

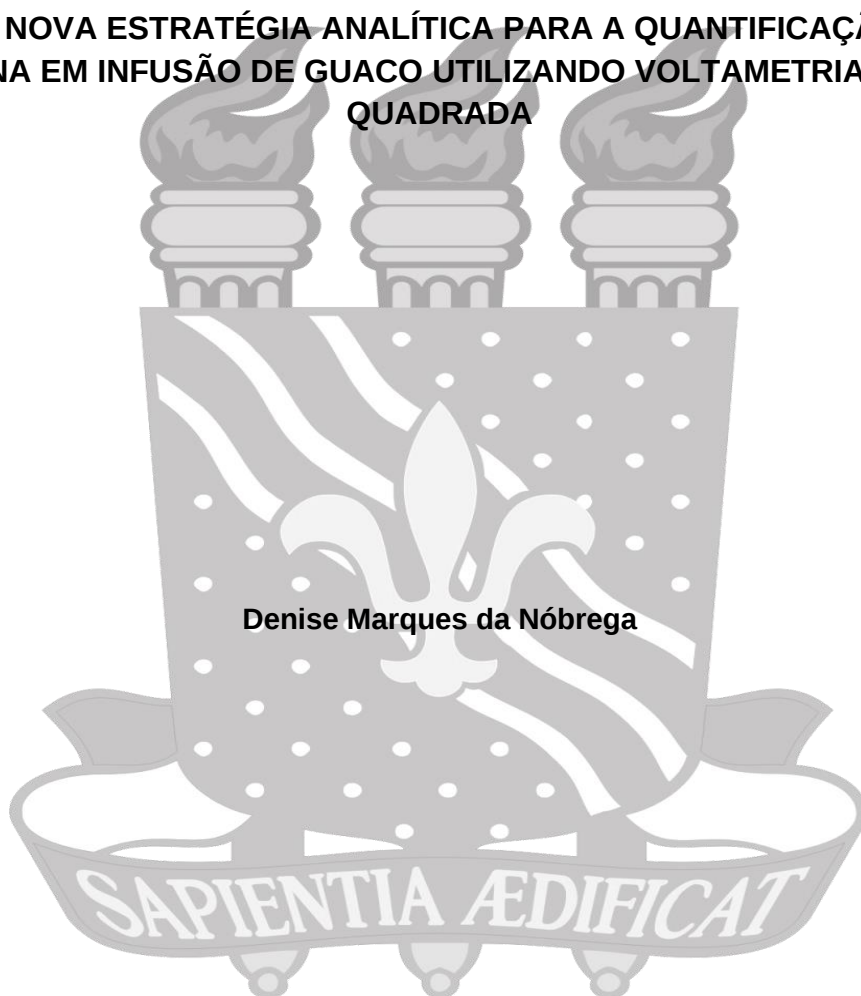


**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**UMA NOVA ESTRATÉGIA ANALÍTICA PARA A QUANTIFICAÇÃO DE
CUMARINA EM INFUSÃO DE GUACO UTILIZANDO VOLTAMETRIA DE ONDA
QUADRADA**

Denise Marques da Nóbrega



**João Pessoa – PB – Brasil
Outubro/2020**



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

UMA NOVA ESTRATÉGIA ANALÍTICA PARA A QUANTIFICAÇÃO DE CUMARINA EM INFUSÃO DE GUACO UTILIZANDO VOLTAMETRIA DE ONDA QUADRADA

Denise Marques da Nóbrega*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, área de concentração Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Mário Cesar Ugulino de Araújo

***Bolsista (CAPES)**

João Pessoa – PB – Brasil
Outubro/2020

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

N754n Nóbrega, Denise Marques da.

Uma nova estratégia analítica para a quantificação de cumarina em infusão de guaco utilizando voltametria de onda quadrada / Denise Marques da Nóbrega. - João Pessoa, 2021.

72 f. : il.

Orientação: Mário Cesar Ugulino de Araújo.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN.

1. Química. 2. Cumarina. 3. Guaco. 4. Mikania Glomerata. 5. Voltametria de onda quadrada. 6. Eletrodo de diamante dopado com boro. I. Araújo, Mário Cesar Ugulino de. II. Título.

UFPB/BC

CDU 54(043)

UMA NOVA ESTRATÉGIA ANALÍTICA PARA A QUANTIFICAÇÃO DE CUMARINA EM INFUSÃO DE GUACO UTILIZANDO VOLTAMETRIA DE ONDA QUADRADA

Dissertação de Mestrado apresentada pela aluna Denise Marques da Nóbrega e aprovada pela banca examinadora em 23 de outubro de 2020.



Prof. Dr. Mário Cesar Ugulino de Araújo
Orientador/Presidente



Prof. Dr. Willame Farias Ribeiro
Examinador



Profa. Dra. Kátia Messias Bichinho
Examinadora

Assinaturas da Banca realizadas em modo Webconferência em 23/10/2020, digitalizadas e certificadas pelo Prof. Dr. Mário César Ugulino de Araújo (SIAPE 334937) em 23/10/2020



Ao meu esposo Robson, meu filho
Abraão e toda minha família por todo
amor, carinho e dedicação.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradecer a Deus por ter me proporcionado essa gratificante caminhada e por ter me dado forças para superar cada desafio que enfrentei até aqui. Gratidão por mais uma conquista meu Deus e por poder compartilhar Contigo a alegria de dever cumprido. Obrigada por cada anjo em forma de amigo que colocastes em meu caminho tornando tudo mais leve.

Aos meus pais, Francisca Telma e Helbo, por acreditar em todo meu potencial, por me ajudar nessa nova fase da minha vida chamada maternidade, além de todo carinho, amor e palavras de encorajamento. Aos meus irmãos Lorena e Giovani e aos meus sobrinhos Gabriel e Ana Clara por todo apoio, amor, carinho e compreensão.

Ao meu esposo, Robson Allisson, pelo incentivo desde o princípio, por tornar dias difíceis em dias mais leves, por ter sido tão paciente e forte quando mais precisei, além de todo apoio, dedicação, carinho e amor.

Ao meu filho, Abraão, pela pureza e amor incondicional, meu grande amor presente divino, que mesmo com alguns meses de vida já me ensinou uma imensidão de coisas.

À minha tia, Diva, pelo acolhimento, pela imensa ajuda e apoio nessa caminhada.

À David, Anabel e Wellington pela imensa contribuição e apoio no desenvolvimento e finalização desse trabalho, além da disponibilidade para ajudar sem medir esforços. Meu muito obrigada!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Mário Ugulino, pela orientação, pelos ensinamentos passados e por todo apoio.

Aos professores da banca examinadora pela disponibilidade e contribuições significativas.

Aos professores suplentes pela disponibilidade.

Aos grandes amigos, Railson e Ana Zélia, por todo apoio.

Aos amigos do LAQA pela ajuda imprescindível em um momento ímpar da minha vida e que tive o prazer de compartilhar e trocar ideias.

A todos os professores que fizeram parte da minha vida acadêmica.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente nessa jornada.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

Meu muito obrigada!

RESUMO

Plantas medicinais e fitoterápicos além de proporcionar efeitos benéficos à saúde, podem desencadear reações adversas. A cumarina, marcador químico do guaco (*Mikania glomerata* Spreng), é uma das principais responsáveis pelas ações farmacológicas da espécie (atividades broncodilatadora, expectorante e anti-inflamatória). Entretanto, existem evidências que relacionam seu uso com reações como vômito, diarreia, hipertensão e uma possível interferência na coagulação sanguínea. Portanto, é de grande relevância sua quantificação e, consequentemente, a realização do controle da qualidade para que possa ser utilizada de forma mais segura e eficaz. A principal técnica analítica para quantificação da cumarina preconizado pela Farmacopeia Brasileira é a cromatografia em fase líquida de alta eficiência que envolve principalmente a utilização de solventes orgânicos com potencial risco à saúde e causam danos ao meio ambiente, além de se tratar de um instrumento de elevado custo e alta demanda de tempo. Dessa forma, nesse trabalho foi desenvolvida uma nova metodologia eletroquímica para determinação da cumarina em infusões de guaco utilizando voltametria de onda quadrada (VOQ) e eletrodo de diamante dopado com boro. A partir das técnicas de voltametria cíclica e VOQ observou-se um sistema irreversível controlado predominantemente por difusão com sinal de oxidação em torno de + 1,77 V em solução tampão Britton-Robinson 0,1 mol L⁻¹, pH 10. Os valores obtidos na otimização dos parâmetros experimentais da VOQ foram: frequência 75 s⁻¹, amplitude de pulso 75 mV e incremento de potencial 5 mV. Para a curva analítica foi obtida uma faixa linear de trabalho entre 1,54 e 15,3 µg mL⁻¹, R² = 0,9971, com limites de detecção e quantificação de 0,20 e 0,62 µg mL⁻¹, respectivamente. A Análise de Variância, a um nível de confiança de 95%, confirmou a significância da regressão e ausência de falta de ajuste. O método proposto foi utilizado na determinação de cumarina em infusões de amostras comerciais de folha de guaco e os resultados obtidos não evidenciaram nenhuma diferença estatisticamente significativa frente ao método de referência. Os valores de recuperação obtidos foram na faixa de 85,85 a 107,62%. Os coeficientes de variação para a repetibilidade variaram entre 0,18 e 1,49%. O método desenvolvido apresentou relação linear entre a corrente de pico e a concentração do analito, além disso obteve resultados exatos e precisos nas condições experimentais e necessitou apenas de um pré-tratamento simples da amostra, descartando o uso de solventes orgânicos e evitando etapas laboriosas.

Palavras-chave: Química. Cumarina. Guaco. *Mikania glomerata*. Voltametria de onda quadrada. Eletrodo de diamante dopado com boro.

ABSTRACT

Medicinal plants and herbal medicines provide health benefits, but they are thought to be likely to cause side effects. The coumarin is adopted as a marker chemical for guaco (*Mikania glomerata* Spreng). It is one of the main responsible for the medicinal properties of the species, such as a bronchodilator, expectorant, and anti-inflammatory. However, there is evidence of an association between its use and side effects including vomiting, diarrhea, hypertension. Besides, blood coagulation factors may be affected by the administration of coumarin. It is therefore extremely important to quantify them, as well as, to ensure its quality control to establish the effectiveness and safety of herbal medicines. The main analytical technique for the determination of coumarin recommended by the Brazilian Pharmacopeia is high performance liquid chromatography which uses mainly organic solvents that are hazardous to human health and environment, and besides, the instrument is expensive and time-consuming. Thus, in this work was developed a new electrochemical methodology for the determination of coumarin in an aqueous infusion of guaco by square wave voltammetry (SWV). Using cyclic and square wave voltammetry were observed an irreversible system controlled by diffusion with the oxidation peak potential recorded around + 1,77 V in Britton-Robinson buffer 0,1 mol L⁻¹, pH 10. The optimized SWV parameters were frequency 75 s⁻¹, pulse amplitude 75 mV, step potential 5 mV. The analytical curve was constructed in a linear range between 1,54 and 15,3 µg mL⁻¹, R² = 0,9971. The limits of detection and quantification were 0,20 e 0,62 µg mL⁻¹, respectively. Analysis of Variance (ANOVA) (with 95% confidence level) confirms the significance of the regression model and conclude that there is no lack of fit. The coumarin was determined in an aqueous infusion of guaco samples by the proposed method; the results were compared to the reference method and they are not statistically significant. Further, the recovery values were around 85,85 to 107,62%. The coefficient of variation was ranged from 0,18 to 1,49% for repeatability. Additionally, the method developed was linear, accurate and precise; it required a simple sample pre-treatment that avoids organic solvents and laborious steps.

Keywords: Chemistry. Coumarin. Guaco. *Mikania glomerata*. Square wave voltammetry. Boron-doped diamond electrode.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química da cumarina (1,2 – benzopirona).....	16
Figura 2 – Folhas de guaco (Fonte: Própria do autor).....	22
Figura 3 – Biossíntese da cumarina (Extraído de: CZELUSNIAK et al., 2012).....	24
Figura 4 – Sinal de excitação com varredura linear (Fonte: Própria do autor).....	29
Figura 5 – Voltamogramas cíclicos esquemáticos para um processo redox de um sistema reversível (A), quase-reversível (B) e irreversível (C) (extraído de SILVA, 2019).....	29
Figura 6 – Variação da corrente faradaica e corrente capacitiva com o tempo, em técnicas de pulso (extraído de: SOUZA, MACHADO e AVACA, 2003).....	30
Figura 7 – (a) sinais de excitação e (b) sinal de resposta para VPD (adaptado de BRETT e BRETT, 1996 ; SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002).....	31
Figura 8 – Sinal de excitação para VOQ (A) Voltamogramas característicos obtidos na VOQ para um sistema reversível (B) e para um sistema irreversível (C) (adaptado BRETT e BRETT, 1996 ; SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002).....	32
Figura 9 – A) Potenciostato Eco Chemie e o módulo polarográfico. B) Célula eletroquímica e os respectivos eletrodos. (Adaptado de: RIBEIRO, 2012).....	39
Figura 10 – Esquema ilustrativo do processo de preparo e armazenamento da infusão de guaco. (Fonte: Própria do autor).....	41
Figura 11 – Voltamogramas de onda quadrada em solução tampão BR 0,1 mol L ⁻¹ (pH 10), registrados na presença de 7,69 µg mL ⁻¹ em eletrodo de CV (—) ($f = 50 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $\Delta E_p = 50 \text{ mV}$ e janela de potencial de -1,5 a +1,5V) e em eletrodo de DDB (—) ($f = 50 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ e $\Delta E_p = 50 \text{ mV}$ e janela de potencial de -2 a +2,5V) e seus respectivos brancos (—) e (—).....	44
Figura 12 – Voltamogramas cíclico em solução tampão BR 0,1 mol L ⁻¹ (pH 10), registrados em eletrodo de DDB: (.....) na ausência e (—) presença de 15,30 µg mL ⁻¹ de cumarina. ($v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, $\Delta E_s = 2,44 \text{ mV}$, janela de potencial de +1,5 a +2,1V).....	45
Figura 13 – Voltamogramas cíclicos de uma solução de 7,69 µg mL ⁻¹ de cumarina em solução BR 0,1 mol L ⁻¹ (pH 10,0) sobre DDB em diferentes velocidades de varredura: (—) 25, (—) 50, (—) 75, (—) 100, (—) 150, (—) 200 mV s ⁻¹ . Inserção: relação linear do I_p com o $v^{1/2}$	46
Figura 14 – Gráfico da relação do log I_p com o log v	47
Figura 15 – Voltamograma de onda quadrada sobre o eletrodo de diamante dopado com boro de uma solução 7,69 µg mL ⁻¹ de cumarina em solução tampão BR 0,1 mol L ⁻¹ pH 10 (—) corrente total, (—) corrente direta, (—) corrente reversa. ($f = 75 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$ e $\Delta E_p = 50 \text{ mV}$).....	47
Figura 16 – Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida na presença de 7,69 µg mL ⁻¹ de cumarina em tampão BR 0,1 mol L ⁻¹ em diferentes pH ((—) 1,8, (—) 3,5, (—) 4,5, (—) 6,0, (—) 7,0, (—) 8,0, (—) 10,0).....	48
Figura 17 – Cumarina em sua forma de (I) lactona e (II) ácido o-cumárico. (Fonte: página do site da Sigma Aldrich).....	49
Figura 18 – Perfis de concentração para diferentes espécies do ácido o-cumárico (Adaptado de: Benvini et al., (2018)).....	50

Figura 19 – Efeito de memória. Resultado extraído dos voltamogramas de onda quadrada consecutivos em tampão BR 0,1 mol L ⁻¹ (pH 10,0) para a cumarina. (a) 3,85 µg mL ⁻¹ (b) 7,69 µg mL ⁻¹ ($f = 75 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$ e $\Delta E_p = 50 \text{ mV}$, em janela de potencial de 1,5 à 2,2 V).....	51
Figura 20 – Influência da frequência sobre a oxidação da cumarina. Voltamogramas de onda quadrada obtidas em 2,31 µg mL ⁻¹ de cumarina em tampão BR 0.1 mol L ⁻¹ (() 15 Hz, () 25 Hz, () 50 Hz, () 75Hz, () 100Hz, () 150Hz).....	52
Figura 21 – Influência da amplitude de pulso sobre a oxidação da cumarina. Voltamogramas de onda quadrada obtidas em 2,31 µg mL ⁻¹ de cumarina em tampão BR 0,1 mol L ⁻¹ (() 10 mV, () 20 mV, () 30 mV, () 50 mV, () 70 mV, () 100 mV.....	52
Figura 22 – Influência do incremento de potencial sobre a oxidação da cumarina. Voltamogramas de onda quadrada obtidas em 2,31 µg mL ⁻¹ de cumarina em tampão BR 0,1 mol L ⁻¹ (() 1 mV, () 2 mV, () 3 mV, () 5 mV, () 7mV, () 10 mV.....	53
Figura 23 – Voltamogramas de onda quadrada com linha de base corrigida para adições crescentes de uma solução de cumarina em solução tampão BR 0,1 mol L ⁻¹ (pH 10,0) sobre EDDB em concentrações de 1,54 a 15,30 µg mL ⁻¹ ($f = 75 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$ e $\Delta E_p = 50 \text{ mV}$, em janela de potencial de 1,55 a 2,05 V). Inserção: curva analítica.....	54
Figura 24 – Gráfico dos resíduos do modelo de regressão linear da curva analítica para a cumarina....	55
Figura 25 – Curvas analíticas utilizadas na determinação dos limites de detecção e quantificação.....	56
Figura 26 – Elipse de confiança conjunta para o método proposto por voltametria de onda quadrada.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros eletroquímicos estudados por VOQ.....	40
Tabela 2 – Parâmetros eletroquímicos otimizados na VOQ.....	53
Tabela 3 – Análise da variância obtida para a curva analítica na faixa de concentração de 1,54 a 15,30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cumarina.....	56
Tabela 4 – Determinação da cumarina em amostras de infusão de folhas de guaco.....	57
Tabela 5 – Resultados para o estudo de recuperação em três níveis de concentração de cumarina em seis amostras de infusão das folhas de guaco.....	58
Tabela 6 – Resultados obtidos para determinação do estudo de precisão.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OMS	Organização Mundial da Saúde
UNICEF	Fundo das Nações Unidas para a Infância
SUS	Sistema Único de Saúde
APS	Atenção Primária à Saúde
CLAE	Cromatografia em fase Líquida de Alta Eficiência
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
PNPMF	Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CG	Cromatografia em fase gasosa
DIC	Detector de ionização de chama
VC	Voltametria Cíclica
VPD	Voltametria de Pulso Diferencial
VOQ	Voltametria de Onda Quadrada
DDB	Diamante Dopado com Boro
HPHT	Alta Pressão Alta Temperatura (do inglês, <i>High-Pressure/High-Temperature</i>)
CVD	Deposição Química a partir da fase Vapor (do inglês, <i>Chemical Vapor Deposition</i>)
ANOVA	Análise de variância
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
DPR	Desvio Padrão Relativo
CV	Coeficiente de Variação
BR	Britton-Robinson
MMQ	Método dos Mínimos Quadrados
AOAC	Association of Official Analytical Chemists

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Caracterização da problemática	15
1.2 Objetivos	18
1.2.1 Objetivo geral	18
1.2.2 Objetivos específicos	18
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
2.1 Plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil: considerações gerais	20
2.2 <i>Mikania glomerata</i> Spreng	22
2.3 Cumarina	23
2.4 Técnicas analíticas aplicadas à análise da cumarina	25
2.5 Técnicas voltamétricas	27
2.5.1 Voltametria cíclica (VC)	28
2.5.2 Técnicas voltamétricas de pulso	30
2.5.2.1 Voltametria de pulso diferencial (VPD)	31
2.5.2.2 Voltametria de onda quadrada (VOQ)	32
2.6 Eletrodo de Diamante Dopado com Boro (DDB)	33
2.7 Validação do método proposto e quantificação da cumarina	34
2.7.1 Linearidade	34
2.7.2 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	35
2.7.3 Exatidão	35
2.7.4 Precisão	36
3 EXPERIMENTAL	38
3.1 Soluções e reagentes	38
3.2 Instrumentação e software	38
3.3 Procedimento experimental	39
3.4 Determinação de cumarina em amostras de infusão de folha de guaco <i>Mikania glomerata</i> Spreng	40
3.5 Validação do método proposto	41
3.5.1 Linearidade	41
3.5.2 Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)	42
3.5.3 Exatidão	42
3.5.4 Precisão	42

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1 Comportamento eletroquímico da cumarina sobre o EDDB e o ECV	44
4.2 Comportamento eletroquímico da cumarina sobre o EDDB.....	45
4.3 Estudo de velocidade	45
4.4 Influência do pH	48
4.5 Efeito de memória	50
4.6 Otimização dos parâmetros de VOQ.....	51
4.7 Curva analítica	54
4.8 Validação do modelo do método proposto	54
5 CONCLUSÃO	63
REFERÊNCIAS	65

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Caracterização da problemática

O uso de plantas medicinais é uma prática que está presente na humanidade desde os primórdios, sendo desde então amplamente utilizada para a cura e tratamento de doenças. A descoberta de suas propriedades curativas faz parte de um saber cultural que foi disseminado ao longo das gerações, nascendo a tão conhecida fitoterapia.

A fitoterapia veio ganhar força como prática tradicional a partir do ano de 1978 na primeira Conferência Internacional sobre Cuidados Primários de Saúde promovida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pelo Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF) que teve como finalidade promover saúde para todos os povos, recomendando aos Estados membros a implementação da medicina tradicional e medicina complementar e alternativa nos seus Sistemas Nacionais de Atenção à Saúde ([BRASIL, 2018; 2012; OSHIRO et al., 2016; MENDES 2004](#)).

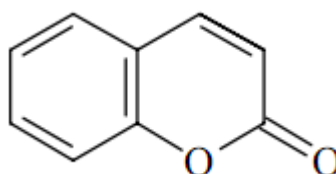
Em concordância com as diretrizes da OMS, a partir da década de 80, as plantas medicinais e fitoterápicos começaram a ganhar importância no Brasil por meio de conferências e elaboração de instrumentos normativos estabelecendo regulamentações para o acesso seguro e uso racional desses fitoterápicos no Sistema Único de Saúde (SUS), principalmente na Atenção Primária à Saúde (APS) ([BRASIL, 2012; 2006](#)).

Segundo [Matsuchita e Matsuchita \(2015\)](#), o Brasil, nesse quesito, é um país privilegiado por possuir uma enorme variedade biológica de plantas com potencial medicinal, além de deter um amplo conhecimento popular e tradicional reflexo de várias etnias que povoaram o país.

Dentre essa diversidade de espécies vegetais, temos a *Mikania glomerata* Spreng, usualmente conhecida como guaco, que vem sendo largamente utilizada pelo SUS na sua forma farmacêutica de xarope e solução oral. Registros medicinais e evidências pré-clínicas têm mostrado seu uso no tratamento de doenças respiratórias, baseado em suas atividades: broncodilatadora, expectorante e anti-inflamatória ([SGUAREZI et al., 2016; BRASIL, 2014](#)).

Diante da limitação da análise de fitoterápicos devido à alta complexidade da matriz da planta foi determinado marcadores químicos que tornam possível sua análise química. Dessa forma, a cumarina (1,2-benzopirona) (**Figura 1**) por ser um dos metabólitos secundários majoritários e uma das principais responsáveis pela ação farmacológica da espécie foi determinada como sendo o marcador químico da *Mikania glomerata* Spreng ([BRASIL, 2014](#)).

Figura 1 – Estrutura química da cumarina (1,2 – benzopirona) (Fonte: [página da Sigma Aldrich¹](#))



Uma série de estudos na literatura relata que a cumarina presente nas folhas de guaco pode causar efeitos benéficos para a saúde. Contudo, reações adversas podem ocorrer caso seja ingerida em excesso, causando: vômito, diarreia, hipertensão e estudos ainda relatam uma correlação entre seu uso e uma possível interferência na coagulação sanguínea ([BERTOLDI, 2016](#); [BRASIL, 2014](#); [NOLLA e SEVERO, 2005](#)). Dessa forma, é de grande importância que metodologias analíticas precisas sejam desenvolvidas para determinar a quantidade dos compostos orgânicos em plantas medicinais, a exemplo da cumarina nas folhas de guaco.

Geralmente, técnicas cromatográficas e espectroscópicas são utilizadas para determinar compostos orgânicos em plantas medicinais ([KAISER, SANTOS e ABREL, 2007](#); [BUENO e BASTOS, 2009](#); [BERTOLDI et al., 2016](#); [GONÇALVES et al., 2017](#)) [SILVA et al., 2008](#)). De acordo com a Farmacopeia Brasileira, a técnica analítica utilizada para quantificação da cumarina em produtos a base de guaco é a cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE) ([BRASIL, 2014; 2005](#)). Apesar de ser uma técnica de alta precisão e exatidão, envolve a utilização de solventes orgânicos com potencial risco à saúde, geração de resíduos no descarte da fase móvel, além de requerer instrumentos sofisticados para detecção dos analitos, alto custo e demanda de tempo.

Poucos trabalhos são encontrados na literatura referentes à utilização de técnicas alternativas, a exemplo das eletroanalíticas para a determinação da cumarina em guaco que é o propósito deste trabalho. Essas técnicas tornam-se promissoras,

¹Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>>. Acesso em: 14 de setembro de 2020

pois quando comparadas aos anteriores, são de rápida execução, utilizam uma instrumentação de baixo custo, e, geralmente, não há a necessidade de pré-tratamento complexo da amostra descartando, em muitos casos, a utilização de solventes orgânicos.

Com relação ao eletrodo de trabalho, atualmente, o eletrodo de diamante dopado com boro (DDB) vem sendo bastante utilizado no desenvolvimento de novos métodos eletroquímicos de análise visto que possui características particulares que são atrativas do ponto de vista eletroquímico, como: ampla janela de potencial, baixa e estável corrente de fundo, estabilidade eletroquímica de resposta em longo prazo entre outras peculiaridades que se destacam frente aos eletrodos convencionais.

Logo, este trabalho tem como proposta desenvolver uma nova estratégia analítica empregando voltametria de onda quadrada e eletrodo de DDB de modo a contribuir com a Química verde e tornar mais viável a determinação da cumarina em infusões aquosas de guaco.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

Desenvolver uma nova estratégia analítica para quantificar cumarina em infusões aquosas de guaco (*Mikania glomerata* Spreng) utilizando voltametria de onda quadrada e eletrodo de diamante dopado com boro.

1.2.2 Objetivos específicos

- Estudar o comportamento eletroquímico da cumarina sob a superfície do eletrodo de diamante dopado com boro;
- Investigar os processos que governam a reação redox da cumarina;
- Otimizar os parâmetros voltamétricos;
- Validar o método proposto;

CAPÍTULO 2

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil: considerações gerais

Planta medicinal, de acordo com a RDC nº 26, de 13 de março de 2014, é definida como sendo uma espécie vegetal utilizada para fins terapêuticos já fitoterápico é aquele obtido empregando-se matérias-primas exclusivamente vegetais, desde que não inclua em sua composição substâncias ativas isoladas, ainda que de origem vegetal, ou até mesmo associações com extratos vegetais ([BRASIL, 2014](#)).

Desde os primórdios, as plantas têm sido utilizadas pelos nossos ancestrais e através de observações e experiências adquiriram conhecimento e começaram a fazer uso de plantas medicinais para fins terapêuticos. Dessa forma, esse conhecimento tradicional adquirido foi sendo disseminado de geração em geração na forma de conhecimento popular ([BRASIL, 2012](#); [LEAL e TELLIS, 2015](#)).

O Brasil é um país com grande potencial para o desenvolvimento de pesquisas com plantas medicinais, segundo a atualização da lista de espécies da [flora do Brasil \(2020\)](#) divulgada pelo Instituto de Pesquisas de Jardim Botânico do Rio de Janeiro existem 49.211 espécies reconhecidas na flora brasileira, sendo 43% exclusivas do território nacional. Além disso, possui um imenso conhecimento tradicional que vem desde os índios e africanos, e sua vasta diversidade biológica nos disponibiliza serviços ecossistêmicos que vai desde os produtos que obtemos da natureza até a sua contribuição sociocultural que são indispensáveis para nossa subsistência e bem-estar ([SCARANO e CEOTTO, 2016](#)).

Apesar do surgimento dos medicamentos alopáticos devido ao avanço e crescimento da ciência e tecnologia ao longo do tempo, as plantas medicinais e fitoterápicos ainda continuam sendo fontes alternativas para fins terapêuticos por cerca de 80% da população mundial ([BRASIL, 2018](#)), principalmente, devido a fatores como: preços elevados dos medicamentos industrializados, baixo poder aquisitivo da população, dificuldades de acesso à assistência médica e a própria tendência de consumo de produtos de origem vegetal ([BADKE et al., 2012](#)).

Nesse contexto, o uso de plantas medicinais e fitoterápicos vem ganhando destaque no Brasil e várias ações foram promovidas desde a década de 80, após a Declaração de Alma-Ata na Conferência Internacional sobre Cuidados Primários de

Saúde realizada pela OMS e pela UNICEF, na qual destaca a promoção à saúde para todos os povos, independentemente das origens sociais e econômicas, incentivando a valorização das terapias tradicionais, inclusive a fitoterapia (OSHIRO *et al.*, 2016; BRASIL, 2018).

Desde então, no Brasil, foram sendo criadas Políticas Públicas, no âmbito da saúde, para incentivar e regulamentar as práticas da medicina tradicional no SUS, com foco na APS. Borges e Sales (2018) definem Políticas Públicas como um sistema de ações planejadas e executadas por parte do governo e seus representantes visando, de modo geral, o bem estar da sociedade. Para elaboração dessas Políticas Públicas da saúde foi criado, através de decreto presidencial, o Grupo de Trabalho Interministerial, coordenado pelo Ministério da Saúde em parceria com órgãos governamentais e não governamentais (BRASIL, 2006).

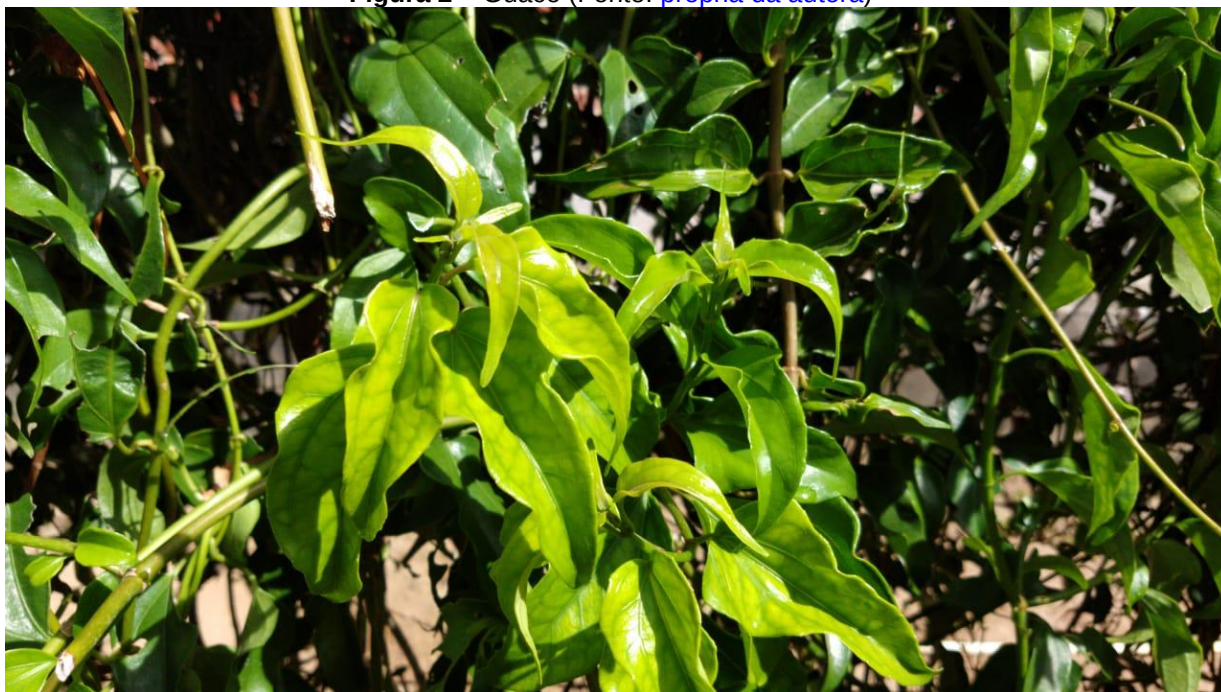
Dentre essas Políticas, está a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) e a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) criadas, respectivamente, por meio da Portaria do Ministério da Saúde nº 971 de 3 de maio de 2006 e do Decreto Presidencial nº 5.813, de 22 junho de 2006, no intuito de incentivar ações para o uso de fitoterápicos no SUS, garantindo que toda a população brasileira tenha acesso as práticas fitoterápicas, visando segurança, eficácia e qualidade, além de promover o uso sustentável da biodiversidade, o fortalecimento da cadeia produtiva de fitoterápicos e desenvolvimento da indústria nacional (MATSUCHITA e MATSUCHITA, 2015; OSHIRO *et al.*, 2016). Dessa forma, algumas resoluções como por exemplo a: RDC nº 26 de 13 de maio de 2014, a RDC nº 67 de 8 de outubro de 2007, a RDC nº 87 de 21 de novembro de 2008 foram publicadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) afim de garantir a segurança sanitária e a eficácia dos medicamentos fitoterápicos, seja no controle da produção, prescrição e distribuição das plantas medicinais e fitoterápicos para promover e proteger a saúde da população (MACEDO, 2016).

A Portaria do Ministério da Saúde nº 2.982, que aprova as normas de execução e de financiamento da Assistência Farmacêutica na Atenção Básica, passa a financiar, desde 2007, alguns fitoterápicos na rede pública, incluindo a *Mikania glomerata* Spreng (guaco), enfatizada nesse estudo, na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (MATSUCHITA e MATSUCHITA, 2015).

2.2 *Mikania glomerata* Spreng

Mikania glomerata, popularmente conhecida como guaco (**Figura 2**), é uma das principais espécies medicinais pertencentes ao gênero *Mikania* que está inserido na família Asteraceae (DOS SANTOS *et al.*, 2019). Essa espécie é nativa do Sul do Brasil, mas, atualmente, devido sua boa capacidade de adaptação é cultivada em quase todo o território brasileiro, sendo uma planta típica do Cerrado e Mata Atlântica (RICARDO e BRANDÃO, 2018).

Figura 2 – Guaco (Fonte: [própria da autora](#))



Em 1929, a *Mikania glomerata* foi reconhecida oficialmente na 1ª edição da Farmacopeia Brasileira e, em 2007, devido suas propriedades terapêuticas, os fitoterápicos a base de guaco, foram inclusos no elenco de referência de medicamentos e insumos complementares para a assistência farmacêutica na atenção básica em saúde. E desde então, após implementação dos programas de incentivo, as práticas fitoterápicas vêm sendo utilizadas em larga escala no SUS (GASPARETTO *et al.*, 2010; CZELUSNIAK *et al.*, 2012; POLONIO *et al.*, 2015).

Evidências pré-clínicas e registros do uso medicinal da planta *Mikania glomerata* têm mostrado que a espécie, devido suas atividades broncodilatadora, expectorante e anti-inflamatória, é muito utilizada no tratamento de doenças

respiratórias (BRASIL, 2014; SGUAREZI, 2016;). Além disso, existem estudos etnofarmacológicos na literatura que evidenciam seu uso para o tratamento de picadas de cobra, gota, reumatismo, gripe, febre e perda do apetite (CORREA, 1984; RICARDO e BRANDÃO, 2018).

Segundo Brasil (2014), suas propriedades terapêuticas são comumente associadas com a presença da cumarina (1,2-benzopirona) que é determinada como sendo o marcador químico da *M. glomerata* Spreng, visto que é um dos metabólitos secundários majoritários e uma das principais responsáveis pela ação farmacológica da espécie.

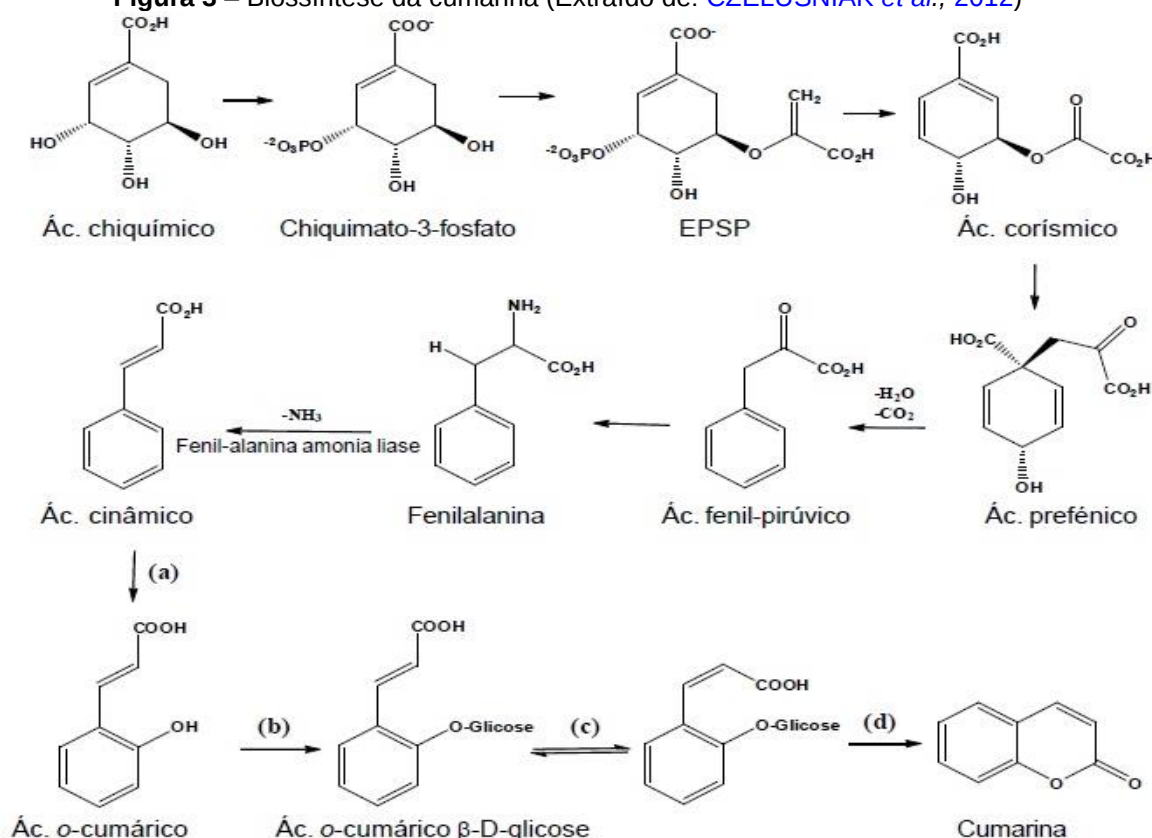
2.3 Cumarina

As cumarinas são compostos que possuem em comum o anel benzênico fundido em uma lactona, sendo a cumarina simples (1,2-benzopirona), estruturalmente, a representante mais simples dentre as lactonas do ácido o-hidroxicinâmico. Aparentemente são cristalinas à temperatura ambiente e incolor, sendo bastante conhecidas pelo seu odor característico similar a baunilha (DOS SANTOS *et al.*, 2019; KUMAR *et al.*, 2015).

Czelusniak *et al.*, (2012) relatam que aproximadamente 1.300 cumarinas já foram isoladas de fontes naturais como vegetais, fungos e bactérias e, geralmente possuem propriedades farmacológicas que são utilizadas em diversas áreas do conhecimento. Na literatura é possível encontrar estudos que descrevem seu potencial farmacoterapêutico devido seu efeito: anti-inflamatório, antimicrobiano, anticoagulante, antitumoral, antifúngico e antioxidante (GASPARETTO *et al.*, 2010; BRASIL, 2014; THAKUR, A., SINGLA, R. e JAIRAK, V, 2015; DELLA PASQUA *et al.*, 2018).

A biossíntese das cumarinas tem origem na via anabólica do ácido chiquímico. Ao se juntar com moléculas de fosfoenolpiruvato são formados aminoácidos aromáticos que ao sofrer redução enzimática dão origem ao ácido cinâmico. A partir do ácido cinâmico é formado o ácido o-cumárico através de uma hidroxilação (a) e, logo em seguida, o ácido o-cumárico sofre glicosilação (b), isomerização (c) e lactonização (d), o que é fundamental para o processo de formação da cumarina (Figura 3) (CZELUSNIAK *et al.*, 2012).

Figura 3 – Biossíntese da cumarina (Extraído de: CZELUSNIAK *et al.*, 2012)



As cumarinas, derivadas da via do ácido chiquímico, fazem parte de um grupo importante de metabólitos secundários denominado de compostos fenólicos. Esses compostos estão amplamente distribuídos nas plantas e sofrem influência em sua concentração dependendo dos fatores ambientais e mudanças sazonais. (DA SILVA, 2013; DOS SANTOS *et al.*, 2019).

Na *Mikania glomerata*, a cumarina é o metabólito secundário majoritário e, portanto, principal responsável pelas ações farmacológicas da espécie, por isso é considerado o marcador químico que é definido segundo a ANVISA como sendo uma:

“substância ou classe de substâncias (ex: alcaloides, flavonoides, ácidos graxos, etc) utilizada como referência no controle da qualidade da matéria-prima vegetal e do fitoterápico, preferencialmente tendo correlação com o efeito terapêutico.”
(BRASIL, 2014, p. 52).

Portanto, marcadores químicos são determinados para análise química das plantas devido à necessidade de garantir a qualidade, eficácia e ausência de toxicidade desde a matéria-prima até o produto final. Com relação ao controle de qualidade de formulações a base de guaco foi estabelecido pela ANVISA, por meio da Instrução Normativa nº 2, de 13 de maio de 2014, dose diária máxima de 5mg de cumarina. Dessa forma, várias metodologias vêm sendo desenvolvidas para avaliação

e controle da qualidade do fitoterápico, assim como do princípio ativo obtido diretamente da matriz vegetal.

2.4 Técnicas analíticas aplicadas à análise da cumarina

Ainda existe uma crença popular quanto ao uso de plantas medicinais e fitoterápicos que, por serem naturais, não há nenhum efeito prejudicial à saúde devido ao seu uso. É válido salientar que a toxicidade de algumas plantas medicinais é um problema sério de saúde pública.

[Czelusniak et al. \(2012\)](#) enfatizam sobre a atual preocupação com o controle e produção de fitoterápicos, uma vez que se o controle não for efetivo poderá ser produzido fitoterápicos de má qualidade devido a fatores como: alteração na composição química, eficácia, pureza e autenticidade da matéria-prima.

É imprescindível a realização do controle de qualidade seguindo todas as normas estabelecidas pela ANVISA para que possam ser utilizadas da forma mais segura e eficaz. Por isso, faz-se necessário a aplicação de metodologias analíticas para análises que vão desde a matéria-prima até o produto acabado ([BRASIL, 2010](#); [BRASIL, 2014](#)).

Conforme preconizado pela Farmacopeia Brasileira, a CLAE é a técnica utilizada para determinação da análise quantitativa da cumarina em guaco ([BRASIL, 2005](#); [2014](#)). Geralmente, algumas desvantagens estão associadas a métodos analíticos que empregam separações cromatográficas, tais como: alto custo, laboriosos, demandam tempo, além de envolver a utilização de solventes com elevado potencial de risco à saúde e geração de resíduos. Diante disso, na literatura é reportado trabalhos que descrevem metodologias que apresentam vantagens seja por: menor consumo de reagentes, ganho de tempo, menor custo, sensibilidade, seletividade. Nesses estudos estão envolvidas técnicas cromatográficas, espectroscópicas e voltamétricas.

[Gonçalves et al., \(2017\)](#) validaram um método utilizando cromatografia em fase reversa com detector de arranjo de diodos (DAD) para análise de cumarina em dez amostras de xarope de guaco com e sem associações. As amostras foram filtradas em papel filtro e os respectivos filtrados passados em filtro seringa com porosidade

de 0,45 μm . A fase móvel, no modo isocrático, foi composta de 50% de água acidificada com 5% de ácido fórmico e 50% de metanol e o tempo de corrida foi equivalente a 7 minutos, obtendo um limite de detecção e quantificação de 0,90 e 2,72 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

Bertoldi *et al.*, (2016) também aplicaram a CLAE-UV para análise de cumarina, porém no extrato das folhas de *Mikania gloremata* Spreng. Esses autores utilizaram uma fase móvel composta de água:acetonitrila (55:45 v/v) e uma coluna com menor dimensões para otimização do tempo de eluição (1 minuto). Esse método desenvolvido obteve limites de detecção 2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e limite de quantificação de 9,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Bueno e Bastos (2009) propuseram um método empregando cromatografia em fase gasosa (CG) para quantificar a cumarina em produtos contendo guaco (xarope, planta e extrato padronizado). Antes da medição foi necessário fazer uma preparação prévia das amostras que envolveu, dependendo do tipo de amostra, etapas de extração, maceração, filtração e centrifugação. E logo em seguida foram analisados em CG equipado com um detector de ionização de chama (DIC), coluna capilar HP-5 utilizando o hidrogênio como gás carreador e uma rampa de aquecimento de 100 a 250° C, a 15° C/min. O limite de detecção para esse estudo foi de 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e o de quantificação 1,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Dessa mesma forma, Kaiser, Santos e Abreu (2007) usaram CG para determinar quantitativamente o teor de cumarina presente em guaco comercializado por diferentes distribuidoras. As amostras passaram por um processo de extração que envolveu uma etapa de otimização da proporção de água:solvente para obter máxima extração. A CG permitiu obtenção de resultados de limites de detecção e quantificação 0,029 e 0,087 mg mL^{-1} , respectivamente.

Silva *et al.*, (2008) desenvolveram uma metodologia empregando a espectroscopia UV. O método consistiu na extração da cumarina em clorofórmio que foi determinado como o solvente de maior capacidade de extração pelo método de Shake-flask. A cumarina foi responsável pelos picos de absorção em 275 nm e em 320 nm. As análises realizadas sem o processo de extração apresentaram interferência dos excipientes do xarope, todavia, as diluições das frações clorofórmicas extraídas do xarope mostraram ser eficientes na redução das concentrações dos interferentes tornando possível a determinação da cumarina no comprimento de onda de 320nm. As médias do teor de cumarina obtidas por essa

técnica foram comparadas com as obtidas com o método de CLAE e os três lotes analisados não apresentaram diferença estatisticamente significativa.

Na literatura, há poucos estudos relacionados à quantificação da cumarina em guaco utilizando técnicas voltamétricas quando comparadas com as técnicas discutidas anteriormente.

Wang e Liu (2009) determinaram a cumarina em óleos essenciais e em fitoterápicos chineses tradicionais utilizando solução tampão BR (pH = 5,83) sob a superfície eletrocátlica do eletrodo de carbono vítreo modificado com mercúrio e chumbo. Os autores obtiveram recuperação entre 97 e 99%. Além disso, os resultados das concentrações das amostras foram comparados com os obtidos por HPLC e obtiveram concordância entre os valores.

Miyano (2014) estudou a determinação da cumarina em amostras de *Mikania glomerata* em eletrodo de DDB por voltametria de onda quadrada obtendo limites de detecção e quantificação de $1,5 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e $4,5 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e os valores de recuperação variaram entre 92 e 104%.

As técnicas voltamétricas tornam-se promissoras, pois apresentam-se como alternativas viáveis de baixo custo comparado com as técnicas cromatográficas e espectroscópicas, demandando pouco tempo na realização das análises, dispensa, na maioria dos casos, o uso de reagentes orgânicos de média a alta toxicidade, além de geralmente possibilitar a eliminação de etapas de pré-purificação ou de separações prévias já que a medida pode ser diretamente realizada na amostra.

2.5 Técnicas voltamétricas

Ao final do século XVIII, Luigi Galvani deu o ponto de partida para os estudos eletroquímicos quando acidentalmente ao dessecar uma rã descobriu e estabeleceu uma associação entre contração muscular e eletricidade estática. A partir disso, invenções e descobertas de alguns cientistas, como por exemplo, Michael Faraday (eletrólise) e Alessandro Volta (pilha voltaica), contribuíram na construção de uma base para as técnicas eletroquímicas e eletroanalíticas (ZANONI *et al.*, 2017).

Desde então, a Eletroquímica e a Eletroanalítica vêm contribuindo com os avanços da Química, tendo uma ampla aplicação em química analítica, seja no controle da qualidade de produtos até análises biomédicas. Além disso, as técnicas

eletroanalíticas vem desempenhando papel importante no desenvolvimento de novos métodos analíticos devido sua alta sensibilidade, seletividade e baixo custo tanto operacional quanto instrumental ([PACHECO et al., 2013](#)).

Tais técnicas baseiam-se na medida da corrente em função de uma diferença de potencial que é aplicada na célula eletroquímica. Essa corrente resultante é de uma reação de oxirredução na qual há transferência de elétrons ocorrendo na interface eletrodo-solução, sendo, portanto, a velocidade da reação governada por processos como: transferência de carga e massa ([SKOOG et al., 2006](#)).

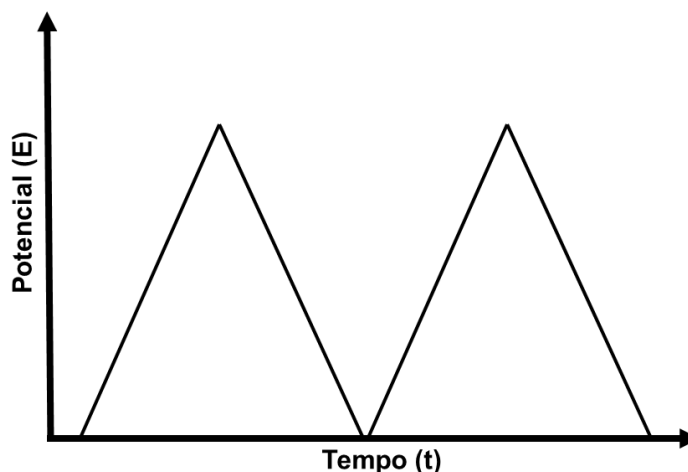
Na voltametria, as células eletroquímicas são comumente compostas por um sistema de três eletrodos: o de trabalho, o de referência e o auxiliar ou contra-eleto. Esses eletrodos são conectados a um amplificador operacional que faz com que ao aplicar uma diferença de potencial entre os eletrodos de trabalho e de referência, a resistência do eletrodo de referência aumente e a do eletrodo auxiliar diminua. Dessa forma, a corrente passará entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo auxiliar evitando variações no eletrodo de referência e mantendo, portanto, seu potencial constante ([SKOOG et al., 2006](#); [PACHECO et al., 2013](#)).

Com relação as técnicas voltamétricas, destacam-se: a voltametria cíclica (VC), a voltametria de pulso diferencial (VPD) e a voltametria de onda quadrada (VOQ).

2.5.1 Voltametria cíclica (VC)

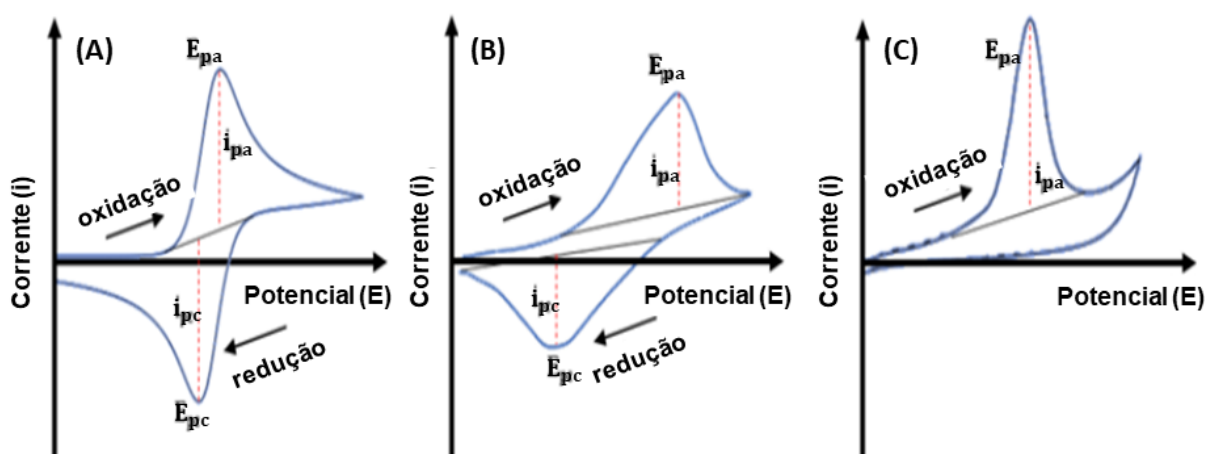
A VC é a técnica mais comumente utilizada para adquirir qualitativamente informações sobre os processos eletroquímicos. Nessa técnica, a varredura de potencial varia continuamente na forma de uma onda triangular entre os eletrodos de trabalho e de referência no sentido direto e inverso em uma velocidade conhecida, podendo ser empregado um ciclo inteiro, um ciclo parcial ou vários ciclos ([BRETT e BRETT, 1996](#); [SKOOG et al., 2006](#)). Assim, na VC, geralmente o potencial aplicado é varrido linearmente com o tempo no eletrodo de trabalho (**Figura 4**).

Figura 4 – Sinal de excitação com varredura linear (Fonte: [própria do autor](#))



Dependendo do tipo de mecanismo redox que o composto a ser estudado apresenta na interface com o eletrodo obtêm-se voltamogramas diferentes no qual caracterizam a reversibilidade dos processos eletroquímicos apresentando picos catódicos e/ou anódicos. Para um processo reversível ou quase-reversível tanto picos catódico e anódico são obtidos, porém para um processo irreversível será observado apenas um pico catódico ou um pico anódico. (BRETT e BRETT, 1996; WANG, 2006). A **Figura 5** ilustra os voltamogramas cíclicos registrados para cada sistema citado anteriormente.

Figura 5 – Voltamogramas cíclicos esquemáticos para um processo redox de um sistema reversível (A), quase-reversível (B) e irreversível (C) (extraído de [SILVA, 2019](#))



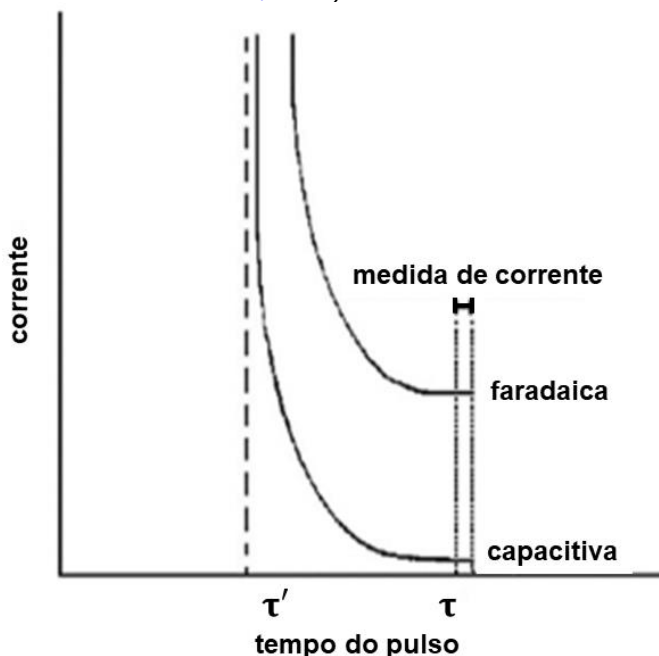
Por meio dessa técnica é possível, além de avaliar a reversibilidade dos processos eletroquímicos, investigar sobre a termodinâmica de processos redox, da

cinética de reações heterogêneas de transferência de elétrons e sobre reações químicas acopladas a processos adsorptivos (WANG, 2006).

2.5.2 Técnicas voltamétricas de pulso

As técnicas de pulso são caracterizadas pela aplicação de degraus de potencial. Após a aplicação dos pulsos de potencial, a taxa de decaimento das correntes faradaica e capacitiva decrescem de modo que a contribuição capacitiva diminui exponencialmente comparado a contribuição faradaica. Dessa forma, o sinal analítico obtido no final da aplicação é resultado da corrente faradaica uma vez que a leitura somente é realizada quando a contribuição da corrente capacitiva é minimizada promovendo, portanto, elevada sensibilidade a técnica (Figura 6) (SOUZA, MACHADO e AVACA, 2003; SKOOG *et al.*, 2006; PACHECO, 2013).

Figura 6 – Variação da corrente faradaica e corrente capacitiva com o tempo, em técnicas de pulso (extraído de: SOUZA, MACHADO e AVACA, 2003)

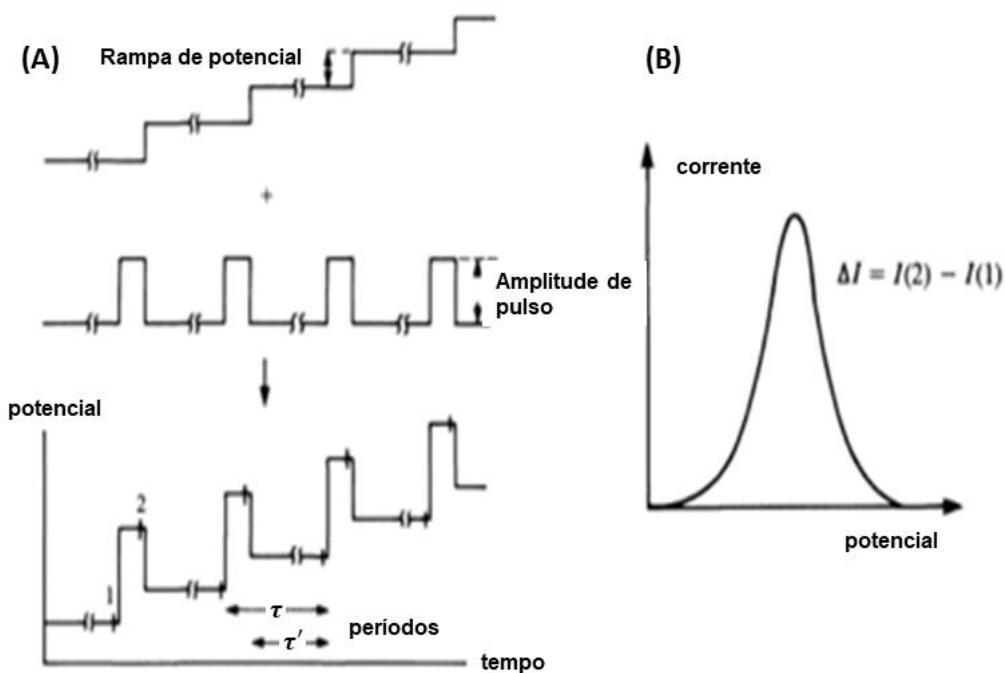


Essas técnicas são amplamente utilizadas para determinação de espécies eletroativas devido a elevada sensibilidade obtida por causa da largura de pulso e do degrau de potencial. Dentre as técnicas pulsadas, destacam-se atualmente: a voltametria de pulso diferencial e voltametria de onda quadrada.

2.5.2.1 Voltametria de pulso diferencial (VPD)

A VPD, segundo [WANG \(2006\)](#), é uma técnica extremamente útil para quantificar em níveis de traços tanto espécies orgânicas quanto inorgânicas. Essa técnica consiste na aplicação de uma série de pulsos, de amplitude constante, no qual é sobreposta a uma rampa linear de potencial em um curto intervalo de tempo (**Figura 7 (A)**). A corrente resultante é decorrência da subtração da primeira corrente medida antes da aplicação do pulso e da segunda corrente ao final do pulso, vale ressaltar que a primeira corrente possui uma contribuição maior da corrente capacitiva e a segunda da corrente faradaica. O voltamograma gerado registra picos de corrente de forma gaussiana onde a área desse pico é diretamente proporcional à concentração da espécie eletroativa (**Figura 7 (B)**) ([BRAUNGARDT, 2015](#); [MENDOZA, 2015](#)).

Figura 7 – (a) sinais de excitação e **(b)** sinal de resposta para VPD (adaptado de [BRETT e BRETT, 1996](#); [SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002](#))



Sabendo que grandes amplitudes originam correntes capacitivas residuais que possivelmente irá diminuir a detecção da corrente faradaica, então é importante ao fazer a escolha da amplitude para o pulso de potencial levar em consideração a reação em estudo, assim como, a sensibilidade exigida. Agora, ao trabalhar com pequenas amplitudes de pulso, é válido ressaltar que o número de elétrons envolvidos e a largura

a meia altura ($W_{1/2}$) do pico de corrente são inversamente proporcionais (BRETT e BRETT, 1996; ZOSKI, C. G., 2006).

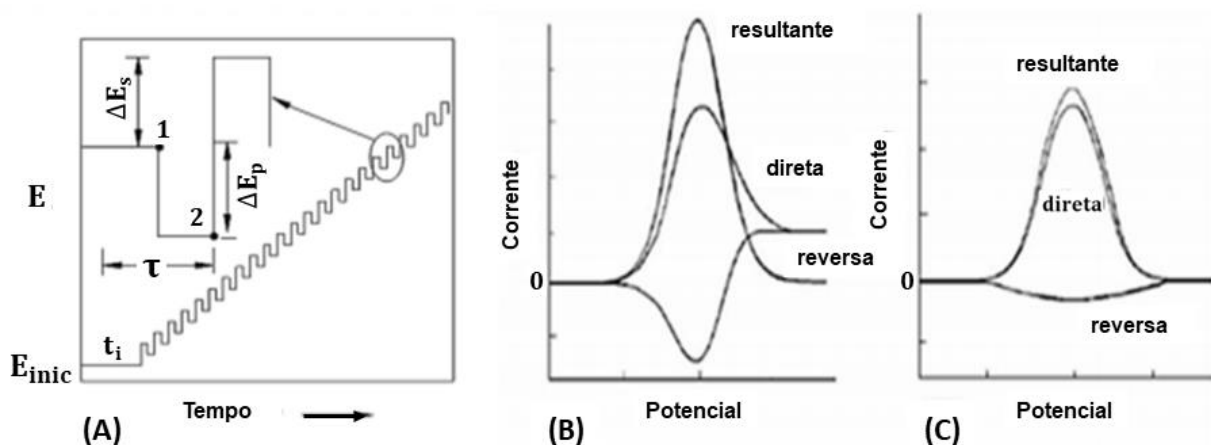
Técnicas de pulso, como VPD, são comumente utilizadas para determinações quantitativas, pois, geralmente, são técnicas mais sensíveis devido a minimização da corrente capacitiva (SIMÕES e XAVIER, 2017).

2.5.2.2 Voltametria de onda quadrada (VOQ)

A VOQ é uma das técnicas de pulso que atualmente é considerada como sendo uma das mais sensíveis e rápidas, tornando possível comparar seus limites de detecção com aqueles obtidos por meio de técnicas cromatográficas e espectroscópicas (SIMÕES e XAVIER, 2017).

Essa técnica de pulso consiste na aplicação de uma variação de potencial na forma de escada, entre o eletrodo de trabalho e o de referência, no qual pulsos de potencial (ΔE_p) com mesma amplitude são sobrepostos a uma escada de potenciais com ciclos de duração $2t_p$ (período) e altura de potencial constante (ΔE_s) (PACHECO, 2013). Ao final do pulso direto e reverso obtidos, respectivamente, no sentido direto e no sentido oposto da varredura obtêm-se a medição da corrente elétrica resultante na qual a diferença entre as correntes direta e reversa corresponde a intensidade do sinal analítico (Figura 8).

Figura 8 – Sinal de excitação para VOQ (A) Voltamogramas característicos obtidos na VOQ para um sistema reversível (B) e para um sistema irreversível (C) (adaptado BRETT e BRETT, 1996; SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002)



Uma das grandes vantagens da VOQ é a velocidade com que os dados são obtidos sem haver a perda da resolução dos picos. Essa rapidez na aquisição de dados é em virtude das frequências de até 100 ciclos de onda quadrada por segundo possibilitando velocidades de varredura de potenciais entre 100 e 1.000 mV s⁻¹ (PACHECO, 2013). Além da redução no tempo de análise, também é característico da técnica elevada sensibilidade que é consequência da sua eficiência em discriminar entre a corrente faradaica e a capacitiva (SIMÕES e XAVIER, 2017).

2.6 Eletrodo de Diamante Dopado com Boro (DDB)

O eletrodo de trabalho em uma célula eletroquímica é um componente imprescindível e extremamente importante visto que inúmeras pesquisas vêm sendo desenvolvidas a fim de elaborar novos eletrodos de trabalho devido a crescente busca pela otimização e funcionalização das superfícies destes eletrodos para que cada vez mais seja possível identificar e quantificar analitos de forma mais rápida e específica (BRAGA *et al.*, 2015).

Atualmente, o eletrodo de DDB vem sendo bastante utilizado no desenvolvimento de novos métodos eletroquímicos de análise, sendo alvo das atenções no que diz respeito às aplicações eletroquímicas e eletroanalíticas. Esse tipo de eletrodo tem se destacado frente aos eletrodos convencionais, como carbono vítreo (CV), ouro e platina, devido suas propriedades atrativas, tais como: sensibilidade, ampla janela de potencial, baixa e estável corrente de fundo, estabilidade eletroquímica de resposta em longo prazo, resistência do eletrodo à desativação ou envenenamento superficial que é de extrema importância, uma vez que, contribui para uma boa resposta redox dos analitos em geral, seja em soluções aquosas ou não-aquosas sem pré-tratamento convencional (PEREIRA *et al.*, 2015; MEDEIROS *et al.*, 2008; JULIÃO, SERRANO e FERREIRA, 2005; PEDROSA, CODOGNOTO e AVACA, 2003).

Apesar do diamante em seu estado puro ter características isolantes, ao ser dopado com algum tipo de material condutor – B, N, O, S – sua condutividade é consideravelmente melhorada. Logo, dependendo do nível de dopagem dos filmes de diamante pode-se obter filmes com comportamento que vai desde um semicondutor para um semimetálico (BRAGA *et al.*, 2015)

Existem dois principais métodos que promovem o crescimento dos filmes de diamante dopado com boro que são: por crescimento a alta-pressão/alta-temperatura (do inglês *High-Pressure/High-Temperature*, HPHT) e por deposição química a partir da fase vapor (em inglês *Chemical Vapor Deposition*, CVD). Esta última técnica abriu uma gama de possibilidades em diferentes áreas da ciência, especialmente na eletroquímica, que desde os anos 90 direciona sua atenção na elaboração desses eletrodos para aplicação na área ([BARROS et al., 2005](#)).

2.7 Validação do método proposto e quantificação da cumarina

A validação de um método analítico é crucial para garantir que o método analítico proposto seja adequado ao que se propõe, reproduzindo valores consistentes frente a um valor de referência ([INMETRO, 2018](#)). Assim, a validação é uma ferramenta necessária para assegurar um sistema de qualidade na química analítica.

Nesse estudo, a validação do método analítico atendeu aos critérios preconizados pela [ANVISA na Resolução nº 166, de 24 de julho de 2017](#), sendo avaliados os seguintes parâmetros: linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), exatidão e precisão.

2.7.1 Linearidade

A linearidade é definida pela relação diretamente proporcional entre a resposta do sinal analítico e a concentração do analito na amostra dentro de um intervalo específico, conforme descrito pela **Equação 1** na qual relaciona essas duas variáveis.

$$y = a + bx$$

Eq. 1

Para que a linearidade seja determinada, é recomendado que no mínimo cinco concentrações diferentes medidas em triplicata, pelo menos, sejam analisadas ([ANVISA, 2017](#)).

É válido ressaltar a importância de verificar se o sistema é homocedástico para que se possa aplicar ações corretivas pertinentes caso seja identificado um comportamento heterocedástico. Além de se fazer uma Análise de Variância (ANOVA) da regressão para que se possa confirmar a significância estatística e verificar se o modelo não apresenta falta de ajuste para assegurar que o modelo linear é adequado (INMETRO, 2018).

2.7.2 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

O LD pode ser definido como sendo a menor concentração do analito presente na amostra que pode ser detectado pela técnica instrumental, mas não necessariamente quantificada. Já o LQ se refere a menor concentração da espécie em interesse presente na amostra que pode ser detectada e quantificada com precisão e exatidão aceitáveis (ANVISA, 2017). Os LD e LQ foram determinados com base nos parâmetros da curva analítica e, portanto, calculados, respectivamente, a partir das **Equações 2 e 3**.

$$LD = \frac{3,3 \times s}{IC} \quad \text{Eq. 2}$$

$$LQ = \frac{10 \times s}{IC} \quad \text{Eq. 3}$$

Em que: **IC** é a inclinação da curva analítica, **s** é o desvio padrão amostral do intercepto do eixo Y de, no mínimo, 3 curvas analíticas construídas contendo concentrações do analito próximas ao suposto limite de detecção/quantificação.

2.7.3 Exatidão

A exatidão é avaliada numericamente por meio da tendência que pode ser avaliado, no caso desse estudo, pela realização de ensaios de recuperação os quais podem ser determinados por meio de amostras fortificadas com concentrações conhecidas do analito. No mínimo, três níveis de concentrações (baixa, média e alta)

que estejam dentro do intervalo linear do método analítico devem ser verificadas (ANVISA, 2017).

O fator de recuperação é calculado conforme **Equação 4**, na qual está relacionado com a quantidade recuperada de determinado analito e a quantidade real presente na amostra.

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad \text{Eq.4}$$

2.7.4 Precisão

A precisão pode ser expressa por meio da repetibilidade, da precisão intermediária ou da reprodutibilidade, sendo neste trabalho avaliado em termos de repetibilidade. Desse modo, a repetibilidade expressa à precisão levando em consideração os seguintes critérios: avaliar as amostras sob as mesmas condições de operação, no mesmo laboratório, com a mesma instrumentação e mesmo analista, em um curto período de tempo (ANVISA, 2017). Este parâmetro é expresso em termos de coeficiente de variação (CV) conforme **Equação 5**.

$$\text{CV} = \frac{\text{DP}}{\text{CMD}} \times 100 \quad \text{Eq. 5}$$

Em que: **DP** é o desvio padrão, **CMD** é a concentração média determinada.

CAPÍTULO 3

EXPERIMENTAL

3 EXPERIMENTAL

3.1 Soluções e reagentes

Os reagentes utilizados nesse trabalho foram de grau analítico e todas as soluções foram preparadas com água purificada obtida em sistema Milli-Q Plus 18 M Ω cm⁻¹.

A solução tampão Britton-Robinson (BR) 0,1 mol L⁻¹ utilizada como eletrólito suporte foi preparada dissolvendo 5,0 g de ácido bórico (H₃BO₃) em 500 mL de água deionizada contendo 2,3 mL de ácido acético e 2,7 mL de ácido fosfórico, e logo em seguida, o volume foi aferido a 1,0 L em um balão volumétrico (MANSANO e SARTORI, 2015) e o pH foi ajustado com uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1,0 mol L⁻¹ em uma faixa de 1,8 a 10.

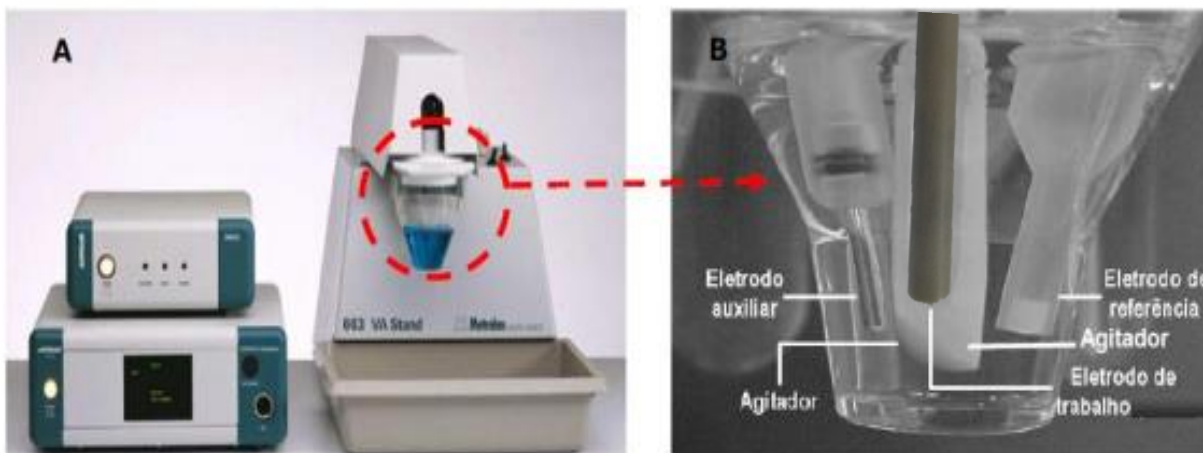
O padrão de alta pureza da cumarina (99%) foi adquirido da Sigma-Aldrich. A solução padrão estoque de cumarina (1,2 – benzopirona) foi preparada numa concentração de 0,01 mol L⁻¹ em água deionizada utilizando banho-ultrassom USC 1400 da Ultrasonic Cleaner numa temperatura de 40°C por 30 minutos.

Na etapa de polarização do eletrodo de DDB foi utilizado uma solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 0,5 mol L⁻¹ (SOUZA, *et al.*, 2019).

3.2 Instrumentação e software

Todos os ensaios voltamétricos foram realizados utilizando o potenciostato Eco Chemie, μ Autolab® Tipo II, marca Metrohm, acoplado a um microcomputador (**Figura 9.A**), controlado pelo software NOVA versão 2.1.3. Os experimentos foram realizados em uma célula eletroquímica equipada com três eletrodos: o eletrodo de referência, Ag/AgCl (KCl, 3,0 mol L⁻¹), o contra-eletrodo, o fio de platina, e o eletrodo de trabalho, o eletrodo de DDB comercial (**Figura 9.B**).

Figura 9 – A) Potenciostato Eco Chemie e o módulo polarográfico. **B)** Célula eletroquímica e os respectivos eletrodos. (Adaptado de: RIBEIRO, 2012)



3.3 Procedimento experimental

Nesse estudo, o procedimento de adequação do eletrodo de DDB descrito por Sousa *et al.*, (2019) foi utilizado com intuito de garantir a reprodutibilidade dos resultados. Assim, no início de cada dia de trabalho, o eletrodo de DDB era submetido a um pré-tratamento eletroquímico que envolvia dois procedimentos em H_2SO_4 0,5 mol L^{-1} : uma polarização anódica cuja função era limpar a superfície do eletrodo aplicando um potencial de +3 V por 120 s e, em seguida, uma polarização catódica na qual foi realizada para ativar a superfície do eletrodo de DDB aplicando um potencial de -3 V por 240 s. Durante a polarização, não houve agitação na célula eletroquímica e antes do voltamograma ser registrado a varredura de potencial era interrompida.

As técnicas utilizadas para realizar os ensaios voltamétricos foram: VPD, VOQ e VC. Inicialmente, foi investigado o comportamento eletroquímico da cumarina sob a superfície do eletrodo de DDB utilizando a VC, em seguida foi verificada a influência do pH sobre a resposta voltamétrica da cumarina utilizando a VPD, numa faixa de 1,8 a 10, empregando a solução tampão BR 0,1 mol L^{-1} como eletrólito suporte e a VOQ foi utilizada para realizar os estudos quantitativos da cumarina sob as condições otimizadas.

Os parâmetros eletroquímicos otimizados para a VOQ, tais como: frequência de pulso, amplitude de pulso e incremento de potencial são apresentados na **Tabela 1**.

Tabela 1 – Parâmetros eletroquímicos estudados por VOQ

PARÂMETROS	FAIXA ESTUDADA
Frequência (Hz)	15 a 150
Amplitude de pulso (mV)	10 a 100
Incremento de potencial (mV)	1 a 10

O conjunto de calibração foi construído para a cumarina, com 9 níveis de concentrações variando de 1,54 a 15,30 $\mu\text{g mL}^{-1}$, realizando adições sucessivas na célula eletroquímica contendo uma solução tampão BR 0,1 mol L⁻¹ (pH 10).

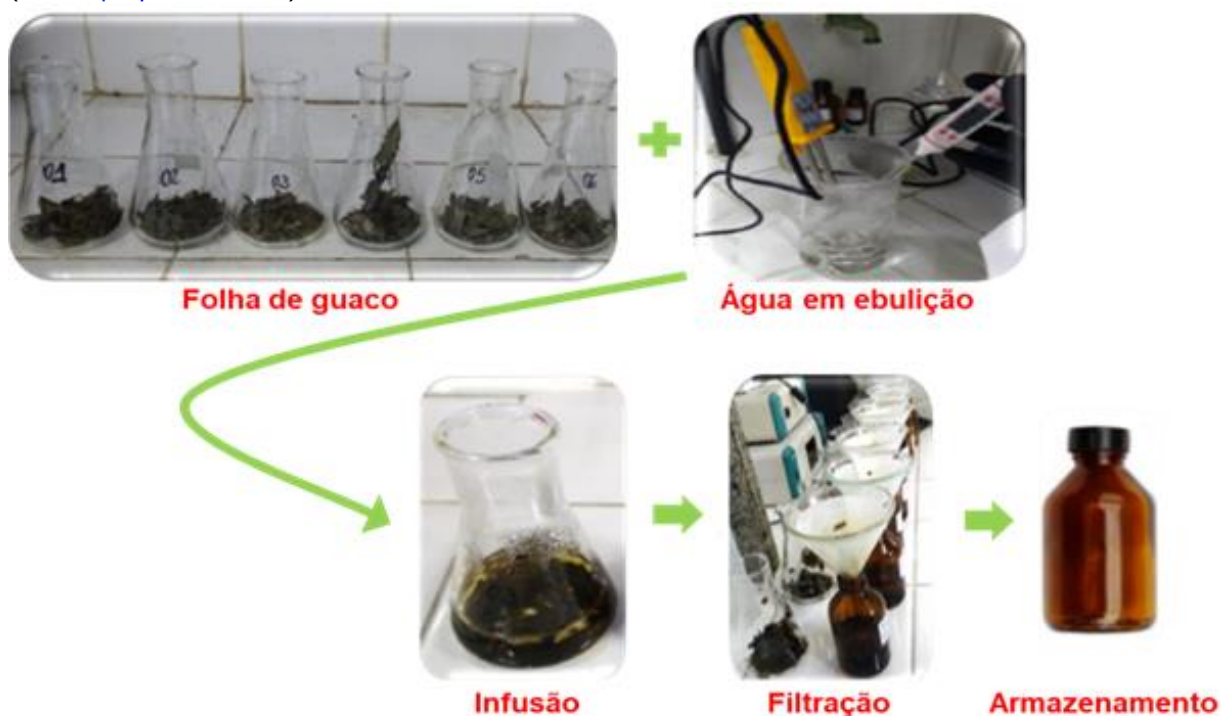
Para realização do método de referência, os parâmetros cromatográficos utilizados foram conduzidos de acordo com estudos encontrados na literatura (BRASIL, 2014, 2005; MEDEIROS e KANIS, 2010).

3.4 Determinação de cumarina em amostras de infusão de folha de guaco *Mikania glomerata* Spreng

Um total de 6 amostras (pacotes) comerciais de marcas e lotes diferentes de folha de guaco com 20 g cada foram adquiridas em estabelecimentos de produtos naturais de João Pessoa e Campina Grande, Paraíba, Brasil.

As infusões foram preparadas a partir de 1 g da folha de guaco em 50 mL de água deionizada a 100 °C para cada amostra. Após o resfriamento, cada infusão foi filtrada com papel de filtro qualitativo e a solução armazenada em frasco âmbar (**Figura 10**). A partir das infusões obtidas da folha de guaco diluições adequadas foram realizadas diretamente na célula eletroquímica contendo 20 mL de eletrólito suporte a fim de obter sinais analíticos dentro da faixa linear da curva analítica.

Figura 10 – Esquema ilustrativo do processo de preparo e armazenamento da infusão de guaco. (Fonte: [própria do autor](#))



Os resultados obtidos pelo método proposto foram comparados com os do método de referência, por meio do teste t pareado ao nível de confiança de 95%, com a finalidade de avaliar se as médias obtidas em ambos possuem estatisticamente alguma diferença.

3.5 Validação do método proposto

A validação do método proposto foi realizada de acordo com a resolução da [ANVISA nº 166, 24 de julho de 2017](#). Os parâmetros avaliados nesse estudo foram: linearidade, limite de detecção e quantificação, precisão e exatidão.

3.5.1 Linearidade

Para a avaliação da linearidade foi preparado nove níveis de concentrações (1,54 a 15,30 $\mu\text{g mL}^{-1}$), em triplicatas independentes, conforme descrito na **seção 3.3**.

A curva analítica foi obtida por regressão linear simples por meio do Método dos Mínimos Quadrados (MMQ) e seu tratamento estatístico foi por ANOVA.

3.5.2 Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Os limites de detecção e quantificação foram obtidos por meio da construção de três curvas analíticas com nove níveis de concentrações variando entre 1,54 a 15,30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e calculadas de acordo com as **Equações 2 e 3** apresentadas na **seção 2.7.2**.

3.5.3 Exatidão

A exatidão foi avaliada em termos de recuperação através da análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas do analito. Este parâmetro foi verificado a partir de 3 réplicas em cada nível de concentração: baixa, média e alta, variando de 6,92 a 9,98 $\mu\text{g mL}^{-1}$, totalizando 9 determinações que contemplam o intervalo linear do método analítico. O fator de recuperação foi calculado em percentual, conforme **Equação 4** apresentada na **seção 2.7.3**.

3.5.4 Precisão

A precisão foi avaliada em termos de repetibilidade. As repetições foram independentes com nove determinações contemplando concentrações baixa, média e alta da faixa linear de trabalho, variando de 1,54 a 7,69 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A precisão foi calculada em termos de CV, por meio da **Equação 5** mostrada na **seção 2.7.4**.

CAPÍTULO 4

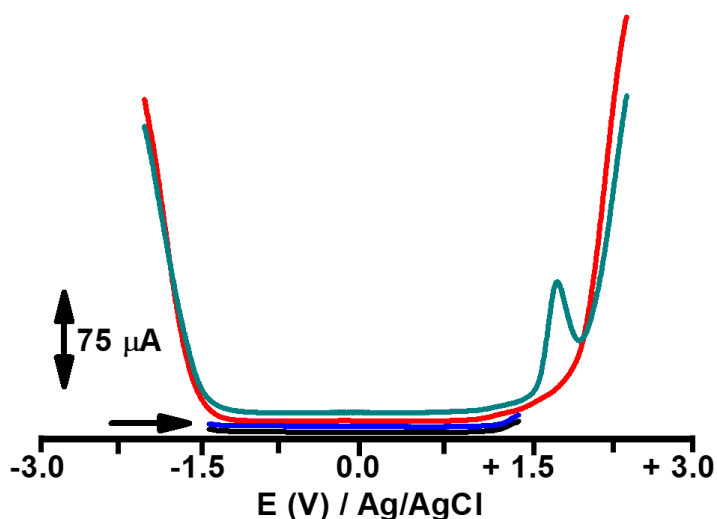
RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Comportamento eletroquímico da cumarina sobre o EDDB e o ECV

Nos estudos iniciais o EDDB e o eletrodo de carbono vítreo (ECV) comercial foram testados para identificação de algum processo eletroquímico referente a cumarina, como visto na **Figura 11**.

Figura 11 – Voltamogramas de onda quadrada em solução tampão BR 0,1 mol L⁻¹ (pH 10), registrados na presença de 7,69 µg mL⁻¹ em eletrodo de CV (—) ($f = 50 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $\Delta E_p = 50 \text{ mV}$ e janela de potencial de -1,5 a +1,5V) e em eletrodo de DDB (—) ($f = 50 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ e $\Delta E_p = 50 \text{ mV}$ e janela de potencial de -2 a +2,5V) e seus respectivos brancos (—) e (—)



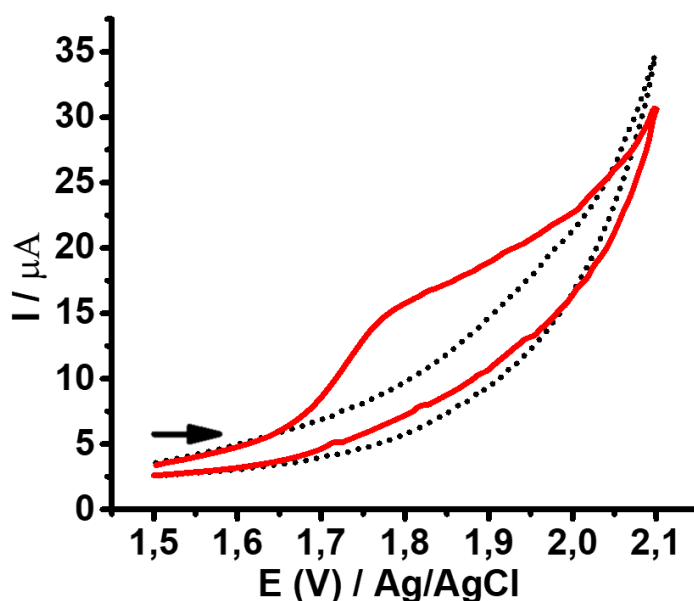
Observa-se que nenhum processo de oxidação e/ou redução da cumarina foi identificado sob a superfície do ECV. Em contrapartida, no trabalho de [Wu e Dewald \(2000\)](#) as cumarinas estudadas (6,7-hidroxycumarina, 6,7-dihidroxi-4-metilcumarina, 7-hidroxycumarina, 7-hidroxi-4-metilcumarina, 7-hidroxi-4-(trifluormetil)cumarina, 4-hidroxycumarina) apresentaram sinais de oxidação no ECV em potenciais entre 0,3 e 1,1V (vs. Ag/AgCl) em eletrólito suporte tampão fosfato.

Na **Figura 11**, o voltamograma de onda quadrada registrado sob a superfície eletrocatalítica do EDDB apresentou sinal analítico em regiões de potenciais positivos, em torno de +1,77V.

4.2 Comportamento eletroquímico da cumarina sobre o EDDB

Na **Figura 12** é apresentado o voltamograma cíclico registrado na ausência (.....) e na presença de $15,30 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cumarina (—) sob a superfície do eletrodo de DDB em uma solução tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 10, o meio utilizado para realização desse estudo foi escolhido com base na literatura (MIYANO *et. al.*, 2014).

Figura 12 – Voltamogramas cíclicos em solução tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 10), registrados em eletrodo de DDB: (.....) na ausência e (—) presença de $15,30 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cumarina. ($v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, $\Delta E_s = 2,44 \text{ mV}$, janela de potencial de +1,5 a +2,1 V)

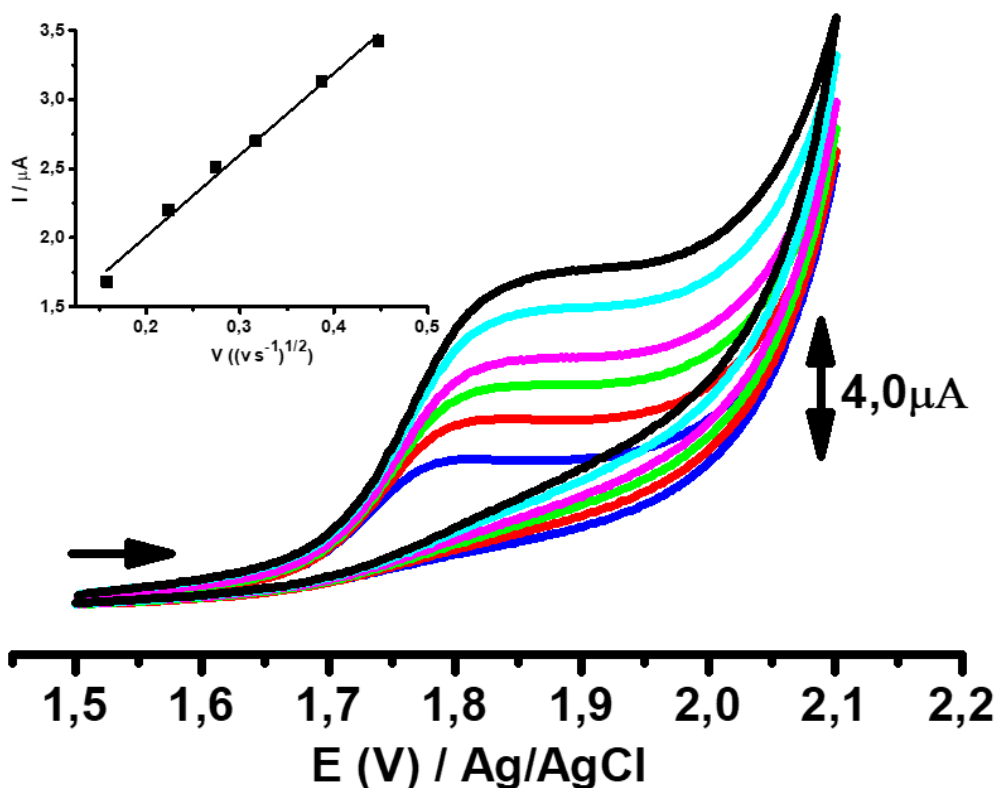


A eletroatividade da cumarina pode ser vista claramente com um sinal de resposta em torno de +1,77 V, em uma janela de potencial de +1,5 a +2,1 V.

4.3 Estudo de velocidade

A fim de avaliar a natureza do transporte do material eletroativo para a superfície do eletrodo de DDB foi investigado o efeito da velocidade de varredura sobre o potencial e a corrente de pico, numa faixa entre 25 e 200 mV s^{-1} por VC (**Figura 13**).

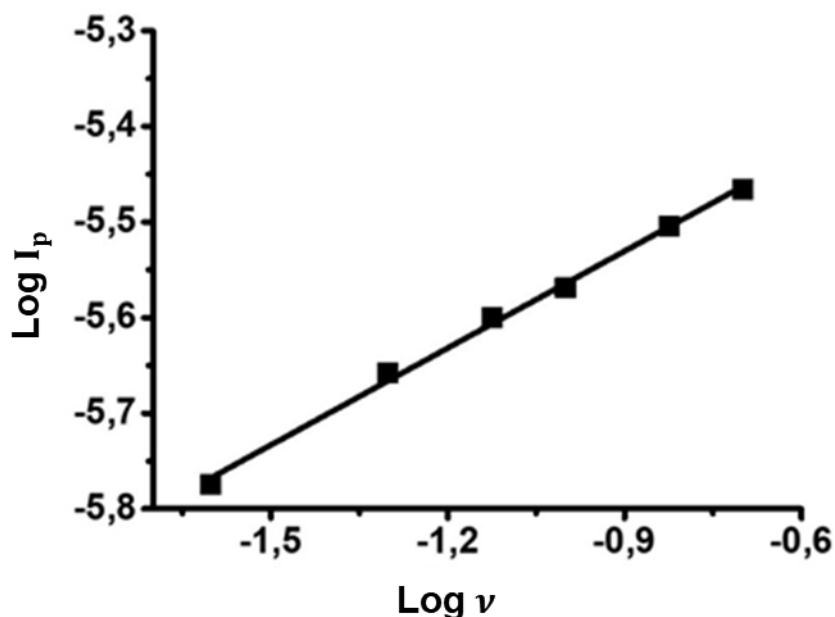
Figura 13 – Voltamogramas cíclicos de uma solução de $7,69 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cumarina em solução BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 10,0) sob a superfície do eletrodo de DDB em diferentes velocidades de varredura: (—) 25, (—) 50, (—) 75, (—) 100, (—) 150, (—) 200 mV s^{-1} . Inserção: relação linear do I_p com o $\nu^{1/2}$



Os resultados obtidos nesse estudo mostram que o processo de oxidação da cumarina sob a superfície do eletrodo de DDB é predominantemente controlado por difusão, já que existe uma relação linear da corrente de pico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura.

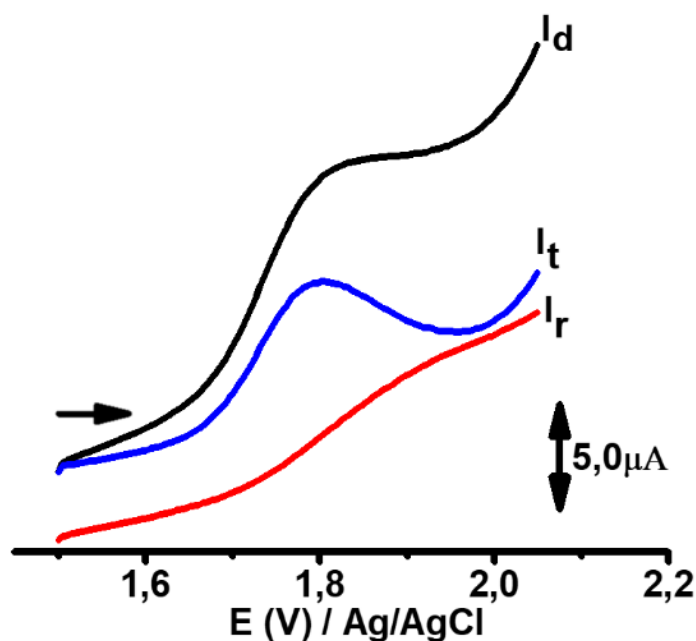
A natureza do transporte de massa também pode ser investigada através do coeficiente angular obtido da relação entre o $\log I_p$ vs $\log \nu$, em que valores iguais a 1,0 e 0,5 correspondem a processos adsorptivos e difusionais, respectivamente (GOSSER Jr., 1993). O gráfico $\log I_p$ vs $\log \nu$, apresentado na **Figura 14**, mostra através da equação da reta ($y = 0,34x - 5,23$, $R^2 = 0,997$) o valor do coeficiente angular igual a 0,34, confirmando ser um processo controlado predominantemente por difusão, o que corrobora com os estudos conduzidos por Wang e Liu (2009) e Miyano *et. al.* (2014).

Figura 14 – Gráfico da relação do $\log I_p$ com o $\log \nu$



Paralelo ao estudo sobre natureza do transporte do material eletroativo para a superfície do eletrodo de DDB, observou-se a partir dos voltamogramas cíclicos que a cumarina apresenta reação de oxidação irreversível, pois não apresenta sinal de resposta na faixa em potenciais catódicos. A fim de esclarecer a reversibilidade da reação redox da cumarina, voltamogramas de onda quadrada foram registrados e as componentes direta e reversa foram decompostas, como apresentado na **Figura 15**.

Figura 15 – Voltamograma de onda quadrada sobre o eletrodo de diamante dopado com boro de uma solução $7,69 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cumarina em solução tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 10 (—) corrente total, (—) corrente direta, (—) corrente reversa. ($f = 75 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$ e $\Delta E_p = 50 \text{ mV}$)

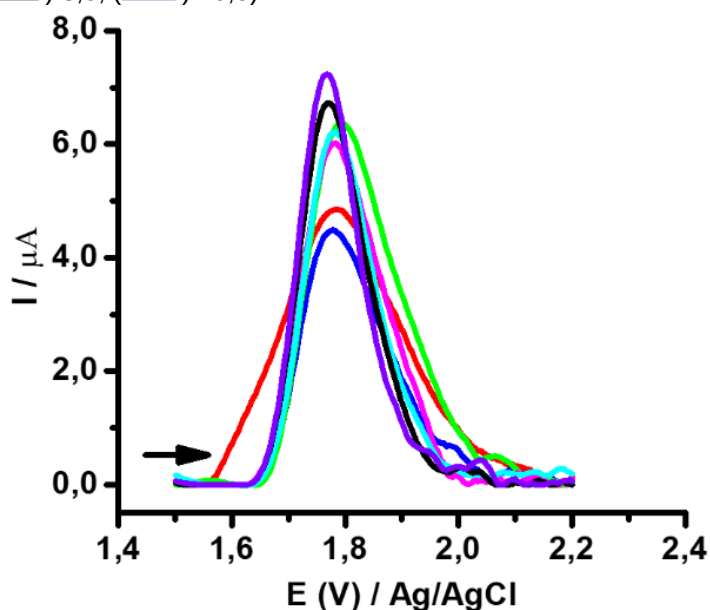


A partir deste estudo, observou-se que não há uma contribuição da corrente reversa na corrente total, ou seja, não há nenhum pico referente ao processo de redução da cumarina indicando, portanto, um processo de irreversibilidade.

4.4 Influência do pH

A influência do pH sobre a oxidação eletrocatalítica da cumarina no eletrodo de DDB foi investigada com a finalidade de observar a dependência da intensidade de corrente e do potencial de pico com a variação de pH numa faixa de 1,8 a 10 em solução tampão BR 0,1 mol L⁻¹ como mostra a **Figura 16**.

Figura 16 – Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida na presença de 7,69 µg mL⁻¹ de cumarina em tampão BR 0,1 mol L⁻¹ em diferentes pH ((—) 1,8, (—) 3,5, (—) 4,5, (—) 6,0, (—) 7,0, (—) 8,0, (—) 10,0)



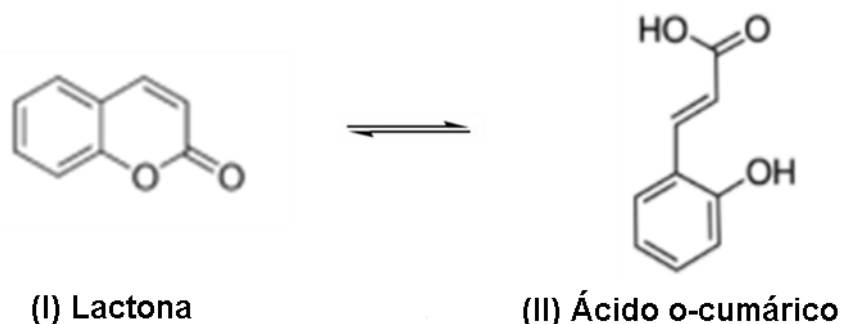
Observa-se que mesmo com a variação de pH, não há deslocamento significativo do potencial, ou seja, o potencial de pico se mantém praticamente constante dentro da faixa de pH estudada. Em paralelo, observou-se uma maior sensibilidade analítica na faixa alcalina em pH=10, sendo este escolhido para os estudos quantitativos.

Nessa faixa de pH, a partir da equação $W_{1/2} = 90/n$, obteve-se experimentalmente o valor de $W_{1/2}$ igual a 72 mV, indicando que o mecanismo de reação da cumarina envolve a transferência de apenas 1 elétron. O valor de $W_{1/2}$

obtido nesse estudo está de acordo com o previsto na literatura, no qual valores de 90 e 45 mV correspondem a processos governados pela transferência de 1 e 2 elétrons na reação eletroquímica, respectivamente (BRETT e BRETT, 1996).

Para valores de $6,8 \leq \text{pH} \leq 11,2$, a cumarina encontra-se tanto em sua forma de lactona quanto de ácido cumárico, como mostra a **Figura 17**. (HARLE e LYONS, 1950).

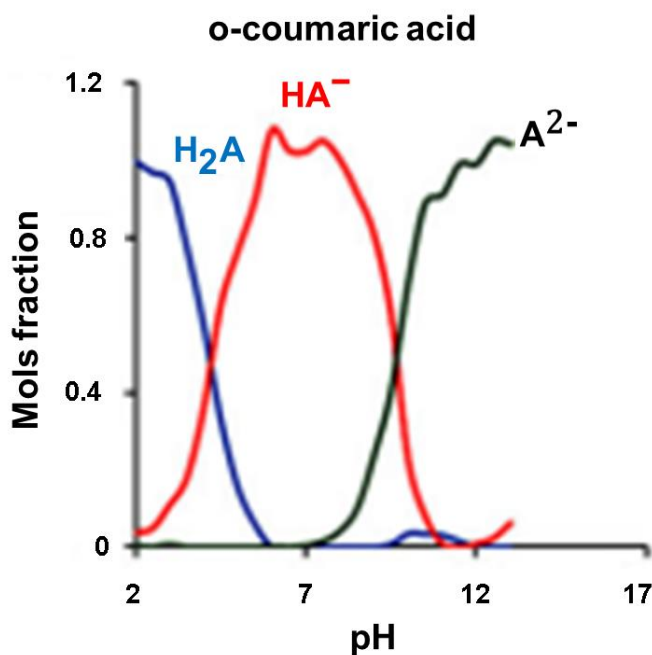
Figura 17 – Cumarina em sua forma de (I) lactona e (II) ácido o-cumárico. (Fonte: [página do site da Sigma Aldrich¹](#))



No pH de estudo no qual obteve-se maior sensibilidade analítica ($\text{pH} = 10$), pode-se inferir que existe a presença de ambas as formas da cumarina. Todavia, nesse pH, de acordo com o princípio de Le Chatelier, há o deslocamento do equilíbrio para a formação do ácido cumárico que pode ser oxidado eletroliticamente devido ao grupo hidroxila ligado ao anel aromático. Segundo Benvini *et al.*, (2018), o ácido cumárico é um ácido diprótico com duas constantes de dissociação, $\text{pK}_{a1} = 4,11$ e $\text{pK}_{a2} = 9,60$, apresentados na **Figura 18**.

¹Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>>. Acesso em: 14 de setembro de 2020

Figura 18 – Perfis de concentração para diferentes espécies do ácido o-cumárico (Adaptado de: Benvini *et al.*, (2018))

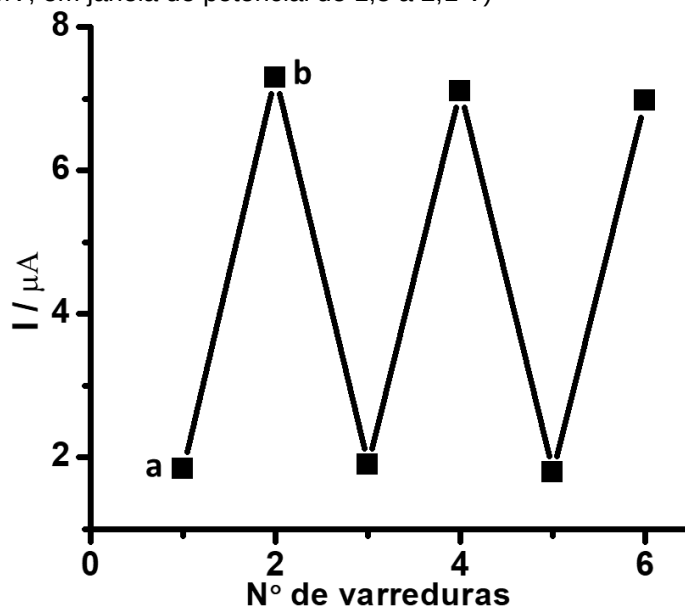


Observa-se que em pK_{a1} temos a desprotonação do grupo carboxila e em pK_{a2} a desprotonação da hidroxila. Stadins e Hasanli (1993) afirmam que a ruptura da ligação OH facilita consideravelmente a eletroxidação de fenóis. Logo, no pH em estudo pode-se concluir que o pico de oxidação encontrado é justificado pela formação da espécie A^{2-} .

4.5 Efeito de memória

Para avaliar a magnitude do efeito de memória do sensor, foram realizadas, alternadamente, varreduras consecutivas de duas concentrações diferentes de cumarina de $3,85 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $7,69 \mu\text{g mL}^{-1}$, como mostra a **Figura 19**.

Figura 19 – Efeito de memória. Resultado extraído dos voltamogramas de onda quadrada consecutivos em tampão BR 0,1 mol L⁻¹ (pH 10,0) para a cumarina. (a) 3,85 µg mL⁻¹ (b) 7,69 µg mL⁻¹ ($f = 75 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$ e $\Delta E_p = 50 \text{ mV}$, em janela de potencial de 1,5 a 2,1 V)



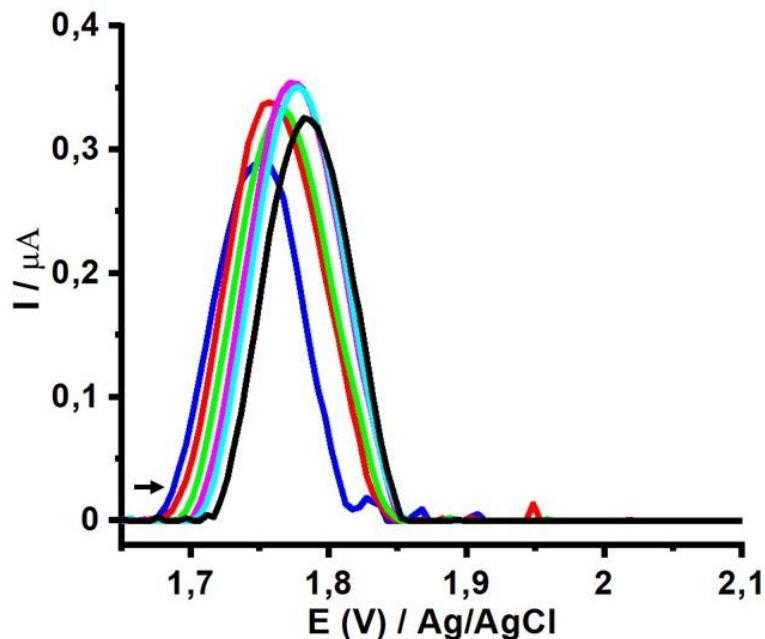
É válido ressaltar que antes de utilizar essas soluções para registro dos voltamogramas, a superfície do eletrodo era lavada com água. É possível observar que há a regeneração da atividade do sensor, uma vez que o mesmo não apresenta qualquer efeito de memória. Desta forma, pode-se dispensar uma etapa de limpeza eletroquímica, química ou até o polimento da superfície do eletrodo, pois apenas uma lavagem simples com água é necessária entre uma medida e outra. O que é um ponto extremamente relevante para o método desenvolvido, pois quando se insere uma etapa de limpeza da superfície do eletrodo no procedimento experimental, o tempo de análise aumenta e a repetibilidade das medidas pode ser comprometida.

4.6 Otimização dos parâmetros de VOQ

Os parâmetros experimentais da VOQ foram otimizados, nesse estudo, buscando condições ótimas para determinação da cumarina sob a superfície do eletrodo de DDB, uma vez que esses parâmetros eletroquímicos influenciam diretamente na sensibilidade (intensidade) e seletividade (largura do meio pico) da técnica em estudo.

Os voltamogramas referentes a variação da frequência de aplicação de pulso de potencial foram obtidos para uma concentração de 2,31 µg mL⁻¹ de cumarina em uma faixa de 15 e 150 Hz, como pode ser visto na **Figura 20**.

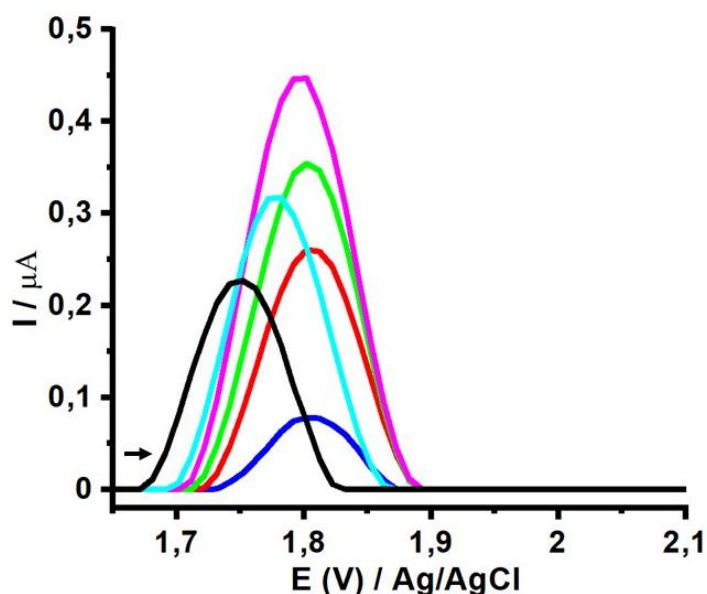
Figura 20 – Influência da frequência sobre a oxidação da cumarina. Voltamogramas de onda quadrada obtidas em $2,31 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cumarina em tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ((—) 15 Hz, (—) 25 Hz, (—) 50 Hz, (—) 75Hz, (—) 100Hz, (—) 150Hz)



Observa-se que houve um ganho na resposta voltamétrica da cumarina, numa frequência de 75 Hz, sendo esta escolhida para os estudos posteriores.

Com relação a amplitude de pulso foi estudada em uma faixa de 10 a 100 mV e para a realização deste experimento utilizou-se uma concentração de $2,31 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cumarina, como mostra a **Figura 21**.

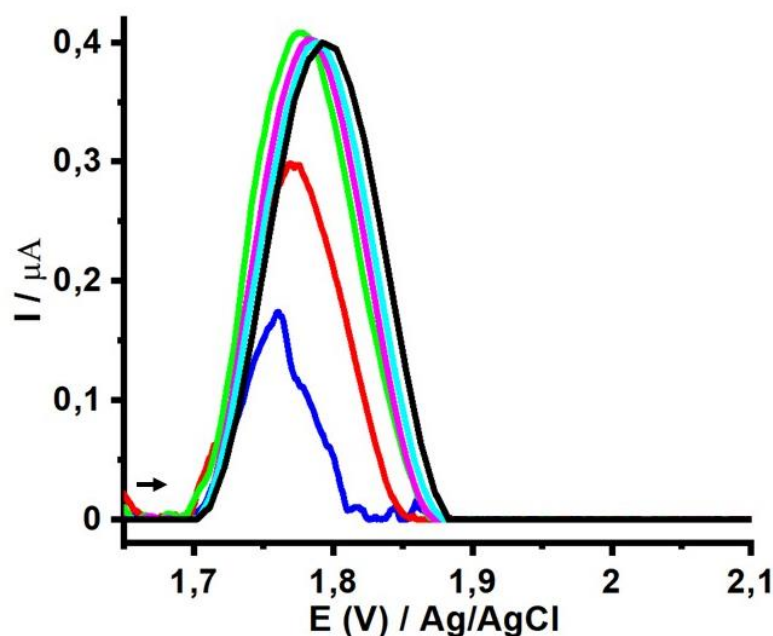
Figura 21 – Influência da amplitude de pulso sobre a oxidação da cumarina. Voltamogramas de onda quadrada obtidas em $2,31 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cumarina em tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (—) 10 mV, (—) 20 mV, (—) 30 mV, (—) 50 mV, (—) 70 mV, (—) 100 mV



A resposta voltamétrica da cumarina que apresentou maior sensibilidade para a amplitude de pulso foi de 50 mV, sendo esta escolhida para os estudos subsequentes.

Além da influência da amplitude de pulso e da frequência de aplicação de pulso de potencial foi investigado também o incremento de varredura em uma faixa de 1 a 10 mV para uma concentração de $2,31 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cumarina, como mostra a **Figura 22**.

Figura 22 – Influência do incremento de potencial sobre a oxidação da cumarina. Voltamogramas de onda quadrada obtidas em $2,31 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cumarina em tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ((—) 1 mV, (—) 2 mV, (—) 3 mV, (—) 5 mV, (—) 7mV, (—) 10 mV



O valor de incremento de potencial escolhido foi de 5 mV, pois obteve maior intensidade de corrente.

Na **Tabela 2** são apresentados de forma resumida os valores de otimização dos parâmetros experimentais da VOQ:

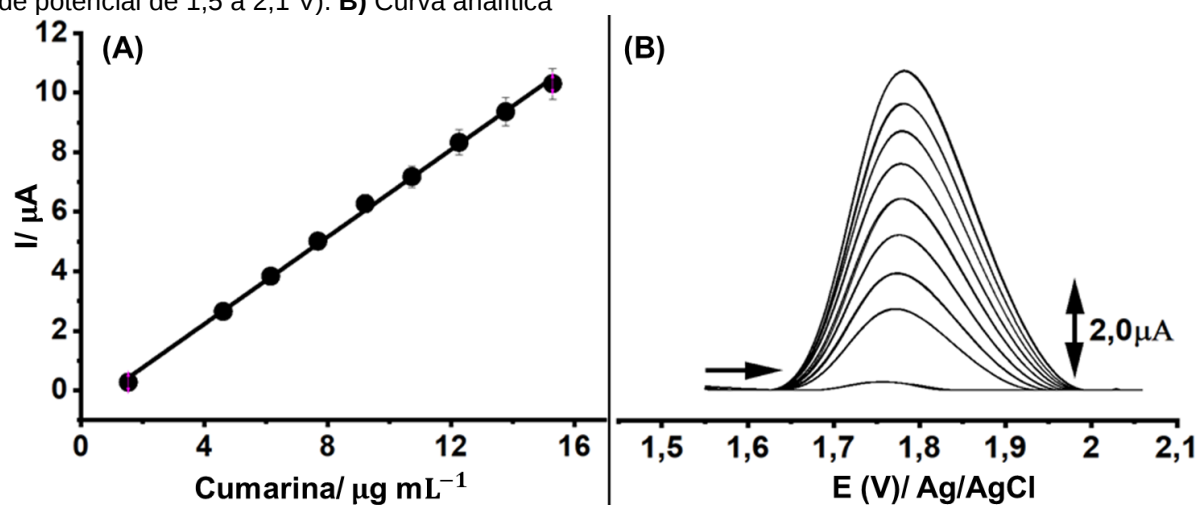
Tabela 2 – Parâmetros eletroquímicos otimizados na VOQ

PARÂMETROS	VALORES OTIMIZADOS
Frequência (Hz)	75
Amplitude de pulso (mV)	50
Incremento de potencial (mV)	5

4.7 Curva analítica

A **Figura 23** mostra a curva analítica, obtida por regressão linear pelo MMQ, construída a partir de concentrações crescentes de uma solução de cumarina com suas respectivas respostas voltamétricas por meio da técnica de VOQ nas condições experimentais otimizadas em eletrólito suporte BR (pH=10).

Figura 23 – A) Voltamogramas de onda quadrada com linha de base corrigida para adições crescentes de uma solução de cumarina em solução tampão BR 0,1 mol L⁻¹ (pH 10,0) sob a superfície do eletrodo de DDB em concentrações de 1,54 a 15,30 µg mL⁻¹ ($f = 75 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$ e $\Delta E_p = 50 \text{ mV}$, em janela de potencial de 1,5 à 2,1 V). **B)** Curva analítica



*(n = 3)

A corrente de pico e a concentração obtiveram uma relação linear para uma faixa de 1,54 a 15,30 µg mL⁻¹ ($R^2 = 0,9971$ para $n = 9$, e $i/\mu\text{A} = 0,73 \pm (0,001) - 0,702 \pm (0,01)$)

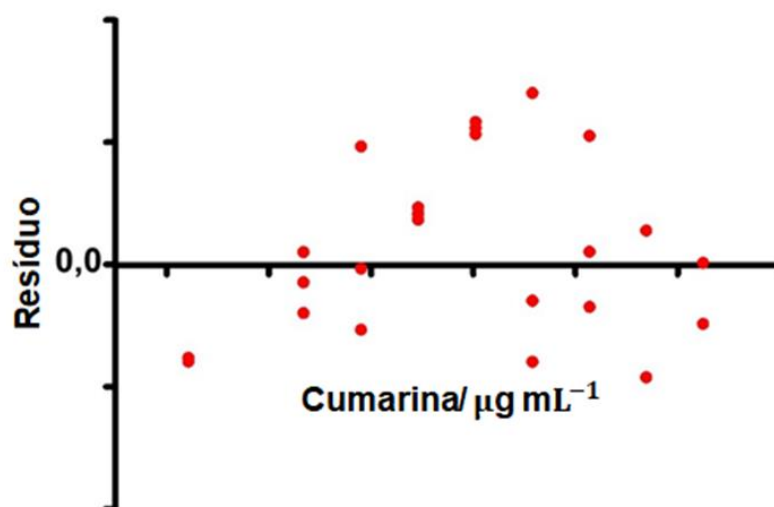
4.8 Validação do modelo do método proposto

Nesse estudo, a homocedasticidade dos dados foi comprovada através do teste de Cochran no qual mostra resultados com valores abaixo do tabelado, $C_{\text{cal}} (0,371) < C_{\text{crít}} (0,478)$, assim, ao nível de 5% de significância, não se rejeitou a hipótese de igualdade das variâncias podendo inferir que em qualquer nível de concentração o sinal analítico apresenta variâncias dos resíduos homogêneas. Diante disso, justifica-se a utilização do MMQ para calcular a equação de regressão linear visto que se trata

de um sistema homocedástico, não sendo necessário um fator de ponderação (INMETRO, 2018). Vale ressaltar que a homocedasticidade geralmente é um requisito necessário para a ANOVA.

Além disso, a **Figura 24** apresenta o gráfico dos resíduos do modelo de calibração no qual foi construído com a finalidade de identificar se existe algum padrão nos resíduos.

Figura 24 – Gráfico dos resíduos do modelo de regressão linear da curva analítica para a cumarina



Pode-se verificar que visivelmente não há tendência no gráfico de resíduos, sendo observado um comportamento aleatório mostrando que o modelo proposto é adequado. Embora não seja exibido uma eventual falta de ajuste devido a distribuição dos resíduos, é importante submeter os dados ao teste F para então concluir que o modelo não apresenta falta de ajuste, assim como, avaliar a significância estatística da regressão.

Os resultados da ANOVA, apresentados da **Tabela 3**, foram empregados para a validação do modelo do método proposto.

Tabela 3 – Análise de variância obtida para a curva analítica na faixa de concentrações de 1,54 a 15,30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cumarina

Fonte de variação	Soma Quadrática (SQ)	Graus de Liberdade	Média quadrática (MQ)
Regressão	$2,59 \times 10^{-10}$	1	$2,59 \times 10^{-10}$
Resíduo	$7,53 \times 10^{-13}$	25	$3,01 \times 10^{-14}$
Falta de ajuste	$3,76 \times 10^{-13}$	7	$5,37 \times 10^{-14}$
Erro puro	$3,78 \times 10^{-13}$	18	$2,10 \times 10^{-14}$
Total	$2,60 \times 10^{-10}$	26	
$MQ_{\text{Reg}}/MQ_{\text{res}}$	$8,58 \times 10^3$	$F_{\text{crit}} = 4,24$	
$MQ_{\text{FAj}}/MQ_{\text{EP}}$	2,56	$F_{\text{crit}} = 2,58$	

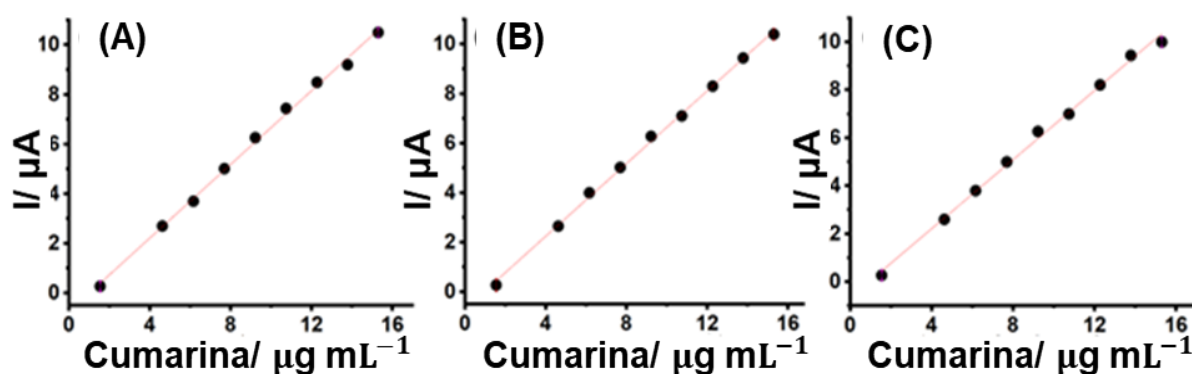
MQ_{Reg} : média quadrática da regressão; MQ_{res} : média quadrática do resíduo; MQ_{FAj} : média quadrática da falta de ajuste; MQ_{EP} : média quadrática do erro puro.

As médias quadráticas apresentadas nessa tabela foram submetidas aos testes de falta de ajuste e significância da regressão, dessa forma, foi atestado que há significância na regressão do modelo ($F_{\text{cal}} (8,58 \times 10^3) > F_{\text{crit}} (4,24)$), assim como, é possível confirmar que a um nível de confiança de 95% não há falta de ajuste $F_{\text{cal}} (2,56) < F_{\text{crit}} (2,58)$.

Após investigar sobre o comportamento linear do modelo e constatar a homocedastidade dos dados, comprovar a significância da regressão e evidenciar que não há falta de ajuste, o sistema estudado foi avaliado com base nas seguintes figuras de mérito: LD, LQ, exatidão e precisão.

A partir da construção de três curvas analíticas, como pode ser visto na **Figura 25**, foram calculados os LD e LQ que foram estimados pelas **Equações 1 e 2**.

Figura 25 – Curvas analíticas utilizadas na determinação dos limites de detecção e quantificação



(A) $i/\mu\text{A} = 0,742 \pm (0,0014) - 0,751 \pm (0,14) R^2 = 0,9976$

(B) $i/\mu\text{A} = 0,734 \pm (0,0011) - 0,688 \pm (0,11) R^2 = 0,9985$

(C) $i/\mu\text{A} = 0,721 \pm (0,0016) - 0,668 \pm (0,16) R^2 = 0,9964$

Dessa forma, para o cálculo dessas equações foram empregados o desvio padrão ($4,37 \times 10^{-8}$) obtidos através dos coeficientes lineares mostrados na **Figura 25** em suas respectivas equações de regressão e R^2 , e o coeficiente angular da curva analítica apresentada na **Figura 23**. Assim, os LD e LQ foram estimados em $0,20 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $0,62 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Valores de $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $9,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ para LD e LQ, respectivamente, foram encontrados por Bertoldi *et al.* (2016) ao quantificarem cumarina em amostras de extrato de guaco por HPLC-UV. Valores inferiores referentes aos LD e LQ foram alcançados no método desenvolvido nesta pesquisa.

A exatidão foi avaliada por meio da comparação das médias do método proposto e do método de referência e pelo teste de recuperação em seis amostras de infusão das folhas de guaco.

O método de referência (CLAE) preconizado pela Farmacopeia Brasileira foi utilizado para validar o método proposto. Logo, o teste t pareado foi aplicado, ao nível de 95% de confiança, para comparar as médias das concentrações de cumarina em infusões de seis amostras comerciais de folha de guaco de ambos os métodos, apresentados na **Tabela 4**.

Tabela 4 – Determinação da cumarina em amostras de infusão de folhas de guaco

Amostras	Cumarina ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
	Método proposto	Método de referência
	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP
01	24,72 $\pm$ 0,04	25,56 $\pm$ 0,6
02	39,10 $\pm$ 0,2	41,65 $\pm$ 1,04
03	8,57 $\pm$ 0,01	7,23 $\pm$ 0,06
04	10,23 $\pm$ 0,01	12,45 $\pm$ 0,1
05	25,30 $\pm$ 0,05	27,63 $\pm$ 0,2
06	24,61 $\pm$ 0,09	25,62 $\pm$ 0,01

É possível concluir que os valores obtidos nos métodos não possuem nenhuma diferença estatisticamente significativa, uma vez que o valor de t_{cal} (2,12) é menor do

que o valor de t_{crit} (2,23), evidenciando a exatidão do método. Um outro método para doseamento da cumarina foi desenvolvido por [Silva et al., \(2008\)](#), onde a cumarina é determinada no xarope de guaco com clorofórmio utilizando espectroscopia UV. Similarmente a esta pesquisa, as médias do teor de cumarina obtidas pela técnica espectrofotométrica foram comparadas com aquelas obtidas pela técnica cromatográfica e os 3 lotes quantificados não obtiveram diferença estatisticamente significativa.

Com relação ao teste de recuperação, foram realizadas fortificações em três níveis de concentrações diferentes: baixa (6,92 $\mu\text{g mL}^{-1}$), média (8,45 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e alta (9,98 $\mu\text{g mL}^{-1}$), conforme apresentado na **Tabela 5**.

Tabela 5 – Resultados para o estudo de recuperação em três níveis de concentração de cumarina em seis amostras de infusão das folhas de guaco

Amostras	Cumarina ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			Média das recuperações (%) $\pm$ DP	CV* (%)
	Concentração teórica	Concentração experimental $\pm$ DP	CV* (%)		
Amostra 01	6,92	7,37 $\pm$ 0,04	0,53	107,62 $\pm$	0,99
	8,45	9,17 $\pm$ 0,03	0,36		
	9,98	10,77 $\pm$ 0,05	0,50		
Amostra 02	6,92	5,93 $\pm$ 0,01	0,22	86,40 $\pm$	0,82
	8,45	7,34 $\pm$ 0,001	0,02		
	9,98	8,67 $\pm$ 0,01	0,13		
Amostra 03	6,92	7,49 $\pm$ 0,01	0,11	107,42 $\pm$	0,73
	8,45	9,08 $\pm$ 0,01	0,16		
	9,98	10,65 $\pm$ 0,02	0,17		
Amostra 04	6,92	7,45 $\pm$ 0,02	0,21	106,99 $\pm$	0,76
	8,45	9,07 $\pm$ 0,02	0,18		
	9,98	10,59 $\pm$ 0,01	0,13		
Amostra 05	6,92	5,99 $\pm$ 0,01	0,18	85,85 $\pm$	1,45
	8,45	7,33 $\pm$ 0,02	0,26		
	9,98	8,43 $\pm$ 0,01	0,13		
Amostra 06	6,92	6,78 $\pm$ 0,02	0,34	97,42 $\pm$	0,43
	8,45	8,21 $\pm$ 0,03	0,39		
	9,98	9,70 $\pm$ 0,02	0,20		

*CV = coeficiente de variação (n=3)

A [ANVISA](#) em sua resolução nº 166, 24 de julho de 2017, estabelece que para determinação quantitativa do analito em matérias-primas ou em formas farmacêuticas os limites percentuais do teor do analito devem estar dentro de uma faixa de 80 a 120% da concentração teórica do teste ([BRASIL, 2003](#)). As recuperações obtidas nesse estudo foram em uma faixa de 85,85 a 107,62%. Dessa forma, nessa faixa de concentração estudada as recuperações obtidas são aceitáveis, pois estão de acordo com os limites sugeridos pela [ANVISA](#).

A precisão também foi investigada a partir de três níveis de concentrações diferentes: baixa ($1,54 \mu\text{g mL}^{-1}$), média ($4,62 \mu\text{g mL}^{-1}$) e alta ($7,69 \mu\text{g mL}^{-1}$) e expressa nesse estudo por meio da repetibilidade. Os resultados foram calculados em termos de coeficiente de variação sendo obtido valores entre 0,18 e 1,49 como mostrado na **Tabela 6**.

Tabela 6 – Resultados obtidos para determinação do estudo de precisão

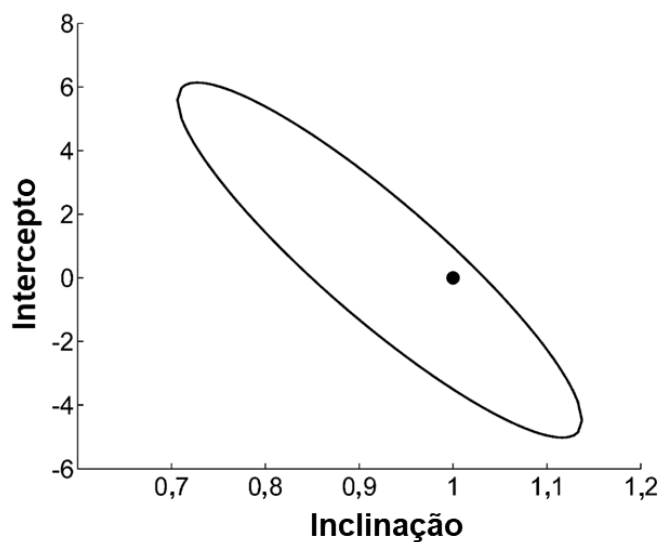
	Cumarina ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
Concentração teórica	1,54	4,62	7,69
Concentração predita 01	1,39	4,86	8,16
Concentração predita 02	1,39	4,78	8,17
Concentração predita 03	1,38	4,71	8,14
Média	1,39	4,78	8,16
Desvio padrão	0,0049	0,071	0,014
CV*(%)	0,36	1,49	0,18
Média CV (%)		0,68	

*CV = coeficiente de variação (n = 3)

Os valores obtidos nesse estudo de precisão estão em concordância com o estabelecido pela [Association of Official Analytical Chemists \(AOAC\) \(2016\)](#), no qual sugere que a um nível de concentração de 10 mg L^{-1} o coeficiente de variação obtido sob condições de repetibilidade seja menor ou igual a 7,3.

Por fim, a **Figura 26** apresenta o gráfico da elipse de confiança conjunta para o método proposto por VOQ.

Figura 26 – Elipse de confiança conjunta para o método proposto por voltametria de onda quadrada



É possível notar que a elipse gerada contém o ponto ideal teórico e dessa forma podemos concluir que o método desenvolvido para determinar a concentração de cumarina nas infusões de seis amostras comerciais de folha de guaco, (*Mikania glomerata*) estão de acordo com os valores obtidos pelo método de referência.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÃO

5 CONCLUSÃO

O estudo realizado neste trabalho evidencia a viabilidade do desenvolvimento de uma nova metodologia para a quantificação da cumarina em infusão de guaco utilizando a VOQ e EDDB.

A cumarina apresentou um único pico de oxidação em torno de + 1,77 V, com características de um processo irreversível com transferência de 1 elétron, sendo o processo de oxidação da cumarina predominantemente controlado por difusão das espécies. Os melhores resultados analíticos sobre o EDDB em tampão BR foram obtidos em pH 10, com frequência de 75 s⁻¹, amplitude de pulso de 50 mV e incremento de potencial 5 mV.

O método proposto mostrou uma relação linear em uma faixa de concentração de 1,54 a 15,30 µg mL⁻¹ ($R^2 = 0,9971$), com LD e LQ de 0,20 µg mL⁻¹ e 0,62 µg mL⁻¹, respectivamente. As médias das concentrações de cumarina nas amostras de guaco pelo método proposto não apresentaram diferença estatisticamente significativa daqueles obtidos pelo método de referência, assim como, foram obtidos excelentes valores de recuperação variando de 85,85 a 107,62%, evidenciando ser um método exato. Além disso, o método desenvolvido mostrou ser preciso ao obter coeficientes de variação (0,36-1,49%) dentro do estabelecido pela AOAC.

Além disso trata-se de uma técnica que utiliza uma instrumentação de baixo custo, rápida execução, não havendo a necessidade de um pré-tratamento complexo da amostra, descartando a utilização de solventes orgânicos e garantindo a simplicidade e rapidez no desenvolvimento da metodologia analítica.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **O que devemos saber sobre medicamentos**. Brasília, DF: ANVISA. Ministério da Saúde, 2010.

BADKE, M. R.; BUDÓ, M. D. L. D.; ALVIM, N. A. T.; ZANETTI, G. D., & HEISLER, E. V.. Saberes e práticas populares de cuidado em saúde com o uso de plantas medicinais. **Texto & Contexto-Enfermagem**, v. 21, n. 2, p. 363-370, Abr/Jun, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-07072012000200014>

BARROS NETO, B. de; SCARMÍNIO, I. S.; BRUNS, R. E.. **Como fazer experimentos**: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 4ª Ed. Porto Alegre: Bookman, 2010, 414 p.

BARROS, R. C. M.; RIBEIRO, M. C.; NA-SUMODJO, P. T.; JULIÃO, M. S. S.; SERRANO, S. H. P.. Filmes de diamante CVD dopado com boro. Parte 1. Histórico, produção e caracterização. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 317-325, 2005.

BARROS, R. C. M.; RIBEIRO, M. C.; NA-SUMODJO, P. T.; JULIÃO, M. S. S.; SERRANO, S. H. P.; FERREIRA, N. G.. Filmes de diamante CVD dopado com boro. Parte I . histórico, produção e caracterização. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 317-325, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000200024>

BENVINI, A.; DADRAS, A.; ABBASI, S.; TEZERJANI, M. D.; REZAEINASAB, M.; TABARAKI, R.; NAMAZIAN, M.. Experimental and computational study of the pK_a of coumaric acid derivatives. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 66, n. 6, p. 589-593, 2019. DOI: [10.1002/jccs.201800265](https://doi.org/10.1002/jccs.201800265)

BERTOLDI, F. C.; DESCHAMPS, F. C.; SILVA JUNIOR, A. A.; CORREA, A. F.; FRANCO, M. F.; EBERLIN, M. N.. Validação de um método analítico rápido por CLAE-UV para determinação de cumarina em guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) confirmado com espectrometria de massas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 1, supl. 1, p. 316-325, 2016. DOI: http://doi.org/10.1590/1983-084X/15_160

BORGES, F. V.; SALES, M. D. C.. Políticas públicas de plantas medicinais e fitoterápicos no brasil: sua história no sistema de saúde. **Pensar Acadêmico**, v. 16, n. 1, Jan-Jun, p. 13-27, 2018.

BRAGA, N. A.; FERREIRA, L. M. M.; BALDAN, M. R.; FERREIRA, N. G.. Diamante dopado com boro obtido pela técnica HFCVD para detecção eletroanalítica de metais.

Revista Brasileira de Aplicações de Vácuo, v. 34, n. 3, p. 98-108, 2015. DOI: [10.17563/rbav.v34i3.1000](https://doi.org/10.17563/rbav.v34i3.1000)

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Primeiro suplemento do formulário de fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira**. 1ª Ed. Brasília: ANVISA, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada, Nº 166 de 24 de Julho de 2017 que Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providência. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n. 141, p. 87, 25 Julho 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada, Nº 26 de 13 de Maio de 2014 que Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. **Diário Oficial da União**: seção: 1, Brasília, DF, p. 52, 14 Maio 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Monografia da espécie *Mikania glomerata* (GUACO)**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica**. Brasília: Ministério da Saúde, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciências, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC 313 de 25 de outubro de 2005. Aprova o fascículo 6 da parte II da 4ª edição da Farmacopéia Brasileira. 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde: Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução – RE, Nº 899 de 29 de Maio de 2003. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n. 104, 2 de junho de 2003.

BRAUNGARDT, C. B.. Evaluation of analytical instrumentation. Part XXVI: Instrumentation for voltammetry. **Analytical Methods**, v. 7, n. 4, p. 1249-1260, 2015. DOI: [10.1039/c4ay90088j](https://doi.org/10.1039/c4ay90088j)

BRETT, A. M. O.; BRETT, C. M. A. **Eletroquímica princípios, métodos e aplicações**. Coimbra: Livraria Almedina, 1996.

BUENO, P. C. P.; BASTOS, J. K.. A validated gas chromatography method for guaco (*Mikania glomerata* S.) quality control and rastreability: from plant biomass to phytomedicines. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1B, p. 218-223, Jan/Mar, 2009. DOI: <http://doi.org/10.1590/S0102-695X2009000200007>

CZELUSNIAK, K. E.; BROCCO, A.; PEREIRA, D. F.; FREITAS, G. B. L.. Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: revisão considerando *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schulyz Bip. Ex Baker. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 14, n. 2, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-05722012000200022>

DELLA PASQUA, C. S. P.; IWAMOTO, R. D.; ANTUNES, E.; BORGHI, A. A.; SAWAYA, A. C. F. H.; LANDUCCI, E. C. T.. Pharmacological study of anti-inflammatory activity of aqueous extracts of *Mikania glomerata* (Spreng.) and *Mikania laevigata* (Sch. Bip. Ex Baker). **Journal of ethnopharmacology**, v. 231, p. 50-56, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.11.012>

DOS SANTOS, R. R.; TURRA, B.; SIMON, K.; DAMIANI, A. P.; STRAPAZZON, G.; LEANDRO, R. T.; AMARAL, P. A.. Evaluation of genotoxicity and coumarin production in conventional and organic cultivation systems of *Mikania glomerata* Spreng. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, p. 1–9, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1080/03601234.2019.1634423>

Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 24 de agosto de 2020.

GASPARETTO, J. C.; CAMPOS, F. R.; BUDEL, J. M.; PONTAROLO, R.. *Mikania glomerata* Spreng. E *M. laevigata* Sch. Bip. ex Baker, Asteraceae: estudos agrônômicos, genéticos, morfoanatômicos, químicos, farmacológicos, toxicológicos e uso nos programas de fitoterapia do Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Curitiba, v. 20, n. 4, Ago/Set, 2010. DOI: <https://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2010000400025>

GONÇALVES, C. P.; YASUDA, F. S.; SANTOS, M. A.; REIS, R. D.; SAVINO, M. I.; RIBEIRO, W.; RECHE, L.; GONÇALVES, I. D.; MARQUES, L. C.; MARCUCCI, M. C.. Development and validation of an HPLC-DAD method for the determination of coumarin in syrups with guaco and critical analysis of drug labels. **American Journal**

of **Phytomedicine and Clinical Therapeutics**, v. 5, n. 3: 19, p. 1-8, 2017. DOI: <https://doi.org/10.21767/2321-2748.100332>

INMETRO. DOQCGCRE-008: **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. Revisão 07, 2018.

KAISER, C. R.; SANTOS, A. R.; ABREU, A. S.. Determinação de cumarina em extratos de guaco comercial: um estudo de caso sobre o controle de qualidade de fitoterápicos. **Revista Fitos**, v. 3, n. 1, p. 60-66, Mar, 2007.

KUMAR, K. A.; RENUKA, N.; PAVITHRA, G.; KUMAR, G. V.. Comprehensive review on coumarins: Molecules of potencial chemical and pharmacological interest. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 9, p. 67-81, 2015.

LEAL, L. R.; TELLIS, C. J. M.. Farmacovigilância de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil: uma breve revisão. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 4, p.253-202, Out/Dez, 2015. DOI <https://doi.org/10.5935/2446-4775.20150020>

MACEDO, J. A. B.. **Plantas medicinais e fitoterápicos na Atenção Primária à Saúde: contribuição para profissionais prescritores**. 2016. 56f. Trabalho de Conclusão de Curso (especialização) – Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca. Rio de Janeiro, 2016.

MANSANO, G. R.; SARTORI, E. R.. Oxidação eletroquímica de anlodipino e hidroclorotiazida sobre o eletrodo de diamante dopado com boro: potencialidade de determinação simultânea. **Orbital: The Electronic Journal of Chemistry**, v. 7, n. 1, p. 81-86, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.17807/orbital.v7i1.673>

MATSUCHITA, H. L. P.; MATSUCHITA, A. S. P.. A Contextualização da Fitoterapia na Saúde Pública. **Uniciências**, v. 19, n. 1, p. 86-92, 2015.

MEDEIROS, J. de, KANIS, L. A.. Avaliação do efeito de polietilenoglicóis no perfil de extratos de *Mikania glomerata* Spreng., *Asteraceae*, e *Passiflora edulis* Sims, *Passifloraceae*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Curitiba, v. 20, n. 5, p. 796-802, Nov. 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-695x2010005000001>

MEDEIROS, R. A.; CARVALHO, A. E.; ROCHA-FILHO, R. C.; FATIBELLO-FILHO, O.. Determinação voltamétrica de ciclamato de sódio em produtos dietéticos empregando um eletrodo de diamante dopado com boro. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p.1405-1409, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000600024>

MENDES, I. A. C.. Desenvolvimento e saúde: a declaração de Alma-Ata e movimentos posteriores. **Revista Latino-América de Enfermagem**, v.12, n. 3, p. 447-448, Jun, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0104-11692004000300001>

MENDOZA, S.; BUSTOS, E.; MANRÍQUEZ, J.; GODÍNEZ, L. A.. Voltammetric techniques. In: ESCARPA, A.; GONZÁLEZ, M. C.; LÓPEZ, M. A.. **Agricultural and Food Electroanalysis**. Wiley, 2015, Cap. 2, p. 21-28. DOI: [10.1002/9781118684030.ch2](https://doi.org/10.1002/9781118684030.ch2)

MIYANO, D. M.; LIMA, T.; SIMÕES, F. R.; LA-SCALEA, M. A.; OLIVEIRA, H. P. M.; CODOGNOTO, L.. Eletrochemical study of simple coumarin and its determination in aqueous infusion of *Mikania glomerata*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 3, p. 602-609, Mar, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.5935/0103-5053.20140046>

NOLLA, D.; SEVERO, B. M. A. **Plantas Medicinais**. 2 ed., Passo Fundo: Editora Universitária UPF, 2005. 72p.

OSHIRO, M. C.; DALLARMI MIGUEL, D.; DIAS, J. F. G.; GOMES, E. C.; GOMES MIGUEL, O.. A evolução do registro e prescrição de fitoterápicos no Brasil sob a perspectiva legal e sanitária. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**, v.4, n.4, p.116-122, Out, 2016. DOI: <https://doi.org/10.22239/2317-269X.00790>

PEDROSA, V. A.; CODOGNOTO, L.; AVACA, L. A.. Determinação voltamétrica de 4-clorofenol sobre o eletrodo de diamante dopado com boro utilizando voltametria de onda quadrada. **Química Nova**, v. 26, n. 6, p. 844-849, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000600012>

PEREIRA, P. F.; SILVA, W. P.; MUÑOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M.. Determinação rápida e simultânea de sulfametoxazol e trimetoprima utilizando análise por injeção em batelada com detecção amperométrica e eletrodo de diamante dopado com boro. **Química Nova**, v. 38, n. 4, p. 663-668, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20150059>

PIO CORREA, M.. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**, 2 ed., Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, 1984.

POLONIO, J.C; ALMEIDA, T. T.; GARCIA, A.; MARIUCCI, G. E. G.; AZEVEDO, J. L.; RHODEN, S. A.; PAMPHILE, J. A.. Biotechnological prospecting of foliar endophytic fungi of guaco (*Mikania glomerata* Spreng.) with antibacterial and antagonistic activity

against phytopathogens. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 3, p. 7297-7309, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.4238/2015.July.3.5>

RIBEIRO, W. F.. **Determinação voltamétrica de ricina em mamona usando carbono vítreo e diamante dopado com boro**. 2012. 112f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2012.

RICARDO, L. M.; BRANDÃO, M. G. L.. *Mikania glomerata* Spreng. & *Mikania laevigata* Sch.Bip. ex Baker. In: ALBUQUERQUE, U. P.; PATIL, U.; MÁTHÉ, A. (Eds.). **Medicinal and Aromatic Plants of South America**. Springer, p. 337–344, 2018. DOI: [10.1007/978-94-024-1552-0_30](https://doi.org/10.1007/978-94-024-1552-0_30)

RODRIGUES, R. F.. **Extração da cumarina a partir das sementes da emburana (*Torresea cearensis*) utilizando dióxido de carbono supercrítico**. 2005. 73f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química da Unicamp, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2005.

SCARANO, F. R.; CEOTTO, P.. A importância da biodiversidade brasileira e os desafios para a conservação, para a ciência e para o setor privado. In: ROLIM, S.G.; MENEZES, L.F.T.; SRBEK-ARAUJO, A.C. (org.). **Floresta Atlântica de Tabuleiro: Diversidade e Endemismos na Reserva Natural Vale**. São Paulo: Rupestre, 2016. p. 483-495.

SGUAREZI, J. G. D.; GONÇALVES, V. F.; ROCHA, T.; MURAKAMI, D. Y.; UZUELLE, M. A.; DE MOURA, P. R.. Fitoterápicos na Rede Pública de Saúde (SUS) no Brasil: Um estudo toxicológico de *Mikania glomerata* em fetos de ratas Wistar. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 4, p. 460-468, Out/Dez, 2016. DOI: <https://doi.org/10.5935/2446-4775.20160033>

SILVA, A. C.. **Determinação voltamétrica de ácidos orgânicos em sucos utilizando um eletrodo de pasta de carbono modificado com ftalocianina de cobalto (II) associado à calibração de segunda ordem**. 2019. 95f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2019.

SILVA, C. R.; GOMES, V. S.; KULKAMP, I. C.; KANIS, L. A.. Método espectroscópico para determinação de cumarina em xarope de *Mikania glomerata* Sprengel. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 594-599, Out/Dez, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000400017>

SILVA JUNIOR, S.A.A.. **Essentia herba: plantas bioativas**, Epagri, Florianópolis, 2006, 634p.

SIMÕES, F. R.; XAVIER, M. G.. Electrochemical sensors. In: DA RÓZ, A. L.; FERREIRA, M.; LEITE, F. L.; OLIVEIRA, O. N.. **Nanoscience and its applications**. William Andrew, 2017, Cap. 6, p.155-178. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-49780-0.00006-5>

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5ª Ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R.. **Fundamentos de Química Analítica**, Editora Thompson, tradução da 8ª edição, 2006.

SOUZA, C. P.; RIBEIRO, F. W. P.; OLIVEIRA, T. M. B. F.; SALAZAR-BANDA, G. R.; de LIMA-NETO, P; MORAIS, S.; CORREIA, A. N.. Electroanalysis of pharmaceuticals on boron-doped diamonds electrode: a review. **ChemElectroChem**, v. 6, n. 9, p. 2350-2378, 2019. DOI: [10.1002/celec.201801742](https://doi.org/10.1002/celec.201801742)

SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A.. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 81-89, 2003. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422003000100015>

STRADINS, J.; HASANLI, B.. Anodic voltammetry of phenol and benzenethiol derivatives.: Part 1. Influence of pH on electron-oxidation potentials of substituted phenols and evaluation of pKa from anodic voltammetry data. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v.353, n. 1-2, p. 57–69, 1993. DOI:

THAKUR, A.; SINGLA, R.; JAITAK, V.. Coumarins as anticancer agents: A review on synthetic strategies, mechanism of action and SAR studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 101, p. 476-495, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.07.010>

WANG, J.. **Analytical Electrochemistry**. 3ª Ed. New Jersey: John Wiley & Sons Ltd., 2006.

WANG, L.; LIU, H.. Electrochemical reduction of coumarins at a film-modified electrode and determination of their levels in essential oils and traditional Chinese herbal medicines. **Molecules**, v. 14, n. 9, p. 3538-3550, 2009. DOI: [10.3390/molecules14093538](https://doi.org/10.3390/molecules14093538)

WU, Q.; DEWALD, H. D.. Voltammetry of coumarins. **Electroanalysis**, v. 13, n. 1, p. 45-48, 2000. DOI: [10.1002/1521-4109\(200101\)13:1<45::AID-ELAN45>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/1521-4109(200101)13:1<45::AID-ELAN45>3.0.CO;2-Y)

ZANONI, M. V. B.; BORGES, A. S.; BENEDETTI, A. V.; YAMANAKA, H.; SOTOMAYOR, M. P. T.; BESSEGATO, G. G.; STRADIOTTO, N. R.; ZANTA, C. L. P. S.; ANDRADE, A. R.. Panaroma da eletroquímica e eletroanalítica no Brasil. **Química Nova**, v. 40, n. 6, p. 663-669, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170072>