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

POLLYANA SOUZA CASTRO

**Fabricação de Microeletrodos para Aplicações em
Microscopia Eletroquímica de Varredura**

Versão Corrigida da Dissertação

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
01/08/2011

POLLYANA SOUZA CASTRO

**Fabricação de Microeletrodos para Aplicações em
Microscopia Eletroquímica de Varredura**

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

Orientador: Prof. Dr. Mauro Bertotti

São Paulo

2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

**“Fabricação de microeletrodos para aplicações
em microscopia eletroquímica de varredura”**

POLLYANA SOUZA CASTRO

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências - Programa: Química.

Aprovado (a) por:

Prof. Dr. Mauro Bertotti
(Orientador e Presidente)

Prof. Dra. Silvia Helena Pires Serrano
IQ - USP

Prof. Dr. Hugo Barbosa Suffredini
UFABC

SÃO PAULO
19 de agosto de 2011

*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 ter me ensinado a ser uma pessoa forte igual a você. Pai, obrigada por sempre acreditar nos meus sonhos e me apoiar em todas as minhas decisões.

À minha irmã Patricia por todos os momentos vividos e por todo aprendizado que me proporcionou. Obrigada pelo presente mais valioso, o Arthur.

Ao Prof. Dr. Mauro Bertotti por ser uma pessoa brilhante e um orientador sempre presente.

À Prof^a. Dr^a. Silvia Serrano e ao Prof. Dr. Jairo Pedrotti por participarem do meu exame de qualificação e contribuir com este trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Maria Cecília B. S. Salvadori, pela ajuda com os experimentos de Microscopia de Força Atômica.

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Francci e ao Alexander Cassandri Nishida da Faculdade de Odontologia da USP por toda ajuda e ensinamentos.

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 por me estimular e me apoiar na decisão de morar e estudar em São Paulo.

A todos os professores do IQ-USP. Em especial ao Prof. Dr. Lúcio Angnes, Prof. Dr. Ivano Gutz, Prof^a. Dr^a. Silvia Serrano e Prof. Dr. Pedro Vitoriano de Oliveira pelos ensinamentos nas disciplinas.

A todos os funcionários do IQ-USP. Em especial, agradeço aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação, Cibele, Emiliano, Milton e Marcelo e às queridas técnicas Cristina e Lúcia por todo apoio.

Aos amigos do Laboratório de Sensores Eletroquímicos e Métodos Eletroanalíticos (LSEME): Ana, Alex, Áurea, Capeta, Luiza, Maiara, Roselyn e Juan pela convivência e ajuda durante estes dois anos.

Aos amigos e ex-membros do LSEME: André, Prof^a. Dr^a. Juliana Naozuka, Dr^a. Helena Junqueira. Em especial agradeço aos professores Tiago Ferreira (Pé) e Thiago Paixão por toda ajuda, atenção e amizade.

Aos Amigos do Laboratório de Automação e Instrumentação Analítica (LAIA), Laboratório de Preparo de Amostras e de Espectrometria Atômica (LPAEA), Laboratório de Materiais Eletroativos (LME), Laboratório de Cromatografia e Eletroforese Capilar (LACE), Laboratório de Análise em Fluxo (LAF), ao Grupo de Bioeletroanalítica e Bioeletroquímica e ao Grupo de Química Supramolecular e Nanotecnologia. Agradeço pelos favores, pelas festas, pelas conversas de corredor e pelas amizades que fiz.

Ao meu segundo pai Sérgio Murilo, por sempre me apoiar nos estudos e por sempre ajudar minha família.

Ao Vovito Sergio Fouraux e às minhas queridas madrinhas Lucilene e Vera.

À minha prima Márcia por me entender sempre e por sonhar junto comigo.

Aos meus tios Bim (*in memorian*) e Cida por serem pessoas maravilhosas e por sempre acreditarem nos meus sonhos.

Ao amigo querido Luis, que desde a primeira semana de faculdade se mostra como um companheiro incrível, bom ouvinte e super inteligente. Obrigada por toda ajuda e apoio nos momentos que mais precisei. Obrigada pelos ótimos momentos que passamos em inúmeras situações. Adoro nossa amizade. E que venham muitos anos juntos.

À querida Mary pelos anos de convivência, pela amizade e pelas inúmeras baladas. Estaremos sempre juntas amiga.

À amiga querida Luana que mesmo longe continua sendo muito especial e importante. Conviver com você na graduação foi simplesmente bom demais.

Ao amigo Del pessoa inexplicável em minha vida e à querida amiga Gy, cativante e simplesmente nota 10. Sem vocês, São Paulo teria sido muito mais difícil.

Ao Dr. Victor Hugo e a Dr^a. Cristiane por todo carinho, ajuda e amizade.

Aos amigos de Juiz de Fora: Claudia, Bê, Cezar, Raphael Alvim, Vituxo, Clarinha, Mafra, Shrek, Sabrina, Glaucia, Dil, Maryana, Guilherme, Rafael Rangel, George e Helôuka.

Aos primos queridos: Maycon, Fael, Edim, Fabi, Thati, Marcelo e aos meus tios Zé e Guta.

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa Científica de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro.

Muito Obrigada!

*“Ah! Se o mundo inteiro me pudesse ouvir.
Tenho tanto pra contar, dizer que aprendi.”*

Tim Maia

*“Aprendi com as primaveras a me deixar cortar
para voltar sempre inteira”*
Cécília Meireles

RESUMO

Castro, P. S. **Fabricação de Microeletrodos para Aplicações em Microscopia Eletroquímica de Varredura**. 2011. 95p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências (Química). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

No presente trabalho, microeletrodos de platina foram fabricados e empregados juntamente com a técnica de Microscopia Eletroquímica de Varredura (*Scanning Electrochemical Microscopy* - SECM) para a obtenção de informações a respeito da erosão ácida do esmalte dentário. Em uma etapa inicial do projeto, um procedimento de fabricação de microeletrodos utilizando o equipamento *Micropipette Puller* foi desenvolvido. A selagem e o polimento da área ativa dos dispositivos foram consideradas etapas críticas do processo de construção. Uma bomba a vácuo foi empregada durante a fabricação dos dispositivos, o que aumentou a eficiência da selagem do vidro sobre a microfibras. Os parâmetros do equipamento necessários à fabricação dos dispositivos foram otimizados e desta forma obteve-se uma metodologia reprodutível e eficiente. Assim, microeletrodos de diversos materiais e dimensões foram construídos e avaliados quanto à utilização em SECM. Uma metodologia alternativa para a redução no tamanho da ponta de prova foi proposta. Um polimento cuidadoso na ponta de prova foi feito e através de comparações entre Curvas de Aproximação teóricas e experimentais, chegou-se a microeletrodos com RG (razão raio do vidro e raio do microeletrodo) próximos de 15. Em uma segunda etapa do projeto, a erosão ácida do esmalte dentário foi investigada utilizando SECM. Empregando um microeletrodo de platina, foram obtidas imagens SECM que revelaram haver um intenso consumo de íons hidrogênio na interface esmalte dentário-solução ácida. Isso ocorre devido à reação de desmineralização da camada protetora do dente, sendo comprovado que este processo é relativamente rápido. Imagens SECM também mostraram diferenças topográficas do esmalte dentário e, desta forma, após um intenso processo de desmineralização ácida, a SECM foi utilizada para estimar a espessura da camada de esmalte erodida. Com o auxílio das Curvas de Aproximação concluiu-se que, após 48 horas de exposição, a camada de esmalte erodida foi de 18 μm e após 96 horas a espessura da camada erodida aumentou para 25 μm . Microscopia de Força Atômica também foi utilizada para visualização das mudanças morfológicas após o esmalte permanecer em contato com diferentes bebidas de elevada acidez. Desta forma, pode-se concluir que em longo prazo o esmalte dentário pode ser removido devido ao contato com substâncias ácidas, expondo a dentina ao ambiente bucal e gerando problemas de hipersensibilidade dentária.

Palavras-chave: microeletrodos, SECM, erosão ácida, esmalte dentário.

ABSTRACT

Castro, P. S. Fabrication of Microelectrodes for Applications in Scanning Electrochemical Microscopy. 2011. 95p. Masters Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

In this study, platinum microelectrodes were fabricated with a Micropipette Puller and used in Scanning Electrochemical Microscopy (SECM) to obtain information on the acid erosion of tooth enamel. The sealing and polishing of the active area of the fabricated devices are considered critical steps in the construction process, hence a vacuum pump was used to enhance the efficiency of the seal of the glass microfiber. The parameters of the equipment were optimized allowing a reproducible and efficient method to be developed. Thus, microelectrodes of various materials and dimensions were constructed and evaluated for use in SECM. An alternative method for reducing the size of the probe was also proposed. A careful polishing of the probe was done and by comparing theoretical and experimental approach curves, microelectrodes with RG values near to 15 were obtained. The acid erosion of dental enamel was investigated using SECM and a platinum microelectrode as a probe to H^+ ions. The obtained images revealed a significant and relatively fast consumption of H^+ ions at the interface enamel-acid solution, as a consequence of the demineralization reaction of the protective layer. SECM images also showed topographical differences with respect to the tooth enamel and after an exhaustive process of acid demineralization, the thickness of the layer of eroded enamel was estimated. By using approach curves it was concluded that the thickness of the eroded enamel layer was around 18 μm after 48 hours of exposure, this value being enhanced to 25 μm after 96 hours. Atomic Force Microscopy was also used to confirm the morphological changes after exposing the enamel to different beverages with high acidity. Accordingly, one can conclude that the acid erosion of enamel exposes the dentin to the oral environment and creates problems associated with dental hypersensitivity.

Keywords: microelectrodes, SECM, acid erosion, dental enamel

Sumário

1. Introdução	13
1.1. Microeletrodos	14
1.2. Microscopia Eletroquímica de Varredura	22
1.2.1. Modos amperométricos de operação utilizados em SECM	24
1.2.1.1. Feedback mode	24
1.2.1.2. Generation- collection mode	29
1.2.2. Aquisição de imagens utilizando SECM	30
1.3. Aplicações utilizando SECM	32
1.3.1. SECM como ferramenta para investigação de processos químicos em dentes	33
1.3.2. SECM como ferramenta para a caracterização da erosão ácida do esmalte dentário	35
2. Objetivos	37
2.1. Objetivo Principal	37
2.2. Objetivos específicos	37
3. Parte Experimental	38
3.1. Reagentes e soluções	38
3.2. Instrumentação	38
3.3. Obtenção e preparo das amostras de dentes	39
3.3.1. Estudo da erosão ácida do esmalte dentário utilizando SECM	40
3.3.2. Estudo da erosão ácida do esmalte dentário utilizando AFM	40
4. Resultados e discussões	41
4.1. Fabricação de microeletrodos	41
4.1.1. Verificação do contato elétrico	48
4.1.2. Verificação do funcionamento do microeletrodo fabricado utilizando <i>Micropipette Puller</i>	50
4.1.3. Verificação da metodologia desenvolvida para a fabricação de microeletrodos utilizando <i>Micropipette Puller</i>	52
4.1.4. Estudo da variação da velocidade de varredura de macro e microeletrodos de platina	54
4.1.5. Determinação do RG de microeletrodos	57
4.2. Estudo do posicionamento do microeletrodo na formação da imagem SECM	59
4.3. Estudo da erosão ácida do esmalte dentário utilizando SECM	64
4.3.1. Resposta do microeletrodo de Platina a íons H^+	64
4.3.2. Perfis de concentração	65
4.3.3. Imagens SECM	67
4.3.4. Estudo da espessura de camada de esmalte dentário erodida utilizando SECM	74
4.4. Microscopia de força atômica aplicada no estudo da erosão ácida do esmalte dentário	78
5. Conclusões	83
6. Estudos Futuros	85
6.1. SECM aplicada no estudo da eficiência no bloqueio dos túbulos dentários	85

6.2. SECM aplicada no mapeamento do fluxo de H_2O_2 em dentes	86
7. Referências Bibliográficas	87
Súmula Curricular	i

1. Introdução

A química tem sido de grande importância em diferentes áreas da ciência e tecnologia, possuindo grande atuação no controle de processos industriais, no monitoramento ambiental e em diferentes aplicações na medicina e biotecnologia (Stuart; Sweedler, 2003). Na química analítica, o desenvolvimento de sensores eletroquímicos que possam gerar informações de maneira simples, rápida e confiável para o monitoramento de espécies químicas vem evoluindo de maneira acentuada (Lowinsohn; Bertotti, 2006). Dependendo do tipo de informação requerida, esta pode ser obtida na forma de imagens resolvidas no espaço e no tempo, desde que a escala de tempo da propagação dos eventos seja compatível com a velocidade de medição da técnica empregada. Isto é particularmente possível utilizando sensores eletroquímicos, pois o sinal medido é função da velocidade de processos de transferência eletrônica e de massa, os quais são relativamente rápidos e podem ser significativamente acelerados trabalhando-se em condições experimentais apropriadas.

Uma tendência da ciência contemporânea é a miniaturização dos sistemas analíticos, a qual tem sido muito estudada em áreas de instrumentação e automação. Vantagens como portabilidade, baixo consumo de reagentes e amostras e elevada frequência analítica podem ser citadas ao se empregar tais dispositivos miniaturizados, tornando sua utilização adequada às exigências da sociedade moderna (Manz; Graber *et al.*, 1990; Simonet; Valcarcel, 2006).

1.1. Microeletrodos

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, 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 (Correia; Mascaro *et al.*, 1995).

O primeiro trabalho de relevância empregando microeletrodos foi publicado na década de 40. Neste trabalho, um microdisco de platina com raio de 15 μm foi utilizado para a realização de medidas de concentração de oxigênio em tecidos musculares (Davies; Brink, 1942). Posteriormente, nas décadas de 70 e 80 surgiram novos métodos de fabricação de microeletrodos com diferentes geometrias, tamanhos e materiais (Adams, 1976; Wightman, 1981; Hepel; Osteryoung, 1982; Ewing; Bigelow *et al.*, 1983; White; Stclair *et al.*, 1986). Embora as técnicas de fabricação de microeletrodos já sejam bem conhecidas, a busca por novas metodologias que visam à melhoria dos resultados eletroanalíticos são bastante exploradas (Paixão; Bertotti, 2009). A Figura 1 mostra o número de artigos publicados nas últimas décadas com base em informações do *ISI Web of Science* no período de 1942-2011, utilizando a palavra de busca “*microelectrode*”.

Figura 1: Número de artigos publicados desde 1942 até maio de 2011 encontrado no banco de dados do portal ISI Web of Science com a palavra chave “microelectrode (adaptado Paixão; Bertotti, 2009).

Pode ser observado que, por volta de 1990, o número de artigos científicos publicados citando o uso destes dispositivos aumentou significativamente. Com isso, pode-se inferir que essa contribuição se deve preferencialmente ao maior domínio sobre as técnicas de fabricação e também a uma melhoria dos equipamentos utilizados, já que estes passaram a medir correntes de baixa magnitude (Correia; Mascaro *et al.*, 1995).

Microeletrodos são sensores químicos com áreas ativas em dimensões micrométricas (Pons; Fleischmann, 1987), fabricados isoladamente ou em arranjos, possuindo as mais variadas configurações. A Figura 2 mostra diferentes geometrias para microeletrodos, as quais são mais encontradas na literatura (Stulik; Amatore *et al.*, 2000).

Figura 2: Geometria de microeletrodos e arranjo de microeletrodo usualmente empregadas na literatura: microdisco (A), microanel (B), arranjo de microdiscos (C), banda (D), microcilíndrico (E), microesfera (F), microhemisfério (G) e arranjo interdigitado (H) (adaptado Zoski, 2007).

No presente trabalho foram fabricados e utilizados microeletrodos na geometria de microdisco. Isso se deve ao fato de que as técnicas de fabricação destes dispositivos são mais simples e estão disponíveis para utilização no grupo de pesquisa (Laboratório de Sensores Eletroquímicos e Métodos Eletroanalíticos - LSEME) e também porque há um maior domínio sobre as equações matemáticas que governam seu comportamento eletroquímico.

A característica que determina o comportamento eletroquímico de um eletrodo é o transporte de massa do seio da solução até a superfície do dispositivo. Quando o potencial em um eletrodo é mudado de uma condição onde não há reação eletródica para outra, na qual uma corrente (catódica ou anódica) é observada, a concentração da espécie eletroativa na superfície do eletrodo se torna zero. Assim, o gradiente de concentração se desenvolve até certa distância da superfície do eletrodo em direção ao seio da solução. Esta distância aumenta com o aumento do tempo de eletrólise e o volume dentro do qual o fluxo difusional da

substância se estabelece é chamado de camada de difusão. A Equação 1 mostra a dependência da espessura da camada de difusão com o tempo (Brett; Brett, 1996).

$$\delta = (\pi Dt)^{1/2} \quad \text{Equação 1}$$

onde: δ = espessura da camada de difusão (cm); π = constante 3,14; D = coeficiente de difusão da espécie eletroativa ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$); t = tempo (s).

Quando a geometria do eletrodo é aproximada para o modelo de um eletrodo plano de largura infinita com o fluxo de espécies eletroativas perpendicular ao plano do eletrodo, o fluxo de material é uniforme em toda a superfície do eletrodo e a concentração da espécie eletroativa atinge o valor da concentração no seio da solução em distâncias relativamente curtas, ou seja, a camada de difusão pode ser considerada muito fina. Entretanto, o fluxo de material não é uniforme quando se limita o tamanho do eletrodo. O fluxo nas bordas é diferente daquele nas regiões mais centrais do eletrodo (efeito de borda). Deste modo, existem dois casos limitantes que estão mostrados na Figura 3. Em A, tem-se o caso em que δ é muito menor que o raio (r) do dispositivo e em B quando δ é muito maior que o raio (r) do dispositivo (Ferreira, 2008).

Figura 3: Representação esquemática dos regimes de difusão em tempos longos: (A) eletrodo de tamanho convencional e (B) microeletrodo (adaptado Ferreira, 2008).

Para $\delta \ll r$, a perturbação do fluxo linear causada pela difusão hemisférica nas bordas do eletrodo se estende por uma distância curta, da mesma ordem de grandeza de δ . Assim, apenas uma pequena extensão da superfície do eletrodo é afetada, e o comportamento do eletrodo pode ser descrito pelo modelo da difusão infinita. Para $\delta \gg r$, o efeito de borda exerce papel predominante e o fluxo difusional é constante com o tempo, porém não é homogêneo por toda a superfície do eletrodo; ele aumenta progressivamente do centro para as bordas do eletrodo (Ferreira, 2008).

Os efeitos descritos acima demonstram que a espessura da camada de difusão depende do tempo. Por esta razão, a diferenciação entre os dois casos acima também é dependente do tempo. Em tempos suficientemente curtos, qualquer eletrodo planar, não importando quão pequeno ele seja (dentro das limitações do modelo de difusão), se comporta como um eletrodo de largura infinita. Em tempos longos, o comportamento do eletrodo gradualmente muda em direção ao segundo caso. De fato, a simples relação entre δ e r é suficiente para descrever o comportamento do eletrodo. Após tempos suficientemente longos, um estado estacionário é estabelecido para eletrodos com algumas geometrias como os de discos, por exemplo. Deste modo, o tempo necessário para que condições de estado estacionário de corrente sejam alcançadas depende das dimensões do eletrodo (Ferreira, 2008).

Para uma definição mais adequada de microeletrodos, é necessário, dentro de uma condição experimental, que a dimensão do microeletrodo seja comparável ou menor que a espessura da camada de difusão. Devido ao transporte de massa mais eficiente atribuído à difusão radial, um imediato perfil de estado estacionário é alcançado. Deste modo, um comportamento eletroquímico diferenciado é obtido com voltamogramas em perfil sigmoidal (Paixão; Bertotti, 2009).

Ao se fabricar tais sensores 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 proporcionalmente 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 também 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 microeletrodos possam ser utilizados como ponta de prova em Microscopia Eletroquímica de Varredura. O rápido alcance do estado estacionário 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 ativa destes dispositivos confere a essa técnica uma considerável resolução espacial.

Microeletrodos podem ser adquiridos comercialmente, porém, a um custo que torna restritiva sua aquisição para uso em atividades de rotina. Assim, é importante desenvolver e dominar novos métodos de construção de microeletrodos, para que estes possam ser utilizados com frequência nos laboratórios de pesquisa (Paixão; Bertotti, 2009). Várias técnicas para a fabricação de microeletrodos de disco estão descritas na literatura, entre elas 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) e deposição química em fase vapor (Bozon; Giolando *et al.*, 2001). Outros métodos para fabricação de microeletrodos são descritos na literatura para utilização em técnicas eletroanalíticas variadas e em diversos microambientes (Burdallo; Jimenez-Jorquera, 2009; Paixão; Bertotti, 2009).

Microeletrodos de disco podem ser ainda fabricados por encapsulamento de uma microfibras em suporte apropriado. Esta técnica emprega uma metodologia de construção mais simples e utiliza um tipo de fibra chamada *Wollaston*, encapsulada em capilares de vidro ou em resinas não condutoras (Silva; Alves *et al.*, 1998).

Para a obtenção de dispositivos que possam ser utilizados em Microscopia Eletroquímica de Varredura é importante que a ponta deste dispositivo, o qual contém o microdisco, também seja microscópica. Para isso, utiliza-se um equipamento chamando *Micropipette Puller*, que possibilita o afinamento de capilares de vidro ao qual está inserida uma microfibras (Shao; Mirkin *et al.*, 1997; Katemann; Schuhmann, 2002).

O maior desafio no campo da fabricação de microeletrodos é a obtenção reprodutível de microdiscos perfeitos. Isso é especificamente difícil quando o raio das microfibras é menor do que 5 μm . O pequeno diâmetro dessas microfibras faz com que elas sejam frágeis à manipulação durante a fabricação. Como alternativa os fabricantes recobrem a microfibras com uma camada de prata, deixando-as mais resistentes. Portanto, para a fabricação destes

dispositivos, uma etapa é adicionada na metodologia de construção, sendo necessária a remoção da camada de prata que recobre a microfibras.

A forma com que a microfibras é encapsulada no material isolante (vidro), o tipo de microfibras, o vidro utilizado e o polimento realizado na superfície do microeletrodo são fatores que determinam a eficiência de fabricação dos dispositivos. A Figura 4 mostra algumas estruturas não ideais que podem ser geradas durante o processo de fabricação de microeletrodos de disco (Zoski, 2007).

Figura 4: Diferentes formas de microeletrodos de disco: (A) microeletrodo em perfeitas condições, (B) microfibras encapsulada com um certo ângulo em relação a parte isolante gerando uma elipse, (C) saliência irregular do microdisco, (D) saliência irregular do isolante, (E) cavidade do isolante maior do que a do microdisco, (F) selagem imperfeita da microfibras no isolante e (G) polimento impróprio fazendo com que a superfície não seja plana (adaptado Zoski, 2007).

Quando a microfibras é selada de maneira conveniente sob o vidro, tem-se como resultado um perfeito microeletrodo de disco como mostrado em A. Se, no entanto, a microfibras for inserida no capilar de vidro formando um ângulo após a selagem, tem-se como resultado um microeletrodo com área eletroativa na forma de elipse, mostrado em B. Numa situação em que o polimento do dispositivo é insuficiente ou o material isolante é mais macio que a microfibras, tem-se um microeletrodo como mostrado em C. Quando o polimento é

insuficiente para desgastar a parte isolante, obtém-se um dispositivo como mostrado em D e E. Se o processo de selagem não for eficiente, ou seja, a temperatura ideal para encapsular a microfibras sobre o vidro não é atingida, microeletrodos como mostrado em F podem ser obtidos (Zoski, 2007). Se o microeletrodo passar pelo processo de polimento e este não for posicionado perpendicularmente à superfície da lixa, obtém-se dispositivos como mostrado em G. Este último caso é determinante para a utilização dos dispositivos em Microscopia Eletroquímica de Varredura. A planaridade entre a superfície do microeletrodo e a superfície do substrato é de fundamental importância para a obtenção das Curvas de Aproximação e também para a aquisição das imagens.

1.2. Microscopia Eletroquímica de Varredura

A construção do primeiro Microscópio Eletroquímico de Varredura surgiu após investigações com um microeletrodo posicionado muito próximo à superfície de um substrato imerso em solução contendo uma substância eletroativa, sendo o termo *Scanning Electrochemical Microscopy* (SECM) criado pelo grupo do Prof. A. J. Bard, na Universidade do Texas, Austin (Bard, A. J.; Fan, F.-R. *et al.*, 1989; Kwak; Bard, 1989b; a; Bard; Denuault *et al.*, 1990). SECM é uma técnica relativamente nova e ainda pouco difundida no Brasil. Embora possua menor resolução espacial em comparação com técnicas como AFM e SEM (Bottomley; Coury *et al.*, 1996), esta técnica preenche uma lacuna importante no que tange às investigações sobre a reatividade química de superfícies frente a uma espécie mediadora (Neufeld; O'mullane, 2006). Isso se deve ao fato de haver interação da espécie ou superfície investigada com o microeletrodo, sendo que diferentes modos para a aquisição das medidas eletroquímicas podem ser empregadas, mudando apenas a configuração do microeletrodo (Mirkin; Horrocks, 2000). Portanto, a SECM pode ser utilizada para o estudo de processos eletródicos com êxito em vários tipos de aplicações. Por exemplo, podem ser obtidas

informações localizadas sobre as propriedades químicas, eletroquímicas, bioeletroquímicas, cinéticas e topográficas das interfaces em estudo (Bard, A. J.; Fan, F.-R. *et al.*, 1989; Bard; Denuault *et al.*, 1990; Zhou; Shiku *et al.*, 2001). Superfícies sólidas contendo metais como ouro (Coates; Cabet *et al.*), platina (Rodriguez-Lopez; Minguzzi *et al.*, 2010) ou polímeros (Ghilane; Martin *et al.*, 2009) e membranas biológicas podem ser empregadas como substrato (Bath; Scott *et al.*, 2000), assim como alguns líquidos e óleos que formam fases (Barker; Gonsalves *et al.*, 1999b). A representação esquemática do equipamento está mostrada na Figura 5.

Figura 5: Representação esquemática de um Microscópio Eletroquímico de Varredura (adaptado Mirkin; Horrocks, 2000).

Cada componente do equipamento SECM exerce uma função que é de fundamental importância para o seu funcionamento. Como pode ser observado na Figura 5, o substrato e o microeletrodo (eletrodo de trabalho, também chamado de ponta de prova) são partes da célula eletroquímica que contém ainda o eletrodo de referência e o eletrodo auxiliar. Todo este conjunto está imerso em solução contendo um eletrólito suporte apropriado. O deslocamento

da ponta de prova é feito com relação ao substrato, que pode ser polarizado ou não, dependendo de suas propriedades (condutor ou isolante). De acordo com o experimento, a espécie eletroativa a ser monitorada pelo microeletrodo pode ser fornecida pela solução ou pelo substrato. Um componente importante do equipamento é o sistema de posicionamento piezoelétrico, que desloca o microeletrodo nas direções x , y e z , com velocidade constante na ordem de $\mu\text{m s}^{-1}$. Pode-se aplicar um potencial somente no microeletrodo ou em ambos, substrato e microeletrodo. Assim, um bipotenciostato é empregado para controlar os potenciais aplicados tanto na ponta de prova quanto no substrato *versus* eletrodo de referência. É essencial que o equipamento seja capaz de fazer medidas de baixas correntes, uma vez que são utilizados microeletrodos. O computador controla o posicionamento do microeletrodo nos três eixos cartesianos e envia os comandos para que seja feita a aquisição e processamento dos dados.

1.2.1. Modos amperométricos de operação utilizados em SECM

As correntes medidas no microeletrodo e no substrato são funções de parâmetros como distância microeletrodo-substrato e potenciais aplicados tanto na ponta de prova quanto no substrato. SECM pode ser utilizada em diferentes modos de operação, sendo os mais empregados o *feedback mode*, *generation-collection mode* e *redox competition* (Kwak; Bard, 1989b; Mirkin; Horrocks, 2000; Karnicka; Eckhard *et al.*, 2007; Lu; Wang *et al.*, 2007).

1.2.1.1. "Feedback mode"

Quando o equipamento é operado no *feedback mode*, uma corrente resultante de processos faradaicos que ocorrem com espécies eletroativas (mediador redox) deliberadamente adicionadas à solução ou provenientes do substrato é observada. Essa

corrente monitorada no microeletrodo é função da composição da solução, da natureza do substrato e da distância entre sensor e substrato. Neste modo de operação, um microeletrodo é polarizado em um potencial adequado para que ocorra uma reação e posicionado próximo a um substrato onde ambos são imersos em solução contendo um mediador redox apropriado, por exemplo, em sua forma oxidada (O) que possa ser reduzida (R) de maneira reversível (Kwak; Bard, 1989b; Wittstock; Burchardt *et al.*, 2007)

A corrente medida pelo microeletrodo depende tanto da distância entre sensor e substrato quanto da natureza desta superfície. A Figura 6 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).

Figura 6: Comportamento da corrente monitorada pelo microeletrodo quando o mesmo está a uma distância infinita do substrato em (A), quando esta próximo de um substrato condutor (polarizado ou não polarizado) em (B) e quando esta próximo de um substrato isolante em (C) (adaptado Mirkin; Horrocks, 2000).

De acordo com a Figura 6 (A), quando o microeletrodo está afastado do substrato, considerando uma distância infinita ($d > 10 r$), a corrente limite monitorada ($i_{\text{solução}}$) 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. Quando o microeletrodo está próximo do substrato ($d < 2r$) têm-se duas situações distintas dependendo da natureza do substrato. Quando a superfície do substrato é condutora, como mostrado na Figura 6 (B), o produto formado (O) na superfície do microeletrodo difunde para a superfície do substrato, ocorrendo a reação reversa com regeneração da forma reduzida (R). Esse fenômeno proporciona uma retroalimentação devido aos inúmeros ciclos redox, gerando assim um aumento na corrente medida (i). Desta forma, a corrente monitorada próximo a essa superfície é maior do que a corrente monitorada a distâncias infinitas ($i > i_{solução}$). Este fenômeno é denominado de *positive feedback* (Bard, A. J.; Fan, F. R. F. *et al.*, 1989; Kwak; Bard, 1989b).

Quando se aproxima o microeletrodo à superfície de um substrato isolante, como mostrado na Figura 6 (C), a chegada de espécies eletroativas até a superfície do microeletrodo fica limitada, ocorrendo o fenômeno de bloqueio de sua área ativa. Assim, a corrente monitorada bem próxima a essa superfície isolante é menor do que a corrente medida a distâncias infinitas ($i < i_{solução}$), sendo este fenômeno denominado de *negative feedback* (Bard, A. J.; Fan, F. R. F. *et al.*, 1989; Wipf; Bard, 1991).

Os valores de corrente monitorados durante esses processos podem ser medidos em função da posição do microeletrodo na direção z , quando movido perpendicularmente desde uma distância infinita até a superfície do substrato. Neste caso, temos o que é denominado de Curva de Aproximação, como mostrado na Figura 7. O gráfico de uma curva de aproximação mostra a relação da corrente monitorada no microeletrodo (i), em função da distância entre a ponta de prova e o substrato (d).

Figura 7: Curvas de aproximação teórica para negative feedback em (A) e positive feedback em (B) (adaptado Zoski, 2007).

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:

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

onde: i = corrente monitorada pelo microeletrodo durante a aproximação (A); $i_{\text{solução}}$ = corrente monitorada à distância infinita do substrato (A); d = distância relativa microeletrodo-substrato (μm); r = raio do microeletrodo (μm).

Curvas de Aproximação permitem avaliar as características geométricas da ponta de prova e obter, com considerável precisão, a distância (d) entre o substrato e o microeletrodo, desde que se conheça o raio do dispositivo. O forte efeito que a superfície (condutora ou isolante) próxima do microeletrodo exerce na corrente controlada por difusão permite que

estes parâmetros possam ser determinados (Zoski, 2007). Adicionalmente, as Curvas de Aproximação podem produzir informações sobre o perfil de concentração, reatividade da superfície do substrato e distância ponta de prova-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 de microeletrodos. 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 2 e mostrado na Figura 8.

$$RG = \frac{r_{\text{vidro}}}{r_{\text{microeletrodo}}} \quad \text{Equação 2}$$

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

Figura 8: Representação esquemática da relação entre raio do vidro e raio do microeletrodo.

A Figura 9 apresenta as Curvas de Aproximação para *negative feedback* e *positive feedback* simuladas com dados descritos na literatura para diferentes valores de RG (Amphlett; Denuault, 1998).

Figura 9: Curvas de aproximação teóricas para *negative feedback* em (A) e *positive feedback* em (B) para diferentes valores de RG (Amphlett; Denuault, 1998).

Como pode-se observar, Curvas de Aproximação para *negative feedback* são altamente influenciadas pelo parâmetro RG . Isso ocorre devido ao fenômeno de bloqueio da ponta de prova ser mais significativo do que o fenômeno de retroalimentação em curvas para *positive feedback*. Observa-se que quanto menor o valor deste parâmetro, mais brusco é o decaimento da corrente monitorada quando 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).

1.2.1.2. Generation- collection mode

O modo *generation-collection* é uma variação do modo *feedback*, mas necessariamente trabalha-se com um substrato polarizado. Esta modalidade muitas vezes expande a aplicabilidade da técnica em uma vasta gama de aplicações (Mauzeroll; Buda *et al.*, 2002; Fernandez; Bard, 2003). Neste modo, o coletor trabalha como um sensor amperométrico que coleta os produtos formados na superfície do gerador. Existem duas

modalidades distintas de operação, *tip generation-substrate collection mode* e *substrate generation-tip collection mode*. No primeiro modo, 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 à reações eletródicas, pois o fator de coleta vai depender da distância entre microeletrodo-substrato e da cinética da reação química (Fernandez; Bard, 2004; Sanchez-Sanchez; Rodriguez-Lopez *et al.*, 2008). Como a área do “coletor” é muito maior, a eficiência de coleta é, via de regra, unitária desde que a espécie gerada seja estável.

No segundo modo de operação, quando o microeletrodo é o “coletor” e o substrato o “gerador”, obtêm-se dados sobre o perfil de concentração da espécie produzida no substrato. Para isso, pode-se variar a posição do microeletrodo no eixo z ou sobre as zonas reativas na superfície do substrato, mapeando com o microeletrodo nos eixos x e y . Estes modos de operação são bem explorados em estudos cinéticos com eletrodos contendo filmes depositados, para a obtenção de informações sobre cinética de transferência eletrônica, em investigações sobre os mecanismos de reação, na determinação de coeficientes de difusão, entre outros (Bertoncello; Ciani *et al.*, 2006; McKay; Lesuer, 2008; Rodriguez-Lopez; Alpuche-Aviles *et al.*, 2008; Tenent; Wipf, 2009).

1.2.2. Aquisição de imagens utilizando SECM

O princípio de funcionamento do Microscópio Eletroquímico de Varredura para a aquisição de imagens envolve primeiramente a fixação do sensor a uma distância geralmente da ordem de 2 a 30 μm do substrato para que sua superfície possa ser mapeada. Tal distância é determinada utilizando Curvas de Aproximação, que permitem obter o ponto no qual a distância entre o microeletrodo e o substrato é zero ou muito próxima deste valor. Em seguida, com o auxílio do sistema de posicionamento é selecionada a distância que o experimento será realizado. A resolução espacial das imagens obtidas utilizando SECM é

fortemente influenciada pelo tamanho da ponta de prova e também pela distância entre o microeletrodo e a superfície da amostra.

No equipamento utilizado no presente trabalho, existem diferentes modos de varredura da ponta de prova sobre a superfície do substrato. A Figura 10 mostra o modo de varredura *meander* o qual foi utilizado para a aquisição das imagens SECM. O sistema de posicionamento desloca o microeletrodo na direção x , geralmente o deslocamento é duas vezes o raio do microeletrodo utilizado. Em seguida, a ponta de prova fica estática e após alguns milissegundos (ms) é feita a medida de corrente referente àquele local. Ao final de cada linha o microeletrodo se desloca na direção y de modo a obter imagens em três dimensões, sendo x e y as posições relativas do microeletrodo e z a corrente monitorada pela ponta de prova (Bard; Fan *et al.*, 1994; Mirkin, 1996; Barker; Gonsalves *et al.*, 1999a; Bard; Mirkin, 2001). Deste modo, informações sobre a topografia, consumo ou geração de espécies, reatividade e permeabilidade de uma dada superfície podem ser obtidas (Mirkin, 1996; Edwards; Martin *et al.*, 2006).

Figura 10: Representação esquemática do modo de varredura (*meander*) utilizado para obtenção de imagens SECM.

1.3. Aplicações utilizando SECM

A Microscopia Eletroquímica de Varredura possui diversas aplicações em uma variedade de áreas. A técnica tem se tornado uma poderosa ferramenta para investigações quantitativas de processos físico-químicos interfaciais. Como exemplo, podemos citar a obtenção de informações a respeito da topografia de superfícies (Neufeld; O'mullane, 2006), da reatividade de interfaces sólidas-líquidas (Barker; Gonsalves *et al.*, 1999b), estudos de processos interfaciais em nível local, incluindo constante de velocidade de transferência de elétrons (Liu; Bard *et al.*, 2005), atividade enzimática (Lei; Stratmann *et al.*, 2009), etching (Mcgeouch; Edwards *et al.*, 2010), corrosão (Gonzalez; Santana *et al.*) e cinética de dissolução (Alpuche-Aviles; Baur *et al.*, 2008). Além disso, SECM tem sido amplamente utilizada como ferramenta em estudos que forneçam o entendimento do fluxo de espécies eletroativas em diferentes substratos, como em membranas porosas (Bath; Lee *et al.*, 1998) e em tecidos biológicos como pele, cartilagem e dentes (Scott; Phipps *et al.*, 1995; Nugues; Denuault, 1996; Gonsalves; Macpherson *et al.*, 2000).

A obtenção de imagens localizadas que mostrem o consumo de espécies eletroativas em diferentes substratos tem sido bastante explorada. A visualização do consumo de O₂ vem sendo utilizada na caracterização da atividade catalítica de células combustíveis (Eckhard; Schuhmann, 2007) e em superfícies contendo um sistema biomimético de cobre (Matos; Ferreira *et al.*, 2010). O monitoramento do perfil de concentração de oxigênio também permite avaliar a atividade respiratória de embriões humanos e bovinos e de células bacterianas, sendo possível identificar diferentes estágios de desenvolvimento (Shiku; Yasukawa *et al.*, 2007; Abe; Yokoo *et al.*, 2008).

1.3.1. SECM como ferramenta para investigação de processos químicos em dentes

Um dos problemas mais estudados na comunidade odontológica e que atinge grande parte da população é a hipersensibilidade dentária (Pinto; Pochapski *et al.*, 2007). Este sério problema ocorre quando a dentina se expõe ao ambiente bucal, ficando esta suscetível às variações de estímulos térmicos, químicos, mecânicos e evaporativos nos túbulos dentários. No interior destes túbulos se encontra um fluido intratubular, que se movimenta devido a esses estímulos, resultando na sensação de dor (Wang; Sa *et al.*, 2010). A exposição da dentina pode ocorrer devido às recessões gengivais, atrições entre a parte mais externa do dente (esmalte), ocorrendo seu desgaste, ou ainda devido às erosões dentárias causadas pelo contato diário com substâncias ácidas. Uma representação esquemática das regiões que compõem o dente está mostrada na Figura 11.

Figura 11: Representação esquemática da estrutura do dente (Www.Colgate.Com).

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% de fosfato de cálcio (hidroxiapatita), 3% de proteínas e 1% de água. A dentina se encontra na região intermediária do dente e é composta por 70% de fosfato de cálcio (hidroxiapatita), 20% de colágeno e 10% de água. Nessa região estão situados os túbulos dentários, tipicamente com 1 a 2 μm de diâmetros e densidade na ordem de 10^6 a 10^7 cm^{-2} , os quais estão orientados da polpa até a interface dentina-esmalte (Macpherson; Beeston *et al.*, 1995a). Na parte interna do dente está localizada a polpa, que contém as terminações nervosas e os vasos sanguíneos.

Compreender as causas e os mecanismos que ocasionam a hipersensibilidade dentária é muito importante para a elaboração de novos tratamentos. Assim, a permeação de espécies através dos túbulos dentários (Wang; Sa *et al.*, 2010), a eficiência no bloqueio dos túbulos por agentes dessensibilizantes (Pinto; Pochapski *et al.*, 2007) e também como ocorre a erosão ácida do esmalte dentário (Barbour; Parker *et al.*, 2003; White; Yorath *et al.*, 2010) são alguns dos fenômenos que devem ser estudados para que os efeitos causados pela hipersensibilidade sejam minimizados.

Devido às inúmeras vantagens já apresentadas na utilização da Microscopia Eletroquímica de Varredura, esta técnica se mostra como uma ferramenta bastante atraente para o entendimento dos processos dentários, já que esta é capaz de fornecer informações altamente localizadas. SECM já foi utilizada para obtenção de medidas quantitativas do fluxo convectivo de espécies eletroativas em túbulos dentários. Imagens com alta resolução espacial do fluxo de um único túbulo foram obtidas, sendo possível calcular o fluxo que permeia através deste microcanal (Macpherson; Beeston *et al.*, 1995b; Nugues; Denuault, 1996). A eficiência do tratamento da hipersensibilidade dentária também já foi investigada utilizando SECM. Neste estudo, foi possível avaliar a eficácia de produtos que precipitam na interface

dentina-saliva, bem como calcular a espessura da camada de agente dessensibilizante depositada na superfície da dentina (Macpherson; Beeston *et al.*, 1995a; Macpherson; Unwin, 2005).

1.3.2. SECM como ferramenta para a caracterização da erosão ácida do esmalte dentário

As últimas décadas têm assistido a grandes avanços na medicina dentária e na saúde oral. Um desses avanços foi na melhoria da higiene bucal e a prática de dietas mais saudáveis, sendo estes os principais fatores que contribuem para uma maior longevidade da dentição. No entanto, mais pessoas estão apresentando problemas relacionados à hipersensibilidade dentária, a qual está diretamente relacionada com a erosão ácida do esmalte, sendo este um revestimento rígido de proteção, composto de hidroxiapatita de cálcio, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (Barbour; Parker *et al.*, 2003). As mudanças nos hábitos alimentares da população são as causas mais frequentes desse problema. O consumo de alimentos e bebidas de elevada acidez como frutas cítricas, refrigerantes e isotônicos ocasionam a erosão ácida do esmalte, conhecida como sendo de origem externa. Este problema também pode estar relacionado a origens internas como no caso de pessoas que possuem problemas de refluxo e que, por isso, podem ter ácidos gástricos na região bucal (Cheng; Yang *et al.*, 2009).

A erosão ácida do esmalte dentário é, portanto, a perda do esmalte do dente, sem que haja o envolvimento de bactérias. Um caso típico de erosão está mostrado na Figura 12, sendo que este sério problema pode causar além da hipersensibilidade, perda de brilho, amarelamento e deformação dos dentes, podendo exigir intervenções complexas (Cheng; Yang *et al.*, 2009).

Figura 12: *Desgaste causado pelo consumo excessivo de refrigerante de cola.*

A deterioração da estrutura dos dentes tem sido investigada por várias técnicas, tais como Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (Xu; Neoh *et al.*, 2008), Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM) (Cheng; Wang *et al.*, 2009), Microscopia de Força Atômica (AFM) (Quartarone; Mustarelli *et al.*, 2008) e Microscopia Laser Confocal (Heurich; Beyer *et al.*, 2009), sendo que estas técnicas fornecem imagens que mostram a topografia das amostras antes e após o processo de erosão. SECM também já foi utilizada no estudo da erosão dentária, sendo comprovado que o processo de dissolução do esmalte é rápido (Margolis; Zhang *et al.*, 1999; Mcgeouch; Edwards *et al.*, 2010). No presente estudo, a dissolução química do esmalte dentário bovino por soluções ácidas foi investigada utilizando Microscopia Eletroquímica de Varredura (SECM), uma técnica atraente para obter informações localizadas sobre a natureza e as propriedades de dada superfície.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Principal

Fabricar microeletrodos utilizando o equipamento *Micropipette Puller* e utilizar tais sensores como ponta de prova em Microscopia Eletroquímica de Varredura.

2.2. Objetivos específicos

- Otimizar os parâmetros do equipamento *Micropipette Puller* de modo a obter uma metodologia de fabricação de microeletrodos de disco de dimensões estruturalmente micrométricas e de forma reprodutível;
- Empregar SECM como ferramenta para a obtenção de informações químicas e mudanças topográficas em superfícies de dentes que passaram pelo processo de erosão ácida.

3. Parte Experimental

3.1. Reagentes e soluções

Os reagentes de grau analítico utilizados nos experimentos foram ferricianeto de potássio (Baker), acetato de sódio (Synth), cloreto de potássio, ácido sulfúrico e ácido acético (Merk). Todos os reagentes foram dissolvidos e diluídos em água desionizada processada pelo sistema de purificação Nanopure Infinity (System, Barnstead, Dubuque, $18 \text{ M } \Omega \text{ cm}^{-1}$).

3.2. Instrumentação

Na fabricação dos microeletrodos empregou-se o equipamento *Flaming/Brown Micropipette Puller* modelo P-97 (*Sutter Instrument Company*®). Capilares de vidro borossilicato (*Sutter Instrument Company*®) foram utilizados para a fabricação dos microdispositivos. Os capilares tinham as seguintes dimensões: diâmetro externo de 1,5 mm, diâmetro interno de 0,86 mm e comprimento de 15 cm. Utilizaram-se microfibras (*Alfa Aesar*®) de ouro, platina, cobre e carbono com diferentes dimensões. Para a medida da resistência elétrica dos dispositivos foi utilizado um multímetro digital modelo IK1500A (*Icel*). Foi empregada uma bomba a vácuo modelo NOF-650 (*New Pump*) para a fabricação dos microeletrodos. Para visualização da área ativa dos microdispositivos foi utilizado um microscópio óptico NI 150 *High Intensity Illuminator* (*Nikon Instruments Inc.*). As medidas eletroquímicas foram realizadas em um bipotenciostato da Autolab PGSTAT 30 (*EcoChemie*), conectado a um computador e utilizando o *software* GPES 4.9. Uma célula eletroquímica convencional de três eletrodos foi utilizada, sendo o eletrodo de trabalho um microeletrodo, o eletrodo de referência $\text{Ag/AgCl/KCl}_{(\text{sat})}$ e o eletrodo auxiliar um fio de platina. Uma Gaiola de Faraday foi utilizada para a eliminação ou atenuação dos ruídos

eletrônicos, visto que a magnitude das correntes monitoradas durante a utilização de microeletrodos é pequena. Para o estudo do posicionamento do microeletrodo, foram confeccionadas estruturas em *toner* e para tanto utilizou-se uma impressora a laser modelo HP *Laser Jet P2015 (Hewlett-Packard)* e também uma prensa térmica HLM 230 (*Metalnox*). Os experimentos utilizando Microscopia Eletroquímica de Varredura foram realizados em equipamento da *Sensolytics GmbH Bochum (Germany)*, empregando-se um sistema de 3 eletrodos: eletrodo de trabalho (microeletrodo), eletrodo de referência $\text{Ag/AgCl/KCl}_{(\text{sat})}$ e como eletrodo auxiliar um fio de platina. Os experimentos utilizando Microscopia de Força Atômica foram realizados em equipamento de *Scanning Probe Microscope* (“SPM”) modelo NonoScope IIIA (*Digital Instruments, Veeco*).

3.3. Obtenção e preparo das amostras de dentes

Dentes incisivos bovinos mandibulares foram extraídos sem fraturas visíveis e tiveram os tecidos moles removidos usando curetas periodontais (Campos; Campos *et al.*, 2008). As amostras foram submetidas a profilaxia com água e pedra-pomes, sendo em seguida armazenadas em solução desinfetante de Cloramina T 0,5% a 4° C, por um período de um mês. Posteriormente, os mesmos foram fixados em uma máquina de corte (Extec® Labcut 1010), a qual contém um disco de diamante refrigerado a água capaz de fazer cortes precisos. Foram obtidas amostras com diferentes dimensões. O polimento da superfície dos dentes foi realizado utilizando lixas d’água (# 1200) e feltro com alumina (*Alfa Aesar*®) 1 µm. As amostras foram então lavadas e armazenadas em água desionizada à temperatura ambiente após o procedimento de polimento.

3.3.1. Estudo da erosão ácida do esmalte dentário utilizando SECM

Foram confeccionados suportes de resina epóxi com o formato da amostra, para que durante o experimento a amostra permanecesse estática para a realização das medidas eletroquímicas.

3.3.2. Estudo da erosão ácida do esmalte dentário utilizando AFM

Duas semanas antes do experimento, os dentes foram submetidos ao processo de erosão ácida pelo contato com bebidas de elevada acidez como refrigerante de cola e bebida isotônica, por um período de 10 minutos, duas vezes ao dia. Logo após a imersão, os mesmos foram lavados com água destilada e retornaram para seus respectivos frascos contendo soro fisiológico (Quartarone; Mustarelli *et al.*, 2008). Para a obtenção das imagens, as amostras foram colocadas no porta-amostra que continha um pequeno pedaço de massa de modelar. Em seguida, o dente foi prensando contra essa massa de modelar para que sua superfície ficasse plana para a realização do experimento.

4. Resultados e discussões

4.1. Fabricação de microeletrodos

A resolução das imagens obtidas com a técnica de Microscopia Eletroquímica de Varredura, assim como em todas as técnicas de *Scanning Probe Microscopy* (Bottomley; Coury *et al.*, 1996), é função do tamanho da sonda justificando-se, portanto, o desenvolvimento e o domínio de novas metodologias para a fabricação de sensores em escala micrométrica. De maneira geral, para que regiões de uma amostra sejam distinguidas a sua dimensão terá que ser maior que o diâmetro da sonda, possibilitando assim sua observação nas imagens SECM.

Uma etapa inicial consistiu na construção de microeletrodos de diferentes materiais (platina, ouro, cobre e carbono) de diâmetro variável na faixa de 2,5 a 25 μm de raio utilizando diferentes metodologias, cada uma delas possuindo suas vantagens e desvantagens, dependendo da aplicação que se queira realizar.

Microeletrodos de disco são usualmente construídos por meio de encapsulamento da microfibras em vidro. No procedimento mais comum, utilizou-se um capilar ou pipeta Pasteur e uma das extremidades foi quase fechada por aquecimento. Após esta etapa, uma microfibras com aproximadamente 2 cm de comprimento ao qual estava conectado o fio de Ni/Cr com o auxílio de cola de prata foi posicionada no interior da extremidade semi-selada do capilar. A outra extremidade do capilar foi conectada a uma bomba a vácuo. A extremidade semi-selada do capilar, em cujo interior encontra-se a microfibras, foi então reaquelada utilizando-se a chama de um bico de Bunsen e, dessa forma, o vidro foi selado sobre a microfibras sem a exposição da mesma a altas temperaturas. A extremidade selada foi polida a fim de expor a superfície da fibras (Paixão; Bertotti, 2009). O polimento da superfície dos microeletrodos é

uma etapa crítica da fabricação e envolve um processo de abrasão manual em lixa d'água (# 1200) e alumina 1 μm . Neste procedimento o microeletrodo é mantido na posição vertical e movimentos na forma de oito são feitos repetidas vezes. Após esta etapa é feita a lavagem para remoção de partículas dos abrasivos com jatos de água destilada. Como não é possível fazer a inspeção visual da superfície do microdisco, o dispositivo deve ser levado ao microscópio óptico para avaliação da área ativa.

Microeletrodos também foram fabricados utilizando ponteiros de micropipetas. A microfibras foi introduzida na sua extremidade e o processo de selagem foi feito com o auxílio de resina epóxi Araldite®, silicone Sylgard® ou qualquer outro tipo de resina não condutora. Este método é preferencialmente utilizado para a fabricação de microeletrodos de fibra de carbono (Cho; Jang *et al.*), visto que frequentemente ocorre perda do material devido à exposição ao calor quando se utiliza selagem por aquecimento. O contato elétrico e o processo de polimento são efetuados como descrito anteriormente. Com estas metodologias microeletrodos podem ser fabricados, mas estes dispositivos não possuem dimensões físicas estruturalmente pequenas, como pode ser visto na Figura 13 e assim, para este propósito, outras metodologias foram desenvolvidas.

Figura 13: Imagem de microeletrodo de Pt ($r = 12,5 \mu\text{m}$) construído em ponteira de micropipeta (A) e em pipeta de Pasteur (B).

Para aperfeiçoar a resolução das imagens, exige-se um trabalho com pontas de prova com dimensões ainda menores. Para isso, as fibras foram encapsuladas em capilares de vidro com o auxílio do equipamento *Micropipette Puller* mostrado na Figura 14.

Figura 14: Imagem do equipamento *Micropipette Puller*.

Previamente à confecção dos microeletrodos, se faz necessária a elaboração de um programa de aquecimento denominado Rampa de teste. Este procedimento é feito para obtenção da temperatura em que o vidro utilizado amolece. Este valor de temperatura está relacionado com as características do filamento de resistência elétrica utilizado e a composição e dimensões do vidro. Portanto, este teste deve ser realizado quando se utiliza o equipamento pela primeira vez, quando o filamento é trocado ou ainda quando se muda o tipo de vidro ou suas dimensões.

Para todos os microeletrodos fabricados neste trabalho foi utilizado o vidro de borossilicato e temperatura de amolecimento ao redor de 820°C. A Tabela 1 a seguir mostra os valores em percentagem dos componentes desse tipo de vidro.

Tabela 1: Composição do vidro de borossilicato.

Componente	Percentagem (%)
SiO ₂	80,6
B ₂ O ₃	13,0
Na ₂ O	4,0
Al ₂ O ₃	2,3

É importante salientar que deve-se conhecer o tipo de vidro utilizado, pois com a mudança da composição muda-se também algumas propriedades físicas. Por exemplo, no equipamento utilizado não é recomendado que se utilize quartzo, pois a resistência elétrica não alcança a temperatura de amolecimento deste material, que pode chegar a 1600°C.

De maneira simplificada, o funcionamento do equipamento se dá pela fixação de um capilar entre dois braços mecânicos em cujo centro se encontra uma resistência elétrica, como mostrado na Figura 15. Por essa resistência passa uma determinada corrente elétrica que então aquece o capilar, deixando-o maleável para que enfim esse possa ser estendido.

Figura 15: Imagem do equipamento *Micropipette Puller* em funcionamento, onde é mostrado o capilar de vidro preso entre os braços mecânicos em cujo centro se encontra uma resistência elétrica.

Para determinar o valor da temperatura de amolecimento do vidro, o equipamento aplica uma rampa de aquecimento até que o vidro seja estendido. O valor informado pelo equipamento para a capilar de vidro utilizado foi de 602, sendo este o valor do parâmetro de aquecimento.

Quando se utiliza o *Micropipette Puller*, há uma série de parâmetros que devem ser otimizados de acordo com a finalidade que se queria dar ao dispositivo, sendo cada um destes descritos brevemente a seguir:

AQUECIMENTO: Controla a corrente elétrica que passa pelo filamento. O calor requerido para derreter o vidro é função do filamento instalado, composição e forma do vidro. Este valor é estimado utilizando a rampa de teste.

ESTIRAMENTO: Este parâmetro controla a força com que o capilar de vidro será estendido. Em geral, quanto maior o valor deste parâmetro maior será o comprimento da ponta e menor o seu diâmetro.

VELOCIDADE: É a velocidade com que o braço mecânico se move antes de executar a força para estender o capilar. Esse parâmetro é determinado pela viscosidade do vidro, que por sua vez é uma função da temperatura.

TEMPO: Controla o tempo de refrigeração.

Para a fabricação de microeletrodos, deve-se utilizar os parâmetros de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2: Parâmetros para fabricação de microeletrodos.

PARÂMETRO PROCEDIMENTO	AQUECIMENTO	ESTIRAMENTO	VELOCIDADE	TEMPO
1	602	40	40	7
2	582	0	40	270

Quando se faz necessário a fabricação de microdispositivos com raios menores do que 5 μm , uma etapa adicional é requerida. Microfibras com tais dimensões possuem uma camada protetora de Ag depositada ao seu redor. Desta forma, antes do procedimento de fabricação utilizando o *Micropipette Puller*, o material passa por um processo de remoção da camada protetora. Primeiramente, a microfibra é imersa em HNO_3 concentrado por um intervalo de tempo de aproximadamente 5 minutos e em seguida, a mesma é lavada com água destilada para se proceder com as etapas posteriores de fabricação.

No procedimento de fabricação desenvolvido, primeiramente a microfibra de platina, ouro, cobre ou carbono de 1,5 cm de comprimento foi posicionada no centro de um capilar de vidro. A Figura 16 mostra as várias etapas do processo de fabricação de microeletrodos. Na primeira etapa, utilizam-se os parâmetros da tabela 2, procedimento 1. O conjunto microfibra-capilar foi fixado no equipamento e uma primeira temperatura de aquecimento previamente otimizada pela Rampa de teste foi aplicada. Nesta etapa 1, o vidro no qual a microfibra está inserida é estendido. É importante salientar que durante a fabricação destes dispositivos

utiliza-se um arame no formato de U, que segura os braços mecânicos de forma que os mesmos só são estendidos a uma determinada distância determinada no processo de otimização da fabricação. Na etapa 2, a segunda temperatura de aquecimento foi empregada, ocorrendo desta forma a selagem do vidro ao qual a microfibras foi inserida. É importante destacar que se utiliza o parâmetro $ESTIRAMENTO = 0$, devido à falta de necessidade de estender o capilar na segunda parte do procedimento. Nesta etapa também se aplica vácuo em ciclos de 30 segundos para minimizar problemas posteriores oriundos de eventual presença de bolhas de ar e também para auxiliar na selagem. Com a utilização da bomba a vácuo, problemas antes encontrados com relação à selagem foram eliminados. Em seguida, já na etapa 3 um corte no conjunto microfibras-capilar foi realizado para exposição da área ativa do disco, sendo na etapa 4 realizados o polimento em lixa d'água (# 1200) e o contato elétrico feito utilizando um fio de cobre e um material condutor para conexão com a microfibras.

Figura 16: Representação esquemática do processo de fabricação de microeletrodos de disco utilizando o equipamento Micropipette Puller (adaptado Paixão; Bertotti, 2009).

Com a metodologia desenvolvida são obtidos dois microeletrodos por fabricação. Uma imagem deste tipo de dispositivo fabricado se encontra na Figura 17, sendo que a espessura da parede do vidro é bastante reduzida, abrindo-se perspectivas para a miniaturização dos dispositivos.

Figura 17: Imagem de um microeletrodo de Pt ($r = 12,5 \mu\text{m}$) confeccionado para aplicação em SECM.

4.1.1. Estabelecimento do contato elétrico

Foram fabricados conforme procedimento mostrado anteriormente três microeletrodos de platina ($r = 12,5 \mu\text{m}$) com três tipos de contatos elétricos disponíveis no laboratório. Foi utilizado um fio de cobre e o contato elétrico entre este fio e a microfibras foi feito empregando cola de prata, solda de índio e solda de estanho. A Figura 18 mostra os voltamogramas obtidos em solução de ferricianeto de potássio 10 mmol L^{-1} em cloreto de potássio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ para os três microeletrodos.

Figura 18: Voltamogramas cíclicos obtidos com microeletrodos de Pt ($r = 12,5 \mu\text{m}$) em solução de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 10 mmol L^{-1} em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Em (A) contato elétrico feito com cola de prata, em (B) solda de índio e em (C) solda de estanho. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Como pode ser observado nos voltamogramas cíclicos obtidos, há uma pequena diferença no valor da corrente limite de estado estacionário em $-0,1 \text{ V vs. Ag/AgCl/KCl}_{(\text{Sat})}$. A variação da corrente limite monitorada neste conjunto de dispositivos foi de 4,2% (desvio padrão = 1,33 nA), indicando portanto que não há uma diferença significativa nos perfil voltamétrico dos microdispositivos.

A resistência elétrica desses dispositivos foi medida utilizando um multímetro digital e uma pequena gota de mercúrio. Um dos pólos do multímetro foi preso ao fio de cobre e o outro pólo foi inserido na gota de mercúrio, na qual estava imersa a ponta do microeletrodo. A Tabela 3 mostra os valores de resistência elétrica obtidos para os três microeletrodos.

Tabela 3: Valores de resistência elétrica medida para microeletrodos fabricados com diferentes contatos elétricos.

Contato Elétrico	Resistência medida (Ω)
Cola de prata	5,6
Solda de índio	3,2
Solda de estanho	3,3

Como pode ser observado na Tabela 3, os valores de resistência elétrica não diferem muito entre si. Entretanto, devido à maior facilidade de utilização, o fio de índio foi escolhido como o contato elétrico a ser utilizado em todos os microeletrodos fabricados. Portanto, após a etapa 4 da Figura 16 um pequeno pedaço do fio de índio foi cortado e inserido no capilar. Em seguida o fio de cobre também foi inserido e com o auxílio de calor foi feito a solda entre o fio de cobre e a microfibras.

4.1.2. Avaliação do desempenho do microeletrodo fabricado utilizando Micropipette Puller

Depois da etapa de fabricação, um procedimento de grande importância é a verificação do funcionamento do microdispositivo. Para isso, registram-se voltamogramas em solução contendo uma espécie eletroativa com comportamento reversível. O voltamograma cíclico apresenta um perfil sigmoidal com baixa histerese e com patamares de corrente, conhecido como corrente limite do estado estacionário (i_L), a qual é dependente da difusão da espécie até a superfície do microeletrodo. A Equação 3 descreve a corrente limite para um processo com transporte de massa controlado por difusão para um microeletrodo (Correia; Mascaro *et al.*, 1995):

$$i_L = 4nFDrC$$

Equação 3

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).

De acordo com o procedimento descrito anteriormente, construíram-se ao longo deste projeto microeletrodos utilizando microfibras de platina, ouro, cobre e carbono com diferentes valores nominais de raio determinado pelo fabricante. A Figura 19 mostra os voltamogramas cíclicos obtidos em uma solução de ferricianeto de potássio 10 mmol L^{-1} em cloreto de potássio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ para eletrodos construídos conforme procedimento descrito anteriormente, sendo utilizadas microfibras de platina com diferentes dimensões.

Figura 19: Voltamogramas cíclicos obtidos com microeletrodo de Pt raio (A) $2,6 \mu\text{m}$, (B) $4,5 \mu\text{m}$, (C) $8,3 \mu\text{m}$ e (D) $12,6 \mu\text{m}$ em solução de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 10 mmol L^{-1} em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. $v=50 \text{ mVs}^{-1}$.

As microfibras de platina utilizadas possuíam um raio de 2,5; 5,0; 10,0 e 12,5 μm (fornecido pelo fabricante). O cálculo do raio foi realizado utilizando a Equação 2, sendo obtidos os valores de 2,6; 4,5; 8,3 e 12,6 μm para os microeletrodos de platina A, B, C e D respectivamente.

Durante o processo de fabricação, dependendo da dimensão da microfibra, a mesma pode ser estendida, devido às altas temperaturas atingidas. Assim, pode-se notar que os microeletrodos B e C possuem raio menor do que o informado pelo fabricante. O mesmo não ocorre com microfibras de raio maior que 12,5 μm , pois elas são mais resistentes à temperatura. Microfibras com dimensões menores que 5 μm de raio necessitam de um estudo cuidadoso da temperatura de aquecimento apropriada para estender o capilar e não danificar a microfibra.

4.1.3. Avaliação da metodologia desenvolvida para a fabricação de microeletrodos utilizando *Micropipette Puller*

A maneira com que a microfibra se encontra encapsulada no vidro ou ainda o polimento realizado no microdisco podem variar, o que altera a dimensão do raio do dispositivo como mostrado na Figura 4. Para este estudo, foram construídos 10 microeletrodos de platina de raio 5 μm , empregando-se a metodologia desenvolvida. Primeiramente, um polimento utilizando lixa d'água (# 1200) e alumina 1 μm foi realizado em cada um dos microeletrodos de maneira análoga. Em seguida, uma inspeção microscópica para visualização da área ativa foi feita e em 8 microeletrodos foi possível visualizar um microdisco.

O funcionamento desses microeletrodos foi avaliado utilizando voltametria cíclica. Os voltamogramas foram obtidos utilizando ferricianeto de potássio 15 mmol L^{-1} em cloreto de potássio 0,1 mol L^{-1} . Para todos os 8 microeletrodos testados foi observado um

comportamento eletroquímico esperado, ou seja, observou-se um perfil sigmoidal como mostrado na Figura 20.

Figura 20: Voltamogramas cíclicos obtidos com os microeletrodos de Pt ($r = 5 \mu\text{m}$) em solução de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 15 mmol L^{-1} em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$. $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Um gráfico que relaciona a corrente limite em $-0,1 \text{ V vs. Ag/AgCl/KCl}_{(\text{Sat})}$ para cada microeletrodo fabricado juntamente com o raio calculado de acordo com a Equação 2 está mostrado na Figura 21. A variação da corrente limite monitorada neste conjunto de dispositivos foi menor do que 3% (desvio padrão = $0,43 \text{ nA}$), indicando portanto que a metodologia de fabricação desenvolvida produz microeletrodos de forma reprodutível.

Figura 21: Relação entre o microeletrodo construído e a corrente monitorada em $-0,1$ V vs. Ag/AgCl/KCl_(Sat).

4.1.4. Comportamento eletroquímico de macro e microeletrodos de platina

Com o objetivo de verificar a dependência da corrente faradaica com a variação da velocidade de varredura, v , foram registrados, sequencialmente, voltamogramas cíclicos tanto para macroeletrodo de platina ($r = 1$ mm) quanto para microeletrodo de platina ($r = 5$ μ m) em solução de ferricianeto de potássio 15 mmol L⁻¹ em cloreto de potássio $0,1$ mol L⁻¹, com velocidades de varreduras de 20 , 50 , 100 , 200 , 300 e 500 mV s⁻¹. Estes estão apresentados na Figura 22.

Figura 22: Voltamogramas cíclicos obtidos com macroeletrodo de Pt ($r = 1,00$ mm) em (A) microeletrodo de Pt ($r = 4,3$ μm) em (B) em solução de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 15 mmol L^{-1} em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes velocidade de varreduras:

— 500 mV s^{-1} , — 300 mV s^{-1} , — 200 mV s^{-1} , — 100 mV s^{-1} , — 50 mV s^{-1} , — 20 mV s^{-1} .

A Figura 22 mostra o comportamento destes dispositivos quando se faz uma variação da velocidade de varredura. Na figura 22 (A₂) os voltamogramas cíclicos foram obtidos para um macroeletrodo de platina raio 1 mm . Nota-se um nítido incremento de corrente com o aumento da velocidade de varredura. Sabe-se que a intensidade de corrente varia com esse parâmetro de acordo com a equação de *Randles-Sevcik*:

$$i_p = (2.69 \times 10^5) n^{3/2} A D^{1/2} C v^{1/2} \quad \text{Equação 4}$$

onde: n = número de elétrons envolvidos; A = área do eletrodo (cm^2); D = coeficiente de difusão da espécie eletroativa ($\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$); C = concentração da espécie eletroativa no seio da solução (mol cm^{-3}); v = velocidade de varredura (V s^{-1}).

Um gráfico relacionando tanto a corrente de pico anódica (i_{pa}) quanto a corrente de pico catódica (i_{pc}) com a raiz quadrada da velocidade de varredura foi construído. A Figura 22 A₁ apresenta as retas obtidas, as quais são descritas pelas seguintes equações:

$$i_{pc} (\mu A) = 8,7 \times 10^{-6} v^{1/2} (mV s^{-1}) + 7,2 \times 10^{-6}, R = 0,9959 \text{ e}$$

$$i_{pa} (\mu A) = - 8,9 \times 10^{-6} v^{1/2} (mV s^{-1}) - 7,9 \times 10^{-6}, R = 0,9948.$$

Estas equações apresentam uma relação linear entre os dois parâmetros relacionados e, portanto, estão de acordo com a equação de Randles-Sevcik.

O aumento do sinal de corrente, tanto para o processo catódico quanto para o anódico, com o aumento da velocidade de varredura é explicado pelo fato de que à medida em que se aumenta a taxa de variação de potencial, o tempo do experimento diminui e a camada de difusão se torna menos espessa. Assim, o aumento da velocidade de varredura causa aumento do sinal de corrente, pois há um maior fluxo da espécie eletroativa em função do tempo para a superfície do eletrodo (Brett; Brett, 1996).

Posteriormente, utilizando um microeletrodo de platina raio de 5 μm , foram registrados voltamogramas cíclicos nas mesmas velocidades de varreduras estudadas anteriormente e na mesma solução de ferricianeto de potássio, como está mostrado na Figura 22 B. Pode ser observado que, apesar do aumento da velocidade de varredura, obtêm-se voltamogramas cíclicos com perfil sigmoidal referente ao rápido alcance do estado estacionário. Assim a utilização de microeletrodos em Microscopia Eletroquímica de Varredura se torna apropriada devido à rápida velocidade na aquisição de dados quando se trabalha com esta técnica. Cumpre ressaltar que mesmo obtendo-se um perfil sigmoidal, há um aumento da histerese do voltamograma cíclico com o aumento da velocidade de varredura, pois ocorre uma transição do regime de difusão radial para difusão planar.

4.1.5. Determinação do RG de microeletrodos

Um parâmetro que deve ser determinado nos microeletrodos fabricados é o valor do RG. Para a determinação deste parâmetro utilizam-se Curvas de Aproximação, onde um microeletrodo movendo-se lentamente em direção a um substrato é polarizado em um potencial apropriado para monitorar a corrente referente à reação de oxidação ou redução do mediador redox. Quando o microeletrodo está muito próximo do substrato, quanto menor o RG do microeletrodo, mais facilmente as espécies eletroativas chegam à sua superfície. Assim, diminuições bruscas de corrente somente são observadas quando a separação substrato-microeletrodo é relativamente pequena. Portanto, Curvas de Aproximação para *negative feedback* são amplamente influenciadas pelo tamanho da ponta de prova (Bard; Mirkin, 2001).

Deste modo, em uma Curva de Aproximação para *negative feedback*, a distância entre o microeletrodo e o substrato é reduzida a uma determinada velocidade ($\mu\text{m s}^{-1}$), sendo a corrente monitorada a partir de uma certa altura (eixo z) do substrato. Quando a distância microeletrodo-substrato é grande e o substrato não exerce influência sobre a difusão de espécies eletroativas ao microeletrodo, tem-se a corrente monitorada no seio da solução ($i_{\text{solução}}$). Quando a ponta de prova é aproximada do substrato, a corrente monitorada pelo microeletrodo ($i_{\text{microeletrodo}}$) decai rapidamente por causa da restrição de acesso do material eletroativo à superfície (Bard; Mirkin, 2001).

O procedimento para a redução do RG de um microeletrodo para valores próximos de 10, o qual é o mais utilizado nos experimentos SECM (Wittstock; Burchardt *et al.*, 2007) consiste no polimento cuidadoso da parte isolante externa do dispositivo. Primeiramente, obteve-se uma Curva de Aproximação em solução de ferricianeto de potássio 15 mmol L^{-1} e cloreto de potássio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ utilizando um microeletrodo de platina ($r = 12,6 \mu\text{m}$) sem nenhum processo de polimento das laterais. A Figura 24 mostra esta curva e pode ser

observado que o valor do RG é muito maior do que 15,2 se comparado com as curvas teóricas mostrada na Figura 9. Em seguida, o microeletrodo passou pelo processo de polimento das laterais. O procedimento consistiu em utilizar um microscópio óptico para visualização da ponta do microeletrodo e empregar uma lixa d'água (# 1200) fixa a um sistema rotatório. O microeletrodo foi então fixado em um micromanipulador e vagarosamente aproximado da lixa rotatória (ângulo de 45°) para que ocorresse o desgaste das laterais. O aparato instrumental utilizado pode ser visualizado na Figura 23.

Figura 23: Imagem do aparato instrumental utilizado para o polimento das laterais do vidro de um microeletrodo.

Como resultado, tem-se a diminuição da dimensão da parte isolante (vidro) que recobre a parte condutora (microfibra). Em seguida, lavou-se o microeletrodo e obteve-se uma segunda Curva de Aproximação. Na Figura 24 pode-se observar uma mudança significativa no perfil da Curva de Aproximação para *negative feedback* após o polimento. A nova curva obtida se assemelha bastante com a Curva de Aproximação teórica para um microeletrodo de RG 15,2.

Figura 24: Curvas de aproximação teórica e experimentais para negative feedback.

4.2. Estudo do posicionamento do microeletrodo na formação da imagem SECM

Há situações em que é preciso obter informações numa mesma região da superfície antes e após algum procedimento realizado no substrato. Portanto, nesta parte do estudo, foi investigado se existem diferenças significativas após a obtenção de imagens consecutivas, ou seja, procurou-se avaliar se o microeletrodo retorna exatamente à sua posição original. Para isso foi preciso utilizar uma estrutura cuja forma geométrica fosse conhecida. Desta forma, utilizou-se como substrato uma superfície de policarbonato na qual foram impressas linhas de *toner*.

A metodologia de fabricação deste tipo de dispositivo utilizando *toner* consistiu em três etapas. A primeira delas foi empregar um *software* de imagem como o *CorelDraw®* (Corel, Ottawa Canadá) para elaboração dos desenhos das estruturas. A segunda etapa consistiu na impressão desses desenhos utilizando uma impressora a laser (HP Laser Jet P2015, Hewlett-Packard) em um papel vegetal ou um papel de transferência para fabricação

de camisetas (papel transfer). Em seguida, utilizando uma prensa térmica (HLM 230, Metalnox) transferiram-se por calor essas imagens para o substrato de policarbonato (Lowinsohn; Richter *et al.*, 2006). A largura de cada linha desenhada foi de aproximadamente 600 a 700 μm e o espaçamento entre as mesmas foi de 500 μm . A Figura 25 mostra um desenho esquemático desta estrutura.

Figura 25: Estrutura utilizada para realização dos experimentos para estudo do posicionamento do microeletrodo, em (A) visualização da camada de toner sobre o substrato e em (B) vista superior das linhas impressas.

Utilizando a estrutura fabricada como substrato, foram realizados estudos para a verificação dos erros de posicionamento em x , y e z . Para a aquisição de todas as imagens desta parte do estudo utilizou-se um microeletrodo de platina (raio = 4,7 μm e RG = 20,1) em solução contendo como espécie mediadora ferricianeto de potássio 15 mmol L^{-1} em cloreto de potássio 0,1 mol L^{-1} .

No primeiro experimento realizado, foi analisado o erro existente nos eixos x e y quando se utiliza o modo de varredura *meander* (como mostrado na Figura 26). A Curva de Aproximação foi feita sobre a região mais alta da superfície (toner) e a distância entre ponta de prova-substrato foi mantida em 10 μm .

O microeletrodo foi posicionado em um ponto da superfície do substrato de modo que, ao se fazer a varredura, a imagem obtida fosse de apenas uma linha do *toner*. A Figura 27 A

mostra a primeira imagem obtida. Observa-se claramente o fenômeno de *feedback negativo* quando o microeletrodo passa sobre uma linha de *toner*, pois há um decréscimo da corrente devido à menor distância entre ponta de prova e substrato. Logo após à obtenção da primeira imagem, o equipamento volta ao ponto inicial somente no eixo *x*. Em seguida, utilizando o motor de passo do equipamento, voltou-se ao ponto inicial do eixo *y* a uma velocidade de $5 \mu\text{m s}^{-1}$. Esse reposicionamento está mostrado na Figura 26.

Figura 26: Varredura (modo meander) do microeletrodo nas direções *x* e *y* para obtenção de imagens SECM ( ). Reposicionamento do microeletrodo para aquisição de uma nova imagem ( ).

Com o microeletrodo posicionado no ponto inicial da primeira imagem acionou-se novamente o equipamento para aquisição de uma segunda imagem, Figura 27 B. De posse destas duas imagens, obteve-se a imagem da Figura 27 C, que é a diferença entre as imagens A e B. Pode-se perceber que os valores encontrados na imagem C são muito próximos de zero, o que indica que não houve uma diferença significativa nos valores de corrente entre as imagens obtidas. O mesmo procedimento foi realizado repetidas vezes, obtendo-se

praticamente as mesmas variações de correntes. Tais valores variaram entre 0,025 nA e - 0,021 nA sendo a média de todos os pontos igual a 0,0037 nA.

Figura 27: Imagens 3-D SECM obtidas utilizando microeletrodo de Pt ($r = 4,7 \mu\text{m}$ e $RG = 20,1$) em solução de $K_3[Fe(CN)_6]$ 15 mmol L^{-1} em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Em (A) primeira imagem obtida, em (B) imagem obtida logo após o reposicionamento e em (C) a diferença entre as imagens A e B.

Um segundo estudo foi realizado para a verificação da diferença de corrente monitorada quando o microeletrodo foi sucessivamente mudado de posição na direção z. O primeiro conjunto de medidas foi obtido a $5 \mu\text{m}$ de distância do substrato. O microeletrodo movimentava-se $1500 \mu\text{m}$ para cima e em seguida $1500 \mu\text{m}$ para baixo a uma velocidade de $10 \mu\text{m s}^{-1}$. Foram feitos 10 ciclos com esta movimentação do microeletrodo e, ao final de cada

ciclo, um voltamograma cíclico com janela de potencial de 0,5 a - 0,1 V vs. Ag/AgCl/KCl_(Sat) a uma velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹ era obtido. Em seguida modificou-se a distância entre sensor e substrato para 1500 μm e repetiu-se o mesmo procedimento de subida e descida para a obtenção de mais 10 voltamogramas cíclicos. A Figura 28 mostra o valor da corrente limite obtida a - 0,1 V vs. Ag/AgCl/KCl_(Sat), tanto para o monitoramento a 5 μm quanto para 1500 μm.

Figura 28: Valores de corrente limite monitorados a - 0,1 V vs. Ag/AgCl/KCl_(Sat). Em (▼) distância de 5 μm entre microeletrodo-substrato e em (●) distância de 1500 μm entre microeletrodo-substrato.

Com base nos valores de correntes obtidos para ambos os experimentos construiu-se a Tabela 4. Analisando os dados podemos observar que o desvio padrão relativo foi menor que 3% indicando, portanto, que as medidas não diferem significativamente entre si e que desta forma o erro de posicionamento do microeletrodo na direção z é pequeno.

Tabela 4: Parâmetros obtidos em diferentes distâncias entre microeletrodo e substrato.

Distância microeletrodo/substrato	5 μm	1500 μm
Parâmetros		
Média (nA)	-7,68	-26,4
Desvio padrão (nA)	0,22	0,42
Desvio padrão relativo (%)	2,85	1,57

4.3. Estudo da erosão ácida do esmalte dentário utilizando SECM

4.3.1. Resposta do microeletrodo de Platina a íons H^+

O monitoramento das mudanças do valor de pH nas vizinhanças da superfície do dente (esmalte) durante o processo de erosão ácida foi realizado utilizando um microeletrodo de platina. Experimentos preliminares para avaliar o comportamento da sonda foram realizados registrando voltamogramas cíclicos em soluções contendo $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de cloreto de potássio, em concentrações de H_2SO_4 variando de $0,025$ a $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$. Por uma questão de simplicidade, convencionou-se que a concentração de prótons é a mesma que a sua atividade e por isso o pH é uma medição da concentração de íons H^+ . A Figura 29 mostra um voltamograma típico registrado a uma velocidade de varredura 20 mV s^{-1} , onde uma onda sigmoidal característica foi obtida. Uma relação linear entre corrente limite e concentração de H_2SO_4 foi obtida sendo a equação mostrada a seguir:

$$i \text{ (nA)} = -68,7 + 4,1 [\text{H}_2\text{SO}_4] \text{ (mmol L}^{-1}\text{)}, R = 0,9968$$

Figura 29: Voltamograma cíclico obtido com microeletrodo de Pt ($r = 12,6 \mu\text{m}$) em solução H_2SO_4 $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (A) e curva analítica (B). $\nu = 20 \text{ mV s}^{-1}$.

4.3.2. Perfis de concentração

O consumo de prótons na superfície dos dentes foi primeiramente investigado pela realização de Curvas de Aproximação em uma solução de $\text{pH} = 3,4$. A ponta de prova foi polarizada a $-0,5 \text{ V vs. Ag/AgCl/KCl}_{(\text{sat})}$, onde a redução de prótons solvatados foi controlada por transporte de massa. Em um primeiro experimento foram registradas Curvas de Aproximação sobre uma superfície isolante, obtendo-se a curva A da Figura 30. A corrente de estado estacionário diminuiu bruscamente quando o microeletrodo tocou a superfície isolante, evidenciando o bloqueio da ponta de prova. Neste caso, o efeito de *negative feedback* foi observado e este apareceu somente quando a distância entre o substrato e o microeletrodo foi em torno de algumas unidades de L . Nenhuma histerese entre a ida e a volta foi notada, mostrando assim que este experimento não tem dependência com o tempo. Por outro lado,

uma clara diferença foi notada quando o experimento foi repetido com uma amostra de dente (esmalte) como substrato, cujos resultados são mostrados na Figura 30 B. Neste caso, a corrente começa a decair em uma região consideravelmente distante da superfície do substrato (por volta de 2000 μm). Portanto, uma indicação do consumo químico de prótons e o desenvolvimento de um gradiente de concentração podem ser observados (Castro; Lima *et al.*, 2011). Assim, o processo envolvendo a dissolução do esmalte é dependente do tempo, o que explica a histerese significativa observada na varredura inversa (curva não mostrada).

Figura 30: Curvas de aproximação obtidas com microeletrodo de Pt ($r = 12,6 \mu\text{m}$ e $RG = 15,2$) em solução H_2SO_4 $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ para um substrato isolante (A) e para amostra de dente (esmalte) (B). $v = 10 \mu\text{m s}^{-1}$.

4.3.3. Imagens SECM

A corrente que flui no microeletrodo é proporcional à concentração de íons H^+ presentes em solução. A concentração local de prótons pode mudar de acordo com a separação entre o microeletrodo e a superfície do dente, como também devido à erosão ácida que ocorre no esmalte, de acordo com a seguinte equação:

A Figura 31 mostra de maneira esquemática os processos que ocorrem na superfície do dente (erosão ácida no esmalte) e na ponta do microeletrodo, sendo que o processo de redução dos íons H^+ pode ser descrito de acordo com a equação 6.

Figura 31: Representação esquemática do experimento SECM.

Varreduras foram realizadas em uma separação constante entre microeletrodo-substrato de 10 μm . Todas as imagens obtidas possuem uma área de 300 μm x 300 μm . As imagens SECM na Figura 32 correspondem a uma representação 2-D da corrente local monitorada na ponta de prova. Desde que a superfície do dente é plana, as mudanças observadas indicam variações na concentração de prótons na região estudada. Um prévio experimento foi realizado, fazendo-se uma varredura sobre um substrato isolante que é inerte com relação à reação de consumo de íons H^+ . A imagem A obtida não revela nenhuma mudança significativa no valor de corrente, o que indica uma resposta reprodutível da sonda e um bom nivelamento da superfície. A Figura 32 A ainda mostra uma representação esquemática do modo de varredura (*meander*) utilizado para aquisição das imagens SECM.

Uma diferença visível pode ser observada quando o mesmo experimento foi repetido utilizando-se o dente (esmalte) como substrato, como mostrado na imagem B. Neste caso, uma queda considerável no valor de corrente durante a varredura pode ser observada como consequência do consumo de prótons na proximidade da superfície do substrato. Tendo em conta o tempo necessário para a obtenção de uma imagem (cerca de 5 minutos) nas condições experimentais utilizadas neste experimento ($v = 20 \mu\text{m s}^{-1}$), podemos concluir que o processo de erosão é relativamente rápido. Isto está de acordo com os resultados de estudos sobre a cinética de dissolução química da hidroxiapatita de cálcio nos valores de pH no intervalo 3,7 - 6,5 (Barbour; Parker *et al.*, 2005; Mcgeouch; Edwards *et al.*, 2010). Uma nova imagem C foi obtida após um tempo decorrido de uma hora e nenhuma mudança significativa foi observada, ressaltando apenas que a corrente se manteve em valor baixo. Por outro lado, uma situação diferente foi observada quando a solução foi agitada para sua homogeneização e em seguida obteve-se uma nova imagem D. Pode-se observar que no início da varredura tem-se um comportamento similar ao observado na imagem B, mas como a decomposição do esmalte é

muito acelerada, rapidamente o valor de corrente decai novamente, indicando um alto consumo de íons H^+ nesta região (Barbour; Parker *et al.*, 2005; Heurich; Beyer *et al.*, 2009).

Figura 32: Imagens 2-D SECM obtidas com microeletrodo de Pt ($r = 12,6 \mu m$ e $RG = 15,2$) em solução H_2SO_4 $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ para um substrato isolante (A) e para amostra de dente (esmalte) em diferentes tempos: 0 minutos (B), 60 minutos (C) e 70 minutos após agitação da solução (D). $v = 20 \mu m s^{-1}$, $d = 10 \text{ mm}$

Um segundo experimento mostrado na Figura 33, foi realizado utilizando uma solução tampão ácido acético $9,5 \text{ mmol L}^{-1}$ /acetato de sódio $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ $pH = 3,4$. Nesta varredura, foi observado que os valores de corrente são praticamente os mesmos durante a obtenção da imagem, indicando que o pH foi mantido em um valor constante porque prótons são eficientemente fornecidos pelo tampão.

Figura 33: Imagem 2-D SECM obtida com microeletrodo de Pt ($r = 12,6 \mu\text{m}$ e $RG = 15,2$) em solução tampão ácido acético $9,5 \text{ mmol L}^{-1}$ /acetato de sódio $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ $\text{pH} = 3,8$ para uma amostra de dente (esmalte).

Um experimento adicional para a comprovação do consumo de prótons quando o esmalte dentário entra em contato com uma solução ácida foi realizado. Utilizou-se novamente um substrato isolante e uma amostra de dente (esmalte dentário) para comparação dos resultados. Os substratos foram recobertos por uma camada protetora inerte, conforme esquematizado na Figura 34.

Figura 34: Representação esquemática da região em que foram obtidas as imagens SECM (linha tracejada). Em (A) substrato isolante e em (B) amostra de esmalte dentário, ambos contendo a camada protetora.

Para aquisição das imagens SECM, foi utilizando um microeletrodo de platina ($r = 12,6 \mu\text{m}$ e $RG = 15,2$), sendo as imagens obtidas na intersecção entre os dois tipos de superfície (protegida e não protegida). Para cada substrato foram obtidas duas imagens SECM na mesma região, utilizando dois diferentes mediadores redox. Primeiramente, foi utilizada uma solução de ferricianeto de potássio 15 mol L^{-1} em cloreto de potássio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Em seguida, a célula eletroquímica foi cuidadosamente lavada com água desionizada e uma solução de H_2SO_4 $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ em cloreto de potássio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foi adicionada para a aquisição da segunda imagem SECM. Varreduras foram realizadas em uma separação constante entre microeletrodo-substrato de $20 \mu\text{m}$. As imagens SECM obtidas estão mostradas na Figura 35.

Figura 35: Imagens 3-D SECM obtidas com microeletrodo de Pt ($r = 12,6 \mu\text{m}$ e $RG = 15,2$). Em (A) substrato isolante em solução de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 15 mmol L^{-1} em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, em (B) substrato isolante em solução de H_2SO_4 $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, em (C) amostra de dente em solução de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 15 mmol L^{-1} em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e em (D) amostra de dente em solução de H_2SO_4 $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. $v = 20 \mu\text{m s}^{-1}$.

Foram utilizados dois diferentes mediadores redox para obtenção das imagens SECM. Quando ferricianeto de potássio foi utilizado, tanto a imagem obtida sobre uma superfície isolante, Figura 35 A, quanto a imagem obtida sobre a superfície do dente (esmalte dentário), Figura 35 C, mostram a topografia do substrato analisado. O mediador redox utilizado neste caso, não reage com ambas as superfícies, sendo observado desta forma o efeito de *negative*

feedback. Pode-se observar que regiões não cobertas pela camada protetora possuem maiores intensidades de corrente, pois a separação entre ponta de prova e substrato é maior do que em regiões que foram cobertas pela camada protetora.

Quando foram utilizados prótons como mediador redox (Zhou; Zu *et al.*, 2000), observou-se um comportamento diferenciado da corrente monitorada na região do esmalte dentário a qual não foi recoberta pela camada protetora. Quando se utilizou o substrato isolante, o mesmo perfil com relação à topografia do substrato foi observado, como mostrado na Figura 35 B. O efeito de *negative feedback* foi observado e como o mediador redox não reagiu com a superfície isolante a figura obtida refere-se à topografia do substrato. Quando a imagem foi feita utilizando como substrato o dente (esmalte dentário), pode-se observar que na região que continha a camada protetora as intensidades de corrente são próximas das intensidades observadas quando o substrato é isolante (Figura 35 D). Entretanto, quando o microeletrodo monitorou a corrente na região da amostra não protegida a corrente decaiu bruscamente, comprovando que prótons estão sendo consumidos na região não protegida do esmalte dentário. Isso indica que a reação de desmineralização do esmalte dentário está ocorrendo.

4.3.4. Estudo da espessura de camada de esmalte dentário erodida utilizando SECM

A amostra de dente (esmalte dentário) foi posicionada verticalmente em um recipiente contendo solução de H_2SO_4 $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$. A região que não estava em contato com a solução foi previamente protegida com uma fita adesiva. A finalidade deste procedimento foi provocar a erosão em uma parte desprotegida do esmalte dentário para posterior comparação com a superfície que não entrou em contato com a solução ácida. Previamente à realização dos experimentos SECM, a fita adesiva que protegia a região do esmalte era retirada. Primeiramente, uma Curva de Aproximação sobre a região protegida do esmalte foi obtida utilizando um microeletrodo de platina ($r = 4,7 \text{ }\mu\text{m}$ e $\text{RG} = 20,1$) polarizado em $-0,1 \text{ V vs. Ag/AgCl/KCl}_{(\text{sat})}$ em solução de ferricianeto de potássio 15 mmol L^{-1} em cloreto de potássio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 36). Como pode ser observado, um perfil de *negative feedback* foi obtido na região protegida da amostra.

Figura 36: Curva de aproximação sobre a região protegida do esmalte, obtida com microeletrodo de Pt ($r = 4,7 \text{ }\mu\text{m}$ e $\text{RG} = 20,1$) em $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 15 mmol L^{-1} e KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em amostra de dente (esmalte dentário). $v = 2,5 \text{ }\mu\text{m s}^{-1}$.

Imagens SECM foram obtidas na região de intersecção de superfícies, ou seja, na região que foi anteriormente protegida com a fita adesiva e que, portanto não entrou em contato com a solução de H_2SO_4 $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ e a região que entrou em contato com a solução ácida. Primeiramente, uma imagem SECM em solução de ferricianeto de potássio 15 mmol L^{-1} em cloreto de potássio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foi obtida antes de a amostra permanecer em contato com a solução ácida, como mostrado na Figura 37 A. Pode-se perceber que a corrente total (i_t) fica próximo de 0,39, sendo este o valor médio de todos os pontos da varredura. Portanto não há uma diferença significativa na topografia da amostra analisada. O valor de i_t , também permite avaliar a distância entre o microeletrodo e substrato. Para isto é preciso analisar o *inset* da Curva de Aproximação na Figura 36, pois sendo $i_t = 0,39$ obtém-se um valor de L aproximadamente igual 1,5, o qual fornece uma distância de $7,05 \mu\text{m}$, já que o raio do microeletrodo é $4,7 \mu\text{m}$.

Numa outra etapa, a amostra de dente permaneceu em contato com a solução ácida por um intervalo de tempo de duas horas. Obteve-se uma imagem SECM (não mostrada) na região de interesse, mas nenhuma mudança significativa de corrente foi observada. Isso se deve ao fato de que houve pouca alteração na topografia do esmalte durante o tempo em que a amostra permaneceu exposta à solução ácida. Optou-se, portanto, por deixar a amostra em contato com a solução ácida por um intervalo de tempo maior, para que assim diferenças na topografia pudessem ser visualizadas. Desta forma, a amostra foi deixada em contato com a solução ácida por um intervalo de tempo de 48 horas para posterior aquisição da imagem SECM. A Figura 37 B mostra a diferença na topografia causada pelo contato com a solução ácida, sendo a imagem obtida em solução de ferricianeto de potássio 15 mmol L^{-1} em cloreto de potássio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Deixou-se a amostra por mais 48 horas em contato com a solução ácida e uma nova imagem SECM foi obtida utilizando a mesma solução de ferricianeto de potássio, como mostrado na Figura 37 C. Pela comparação entre as imagens A e B, pode-se notar a evidente variação da corrente, justificada pela mudança da topografia devido ao processo de erosão. Após 96 horas

(imagem C) essa mudança de corrente foi ainda mais expressiva, indicando a significativa erosão da região exposta à solução ácida.

Figura 37: Imagens SECM 3-D obtidas utilizando microeletrodo de Pt ($r = 4,7 \mu m$ e $RG = 20,1$) em solução de $K_3[Fe(CN)_6]$ 15 mmol L^{-1} em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Em (A) imagem obtida em esmalte dentário polido, em (B) imagem obtida em esmalte dentário bovino após 48 horas de exposição à solução ácida e em (C) imagem obtida em esmalte dentário bovino após 96 horas de exposição à solução ácida.

A espessura da camada de esmalte erodida pode ser estimada utilizando a relação entre i_t e L quando o microeletrodo está próximo do substrato, como mostrado no *inset* da Figura 36. Relacionando as correntes totais (i_t) obtidas nas regiões em que a amostra foi erodida, obtêm-se o valor de L . Como o raio (r) do microeletrodo utilizado é conhecido, pode-se estimar o valor da distância entre o microeletrodo-substrato por meio da relação ($L = d/r$) e consequentemente o valor da espessura da camada de esmalte erodida. A Tabela 5 mostra os dados obtidos.

Tabela 5: Relação entre o tempo de exposição à solução ácida, corrente total (i_t) na região erodida, valor de L obtido e distância (d) entre microeletrodo e substrato.

Exposição ao H ₂ SO ₄ (horas)	i_t na região erodida	L	d (μm)
0	0,39	1,5	7,05
48	0,71	5,32	25,0
96	0,80	6,75	31,7

Desta forma, pode-se estimar a espessura da camada de esmalte erodida. Nas primeiras 48 horas a reação de desmineralização consumiu uma camada de esmalte dentário de aproximadamente 18 μm de espessura e após 96 horas este valor passou a ser de aproximadamente 25 μm.

4.4. Microscopia de força atômica aplicada no estudo da erosão ácida do esmalte dentário

Os experimentos foram realizados utilizando um equipamento de Scanning Probe Microscope (“SPM”) da Digital Instruments (Veeco), modelo NanoScope IIIA, mostrado na Figura 38.

Figura 38: Equipamento de Scanning Probe Microscope (“SPM”) da Digital Instruments (Veeco), modelo NanoScope IIIA.

A técnica utilizada foi a Microscopia de Força Atômica, no modo contato intermitente. É importante destacar que após o processo de erosão ácida a superfície do esmalte dentário se torna bastante frágil e o modo contato intermitente foi assim escolhido para que qualquer efeito de arrastamento de ponta sobre a superfície fosse evitado (Quartarone; Mustarelli *et al.*, 2008). Os parâmetros do equipamento foram otimizados com o intuito de obter uma imagem com boa resolução e a Tabela 6 mostra esses dados. Um cantilever de silício com frequência de ressonância e constante elástica apropriada para a obtenção de imagens, utilizando a Microscopia de Força Atômica no modo contato intermitente, foi utilizado. As imagens foram obtidas em velocidade de varredura apropriada, utilizando uma resolução de 512 x 512 pixels, sendo que a área analisada foi de 10 μm x 10 μm .

Tabela 6: Ajuste de parâmetros para obtenção de imagens em AFM de contato intermitente.

Parâmetro	Ajuste
Técnica	AFM de contato intermitente
Scanner	“J”
Set Point	1, 292
Integral gain	0,700
Proportional gain	6,00
Scan size	10 µm
Sample/line	512
Frequência de ressonância	233,1 KHz

Com os parâmetros devidamente ajustados, foram obtidas imagens do esmalte dentário que não sofreu o processo de erosão, do esmalte dentário que passou pelo processo de erosão em refrigerante de cola e do esmalte dentário que passou pelo processo de erosão em bebida isotônica, Figuras 39, 40 e 41, respectivamente.

Figura 39: Imagem 2-D utilizando microscopia de força atômica no modo contato intermitente para amostra de dente que não sofreu processo de erosão.

Figura 40: Imagem 2-D utilizando microscopia de força atômica no modo contato intermitente para amostra de dente que sofreu processo de erosão em refrigerante de cola.

Figura 41: Imagem 2-D utilizando microscopia de força atômica no modo contato intermitente para amostra de dente que sofreu processo de erosão em bebida isotônica.

Fazendo uma análise comparativa entre as figuras, percebe-se nitidamente que a superfície que não sofreu o processo de erosão é mais plana (*flat*) do que aquelas que sofreram o processo. Isso pode ser evidenciado pelo parâmetro *data scale* mostrado nas imagens, os quais foram 200 nm, 2 μ m e 1,5 μ m para as Figuras 39, 40 e 41, respectivamente, e também pelas diferenças nas variações das escalas, onde as cores mais claras são regiões de maiores alturas e as cores mais escuras são regiões de menores alturas na superfície da amostra. Ainda na Figura 39, pode se observar algumas ranhuras na superfície do dente, provavelmente devido ao processo de polimento da superfície feito previamente.

Os parâmetros mais conhecidos que caracterizam a morfologia de superfícies são a rugosidade RMS, que representa a média da diferença quadrática de altura entre os picos e vales da superfície, e rugosidade Ra, que representa a distância média entre os picos e vales da superfície. No entanto, estas descrições estatísticas, apesar de serem simples e confiáveis, não fazem qualquer distinção entre variações significativas da topografia de uma superfície. Uma descrição mais completa nesse sentido é fornecida pela densidade de potência espectral (PSD – *Power Spectral Density*) da superfície topográfica, que representa a decomposição do perfil da superfície para o seu comprimento de onda e amplitude correspondente, sendo esta uma transformada de *Fourier* na topografia da superfície (Vatel; Dumas *et al.*, 1993).

O PSD apresenta um gráfico da transformada de Fourier do perfil do quadrado da altura h como função do comprimento de onda. Assim, todas as características da superfície podem ser explicadas de forma independente. Por exemplo, se uma superfície tem uma grade perfeitamente regular na direção x , o PSD irá produzir um pico de amplitude de altura no comprimento de onda da grade. Se o processamento for por RMS, apenas um número será gerado. Isto significa que uma superfície pode ser plenamente compreendida usando os resultados do PSD, mas não usando RMS. A caracterização do PSD prevê neste caso um poderoso método para identificar os comprimentos de onda morfológicos criado na superfície

erodida. A Figura 42, a seguir, mostra o gráfico onde no eixo x tem-se o inverso do comprimento de onda (λ) e no eixo y o parâmetro PSD para o dente que não passou pelo processo de erosão, para o dente que sofreu erosão devido o contato com refrigerante de cola e com bebida isotônica. Pode-se perceber que não há nenhum comprimento de onda que sobressaia nas amostras, indicando que não há estruturas repetidas e que a erosão ocorreu de forma irregular e em diferentes intensidades, dependendo da bebida utilizada.

Figura 42: Gráfico PSD para amostra de dente que não passou pelo processo de erosão ácida (A), dente que passou pelo processo de erosão em refrigerante de cola (B) e dente que passou pelo processo de erosão em bebida isotônica.

5. Conclusões

O presente projeto teve como objetivo inicial desenvolver metodologia para a fabricação de microeletrodos de variados materiais e dimensões utilizando o equipamento *Micropipette Puller*. A etapa de selagem era uma dificuldade frequentemente encontrada quando microeletrodos eram construídos empregando o equipamento. Parâmetros como temperatura de aquecimento, velocidade e tempo para estender o capilar foram otimizados e desta forma obteve-se um processo eficiente de selagem dos microdispositivos. Para isso, foi também empregada uma bomba a vácuo, para que a selagem fosse feita de maneira ainda mais eficiente e sem que a microfibras fosse danificada. Com a metodologia desenvolvida, pontas de prova em dimensões micrométricas foram obtidas, podendo estas serem utilizadas em SECM. Assim, microeletrodos de platina, ouro, cobre e fibra de carbono em diferentes dimensões foram construídos e em seguida caracterizados quanto ao tamanho real de sua área ativa. O contato elétrico de solda de índio, o polimento da área ativa bem como o acabamento dado aos microeletrodos foram aperfeiçoados e desta forma estes dispositivos podem ser fabricados e utilizados com frequência pelo grupo de pesquisa.

Uma segunda etapa do projeto consistiu em avaliar o funcionamento dos microeletrodos fabricados quanto à utilização em Microscopia Eletroquímica de Varredura, já que para este propósito é recomendável obter microdispositivos com RG próximo de 10. Para isso, um processo cuidadoso de polimento das laterais da parte isolante do microdispositivo foi realizado e por comparação com curvas teóricas chegou-se a microeletrodos com RG próximo de 15.

A técnica de Microscopia Eletroquímica de Varredura foi conjuntamente empregada com os microeletrodos fabricados para obtenção de informações a respeito da erosão ácida do esmalte dentário. Com os resultados apresentados, pode-se confirmar que a dissolução do

esmalte dentário é um processo relativamente rápido. Pode-se ainda mostrar que SECM é uma poderosa ferramenta para o estudo de reações que ocorrem na interface microeletrodo-solução. Embora a utilização de SECM para obtenção de informações a respeito da topografia de superfícies não seja sua aplicação mais atraente, pode-se também utilizar a SECM para obtenção de informações a respeito da mudança na topografia do esmalte dentário. Após um longo período de exposição da amostra à solução ácida, foi possível estimar a espessura da camada de esmalte erodida. As imagens de Microscopia de Força Atômica também ajudaram a estudar este processo, sendo que a técnica foi empregada com sucesso para investigar as mudanças morfológicas do esmalte dentário que não passou pelo processo de erosão e aqueles que sofreram o processo de erosão ácida por diferentes bebidas.

6. Estudos Futuros

6.1. SECM aplicada no estudo da eficiência no bloqueio dos túbulos dentários

A obstrução dos túbulos abertos na superfície da dentina é um tratamento frequentemente utilizado para combater a hipersensibilidade dentária. Intervenções com laser ou até mesmo aplicação de resinas compostas, adesivos dentários e sólidos solúveis que precipitam na interface dentina-saliva são tratamentos comumente encontrados nos consultórios odontológicos (Greenhill; Pashley, 1981). A eficiência do tratamento da hipersensibilidade dentária já foi investigada utilizando a SECM em estudo onde se avaliou a eficácia de agentes que precipitam na interface dentina-saliva e que bloqueiam a passagem de estímulos através dos túbulos dentários. Medidas quantitativas do fluxo de espécies através da dentina foram realizadas antes e após a utilização destes produtos. Após a aplicação, verificou-se a ausência de um fluxo de espécies através da dentina, evidenciando desta forma o bloqueio efetivo dos túbulos (Macpherson; Beeston *et al.*, 1995a; Macpherson; Unwin, 2005).

Recentemente, as empresas que fabricam cremes dentais têm mostrado, nos meios de comunicação, que seus produtos possuem eficiência garantida no bloqueio dos túbulos expostos. Afirmam que o produto age formando uma barreira física que impede a passagem de estímulos até a polpa. Desta forma, SECM pode ser utilizada para obtenção de resultados que comprovem a eficiência no bloqueio após a utilização destes produtos.

6.2. SECM aplicada no mapeamento do fluxo de H₂O₂ em dentes

Diferentes substâncias têm sido utilizadas para a obtenção de um clareamento dentário satisfatório. Atualmente, os agentes clareadores mais comumente utilizados são peróxido de hidrogênio, peróxido de carbamida e perborato de sódio, sendo que estes dois últimos liberam peróxido de hidrogênio em meio aquoso e vem sendo amplamente utilizados em tratamentos dentários caseiros (Riehl, 2002).

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. Apresenta a propriedade de desnaturar proteínas e desta forma remove não somente manchas superficiais, como também aquelas presentes mais profundamente nos tecidos dentários (Spalding, 2000). Fatores que aumentam a penetração de agentes clareadores como tratamento por tempo prolongado, aumento de temperatura, uso indiscriminado e sem o acompanhamento de um profissional capacitado podem causar inflamação pulpar ou danos mais sérios. Há estudos que relatam um potencial carcinogênico dessas espécies quando expostas ao ambiente bucal (Pieroli, 1997). Assim, é de grande relevância a manutenção do agente clareador na região do esmalte e da dentina, mas sem progressão posterior à polpa.

A permeabilidade dentária pode ser alterada devido à utilização destes produtos clareadores e, conseqüentemente, maior possibilidade de inflamação pulpar ou danos mais graves podem ser observados. Com o emprego da SECM, há a possibilidade de desenvolvimento de uma metodologia mais segura para a aplicação destes produtos, visto que o clareamento dentário caseiro se tornou uma prática popular e muitas vezes este não é acompanhado pelo profissional capacitado.

7. Referências Bibliográficas

ABE, H.; M. YOKOO; T. ITOH-SASAKI; M. NASU; K. GOTO; Y. KUMASAKO; Y. ARAKI; H. SHIKU; T. MATSUE; T. UTSUNOMIYA. Measurement of the Respiratory Activity of Single Human Embryos by Scanning Electrochemical Microscopy. **Transactions of the Materials Research Society of Japan**, v.33, n.3, p. 759-762. 2008.

ADAMS, R. N. Probing brain chemistry with electroanalytical techniques. **Analytical Chemistry**, v.48, n.14, p. 1126A-1138A. 1976.

ALPUCHE-AVILES, M. A.; J. E. BAUR; D. O. WIPF. Imaging of metal ion dissolution and electrodeposition by anodic stripping voltammetry-scanning electrochemical microscopy. **Analytical Chemistry**, v.80, n.10, p. 3612-3621. 2008.

AMEMIYA, S.; J. D. GUO; H. XIONG; D. A. GROSS. Biological applications of scanning electrochemical microscopy: chemical imaging of single living cells and beyond. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.386, n.3, p. 458-471. 2006.

AMPHLETT, J. L.; G. DENUAULT. Scanning electrochemical microscopy (SECM): An investigation of the effects of tip geometry on amperometric tip response. **Journal of Physical Chemistry B**, v.102, n.49, p. 9946-9951. 1998.

ARBAULT, S.; N. SOJIC; D. BRUCE; C. AMATORE; A. SARASIN; M. VUILLAUME. Oxidative stress in cancer prone xeroderma pigmentosum fibroblasts. Real-time and single cell monitoring of superoxide and nitric oxide production with microelectrodes. **Carcinogenesis**, v.25, n.4, p. 509-515. 2004.

BARBOUR, M. E.; D. M. PARKER; G. C. ALLEN; K. D. JANDT. Human enamel erosion in constant composition citric acid solutions as a function of degree of saturation with respect to hydroxyapatite. **Journal of Oral Rehabilitation**, v.32, n.1, p. 16-21. 2005.

BARBOUR, M. E.; D. M. PARKER; K. D. JANDT. Enamel dissolution as a function of solution degree of saturation with respect to hydroxyapatite: a nanoindentation study. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.265, n.1, p. 9-14. 2003.

BARD, A. J.; J. A. CRAYSTON; G. P. KITTESEN; T. V. SHEA; M. S. WRIGHTON. Digital-simulation of the measured electrochemical response of reversible redox couples at microelectrode arrays - consequences arising from closely spaced ultramicroelectrodes. **Analytical Chemistry**, v.58, n.11, p. 2321-2331. 1986.

BARD, A. J.; G. DENUAULT; C. LEE; D. MANDLER; D. O. WIPF. Scanning electrochemical microscopy - a new technique for the characterization and modification of surfaces. **Accounts of Chemical Research**, v.23, n.11, Nov, p. 357-363. 1990.

BARD, A. J.; F.-R. FAN; J. KWAK; O. LEV. Scanning electrochemical microscopy - introduction and principles. **Analytical Chemistry**, v.61, n.2, p. 132-138. 1989.

BARD, A. J.; F.-R. FAN; M. V. MIRKIN. Scanning Electrochemical Microscopy in Electroanalytical Chemistry. New York: Marcel Dekker. 1994

BARD, A. J.; F. R. F. FAN; J. KWAK; O. LEV. Scanning Electrochemical Microscopy - Introduction And Principles. **Analytical Chemistry**, v.61, n.2, p. 132-138. 1989.

BARD, A. J.; M. V. MIRKIN. Scanning Electrochemical Microscopy. New York: John Wiley & Sons. 2001

BARKER, A. L.; M. GONSALVES; J. V. MACPHERSON; C. J. SLEVIN; P. R. UNWIN. Scanning electrochemical microscopy: beyond the solid/liquid interface. Analytica Chimica Acta. 385: 223-240 p. 1999a.

_____. Scanning electrochemical microscopy: beyond the solid/liquid interface. **Analytica Chimica Acta**, v.385, n.1-3, Apr, p. 223-240. 1999b.

BATH, B. D.; R. D. LEE; H. S. WHITE; E. R. SCOTT. Imaging molecular transport in porous membranes. Observation and analysis of electroosmotic flow in individual pores using the scanning electrochemical microscope. **Analytical Chemistry**, v.70, n.6, p. 1047-1058. 1998.

BATH, B. D.; E. R. SCOTT; J. B. PHIPPS; H. S. WHITE. 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**, v.89, n.12, p. 1537-1549. 2000.

BERTONCELLO, P.; I. CIANI; F. LI; P. R. UNWIN. Measurement of apparent diffusion coefficients within ultrathin Nafion Langmuir-Schaefer films: Comparison of a novel scanning electrochemical microscopy approach with cyclic voltammetry. **Langmuir**, v.22, n.25, p. 10380-10388. 2006.

BOTTOMLEY, L. A.; J. E. CORY; P. N. FIRST. Scanning probe microscopy. **Analytical Chemistry**, v.68, n.12, Jun 15, p. R185-R230. 1996.

BOZON, J. P.; D. M. GIOLANDO; J. R. KIRCHHOFF. Development of metal-based microelectrode sensor platforms by chemical vapor deposition. **Electroanalysis**, v.13, n.11, p. 911-916. 2001.

BRETT, A. M. O.; C. M. A. BRETT. Electroquímica: Princípios, métodos e aplicações. New York: Oxford University Press Inc. 1996.p. 471

BURDALLO, I.; C. JIMENEZ-JORQUERA. Microelectrodes for the measurement of cellular metabolism. **Proceedings of the Eurosensors Xxiii Conference**, v.1, n.1, p. 289-292. 2009.

CAMPOS, M. I. C.; C. N. CAMPOS; R. W. F. VITRAL. O uso de dentes bovinos como substitutos de dentes humanos em pesquisas odontológicas: Uma revisão da literatura. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, v.8, n.1, p. 127-132. 2008.

CASTRO, P. S.; A. S. LIMA; T. L. FERREIRA; M. BERTOTTI. Scanning Electrochemical Microscopy as a Tool for the Characterization of Dental Erosion. **International Journal of Electrochemistry**, v.2011, n.p. 1-6. 2011.

CHENG, R.; H. YANG; M. Y. SHAO; T. HU; X. D. ZHOU. Dental erosion and severe tooth decay related to soft drinks: a case report and literature review. **Journal of Zhejiang University-Science B**, v.10, n.5, p. 395-399. 2009.

CHENG, Z. J.; X. M. WANG; F. Z. CUI; J. GE; J. X. YAN. The enamel softening and loss during early erosion studied by AFM, SEM and nanoindentation. **Biomedical Materials**, v.4, n.1, Feb, p. 7. 2009.

CHO, S. H.; A. JANG; P. L. BISHOP; S. H. MOON. Kinetics determination of electrogenerated hydrogen peroxide (H_2O_2) using carbon fiber microelectrode in electroenzymatic degradation of phenolic compounds. **Journal of Hazardous Materials**, v.175, n.1-3, p. 253-257. 2010.

COATES, M.; E. CABET; S. GRIVEAU; T. NYOKONG; F. BEDIQUI. Microelectrochemical patterning of gold surfaces using 4-azidobenzenediazonium and scanning electrochemical microscopy. **Electrochemistry Communications**, v.13, n.2, p. 150-153. 2011.

CORREIA, A. N.; L. H. MASCARO; S. A. S. MACHADO; L. H. MAZO; L. A. AVACA. Ultramicroelectrodes .1. Theoretical revision and outlook. **Quimica Nova**, v.18, n.5, p. 475-480. 1995.

DAVIES, P. W.; F. BRINK. Microelectrodes for measuring local oxygen tension in animal tissues. **Review of Scientific Instruments**, v.13, n.12, p. 524-533. 1942.

ECKHARD, K.; W. SCHUHMANN. Localised visualisation of O_2 consumption and H_2O_2 formation by means of SECM for the characterisation of fuel cell catalyst activity. **Electrochimica Acta**, v.53, n.3, p. 1164-1169. 2007.

EDWARDS, M. A.; S. MARTIN; A. L. WHITWORTH; J. V. MACPHERSON; P. R. UNWIN. Scanning electrochemical microscopy: principles and applications to biophysical systems. **Physiological Measurement**, v.27, n.12, p. R63-R108. 2006.

EL-GIAR, E. E. M.; D. O. WIPF. Preparation of tip-protected poly (oxyphenylene) coated carbon-fiber ultramicroelectrodes. **Electroanalysis**, v.18, n.23, p. 2281-2289. 2006.

EWING, A. G.; J. C. BIGELOW; R. M. WIGHTMAN. Direct *in vivo* monitoring of dopamine released from 2 striatal compartments in the rat. **Science**, v.221, n.4606, p. 169-171. 1983.

FERNANDEZ, J. L.; A. J. BARD. Scanning electrochemical microscopy. 47. Imaging electrocatalytic activity for oxygen reduction in an acidic medium by the tip generation-substrate collection mode. **Analytical Chemistry**, v.75, n.13, p. 2967-2974. 2003.

_____. Scanning electrochemical microscopy 50. Kinetic study of electrode reactions by the tip generation-substrate collection mode. **Analytical Chemistry**, v.76, n.8, p. 2281-2289. 2004.

FERREIRA, T. L. **Estudos de sistemas micelares usando voltametria com microeletrodos**. 2008. 107 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008

FORTGANG, P.; C. AMATORE; E. MAISONHAUTE; B. SCHOLLHORN. Microchip for ultrafast voltammetry. **Electrochemistry Communications**, v.12, n.7, p. 897-900. 2010.

GHILANE, J.; P. MARTIN; M. JANIN; H. RANDRIAMAHAZAKA; P. HAPIOT; J. C. LACROIX. Electrochemical investigation of thin PEDOT film above an insulating substrate using scanning electrochemical microscopy. **Electrochemistry Communications**, v.11, n.12, p. 2304-2307. 2009.

GONSALVES, M.; J. V. MACPHERSON; D. O'HARE; C. P. WINLOVE; P. R. UNWIN. High resolution imaging of the distribution and permeability of methyl viologen dication in bovine articular cartilage using scanning electrochemical microscopy. **Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects**, v.1524, n.1, p. 66-74. 2000.

GONZALEZ, S.; J. J. SANTANA; Y. GONZALEZ-GARCIA; L. FERNANDEZ-MERIDA; R. M. SOUTO. Scanning electrochemical microscopy for the investigation of localized degradation processes in coated metals: Effect of oxygen. **Corrosion Science**, v.53, n.5, p. 1910-1915. 2011.

GREENHILL, J. D.; D. H. PASHLEY. The effects of desensitizing agents on the hydraulic conductance of human-dentin in vitro. **Journal of Dental Research**, v.60, n.3, p. 686-698. 1981.

HEPEL, T.; J. OSTERYOUNG. Chronoamperometric transients at the stationary disk microelectrode. **Journal of Physical Chemistry**, v.86, n.8, p. 1406-1411. 1982.

HEURICH, E.; M. BEYER; K. D. JANDT; J. REICHERT; V. HEROLD; M. SCHNABELRAUCH; B. W. SIGUSCH. Quantification of dental erosion- A comparison of stylus profilometry and confocal laser scanning microscopy (CLSM). **Dental Materials**, v.26, n.4, p. 326-336. 2009.

ITAYA, K.; T. ABE; I. UCHIDA. An electrochemical fabrication method for platinum ultramicro disk electrodes. **Journal of the Electrochemical Society**, v.134, n.5, p. 1191-1193. 1987.

KARNICKA, K.; K. ECKHARD; D. A. GUSCHIN; L. STOICA; P. J. KULESZA; W. SCHUHMANN. Visualisation of the local bio-electrocatalytic activity in biofuel cell cathodes by means of redox competition scanning electrochemical microscopy (RC-SECM). **Electrochemistry Communications**, v.9, n.8, p. 1998-2002. 2007.

KATEMANN, B. B.; T. SCHUHMANN. Fabrication and characterization of needle-type Pt-disk nanoelectrodes. **Electroanalysis**, v.14, n.1, p. 22-28. 2002.

KWAK, J.; A. J. BARD. Scanning electrochemical microscopy - apparatus and two-dimensional scans of conductive and insulating substrates. **Analytical Chemistry**, v.61, n.17, Sep, p. 1794-1799. 1989a.

_____. Scanning electrochemical microscopy - theory of the feedback mode. **Analytical Chemistry**, v.61, n.11, p. 1221-1227. 1989b.

LEI, R.; L. STRATMANN; D. SCHAFER; T. ERICHSEN; S. NEUGEBAUER; N. LI; W. SCHUHMANN. Imaging biocatalytic activity of enzyme-polymer spots by means of combined scanning electrochemical microscopy/electrogenerated Chemiluminescence. **Analytical Chemistry**, v.81, n.12, p. 5070-5074. 2009.

LIU, B.; A. J. BARD; C. Z. LI; H. B. KRAATZ. Scanning electrochemical microscopy. 51. Studies of self-assembled monolayers of DNA in the absence and presence of metal ions. **Journal of Physical Chemistry B**, v.109, n.11, p. 5193-5198. 2005.

LOWINSOHN, D.; M. BERTOTTI. Electrochemical sensors: Fundamentals and applications in microenvironments. **Quimica Nova**, v.29, n.6, p. 1318-1325. 2006.

LOWINSOHN, D.; E. M. RICHTER; L. ANGNES; M. BERTOTTI. Disposable gold electrodes with reproducible area using recordable CDs and toner masks. **Electroanalysis**, v.18, n.1, p. 89-94. 2006.

LU, X.; Q. WANG; X. LIU. Review: Recent applications of scanning electrochemical microscopy to the study of charge transfer kinetics. **Analytica Chimica Acta**, v.601, n.1, p. 10-25. 2007.

MACPHERSON, J. V.; M. A. BEESTON; P. R. UNWIN; N. P. HUGHES; D. LITTLEWOOD. Imaging the action of fluid-flow blocking-agents on dentinal surfaces using a scanning electrochemical microscope **Langmuir**, v.11, n.10, p. 3959-3963. 1995a.

_____. Scanning electrochemical microscopy as a probe of local fluid-flow through porous solids - application to the measurement of convective rates through a single dentinal tubule. **Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions**, v.91, n.9, p. 1407-1410. 1995b.

MACPHERSON, J. V.; P. R. UNWIN. Scanning electrochemical microscopy as an in vitro technique for measuring convective flow rates across dentine and the efficacy of surface blocking treatments. **Electroanalysis**, v.17, n.3, p. 197-204. 2005.

MANZ, A.; N. GRABER; H. M. WIDMER. Miniaturized total chemical-analysis systems - a novel concept for chemical sensing. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v.1, n.1-6, p. 244-248. 1990.

MARGOLIS, H. C.; Y. P. ZHANG; C. Y. LEE; R. L. KENT; E. C. MORENO. Kinetics of enamel demineralization in vitro. **Journal of Dental Research**, v.78, n.7, p. 1326-1335. 1999.

MATOS, I. O.; T. L. FERREIRA; T. R. L. C. PAIXÃO; A. S. LIMA; M. BERTOTTI; W. A. ALVES. Approaches for multicopper oxidases in the design of electrochemical sensors for analytical applications. **Electrochimica Acta**, v.55, n.18, 18 April 2010, p. 5223-5229. 2010.

MAUZEROLL, J.; M. BUDA; A. J. BARD; F. PRIETO; M. RUEDA. Detection of Tl(I) transport through a gramicidin-dioleoylphosphatidylcholine monolayer using the substrate

generation-tip collection mode of scanning electrochemical microscopy. **Langmuir**, v.18, n.24, p. 9453-9461. 2002.

MCGEOUCH, C. A.; M. A. EDWARDS; M. M. MBOGORO; C. PARKINSON; P. R. UNWIN. Scanning Electrochemical Microscopy as a Quantitative Probe of Acid-Induced Dissolution: Theory and Application to Dental Enamel. **Analytical Chemistry**, v.82, n.22, p. 9322-9328. 2010.

MCKAY, L.; R. J. LESUER. A mechanistic investigation of di-tert-butyl nitroxide using scanning electrochemical microscopy (SECM). **Electrochimica Acta**, v.53, n.28, p. 8305-8309. 2008.

MIRKIN, M. V. Recent advances in scanning electrochemical microscopy. **Analytical Chemistry**, v.68, n.5, Mar, p. A177-A182. 1996.

MIRKIN, M. V.; B. R. HORROCKS. Electroanalytical measurements using the scanning electrochemical microscope. **Analytica Chimica Acta**, v.406, n.2, p. 119-146. 2000.

NEUFELD, A. K.; A. P. O'MULLANE. Effect of the mediator in feedback mode-based SECM interrogation of indium tin-oxide and boron-doped diamond electrodes. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v.10, n.10, p. 808-816. 2006.

NUGUES, S.; G. DENUAULT. Scanning electrochemical microscopy: Amperometric probing of diffusional ion fluxes through porous membranes and human dentine. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v.408, n.1-2, p. 125-140. 1996.

PAIXÃO, T. R. L. C.; M. BERTOTTI. Methods for fabrication of microelectrodes towards detection in microenvironments. **Química Nova**, v.32, n.5, p. 1306-1314. 2009.

PELLISSIER, M.; D. ZIGAH; F. BARRIERE; P. HAPIOT. Optimized preparation and scanning electrochemical microscopy analysis in feedback mode of glucose oxidase layers grafted onto conducting carbon surfaces. **Langmuir**, v.24, n.16, p. 9089-9095. 2008.

PIEROLI, D. A. **Avaliação do potencial carcinogênico dos agentes clareadores dentais**. 1997. 119 f. - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 1997

PINTO, S. C. S.; M. T. POCHAPSKI; D. S. WAMBIER; G. L. PILATTI; F. A. SANTOS. Análise de substâncias dessensibilizantes na permeabilidade da dentina e obliteração de túbulos dentinários - estudo in vitro. **Revista de Periodontia**, v.17, n.3, p. 41-48. 2007.

PONS, S.; M. FLEISCHMANN. The behavior of microelectrodes. **Analytical Chemistry**, v.59, n.24, p. A1391-A1399. 1987.

QUARTARONE, E.; P. MUSTARELLI; C. POGGIO; M. LOMBARDINI. Surface kinetic roughening caused by dental erosion: An atomic force microscopy study. **Journal of Applied Physics**, v.103, n.10, May, p. 104702 (1-6). 2008.

RIEHL, H. **Estudo in vitro do efeito de três diferentes agentes clareadores sobre a dureza e rugosidade do esmalte dentário bovino**. 2002. 116 f. - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2002

RODRIGUEZ-LOPEZ, J.; M. A. ALPUCHE-AVILES; A. J. BARD. Selective insulation with poly(tetrafluoroethylene) of substrate electrodes for electrochemical background. reduction in scanning electrochemical microscopy. **Analytical Chemistry**, v.80, n.5, p. 1813-1818. 2008.

RODRIGUEZ-LOPEZ, J.; A. MINGUZZI; A. J. BARD. Reaction of various reductants with oxide films on Pt electrodes as studied by the surface interrogation mode of scanning electrochemical microscopy (SI-SECM): Possible validity of a marcus relationship. **Journal of Physical Chemistry C**, v.114, n.43, p. 18645-18655. 2010.

SANCHEZ-SANCHEZ, C. M.; J. RODRIGUEZ-LOPEZ; A. J. BARD. Scanning electrochemical microscopy. 60. Quantitative calibration of the SECM substrate generation/tip collection mode and its use for the study of the oxygen reduction mechanism. **Analytical Chemistry**, v.80, n.9, p. 3254-3260. 2008.

SANTOS, L. M.; J. GHILANE; C. FAVE; P. C. LACAZE; H. RANDRIAMAHAZAKA; L. M. ABRANTES; J. C. LACROIX. Electrografting Polyaniline on Carbon through the Electroreduction of Diazonium Salts and the Electrochemical Polymerization of Aniline. **Journal of Physical Chemistry C**, v.112, n.41, p. 16103-16109. 2008.

SCOTT, E. R.; J. B. PHIPPS; H. S. WHITE. Direct imaging of molecular-transport through skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v.104, n.1, p. 142-145. 1995.

SEDDON, B. J.; Y. SHAO; J. FOST; H. H. GIRAULT. The application of excimer-laser micromachining for the fabrication of disc microelectrodes. **Electrochimica Acta**, v.39, n.6, p. 783-791. 1994.

SHAO, Y. H.; M. V. MIRKIN; G. FISH; S. KOKOTOV; D. PALANKER; A. LEWIS. Nanometer-sized electrochemical sensors. **Analytical Chemistry**, v.69, n.8, p. 1627-1634. 1997.

SHIKU, H.; T. YASUKAWA; T. MATSUE; T. ITO-SASAKI; M. YOKOO; H. ABE. Oxygen consumption of mammalian embryos and Oocytes monitored by scanning electrochemical microscopy. **2007 Ieee Sensors, Vols 1-3**, v.p. 1408-1411. 2007.

SILVA, S. M.; C. R. ALVES; A. N. CORREIA; R. M. MARTINS; A. L. R. NOBRE; S. A. S. MACHADO; L. H. MAZO; L. A. AVACA. Ultramicroelectrodes. Part II: Construction and applications. **Quimica Nova**, v.21, n.1, p. 78-85. 1998.

SIMONET, B. M.; M. VALCARCEL. Analytical chemistry in modern society: What we can expect. **Microchimica Acta**, v.153, n.1-2, p. 1-5. 2006.

SOSNA, M.; G. DENUAULT; R. W. PASCAL; R. D. PRIEN; M. MOWLEM. Development of a reliable microelectrode dissolved oxygen sensor. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v.123, n.1, p. 344-351. 2007.

SPALDING, M. **Estudo “in vitro” do aspecto morfológico da superfície do esmalte e alteração na permeabilidade dentária após clareação**. 2000. 156 f. - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2000

STUART, J. N.; J. V. SWEEDLER. Single-cell analysis by capillary electrophoresis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.375, n.1, Jan, p. 28-29. 2003.

STULIK, K.; C. AMATORE; K. HOLUB; V. MARECEK; W. KUTNER. Microelectrodes. Definitions, characterization, and applications (Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v.72, n.8, Aug, p. 1483-1492. 2000.

TENENT, R. C.; D. O. WIPF. Local electron transfer rate measurements on modified and unmodified glassy carbon electrodes. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v.13, n.4, p. 583-590. 2009.

VATEL, O.; P. DUMAS; F. CHOLLET; F. SALVAN; E. ANDRE. Roughness assessment of polysilicon using power spectral density. **Japanese Journal of Applied Physics Part 1- Regular Papers Short Notes & Review Papers**, v.32, n.12A, p. 5671-5674. 1993.

WANG, Z. J.; Y. SA; S. SAURO; H. CHEN; W. Z. XING; X. MA; T. JIANG; Y. N. WANG. Effect of desensitising toothpastes on dentinal tubule occlusion: A dentine permeability measurement and SEM in vitro study. **Journal of Dentistry**, v.38, n.5, p. 400-410. 2010.

WHITE, A. J.; C. YORATH; V. TEN HENGEL; S. D. LEARY; M. HUYSMANS; M. E. BARBOUR. Human and bovine enamel erosion under 'single-drink' conditions. **European Journal of Oral Sciences**, v.118, n.6, p. 604-609. 2010.

WHITE, J. G.; R. L. STCLAIRE; J. W. JORGENSEN. Graphite fiber microelectrodes for on-column voltammetric detection in open-tubular liquid-chromatography. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, v.191, n.p. 119-125. 1986.

WIGHTMAN, R. M. Microvoltammetric electrodes. **Analytical Chemistry**, v.53, n.9, p. 1125A-1134A. 1981.

_____. Probing cellular chemistry in biological systems with microelectrodes. **Science**, v.311, n.5767, p. 1570-1574. 2006.

WIPF, D. O.; A. J. BARD. SCANNING ELECTROCHEMICAL MICROSCOPY .10. HIGH-RESOLUTION IMAGING OF ACTIVE-SITES ON AN ELECTRODE SURFACE. **Journal of the Electrochemical Society**, v.138, n.5, p. L4-L6. 1991.

WITTSTOCK, G.; M. BURCHARDT; S. E. PUST; Y. SHEN; C. ZHAO. Scanning electrochemical microscopy for direct imaging of reaction rates. **Angewandte Chemie-International Edition**, v.46, n.10, p. 1584-1617. 2007.

WWW.COLGATE.COM. acessado em maio de 2011.

XU, Z.; K. G. NEOH; A. KISHEN. Monitoring acid-demineralization of human dentine by electrochemical impedance spectroscopy (EIS). **Journal of Dentistry**, v.36, n.12, Dec, p. 1005-1012. 2008.

YOGESWARAN, U.; S. THIAGARAJAN; S. M. CHEN. Nanocomposite of functional multiwall carbon nanotubes with nafion, nano platinum, and nano biosensing film for

simultaneous determination of ascorbic acid, epinephrine, and uric acid. **Analytical Biochemistry**, v.365, n.1, p. 122-131. 2007.

ZHOU, H. F.; H. SHIKU; S. KASAI; H. NODA; T. MATSUE; H. OHYA-NISHIGUCHI; H. KAMADA. Mapping peroxidase in plant tissues by scanning electrochemical microscopy. **Bioelectrochemistry**, v.54, n.2, p. 151-156. 2001.

ZHOU, J. F.; Y. B. ZU; A. J. BARD. Scanning electrochemical microscopy Part 39. The proton/hydrogen mediator system and its application to the study of the electrocatalysis of hydrogen oxidation. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v.491, n.1-2, Sep 8, p. 22-29. 2000.

ZOSKI, C. G. Handbook of Electrochemistry. New Mexico: Elsevier Science, v.1. 2007.p. 892

Súmula Curricular

DADOS PESSOAIS

Nome: Pollyana Souza Castro

Local e data de nascimento: Juiz de Fora, 23 de fevereiro de 1987

EDUCAÇÃO

Colégio e Curso Catedral, Juiz de Fora, 2004.

Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2009

Licenciatura Plena em Química e Bacharelado em Química.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

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

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

OCUPAÇÃO

Bolsista de Mestrado, CNPq, Processo: 135846/2009-9, Vigência: De 01/08/2009 a 31/07/2011

PUBLICAÇÕES

ARTIGOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

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.

ARTIGOS EM FASE DE SUBMISSÃO

Castro, P.S.; Bertotti, M.; *SECM evaluation of topographic changes upon acid erosion in teeth samples.*

RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSO

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.

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, São Paulo, Brasil.

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 Encontro Nacional de Química Analítica (ENQA) e 3º Congresso Iberoamericano de Química Analítica (CIAQA) 2009, Salvador, Brasil

Castro, P. S.; Semaan, F. S.; Lowinsohn, D. *Determinação rápida de etambutol em amostras farmacêuticas por voltametria de onda quadrada empregando eletrodo compósito.* 15º Encontro Nacional de Química Analítica (ENQA) e 3º Congresso Iberoamericano de Química Analítica (CIAQA) 2009, Salvador, Brasil

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, São Paulo, Brasil.