciométrica do sensor utilizando solução de CaCl₂ 0,01 mmol L⁻¹ (pCa²⁺ = 5) em solução de KCl 100 mmol L⁻¹ pH 6,8. Diâmetro da sonda ISME-SICM $d_i = 3 \mu\text{m}$

Figura 4.9 - a) resposta SICM e b) resposta ISME para curvas de aproximação sobre um microcristal de calcita usando sensor ISME-SICM com velocidades de 0,2; 0,8; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 $\mu\text{m s}^{-1}$ em solução de KCl 100 mmol L⁻¹ pH 6,8. Diâmetro da sonda ISME-SICM $d_i = 1,3 \mu\text{m}$

Figura 4.10 - Sensores ISME-SICM com canal SICM neutro (linha preta) e canal SICM ácido (linha vermelha). a) Curvas de calibração, b) Curvas de aproximação sobre microcristal de calcita e c) Curvas de aproximação sobre superfície de vidro longe de qualquer cristal. Diâmetro da sonda ISME-SICM $d_1 = 1,3 \mu\text{m}$

Figura 4.11 - Representação esquemática do modelo geométrico FEM, representando o microcristal de calcita em solução de eletrólito.

Figura 4.12 - Perfis de concentração de íons cálcio (a) e pH interfacial (b) ao redor de um microcristal de calcita em processo de dissolução em solução de KCl 100 mmol L⁻¹ pH 6,8.

Figura 4.13 - Representação esquemática do modelo geométrico FEM, representando o microcristal de calcita e sensor ISME-SICM em solução de eletrólito. Os números das diferentes faces representam as condições de contorno na modelagem, sendo que o canal ISME foi desconsiderado. Veja Tabela 4.4 para condições de contorno. Diâmetro da sonda ISME-SICM $d_i = 3 \mu\text{m}$

Figura 4.14 - pH interfacial (a) e perfis de concentração de íons cálcio (b) ao redor de um microcristal de calcita e dentro do canal SICM. Diâmetro da sonda ISME-SICM $d_i = 3 \mu\text{m}$

Figura 4.15 Curvas de aproximação monitorando i_{DC} utilizando sensores ISME-SICM canal neutro (linha preta) e canal ácido (linha vermelha) sobre um microcristal de calcita. Diâmetro da sonda ISME-SICM $d_i = 1,3 \mu\text{m}$

Figura 4.16 - Concentração de íons cálcio a 700 nm de distância da superfície de microcristal de calcita em função de diferentes valores de fluxo interfacial J_{surf} .

Figura 4.17 - a) Micrografia óptica b) mapa topográfico c) perfil de concentração de íons cálcio sob condições de dissolução ácida utilizando o modo de varredura Hopping Mode. Diâmetro da sonda ISME-SICM $d_1 = 3 \mu\text{m}$. $v_{app} = 1,5 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$, $-Z_{app} = -20 \mu\text{m}$, $Step_{x,y} = 5 \mu\text{m}$.

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos*

SEPM - *Scanning Electrochemical Probe Microscopy*

SECM - *Scanning Electrochemical Microscopy*

ISME - *Ion Selective Microeletrode*

SICM - *Scanning Ion Conductance Microscopy*

ISME-SICM - sensor multifuncional ISME-SICM

FEM - *Finite Element Modeling*

Tip - sonda eletroquímica

AFM - *Atomic Force Microscopy*

SEM - *Scanning Electron Microscopy* ou MEV – *Microscopia Eletrônica de Varredura*

TG/SC - tip geradora/ substrato coletor

SG/TC - substrato gerador/ tip coletora

(AC)SECM - corrente alternada-SECM

(SF)SECM - *shear force*-SECM

(IC)SECM - contato intermitente-SECM

(DB)SECM - *droplet based*-SECM

AFM-SECM - técnica híbrida AFM-SECM

RG – relação entre raio total e raio da microfibrila

PMMA - polimetilmetacrilato

CLSM - *Confocal Laser Scanning Microscopy*

ISE – *Ion Selective Electrode*

PVC - policloreto de vinila

ISFET - transistor de efeito de campo sensíveis a íon

ESMF - *External Static Magnetic Field*

QRCE - quase-referência contra-eletrodos

*as abreviações nem sempre foram traduzidas da língua inglesa para evitar ambiguidades nas interpretações.

Sumário

Capítulo 1 - SECM modo amperométrico	23
1.1. Introdução	24
1.1.1. Histórico e desenvolvimento da técnicas de Microscopia Eletroquímica.....	24
1.1.2. Microscopia Eletroquímica de Varredura (SECM).....	31
1.1.3. Fabricação de microeletrodos para aplicações em SECM.....	33
1.1.4. Modos de operação utilizados em SECM amperométrico.....	37
1.1.5. Investigação de fenômenos interfaciais.....	43
1.1.5.1. Hipersensibilidade Dentária: causas e tratamentos	44
1.2. Objetivos	48
1.3. Parte Experimental.....	48
1.3.1. Reagentes	48
1.3.2. Instrumentação	49
1.3.3. Preparação das amostras de dente bovino.....	50
1.3.4. Experimento de erosão ácida em amostras de esmalte dentário	53
1.3.5. Experimentos de permeação de espécies eletroativas em dentina	55
1.4. Resultados e discussões dos resultados.....	56
1.4.1. Fabricação e caracterização de microeletrodos para aplicações em SECM	56
1.4.2. Estudo de transporte de espécies eletroativas através de dentina	58
1.4.2.1. Caracterização da dentina utilizando SEM.....	58
1.4.2.2. Estudo do transporte de espécies eletroativas através de dentina utilizando SECM60	
1.4.2.3. Estudo de eficiência da obliteração dos túbulos dentários utilizando SECM	62
1.4.2.4. Estudo da obliteração dos túbulos dentários utilizando SEM.....	66
1.4.2.5. Estudo da resistência ácida dos agentes obliterantes utilizando SEM	69
1.4.3. Estudo do das alterações topográficas do esmalte dentário utilizando SECM.....	72
1.4.4. Estudo do transporte de H ₂ O ₂ através de esmalte/dentina utilizando SECM	77
1.4.4.1. Alterações morfológicas na dentina causada por H ₂ O ₂ investigadas por SEM	81
1.5. Conclusões.....	83
Capítulo 2 - SECM modo potenciométrico.....	85
2.1. Introdução	86
2.1.1. Eletrodos Íon-Seletivo (ISE): Histórico e desenvolvimento de sensores miniaturizados.....	87
2.1.2. Microeletrodos íon-seletivos (ISME) de membrana líquida	89

2.1.3. ISME para detecção de íons Cálcio.....	94
2.2. Objetivos	96
2.3. Parte Experimental.....	97
2.3.1. Materiais	97
2.3.2. Instrumentação	98
2.3.3. Fabricação de microeletrodos íon-seletivos (ISME) de membrana líquida	98
2.3.4. Protocolo de calibração dos sensores ISME para detecção de íons Cálcio.....	100
2.3.5. Preparo dos filmes poliméricos: membrana neutra, membrana de xantana e membrana de xantana/magnetita.....	100
2.3.6. Experimento de permeação de íons Cálcio através de filmes poliméricos.....	102
2.4. Resultados e discussões dos resultados.....	103
2.4.1. Caracterização de micropipetas utilizando SEM	103
2.4.2. Procedimento de silanização para preparo do microsensor ISME.....	104
2.4.3. Calibração e estabilidade do microsensor ISME para detecção de íons Cálcio.....	106
2.4.4. SECM: Aproximação sobre uma superfície utilizando ISME	109
2.4.5. Estudo da dissolução ácida do esmalte dentário utilizando ISME para a detecção de íons cálcio	110
2.4.6. Estudo do transporte de íons cálcio através de membranas sintéticas utilizando ISME.....	115
2.5. Conclusões.....	119
Capítulo 3 – SICM hopping mode.....	121
3.1. Introdução	122
3.1.1. Microscopia de Condutancia Iônica de Varredura (SICM)	122
3.1.2. Mecanismos de feedback posicional utilizados em SICM	125
3.1.3. Modos de varredura utilizados em SICM	128
3.1.4. Aplicações utilizando SICM	129
3.2. Objetivos	130
3.3. Parte Experimental.....	131
3.3.1. Reagentes.....	131
3.3.2. Instrumentação	131
3.3.3. Fabricação de nanopipetas SICM	132
3.3.4. Preparação de microcristais de calcita.....	133
3.4. Resultados e discussões dos resultados.....	133
3.4.1. Caracterização de nanopipetas por SEM	133
3.4.2. Curvas de aproximação utilizando SICM	134

3.4.3. Topografia de um microcristal de calcita utilizando SICM-hopping mode	136
3.5. Conclusões.....	138
Capítulo 4	139
Sondas multifuncionais ISME-SICM	139
4.1. Introdução	140
4.2. Objetivos	143
4.3. Parte Experimental.....	144
4.3.1. Reagentes.....	144
4.3.2. Instrumentação	144
4.3.3. Preparação dos microcristais de calcita	145
4.3.4. Preparação das sondas multifuncionais ISME-SICM	146
4.3.5. Protocolo de calibração do canal ISME para detecção de íons cálcio	148
4.3.6. Protocolo de medida ISME-SICM	149
4.3.7. Modelagem Computacional	149
4.3.7.1. Modelo de dissolução dos microcristais de calcita em meio neutro	150
4.3.7.2. Modelo de dissolução dos microcristais de calcita em meio ácido	150
4.4. Resultados e Discussões dos resultados	151
4.4.1. Caracterização das sondas multifuncionais ISME-SICM utilizando SEM.....	151
4.4.2. Preparação das sondas multifuncionais ISME-SICM	153
4.4.3. Calibração das sondas multifuncionais ISME-SICM.....	153
4.4.4. Preparação do contato elétrico sólido no canal ISME utilizando polímero condutor EDOT	155
4.4.5. Avaliação do tempo de resposta do canal ISME durante curvas de aproximação	159
4.4.6. Estudo da dissolução ácida de microcristais de calcita utilizando sondas multifuncionais ISME-SICM.....	161
4.4.7. Finite element method FEM.....	164
4.4.7.1. Dissolução dos microcristais de calcita em meio neutro	165
4.4.7.2. Dissolução dos microcristais de calcita em meio ácido	169
4.4.8. Imagem do microcristal de calcita utilizando sondas multifuncionais ISME-SICM.....	173
4.5. Conclusões.....	176
Capítulo 5	177
Considerações Finais e Perspectivas	177
Capítulo 6	180
Referências Bibliográficas	180
Súmula Curricular	i

Apresentação da tese

Microscopia por Sonda Eletroquímica de Varredura (*Scanning Electrochemical Probe Microscopy - SEPM*), de forma generalizada, baseia-se no uso de um sensor eletroquímico posicionado próximo à superfície de interesse para mapear quantitativamente processos físico-químicos interfaciais altamente localizados. Aplicações relevantes na ciência e tecnologia investigam processos que ocorrem em dimensões micro e nanométricas sendo, portanto, a resolução espacial das imagens determinadas pelo tamanho da sonda eletroquímica. Portanto, a minaturização de sensores tem atraído considerável atenção no sentido de desenvolver metodologias reprodutíveis que gerem sensores eletroquímicos com alta sensibilidade, estáveis e com rápido tempo de resposta. Desta forma, a eletroquímica pode ser considerada uma ferramenta fundamental, auxiliando na compreensão de vários fenômenos em diferentes áreas do conhecimento. Nesse sentido, a presente tese baseia-se, no desenvolvimento e caracterização de sensores eletroquímicos incluindo microeletrodos, microeletrodos íon-seletivos, micropipetas e sondas multifuncionais, os quais podem ser aplicados em diferentes técnicas da família de SEPMs para investigações de processos dinâmicos interfaciais.

No Capítulo 1, será abordada a construção e caracterização de microeletrodos de platina e concomitante uso em SECM (*Scanning Electrochemical Microscopy*) no modo amperométrico. Materiais dentários foram utilizados como substrato e investigações relevantes com relação à Hipersensibilidade Dentária e Erosão Ácida foram obtidas. Desta forma, as alterações da topografia do esmalte dentário causadas pelo processo de dissolução ácida induzida foram investigadas utilizando SECM. Além disso, investigações com respeito ao transporte de espécies eletroativas através de dentina foram realizadas para avaliar a eficácia de produtos comerciais usados para o tratamento da Hipersensibilidade Dentária, assim como na investigação da permeação de agentes

clareadores. Os resultados obtidos foram comparados com as observações obtidas por SEM.

O Capítulo 2 mostra o desenvolvimento de microeletrodos íon-seletivos (ISME) e concomitante utilização de SECM no modo potenciométrico. O sensor ISME, sensível a íons Cálcio, foi utilizado para investigar o perfil de dissolução ácida do esmalte dentário em diferentes pHs. Além disso, o transporte de íons Cálcio através de filmes poliméricos porosos foi brevemente estudado, e investigações com relação à influência de campos magnéticos na permeação dessas espécies carregadas foram realizadas e correlacionadas com dados de crescimento celular sobre as mesmas condições experimentais.

O Capítulo 3 demonstra o uso de nanopipetas de vidro, preenchidas com solução de eletrólito suporte, as quais foram utilizadas como sondas em SICM (Scanning Ion Conductance Microscopy). O mecanismo de *feedback* por modulação de distância, bem como o modo de varredura *Hopping Mode*, são descritos e utilizados com sucesso no mapeamento da topografia de um microcristal de calcita. Com esta técnica foi possível obter imagens topográficas de alta resolução espacial e temporal.

Finalmente, o Capítulo 4 descreve o desenvolvimento de um novo microssensor multifuncional ISME-SICM, abordando-se a metodologia de fabricação empregada bem como a caracterização da sonda para detecção simultânea dos sinais referentes a ambos os canais. A capacidade de liberação controlada de reagentes ácidos adicionados ao canal SICM também foi explorada, sendo possível investigar simultaneamente as alterações de topografia e a dissolução ácida localizada induzida sobre a superfície de microcristal de calcita. Além disso, *Finite Element Modeling* (FEM) foi utilizado para validação dos resultados experimentais e comparação com dados obtidos na literatura.

Capítulo 1

SECM modo amperométrico

**Uso de microeletrodos de platina para obtenção
da topografia e fluxo de espécies eletroativas
em materiais dentários**

1.1. Introdução

1.1.1. Histórico e desenvolvimento da técnicas de Microscopia Eletroquímica

A Microscopia de Varredura por Sonda Eletroquímica (*Scanning Electrochemical Probe Microscopy* – SEPM) compreende uma família de técnicas microscópicas que utilizam como sonda um micro nanosensor eletroquímico posicionado muito próximo à superfície de um substrato (Bottomley, Coury, and First 1996). Usualmente, a sonda eletroquímica empregada nas verreduras é denominada de *tip*. Quando um microeletrodo é utilizado como *tip*, podemos definir a técnica de Microscopia Eletroquímica de Varredura (*Scanning Electrochemical Microscopy* – SECM). SECM utiliza um microeletrodo imerso em solução aquosa contendo uma substância eletroativa e desta forma informações com relação à topografia e reatividade do substrato podem ser obtidas. SECM foi primeiramente introduzida pelo grupo do Prof. Allen. J. Bard, na Universidade do Texas, Austin em 1989 (Bard et al. 1989; Juhyoun Kwak and Bard 1989; Tsionsky et al. 1999; Amemiya et al. 2008;) e deste então vem contribuindo significativamente para investigações sobre perfis de concentração localizados em diferentes tipos de substratos (Amemiya et al. 2006; Fernandez and Bard 2003; Neufeld and O'Mullane 2006). Relativamente nova e ainda pouco difundida no Brasil, a SECM vem sendo mais frequentemente operada no modo amperométrico, fazendo-se uso de microeletrodos (2 a 25 μm de diâmetro) como sonda (Mirkin and Horrocks 2000). Em SEPM, mais recentemente, outras configurações e modos de operação têm sido explorados e utilizados nas investigações interfaciais localizadas. Desta forma, novos princípios, instrumentação e teoria são amplamente discutidos pela comunidade científica. Assim, o escopo desta tese é mostrar aplicações utilizando a convencional SECM, assim como outras metodologias SEPM demonstrando a capacidade de mapear processos interfaciais localizados.

A diminuição do tamanho dos microeletrodos implica em uma maior resolução espacial e temporal das imagens SECM. Desta forma, o entendimento dos fenômenos eletroquímicos em superfícies de dimensões micro e nanoscópicas pode ser considerado uma das mais importantes fronteiras da ciência moderna. Aplicações utilizando SECM têm sido extensivamente reportadas na literatura, possibilitando o desenvolvimento de estudos envolvendo a transferência de elétrons em superfícies modificadas (Liu et al. 2005; Penner et al. 1990), a eletrogeração de espécies em substratos condutores, a detecção de uma molécula unitária (*single-molecule*), o mapeamento de atividade enzimática localizada (Lei et al. 2009), *etching* (Jones, Unwin, and Macpherson 2003; McGeouch et al. 2010), a dissolução de materiais (McGeouch et al. 2012), a corrosão (González et al. 2011; Santana et al. 2010) e o fluxo de espécies eletroativas em membranas (Bath et al. 1998; McKelvey et al. 2011). Em termos de topografia, pode-se afirmar que a SECM possui menor resolução lateral em comparação com técnicas como Microscopia de Força Atômica (*Atomic Force Microscopy*- AFM) e Microscopia Eletrônica de Varredura (*Scanning Electron Microscopy*- SEM) em virtude do fato de existirem limitações tanto na fabricação como no uso de microeletrodos menores do que 2 μm de diâmetro (Zoski 2002). Ainda assim, o mapeamento eletroquímico de superfícies utilizando a SECM vem, portanto, contribuindo substancialmente na evolução científica, no sentido de fornecer informações sobre a reatividade eletroquímica e perfis de difusão de espécies químicas em diferentes substratos. Como exemplo de processos frequentemente investigados por SECM e outros modos de mapeamento eletroquímico, podemos citar a dissolução de um sólido em água ou o fluxo de espécies através de membranas porosas como, por exemplo, pele (Nugues and Denuault 1996; Scott, White, and Phipps 1993), cartilagem (Gonsalves et al. 2001), tecidos de plantas (Felle 1989; Yasukawa, Kaya, and Matsue 1999), membranas lipídicas e dentes (McKelvey et al. 2011). A Figura 1.1 mostra uma representação esquemática dos fenômenos de dissolução e permeação de espécies em solução.

Figura 1.1 - Perfil de difusão em dois processos dinâmicos complexos distintos a) dissolução de um cristal em solução aquosa e b) fluxo/transporte de substâncias através de membranas.

Em SECM, a resolução lateral das imagens é determinada pela capacidade da sonda em se manter próximo do substrato durante a varredura e, na maioria dos experimentos, utiliza-se o modo altura constante. Neste modo, o microeletrodo (*tip*) é, basicamente, movido lateralmente nas direções ao longo do plano xy , possibilitando investigações sobre áreas micrométricas. Este modo de varredura é usualmente adequado para investigações em superfícies planas ou em aplicações envolvendo a geração de espécies eletroativas, sendo o microeletrodo posicionado sobre a superfície de interesse e mantendo-se constante a altura *tip*-substrato. Desta forma, as mudanças de corrente monitoradas pelo microeletrodo são devidas às variações de reatividade da superfície bem como devido à distância *tip*-substrato formando uma resposta acoplada. (J Kwak and Bard 1989; Mauzeroll et al. 2002) Geralmente, essa distância *tip*/substrato é mantida na mesma ordem de grandeza que o diâmetro do microeletrodo empregado, permitindo o mapeamento da superfície com resolução micrométrica. Em SECM no modo altura constante, o uso de sondas nanométricas implica em eventuais quebras do eletrodo devido à pequena distância de trabalho e superfícies com rugosidade alta são geralmente mapeadas utilizando outros modos de varredura, os quais serão explicados adiante.

Para superar tais limitações, o mapeamento utilizando o modo distância constante tem sido utilizado na tentativa de melhorar a resolução lateral das imagens SECM. (Nebel, Erichsen, and Schuhmann 2014) Desta forma, um sinal dependente da distância é usado para manter o microeletrodo a uma separação constante do substrato durante a varredura. A Figura 1.2 mostra uma representação esquemática mostrando os modos altura e distância constante utilizados em SECM.

Figura 1.2 - Representação esquemática (sem escala) dos modos de varredura altura constante e distância constante, ambos empregados em SECM.

A forma mais simples de utilizar o modo distância constante em SECM é modulando o sinal de corrente monitorado pelo microeletrodo em um valor constante, sendo possível, desta forma, obter o mapeamento topográfico de superfícies condutoras ou isolantes. Assim, outras metodologias foram desenvolvidas no sentido de separar as contribuições topográficas das contribuições de reatividade. Inicialmente, corrente alternada (AC)SECM foi desenvolvida para controlar a distância tip-substrato, especialmente quando biossensores e microeletrodos íon seletivos eram utilizados como sonda ou quando o foco era a investigação de superfícies modificadas (Eckhard, Schuhmann, and Maciejewska 2009). Neste caso, o controle de distância não é feito utilizando um feedback de corrente para aquisição da topografia, sendo um potencial alternado de alta frequência aplicado entre o microeletrodo e o contra eletrodo. Assim, a técnica (AC)SECM geralmente não requer a presença de mediadores redox em solução para obtenção de um feedback posicional, sendo

o sinal proveniente somente da reatividade da superfície em investigação, ou seja, da superfície modificada no substrato ou da resposta do sensor eletroquímico utilizando biossensores ou microeletrodos íon seletivos. Dessa maneira, (AC)SECM permite medida simultânea da resposta faradaica e da posição relativa no eixo z, fornecendo imagens com relação a estes dois parâmetros (Alpuche-Aviles and Wipf 2001). Mais recentemente, medidas baseadas no mecanismo *shear-force* (SF)SECM (Ballesteros Katemann, Schulte, and Schuhmann 2003) e no modo contato intermitente (IC)SECM também foram realizadas (McKelvey et al. 2011) e utilizadas no controle da distância *tip*-substrato, permitindo o mapeamento de superfícies em alta resolução lateral, já que estas metodologias necessitam de eletrodos com dimensões nanométricas, geralmente entre 100 a 400 nm de diâmetro (Etienne et al. 2006; Katemann and Schuhmann 2002).

Sondas eletroquímicas utilizadas em SECM também podem ser produzidas a partir de micro-nanopipetas de vidro preenchidas com solução, particularmente devido à transferência de íons facilitada através da interface líquido/líquido. Desta forma, o desenvolvimento de sensores baseado em nanopipetas de vidro tem sido investigado devido à maior praticidade no preparo das sondas em comparação com a fabricação de microeletrodos. Neste caso, a pipeta mantida sob aquecimento é puxada utilizando *Pipette Pullers* ao longo do seu eixo longitudinal, de forma que seu diâmetro diminua, podendo atingir dimensões nanométricas da ordem de 50 nm. Neste modo SECM, o capilar puxado (*tip*) é preenchido com um eletrólito, geralmente uma solução orgânica, imiscível em solução aquosa onde se encontra o substrato. Aplicações incluem mapeamento de superfícies eletródicas, deposição de metais, liberação controlada e localizada de espécies e dissolução de materiais. Além disso, medidas eletroquímicas de alta resolução espacial também podem ser obtidas posicionando-se pipetas, preenchidas com eletrólito, sobre superfícies secas. Tal configuração *droplet-based* (DB)SECM foi inicialmente desenvolvida para aplicações na área de corrosão, onde há formação de um menisco na ponta da pipeta que, ao entrar em contato com a superfície da amostra, gera uma corrente elétrica inerente à reatividade da

mesma (Williams et al. 2009). Mais recentemente, o uso de capilares duplos (*theta capillaries*) preenchidos com eletrólito suporte permitiu o desenvolvimento da SECCM (*Scanning Electrochemical Cell Microscopy*). Nesta técnica, uma corrente flui através de um pequeno menisco formado na ponta da nanopipeta conectando aos dois canais contendo eletrólito suporte. SECCM portanto, explora a capacidade de controlar o potencial aplicado entre os eletrodos de referência inseridos em cada canal controlando-se desta forma, o transporte de massa. Isso permite que medidas eletroquímicas específicas em um ponto particular da amostra sejam obtidas. Assim, desde sua introdução em 2010, o uso de SECCM tem possibilitado a investigação de problemas complexos que envolvem reatividade e estrutura em escala nanométrica. Aplicações na caracterização de nanotubos modificados com nanopartículas, e reatividade das camadas de grafeno podem ser encontradas em trabalhos envolvendo SECCM (Ebejer et al. 2013). Portanto, SECCM se mostra como uma metodologia extremamente eficiente para investigações de transferência de íons e elétrons em superfícies de alta relevância científica.

Em paralelo ao desenvolvimento de SECM e (DB)SECM, a Microscopia de Condutância Iônica de Varredura (*Scanning Ion Conductance Microscopy – SICM*) foi introduzida no final da década de 1980, puramente como uma técnica aplicada na obtenção de imagens topográficas, sem que houvesse contato direto com a superfície. SICM utiliza uma nanopipeta de vidro preenchida com eletrólito suporte, posicionada sobre um substrato, o qual se encontra imerso em solução eletrolítica. Este sistema opera gerando uma corrente iônica entre os eletrodos de referência situados no interior da pipeta e no seio da solução, sendo o mecanismo de feedback posicional baseado no fluxo iônico entre os dois eletrodos (corrente de condutância). A maioria das aplicações SICM envolvem investigações topográficas de materiais biológicos como células, embora medidas de transferência de íons e mapeamento de distribuição de carga também tenham sido investigados mais recentemente (Gorelik et al. 2004; Takahashi et al. 2012). A SICM será mais detalhadamente explicada no Capítulo 3.

Atualmente, diferentes configurações de sensores eletroquímicos, acoplados em uma única estrutura, têm sido exploradas e utilizadas com sucesso na investigação de problemas envolvendo a dinâmica de processos químicos e biológicos em interfaces complexas (Edwards et al. 2006; Mirkin 1999). Assim, sondas multifuncionais vêm sendo amplamente empregadas em uma variedade de aplicações, demonstrando, portanto, seu grande potencial como técnica de caracterização de superfícies (Shevchuk et al. 2001). Inicialmente, AFM-SECM foi extensivamente empregada na detecção simultânea da topografia e reatividade eletroquímica de superfícies, incluindo materiais porosos (Macpherson et al. 2002) e biológicos, como células (Salomo et al. 2010). Recentemente, SECM-SICM tem sido explorada devido à maior simplicidade na preparação da sonda, bem como sua utilização. O desenvolvimento de um novo sensor SECM-SICM será discutido com mais detalhes no Capítulo 4. A Figura 1.3 resume algumas das técnicas frequentemente aplicadas em SEPM, como SECM, SECCM, SECM-SICM, evidenciando a evolução no preparo das sondas eletroquímicas.

Figura 1.3 - Diferentes sensores eletroquímicos frequentemente utilizados em SEPM. SECM: microeletrodo em solução eletrolítica. SECCM: menisco formado entre o capilar duplo contendo solução eletrolítica e o substrato, SECM-SICM: sonda multifuncional em solução eletrolítica.

1.1.2. Microscopia Eletroquímica de Varredura (SECM)

Os elementos básicos de um equipamento SECM estão mostrados na representação esquemática da Figura 1.4.

Figura 1.4 - Representação esquemática do equipamento SECM utilizado nos experimentos descritos na tese. LSEME- Laboratório de Sensores Eletroquímicos e Métodos Eletroanalíticos.

O princípio de funcionamento da SECM envolve o deslocamento controlado de um sensor eletroquímico sobre um substrato nas direções x , y e z . O sistema de posicionamento é responsável pelo deslocamento da sonda com alta precisão e é composto por um motor de passo e uma cerâmica piezelétrica. Este permite posicionar a *tip* sobre uma região específica (z) e ainda varrer a superfície variando-se (x, y). O modo altura constante *tip*/substrato foi empregado nos experimentos SECM aqui demonstrados. O deslocamento nas direções x , y e z é feito numa velocidade constante na ordem de $\mu\text{m s}^{-1}$. A resolução das imagens obtidas utilizando SECM é fortemente influenciada pelo tamanho da sonda (área ativa do sensor eletroquímico), como também pela distância *tip*/substrato.

A célula eletroquímica é constituída de um eletrodo de trabalho (sensor eletroquímico e/ou substrato), um eletrodo de referência e um eletrodo auxiliar, sendo que o substrato é geralmente fixo na parte inferior da célula. O equipamento para as medidas eletroquímicas (bipotenciostato/galvanostato) permite trabalhar no modo amperométrico aplicando potenciais independentes no microeletrodo e no substrato e monitorando a corrente proveniente dos processos faradaicos que ocorrem em solução. O computador realiza a aquisição de dados e o controle do sistema de posicionamento.

Dentre os vários modos de operação utilizados em SECM, o presente capítulo demonstra os resultados obtidos utilizando SECM detecção amperométrica no modo altura constante (Amemiya et al. 2008; Mirkin 1999). A Figura 1.5 demonstra uma variedade de informações que podem ser obtidas em diferentes superfícies monitorando-se o sinal de corrente de um microeletrodo posicionado próximo a um substrato.

Figura 1.5 - Sistemas usualmente investigados utilizando SECM no modo amperométrico e sua referente resposta de corrente sobre influência de diferentes substratos.

1.1.3. Fabricação de microeletrodos para aplicações em SECM

Microeletrodos são eletrodos que, em determinada condição experimental, possuem dimensão comparável ou menor do que a camada de difusão (Amatore et al. 2010). Essa característica confere ao microeletrodo um comportamento eletroquímico diferenciado em consequência da elevada taxa de transporte de massa em direção à superfície eletródica (Paixão and Bertotti 2009). Desta forma, devido ao transporte de massa mais eficiente atribuído à difusão radial, um imediato perfil de estado estacionário é alcançado obtendo-se voltamogramas em perfil sigmoidal (Paixão; Bertotti, 2009). A Equação 1.1 descreve a corrente limite do estado estacionário para um processo com transporte de massa controlado por difusão:

$$i_L = 4nFDrC^* \quad \text{Equação 1.1}$$

onde: i_L = corrente limite do estado estacionário (A); n = número de elétrons envolvidos; F = constante de Faraday (96495 C mol^{-1}); D = coeficiente de difusão da espécie eletroativa ($\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$); C^* = concentração da espécie eletroativa (mol cm^{-3}); r = raio do microeletrodo (cm).

Microeletrodos são utilizados para o monitoramento de uma gama de espécies eletroativas em vários tipos de matrizes e em diversos microambientes (Arbault; Sojic *et al.*, 2004; Lowinsohn; Bertotti, 2006; Wightman, 2006; Sosna; Denuault *et al.*, 2007). O desenvolvimento de sensores eletroquímicos consiste em área de crescente interesse em função de algumas características favoráveis destes dispositivos. A portabilidade, seletividade, alta sensibilidade, ampla faixa linear de concentração, facilidade de automação, baixo custo, viabilidade de medições em campo, obtenção de dados em tempo real e, principalmente, a possibilidade de miniaturização, são algumas das vantagens que fizeram estes dispositivos serem amplamente utilizados em áreas como eletroquímica e eletroanalítica.

Ao se fabricar tais sensores eletroquímicos com áreas ativas reduzidas, muitas propriedades indesejáveis decorrentes das técnicas eletroquímicas e eletroanalíticas podem ser reduzidas ou até mesmo eliminadas (Paixão; Bertotti, 2009). Portanto, pode-se citar como vantagens:

- Razão corrente faradaica/corrente capacitiva (I_F/I_C) elevada, uma vez que a corrente capacitiva decai exponencialmente com a área do eletrodo, enquanto que a corrente faradaica é proporcional aos parâmetros dimensionais do dispositivo;
- Queda ôhmica (IR) desprezível por consequência dos baixos valores de correntes monitorados, possibilitando estudos eletroquímicos de sistemas redox em solventes com elevada resistência ou na ausência de eletrólito suporte;
- O potencial aplicado pode ser variado rapidamente, porque a corrente capacitiva é minimizada;
- A razão sinal/ruído em condições de estado estacionário é melhorada quando comparada com eletrodos de tamanho convencional, o que permite a diminuição do limite de detecção;
- Transporte de massa efetivo devido à difusão radial, o que permite que a corrente de estado estacionário para processos faradaicos seja obtida em um curto intervalo de tempo, havendo pouca interferência de efeitos hidrodinâmicos sobre o sinal de corrente;
- O pequeno tamanho dos eletrodos pode propiciar a sua utilização para a exploração de domínios microscópicos (pequenos volumes de amostra).

Estas duas últimas características, em especial, fazem com que a fabricação de sensores eletroquímicos miniaturizados seja alvo de interesse em muitos grupos de pesquisa, gerando conseqüentemente, muitas aplicações envolvendo SECM operando, em sua grande maioria, no modo amperométrico. (Walsh et al. 2005; Zoski 2002) Além disso, o desenvolvimento desses sensores contribui significativamente em áreas como a

neurociência (Wightman 2006) e biossensores. (Loeb, Peck, and Martyniuk 1995) Diferentes métodos de fabricação de microeletrodos com diversas formas geométricas podem ser encontrados na literatura, como eletrodos na forma de hemisfério, de anel, de cone, de banda, de disco, de disco-anel entre outros. (Zhang et al. 2007; Zhao, Giolando, and Kirchhoff 1995) Dentre todas as geometrias citadas, os microeletrodos de disco podem ser considerados os de mais fácil e reprodutível fabricação, existindo várias técnicas descritas na literatura (Paixão and Bertotti 2009). Assim, podemos destacar as técnicas litográficas (Bard; Crayston *et al.*, 1986; Fortgang; Amatore *et al.*, 2010), as técnicas de desgaste eletroquímico (Itaya; Abe *et al.*, 1987; El-Giar; Wipf, 2006), ablação a laser (Seddon; Shao *et al.*, 1994), deposição química em fase vapor (Bozon; Giolando *et al.*, 2001) e também a mais simples baseada no encapsulamento de uma microfibrila em pipetas de vidro. (Castro et al. 2011)

SECM pode ser utilizada como ferramenta para caracterização da geometria de sensores eletroquímicos, mais especificamente microeletrodos de disco, que possuem equações matemáticas simplificadas se comparado com outras geometrias. (Lindsey et al. 2007; Shao et al. 1997) Para isso, curvas de aproximação contra o substrato são obtidas e, utilizando-se de teoria e computação, obtêm-se parâmetros relevantes em SECM, como RG do microeletrodo. Uma explicação mais detalhada sobre este parâmetro (relação entre raio da parte isolante e raio do microeletrodo) será feita mais adiante. Adicionalmente, microeletrodos podem ser caracterizados utilizando microscopia óptica, SEM e/ou voltametria cíclica para estimativa do raio do microeletrodo empregando a equação 1.1, mostrada anteriormente.

Uma metodologia desenvolvida pelo nosso grupo de pesquisa é, portanto, rotineiramente utilizada no preparo de microdiscos de platina encapsulados sobre vidro com diâmetros médios variando entre 5 e 20 μm . (Castro 2011) O procedimento é geralmente realizado empregando-se puxadores de pipeta (*Micropipette Puller*) com sistema de

aquecimento por resistência elétrica. A Figura 1.6 mostra uma representação esquemática do processo de fabricação de microeletrodos desenvolvido no LSEME, os quais são utilizados em experimentos SECM no modo amperométrico.

Figura 1.6 - Representação esquemática das etapas do processo de fabricação de microeletrodos de disco utilizando o equipamento Micropipette Puller para aplicações em SECM.

Basicamente, um rápido e reproduzível aquecimento local do conjunto pipeta /microfibra possibilita que ela seja puxada e selada, gerando microeletrodos de disco com dimensões microscópicas. Após este procedimento, o contato elétrico utilizando fio de cobre soldado na microfibra com o auxílio de um pequeno pedaço de fio de índio é realizado. Em seguida, um cuidadoso polimento da superfície eletroativa é realizado, seguida da caracterização da geometria, como explicado anteriormente.

O rápido estabelecimento do estado estacionário obtido pelos microeletrodos permite que medidas de corrente sejam feitas durante a varredura de uma superfície, sem que haja perda de informação. Além disso, o pequeno tamanho da área eletroativa destes dispositivos confere a essa técnica uma considerável resolução espacial. Entretanto, investigações SECM utilizando microeletrodos com raios menores do que 1 μm são bastante desafiadoras devido às maiores dificuldade de fabricação, polimento e uso. (Salomo and Bak 1973) Recentemente, puxadores de pipeta com aquecimento a laser (*Laser Micropipete Puller*) têm possibilitado a fabricação de sensores com dimensões nanométricas, atingindo-

se dimensões da ordem de 10 nm e permitindo investigações SECM de alta resolução espacial.(Etienne et al. 2006; Mirkin 1999; Zhang and Girault 2007)

1.1.4. Modos de operação utilizados em SECM amperométrico

A SECM operada utilizando a amperometria pode ser utilizada em estudos eletródicos em diferentes modos de operação: modo *feedback*, modo gerador/coletor, modo competição redox, entre outros. (Amemiya et al. 2008; Bard et al. 1989; Wittstock et al. 2007)

O modo *feedback* é o mais bem estabelecido e utilizado em SECM, sendo amplamente empregado na investigação da topografia de substratos onde a resolução espacial das imagens é altamente dependente do tamanho dos microeletrodos. Neste caso, um microeletrodo é posicionado próximo a um substrato e polarizado em um potencial adequado para que ocorra uma reação eletroquímica do mediador redox. (Neufeld and O'Mullane 2006) Neste caso, vamos assumir que inicialmente O (mediador redox) seja a espécie presente em solução a qual é convertida na superfície do eletrodo para R, de acordo com a Equação 1.2.

Uma corrente oriunda dos processos faradaicos, que ocorrem com as espécies eletroativas (mediador redox) adicionadas à solução ou provenientes do substrato é então observada. A resposta de corrente monitorada no microeletrodo é função da composição da solução, da natureza do substrato e da distância entre sensor e substrato. A Figura 1.7 mostra o comportamento da corrente quando o microeletrodo é posicionado a uma distância infinita do substrato (a) ou quando o mesmo se encontra muito próximo de uma superfície condutora (b) ou isolante (c), considerando a equação eletroquímica na qual a reação redox ocorre:

Figura 1.7 - Comportamento da corrente monitorada pelo microeletrodo quando o mesmo está a uma distância infinita do substrato (A), quando está próximo de um substrato condutor (B) e quando está próximo de um substrato isolante (C).

Quando um microeletrodo está afastado do substrato, como mostrado na Figura 1.7a, ou seja, a uma distância considerada infinita (distância *tip*/substrato > 10 vezes o raio do microeletrodo), a corrente limite monitorada (i_{bulk}) está relacionada com as reações eletroquímicas das espécies que chegam até a superfície do microeletrodo via difusão radial, sendo que o substrato não exerce qualquer influência sobre essa corrente medida. No caso em que o microeletrodo está próximo do substrato, têm-se duas situações distintas, dependendo da natureza do substrato. Quando utiliza-se um substrato condutor não polarizado, a concentração de R no seio da solução, C_R^* , é ≈ 0 e podemos considerar a equação de Nernst como sendo $(E_s - E^\circ) \gg 0$, onde E_s é o potencial do substrato e E° é o potencial padrão do mediador redox. Desta forma, todas as espécies reduzidas que difundem do microeletrodo são oxidadas no substrato (Etienne et al. 2006), como mostrado na Figura 1.7b. Esse fenômeno proporciona uma retroalimentação devido aos inúmeros ciclos redox, gerados entre o microeletrodo e a superfície condutora, provocando assim um aumento na corrente medida (i). Desta forma, a corrente (i) monitorada pelo microeletrodo próximo a essa superfície aumenta, se comparado a distâncias infinitas (i_{bulk}). Assim, $i > i_{bulk}$. Este fenômeno é denominado de *positive feedback*, sendo o princípio de regeneração do mediador amplamente aplicado em estudos de reatividade de superfícies. (Cornut et al. 2010)

Em contrapartida, a aproximação do microeletrodo sobre um substrato isolante (Figura 1.7c) limita a chegada de espécies eletroativas até sua superfície, ocorrendo um decréscimo da corrente (i) até o bloqueio físico da superfície do sensor. Assim, $i < i_{bulk}$, onde i tende a zero quando a distância *tip*/substrato também se aproxima de zero. Este fenômeno é denominado de *negative feedback* e é mais frequentemente utilizado para aquisição de imagens da topografia do substrato. (Cortés-Salazar et al. 2011; Zhang and Girault 2007)

A Figura 1.8 mostra curvas de aproximação teóricas e experimentais para ambos os fenômenos de *Positive Feedback* e *Negative Feedback*.

Figura 1.8 – Curvas de aproximação teóricas e experimentais para *Positive Feedback* e *Negative Feedback* obtidos em substrato condutor e isolante, respectivamente.

Normalmente, as curvas de aproximação são mostradas normalizando os valores de corrente e distância, possibilitando a comparação de curvas obtidas em diferentes condições experimentais sem nenhuma influência da concentração ou do coeficiente de difusão do mediador utilizado. A normalização é realizada da seguinte maneira:

$$i_T = \frac{i}{i_{bulk}} \quad vs. \quad L = \frac{d}{r}$$

onde: i = corrente monitorada pelo microeletrodo durante a aproximação (A); i_{bulk} = corrente monitorada a distância infinita do substrato (A); d = distância relativa *tip*/substrato (μm); r = raio do microeletrodo (μm).

Curvas de aproximação permitem avaliar as características geométricas da ponta de prova e obter a distância (d) entre o substrato e o microeletrodo com considerável precisão, desde que se conheça o raio do dispositivo. O forte efeito que a superfície (condutora ou isolante) próxima ao microeletrodo exerce sobre a corrente controlada por difusão permite que estes parâmetros possam ser determinados. (Zoski, 2007) Adicionalmente, as curvas de aproximação podem gerar informações sobre o perfil de concentração, reatividade da superfície do substrato e distância *tip*-substrato a partir da corrente monitorada no microeletrodo. (Amemiya; Guo *et al.*, 2006; Yogeswaran; Thiagarajan *et al.*, 2007; Pellissier; Zigah *et al.*, 2008; Santos; Ghilane *et al.*, 2008)

Um parâmetro de considerável importância quando se trabalha com SECM é o valor do RG do microeletrodo. Este parâmetro é a relação entre o raio da parte isolante e o raio da fibra utilizada na construção do microeletrodo, como descrito na Equação 1.3 e mostrado na Figura 1.9.

$$RG = \frac{r_{vidro}}{r_{microeletrodo}} \quad \text{Equação 1.3}$$

onde: r_{vidro} = raio da parte isolante + raio do microeletrodo (μm) e $r_{microeletrodo}$ = raio do microeletrodo (μm).

Figura 1.9 - Representação esquemática do parâmetro RG.

A Figura 1.10 apresenta as curvas de aproximação para *Negative Feedback* simuladas com dados descritos na literatura para diferentes valores de RG (Amphlett; Denuault, 1998).

Figura 1.10 - Curvas de aproximação teóricas para *Negative Feedback* utilizando diferentes valores de RG (Amphlett; Denuault, 1998).

Como pode ser observado, as curvas de aproximação para *Negative Feedback* são influenciadas pelo parâmetro RG. Isso ocorre devido ao fenômeno de bloqueio da área eletroativa do sensor eletroquímico ser mais significativo do que o fenômeno de retroalimentação à medida em que se varia o tamanho da área isolante. Observa-se que

quanto menor o valor deste parâmetro, mais acentuado é o decaimento da corrente monitorada na medida em que o microeletrodo se aproxima do substrato. Portanto, a forte dependência dos perfis das curvas de aproximação para *negative feedback* com o RG possibilita estimar o valor deste parâmetro nos microeletrodos construídos. (Zoski, 2007)

O modo *gerador/coletor* é uma variação do modo *feedback*, mas necessariamente trabalha-se com um substrato polarizado. Esta modalidade muitas vezes expande o uso da técnica para uma ampla gama de aplicações. Neste modo, o coletor trabalha como um sensor amperométrico que detecta os produtos formados na superfície do gerador. Existem duas formas distintas de operação, modo *tip gerador/substrato coletor* (TG/SC) e modo *substrato gerador/tip coletora* (SG/TC). No primeiro modo, TG/SC, quando o microeletrodo é o “gerador” de uma espécie e o substrato opera como “coletor” dessa espécie, pode-se obter informações sobre processos químicos acoplados a reações eletródicas, pois o fator de coleta vai depender da distância entre microeletrodo e substrato e da cinética da reação química. Como a área do “coletor” é muito maior, a eficiência de coleta é, via de regra, unitária, desde que a espécie gerada seja estável (Fernandez and Bard 2003, 2004).

No segundo modo de operação, SG/TC, no qual o microeletrodo é o “coletor” e o substrato o “gerador”, obtêm-se dados sobre o perfil de concentração da espécie produzida no substrato, variando-se a posição do microeletrodo no eixo z . Informações a respeito das zonas reativas na superfície do substrato também podem ser obtidas, varrendo a superfície com o microeletrodo nos eixos x e y . Este modo de operação é bem explorado em estudos cinéticos com eletrodos contendo filmes depositados, na obtenção de informações sobre cinética de transferência eletrônica, em investigações sobre mecanismos de reação, na determinação de coeficientes de difusão e no estudo da dissolução de materiais sólidos. (Mauzeroll et al. 2002; Sanchez-Sanchez, Rodriguez-Lopez, and Bard 2008) Uma extensão desse modo de operação seria o estudo do transporte de espécies eletroativas através de membranas porosas, uma vez que o substrato ‘gera’ as espécies eletroativas devido a

permeação por este material, sendo o microeletrodo a sonda coletora que fornece informações com respeito ao fluxo local das espécies. (Jones et al. 2003)

1.1.5. Investigação de fenômenos interfaciais

O transporte de espécies químicas através de membranas porosas sintéticas e biológicas (Nugues and Denuault 1996; Takahashi et al. 2012, 2011) é um fenômeno interfacial importante e de interesse em muitas áreas. Estes incluem processos relacionados à medicina, envolvendo transporte de água e soluto por cartilagens (Gonsalves et al. 2001) e a liberação transdérmica controlada de fármacos (B D Bath, White, and Scott 2000; Bradley D. Bath et al. 2000). Além disso, processos celulares em bicamadas lipídicas (Amemiya and Bard 2000), assim como aplicações na nanotecnologia de células a combustível, vêm sendo recentemente exploradas (Aaronson et al. 2015; Karnicka et al. 2007).

A odontologia vem se beneficiando muito com este tipo de investigação, uma vez que estudos envolvendo o fluxo de espécies através da dentina implicam no desenvolvimento de estratégias para o tratamento dos sintomas causados pela Hipersensibilidade Dentária. (Faria and Villela 2000) Um grande número de técnicas tem sido empregado para a medida das taxas de fluxo dentinal (Markowitz and Pashley 2008). Entretanto, a SECM se mostra mais adequada para este tipo de investigação devido à possibilidade de monitoramento *in-situ* do transporte de espécies eletroativas através dos túbulos dentários (Macpherson and Unwin 2005).

1.1.5.1. Hipersensibilidade Dentária: causas e tratamentos

O dente é formado por regiões distintas como o esmalte dentário, dentina e polpa. O esmalte está situado na parte mais externa, o qual é formado por um tecido mineralizado poroso, constituído por 96% hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), 3% de proteínas e 1% de água. A dentina se encontra na região intermediária do dente e é composta por 70% de hidroxiapatita, 20% de colágeno e 10% de água (Daniele, Smaniotto, and Machado 2011). Nessa região estão situados os túbulos dentários, tipicamente com 1 a 2 μm de diâmetro e densidade na ordem de 10^6 a 10^7 túbulos cm^{-2} , os quais estão orientados da polpa até a interface dentina-esmalte (Macpherson et al. 1995). Na parte interna do dente está localizada a polpa, que contém as terminações nervosas e os vasos sanguíneos. Uma representação esquemática das regiões que compõem o dente está mostrada na Figura 1.11.

Figura 1.11 - Representação esquemática da estrutura do dente.

Um dos problemas mais estudados na comunidade odontológica e que atinge grande parte da população é a Hipersensibilidade Dentária (Pinto et al. 2008). A literatura clínica sugere que a sensibilidade no dente é uma manifestação sintomática de problemas dentais

mais graves, como fraqueza ou perda estrutural sem que ocorra ataque ácido por bactéria (cárie dentária). Essa condição torna-se ainda mais evidente à medida que a dentição natural envelhece, sendo frequentemente consequência de práticas agressivas de higiene oral e dietas ricas em alimentos de acidez elevada. Consequentemente, a exposição da dentina pode ocorrer devido às recessões gengivais, que são atrições mecânicas que desgastam o esmalte, ou ainda devido à erosão ácida do esmalte causada pelo contato diário com substâncias ácidas, como refrigerantes de cola. Assim, a Hipersensibilidade Dentária geralmente ocorre quando a dentina se expõe ao ambiente bucal, ficando esta suscetível às variações de estímulos térmicos, químicos, mecânicos e vaporativos nos túbulos dentários. (Alfano et al. 2010) Sabe-se que no interior destes túbulos se encontra um fluido intratubular, que se movimenta devido a esses estímulos, resultando numa resposta mecanoreceptora nas fibras dos nervos detectada como sensação de dor. (Wang et al. 2010) Intervenções utilizando laser, ou até mesmo aplicando resinas compostas ou adesivos dentários, são tratamentos comumente encontrados nos consultórios odontológicos, embora o custo desse tipo de procedimento seja relativamente elevado.

Compreender as causas e os mecanismos que ocasionam a Hipersensibilidade Dentária é muito importante para a elaboração de novos tratamentos que amenizem a sensação de dor imediatamente após o uso de agentes dessensibilizantes que precipitam na superfície da dentina. Desta forma, a obstrução dos túbulos abertos na superfície da dentina é um tratamento caseiro frequentemente utilizado para combater a Hipersensibilidade Dentária (Pinto et al. 2008; Wang et al. 2010). Recentemente, o surgimento de novos produtos comerciais, que amenizam as dores causadas pela Hipersensibilidade Dentária, tem chamado a atenção dos pesquisadores no que tange a investigações sobre o efetivo bloqueio dos túbulos dentários após a utilização de pastas de dente específicas para este fim. As empresas que comercializam estes produtos afirmam que o produto age formando uma barreira física, que impede a passagem de estímulos até a polpa desde a primeira aplicação. Assim, a SECM pode ser utilizada para a obtenção de informações quantitativas a

respeito da permeação de espécies eletroativas através dos túbulos dentários, com posterior investigação sobre o efetivo do bloqueio destes túbulos e consequente comprovação da eficiência de tratamentos caseiros (Gardner, Unwin, and Macpherson 2005; Macpherson et al. 1995).

A erosão ácida, uma das causas da Hipersensibilidade Dentária, pode ser considerada um sério problema para a saúde dental, e é causada por um estilo de vida que inclui o consumo de alimentos e bebidas com acidez elevada (Cheng et al. 2009). Assim, a erosão ácida (Barbour, Parker, and Jandt 2003; Thomann, Voegel, and Gramain 1991) ocorre devido à dissolução do esmalte de acordo com a equação 1.4, podendo ser causada por fatores intrínsecos e extrínsecos.

A erosão dentária está associada com a ação intrínseca que resulta de ácidos endógenos, ou seja, ácidos produzidos pelo corpo, tais como suco gástrico, que possui concentração de HCl elevada. Os fatores extrínsecos estão relacionados à ação de ácidos exógenos, tais como os ácidos presentes em refrigerantes, isotônicos, sucos, alimentos e medicamentos. A perda estrutural do esmalte deixa os dentes com má aparência e sensível a estímulos. Assim, compreender o processo químico de erosão dentária é importante, uma vez que este assunto não é frequentemente discutido em consultórios odontológicos, sendo o problema apenas diagnosticado quando a erosão está em um estágio avançado e intervenções drásticas devem ser feitas para aliviar os sintomas.

A Hipersensibilidade Dentária é uma patologia de grande incidência na população, principalmente como consequência de procedimentos de clareamento dentário, que vêm ganhando popularidade nos últimos anos. Este procedimento é indicado para casos de escurecimento dos dentes por idade, trauma, tratamento endodôntico, ingestão de comidas com corantes, tabagismo e dentes naturalmente escurecidos.(Cavalli et al. 2004)

Uma das primeiras referências à clareação dos dentes foi feita em 1850 por Dwinelle e, a partir de então, vários refinamentos da técnica vêm ocorrendo no intuito de otimizar os resultados e satisfazer os anseios da população relacionado aos padrões estéticos de beleza. (Pinto et al. 2004) Um efetivo agente clareador é o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), usualmente empregado em altas concentrações (30 – 35%) em tratamentos realizados em consultório. O peróxido de hidrogênio possui baixo peso molecular e tem capacidade de permear o esmalte e a dentina em vista da inerente porosidade e permeabilidade destes tecidos. (Ghazali 2003) Entretanto, sabe-se que H_2O_2 e os produtos da sua degradação, conhecidos como espécies reativas de oxigênio, podem ter efeitos citotóxicos na polpa (Soares et al. 2011), podendo ocorrer mutagênese, carcinogênese, danos por oxidação lipídica na membrana da célula e fragmentação de proteínas, o que pode resultar em apoptose ou morte celular. (Spalding, 2000)

Na maioria dos casos, o procedimento de clareamento dentário contribui de maneira significativa para a acentuação dos sintomas da hipersensibilidade nos dentes. Há estudos que relatam um potencial carcinogênico elevado dessas espécies quando deliberadamente expostas ao ambiente bucal. (Pieroli, 1997) Assim, é de grande relevância a manutenção do agente clareador na região do esmalte e da dentina, contudo sem que ocorra progressão posterior à polpa. Fatores que aumentam a penetração de agentes clareadores, como o tratamento por intervalo de tempo prolongado, o aumento de temperatura e o uso indiscriminado sem o acompanhamento de um profissional capacitado, podem causar inflamação pulpar ou até danos mais sérios. (Soares et al. 2011) Desta forma, a concentração e o tempo de exposição dos dentes a esses agentes clareadores são parâmetros de extrema importância a serem considerados durante o tratamento. Além disso, sabe-se que a interação do H_2O_2 com a estrutura dentária altera sua permeabilidade, causando severas dores relacionadas à Hipersensibilidade Dentária, tanto durante quanto após o tratamento.

Nesse sentido, a SECM pode ser utilizada para analisar o transporte dessa molécula através da estrutura dentária de maneira a contribuir para uma metodologia mais segura e eficiente de aplicação, visto que esta se tornou uma prática de rotina nos consultórios odontológicos na atualidade.

1.2. Objetivos

O objetivo deste capítulo é reportar o emprego da SECM como ferramenta para a caracterização de superfícies dentárias (esmalte e dentina). Desta forma, investigações a respeito das mudanças topográficas da superfície de esmalte dentário após este sofrer processo de erosão ácida, bem como informações a respeito da permeação de espécies eletroativas através dos túbulos dentários, foram obtidas. Além disso, foi avaliada a eficiência de produtos comerciais utilizados no bloqueio dos túbulos com consequente alívio dos sintomas da Hipersensibilidade Dentária. Os resultados obtidos por essa técnica foram comparados com imagens obtidas por SEM.

1.3. Parte Experimental

1.3.1. Reagentes

Todos os reagentes empregados foram de grau analítico e utilizados tal como recebidos. Ferrocianeto de potássio ($K_3[Fe(CN)_6]$) foi obtido a partir da Baker. Cloreto de potássio (KCl), ácido cítrico ($C_6H_8O_7$), ácido clorídrico (HCl), acetona (C_3H_6O), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e cloramina T ($CH_3C_6H_4SO_2NCINa \cdot 3H_2O$) foram obtidos a partir da Merck. Hidróxido de sódio (NaOH) foi obtido a partir da Synth. Todos os

reagentes foram dissolvidos ou diluídos em água purificada através NanoPure Infinity System (Barnstead, Dubuque, 18 MΩ cm⁻¹). A água mineral da marca Crystal foi obtida em um mercado local. Para as simulações dos tratamentos dentários foram utilizados cremes dentais comerciais obtidos em uma drogaria. Creme convencional (Colgate®) foi utilizado nos experimentos controle e cremes dentais, especificamente vendidos para o alívio dos sintomas da Hipersensibilidade Dentária (Colgate Sensitive Pro Alívio® e Sensodyne Rápido Alívio®), foram utilizados como tratamento teste. Além disso, peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 29% da Merck foi empregado para simulação do clareamento dentário.

1.3.2. Instrumentação

Microeletrodos foram fabricados utilizando o equipamento *Flaming/Brown Micropipette Puller* modelo P-97, capilares de vidro borossilicato (Sutter Instrument Company ®) e microfibras de platina (Goodfellow, Cambridge, England). O capilar tinha as seguintes dimensões: diâmetro externo 1,5 mm, diâmetro interno de 0,86 mm e comprimento de 15 cm. A selagem dos microeletrodos foi realizada com o auxílio de uma bomba a vácuo modelo NOF-650 (New Pump). O polimento do microdisco de platina, bem como das faces laterais do capilar de vidro para o ajuste do RG foi feito utilizando o equipamento BV-10 *Micropipette Beveler* (Sutter Instrument Company ®).

Os dentes bovinos foram cortados em uma máquina com disco diamantado dupla-face e refrigeração a água (KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil) no Departamento de Materiais Dentário da Faculdade de Odontologia da USP. Após o corte, um polimento utilizando lixas de várias granulometrias foi realizado (Özok, Wu, and Wesselink 2002). Um microscópio óptico NI 150 High Intensity Illuminator (Nikon Instruments Inc.) foi usado para inspecionar a superfície dos microeletrodos e amostras de dentes. Experimentos SECM foram realizados em um equipamento da Bochum GmbH Sensolytics (Alemanha), utilizando um sistema

convencional de três eletrodos: um eletrodo de trabalho (microdisco de Pt), um eletrodo de referência ($\text{Ag} | \text{AgCl} | \text{KCl}_{(\text{sat})}$) e um fio de platina como eletrodo auxiliar.

Amostras de esmalte foram erodidas em soluções ácidas e sob agitação suave em um agitador automático (Fisatom 752). O pH das soluções foi medido utilizando um pHmetro (Metrohm 713). Imagens SEM para visualização dos túbulos dentários foram obtidas com um microscópio da JEOL FEG-SEM JSM 6330F (Central Analítica IQ-USP), operado entre 2,5 e 5 kV. A secagem das amostras de dentina para visualização dos túbulos por imagens SEM foi feita em estufa (Fanem LTDA).

A célula eletroquímica utilizada nos experimentos de permeação de espécies eletrotivas através de dentina foi projetada utilizando o programa Corel Draw 12 (Corel Corporation – versão 12.0.0.-2003) e confeccionada em acrílico utilizando equipamento a laser de CO_2 (Gravograph Industrie International modelo L- Solution 100) do Grupo de Pesquisa em Química Analítica Instrumental (GPQAI), Instituto de Química da USP.

1.3.3. Preparação das amostras de dente bovino

Dentes incisivos bovinos sem fraturas visíveis foram extraídos e os tecidos moles periodontais foram removidos utilizando instrumentos adequados (Campos, Campos, and Vitral 2008). As amostras foram submetidas a profilaxia com água e pedra-pomes, e então armazenadas em solução desinfetante de cloramina T 0,5% a 4°C durante um período de um mês.

Para os experimentos de erosão ácida, utilizou-se uma máquina de corte com refrigeração a água (disco diamantado dupla-face) para obtenção de superfícies planas de esmalte dentário, as quais são apropriadas para os experimentos SECM. Um polimento da superfície do esmalte foi feito utilizando lixa d'água (# 600 e 1200), seguido do uso de feltro

e alumina 1 μ m (Alfa Aesar). Em seguida, as amostras foram moldadas em resina epóxi (Araldite[®]) para a fabricação de suportes, possibilitando uma maior estabilidade das amostras durante a aquisição das imagens. Antes e após o polimento, as amostras foram lavadas utilizando etanol e banho ultrassônico (15 minutos).

Para os experimentos de permeação em dentina, foi utilizado o mesmo equipamento especificado anteriormente para o procedimento de corte. A espessura final das amostras de dentina foi de aproximadamente 1,5 mm, medida com paquímetro digital (Caliper). As amostras foram posicionadas no centro de uma matriz quadrada confeccionada previamente (material elastomérico) nas medidas de 35 mm x 35 mm x 4mm (largura x comprimento x altura), onde foram fixadas com resina acrílica de maneira com que as faces ficassem totalmente isoladas uma da outra, impedindo a permeação de qualquer material por qualquer via que não fosse através dos túbulos dentários. Depois da polimerização da resina acrílica, as faces foram desgastadas com lixas e inspecionadas com microscópio óptico para garantir que não houve obliteração de ambos os lados da superfície de dentina. Em seguida, as amostras foram lavadas utilizando etanol e banho ultrassônico (15 minutos), seguindo-se da etapa de limpeza adicional em solução de EDTA 5% (pH 7,2) por 30 segundos em cada face, com o objetivo de remover uma camada residual formada devido ao procedimento de corte. (Soares et al. 2011) A Figura 1.12 mostra a lâmina de dentina preparada para os experimentos de permeação em SECM.

Figura 1.12 - Imagem de umas das faces da amostra de dentina usada nos experimentos de permeação utilizando SECM.

Para os experimentos de permeação de H_2O_2 utilizando SECM, a preparação da amostra foi mais simples, sendo somente uma das faces polida em lixa rotatória. A face inferior manteve-se preservada, ou seja, o esmalte que reveste o dente não foi removido e durante os experimentos o produto foi aplicado nesta face para que penetrasse através dessa estrutura, passando pela dentina para que por fim fosse detectado no microeletrodo posicionado sobre a câmara pulpar. A espessura final desse tipo de amostra foi de aproximadamente 4 mm.

Para os experimentos utilizando SEM empregou-se primeiramente uma lixa rotatória de granulometria 320. As amostras foram desgastadas sobre a lixa rotatória até exposição da dentina. Em seguida, utilizando-se um equipamento de corte apropriado (disco diamantado dupla-face refrigerado a água), seccionou-se a amostra em seis partes iguais como mostra a Figura 1.13. As duas partes superiores da amostra foram descartadas por se tratar apenas de esmalte dentário (tecido de revestimento do dente). As quatro partes restantes da amostra com superfície exposta de dentina foram utilizadas nos experimentos SEM. Cada uma das quatro partes possuem as mesmas características morfológicas necessárias para a análise dos tratamentos empregados. Como pode ser observado, as amostras não foram encapsuladas em material elastomérico, sendo introduzidas diretamente no equipamento FEG-SEM para aquisição das imagens SEM.

Figura 1.13 - Imagem da amostra de dentina para experimentos SEM. Região em destaque a qual foi mapeada por SEM.

Após os procedimentos de preparo de amostras para utilização em diferentes técnicas de microscopia, essas foram lavadas utilizando etanol e banho ultrassônico (15 minutos), seguindo-se de uma etapa de limpeza adicional solução de EDTA 5% (pH 7,2) por 30 segundos, com o objetivo de remover a camada residual formada devido à abrasão ou corte da estrutura dentária. (Soares et al. 2011)

Após o corte e preparo específico para cada tipo de experimento, as amostras foram armazenadas em etanol 70% (v/v) para impedir o crescimento bacteriano dentro dos túbulos dentários. Uma semana antes dos experimentos, as amostras foram lavadas e armazenadas em água desionizada à temperatura ambiente. Adicionalmente, para aquisição das imagens SEM após o tratamento das amostras utilizando os produtos odontológicos, as mesmas passaram por um processo de secagem em estufa por 4 horas a 80°C.

1.3.4. Experimento de erosão ácida em amostras de esmalte dentário

Duas soluções aquosas diferentes, ácido cítrico 20 mmol L⁻¹ e ácido clorídrico 80 mmol L⁻¹, foram utilizadas nos experimentos de erosão ácida. Os valores de pH das soluções foram medidos com um pHmetro e ajustados usando uma solução de NaOH, resultando em pH 2,2 e 1,2 para o ácido cítrico e ácido clorídrico, respectivamente. Água mineral com pH 7,1 foi utilizada em experimentos controle. A Figura 1.14 mostra uma representação esquemática da preparação da amostra para os experimentos SECM. A Figura 1.14A mostra o esmalte dentário polido, sendo que metade da área foi coberta com uma camada de resina protetora deixando uma região do esmalte exposta (Figura 1.14B). A superfície coberta não foi afetada pela erosão e foi usada como superfície controle. As amostras foram então tratadas com 30 mL de cada solução ácida à temperatura ambiente. Para evitar um aumento da concentração local de íons Ca²⁺ e PO₄³⁻ dissolvidos na superfície

da amostra durante o processo de erosão, as soluções foram agitadas com um agitador automático a 50 rpm. Nesta condição experimental, o processo de dissolução ocorre continuamente à medida que a camada de solução adjacente ao dente é constantemente substituída.

Após o tempo de erosão 1 (Tabela 1.1), as amostras (Figura 1.14C) foram removidas das soluções, lavadas com água desionizada durante 30s e secas com ar comprimido. Em seguida, a superfície do esmalte foi coberta novamente com uma camada de resina protetora, como mostrado na Figura 1.14D (largura de aproximadamente 300 μm). Após secagem, as amostras foram colocadas novamente em solução de ácido (tempo de erosão 2). A Tabela 1.1 mostra os parâmetros utilizados nos experimentos. (Barbour et al. 2005; Heurich et al. 2010)

Figura 1.14 - Representação esquemática da preparação da amostra de dente bovino (esmalte dentário) para os experimentos SECM relacionado às alterações topográficas da superfície. Uma região de referência foi utilizada para comparação dos dados utilizando uma camada de resina protetora sobre a superfície (B)

Tabela 1.1: Soluções, pH e tempo de erosão.

Solução	Concentração ácida (mmol L ⁻¹)	pH	Tempo de erosão 1 (min)	Tempo de erosão 2 (min)
Água mineral	-	7,1	30	30
Ácido cítrico	20	2,2	25	25
Ácido clorídrico	80	1,2	10	10

Após o tempo de erosão 2 (Figura 1.14E), a camada de resina protetora foi removida usando uma haste flexível com ponta de algodão embebida em acetona. As superfícies das amostras foram examinadas em um microscópio óptico e qualquer resina remanescente foi cuidadosamente removida. Imagens topográficas SECM foram registradas sobre uma área específica, como mostrada na Figura 1.14F.

1.3.5. Experimentos de permeação de espécies eletroativas em dentina

Para a execução dos experimentos de permeação, foi necessário confeccionar uma célula eletroquímica em polimetilmetacrilato (PMMA) utilizando laser a CO₂. O dispositivo resultante confeccionado é mostrado na Figura 1.15 e foi fabricado com o intuito de que ambas a faces da amostra de dentina ficassem isoladas para que a permeação ocorresse somente pelos túbulos dentários.

Figura 1.15 - Imagem da célula eletroquímica fabricada em PMMA. Compartimento doador com entrada e saída de solução (A) e compartimento receptor com volume total de 3 mL (B).

A Figura 1.16 mostra a representação esquemática do experimento de permeação utilizando SECM, sendo os compartimentos doador e receptor representados por A e B, respectivamente.

Figura 1.16 - Representação esquemática do experimento SECM de permeação de espécies eletroativas através de dentina. Compartimento doador (A) e compartimento acceptor (B) de espécies eletroativas. Os eletrodos de referência e auxiliar foram omitidos.

1.4. Resultados e discussões dos resultados

1.4.1. Fabricação e caracterização de microeletrodos para aplicações em SECM

Após a fabricação dos microeletrodos é importante verificar o funcionamento destes dispositivos e para isso registram-se voltamogramas cíclicos em solução contendo uma espécie eletroativa com comportamento reversível. A Figura 1.17 mostra voltamogramas cíclicos obtidos em solução de ferricianeto de potássio 15 mmol L^{-1} em cloreto de potássio 100 mmol L^{-1} para microeletrodos com diferentes valores nominais de raios da microfibra de platina de 5 e $10 \text{ }\mu\text{m}$ em A e B, respectivamente.

Figura 1.17 - Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de $K_3[Fe(CN)_6]$ 15 mmol L^{-1} + KCl 100 mmol L^{-1} utilizando microeletrodos de Pt (A) $r = 3,5 \text{ }\mu\text{m}$ e (B) $r = 10 \text{ }\mu\text{m}$. ($D = 7,6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$).

Como pode ser observado na Figura 1.17, os voltamogramas cíclicos apresentam um perfil sigmoidal com baixa histerese e patamar de corrente, conhecido como corrente limite do estado estacionário, a qual é dependente da difusão das espécies até a superfície do microeletrodo. O valor do raio dos microeletrodos calculado utilizando a Equação 1.1 foi de $3,5 \text{ }\mu\text{m}$ e $10 \text{ }\mu\text{m}$ para os dispositivos A e B, respectivamente. Vale ressaltar que ao se fabricar microeletrodos com diâmetros nominais $\leq 10 \text{ }\mu\text{m}$, ocorre um afinamento da fibra durante o processo de aquecimento do capilar para posterior estiramento no *Micropipette Puller*, o que justifica o menor valor de raio encontrado para esse dispositivo.

Os microeletrodos construídos passaram por um processo de polimento utilizando o equipamento *Micropipette Beveler* para diminuir a dimensão da parte isolante que recobre a microfibra. Este procedimento foi realizado com o intuito de reduzir o parâmetro RG para valores próximos de 10, o qual é o mais utilizado nos experimentos SECM. Este valor é amplamente explorado nas simulações e por não deixar os microeletrodos muito frágeis (Tóth et al. 1995). A estimativa do RG dos microeletrodos utilizados nos experimentos

SECM foi realizada comparando as curvas de aproximação experimental e a teórica obtidas em *Negative Feedback*.

1.4.2. Estudo de transporte de espécies eletroativas através de dentina

Compreender os mecanismos que ocasionam a Hipersensibilidade Dentária, bem como estabelecer um tratamento mais adequado e/ou eficiente, são desafios importantes e amplamente discutidos na comunidade odontológica. Assim, compreender o processo de permeação de espécies através dos túbulos dentários (Wang et al. 2010), analisar a eficiência das pastas de dente desenvolvidas para tratar a Hipersensibilidade Dentária e também monitorar o transporte de agentes clareadores pela estrutura dos dentes são alguns dos desafios dessa área de pesquisa e que, portanto, podem ser investigados utilizando SECM. (Pinto et al. 2008)

1.4.2.1. Caracterização da dentina utilizando SEM

SEM é uma técnica muito versátil e utilizada rotineiramente para a análise microestrutural de materiais sólidos. Apesar da complexidade dos mecanismos para a obtenção da imagem, o resultado é geralmente de 'fácil interpretação'. Embora a SEM não forneça medidas quantitativas em três dimensões, essa técnica tem sido muito utilizada para avaliar as mudanças estruturais e topográficas causadas pelos novos tratamentos odontológicos alvos deste estudo. (Wang et al. 2010) Entretanto, como desvantagem esta técnica requer condições especiais para a obtenção de imagens, como baixa pressão, o que pode mudar as condições naturais da estrutura dentária. Ainda sim, a SEM tem sido

considerada uma importante ferramenta de análise estrutural e morfológica, sendo também amplamente empregada na área odontológica.(Olley et al. 2012)

A preparação das amostras de dente bovino para experimentos em SECM pode ser considerada uma fase crítica do estudo em questão. (Alfano et al. 2010) Neste contexto, a etapa de limpeza com EDTA para desobstrução dos túbulos dentários deve ser avaliada previamente aos experimentos SECM. A Figura 1.18 mostra imagens SEM da superfície de dentina antes e após o processo de limpeza utilizando solução de EDTA.

Figura 1.18 - Imagens SEM de amostras de dentina antes (A) e após (B) o tratamento de limpeza em EDTA.

Devido ao procedimento de corte e polimento da superfície, pode-se visualizar na Figura 1.18A uma fina camada residual (1-5 μm de espessura) a qual recobre os túbulos dentários. Desta forma, após o processo de limpeza em EDTA pode-se observar a completa remoção desta camada e consequente desobstrução dos túbulos dentários, como observado na Figura 1.18B. Neste sentido, fica evidenciada a importância do procedimento de limpeza para a exposição dos túbulos dentários e consequente avaliação da permeação de espécies eletroativas através dessa estrutura utilizando SECM. Além disso, é evidente que a visualização dos túbulos dentários por imagens SEM permite auxiliar a interpretação dos resultados SECM. Adicionalmente, o polimento da dentina para exposição dos túbulos dentários deve seguir um protocolo, na tentativa de padronizar o tamanho do túbulo, distribuição e orientação o tanto quanto possível.

1.4.2.2. Estudo do transporte de espécies eletroativas através de dentina utilizando SECM

O modo *tip coletora/substrato* gerador foi utilizado para investigar processos de transporte de massa local através de membranas, como a dentina. Neste modo, o microeletrodo localizado no compartimento acceptor mede a concentração local de espécies eletroativas emergindo da membrana. A Figura 1.16 (mostrada na seção anterior) mostra a representação esquemática do experimento de permeação utilizando SECM, sendo os compartimentos doador e acceptor representados por A e B, respectivamente.

O processo de transporte de massa através da membrana pode ser governado por um gradiente de concentração, gradiente de pressão ou gradiente de potencial entre os dois compartimentos (Uitto and White 2003; Wittstock et al. 2007). Portanto, a SECM pode ser empregada na investigação quantitativa da eficiência de bloqueio dos túbulos dentários, bem como no estudo da resistência destes produtos ao desafio erosivo, já que investigações utilizando SEM fornecem apenas informações morfológicas sobre as alterações causadas na dentina.

A amostra de dentina foi posicionada entre os dois compartimentos distintos. No compartimento acceptor foram adicionados 3 mL de solução de cloreto de potássio 100 mmol L^{-1} e no compartimento doador foi adicionada uma solução de ferricianeto de potássio 100 mmol L^{-1} + cloreto de potássio 100 mmol L^{-1} . A permeação das espécies eletroativas foi primeiramente investigada variando-se a altura do reservatório (H) contendo solução de ferricianeto de potássio 100 mmol L^{-1} + cloreto de potássio 100 mmol L^{-1} . Primeiramente, posicionou-se o microeletrodo de Pt ($r = 3,5 \text{ }\mu\text{m}$) a uma distância de $50 \text{ }\mu\text{m}$ da superfície da dentina (curva de aproximação feita previamente). Em seguida, foi feito o monitoramento da corrente em função do tempo a um potencial constante de $-100 \text{ mV vs. Ag|AgCl|KCl}_{(\text{sat})}$, valor de potencial que corresponde à corrente limite de difusão para a redução de íons ferricianeto (voltamograma mostrado na Figura 1.17) que permeiam através

dos túbulos dentários e atingem o compartimento aceptor, que inicialmente contém apenas eletrólito suporte. O experimento iniciou-se com o sistema em equilíbrio ($H = 0$ cm) e em seguida a altura da coluna do reservatório foi alterada para 5, 10 e 20 cm. A Figura 1.19 mostra o amperograma para a permeação de espécies eletroativas em diferentes alturas.

Figura 1.19 - Permeação de $K_3[Fe(CN)_6]$ através de dentina utilizando microeletrodo Pt ($r = 3,5 \mu m$, $RG = 15,2$; $d = 50 \mu m$ e $E_{tip} = -0,1$ V) Altura do reservatório (H) 5 cm, 10 cm e 20 cm. Solução doadora $K_3[Fe(CN)_6]$ 100 mmol L^{-1} + KCl 100 mmol L^{-1} e solução receptora KCl 100 mmol L^{-1} .

Pode-se observar na Figura 1.19 uma variação significativa da corrente monitorada pelo microeletrodo à medida que a altura do reservatório é alterada. Isso pode ser facilmente explicado devido à maior pressão exercida pelo líquido, o que acarreta um maior fluxo de espécies eletroativas que permeiam através dos túbulos dentários para o compartimento contendo apenas eletrólito suporte inicialmente. Portanto, este comportamento do sistema sugere que o transporte de massa seja convectivo-difusivo. (Uitto, White, and Aoki 2002) Adicionalmente, a pressão exercida pela coluna de 20 cm de altura equivale à pressão pulpar medida *in vivo*, que corresponde a 2 kPa. (Macpherson et al. 1995)

1.4.2.3. Estudo de eficiência da obliteração dos túbulos dentários utilizando SECM

A Figura 1.20 explica de maneira ilustrativa como ocorre a obliteração dos túbulos dentários na superfície da dentina após o uso de produtos que têm a capacidade de precipitar sobre sua superfície (Walsh 2012).

Figura 1.20- Representação esquemática da obliteração dos túbulos dentários após o uso de produtos comerciais que precipitam na interface dentina/saliva.

Primeiramente, o fluxo de espécies eletroativas que permeiam através da dentina foi investigado. Para obtenção das imagens SECM, posicionou-se o microeletrodo no centro da amostra de dentina, região contendo túbulos dentários ativos, e uma curva de aproximação (*negative feedback*) empregando ferricianeto de potássio 15 mmol L^{-1} + cloreto de potássio 100 mmol L^{-1} foi obtida utilizando microeletrodo de Pt ($r = 3,5 \text{ }\mu\text{m}$ e $RG = 15,2$) polarizado a $-100 \text{ mV vs. Ag|AgCl|KCl}_{(\text{sat})}$. A distância microeletrodo-dentina foi mantida em $10 \text{ }\mu\text{m}$ (modo altura constante) para aquisição das imagens SECM. Em seguida, a célula eletroquímica foi exaustivamente lavada e 3 mL de solução de cloreto de potássio 100 mmol L^{-1} foram adicionados no compartimento acceptor. Ajustou-se então a altura da coluna contendo solução de ferricianeto de potássio 100 mmol L^{-1} + cloreto de potássio 100 mmol L^{-1} em $H = 20 \text{ cm}$. Desta forma, ocorreu a passagem da espécie eletroativa para o compartimento acceptor (inicialmente apenas solução de KCl 100 mmol L^{-1}) e uma imagem SECM ($300 \text{ }\mu\text{m} \times$

300 μm) foi obtida como mostra a Figura 1.21A. Em seguida, a coluna foi movida para o nível zero e o compartimento acceptor lavado com água desionizada. Aplicou-se o creme dental contendo arginina (Colgate Pro-alivio) sobre a superfície de dentina, conforme as recomendações do fabricante (tempo de escovação de 2 minutos), e em seguida a célula eletroquímica foi novamente lavada. Finalmente, foi adicionado 3 mL de solução de cloreto de potássio 100 mmol L^{-1} no compartimento acceptor e ajustou-se a altura da coluna para 20 cm. Uma imagem SECM (300 μm x 300 μm) após o uso do creme dental foi obtida, como mostra a Figura 1.21B.

Figura 1.21 - Imagens SECM da permeação de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ através dentina utilizando microeletrodo de Pt ($r = 3,5 \mu\text{m}$, $\text{RG} = 15,2$, $d = 10 \mu\text{m}$, $E_{\text{tip}} = -0,1 \text{ V}$, e $v_{\text{step}} = 10 \mu\text{m s}^{-1}$). (A) antes e (B) após utilização de creme dental contendo arginina. Solução doadora $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 100 mmol L^{-1} + KCl 100 mmol L^{-1} e solução acceptora KCl 100 mmol L^{-1} .

Como pode ser observado na Figura 1.21A e considerando que a superfície inicial de dentina analisada é isolante e plana (devido ao prévio tratamento e polimento da superfície como descritos anteriormente), pode-se afirmar que as variações localizadas de corrente, que correspondem aos picos de corrente (i/i_{bulk}) observados durante a varredura, são atribuídas à variação do fluxo 'local' de íons $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ que permeiam do compartimento doador para o compartimento acceptor através dos túbulos dentários. É importante salientar que do início ao fim da varredura para a obtenção da imagem SECM observam-se picos de

corrente comparáveis a correntes de *positive feedback* ($i / i_{bulk} > 1$), indicando um fluxo convectivo-difusivo das espécies através dos túbulos dentários. Entretanto, à medida que o tempo do experimento passa há um aumento na concentração total de íons ferricianeto no compartimento acceptor, evidenciado pela mudança gradativa nas cores que representam as correntes monitoradas. Este resultado corrobora estudos que relatam a alta permeabilidade deste tipo de estrutura (Ghazali 1969; Özok et al. 2002)

Após a aquisição da imagem de permeação de íons ferricianeto através da dentina, registrou-se uma segunda imagem após utilização de creme dental contendo princípio ativo de precipitação e bloqueio dos túbulos dentários. Como pode ser observado na Figura 1.21B, as baixas intensidades de corrente monitoradas durante a varredura são comparáveis às correntes de *negative feedback* ($i / i_{bulk} < 1$) e próximas de zero, indicando que o produto certamente obstruiu grande quantidade dos túbulos dentários devido à reação de precipitação do produto, deixando poucas regiões ativas para passagem das espécies eletroativas. A imagem SECM obtida após o tratamento corresponde à topografia ligeiramente rugosa da camada de creme dental depositado sobre a dentina, a qual possui características de substrato isolante. O resultado obtido indica que o produto age eficientemente no bloqueio à passagem de espécies eletroativas através da dentina, podendo ser indicado no tratamento dos sintomas da Hipersensibilidade Dentária. Resultados semelhantes com relação à eficiência deste produto comercial também já foram descritos na literatura utilizando imagens SEM e também relatos clínicos. (Olley et al. 2012; Walsh 2012)

Do ponto de vista instrumental, a configuração SECM adotada neste experimento não permitiu obter imagens com alta resolução lateral, já que no sistema miniatura *Wall-Jet* utilizado empregou-se um microeletrodo com diâmetro maior que o diâmetro médio do túbulo dentário, onde $2r \gg b$ ($2r$ = diâmetro do microeletrodo = $7 \mu\text{m}$, b = diâmetro do túbulo = $2\text{-}3 \mu\text{m}$). Sendo assim, não foi possível visualizar a permeação de espécies eletroativas

por apenas um túbulo dentário e sim por um conjunto deles. A alta densidade de túbulos na dentina foi demonstrada por imagens SEM da Figura 1.13. Além disso, a distância microeletrodo/dentina ($d = 10 \mu\text{m}$) adotada como altura de segurança para varreduras no modo altura constante também contribuiu para a dificuldade de distinção entre poros, em função da sobreposição das camadas de difusão (a distância entre túbulos é da ordem de poucos micrometros).

Desta forma, uma melhora significativa da resolução das imagens de permeação de espécies eletroativas obtidas por SECM pode ser obtida assumindo uma geometria *Wall-Tube*, a qual trabalha com sondas com diâmetros menores do que o diâmetro do túbulo dentário onde $2r \ll b$. Nestas condições, $d \ll b$ e conseqüentemente a visualização do fluxo de espécies eletroativas por túbulos individuais pode ser observada e uma interpretação mais quantitativa dos tratamentos dentários recentemente desenvolvidos pode ser feita. (Gardner et al. 2005; Macpherson et al. 1995, 2002)

De fato, SECM já foi utilizada para a obtenção de medidas quantitativas do transporte de espécies eletroativas em um único túbulo dentário, sendo possível calcular o fluxo convectivo de material que permeia através dessa estrutura (Nugues and Denuault 1996). A microscopia Laser Confocal (*Confocal Laser Scanning Microscopy-CLSM*) também tem sido utilizada com sucesso para o mapeamento de permeabilidade deste tipo de material abrangendo áreas relativamente grandes e com alta resolução espacial. (Williams et al. 2008)

1.4.2.4. Estudo da obliteração dos túbulos dentários utilizando SEM

Uma variação morfológica entre amostras distintas de dentina pode ser observada em análise por imagens SEM devido às diferenças intrínsecas de polimento existente entre as amostras. Portanto, o corte dividindo a amostra em quatro partes (Figura 1.13) permite uma melhor comparação da morfologia e alterações da superfície da dentina antes e após um determinado tratamento odontológico (neste caso, obliteração dos túbulos), já que todas as partes possuem o mesmo tamanho médio de túbulos dentários, pois foram produzidas a partir do mesmo polimento ou altura de dentina.

Tratamentos caseiros utilizando cremes dentais desenvolvidos para Hipersensibilidade Dentária têm sido cada vez mais utilizados. Existem no mercado diversas marcas com diferentes mecanismos de ação. O primeiro tipo são os cremes dentais contendo sais de potássio, que aliviam as dores devido à despolarização da transmissão nervosa. Já os cremes dentais contendo sais de estrôncio ou arginina são utilizados com o objetivo de criar uma barreira física à transmissão nervosa do estímulo doloroso (Alfano et al. 2010). Portanto, quando aplicados sobre a superfície da dentina, tais cremes dentais precipitam formando uma camada protetora sobre a dentina. A Tabela 1.2 mostra dois diferentes cremes dentais utilizados para o tratamento caseiro da Hipersensibilidade Dentária e seus respectivos princípios ativos. Adicionalmente, foi utilizado um creme dental convencional, sem qualquer princípio de precipitação como condição controle.

Tabela 1.2 - Cremes dentais e seus diferentes princípios ativos para bloqueio dos túbulos dentários.

Marca	Princípio ativo de precipitação
Colgate® Convencional	-
Colgate® Sensitive Pro-Alívio	8% Arginina
Sensodyne® Alívio Rápido	8% Acetato de estrôncio

SEM foi empregada no estudo das mudanças morfológicas da dentina após o tratamento com os três diferentes cremes dentais. O equipamento foi operado em baixa voltagem (2,5 kV), sendo as amostras presas no *holder* utilizando fita dupla face condutora de carbono. Cada amostra foi tratada com um produto específico, sendo a primeira parte de cada amostra o controle sobre a morfologia inicial dos túbulos dentários, como mostrado na Figura 1.22 A₁, B₁ e C₁. As duas outras partes restantes de cada amostra foram escovadas com uma pequena porção de cada produto, conforme as recomendações de cada fabricante. Em seguida, as amostras foram enxaguadas com água desionizada, sendo a segunda parte de cada amostra levada para aquisição das imagens SEM, como mostra as Figura 1.22 A₂, B₂ e C₂. A terceira parte de cada amostra foi armazenada em água deionizada e no dia seguinte uma nova escovação foi feita para aquisição de imagens SEM após a segunda aplicação dos produtos, como mostra a Figura 1.22 A₃, B₃ e C₃.

Figura 1.22 - Imagens SEM da superfície de dentina submetidas ao tratamento com creme dental convencional (A), creme dental contendo arginina (B) e creme dental contendo acetato de estrôncio (C). Em A₁, B₁ e C₁ amostras controle, A₂, B₂ e C₂ primeira aplicação de cada produto, A₃, B₃ e C₃ segunda aplicação de cada produto.

Como pode ser observado, as amostras são diferentes entre si, mas o objetivo deste experimento foi analisar as alterações na morfologia da dentina dentro do mesmo grupo de amostragem. Portanto, pode-se observar que o creme dental convencional não alterou a morfologia da superfície de dentina após as aplicações, mantendo os túbulos dentários expostos. Entretanto, quando as amostras foram tratadas com cremes dentais com princípio ativo de precipitação, uma mudança significativa da superfície de dentina foi observada. Já na primeira aplicação de ambos os produtos, uma precipitação relevante com consequente bloqueio dos túbulos dentários pode ser observada nas Figuras 1.22 B₂ e C₂. Entretanto, quando se analisa a imagem B₂ pode-se notar a existência de alguns túbulos dentários ainda expostos, enquanto que na imagem C₂ eles aparecem em menor quantidade. Adicionalmente, pode-se observar que a segunda aplicação do produto acarreta numa precipitação quantitativa sobre a superfície de dentina, permitindo um completo bloqueio dos túbulos dentários, como pode ser observado nas imagens da Figura 1.22 B₃ e C₃. Os mecanismos de precipitação de cada produto diferem consideravelmente, sendo que a arginina age conjuntamente com carbonato de cálcio formando um aglomerado alcalino com carga positiva sobre a superfície da dentina (Barnes et al. 2009). A saliva é essencial para o mecanismo de ação da arginina, contribuindo para uma deposição rápida e eficiente. Em contraste, o mecanismo de ação para a deposição de acetato de estrôncio se baseia na forte capacidade de absorção dos tecidos calcificados, especialmente por aqueles com alto teor de matéria orgânica como a dentina. Este mecanismo de ação se torna possível devido à alta permeabilidade deste tecido bem como a presença de tecidos odontoblásticos. (Jennings et al. 2004)

1.4.2.5. Estudo da resistência ácida dos agentes obliterantes utilizando SEM

A SEM foi empregada para investigação da resistência de bloqueio dos túbulos dentários após contato com substâncias ácidas. Portanto, após cada escovação com os três diferentes produtos, as amostras foram colocadas em contato com refrigerante de cola. Na Figura 1.23 A₁, B₁ e C₁ pode-se observar a presença dos túbulos dentários nas amostras nomeadas controle. As duas outras partes restantes de cada amostra foram escovadas com uma pequena porção de cada produto conforme as recomendações de cada fabricante. Decorridos 60 minutos após este procedimento, as amostras foram submetidas ao desafio erosivo em refrigerante de cola (pH 2,4) por 5 minutos sem agitação. Em seguida, as amostras foram enxaguadas com água desionizada, sendo a segunda parte de cada amostra levada para aquisição das imagens SEM, como mostra a Figura 1.23 A₂, B₂ e C₂. A terceira parte de cada amostra foi armazenada em água desionizada e no dia seguinte uma nova escovação seguida de um novo desafio erosivo foi feita para aquisição de imagens SEM apresentadas na Figura 1.23 A₃, B₃ e C₃.

Figura 1.23 - Imagens SEM da superfície de dentina submetidas ao tratamento com creme dental convencional (A), creme dental contendo arginina (B) e creme dental contendo acetato de estrôncio (C). Em A₁, B₁ e C₁ amostras controle, em A₂, B₂ e C₂ primeira aplicação de cada produto + desafio erosivo em refrigerante de cola, em A₃, B₃ e C₃ segunda aplicação de cada produto + desafio erosivo em refrigerante de cola.

O objetivo desse estudo foi investigar a resistência ácida das pastas de dente desenvolvidas para tratar a Hipersensibilidade Dentária (Markowitz and Pashley 2008). A exposição dos túbulos dentários é na maioria das vezes ocasionada devido ao consumo de alimentos com elevada acidez, que facilmente removem o esmalte dentário que recobre a dentina expondo os túbulos e iniciando a hipersensibilidade. Como foi observado anteriormente na Figura 1.22, ocorreu uma significativa oclusão dos túbulos dentários somente quando foram utilizados os cremes dentais específicos para Hipersensibilidade Dentária. O creme dental convencional manteve os túbulos expostos mesmo após consecutivas aplicações. Neste novo procedimento, cada superfície de dentina foi analisada após utilização dos cremes dentais seguida do contato com refrigerante de cola. Analisando as imagens SEM da Figura 1.23 pode-se observar uma superfície de dentina bem diferente

da mostrada na Figura 1.22. Após o desafio erosivo em refrigerante de cola, ocorreu uma intensa remoção de ambos os produtos tanto na primeira (Figura 1.23 B₂ e C₂) quanto na segunda aplicação (Figura 1.23 B₃ e C₃). Essas observações indicam que os produtos utilizados são susceptíveis à lixiviação (dissolução do material depositado) devido ao contato com substâncias ácidas e estes resultados corroboram as observações previamente descritas na literatura (Olley et al. 2012). Neste trabalho, os autores discutem justamente a resistência ácida destes dois produtos que possuem forte capacidade de adesão (absorção) à dentina. Após o contato com *suco de uva* o creme dental contendo acetato de estrôncio demonstrou ser mais resistente ao ataque ácido do que o creme dental contendo arginina. Esta informação também corrobora os resultados obtidos nos experimentos SEM. Adicionalmente, a Figura 1.24 mostra em maior magnificação a superfície da dentina e os túbulos dentários após a primeira aplicação seguida do desafio erosivo em refrigerante de cola.

Figura 1.24 - Imagens SEM da superfície de dentina submetidas ao tratamento com creme dental contendo arginina + desafio erosivo (A) e creme dental contendo acetato de estrôncio + desafio erosivo (B).

Analisando detalhadamente imagens SEM após a primeira aplicação dos produtos seguida do desafio erosivo, nota-se que mesmo após o contato com refrigerante de cola o precipitado de acetato de estrôncio (Figura 1.24B) permaneceu mais aderido à superfície de dentina se comparado com o creme dental contendo arginina (Figura 1.23A). Portanto, este estudo *in vitro* demonstrou a presença de depósito particulado dentro e ao redor dos túbulos

dentários mesmo após os 5 minutos em contato com refrigerante de cola. Por outro lado, o aglomerado alcalino formado a partir do aminoácido arginina se mostra mais susceptível ao desafio erosivo, já que os túbulos dentários se encontram parcialmente e/ou totalmente desobstruídos, como mostrado na Figura 1.24A. Estudos similares demonstram o mesmo efeito quando as amostras foram colocadas em contato com ácido cítrico após a utilização de três produtos comerciais. As imagens SEM mostradas neste trabalho também sugerem a baixa resistência ácida dos compostos depositados sobre a superfície de dentina (Wang et al. 2010).

1.4.3. Estudo das alterações topográficas do esmalte dentário utilizando SECM

Ácidos presentes em frutas, bebidas e suco gástrico desmineralizam a matriz inorgânica da estrutura do esmalte dentário e conduzem a um amolecimento seguido por um colapso do esmalte (Daniele et al. 2011). A estabilidade do material que compreende o esmalte depende das concentrações de íons cálcio, fosfato e fluoreto em solução (Barbour et al. 2003), pH, força de ácido, assim como o tempo de exposição (Waszkiel, Opalko, and Chlubek 2004). A concentração de íons cálcio durante o processo de dissolução do esmalte dentário durante a erosão ácida será investigada no Capítulo 3 mais especificamente.

Para investigar o processo de erosão, criou-se uma área de referência na superfície da amostra, sendo o esmalte recoberto por uma camada de resina protetora. A perda de esmalte, com base em um processo de erosão *in vitro*, resulta em um degrau entre a superfície do esmalte erodido e a área previamente protegida, como mostrado anteriormente na Figura 1.14C e E). O degrau representa a espessura da camada de esmalte consumida na reação química entre o esmalte dentário e as substâncias ácidas, de acordo com a equação 1.4.

Curvas de aproximação e imagens topográficas SECM foram utilizadas para avaliação das mudanças topográficas ocorridas na superfície do esmalte dentário após a erosão ácida. Primeiramente, curvas de aproximação foram obtidas sobre a área de referência (superfície polida de esmalte dentário) utilizando $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ como mediador redox. Um microdisco de Pt ($r = 10 \mu\text{m}$ e $\text{RG} = 10,2$) foi polarizado a -100 mV vs $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{KCl}_{(\text{sat})}$, valor de potencial que corresponde à corrente limite de difusão para a redução da espécie eletroativa em solução. A curva de aproximação obtida está mostrada na Figura 1.25 e confirma a natureza isolante do esmalte, onde a corrente tende a zero quando d (distância entre *tip*-esmalte) se aproxima de zero (kwak 2009).

Figura 1.25 - Curva de aproximação obtida em solução de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6] 15 \text{ mmol L}^{-1} + \text{KCl } 100 \text{ mmol L}^{-1}$ utilizando microeletrodo de Pt ($r = 10 \mu\text{m}$, $\text{RG} = 10,2$, $E_{\text{tip}} = -0,1 \text{ V}$, $v_{\text{app}} = 1 \mu\text{m s}^{-1}$) sobre área de referência (superfície de esmalte polido) (---) curva experimental, (—) curva de aproximação teórica (negative feedback). L = razão entre distância *tip*-substrato e raio do microeletrodo.

A Figura 1.26 mostra as imagens topográficas SECM do esmalte dentário após exposição em água mineral (A), ácido cítrico (B) e ácido clorídrico (C). Nenhuma mudança significativa de corrente foi observada durante a varredura no experimento realizado após contato com água mineral (experimento controle), ou seja, $i / i_{\text{bulk}} = 0,19$ (média de todos os pontos da área avaliada). Levando em consideração este valor e analisando a curva de

aproximação mostrada na Figura 1.25, podemos inferir que a distância entre microeletrodo e o esmalte dentário (área de referência) foi de aproximadamente 4 a 5 μm , pois $L = 0,42$ e o raio microeletrodo utilizado foi de 10 μm .

Figura 1.26 - Imagens topográficas SECM obtidas em solução de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 15 mmol L^{-1} + KCl 100 mmol L^{-1} utilizando microeletrodo de Pt ($r = 10 \mu\text{m}$, $\text{RG} = 10,2$; $E_{\text{tip}} = -0,1 \text{ V}$ $d = 5 \mu\text{m}$ e $v_{\text{step}} = 20 \mu\text{m s}^{-1}$) sobre superfície de esmalte dentário após contato com (A) água mineral (experimento controle), (B) solução de ácido cítrico 20 mmol L^{-1} pH 2,2 e (C) solução de ácido clorídrico 80 mmol L^{-1} pH 1,2.

Após o processo de erosão em ácido cítrico e ácido clorídrico, as superfícies de esmalte foram examinadas em um microscópio óptico. A aparência macroscópica das superfícies expostas a ambos os ácidos com respeito à superfície de referência tornou-se esbranquiçada e opaca, indicando que ambas as soluções são potencialmente erosivas. As

figuras 1.26B e 1.26C mostram imagens topográficas SECM obtidas após a exposição em ácido cítrico e ácido clorídrico, respectivamente. A variação da corrente monitorada durante a varredura é consequência do aumento na separação microeletrodo-substrato, causada pela desmineralização do esmalte após o contato com ambas as soluções ácidas. A espessura da camada de esmalte erodida pode ser estimada utilizando a relação entre i / i_{bulk} e L quando o microeletrodo está próximo ao substrato e os resultados são mostrados na Tabela 1.3.

Tabela 1.3 - Espessura da camada de esmalte erodida após contato com ácido cítrico e clorídrico.

	Espessura da camada de esmalte erodida em ácido cítrico (μm)	Espessura da camada de esmalte erodida em ácido clorídrico (μm)
Tempo de erosão 1	7	12
Tempo de erosão 2	21	26

A quantidade de mineral dissolvido no esmalte dentário é função da acidez da solução, pH do meio, tempo de exposição e concentração de íons Ca^{2+} , PO_4^{3-} e F^- . Analisando a equação 1.4, pode-se observar que a solubilidade da hidroxiapatita aumenta com a diminuição do pH. Assim, os dados mostrados na Tabela 1.3 confirmam que a espessura da camada de esmalte erodido após contato com o ácido clorídrico foi significativamente maior quando comparado com o obtido com um ácido fraco (pK_{a1} para ácido cítrico é 3,1), embora o tempo de exposição tenha sido menor. Já para o tempo de erosão 2 observam-se valores de corrente i_T próximos de 0,8, o que significa valores associados ao i_{Bulk} (microeletrodo a distância considerada infinita do substrato). Assim, o cálculo dessa espessura não pode ser considerado de alta precisão devido à grande distância *tip*/substrato, sendo possível somente afirmar que a camada de espessura de esmalte dentário aumentou drasticamente após o segundo desafio ácido. No que diz respeito ao ácido cítrico, este é também um importante agente de erosão devido à sua ação

quelante sobre o cálcio. Assim, o processo de erosão do esmalte pode continuar mesmo após o pH aumentar em regiões adjacentes à superfície do dente.

Outras metodologias já foram utilizadas para determinar a camada de espessura do esmalte erodido após o contato com o ácido cítrico empregando medidas de profilometria. Dados da literatura reportaram que, a espessura da camada de esmalte erodido após contato em ácido cítrico 50 mmol L⁻¹ (pH 2,3) durante 20 min e 60 min foi de (10,3 ± 6,5 μm) e (17,6 ± 6,1 μm), respectivamente. Desta forma, podemos observar que estes valores são consistentes com os obtidos neste trabalho. Vale a pena ressaltar que a perda estrutural é mais lenta em meio oral devido ao efeito de remineralização causado pela saliva, mas por longos períodos a erosão pode ser significativa (Schlueter et al. 2011).

Várias metodologias são reportadas na literatura para quantificação da perda estrutural do esmalte dentário (Schlueter et al. 2011). Medidas ultrassônicas da espessura da camada de esmalte erodido têm sido relatadas, mas problemas associados com reprodutibilidade foram encontrados. A CLSM (Microscopia Laser Confocal) também é utilizada para obtenção da topografia do substrato possuindo alta resolução espacial e rápida velocidade para aquisição de imagens. Contudo, o laser utilizado pode penetrar no esmalte translúcido levando a um ruído de fundo. Além disso, artefatos devido à perda de água podem ser introduzidos nas medidas (Heurich et al. 2010). A dissolução do esmalte dentário também tem sido estudada por AFM (Tanaka et al. 2012) e SEM (Cheng et al. 2009), mas o uso de SEM para avaliar a morfologia da superfície de esmalte requer condições especiais, como revestimento com um material condutor e ambiente de baixa pressão, os quais podem alterar as condições naturais da estrutura dentária. Além disso, SEM não fornece imagens tridimensionais e quantitativas sobre a morfologia da superfície analisada. A AFM é uma técnica que permite obtenção de imagens com alta resolução espacial sobre a morfologia da superfície e requer mínima preparação da amostra. No entanto, após o processo de erosão a ponta do *cantilever* pode danificar a superfície do

esmalte, que se torna frágil e susceptível a sofrer arranhões (Quartarone et al. 2008). Assim, a utilização de SECM para quantificar a espessura da camada de esmalte dissolvido pela erosão ácida pode ser considerada uma técnica não invasiva e que não introduz artefatos devido à perda de água.

1.4.4. Estudo do transporte de H_2O_2 através de esmalte/dentina utilizando SECM

O transporte de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) através da estrutura dentária foi investigado com o intuito de monitorar o tempo de permeação dessas espécies através de materiais dentários e consequente efeito na estrutura (Cavalli et al. 2004). Para isso, foi utilizado microeletrodo de platina como eletrodo de trabalho monitorando-se a concentração dessa espécie durante os experimentos de permeação através da estrutura dentária (dentina/esmalte). Primeiramente, um voltamograma cíclico em solução de H_2O_2 10 mmol L⁻¹ em KCl 100 mmol L⁻¹ foi obtido como mostra a Figura 1.27. A janela de potencial empregada foi de 0,2 a 1,2 V vs. Ag|AgCl|KCl_(sat), sendo observado um perfil sigmoidal referente à oxidação dessa espécie em eletrodo de platina (Evans et al. 2002).

Figura 1.27 - Voltamogramas cíclicos utilizando microeletrodo Pt ($r = 5 \mu m$, $RG = 10,2$ e $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$). (—) solução controle KCl 100 mmol L⁻¹, (—) solução de H_2O_2 10 mmol L⁻¹ + KCl 100 mmol L⁻¹.

A técnica de amperometria foi utilizada para avaliação da resposta linear entre corrente e concentração de H_2O_2 . Um potencial suficientemente positivo de 0,9 V foi escolhido. Na Figura 1.28 temos um amperograma para adições sucessivas de H_2O_2 em solução de KCl 100 mmol L^{-1} no intervalo de concentração de 0,05 a 0,5 mmol L^{-1} e sua respectiva curva analítica.

Figura 1.28 - Amperograma para adições sucessivas de H_2O_2 em solução de KCl 100 mmol L^{-1} e correlação linear entre concentração e corrente na faixa de 0,05 a 0,5 mmol L^{-1} . $E_{\text{tip}} = 0,9 \text{ V}$

Como se pode observar na Figura 1.28, para a faixa de concentração estudada obteve-se uma resposta linear entre a concentração de H_2O_2 e a corrente, como pode ser observado no *inset* da Figura 1.28, tendo como equação linear $i \text{ (nA)} = 0,13 + 2,4 [\text{H}_2\text{O}_2]$ mmol L^{-1} e $r = 0,9945$.

Utilizando apenas o sistema de posicionamento piezelétrico do equipamento SECM, investigou-se a permeação de H_2O_2 através da estrutura dentária. Portanto, apenas foi feito o monitoramento local, não sendo obtidas imagens SECM com respeito à permeação dessa espécie. Assim, durante todos os experimentos o microeletrodo permaneceu estático a 50 μm de distância da superfície de dentina. O experimento foi realizado para verificar as diferenças nos tempos de permeação do H_2O_2 durante sucessivas aplicações do produto na tentativa de uma simulação *in-vitro* de clareamento dentário. Desta forma, utilizando-se uma

amostra contendo esmalte/dentina, sendo feitas três sucessivas aplicações de solução de H_2O_2 9,8 mol L^{-1} no intervalo de tempo de 1 hora cada. Entre as sessões de clareamento (3 dias consecutivos) armazenou-se a amostra em água desionizada a temperatura ambiente. As amostras foram posicionadas entre dois compartimentos distintos e o microeletrodo posicionado a 50 μm de distância do substrato. Para isso, uma curva de aproximação foi feita antes de iniciar o experimento utilizando ferricianeto de potássio como mediador redox. Em seguida, a célula eletroquímica foi lavada e no compartimento acceptor foram adicionados 3 mL de solução de KCl 100 mmol L^{-1} . No compartimento doador foram adicionados uma solução de H_2O_2 9,8 mol L^{-1} + KCl 100 mmol L^{-1} em coluna com altura de 20 cm. A Figura 1.29 mostra o monitoramento da permeação de H_2O_2 através da amostra de esmalte/dentina em consecutivas aplicações do agente clareador.

Figura 1.29 – Permeação de H_2O_2 através de esmalte/dentina utilizando microeletrodo Pt ($r = 5 \mu\text{m}$ e $d = 50 \mu\text{m}$) (—) primeira aplicação, (—) segunda aplicação, (—) terceira aplicação e (—) permeação controle utilizando solução de KCl 100 mmol L^{-1} . Solução doadora H_2O_2 9,8 mol L^{-1} + KCl 100 mmol L^{-1} e solução receptora de KCl 100 mmol L^{-1} .

Como pode ser observado na Figura 1.29, a medida em que as sessões de clareamento dentário ocorrem (1ª, 2ª e 3ª consecutivamente), uma antecipação nos tempos de chegada de H_2O_2 até a superfície do microeletrodo com consequente aumento nas intensidades de corrente podem ser observadas. Desta forma, podemos inferir que o

produto interage com a estrutura dentária passando pelo esmalte dentário, junção amelodentinária, dentina e chegando por fim na interface dentina/polpa na qual o microeletrodo foi posicionado (Courts 1961). Desta forma, pode-se concluir que na primeira aplicação o tempo para a permeação de H_2O_2 através da estrutura dentária e consequente detecção no microeletrodo foi de aproximadamente 2200 s. Já na segunda aplicação este tempo diminuiu para 1200 s e na terceira aplicação H_2O_2 foi detectado em 700 s.

Relatos de Hipersensibilidade Dentária durante ou após o processo de clareamento sugerem a capacidade de infiltração desses agentes através dos tecidos dentários, possivelmente causando alguma alteração morfológica, estrutural ou na composição química desses tecidos (Spalding 2000). A possibilidade da infiltração dos agentes clareadores em direção à câmara pulpar ocorre, portanto, em função do alto grau de permeabilidade desta estrutura. A preocupação com os efeitos dos agentes clareadores nos tecidos dentários, na alteração da microdureza, rugosidade, composição química, redução da capacidade de adesão de materiais restauradores ao dente clareado e alterações morfológicas na superfície dentária é observada na literatura pertinente (Pedreira de Freitas et al. 2010). A dentina deve ser entendida como um tecido mineralizado altamente dinâmico, e sua permeabilidade sendo dependente de vários fatores como dimensão e diâmetro dos túbulos, espessura da dentina, pressão osmótica e hidrostática (movimento de fluidos), presença da camada residual e variação da temperatura.

Existem vários métodos para avaliar a permeabilidade dos tecidos dentários. O uso de corantes é uma das formas mais empregadas além da análise da condução hidráulica e análise do coeficiente de difusão através do tecido, quer seja por marcadores radioativos ou moléculas sem carga. Entretanto, a SECM se mostra como alternativa promissora para a investigação da permeação dos agentes clareadores devido à capacidade de obtenção de informações quantitativas referente ao tempo de permeação e interação dessas espécies com a estrutura dentária.

1.4.4.1. Alterações morfológicas na dentina causada por H₂O₂ investigadas por SEM

O peróxido de hidrogênio possui baixo peso molecular e tem capacidade de permear o esmalte e a dentina em vista da inerente porosidade e permeabilidade destes tecidos, como podemos observar na seção anterior utilizando SECM. Assim, é de grande relevância a manutenção do agente clareador na região do esmalte e da dentina, sem que haja progressão posterior à polpa (Pinto et al. 2004, 2008). Paralelamente a essas observações, pode-se correlacionar casos de Hipersensibilidade Dentária ao uso dos agentes clareadores. A interação dessas substâncias com a dentina altera sua estrutura, fazendo com que os estímulos sejam sentidos em maior intensidade tanto durante quanto após o tratamento de clareamento dentário. Para isso, investigações das alterações morfológicas na superfície de dentina durante sessões consecutivas de clareamento foram avaliadas utilizando SEM. A Figura 1.30 mostra imagens SEM com respeito à alteração da morfologia da dentina após 3 sessões consecutivas de clareamento dentário feitas seguindo o mesmo procedimento descrito nos experimentos SECM. A preparação da amostra foi realizada conforme descrito nos experimentos para a verificação da obliteração dos túbulos, utilizando-se dessa forma 4 partes semelhantes da mesma amostra. Na Figura 1.30A podemos visualizar a parte da amostra denominada controle, ou seja, sem qualquer tratamento com agentes clareadores. A Figura 1.30 B, C, e D mostra a superfície da dentina após a 1ª, 2ª e 3ª sessões de clareamento dentário respectivamente. Cada sessão de clareamento dentário teve a duração de 1 hora, sendo as amostras mantidas em contato com solução de peróxido de hidrogênio 9,8 mol L⁻¹, concentração usualmente utilizada em tratamentos de consultório odontológico. É importante ressaltar que entre cada sessão de clareamento dentário as amostras foram mantidas em água desionizada à temperatura ambiente.

Figura 1.30 - Imagens SEM da superfície de dentina sem tratamento (A), após primeira sessão (B), após segunda sessão (C) e após terceira sessão (D) de clareamento dentário utilizando H_2O_2 $9,8 \text{ mol L}^{-1}$ durante 1 h.

Como pode ser observado nas imagens SEM, após sucessivas aplicações de H_2O_2 sobre a superfície de dentina pode-se notar um ligeiro aumento no tamanho médio dos túbulos dentários sobre a área analisada. A Tabela 1.4 mostra a variação no tamanho médio dos túbulos dentários os quais foram analisados utilizando o programa *ImageJ*® e levando em consideração o diâmetro médio dos túbulos dentários.

Tabela 1.4 - Tamanho médio dos túbulos dentários após sessões de clareamento.

	Diâmetro médio (μm)	Número de túbulos amostrados
Amostra controle	1,85	694
1ª aplicação	1,87	568
2ª aplicação	3,59	689
3ª aplicação	3,79	707

Analisando os dados da Tabela 1.4, pode-se observar que após a primeira sessão de clareamento dentário o diâmetro médio dos túbulos não sofreu alterações significativas se comparado com a amostra controle. Já após a segunda sessão de clareamento, houve um aumento considerável do diâmetro médio dos túbulos de 1,87 para 3,59 μm , e na terceira sessão pode-se notar novamente um ligeiro aumento para 3,79 μm . Desta forma, pode-se verificar uma alteração na estrutura da dentina após este tipo de tratamento, o que justifica o aumento de permeabilidade a qual foi observada nos experimentos SECM. Assim, estes resultados corroboram os resultados clínicos os quais evidenciam rigorosa manifestação de Hipersensibilidade Dentária entre pacientes que se submeteram ao tratamento.

1.5. Conclusões

Os resultados apresentados a respeito da metodologia empregada para fabricação e caracterização de microeletrodos demonstram que tais dispositivos podem ser utilizados com sucesso como sonda eletroquímica em SECM. Com respeito à erosão dentária, a SECM mostrou ser uma poderosa ferramenta para a investigação das mudanças topográficas do esmalte bovino após contato com dois diferentes ácidos. A relação entre corrente monitorada e distância microeletrodo/esmalte dentário pode ser utilizada para determinar a espessura da camada de esmalte erodida. Os resultados demonstram a dependência dessa camada de espessura de esmalte consumida pela reação de desmineralização, com parâmetros como tempo, pH, força do ácido e concentração. Desta forma, a SECM pode ser considerada uma técnica não invasiva à amostra, não requerendo preparação especial da mesma, o que evita artefatos devido à perda de água.

Com relação aos resultados obtidos para a permeação de espécies eletroativas através dos túbulos dentários, foi demonstrado analisando imagens SEM que o tratamento ácido realizado nas faces da dentina é necessário para a remoção da camada residual e

desobstrução dos túbulos. As imagens SECM demonstram a ocorrência de um fluxo de espécies eletroativas através dos túbulos e que esta permeação ocorre imediatamente após a injeção da solução no compartimento doador (espessura da amostra de dentina de 1,5 mm). Além disso, os resultados apresentados mostraram que SEM e SECM podem ser empregadas no estudo das alterações da superfície de dentina após dois diferentes tratamentos odontológicos. Para o tratamento da Hipersensibilidade Dentária, pode-se avaliar através das imagens SEM tanto a eficiência de precipitação quanto a resistência ao desafio erosivo após utilização de cremes dentais específicos para este fim. Os resultados mostraram que os cremes dentais precipitam quantitativamente sobre a superfície de dentina, contudo ocorre perda considerável de material quando este entra em contato com substâncias ácidas, tal como refrigerante de cola. Analisando as imagens SECM, pode-se relacionar a diminuição da corrente referente à permeação das espécies eletroativas com a obliteração dos túbulos após escovação com o creme dental específico à base de arginina.

Com relação ao tratamento de clareamento dentário pode-se constatar que a permeabilidade da estrutura da dentina é significativamente alterada. Analisando as imagens SEM, observou-se um aumento considerável no tamanho médio dos túbulos dentários enquanto que nos experimentos SECM foi observado um aumento no fluxo de peróxido de hidrogênio à medida em que foram feitas sessões de clareamento dentário. Deve-se ressaltar que para estes experimentos foram utilizadas amostras contendo a estrutura esmalte/dentina (espessura da amostra de 4 mm) e por isso pode-se constatar maiores tempo de permeação de H_2O_2 se comparado com o experimento utilizando apenas dentina com espessura de apenas 1,5 mm, conforme mostrado na Figura 1.21. Além disso, uma antecipação na detecção de peróxido de hidrogênio no compartimento receptor após cada sessão de clareamento foi observado, evidenciando a alteração da permeabilidade e justificando o aumento da hipersensibilidade dentária constatada nas pesquisas clínicas (Godinho, Grippi, and Costa 2011).

Capítulo 2

SECM modo potenciométrico

Desenvolvimento de microeletrodos íon-seletivo para detecção de íons cálcio e aplicações na investigação da dissolução ácida do esmalte dentário e transporte por membranas sintéticas

2.1. Introdução

Nos últimos anos, a SECM tem sido usada numa variedade de aplicações em diferentes sistemas eletroquímicos, como foi mostrado no Capítulo 1. Uma vantagem da SECM, quando no modo amperométrico, é o fornecimento de informações localizadas sobre a natureza química do substrato além de imagens topográficas (Cortés-Salazar et al. 2011). Desta forma, esta técnica permite distinguir entre substratos com regiões isolantes e condutoras, mapear a reatividade eletroquímica de superfícies modificadas (Neufeld and O'Mullane 2006), investigar atividade redox de enzimas imobilizadas (Lei et al. 2009; Zhang, Peng, and Jin 2006), além do mapeamento localizado da concentração de espécies eletroativas (Sosna et al. 2007).

Recentemente, mecanismos de sinalização biológica e crescimento celular têm sido alvo de interesse em muitos centros de pesquisa (Arbault et al. 2004; Scrase-Field and Knight 2003). Entretanto, muitos destes sistemas químicos interessantes não são acessíveis por técnicas amperométricas, devido ao fato de as espécies não serem eletroativas ou possuírem interferência devido às reações de redução de oxigênio ou evolução de hidrogênio (em superfície de platina por exemplo). Para expandir ainda mais as aplicações de SECM e superar algumas limitações do modo amperométrico, a potenciometria também tem sido frequentemente empregada. Este modo permite determinar diretamente a atividade iônica local de diferentes íons de forma passiva a partir de uma curva de calibração. Esta pode ser considerada como uma das grandes vantagens desse tipo de medida, visto que, em SECM no modo amperométrico, o sinal do microeletrodo é também afetado pela topografia do substrato. Além disso, sensores potenciométricos fornecem melhor seletividade se comparado aos amperométricos. Desta forma, o desenvolvimento de novos microeletrodos íon-seletivo (Ion Selective Microelectrodes – ISME), operando no modo potenciométrico em SECM, tem se tornado uma área de grande relevância científica, visto os desafios encontrados tanto na fabricação destes dispositivos e instrumentação para

aquisição de imagens localizadas com alta resolução espacial e temporal (Horrocks et al. 1993).

2.1.1. Eletrodos Íon-Seletivo (ISE): Histórico e desenvolvimento de sensores miniaturizados

Medidas quantitativas de um determinado analito dependem de um grande número de fatores (Simonet and Valcárcel 2006). Diferentes técnicas eletroanalíticas têm sido empregadas na quantificação de espécies químicas e alguns parâmetros, como seletividade, sensibilidade, precisão, exatidão, robustez e custo, devem ser considerados durante o desenvolvimento e aplicação de um método analítico. A potenciometria é uma técnica bem conhecida dos eletroquímicos, sendo que os eletrodos íon-seletivos (*Ion Selective Electrodes - ISEs*), representam somente uma pequena parte deste vasto campo de desenvolvimento de sensores em química eletroanalítica.

A base da potenciometria foi estabelecida por Nernst, em 1888, descrevendo a origem do potencial de eletrodo entre um metal e uma solução contendo íons deste metal, e o potencial redox entre um metal inerte e uma solução contendo um sistema redox. No início do século XX, era grande a necessidade de quantificar o grau de acidez, o que fez com que houvesse uma corrida para pesquisas nesta área. O primeiro sensor potenciométrico usado para medir a acidez de uma solução aquosa foi o eletrodo padrão de hidrogênio, proposto por Nernst, em 1897, mas devido à sua complexidade, este não tinha finalidade prática. (Fernandes, Kubota, and Neto 2001). Contribuindo significativamente para o avanço da potenciometria, a integração dos conceitos de química das soluções, eletroquímica e eletrônica possibilitou o aperfeiçoamento tecnológico do eletrodo de vidro, fazendo com que as medidas de pH se tornassem uma prática rotineira na maioria dos laboratórios de pesquisa.

Embora a potenciometria tenha surgido no fim do século XIX, foi somente nos últimos 40 anos que as investigações analíticas utilizando ISE se estabeleceram como técnicas de quantificação rotineiras em laboratórios (Bühlmann, Pretsch, and Bakker 1998; Tsien and Rink 1980). Este fato pode ser diretamente relacionado ao uso de membranas líquidas íon-seletivas e a possibilidade de incorporação de carreadores neutros. Desta forma, a utilização de valinomicina para construção de um sensor ISE para detecção de íons potássio pode ser considerada um dos avanços mais notáveis nesta área. Não menos importante, a incorporação do polímero PVC (policloreto de vinila) como material de membrana contribuiu bastante para a ampliação das investigações analíticas baseadas na detecção potenciométrica ISE. Dentro deste contexto, o desenvolvimento dos ISEs-Enzimáticos também contribuiu para o avanço da potenciometria, possibilitando a detecção de substâncias biológicas não iônicas. Estes sensores são comumente conhecidos como biossensores, e seu mecanismo de resposta se baseia em reações enzimáticas (Zuliani, Forster, and Keyes 2010). Finalmente, dentro da área de potenciometria, podemos citar o desenvolvimento dos transistores de efeito de campo sensíveis a íon (ISFETs), que podem ser aplicados no monitoramento de espécies *in vitro* (Murakami et al. 2006). É importante ressaltar que estes sensores até então descritos foram desenvolvidos em tamanho convencional, ou seja, na ordem de mm, sendo desta forma, amplamente empregados em determinações analíticas sem a utilização da SECM.

A possibilidade de miniaturização trouxe uma série de benefícios ao campo da SECM, contribuindo ainda mais para a grande versatilidade desta técnica (Horrocks et al. 1993). Primeiramente, os ISMEs foram utilizados em áreas de corrosão na investigação de mecanismos de passivação de superfícies (Izquierdo et al. 2013; Santana et al. 2010). Mas, recentemente, a aplicabilidade tem se expandido para as áreas biológicas e biomédicas, ampliando os conhecimentos em sinalização, absorção e crescimento celular (Shevchuk et al. 2001). ISMEs no estado sólido foram os primeiros sensores a serem aplicados em SECM devido ao rápido tempo de resposta, fácil fabricação e robustez. Desta forma,

microeletrodos de antimônio e/ou irídio foram inicialmente utilizados como sensores para investigações relacionadas às mudanças de pH local em vários sistemas químicos modelo. (Horrocks et al. 1993) Como principal vantagem destes sensores, podemos citar a habilidade de desempenhar duas funções, podendo detectar o pH local utilizando o modo potenciométrico, bem como utilizar o modo amperométrico para detecção de espécies eletroativas e, consequente, o posicionamento sobre a superfície (controle de *feedback*). Entretanto, ISME no estado sólido se mostra limitado à detecção de poucas espécies iônicas, a exemplo dos íons H^+ . (Murakami et al. 2006)

O desenvolvimento de ISMEs com base em membranas líquidas tem se mostrado uma área promissora no que diz respeito à miniaturização de sensores potenciométricos. (Ammann et al. 1987) Além disso, vale ressaltar que uma variedade de membranas líquidas (também denominados de coquetéis) é comercialmente disponível, o que viabiliza a detecção de diferentes espécies químicas nos mais variados ambientes (Wilson and Johnson 2008).

2.1.2. Microeletrodos íon-seletivos (ISME) de membrana líquida

O conceito fundamental deste tipo de sensor é empregar uma micropipeta como sonda a qual contém uma membrana líquida responsável pela detecção do sinal potenciométrico referente à concentração dos íons de interesse (Ammann et al. 1987). A natureza da membrana determina a seletividade do sensor, podendo esta ser constituída de qualquer material que separa duas soluções, uma sendo a amostra e a outra a solução de referência no interior da micropipeta. Desta forma, a célula de medida eletroquímica consiste em duas meia-células galvânicas: o ISME e um eletrodo de referência (neste caso $Ag | AgCl | KCl_{(sat)}$), podendo ser descrita como:

A diferença de potencial E geralmente é medida sob condições de corrente zero entre os dois eletrodos. Desta forma, E é a soma de todas as contribuições de potenciais individuais que surgem em cada interface eletroquímica, como pode ser descrito na Equação 2.1:

$$E = E_{const} + E_{PJ} + E_{Membrana} \quad \text{Equação 2.1}$$

onde $E_{Membrana}$ é o potencial de membrana e E_{PJ} é o potencial de junção líquida da interface amostra/eletrodo de referência. Usualmente, E_{PJ} pode ser mantido em valores pequenos e constantes, ajustando-se as condições do experimento, como a utilização de íons com mobilidades iônicas próximas (K^+ e Cl^-).

A resposta deste tipo de sensor tem sido investigada utilizando vários modelos. Dentre eles, o modelo de potencial de fronteira (*phase-boundary potential*) tem sido amplamente empregado no desenvolvimento deste tipo de sensor e é descrito como um potencial que emerge na interface membrana líquida/solução aquosa. Este modelo utiliza as condições de equilíbrio termodinâmico e eletroneutralidade de cada fase considerando que os processos cinéticos ocorridos nessa interface são rápidos. Desta forma, este modelo está diretamente relacionado ao equilíbrio de partição dos íons através da interface membrana líquida/amostra (Wang et al. 2001).

Na maioria dos casos, a resposta potenciométrica de um ISME para detecção da concentração de íons pode ser descrita pelo potencial de fronteira (E), uma vez que todas as outras contribuições são suficientemente constantes, como por exemplo, o potencial de junção líquida nos eletrodos de referência. Desta forma, podemos considerar o potencial eletroquímico deste sistema na presença de um íon de acordo com a Equação 2.2 a seguir:

$$\mu^* = \mu^\circ + RT \ln a + zFE \quad \text{Equação 2.2}$$

onde: μ^* é o potencial eletroquímico do sistema, μ° é o potencial químico padrão, R é a constante dos gases; T é a temperatura, a é a atividade do íon; z é a carga do íon; F é a constante de Faraday e E é o potencial eletrostático.

Primeiramente, vamos considerar um sistema contendo dois compartimentos (1 e 2) separados por uma membrana semipermeável. Quando os dois compartimentos estão em equilíbrio, ou seja, $\Delta G = 0$, o movimento de íons através da membrana é zero sendo os potenciais eletroquímicos idênticos:

$$\mu_1^* = \mu_2^* \quad \text{Equação 2.3}$$

$$\mu_1^\circ + RT \ln a_1 + zFE_1 = \mu_2^\circ + RT \ln a_2 + zFE_2 \quad \text{Equação 2.4}$$

ou

$$zF(E_2 - E_1) = RT \ln \frac{a_1}{a_2} \quad \text{Equação 2.5}$$

$$\Delta E_{2-1} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{a_1}{a_2} \quad \text{Equação 2.6}$$

Assumindo que $a = \gamma[X^{z+}]$ e considerando que as propriedades físico-químicas dos dois compartimentos são similares,

onde: γ é o coeficiente de atividade que varia com a força iônica do meio e a valência do íon.

Desta forma, $\gamma_1 = \gamma_2$ e finalmente podemos derivar a equação de Nernst para o sistema em questão:

$$\Delta E_{2-1} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[X^{z+}]_1}{[X^{z+}]_2} \quad \text{Equação 2.7}$$

e considerando a temperatura ambiente, $RT/(F \times \log e) = 0,058$, assim,

$$\Delta E_{2-1} = \frac{0,058}{z} \log \frac{[X^{z+}]_1}{[X^{z+}]_2} \quad \text{Equação 2.8}$$

A Figura 2.1 demonstra dois casos específicos dos equilíbrios existentes entre a membrana semipermeável entre duas soluções.

Figura 2.1 – Representação esquemática do potencial desenvolvido entre dois compartimentos contendo duas soluções separadas por uma membrana semipermeável. Adaptado de (Lee, Boron, and Parker 2013)

Desta forma, podemos afirmar que, quando os compartimentos 1 e 2 possuem concentrações iguais de X^{z+} , $\Delta E_{2-1} = 0$ mV como mostrado na Figura 2.1a. Entretanto, uma diferença de 10 vezes na concentração das espécies X^{z+} através da membrana irá produzir uma diferença de potencial de $\Delta E_{2-1} = 58$ mV no caso de íons monovalentes (Figura 2.1b), ou 29 mV no caso de íons divalentes. (Lee et al. 2013)

No caso de um sensor ISME, podemos considerar a membrana líquida como a membrana semipermeável do sistema mostrado na Figura 2.1. Além disso, a solução de referência pode ser considerada como sendo o compartimento 2, a qual fornece o contato elétrico utilizando geralmente um fio de Ag|AgCl. A amostra onde o microsensor é posicionado pode ser considerada como o compartimento 1, onde se faz necessária a determinação da concentração dos íons de interesse. Desta forma, podemos considerar a seguinte equação para determinação da concentração de íons numa determinada amostra com concentração de íons $[X]_{amostra}^{z+}$ desconhecida:

$$E_{ref-amostra} = \frac{0,058}{z} \log \frac{[X]_{amostra}^{z+}}{[X]_{ref}^{z+}} \quad \text{Equação 2.9}$$

É importante ressaltar que, a solução de referência deve conter os íons de interesse $[X]_{ref}^{z+}$ numa concentração conhecida e constante para estabilização do potencial químico, além de íons cloreto que forneça um potencial de junção líquida estável no eletrodo de Ag|AgCl inserido como contato elétrico na solução de referência interna do microsensor

ISME. Tais considerações seguem o modelo de potencial de fronteira descrito anteriormente.(Izquierdo et al. 2012)

O uso de membranas líquidas em ISMEs tem sido amplamente reportado na literatura em virtude da alta seletividade em suas determinações. Usualmente, a membrana líquida é constituída de uma fase polimérica orgânica imiscível em água e com alta viscosidade. Os componentes-chave de uma membrana líquida são o ionóforo e o íon lipofílico. O ionóforo é o componente mais importante da membrana líquida e sua seletividade está relacionada às constantes de equilíbrio para a formação de complexos entre os íons de interesse e o ionóforo da membrana. Geralmente apresentam-se na forma carregada ou eletricamente neutra. Os ISMEs para detecção de cátions geralmente usam ionóforos neutros e, usualmente, contêm anéis macrocíclicos de heteroátomos ou grupos funcionais que são capazes de complexar o íon de interesse, onde a cavidade do anel serve para excluir os íons interferentes, baseado nos diferentes raios iônicos. Os ionóforos existentes para ânions mais comuns são os compostos organometálicos que se ligam com o ânion de interesse através de uma ligação de coordenação. Por estes ionóforos conterem metais de transição, eles possuem cargas positivas. Assim, a força de interação do ionóforo com o íon de interesse talvez seja a mais importante e é determinada pela constante de formação do complexo. (Chumbimuni Torres and Bakker 2006)

Os ISMEs de membrana líquida que não possuem íons lipofílicos não trabalham apropriadamente como um microsensor potenciométrico. Um pré-requisito para que um ISME exiba resposta nernstiana é que nenhuma quantidade de íons com carga oposta ao íon de interesse seja extraída na membrana. Isto significa que a membrana deve ser permeável somente a íons com a mesma carga que o íon de interesse. Esta característica da membrana é chamada de permeabilidade seletiva, ou também conhecida como exclusão de Donnan, e refere-se à repulsão eletrostática de íons carregados com carga diferente ao íon de interesse. Portanto, a presença de íons lipofílicos na membrana garante a exclusão de íons com carga oposta ao íon de interesse, mantendo a concentração constante na

membrana. Consequentemente, está bem estabelecido que o uso de íons lipofílicos, tais como os sais de amônio quaternário para ânions e os derivados de tetrafenilborato para cátions, na preparação das membranas seletivas se faz necessário. Desta forma, até a década de 90, a maioria das pesquisas envolvendo este assunto esteve focada no entendimento da termodinâmica e cinética destes ionóforos para que pudessem fornecer alta seletividade, baixos limites de detecção e rápido tempo de resposta. (Ammann et al. 1987; Bakker, Bühlmann, and Pretsch 1997)

2.1.3. ISME para detecção de íons Cálcio

Os cátions de metais alcalinos e metais alcalinos terrosos são íons de grande relevância em sistemas biológicos e não são acessíveis por técnicas amperométricas convencionais. (Toiubara and Koval 1970) O primeiro ISME disponível comercialmente foi o sensor para determinação da concentração de íons Ca^{2+} em amostras clínicas e também em análises ambientais. (Anker et al. 1981) Tais aplicações fizeram dos íons Ca^{2+} , um dos analitos de maior interesse em determinações por potenciometria incentivando o desenvolvimento de membranas líquidas mais seletivas e estáveis. Desde que as investigações utilizando membranas líquidas contendo ionóforos foram iniciadas na década de 1970, houve um aumento considerável no número de publicações envolvendo ISME devido à simples operação do sistema e a alta seletividade das medidas potenciométricas. Desta forma, vários ionóforos têm sido desenvolvidos, como os ésteres derivados de ácido fosfórico e os ésteres de coroa macrocíclica derivados de amidas. Este último pode ser considerado como um dos melhores ionóforos para detecção de íons Ca^{2+} devido à sua alta seletividade, sendo a estrutura do ionóforo ETH 1001 mostrado na Figura 2.2.

Figura 2.2 - Estrutura do ionóforo ETH 1001 utilizado no desenvolvimento dos sensores ISME para detecção de íons cálcio.

Ligantes lipofílicos eletricamente neutros possuem um número apropriado de sítios de ligação (cavidade macrocíclica) para cátions da família dos metais alcalinos e metais alcalinos terrosos. Assim, a complexação ocorre entre o cátion e o oxigênio do éster de coroa, resultando em complexos com alta estabilidade e seletividade. Atualmente, estes materiais podem ser obtidos comercialmente na forma de coquetéis possuindo três componentes básicos: um ionóforo, um solvente imiscível em água e aditivos que são usados para modificar a resistência elétrica, hidrofobicidade, viscosidade e seletividade do material (Wang et al. 2001). Desta forma, a membrana ionófora utilizada nos experimentos deste trabalho para detecção de íons Ca^{2+} consistia em um coquetel comercialmente disponível pela empresa *Sigma-Aldrich*. A composição e as características básicas do coquetel são mostrados na Tabela 2.1.

Tabela 2.1: Componentes da membrana íon-seletiva para detecção de íons cálcio.

Componente	Composição	Características
Ionóforo	10% ETH 1001	Formação de complexos altamente estáveis entre o ionóforo e íons Ca^{2+} com alta constante de estabilidade
Solvente	89% 2-nitrofeniloctil éter	Redução da resistência elétrica e da viscosidade, aumento da estabilidade e homogeneidade da fase orgânica assegurando uma relativa mobilidade dos íons na membrana
Aditivo	1% tetrafenilborato de sódio	Redução da resistência elétrica sem o comprometimento da seletividade

Usualmente, PVC pode ser incorporado como aditivo à membrana ionófora aumentando a estabilidade do sensor ISME e tornando-o mais robusto e resistente durante as varreduras sobre uma determinada superfície. Por outro lado, a quantidade de PVC adicionada é considerada crítica, o que pode causar entupimento da ponta do sensor em virtude de seu pequeno tamanho, na ordem de poucos micrometros. O aumento da viscosidade da membrana líquida inviabiliza o preenchimento do canal ao longo da pipeta. Além disso, considerável aumento no tempo de resposta pode ser observado durante as medições potenciométricas. Assim, o uso deste aditivo polimérico não foi considerado no desenvolvimento dos microsensores ISME utilizados neste trabalho.

2.2. Objetivos

O presente capítulo tem como objetivo principal o desenvolvimento de microeletrodos íon-seletivo (ISME) de membrana líquida para detecção de íons cálcio. Uma abordagem com relação à incorporação deste microssensor ao SECM também foi explorada utilizando-se dois sistemas diferentes, nos quais a detecção da concentração local de íons cálcio se faz relevante. Desta forma, a dissolução ácida do esmalte dentário foi mais uma vez investigada, desta vez monitorando-se a concentração de íons cálcio provenientes da

reação de desmineralização ácida em soluções com diferentes concentrações hidrogeniônicas (pHs). Adicionalmente, o microsensor potenciométrico ISME foi utilizado para investigações com relação à permeação de íons cálcio através de filmes poliméricos sintéticos com diferentes propriedades magnéticas.

2.3. Parte Experimental

2.3.1. Materiais

Cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio di-hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), dimetildiclorosilano-DMDCS ($(\text{CH}_3)_2\text{SiCl}_2$), N-(trimetilsilil)dimetilamina-TMSDMA ($(\text{CH}_3)_3\text{SiN}(\text{CH}_3)_2$), e membrana ionófora de cálcio (coquetel I - ETH1001) para preparação dos ISMEs foram obtidos da Sigma-Aldrich. Ácido clorídrico (HCl), hidróxido de sódio (NaOH) e ácido sulfúrico (H_2SO_4) foram adquiridos da Fischer Química. Dentes incisivos bovinos foram adquiridos no Departamento de Materiais Dentários da Faculdade de Odontologia da USP. Para o preparo de filmes poliméricos, Xantana comercial (Kelzan®, CP Kelco, USA, grau de piruvato = 0,38, grau de acetil = 0,41, $M_v \sim 1,0 \cdot 10^6 \text{ g mol}^{-1}$, grau de polimerização ~ 1072) foi utilizada conforme recebido. Ácido cítrico (Analítica Química-Brasil) foi recristalizado duas vezes com água antes do uso. Cloreto férrico (FeCl_3), cloreto ferroso (FeCl_2) e hidróxido de amônio (NH_4OH) foram obtidos da Synth do Brasil. Todas as soluções foram preparadas utilizando água Milli-Q (Millipore Corp.) com resistividade de ca. $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ a 25°C .

2.3.2. Instrumentação

Os sensores potenciométricos foram fabricados utilizando o equipamento *Laser Micropipette Puller* modelo P-2000 puxando-se capilares de vidro borossilicato (Sutter Instrument Company®) com as seguintes dimensões: diâmetro externo 1,5 mm, diâmetro interno de 0,86 mm e comprimento de 15 cm. Os dentes bovinos foram lavados, desinfetados e armazenados como descrito no Capítulo 1. Os valores de pH das soluções foram medidos em pHmetro (Methrom 827) calibrado utilizando soluções padrão com valores de pH 4,0; 7,0 e 11. Um microscópio metalográfico (Kontrol®) foi utilizado para visualização da ponta do sensor ISME. Um fio de Ag (250µm de diâmetro) revestido com AgCl foi utilizado como contato elétrico na solução de referência interna dos microssensores ISME. Experimentos potenciométricos foram realizados em um equipamento *Sensolytics* SECM contendo um bipotentiostato (Bochum GmbH Sensolytics, Alemanha) operado com os programas SECM Sensolytics e NOVA versão 1.10. Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas dentro de uma gaiola de Faraday. Uma vídeo-câmera (*The Imaging Source* - Alemanha) foi utilizada para auxiliar a aproximação do sensor à superfície de interesse. Imagens SEM para visualização das micropipetas foram obtidas com o microscópio eletrônico de varredura FEG-SEM JSM 7401-F (Central Analítica IQ-USP).

2.3.3. Fabricação de microeletrodos íon-seletivos (ISME) de membrana líquida

Primeiramente, os capilares foram limpos por imersão em uma solução H_2SO_4 1 mol L⁻¹ durante 24 horas, seguido por uma lavagem com água e finalizando com etanol para remover completamente os traços de sujeira e ácido. (Cras et al. 1999) Em seguida, os capilares condicionados foram secos em forno durante 4 horas a 180°C e posteriormente armazenados em recipientes hermeticamente fechados até a utilização. Os capilares limpos

foram então puxados no equipamento *Laser Micropipette Puller* (Walsh et al. 2005), utilizando um programa com os seguintes parâmetros:

Linha 1: Heat 450, Fil 3 Vel 30, Del 150, Pul 30

Linha 2: Heat 435, Fil 2 Vel 30, Del 135, Pul 40

Uma caracterização prévia com relação aos parâmetros geométricos da sonda foram obtidas utilizando SEM. Para a fabricação de microsensores ISME foi necessário silanizar as paredes internas do capilar, para subsequente fixação da membrana ionófora. Dois diferentes compostos derivados de silano foram utilizados no procedimento, DMDCS e TMSDMA (Munoz, Deyhimi, and Coles 1983). Desta forma, vapores de ambos os compostos foram coletados com uma seringa de vidro (volume total de 1 mL) e em seguida injetados no canal potenciométrico com o auxílio de uma agulha de seringa flexível (Microfil™ 37G). (Munoz et al. 1983) Para completar o processo de silanização, os sensores foram colocados num forno a 120° C durante 1 hora. Para a fabricação do microsensor sensível a íons cálcio, o canal silanizado foi preenchido com membrana ionófora seletiva para a detecção de íons cálcio (coquetel I) utilizando microponteiras (*Eppendorf Microloader* 20 µL). Em seguida, o restante do capilar foi preenchido com uma solução de referência interna contendo CaCl_2 100 mmol L⁻¹ utilizando uma agulha de seringa flexível (Microfil™ 34G). O contato elétrico foi realizado inserindo-se um fio de Ag|AgCl na solução de referência interna. A Figura 2.3 mostra uma representação esquemática de um típico ISME.

Figura 2.3 – Representação esquemática (sem escala) de um típico ISME, contendo a membrana ionófora, a solução de referência interna e um eletrodo Ag | AgCl.

2.3.4. Protocolo de calibração dos sensores ISME para detecção de íons Cálcio

Após o preparo dos microssensores como descrito anteriormente, estes foram condicionados em solução de CaCl_2 50 mmol L^{-1} por 24 horas. Os sensores foram calibrados antes e após os experimentos de dissolução ácida do esmalte dentário e transporte por filmes poliméricos sintéticos. Desta forma, foi conduzido o monitoramento do potencial de circuito aberto entre o microssensor ISME e o eletrodo de referência Ag | AgCl | $\text{KCl}_{(\text{sat})}$ em soluções contendo KCl 100 mmol L^{-1} (pH 6,8) com quantidades variáveis de CaCl_2 entre 0,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ a 100 mmol L^{-1} .

2.3.5. Preparo dos filmes poliméricos: membrana neutra, membrana de xantana e membrana de xantana/magnetita.

Filmes poliméricos de xantana contendo ácido cítrico foram obtidos por *casting* de uma solução de xantana 6 g L^{-1} em água contendo 0,3 g L^{-1} de ácido cítrico, previamente homogeneizada utilizando um agitador Ika Turrax® a 18000 rpm por 5 minutos e centrifugadas para remover eventuais bolhas de ar. A reticulação para obter os hidrogéis de

xantana-ácido cítrico foi realizada aquecendo os filmes a 165 °C por 7 minutos. A fração sol foi extraída com água a 70°C, sob agitação branda, por 24 h. Os hidrogéis foram secos a 45°C por 48h. A Figura 2.4 mostra uma imagem SEM das membranas de xantana sintetizadas no Laboratório da Professora Denise Petri (Bueno, Bentini, et al. 2013).

Figura 2.4- Imagem SEM de uma membrana de xantana preparada utilizando-se ácido cítrico durante a etapa de reticulação. Figura retirada de (Bueno, Bentini, et al. 2013).

Magnetitas nanoparticuladas foram preparadas pelo processo de co-precipitação em ultrassom a 24°C misturando-se durante 10 minutos 100 mL de solução FeCl_3 1 mol L^{-1} e 100 mL de solução FeCl_2 0,5 mol L^{-1} (pH 10 corrigido utilizando-se solução 1 mol L^{-1} de NH_4OH). A incorporação das nanopartículas magnéticas na membrana de xantana foi feita mergulhando-as em solução de magnetita pH 8 durante 5 minutos. Após este procedimento, as membranas de xantana/magnetita foram secas em estufa a 60°C por 2h. Todos os filmes poliméricos foram armazenados em placas de Petri hermeticamente fechadas à temperatura ambiente até o momento de uso nos experimentos para investigação da permeação de íons cálcio através de sua estrutura.

2.3.6. Experimento de permeação de íons Cálcio através de filmes poliméricos

Para a execução dos experimentos de permeação através dos filmes poliméricos, a célula em acrílico, confeccionada previamente para os experimentos de permeação em dentina, foi novamente utilizada. A Figura 2.5 mostra um filme polimérico posicionado entre os compartimentos doador (A) e receptor (B) e um microsensor ISME para detecção de íons Ca^{2+} .

Figura 2.5 – Representação esquemática dos experimentos de permeação de íons cálcio através de filmes poliméricos e investigação da influência de campos magnéticos externos. O eletrodo de referência foi omitido.

No compartimento doador (A), foi adicionado solução de CaCl_2 1 mol L^{-1} + KCl 100 mmol L^{-1} , sendo a altura (H) do reservatório mantida em 10 cm para todos os experimentos. No compartimento receptor (B) foi adicionado 2 mL de solução de KCl 100 mmol L^{-1} sendo o ISME posicionado sobre a superfície da membrana polimérica (procedimento de aproximação será descrito na seção 2.4.3, a seguir). A permeação de íons cálcio foi investigada utilizando membrana neutra, membrana de xantana e membrana de xantana/magnetita. Além disso, os experimentos foram realizados na ausência e na presença de um campo magnético externo de 0,4T (*External Static Magnetic Field* – ESMF), o qual foi posicionado na parte inferior externa do compartimento doador (A).

2.4. Resultados e discussões dos resultados

2.4.1. Caracterização de micropipetas utilizando SEM

Microsensores ISME podem ser facilmente preparados a partir de capilares de vidro afinados em puxadores de pipeta a laser (Walsh et al. 2005). Desta forma, com base no ajuste dos parâmetros do equipamento como temperatura, tempo de aquecimento, força e velocidade de estiragem, pipetas com tamanho reproduzível podem ser produzidas. Desta forma, após o afinamento dos capilares no equipamento, as micropipetas foram caracterizadas com relação ao diâmetro, utilizando imagens obtidas por SEM. A Figura 2.6 mostra as micropipetas fabricadas utilizando o programa desenvolvido, obtendo-se sondas com raio interno (r_1) típico na ordem de $1,5\ \mu\text{m}$.

Figura 2.6 - Imagens SEM mostrando em (a) a ponta de uma micropipeta afinada no puxador a laser formando uma abertura com raio interno (r_1) = $1,5\ \mu\text{m}$ e em (b) vista lateral mostrando a forma cônica da micropipeta.

2.4.2. Procedimento de silanização para preparo do microsensor ISME

O sucesso na fabricação de sensores ISME é fortemente dependente da etapa de silanização das paredes internas da micropipeta de vidro. Dessa forma, a superfície interna do vidro deve tornar-se suficientemente hidrófoba para manter a membrana ionófora ligada a este material. Isto irá conferir uma maior estabilidade das medidas potenciométricas, uma vez que a membrana permanecerá estática dentro do capilar, possibilitando a formação de uma interface membrana/solução de referência interna estável. Desta forma, antes da silanização, os capilares foram submetidos a um tratamento ácido de condicionamento por 24 horas em solução de H_2SO_4 1 mol L^{-1} , o que auxiliou na restauração dos grupos hidroxila do vidro borossilicato, aumentando a fixação dos compostos de silano à sua superfície. A Figura 2.7 mostra uma representação esquemática da superfície de vidro borossilicato seco e seus grupos hidroxila expostos após condicionamento ácido.

Figura 2.7 - Representação esquemática da superfície do vidro borossilicato mostrando os grupos hidroxila expostos após condicionamento ácido.

Desta forma, vapores de $(\text{CH}_3)_2\text{SiCl}_2$ foram primeiramente utilizados numa tentativa de silanizar as paredes internas da micropipeta de vidro, como descrito na seção experimental. A Figura 2.8 mostra a reação que ocorre durante este procedimento.

Figura 2.8 - Reação entre os vapores de $(\text{CH}_3)_2\text{SiCl}_2$ e grupos hidroxila na superfície interna do micropipeta de vidro.

Como pode ser observado, esta reação forma HCl como subproduto, que pode danificar a superfície interna da micropipeta recém silanizada e dificultar a fixação da membrana ionófora no vidro. Além disso, $(\text{CH}_3)_2\text{SiCl}_2$ geralmente reage com água, formando uma camada de silicone devido à reação de polimerização. Desta forma, o canal silanizado muitas vezes foi encontrado bloqueado devido à formação de uma espessa camada deste produto dentro do canal da micropipeta. Alternativamente, TMSDMA, que tem uma pressão de vapor relativamente elevada, não forma um polímero com água e não produz um subproduto corrosivo, foi empregado com sucesso para a silanização da micropipeta. A Figura 2.9 exemplifica a reação que ocorre no interior do capilar de vidro durante a injeção dos vapores de TMSDMA.

Figura 2.9 - Reação entre os vapores de TMSDMA e grupos hidroxila na superfície interna do micropipeta de vidro.

Utilizando TMSDMA no processo de silanização das micropipetas, observou-se que o preenchimento com a membrana ionófora ocorreu mais facilmente, sem a presença de bolhas ou produtos indesejáveis que bloqueassem a ponta do sensor. A Figura 2.10 mostra uma imagem óptica de um típico microsensor ISME, preparado de acordo com o procedimento descrito acima e utilizado nos experimentos deste capítulo.

Figura 2.10 - Imagem óptica da ponta do microsensor ISME, mostrando com detalhe a interface membrana ionófora/ solução de referência interna CaCl_2 100 mmol L^{-1} .

2.4.3. Calibração e estabilidade do microsensor ISME para detecção de íons Cálcio

Como discutido na seção 2.1.2, o potencial de um microsensor ISME pode ser descrito pela equação de Nernst, na qual se pode obter facilmente o valor de concentração de um determinado íon na solução de amostra, uma vez que a concentração do íon na solução de referência é conhecida e constante. Este sistema pode ser comparado com o princípio de uma pilha de concentração, onde uma diferença de concentração do íon de interesse através da membrana íon-seletiva gera uma diferença de potencial, a qual pode ser facilmente medida (Lee et al. 2013). A equação 2.9 mostra a equação que descreve este sistema:

$$E_{ref-amostra} = \frac{0,058}{z} \log \frac{[X]_{amostra}^{z+}}{[X]_{ref}^{z+}} \quad \text{Equação 2.9}$$

Em uma curva de calibração em que o sensor eletroquímico responde idealmente à equação de Nernst, como mostrada na equação 2.9 acima, demonstra-se que o mesmo quantifica seletivamente o íon de interesse. Além disso, as soluções utilizadas na calibração do sensor devem apresentar a mesma composição da amostra a ser medida (incluindo íons interferentes) abrangendo uma região de valores os quais podem ser esperados na amostra durante o experimento. Desta forma, a resposta potenciométrica do microsensor ISME foi verificada através de curvas de calibração empregando solução de eletrólito KCl 100 mmol L⁻¹, pH = 6,8 e variando a concentração de CaCl₂ de 0,1 µmol L⁻¹ a 100 mmol L⁻¹ ($1 \leq \text{pCa}^{2+} \leq 7$, onde $\text{pCa}^{2+} = -\log [\text{Ca}^{2+}]$). A Figura 2.11 exibe o perfil típico das curvas de calibração obtidas antes e após um dia típico de experimentos utilizando o microsensor ISME.

Figura 2.11 – Curvas de calibração de um microsensor ISME mostrando seu comportamento nernstiano antes (—) e após (—) um dia típico de experimentos.

Como pode ser observado na Figura 2.11, nenhuma mudança significativa do coeficiente angular foi observado (31 e 29 mV para cada unidade de pCa^{2+} antes e após as medidas experimentais, respectivamente), mostrando uma considerável estabilidade das medidas potenciométricas durante os experimentos. Além disso, a estabilidade da medida ao longo do tempo foi investigada para determinar o desvio de potencial monitorado com relação ao tempo. A Figura 2.12 mostra o monitoramento do potencial de circuito aberto ao longo do tempo para uma solução de CaCl_2 1 mmol L^{-1} em KCl 100 mmol L^{-1} , $\text{pH} = 6,8$, evidenciando mais uma vez a estabilidade do microsensor desenvolvido no monitoramento de íons Ca^{2+} , que apresentou um desvio de $0,04 \text{ mV min}^{-1}$.

Figura 2.12 – Estabilidade do microsensor ISME: Medida de potencial de circuito aberto (vs. $\text{Ag} | \text{AgCl} | \text{KCl}_{(\text{sat})}$) em solução de CaCl_2 1 mmol L^{-1} + KCl 100 mmol L^{-1} , $\text{pH} = 6,8$.

Vale salientar que, enquanto o microsensor não estava sendo utilizado nos experimentos, o mesmo foi mantido numa solução de CaCl_2 50 mmol L^{-1} em posição vertical, o que estendeu a sua vida útil para vários dias após a primeira calibração.

2.4.4. SECM: Aproximação sobre uma superfície utilizando ISME

O equipamento SECM (modo de varredura altura constante) utilizado nos experimentos desta tese não opera no modo potenciométrico, inviabilizando investigações de mapeamento de superfícies. Uma limitação instrumental, relacionada à aquisição de dados potenciométricos juntamente com as posições relativas do microsensor ISME nos eixos x , y e z , foi observada durante os experimentos. Essa limitação instrumental da técnica tem sido discutida, e soluções definitivas ainda não foram determinadas para solucionar este problema. Entretanto, somente é possível posicionar o microsensor ISME a certa altura (d) da superfície de interesse com o auxílio de uma vídeo-câmera. Assim, o sistema piezelétrico pode ser operado de forma independente, enquanto o potenciostato faz medidas de potencial de circuito aberto (vs. $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{KCl}_{(\text{sat})}$) relativas à concentração local de íons sobre uma superfície. Desta forma, o microsensor ISME foi aproximado perpendicularmente à superfície, com o auxílio do motor de passo (manual), o mais próximo possível da mesma (Figura 2.13A). Em seguida, o eletrodo foi afastado 300 μm na direção z , desta vez utilizando o sistema de posicionamento piezelétrico SECM (Figura 2.13B). Portanto, para todas as medidas obtidas neste capítulo, foi utilizado este procedimento padrão de posicionamento que, embora não seja muito preciso, pode ser considerado como uma alternativa útil para a aquisição de informações sobre a dissolução ácida do esmalte dentário e permeação de íons cálcio através de membranas sintéticas. (Wei et al. 1995)

Figura 2.13: Posicionamento do microsensor ISME sobre superfície de esmalte dentário. Em a, aproximação utilizando motor de passo com microsensor muito próximo à superfície e em b microsensor a 300 μm de distância da superfície.

2.4.5. Estudo da dissolução ácida do esmalte dentário utilizando ISME para a detecção de íons cálcio

Nas últimas décadas, foram estabelecidos avanços significativos na medicina dentária e na saúde oral. Um desses avanços foi na melhoria da higiene bucal e no emprego de dietas mais saudáveis, sendo estes os principais fatores que contribuíram para uma maior longevidade da dentição no interior da cavidade oral. (Alfano et al. 2010) Consequentemente, o desgaste dental vem sendo frequentemente diagnosticado na prática odontológica atual. Quando essa perda estrutural envolve uma reação química com substâncias ácidas, denominamos esse processo de erosão dentária. Desta forma, existe uma estreita relação entre essa patologia e o estilo e qualidade de vida dos pacientes, a exemplo daqueles que consomem em excesso alimentos e bebidas de elevada acidez (Johansson et al. 2004; Tanaka et al. 2012). Esta condição também pode ser associada a diversas desordens alimentares, como bulimia e anorexia, e alterações sistêmicas, como refluxo gástrico. A patologia ainda pode ser vinculada ao consumo de medicamentos e trabalho em indústrias de agentes corrosivos. Desta forma, quando estas substâncias ácidas entram em contato frequente com o esmalte dentário, é ocasionada a perda progressiva e

irreversível da estrutura dental provocada por processos químicos que não envolvam bactérias. A Figura 2.14 mostra o caso de um paciente que consumiu em excesso refrigerante de cola (pH médio 2,7) durante 6 anos, levando ao desgaste do esmalte e à exposição da dentina, causando, consequentemente, a Hipersensibilidade Dentária, além da perda de forma e alteração da cor do dente. (Alfano et al. 2010)

Figura 2.14: Exemplo de erosão dentária causada pelo consumo excessivo de refrigerante de cola.

Várias técnicas vêm sendo utilizadas para a investigação de processos relacionados à erosão dentária. A mais convencional é o ensaio de perda de massa, no qual as amostras de dentes são pesadas antes e após a imersão por tempo pré-determinado em soluções contendo diferentes composições e valores de pH. Além disso, diferentes técnicas de microscopia têm sido utilizadas para investigar a dissolução ácida do esmalte dentário, incluindo as técnicas de profilometria (Heurich et al. 2010), impedância eletroquímica e SEM (Xu, Neoh, and Kishen 2008), AFM e nanoindentação. (Barbour et al. 2005) Tais técnicas vêm sendo utilizadas devido à alta sensibilidade para verificação dos estágios iniciais de amolecimento da superfície e consequente perda do esmalte, fornecendo uma visão detalhada das mudanças estruturais ocorridas na superfície. Os estágios iniciais da erosão dentária são particularmente interessantes, uma vez que o processo pode ser revertido devido à ação remineralizante da saliva ou de produtos específicos, recentemente desenvolvidos como os derivados de silicatos (Parker et al. 2014) ou até mesmo aqueles mais convencionais como a utilização de flúor (Gjorgievska et al. 2013).

Neste trabalho, a erosão dentária *in vitro* foi investigada monitorando-se a dissolução localizada do esmalte em soluções de mesma composição, mas com diferentes valores de pH. Para isso, um microsensor ISME sensível à detecção de íons cálcio foi posicionado sobre a superfície do esmalte dentário desta vez sem qualquer tratamento de polimento da superfície. (Campos et al. 2008) A aproximação *tip*/substrato foi discutida na seção anterior, sendo a distância de 300 μm mantida para todas as medidas. A Figura 2.15 mostra o perfil de concentração de íons cálcio monitorado pelo ISME durante a dissolução de uma amostra de dente bovino utilizando três soluções com valores de pHs 6,7; 4,0 e 2,5.

Figura 2.15 - Dissolução ácida do esmalte dentário utilizando o microsensor ISME ($r_1 = 1,5 \mu\text{m}$). (—) controle em solução de KCl 100 mmol L^{-1} pH 6,7; (—) monitoramento da concentração de íons cálcio sobre superfície de esmalte dentário em solução de KCl 100 mmol L^{-1} pH 6,7, (—) monitoramento da concentração de íons cálcio sobre superfície de esmalte dentário em solução de KCl 100 mmol L^{-1} + HCl 0,1 mmol L^{-1} pH 4,0; (—) monitoramento da concentração de íons cálcio sobre superfície de esmalte dentário em solução de KCl 100 mmol L^{-1} + HCl 5 mmol L^{-1} pH 2,5. ($d = 300 \mu\text{m}$)

Inicialmente utilizou-se uma solução de KCl 100 mmol L^{-1} pH 6,7 e o monitoramento do fluxo de íons cálcio foi feito durante um intervalo de tempo de aproximadamente 30 minutos. A curva em vermelho da Figura 2.15 mostra o perfil de concentração de íons cálcio obtido, pelo qual foi possível observar que a concentração permaneceu próxima de zero, indicando desta forma, a não ocorrência de reação de desmineralização ácida nesta condição específica. Além disso, a referida curva se mostra bastante similar à curva controle

obtida em solução de KCl 100 mmol L⁻¹ pH 6,7 sem a presença do dente em solução. Em seguida, a solução pH 6,7 foi retirada e adicionou-se uma solução de KCl 100 mmol L⁻¹ + HCl 0,1 mmol L⁻¹ pH 4,0. A curva em azul na Figura 2.15 mostra o monitoramento da concentração de íons cálcio e observa-se um ligeiro aumento a partir de 1000 s, indicando desta forma, a ocorrência de dissolução ácida da superfície do esmalte dentário, imediatamente exposta à solução. Por fim, utilizou-se uma solução de KCl 100 mmol L⁻¹ + HCl 5 mmol L⁻¹ pH 2,5 em contato com o esmalte dentário. Pode ser observado na curva em verde da Figura 2.15, uma dissolução ainda mais pronunciada do esmalte dentário, evidenciada pela alta concentração de íons cálcio monitorada pelo microsensor ISME desde o início do experimento.

A Equação 1.3, novamente demonstrada neste capítulo, mostra a reação de desmineralização que ocorre no esmalte dentário em meio ácido, sendo o pH 5,5 considerado o valor crítico para início da desmineralização dos cristais de hidroxiapatita (Christoffersen and Christoffersen 1984).

A perda de estrutura dentária representa preocupação constante no meio odontológico, pois, embora o esmalte seja um tecido morto no sentido estritamente biológico, ele é permeável, e trocas iônicas podem ocorrer entre esta estrutura e o ambiente na cavidade oral (Brudevold, Tehrani, and Cruz 1982). Sobre condições fisiológicas normais (pH 7,0), a saliva é supersaturada de íons cálcio e fosfato não ocorrendo dissolução da estrutura do esmalte dentário, sendo a remineralização um mecanismo de reparo natural dos dentes (Cochrane et al. 2010). Assim, a curva de dissolução em pH 6,7 reproduz esse comportamento da saliva mostrando a estabilidade da hidroxiapatita neste meio sendo, portanto, o fluxo salivar fundamental no controle deste processo (Margolis et al. 1999).

A dissolução do esmalte em solução ácida depende de vários fatores incluindo pH, concentração do ácido e grau de saturação com relação a hidroxiapatita (Barbour et al. 2003). Desta forma, diferentes estudos envolvendo a dissolução da hidroxiapatita do esmalte dentário sugerem que este processo depende das propriedades interfaciais da superfície, as quais desempenham um papel importante no controle da cinética de dissolução ácida deste cristal. Assim, os perfis de dissolução obtidos nos pHs 4,0 e 2,5 são consistentes com o modelo de dissolução da hidroxiapatita, uma vez que quanto mais ácido o meio, maior é a solubilidade deste composto. (Margolis et al. 1999) Além disso, os perfis de dissolução mostram oscilações na concentração de íons cálcio. Este comportamento pode ser explicado através do aumento do grau de saturação superficial com relação aos íons cálcio e fosfato, diminuindo a taxa de dissolução ácida. Em estudos anteriores, foi demonstrado que a extensão e a taxa de dissolução ácida do esmalte dentário é fortemente dependente da difusão de Ca^{2+} e PO_4^{3-} em direção à superfície ou no sentido oposto à mesma. (Fisher et al. 2011; Parker et al. 2014; Thomann et al. 1991)

Assim, a metodologia proposta para o monitoramento da dissolução do esmalte dentário pode ser utilizada como alternativa eficiente para investigação e desenvolvimento de novos produtos que reparam e protegem a superfície do esmalte dentário contra a erosão ácida (Cochrane et al. 2010; Dedhiya, Young, and Higuchi 1973). Um exemplo bastante conhecido e utilizado como política pública de combate e erosão dentária é a adição de flúor na água de abastecimento (Ramires and Buzalaf 2006). Desta forma, a superfície do esmalte dentário torna-se mais resistente à dissolução ácida devida a formação de fluorapatita ($K_{ps} = 1,95 \times 10^{-56}$) que possui menor solubilidade se comparado à hidroxiapatita ($K_{ps} = 5,25 \times 10^{-53}$). Assim o pH crítico desse composto é reduzido para valores próximos a 4,5. Desta forma, o efeito do tratamento da superfície do esmalte após utilização destes e outros compostos pode ser investigado, sendo o efeito na taxa de dissolução ácida facilmente monitorado pelo microsensor ISME. (Dedhiya et al. 1973)

Recentemente, a técnica SECCM foi utilizada para investigação da cinética de dissolução local de cristais iônicos de hidroxiapatita (esmalte dentário humano). Silicato de cálcio foi testado como uma nova composição de pasta de dentes mostrando potencial eficiência para proteger a superfície contra a erosão dentária, bem como reparar a superfície de esmalte desmineralizada. A sonda SECCM contendo solução de HNO_3 1 mmol L^{-1} + KNO_3 50 mmol L^{-1} foi utilizada para produzir uma erosão pontual (*etching*) na superfície de dentina antes e após os tratamentos (escovação conforme as recomendações do fabricante utilizando o novo produto) e, com o auxílio das imagens AFM, o volume erodido e/ou reparado pode ser quantificado. A dissolução ácida localizada de microcristais será abordada com mais detalhes no Capítulo 4 da tese com o uso de sondas multifuncionais SECM-SICM.

2.4.6. Estudo do transporte de íons cálcio através de membranas sintéticas utilizando ISME

Goma de xantana é um polímero extracelular produzido principalmente pela bactéria *Xanthomonas campestris*, sendo um polissacarídeo de alto peso molecular. Este polímero pode ser produzido industrialmente e tem sido amplamente utilizado como agente espessante na produção de alimentos e cosméticos. Suas propriedades incluem estabilidade térmica e comportamento pseudoplástico, além de possuir características estabilizantes. (Petri 2015) Os hidrogéis de xantana são estruturas tridimensionais de um polímero hidrofílico que possuem capacidade de absorver grandes teores de água. Além disso, membranas de xantana são materiais interessantes e podem ser aplicados em biomedicina devido à sua biocompatibilidade e não toxicidade (Bueno, Bentini, et al. 2013). Como exemplo, podemos citar os nanocompósitos de xantana e hidroxiapatita, os quais têm sido recentemente investigados como biocompósitos para regeneração óssea (Nie et al. 2012). Além disso, a habilidade dessas estruturas em responder a estímulos externos, como

temperatura, pH, força iônica, campos elétricos e magnéticos, depende da natureza do polímero e mudanças significativas das propriedades físicas dessa estrutura podem ser observadas. (Petri 2015) Recentemente, aplicações na liberação controlada de fármacos têm demonstrado a capacidade desses hidrogéis de serem considerados como materiais inteligentes onde, neste caso, o grau de absorção de água se mostra sensível ao pH do meio.

O efeito do magnetismo sob estes materiais também vem sendo recentemente investigado, encontrando-se aplicações relevantes na biomedicina celular. Nanopartículas magnéticas podem ser facilmente distribuídas em matrizes poliméricas criando nanocompósitos híbridos, os quais podem ser utilizados no combate ao câncer (Depan and Misra 2012). Além disso, o tratamento por hipertermia de células tumorais também vem sendo empregado como uma alternativa bastante eficiente devido à maior sensibilidade térmica dessas células às alterações de temperatura causadas pela indução magnética (Lin, Lin, and Lin 2012).

O fluxo de íons Ca^{2+} em meios de cultura celular é crucial no sinal de transdução celular e metabolismo (Shevchuk et al. 2001). Desta forma, a quantificação desses íons em ambientes intra e extracelular utilizando ISME vem sendo investigada por muitos anos, devido aos processos vitais que os íons cálcio desempenham no organismo humano (Scrase-Field and Knight 2003). Recentemente, observou-se que interação de cátions com o campo elétrico do substrato pode ser modulada aplicando-se um campo magnético proveniente de uma fonte externa. (Petri 2015) Desta forma, uma modulação dessa atração eletrostática pode favorecer a permeação de espécies carregadas através de materiais porosos promovendo uma permeação mais eficiente capaz de acelerar ou promover o crescimento celular.

Nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) são usualmente sintetizadas pelo método de co-precipitação em ultrassom, com tamanho médio de 10 nm, e podem ser facilmente incorporadas na superfície de filmes de xantana. (Bueno, Silva, et al. 2013) Desta forma,

estes filmes poliméricos híbridos podem ser utilizados como substrato para crescimento celular *in vitro*. O sucesso desse tipo de aplicação está baseado no pequeno tamanho das partículas, além da estabilidade coloidal que evita agregação e oxidação das mesmas. Em estudos recentes, estes materiais magnéticos híbridos foram empregados em investigações com respeito à absorção celular e engenharia de tecidos. Os resultados demonstram que, na ausência de uma fonte magnética externa (ESMF), a proliferação de fibroblastos (3T3 L1) sobre os filmes de xantana/magnetita foi favorecida se comparada com o crescimento celular sobre membranas de xantana pura. Além disso, proliferação celular nos filmes de xantana/magnetita sem ESMF foi comparável à observada sobre os filmes de xantana pura na presença do ESMF (Bueno, Silva, et al. 2013).

Portanto, neste trabalho procurou-se investigar sistematicamente a influência de campos magnéticos na permeação de íons Ca^{2+} através de membranas de xantana e membranas híbridas de xantana/magnetita na presença e ausência de ESMF. Além disso, uma membrana polimérica neutra foi utilizada como controle, uma vez que as membranas de xantana e xantana/magnetita são negativamente carregadas devido à utilização de íons citrato durante a etapa de reticulação dos filmes poliméricos. A espessura média dos filmes utilizados nos experimentos de permeação de íons Ca^{2+} foi de 60 μm , sendo estes montados na célula eletroquímica entre os compartimentos doador e aceptor, como mostrado na Figura 2.5. O microsensor ISME foi posicionado no centro de célula e a aproximação foi feita conforme explicado na seção 2.4.3. A Figura 2.16 mostra o fluxo de íons Ca^{2+} medido através dos filmes poliméricos de membrana neutra (curva em preto), membrana de xantana (curva em vermelho) e membrana de xantana/magnetita (curva em azul) na ausência e na presença de ESMF, a e b respectivamente.

Figura 2.16 – Permeação de íons Cálcio através de membranas sintéticas utilizando ISME ($d = 300 \mu m$). (a) sem ESMF e (b) com ESMF. (—) membrana neutra, (—) membrana de xantana e (—) membrana de xantana/magnetita.

Como pode ser observado, a permeação de íons cálcio parece ser mais pronunciada quando a membrana de xantana contém nanopartículas magnéticas em sua estrutura, formando híbridos de xantana/magnetita. Este comportamento pode ser observado para ambos os experimentos, na presença e ausência de ESMF. Além disso, também pode ser observada uma ligeira diminuição do fluxo de íons cálcio através da membrana xantana/magnetita quando o monitoramento foi feito na presença de ESMF em comparação com a curva obtida na ausência de ESMF. Por outro lado, não foi observada uma diferença significativa na permeação de íons Ca^{2+} através da membrana neutra (controle) e da

membrana de xantana, mesmo na ausência e na presença do ESMF. Este comportamento evidencia a maior influência do campo magnético proveniente das nanopartículas magnéticas incorporadas na superfície da membrana reafirmando, desta maneira, a importância dos materiais híbridos em investigações com relação ao crescimento celular sobre estes substratos. Desta forma, estes resultados corroboram os estudos de crescimento celular investigados anteriormente sobre estes substratos, e uma possível explicação para este comportamento seria de que o campo magnético gerado pelo material híbrido (nanopartículas de magnetita) enfraquece o campo elétrico existente na estrutura da membrana negativamente carregada devido à presença dos íons citrato. Assim, sob estas condições a permeação de íons Ca^{2+} torna-se mais evidente, explicando desta forma a maior taxa de crescimento celular quando utiliza-se filmes poliméricos híbridos.

2.5. Conclusões

Neste capítulo, foi desenvolvida uma metodologia reprodutível de fabricação de microeletrodos íon-seletivos para detecção de íons cálcio. O processo de silanização das paredes internas da micropipeta bem como o armazenamento do microssensor em solução apropriada são procedimentos importantes que garantem a estabilidade e reprodutibilidade das medidas potenciométricas. Além disso, a metodologia desenvolvida pode ser utilizada para fabricação de diversos ISMEs seletivos a outros íons apenas mudando-se a composição da membrana ionófora.

A SECM no modo potenciométrico se mostra como uma técnica versátil para investigações de diferentes sistemas eletroquímicos, embora neste trabalho uma abordagem com relação à obtenção de imagens não tenha sido explorada. Entretanto, apenas posicionando-se o microssensor sobre uma superfície foi possível estudar interfaces interessantes e de relevância para melhoria da saúde humana. Assim, a dissolução ácida do

esmalte dentário pode ser investigada monitorando-se a concentração local de íons cálcio provenientes do substrato em contato com diferentes soluções. Os perfis de dissolução ácida demonstram que a taxa de desmineralização do esmalte dentário é altamente dependente do pH do meio. Desta forma, esta metodologia permite auxiliar no desenvolvimento de novos produtos comerciais que sejam efetivos na blindagem/proteção da superfície contra o ataque de substâncias ácidas, impedindo desta forma que ocorra erosão dentária do esmalte e consequentemente evitando problemas relacionados à Hipersensibilidade Dentária.

Com relação às membranas poliméricas, hidrogéis de xantana foram obtidos na presença de ácido cítrico, um agente de reticulação não tóxico para polissacarídeos. Analisando os perfis de permeação dos íons Ca^{2+} através dos substratos, foi possível observar certa influência do campo magnético sobre a taxa de permeação. Desta forma, podemos inferir que ocorreu um enfraquecimento do campo elétrico da membrana negativamente carregada, o que promoveu uma diminuição da interação eletrostática com íons Ca^{2+} e, consequentemente, um fluxo mais pronunciado destes íons pode ser detectado pelo sensor ISME. Estes resultados corroboram os experimentos *in vitro*, onde o crescimento de fibroblastos foi investigado sob a influência de campos magnéticos, sendo demonstrada uma maior contagem dessas células sobre essas condições.

Capítulo 3

SICM-hopping mode

**Utilização de nanopipetas de vidro para
determinação da topografia de microcristais de calcita**

3.1. Introdução

3.1.1. Microscopia de Condutância Iônica de Varredura (SICM)

Paralelamente ao surgimento e todo o desenvolvimento da SECM, uma outra classe de sondas eletroquímicas em SEPM também foi amplamente empregada no mapeamento de superfícies delicadas com alta resolução espacial e robustez. Utilizando nanopipetas de vidro preenchidas com eletrólito suporte, a Microscopia de Condutância Iônica de Varredura (*Scanning Ion Conductance Microscopy* – SICM) (Hansma et al. 1987), se desenvolveu baseada em sua capacidade de mapear superfícies biológicas com altas velocidades de varredura sem o efetivo contato *tip*/substrato (Chen, Zhou, and Baker 2012; Happel, Thatenhorst, and Dietzel 2012; Takahashi et al. 2012). Além disso, sondas SICM podem ser consideradas de fácil fabricação, uma vez que capilares de vidro são afinados em puxadores de pipeta a laser (*Laser Micropipette Puller*), atingindo facilmente poucos nanômetros de diâmetro (Chen and Baker 2011). Uma representação esquemática simplificada do aparato instrumental utilizado em SICM pode ser observada na Figura 3.1, onde tanto a nanopipeta quanto a amostra são imersos em solução eletrolítica.

Figura 3.1 - Representação esquemática do aparato instrumental utilizado em SICM. adaptado (Chen et al. 2012)).

O princípio de operação de SICM se baseia na aplicação de uma diferença de potencial constante (E_{DC}) entre os quase-referência contra-eletrodos (QRCE) inseridos dentro da nanopipeta e o no seio da solução. Usualmente estes eletrodos são constituídos de um fio de Ag|AgCl (espessura na ordem de 100 a 250 μm de diâmetro) facilmente inseridos no canal SICM. Uma corrente é observada devido ao processo reversível que ocorre na interface eletrodo/solução de acordo com a Equação 3.1.

Considerando que o processo de transferência de carga que ocorre na reação é rápido e que a área superficial dos eletrodos de referência é bem maior que a dimensão do canal existente na ponta da nanopipeta (raio do sensor), podemos definir uma corrente iônica (i_{DC}) que flui entre os eletrodos passando através da abertura na ponta do sensor. (Edwards et al. 2009) A magnitude dessa corrente é portanto determinada pela resistência total da pipeta R_T , onde:

$$R_T = R_{tip} + R_{ac} \quad \text{Equação 3.2}$$

sendo: R_{tip} a própria resistência da tip contendo solução de eletrólito interno e R_{ac} a resistência de acesso entre a pipeta e a superfície da amostra.

Estes dois parâmetros podem ser representados de acordo com as Equações 3.3 e 3.4 respectivamente.

$$R_{tip} = \frac{\gamma \cot(\theta/2)}{\pi r_1} \quad \text{Equação 3.3}$$

$$R_{ac} = \frac{3/2 \ln(r_0/r_1)}{k \cdot \pi \cdot d} \quad \text{Equação 3.4}$$

sendo: γ a resistência da solução interna; θ o semi-ângulo da pipeta; r_1 o raio interno da pipeta; r_0 o raio externo da pipeta; k condutividade do eletrólito na pipeta; d a distância *tip*/substrato.

Embora R_{tip} seja constante para pipetas de mesma geometria e composição da solução interna, R_{ac} é fortemente afetado pela distância (d) entre a *tip* e a amostra. Desta forma, a magnitude da corrente iônica é determinada a partir do potencial aplicado E_{DC} e R_T (Chen et al. 2012). Assim, parâmetros como raio da sonda, comprimento cônico e semi-ângulo do sensor devem ser determinados previamente ao experimento e usualmente imagens SEM são utilizadas na caracterização das nanopipetas. A Figura 3.2 mostra a geometria de uma nanopipeta de vidro geralmente utilizada em estudos SICM, onde r_1 é o raio interno, r_o é o raio externo da sonda e d é a separação *tip*/substrato.

Figura 3.2 - Geometria 2D de uma nanopipeta de vidro utilizada em SICM.

Em estudos empregando modelagem computacional foi demonstrado que a corrente monitorada em SICM é função da geometria da pipeta, onde o aumento do semi-ângulo (θ) e baixos valores para o parâmetro RG ($RG = r_o/r_i$) fazem o mapeamento por SICM ser mais sensível com relação à separação *tip*/substrato (d), tornando a técnica eficiente para a obtenção de informações estruturais de superfícies delicadas sem causar danos à amostra. (Edwards et al. 2009)

3.1.2. Mecanismos de feedback posicional utilizados em SICM

Inicialmente, o mecanismo de feedback posicional foi baseado apenas na corrente de condutância i_{DC} entre os QRCEs. Desta forma, i_{DC} pode ser usada diretamente para controlar a posição da sonda sobre a superfície, permitindo que a pipeta siga o contorno do substrato de acordo com a representação esquemática mostrada na Figura 3.3a. Na região próxima à superfície, a corrente iônica sofre forte influência com relação à posição da pipeta sobre o substrato, fornecendo desta forma um método de feedback para controle da posição na direção do eixo z. Uma infinidade de amostras biológicas já foram analisadas utilizando este mecanismo de feedback, sendo a superfície detectada tipicamente quando há mudança de 0,2 a 3% da corrente iônica medida no seio da solução (Chen et al. 2012; Happel et al. 2012). Entretanto, este mecanismo se mostra instável quando ocorrem mudanças na resistência da solução (flutuações térmicas), bloqueio da nanopipeta ou quando mudanças bruscas na topografia do substrato ocorrem, além da alta sensibilidade a mudanças de força iônica local da superfície. (Edwards et al. 2009)

Para superar estes problemas, a modulação da distância (separação *tip*/substrato (d)) foi introduzida promovendo uma melhor estabilidade da resposta de *feedback* durante a varredura do substrato. Neste mecanismo de *feedback*, a posição da nanopipeta é oscilada de modo sinusoidal normal à superfície (Δd) numa frequência e amplitude pré-definidos. (Edwards et al. 2009; McKelvey et al. 2014). Uma representação esquemática deste modo é mostrada na Figura 3.3b.

Figura 3.3 - Modos de varredura em SICM: a) sem modulação de distância tip/substrato (i_{DC}). b) com modulação de distância tip/substrato (i_{DC}) (adaptado (Chen et al. 2012)).

À medida que o sensor se aproxima do substrato, uma oscilação na resistência da pipeta é produzida, introduzindo uma oscilação na corrente iônica (i_{DC}) e gerando desta vez uma corrente iônica alternada (i_{AC}), usada agora como mecanismo de *feedback* posicional. Uma curva de aproximação teórica SICM é mostrada na Figura 3.4.

Figura 3.4 - a) Curva de aproximação teórica SICM mostrando o sinal i_{DC} , b) Modulação da distância via componente ac.

Como pode ser observado na Figura 3.4a, à medida que o sensor se aproxima de uma superfície, i_{DC} diminui. Este fenômeno se deve ao fato de haver uma diminuição do fluxo de íons na região ao redor da interface *tip*/substrato. Desta forma, um decréscimo de (i_{DC}) pode ser observado assim como no fenômeno de *negative feedback* utilizado em SECM. Além disso, a natureza da corrente em SICM é limitada por migração diferentemente

das correntes tipicamente difusivas e às vezes convectivas monitoradas por SECM (J Kwak and Bard 1989). A Figura 3.4b mostra o aumento da i_{AC} quando o sensor se aproxima do substrato, sendo este parâmetro utilizado como controle de *feedback* sobre a superfície.

Em SICM, embora a resistência da pipeta seja constante para sondas de mesma geometria, a resistência de acesso (R_{ac}) é fortemente afetada pela separação *tip*/substrato (d), como demonstrado pela Equação 3.4. Consequentemente, ocorre um aumento de R_{ac} à medida que o sensor se aproxima do substrato, justificando o decréscimo na corrente iônica i_{DC} . No caso do mecanismo de *feedback* não modulado, o máximo de corrente é observado quando a pipeta se encontra distante do substrato, e a magnitude da corrente iônica decresce à medida que o sensor se aproxima da superfície. Entretanto, no caso do mecanismo de *feedback* modulado, o sinal (i_{AC}) é observado somente quando a pipeta está muito próxima da superfície, aumentando dramaticamente a resolução e estabilidade das imagens obtidas por SICM. Além disso, mudanças na corrente iônica as quais não estão em fase com a frequência empregada na modulação não afetam o controle posicional da sonda, permitindo contínuas observações em diferentes sistemas interfaciais por longos períodos de tempo. (Chen et al. 2012; Edwards 2008; Gorelik et al. 2004)

Em SICM, uma mudança de corrente iônica detectada na pipeta gera uma resposta referente à topografia da superfície sem que haja contato físico entre elas, caracterizando SICM como uma poderosa técnica de mapeamento sem contato. Assim, superfícies delicadas podem ser investigadas por SICM mostrando vantagens significativas se comparado com a técnica de AFM, por exemplo. Neste caso, a formação da imagens topográficas está baseada nas forças de interação entre o cantilever e a amostra, mesmo utilizando o modo contato intermitente, ocasionando frequentemente danos ou deformação da superfície investigada. Em ambientes fisiológicos, tais forças mecânicas externas não podem ser utilizadas para aquisição de imagens devido à alta sensibilidade mecânica deste tipo de amostra.

Recentemente, um novo mecanismo de *feedback* foi introduzido em SICM através da modulação do potencial aplicado entre os QRCEs. Ambas amplitude e fase da i_{AC} são sensíveis à distância *tip*/substrato, fornecendo um sinal de *feedback* muito estável. Esta nova metodologia elimina a oscilação física da pipeta para geração de i_{AC} como descrito para a modulação de *feedback* por distância. Além disso, a modulação de potencial pode ser utilizada para a obtenção de imagens com maior velocidade de varredura, com aplicações na investigação da formação de pits em superfícies de cristais de calcita (McKelvey et al. 2014).

3.1.3. Modos de varredura utilizados em SICM

As melhorias no controle de *feedback* (modulação de distância) permitiram que um sinal AC de alta estabilidade fosse obtido com um amplificador *lock-in* na mesma frequência da oscilação aplicada. Este mecanismo reduz consideravelmente o ruído e melhora a sensibilidade na detecção da superfície (eixo z). Consequentemente, diferentes modos de varredura utilizando SICM têm sido desenvolvidos para o mapeamento de superfícies de complexa topografia e com grandes variações de altura (z) numa tentativa de substituição aos modos distância constante. Assim, o modo de varredura por saltos (*Hopping Mode*) tem sido amplamente utilizado na investigação de amostras de alta complexidade, sendo as posições relativas do sensor sobre a superfície mostradas na representação esquemática da Figura 3.5.

Figura 3.5 - Modo de varredura *Hopping Mode* usualmente utilizado em SICM. No esquema ($\downarrow$) representa a curva de aproximação na direção ao substrato (Z_{app}). ($\uparrow$) representa o afastamento da superfície ($-Z_{app}$) e ($\rightarrow$) representa o reposicionamento lateral ($Step_{x,y}$).

Como pode ser observado, este modo de varredura emprega uma série de curvas de aproximação sobre o substrato (Z_{app}), com subsequente afastamento ($-Z_{app}$) e reposicionamento lateral ($Step_{x,y}$) seguido de um novo ciclo de aproximação, afastamento e reposicionamento até completar toda a área programada. Desta forma, a cada ponto da imagem obtém-se uma curva de aproximação, sendo o número de pontos da medida (pixel da imagem) o fator determinante na resolução e tempo para aquisição da imagem. Adicionalmente, as velocidades de aproximação, afastamento e reposicionamento podem ser controladas e representadas por v_{app} , $-v_{app}$ e v_{step} , respectivamente. Além disso, é importante fazer um reconhecimento prévio da amostra pra determinar sua rugosidade e o valor máximo de afastamento $-Z_{app}$, o que garante o mapeamento sem que haja o contato do nanossensor com a amostra. A Figura 3.6 mostra uma representação esquemática do modo de varredura *Hopping Mode* utilizado em SICM.

Figura 3.6 – Modo de varredura *Hopping Mode* frequentemente empregado no mapeamento de superfícies utilizando SICM.

3.1.4. Aplicações utilizando SICM

A maioria das aplicações utilizando SICM se baseia no mapeamento topográfico sem contato de amostras de natureza biológica (Ishizaki et al. 2013). A primeira aplicação em

células foi reportada em 1997 por Korchev e colaboradores. (Korchev et al. 1997) Desde então, SICM tem sido utilizada no mapeamento de diferentes culturas celulares como neurônios e cardiomiócitos. (Gorelik et al. 2004; Yang et al. 2011) Além disso, SICM tem sido bastante utilizada para correlacionar as informações de topografia com as propriedades de transporte de íons, como Cl^- e K^+ , através de medidas de condutância. Desta forma, o fluxo através de nanoporos em membranas poliméricas, as quais geram gradientes de concentração no compartimento acepor, pode ser mapeado. (Chen and Baker 2011). Investigações relevantes com relação ao mapeamento de carga de superfícies têm sido demonstradas utilizando SICM (Mckelvey et al. 2014; Perry et al. 2015).

SICM tem sido frequentemente combinada com outras técnicas, exibindo significantes benefícios para ambas as metodologias. *Patch-clamp* tem sido utilizada juntamente com medidas SICM e a metodologia tem permitido a obtenção de medidas de corrente iônicas de canais com considerável resolução espacial (Yang et al. 2011). SICM tem sido também utilizada em combinação com a CLSM (microscopia Laser Confocal), sendo possível obter imagens de alta resolução espacial. Além disso, uma outra aplicabilidade de SICM inclui a liberação controlada de espécies químicas sobre a superfície de interesse adicionando-se um reagente químico específico na solução de eletrólito suporte situado dentro da nanopipeta (Takahashi et al. 2011). Uma abordagem com relação a este tema será discutida no Capítulo 4.

3.2. Objetivos

O objetivo principal deste capítulo foi demonstrar de forma simples e direta a utilização de SICM como técnica de mapeamento topográfico de alta resolução. Assim, o capítulo trata da construção e caracterização de nanopipetas de vidro as quais foram utilizadas como nanossensor em SICM. Desta forma, imagens topográficas de um

microscristal de calcita foram obtidas utilizando o mecanismo de feedback por modulação de distância empregando *Hopping Mode*.

3.3. Parte Experimental

3.3.1. Reagentes

Cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio di-hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), bicarbonato de sódio (NaHCO_3) e etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), foram obtidos da Sigma-Aldrich. Ácido sulfúrico (H_2SO_4) foi adquirido da Fischer Química. Todas as soluções foram preparadas utilizando água Milli-Q (Millipore Corp.) com resistividade de ca. 18,2 M Ω cm a 25 °C.

3.3.2. Instrumentação

Nanopipetas de vidro foram fabricadas utilizando o equipamento *Laser Micropipette Puller* modelo P-2000 (Sutter Instrument Company®) empregando capilares de vidro borossilicato (Sutter Instrument Company ®) com as seguintes dimensões: diâmetro externo 1,5 mm, diâmetro interno de 0,86 mm e comprimento de 15 cm. Todos os experimentos para aquisição de imagens SICM foram feitos em gaiola de Faraday com isolamento térmico. O sensor foi montado perpendicularmente sobre um posicionador piezoelétrico (P-611, 3S Nanocube), que por sua vez foi montado num microscópio óptico invertido (Axiovert 40 CFL, Zeiss). A corrente no canal SICM foi medida utilizando um conversor corrente-voltagem construído no *Warwick Electrochemistry and Interfaces Group* (Warwick University - United Kingdom). Um amplificador lock-in (SR830, Stanford Research Systems) foi usado para gerar o sinal oscilatório no sensor e em seguida determinar a amplitude e fase da corrente iônica alternada (i_{AC}) gerada. A gravação dos dados, bem como o controle posicional (x, y) e

a voltagem aplicada no canal SICM, foram realizados usando um programa LabVIEW desenvolvido pelo referido grupo de pesquisa (National Instruments, 2013) utilizando uma placa FPGA (7852R, National Instruments). A caracterização do tamanho das sondas foi feita utilizando um microscópio eletrônico de varredura (Supra 55-VP, Zeiss). O pH das soluções foram medidos utilizando um pHmetro (Metler Toledo International Inc).

3.3.3. Fabricação de nanopipetas SICM

Primeiramente, os capilares foram limpos por imersão em uma solução de H_2SO_4 1 mol L^{-1} durante 24 horas, seguido por uma lavagem com água e finalizando com etanol para remover completamente os traços de sujeira e ácido. (Cras et al. 1999) Em seguida, os capilares condicionados foram secos em forno durante 4 horas a 180°C e posteriormente armazenados em recipientes hermeticamente fechados até a utilização. Os capilares limpos foram então puxados no equipamento *Laser Micropipette Puller* (Walsh et al. 2005), utilizando um programa com os seguintes parâmetros:

Linha 1: Heat 460, Fil 4 Vel 30, Del 150, Pul 20

Linha 2: Heat 450, Fil 4 Vel 30, Del 150, Pul 60

Linha 2: Heat 435, Fil 3 Vel 30, Del 135, Pul 40

Uma caracterização prévia com relação aos parâmetros geométricos da sonda foram obtidos utilizando SEM. Para a preparo de nanossensores SICM foi necessário apenas o preenchimento da capilar com solução de KCl 100 mmol L^{-1} pH 6,8 com o auxílio de uma agulha de seringa flexível (MicrofilTM 34G). Uma inspeção no microscópio óptico se faz necessária para avaliar a presença de bolhas na ponta do nanossensor. O contato elétrico foi realizado inserindo-se QRCE na solução de eletrólito suporte interna.

3.3.4. Preparação de microcristais de calcita

Microcristais de calcita foram preparados por um processo simples de precipitação. Resumidamente, volumes iguais de soluções de cloreto de cálcio 10 mmol L^{-1} e bicarbonato de sódio 10 mmol L^{-1} (pH 10,5) foram misturados numa placa de Petri e a solução resultante foi mantida fechada em ambiente limpo durante 2 horas. Os microcristais formados na base da placa, com dimensões típicas de $10 \text{ }\mu\text{m} \times 10 \text{ }\mu\text{m}$ e 5-10 μm de altura, foram lavados cuidadosamente com água Milli-Q e secos com um fluxo de gás nitrogênio por 2 minutos. Em seguida, as amostras foram armazenadas em local seco e utilizadas nos experimentos somente uma semana após o seu crescimento. Este procedimento se faz necessário uma vez que os cristais precisam estar completamente fixados na base da placa de Petri para subsequente aquisição de imagens topográficas SICM. (Archibald, Qadri, and Gaber 1996)

3.4. Resultados e discussões dos resultados

3.4.1. Caracterização de nanopipetas por SEM

O processo de fabricação de sensores eletroquímicos afinados até dimensões micro ou nanométricas é uma etapa decisiva no desenvolvimento de técnicas de microscopia. A reprodutibilidade dos programas desenvolvidos no equipamento *Laser Micropipette Puller* depende da manutenção do mesmo, no que diz respeito ao alinhamento do laser e a limpeza dos espelhos de reflexão, os quais devem ser feitos periodicamente (Mezour, Morin, and Mauzeroll 2011). A caracterização dos sensores é avaliada, geralmente, por imagens obtidas por SEM, sendo possível obter parâmetros como diâmetro, espessura do vidro e semiângulos do sensor. A Figura 3.7 mostra uma imagem SEM de uma sonda SICM

fabricada de acordo com o procedimentos descritos anteriormente e utilizada dos experimentos de mapeamento da topografia de um microcristal de calcita.

Figura 3.7 - Imagem SEM mostrando a ponta de um nanossensor SICM afinado no puxador a laser formando uma abertura com raio interno (r_1) = 200 nm.

3.4.2. Curvas de aproximação utilizando SICM

A modulação de distância foi desenvolvida para melhorar o controle posicional da pipeta, uma vez que a oscilação vertical (Δd) ocasiona uma oscilação em R_{ac} introduzindo uma componente *ac* na corrente iônica i_{DC} . A corrente alternada resultante (i_{AC}) é detectada empregando-se um amplificador *lock-in* e utilizada como controle de *feedback* posicional. Uma alteração deste sinal só é observada quando a pipeta está muito próxima do substrato, ou seja, nas mesmas dimensões do raio da sonda conduzindo investigações com considerável resolução espacial.

Desta forma, curvas de aproximação sobre microcristais de calcita imersos em solução eletrolítica de KCl 100 mmol L⁻¹ pH 6,8 foram obtidas utilizando uma sonda SICM (r_1 = 200 nm) oscilando 20 nm de amplitude pico a pico com uma frequência de 288 Hz. Uma diferença de potencial de 0,1 V foi aplicada entre os QRCEs situados dentro da nanopipeta e na solução eletrolítica. O posicionamento da sonda sobre a superfície do cristal foi feito utilizando-se um microscópio invertido. A Figura 3.8 mostra as curvas de aproximação

monitorando-se i_{DC} e i_{AC} sobre a superfície de vidro (a e b) e sobre a superfície do microcristal (c e d), respectivamente.

Figura 3.8 Curvas de aproximação utilizando sonda SICM ($r_1 = 200 \text{ nm}$, $v_{app} = 2 \mu\text{m s}^{-1}$, $E_{DC} = 0,1 \text{ V}$) em solução de KCl 100 mmol L^{-1} pH = 6,8. (a e b) i_{DC} e i_{AC} sobre a superfície de vidro e (c e d) i_{DC} e i_{AC} sobre a superfície do microcristal de calcita.

Como pode ser observado, à medida que o sensor SICM moveu-se em direção ao substrato, a corrente iônica i_{DC} diminuiu enquanto i_{AC} apenas aumentou bruscamente nas proximidades da superfície (valor de *setpoint* $i_{AC} = 2 \text{ pA}$). Vale ressaltar que tais curvas de aproximação não foram normalizadas com relação ao raio da nanopipetta (d/r_1), mostrando-se desta forma, o deslocamento do sensor a partir do ponto zero do sistema piezoelétrico até atingir a superfície do cristal. Desta forma, pode-se obter rapidamente informações com relação à altura do microcristal de calcita, a partir dos valores Z_{final} da aproximação no vidro e no microcristal de calcita:

$$Z_{final}^{vidro} - Z_{final}^{cristal} = \text{altura do cristal} = h_{cristal}$$

$$h_{cristal} = 43,1 - 37,3 = 5,8 \approx 6 \mu\text{m}$$

Este procedimento, portanto, é de fundamental importância na determinação de parâmetros para o mapeamento utilizando o modo de varredura *Hopping Mode*. Desta forma, pode-se inferir que $-Z_{app}$ precisa ser maior que $6 \mu\text{m}$ para que não ocorra nenhum dano à superfície do cristal a ser investigado para obtenção de sua topografia. Usualmente, aplica-se a relação mostrada na equação 3.5.

$$-Z_{app} = h_{cristal} + 5 \mu\text{m} \quad \text{Equação 3.5}$$

3.4.3. Topografia de um microcristal de calcita utilizando SICM-hopping mode

Para mapear um microcristal de calcita durante o processo de dissolução em solução de KCl 100 mmol L^{-1} em pH 6,8, foi então implementado o modo de varredura *Hopping Mode* descrito anteriormente. A Figura 3.9 mostra uma representação esquemática de uma imagem obtida aplicando-se 9 *hoppings* sobre a superfície.

Figura 3.9 Modo de varredura *hopping mode* com modulação da distância utilizado em SICM. No esquema ($\downarrow$) representa a curva de aproximação na direção ao substrato (Z_{app}), ($\uparrow$) representa o afastamento da superfície ($-Z_{app}$) e ($\rightarrow$) representa o reposicionamento lateral ($Step_{x,y}$).

Assim, uma série de curvas de aproximação foram obtidas e os valores de Z_{final} registrados para obtenção do mapa topográfico do microcristal, construindo-se ao final imagens de $24 \times 24 \mu\text{m}^2$. Brevemente, a sonda foi aproximada a uma velocidade $v_{app} = 1,5 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$, afastada do substrato $-Z_{app} = 10 \mu\text{m}$ numa velocidade $-v_{app} = 5 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ e a distância entre cada aproximação foi $Step_{x,y} = 2 \mu\text{m}$. A Figura 3.10 mostra a imagem óptica do microcristal de calcita (a), a imagem SICM obtida utilizando *Hopping Mode* (b) e a imagem topográfica do cristal de calcita após tratamento matemático aplicando a ferramenta de contorno *shading_interp* na construção da figura no programa MatLAB (c).

Figura 3.10 - (a) Micrografia óptica de um microcristal de calcita, (b) Imagem topográfica SICM, (c) imagem topográfica (*shading_interp* no programa MatLAB) ($r_1 = 200 \text{ nm}$, $v_{app} = 1,5 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$, $-Z_{app} = 10 \mu\text{m}$, $-v_{app} = 1,5 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$, $Step_{x,y} = 2 \mu\text{m}$).

Como pode-se observar na Figura 3.10, a imagem SICM parece corresponder exatamente à imagem de micrografia óptica, com a vantagem de que a imagem SICM fornece informações com relação à altura do cristal, bem como as dimensões laterais. Desta forma, imagens de alta resolução utilizando SICM - *Hopping Mode* foram obtidas sobre um microcristal de calcita obtendo as seguintes dimensões ($14\ \mu\text{m} \times 14\ \mu\text{m} \times 6\ \mu\text{m}$).

3.5. Conclusões

Neste capítulo, a SICM foi utilizada para obtenção de imagens multidimensionais de alta resolução espacial de microscristais de calcita. SICM emprega nanopipetas de vidro como sondas sensíveis à detecção da distância *tip*/substrato sendo a fabricação das sondas considerada simples, rápida e de alta reprodutibilidade. Além disso, a modulação da distância utilizando i_{AC} como mecanismo de feedback pode ser considerada como uma metodologia estável de mapeamento por longos períodos de tempo. A varredura *Hopping Mode* se mostra bastante eficiente para obtenção de imagens em alta velocidade obtendo-se tempos consideráveis de mapeamento. Assim, uma das grandes vantagens dessa metodologia pôde ser demonstrada por imagens adquiridas sem que houvesse contato físico entre sonda e amostra. SICM, desta forma, pode ser considerada como uma metodologia viável e de simples instrumentação sendo possível obter imagens topográficas de amostras delicadas em ambientes fisiológicos.

Capítulo 4

Sondas multifuncionais ISME-SICM

**Determinação simultânea da topografia e fluxo de íons
cálcio em microcristais de calcita: um modelo para
investigações de dissolução ácida induzida**

4.1. Introdução

Quanto à pesquisa e o desenvolvimento de áreas voltadas para as ciências biológicas, há uma necessidade crescente de investigar e mapear eventos moleculares correlacionando múltiplos parâmetros (Beaulieu et al. 2011; Wilson and Johnson 2008). Desta forma, técnicas individuais podem ser combinadas formando técnicas híbridas capazes de obter simultaneamente o mapeamento topográfico e químico com alta resolução espacial e temporal de amostras biológicas. (Böcker et al. 2007) Existem várias técnicas híbridas as quais já foram implementadas em investigações relevantes com relação aos materiais biológicos como a AFM-SECM (Gardner et al. 2005; Salomo et al. 2010) e STM-SNOM (*Scanning Tunelling Microscopy - Near Field Optical Microscopy*), as quais requerem métodos sofisticados de fabricação, uma vez que a funcionalidade analítica do sensor está diretamente integrada à sonda (Cortés-Salazar et al. 2011; Wang, Kranz, and Mizaikoff 2008).

Uma abordagem utilizando capilares duplos de vidro (*theta-pipettes*) tem sido recentemente explorada na tentativa de se produzir sensores multifuncionais ISME-SICM, os quais podem ser fabricados em *Laser Micropipette Puller*. (Nadappuram et al. 2015) O canal SECM geralmente utiliza microeletrodos nos modos amperométricos e potenciométricos, os quais são responsáveis pela detecção das espécies químicas relativas à reatividade localizada da superfície. (Takahashi et al. 2011) Geralmente, a fabricação destes dispositivos se baseia na decomposição pirolítica de gás butano em um dos canais do capilar formando um microeletrodo de carbono. (Morris et al. 2013; Nadappuram et al. 2013) Em seguida, o preenchimento do segundo canal com solução eletrolítica possibilita a formação do canal SICM. A Figura 4.1 mostra uma representação esquemática de uma sonda multifuncional SECM-SICM, geralmente produzida com alta reprodutibilidade e diâmetro variando de 20 nm a 2 µm. (Morris et al. 2013; Takahashi et al. 2011)

Figura 4.1- Representação esquemática de um sensor multifuncional SECM-SICM para detecção simultânea da topografia e reatividade eletroquímica da superfície

Num primeiro momento, o canal SECM foi utilizado no modo amperométrico para obter informações químicas com respeito à reatividade de membranas PET, arranjos de microeletrodos, células (Yasukawa, Kaya, and Matsue 2000) e neurônios sensoriais (Happel et al. 2012) utilizando mediadores redox apropriados para cada tipo de substrato, enquanto SICM forneceu o mapa topográfico das superfícies em alta resolução espacial. (Takahashi et al. 2011). Em seguida, a modificação do canal SECM para formação de um sensor potenciométrico começou a ser explorada por alguns grupos de pesquisa. Neste caso, microeletrodos de antimônio, (Horrocks et al. 1993) microeletrodos de ouro modificados com filme de poli-anilina (PANi) (Morris et al. 2013) ou óxido de irídio depositado sobre microeletrodos de carbono (Nadappuram et al. 2013) foram fabricados para determinação do pH local de superfícies.

Assim, sensores ISMEs no estado sólido para detecção de íons H^+ são formados no canal SECM, os quais apresentam uma pequena e definida área geométrica e possibilitam medidas com elevada resolução espacial e temporal. A funcionalidade deste sensor multifuncional ISME-SICM foi demonstrada durante os experimentos de dissolução dos microcristais de calcita, onde mudanças no pH interfacial cristal-solução puderam ser observadas obtendo-se parâmetros cinéticos relacionados à dissolução dos microcristais. (Nadappuram et al. 2013)

A detecção potenciométrica empregando ISMEs não poderia ser apenas limitada à quantificação de íons H^+ . Desta forma, estudos relativos ao desenvolvimento de novos sensores multifuncionais empregando membrana líquida íon seletiva para formação do canal SECM atuando no modo potenciométrico têm sido bastante explorados (Bühlmann and Chen 2011). Como foi demonstrado no Capítulo 2, a utilização de ISMEs com membranas ionóforas possibilita o desenvolvimento de sensores com elevada seletividade, baixos limites de detecção (sub-micromolar) e estabilidade temporal (Ammann et al. 1987; Bühlmann and Chen 2011; Bühlmann et al. 1998; González et al. 2011). Se compararmos os modos amperométricos e potenciométricos em SECM, é importante ressaltar que enquanto o modo amperométrico baseia-se na interação do sistema com as espécies eletroativas geradas na ponta do microeletrodo, a detecção potenciométrica requer a existência de um perfil de concentração entre a superfície e o seio da solução, sendo a medida realizada de forma passiva (Wei et al. 1996). Desta forma, a detecção seletiva de íons denominados sinalizadores intra e extracelulares (K^+ , Ca^{2+} , Na^+ , Cl^-) tem possibilitado investigações de relevância clínica, ambiental, e biológica, onde perfis de atividade iônica podem ser monitorados. (Silver and Erecinska 1990; Smith et al. 1999; Tóth et al. 1995; Tsien and Rink 1980; Uitto et al. 2002; Wang and Bishop 2010; Wilson and Johnson 2008)

A miniaturização dos sensores ISME-SICM está limitada à estabilidade das medidas potenciométricas, uma vez que o pequeno tamanho das sondas contribui significativamente para o aumento da resistência do canal potenciométrico. (Wei et al. 1996; Yoon et al. 2007) Recentemente, a melhoria na estabilidade das medidas ISME foi obtida introduzindo-se um contato elétrico sólido diretamente na membrana ionófora (Gyetsvai et al. 2007). Desta forma, microfibras de carbono recobertas com polímero condutor (polipirrol, polianilina ou EDOT) podem ser utilizadas para a obtenção de medidas potenciométricas mais estáveis durante o mapeamento da superfície. (Chumbimuni-Torres et al. 2006; Guinovart et al. 2013)

Nesse contexto, o desenvolvimento de sensores ISME-SICM se mostra bastante relevante e desafiador em termos de fabricação de sondas para SEPM. Este capítulo mostra

os resultados referentes à fabricação e caracterização de um novo sensor multifuncional ISME-SICM e sua aplicação na investigação dos processos de dissolução de microcristais de calcita. Em particular, o processo de silanização de um dos microcanais do sensor e a utilização do contato elétrico sólido na canal ISME podem ser considerados como avanços significativos para o sucesso dessas medidas. (Chumbimuni-Torres et al. 2006)

Previamente, um dos microcanais foi silanizado e preenchido com membrana ionófora específica para quantificação de íons cálcio. O segundo canal SICM foi preenchido com solução de eletrólito suporte seguida da inserção do QRCE, formando assim o canal responsável pelo mapeamento da topografia superfície. Desta forma, o sensor multifuncional ISME-SICM foi utilizado no mapeamento de microcristais de calcita durante o processo de dissolução em meio neutro (pH 6,8) e sob condições de dissolução ácida induzida (McGeouch et al. 2012). Para isso, o canal SICM foi preenchido com solução eletrolítica ácida (pH 3,8) ocorrendo a liberação controlada e localizada de íons H^+ sobre a superfície do cristal induzindo a dissolução localizada do mesmo. Informações cinéticas foram extraídas com o auxílio de curvas de aproximação sobre a superfície do microcristal, e o uso de modelagem computacional utilizando *Finite Element Method* (FEM) permitiu obter informações com respeito aos fluxos de dissolução em meio ácido e neutro.

4.2. Objetivos

Os objetivos deste capítulo foram desenvolver uma metodologia viável de construção de microssensores multifuncinais ISME-SICM e através da dissolução de microcristais de calcita em solução eletrolítica criar um sistema dinâmico onde as mudanças topográficas e o perfil de concentração de íons cálcio ao redor do cristal pudessem ser monitorados simultaneamente. Assim, parâmetros analíticos foram primeiramente testados, como faixa linear, limite de detecção, tempo de resposta e estabilidade potenciométrica do canal ISME.

Além disso, a capacidade de liberação controlada e localizada de íons H^+ fornecido pelo canal SICM foi avaliada em experimentos de curva de aproximação realizados monitorando-se a concentração local de íons cálcio dissolvida do cristal. Finalmente, modelagem computacional foi utilizada na tentativa de comparar os dados teóricos e experimentais obtidos e dessa forma obter os parâmetros cinéticos de dissolução dos microcristais de calcita.

4.3. Parte Experimental

4.3.1. Reagentes

Cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio di-hidratado ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$), bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$), etanol (CH_3CH_2OH), diclorodimetilsilano ($(CH_3)_2SiCl_2$), N-(trimetilsilil)dimetilamina (TMSDMA), 4,3-etilenodioxitiofeno (EDOT), 1-butil-3-metilimidazoliumhexafluorophosphate ($BMIM^+ PF_6^-$), e membrana ionófora de cálcio (coquetel I - ETH1001) foram obtidos da Sigma-Aldrich. Ácido clorídrico (HCl), hidróxido de sódio (NaOH) e ácido sulfúrico (H_2SO_4) foram adquiridos da Fischer Química. Todas as soluções foram preparadas utilizando água Milli-Q (Millipore Corp.) com resistividade de ca. $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ a 25°C .

4.3.2. Instrumentação

O sensor foi montado sobre um posicionador piezoelétrico (P-611, 3S Nanocube), que por sua vez foi montado num microscópio óptico invertido (Axiovert 40 CFL, Zeiss). A corrente no canal SICM foi medida utilizando um conversor corrente-voltagem construído no

Warwick Electrochemistry and Interface Group (University of Warwick-United Kingdom). Um amplificador lock-in (SR830, Stanford Research Systems) foi usado para gerar o sinal oscilatório no sensor e em seguida determinar a amplitude e fase da corrente iônica alternada (i_{AC}) gerada. A gravação dos dados, bem como o controle posicional (x, y) e a voltagem aplicada no canal SICM foram realizados usando um programa LabVIEW desenvolvido pelo referido grupo de pesquisa (National Instruments, 2013) utilizando uma placa FPGA (7852R, National Instruments). Um *seguidor de voltagem* foi empregado incorporando um amplificador operacional LMP7721 (Texas Instruments Inc), com corrente de entrada de 3 fA e impedância de 8×10^{14} Ohms. Um amplificador SOIC-8 foi montado sobre uma placa de circuito impresso com base de PTFE para preservar a baixa corrente medida pelo dispositivo. Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas dentro de uma gaiola de Faraday com isolamento térmico.

4.3.3. Preparação dos microcristais de calcita

Os microcristais de calcita foram preparados utilizando o mesmo processo de precipitação descrito no capítulo anterior. O tempo de crescimento desta vez foi de 4 horas, formando-se microcristais com dimensões típicas de $25 \mu\text{m} \times 25 \mu\text{m}$ e 15-20 μm de altura. O mesmo procedimento de lavagem com água Milli-Q e secagem com um fluxo de gás nitrogênio foi realizado nos cristais. As amostras foram armazenados em local seco e utilizadas nos experimentos somente uma semana após o seu crescimento. (Archibald et al. 1996)

4.3.4. Preparação das sondas multifuncionais ISME-SICM

Os sensores ISME-SICM foram fabricados a partir de teta-capilares de vidro borosilicato (30-0114, Harvard Apparatus). Primeiramente, os capilares foram limpos por imersão em uma solução de H_2SO_4 1 mol L^{-1} durante 24 horas, seguido por uma lavagem com água e finalizando com etanol para remover completamente os traços de sujeira e ácido. (Cras et al. 1999) Em seguida, os capilares foram secos em forno durante 4 horas a 180°C e depois armazenados em recipientes hermeticamente fechados até a utilização. Os capilares limpos foram puxados no equipamento *Laser Micropipette Puller* (P-2000, Sutter Instruments) (Walsh et al. 2005), formando pontas com diâmetro total típico entre 1,5 e 3 μm utilizando um programa com os seguintes parâmetros:

Programa 1: Diâmetro total de 1,5 μm :

Linha 1: Heat 450, Fil 3 Vel 23, Del 150, Pul 30,

Linha 2: Heat 415, Fil 2 Vel 18, Del 150, Pul 50,

Linha 3: Heat 430, Fil 2 Vel 18, Del 135, Pul 40.

Programa 2: Diâmetro total de 3,0 μm :

Linha 1: Heat 460, Fil 3 Vel 23, Del 150, Pul 30,

Linha 2: Heat 415, Fil 2 Vel 18, Del 150, Pul 50,

Linha 3: Heat 440, Fil 2 Vel 18, Del 135, Pul 40.

Após o afinamento dos capilares, as pipetas foram caracterizadas com relação ao diâmetro, forma dos canais e semi-ângulo, utilizando imagens obtidas por SEM.

Para a fabricação de sensores ISME-SICM, foi necessário silanizar um dos canais do capilar duplo, para subsequente introdução da membrana seletiva para íons cálcio e fabricação do canal potenciométrico. Desta forma, a ponta do capilar duplo foi mantida verticalmente no centro de uma resistência elétrica circular aquecida a 200°C . Paralelamente, vapores de TMSDMA foram coletados com uma seringa de vidro (volume

total de 1 mL) e em seguida injetados no canal potenciométrico com o auxílio de uma seringa (Microfil 37G), enquanto se mantinha um fluxo constante de gás argônio (4 bar) pelo outro canal. (Munoz et al. 1983) Para completar o processo de silanização, os sensores foram colocados num forno a 120° C durante 1 hora. Em seguida, o canal não silanizado foi preenchido com solução de eletrólito e um QRCE foi inserido para obtenção das medidas SICM. O canal silanizado foi preenchido com membrana ionófora seletiva para a detecção de íons cálcio (coquetel I) e duas configurações de contato elétrico foram utilizadas. A Figura 4.2a mostra a representação esquemática do experimento, bem como o circuito elétrico simplificado empregado no sistema ISME-SICM. Na primeira configuração, mostrada na Figura 4.2b e denominada de contato elétrico convencional, o canal contendo a membrana foi preenchido com uma solução de CaCl_2 100 mmol L^{-1} e um $\text{Ag}|\text{AgCl}$ foi utilizado para completar o circuito. A Figura 4.2c mostra uma imagem do sensor obtida com um microscópio óptico. A segunda configuração utilizada, mostrada na Figura 4.2d e denominada de contato elétrico sólido, foi preparada a partir da eletropolimerização de EDOT sobre uma microfibras de carbono a qual foi diretamente inserida em contato com a membrana íon seletiva. A Figura 4.2e mostra uma imagem do sensor obtida com um microscópio óptico.

Figura 4.2 - (a) Representação esquemática do sensor multifuncional ISME-SICM e parte do circuito elétrico utilizado. b) Representação esquemática do sensor ISME-SICM empregando contato elétrico convencional. c) Micrografia óptica de um típico sensor ISME-SICM empregando contato elétrico líquido. d) Representação esquemática do sensor ISME-SICM empregando contato elétrico sólido. e) Micrografia óptica de um sensor ISME-SICM empregando contato elétrico sólido.

4.3.5. Protocolo de calibração do canal ISME para detecção de íons cálcio

Após o preparo dos sensores, estes foram condicionados em solução de $CaCl_2$ 50 mmol L⁻¹ por 24 horas. Após a estabilização do sensor, os mesmos foram calibrados antes e após os experimentos monitorando-se o potencial de circuito aberto entre o sensor ISME e o QRCE em solução de KCl 100 mmol L⁻¹ (pH 6,8) contendo quantidades variáveis de $CaCl_2$ entre 0,1 μmol L⁻¹ a 10 mmol L⁻¹.

4.3.6. Protocolo de medida ISME-SICM

O canal SICM foi usualmente preenchido com uma solução de KCl 100 mmol L⁻¹ (pH 6,8) ou com uma solução de KCl 100 mmol L⁻¹ contendo HCl 0,1 mmol L⁻¹ (pH 3,9). A distância *tip*/substrato foi controlada através da componente de corrente iônica alternada i_{AC} . Resumidamente, um potencial de 0,1 V foi aplicado entre os QRCEs situados dentro do canal SICM e no seio da solução para induzir uma corrente iônica i_{DC} entre eles. Paralelamente, o sensor foi oscilado normal à superfície numa frequência de 69,23 Hz com 200 nm de amplitude, pico a pico, gerando uma componente de corrente iônica alternada i_{AC} na corrente iônica i_{DC} quando o sensor foi posicionado próximo ao substrato de interesse (visualização feita com o auxílio de um microscópio invertido). Esta corrente iônica alternada i_{AC} foi usada como um sinal de realimentação (*loop feedback*) para detectar e controlar a separação entre a ponta do sensor e a superfície da amostra. A sonda foi aproximada da superfície até que a magnitude da corrente iônica alternada i_{AC} atingisse um valor de *set-point* equivalente ao raio do sensor. Em seguida, empregando o modo de varredura *hopping mode*, o sinal potenciométrico, i_{AC} , e as posições x , y e z foram usadas para monitorar simultaneamente a topografia e o perfil de dissolução dos íons cálcio provenientes do microcristal de calcita.

4.3.7. Modelagem Computacional

Um modelo em três dimensões denominado *Finite Element Method* (FEM) foi construído para simular a dissolução dos microcristais de calcita nas mesmas condições utilizadas nos experimentos práticos. Os parâmetros geométricos do cristal (xy) foram obtidos através de micrografia óptica da amostra, enquanto que a altura do cristal foi extraída a partir de curvas de aproximação SICM. Os parâmetros geométricos do sensor ISME-SICM foram obtidos através de imagens SEM. As simulações foram geradas no

programa Comsol Multiphysics (v4.4) usando uma estação de trabalho Dell Precision T3610 CTO Base, 64 GB de RAM, processador Intel® Xeon E5-1620 v2, com sistema operacional Windows 8.

4.3.7.1. Modelo de dissolução dos microcristais de calcita em meio neutro

Para este modelo, o efeito da presença da sonda sobre a dissolução do microcristal foi considerado negligenciável, uma vez que o canal SICM foi preenchido com a mesma solução encontrada em contato com o cristal (KCl 100 mmol L⁻¹ pH 6,8). Os módulos de transporte de espécies diluídas e de engenharia de reações químicas foram usados para caracterizar o perfil de difusão dos íons cálcio em todo o microcristal, sendo que somente a difusão rege o transporte iônico. Convecção e migração foram considerados negligenciáveis e, portanto, o fluxo de espécies i pode ser definido como:

$$J_i = -D_i \nabla c_i \quad \text{Equação 4.1}$$

onde: D_i e c_i representam o coeficiente de difusão e concentração das espécies i , respectivamente.

4.3.7.2. Modelo de dissolução dos microcristais de calcita em meio ácido

Neste modelo, a geometria do sensor ISME-SICM foi introduzida na simulação para estimar o efeito da dissolução induzida pelo ácido adicionado ao canal SICM sobre a superfície do cristal durante as curvas de aproximação. O canal ISME não foi simulado, uma vez que não se observa um efeito sobre a dissolução do cristal. Desta forma, o canal SICM contendo solução de KCl 100 mmol L⁻¹ + HCl 0,1 mmol L⁻¹ (pH 3,9) foi simulado perto da superfície do cristal. Os módulos de transporte de espécies diluídas, de engenharia de reações químicas e de corrente elétrica foram implementados considerando ambos efeitos

de difusão e migração sobre a concentração dos íons cálcio. O fluxo de espécies i é dado como:

$$J_i = -D_i \nabla c_i - z_i \frac{F}{RT} D_i c_i \nabla \phi \quad \text{Equação}$$

4.2

onde: D_i , z_i e c_i representam o coeficiente de difusão, carga e concentração das espécies i . F , R and T são constante de Faraday, constante dos gases e temperatura, respectivamente.

4.4. Resultados e Discussões dos resultados

4.4.1. Caracterização das sondas multifuncionais ISME-SICM utilizando SEM

A microfabricação de capilares de vidro com diferentes composições e configurações possibilitou a introdução de novos arranjos de sensores eletroquímicos para obtenção de imagens em alta resolução e em diferentes sistemas. Atualmente, vários tipos de capilares podem ser produzidos em vidro borossilicato, quartzo, pirex entre outros. Além disso, as diferentes configurações e arranjos destes capilares têm possibilitado sua utilização em diferentes áreas do conhecimento. A Figura 4.3 ilustra as diferentes formas na qual estes capilares podem ser fabricados com excelente qualidade e alta reprodutibilidade.

Figura 4.3 - Capilares de vidro produzidos em diferentes configurações (<http://www.hilgenberg-gmbh.de/en/products/glass-capillaries/>).

A Figura 4.4 mostra uma imagem SEM de um típico capilar duplo de vidro borossilicato afinado no equipamento *Laser Micropipette Puller* (programa 1 descrito anteriormente), formando dois canais semielípticos separados por um septo de vidro. A caracterização com relação aos parâmetros como semi-ângulos, comprimento e diâmetros podem ser obtidas através das imagens SEM, sendo necessária uma caracterização prévia dos dispositivos para utilização dos dados em simulação computacional e comparação com os dados experimentais (Walsh et al. 2005).

Figura 4.4 - Imagem SEM de um típico capilar duplo de vidro com dois canais semielípticos separados por um septo de vidro. Diâmetro total da sonda multifuncional ISME-SICM $d_i = 1,3 \mu\text{m}$.

Devido ao tamanho microscópico dos eletrodos potenciométricos, a impedância dos sensores ISME pode ser considerada muito alta, variando entre 10^7 a 10^9 ohms. Desta forma, qualquer corrente consumida pelo canal ISME para fazer uma medida de potencial de circuito aberto leva a um erro gerado pela queda de tensão devido à impedância deste microeletrodo. Para minimizar tais erros, a impedância efetiva de entrada do amplificador (*seguidor de voltagem*) deve ser muito mais elevada do que a impedância do eletrodo potenciométrico utilizado, de tal modo que o consumo de corrente de saída seja minimizado. Desta forma, medidas potenciométricas estáveis com sensores menores do que $1,5 \mu\text{m}$ de diâmetro total não foram obtidas, definindo-se este como o tamanho limite de miniaturização dos capilares duplos ISME-SICM.

4.4.2. Preparação das sondas multifuncionais ISME-SICM

A fabricação de sensores duplos ISME-SICM é um tanto quanto desafiadora, pois apenas um canal do sensor deve ser silanizado tornando-se hidrófobo o suficiente para manter a membrana ionófora ligada ao vidro. Além disso, é importante salientar que o fluxo de gás argônio através do canal SICM durante o procedimento de silanização impediu que o vapor de TMSDMA entrasse em contato com este canal. Nessa condição, o preenchimento do canal com solução de eletrólito foi feito de maneira fácil e sem que bolhas de ar fossem observadas no microscópio óptico.

4.4.3. Calibração das sondas multifuncionais ISME-SICM

A resposta potenciométrica do canal ISME utilizando contato elétrico convencional foi verificada através de curvas de calibração empregando solução de eletrólito KCl 100 mmol L⁻¹, pH = 6,8 e variando a concentração de CaCl₂ de 0,1 μmol L⁻¹ a 10 mmol L⁻¹ ($2 \leq \text{pCa}^{2+} \leq 7$, onde $\text{pCa}^{2+} = -\log [\text{Ca}^{2+}]$). Uma resposta nernstiana correlacionando o potencial de circuito aberto (mV) e pCa^{2+} é esperada para este tipo de sensor. A Figura 4.5a exibe curvas de calibração obtidas durante 3 dias consecutivos para um sensor ISME-SICM, onde nenhuma mudança significativa do coeficiente angular foi observado (31 mV para cada unidade de pCa^{2+}), demonstrando a boa estabilidade do sensor. Vale salientar que enquanto o sensor não estava sendo utilizado nos experimentos, o mesmo foi mantido numa solução de CaCl₂ 50 mmol L⁻¹ em posição vertical, o que estendeu a sua vida útil para vários dias após a primeira calibração (Guinovart et al. 2013).

Figure 4.5 - Sensor ISME-SICM utilizando contato elétrico convencional. a) Curva de calibração obtida durante 3 dias consecutivos. b) Estabilidade do sensor em solução de CaCl_2 $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ + KCl 100 mmol L^{-1} pH 6,8 ($p\text{Ca}^{2+} = 4$). c) Curvas de calibração para íons Ca^{2+} em solução de KCl 100 mmol L^{-1} pH 6,8 aplicando diferentes potenciais no canal SICM. Diâmetro da sonda ISME-SICM $d_t = 1,3 \mu\text{m}$

Enquanto a espessura da membrana ionófora não tem qualquer efeito direto sobre a seletividade e o tempo de resposta do sensor potenciométrico, membranas mais finas podem aumentar o fluxo iônico na membrana e interferir no limite de detecção do

sensor. Assim, uma altura típica de membrana de 300 - 500 μm foi empregada proporcionando um limite de detecção de 0,3 μM de íons Ca^{2+} em solução de KCl 100 mmol L^{-1} em pH 6,8. A estabilidade da medida potenciométrica empregando o sensor multifuncional ISME-SICM com contato elétrico convencional foi investigada utilizando uma solução CaCl_2 0,1 mmol L^{-1} + KCl 100 mmol L^{-1} em pH 6,8 ($\text{pCa}^{2+} = 4$). Pode-se observar na Figura 4.5b que o valor de potencial medido sofreu desvios durante o experimento, mas retornou ao valor inicial após 70 min. Este desvio pode ser explicado devido às diferenças de pressão osmótica na membrana ionófora e também devido à evaporação da solução de preenchimento (100 mmol L^{-1} CaCl_2) situada no interior do canal ISME.

A influência da polarização aplicada no canal SICM sobre a resposta potenciométrica do canal ISME também foi investigada. A Figura 4.5c mostra diferentes curvas de calibração obtidas aplicando diferentes potenciais entre os QRCEs situados na solução contendo eletrólito e no canal SICM. Uma mudança de 0,1 V na magnitude do potencial de circuito aberto foi observada para cada aumento de 0,1 V aplicado no canal SICM. No entanto, as inclinações das curvas de calibração mantiveram-se estáveis (30 mV dec^{-1}), indicando que o desempenho do sensor ISME não foi afetado pela mudança na polarização aplicada no canal SICM. Desta forma, um potencial de 0,1 V aplicado entre os QRCEs localizado na solução e no canal SICM foi escolhido para realizar todos os experimentos seguintes.

4.4.4. Preparação do contato elétrico sólido no canal ISME utilizando polímero condutor EDOT

Embora sejam muito utilizados devido à facilidade de preparo e versatilidade, sensores potenciométricos utilizando contato elétrico convencional mostraram algumas limitações experimentais associadas ao seu desempenho e estabilidade. Desta forma, o desenvolvimento de sensores potenciométricos empregando contato elétrico sólido tem sido

amplamente utilizado como uma alternativa conveniente para a obtenção de medidas potenciométricas mais estáveis. Assim, polímeros contendo ligações π -conjugadas são de especial interesse no desenvolvimento de contatos elétricos sólidos devido à sua elevada condutividade, reversibilidade eletroquímica, estabilidade e elevada atividade catalítica (Chumbimuni-Torres et al. 2006; Sundfors et al. 2006). Diferentes polímeros condutores têm sido utilizados como contato elétrico sólido como, por exemplo, polianilina, polipirrol, politiofeno, e poli(3,4-etilenodioxitiofeno) (EDOT). (Gyvetvai et al. 2007) Brevemente, a preparação do contato elétrico sólido consistiu na utilização de uma microfibras de carbono (6 μm de diâmetro), a qual foi conectada a um fino fio de cobre utilizando cola de prata. Uma solução de EDOT 0,1 mol L⁻¹ foi preparada utilizando o líquido iônico BMIM⁺ PF₆⁻ como solvente. O oxigênio da solução foi previamente removido purgando gás N₂ por 10 minutos. A fibra de carbono, eletrodo de trabalho, foi mergulhada nesta solução e um fio de platina foi utilizado como contra eletrodo. Voltametria cíclica foi empregada para a eletropolimerização de EDOT sobre a microfibras de carbono em um intervalo de potencial de -0,9 a 1,3 V com velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹, como mostrado na Figura 4.6.

Figura 4.6 - Preparação do contato elétrico sólido. a) Voltamogramas cíclicos registrados durante a eletropolimerização de EDOT sobre microfibras de carbono b) Voltamogramas cíclicos registrados durante a dopagem de PEDOT em líquido iônico $\text{BMIM}^+ \text{PF}_6^-$, c) Voltamogramas cíclicos de PEDOT dopado em solução KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$. d) Micrografia óptica de uma microfibras de carbono revestida com PEDOT.

A Figura 4.7 mostra uma representação esquemática do processo de eletropolimerização de EDOT utilizando líquido iônico como solvente.

Figura 4.7 - Eletropolimerização de EDOT sobre microfibras de carbono em líquido iônico.

A dopagem do revestimento foi realizada em líquido iônico $\text{BMIM}^+ \text{PF}_6^-$ através de 10 ciclos voltamétricos no intervalo de -0,9 a 0,8 V, como pode ser observado na Figura 4.6b. Este procedimento serve para organizar as camadas de PEDOT sobre a microfibras de carbono. Finalmente, a camada de polímero condutor (PEDOT) foi testada em solução de KCl 0,1 mol L⁻¹ com 5 voltamogramas cíclicos no intervalo de -0,4 a 0,5 V, como pode ser observado na Figura 4.6c. Por fim, a Figura 4.6d mostra uma micrografia óptica da camada de PEDOT eletropolimerizada sobre a microfibras de carbono.

A microfibras de carbono revestida com o polímero condutor foi diretamente inserida no canal ISME em contato com a membrana ionófora (ver Figura 4.2d na seção experimental). Curvas de calibração foram obtidas para este novo tipo de sensor, que funciona exatamente da mesma forma como nos sensores preparados com contato elétrico convencional. Uma resposta nernstiana foi obtida correlacionando o potencial de circuito aberto (mV) e pCa^{2+} , com uma mudança de 39 mV para cada unidade de pCa^{2+} , como representado na Figura 4.8. A estabilidade da medida potenciométrica foi também avaliada resultando num desvio de 0,04 mV·min⁻¹ (*inset* da Figura 4.8). A maior estabilidade das medidas potenciométricas quando comparadas com o sensor utilizando contato elétrico convencional pode ser explicada devido à inserção direta do polímero condutor na membrana íon seletiva. Este contato entre membrana e polímero condutor aumenta significativamente a capacitância interfacial entre os dois materiais, fazendo com que essa interface não seja susceptível à polarização. (Ammann et al. 1987; Buhrer and Gehrto 1988)

Figura 4.8 - Curva de calibração usando sensor multifuncional ISME-SICM com contato elétrico sólido PEDOT em soluções de CaCl_2 , entre $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ e 10 mmol L^{-1} ($\text{pCa}^{2+} = 7$ e $\text{pCa}^{2+} = 2$, respectivamente) em solução de $\text{KCl } 100 \text{ mmol L}^{-1}$ pH 6,8. Inset: estabilidade potenciométrica do sensor utilizando solução de $\text{CaCl}_2 \text{ } 0,01 \text{ mmol L}^{-1}$ ($\text{pCa}^{2+} = 5$) em solução de $\text{KCl } 100 \text{ mmol L}^{-1}$ pH 6,8. Diâmetro da sonda ISME-SICM $d_i = 3 \mu\text{m}$

4.4.5. Avaliação do tempo de resposta do canal ISME durante curvas de aproximação

O tempo de resposta do sensor multifuncional ISME-SICM foi investigado através de curvas de aproximação sobre um microcristal de calcita utilizando diferentes velocidades (v_{app}), que variaram de $0,1$ a $8 \mu\text{m s}^{-1}$. A Figura 4.9a mostra o sinal de corrente i_{DC} monitorado pelo canal SICM durante as aproximações sobre o microcristal de calcita. Pode-se observar que nenhuma variação significativa na corrente i_{DC} foi observada à medida que a velocidade de aproximação foi alterada. É possível apenas notar que o sinal de corrente i_{DC} tornou-se mais ruidoso quando a curva de aproximação foi feita com velocidades de varredura mais baixas. Em contraste, a Figura 4.9b mostra o sinal potenciométrico registrado pelo canal ISME, o qual monitora a concentração de íons Ca^{2+} proveniente da dissolução do microcristal de calcita em solução de $\text{KCl } 100 \text{ mmol L}^{-1}$, pH 6,8. Como pode ser observado, à medida que se aumentou a velocidade de aproximação ($v_{\text{app}} > 2,0 \mu\text{m s}^{-1}$) houve uma perda significativa de sinal potenciométrico referente à

concentração de íons cálcio. Desta forma, estabeleceu-se um limite de velocidade de aproximação de no máximo $1 \mu\text{m s}^{-1}$ para a realização dos experimentos seguintes.

Figura 4.9 - a) resposta SICM e b) resposta ISME para curvas de aproximação sobre um microcristal de calcita usando sensor ISME-SICM com velocidades de 0,2; 0,8; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 $\mu\text{m s}^{-1}$ em solução de KCl 100 mmol L^{-1} pH 6,8. Diâmetro da sonda ISME-SICM $d_t = 1,3 \mu\text{m}$

4.4.6. Estudo da dissolução ácida de microcristais de calcita utilizando sondas multifuncionais ISME-SICM

A introdução de reagentes no canal SICM é uma alternativa bastante interessante para a investigação da dissolução ácida dos microcristais de calcita devido à adição localizada de certa quantidade de íons H^+ sobre a superfície do microcristal e subsequente quantificação de íons cálcio pelo canal ISME. Desta forma, dois sensores ISME-SICM foram utilizados, sendo que no canal SICM foram adicionadas duas soluções diferentes. No primeiro sensor foi adicionada uma solução de KCl 100 mmol L^{-1} , pH 6,8, como utilizado anteriormente. Já no segundo sensor, o canal SICM foi preenchido com solução de HCl $0,1\text{ mmol L}^{-1}$ + KCl 100 mmol L^{-1} pH 3,9. Um potencial de 0,1 V foi aplicado entre os eletrodos de referência situados dentro do canal SICM e na solução de KCl 100 mmol L^{-1} pH 6,8 utilizada como eletrólito suporte. As comparações entre *tip* ácida e *tip* neutra são mostradas na Figura 4.10 em vermelho e preto, respectivamente.

Figura 4.10 - Sensores ISME-SICM com canal SICM neutro (linha preta) e canal SICM ácido (linha vermelha). a) Curvas de calibração, b) Curvas de aproximação sobre microcristal de calcita e c) Curvas de aproximação sobre superfície de vidro longe de qualquer cristal. Diâmetro da sonda ISME-SICM $d_1 = 1,3 \mu\text{m}$

Primeiramente, curvas de calibração foram obtidas para cada tipo de sensor investigando-se a influência do pH do canal SICM sobre a detecção potenciométrica de íons Ca^{2+} no canal ISME. A Figura 4.10a mostra ambas as curvas de calibração para o sensor neutro representado em preto e para o sensor contendo solução ácida em vermelho. Pode-se observar uma pequena variação na inclinação das curvas de calibração assim como na magnitude do potencial de circuito aberto medida para cada solução. Em seguida, curvas de aproximação sobre um microcristal de calcita foram obtidas utilizando ambos os microsensores. A Figura 4.10b mostra a resposta potenciométrica obtida durante este procedimento, onde ambas as curvas iniciam-se a 20 μm de distância da superfície do microcristal. A curva em preto representa a curva de aproximação utilizando o sensor contendo apenas solução de KCl 100 mmol L^{-1} pH 6,8 no canal SICM, enquanto a curva em vermelho representa a curva de aproximação obtida para o sensor contendo solução de HCl 0,1 mmol L^{-1} + KCl 100 mmol L^{-1} pH 3,9 no canal SICM. Pode-se observar um aumento mais pronunciado na concentração de íons cálcio quando a aproximação foi feita utilizando o sensor contendo solução ácida. Este comportamento se deve à ejeção de prótons de dentro do canal SICM em direção à superfície do microcristal, induzindo a dissolução ácida do mesmo, de acordo com a Equação 4.3.

Portanto, esta dissolução induzida do microcristal origina a formação de íons cálcio, os quais difundem para o seio da solução e são detectados mesmo em longas distâncias (McGeouch et al. 2010). Além disso, para o sensor contendo ácido no canal SICM, a concentração de íons cálcio perto da superfície do microcristal quase duplica em comparação com a aproximação feita quando o sensor utilizado possuía apenas solução de eletrólito KCl 100 mmol L^{-1} pH 6,8 (considere a distância tip/substrato de aproximadamente 300 nm definido pelo *setpoint* (i_{AC})). Este aumento parece pequeno em comparação com a diferença de pH existente entre os dois sensores utilizados. Desta forma, modelagem

computacional foi utilizada para o entendimento deste comportamento (como mostra a seção 4.4.7 a seguir). Adicionalmente, curvas de aproximação utilizando ambos os sensores foram feitas sobre um substrato inerte de vidro longe de qualquer microcristal de calcita. A Figura 4.10c mostra ambas as curvas de aproximação para o sensor neutro, linha preta, e sensor ácido, linha vermelha e, como pode ser observado, uma concentração de íons cálcio de aproximadamente 0,3 µM foi detectada durante ambas as aproximações, sendo este o limite de detecção do sensor potenciométrico utilizado.

4.4.7. Finite element method FEM

A dissolução dos microcristais de calcita é fortemente dependente do pH e ocorre de acordo com as reações mostradas pelas equações a seguir:

A composição da solução utilizada nos experimentos foi calculada usando o programa MINEQL⁺ (software de modelagem em equilíbrio químico, versão 4.6), utilizando as constantes de dissociação e de equilíbrio corrigidas. Os equilíbrios descritos na Tabela 4.1 foram aplicados no modelo e descrevem a dissolução dos microcristais de calcita em solução aquosa de carbonato de cálcio aberto para a atmosfera.

Tabela 4.1 - Dados para o equilíbrio do sistema calcita- H_2O .

Equação	Reação	pK
4.7	$CO_2 + H_2O \leftrightarrow H_2CO_3$	1,466
4.8	$H_2CO_3 \leftrightarrow H^+ + HCO_3^-$	6,351
4.9	$HCO_3^- \leftrightarrow H^+ + CO_3^{2-}$	10,330
4.10	$CaCO_3 \leftrightarrow Ca^{2+} + CO_3^{2-}$	3,2
4.11	$H_2O \leftrightarrow H^+ + OH^-$	13,997

Os coeficientes de difusão das espécies utilizadas no modelo simulado estão apresentados na Tabela 4.2 e são considerados constantes no modelo utilizado. As simulações foram construídas utilizando o programa Comsol Multiphysics (versão 4.4).

Tabela 4.2 - Lista dos coeficientes de difusão das espécies utilizadas no modelo FEM.

Espécies	Ca^{2+}	H^+	OH^-	K^+	Cl^-	H_2CO_3	HCO_3^-	CO_3^{2-}
Coeficiente de difusão $\times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$	0,792	9,311	5,273	1,957	2,032	1,185	1,185	0,932

4.4.7.1. Dissolução dos microcristais de calcita em meio neutro

Um modelo 3D FEM que pudesse reproduzir a geometria do microcristal de calcita em solução aquosa foi desenhado conforme a Figura 4.11 e implementando os equilíbrios da Tabela 4.1.

Figura 4.11 - Representação esquemática do modelo geométrico FEM, representando o microcristal de calcita em solução de eletrólito. Cada número representa a condição de contorno utilizada na modelagem de acordo com a Tabela 4.3.

Os módulos de transporte de espécies diluídas e de engenharia de reações químicas foram usados pra construir um método numérico. Assim, sobre as condições do experimento (pH 6,8), o processo de dissolução descrito pela equação 4.6 é dominante. O efeito do sensor ISME-SICM na dissolução do microcristal não foi incluído no modelo. As condições de contorno de 1-5 representam o seio da solução, enquanto que a condição de contorno 6 representa a superfície não reativa do vidro. As condições de contorno de 7-11 representam as faces do microcristal de calcita a qual se dissolve na forma de íons Ca^{2+} e HCO_3^- e OH^- . Todas as condições de contorno estão descritas na Tabela 4.3. Neste modelo, o transporte iônico das espécies foi governado somente pela difusão seguindo a primeira lei de Fick. Portanto, o fluxo difusional das espécies i é dado pela equação 4.1. (Arvidson et al. 2003; Nadappuram et al. 2013)

Tabela 4.3 - Condições de contorno aplicadas na modelagem da dissolução do microcristal de calcita em pH 6,8.

Condições de contorno	Equação
1-5	$C_i = C_{0,i}$
6	$J_i = 0$
7-11	$n.(D_{Ca^{2+}} \nabla C_{Ca^{2+}}) = J_{surf}$
	$n.(D_{HCO_3^-} \nabla C_{HCO_3^-}) = J_{surf}$
	$n.(D_{OH^-} \nabla C_{OH^-}) = J_{surf}$

A dissolução do microcristal de calcita começa imediatamente após a superfície do cristal entrar em contato com o meio aquoso. Desta forma, atinge-se o estado estacionário de acordo com a equação 4.6, com consequente elevação do pH na interface cristal/solução devido à produção localizada de íons hidroxila (OH^-). Em artigo publicado em 2013, Binoy P. Nadappuram e colaboradores (Nadappuram et al. 2013) descrevem a fabricação de um sensor multifuncional pH-SICM e utilização para obtenção de medidas de alta resolução com relação à topografia de um microcristal calcita e o pH local da superfície durante o processo de dissolução em solução KCl 100 mmol L⁻¹ pH 6,8. Assim, valores da constante de dissolução foram estimados e comparados com valores encontrados no modelo tridimensional simulado por FEM. O pH interfacial de 7,9 foi detectado experimentalmente pelo sensor, o qual foi comparado com os dados obtidos na modelagem computacional, sendo esses concordantes entre si. Desta forma, o mapa do pH corresponde a uma dissolução do cristal com um fluxo interfacial de $1,6 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$, o que corresponde a valores cinéticos encontrados na literatura utilizando outras metodologias.

De maneira semelhante, neste trabalho o perfil de difusão dos íons cálcio e o pH interfacial foram modelados por FEM e aplicando-se diferentes valores de constante de fluxo interfacial utilizando um microcristal de calcita (25 μm x 25 μm x 18 μm) em solução de KCl

100 mmol L⁻¹ pH 6,8 . Mapas típicos de perfis de difusão 2D ($x - z$) podem ser obtidos, onde se mostra o perfil de concentração de íons cálcio e o pH ao redor do microscristal, nas Figuras 4.12a e b, respectivamente.

Figura 4.12 - Perfis de concentração simulados de íons cálcio (a) e pH interfacial (b) ao redor de um microcristal de calcita em processo de dissolução em solução de KCl 100 mmol L⁻¹ pH 6,8.

A Figura 4.13 mostra a relação entre a concentração de íons cálcio simulada numa distância de 300 nm da superfície do cristal (valor estimado de acordo com o valor de *setpoint* utilizado nas aproximações SICM) e os diferentes valores de constante de fluxo interfacial.

Figura 4.13 - Concentração simulados de íons cálcio a 300 nm de distância da superfície de microcristal de calcita em função de diferentes valores de fluxo interfacial J_{surf} em condições de meio neutro.

Considerando a concentração de íons cálcio monitorada durante a curva de aproximação obtida para o sensor neutro ISME-SICM sobre a superfície do microcristal (Figura 4.10b - linha preta), a concentração experimental de íons cálcio encontrada a 300 nm de distância da superfície do cristal foi de $33,0 \pm 0,2 \mu\text{mol L}^{-1}$, o que nos fornece uma constante de fluxo interfacial de $2,82 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$, valor este que está em concordância com dados obtidos pela literatura.

4.4.7.2. Dissolução dos microcristais de calcita em meio ácido

Um modelo 3D FEM foi construído na tentativa de reproduzir a geometria do microcristal de calcita sob influência do canal SICM com geometria de 750 nm de raio e semi-ângulo no valor de 6° em solução de KCl 100 mmol L^{-1} pH 6,8. A solução no interior do canal SICM foi modelada como HCl 0,1 mmol L^{-1} + KCl 100 mmol L^{-1} pH 3,9, enquanto que o canal ISME foi considerado não reativo sobre a dissolução do microcristal de calcita. Simulações foram construídas usando os módulos de transporte de espécies diluídas, de engenharia de reações químicas e de corrente elétrica. Sobre condições ácidas, a dissolução dos microcristais de calcita é dominada pela reação representada na equação 4.4. Na Figura 4.14, as condições de contorno de 1-5 representam o seio da solução eletrolítica, a condição de contorno 6 representa a superfície não reativa de vidro, a condição de contorno 7 representa a superfície do microcristal de calcita, as condições de contorno 8 e 9 representam o canal SICM e ISME, respectivamente e a condição de contorno 10 representa o potencial de 0,1 V aplicado entre os QRCEs.

Figura 4.14 - Representação esquemática do modelo geométrico FEM, representando o microcristal de calcita e sensor ISME-SICM em solução de eletrólito. Os números das diferentes faces representam as condições de contorno na modelagem, sendo que o canal ISME foi desconsiderado. Veja Tabela 4.4 para condições de contorno. Diâmetro da sonda ISME-SICM $d_i = 3 \mu\text{m}$

Todas as condições de contorno para o modelo de dissolução ácida dos microcristais de calcita estão listadas na Tabela 4.4.

Tabela 4.4: Condições de contorno aplicada na modelagem da dissolução ácida dos microcristais de calcita.

Condições de contorno	Equação
1-5	$c_i = c_{0,i}$
6	$J_i = 0$
7	$n.(D_{Ca^{2+}} \nabla c_{Ca^{2+}}) = J_{surf}$ $n.(D_{HCO_3^-} \nabla c_{HCO_3^-}) = J_{surf}$ $n.(D_{OH^-} \nabla c_{OH^-}) = J_{surf}$
8-9	SICM-ISME
10	$E = 0,1 \text{ V}$ $c_i = c_{0,i}$

O transporte iônico neste modelo foi governado pela difusão e migração, onde o fluxo pode ser representado pela equação 4.2. O fluxo de dissolução interfacial dos microcristais de calcita em $\text{pH} = 6,8$ obtido na modelagem anterior foi utilizado na modelagem de dissolução ácida utilizando o canal SICM como fonte geradora de prótons, o qual dissolve microcristal a cada aproximação sobre sua superfície. Desta forma, a constante obtida foi utilizada para atingir um perfil de difusão no estado estacionário ao redor do cristal para que dessa forma fosse aplicado o modelo de dissolução induzida por ácido. Assim, mapas típicos de perfis de difusão 2D ($x - z$) podem ser obtidos mostrando o pH e a concentração de íons cálcio ao redor do cristal e no interior do canal SICM, como mostrado na Figura 4.15 a e b, respectivamente.

Figura 4.15 - pH interfacial (a) e perfis de concentração de íons cálcio (b) ao redor de um microcristal de calcita e dentro do canal SICM. Diâmetro da sonda ISME-SICM $d_i = 3 \mu\text{m}$

Como pode ser observado na Figura 4.15a, íons H^+ no canal SICM difundem para o seio da solução, ocorrendo uma queda de concentração de 92% a partir da concentração inicial de $\text{HCl } 0,1 \text{ mmol L}^{-1} + \text{KCl } 100 \text{ mmol L}^{-1}$. Assim, é possível observar a criação de um gradiente de concentração de prótons H^+ dentro do canal SICM, sendo que o valor de pH na abertura da pipeta aumenta de 3,9 para 5,0. Essa concentração de íons H^+ é suficiente para dissolver o cristal ejetando íons cálcio para o seio da solução.

A concentração de íons cálcio também pode ser estimada, como mostra a Figura 4.15b, uma vez que íons cálcio difundem para o seio da solução em direção ao sensor ISME-SICM. Assim, pode-se afirmar que a concentração local de íons cálcio foi medida pelo canal ISME a cada aproximação em direção ao cristal. Essa ejeção de íons cálcio em direção ao sensor ISME-SICM também pode ser evidenciada analisando o sinal de corrente iônica (i_{DC}) durante os experimentos de curva de aproximação sobre o microcristal de calcita utilizando os sensores ISME-SICM com canal SICM neutro e ácido. A Figura 4.16 mostra uma diferença de 10% na corrente iônica (i_{DC}) monitorada pelo canal SICM ácido (linha vermelha) e canal SICM neutro (linha preta) durante as aproximações sobre a superfície do microcristal. Esta pequena diferença na i_{DC} sugere um pequeno aumento da condutividade iônica local em virtude da dissolução ácida do microcristal de calcita de acordo com as equações 4.4, 4.5 e 4.6.

Figura 4.16- Curvas de aproximação monitorando i_{DC} utilizando sensores ISME-SICM canal neutro (linha preta) e canal ácido (linha vermelha) sobre um microcristal de calcita. Diâmetro da sonda ISME-SICM $d_i = 1,3 \mu m$

A Figura 4.17 mostra a relação entre a concentração de íons cálcio simulada a 700 nm da superfície do cristal (valor estimado de acordo com o valor de *setpoint* utilizado nas aproximações SICM) utilizando sensor ISME-SICM ($d_i = 3 \mu m$) com canal SICM ácido e o fluxo interfacial $J_{Ca^{2+}}$, o qual é diretamente proporcional à concentração local de íons H^+ :

$$J_{Ca^{2+}} = k_0[H^+]$$

Equação 4.12

Figura 4.17 - Concentração simulada de íons cálcio a 700 nm de distância da superfície de microcristal de calcita em função de diferentes valores de fluxo interfacial J_{surf} .

De acordo com a curva de aproximação utilizando sensor ISME-SICM com canal SICM ácido, Figura 4.10b (linha vermelha), detectou-se experimentalmente a concentração interfacial de íons cálcio de $66,0 \pm 0,2 \mu\text{mol L}^{-1}$. Assim, um fluxo interfacial $J_{surf} = 1,88 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ foi encontrado para a dissolução do microcristal de calcita induzida por ácido, sendo que os dados corroboram os resultados encontrados na literatura (Arvidson et al. 2003).

4.4.8. Imagem do microcristal de calcita utilizando sondas multifuncionais ISME-SICM

A dissolução dos microcristais de calcita é um processo dinâmico que ocorre em uma interface do tipo sólido/líquido alterando simultaneamente a topografia do cristal e a

concentração iônica local. (Jones et al. 2003) Neste trabalho, foi desenvolvido um sensor ISME-SICM capaz de monitorar simultaneamente a distância *tip*/substrato e a concentração local de íons cálcio sendo, portanto, a dissolução ácida do microcristais de calcita um bom sistema para testar essa nova ferramenta de análise multifuncional. Desta forma, utilizando a modulação da corrente iônica alternada i_{AC} no canal SICM combinada com o monitoramento potenciométrico da concentração local de íons cálcio pelo canal ISME, imagens de um microcristal de calcita foram obtidas com considerável resolução espacial e temporal. Desta forma, um sensor ISME-SICM utilizando contato elétrico sólido no canal ISME e canal SICM ácido foi utilizado nos experimentos para obtenção de imagens no modo de varredura *Hopping Mode* sobre um microcristal de calcita em solução KCl 100 mmol L⁻¹ em pH 6,8. Para isso, o sensor foi oscilado a 200 nm pico a pico, gerando uma componente de corrente iônica alternada i_{AC} . Essa foi usada para controlar a distância *tip*/substrato através de um mecanismo de *feedback*, definindo um valor de *set point* que equivale a uma distância de 700 nm de distância do substrato. Portanto, para a obtenção das imagens, o sensor ISME-SICM aproximou-se da amostra numa velocidade de 0,6 μm s⁻¹ (v_{app}) até que o valor de *set point* fosse atingido, sendo os valores do eixo Z_{final} e o potencial de circuito aberto medidos simultaneamente pelo equipamento. Em seguida, o sistema piezoelétrico afastou-se 20 μm ($-Z_{app}$) com relação ao valor mais próximo da superfície do substrato, moveu-se a sonda lateralmente em 5 μm ($Step_{x,y}$) a uma velocidade de 4 μm s⁻¹ (v_{step}) e iniciou-se uma nova aproximação em direção ao substrato, até que completasse uma imagem com área de 50 x 50 μm².

Uma imagem de microscopia ótica de um típico microcristal de calcita em solução KCl 100 mmol L⁻¹ em pH 6,8 está mostrada na Figura 4.18a e o correspondente mapa topográfico e o perfil de concentração de íons cálcio são mostrados na Figura 4.18b e 4.18c, respectivamente.

Figura 4.18 - a) Micrografia óptica b) mapa topográfico c) perfil de concentração de íons cálcio sob condições de dissolução ácida utilizando o modo de varredura Hopping Mode. Diâmetro da sonda ISME-SICM $d_1 = 3 \mu\text{m}$. $v_{app} = 1,5 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$, $-Z_{app} = -20 \mu\text{m}$, $\text{Step}_{x,y} = 5 \mu\text{m}$.

Como pode ser observado, a topografia observada na imagem SICM (Figura 4.17b) equivale à imagem de microscopia óptica mostrada na Figura 4.18a, mas a imagem SICM apresenta como principal vantagem a informação sobre a altura do microcristal de calcita, que neste caso variou ao redor de $14 \mu\text{m}$. O mapa de concentração de íons cálcio sobre condições de dissolução ácida induzida mostra um aumento significativo de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ (a

15 μm da superfície do cristal) para valores superiores a 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$ sobre a superfície de calcita (a 700 nm da superfície do cristal), mostrando dessa forma que a cada aproximação do cristal a dissolução do mesmo acontecia em virtude do ataque ácido proveniente do canal SICM. Além disso, é importante mencionar que a cada aproximação feita no cristal, os valores de concentração de íons cálcio medidos pelo canal ISME diferiam entre si, indicando assim regiões mais susceptíveis à dissolução ácida muito provavelmente devido à formação de pequenos pits.

4.5. Conclusões

Os resultados apresentados neste capítulo mostraram o procedimento de fabricação e utilização de uma nova sonda multifuncional ISME-SICM. A caracterização deste sensor quanto a estabilidade, faixa linear, limite de detecção, comportamento em diferentes meios eletrolíticos e resolução temporal foram avaliados visando a obtenção de informações confiáveis e imagens altamente resolvidas espacialmente. Desta forma, medidas *in situ* de processos dinâmicos envolvendo a dissolução localizada do microcristais de calcita em ambientes neutros e ácidos foram realizadas. A partir dos resultados obtidos, foi possível concluir que os microcristais de calcita podem ser considerados como um bom modelo para medidas simultâneas da topografia e de perfil de concentração de íons cálcio durante o processo de dissolução. Os resultados obtidos são consistentes com os valores obtidos pela simulação FEM. Desta forma, o sensor pode ser empregado com sucesso em investigações utilizando amostras de materiais dentários com o objetivo de monitorar a erosão dentária e desenvolver novos tratamento odontológicos. Além disso, o sensor desenvolvido pode ser utilizado para detecção de diferentes íons (canal ISME) apenas mudando a membrana ionófora.

Capítulo 5

Considerações Finais e Perspectivas

- Microeletrodos de platina e outros metais como ouro e cobre são frequentemente fabricados utilizando o procedimento desenvolvido e apresentado no Capítulo 1 desta tese. Assim, microeletrodos são aplicados como sensores em determinações analíticas e como *tip* em SECM pelo nosso grupo de pesquisa.
- Microeletrodos também têm sido recentemente fabricados por nosso grupo de pesquisa com o equipamento *Laser Micropipette Puller*, o que possibilita a obtenção de sensores com raios significativamente menores (da ordem de 300-400 nm) com os quais aumenta-se a resolução espacial das imagens SECM. Além disso, o módulo *shear force* foi recentemente adquirido e consequentemente imagens da reatividade local do substrato podem ser obtidas sem que haja influência da topografia.
- SECM se mostra uma técnica bastante apropriada para investigações relacionadas às alterações de topografia do esmalte dentário após erosão ácida, sendo a preparação da amostra considerada simples se comparada com técnicas como SEM, AFM e profilometria, as quais são geralmente utilizadas.
- Imagens SECM com relação à permeação de espécies eletroativas através de materiais porosos foram obtidas neste trabalho. No que diz respeito à dentina, podemos inferir que o tratamento caseiro utilizando pasta de dente com princípio ativo de precipitação e bloqueio dos túbulos pode ser considerado eficiente. Como perspectiva para esta linha de pesquisa, pode-se estudar tanto a estabilidade desta camada depositada quanto a resistência ao desafio erosivo analisando as diferenças de fluxo de espécies eletroativas usando SECM. A diminuição do raio da *tip* é de fundamental importância para obtenção de imagens com alta resolução.
- SECM no modo potenciométrico se mostra bastante versátil no sentido de que apenas mudando a membrana ionófora comercial pode-se construir ISMEs para a detecção de diversos íons. Uma tendência observada na literatura com relação a este tema está relacionada à construção de sensores multifuncionais empregando 2

ou mais canais potenciométricos. Como exemplo, podemos citar a detecção de íons K^+ , Ca^{2+} , H^+ , Na^+ , os quais são relevantes no meio biológico e celular.

- Com relação aos estudos empregando as membranas sintéticas de xantana, podemos afirmar que a SECM se mostra como uma ferramenta bastante apropriada para obter o fluxo de íons que permeiam por esta estrutura. Investigações mais detalhadas com relação a este tema estão sendo desenvolvidas, visto a importância deste assunto multidisciplinar.
- SICM foi utilizada de maneira simples e objetiva nesta tese para obtenção de imagens topográficas de alta resolução espacial sobre microcristais de calcita. Vale salientar que a resolução desta técnica está diretamente relacionada ao tamanho da nanopipeta, que pode atingir raios típicos de 50 nm quando se utiliza *Laser Micropipette Puller*.
- O sensor multifuncional ISME-SICM desenvolvido nesta tese foi aplicado com sucesso na investigação do processo de dissolução ácida de microcristais de calcita. Este modelo de dissolução foi utilizado para demonstrar a viabilidade e funcionalidade do sensor construído. Aplicações utilizando materiais dentários podem ser consideradas como a próxima etapa deste trabalho. Desta forma, diferentes produtos desenvolvidos para o tratamento da erosão dentária podem ser testados, sendo a dissolução ácida induzida localmente pelo canal SICM quantificada pelo canal ISME.

Capítulo 6

Referências Bibliográficas

- Aaronson, Barak D. B., Jesús Garoz-Ruiz, Joshua C. Byers, Alvaro Colina, and Patrick R. Unwin. 2015. "Electrodeposition and Screening of (Photo)electrochemical Activity in Conjugated Polymers Using Scanning Electrochemical Cell Microscopy." *Langmuir*.
- Alfano, Michael C. et al. 2010. "New Research on Superior Dentin Hypersensitivity Relief with Stain Removal." *American Journal of Dentistry* 23(Special Issue A):1A – 40A.
- Alpuche-Aviles, M. a. and D. O. Wipf. 2001. "Impedance Feedback Control for Scanning Electrochemical Microscopy." *Analytical Chemistry* 73(20):4873–81.
- Amatore, Christian, Cécile Pebay, Laurent Thouin, Aifang Wang, and J. S. Warkocz. 2010. "Difference between Ultramicroelectrodes and Microelectrodes: Influence of Natural Convection." *Analytical Chemistry* 82(16):6933–39.
- Amemiya, Shigeru and Allen J. Bard. 2000. "Scanning Electrochemical Microscopy. 40. Voltammetric Ion-Selective Micropipet Electrodes for Probing Ion Transfer at Bilayer Lipid Membranes." *Analytical Chemistry* 72(20):4940–48.
- Amemiya, Shigeru, Allen J. Bard, Fu-Ren F. Fan, Michael V Mirkin, and Patrick R. Unwin. 2008. "Scanning Electrochemical Microscopy." *Annual review of analytical chemistry (Palo Alto, Calif.)* 1:95–131.
- Amemiya, Shigeru, Jidong Guo, Hui Xiong, and Darrick a. Gross. 2006. "Biological Applications of Scanning Electrochemical Microscopy: Chemical Imaging of Single Living Cells and beyond." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 386:458–71.
- Ammann, D., U. Oesch, T. Bührer, and W. Simon. 1987. "Design of Ionophores for Ion-Selective Microsensors." *Canadian journal of physiology and pharmacology* 65:879–84.
- Anker, Peter, Erich Wieand, Daniel Ammann, E. Dohner, and Wilhelm Simon. 1981. "Neutral Carrier Based Ion-Selective Electrode for the Determination of Total Calcium in Blood Serum." *Analytical Chemistry* 53(30):1970–74.
- Arbault, Stéphane et al. 2004. "Oxidative Stress in Cancer Prone Xeroderma Pigmentosum Fibroblasts. Real-Time and Single Cell Monitoring of Superoxide and Nitric Oxide Production with Microelectrodes." *Carcinogenesis* 25(4):509–15.
- Archibald, D. D., S. B. Qadri, and B. P. Gaber. 1996. "Modified Calcite Deposition Due to Ultrathin Organic Films on Silicon Substrates." *Langmuir* 12(14):538–46.
- Arvidson, Rolf S., Inci Evren Ertan, James E. Amonette, and Andreas Luttge. 2003. "Variation in Calcite Dissolution Rates: A Fundamental Problem?" *Geochimica et Cosmochimica Acta* 67(9):1623–34.
- Bakker, Eric, Philippe Bühlmann, and Ernő Pretsch. 1997. "Carrier-Based Ion-Selective Electrodes and Bulk Optodes. 1. General Characteristics." *Chemical reviews* 97(94):3083–3132.
- Ballesteros Katemann, Bernardo, Albert Schulte, and Wolfgang Schuhmann. 2003.

- “Constant-Distance Mode Scanning Electrochemical Microscopy (SECM) - Part I: Adaptation of a Non-Optical Shear-Force-Based Positioning Mode for SECM Tips.” *Chemistry - A European Journal* 9(9):2025–33.
- Barbour, M. E., D. M. Parker, G. C. Allen, and K. D. Jandt. 2005. “Human Enamel Erosion in Constant Composition Citric Acid Solutions as a Function of Degree of Saturation with Respect to Hydroxyapatite.” *Journal of Oral Rehabilitation* 32(1):16–21.
- Barbour, Michele E., David M. Parker, and Klaus D. Jandt. 2003. “Enamel Dissolution as a Function of Solution Degree of Saturation with Respect to Hydroxyapatite: A Nanoindentation Study.” *Journal of Colloid and Interface Science* 265(1):9–14.
- Bard, Allen J., Fu-ren F. Fan, Juhyou Kwak, and Ovadia Lev. 1989. “Scanning Electrochemical Microscopy. Introduction and Principles.” *Analytical Chemistry* 61(24):132–38.
- Barnes, Caren M., Robert L. Boyd, Kenneth H. Burrell, and John J. Hefferren. 2009. “Journal of Clinical Dentistry.” *Journal of Clinical Dentistry* XX(Special Issue 4):109–14.
- Bath, B. D., H. S. White, and E. R. Scott. 2000. “Visualization and Analysis of Electroosmotic Flow in Hairless Mouse Skin.” *Pharmaceutical research* 17(4):471–75.
- Bath, Bradley D. et al. 1998. “Imaging Molecular Transport in Porous Membranes. Observation and Analysis of Electroosmotic Flow in Individual Pores Using the Scanning Electrochemical Microscope.” *Analytical chemistry* 70(6):1047–58.
- Bath, Bradley D., Erik R. Scott, J. Bradley Phipps, and Henry S. White. 2000. “Scanning Electrochemical Microscopy of Iontophoretic Transport in Hairless Mouse Skin. Analysis of the Relative Contributions of Diffusion, Migration, and Electroosmosis to Transport in Hair Follicles.” *Journal of Pharmaceutical Sciences* 89(12):1537–49.
- Beaulieu, Isabelle, Sabine Kuss, Janine Mauzeroll, and Matthias Geissler. 2011. “Biological Scanning Electrochemical Microscopy and Its Application to Live Cell Studies.” *Anal. Chem.* 83(5):1485–92.
- Böcker, Matthias, Boris Anczykowski, Joachim Wegener, and Tilman E. Schäffer. 2007. “Scanning Ion Conductance Microscopy with Distance-Modulated Shear Force Control.” *Nanotechnology* 18(14):145505.
- Bottomley, L. a., J. E. Coury, and P. N. First. 1996. “Scanning Probe Microscopy.” *Analytical Chemistry* 68(12):185R – 230R.
- Brudevold, F., a Tehrani, and R. Cruz. 1982. “The Relationship among the Permeability to Iodide, Pore Volume, and Intraoral Mineralization of Abraded Enamel.” *Journal of dental research* 61(5):645–48.
- Bueno, V. B., A. M. Silva, et al. 2013. “Hybrid Composites of Xanthan and Magnetic Nanoparticles for Cellular Uptake.” *Chemical Communications* 49(207890):9911–14.

- Bueno, V. B., Ricardo Bentini, Luiz Henrique Catalani, and Denise Freitas Siqueira Petri. 2013. "Synthesis and Swelling Behavior of Xanthan-Based Hydrogels." *Carbohydrate Polymers* 92(2):1091–99.
- Bühlmann, Philippe and Li D. Chen. 2011. "Ion-Selective Electrodes With Ionophore-Doped Sensing Membranes." *Supramolecular Chemistry* 2539–79.
- Bühlmann, Philippe, Ernő Pretsch, and Eric Bakker. 1998. "Carrier-Based Ion-Selective Electrodes and Bulk Optodes. 2. Ionophores for Potentiometric and Optical Sensors." *Chemical Reviews* 98(97):1593–1688.
- Buhrer, Thomas and Peter Gehrto. 1988. "Neutral-Carrier-Based Design and Application A Review." *Analytical Sciences* 4(December):547–57.
- Campos, Maria Inês da Cruz, Celso Neiva Campos, and Roberto Willer Farinazzo Vitral. 2008. "O Uso de Dentes Bovinos Como Substitutos de Dentes Humanos Em Pesquisas Odontológicas: Uma Revisão Da Literatura." *Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada* 8(1):127–32.
- Castro, Pollyana S. 2011. "Fabricação de Microeletrodos Para Aplicações Em Microscopia Eletroquímica de Varredura." Dissertação de Mestrado, USP.
- Castro, Pollyana S., Alex S. Lima, Tiago L. Ferreira, and Mauro Bertotti. 2011. "Scanning Electrochemical Microscopy as a Tool for the Characterization of Dental Erosion." *International Journal of Electrochemistry* 2011:1–6.
- Cavalli, V., C. a G. Arrais, M. Giannini, and G. M. B. Ambrosano. 2004. "High-Concentrated Carbamide Peroxide Bleaching Agents Effects on Enamel Surface." *Journal of oral rehabilitation* 31(2):155–59.
- Chen, Chiao-Chen and Lane a. Baker. 2011. "Effects of Pipette Modulation and Imaging Distances on Ion Currents Measured with Scanning Ion Conductance Microscopy (SICM)." *The Analyst* 136:90–97.
- Chen, Chiao-Chen, Yi Zhou, and Lane a. Baker. 2012. "Scanning Ion Conductance Microscopy." *Annual Review of Analytical Chemistry* 5:207–28.
- Cheng, Ran, Hui Yang, Mei-ying Shao, Tao Hu, and Xue-dong Zhou. 2009. "Dental Erosion and Severe Tooth Decay Related to Soft Drinks: A Case Report and Literature Review." *Journal of Zhejiang University. Science. B* 10(5):395–99.
- Christoffersen, Jorgen and Margaret R. Christoffersen. 1984. "Kinetics of Dissolution of Calcium Hydroxyapatite." *Faraday Discussions of the Chemical Society* 77(2):235–42.
- Chumbimuni Torres, K. Y. and Eric Bakker. 2006. "Recentes Avanços E Novas Perspectivas Dos Eletrodos Ion-Seletivos." *Quimica Nova* 29(5):1094–1100.
- Chumbimuni-Torres, Karin Y., Nastassia Rubinova, Aleksandar Radu, Lauro T. Kubota, and Eric Bakker. 2006. "Solid Contact Potentiometric Sensors for Trace Level

- Measurements.” *Analytical Chemistry* 78(4):1318–22.
- Cochrane, N. J., F. Cai, N. L. Huq, M. F. Burrow, and E. C. Reynolds. 2010. “New Approaches to Enhanced Remineralization of Tooth Enamel.” *Journal of dental research* 89(11):1187–97.
- Cornut, R., M. Mayoral, D. Fabre, and Janine Mauzeroll. 2010. “Scanning Electrochemical Microscopy Approach Curves for Ring Microelectrodes in Pure Negative and Positive Feedback Mode.” *Journal of The Electrochemical Society* 157:F77–82.
- Cortés-Salazar, Fernando, Dmitry Momotenko, Hubert H. Girault, Andreas Lesch, and Gunther Wittstock. 2011. “Seeing Big with Scanning Electrochemical Microscopy.” *Analytical Chemistry* 83:1493–99.
- Courts, A. 1961. “Structural Changes in Collagen. 2. Enhanced Solubility of Bovine Collagen: Reactions with Hydrogen Peroxide and Some Properties of Soluble Eucollagen.” *The Biochemical journal* 81(1925):356–65.
- Cras, J. J., C. a. Rowe-Taitt, D. a. Nivens, and F. S. Ligler. 1999. “Comparison of Chemical Cleaning Methods of Glass in Preparation for Silanization.” *Biosensors and Bioelectronics* 14:683–88.
- Daniele, C., C. Smaniotto, and R. Machado. 2011. “Estudo Do Potencial de Erosão Dentária de Bebidas Ácidas Study of the Potential of Dental Erosion by Acids Drinks.” *Ciência, Biologia e Saúde* 13(1):11–16.
- Dedhiya, M. G., F. Young, and W. I. Higuchi. 1973. “Mechanism for the Retardation of the Acid Dissolution Rate of Hydroxyapatite by Strontium.” *Journal of Dental Research* 52(5):1097–1109.
- Depan, D. and R. D. K. Misra. 2012. “Hybrid Nanoparticle Architecture for Cellular Uptake and Bioimaging: Direct Crystallization of a Polymer Immobilized with Magnetic Nanoparticles on Carbon Nanotubes.” *Nanoscale* 4(20):6325–35.
- Ebejer, Neil et al. 2013. “Scanning Electrochemical Cell Microscopy: A Versatile Technique for Nanoscale Electrochemistry and Functional Imaging.” *Annual review of analytical chemistry (Palo Alto, Calif.)* 6:329–51.
- Eckhard, Kathrin, Wolfgang Schuhmann, and Monika Maciejewska. 2009. “Determination of Optimum Imaging Conditions in AC-SECM Using the Mathematical Distance between Approach Curves Displayed in the Impedance Domain.” *Electrochimica Acta* 54(7):2125–30.
- Edwards, Martin a, Sophie Martin, Anna L. Whitworth, J. V Macpherson, and Patrick R. Unwin. 2006. “Scanning Electrochemical Microscopy: Principles and Applications to Biophysical Systems.” *Physiological measurement* 27:R63–108.
- Edwards, Martin a, Cara G. Williams, Anna L. Whitworth, and Patrick R. Unwin. 2009.

- “Scanning Ion Conductance Microscopy: A Model for Experimentally Realistic Conditions and Image Interpretation.” *Analytical Chemistry* 81(11):4482–92.
- Edwards, Martin A. 2008. “Development of Electrochemical Probe Microscopy and Related Techniques.” *phD Thesis, Warwick University*.
- Etienne, Mathieu, Emily C. Anderson, Stephanie R. Evans, Wolfgang Schuhmann, and Ingrid Fritsch. 2006. “Feedback-Independent Pt Nanoelectrodes for Shear Force-Based Constant-Distance Mode Scanning Electrochemical Microscopy.” *Anal. Chem.* 78(20):7317–24.
- Evans, Stuart a G. et al. 2002. “Detection of Hydrogen Peroxide at Mesoporous Platinum Microelctrodes.” *Analytical Chemistry* 74(6):1322–26.
- Faria, Gilson José and Lauro Villela. 2000. “Etiologia E Tratamento Da Hipersensibilidade Dentária Em Dentes Com Lesões Cervicais Não Cariotas.” *Rev.Biociências* 6(1):21–27.
- Felle, Hubert. 1989. “Ca²⁺ -Selective Microelectrodes and Their Application to Plant Cells and Tissues.” *Plant Physiology* 91:1239–42.
- Fernandes, Julio Cesar Bastos, Lauro Tatsuo Kubota, and Graciliano De Oliveira Neto. 2001. “Eletrodos Ion-Seletivos: Histórico, Mecanismo de Resposta, Seletividade E Revis??o Dos Conceitos.” *Quimica Nova* 24(1):120–30.
- Fernandez, J. L. .. and Allen J. Bard. 2003. “Scanning Electrochemical Microscopy. 47. Imaging Electrocatalytic Activity for Oxygen Reduction in an Acidic Medium by the Tip Generation-Substrate Collection Mode.” *Analytical chemistry* 75(13):2967–74.
- Fernandez, J. L. and Allen J. Bard. 2004. “Scanning Electrochemical Microscopy 50 . Kinetic Study of Electrode Reactions by the Tip Generation - Substrate Collection Mode.” *Analytical Chemistry* 76(8):2281–89.
- Fisher, Robin D. et al. 2011. “Dissolution Kinetics of Polycrystalline Calcium Sulfate-Based Materials: Influence of Chemical Modification.” *ACS Applied Materials and Interfaces* 3(9):3528–37.
- Gardner, Catherine E., Patrick R. Unwin, and J. V Macpherson. 2005. “Correlation of Membrane Structure and Transport Activity Using Combined Scanning Electrochemical-Atomic Force Microscopy.” *Electrochemistry Communications* 7:612–18.
- Ghazali, F. B. C. 1969. “Permeability of Dentine.” *Malaysian Journal of Medical Society* 10(1):27–36.
- Ghazali, F. B. C. 2003. “Permeability of Dentine.” 10(1):27–36.
- Gjorgievska, E. S., J. W. Nicholson, I. J. Slipper, and M. M. Stevanovic. 2013. “Remineralization of Demineralized Enamel by Toothpastes: A Scanning Electron Microscopy, Energy Dispersive X-Ray Analysis, and Three-Dimensional Stereo-Micrographic Study.” *Microsc Microanal* 19(3):587–95.

- Godinho, Cláudia Jorge, Marcela Fellet Grippi, and Leonardo César Costa. 2011. "Avaliação Clínica Do Uso de Dois Novos Cremes Dentais No Tratamento Da Hipersensibilidade Dentinária." *RPG Rev Pós Grad* 18(2).
- Gonsalves, M., J. V Macpherson, D. O'Hare, C. P. Winlove, and P. R. Unwin. 2001. "High Resolution Imaging of the Distribution and Permeability of Methyl Viologen Dication in Bovine Articular Cartilage Using Scanning Electrochemical Microscopy." *Biochimica et biophysica acta* 1524:66–74.
- González, Sergio, Juan J. Santana, Yaiza González-García, Luis Fernández-Mérida, and Ricardo M. Souto. 2011. "Scanning Electrochemical Microscopy for the Investigation of Localized Degradation Processes in Coated Metals: Effect of Oxygen." *Corrosion Science* 53:1910–15.
- Gorelik, J. et al. 2004. "The Use of Scanning Ion Conductance Microscopy to Image A6 Cells." *Molecular and cellular endocrinology* 217(1-2):101–8.
- Guinovart, Tomàs, Marc Parrilla, Gastón a Crespo, F. Xavier Rius, and Francisco J. Andrade. 2013. "Potentiometric Sensors Using Cotton Yarns, Carbon Nanotubes and Polymeric Membranes." *The Analyst* 138(18):5208–15.
- Gyvetvai, Gergely, Sören Sundblom, Livia Nagy, Ari Ivaska, and Géza Nagy. 2007. "Solid Contact Micropipette Ion Selective Electrode for Potentiometric SECM." *Electroanalysis* 19:1116–22.
- Hansma, P. K., B. Drake, S. A. C. Gould, and C. B. Prater. 1987. "The Scanning Ion-Conductance Microscope." 3(1966):3–5.
- Happel, Patrick, Denis Thatenhorst, and Irmgard D. Dietzel. 2012. "Scanning Ion Conductance Microscopy for Studying Biological Samples." *Sensors (Switzerland)* 12:14983–8.
- Heurich, Erik et al. 2010. "Quantification of Dental Erosion-A Comparison of Stylus Profilometry and Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)." *Dental Materials* 26(4):326–36.
- Horrocks, B. R. et al. 1993. "Scanning Electrochemical Microscopy .19. Ion-Selective Potentiometric Microscopy." *Analytical Chemistry* 65(12):1213–24.
- Ishizaki, Kimihiro, Tatsuo Ushiki, Masato Nakajima, and Futoshi Iwata. 2013. "Influence of Charged Samples on Imaging in Scanning Ion Conductance Microscopy." *Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS)* 1–4.
- Izquierdo, J. et al. 2012. "Scanning Electrochemical Microscopy for the Investigation of Corrosion Processes: Measurement of Zn²⁺ Spatial Distribution with Ion Selective Microelectrodes." *Electrochimica Acta* 59:398–403.
- Izquierdo, J. et al. 2013. "Development of Mg²⁺ Ion-Selective Microelectrodes for

- Potentiometric Scanning Electrochemical Microscopy Monitoring of Galvanic Corrosion Processes.” *Journal of the Electrochemical Society* 160(9):C451–59.
- Jennings, D. T., K. M. McKenzie, D. C. Greenspan, and E. Clark. 2004. “Occlusion Using NovaMin (Sodium Calcium.” 83:2416.
- Johansson, Ann Katrin, Peter Lingström, Thomas Imfeld, and Downen Birkhed. 2004. “Influence of Drinking Method on Tooth-Surface pH in Relation to Dental Erosion.” *European Journal of Oral Sciences* 112(6):484–89.
- Jones, Claire E., Patrick R. Unwin, and J. V Macpherson. 2003. “In Situ Observation of the Surface Processes Involved in Dissolution from the Cleavage Surface of Calcite in Aqueous Solution Using Combined Scanning Electrochemical-Atomic Force Microscopy (SECM-AFM).” *Chemphyschem* 4:139–46.
- Karnicka, Katarzyna et al. 2007. “Visualisation of the Local Bio-Electrocatalytic Activity in Biofuel Cell Cathodes by Means of Redox Competition Scanning Electrochemical Microscopy (RC-SECM).” *Electrochemistry Communications* 9(8):1998–2002.
- Katemann, B. Ballesteros and Wolfgang Schuhmann. 2002. “Fabrication and Characterization of Needle-Type.” *Electroanalysis* 14(810):22–28.
- Korchev, Y. E., C. L. Bashford, M. Milovanovic, I. Vodyanoy, and M. J. Lab. 1997. “Scanning Ion Conductance Microscopy of Living Cells.” *Biophysical journal* 73(2):653–58.
- Kwak, J. and Allen J. Bard. 1989. “Scanning Electrochemical Microscopy. Theory of the Feedback Mode.” *Analytical Chemistry* 61(11):1221–27.
- Kwak, Juhyoun and Allen J. Bard. 1989. “Scanning Electrochemical Microscopy. Apparatus and Two-Dimensional Scans of Conductive and Insulating Substrates.” *Analytical Chemistry* 61:1794–99.
- Lee, Seong Ki, Walter F. Boron, and Mark D. Parker. 2013. “Monitoring Ion Activities in and around Cells Using Ion-Selective Liquid-Membrane Microelectrodes.” *Sensors (Switzerland)* 13:984–1003.
- Lei, Rong et al. 2009. “Imaging Biocatalytic Activity of Enzyme-Polymer Spots by Means of Combined Scanning Electrochemical Microscopy/electrogenerated Chemiluminescence.” *Analytical Chemistry* 81(12):5070–74.
- Lin, Ta Chun, Feng Huei Lin, and Jui Che Lin. 2012. “In Vitro Feasibility Study of the Use of a Magnetic Electrospun Chitosan Nanofiber Composite for Hyperthermia Treatment of Tumor Cells.” *Acta Biomaterialia* 8(7):2704–11.
- Lindsey, Georgina, Stuart Abercrombie, Guy Denuault, Salvatore Daniele, and Eddy De Faveri. 2007. “Scanning Electrochemical Microscopy: Approach Curves for Sphere-Cap Scanning Electrochemical Microscopy Tips.” *Analytical Chemistry* 79(7):2952–56.

- Liu, Biao, Allen J. Bard, Chen Zhong Li, and Heinz Bernhard Kraatz. 2005. "Scanning Electrochemical Microscopy. 51. Studies of Self-Assembled Monolayers of DNA in the Absence and Presence of Metal Ions." *Journal of Physical Chemistry B* 109:5193–98.
- Loeb, G. E., R. a. Peck, and J. Martyniuk. 1995. "Toward the Ultimate Metal Microelectrode." *Journal of Neuroscience Methods* 63:175–83.
- Macpherson, J. V, Mark A. Beeston, Patrick R. Unwin, Nigel P. Hughes, and David Littlewood. 1995. "Imaging the Action of Fluid Flow Blocking Agents on Dentinal Surfaces Using a Scanning Electrochemical Microscope." *Langmuir* 11(10):3959–63.
- Macpherson, J. V, Claire E. Jones, Anna L. Barker, and Patrick R. Unwin. 2002. "Electrochemical Imaging of Diffusion through Single Nanoscale Pores." *Analytical Chemistry* 74(8):1841–48.
- Macpherson, J. V and Patrick R. Unwin. 2005. "Scanning Electrochemical Microscopy as an in Vitro Technique for Measuring Convective Flow Rates across Dentine and the Efficacy of Surface Blocking Treatments." *Electroanalysis* 17:197–204.
- Margolis, H. C., Y. P. Zhang, C. Y. Lee, R. L. Kent, and E. C. Moreno. 1999. "Kinetics of Enamel Demineralization in Vitro." *Journal of dental research* 78(7):1326–35.
- Markowitz, K. and D. H. Pashley. 2008. "Discovering New Treatments for Sensitive Teeth: The Long Path from Biology to Therapy." *Journal of oral rehabilitation* 35(4):300–315. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18321266>).
- Mauzeroll, J., M. Buda, Allen J. Bard, F. Prieto, and M. Rueda. 2002. "Detection of Tl(I) Transport through a Gramicidin-Dioleoylphosphatidylcholine Monolayer Using the Substrate Generation-Tip Collection Mode of Scanning Electrochemical Microscopy." *Langmuir* 18(24):9453–61.
- McGeouch, Carrie Anne et al. 2012. "Quantitative Localized Proton-Promoted Dissolution Kinetics of Calcite Using Scanning Electrochemical Microscopy (SECM)." *Journal of Physical Chemistry C* 116:14892–99.
- McGeouch, Carrie Anne, Martin a. Edwards, Michael M. Mbogoro, Charles Parkinson, and Patrick R. Unwin. 2010. "Scanning Electrochemical Microscopy as a Quantitative Probe of Acid-Induced Dissolution: Theory and Application to Dental Enamel." *Analytical Chemistry* 82(22):9322–28.
- Mckelvey, Kim, Sophie L. Kinnear, David Perry, Dmitry Momotenko, and Patrick R. Unwin. 2014. "Surface Charge Mapping with a Nanopipette." *Journal of the American Chemical Society* 136:13735–44.
- McKelvey, Kim, David Perry, Joshua C. Byers, Alex W. Colburn, and Patrick R. Unwin. 2014. "Bias Modulated Scanning Ion Conductance Microscopy." *Analytical Chemistry* 86(7):3639–46.

- McKelvey, Kim, Michael E. Snowden, Massimo Peruffo, and Patrick R. Unwin. 2011. "Quantitative Visualization of Molecular Transport through Porous Membranes: Enhanced Resolution and Contrast Using Intermittent Contact-Scanning Electrochemical Microscopy." *Analytical Chemistry* 83(17):6447–54.
- Mezour, Mohamed A., Mario Morin, and Janine Mauzeroll. 2011. "Fabrication and Characterization of Laser Pulled Platinum Microelectrodes with Controlled Geometry." *Analytical Chemistry* 83:2378–82.
- Mirkin, M. V. 1999. "High Resolution Studies of Heterogeneous Processes with the Scanning Electrochemical Microscope." *Mikrochim. Acta* 130:127–53.
- Mirkin, Michael V and Benjamin R. Horrocks. 2000. "Electroanalytical Measurements Using the Scanning Electrochemical Microscope." *Anal. Chim. Acta* 406:119–46.
- Morris, C. A., C. C. Chen, T. Ito, and L. A. Baker. 2013. "Local pH Measurement with Scanning Ion Conductance Microscopy." *Journal of The Electrochemical Society* 160(8):H430–35.
- Munoz, J. L., F. Deyhimi, and J. a. Coles. 1983. "Silanization of Glass in the Making of Ion-Sensitive Microelectrodes." *Journal of Neuroscience Methods* 8:231–47.
- Murakami, Keiko, Yuichi Kitasako, Michael F. Burrow, and Junji Tagami. 2006. "In Vitro pH Analysis of Active and Arrested Dentinal Caries in Extracted Human Teeth Using a Micro pH Sensor." *Dental materials journal* 25(3):423–29.
- Nadappuram, Binoy Paulose et al. 2015. "Quad-Barrel Multifunctional Electrochemical and Ion Conductance Probe for Voltammetric Analysis and Imaging." *Analytical Chemistry* 150226143707000.
- Nadappuram, Binoy Paulose, Kim McKelvey, Rehab Al Botros, Alex W. Colburn, and Patrick R. Unwin. 2013. "Fabrication and Characterization of Dual Function Nanoscale pH-Scanning Ion Conductance Microscopy (SICM) Probes for High Resolution pH Mapping." *Analytical Chemistry* 85:8070–74.
- Nebel, Michaela, Thomas Erichsen, and Wolfgang Schuhmann. 2014. "Constant-Distance Mode SECM as a Tool to Visualize Local Electrocatalytic Activity of Oxygen Reduction Catalysts." *Beilstein Journal of Nanotechnology* 5(1):141–51.
- Neufeld, a. K. and a. P. O'Mullane. 2006. "Effect of the Mediator in Feedback Mode-Based SECM Interrogation of Indium Tin-Oxide and Boron-Doped Diamond Electrodes." *Journal of Solid State Electrochemistry* 10:808–16.
- Nie, Lei, Jinping Suo, Peng Zou, and Shuibin Feng. 2012. "Preparation and Properties of Biphasic Calcium Phosphate Scaffolds Multiply Coated with HA/PLLA Nanocomposites for Bone Tissue Engineering Applications." *Journal of Nanomaterials* 2012:1–11.
- Nugues, S. and G. Denuault. 1996. "Scanning Electrochemical Microscopy: Amperometric

- Probing of Diffusional Ion Fluxes through Porous Membranes and Human Dentine.” 408:125–40.
- Olley, Ryan C. et al. 2012. “An in Situ Study Investigating Dentine Tubule Occlusion of Dentifrices Following Acid Challenge.” *Journal of Dentistry* 40(7):585–93.
- Özok, a. R., M. K. Wu, and P. R. Wesselink. 2002. “Comparison of the in Vitro Permeability of Human Dentine according to the Dentinal Region and the Composition of the Simulated Dentinal Fluid.” *Journal of Dentistry* 30(2-3):107–11.
- Paixão, T. R. L. C. and Mauro Bertotti. 2009. “Métodos Para Fabricação de Microeletrodos Visando a Detecção Em Microambientes.” *Química Nova* 32(5):1306–14.
- Parker, Alexander S. et al. 2014. “Measurement of the Efficacy of Calcium Silicate for the Protection and Repair of Dental Enamel.” *Journal of dentistry* 42 Suppl 1:S21–29.
- Pedreira de Freitas, Ana Carolina et al. 2010. “AFM Analysis of Bleaching Effects on Dental Enamel Microtopography.” *Applied Surface Science* 256:2915–19.
- Penner, R. M., M. J. Heben, T. L. Longin, and N. S. Lewis. 1990. “Fabrication and Use of Nanometer-Sized Electrodes in Electrochemistry.” *Science (New York, N.Y.)* 250:1118–21.
- Perry, David, Rehab Al Botros, Dmitry Momotenko, Sophie L. Kinnear, and Patrick R. Unwin. 2015. “Simultaneous Nanoscale Surface Charge and Topographical Mapping.” *ACS Nano* 9(7):7266–76.
- Petri, Denise F. S. 2015. “Xanthan Gum : A Versatile Biopolymer for Biomedical and Technological Applications.” *Journal of Applied Polymer Science* 42035(42035):1–13.
- Pinto, Cristiane Franco, Rogério De Oliveira, Vanessa Cavalli, and Marcelo Giannini. 2004. “Peroxide Bleaching Agent Effects on Enamel Surface Microhardness, Roughness and Morphology.” *Brazilian oral research* 18(4):306–11.
- Pinto, Shelon Cristina Souza, Márcia Thaís Pochapski, Denise Stadler Wambier, Gibson Luiz Pilatti, and Fábio André Santos. 2008. “Análise De Substâncias Dessensibilizantes Na Permeabilidade Da Dentina E Oblteração De Túbulos Dentinários - Estudo in Vitro.” *Revista Periodontia* 17(3):41–48.
- Quartarone, Eliana, Piercarlo Mustarelli, Claudio Poggio, and Marco Lombardini. 2008. “Surface Kinetic Roughening Caused by Dental Erosion: An Atomic Force Microscopy Study.” *Journal of Applied Physics* 103(10):1–6.
- Ramires, I. and M. A. R. Buzalaf. 2006. “A Fluoretação Da água de Abastecimento Público E Seus Benefícios No Controle Da Cárie Dentária – Cinquenta Anos No Brasil Fifty Years of Fluoridation of Public Water Supplies in Brazil : Benefits for the Control of Dental Caries.” *Ciência & Saúde Coletiva* 12(4):1057–65.
- Salomo, M. and M. J. Bak. 1973. “Design, Fabrication, and in Vivo Behavior of Chronic

- Recording Intracortical Microelectrodes.” *IEEE transactions on bio-medical engineering* 20(4):253–60.
- Salomo, M., S. E. Pust, G. Wittstock, and E. Oesterschulze. 2010. “Integrated Cantilever Probes for SECM/AFM Characterization of Surfaces.” *Microelectronic Engineering* 87(5-8):1537–39.
- Sanchez-Sanchez, Carlos M., Joaquin Rodriguez-Lopez, and Allen J. Bard. 2008. “Quantitative Calibration of the SECM Substrate Generation / Tip Collection Mode and Its Use for the Study of the Oxygen Reduction Mechanism.” *Anal. Chem.* 80(9):3254–60.
- Santana, J. J., J. González-Guzmán, L. Fernández-Mérida, S. González, and R. M. Souto. 2010. “Visualization of Local Degradation Processes in Coated Metals by Means of Scanning Electrochemical Microscopy in the Redox Competition Mode.” *Electrochimica Acta* 55(15):4488–94.
- Schlueter, N., a. Hara, R. P. Shellis, and C. Ganss. 2011. “Methods for the Measurement and Characterization of Erosion in Enamel and Dentine.” *Caries Research* 45(SUPPL. 1):13–23.
- Scott, E. R., H. S. White, and J. B. Phipps. 1993. “Iontophoretic Transport through Porous Membranes Using Scanning Electrochemical Microscopy: Application to in Vitro Studies of Ion Fluxes through Skin.” *Analytical chemistry* 65(3):1537–45.
- Scrase-Field, S. a M. G. and Marc R. Knight. 2003. “Calcium: Just a Chemical Switch?” *Current Opinion in Plant Biology* 6(5):500–506.
- Shao, Yuanhua et al. 1997. “Nanometer-Sized Electrochemical Sensors.” 69(8):1627–34.
- Shevchuk, A. I. et al. 2001. “Simultaneous Measurement of Ca²⁺ and Cellular Dynamics: Combined Scanning Ion Conductance and Optical Microscopy to Study Contracting Cardiac Myocytes.” *Biophysical Journal* 81(3):1759–64.
- Silver, I. A. and M. Erecinska. 1990. “Intracellular and Extracellular Changes of Ca²⁺ in Hypoxia and Ischemia in Rat Brain in Vivo.” *Journal Of General Physiology* 95(May):837–66.
- Simonet, Bartolomé M. and Miguel Valcárcel. 2006. “Analytical Chemistry in Modern Society: What We Can Expect.” *Microchimica Acta* 153(1-2):1–5.
- Smith, P. J., K. Hammar, D. M. Porterfield, R. H. Sanger, and J. R. Trimarchi. 1999. “Self-Referencing, Non-Invasive, Ion Selective Electrode for Single Cell Detection of Trans-Plasma Membrane Calcium Flux.” *Microscopy research and technique* 46(May):398–417.
- Soares, D. G. S. et al. 2011. “Transenamel and Transdental Cytotoxicity of Carbamide Peroxide Bleaching Gels on Odontoblast-like MDPC-23 Cells.” *International*

- Endodontic Journal* 44(2):116–25.
- Sosna, Maciej, Guy Denuault, Robin W. Pascal, Ralf D. Prien, and Matt Mowlem. 2007. “Development of a Reliable Microelectrode Dissolved Oxygen Sensor.” *Sensors and Actuators, B: Chemical* 123(1):344–51.
- Spalding, Marianne. 2000. “Estudo in Vitro Do Aspecto Morfológico Da Superfície Do Esmalte E Alteração Na Permeabilidade Dentária Após Clareação.” Dissertação de mestrado, USP.
- Sundfors, Fredrik et al. 2006. “Microcavity Based Solid-Contact Ion-Selective Microelectrodes.” *Electroanalysis* 18:1372–78.
- Takahashi, Yasufumi et al. 2011. “Multifunctional Nanoprobes for Nanoscale Chemical Imaging and Localized Chemical Delivery at Surfaces and Interfaces.” *Angewandte Chemie - International Edition* 50:9638–42.
- Takahashi, Yasufumi et al. 2012. “Topographical and Electrochemical Nanoscale Imaging of Living Cells Using Voltage-Switching Mode Scanning Electrochemical Microscopy.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(29):11540–45.
- Tanaka, O. M., E. S. Camargo, B. B. Cerci, O. Guariza-Filho, and L. S. Roman. 2012. “Dental Enamel Roughness with Different Acid Etching Times: Atomic Force Microscopy Study.” *European Journal of General Dentistry* 1(3):187.
- Thomann, J. M., J. C. Voegel, and Ph. Gramain. 1991. “Kinetics of Dissolution of Calcium Hydroxyapatite Powder IV. Interfacial Calcium Diffusion Controlled Process.” *Colloids and Surfaces* 54:145–59.
- Toiubara, T. Y. and L. Koval. 1970. “Amperometric Complex-Formation Titration of Traces of Alkaline Earths.” *Talanta* 17(February):1006–9.
- Tóth, K., Géza Nagy, Chang Wei, and Allen J. Bard. 1995. “Novel Application of Potentiometric Microelectrodes: Scanning Potentiometric Microscopy.” *Electroanalysis* 7:801–10.
- Tsien, R. Y. and T. J. Rink. 1980. “Neutral Carrier Ion-Selective Microelectrodes for Measurement of Intracellular Free Calcium.” *Biochimica et biophysica acta* 599:623–38.
- Tsionsky, Michael et al. 1999. “Scanning Electrochemical Microscopy. 38. Application of SECM to the Study of Charge Transfer through Bilayer Lipid Membranes.” *Anal. Chem.* 71(19):4300–4305.
- Uitto, Olivia D. and Henry S. White. 2003. “Electroosmotic Pore Transport in Human Skin.” *Pharmaceutical research* 20(4):646–52.
- Uitto, Olivia D., Henry S. White, and Koichi Aoki. 2002. “Diffusive-Convective Transport into a Porous Membrane. A Comparison of Theory and Experiment Using Scanning Electrochemical Microscopy Operated in Reverse Imaging Mode.” *Analytical Chemistry*

74(17):4577–82.

- Voronin, Oleg G. et al. 2012. “Prussian Blue-Modified Ultramicroelectrodes for Mapping Hydrogen Peroxide in Scanning Electrochemical Microscopy (SECM).” *Electrochemistry Communications* 23(1):102–5.
- Walsh, Darren a, L. Ferna, Janine Mauzeroll, and Allen J. Bard. 2005. “Fabrication and Characterization of Micropipet Probes.” *Analytical chemistry* 77(16):5182–88.
- Walsh, Laurence J. 2012. “The Effects of GC Tooth Mousse on Cervical Dentinal Sensitivity : A Controlled Clinical Trial.” *International Dentistry* 1:4–12.
- Wang, E. et al. 2001. “Transport Properties of the Calcium Ionophore ETH-129.” *Biophysical journal* 81(6):3275–84.
- Wang, John J. and Paul L. Bishop. 2010. “Fabrication, Calibration and Evaluation of a Phosphate Ion-Selective Microelectrode.” *Environmental Pollution* 158(12):3612–17.
- Wang, L., Christine Kranz, and B. Mizaikoff. 2008. “Monitoring Scanning Electrochemical Microscopy Approach Curves with Mid-Infrared Spectroscopy – Towards a Novel Current-Independent Positioning Mode.” *Anal. Chem.* 15(10):1203–14.
- Wang, Zhejun et al. 2010. “Effect of Desensitising Toothpastes on Dentinal Tubule Occlusion: A Dentine Permeability Measurement and SEM in Vitro Study.” *Journal of Dentistry* 38(5):400–410.
- Waszkiel, Danuta, Krystyna Opalko, and Dariusz Chlubek. 2004. “Fluoride and Magnesium Content in Superficial Enamel Layers of Teeth with Erosions.” 37(4):271–77.
- Wei, C., Allen J. Bard, I. Kapui, G. Nagy, and K. Tóth. 1996. “Scanning Electrochemical Microscopy. 32. Gallium Ultramicroelectrodes and Their Application in Ion-Selective Probes.” *Analytical chemistry* 68(15):2651–55.
- Wei, Chang, Allen J. Bard, Geza Nagy, and K. Tóth. 1995. “Scanning Electrochemical Microscopy. 28. Bon-Selective Neutral CarriermBased Microelectrode Potent Iometry.” *Anal. Chem* 67(8):1346–1.
- Wightman, R. Mark. 2006. “Detection Technologies. Probing Cellular Chemistry in Biological Systems with Microelectrodes.” *Science (New York, N.Y.)* 311(5767):1570–74.
- Williams, Cara G., Martin a Edwards, Anna L. Colley, J. V Macpherson, and Patrick R. Unwin. 2009. “Scanning Micropipet Contact Method for High-Resolution Imaging of Electrode Surface Redox Activity.” *Analytical Chemistry* 81(7):2486–95.
- Williams, Cara G., J. V Macpherson, Patrick R. Unwin, and Charles Parkinson. 2008. “Laser Scanning Confocal Microscopy Coupled with Hydraulic Permeability Measurements for Elucidating Fluid Flow across Porous Materials: Application to Human Dentine.” *Analytical sciences : the international journal of the Japan Society for Analytical*

Chemistry 24(4):437–42.

- Wilson, George S. and Michael A. Johnson. 2008. “In-Vivo Electrochemistry: What Can We Learn about Living Systems.” *Chemical Reviews* 108(7):2462–81.
- Wittstock, Gunther, Malte Burchardt, Sascha E. Pust, Yan Shen, and Chuan Zhao. 2007. “Scanning Electrochemical Microscopy for Direct Imaging of Reaction Rates.” *Angewandte Chemie - International Edition* 46:1584–1617.
- Xu, Zhang, Koon Gee Neoh, and Anil Kishen. 2008. “Monitoring Acid-Demineralization of Human Dentine by Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS).” *Journal of Dentistry* 36(12):1005–12.
- Yang, Xi et al. 2011. “Investigation of Morphological and Functional Changes during Neuronal Differentiation of PC12 Cells by Combined Hopping Probe Ion Conductance Microscopy and Patch-Clamp Technique.” *Ultramicroscopy* 111(8):1417–22.
- Yasukawa, Tomoyuki, Takatoshi Kaya, and Tomokazu Matsue. 1999. “Imaging of Photosynthetic and Respiratory Activities of a Single Algal Protoplast by Scanning Electrochemical Microscopy.” *Chemistry Letters* 71(20):975–76.
- Yasukawa, Tomoyuki, Takatoshi Kaya, and Tomokazu Matsue. 2000. “Characterization and Imaging of Single Cells with Scanning Electrochemical Microscopy.” *Electroanalysis* 12:653–59.
- Yoon, Young Hwan et al. 2007. “A Nanometer Potential Probe for the Measurement of Electrochemical Potential of Solution.” *Electrochimica Acta* 52:4614–21.
- Zhang, Bo et al. 2007. “Bench-Top Method for Fabricating Glass-Sealed Nanodisk Electrodes, Glass Nanopore Electrodes, and Glass Nanopore Membranes of Controlled Size.” *Analytical Chemistry* 79(13):4778–87.
- Zhang, Meiqin and Hubert H. Girault. 2007. “Fingerprint Imaging by Scanning Electrochemical Microscopy.” *Electrochemistry Communications* 9:1778–82.
- Zhang, Xiaoli, Xuewei Peng, and Wenrui Jin. 2006. “Scanning Electrochemical Microscopy with Enzyme Immunoassay of the Cancer-Related Antigen CA15-3.” *Analytica Chimica Acta* 558:110–14.
- Zhao, Gang, Dean M. Giolando, and Jon R. Kirchhoff. 1995. “Carbon Ring - Disk Ultramicroelectrodes.” 67(8):5537–41.
- Zoski, C. .. 2002. “Ultramicroelectrodes: Design, Fabrication, and Characterization.” *Electroanalysis* 14:1041–51.
- Zuliani, Claudio, Robert J. Forster, and Tia E. Keyes. 2010. “Nano- and Micro- Electrodes: Applications in the Biosensing Field.” *Chemical Sciences* 242.

Súmula Curricular

1. DADOS PESSOAIS

Pollyana Souza Castro

Local e data de Nascimento: Juiz de Fora, Minas Gerais – 23/02/1987

2. EDUCAÇÃO

09/2011-12/2015 - Doutorado em Química

Departamento de Química Fundamental – Instituto de Química

Universidade de São Paulo, USP, Brasil

Orientador: Mauro Bertotti

Grupo de pesquisa: Laboratório de Sensores Eletroquímicos e Métodos Eletroanalíticos

Bolsista do (a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP

11/2013-11/2014 - Estágio de doutorado sanduíche

Chemistry Department

Warwick University, Reino Unido

Orientador no Exterior: Patrick R. Unwin

Grupo de pesquisa: Warwick Electrochemistry and Interfaces Group

Bolsista do (a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq.

09/2009 -09/2011 - Mestrado em Química Analítica

Departamento de Química Fundamental – Instituto de Química

Universidade de São Paulo

Orientador: Mauro Bertotti

Grupo de pesquisa: Laboratório de Sensores Eletroquímicos e Métodos Eletroanalíticos

Bolsista do (a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- CNPq.

03/2005- 07/2009 – Graduação em Química (Bacharelado e Licenciatura)

Universidade Federal de Juiz de Fora

Departamento de Química - Instituto de Ciências Exatas

Orientador: Renato Camargo Matos

Grupo de pesquisa: Laboratório de Análise Instrumental

Bolsita do: Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica do CNPq – PIBIC/CNPq.

3. FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2013 Introdução Matlab (Carga horária: 4h) Warwick University, Reino Unido

2011 Microondas para o preparo de amostras. (Carga horária: 8h).Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

2007 Fundamentos de Espectroscopia Molecular. (Carga horária: 12h).Universidade Federal de Juiz de Fora, UFJF, Brasil.

2006 Desinfecção química de água. (Carga horária: 4h) Universidade Federal de Juiz de Fora, UFJF, Brasil

4. PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Cardoso, M. B. T.; Lewis, E.; **Castro, P. S.**; Dantas, L. M. F.; Oliveira, C. C. S.; Bertotti, M.; Camargo, P. H. C.; A Facile Strategy to Support Palladium Nanoparticles on Carbon Nanotubes, Employing Polyvinylpyrrolidone as a Surface Modifier. *European Journal of Inorganic Chemistry*, v. 2014, p. 1439-1445, 2014.

Dantas, L. M. F ; Millaray, C. R. P.; **Castro, P. S.**; Bertotti, M.; Amperometric determination of hydrogen peroxide using a copper microelectrode. *Analytical Methods*, v. 6, p. 2112, 2014.

Reis, R. M.; Valim, R. B.; Rocha, R. S.; Lima, A. S.; **Castro, P. S.**; Bertotti, M.; Lanza, M.R.V. The use of copper and cobalt phthalocyanines as electrocatalysts for the oxygen reduction reaction in acid medium. *Electrochimica Acta*, v. 139, p. 1-6, 2014.

Valim, R. B.; Reis, R. M.; **Castro, P. S.**; Lima, A. S.; Rocha, R. S.; Bertotti, M.; Lanza, M. R.V.; Electrogenation of hydrogen peroxide in gas diffusion electrodes modified with tert-butyl-anthraquinone on carbon black support. *Carbon* , v. 61, p. 236-244, 2013.

Dantas, L. M. F.; De Souza, A. P. R.; **Castro, P. S.**; Paixão, T. R. L. C.; Bertotti, M.; SECM Studies on the Electrocatalytic Oxidation of Glycerol at Copper Electrodes in Alkaline Medium. *Electroanalysis*, v. 24, p. 1778-1782, 2012.

Castro, P. S.; Dantas, L. M. F.; Nishida, A. C.; Francci, C. E.; Bertotti, M.; Probing the Enamel Topography After Acid Erosion by Scanning Electrochemical Microscopy. *International Journal of Electrochemical Science*, v. 7, p. 12720-12729, 2012.

Castro, P. S.; Lima, A. S.; Ferreira, T. L.; Bertotti, M.; Scanning Electrochemical Microscopy as a Tool for the Characterization of Dental Erosion. *International Journal of Electrochemistry*, v. 2011, p. 1-6, 2011.

5. CONTRIBUIÇÕES RELEVANTES EM CONFERÊNCIAS CIENTÍFICAS

Castro, P. S. Miyahara, M. Y., Petri, D. F. S. Bertotti, M.; Flux of calcium ions through hybrid xanthan/magnetite membranes detected by potentiometric measurements using ion selective membrane microelectrodes (ISME). XX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2015, Uberlândia.

Castro, P. S.; Bertotti, M. Estudo do transporte de materiais através de dentina utilizando Microscopia Eletroquímica de Varredura. XIX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2013, Campos do Jordão.

Castro, P. S.; Nishida, A. C.; Francci, C. E.; Bertotti, M.; Avaliação das mudanças topográficas do esmalte dentário após erosão em ácido cítrico utilizando Microscopia Eletroquímica de Varredura. 35ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2012, Águas de Lindóia.

Castro, P. S.; Nishida, A. C.; Dantas, L. M. F.; Francci, C. E.; Bertotti, M.; Probing the enamel topography after acid erosion by SECM. 63rd Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, 2012, Praga.

Dantas, L. M. F.; **Castro, P. S.**; Souza, A. P. R.; Bertotti, M.; SECM Studies on the Electrocatalytic Oxidation of Glycerol at Copper Electrodes in Alkaline Medium. 63rd Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, 2012, Praga.

Souza, A. P. R.; **Castro, P. S.**; Dantas, L. M. F.; Bertotti, M.; Using SECM to investigate the deposition of toner masks onto gold surfaces. 63rd Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, 2012, Praga.

Lima, A. S.; Salles, M. O.; **Castro, P. S.**; Ferreira, T. L.; Bertotti, M.; SECM Characterization of Cu(I) Formation During the Anodic Dissolution of Copper in Acidic Medium. Pittsburg Conference & Expo 2011, Atlanta, GA, EUA.

Dantas, L. M. F.; **Castro, P. S.**; Souza, A. P. R.; Bertotti, M.; Determinação de glicerol em biodiesel utilizando microeletrodos de cobre. XVIII SIBEE- Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2011, Bento Gonçalves.

Souza, A. P. R.; Dantas, L. M. F.; **Castro, P. S.**; Bertotti, M.; Determinação de Pb(II) em amostras de lágrima. XVIII SIBEE- Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2011, Bento Gonçalves.

Castro, P. S.; Dantas, L. M. F.; Bertotti, M.; Fabricação de microeletrodos para aplicações no estudo processo de erosão dentária utilizando SECM. XVIII SIBEE- Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2011, Bento Gonçalves.

Castro, P. S.; Lima, A. S.; Ferreira, T. L.; Bertotti, M.; Uso da microscopia eletroquímica de varredura (SECM) no monitoramento do consumo de íons H^+ em dentes. 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2010, Águas de Lindóia.

Castro, P. S.; Silvia, V. L.; Matos, M. A. C.; Matos, R. C.; Extração da enzima ascorbato oxidase do *Cucumis sativus* para a determinação amperométrica de ácido ascórbico em mel. 15º ENQA e 3º CIAQA 2009, Salvador.

Castro, P. S.; Semaan, F. S.; Lowinsohn, D.; Determinação rápida de etambutol em amostras farmacêuticas por voltametria de onda quadrada empregando eletrodo compósito. 15º ENQA e 3º CIAQA 2009, Salvador.

Delage, D. T.; Ferreira, L. M. C.; **Castro, P. S.**; Matos, R. C.; Avaliação dos níveis de Cu, Pb e Cd por redissolução potenciométrica (PSA) em amostras de mel. 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008, Águas de Lindóia.

6. ARTIGOS EM FASE DE SUBMISSÃO

Castro, P. S.; Al Botros, R., Nadappuram, B. P.; Colburn, A. W., Bertotti, M. and Unwin, P. R.; Dual Functional Ion Selective Microelectrode - Scanning Ion Conductance Microscopy (ISME-SICM) Probe: Fabrication and Characterization; Enviado para *Analytical Chemistry*.

Souza, A. P. R.; Felix, F. S.; **Castro, P. S.**; Angnes, L.; Bertotti, M. Gold random microarrays: Design, characterization and Amperometric determination of ciclopirox olamine in pharmaceutical products. Enviado para *Analytical Methods*.