



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - CPM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Camila Silva de Sousa

**Desenvolvimento de métodos eletroquímicos robustos para determinação da
naringenina em formulações farmacêuticas**

Florianópolis – SC

2023

Camila Silva de Sousa

Desenvolvimento de métodos eletroquímicos robustos para determinação da naringenina em formulações farmacêuticas

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador(a): Prof^ª Dr^ª Cristiane Luisa Jost.

Florianópolis - SC

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Silva de Sousa, Camila

Desenvolvimento de métodos eletroquímicos robustos para
determinação da naringenina em formulações farmacêuticas /
Camila Silva de Sousa ; orientador, Cristiane Luisa Jost,
2023.

94 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas,
Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Química. 2. Naringenina. 3. Método eletroanalítico. 4.
Eletrodo de carbono vítreo. 5. Eletrodo de ouro. I. Jost,
Cristiane Luisa. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

Camila Silva de Sousa

Desenvolvimento de métodos eletroquímicos robustos para determinação da naringenina em formulações farmacêuticas

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 25 de Agosto de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof^ª Dr^ª Cristiana Andrade Pessôa
Universidade Federal de Ponta Grossa

Prof. Dr. Eduardo Zapp
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestra em Química.

Insira neste espaço a
assinatura digital

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a
assinatura digital

Prof^ª Dr^ª Cristiane Luisa Jost
Orientadora

Florianópolis, 2023.

“É preciso força pra sonhar e perceber que a estrada vai além do que se vê.”

Los Hermanos

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me dar forças para que eu pudesse prosseguir em minha caminhada em busca dos meus sonhos, me protegendo e guiando em todos os momentos.

À minha família em especial ao meu pai Marco Antônio por todo o apoio, incentivos e sacrifícios para que eu alcançasse meus objetivos. Seu apoio tem sido fundamental em minha jornada.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a. Cristiane Luisa Jost pelo voto de confiança que depositou em mim para a realização deste trabalho e me acolher tão bem em seu grupo de pesquisa. Sou grata por todos os ensinamentos e o apoio que recebi, além de ser inspirada pelo seu exemplo como mulheres na ciência. Sua orientação foi essencial para o desenvolvimento desta pesquisa e para meu crescimento profissional.

Ao meu amigo Antônio Gomes por sempre estar ao meu lado me ajudando, incentivando e encorajando tanto na vida acadêmica quanto pessoal. Sua presença e apoio têm sido inestimáveis para mim. Obrigada por ser um amigo leal em todos os momentos.

Aos amigos do Ampere, em especial ao José, Kelline e o Adriano por sempre estarem dispostos a me ajudar, tanto na vida pessoal quanto acadêmica, compartilhando conhecimentos.

Ao Ampere pela estrutura maravilhosa que contribuiu para o meu desenvolvimento durante o mestrado, especialmente nesta pesquisa.

À Ana Caroline, ao Laboratório de Eletroquímica (LEQUI) – UFAL e à Essentia Pharma pela parceria.

À Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC por todas as oportunidades que me foram proporcionadas.

A todos os excelentes professores da UFSC que contribuíram para a minha formação.

Aos órgãos de fomento CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

A NAR é um flavonoide fitoterápico amplamente encontrado em frutas cítricas e vegetais, apresentando uma variedade de efeitos farmacológicos. Este flavonoide é considerado um candidato promissor para uso industrial, incluindo aplicações em produtos farmacêuticos e alimentícios. Devido à sua extrema importância, torna-se essencial o desenvolvimento de um método analítico sensível, robusto e seletivo para a sua detecção e/ou quantificação. O presente trabalho apresenta o desenvolvimento de métodos eletroquímicos para determinação do antioxidante NAR em formulações farmacêuticas. Para isso, realizou-se a caracterização e aplicação de eletrodos de carbono vítreo (GCE) e ouro (GE) a partir de estudos por espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS), voltametria cíclica (CV) e voltametria de pulso diferencial (DPV). O melhor sinal de corrente foi otimizado em eletrólito suporte B-R 0,30 mol/L⁻¹ (pH 10,0) para GCE e B-R 0,10 mol/L⁻¹ (pH 9,0). A DPV foi empregada para a determinação eletroanalítica de NAR, em condições otimizadas, observou-se incremento de corrente de pico de oxidação na faixa de 1,20 a 19,10 mg L⁻¹ ($R^2 = 0,995$) com valor de LOD = 0,11 mg L⁻¹ e LOQ = 0,36 mg L⁻¹ para GCE, utilizando o método de calibração externa. Para o GE, apresentou linearidade no intervalo de 0,27 – 0,48 mg L⁻¹ ($R^2 = 0,996$), com valores de LOD = 0,04 mg L⁻¹ e LOQ = 0,13 mg L⁻¹, utilizando o método de calibração por adição de padrão. Os eletrodos apresentaram seletividade adequada na presença de possíveis interferentes. A precisão intra e inter dia foi determinada com baixos valores de desvio padrão relativo (RSD), 1,54% e 3,99%, respectivamente, utilizando o GCE, e 0,46% e 1,10%, respectivamente, utilizando o GE. Os resultados demonstram que os métodos desenvolvidos podem ser usados para a determinação de NAR em formulações farmacêuticas com sensibilidade, seletividade e robustez.

Palavras-chave: naringenina; flavonoides; método eletroanalítico; eletrodo de carbono vítreo; eletrodo de ouro.

ABSTRACT

NAR is a herbal flavonoid widely found in citrus fruits and vegetables, presenting a variety of pharmacological effects. This flavonoid is considered a promising candidate for industrial use, including applications in pharmaceutical and food products. Due to their extreme importance, as the intake of antioxidants is related to the treatment and prevention of diseases, it is essential to develop a sensitive, robust and selective analytical method for their detection and/or quantification. The present work presents the development of electrochemical methods for determining antioxidant NAR in pharmaceutical formulations. To this end, the characterization and application of glassy carbon (GCE) and gold (GE) electrodes was carried out based on studies using electrochemical impedance spectroscopy (EIS), cyclic voltammetry (CV) and differential pulse voltammetry (DPV). The best current signal was optimized in supporting electrolyte B-R 0.30 mol/L⁻¹ (pH 10.0) for GCE and B-R 0.10 mol/L⁻¹ (pH 9.0). DPV was used for the electroanalytical determination of NAR, under optimized conditions, an increase in oxidation peak current was observed in the range of 1.20 to 19.10 mg L⁻¹ ($R^2 = 0,995$) with a LOD value = 0.11 mg L⁻¹ and LOQ = 0.36 mg L⁻¹ for GCE, using the external exclusion method. For GE, it presented linearity in the range of 0.27 – 0.48 mg L⁻¹ ($R^2 = 0,996$), with values of LOD = 0.04 mg L⁻¹ and LOQ = 0.13 mg L⁻¹, using the specificity method by pattern addition. The electrodes showed adequate selectivity in the presence of possible interference. Intra- and inter-day precision was determined with low relative standard deviation (RSD) values, 1.54% and 3.99%, respectively, using the GCE, and 0.46% and 1.10%, respectively, using the GE. The results demonstrate that the developed methods can be used to determine NAR in pharmaceutical formulations with sensitivity, selectivity and robustness.

Keywords: naringenin; flavonoids; electroanalytical method; glassy carbon electrode; gold electrode.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura básica dos flavonoides.....	18
Figura 2: Subclasses de alguns flavonoides: (a) flavonóis, (b) flavonas, (c) chalconas, (d) flavanonas, (e) antocianidinas e (f) isoflavonas [30].....	19
Figura 3: Estrutura da NAR.....	20
Figura 4: (a) Perfil de corrente registrado em função do potencial, conhecido como voltamograma cíclico e (b) variação de potencial no tempo durante a CV.....	25
Figura 5: (a) Representação do voltamograma de pulso diferencial e (b) representação esquemática da aplicação do potencial em função do tempo na DPV.	26
Figura 6: Gráfico de Nyquist.....	28
Figura 7: Voltamograma cíclico do GE em 10 mL de solução aquosa de ácido sulfúrico 0,50 mol L ⁻¹ como eletrólito suporte.	34
Figura 8: Diagrama de Nyquist obtido por EIS para GCE.	42
Figura 9: Voltamogramas cíclicos do GCE em K ₃ Fe(CN) ₆ /K ₄ Fe (CN) ₆ 5 mmol L ⁻¹ em KCl 0,1 mol L ⁻¹	43
Figura 10: Voltamogramas cíclicos referentes a ausência (voltamograma preto) e a presença de 13,60 mg L ⁻¹ de NAR (voltamograma vermelho) no GCE. Experimentos conduzidos em eletrólito suporte 0,10 mol L ⁻¹ B-R, pH 10,0, v = 0,05 V s ⁻¹	44
Figura 11: (a) e (b) Voltamogramas cíclicos para NAR 13,60 mg L ⁻¹ sobre o GCE na presença de diferentes pHs, (c) dependência da corrente (ipa) e potencial de pico (Ep) com o pH do meio (n = 3). Experimentos conduzidos em eletrólito suporte B-R 0,10 mol L ⁻¹ , v = 0,05 V s ⁻¹	45
Figura 12: (a) Voltamogramas cíclicos para NAR em 13,60 mg L ⁻¹ , (b) potencial de pico para cada tipo de eletrólito (n = 3) e (c) dependência do potencial de pico (Ep) para cada tipo de eletrólito suporte. Estudos conduzidos em B-R 0,10 mol L ⁻¹ (pH 10,0), utilizando a plataforma GCE, v=0,05 V s ⁻¹	46
Figura 13: (a) Voltamogramas cíclicos para NAR em 13,60 mg L ⁻¹ e (b) ipa vs. concentração (n = 3). Estudo realizado em eletrólito suporte B-R 0,05 a 0,30 mol L ⁻¹ (pH 10,0) utilizando o GCE, v = 0,05V s ⁻¹	47
Figura 14: (a) Voltamogramas cíclicos para 13,60 mg L ⁻¹ de NAR sobre o GCE em diferentes velocidades de varredura, variando de 0,020 a 0,100 Vs ⁻¹ , (b) dependência linear das correntes de pico (ipa) com a variação de velocidade de varredura e (c) ipa vs. v ^{1/2} . Experimentos conduzidos em solução B-R 0,30 mol L ⁻¹ , pH 10,0.	48

Figura 15: Voltamogramas cíclicos para (a) 13,60 mg L ⁻¹ de NAR sobre o GCE em solução B-R 0,30 mol L ⁻¹ , pH 10,0 em diferentes velocidades de varredura, variando de 0,100 a 0,500 Vs ⁻¹ , (b) dependência linear das ipa com a v ; (c) dependência linear das ipa vs. $v^{1/2}$ e (d) dependência do log ipa com o log v da NAR.	49
Figura 16: Voltamograma de pulso diferencial (ΔI vs. E/V) em presença de 25 mg L ⁻¹ de NAR. Estudo realizado em eletrólito 0,30 mol L ⁻¹ de B-R, pH 10,0, $v=0,05$ V s ⁻¹	50
Figura 17: Mecanismo proposto para a oxidação da NAR sobre a plataforma GCE.	50
Figura 18: Voltamograma cíclico referente às diferentes adições de NAR em solução eletrolítica contendo o GCE. Experimentos coletados em eletrólito suporte B-R 0,30 mol L ⁻¹ (pH 10,0). [NAR] = 2,7, 4,1 5,5, 6,8, 8,2, 9,5, 10,9, 12,3 e 13,60 mg L ⁻¹	51
Figura 19: (a) Voltamogramas referentes ao estudo de diferentes técnicas para 20 mg L ⁻¹ de NAR e (b) ipa vs. diferentes técnicas ($n = 3$). Estudos coletados em B-R 0,30 mol L ⁻¹ , pH 10,0 e $v=0,05$ V s ⁻¹	52
Figura 20: (a) Voltamograma DPV para diferentes velocidades de varredura para 25 mg L ⁻¹ de NAR, (b) Curva relacionando ipa pela velocidade de velocidade, (c) DPV para diferentes t pulso para 20 mg L ⁻¹ de NAR; (d) Curva relacionando ipa com t pulso, (e) DPV para diferentes E pulso para 15 mg L ⁻¹ de NAR e (f) Curva relacionando ipa pelo E pulso. Estudos coletados com solução B-R 0,30 mol L ⁻¹ , pH 10,0, ($n = 3$).	54
Figura 21: (a) DPV para diferentes concentrações de NAR. (b) Curva de calibração por adição padrão ($n = 3$). Experimentos coletados em eletrólito suporte B-R 0,30 mol L ⁻¹ (pH 10,0). [NAR] = 2,2, 3,8, 4,9, 7,1, 8,2, 9,3, 10,9, 13,6, 16,3, 19,1, 21,8, 24,5 e 27,20 mg L ⁻¹	56
Figura 22: (a) DPV referente às diferentes adições de NAR em solução eletrolítica contendo o GCE, (b) Curva referente a calibração externa ($n = 3$). Experimentos coletados em eletrólito suporte B-R 0,3 mol L ⁻¹ (pH 10,0). [NAR] = 1,2, 1,6,1,9, 2,2, 2,3, 2,7, 3,8, 4,9, 7,1, 8,2, 9,3, 10,9, 13,6, 16,3 e 19,10 mg L ⁻¹	56
Figura 23: Curva referente a calibração externa e adição de padrão ($n = 3$). Experimentos coletados em eletrólito suporte B-R 0,30 mol L ⁻¹ (pH 10,0). [NAR] = 2,2, 2,3, 2,7, 3,8, 4,9, 7,1, 8,2, 9,3, 10,9, 13,6, 16,3 e 19,10 mg L ⁻¹	57
Figura 24: Gráfico de ipa com diferentes medidas obtidas através de DPV para: (a) Intra-dia e (b) Inter-dia. Testes coletados em eletrólito suporte B-R 0,30 mol L ⁻¹ , pH 10,0 na presença de 13,60 mg L ⁻¹ de NAR.	58
Figura 25: Influência de possíveis interferentes na corrente de 5,44 mg L ⁻¹ de NAR. Os experimentos foram conduzidos em eletrólito suporte B-R 0,30 mol L ⁻¹ , pH 10. (Interferentes)	

= 27,20 mg L ⁻¹ , (a) ácido ascórbico, (b) quercetina, (c) ácido cítrico, (d) lactose, (e) ácido cafeico, (f) α -celulose e (g) glicose.	61
Figura 26: Diagrama de Nyquist obtido por EIS para GE.....	65
Figura 27: Voltamogramas cíclicos do GE em K ₃ Fe(CN) ₆ /K ₄ Fe (CN) ₆ 5 mmol L ⁻¹ em KCl 0,1 mol L ⁻¹	66
Figura 28: Voltamogramas cíclicos referentes ao GE na ausência (voltamograma preto) e na presença da NAR (voltamograma vermelho). Experimento conduzido em eletrólito suporte B-R 0,10 mol L ⁻¹ , pH 9,0 em 0,05 V s ⁻¹	67
Figura 29: (a) e (b) Voltamogramas cíclicos para NAR 13,60 mg L ⁻¹ sobre o GE na presença de diferentes pHs, (c) dependência da corrente (ipa) e potencial de pico (Ep) com o pH do meio ($n = 3$). Experimentos conduzidos em eletrólito suporte B-R 0,10 mol L ⁻¹ , $v = 0,05 \text{ V s}^{-1}$	68
Figura 30: (a) Voltamogramas cíclicos referente à influência do eletrólito suporte sobre a corrente anódica para oxidação da NAR e (b) relação do potencial de pico para cada tipo de eletrólito. Experimentos coletados em solução Fosfato, Sorensen e B-R (0,10 mol L ⁻¹ , pH 9,0, $v=0,05 \text{ V s}^{-1}$) em eletrodo GE.....	69
Figura 31: (a) Voltamogramas cíclicos para NAR em 13,60 mg L ⁻¹ e (b) ipa com concentração do eletrólito. Estudo realizado em eletrólito suporte B-R 0,05 a 0,30 mol L ⁻¹ (pH 9,0) utilizando o GE e $v = 0,05 \text{ V s}^{-1}$	70
Figura 32: Voltamogramas cíclicos para (a) 13,60 mg L ⁻¹ de NAR sobre o GE em solução B-R 0,10 mol L ⁻¹ , pH 9,0 em diferentes velocidades de varredura, variando de 0,010 a 0,100 Vs ⁻¹ , (b) dependência linear das ipa com a variação da v ; (c) dependência linear das ipa vs. $v^{1/2}$ e (d) dependência log ipa com o log v da NAR.....	71
Figura 33: Gráfico para valores de Ep vs. log v obtidos a partir do estudo de velocidade de varredura.	72
Figura 34: Voltamogramas cíclicos para (a) 13,60 mg L ⁻¹ de NAR sobre o GE em solução B-R 0,10 mol L ⁻¹ , pH 9,0 em diferentes velocidades de varredura, variando de 0,100 a 0,500 Vs ⁻¹ , (b) dependência linear das ipa com a v ; (c) dependência linear das ipa vs. $v^{1/2}$ e (d) dependência do log ipa com o log v	73
Figura 35: Voltamograma cíclico referente às diferentes adições de NAR em solução eletrolítica contendo o GE. Experimentos coletados em eletrólito suporte B-R 0,10 mol L ⁻¹ (pH 9,0). [NAR] = 1,36, 2,72, 4,08, 5,45, 6,81, 8,17, 9,53, 10,89, 12,25, 13,61, 14,97, 16, 16,34, 17,7 e 19,60 mg L ⁻¹	74
Figura 36: Voltamogramas referentes ao estudo de diferentes técnicas para 20 mg L ⁻¹ de NAR coletados em GE com solução B-R 0,10 mol L ⁻¹ , pH 9,0 e $v = 0,05 \text{ V s}^{-1}$	75

- Figura 37: (a) Voltamograma DPV para diferentes velocidades de varredura para 25 mg L^{-1} de NAR, (b) Curva relacionando ipa pela velocidade de varredura, (c) DPV para diferentes t pulso para 20 mg L^{-1} de NAR; (d) Curva relacionando ipa com t pulso, (e) DPV para diferentes E pulso para 15 mg L^{-1} de NAR e (f) Curva relacionando ipa pelo E pulso. Estudos coletados com solução B-R $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, pH 9,0, ($n = 3$)..... 76
- Figura 38: (a) Voltamogramas de pulso diferencial referente às diferentes adições de NAR em solução eletrolítica contendo o GE, (b) subtração da corrente após a adição do analito pela corrente do branco e (d) Curva referentes a calibração por adição padrão ($n = 3$). Experimentos coletados em eletrólito suporte B-R $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 9,0). $[\text{NAR}] = 0,27, 0,32, 0,38, 0,43$ e $0,48 \text{ mg L}^{-1}$ 77
- Figura 39: Gráfico de ipa com diferentes medidas obtidas através de DPV para: (a) Intra-dia e (b) Inter-dia. Testes coletados em eletrólito suporte B-R $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, pH 9,0 na presença de $0,40 \text{ mg L}^{-1}$ de NAR. 78
- Figura 40: Influência de possíveis interferentes na corrente de $0,40 \text{ mg L}^{-1}$ de NAR. Os experimentos foram conduzidos em eletrólito suporte B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 9,0. (Interferentes) = $27,20 \text{ mg L}^{-1}$, (a) ácido ascórbico, (b) quercetina, (c) ácido cítrico, (d) lactose, (e) ácido cafeico, (f) α -celulose e (g) glicose. 81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Propriedades da NAR.	21
Tabela 2: Resumo dos trabalhos encontrados na literatura para determinação de NAR.	23
Tabela 3: Eletrodos de trabalho e suas composições.	31
Tabela 4: Reagentes utilizados no preparo das soluções.	36
Tabela 5: Otimização dos parâmetros de DPV para determinação de NAR.	55
Tabela 6: Parâmetros e valores para NAR sobre a plataforma GCE.	59
Tabela 7: Parâmetros estatísticos obtidos a partir das análises das amostras contendo NAR. .	60
Tabela 8: Efeito de interferentes frente a resposta da NAR no GCE proporção de 1:5.	63
Tabela 9: Parâmetros e valores para NAR sobre a plataforma GE referente a Figura 38c.	79
Tabela 10: Parâmetros estatísticos obtidos a partir das análises das amostras contendo NAR.	79
Tabela 11: Comparação de métodos eletroanalíticos para determinação de NAR.	80
Tabela 12: Efeito de interferentes frente a resposta da NAR no GE proporção de 1:5.	82

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AE - (*Auxiliar Electrode*) - Eletrodo auxiliar

B-R - (*Britton-Robinson buffer solution*) - Solução tampão Britton-Robinson

CE - (*capillary electrophoresis*) - Eletroforese capilar

CE-DAD - Eletroforese capilar com detector de matriz de diodos

CE-ED - Eletroforese capilar com detecção eletroquímica

CV - (*cyclic voltammetry*) - Voltametria cíclica

DPV - (*differential pulse voltammetry*) - Voltametria de pulso diferencial

EIS - (*electrochemical impedance spectroscopy*) - Espectroscopia de impedância eletroquímica

Ep - Potencial de pico

GCE - (*glassy carbon electrode*) - Eletrodo de carbono vítreo

GE - (*gold electrode*) – Eletrodo de ouro

HPLC-DAD - Cromatografia líquida de alto desempenho com um detector de matriz de diodos.

HPLC - UV - Cromatografia líquida de alta eficiência acoplado ao detector de UV.

ipa - Corrente de pico anódico

ip - Corrente de pico

LC - MS - cromatografia líquida-espectrometria de massa

LOD - (*limit of detection*) - Limite de detecção

LOQ - (*limit of quantification*) - Limite de quantificação

LSV - (*linear scan voltammetry*) - Voltametria de varredura linear

RE - (*Reference Electrode*) - Eletrodo de referência

SWV - (*square wave voltammetry*) - Voltametria de onda quadrada

t_p - Tempo de pulso

v - Velocidade de varredura

WE - (*Working Electrode*) - Eletrodo de trabalho

UHPLC–ESI-MS/MS - Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplado com espectrometria de massas com ionização por electrospray

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVOS.....	17
2.1. OBJETIVOS GERAIS	17
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
3.1. FLAVONOIDES	18
3.1.1. Atividade antioxidante	19
3.2. NARINGENINA	20
3.2.1. Técnicas de quantificação da NAR	21
3.3. TÉCNICAS ELETROANALÍTICAS	24
3.3.1 Voltametria Cíclica.....	24
3.3.2 Voltametria de Pulso Diferencial	26
3.3.3 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica.....	27
3.4 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	28
3.4.1 Linearidade	28
3.4.2 Limite de detecção	29
3.4.3 Limite de quantificação.....	29
3.4.4 Precisão.....	30
3.4.5 Exatidão.....	30
3.5 CÉLULA ELETROQUÍMICA E ELETRODOS.....	30
3.5.1 Eletrodos de trabalho	31
3.5.1.1 Eletrodo de carbono vítreo	32

3.5.1.2	Eletrodo de Ouro	33
3.6	DETERMINAÇÃO ELETROQUÍMICA DA NAR.....	34
4	MATERIAIS E PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	35
4.5	REAGENTES E SOLUÇÕES.....	35
4.5.1	Reagentes e soluções	35
4.6	INSTRUMENTAÇÃO.....	36
4.6.1	Medidas eletroquímicas	36
4.7	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	38
4.7.1	Tratamento da superfície do eletrodo GCE	38
4.7.2	Tratamento da superfície do eletrodo de GE	38
4.7.3	Obtenção e preparo das amostras de formulações farmacêuticas	38
4.7.4	Faixa linear, limite de quantificação e limite de detecção	38
4.7.5	Precisão	39
4.7.6	Exatidão	39
4.7.7	Seletividade	40
5	RESULTADOS ATINGIDOS	42
5.1	CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA	42
5.1.1	Medida de espectroscopia de impedância eletroquímica	42
5.1.1.1	Comportamento eletroquímico da NAR	43
5.1.2	Influência do pH e eletrólito suporte	44
5.1.3	Estudo de diferentes velocidades de varredura	47
5.1.4	Voltametria cíclica com diferentes concentrações de NAR	51
5.2	ESTUDOS ELETROANALÍTICOS	52
5.2.1	Seleção de técnica voltamétrica para a determinação da NAR	52
5.2.2	Otimização dos parâmetros operacionais em DPV	53
5.3	AVALIAÇÃO DAS FIGURAS DE MÉRITO DO MÉTODO ELETROANALÍTIVO	55

5.3.1	Curva de calibração	55
5.3.2	Precisão.....	57
5.3.3	Determinação de NAR em formulações farmacêuticas	59
5.3.4	Seletividade	61
6	RESULTADOS ATINGIDOS	65
6.1	CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA	65
6.1.1	Medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica	65
6.1.2	Comportamento eletroquímico da NAR	66
6.1.3	Influência do pH	67
6.1.4	Influência do eletrólito suporte	69
6.1.5	Estudo de diferentes velocidades de varredura	70
6.1.6	Voltametria cíclica com diferentes concentrações de NAR.....	73
6.2	ESTUDOS ELETROANALÍTICOS	74
6.2.1	Seleção de técnica voltamétrica para a determinação da NAR.....	74
6.2.2	Parâmetros operacionais em DPV	75
6.2.3	Curva de calibração	77
6.2.4	Precisão.....	78
6.2.5	Determinação de NAR em formulações farmacêuticas	79
6.2.6	Seletividade	81
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	83
	REFERÊNCIAS.....	84

1. INTRODUÇÃO

A comunidade científica tem se atentado ao estudo de diversos compostos, dentre estes encontram-se os flavonoides [1]–[3]. A fim de possibilitar o aprimoramento significativo de suas características biológicas para aplicação farmacológica, uma vez que sua baixa biodisponibilidade tem sido associada a interações de estágios do processo de digestão, absorção e distribuição, que é fortemente afetado por sua complexa estrutura molecular [4]. Deste modo, o uso de suplementos dietéticos enriquecidos em flavonoides tornou-se cada vez mais popular e necessário, visto que eles possuem baixa associação a efeitos colaterais [5]. Esses polifenóis são substratos de enzimas como as monooxigenases, bem como de transportadores de drogas envolvidos na excreção de drogas, o que faz com que compartilhem as mesmas vias metabólicas com muitos medicamentos terapêuticos [6].

Dentre esses compostos, destaca-se a naringenina (NAR) que é um composto flavonoide encontrado em frutas cítricas (toranjas e laranjas) e legumes [7]. A NAR exhibe vários efeitos farmacológicos, como propriedades anticâncer, antimutagênicas e antiinflamatórias, antioxidantes [8]. Consequentemente, dada a extrema importância da NAR, bem como a importância de associar a ingestão de antioxidantes ao tratamento ou prevenção de doenças, o desenvolvimento de novos métodos analíticos que sejam sensíveis, robustos e seletivos para a detecção e quantificação desse importante antioxidante é de interesse.

Paralelamente, a pesquisa por novos métodos para a determinação de antioxidantes que requerem poucas quantidades de amostras e instrumentação de baixo custo tem atraído o interesse de muitos pesquisadores do mundo inteiro. Os métodos eletroanalíticos tem atraído grande interesse na área de sensores eletroquímicos, dispositivos os quais permitem a coleta de dados e obtenção de informações com manipulação mínima do sistema estudado. As vantagens inerentes ao uso de sensores eletroquímicos incluem versatilidade, facilidade de automatização, possibilidade de miniaturização e baixo custo.

Logo, este trabalho visou o desenvolvimento e aplicação de métodos eletroquímicos sensíveis, robustos e seletivos para a determinação do antioxidante. Buscou-se caracterizar os eletrodos de carbono vítreo (GCE) e ouro (GE) e estudar a resposta eletroquímica da NAR frente a eles. Por fim, com a otimização das características desejadas, validou-se os métodos analíticos e aplicou-se a amostras reais de formulações farmacológicas. Até o momento, não há

relato na literatura para esse tipo de abordagem robusta e prática, o que torna este trabalho de extrema relevância para monitoramento em rotinas de controle de qualidade.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho visa o desenvolvimento de um sensível, robusto e seletivo método eletroquímico para a determinação do antioxidante NAR, para a aplicação em formulações farmacêuticas.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

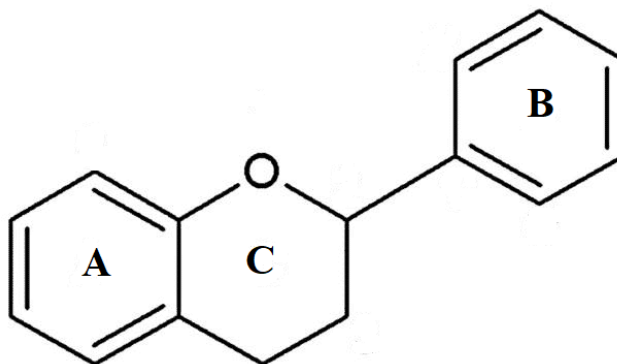
- Analisar o comportamento eletroquímico do GCE e GE por voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) em sonda redox $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 5 mmol/L^{-1} em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol/L}^{-1}$;
- Investigar as propriedades redox da NAR por meio das técnicas voltamétricas: voltametria cíclica (CV), voltametria linear (LSV) voltametria de pulso diferencial (DPV) e voltametria de onda quadrada (SWV);
- Estudar a influência da natureza do eletrólito suporte e velocidade de varredura sobre o comportamento eletroquímico da NAR;
- Otimizar os parâmetros operacionais da técnica escolhida;
- Determinar a faixa de concentração do analito, sensibilidade, seletividade, limite de detecção e quantificação, precisão e exatidão do método proposto;
- Aplicar o método eletroquímico em formulações farmacêuticas;
- Comparar o método proposto com outros descritos em literatura.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. FLAVONOIDES

Os flavonoides são um grupo de compostos encontrados naturalmente em diversas fontes [9]. Existem mais de 9.000 flavonoides atualmente encontrados em frutas [10], vegetais [11], sementes [12], cascas de árvores [13], raízes [14], talos [15], flores [16], chás [17], nozes [18], vinhos tintos [19] e ervas medicinais [20]. A ingestão diária de flavonoides pode variar significativamente, dependendo da dieta e dos alimentos consumidos, geralmente numa faixa de 20 a 500 mg/dia [21], [22]. Os flavonoides são substâncias que possuem propriedades benéficas, como atividades antioxidante, anticâncer, antialérgica, anti-inflamatória, antivírus, atividade antimicrobiana, antiviral, antiulcerosa, antineoplásica, hepatoprotetora, anti-hipertensiva, hipolipidêmica, antiplaquetária, dentre outras [23]. Estes efeitos podem estar relacionados às propriedades inibitórias que os flavonoides desempenham em vários sistemas enzimáticos, incluindo hidrolases, polimerases, fosfatases, proteínas fosfoquinases e aminoácido oxidases. Nas plantas, os flavonoides são frequentemente encontrados como glicosilados derivados de O- ou C-, e desempenham uma ampla variedade de papéis fisiológicos na ecologia vegetal. Eles atuam na proteção das plantas contra diversos estresses abióticos e bióticos, além de funcionarem como filtro UV [24]–[26]. A estrutura fundamental dos flavonoides é composta pelo núcleo flavano, que consiste em três anéis (C₆ - C₃ - C₆) de 15 átomos de carbono rotulados como A, B e C [27].

Figura 1: Estrutura básica dos flavonoides.

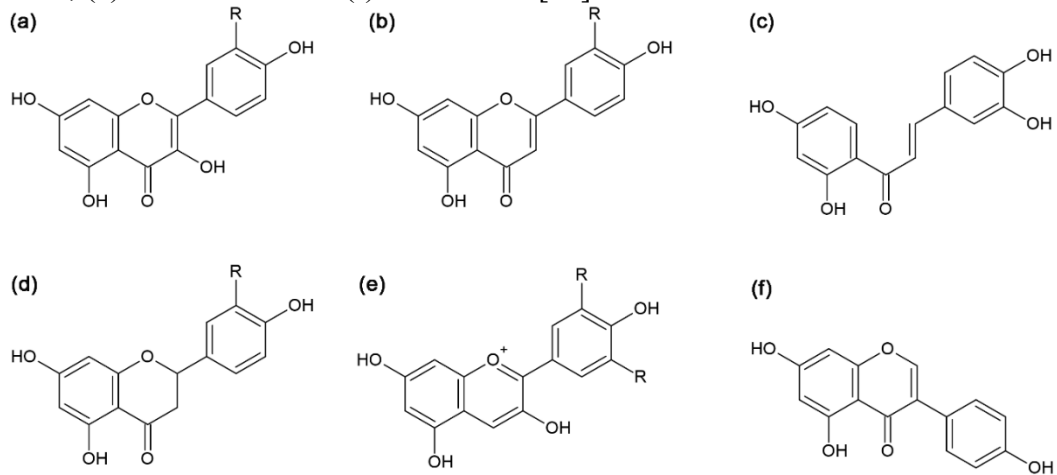


Fonte: Adaptado de N. F. Shamsudin *et al.*, 2022 [28].

Os flavonoides variam entre si devido às diferenças na posição das substituições nos anéis A, B e C [27]. Os flavonoides podem ser divididos em várias subclasses, incluindo

flavonóis, flavonas, chalconas, flavanonas, antocianidinas e isoflavonas, com base na estrutura e substituição química dos substitutos [29].

Figura 2: Subclasses de alguns flavonoides: (a) flavonóis, (b) flavonas, (c) chalconas, (d) flavanonas, (e) antocianidinas e (f) isoflavonas [30].



Fonte: Adaptado de George, Sariga, Ashlay *et al*, 2022 [30].

Os flavonoides possuem múltiplas funções e podem atuar como agentes redutores, supressores de oxigênio singlete, antioxidantes doadores de hidrogênio e também com agentes quelantes. Suas propriedades dependem fortemente da sua estrutura química, a qual é composta por vários grupos hidroxilas fenólicos livres, principalmente a hidroxila ortofenólica. A capacidade dos flavonoides de doar elétrons/hidrogênio e suas atividades quelantes de metais depende do número e da posição dos substituintes oxigenados presentes neles [30].

3.1.1. Atividade antioxidante

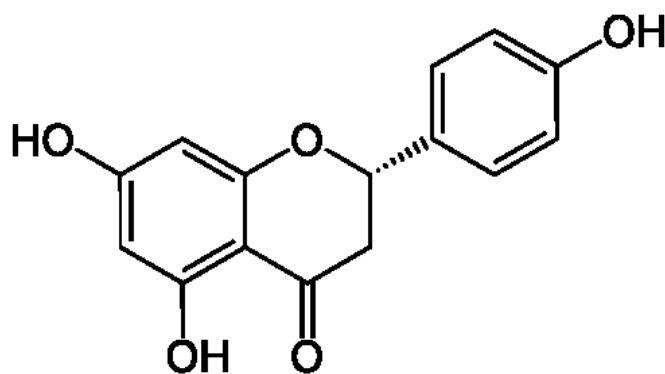
Uma das principais características, com relação a aplicações farmacêuticas de flavonoides é a atividade antioxidante destes. Os antioxidantes são substâncias que retardam o início da reação de oxidação, pois reagem com os radicais livres para formar compostos estáveis e, assim, impossibilitam a propagação das reações em cadeia que formam os compostos oxidados [31]. Os radicais livres são moléculas com elétrons altamente instáveis que podem causar doenças degenerativas e morte celular, gerados durante o metabolismo ou pela exposição a fatores ambientais [32].

O nosso sistema de defesa antioxidante captura e desfaz o excesso de radicais livres [33]. Nem todos esses compostos antioxidantes podem ser produzidos pelo nosso organismo, por isso devemos obtê-los através da alimentação e suplementos. Acredita-se que os antioxidantes ajudam a prevenir o desenvolvimento de doenças crônicas, como câncer, doenças cardíacas, derrame, doença de Alzheimer, artrite reumatóide e catarata [34]–[36].

3.2. NARINGENINA

A NAR também conhecida como 4',5,7-Trihidroxiflavanona, é uma flavanona amplamente encontrada nas frutas cítricas, tomate, cereja, toranja e no cacau, pode ser potencialmente útil como agente farmacológico, anticancerígeno, no tratamento ou prevenção da aterosclerose, com inúmeras atividades antiaterogênicas, com ação anti-inflamatória, antitrombótica e vasodilatadora [37]–[39]. Quando a naringina é glicosada pela atividade do complexo enzimático naringenase que é formado pela α -L-ramnosidase e pela β -D-glucosidade, produz-se a NAR e glicose [37]. A NAR apresenta reconhecida atividade antioxidante a qual é atribuída a sua relação estrutura-atividade [37]. O número de hidroxilas presentes em sua estrutura, permite que a NAR doe hidrogênios às espécies reativas de oxigênio, permitindo adquirir uma estrutura estável e, portanto, sendo capaz de sequestrar estes radicais livres [37] - [38]. Conseqüentemente, há um interesse crescente na administração da NAR por meio de diversas preparações, como produtos farmacêuticos, devido a importância de associar a ingestão deste antioxidante ao tratamento ou prevenção de doenças. Com isso, o desenvolvimento de métodos para a detecção e quantificação da NAR é importante para explorar suas potenciais aplicações.

Figura 3: Estrutura da NAR.



Fonte: Próprio autor.

Tabela 1: Propriedades da NAR.

Propriedades	Dados
Formula molecular	C ₁₅ H ₁₂ O ₅
Peso molecular	272,25 g/mol
Solubilidade em água	0,21 g/L
pKa	7,86

Fonte: Próprio autor.

3.2.1. Técnicas de quantificação da NAR

Na literatura, alguns métodos e técnicas vêm sendo desenvolvidos para a determinação da NAR em amostras com diferentes graus de complexidade, como cromatografia líquida de alta eficiência acoplado ao detector de UV (HPLC-UV) [41], eletroforese capilar com detector de matriz de diodos (CE-DAD) [42], eletroforese capilar com detecção eletroquímica (CE-ED) [41], cromatografia líquida de alto desempenho com um detector de matriz diodos (HPLC-DAD)/cromatografia líquida-espectrometria de massa (LC-MS) [43] e cromatografia líquida de ultra eficiência acoplado com espectrometria de massas com ionização por electrospray (UHPLC-ESI-MS/MS) [44]. Alguns desses trabalhos encontrados na literatura para a determinação da NAR estão descritos abaixo.

WSC Quintão *et al.*, [39] realizaram um estudo com o objetivo de validar um método cromatográfico para determinação de NAR em estudos de permeação cutânea. O método demonstrou linearidade ($R^2 > 0,99$) em uma ampla faixa de concentração de 0,5 a 10 mg L⁻¹. Além disso, o método mostrou-se sensível, com um LOD de 0,10 mg L⁻¹ e LOQ de 0,20 mg L⁻¹. Ele também se demonstrou seletivo em matrizes da pele, bem como aos produtos de degradação da NAR. Portanto, concluíram que o método foi adequado para ser utilizado em estudos de permeação celular que envolvem a NAR.

S Sanli e C Lunte. [40] Desenvolveram um método utilizando eletroforese capilar com detector de matriz de diodos (CE-DAD) para a identificação e quantificação de onze flavonoides, incluindo a NAR, em extratos de flores de camomila e tília. A linearidade foi estabelecida em uma faixa de concentração de 0,087 a 27,22 mg L⁻¹ para alguns dos analitos, incluindo a NAR, com coeficientes de correlação $\geq 0,99$. O método apresentou LOD de 0,027

mg L⁻¹ e LOQ de 0,081 mg L⁻¹. Concluíram que a aplicação do método em amostra de plantas, como flores de camomila e tília, resultou em recuperações satisfatórias dos flavonoides.

Y Peng *et al.*, [41] Desenvolveram um método de eletroforese capilar com detecção eletroquímica (CE-ED) para determinação simultânea de quatro principais marcadores flavonoides, dentre eles a NAR, em amostra de *Fruscus aurantii* de diferentes origens geográficas. As curvas de calibração foram lineares na faixa de 0,490 a 500 mg L⁻¹ para os marcadores. Para a NAR, foi obtido uma correlação linear de 0,99, com LOD de 0,010 mg L⁻¹. Concluíram que método foi aplicado com sucesso na análise de *Fruscus aurantii* utilizando procedimentos de extração robusta e que os resultados dos ensaios foram satisfatórios.

B. Barfi *et al.*, [42] Descreveram um método simplificado de distribuição de fase contínua de matriz assistida por ultrassom miniaturizado (SM-USA-MSPD) com uma aplicação em matrizes líquidas. Esse método foi desenvolvido para extrair diversos flavonoides, incluindo a NAR, de sucos de frutas cítricas e plasma humano, antes da sua determinação por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A curva de calibração mostrou uma faixa linear de concentração de 0,118 a 140,7 mg L⁻¹, com um coeficiente de correlação de 0,99. Os LOD e LOQ para a NAR foram de 0,037 a 0,109 mg L⁻¹, respectivamente. Concluíram que o método SM-USA-MSPD foi aplicado com sucesso para estimar os níveis de hesperidina e NAR no plasma e na excreção urinária após a ingestão de sucos de limão, laranja e toranja.

MLM Bilbao *et al.*, [43] Desenvolveram um método para identificação e quantificação de flavonoides em extratos de frutas cítricas por meio de HPLC com detector de matriz de diodos. Além disso, a cromatografia líquida acoplada à técnica de espectroscopia de massas foi aplicada para confirmar os resultados obtidos. A faixa linear de concentração para os flavonoides variou de 0,1 a 0,3 mg L⁻¹, com um coeficiente de correlação > 0,99. Os LOD e LOQ para a NAR de 0,014 mg L⁻¹ e 0,05 mg L⁻¹, respectivamente. Concluíram que método apresenta abordagem direta e rápida para a quantificação de flavonoides em extratos de frutas cítricas, com um tratamento de amostra simples.

IA Ribeira e MHL Ribeiro [44] Desenvolveram e validaram um método rápido de HPLC para controle simultâneo da naringina e NAR em diversas amostras de frutos cítricos. O método demonstrou linearidade na faixa de concentração de 10 a 60 mg L⁻¹ para a NAR, com R² = 0,99. Os LOD e LOQ obtidos para a NAR foram de 3,37 mg L⁻¹ e 1,11 mg L⁻¹, respectivamente. Concluíram que o método apresentou linearidade, precisão e seletividade para a identificação e quantificação de naringina e NAR em sucos cítricos.

L Di Donna *et al.*, [45] Apresentam uma metodologia simples e rápida para a análise e quantificação de flavanonas em sucos de frutas, ao qual se baseia no uso da química de derivatização, marcação de isótopos e espectrometria de massa em tandem. O ensaio é realizado usando cromatografia líquida de ultra alta pressão que reduz o tempo de análise para 16 min. A faixa linear foi obtida de 0,01 a 0,8 mg L⁻¹ para a NAR, com R² = 0,99. Os LOD e LOQ para a NAR foram de 0,14 mg L⁻¹ e 0,09 mg L⁻¹, respectivamente. Assim, concluíram que LODs tornam a metodologia útil para a investigação de metabólitos de flavanonas em fluidos biológicos. Além disso, uma outra aplicação pode ser uma análise de alimentos adulterados contendo sucos cítricos.

A Tabela 2 resume os trabalhos encontrados na literatura para a determinação de NAR, citados anteriormente, com suas respectivas faixas lineares, LOD, LOQ e amostras.

Tabela 2: Resumo dos trabalhos encontrados na literatura para determinação de NAR.

Técnica	Faixa Linear (mg L ⁻¹)	LOD (mg L ⁻¹)	LOQ (mg L ⁻¹)	Amostras	Referência
HPLC-UV	0,5 - 10	0,10	0,20	Permeação cutânea	[41]
HPLC-DAD	0,87 - 27,22	0,027	0,081	Extrato de plantas	[45]
CE-ED	0,490 – 500	0,010		<i>Frucus aurantii</i>	[42]
HPLC/SM-USA-MSPD	0,118 – 140,7	0,037	0,109	Frutas cítricas, plasma e urina em humanos.	[46]
HPLC-DAD/LC-MS	0,1 – 0,3	0,014	0,05	Frutas cítricas	[43]
HPLC-DAD	10 - 60	3,37	1,11	Sucos de frutas cítricas	[47]
UHPLC-ESI-MS/MS	0,01 – 0,8	0,14	0,09	Sucos de frutas cítricas	[44]

Fonte: Próprio autor.

No entanto, essas técnicas exigem um alto grau de habilidade técnica para operar um equipamento, altos custos em termos de maquinário, manutenção e uso de produtos químicos. Desta forma, as técnicas eletroanalíticas se apresentam como uma alternativa promissora, de mais baixo custo quando comparadas com as técnicas descritas na Tabela 2 e podem fornecer valores satisfatórios de LOD e LOQ.

3.3. TÉCNICAS ELETROANALÍTICAS

As técnicas eletroanalíticas fornecem inúmeras informações essenciais sobre o composto em análise, ela está principalmente relacionada com a natureza dos processos de oxirredução e mecanismos de transporte de elétrons, permitindo a quantificação de diferentes moléculas (ou espécies) com alta sensibilidade [48]. Ao longo dos anos como resultado do uso de técnicas eletroanalíticas, há um interesse crescente em estudar e aperfeiçoar seus procedimentos operacionais. O campo de aplicação dessas técnicas é muito amplo, principalmente em relação a medidas de concentração de espécies eletroativas usando sensores amperométricos, voltamétricos e potenciométricos [49]. Dentre essas técnicas, a voltametria é amplamente utilizada e discutida na comunidade científica. O princípio da voltametria emerge da aplicação controlada de um potencial elétrico por um certo tempo à superfície de um eletrodo, obtendo-se assim uma resposta analítica na forma de uma corrente proporcional à concentração do analito na solução [49].

As principais técnicas voltamétricas aplicadas em eletroanálise são: CV, DPV e SWV. Para estudos preliminares, é mais comum utilizar a técnica de CV, que é uma técnica analítica e eletroquímica que envolve a variação contínua e repetida do potencial (voltagem) aplicado a uma célula eletroquímica. A partir disso, os sinais redox (correntes de pico e potenciais padrão), a reversibilidade da reação e o perfil eletrocatalítico podem ser analisados qualitativamente e qualitativamente [50]. As técnicas de DPV e SWV, são modos de varredura mais sensíveis e que trabalham com o aumento progressivo de pulsos do potencial, são amplamente utilizadas em estudos eletroquímicos e em análises químicas para a determinação de concentração de espécies eletroativas em solução [51].

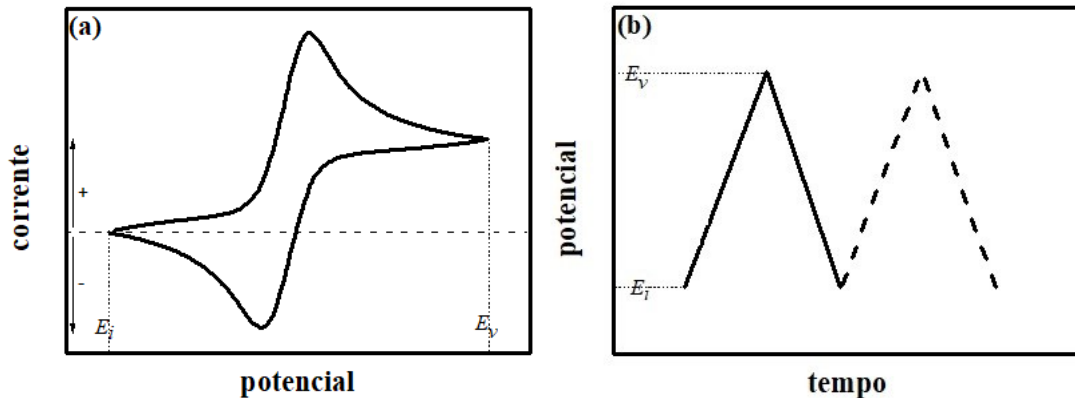
As técnicas mais empregadas no presente trabalho foram a CV e a DPV.

3.3.1 Voltametria Cíclica

Na CV, o potencial aplicado (E) é definido com a diferença de potencial do eletrodo de trabalho (WE) e do eletrodo de referência (RE) [52]. Durante a análise, o potencial varia com o tempo, percorrendo uma faixa desde o potencial inicial (E_i) até o um potencial limite (E_v). No entanto, em vez de terminar no potencial limite, a direção da varredura de potencial é invertida em direção ao potencial inicial, geralmente mantendo-se a velocidade constante [52]. A corrente que flui pelo sistema nessas direções pode ser plotada em função do potencial (corrente *versus*

potencial), gerada em um diagrama denominado voltamograma cíclico [52], como mostrado na Figura 4.

Figura 4: (a) Perfil de corrente registrado em função do potencial, conhecido como voltamograma cíclico e (b) variação de potencial no tempo durante a CV.



Fonte: Adaptado de Fatibello Filho e Orlando *et al.*, 2019 [52].

Quando ocorre um processo redox na interface, haverá um fluxo de elétrons por essa interface [52]. Esse fluxo pode ocorrer de duas formas:

1. No sentido da solução para o eletrodo, o que configura um processo de oxidação. Por convenção da IUPAC, essa oxidação produz uma corrente com sinal positivo [52];
2. No sentido do eletrodo para a solução, o que configura um processo de redução. Nesse caso, a redução produz uma corrente com sinal negativo, por convenção da IUPAC [52].

A corrente de pico na CV está relacionada ao potencial aplicado. No entanto, é importante destacar que a corrente total medida inclui a corrente faradaica (desejável) e da corrente capacitiva (corrente residual). A presença da corrente capacitiva dificulta a utilização da técnica para aplicações quantitativas. Portanto, a CV apresenta limitações, sendo mais adequada para determinar espécies em concentrações entre 10^{-4} e 10^{-5} mol L⁻¹ [53], [54].

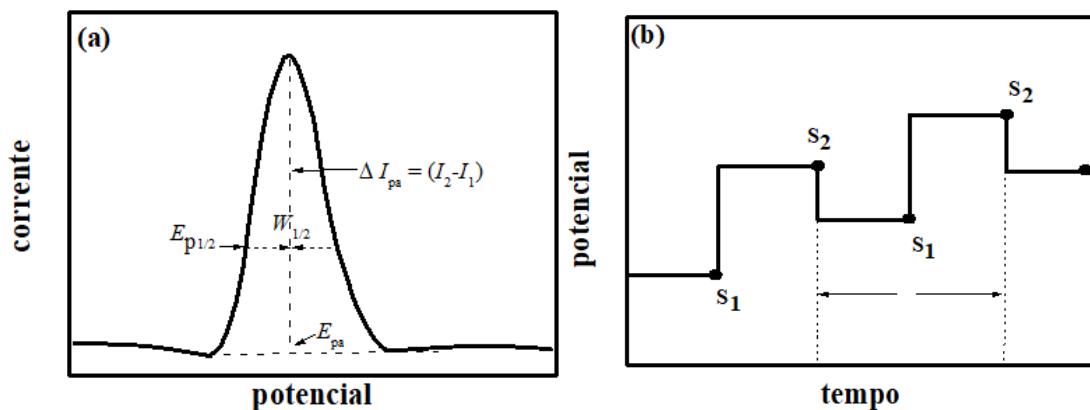
A utilização de técnicas complementares, como DPV, pode superar essas limitações, oferecendo maior sensibilidade e resolução na determinação de espécies em baixas concentrações.

3.3.2 Voltametria de Pulso Diferencial

O desenvolvimento das técnicas de pulso, como a DPV, representa um avanço importante para superar as limitações da LSV em termos de limite de detecção. A melhor sensibilidade da DPV é atribuída principalmente à diminuição da corrente capacitiva nas reações eletroquímicas, resultando em uma melhora significativa na detecção e quantificação dessas reações [55], [56].

Na técnica de DPV, pulsos de potencial são aplicados ao eletrodo de trabalho, sendo sobreposta a uma rampa de potencial crescente, como mostra a Figura 5b. Duas medidas da corrente são realizadas: uma antes da aplicação do pulso (S_1), em que a corrente medida é principalmente a corrente capacitiva remanescente do pulso anteriormente aplicado, e outra ao final do pulso (S_2) Figura 5b, onde a corrente total é lida. Na medida (S_2), ocorre a correção da corrente capacitiva, uma vez que ela diminui exponencialmente após o estímulo ter sido interrompido, enquanto a corrente faradaica diminui de forma hiperbólica. Do ponto de vista instrumental, a primeira corrente (S_1) é subtraída da segunda corrente (S_2), resultando na diferença que representa essencialmente a corrente faradaica, conhecida como densidade da corrente [54], [55], [57].

Figura 5: (a) Representação do voltamograma de pulso diferencial e (b) representação esquemática da aplicação do potencial em função do tempo na DPV.



Fonte: Adaptado de Fatibello Filho e Orlando *et al.*, 2022 [52].

O perfil do voltamograma de pulso diferencial (ΔI versus E) apresenta forma gaussiana, conforme mostrado na Figura 5a. As correntes amostradas (I) em diferentes tempos (S_1 e S_2) são substituídas em $(I_1 - I_2)$. A diferença das correntes (ΔI) é colocada em gráfico em função

do potencial. Para um processo faradaico, a resposta é caracterizada por uma corrente de pico [52], como mostra a Figura 5a.

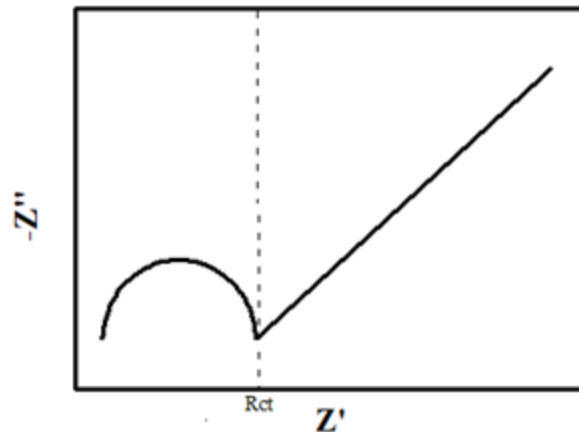
A DPV possui uma sensibilidade muito maior que a CV, alcançando limites de 10^{-7} a 10^{-8} mol L⁻¹. Além disso, essa técnica oferece uma resolução aprimorada, permitindo determinação simultânea de espécies eletroativas com diferentes potenciais de pico em uma faixa estreita de apenas 50 a 100 mV [54].

3.3.3 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

A EIS, é uma técnica bastante empregada na caracterização eletroquímica de diferentes sistemas. Ela possibilita a avaliação das propriedades elétricas das interfaces eletroquímicas, fornecendo informações valiosas sobre resistência, capacitância e indutância do sistema. Através da EIS, é possível investigar a cinética das reações eletroquímicas, o processo de difusão das espécies, absorção de moléculas na superfície do eletrodo e outras características interfaciais [58].

Nos gráficos de Nyquist, plota-se a impedância imaginária (Z'') em função da impedância real (Z'). Em sistemas eletroquímicos, a impedância imaginária é geralmente representada como uma parte negativa [59], característico devido à resposta transitória do sistema em relação ao sinal de entrada. Nesses gráficos, observa-se duas regiões distintas [60]. A primeira é um semicírculo encontrado em altas frequências, conhecido como área de difusão limitada, cujo diâmetro está relacionado à resistência às transferências de carga (R_{ct}) e, portanto, está relacionado aos processos cinéticos de transferência de elétrons da sonda redox na interface do eletrodo [61]. A segunda é uma linha reta conhecida como a região de Warburg, que corresponde ao processo de transporte de massa. Nessa região, a transferência de massa da espécie redox para e da região interfacial torna-se substancial [61].

Figura 6: Gráfico de Nyquist.



Fonte: Adaptado de X. Wan *et al.*, 2019 [60].

Os Gráficos de Nyquist permitem estimar a natureza e estabilidade do sistema sem a necessidade de tratamentos complexos [61].

3.4 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

As técnicas eletroanalíticas devem passar por um processo de validação que envolvem a avaliação de parâmetros de desempenho. Os parâmetros mais comumente avaliados são: linearidade, seletividade, LOD, LOQ, precisão e exatidão. É de extrema importância garantir que essas técnicas sejam devidamente validadas, a fim de garantir a confiabilidade e a precisão dos resultados obtidos [62], [63].

3.4.1 Linearidade

No método, é essencial que exista uma relação linear em toda a faixa estabelecida, o que implica na utilização de no mínimo cinco concentrações diferentes de substância química em solução preparadas em triplicata. Para as técnicas eletroanalíticas, a linearidade é uma medida da correspondência entre a curva de calibração da resposta eletroanalítica e a concentração do analito [64]. Portanto, o coeficiente de correlação (R^2) obtido na curva de calibração é um indicativo da adequação do modelo matemático linear. Recomenda-se um valor de R^2 acima de 0,990, conforme estabelecido pela ANVISA [65].

3.4.2 Seletividade

A seletividade é responsável por garantir que não haja interferência de outras espécies na identificação ou quantificação de um determinado composto. Na eletroquímica, a seletividade é fundamental para assegurar que o pico de resposta gerado no voltamograma (corrente *versus* potencial) seja exclusivamente atribuído ao analito de interesse [63].

A avaliação da seletividade nos permite identificar potenciais interferências causadas pelos componentes da matriz, as quais podem resultar na diminuição ou amplificação do sinal instrumental para o analito. Essa seletividade pode ser determinada por meio de várias abordagens, tais como a comparação entre matriz sem o analito de interesse e a matriz contendo o analito de interesse (como padrão), ou através do emprego do método de adição de padrão.

3.4.2 Limite de detecção

O LOD é determinado pela menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada. Existem várias abordagens que podem ser utilizadas para determinar o limite de detecção do método. Essas abordagens incluem a avaliação visual, a relação sinal-ruído, a estimativa a partir da curva analítica ou o cálculo baseado no desvio padrão do branco na curva analítica. Sendo essa última, utilizada para o cálculo do limite de detecção deste trabalho. O LOD foi estimado estatisticamente pela razão de $3,3 \times \text{SDB}/\text{Slope}$, onde o SDB é o desvio padrão de 10 brancos [63].

3.4.3 Limite de quantificação

O LOQ é definido como a menor concentração de analito em uma amostra que pode ser determinada com uma precisão e exatidão aceitáveis, considerando as condições estabelecidas aceitáveis. As mesmas abordagens utilizadas para definir o LOD podem ser utilizadas para definir o LOQ. Neste trabalho o LOD foi estimado estatisticamente pela razão de $10 \times \text{SDB}/\text{Slope}$, onde o SDB é o desvio padrão de 10 brancos [63].

3.4.4 Precisão

A precisão avalia a concordância entre os resultados obtidos por meio de ensaios com amostras preparadas de acordo com o método analítico a ser validado. A precisão descreve a capacidade de reprodução das medidas, sendo influenciada apenas pela distribuição de erros aleatórios e não pelas proximidades com o valor verdadeiro [53].

Existem três maneiras comuns de expressar a precisão, que são a reprodutibilidade, repetibilidade e a precisão intermediária [63]. A repetibilidade, também conhecida como intra-dia, refere-se à precisão obtida nas mesmas condições em um curto tempo de intervalo (no mesmo dia). Já a precisão intermediária, também chamada de inter-dia, descreve as variações observadas dentro do laboratório, considerando diferentes dias, analistas, equipamentos, etc [65].

Os valores de precisão são frequentemente expressos como desvio padrão (DP) ou desvio padrão relativo (DPR) entre os resultados obtidos a partir de uma série de medidas realizadas exatamente nas mesmas condições [65]

3.4.5 Exatidão

A exatidão de um método analítico é determinada pela concordância entre os resultados individuais obtidos pelo método em estudo e um valor de referência aceito como verdadeiro. Essas avaliações permitem verificar o quão próximo os resultados estão do valor verdadeiro e é utilizada para avaliar a confiabilidade e precisão do método analítico [63].

A exatidão de um método pode ser obtida por meio de diferentes abordagens, como o uso de materiais de referência com valores certificados, a comparação com técnicas oficiais de análise ou a realização de ensaios de recuperação. Essas abordagens visam garantir a confiabilidade e a precisão dos resultados analíticos de acordo com a legislação vigente [63], [65].

3.5 CÉLULA ELETROQUÍMICA E ELETRODOS

Três eletrodos são utilizados nas técnicas eletroanalíticas: o eletrodo de trabalho, no qual a reação de interesse ocorre num potencial aplicado, relativamente a um eletrodo de referência

(Ag/AgCl) no qual não há fluxo de corrente, sendo o circuito completado por um eletrodo auxiliar ou contra-eletrodo, normalmente platina [66].

3.5.1 Eletrodos de trabalho

A escolha de um eletrodo de trabalho é uma etapa crucial. Existem diferentes tipos de eletrodos disponíveis, cada um com suas próprias propriedades e aplicações [67]. Alguns exemplos de eletrodos estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3: Eletrodos de trabalho e suas composições.

Eletrodo	Material	Descrição
Não metálico	Eletrodo de pasta de carbono (CPE)	Eletrodo de um composto de pó de carbono e um aglutinante (óleo mineral Nujol). Carbono vítreo em pó também é utilizado em misturas.
	Eletrodo impresso de carbono Carbono	Eletrodo de pasta de carbono impresso (carbon ink) em um substrato. Várias formas de carbono apresentam boa condutividade. São acessíveis e de baixo custo; materiais usados em muitas aplicações eletroquímicas.
	Grafite	Eletrodo de grafite baseado na propriedade de alta condutividade ao longo das folhas de grafeno.
	Carbono vítreo (GCE)	Obtido a partir da pirólise de fenóis a altas temperaturas (1.000 a 3.000 °C) sob pressão.
	Carbono vítreo em pó	
Metálico	Eletrodo de diamante dopado com boro (BDDE)	Eletrodo composto por um filme de diamante dopado com boro em um substrato condutor.
	Ouro	Eletrodo de fácil fabricação e em uma variedade de formas.
	Mercúrio	Eletrodo em gota utilizado em voltametria e polarografia. Pode formar filmes na superfície de substratos.
	Platina	O eletrodo metálico mais comum em eletroquímica.

Fonte: Adaptado de J. Grimshaw, 2000 [67].

A escolha do eletrodo adequado depende das propriedades desejadas e dos requisitos específicos do estudo.

Para que um eletrodo de trabalho seja ideal, ele deve apresentar propriedades físicas, químicas e eletroquímicas desejáveis, tais como: alta condutividade elétrica; microestrutura homogênea em todo o volume; propriedades físicas, químicas e eletrônicas reprodutíveis; estabilidade química; estabilidade morfológica e microestrutural em uma ampla faixa de potencial de trabalho; cinética rápida de transferência eletrônica para uma ampla gama de sistemas redox; facilmente fabricado, modelado e de baixo custo [66]. Ao selecionar um eletrodo, é essencial avaliar quais propriedades são mais importantes para o estudo em questão [67]. No presente trabalho, os eletrodos escolhidos para estudar o importante antioxidante NAR foram os eletrodos de carbono vítreo e o eletrodo de ouro.

3.5.1.1 Eletrodo de carbono vítreo

O eletrodo de carbono vítreo (GCE) vem sendo amplamente utilizado em estudos eletroquímicos e eletroanalíticos devido às suas diversas propriedades, como: condutividade elétrica; estabilidade química; baixo ruído de fundo; superfície relativamente lisa e uniforme; ampla faixa de potencial; versatilidade, podendo ser facilmente modificado; resistência mecânica; compatibilidade com eletrólitos; baixa resposta capacitiva e disponibilidade comercial [68].

A estrutura do eletrodo de carbono vítreo consiste em finas fitas emaranhadas de folhas de grafite, com ligações cruzadas entre si em uma disposição planar, formando uma estrutura hexagonal [68]. As ligações cruzadas entre as fitas proporcionam estabilidade e coesão à estrutura. A hibridização sp^2 ocorre nos átomos de carbono, originada em uma ligação sigma forte entre os átomos de carbono. Essa estrutura baseada em grafite proporciona ao eletrodo suas propriedades. A presença das ligações pi-conjugadas entre os átomos de carbono na estrutura do carbono vítreo facilita a transferência eficiente de elétrons durante as reações eletroquímicas.

O GCE pode ser polido usando pequenas partículas de alumínio ou diamante em um pano de polimento macio. Esse processo de polimento tem como objetivo obter uma superfície lisa e uniforme do eletrodo, removendo quaisquer imperfeições ou contaminantes que podem afetar o seu desempenho eletroquímico.

O pré-tratamento de superfície é frequentemente realizado para gerar uma superfície ativa e reprodutível. Esse pré-tratamento geralmente envolve a variação do potencial do

eletrodo em uma faixa específica, normalmente de +1 a -1 V, em relação ao eletrodo de referência, como o eletrodo de Ag/AgCl [69]. Esse pré-tratamento também pode ajudar a remover impurezas e contaminantes adsorvidos na superfície do eletrodo, garantindo um sinal analítico mais limpo e confiável.

O eletrodo de carbono vítreo é compatível com uma variedade de soluções e eletrólitos usados em experimentos eletroquímicos. Sua superfície pode ser modificada de várias maneiras para atender às necessidades específicas de uma aplicação [68], [69].

3.5.1.2 Eletrodo de Ouro

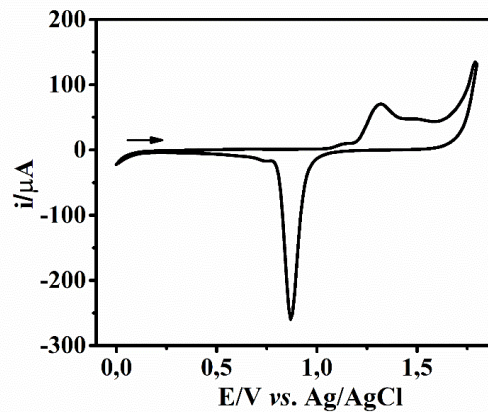
O eletrodo de ouro desempenha um papel significativo na eletroquímica, sendo amplamente utilizado em várias técnicas eletroquímicas, estes eletrodos são comumente usados como eletrodo de trabalho, devido à excelentes propriedades como: condutividade elétrica; estabilidade química; baixo ruído de fundo; superfície modificável; versatilidade, sendo fabricados de várias formas; biocompatibilidade e reatividade superficial [70].

O eletrodo de ouro pode ter estruturas diferentes, dependendo do método de fabricação e do tipo de eletrodo utilizado e algumas das estruturas mais comuns são: eletrodo de ouro maciço; eletrodo de ouro poroso; eletrodo de ouro nanoparticulado e eletrodo de ouro modificado. A estrutura do eletrodo de ouro pode afetar suas propriedades eletroquímicas, como sua área superficial, taxa de transferência de carga e seletividade, e portanto, a escolha da estrutura adequada é essencial para cada aplicação específica.

Os pré-tratamentos do eletrodo de ouro é uma etapa importante para garantir resultados precisos e reprodutíveis em experimentos eletroquímicos. São vários os tipos de pré-tratamento e os mais comuns usados são: polimento mecânico; polimento eletroquímico; enxague com solvente; imersão em solução de limpeza e tratamento térmico [70].

No pré-tratamento eletroquímico, a limpeza do eletrodo de ouro pode ser realizada por meio de um processo eletroquímico de polimento. Esse processo envolve a aplicação de um potencial específico ao eletrodo de ouro em uma solução eletrolítica neutra para remover contaminantes e restaurar a superfície do eletrodo (Figura 7). A limpeza da superfície do eletrodo de ouro deve ser realizada com cuidado para evitar danos à superfície do eletrodo. Além disso, é necessário realizar uma nova caracterização do eletrodo de ouro após sua limpeza, para verificar se a mesma foi eficaz e se as propriedades eletroquímicas do eletrodo foram restauradas.

Figura 7: Voltamograma cíclico do GE em 10 mL de solução aquosa de ácido sulfúrico 0,50 mol L⁻¹ como eletrólito suporte.



Fonte: Próprio autor.

O eletrodo de ouro é geralmente compatível com uma ampla variedade de soluções e eletrólitos usados em análises eletroquímicas, como: eletrólitos orgânicos; soluções contendo compostos redox; soluções ácidas e básicas e soluções aquosas, porém, é importante considerar as propriedades específicas do sistema e as condições experimentais para garantir a compatibilidade adequada.

O eletrodos de carbono vítreo e o eletrodo de ouro tem sido amplamente utilizados para detecção e quantificação de fármacos.

3.6 DETERMINAÇÃO ELETROQUÍMICA DA NAR

Estudos eletroquímicos para a quantificação de NAR tem sido relatado na literatura. Devido às suas excelentes propriedades, tais como versatilidade e baixo custo operacional, a voltametria vem sendo amplamente utilizada. Alguns trabalhos utilizando a voltametria para a detecção de NAR estão listadas abaixo.

Nagappa *et al.*, [71] descreveram um sensor eletroquímico com GCE quimicamente modificado com eletrodo de carbono vítreo modificado com nanofibras de oxido de grafeno reduzidas decoradas com sulfeto de estanho (SnS₂ - rGONRs/GCE). O SnS₂ - rGONRs/GCE foi utilizado para explorar o comportamento eletroquímico da NAR, observaram que a interface SnS₂-rGONRs tem uma excelente capacidade de transferência de carga. Sob as condições otimizadas e utilizando a DPV, foi possível observar pico de oxidação da NAR no potencial de

+ 0,9V, uma relação linear entre a corrente de pico e a concentração de NAR também foi observada na faixa de 0,13 a 15,41 mg L⁻¹, com LOD de 0,09 mg L⁻¹ e LOQ de 0,28 mg L⁻¹. O eletrodo proposto foi empregado para a determinação de NAR em amostras biológicas fortificadas com analito.

Wenjing *et al.*, [72] relatam o desenvolvimento de um sensor voltamétrico utilizando o GCE modificado com nanotubos de carbono de parede simples (SWCNTs), e empregaram na determinação eletroquímica de NAR. O método eletroanalítico foi proposto utilizando a LSV, onde foi possível observar um pico de redução referente a NAR em aproximadamente + 0,98V, observou-se também intervalos lineares de 0,02 a 1,36 mg L⁻¹ e 1,36 a 3,26 mg L⁻¹ com um LOD de 0,01 mg L⁻¹. Então aplicaram este sensor para a determinação de NAR em *Fructus Aurantii Immaturus*.

Manasa *et al.*, [73] desenvolveu uma plataforma com eletrodo de pasta de carbono modificado com nanotubo de carbono de paredes múltiplas funcionalizado e corante catiônico de fenoxazina (fMWCNT/NB/MCPE) como sensor eletroquímico para oxidação catalítica de NAR. O método eletroanalítico para NAR foi proposto utilizando a DPV, a oxidação da NAR ocorreu no potencial de +0,47 V, com um LOD de 0,08 mg L⁻¹, LOQ de 0,25 mg L⁻¹ e intervalos lineares de 13,61 a 2,72 mg L⁻¹ e 2,72 mg L⁻¹ a 2,45 mg L⁻¹. Então a viabilidade do sensor na quantificação de NAR foi validada por meio de sucos de frutas enriquecidos com NAR, como matrizes de amostras reais.

Consequentemente, o presente trabalho descreve o desenvolvimento de um método eletroanalítico sensível, robusto e seletivo, utilizando GCE e GE (não modificados) para a detecção e/ou quantificação da NAR em formulações farmacêuticas.

4 MATERIAIS E PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.5 REAGENTES E SOLUÇÕES

4.5.1 Reagentes e soluções

Os reagentes químicos utilizados no preparo de soluções são descritos na Tabela 4. Todas as soluções foram preparadas utilizando água do tipo ultrapura em sistema Milli-Q da empresa Millipore (Bedford, MA, USA) com resistividade de 18,2 MΩ cm a 25 °C.

Tabela 4: Reagentes utilizados no preparo das soluções.

<i>Reagentes e solventes</i>	<i>Fórmula</i>	<i>Procedência</i>	<i>Pureza</i>
Ácido acético	C ₂ H ₄ O ₂	Vetec	≥99,7%
Ácido ascórbico	C ₆ H ₈ O ₆	Sigma-Aldrich	≥99,0%
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	Acros Organics	≥99,5%
Ácido caféico	C ₉ H ₈ O ₄	Sigma-Aldrich	≥98,0%
Ácido cítrico	C ₆ H ₈ O ₇	Sigma-Aldrich	≥99,5%
Ácido fosfórico	H ₃ PO ₄	Grupo Química	≥85,0%
Álcool metílico	CH ₃ OH	Cromoline	≥99,5%
Cloreto de potássio	KCl	Isofar	≥99,0%
Ferricianeto de potássio	K ₃ Fe(CN) ₆	Vetec	≥99,0%
Ferrocianeto de potássio	K ₄ Fe(CN) ₆	Vetec	≥98,5%
Fosfato de sódio dibásico	Na ₂ HPO ₄	Vetec	≥99,0%
Glicina	C ₂ H ₅ NO ₂	Sigma-Aldrich	≥99,0%
Glicose	C ₆ H ₁₂ O ₆	Sigma-Aldrich	≥99,5%
Hidróxido de sódio	NaOH	Vetec	≥99,0%
Lactose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	Sigma-Aldrich	≥99,5%
Naringenina	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	Sigma-Aldrich	≥95,0%
α-celulose	(C ₆ H ₁₀ O ₅) _n	Sigma-Aldrich	≥99,5%
Quercetina	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	Sigma-Aldrich	≥95,0%

A solução estoque de NAR (0,001 mol L⁻¹), foi preparada com a mistura de metanol e água (1:1). A solução de KCl foi preparada a 0,10 mol L⁻¹ e as soluções de K₃Fe(CN)₆ e K₄Fe(CN)₆ a 0,005 mol L⁻¹ cada.

O eletrólito suporte Britton-Robinson (B-R) foi preparado a partir da mistura de ácidos acético, bórico e fosfórico (0,10 mol L⁻¹) em uma faixa de pH de 2,0 a 10,0 [74]. O fosfato preparado a partir do fosfato de sódico dibásico e Sorensen composto por glicina [75], foram utilizados em pH 9,0 e 10,0 em concentração (0,10 mol L⁻¹). O B-R em concentrações 0,05, 0,10, 0,20 e 0,30 mol L⁻¹ em pH 9,0 e 10,0 também foram preparados. Todos os valores de pH foram ajustados com NaOH. Estes eletrólitos foram mantidos sob refrigeração a 4 °C por um período máximo de 3 meses.

4.6 INSTRUMENTAÇÃO

4.6.1 Medidas eletroquímicas

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato Palm Sens® (Palm Instruments BV, The Netherlands), conectado a um computador com o software PSTrace versão 5.5 para a obtenção e processamento de dados. Os dados foram extraídos e por fim tratados no programa Origin (versão 8.5). As respostas eletroquímicas de corrente de pico e potencial foram obtidas através das técnicas de CV, LSV, DPV e SWV.

A caracterização dos eletrodos foi realizada por EIS com o uso de um potenciostato/galvanostato Metrohm (DropSens) conectado a um computador contendo o *software* DropView 8400. A partir deste sistema conectado por fios aos eletrodos da célula eletroquímica obtiveram-se os perfis impedimétricos. Os espectros de impedância foram obtidos numa célula contendo 5,0 mL de KCl 0,10 mol L⁻¹ (eletrólito de suporte) com 0,005 mol L⁻¹ de K₃Fe(CN)₆ e K₄Fe(CN)₆, cada. Utilizou-se amplitude de 10 mV e faixa de frequência de 0,01 a 100.000 Hz.

Para realização das medidas eletroquímicas, foi utilizada uma célula eletroquímica convencional com capacidade máxima para 10,0 mL de eletrólito e comportando entrada para três eletrodos, o eletrodo de referência - RE (Ag/AgCl), o eletrodo auxiliar - AE (fio de platina), e um eletrodo de trabalho - WE (GCE ou GE).

As medidas de pH foram realizadas usando um pHmetro da marca Ohaus (modelo ST3100-F), antes das medidas, uma calibração do eletrodo de referência foi realizada utilizando soluções tampão em 3 níveis de pH. Para auxiliar na solubilização de alguns reagentes, foi utilizado ultrassom Unique (modelo UltraCleaner 800). Para agitação das soluções na célula eletroquímica, foi utilizado um agitador magnético da marca IKA lab disc. As pesagens de reagentes utilizados na preparação das soluções foram realizadas numa balança analítica Unibloc (modelo AUX320) Shimadzu.

O método comparativo foi realizado através de análises de espectroscopia de absorção molecular, utilizando um espectrofotômetro UV-1800 da marca Shimadzu, conectado ao *software* UVProbe (versão 2.50) para obtenção e processamento de dados. Foi utilizada uma célula de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm, com resolução de 1nm, os espectros foram obtidos no intervalo de comprimento de onda de 190 a 1100 nm, com comprimento de onda máxima de 290 nm para a NAR e a curva de calibração construída pelo método de calibração externa.

4.7 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.7.1 Tratamento da superfície do eletrodo GCE

A superfície do GCE (diâmetro de 3 mm) foi cuidadosamente polida com óxido de alumínio de diferentes granulometrias (0,5 μm , 0,3 μm e 0,05 μm) em uma manta de feltro, realizando movimentos em forma de '8' (10 repetições) [69]. Posteriormente, o GCE foi lavado com água destilada e sonicado em banho de ultrassom, para a remoção de possíveis partículas de alumina aderidas na sua superfície.

4.7.2 Tratamento da superfície do eletrodo de GE

A superfície do GE (diâmetro de 2 mm) foi lavada com água destilada e etanol, após a lavagem e antes de cada medida, foi realizada a ativação eletroquímica da superfície do GE utilizando o método de CV em 10 mL de solução aquosa de ácido sulfúrico 0,50 mol L⁻¹ como eletrólito suporte. O eletrodo foi polarizado entre os potenciais de 0,0 a + 1,80 V com uma velocidade de varredura de 500 mV s⁻¹ e 50 ciclos de varredura foram aplicados para garantir a limpeza e regeneração da superfície do GE [70].

4.7.3 Obtenção e preparo das amostras de formulações farmacêuticas

As formulações farmacêuticas foram adquiridas na Essentia Pharma, sendo: A) NAR (200 mg) e B) NAR (400 mg), ambos em caixa contendo 10 cápsulas cada. As soluções de cada amostra foram preparadas solubilizando-as em metanol-água (1:1) e utilizadas na preparação de soluções diluídas com concentrações desejadas. Para cada amostra, os experimentos foram coletados em triplicata.

4.7.4 Faixa linear, limite de quantificação e limite de detecção

Para a construção da curva de calibração, uma solução estoque de NAR em concentração 0,001 mol L⁻¹ foi preparada. Foram retiradas alíquotas dessa solução padrão estoque e diluídas

nas concentrações desejadas. As medidas foram realizadas em triplicata, por DPV. Os LOQs e LOQs foram calculados pela razão de $3 \times \text{SDb}/\text{Slope}$ e $10 \times \text{SDb}/\text{Slope}$ [76], [77]. onde o SDb é o desvio padrão de 10 brancos.

4.7.5 Precisão

A avaliação da precisão do método eletroanalítico foi realizada em períodos intra-dia e inter-dia na presença de uma concentração fixa de NAR definida, considerando a faixa linear obtida na curva de calibração e no mesmo eletrólito suporte. A avaliação de intra-dia foi avaliada com cinco medidas de ipa intercaladas no mesmo dia. Para avaliar inter-dia, realizou-se medidas de ipa em cinco dias consecutivos. Com os valores de ipa obtidos, o valor médio das correntes e o desvio padrão relativo às medidas pôde ser calculado.

4.7.6 Exatidão

A identificação e quantificação da NAR em formulações farmacêuticas adquiridas na Essentia Pharma, foi realizada através de sobreposição de duas medidas [93] de DPV obtidas com soluções de amostra e padrão contendo NAR (15 mg para o GCE e 0,427 mg para GE) de acordo com as curvas de calibração.

A verificação da exatidão do método proposto para determinação da NAR foi realizada utilizando a espectrometria de absorção molecular na região UV-Vis. A partir de uma solução estoque de NAR ($0,001 \text{ mol L}^{-1}$) preparada com a mistura de metanol e água (1:1), foram realizadas diluições em concentrações desejadas para a construção da curva de calibração. Para análise das amostras, estas também foram preparadas solubilizando-as em metanol-água (1:1) e utilizadas na preparação de soluções diluídas com concentrações desejadas.

4.7.7 Seletividade

Avaliou-se a seletividade do método proposto na presença de compostos potencialmente concorrentes nas amostras experimentais. Para avaliar a resposta de interferência de cada composto, utilizamos a intensidade de corrente ipa da NAR em uma concentração fixa e utilizando um excesso de 5 vezes de cada possível interferente (ácido ascórbico, quercetina, ácido cítrico, α – celulose, lactose, ácido cafeico e glicose). Estimamos a resposta de interferência pela mudança observada no sinal antes a após a adição de cada interferente. Com os resultados obtidos, calculamos o desvio padrão relativo (RSD).

Capítulo 1

5 RESULTADOS ATINGIDOS

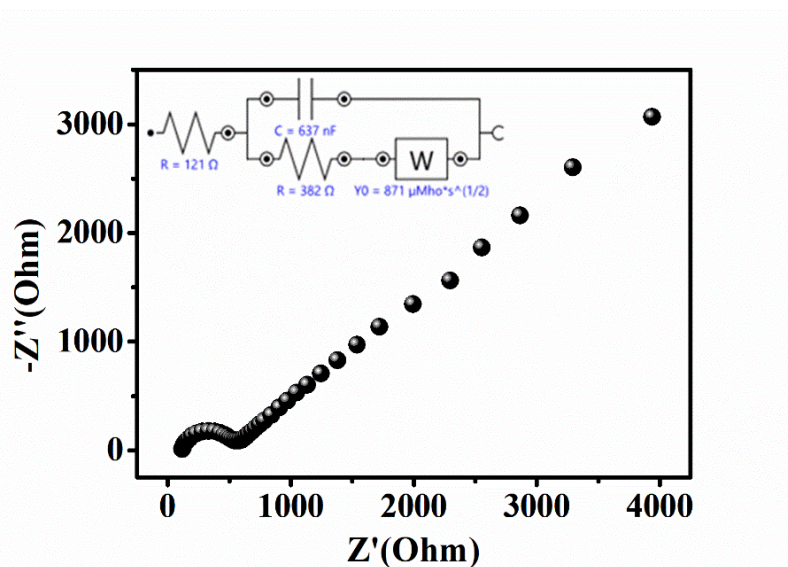
5.1 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA

5.1.1 Medida de espectroscopia de impedância eletroquímica

Para investigar a resistência à transferência de carga (R_{ct}) da interface entre a plataforma eletroquímica e o eletrólito suporte, realizou-se medida de EIS. O experimento realizado ocorreu em uma célula contendo $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ 5 mmol L^{-1} em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. O diagrama obtido chama-se Nyquist e é composto por duas partes, o semicírculo e a reta. O diâmetro do semi-círculo representa a R_{ct} e a parte linear representa o processo de difusão do produto para a solução [78].

Como visto no gráfico de Nyquist da Figura 8, o GCE exibe um valor de R_{ct} de 382Ω , possui diâmetro de semicírculo aproximado ou menor que trabalhos já registrados na literatura [79]–[81].

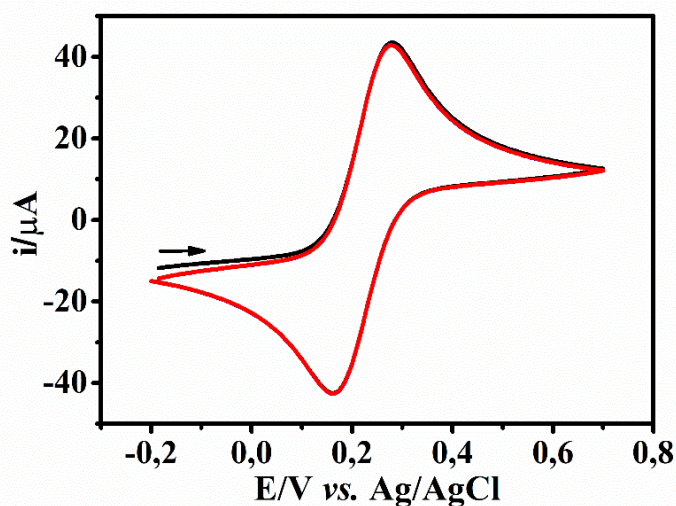
Figura 8: Diagrama de Nyquist obtido por EIS para GCE.



A Figura 9 apresenta voltamogramas cíclicos referente ao comportamento do par redox $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ 5 mmol L^{-1} em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em GCE, onde é observado a existência de dois processos redox, um pico anódico de $+ 41,30 \mu A$ em potencial de $+ 0,28 \text{ V}$, que

corresponde à oxidação do Fe^{2+} a Fe^{3+} e um pico catódico de $-42,02 \mu\text{A}$ em potencial de $+0,16 \text{ V}$, que corresponde à redução do Fe^{3+} a Fe^{2+} .

Figura 9: Voltamogramas cíclicos do GCE em $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 5 mmol L^{-1} em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.



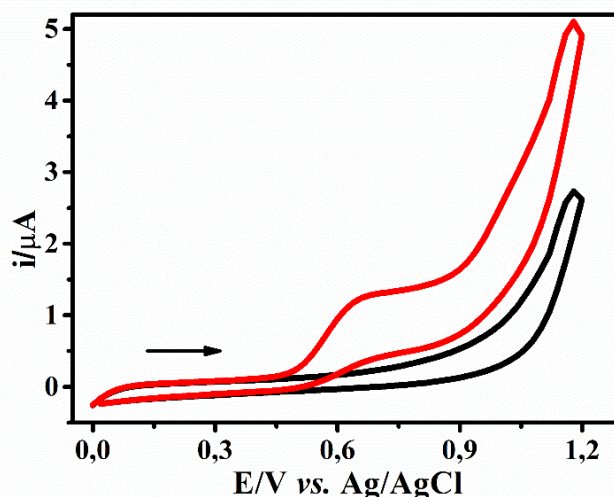
5.1.1.1 Comportamento eletroquímico da NAR

Voltamogramas cíclicos foram coletados a fim de verificar o comportamento da NAR na superfície do eletrodo de trabalho (GCE). A Figura 10 mostra os voltamogramas cíclicos na ausência e presença de $13,60 \text{ mg L}^{-1}$ de NAR em eletrólito suporte $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ Britton-Robinson (B-R) em $\text{pH } 10,0$. O intervalo de potencial aplicado deu-se entre $0,0$ e $+1,20 \text{ V}$ com velocidade de varredura de $0,05 \text{ V s}^{-1}$. Verifica-se neste intervalo de potencial um processo irreversível em $+0,68 \text{ V}$ (vs. Ag/AgCl), referente a oxidação da NAR no GCE. Na literatura já se foi observado este comportamento [73].

Manasa *et al.*, [73] desenvolveu uma plataforma eletroquímica denominada fMWCNT/NB/MCPE, onde observaram que na faixa de $\text{pH } 3,0$ a $10,0$ a NAR sofre oxidação irreversível no potencial de $+0,47 \text{ V}$ via transferência de $1e^-/\text{H}^+$.

Conforme pode-se observar nesses voltamogramas, estes resultados sugerem que o GCE pode ser usado para o estudo de determinação do antioxidante.

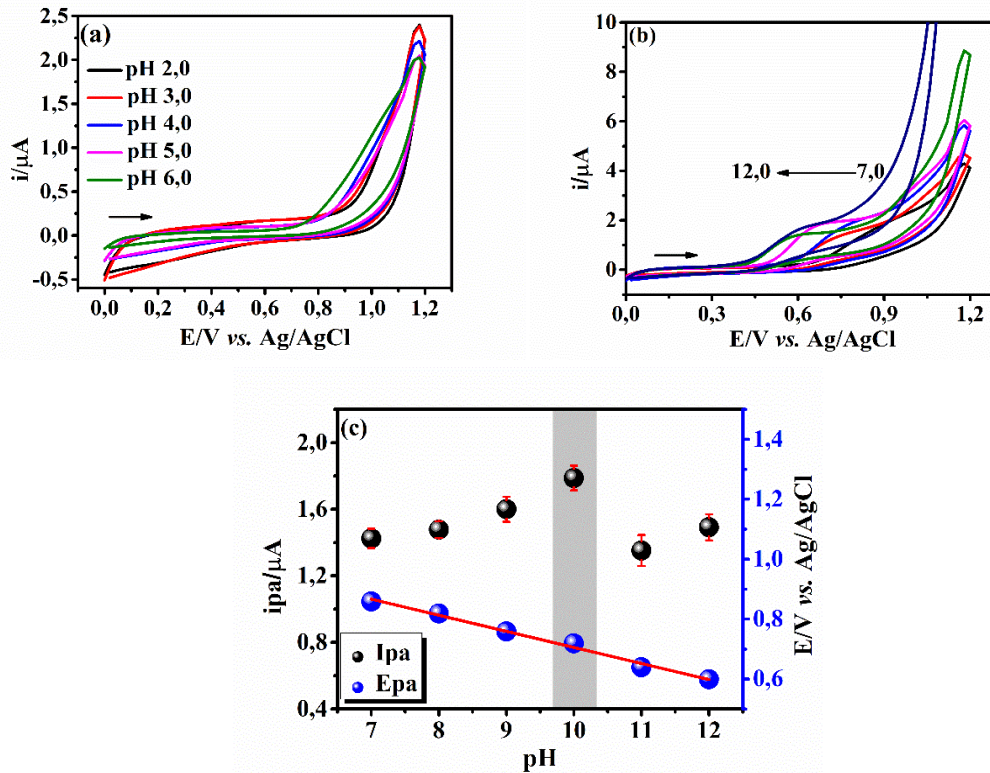
Figura 10: Voltamogramas cíclicos referentes a ausência (voltamograma preto) e a presença de 13,60 mg L⁻¹ de NAR (voltamograma vermelho) no GCE. Experimentos conduzidos em eletrólito suporte 0,10 mol L⁻¹ B-R, pH 10,0, $v = 0,05 \text{ V s}^{-1}$.



5.1.2 Influência do pH e eletrólito suporte

Inicialmente, a influência do pH do meio sobre a resposta do GCE foi investigada, as medidas ocorreram no intervalo de pH 2,0 ao 6,0 (Figura 11a) e pH 7,0 a 12,0 (Figura 5b), com 13,60 mg L⁻¹ de NAR em eletrólito suporte B-R 0,10 mol L⁻¹ com $v = 0,05 \text{ V s}^{-1}$. Observamos a presença de picos referente a oxidação da NAR no intervalo de pH de 7,0 a 12,0 (Figura 11b), variando em potenciais de + 0,86 a + 0,60 V (*vs.* Ag/AgCl). A Figura 11c mostra a correlação entre a variação do pH e seus respectivos valores de corrente (i_p) e potenciais de pico (E_p) para a oxidação da NAR, onde pode-se observar maior valor de corrente de pico para o pH 10,0, acompanhado de uma melhor definição por apresentar um menor alargamento de pico, aprimorando o sistema e diminuindo a possibilidade de possíveis interferentes. Com base nessas observações, optou-se em utilizar o pH 10,0 para realização dos experimentos posteriores com o GCE.

Figura 11: (a) e (b) Voltamogramas cíclicos para NAR $13,60 \text{ mg L}^{-1}$ sobre o GCE na presença de diferentes pHs, (c) dependência da corrente (ipa) e potencial de pico (E_p) com o pH do meio ($n = 3$). Experimentos conduzidos em eletrólito suporte B-R $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, $v = 0,05 \text{ V s}^{-1}$.



A partir dos dados apresentados na Figura 11c, observou-se a presença da relação linear entre E_p e pH que pode ser expressa por $E/V = -0,054 \text{ pH} + 1,243$ ($R^2 = 0,989$). A inclinação no valor de $-0,054 \text{ mV pH}^{-1}$ é relacionada com o valor teórico da equação de Nernst ($0,0592 \text{ V/pH}^{-1}$) [82] (Equação 1, onde m são prótons e n elétrons), sugerindo que o número de mols de elétrons transferidos na oxidação do sinal da NAR é igual ao número de prótons, mecanismo similar ao já reportado por outros autores [83].

$$\text{coeficiente angular} = -\frac{0,0592m}{n}$$

Equação 1

$$-0,0537 = -\frac{0,0592m}{n}$$

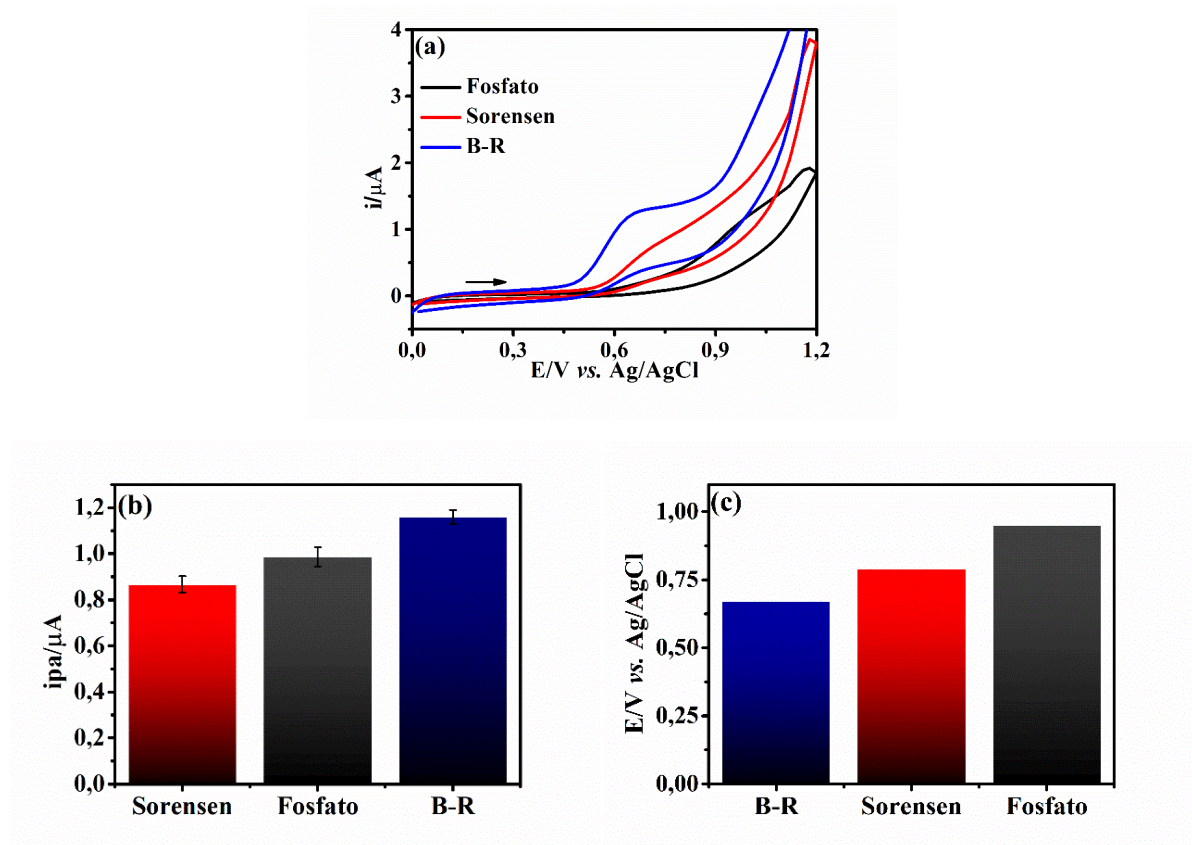
$$\frac{m}{n} = \frac{-0,0537}{-0,0592}$$

$$\frac{m}{n} = 0,91$$

Investigou-se também a influência do tipo de eletrólito suporte na resposta do GCE, que foram analisados com três tipos diferentes eletrólitos, como: Fosfato, Sorensen e Britton-Robinson em concentrações de $0,10 \text{ mol L}^{-1}$. Estes eletrólitos foram utilizados a fim de se investigar qual desses eletrólitos proporcionaria melhor resposta para o GCE, os estudos foram conduzidos utilizando-se a CV.

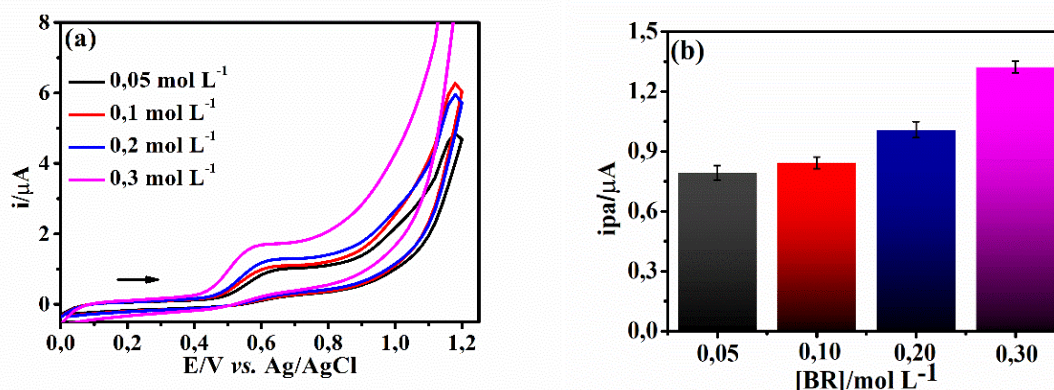
A Figura 12 traz os voltamogramas cíclicos obtidos para $16,32 \text{ mg L}^{-1}$ de NAR frente a diferentes eletrólitos. Já a Figura 12b estabelece a relação entre eletrólito suporte e a corrente de pico anódico. Estes resultados nos sugerem que o eletrólito suporte B-R fornece uma melhor resposta, já que permitiu a obtenção de um maior valor de corrente, garantindo maior sensibilidade quando comparado aos outros eletrólitos. A Figura 6c nos mostra a relação do potencial de pico para cada tipo de eletrólito. Estes resultados mostram que em solução B-R além de proporcionar maior corrente de pico, também proporciona um menor valor de potencial. Desta forma, a solução B-R foi escolhida para os experimentos posteriores com o GCE.

Figura 12: (a) Voltamogramas cíclicos para NAR em $13,60 \text{ mg L}^{-1}$, (b) potencial de pico para cada tipo de eletrólito ($n = 3$) e (c) dependência do potencial de pico (E_p) para cada tipo de eletrólito suporte. Estudos conduzidos em B-R $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 10,0), utilizando a plataforma GCE, $v=0,05 \text{ V s}^{-1}$.



O efeito da concentração do eletrólito de suporte sobre a oxidação da NAR foi avaliado em seguida, mantendo-se o pH 10,0 para o GCE e variou-se a concentração do eletrólito suporte B-R na faixa entre 0,05 a 0,30 mol L⁻¹. A Figura 13a refere-se aos voltamogramas para NAR 13,60 mg L⁻¹ e a Figura 13b a relação entre ipa e concentração do eletrólito, observa-se que há um aumento da ipa à medida em que se aumenta a concentração do eletrólito de suporte [82] o sinal definido e com maior intensidade foi observado em concentração 0,30 mol L⁻¹, sendo esta escolhida para estudos eletroanalíticos posteriores.

Figura 13: (a) Voltamogramas cíclicos para NAR em 13,60 mg L⁻¹ e (b) ipa vs. concentração ($n = 3$). Estudo realizado em eletrólito suporte B-R 0,05 a 0,30 mol L⁻¹ (pH 10,0) utilizando o GCE, $v = 0,05V s^{-1}$.

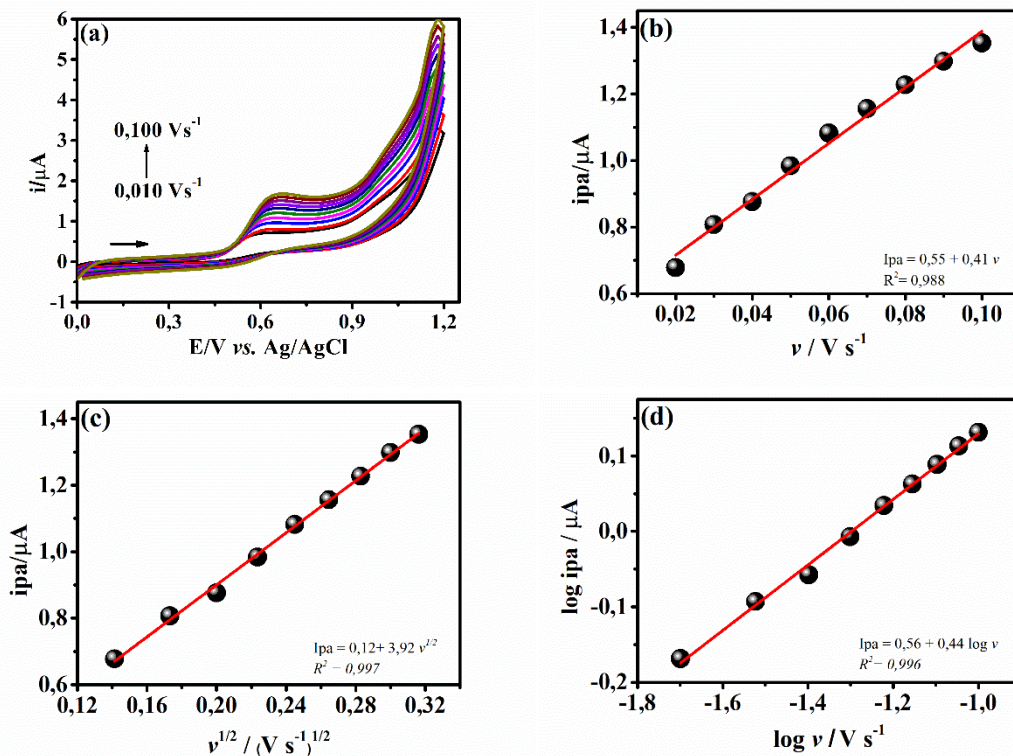


5.1.3 Estudo de diferentes velocidades de varredura

Realizou-se o estudo da velocidade de varredura para GCE na presença de 13,60 mg L⁻¹ de NAR. A Figura 14a mostra os voltamogramas cíclicos referentes ao GCE em eletrólito suporte B-R 0,30 mol L⁻¹ (pH 10,0) variando a velocidade de varredura de 20 a 100 mV/s. Como pode ser visto, os voltamogramas cíclicos exibem um pico anódico relacionados a NAR e que à medida que a velocidade aumenta, maiores valores de corrente anódica são alcançados. No entanto, os picos de corrente tornam-se gradativamente menos definidos e conseqüentemente mais alargados, nota-se também que a medida que aumenta a velocidade de varredura ocorre um deslocamento do potencial de pico (E_p) para valores mais positivos com o aumento da taxa de varredura, comportamento esperado em um processo irreversível [89].

Ao se avaliar o comportamento da corrente de pico com a velocidade de varredura (i_{pa} vs. v) Figura 14b, ela apresentou uma relação linear satisfatória ($R^2 = 0,988$). Quando se relaciona os valores de i_{pa} com a $v^{1/2}$ ($R^2 = 0,997$) Figura 14c, a mesma apresenta um coeficiente de correlação superior ao da Figura 14b. Além disso, a relação linear entre o $\log i_p$ e o $\log v$ (Figura 14d) cujo coeficiente de correlação é igual a 0,996, apresenta um valor de inclinação de 0,44 indicando que o processo é controlado por difusão [82], [89].

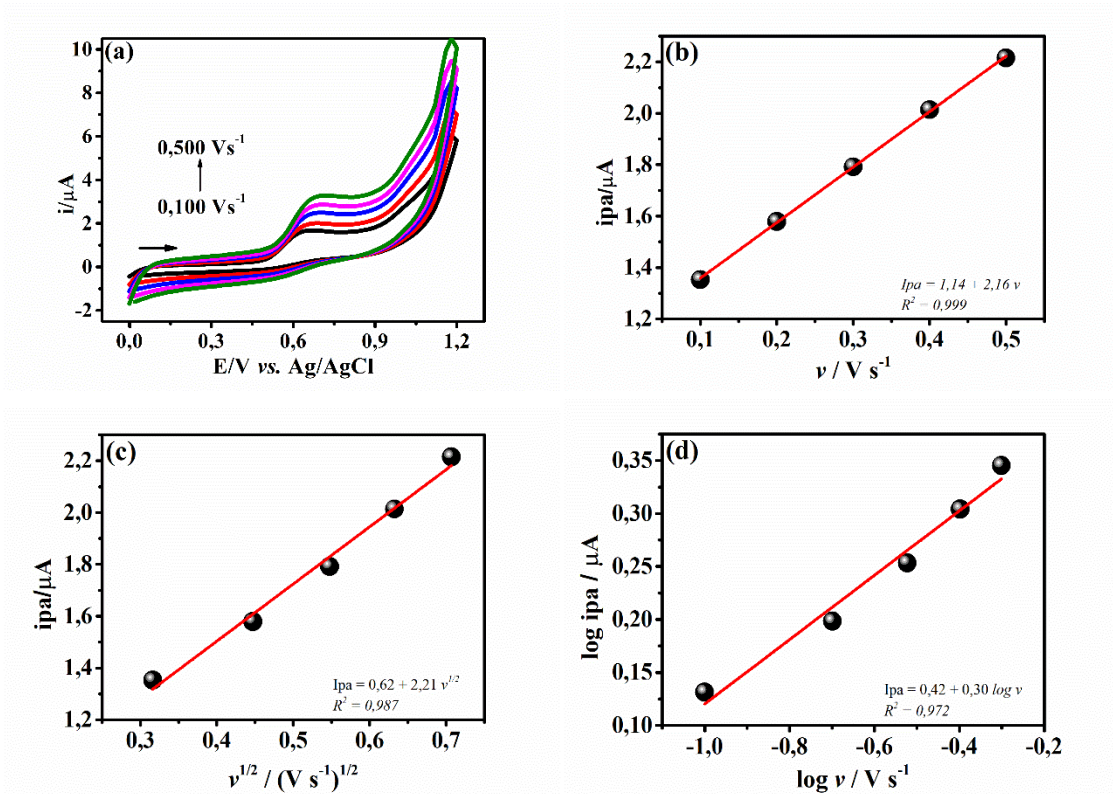
Figura 14: (a) Voltamogramas cíclicos para $13,60 \text{ mg L}^{-1}$ de NAR sobre o GCE em diferentes velocidades de varredura, variando de $0,020$ a $0,100 \text{ Vs}^{-1}$, (b) dependência linear das correntes de pico (i_{pa}) com a variação de velocidade de varredura e (c) i_{pa} vs. $v^{1/2}$. Experimentos conduzidos em solução B-R $0,30 \text{ mol L}^{-1}$, pH 10,0.



Para verificar o comportamento do GCE em altas velocidades, voltamogramas foram coletados em de velocidade de varredura de 100 a 500 mV/s (Figura 15a). Com o aumento da velocidade de varredura (v) a corrente de pico também aumenta, e conseqüentemente à um deslocamento de potencial para valores mais positivos. Ao se avaliar o comportamento da corrente de pico com a velocidade de varredura (i_{pa} vs. v) Figura 15b, ela apresentou uma excelente relação linear ($R^2 = 0,999$), também pôde ser observado na Figura 15c, que i_{pa} varia linearmente com $v^{1/2}$, há uma relação linear ($R^2 = 0,987$). Analisando-se o resultado obtido, verificou-se também que há uma relação linear ($R^2 = 0,972$) entre $\log i_{pa}$ e $\log v$ (Figura 15d),

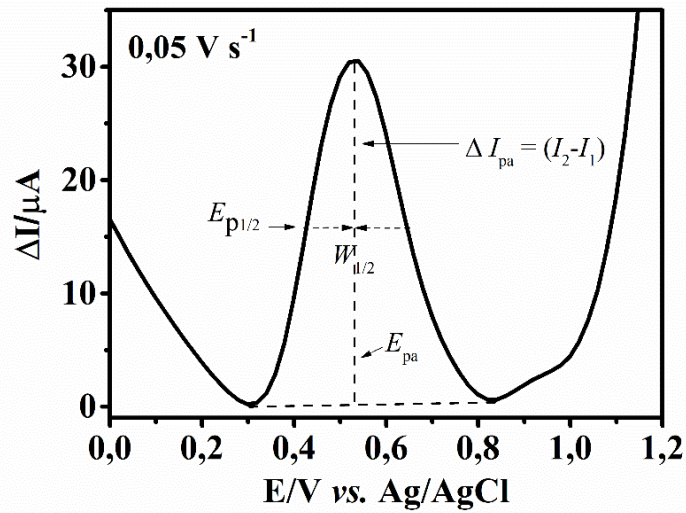
cujo coeficiente angular da reta é 0,30. Este valor é um indicativo que o processo deve ser controlado por difusão, uma vez que o valor obtido para o ângulo de inclinação para reta $\log i_{pa}$ vs. $\log v$ está mais próximo a 0,5 que a 1.

Figura 15: Voltamogramas cíclicos para (a) $13,60 \text{ mg L}^{-1}$ de NAR sobre o GCE em solução B-R $0,30 \text{ mol L}^{-1}$, pH 10,0 em diferentes velocidades de varredura, variando de $0,100$ a $0,500 \text{ Vs}^{-1}$, (b) dependência linear das i_{pa} com a v ; (c) dependência linear das i_{pa} vs. $v^{1/2}$ e (d) dependência do $\log i_{pa}$ com o $\log v$ da NAR.



É possível determinar o mecanismo da reação de transferência de carga utilizando uma medida de DPV em presença de 25 mg L^{-1} de NAR a partir da largura de meia altura $W_{1/2}$ onde para pequenas amplitudes de pulso, $W_{1/2}$ é inversamente proporcional ao número de elétrons transferidos ($W_{1/2} = 3,52RT/nF$ ou $W_{1/2} = 90/n$) [52], [53], [82].

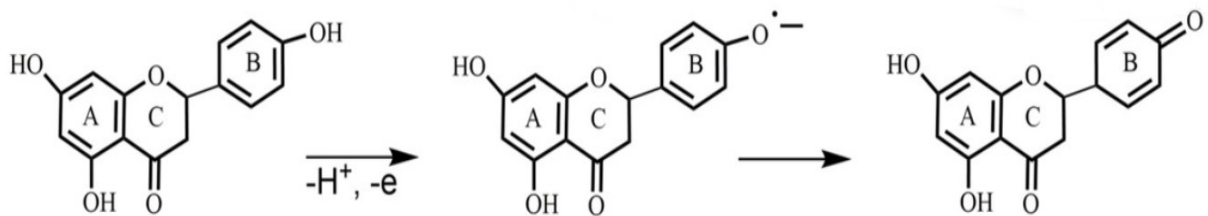
Figura 16: Voltamograma de pulso diferencial (ΔI vs. E/V) em presença de 25 mg L⁻¹ de NAR. Estudo realizado em eletrólito 0,30 mol L⁻¹ de B-R, pH 10,0, $v=0,05$ V s⁻¹.



O número de elétrons envolvidos nesse processo de oxidação foi estabelecido em um elétron, considerando que a largura a meia altura do pico anódico é $W_{1/2} = 222$ mV [52], [53], [82]

Conseqüentemente, conclui-se que a oxidação da NAR na plataforma GCE apresenta um processo determinante controlado por difusão e envolve a participação de 1 mol de elétrons.

Figura 17: Mecanismo proposto para a oxidação da NAR sobre a plataforma GCE.

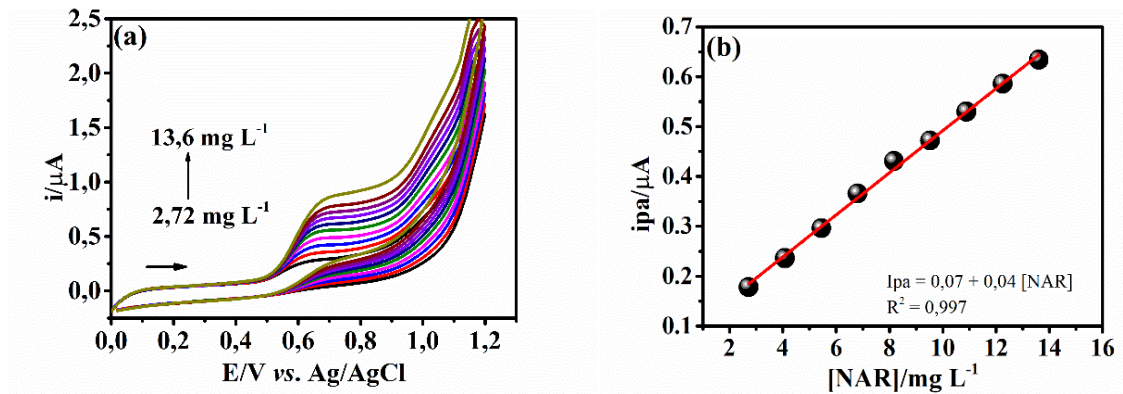


Fonte: Adaptado de T. Moeller *et al.*, 1980 [66].

5.1.4 Voltametria cíclica com diferentes concentrações de NAR

Com o intuito de avaliar o emprego do GCE na determinação da NAR, voltamogramas cíclicos foram coletados em diferentes concentrações do analito onde um aumento proporcional da corrente de pico pôde ser observado à medida em que a concentração de NAR na célula aumenta. A Figura 18 apresenta os voltamogramas cíclicos para as diferentes concentrações de NAR.

Figura 18: Voltamograma cíclico referente às diferentes adições de NAR em solução eletrolítica contendo o GCE. Experimentos coletados em eletrólito suporte B-R 0,30 mol L⁻¹ (pH 10,0). [NAR] = 2,7, 4,1 5,5, 6,8, 8,2, 9,5, 10,9, 12,3 e 13,60 mg L⁻¹.



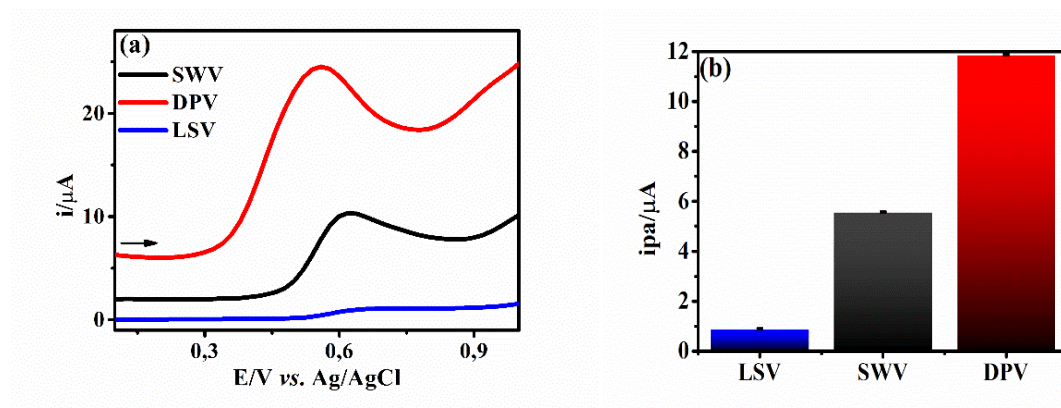
A partir dos voltamogramas obtidos, uma curva de calibração pôde ser construída relacionando os valores de corrente de pico associados a oxidação da NAR com a concentração deste analito, apresentada na Figura 18. A curva de calibração obtida fornece a seguinte equação de reta: $i_{pa} = 0,07 + 0,04 [NAR]$ com $R^2 = 0,997$, mostrando que o GCE é capaz de quantificar baixa concentração de NAR (2,72 mg L⁻¹), até concentrações maiores que podem ser encontradas em formulações farmacêuticas.

5.2 ESTUDOS ELETROANALÍTICOS

5.2.1 Seleção de técnica voltamétrica para a determinação da NAR

A fim de desenvolver um método para a determinação da NAR em formulações farmacêuticas, três diferentes modos de varredura de potenciais foram estudados, sendo eles a SWV, DPV e LSV. O comparativo dos sinais voltamétricos são apresentados na Figura 19.

Figura 19: (a) Voltamogramas referentes ao estudo de diferentes técnicas para 20 mg L⁻¹ de NAR e (b) *i*_{pa} vs. diferentes técnicas (*n* = 3). Estudos coletados em B-R 0,30 mol L⁻¹, pH 10,0 e *v*=0,05 V s⁻¹.

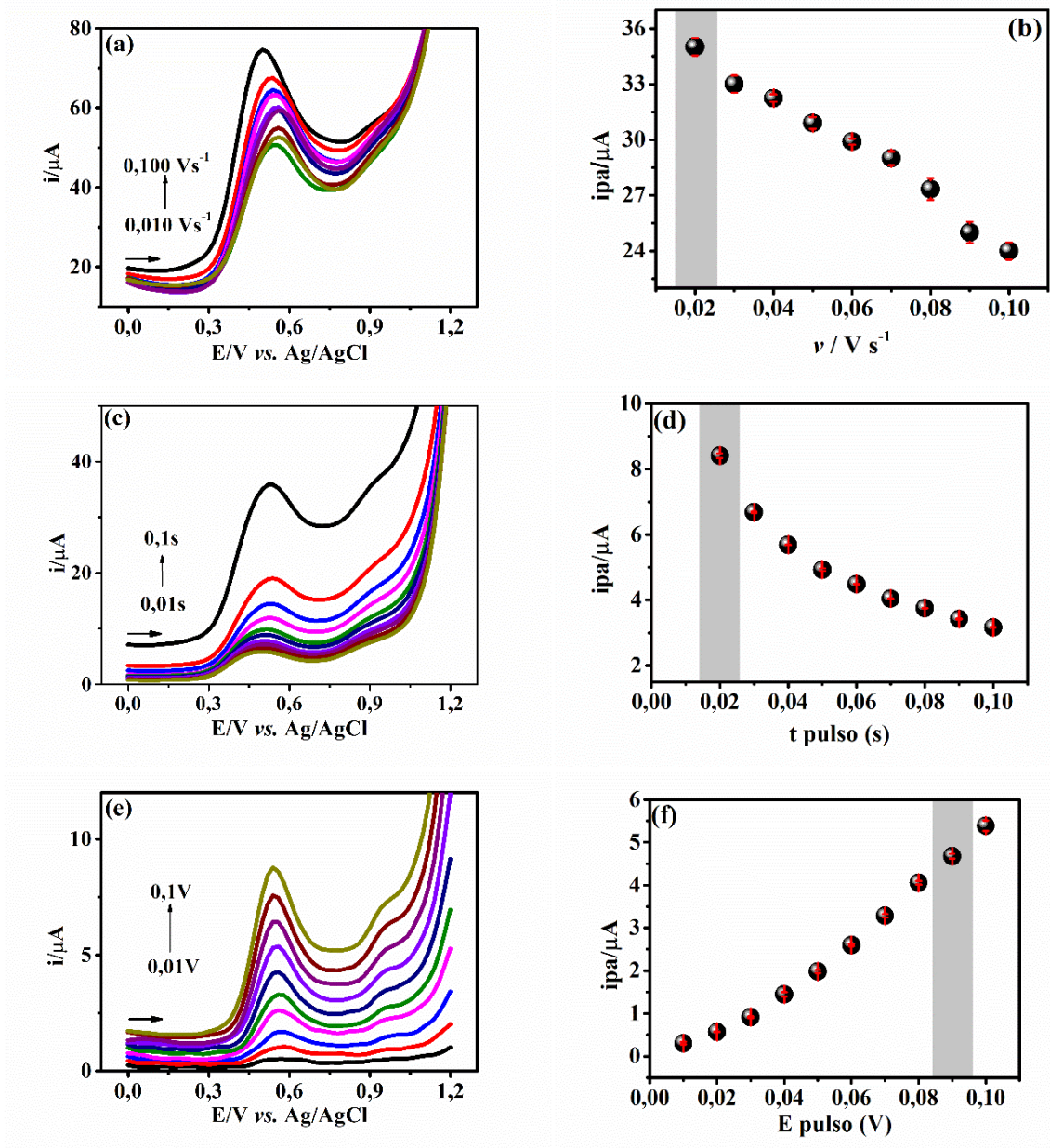


Uma baixa resposta é observada para a técnica de LSV que pode ser justificada devido a maior contribuição da corrente capacitiva quando comparada às técnicas de pulso e onda quadrada, dificultando a definição dos sinais. As respostas de corrente de pico são mais significativas em SWV e DPV. A SWV respondeu com um bom pico de corrente, este sendo aproximadamente 5,6 μA e para DPV a resposta eletroquímica para NAR foi altamente favorável (11,9 μA). A explicação para este resultado se deve à cinética lenta comum em reações redox irreversíveis [89]. A DPV utiliza pulsos de potencial controlados para investigar as características das reações redox, permitindo uma análise mais detalhada do sistema devido à sua capacidade de lidar com a cinética lenta dessas reações. Então, a DPV foi escolhida para os estudos posteriores.

5.2.2 Otimização dos parâmetros operacionais em DPV

Na DPV, o a taxa de varredura (V/s), t pulso (s) e E pulso (V) são parâmetros muito importantes, já que esses estão diretamente relacionados à sensibilidade e à seletividade do sistema. Voltamogramas foram obtidos em NAR em eletrólito suporte B-R $0,30 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 10,0 (Figura 20). Inicialmente, a velocidade de varredura foi variada na faixa de $0,01$ a $0,1 \text{ V s}^{-1}$ para 25 mg L^{-1} de NAR, mantendo-se o t pulso e E pulso constante e iguais a $0,05 \text{ s}$ e $0,05 \text{ V}$ respectivamente. O GCE forneceu uma melhor corrente de pico com melhor relação entre sensibilidade e alargamento na largura-meia altura do pico, quando submetida a velocidade de $0,02 \text{ V s}^{-1}$ ($i_{pa} = 35 \mu\text{A}$) observados na Figura 20b. Em seguida, variou-se o tempo de pulso num intervalo de $0,01$ a $0,1 \text{ s}$ para 20 mg L^{-1} de NAR. O GCE alcançou maiores correntes de pico quando se aplicou t pulso de $0,02 \text{ s}$ ($i_{pa} = 8,4 \mu\text{A}$) observados na Figura 20d. Conseqüentemente, variou-se o E pulso num intervalo de $0,01$ a $0,1 \text{ V}$ para 15 mg L^{-1} de NAR. O GCE alcançou maiores correntes de pico quando se aplicou E pulso de $0,09 \text{ V}$ ($i_{pa} = 4,7 \mu\text{A}$) observados na Figura 20f. Considerou-se esses como ótimos valores a ser utilizado na construção da curva de calibração referente à técnica de DPV. Variou-se a concentração da NAR ao decorrer das otimizações a fim de utilizar uma menor quantidade de amostra.

Figura 20: (a) Voltamograma DPV para diferentes velocidades de varredura para 25 mg L⁻¹ de NAR, (b) Curva relacionando ipa pela velocidade de velocidade, (c) DPV para diferentes t pulso para 20 mg L⁻¹ de NAR; (d) Curva relacionando ipa com t pulso, (e) DPV para diferentes E pulso para 15 mg L⁻¹ de NAR e (f) Curva relacionando ipa pelo E pulso. Estudos coletados com solução B-R 0,30 mol L⁻¹, pH 10,0, (n = 3).



Os valores escolhidos na otimização dos parâmetros da técnica foram utilizados nos estudos posteriores e estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5: Otimização dos parâmetros de DPV para determinação de NAR.

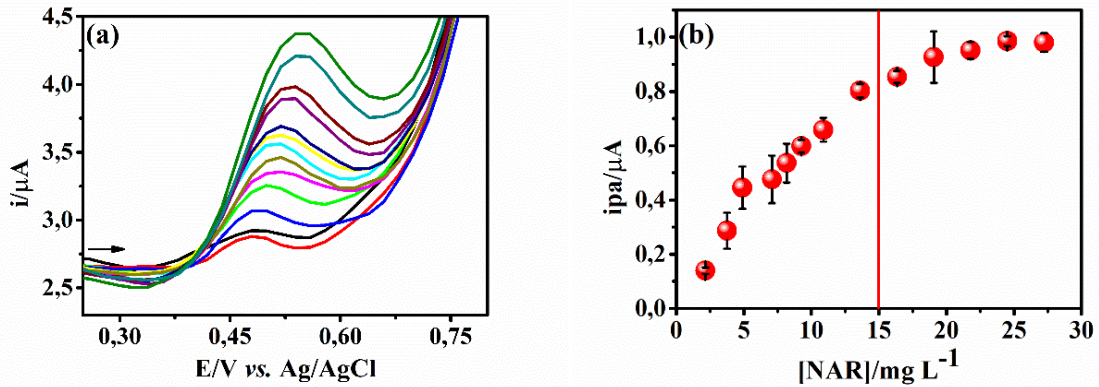
Parâmetro	Modo/Intervalo de estudo	Modo/Valor selecionado
Modo de operação	LSV, DPV ou SWV	DPV
taxa de varredura (V/s)	0,01 a 0,1 V/s ⁻¹	0,02 V/s ⁻¹
t pulso (s)	0,01 a 0,1 s	0,02 s
E pulso (V)	0,01 a 0,1 V	0,09 V

5.3 AVALIAÇÃO DAS FIGURAS DE MÉRITO DO MÉTODO ELETROANALÍTIVO

5.3.1 Curva de calibração

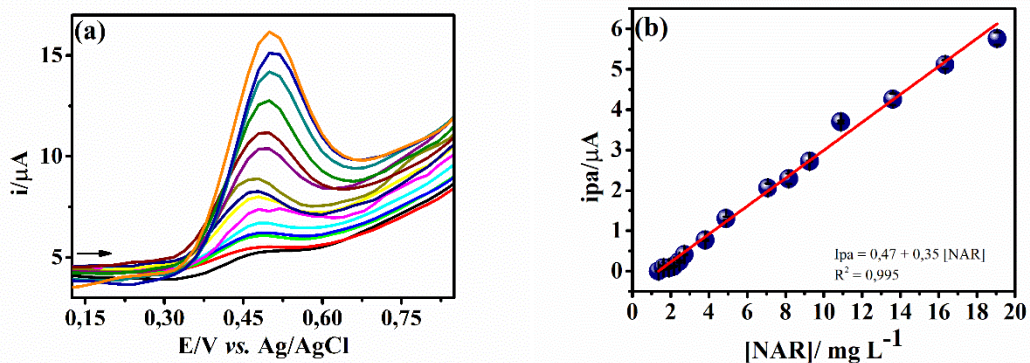
Após a otimização dos parâmetros experimentais da técnica de DPV descritos no estudo anterior, a curva de calibração para a determinação de NAR foi desenvolvida. As medidas voltamétricas foram realizadas em triplicata ($n = 3$). A Figura 21 apresenta DPV para várias concentrações de NAR pelo método de adição padrão em eletrólito suporte B-R 0,30 mol L⁻¹, pH 10,0. Observam-se picos definidos próximo ao potencial + 0,50 V, cuja intensidade de corrente aumenta com adição de alíquotas de NAR variando a concentração de 2,20 a 13,60 mg L⁻¹. Para concentrações acima de 13,60 mg L⁻¹ não foi observado um aumento significativo na intensidade da corrente, sugerindo uma saturação dos sítios ativos na superfície do eletrodo. Estes resultados nos mostram que é possível determinar a NAR com o GCE, mas a curva pelo método de adição padrão não nos fornece resultados satisfatórios devido a saturação na superfície do eletrodo, sugerindo assim, a utilização da curva de calibração externa para uma melhor avaliação.

Figura 21: (a) DPV para diferentes concentrações de NAR. (b) Curva de calibração por adição padrão ($n = 3$). Experimentos coletados em eletrólito suporte B-R 0,30 mol L⁻¹ (pH 10,0). [NAR] = 2,2, 3,8, 4,9, 7,1, 8,2, 9,3, 10,9, 13,6, 16,3, 19,1, 21,8, 24,5 e 27,20 mg L⁻¹.



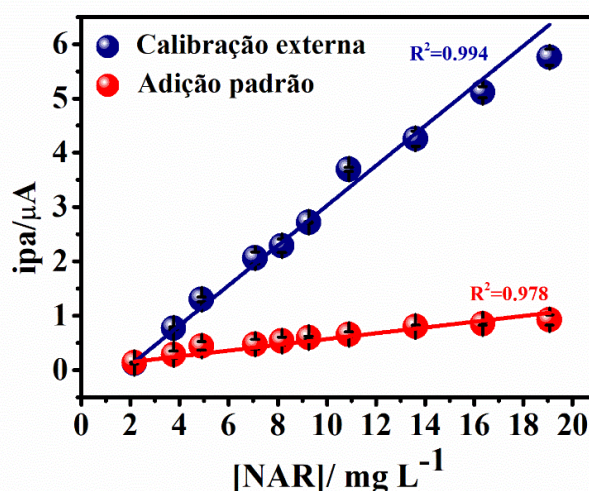
A Figura 22a apresenta DPV para várias concentrações de NAR pelo método de calibração externa em eletrólito suporte B-R 0,30 mol L⁻¹, pH 10,0. Observam-se picos bem definidos em aproximadamente + 0,50 V, cuja corrente aumenta com o aumento da concentração de NAR em um intervalo de 1,2 a 19,10 mg L⁻¹. O aumento na corrente de pico observado é diretamente proporcional à concentração de NAR na célula. Para concentrações acima de 19,10 mg L⁻¹ não foi observado um aumento significativo na intensidade da corrente, sugerindo uma saturação da superfície do eletrodo. A curva de calibração obtida (Figura 22b) fornece a seguinte equação de reta: $i_{pa} = 0,47 + 0,35 [NAR]$, com $R^2 = 0,995$ ($n = 3$), onde i_p é a corrente de pico em μA e $[NAR]$ é a concentração de NAR em mg L⁻¹.

Figura 22: (a) DPV referente às diferentes adições de NAR em solução eletrolítica contendo o GCE, (b) Curva referente a calibração externa ($n = 3$). Experimentos coletados em eletrólito suporte B-R 0,3 mol L⁻¹ (pH 10,0). [NAR] = 1,2, 1,6, 1,9, 2,2, 2,3, 2,7, 3,8, 4,9, 7,1, 8,2, 9,3, 10,9, 13,6, 16,3 e 19,10 mg L⁻¹.



A Figura 23 apresenta as curvas constituídas por adição padrão e calibração externa variando a concentração de NAR de 2,20 a 19,10 mg L⁻¹ para uma melhor comparação das abordagens. Verifica-se que o valor do coeficiente angular da curva por adição padrão é de $R^2 = 0,978$ e para a curva por calibração externa $R^2 = 0,995$, esta diferença se dá devido a melhor linearidade acompanhada de uma melhor inclinação da reta e sensibilidade da curva pelo método de calibração externa.

Figura 23: Curva referente a calibração externa e adição de padrão ($n = 3$). Experimentos coletados em eletrólito suporte B-R 0,30 mol L⁻¹ (pH 10,0). [NAR] = 2,2, 2,3, 2,7, 3,8, 4,9, 7,1, 8,2, 9,3, 10,9, 13,6, 16,3 e 19,10 mg L⁻¹.



A partir dos resultados obtidos por meio da curva pelo método de calibração externa, pôde-se ainda estimar os valores de LOD e LOQ do sistema proposto na determinação da NAR. Os LOD e LOQ foram estimados estatisticamente pela razão de $3 \times \text{SDb}/\text{Slope}$ e $10 \times \text{SDb}/\text{Slope}$, respectivamente, onde o SDb é o desvio padrão de 10 brancos. Os valores obtidos foram de $\text{LOD} = 0,11 \text{ mg L}^{-1}$ e $\text{LOQ} = 0,36 \text{ mg L}^{-1}$.

5.3.2 Precisão

O estudo da precisão do método eletroanalítico foi realizado em períodos intra-dia e inter-dia na presença de $13,60 \text{ mg L}^{-1}$ de NAR, ambos sobre o GCE, em eletrólito suporte B-R $0,30 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 10,0) e sob as condições otimizadas. As correntes de pico referentes a cada medição foram extraídas de DPV e plotadas nos gráficos de barras apresentados na Figura 24.

Para avaliar intra-dia, tomou-se como base cinco medidas de ipa intercaladas no mesmo dia. Já para avaliar inter-dia, realizou-se cinco medidas de ipa em cinco dias consecutivos. Com os valores de ipa obtidos, o valor médio das correntes e o desvio padrão relativo às medidas pôde ser calculado. As fórmulas utilizadas para cada situação foram:

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

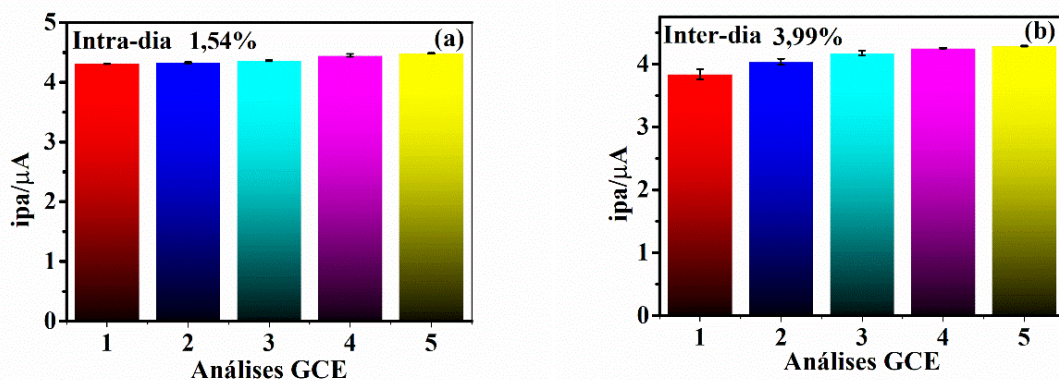
Equação 2

$$RSD (\%) = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$$

Equação 3

onde s é o desvio padrão absoluto, x_i o valor de cada, \bar{x} a média dos valores e n o número de ensaios. O desvio padrão relativo (RSD) obtido para as medidas intra-dia foi 1,54% ($n = 5$) e para inter-dia 3,99% ($n = 5$). Portanto, com os resultados obtidos, é possível afirmar que o método apresenta boa precisão mesmo em momentos diferentes do mesmo dia e em dias distintos, visto que foi possível encontrar valores inferiores a 5% [65], [84].

Figura 24: Gráfico de ipa com diferentes medidas obtidas através de DPV para: (a) Intra-dia e (b) Inter-dia. Testes coletados em eletrólito suporte B-R 0.30 mol L⁻¹, pH 10,0 na presença de 13,60 mg L⁻¹ de NAR.



A Tabela 6 resume todos os parâmetros analíticos e valores até aqui mencionados para detecção da NAR.

Tabela 6: Parâmetros e valores para NAR sobre a plataforma GCE.

Parâmetro	Valor
Potencial de pico (V)	+0,50
Faixa linear (mg L ⁻¹)	1,20 a 19,10
Coefficiente de determinação (R ²)	0,995
Coefficiente angular (µA L mg ⁻¹)	0,35
Coefficiente linear (µA)	-0,47
LOD (mg L ⁻¹)	0,11
LOQ (mg L ⁻¹)	0,36
Repetibilidade intra-dia (%)	1,54
Repetibilidade inter-dia (%)	3,99

5.3.3 Determinação de NAR em formulações farmacêuticas

A identificação e quantificação de NAR em formulações farmacêuticas adquiridas na Essentia Pharma, foi realizada utilizando o método proposto e os resultados foram listados na Tabela 7.

Os valores foram determinados por meio da sobreposição de duas medidas de DPV obtidas a partir de soluções padrão e amostras (A e B). As amostras de referência apresentaram um comportamento eletroquímico semelhante ao observado para a solução padrão NAR. Observou-se que a concentração de NAR encontrada para amostra A (Cápsula de 200 mg) foi de 203,4 mg e para amostra B (Cápsula de 400 mg) 410 mg. Os resultados dos testes de recuperação, conforme observado na Tabela 7, mostram claramente que o método proposto apresentou boa precisão, pois foi obtido um percentual de recuperação de 101,7 % para a amostra A e 102,5 % para a amostra B, certificando que o GCE proveu boa recuperação da NAR nas amostras testadas.

Para verificação da exatidão do método proposto, foram comparados os resultados obtidos por espectrometria de absorção molecular na região UV-Vis pela coleta de dados no comprimento de onda máximo igual a 290 nm. Observou-se que a concentração de NAR encontrada para amostra A (Cápsula de 200 mg) foi de 171,4 mg e para amostra B (Cápsula de 400 mg) 349,9 mg, portanto, os valores de recuperação foram de 85,87% para amostra A e 87,47% para amostra B. Para conferir a confiabilidade estatística ao método proposto, foram aplicado o teste *t* de Student. A equação matemática é:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{S_a \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

Equação 4

Onde \bar{x}_1 é a média dos valores obtidos pela técnica voltamétrica, \bar{x}_2 a média proveniente das leituras espectrométricas, S_a o valor do desvio padrão agregado, n_1 o número de replicatas da voltametria e n_2 da espectrometria e S o desvio padrão amostral de cada uma delas.

O teste t foi utilizado para ambos os tipos de amostras, os valores correspondentes à amostra A e B foram de 0,99 e 0,52 respectivamente. O valor de t crítico para seis graus de liberdade é 2,18.

A técnica de Espectrometria de absorção molecular no UV-vis pode ser usada para a determinação da NAR. No entanto, a incidência direta de um feixe de luz na amostra possivelmente degradada a NAR, o que leva a uma possível alteração espectral. Conseqüentemente, o método voltamétrico aqui proposto está de acordo com as características do analito considerado, pois a realização das medidas em condições de penumbra é suficiente para garantir dados confiáveis e de alta qualidade analítica.

A Tabela 7 resume os parâmetros estatísticos obtidos a partir das análises das amostras contendo NAR.

Tabela 7: Parâmetros estatísticos obtidos a partir das análises das amostras contendo NAR.

Amostra Técnica	A		B	
	DPV	UV-Vis	DPV	UV-Vis
Adicionado (mg) ^a		200		400
Encontrado ^a	203,4	171,7	410	349,9
Recuperado (%) ^c	101,7	85,87	102,5	87,47
Erro (%) ^d		18,40		17,18
RSD (%) ^a	0,31	0,35	0,32	0,06
t_{valor} ^f		0,99		0,52

Amostra A: Cápsula de 200 mg /Amostra B: Cápsula de 400 mg

^a $n = 3$.

^c Recuperado = [(Valor encontrado / Valor adicionado) × 100].

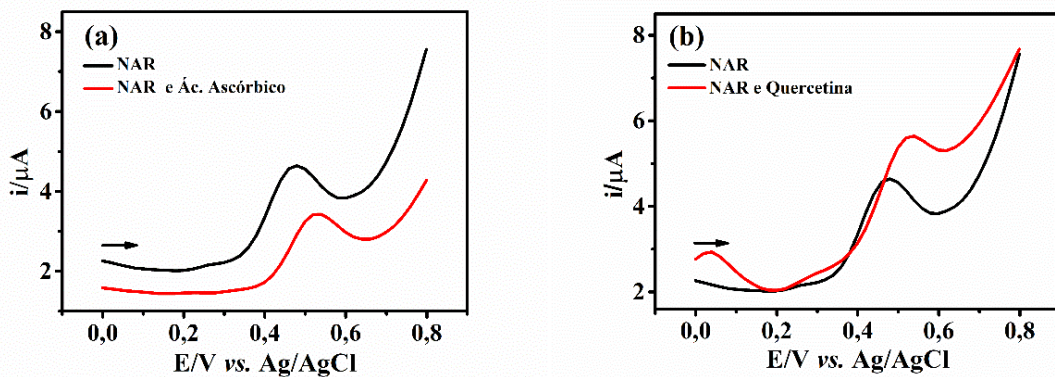
^d Erro = [(Método proposto - Método comparativo) / (Método comparativo)] × 100.

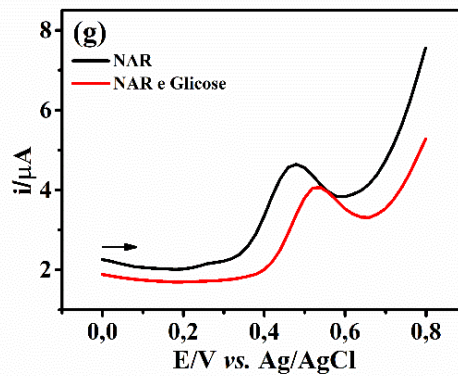
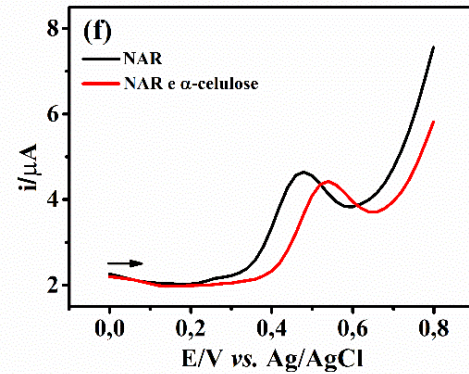
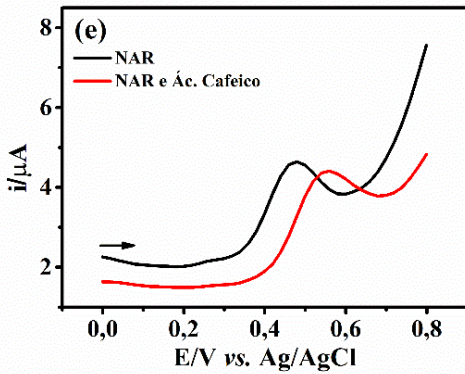
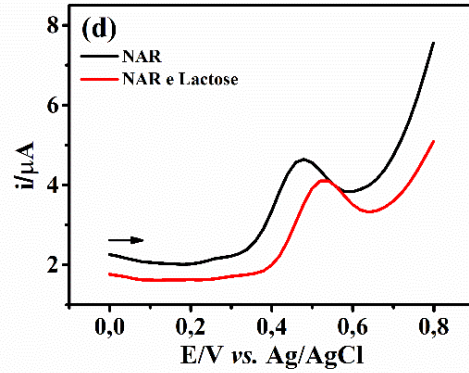
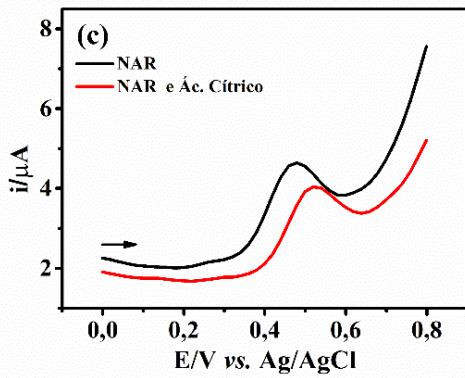
^f $t_{\text{crítico}} = 2,18$

5.3.4 Seletividade

A fim de utilizar o método proposto para a determinação de NAR em preparações farmacêuticas, avaliou-se a seletividade do GCE na presença de compostos potencialmente presentes em formulações farmacêuticas. Para avaliar a resposta de interferência de cada composto, usamos a intensidade da corrente na presença de uma concentração fixa de analito, e estimamos a interferência pela mudança de corrente observada antes e após a adição de cada interferente. Para tanto, foram feitas medidas em uma concentração fixa de $5,44 \text{ mg L}^{-1}$ de NAR, usando um excesso de 5 vezes de cada possível substância interferente. Os compostos investigados como interferentes foram: (a) ácido ascórbico, (b) quercetina, (c) ácido cítrico, (d) lactose, (e) ácido cafeico, (f) α -celulose e (g) glicose. Os resultados são apresentados na Figura 25.

Figura 25: Influência de possíveis interferentes na corrente de $5,44 \text{ mg L}^{-1}$ de NAR. Os experimentos foram conduzidos em eletrólito suporte B-R $0,30 \text{ mol L}^{-1}$, pH 10. (Interferentes) = $27,20 \text{ mg L}^{-1}$, (a) ácido ascórbico, (b) quercetina, (c) ácido cítrico, (d) lactose, (e) ácido cafeico, (f) α -celulose e (g) glicose.





O erro (%) foi calculado para todos os possíveis interferentes e descrito na Tabela 8. O perfil voltamétrico obtido antes e após a adição de cada interferência não apresentou variação significativa, já que o valor ideal para não apresentar interferência é até 15%, mostrando a seletividade do eletrodo na presença de outros possíveis interferentes.

Tabela 8: Efeito de interferentes frente a resposta da NAR no GCE proporção de 1:5.

Interferente^a	Erro (%)
Ácido ascórbico (a)	15,88
Quercetina (b)	11,88
Ácido cítrico (c)	11,19
Lactose (d)	0,19
Ácido cafeico (e)	0,77
α -Celulose (f)	2,74
Glicose (g)	3,06

^a n = 3.

Capítulo 2

6 RESULTADOS ATINGIDOS

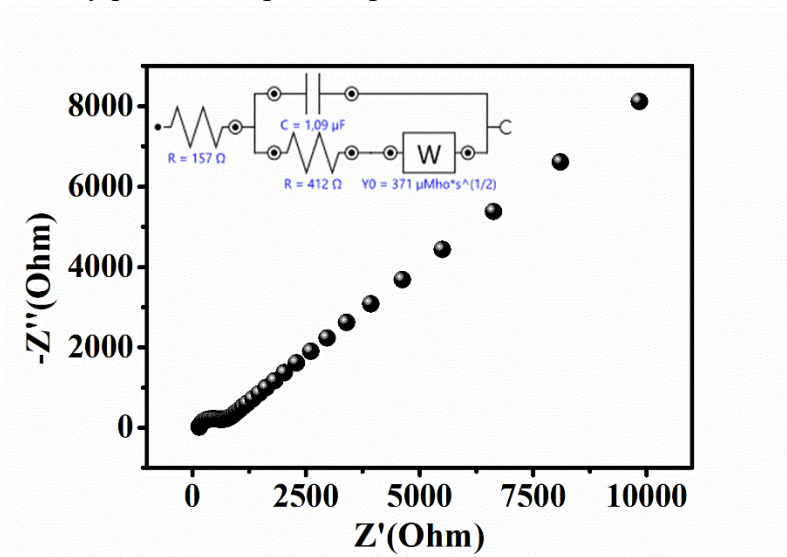
6.1 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA

6.1.1 Medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica

Para investigar a R_{ct} da interface entre a plataforma eletroquímica e o eletrólito suporte, realizou-se medida de EIS. O experimento realizado ocorreu em uma célula contendo $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ 5 mmol L^{-1} em KCl $0,1\text{ mol L}^{-1}$.

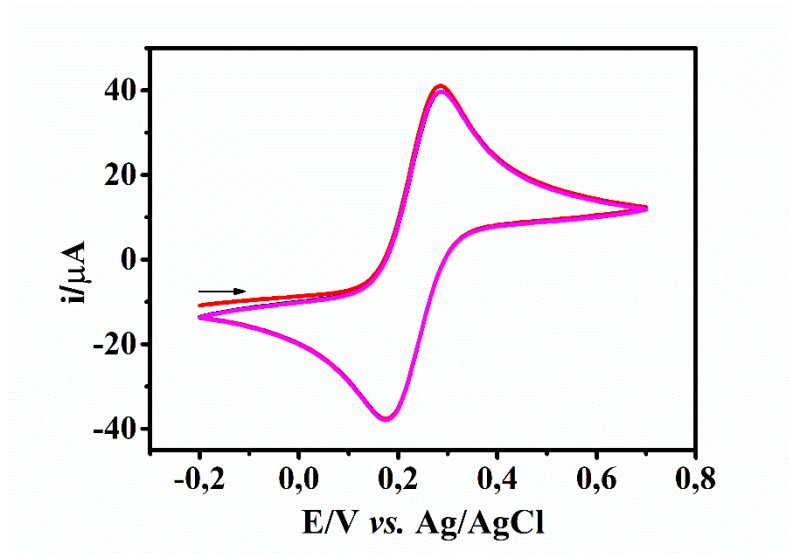
Como visto no gráfico de Nyquist da Figura 26, o GE exibe um valor de R_{ct} de $412\ \Omega$, possui diâmetro de semicírculo aproximado ou menor que trabalhos já registrados na literatura [85]–[87].

Figura 26: Diagrama de Nyquist obtido por EIS para GE.



A Figura 27 apresenta voltamogramas cíclicos referente ao comportamento do par redox $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ 5 mmol L^{-1} em KCl $0,1\text{ mol L}^{-1}$ em GE, onde é observado a existência de dois processos redox, um pico anódico ($E_p = +0,29\text{ V}$), que corresponde à oxidação do Fe^{2+} a Fe^{3+} e um pico catódico ($E_p = +0,18\text{ V}$), que corresponde à redução do Fe^{3+} a Fe^{2+} .

Figura 27: Voltamogramas cíclicos do GE em $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ 5 mmol L⁻¹ em KCl 0,1 mol L⁻¹.

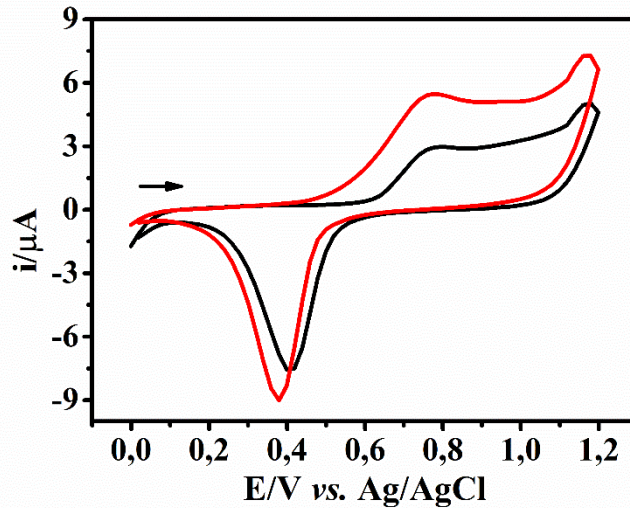


6.1.2 Comportamento eletroquímico da NAR

Voltamogramas foram obtidos com o GE e apresentados na Figura 28 na ausência (voltamograma preto) e na presença (voltamograma vermelho) de 13,60 mg L⁻¹ da NAR, em eletrólito suporte Britton-Robinson (B-R), pH 9,0 a 0,10 mol L⁻¹.

Em reposta ao GE, observa-se um pico na região anódica próximo a + 0,77 V e na região catódica próximo a + 0,40 V (*vs.* Ag/AgCl) os quais são referentes à oxidação e redução do GE. Na presença do analito observa-se o aumento significativo de corrente na região anódica, referente a oxidação da NAR. Conforme pode-se observar, o GE pode ser promissor para a determinação do antioxidante.

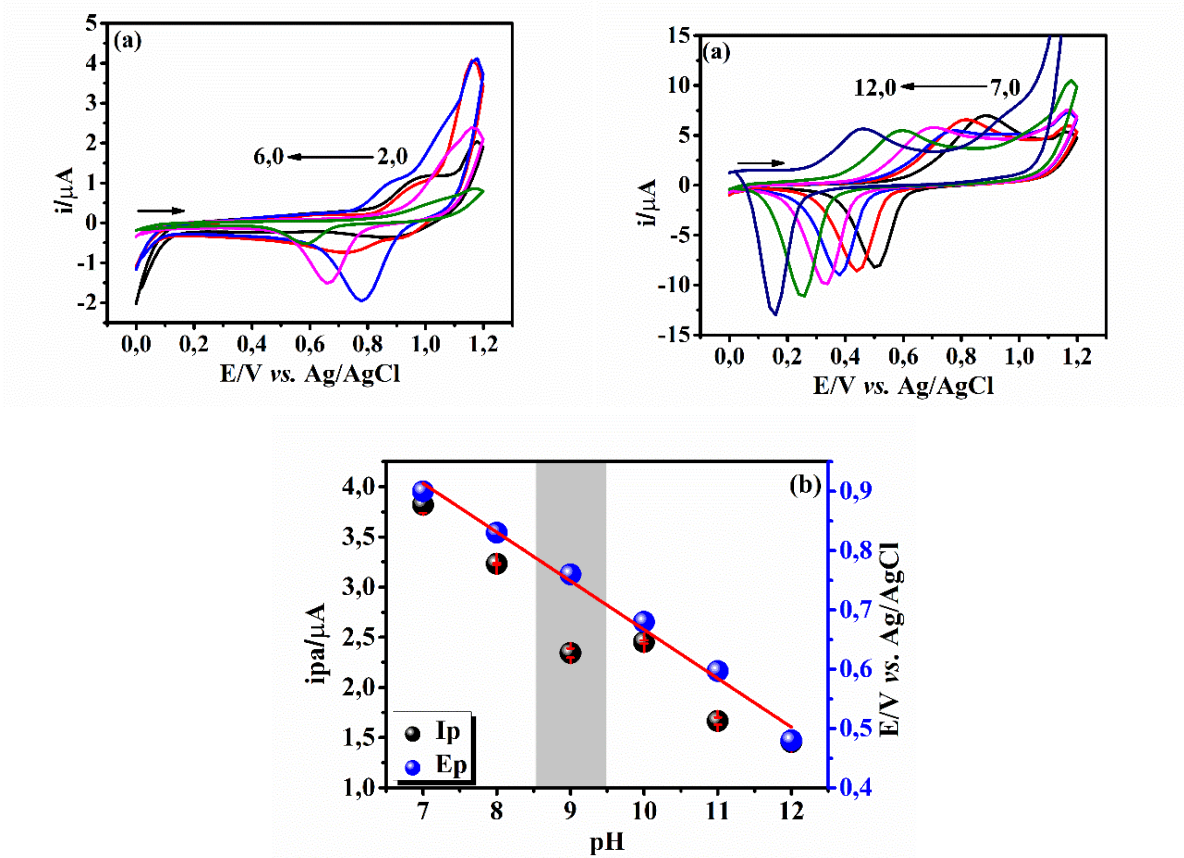
Figura 28: Voltamogramas cíclicos referentes ao GE na ausência (voltamograma preto) e na presença da NAR (voltamograma vermelho). Experimento conduzido em eletrólito suporte B-R $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, pH 9,0 em $0,05 \text{ V s}^{-1}$.



6.1.3 Influência do pH

A influência do pH do meio sobre a resposta do GE foi investigado em eletrólito suporte B-R $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, as medidas ocorreram no intervalo de pH 2,0 ao 6,0 (Figura 29a) e pH 7,0 a 12,0 (Figura 29b) em presença de $13,60 \text{ mg L}^{-1}$ de NAR. Observamos a presença de picos referente a oxidação da NAR em ambos os intervalos de pH, contudo, no intervalo de pH de 7,0 a 12,0 (Figura 29b), a oxidação da NAR é mais significativa, apresentando maiores correntes de pico em meio básico. Na Figura 29b estes picos de oxidação estão variando em potenciais de + 0,9 a + 0,48 V (vs. Ag/AgCl). Os valores de correntes de pico anódico (i_{pa}) foram extraídos mediante a subtração do branco e assim plotados. A Figura 29c mostra a correlação entre a variação do pH (7,0 a 12,0) e seus respectivos valores de corrente (i_p) e potenciais de pico (E_p) para a oxidação da NAR, onde pode-se observar maiores valores de corrente de pico em pHs de 7,0 a 10,0. Uma melhor definição é observada em pH 9,0, por apresentar um menor alargamento de pico, aprimorando o sistema e diminuindo a possibilidade de possíveis interferentes. Com base nessas observações, optou-se em utilizar o pH 9,0 para realização dos experimentos posteriores com o GE.

Figura 29: (a) e (b) Voltamogramas cíclicos para NAR $13,60 \text{ mg L}^{-1}$ sobre o GE na presença de diferentes pHs, (c) dependência da corrente (ipa) e potencial de pico (E_p) com o pH do meio ($n = 3$). Experimentos conduzidos em eletrólito suporte B-R $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, $v = 0,05 \text{ V s}^{-1}$.



A partir dos dados apresentados na Figura 29c, observou-se a presença de relação linear entre E_p e pH que pode ser expressa por $E/V = -0,082 \text{ pH} + 1,489$ ($R^2 = 0,988$). A inclinação no valor de $-0,082 \text{ mV pH}^{-1}$ é relacionada com o valor teórico da equação de Nernst ($0,0592 \text{ V/pH}^{-1}$) [89] - Equação 1, onde m são prótons e n elétrons, sugerindo que o número de mols de elétrons transferidos na oxidação do sinal da NAR é aproximadamente igual ao número de prótons.

$$\text{coeficiente angular} = -\frac{0,0592m}{n}$$

Equação 1

$$-0,0822 = -\frac{0,0592m}{n}$$

$$\frac{m}{n} = \frac{-0,0822}{-0,0592}$$

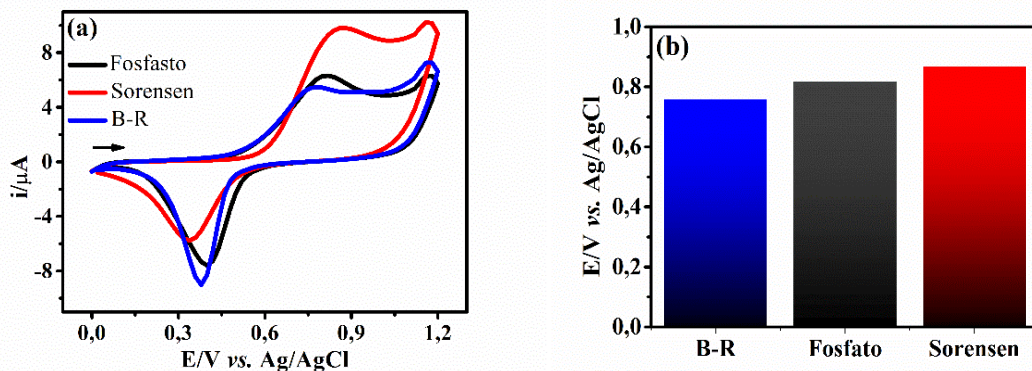
$$\frac{m}{n} = 1,38$$

6.1.4 Influência do eletrólito suporte

Investigou-se também a influência do tipo de eletrólito suporte na resposta do GE, que foram analisados com três tipos diferentes de eletrólito suporte, como: Fosfato, Sorensen e Britton – Robinson (B-R) em concentrações de $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ e $13,60 \text{ mg L}^{-1}$ de NAR. Estes eletrólitos foram utilizados a fim de se investigar qual desses proporcionaria melhor resposta, os estudos foram conduzidos utilizando-se a CV.

A Figura 30a traz os voltamogramas cíclicos obtidos para $13,60 \text{ mg L}^{-1}$ de NAR. A Figura 30b nos mostra a relação do potencial de pico para cada tipo de eletrólito. Estes resultados nos mostram que a solução B-R proporciona um menor valor de potencial, acompanhado de menor largura de pico, garantindo assim melhor determinação do analito. Desta forma, a solução B-R foi escolhida para os experimentos posteriores com o GE.

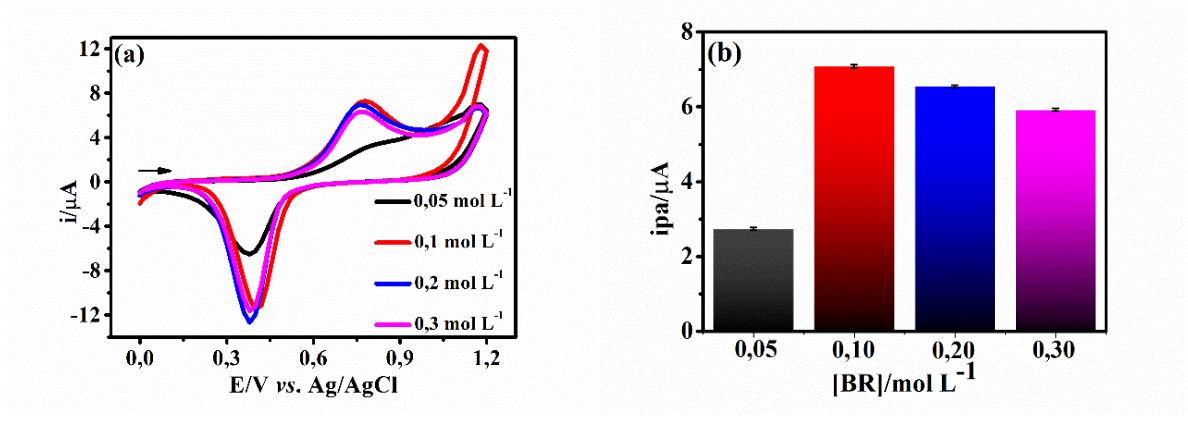
Figura 30: (a) Voltamogramas cíclicos referente à influência do eletrólito suporte sobre a corrente anódica para oxidação da NAR e (b) relação do potencial de pico para cada tipo de eletrólito. Experimentos coletados em solução Fosfato, Sorensen e B-R ($0,10 \text{ mol L}^{-1}$, pH 9,0, $v=0,05 \text{ V s}^{-1}$) em eletrodo GE.



O efeito da concentração do eletrólito de suporte sobre a oxidação da NAR também foi avaliado, mantendo-se o pH 9,0 e variou-se a concentração do eletrólito suporte B-R na faixa entre $0,05$ e $0,30 \text{ mol L}^{-1}$. Os resultados obtidos neste teste estão apresentados na Figura 31, verificou-

se que o eletrólito suporte com concentração $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ fornece maior ipa, dessa forma, optou-se em utilizar esta concentração para estudos posteriores, utilizando o GE.

Figura 31: (a) Voltamogramas cíclicos para NAR em $13,60 \text{ mg L}^{-1}$ e (b) ipa com concentração do eletrólito. Estudo realizado em eletrólito suporte B-R $0,05$ a $0,30 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 9,0) utilizando o GE e $v = 0,05 \text{ V s}^{-1}$.

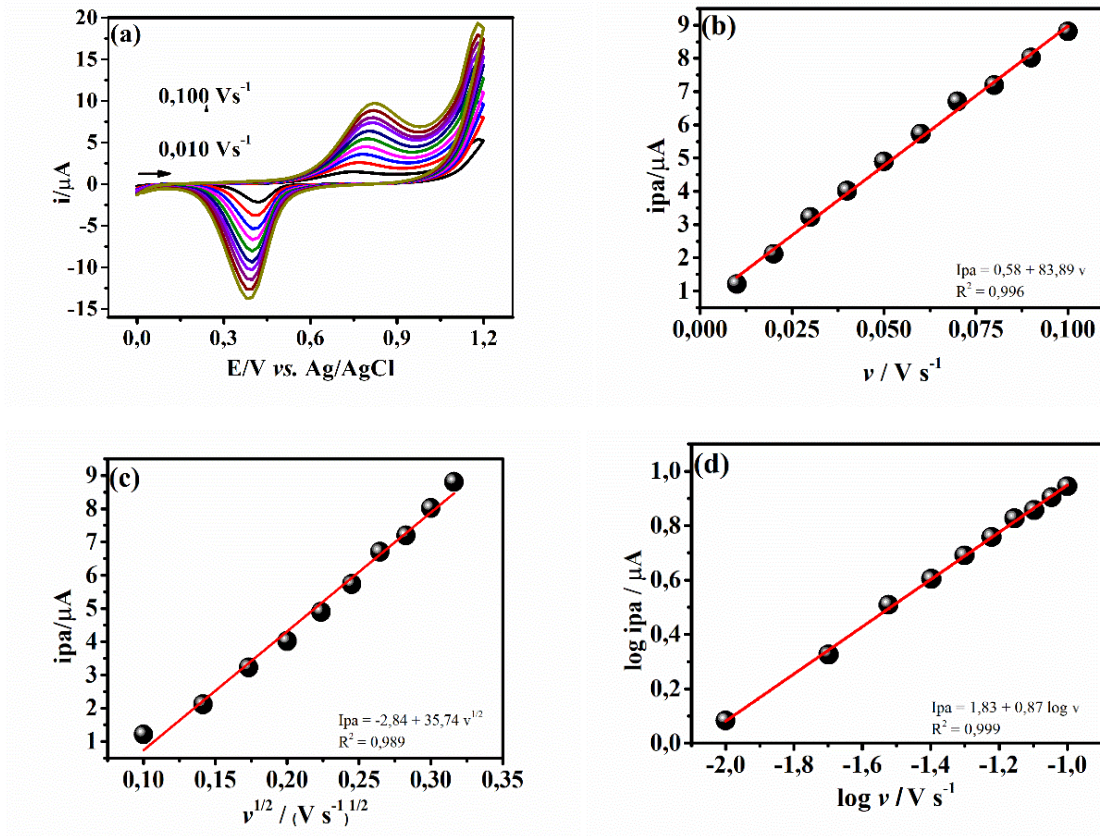


6.1.5 Estudo de diferentes velocidades de varredura

O estudo da velocidade de varredura para GE na presença de $13,60 \text{ mg L}^{-1}$ de NAR também foi realizado. A Figura 32a mostra os voltamogramas cíclicos referentes ao GE em eletrólito suporte B-R $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 9,0) variando a velocidade de varredura de 10 a 100 mV/s . Como pode ser visto, à medida que a velocidade aumenta, maiores valores de corrente anódica são alcançados. No entanto, os picos de corrente tornam-se gradativamente menos definidos e conseqüentemente mais alargados, nota-se também que a medida que aumenta a velocidade de varredura ocorre um deslocamento do potencial de oxidação (E_p) para valores mais positivos.

Ao se avaliar o comportamento da corrente de pico com a velocidade de varredura (i_p vs. v) Figura 32b, ela apresentou uma relação linear satisfatória ($R^2 = 0,996$), superior a quando se relaciona os valores de i_{pa} com a $v^{1/2}$ ($R^2 = 0,989$) Figura 32c. Além disso, o $\log i_{pa}$ em relação ao $\log v$ atingiu o valor de inclinação da reta igual a 0,87 (Figura 32d), muito próximo do valor teórico ($\text{slope} = 1$) que caracteriza processos totalmente controlados por adsorção [88].

Figura 32: Voltamogramas cíclicos para (a) 13,60 mg L⁻¹ de NAR sobre o GE em solução B-R 0,10 mol L⁻¹, pH 9,0 em diferentes velocidades de varredura, variando de 0,010 a 0,100 Vs⁻¹, (b) dependência linear das ipa com a variação da v ; (c) dependência linear das ipa vs. $v^{1/2}$ e (d) dependência log ipa com o log v da NAR.

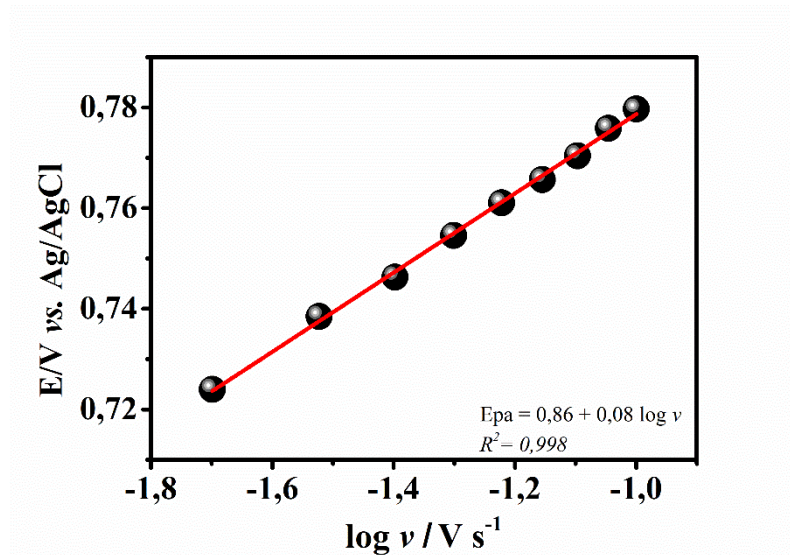


Foi plotado o gráfico correlacionando dependência do E_p vs. $\log v$ para NAR (Figura 33).

Percebe-se um deslocamento linear ($R^2 = 0,998$) dos valores de E_p com relação ao $\log v$ e obtenção da equação $E_p = 0,08 \log v + 0,86$. Como a oxidação da NAR no GE é controlada por adsorção, foi utilizada a equação de Laviron [89] – Equação 5 para cálculo do número de mols de elétrons envolvidos (n), sendo que $E^{o'}$ é o potencial formal de redução, R é a constante dos gases ideais ($8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), T a temperatura (298 K), α o coeficiente de transferência eletrônica, F a constante de Faraday ($96.485 \text{ C mol}^{-1}$) e k^o a constante de velocidade heterogênea, tem-se que:

$$E_p = E_o + \left(\frac{2,303 RT}{\alpha n F} \right) \log \left(\frac{RT k^o}{\alpha n F} \right) + \left(\frac{2,303 RT}{\alpha n F} \right) \log v$$

Figura 33: Gráfico para valores de E_p vs. $\log v$ obtidos a partir do estudo de velocidade de varredura.



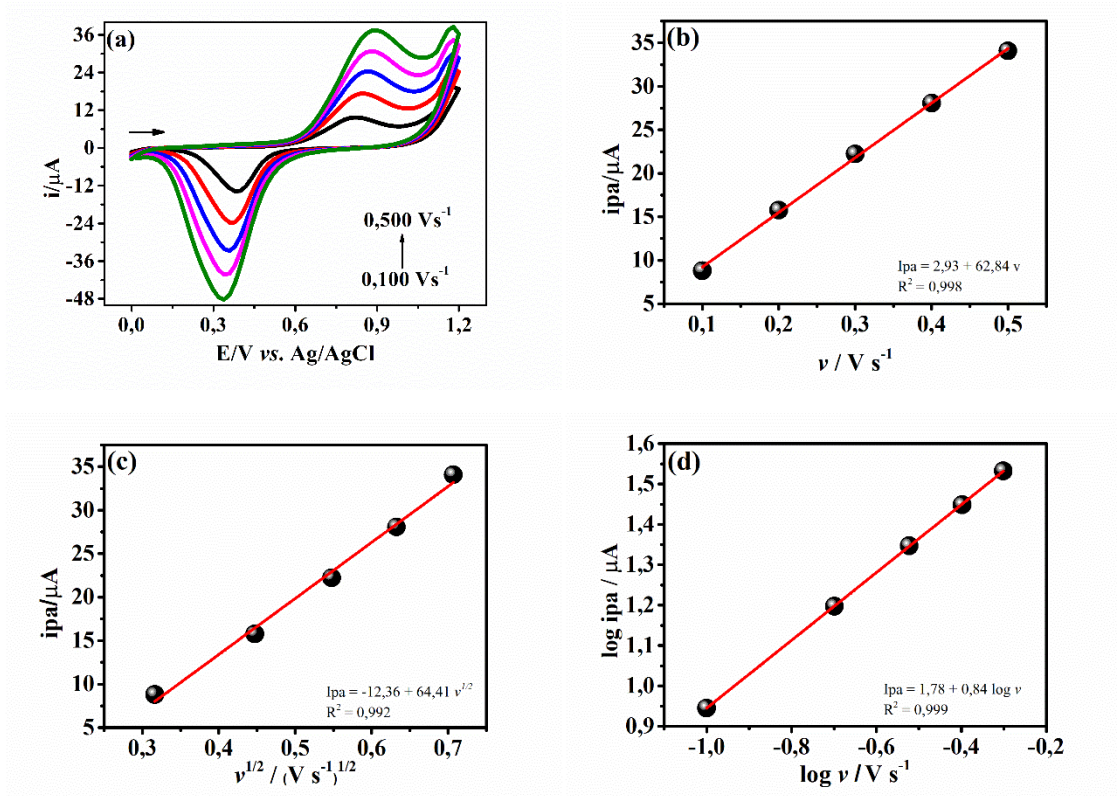
A partir da correlação dos valores de E_p e $\log v$, o coeficiente angular obtido pode ser igualado à $(2,303 RT)/\alpha nF$. Atribuindo a α o valor de 0,5 [89], temos que o número de mols de elétrons transferidos entre a NAR e a plataforma GE vale 1,4, podendo ser aproximado à 1. Este resultado corrobora com o obtido no estudo anterior de pH, onde fora encontrado o envolvimento de 1 mol de elétrons.

Assim, conclui-se que a oxidação da NAR sobre a plataforma GE apresenta um processo determinante controlado por adsorção e envolve a participação proporcional de 1 mol de elétrons para 1 mol de prótons. Mecanismo proposto para a oxidação da NAR sobre a plataforma está representado no Capítulo 1 (Figura 17).

Para investigar o comportamento do GE em altas velocidade, foram coletados voltamogramas em velocidade de varredura de 100 a 500 mV/s. Observa-se que, à medida que aumenta a velocidade de varredura (v) o tamanho pico também aumenta e ocorre um deslocamento de potencial para potenciais mais positivos. Conforme ilustrado na Figura 34c, que (i_{pa}) varia linearmente com a $v^{1/2}$, há uma relação linear ($R^2 = 0,982$). Além disso, ao analisar os resultados, verificou-se também que há uma relação linear ($R^2 = 0,999$) entre $\log i_{pa}$

e $\log v$, cujo coeficiente angular da reta é 0,84. Este valor surge que o processo deve ser controlado por adsorção, uma vez que o ângulo de inclinação para a reta $\log i_{pa}$ vs. $\log v$ está mais próximo a 1 que a 0,5.

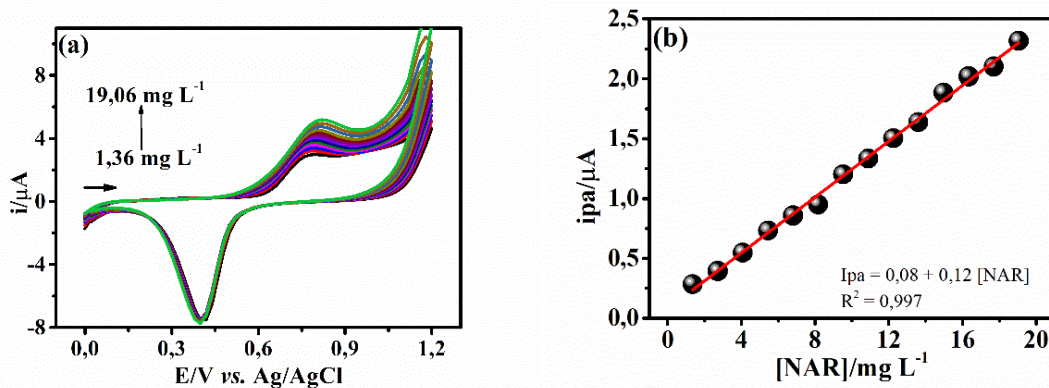
Figura 34: Voltamogramas cíclicos para (a) $13,60 \text{ mg L}^{-1}$ de NAR sobre o GE em solução B-R $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, pH 9,0 em diferentes velocidades de varredura, variando de $0,100$ a $0,500 \text{ Vs}^{-1}$, (b) dependência linear das i_{pa} com a v ; (c) dependência linear das i_{pa} vs. $v^{1/2}$ e (d) dependência do $\log i_{pa}$ com o $\log v$.



6.1.6 Voltametria cíclica com diferentes concentrações de NAR

Com o objetivo de avaliar o desempenho do GE na determinação da NAR, foram coletados voltamogramas cíclicos em várias concentrações do analito. Na Figura 35 é possível observar um aumento de corrente de pico proporcional ao aumento da concentração da NAR.

Figura 35: Voltamograma cíclico referente às diferentes adições de NAR em solução eletrolítica contendo o GE. Experimentos coletados em eletrólito suporte B-R 0,10 mol L⁻¹ (pH 9,0). [NAR] = 1,36, 2,72, 4,08, 5,45, 6,81, 8,17, 9,53, 10,89, 12,25, 13,61, 14,97, 16, 16,34, 17,7 e 19,60 mg L⁻¹.



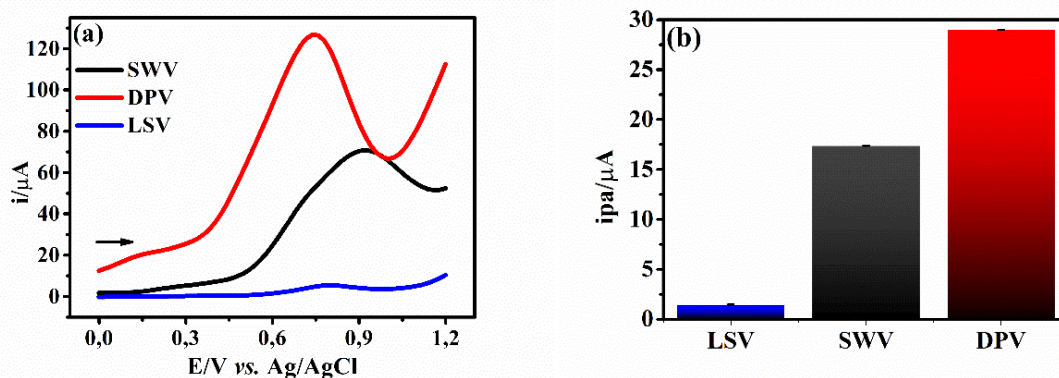
Com base nos resultados voltamogramas obtidos, foi possível construir uma curva de calibração que relaciona os valores de corrente de pico associados a oxidação da NAR com a concentração deste analito. Essa curva é apresentada na Figura 35b. A curva de calibração obtida fornece a seguinte equação de reta: $i_{pa} = 0,08 + 0,12 [NAR]$ com $R^2 = 0,997$. Isso demonstra que o GE é capaz de quantificar baixas concentrações de NAR (1,36 mg L⁻¹), até concentrações mais elevadas em formulações farmacêuticas.

6.2 ESTUDOS ELETROANALÍTICOS

6.2.1 Seleção de técnica voltamétrica para a determinação da NAR

A fim de se desenvolver um método sensível para a determinação da NAR, foram utilizadas três diferentes técnicas de voltamétricas (LSV, SWV e DPV).

Figura 36: Voltamogramas referentes ao estudo de diferentes técnicas para 20 mg L^{-1} de NAR coletados em GE com solução B-R $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, pH 9,0 e $v = 0,05 \text{ V s}^{-1}$.



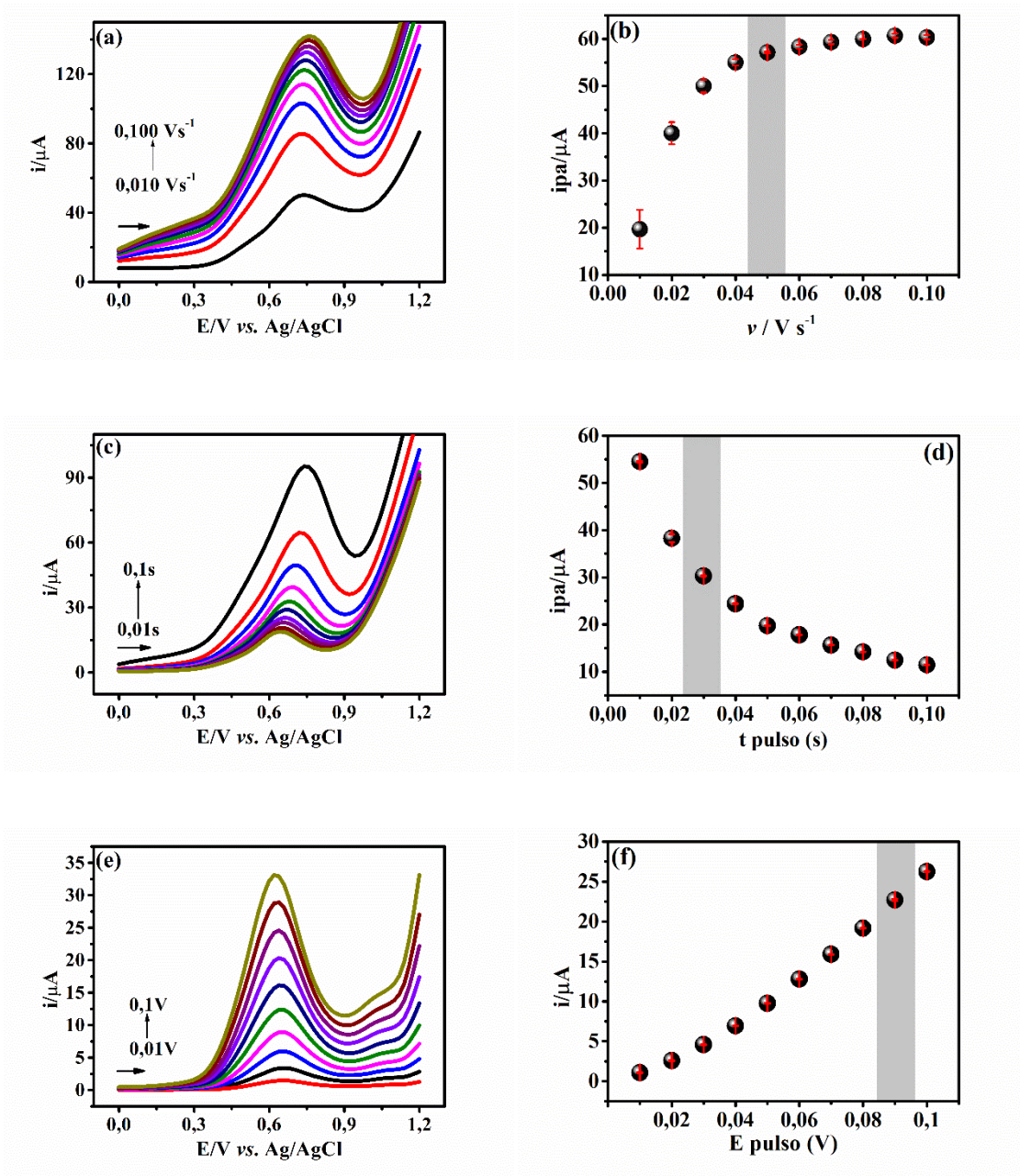
Na Figura 36, é observado que as respostas de corrente de pico são mais intensas em SWV e DPV para o GE. A SWV respondeu com um alto pico de corrente, este sendo aproximadamente $17 \mu\text{A}$ e para DPV a resposta eletroquímica para NAR foi altamente favorável, sendo ela com corrente de pico próximo a $28 \mu\text{A}$. Então, a técnica de DPV foi escolhida para os estudos posteriores.

6.2.2 Parâmetros operacionais em DPV

Voltamogramas para em NAR foram coletados utilizando eletrólito suporte B-R $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, pH 9,0. Inicialmente, a taxa de varredura foi variada na faixa de $0,01$ a $0,1 \text{ V s}^{-1}$ em presença de 25 mg L^{-1} de NAR, mantendo-se o t pulso e E pulso constante e iguais a $0,05 \text{ s}$ e $0,05 \text{ V}$ respectivamente. O GE apresentou uma melhor ipa, quando submetido a velocidade de $0,05 \text{ V s}^{-1}$ ($ipa = 57,1 \mu\text{A}$), após este valor, não apresenta mudança significativa na ipa, conforme pode ser observados na Figura 37a. Posteriormente, o t pulso foi variado num intervalo de $0,01$ a $0,1 \text{ s}$ para uma concentração de 20 mg L^{-1} de NAR. Observou-se que o GE apresentou correntes de pico mais elevados quando se foi aplicado t pulso de $0,03 \text{ s}$ ($ipa = 30,3 \mu\text{A}$) conforme ilustrado na Figura 37d. Conseqüentemente, o valor de o E pulso foi variado dentro da faixa de $0,01$ a $0,1 \text{ V}$ para uma concentração de 15 mg L^{-1} de NAR. O GE alcançou correntes de pico mais elevadas quando se aplicou E pulso de $0,09 \text{ V}$ ($ipa = 22,7 \mu\text{A}$) conforme observado na Figura 37f. Esses valores foram considerados ótimos para serem utilizados na

construção da curva de calibração na técnica de DPV. Durante as otimizações, a concentração da NAR foi variada, a fim de utilizar uma quantidade menor de amostra.

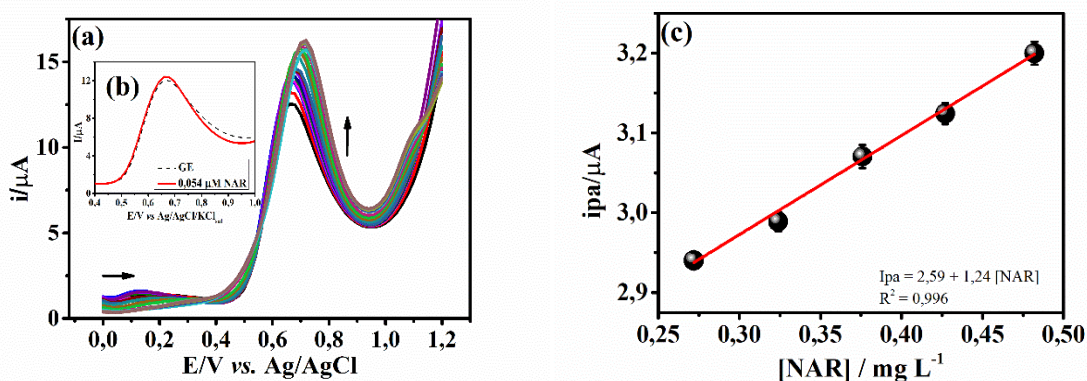
Figura 37: (a) Voltamograma DPV para diferentes velocidades de varredura para 25 mg L^{-1} de NAR, (b) Curva relacionando i_{pa} pela velocidade de varredura, (c) DPV para diferentes t pulso para 20 mg L^{-1} de NAR; (d) Curva relacionando i_{pa} com t pulso, (e) DPV para diferentes E pulso para 15 mg L^{-1} de NAR e (f) Curva relacionando i_{pa} pelo E pulso. Estudos coletados com solução B-R $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, pH 9,0, ($n = 3$).



6.2.3 Curva de calibração

A Figura 38a apresenta DPV para várias concentrações de NAR pelo método de calibração por adição padrão em eletrólito suporte B-R 0,10 mol L⁻¹, pH 9,0. Observam-se picos bem definidos em aproximadamente + 0,67 V, cuja corrente aumenta com o aumento da concentração de NAR em um intervalo de 0,27 a 0,48 mg L⁻¹. O aumento na corrente de pico observado é diretamente proporcional à concentração de NAR na célula. A inserção (Figura 38b) na Figura 38a, mostra o voltamograma do GE e após a primeira adição do analito, mostrando a necessidade da subtração da corrente após adição do analito pela corrente do branco. Os valores de correntes de pico anódico (ipa) foram extraídos mediante a subtração do branco e assim plotados na Figura 38c. É possível se observar a presença de uma linearidade, apresentada no intervalos entre 0,27 – 0,48 mg L⁻¹ Figura 38c. A curva de calibração obtida fornece a seguinte equação de reta: $i_{pa} = 2,59 + 1,24 [NAR]$, com $R^2 = 0,996$ ($n = 3$), onde ip é a corrente de pico em μA e $[NAR]$ é a concentração de NAR em mg L⁻¹.

Figura 38: (a) Voltamogramas de pulso diferencial referente às diferentes adições de NAR em solução eletrolítica contendo o GE, (b) subtração da corrente após a adição do analito pela corrente do branco e (d) Curva referentes a calibração por adição padrão ($n = 3$). Experimentos coletados em eletrólito suporte B-R 0,10 mol L⁻¹ (pH 9,0). $[NAR] = 0,27, 0,32, 0,38, 0,43$ e $0,48$ mg L⁻¹.

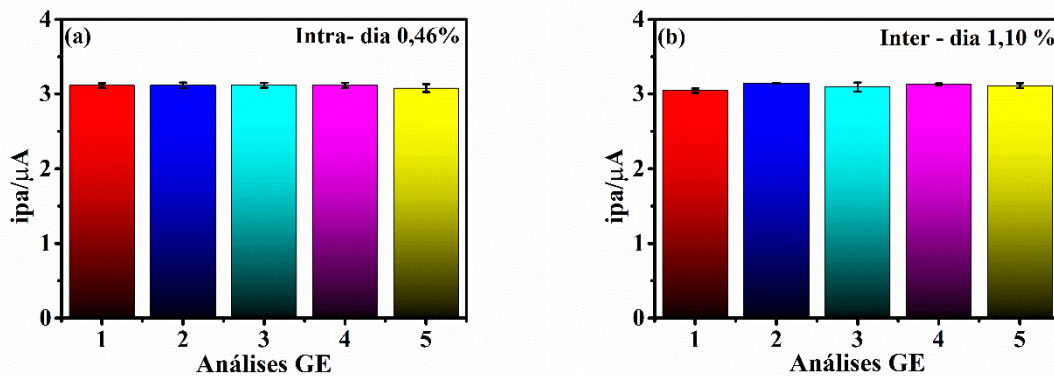


A partir dos resultados obtidos por meio da curva pelo método de calibração por adição padrão, pôde-se ainda estimar os valores de LOD e LOQ do sistema proposto na determinação da NAR. Os LOD e LOQ foram estimados estatisticamente pela razão de $3 \times SDb/Slope$ e $10 \times SDb/Slope$, respectivamente. Os valores obtidos foram de $LOD = 0,04$ mg L⁻¹ e $LOQ = 0,13$ mg L⁻¹.

6.2.4 Precisão

A avaliação da precisão do método eletroanalítico foi conduzida em períodos intra-dia e inter-dia na presença de $0,40 \text{ mg L}^{-1}$ de NAR, utilizando o GE como eletrodo, em eletrólito suporte B-R $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 9,0) e sob as condições otimizadas. As correntes de pico referentes a cada medição foram obtidas através de medidas de DPV e plotadas em gráficos de barras exibidos na Figura 39. Para avaliação intra-dia, foram utilizadas cinco medidas de ipa intercaladas ao longo do mesmo dia. Para avaliação inter-dia, foram realizadas cinco medidas de ipa em cinco dias consecutivos. A partir dos valores de ipa obtidos, foi possível calcular o valor médio das correntes e o desvio padrão relativo às medidas.

Figura 39: Gráfico de ipa com diferentes medidas obtidas através de DPV para: (a) Intra-dia e (b) Inter-dia. Testes coletados em eletrólito suporte B-R $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, pH 9,0 na presença de $0,40 \text{ mg L}^{-1}$ de NAR.



O desvio padrão relativo (RSD) obtido para as medidas intra-dia foi 0,46% ($n = 5$) e para inter-dia 1,10% ($n = 5$). Portanto, é possível afirmar que o método desenvolvido apresenta boa precisão mesmo em momentos diferentes do mesmo dia e em dias distintos [65], [84].

A Tabela 9 resume todos os parâmetros analíticos e valores até aqui mencionados para detecção da NAR utilizando GE.

Tabela 9: Parâmetros e valores para NAR sobre a plataforma GE referente a Figura 38c.

Parâmetro	Valor
Potencial de pico (V)	+0,67
Faixa linear (mg L ⁻¹)	0,27 – 0,48
Coefficiente de determinação (R ²)	0,996
Coefficiente angular (µA L mg ⁻¹)	1,24
Coefficiente linear (µA)	2,59
LOD (mg L ⁻¹)	0,04
LOQ (mg L ⁻¹)	0,13
Repetibilidade intra-dia (%)	0,46
Repetibilidade inter-dia (%)	1,10

6.2.5 Determinação de NAR em formulações farmacêuticas

A identificação e quantificação de NAR em amostras adquiridas na Essentia Pharma, foram realizadas utilizando o método proposto e os resultados foram listados na tabela abaixo.

Tabela 10: Parâmetros estatísticos obtidos a partir das análises das amostras contendo NAR.

Amostra	A	B
Técnica	DPV	
Adicionado (mg) ^a	200	400
Encontrado ^a	207,02	420,6
Recuperado (%) ^c	103,51	105,15
RSD (%) ^a	3,56	4,67

Amostra A: Cápsula de 200 mg / Amostra B: Cápsula de 400 mg; ^a n = 3.; ^c Recuperado = [(Valor encontrado / Valor adicionado) × 100]; ^d Erro = [(Método proposto – Método comparativo) / (Método comparativo)] × 100.

Os valores foram determinados por meio da sobreposição de duas medidas de DPV obtidas a partir de soluções padrão e amostras (A e B). Observou-se que a concentração de NAR encontrada para amostra A (Cápsula de 200 mg) foi de 207,02 mg e para amostra B (Cápsula de 400 mg) 420,6 mg. Os resultados dos testes de recuperação, conforme apresentados na Tabela 11, indicam claramente que o método proposto apresentou boa precisão, pois foram obtidos percentuais de recuperação de 103,51 % para a amostra A e 105,15 % para a amostra B, evidenciando que o sensor GE proveu boa recuperação da NAR nas amostras testadas.

Existem estudos relatados na literatura sobre a determinação eletroquímica da NAR em diferentes amostras, alguns estão descritos na tabela 12.

Tabela 11: Comparação de métodos eletroanalíticos para determinação de NAR.

Eletrodo	Técnica	Faixa Linear (mg L ⁻¹)	LOD (mg L ⁻¹)	LOQ (mg L ⁻¹)	Amostra	Processo	Referência
SnS - rGONRs/ GCE ^a	DPV	0,13 - 15,41	0,09	0,28	Urina e soro	Red	[90]
SWCNTs/ GCE ^b	LSV	0,022 - 1,36 1,361 - 3,26	0,01	-	Fructus Aurantii	Red	[91]
(fMWNC T/NB/ MCPE ^c	DPV	13,61 - 2,72 2,72 - 2,45	0,082	0,25	Frutas	Oxi	[83]
PGE ^d	DPV	0,02 - 49,50	0,008	0,03	Suco toranja	Oxi	[92]
PGE ^d	SWV	0,02 - 27,23	0,012	0,03	Suco toranja	Oxi	[92]
GCE	DPV	1,36 - 19,06	0,108	0,36	Formula ções farmacêu ticas	Oxi	Este trabalho
GE	DPV	0,27 - 0,48 0,73 - 4,17	0,04 0,29	0,13 0,96	Formula ções farmacêu ticas	Oxi	Este trabalho

^a Eletrodo de carbono vítreo modificado com nanofibras de oxido de grafeno reduzidas decoradas com sulfeto de estanho.

^b Eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubo de carbono de paredes simples.

^c Eletrodo de pasta de carbono modificado com nanotubo de carbono de paredes múltiplas funcionalizado e corante catiônico de fenoxazina.

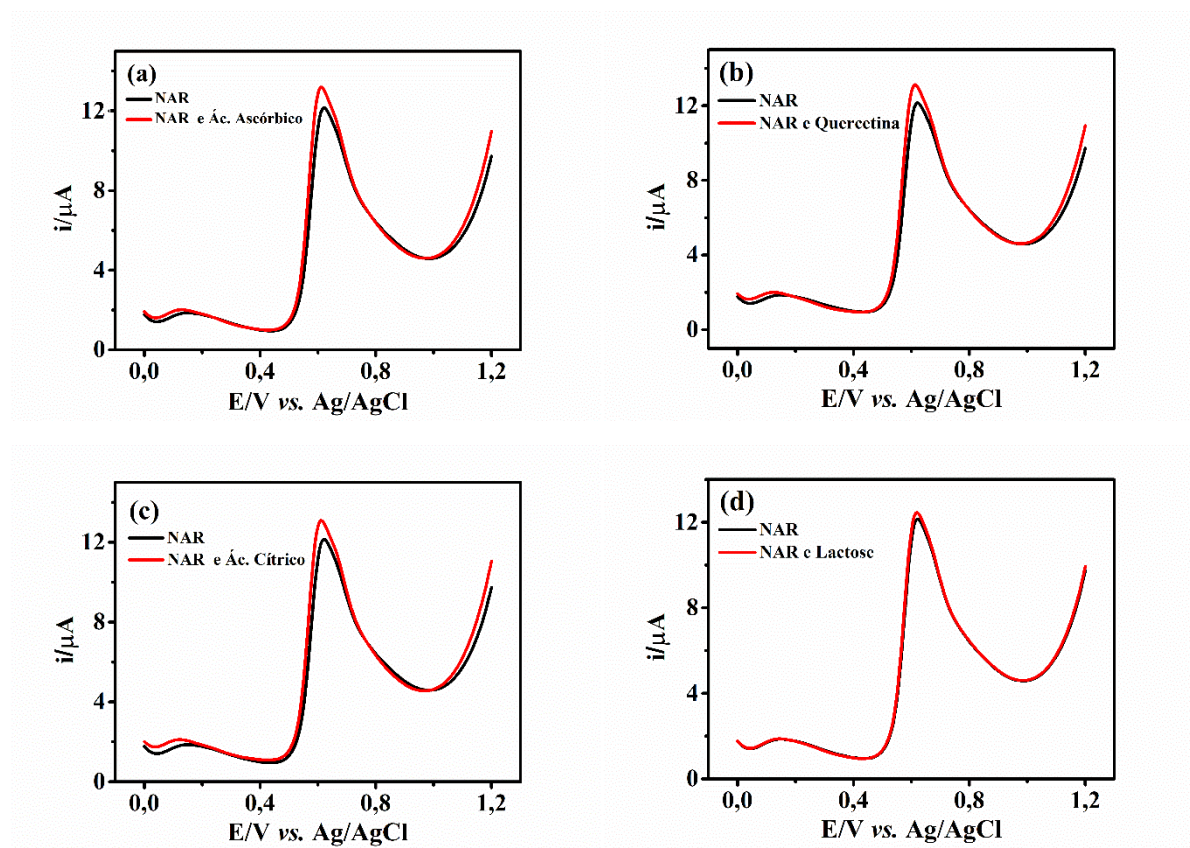
^d Eletrodo de grafite

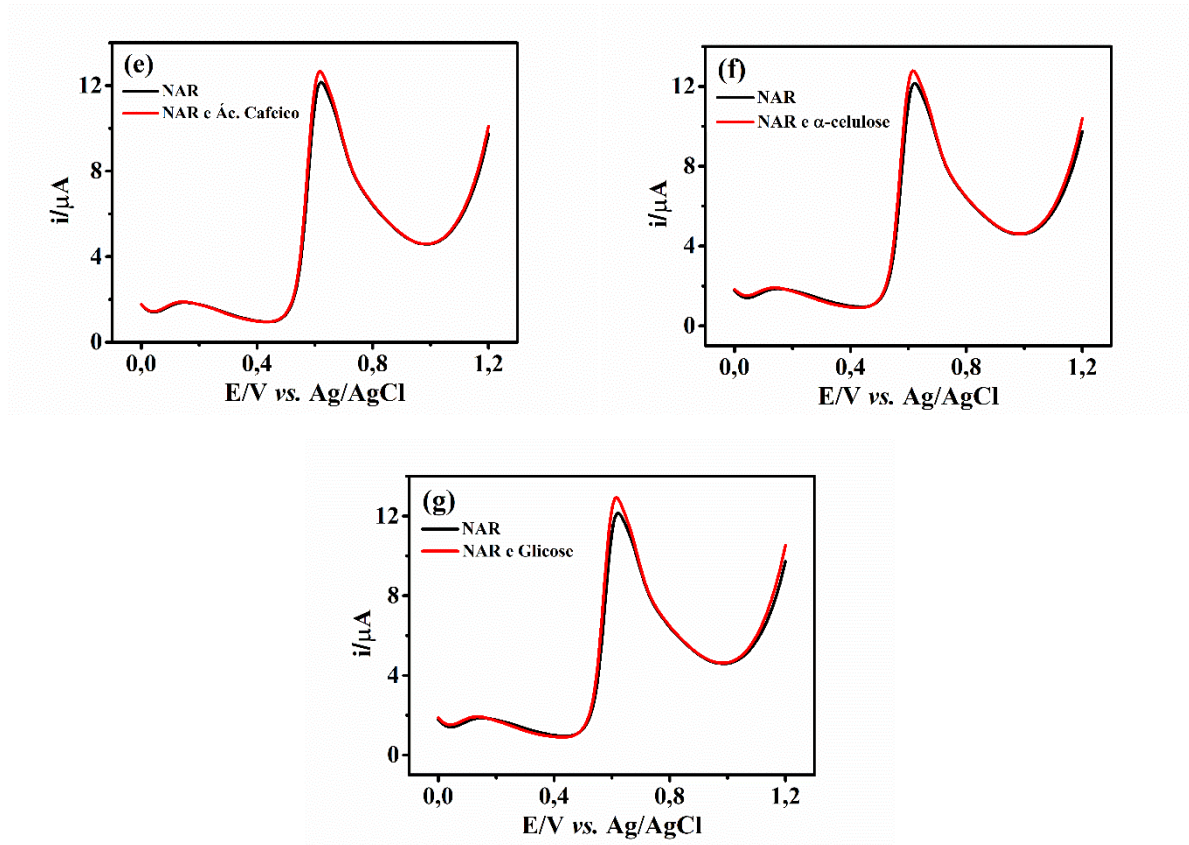
Até onde sabemos, não há relato de trabalho na literatura para determinação eletroquímica de NAR em formulações farmacêuticas. Assim, um método com menor sensibilidade para determinação de NAR em amostras farmacêuticas em comparação a outros métodos para outros tipos amostra não é uma desvantagem, pois a NAR geralmente está presente em altas concentrações nas formulações. Além disso, o uso de eletrodos não modificados como os propostos neste trabalho possibilita a aplicação de um método robusto, rápido e de baixo custo para determinação de NAR em formulações farmacêuticas.

6.2.6 Seletividade

A seletividade do método proposto para a determinação de NAR foi avaliada utilizando-se o GE na presença de compostos que podem estar presentes em formulações farmacêuticas. Medidas de DPV em concentração fixa de $0,40 \text{ mg L}^{-1}$ de NAR, usando um excesso de 5 vezes de cada possível substância interferente, foram realizadas. Os compostos investigados como interferentes foram: (a) ácido ascórbico, (b) quercetina, (c) ácido cítrico, (d) lactose, (e) ácido cafeico, (f) α -celulose e (g) glicose. Os resultados são apresentados na Figura 40.

Figura 40: Influência de possíveis interferentes na corrente de $0,40 \text{ mg L}^{-1}$ de NAR. Os experimentos foram conduzidos em eletrólito suporte B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 9,0. (Interferentes) = $27,20 \text{ mg L}^{-1}$, (a) ácido ascórbico, (b) quercetina, (c) ácido cítrico, (d) lactose, (e) ácido cafeico, (f) α -celulose e (g) glicose.





Observou-se que o perfil voltamérico ocorre praticamente inalterado antes e após a adição de cada interferente, causando uma variação insignificante. O erro (%) foi calculado e descrito na Tabela 12, mostrando a seletividade do GE mesmo na presença de possíveis interferentes.

Tabela 12: Efeito de interferentes frente a resposta da NAR no GE proporção de 1:5.

Interferente^a	Erro (%)
Ácido ascórbico (a)	11,52
Quercetina (b)	10,46
Ácido cítrico (c)	10,28
Lactose (d)	3,21
Ácido cafeico (e)	5,95
α-Celulose (f)	6,50
Glicose (g)	9,20

^a $n = 3$.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O comportamento eletroquímico da NAR é demonstrado utilizando técnicas voltamétricas, onde o fármaco apresenta um comportamento irreversível frente ao GCE e GE. Os métodos propostos exibem uma determinação rápida, robusta e de baixo custo da NAR em formulação farmacêutica. O GCE apresentou linearidade no intervalo de 1,20 - 19,10 mg L⁻¹ ($R^2 = 0,995$), com valores de LOD = 0,11 mg L⁻¹ e LOQ = 0,36 mg L⁻¹. O GE, apresentou-se linearidade no intervalo de 0,27 - 0,48 mg L⁻¹ ($R^2 = 0,995$), apresentando valores de LOD = 0,04 mg L⁻¹ e LOQ = 0,13 mg L⁻¹. O GCE e GE apresentaram seletividade adequada na presença de possíveis interferentes e boa precisão intra e inter dia. A precisão intra e inter dia foi determinada com baixos valores de RSD, 1,54% e 3,99%, respectivamente, utilizando o GCE, e 0,46% e 1,10%, respectivamente, utilizando o GE. Portanto, os resultados mostraram que os métodos desenvolvidos podem ser aplicados com sucesso no controle de qualidade do antioxidante NAR em formulações farmacêuticas.

REFERÊNCIAS

- [1] F. Alam, K. Mohammadin, Z. Shafique, S. T. Amjad, and M. H. H. bin Asad, "Citrus flavonoids as potential therapeutic agents: A review," *Phytotherapy Research*, vol. 36, no. 4, pp. 1417–1441, Apr. 2022, doi: 10.1002/ptr.7261.
- [2] N. Zulkefli *et al.*, "Flavonoids as Potential Wound-Healing Molecules: Emphasis on Pathways Perspective," *Int J Mol Sci*, vol. 24, no. 5, p. 4607, Feb. 2023, doi: 10.3390/ijms24054607.
- [3] H. Slika *et al.*, "Therapeutic potential of flavonoids in cancer: ROS-mediated mechanisms," *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 146, p. 112442, Feb. 2022, doi: 10.1016/j.biopha.2021.112442.
- [4] L. Chen, H. Cao, Q. Huang, J. Xiao, and H. Teng, "Absorption, metabolism and bioavailability of flavonoids: a review," *Crit Rev Food Sci Nutr*, vol. 62, no. 28, pp. 7730–7742, Oct. 2022, doi: 10.1080/10408398.2021.1917508.
- [5] N. Cheng, L. Bell, D. J. Lamport, and C. M. Williams, "Dietary Flavonoids and Human Cognition: A Meta-Analysis," *Mol Nutr Food Res*, vol. 66, no. 21, p. 2100976, Nov. 2022, doi: 10.1002/mnfr.202100976.
- [6] T. Minocha *et al.*, "Flavonoids as Promising Neuroprotectants and Their Therapeutic Potential against Alzheimer's Disease," *Oxid Med Cell Longev*, vol. 2022, pp. 1–13, Aug. 2022, doi: 10.1155/2022/6038996.
- [7] A. Csuti, B. Sik, and Z. Ajtony, "Measurement of Naringin from Citrus Fruits by High-Performance Liquid Chromatography – a Review," *Crit Rev Anal Chem*, pp. 1–14, Jun. 2022, doi: 10.1080/10408347.2022.2082241.
- [8] Y. Yang, M. Trevethan, S. Wang, and L. Zhao, "Beneficial effects of citrus flavanones naringin and naringenin and their food sources on lipid metabolism: An update on bioavailability, pharmacokinetics, and mechanisms," *J Nutr Biochem*, vol. 104, p. 108967, Jun. 2022, doi: 10.1016/j.jnutbio.2022.108967.
- [9] A. Roy *et al.*, "Flavonoids a Bioactive Compound from Medicinal Plants and Its Therapeutic Applications," *Biomed Res Int*, vol. 2022, pp. 1–9, Jun. 2022, doi: 10.1155/2022/5445291.
- [10] M. Addi, A. Elbouzidi, M. Abid, D. Tungmunthum, A. Elamrani, and C. Hano, "An Overview of Bioactive Flavonoids from Citrus Fruits," *Applied Sciences*, vol. 12, no. 1, p. 29, Dec. 2021, doi: 10.3390/app12010029.
- [11] H. Tao *et al.*, "Comparative metabolomics of flavonoids in twenty vegetables reveal their nutritional diversity and potential health benefits," *Food Research International*, vol. 164, p. 112384, Feb. 2023, doi: 10.1016/j.foodres.2022.112384.
- [12] B. Supasatyankul, M. Saisriyoot, U. Klinkesorn, K. Rattanaporn, and S. Sae-Tan, "Extraction of Phenolic and Flavonoid Compounds from Mung Bean (*Vigna radiata* L.) Seed Coat by Pressurized Liquid Extraction," *Molecules*, vol. 27, no. 7, p. 2085, Mar. 2022, doi: 10.3390/molecules27072085.
- [13] A. Borah, S. Selvaraj, S. R. Holla, and S. De, "Extraction and characterization of total phenolic and flavonoid contents from bark of *Swietenia macrophylla* and their antimicrobial and antioxidant properties," *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 15, no. 12, p. 104370, Dec. 2022, doi: 10.1016/j.arabjc.2022.104370.

- [14] T. Pei *et al.*, “Characterization of UDP-glycosyltransferase family members reveals how major flavonoid glycoside accumulates in the roots of *Scutellaria baicalensis*,” *BMC Genomics*, vol. 23, no. 1, p. 169, Mar. 2022, doi: 10.1186/s12864-022-08391-1.
- [15] Y. Wang *et al.*, “Variation in the Main Health-Promoting Compounds and Antioxidant Activity of Different Edible Parts of Purple Flowering Stalks (*Brassica campestris* var. *purpuraria*) and Green Flowering Stalks (*Brassica campestris* var. *campestris*),” *Plants*, vol. 11, no. 13, p. 1664, Jun. 2022, doi: 10.3390/plants11131664.
- [16] J. H. Kim *et al.*, “The inhibitory activity of methoxyl flavonoids derived from *Inula britannica* flowers on SARS-CoV-2 3CLpro,” *Int J Biol Macromol*, vol. 222, pp. 2098–2104, Dec. 2022, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.10.008.
- [17] X. Wang *et al.*, “MS-FINDER Assisted in Understanding the Profile of Flavonoids in Temporal Dimension during the Fermentation of Pu-erh Tea,” *J Agric Food Chem*, vol. 70, no. 23, pp. 7085–7094, Jun. 2022, doi: 10.1021/acs.jafc.2c01595.
- [18] A. Nobari, M. M. Marvizadeh, T. Sadeghi, N. Rezaei-savadkouhi, and A. M. Nafchi, “Flavonoid and Anthocyanin Pigments Characterization of Pistachio Nut (*Pistacia vera*) as a Function of Cultivar,” *Journal of Nuts*, vol. 13, no. 4, pp. 313–322, Dec. 2022, doi: 10.22034/jon.2022.1965310.1191.
- [19] G. Mansour, C. Ghanem, L. Mercenaro, N. Nassif, G. Hassoun, and A. Del Caro, “Effects of altitude on the chemical composition of grapes and wine: a review,” *OENO One*, vol. 56, no. 1, pp. 227–239, Mar. 2022, doi: 10.20870/oeno-one.2022.56.1.4895.
- [20] M. H. Shahrajabian, W. Sun, and Q. Cheng, “The Importance of Flavonoids and Phytochemicals of Medicinal Plants with Antiviral Activities,” *Mini Rev Org Chem*, vol. 19, no. 3, pp. 293–318, May 2022, doi: 10.2174/1570178618666210707161025.
- [21] J. P. Quintal Martínez and M. R. Segura Campos, “Flavonoids as a therapeutical option for the treatment of thrombotic complications associated with COVID-19,” *Phytotherapy Research*, vol. 37, no. 3, pp. 1092–1114, Mar. 2023, doi: 10.1002/ptr.7700.
- [22] Y. Jin and R. Arroo, “The protective effects of flavonoids and carotenoids against diabetic complications—A review of in vivo evidence,” *Front Nutr*, vol. 10, Mar. 2023, doi: 10.3389/fnut.2023.1020950.
- [23] A. Ekalu and J. D. Habila, “Flavonoids: isolation, characterization, and health benefits,” *Beni Suef Univ J Basic Appl Sci*, vol. 9, no. 1, p. 45, Dec. 2020, doi: 10.1186/s43088-020-00065-9.
- [24] E. de Rijke, P. Out, W. M. A. Niessen, F. Ariese, C. Gooijer, and U. A. Th. Brinkman, “Analytical separation and detection methods for flavonoids,” *J Chromatogr A*, vol. 1112, no. 1–2, pp. 31–63, Apr. 2006, doi: 10.1016/j.chroma.2006.01.019.
- [25] C. D. Stalikas, “Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids,” *J Sep Sci*, vol. 30, no. 18, pp. 3268–3295, Dec. 2007, doi: 10.1002/jssc.200700261.
- [26] A. N. Panche, A. D. Diwan, and S. R. Chandra, “Flavonoids: an overview,” *J Nutr Sci*, vol. 5, p. e47, Dec. 2016, doi: 10.1017/jns.2016.41.
- [27] A. Tajammal *et al.*, “Antioxidant, molecular docking and computational investigation of new flavonoids,” *J Mol Struct*, vol. 1254, p. 132189, Apr. 2022, doi: 10.1016/j.molstruc.2021.132189.

- [28] N. F. Shamsudin *et al.*, “Antibacterial Effects of Flavonoids and Their Structure-Activity Relationship Study: A Comparative Interpretation,” *Molecules*, vol. 27, no. 4, p. 1149, Feb. 2022, doi: 10.3390/molecules27041149.
- [29] P. Ramesh, R. Jagadeesan, S. Sekaran, A. Dhanasekaran, and S. Vimalraj, “Flavonoids: Classification, Function, and Molecular Mechanisms Involved in Bone Remodelling,” *Front Endocrinol (Lausanne)*, vol. 12, Nov. 2021, doi: 10.3389/fendo.2021.779638.
- [30] Sariga, A. George, R. Rajeev, D. A. Thadathil, and A. Varghese, “A Comprehensive Review on the Electrochemical Sensing of Flavonoids,” *Crit Rev Anal Chem*, pp. 1–41, Jan. 2022.
- [31] K. Neha, M. R. Haider, A. Pathak, and M. S. Yar, “Medicinal prospects of antioxidants: A review,” *Eur J Med Chem*, vol. 178, pp. 687–704, Sep. 2019, doi: 10.1016/j.ejmech.2019.06.010.
- [32] H. Alkadi, “A Review on Free Radicals and Antioxidants,” *Infect Disord Drug Targets*, vol. 20, no. 1, pp. 16–26, Feb. 2020, doi: 10.2174/1871526518666180628124323.
- [33] A. Elsayed Azab, Almokhtar A Adwas, A. S. Ibrahim Elsayed, A. A Adwas, Ata Sedik Ibrahim Elsayed, and F. A. Quwaydir, “Oxidative stress and antioxidant mechanisms in human body,” *Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering*, vol. 6, no. 1, pp. 43–47, Feb. 2019, doi: 10.15406/jabb.2019.06.00173.
- [34] G. Veurink, G. Perry, and S. K. Singh, “Role of antioxidants and a nutrient rich diet in Alzheimer’s disease,” *Open Biol*, vol. 10, no. 6, Jun. 2020, doi: 10.1098/rsob.200084.
- [35] G. Veurink, G. Perry, and S. K. Singh, “Role of antioxidants and a nutrient rich diet in Alzheimer’s disease,” *Open Biol*, vol. 10, no. 6, Jun. 2020, doi: 10.1098/rsob.200084.
- [36] T. Manivasagam *et al.*, “Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Autism,” 2020, pp. 193–206. doi: 10.1007/978-3-030-30402-7_7.
- [37] A. Arafah *et al.*, “Multi-Therapeutic Potential of Naringenin (4',5,7-Trihydroxyflavone): Experimental Evidence and Mechanisms,” *Plants*, vol. 9, no. 12, p. 1784, Dec. 2020, doi: 10.3390/plants9121784.
- [38] B. Salehi *et al.*, “The Therapeutic Potential of Naringenin: A Review of Clinical Trials,” *Pharmaceuticals*, vol. 12, no. 1, p. 11, Jan. 2019, doi: 10.3390/ph12010011.
- [39] A. Rauf *et al.*, “Comprehensive review on naringenin and naringin polyphenols as a potent anticancer agent,” *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 29, no. 21, pp. 31025–31041, May 2022, doi: 10.1007/s11356-022-18754-6.
- [40] Pubchem, “Naringenin,” *Naringenin (Compound)*, Sep. 16, 2004.
- [41] W. S. C. Quintão, R. Ferreira-Nunes, T. Gratieri, M. Cunha-Filho, and G. M. Gelfuso, “Validation of a simple chromatographic method for naringenin quantification in skin permeation experiments,” *Journal of Chromatography B*, vol. 1201–1202, p. 123291, Jun. 2022, doi: 10.1016/j.jchromb.2022.123291.
- [42] Y. Peng, F. Liu, and J. Ye, “Quantitative and qualitative analysis of flavonoid markers in *Fucus aurantii* of different geographical origin by capillary electrophoresis with electrochemical detection,” *Journal of Chromatography B*, vol. 830, no. 2, pp. 224–230, Jan. 2006, doi: 10.1016/j.jchromb.2005.10.043.
- [43] M. DELOURDESMATABILBAO, C. ANDRESLACUEVA, O. JAUREGUI, and R. LAMUELARAVENTOS, “Determination of flavonoids in a Citrus fruit extract by LC–DAD

- and LC–MS,” *Food Chem*, vol. 101, no. 4, pp. 1742–1747, 2007, doi: 10.1016/j.foodchem.2006.01.032.
- [44] L. Di Donna *et al.*, “Comprehensive assay of flavanones in citrus juices and beverages by UHPLC–ESI-MS/MS and derivatization chemistry,” *Food Chem*, vol. 141, no. 3, pp. 2328–2333, Dec. 2013, doi: 10.1016/j.foodchem.2013.05.034.
- [45] S. Şanlı and C. Lunte, “Determination of eleven flavonoids in chamomile and linden extracts by capillary electrophoresis,” *Anal. Methods*, vol. 6, no. 11, pp. 3858–3864, 2014, doi: 10.1039/C3AY41878B.
- [46] B. Barfi, A. Asghari, M. Rajabi, A. Barfi, and I. Saeidi, “Simplified miniaturized ultrasound-assisted matrix solid phase dispersion extraction and high performance liquid chromatographic determination of seven flavonoids in citrus fruit juice and human fluid samples: Hesperetin and naringenin as biomarkers,” *J Chromatogr A*, vol. 1311, pp. 30–40, Oct. 2013, doi: 10.1016/j.chroma.2013.08.078.
- [47] I. A. Ribeiro and M. H. L. Ribeiro, “Naringin and naringenin determination and control in grapefruit juice by a validated HPLC method,” *Food Control*, vol. 19, no. 4, pp. 432–438, Apr. 2008, doi: 10.1016/j.foodcont.2007.05.007.
- [48] F. Da Silva Santos, L. Vitor da Silva, P. V. S. Campos, C. de Medeiros Strunkis, C. M. G. Ribeiro, and M. O. Salles, “Review—Recent Advances of Electrochemical Techniques in Food, Energy, Environment, and Forensic Applications,” *ECS Sensors Plus*, vol. 1, no. 1, p. 013603, Mar. 2022, doi: 10.1149/2754-2726/ac5cdf.
- [49] Gary A. Mabbott, *Electroanalytical Chemistry: Principles, Best Practices, and Case Studies*. Wiley, 2020.
- [50] V. Climent and J. M. Feliu, “Cyclic Voltammetry,” in *Encyclopedia of Interfacial Chemistry*, Elsevier, 2018, pp. 48–74. doi: 10.1016/B978-0-12-409547-2.10764-4.
- [51] J. O. W. J. A. G. T. R. R. A. Osteryoung, *Pulse Voltammetric Methods of Analysis [and Discussion]*, vol. 302. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences, 1981.
- [52] Fatibello Filho and Orlando *et al.*, *Eletroanálises: aspectos teóricos e práticos*. EdUFSCar, 2022.
- [53] D. A. *et al* SKOOG, *Fundamentos de química analítica*, vol. 8. São Paulo: Cengage Learning, 2006.
- [54] L. M. Aleixo, “Voltametria: conceitos e técnicas,” *Revista Chemkeys*, no. 3, pp. 1–21, Sep. 2018, doi: 10.20396/chemkeys.v0i3.9609.
- [55] A. M. O. ; B. C. M. A. BRETT, *Electroquímica: Princípios, Métodos e Aplicações*, vol. 5. 1996.
- [56] A. J. ; F. L. R. ; W. H. S. BARD, “Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications,” John Wiley & Sons, 2022.
- [57] D. de Souza, S. A. S. Machado, and L. A. Avaca, “Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos,” *Quim Nova*, vol. 26, no. 1, pp. 81–89, Jan. 2003, doi: 10.1590/S0100-40422003000100015.
- [58] L. A. de Carvalho, A. R. de Andrade, and P. R. Bueno, “Espectroscopia de impedância eletroquímica aplicada ao estudo das reações heterogêneas em ânodos dimensionalmente

- estáveis,” *Quim Nova*, vol. 29, no. 4, pp. 796–804, Jul. 2006, doi: 10.1590/S0100-40422006000400029.
- [59] A. LASIA, *Electrochemical Impedance Spectroscopy and its Applications*, 1st ed. Springer Science+Business Media New York, 2014.
- [60] X. Wan *et al.*, “Facile Synthesis of MnO₂ Nanoflowers/N-Doped Reduced Graphene Oxide Composite and Its Application for Simultaneous Determination of Dopamine and Uric Acid,” *Nanomaterials*, vol. 9, no. 6, p. 847, Jun. 2019, doi: 10.3390/nano9060847.
- [61] N. O. Laschuk, E. B. Easton, and O. V. Zenkina, “Reducing the resistance for the use of electrochemical impedance spectroscopy analysis in materials chemistry,” *RSC Adv*, vol. 11, no. 45, pp. 27925–27936, 2021, doi: 10.1039/D1RA03785D.
- [62] C. L. VOIGT, “Tendências e Progressos da Eletroquímica e Eletroanalítica no Brasil,” Ponta Grossa: Atena Editora, 2018.
- [63] M. Ribani, C. B. G. Bottoli, C. H. Collins, I. C. S. F. Jardim, and L. F. C. Melo, “Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos,” *Quim Nova*, vol. 27, no. 5, pp. 771–780, Oct. 2004, doi: 10.1590/S0100-40422004000500017.
- [64] M. Gumustas and S. A. Ozkan, “The Role of and the Place of Method Validation in Drug Analysis Using Electroanalytical Techniques,” *Open Anal Chem J*, vol. 5, no. 1, pp. 1–21, May 2014, doi: 10.2174/1874065001005010001.
- [65] N. E. Q. I. INMETRO – INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, *DOQ-CGCRE- 008, Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos*.
- [66] T. Moeller, J. C. Bailar, J. Kleinberg, C. O. Guss, M. E. Castellion, and C. Metz, “ELECTROCHEMISTRY,” in *Chemistry*, Elsevier, 1980, pp. 744–764. doi: 10.1016/B978-0-12-503350-3.50029-9.
- [67] J. Grimshaw, “ELECTROCHEMICAL OXIDATION AND REDUCTION OF ORGANIC COMPOUNDS,” in *Electrochemical Reactions and Mechanisms in Organic Chemistry*, Elsevier, 2000, pp. 1–26. doi: 10.1016/B978-044472007-8/50001-X.
- [68] A. Dekanski, J. Stevanović, R. Stevanović, B. Ž. Nikolić, and V. M. Jovanović, “Glassy carbon electrodes: I. Characterization and electrochemical activation,” *Carbon N Y*, vol. 39, no. 8, pp. 1195–1205, 2001, doi: 10.1016/S0008-6223(00)00228-1.
- [69] G. N. Kamau, “Surface preparation of glassy carbon electrodes,” *Anal Chim Acta*, vol. 207, pp. 1–16, 1988, doi: 10.1016/S0003-2670(00)80777-1.
- [70] F. L. Almeida and S. G. Santos-Filho, “Surface activation of gold electrodes using electrochemical conditioning,” in *28th Symposium on Microelectronics Technology and Devices (SBMicro 2013)*, IEEE, Sep. 2013, pp. 1–5. doi: 10.1109/SBMicro.2013.6676168.
- [71] N. L. Teradal, A. K. Satpati, and J. Seetharamappa, “A facile one-pot hydrothermal synthesis of tin sulfide-decorated reduced graphene oxide nanoribbons and its sensing application for a flavanone naringenin,” *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 797, pp. 89–96, Jul. 2017, doi: 10.1016/j.jelechem.2017.05.022.
- [72] W. Wang, J. Gao, L. Wang, and B. Ye, “Electrochemical behavior of naringenin and its sensitive determination based on a single-walled carbon nanotube modified electrode,” *Analytical Methods*, vol. 7, no. 20, pp. 8847–8856, 2015, doi: 10.1039/C5AY01782C.

- [73] G. Manasa, R. J. Mascarenhas, A. K. Bhakta, and Z. Mekhalif, "MWCNT/Nileblue Heterostructured Composite Electrode for Flavanone Naringenin Quantification in Fruit Juices," *Electroanalysis*, vol. 32, no. 5, pp. 939–948, May 2020, doi: 10.1002/elan.201900573.
- [74] A. P. Ruas De Souza, F. S. Felix, P. S. Castro, L. Angnes, and M. Bertotti, "Gold random microarrays: Design, characterization and amperometric determination of ciclopirox olamine in pharmaceutical products," *Analytical Methods*, vol. 8, no. 5, pp. 1078–1083, Feb. 2016, doi: 10.1039/c5ay03157e.
- [75] R. N. Gomes *et al.*, "Dispersion of multi-walled carbon nanotubes in [BMIM]PF₆ for electrochemical sensing of acetaminophen," *Materials Science and Engineering C*, vol. 88, pp. 148–156, Jul. 2018, doi: 10.1016/j.msec.2018.03.016.
- [76] B. M. Marson, V. Concentino, A. M. Junkert, M. M. Fachi, R. O. Vilhena, and R. Pontarolo, "VALIDATION of ANALYTICAL METHODS in A PHARMACEUTICAL QUALITY SYSTEM: AN OVERVIEW FOCUSED on HPLC METHODS," *Quim Nova*, vol. 43, no. 8, pp. 1190–1203, 2020, doi: 10.21577/0100-4042.20170589.
- [77] N. M. BRITO, O. P. DE AMARANTE JUNIOR, L. POLESE, and M. L. RIBEIRO, "VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS: ESTRATÉGIA E DISCUSSÃO," *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, vol. 13, pp. 129–146, Dec. 2003, doi: 10.5380/pes.v13i0.3173.
- [78] B.-A. Mei, O. Munteshari, J. Lau, B. Dunn, and L. Pilon, "Physical Interpretations of Nyquist Plots for EDLC Electrodes and Devices," *The Journal of Physical Chemistry C*, vol. 122, no. 1, pp. 194–206, Jan. 2018, doi: 10.1021/acs.jpcc.7b10582.
- [79] J. Tang *et al.*, "A sensitive and selective electrochemical sensor based on graphene quantum dots/gold nanoparticles nanocomposite modified electrode for the determination of luteolin in peanut hulls," *Microchemical Journal*, vol. 145, pp. 899–907, Mar. 2019, doi: 10.1016/j.microc.2018.12.006.
- [80] A. G. K. Tchekep, K. Venkatesan, H. L. Tcheumi, V. Suryanarayanan, and D. K. Pattanayak, "Sonochemical fabrication of a hybrid electrode material based on pristine carbon nanotubes and bentonite clay for fast and highly sensitive determination of dopamine in the presence of ascorbic and uric acid," *Mater Chem Phys*, vol. 292, p. 126867, Dec. 2022, doi: 10.1016/j.matchemphys.2022.126867.
- [81] O. E. Fayemi, A. S. Adekunle, B. E. Kumara Swamy, and E. E. Ebenso, "Electrochemical sensor for the detection of dopamine in real samples using polyaniline/NiO, ZnO, and Fe₃O₄ nanocomposites on glassy carbon electrode," *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 818, pp. 236–249, Jun. 2018, doi: 10.1016/j.jelechem.2018.02.027.
- [82] A. & B. C. Brett, *Electroquímica: princípios, métodos e aplicações*. Coimbra: Almedina, 1996.
- [83] G. Manasa, R. J. Mascarenhas, A. K. Bhakta, and Z. Mekhalif, "MWCNT/Nileblue Heterostructured Composite Electrode for Flavanone Naringenin Quantification in Fruit Juices," *Electroanalysis*, vol. 32, no. 5, pp. 939–948, May 2020, doi: 10.1002/elan.201900573.
- [84] R. et al. KELLNER, *Analytical Chemistry: A Modern Approach to Analytical Science*. Germany: Wiley-VCH, 2004.
- [85] N. Bage and P. Kar, "Electrochemical sensing of biotin-avidin interaction on gold electrode modified by silver nanoparticles through covalent co-assembly," *Sensors International*, vol. 3, p. 100159, 2022, doi: 10.1016/j.sintl.2022.100159.

- [86] R. Pei, Z. Cheng, E. Wang, and X. Yang, "Amplification of antigen–antibody interactions based on biotin labeled protein–streptavidin network complex using impedance spectroscopy," *Biosens Bioelectron*, vol. 16, no. 6, pp. 355–361, Aug. 2001, doi: 10.1016/S0956-5663(01)00150-6.
- [87] L. Fu *et al.*, "Electrochemical detection of silver ions by using sulfur quantum dots modified gold electrode," *Sens Actuators B Chem*, vol. 304, p. 127390, Feb. 2020, doi: 10.1016/j.snb.2019.127390.
- [88] DK Gosser, *Cyclic voltammetry: simulation and analysis of reaction mechanisms*. 1993.
- [89] A. J. , F. L. R. , & W. H. S. Bard, *Electrochemical methods: fundamentals and applications*. John Wiley & Sons, 2022.
- [90] N. L. Teradal, A. K. Satpati, and J. Seetharamappa, "A facile one-pot hydrothermal synthesis of tin sulfide-decorated reduced graphene oxide nanoribbons and its sensing application for a flavanone naringenin," *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 797, pp. 89–96, Jul. 2017, doi: 10.1016/j.jelechem.2017.05.022.
- [91] W. Wang, J. Gao, L. Wang, and B. Ye, "Electrochemical behavior of naringenin and its sensitive determination based on a single-walled carbon nanotube modified electrode," *Analytical Methods*, vol. 7, no. 20, pp. 8847–8856, 2015, doi: 10.1039/C5AY01782C.
- [92] I. G. David *et al.*, "Voltammetric analysis of naringenin at a disposable pencil graphite electrode – application to polyphenol content determination in citrus juice," *Analytical Methods*, vol. 10, no. 48, pp. 5763–5772, 2018, doi: 10.1039/C8AY02281J.
- [93] SILVA, Weberson P. et al. Development of a simple and rapid screening method for the detection of 1-(3-chlorophenyl) piperazine in forensic samples. **Talanta**, v. 233, p. 122597, 2021, doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122597