



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CURSO DE FARMÁCIA**

Fernanda Ellen Constantino da Silva

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO VOLUMÉTRICO PARA QUANTIFICAÇÃO
DE ÁCIDO CINÂMICO EM MATÉRIA-PRIMA**

**JOÃO PESSOA
2024**

FERNANDA ELLEN CONSTANTINO DA SILVA

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO VOLUMÉTRICO PARA QUANTIFICAÇÃO
DE ÁCIDO CINÂMICO EM MATÉRIA-PRIMA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Coordenação do Curso de
Graduação em Farmácia, do Centro de
Ciências da Saúde, da Universidade
Federal da Paraíba, como parte dos
requisitos para obtenção do grau de
Bacharel em Farmácia.

Orientador: Fábio Santos de Souza

Coorientador: José Venâncio Chaves Júnior

JOÃO PESSOA

2024

**Catalogação na publicação
Seção de Catalogação e Classificação**

S586v Silva, Fernanda Ellen Constantino da.
Validação de método volumétrico para quantificação
de ácido cinâmico em matéria-prima / Fernanda Ellen
Constantino da Silva. - João Pessoa, 2024.
57 f. : il.

Orientação: Fábio Santos de Souza.
Coorientação: José Venâncio Chaves Júnior.
TCC (Graduação) - UFPB/CCS.

1. Ácido cinâmico. 2. Validação de método. 3.
Volumetria. 4. Titulometria. I. Souza, Fábio Santos de.
II. Chaves Júnior, José Venâncio. III. Título.

UFPB/CCS

CDU 547.586.5(043.2)

FERNANDA ELLEN CONSTANTINO DA SILVA

VALIDAÇÃO DE MÉTODO VOLUMÉTRICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO CINÂMICO EM MATÉRIA-PRIMA

Trabalho de conclusão de curso
apresentado como requisito parcial para
obtenção do título de Bacharel em
Farmácia, pela Universidade Federal da
Paraíba.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Documento assinado digitalmente

 FABIO SANTOS DE SOUZA
Data: 05/11/2024 14:37:40-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Orientador – Prof. Dr. Fábio Santos de Souza
Universidade Federal da Paraíba – UFPB

Documento assinado digitalmente

 JOSE VENANCIO CHAVES JUNIOR
Data: 05/11/2024 15:01:08-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Coorientador – Dr. José Venâncio Chaves Júnior
Universidade Federal da Paraíba – UFPB

Documento assinado digitalmente

 IONALDO JOSE LIMA DINIZ BASILIO
Data: 06/11/2024 22:26:36-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Examinador 1 – Prof. Dr. Ionaldo José Lima Diniz Basílio
Universidade Federal da Paraíba – UFPB

Documento assinado digitalmente

 VALMIR GOMES DE SOUZA
Data: 08/11/2024 09:43:08-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Examinador 2 – Prof. Dr. Valmir Gomes de Souza
Centro Universitário UNIFIP

DEDICATÓRIA

Dedico esta monografia a todos que vieram antes de mim, aos cientistas que buscaram entender e esclarecer os fenômenos do mundo, aos professores que se dedicaram a ensiná-los e à minha querida família que me encaminhou e me incentiva na busca de conhecimento.

AGRADECIMENTOS

À Deus pai todo poderoso que cuida de mim com tanto amor, pois toda honra e toda glória são dEle e para Ele.

À minha mãe (Eliene), meu pai (Luiz), minha vó (Maria das Neves) que me educaram como humana, agradeço pelo incentivo contínuo, pelo apoio aos meus estudos e pelo carinho. À minha irmã (Laura), que deixa a vida mais alegre e sempre se orgulha de mim, desejo continuar sendo um bom exemplo e te orgulhando. Aos meus tios (Marleide, Marlene, Luciene, Célia e Alberto) e avós (Maria da Penha, Zélia e José) agradeço pelo carinho, orações e incentivo, suas dúvidas sobre doenças, exames e uso de medicamentos me motivaram a estudar sempre mais. À minha prima (Amanda) e minha amiga (Adrielly) que me acompanharam na escolha de curso e sempre me incentivaram com suas mensagens. Querida família, meu caminho acadêmico só foi possível pelo esforço de vocês, minha formação não é apenas minha, pois tornou-se nossa.

Agradeço ao Prof. Dr. Fábio Santos de Souza e ao Dr. José Venâncio Chaves Júnior, pela excelente orientação e coorientação, sou muito grata pelas orientações, sugestões, paciência diante das dúvidas e por acolherem a mim no laboratório durante o estágio supervisionado, foi uma experiência memorável e cheia de aprendizado.

Aos colegas da turma, que se tornaram amigos de profissão e vida (Ana Clara, Brenda, Gabrielly, Mirela, Nayara e Pedro), que compartilhando mais do que a sala de aula possibilitou uma jornada acadêmica mais leve.

Aos meus colegas petianos e à Profa. Dra. Leônia Maria Batista, minha eterna tutora, que contribuíram com meu desenvolvimento pessoal e acadêmico, que refletirá na profissional que serei. Agradeço também aos meus professores de todas as fases (da educação infantil ao ensino superior), em especial o Professor Dr. Gilberto Pedrosa, que me motivaram no caminho da busca por conhecimento, a vocês presto meu respeito e carinho.

Por fim, agradeço a todos que participaram desse ciclo, se possível continuem olhando para mim, pois a jornada continua.

RESUMO

A validação de método é descrita como o processo de provar que um método analítico é aceitável para a finalidade pretendida, sendo assim englobado na área de controle de qualidade. O ácido cinâmico (AC) é um composto fenólico, encontrado abundantemente na natureza, que ganha destaque na área científica diante de estudos sobre suas atividades antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, fotoprotetora, entre outras. Entretanto, não existem métodos analíticos destinados a determinação do AC em compêndios oficiais e os métodos encontrados na literatura, validados ou não, são de alto custo. A volumetria é um método analítico clássico, que apresenta dados quantitativos e precisos de maneira rápida, além de representar um baixo custo de execução e manutenção. Dessa forma, este trabalho possui como objetivo desenvolver e validar um método analítico alternativo utilizando a técnica de volumetria para determinação do ácido cinâmico. O desenvolvimento do método utilizou a volumetria de neutralização, diante da característica do AC como ácido orgânico de baixa solubilidade em meios aquosos, a sua dissolução ocorreu etanol 95%, utilizando o hidróxido de sódio (NaOH) a 0,1 M como titulante e o biftalato de potássio (KHP) para a padronização dessa solução, ambas de balanço estequiométrico (1:1). A monitorização do ponto final se deu de maneira visual a partir da alteração de cor do meio. Em experimentos preliminares a fenolftaleína foi escolhida como melhor indicador. A validação da metodologia foi realizada conforme parâmetros preconizados na RDC 166 de 2017 da ANVISA, em que foram avaliados os parâmetros: seletividade, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão, exatidão e robustez. O método desenvolvido se mostrou seletivo frente a alguns excipientes farmacêuticos. O método foi linear e homocedástico com base na avaliação do coeficiente de correlação ($>0,99$) e no teste de Cochran, respectivamente.. O gráfico de dispersão de resíduos da linearidade apresentou distribuição aleatória de pontos ± 3 DP, não indicando tendências. Foram obtidos LD igual a 2,88mg e LQ igual a 9,61mg. Os valores de desvio padrão relativo e recuperação, obtidos nos testes de precisão, exatidão e robustez, foram, respectivamente, menores que 2% e próximos a 100%. Dessa forma, no presente trabalho foi desenvolvido um método seletivo, preciso, linear, exato e robusto para a determinação do ácido cinâmico em matéria-prima utilizando da técnica de volumetria, o que fornece à comunidade científica um método alternativo, rápido e de baixo custo que pode ser facilmente reproduzido, que contribui para o monitoramento da qualidade destes produtos.

Palavras-chave: ácido cinâmico; validação de método; volumetria; titulometria.

ABSTRACT

Method validation is described as the process of proving that an analytical method is acceptable for the intended purpose, and is therefore included in the area of quality control. Cinnamic acid (CA) is a phenolic compound, found abundantly in nature, which is gaining prominence in the scientific field due to studies into its antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial and photoprotective activities, among others. However, there are no analytical methods for determining CA in official compendia and the methods found in the literature, whether validated or not, are expensive. Volumetry is a classic analytical method that provides quantitative and accurate data quickly, as well as being low cost to perform and maintain. The aim of this work is to develop and validate an alternative analytical method using the volumetric technique for the determination of cinnamic acid. The method was developed using neutralization volumetry, given that CA is an organic acid with low solubility in aqueous media. It was dissolved in 95% ethanol, using 0.1 M sodium hydroxide (NaOH) as a titrant and potassium biftalate (KHP) to standardize the solution, both with a stoichiometric balance (1:1). The end point was monitored visually based on the change in color of the medium. In preliminary experiments, phenolphthalein was chosen as the best indicator. The methodology was validated according to the parameters recommended in ANVISA's RDC 166 of 2017, in which the following parameters were assessed: selectivity, linearity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), precision, accuracy and robustness. The method developed proved to be selective against some pharmaceutical excipients. The method was linear and homoscedastic based on the evaluation of the correlation coefficient (>0.99) and the Cochran test, respectively. The scatter plot of the linearity residuals showed a random distribution of points ± 3 SD, indicating no trends. A LOD of 2.88mg and a LOQ of 9.61mg were obtained. The relative standard deviation and recovery values obtained in the precision, accuracy and robustness tests were less than 2% and close to 100%, respectively. In this way, a selective, precise, linear, accurate and robust method was developed for the determination of cinnamic acid in raw materials using the volumetric technique, which provides the scientific community with an alternative, fast and low-cost method that can be easily reproduced, which contributes to monitoring the quality of these products.

Keywords: cinnamic acid; method validation; volumetry; titrimetry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura química do Ácido cinâmico (isômeros <i>cis</i> e <i>trans</i>).....	19
Figura 2.	Sítios reativos do AC.....	21
Figura 3.	Exemplos de derivados do Ácido cinâmico.....	22
Figura 4.	Requisitos necessários para a aplicação da volumetria.....	24
Figura 5.	Esquema do método de volumetria utilizando indicador.....	25
Figura 6.	Parâmetros de validação de um método analítico.....	36
Figura 7.	Padronização do Hidróxido de Sódio utilizando o Biftalato de potássio.....	40
Figura 8.	Reação entre o Ácido Cinâmico (AC) e Hidróxido de Sódio (NaOH).....	42
Figura 9.	Distribuição teórica de espécies do ácido cinâmico (AC) em função do pH obtida no software Marvin.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores da Padronização do Biftalato de potássio (KHP) no dia 1.....	41
Tabela 2. Valores da titulação do Ácido cinâmico (AC) para escolha do indicador.....	43
Tabela 3. Dados referentes a seletividade do Ácido cinâmico (AC).....	46
Tabela 4. Dados referentes a linearidade, curva de calibração, LD e LQ na validação do método analítico.....	47
Tabela 5. Dados referentes ao parâmetro de precisão do método analítico, expressa teor e DPR.....	50
Tabela 6. Dados referentes ao parâmetro de exatidão do método analítico, expressa teor (em mg e %), recuperação e DPR.....	51
Tabela 7. Dados referentes ao parâmetro de robustez a partir das variáveis e valores de recuperação e DPR obtidos.....	52

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.	Propriedades químicas e físicas do AC.....	20
Quadro 2.	Tipos de titulação volumétricas.....	26
Quadro 3.	Exemplos de organizações e agências internacionais regulamentares.....	28
Quadro 4.	Parâmetros a serem considerados na validação analítica.....	30
Quadro 5.	Características dos indicadores de pH.....	42

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Resultado da análise de Linearidade	
Média.....	48
Gráfico 2. Plotagem de resíduos padronizados do Ácido cinâmico (AC).....	49

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

µL	Microlitros
AC	Ácido Cinâmico
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Associação de Químicos Analíticos Oficiais
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CMD	Concentração média determinada
CV	Coeficiente de Variação
DAC	Derivados do ácido cinâmico
DCF	Departamento de Ciências Farmacêuticas
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
FA	Fator de análise
FAL	Fenilalanina amônia-liase
FC	Fator de correção
g	Gramas
GL	Graus livres
IC	Inclinação da curva
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
KHP	Biftalato de Potássio (do acrônimo em inglês <i>K hydrogen phthalate</i>)
L	Litros
LD	Limite de Detecção
LM	Linearidade média
LQ	Limite de Quantificação
m	Massa
M	Concentração molar
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mg	Miligramas
mL	Mililitros
MM	Massa molar

NaOH	Hidróxido de Sódio
NH₃	Amônia
pH	Potencial Hidrogeniônico
r	Coeficiente de correlação
R	Recuperação
r²	Coeficiente de determinação
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
TAL	Tirosina amônio-liase
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
V	Volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1 ÁCIDO CINÂMICO	19
2.1.1 Propriedades químicas e físicas	19
2.1.2 Fontes e síntese	20
2.1.3 Derivados do ácido cinâmico	21
2.1.4 Propriedades biológicas e empregabilidade	22
2.2 VOLUMETRIA	23
2.2.1 Propriedades de aplicação da técnica	23
2.2.2 Processo de titulação	24
2.2.3 Tipos de titulações volumétricas	26
2.3 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS	27
2.3.1 Regulamentação	28
2.3.2 Parâmetros da validação analítica	29
3 OBJETIVOS	32
3.1 OBJETIVO GERAL	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 MATERIAIS	33
4.1.1 Amostra	33
4.1.2 Reagentes	33
4.2 LOCAL DE PESQUISA	33
4.3 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO	33
4.3.1 Preparação do titulante	33
4.3.2 Padronização do titulante	34
4.3.3 Titulação do Ácido cinâmico e escolha do indicador	34

4.3.4 Cálculos utilizados durante a titulação	35
4.4 VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO	36
4.4.1 Seletividade.....	37
4.4.2 Linearidade e limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ).....	37
4.4.3 Precisão	38
4.4.4 Exatidão	39
4.4.5 Robustez.....	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
5.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO POR VOLUMETRIA.....	40
5.2 VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR VOLUMETRIA	46
5.2.1 Seletividade.....	46
5.2.2 Linearidade e limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ).....	47
5.2.3 Precisão	50
5.2.4 Exatidão	51
5.2.5 Robustez.....	52
6 CONCLUSÕES	53
REFERÊNCIAS	54

1 INTRODUÇÃO

A validação de métodos analíticos consiste na aplicação de processos capazes de averiguar se métodos desenvolvidos e/ou empregados exercem reprodutibilidade, acurácia e precisão, com finalidade de garantir a veracidade de dados, que consequentemente certifica a confiabilidade do processo e seu bom desenvolvimento e aplicação (Lavanya *et al.*, 2013; Raposo; Ibelli-Bianco, 2020).

Os métodos analíticos a serem validados devem observar sua finalidade, a natureza do insumo ou produto investigado, além da regulação vigente que estabelece parâmetros analíticos para a análise dos resultados (Chikanbanjar; Semwal; Jyakhwa, 2020). Nesse sentido, destaca-se a importância do desenvolvimento da validação de métodos na indústria farmacêutica, a qual engloba desde a produção de medicamentos à avaliação de insumos e técnicas que devem estar em conformidade regulatória (Breaux; Jones; Boulas, 2003; Sharma; Goyal; Chauhan, 2018).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é o órgão regulatório responsável que estipula ensaios analíticos em compêndios oficiais, além de determinar critérios para a criação de métodos analíticos validados, conforme descrito na Resolução da Diretoria Colegiada número 166, publicada no ano de 2017 (Brasil, 2017).

O ácido cinâmico ou ácido 3- fenil-2-propenoíco, bem como seus derivados, são encontrados de maneira abundante na natureza, como em plantas, frutas, vegetais, grãos, óleos essenciais e mel. Devido ao seu odor e sabor característico, na indústria é utilizado com aditivo flavorizante e aromatizante nos mais diversos produtos, que variam de produtos de limpeza, cosméticos e à alimentos. Ainda assim, essa substância e seus análogos ganham destaque na comunidade farmacêutica e médica diante das propriedades apresentadas, como antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, fotoprotetora, protetora cardiovascular, neuroprotetora dentre outras (Gunia-Krzyżak *et al.*, 2018; Rodrigues *et al.*, 2019; Ruwizhi; Aderibigbe, 2020). Entretanto, os compêndios oficiais não apresentam uma metodologia analítica validada disponível para a determinação desta substância orgânica (Brasil, 2019a).

Ademais, na literatura foi observada uma escassez de trabalhos científicos de métodos validados para a quantificação de ácido cinâmico utilizando a técnica de volumetria, um método clássico na química analítica caracterizado como simples e

preciso, que é empregado e validado na determinação quantitativa de outros ácidos orgânicos (Maslov *et al.*, 2021). Apresenta um baixo custo em equipamentos e reagentes quando comparados com métodos encontrados aplicados na quantificação por outros sistemas, como a cromatografia líquida de ultra-eficiência acoplada a espectrometria de massas (Jeong *et al.*, 2020) e cromatografia líquida de alta-eficiência acoplada detector ultra-violeta (Pigera *et al.*, 2023).

Os métodos volumétricos são amplamente utilizados nas determinações de várias substâncias que correspondem principalmente a formação de complexos, reações redox ou ácido-base, assim como ocorre com a substância proposta da presente pesquisa. Ademais, a escolha dessa metodologia em detrimento de outras também eficazes, se justifica por ser uma opção alternativa economicamente reproduzível (Ravisankar *et al.*, 2015; Brasil, 2019a; Moravska; Levytsky; Vovk, 2020; Blazheyevskiy *et al.*, 2022).

Nesse sentido, diante das informações levantadas e da necessidade detectada, o presente estudo objetiva desenvolver um método analítico que utilize da volumetria para quantificação do insumo ácido cinâmico em matéria-prima. Adicionalmente, considerando as diretrizes regulatórias, o estudo propõe a validação do método analítico desenvolvido para demonstrar a confiabilidade dos resultados.

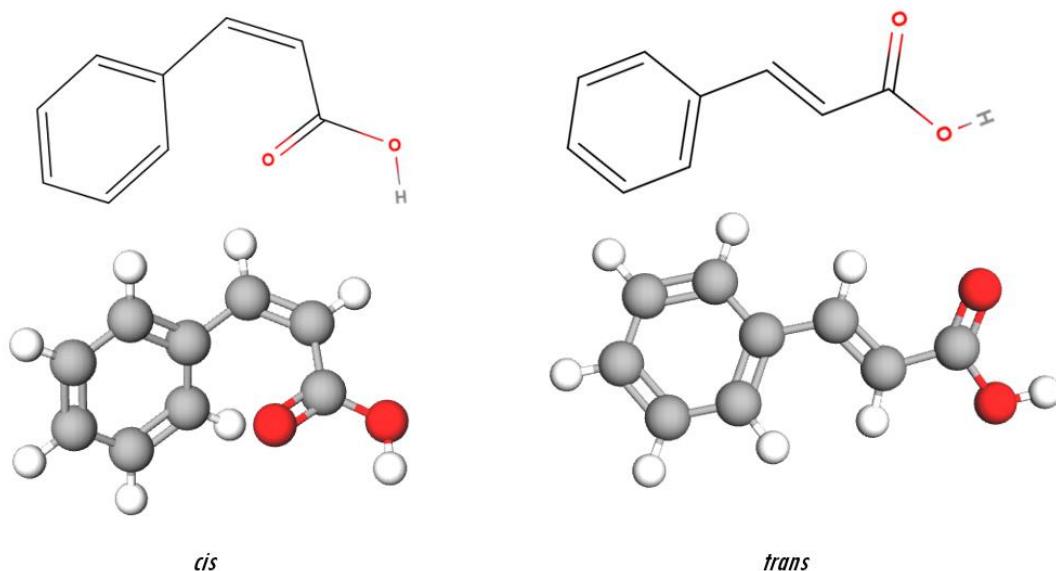
2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ÁCIDO CINÂMICO

2.1.1 Propriedades químicas e físicas

O Ácido 3- fenil-2-propenóico, conhecido como ácido cinâmico (AC), de fórmula molecular $C_9H_8O_2$ (Oladimeji *et al.*, 2019; PubChem, 2024), existe nas formas *cis* (Z) e *trans* (E) (Figura 1), entretanto devido a maior estabilidade no isômero *trans* (E), esta é sua forma mais predominante (Mingoia *et al.*, 2022).

Figura 1. Estrutura química do Ácido cinâmico (isômeros *cis* e *trans*)



*Moléculas geradas pelo web-application MolView.

Fonte: Autoria própria (2024).

Algumas de suas propriedades químicas e físicas estão listadas no quadro 1. O AC pertence à classe dos polifenóis do ácido fenólico, sendo considerado um dos metabólitos secundários vegetais mais abundantes (Mielecki; Lesyng, 2016). Além disso, este ácido em sua forma *trans* pode ser classificado também com um hormônio vegetal, pertencente ao grupo das auxinas, cuja atividade está interligada ao crescimento e a diferenciação celular vegetal (Souza, 2015; Lima *et al.*, 2018).

Quadro 1. Propriedades químicas e físicas do AC

Forma molecular	C ₉ H ₈ O ₂
Massa molar	148,16 g/mol
Característica física	Sólido (pó), cristalino e esbranquiçado
Solubilidade	Pouco solúvel água, boa solubilidade em compostos orgânicos

Fonte: PubChem (2024).

2.1.2 Fontes e síntese

Pode ser encontrado em alimentos dietéticos como em grãos integrais (à exemplo da soja e café), frutas (como a maçã), em vegetais e seus óleos (presente nas folhas de coca, no óleo de oliva e óleo de canela), além de espécies de plantas de gênero *Cinnamomum*, família Lauraceae, como a *Cinnamomum cassia* (canela chinesa) e de outras espécies como o *Panax ginseng* (ginseng) (Ruwizhi; Aderibigbe, 2020). Ademais, o AC e seus derivados podem ser encontrados em produtos naturais de abelhas, como o mel e própolis (Marcucci *et al.*, 1996; Guzman, 2014).

O AC pode ser sintetizado de maneira orgânica, na qual a via biossintética do chiquimato nas plantas é o ponto inicial da produção das substâncias fenilpropanóides, resultando na síntese de fenilalanina e tirosina, que são substâncias precursoras do AC (Vogt, 2010).

Dessa forma, a partir da ação das enzimas fenilalanina amônia-liase (FAL) sobre a L-fenilalanina ou a partir tirosina amônio-liase (TAL) sobre o ácido aminado tirosina é obtido o ácido cinâmico na sua forma *trans*, em ambas, as enzimas (FAL e TAL) catalisam o substrato resultando na sua desaminação não oxidativa (eliminação do NH₃) para formação do AC (Whetten; Mackay; Sederoff, 1998; Souza; Abreu, 2007; Son *et al.*, 2021).

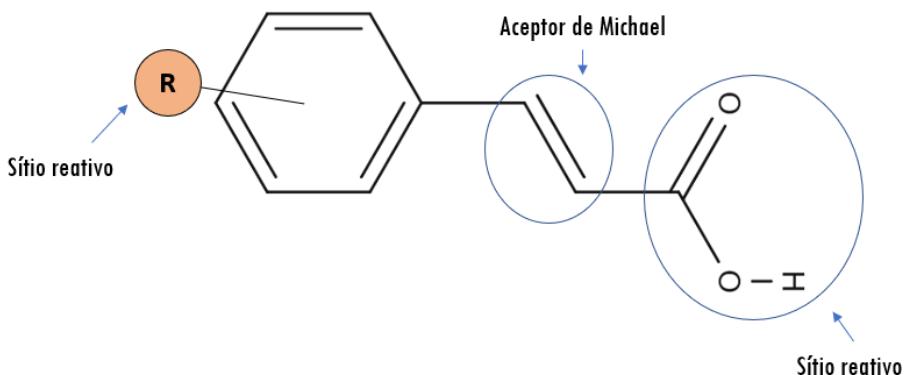
Outro meio de obtenção do AC é por mecanismos sintéticos, cuja obtenção

mais comum é pela reação de Perkin, que consiste na condensação de anidridos acéticos com aldeídos aromáticos (como o benzaldeído) na presença de uma condição básica (acetato de sódio) para a formação de ácido carboxílico (Gunia-Krzyżak *et al.*, 2018; Indriyanti; Prahasiwi, 2020). Outrossim, também pode ser obtido por meio da reação de condensação de Knoevenagel- Doebner, que ocorre a partir de aldeídos (como o benzaldeído) e ácido malônico catalisado por uma base, presença de piridina e/ou piperidina (Pontiki *et al.*, 2014; Peperidou *et al.*, 2017).

2.1.3 Derivados do ácido cinâmico

O AC possui três sítios reativos principais (Figura 2), que são o ácido carboxílico (-COOH), substituinte do anel aromático e uma oleofina conjugada, ou seja, cabonila α - β -insaturada (aceptor da reação de Michael) (De; Baltas; Bedos-Belval, 2011; Gomes *et al.*, 2014).

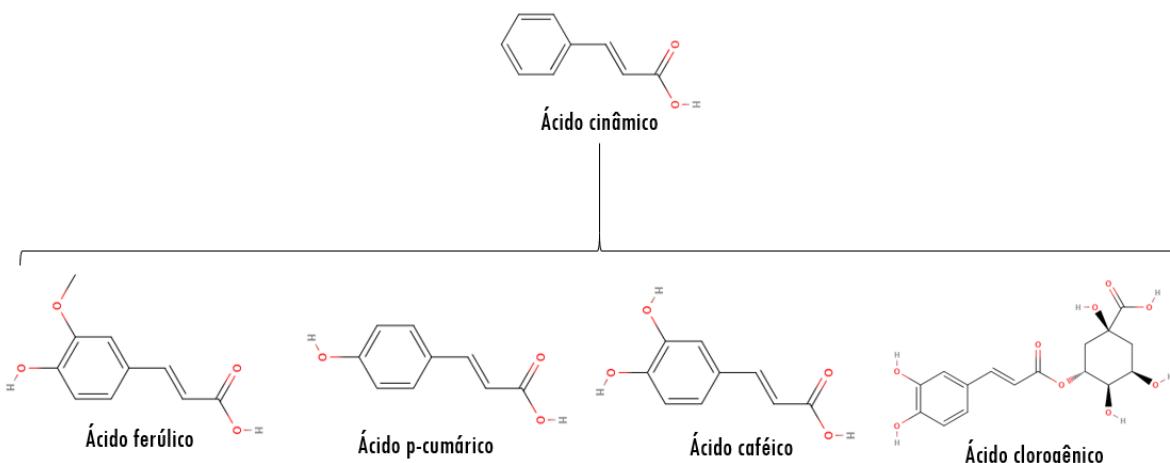
Figura 2. Sítios reativos do AC



Fonte: Adaptado de França e colaboradores (2021).

Nesse sentido, por meio de reações que agem sobre esses sítios reativos (como reações de hidroxilação, metilação e desidratação, por exemplo) são obtidos os derivados do AC (DAC). Vale salientar que alguns desses DAC podem ser encontrados na natureza (Figura 3), como por exemplo o ácido ferúlico, o *p*-cumárico, o caféico e o clorogênico (Souza; Abreu, 2007; De; Baltas; Bedos-Belval, 2011; França *et al.*, 2021).

Figura 3. Exemplos de derivados do Ácido cinâmico



*Moléculas geradas pelo web-application MolView.

Fonte: Autoria própria (2024).

Segundo Ruwizhi e Aderibigbe (2020), também se destacam em quantidade de estudos, investigações acerca das propriedades farmacológicas e aplicações de moléculas que são derivados do ácido cinâmico (DAC).

2.1.4 Propriedades biológicas e empregabilidade

Dentre as ações biológicas apresentadas pelo AC e os DAC, estão a ação anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana (Sova, 2012; Karatas *et al.*, 2020), efeito protetor cardiovascular (Safaeian *et al.*, 2024), ação neurológica no tratamento da doença de Alzheimer (Drakontaeidi; Pontiki, 2024), no tratamento de câncer (De; Baltas; Bedos-Belval, 2011; Mielecki; Lesyng, 2016; Fotopoulos; Hadjipavlou-Litina, 2024), contra infecções bacterianas (Guzman, 2014; Li *et al.*, 2020), atividade antidiabética (Adisakwattana, 2017; Ernawati *et al.*, 2017; Błaszczyk; Rosiak; Kałużna-Czaplińska, 2021), doenças parasitárias, dentre outras (Ruwizhi; Aderibigbe, 2020).

Na indústria e desde a antiguidade, o AC é categorizado como um agente flavorizante e aromatizante, conferindo sabor e odor característico, sendo aditivo de produtos comestíveis e de uso externo (EC, 2012; Dionisio *et al.*, 2018; Rodrigues *et al.*, 2019). O AC é utilizado na composição de fragrâncias, presentes em cosméticos (como cosméticos decorativos e perfumes), em produtos de higiene pessoal (como shampoos e sabonetes), como também em produtos não cosméticos, à exemplo de

produtos de limpeza doméstica, detergentes e aromatizantes (Letizia *et al.*, 2005; Yilmaz; Sova; Ergün, 2018).

Conforme constatado no estudo de França e colaboradores (2011), a versatilidade estrutural deste composto químico unido a potencial interação dela com os principais alvos moleculares e receptores do organismo vivo, tornam o AC uma substância atrativa para o desenvolvimento de análogos.

Principalmente, diante da busca por novos compostos farmacologicamente ativos, os derivados do ácido cinâmico (DAC) se mostram promissores, demonstrando potencialidade para o desenvolvimento de fármacos para a indústria farmacêutica (Sova, 2012; Souza, 2015; Safaeian *et al.*, 2024).

Ademais, os DAC naturais e sintéticos são amplamente empregados como ingredientes na indústria cosmética, majoritariamente na função perfumante, podendo ser adicionadas também derivados do AC com a função fotoprotetora, condicionamento do cabelo e pele, atividade antimicrobiana e como antioxidante (Gunia-Krzyżak *et al.*, 2018).

2.2 VOLUMETRIA

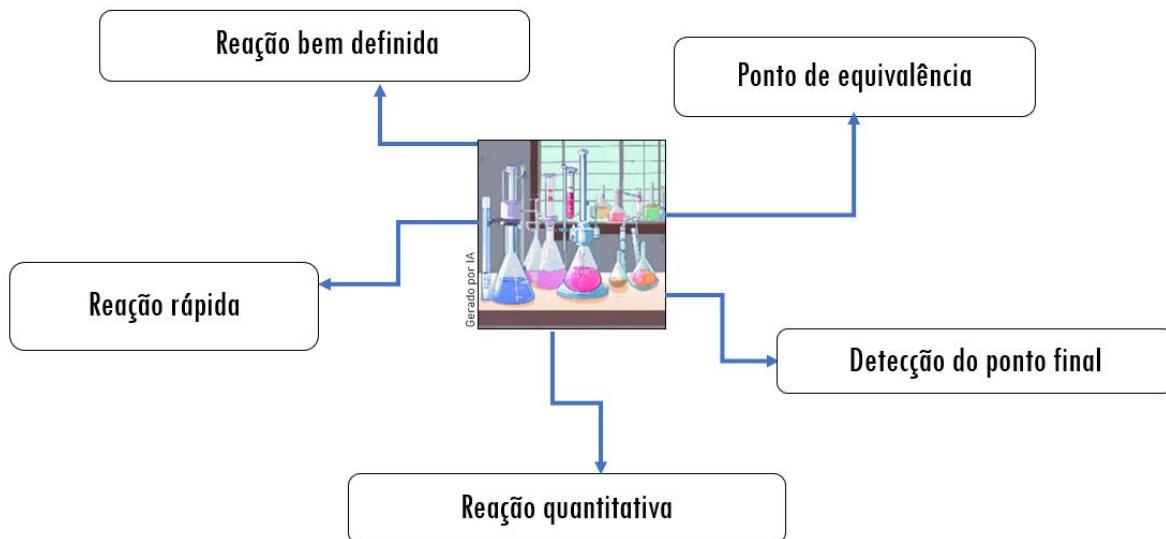
A aplicação da química analítica possui um valor significativo na sociedade contemporânea, uma vez que desenvolve ferramentas para a análise química e facilita a sua aplicação, a partir do desenvolvimento de métodos. Dentre as técnicas analíticas mais precisas, econômicas e úteis se encontram a volumetria, também denominada de titulometria (Rajan; Tiwatane, 2020; Blazheyevskiy *et al.*, 2022; Georgievna, 2023).

A volumetria ou titulometria é um método rápido, que pode ser realizado de maneira manual ou de forma automatizada, e depende do tipo de analito ou substância investigada para a determinação do tipo de titulação, bem como solução padrão e reação. Garantindo assim, a aplicabilidade desta técnica em um método que seja sensível o suficiente para gerar informações quantitativas sobre o analito titulado (De Caro *et al.*, 2023; Wang; Geng; Zhu, 2024).

2.2.1 Propriedades de aplicação da técnica

A aplicabilidade da titulação é dependente de algumas propriedades essenciais para o sistema volumétrico, sendo estes requisitos: a estequiometria da reação, ou seja, a reação entre o analito e o reagente deve ser bem definida; o ponto de equivalência será o valor teórico ideal que ocorre o balanço estequiométrico ou equivalente e a mudança é detectada, sendo o valor real de “viragem” chamado de ponto final; a reação deve acontecer de maneira rápida; deve haver especificidade, ou seja, sem interferentes e reações colaterais que impossibilitem ou mascarem os resultados. Quando a reação estiver finalizada, deve ocorrer alguma alteração significativa em uma característica da solução, pode ser em uma propriedade física ou elétrica, para a identificação podem ser usados instrumentos ou indicadores (são exemplos, a alteração de pH, cor e forma). Por fim, a reação deve quantitativa, o equilíbrio deve estar favorável para a direita, ou seja, a favor da reação para que haja a detecção de mudança de forma precisa (Baccan *et al.*, 2001; Christian; Dasgupta; Schug, 2014; Skoog *et al.*, 2015).

Figura 4. Requisitos necessários para a aplicação da volumetria



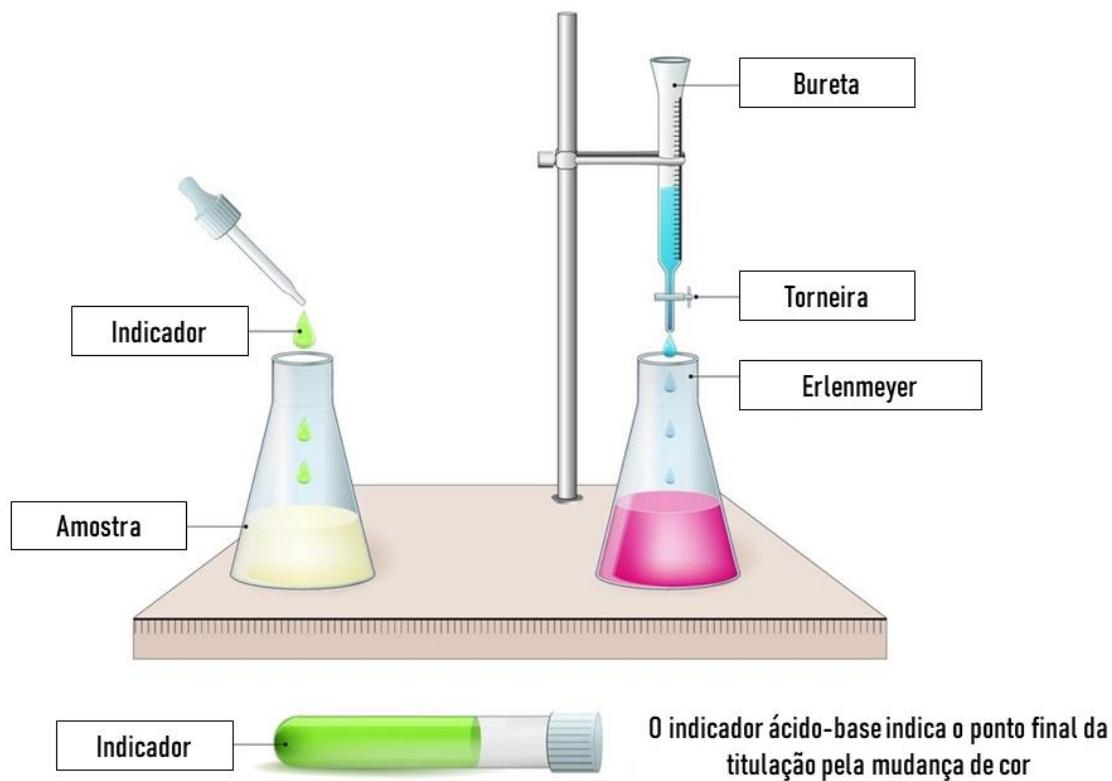
Fonte: Autoria própria (2024).

2.2.2 Processo de titulação

O processo de titulação consiste na investigação de uma substância, denominada analito, de concentração desconhecida que reage diante da adição de outra substância de concentração conhecida, chamada de solução padrão.

Normalmente, em titulações diretas essa solução padrão é adicionada na bureta, em titulações indiretas a substância desconhecida está presente na bureta, como ocorre em processos de padronização de titulantes. A bureta é um instrumento volumétrico, capaz de fornecer medida em volume, que permite o escoamento/gotejamento do titulante por meio de uma torneira. Após a detecção da conclusão da reação entre o titulante e o material titulado, o volume gasto marcado na bureta é usado para calcular a quantidade de analito, uma vez que é conhecida a concentração do reagente e a estequiometria da reação entre analito e o titulante (Baccan *et al.*, 2001; Skoog *et al.*, 2023).

Figura 5. Esquema do método de volumetria utilizando indicador



Fonte: Adaptado de Ray (2024).

Além disso, estão inclusos dentro do processo de titulação a preparação da solução-padrão, preparação da amostra, escolha dos solventes, cuidado e aferição dos equipamentos, da escolha de indicadores ou outros sistemas que permitam a detecção do ponto final. Sendo a natureza da substância investigada essencial para escolha do tipo de titulação a ser escolhido (Baccan *et al.*, 2001; Christian; Dasgupta;

Schug, 2014; Brasil, 2019b).

2.2.3 Tipos de titulações volumétricas

Existem diferentes classificações de titulações volumétricas e elas estão relacionadas ao tipo de reação que ocorre quando há a interação analito e titulante, por isso possuem características distintas. A técnica de titulação pode ser aplicada em meio aquoso e não aquoso, no qual o primeiro consiste na atribuição do analito a ser titulado em solução aquosa, enquanto que em um meio não-aquoso corresponde a outros tipos de solventes utilizados, como por exemplo, o uso de solventes orgânicos. Em ambos os casos devem ser considerados a solubilidade do analito a ser investigado (Baccan *et al.*, 2001; Brasil, 2019b; Skoog *et al.*, 2023). No quadro 2, são categorizados os tipos de titulação volumétricas mais comuns.

Quadro 2. Tipos de titulação volumétricas

Titulações volumétricas	Caracterização
Ácido-base	Conhecida também como volumetria de neutralização por ser um método de análise baseado na reação de neutralização entre os íons H ⁺ e OH ⁻ . Usada para investigar compostos inorgânicos e orgânicos, ácidos ou básicos, que serão titulados com titulantes de natureza ácido-base oposta. No ponto final, a reação provoca uma alteração de pH, que pode ser identificada pelo uso de um indicador ácido-base ou um medidor de pH. É importante salientar que a acidez e a basicidade de muitos ácidos e bases orgânicas podem ser aumentadas pela titulação em solvente não aquoso.
Precipitação	Durante a titulação, é observada a formação de um produto insolúvel (precipitado) resultante da reação do analito e do titulante. O nitrato de prata é um dos titulantes mais comuns neste tipo de volumetria. A identificação do ponto final pode ser feita recorrendo a indicadores ou através do monitoramento elétrico do potencial da solução.
Complexométrica	Neste tipo de volumetria, o titulante é um reagente que forma um complexo solúvel em água com o analito, ou seja, um íon metálico. O titulante costuma ser um agente quelante, sendo o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) um dos agentes

	quelantes mais úteis utilizados para este efeito. Reage com um grande número de íons metálicos e podem ser controladas pelo ajuste do pH. Ademais, os indicadores podem ser utilizados para formar um complexo altamente colorido com o íon metálico.
Redução-Oxidação	A titulação de um agente oxidante com um agente redutor, chamada de reação redox. Havendo ganho (agente oxidante) e perda (agente redutor) de elétrons em uma reação entre eles. A força de um desses agentes é um fator essencial para que ocorra a reação. Podem ser usados para a detecção do ponto final equipamentos eletrométricos ou indicadores apropriados.

Fonte: Christian, Dasgupta e Schug (2014) e Garg, Goyal e Das (2022).

2.3 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Historicamente, a ideia de validação surgiu em 1978 nos Estados Unidos da América e ao decorrer dos anos ganhou novo significado diante da ampliação do uso e adesão nos diferentes ramos industriais. O significado do termo validação, que corresponde a “avaliação de validade ou ação de comprovação de eficácia”, parece simplista, mas corresponde a um processo que envolve técnicas, pessoas, equipamentos e materiais, além de regulamentações e evidências documentadas (Lavanya *et al.*, 2013; Sharma; Goyal; Chauhan, 2018).

Segundo Raposo e Ibelli-Bianco (2020), a validação de método é descrita como o processo de provar que um método analítico é aceitável para a finalidade pretendida. Assim, entende-se que a aplicação da validação do método analítico confirma a capacidade deste de fornecer resultados consistentes e confiáveis, mesmo em caso de alterações, como a sua realização em diferentes laboratórios e instrumentos ou por diferentes operadores (Sharma; Goyal; Chauhan, 2018).

Diante do desenvolvimento de novos métodos para a investigação de insumos e novos medicamentos, quando não há métodos oficiais disponíveis em documentos oficiais, faz-se necessária a validação desses métodos analíticos. Da mesma forma que a criação de métodos de análise alternativos, quando validados garantem a segurança do processo e possibilitam melhora do método e redução de tempo e/ou custo (Ravisankar *et al.*, 2015).

Dessa maneira, garante o controle de qualidade na realização de procedimentos investigativos e de produção, vantajosos para o setor industrial, em destaque a área farmacêutica, e também a população. Assim, revela vantagens econômicas e de satisfação que respalda a relevância de métodos analíticos validados e de estudos de validação (Raposo; Ibelli-Bianco, 2020; Pathuri *et al.*, 2013).

2.3.1 Regulamentação

Internacionalmente, existem diversas agências e organizações reguladoras (Quadro 3), as quais são responsáveis por definirem os padrões de qualidade e estabelecer protocolos que correspondem à referência para concessão de aprovação, autenticação, registro e validação de métodos analíticos, processos industriais e produtos (Doltade; Saudagar, 2019).

Quadro 3. Exemplos de organizações e agências internacionais regulamentares

Organizações e agências internacionais	Sites
International Organization for Standardization (ISO)	www.iso.ch
International Conference on Harmonization (ICH)	www.ich.org
Organization for Economic Cooperation and Development (OECD)	www.oecd.org
Food and Drug Administration (FDA)	www.fda.gov/cder/guidance
Environmental Protection Agency (EPA)	www.epa.gov
• Quality systems	http://www.epa.gov/quality/bestlabs.html
• Office of Solid Waste	www.epa.gov/osw
• US-EPA, Region 4, Science and Ecosystem Support Division	www.epa.gov/region4/sesd
American Association for Clinical Chemistry (AACC)	www.aacc.org
American Association of Cereal Chemistry (AACCI)	www.aaccnet.org/

American Oil Chemists Society (AOCS)	www.aocs.org
The Society of Quality Assurance (SQA)	www.sqa.org
American Society for Testing and Materials (ASTM)	www.astm.org
Association of Official Analytical Chemists International (AOAC International)	www.aoac.org
National Institute of Standards and Technology (NIST)	www.nist.gov

Fonte: Adaptado de Christian, Dasgupta e Schug (2014).

Na área farmacêutica, uma comissão de grande relevância em diversos continentes quanto a validação de métodos analíticos é a *International Conference on Harmonisation* (ICH), a qual reúne autoridades mundiais de regulação de medicamentos e da indústria farmacêutica para discussão, harmonização dos requisitos técnicos para medicamentos e publicação de diretrizes que servem como base mundialmente (Marson *et al.*, 2020).

Em território nacional, a regulamentação de validação analítica é de responsabilidade da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que possui compêndios oficiais com métodos validados (Brasil, 2019a; 2019b) e também integra a comissão internacional ICH como membro (Brasil, 2022).

Como autoridade regulamentadora no Brasil, a ANVISA dispõe da Resolução nº166, de julho de 2017, que regulamenta questões sobre a validação de métodos analíticos no país (Brasil, 2017). Outro órgão importante no Brasil, que corresponde também à validação de métodos, é o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) que possui o documento DOQ-CGCRE-008 de caráter orientativo (INMETRO, 2020). Ademais, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) é o órgão nacional regulamentador para validação de métodos analíticos para produtos de alimentação animal e medicamentos veterinários (Rath; Martínez-Mejia; Schröder, 2015).

2.3.2 Parâmetros da validação analítica

De acordo com a RDC nº 166/2017, a validação analítica é definida como a “avaliação sistemática de um método por meio de ensaios experimentais de modo a

confirmar e fornecer evidências objetivas de que os requisitos específicos para seu uso pretendido são atendidos". Nesse sentido, na validação de métodos analíticos devem ser considerados alguns parâmetros (Quadro 4), os quais irão variar de acordo com o tipo de método aplicado no ensaio realizado (Brasil, 2017).

Quadro 4. Parâmetros a serem considerados na validação analítica

Parâmetro avaliado	Identificação	Teste de Impurezas		Doseamento -Dissolução -Uniformidade de conteúdo -Potência
		Quantitativo	Qualitativo	
Exatidão	Não	Sim	Não	Sim
Precisão Repetibilidade	Não	Sim	Não	Sim
Precisão intermediária	Não	Sim	Não	Sim
Seletividade	Sim	Sim	Sim	Sim
Limite de detecção	Não	Não	Sim	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	Não
Linearidade	Não	Sim	Não	Sim
Intervalo	Não	Sim	Não	sim

Fonte: Brasil (2017).

Dessa forma, a partir da aplicação desses parâmetros é possível verificar se o método corresponde ou não aos requisitos para a validação. Logo, torna-se necessário compreender conceitualmente ao que se refere os principais parâmetros

utilizados na validação de métodos analíticos.

A seletividade é o parâmetro que avalia a capacidade do método em identificar e/ou quantificar o analito investigado na presença de interferentes que podem estar contidos na amostra, como excipientes, possíveis impurezas, ser componentes da matriz e/ou diluentes. Assim, o método demonstra seletivo quando comprova que a resposta obtida é exclusiva do analito (Brasil, 2017; ICH, 2023).

Já a linearidade refere-se à capacidade do método de fornecer respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração da substância na amostra investigada. Para a análise, devem ser respeitados os critérios estabelecidos bem como os níveis de significância dos testes estatísticos (Sebben *et al.*, 2010; Brasil, 2017).

O Limite de Detecção (LD) corresponde a menor quantidade de analito capaz de ser identificada pelo método. Enquanto isso, o Limite de Quantificação (LQ) é a menor quantidade de analito/substância investigada que o método aplicado consegue quantificar com precisão e exatidão aceitáveis (ICH, 2023).

O parâmetro de precisão consiste na capacidade de um método analítico garantir concordância em uma série de resultados do método, que deve ser analisado por meio da repetibilidade (respeita as mesmas condições e demonstra precisão), precisão intermediária (em diferentes condições, seja dias, instrumentos e/ou analistas) e reprodutibilidade. Diretrizes internacionais determinam a necessidade de conformidade para a avaliação da repetibilidade, a qual devem ser estipulados diferentes níveis de concentrações e número de réplicas, mínimo de três níveis e triplicatas, ou a concentração total (100%) em no mínimo seis replicatas (Ravisankar *et al.*, 2015; ICH, 2023).

A exatidão de um método é obtida por meio do nível de concordância entre os resultados da análise em comparação a um valor considerado verdadeiro (Brasil, 2017).

Quanto à robustez, refere-se a testes que indicam a capacidade do método em resistir a pequenas variações propositais das condições analíticas (Brasil, 2017; ICH, 2023).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar metodologia analítica de um método volumétrico para quantificação de ácido cinâmico em matéria-prima.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar as condições das reações estequiométricas com base nas características químicas do analito que fundamenta o desenvolvimento do método analítico utilizando a técnica de volumetria de neutralização aplicado para quantificação do ácido cinâmico em matéria-prima;
- Avaliar a influência de diferentes indicadores ácido-base na determinação do ponto de viragem da titulação no desenvolvimento do método analítico;
- Validar o método desenvolvido em conformidade com os parâmetros estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Amostra

O ácido cinâmico (AC), em matéria-prima na sua forma *trans*, foi adquirido da Sigma-Aldrich (Brasil), ≥ 99% de pureza.

4.1.2 Reagentes

O hidróxido de sódio (NaOH) foi comprado no Brasil da Dinâmica. O biftalato de potássio (KHP) foi obtido da Química Especializada Erich (Brasil). A água destilada foi obtida pelo sistema de osmose reversa. O álcool etílico 95% PA, o etanol absoluto (99%) e o álcool etílico 96°GL foram obtidos, respectivamente, da AlphaTec (Brasil), Dinâmica (Brasil) e Ciavicco (Brasil). Os indicadores (fenolftaleína, azul de bromotimol, vermelho de metila e vermelho fenol) foram obtidos da Vetec (Brasil). Quanto aos excipientes grau farmacêutico foram adquiridos no Brasil: a celulose microcristalina 101, amido de milho e estearato de magnésio da Fragon, o glicolato de amido sódico e croscarmelose da Valdequímica, o talco da Orion e aerosil da Purifarma.

4.2 LOCAL DE PESQUISA

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Controle de Qualidade, localizado no Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF), Centro de Ciências da Saúde (CCS), Campus I da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

4.3 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO

4.3.1 Preparação do titulante

Inicialmente foi realizado o preparo das soluções para posterior titulação e padronização. Para o preparo da solução de Hidróxido de sódio (NaOH) com

concentração molar de 0,1M, foi utilizada a fórmula da Molaridade (Equação 1) para determinar a quantidade de massa a ser pesado e a concentração estipuladas do NaOH. Após a pesagem da massa obtida, 8g, foi realizado com o auxílio de um bastão de vidro a dissolução do NaOH com água destilada em um bêquer, sendo transferido para um balão volumétrico de 2L, o qual foi completado até a marca de aferição da vidraria. Por fim, a solução foi devidamente homogeneizada e identificada.

$$M = \frac{m}{MM.V} \quad (1)$$

Em que,

M = concentração molar (mol/L)

m= massa (g)

MM= massa molar (g/mol)

V= volume (L)

4.3.2 Padronização do titulante

O padrão primário selecionado foi o KHP, o qual possui uma pureza de 99,95%. Para a padronização foi realizada em triplicata a partir da titulação do titulado preparado de KHP mais o indicador de pH fenolftaleína, para identificar visualmente o ponto de viragem da reação de neutralização, e assim, mensurar a concentração do titulante (NaOH) pelo volume gasto na bureta.

Utilizando uma balança analítica, foram pesados em papel de celulose aproximadamente 0,2g de biftalato de potássio com o auxílio de uma espátula, sendo transferido para Erlenmeyer de 150 mL, devidamente identificado, diluído com 50 mL de água destilada e havendo adição de 2 gotas da fenolftaleína. As massas de KHP das amostras e os volumes gastos na titulação foram anotados. Além disso, foi realizada a titulação em branco (sem a presença do analito), para estipular o erro de titulação.

4.3.3 Titulação do Ácido cinâmico e escolha do indicador

Foram pesados aproximadamente 0,2g de AC em matéria prima, o qual foi

transferido para Erlenmeyer de 150 mL, devidamente identificado, diluído com 25 mL de álcool etílico 96°GL e duas gotas do indicador selecionado. A seleção do indicador utilizado no método ocorreu de acordo com os resultados obtidos na titulação, sendo considerado aquele que conceda menos erros (para análise foram calculados o teor e desvio padrão relativo).

4.3.4 Cálculos utilizados durante a titulação

Para o cálculo da concentração foi utilizado as noções de Fator de análise (FA) e Fator de correção do titulante (FC). O Fator de análise corresponde a quantidade em massa do analito que reage com 1mL de uma solução reagente volumétrica padronizada com uma concentração conhecida. Enquanto o FC do titulante, corresponde ao volume teórico sobre o volume experimental, que foi calculado a partir do FA encontrado e massa pesada.

$$FC = \frac{m}{FA.(Vgasto - Vbranco)} \quad \text{ou} \quad FC = \frac{\text{volume teórico (mL)}}{\text{volume efetivo (mL)}} \quad (2)$$

Onde,

FC = Fator de correção

m= massa (mg)

FA= Fator de análise

Vgasto= volume gasto na titulação da amostra(mL)

Vbranco= volume gasto na titulação do branco (mL)

Ademais, aos cálculos de FA do AC e do FC foram realizados a determinação do teor em miligramas (mg) e em porcentagem (%) do analito (AC) a partir dos valores obtidos na titulação, utilizando as equações 3 e 4, respectivamente.

$$Teor (mg) = FA \cdot FC \cdot (Vgasto - Vbranco) \quad (3)$$

$$Teor (\%) = \frac{teor(mg)}{massa efetiva (mg)} \cdot 100 \quad (4)$$

Onde,

FC = Fator de correção

m = massa (mg)

FA = Fator de análise

Vgasto = volume gasto na titulação da amostra (mL)

Vbranco = volume gasto na titulação do branco (mL)

4.4 VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

A validação do método analítico foi realizada utilizando os parâmetros determinados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no documento oficial emitido pela Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 166, de 24 de julho de 2017.

Figura 6. Parâmetros de validação de um método analítico



Fonte: Autoria própria (2024).

4.4.1 Seletividade

Para garantir a seletividade quanto a identificação e quantificação do analito (ácido cinâmico) foi realizada a mistura deste a outros compostos químicos que geralmente são utilizados como excipientes e/ou adjuvantes de formulações farmacêuticas sólidas, uma vez que a amostra investigada também se encontra na forma de pó. A mistura de excipientes corresponde a presença de celulose (80%), amido (10%), glicolato (2,5%), croscarmelose (2,5%), estearato (2%), talco (2%) e aerosil (1%). Assim, as amostras preparadas continham uma mistura do analito (200mg), excipientes (200mg), 25mL de etanol 95% e indicador, sendo realizado a titulação em triplicata.

Além disso, para garantir que os resultados obtidos nesse estudo não sofressem alterações ocasionadas por interferentes da própria solução, foi realizado para cada ensaio testes em branco, que corresponderam à análise das amostras sem o analito.

4.4.2 Linearidade e limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

Para identificar a linearidade do método, ou seja, verificar se a resposta é proporcional a concentração do analito, foram estabelecidos cinco níveis diferentes do analito equivalente a 50, 80, 100, 120 e 150% da massa pesada. Nesse sentido, foram pesados, respectivamente, 100, 160, 200, 240 e 300 mg de AC para as amostras a serem tituladas, havendo no mínimo a realização de triplicata mais teste branco. Para a criação dos gráficos e cálculos acerca da equação da reta de regressão (y em x) pelo método dos mínimos quadrados, coeficientes angulares de correlação (r) e de determinação (r^2) dentre outras funções matemáticas, a ferramenta Excel da Microsoft Office.

A respeito dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), foram calculados a partir das fórmulas:

$$LD = \frac{3,3 \times \sigma}{IC} \quad (5)$$

$$LQ = \frac{10 \times \sigma}{IC} \quad (6)$$

em que, σ foi obtido pelo desvio padrão do intercepto com o eixo Y (σ) e pela inclinação das curvas (IC).

Quanto a avaliação da homoscedasticidade, esta foi realizada a partir do teste de Cochran, e a avaliação do coeficiente angular a partir do teste F (pela ANOVA) e valor de p (obtido pelos cálculos de regressão), sendo adotados em ambos o nível de significância de 5%. Os gráficos de dispersão dos resíduos foram elaborados a partir dos dados de regressão e desvios da curva.

4.4.3 Precisão

Para avaliar o parâmetro de precisão do método foram estabelecidos os seguintes passos: utilização do mesmo lote de ácido cinâmico; realizar duas vezes a titulação de seis réplicas a 100% (cem por cento) da concentração do teste individualmente preparadas. Ademais, o teste foi feito em dois dias diferentes, por operadores distintos, e a cada dia foi realizada a preparação de um novo titulante de mesma concentração que o primeiro dia, bem como foi feita uma nova padronização do mesmo.

Conforme indicado na RDC 166/17, a precisão deve ser demonstrada pela dispersão dos resultados e para isso utiliza-se o cálculo matemático de desvio padrão relativo (DPR), o qual consiste na razão do desvio padrão (DP) pela concentração média determinada (CMD).

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad (7)$$

Conforme previsto pela Coordenação geral de acreditação do INMETRO (INMETRO, 2020) e a Associação Internacional de Químicos Analíticos Oficiais (AOAC International, 2016), foram considerados os valores de DPR de até 2%, que

corresponde a fração mássica igual 1 e 100% do analito.

4.4.4 Exatidão

A avaliação da exatidão ocorreu conforme a determinação da recuperação média (R), pela relação entre a concentração média, determinada experimentalmente, e a concentração teórica. Os valores obtidos são correspondentes a cada nível de concentração da linearidade (baixo, médio e alto), onde foram feitos em triplicata. Além disso, devem ser calculados o DPR de cada concentração.

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica da amostra}} \times 100 \quad (8)$$

4.4.5 Robustez

Foi avaliada através da variação do volume do etanol, em 60 e 160% do volume padrão (25mL), ou seja, 15 e 40mL; variação do volume do indicador em 50 e 150% em relação ao volume padrão (50 μ L), respectivamente, 25 e 75 μ L; variação do tipo de etanol utilizado (95%) correspondente a diferentes teores (96 e 99%); e a variação de $\pm 20\%$ concentração de NaOH utilizada (0,1M), ou seja, 0,08 e 0,12M.

Para a realização da solução de NaOH nas diferentes concentrações foram necessárias a realização de padronizações utilizando o padrão primário biftalato de potássio, conforme descrito anteriormente no item 4.3.2, respeitando os cálculos respectivos para os fatores de correção (FC) dos ensaios de 0,08 e 0,12M.

Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados avaliados a partir do teor obtido em porcentagem (%), do valor de recuperação (%) e do desvio padrão relativo (DPR).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO POR VOLUMETRIA

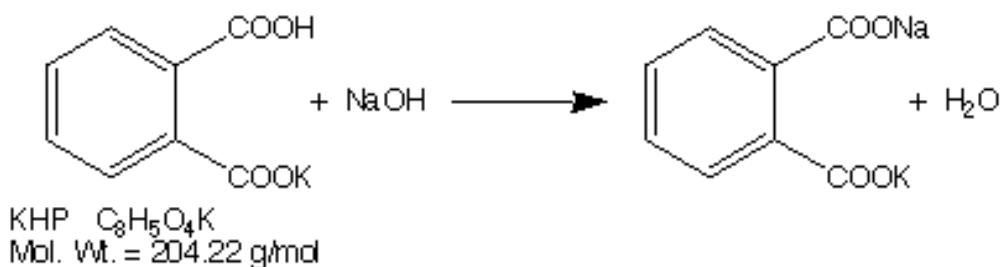
A volumetria ou titulometria, é um método clássico da química analítica experimental, capaz de quantificar um analito de interesse (amostra) por meio da reação química deste com outra substância em solução de concentração conhecida (solução-padrão). Diante disso, é possível calcular a quantidade do constituinte investigado, em decorrência da quantidade utilizada da solução padrão para a reação, que deve ser claramente determinado (Baccan *et al.*, 2001; Skoog *et al.*, 2015; 2023).

Mediante a característica altamente higroscópica do hidróxido de sódio, a qual interfere na precisão da pesagem da matéria prima, não é possível estabelecer devidamente a concentração da solução da mesma (Carr; Hage, 2011; Gomes *et al.*, 2021).

Nesse sentido, torna necessário que haja a padronização desta solução utilizando um padrão primário através do método de titulação do mesmo para garantir melhor exatidão do sistema (Brasil, 2019b). Desse modo, para fazer a volumetria do AC foi utilizado o NaOH como titulante, padronizado pelo KHP (Figura 7), e identificada a reação de neutralização (Equação 4) a partir da observação da alteração da cor, devido ao uso do indicador de pH.

A reação entre o biftalato de potássio e o hidróxido de sódio consistem em uma neutralização de proporção 1:1, a qual pode ser observada abaixo.

Figura 7. Padronização do Hidróxido de Sódio utilizando o Biftalato de potássio



Fonte: Princenton (2024).

A preparação do titulante e sua padronização ocorreram como descrito na

metodologia. Os dados obtidos na padronização (Tabela 1), junto ao fator de análise do KHP (20,42 mg/mL), para a solução do NaOH a 0,1 M, e a titulação em branco (0,1 mL) foram utilizados para o cálculo do fator de correção, para determinar o fator de correção, resultando em FC igual a 0,974, com um desvio padrão de 0,005.

Tabela 1. Valores da Padronização do Biftalato de potássio (KHP) no dia 1

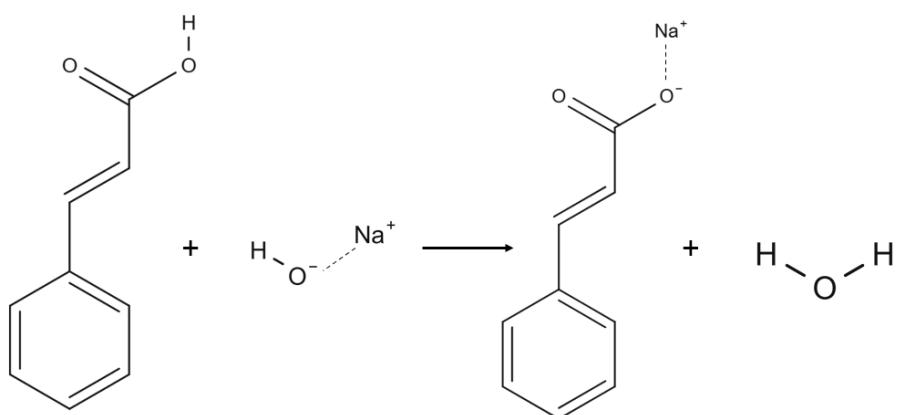
PADRONIZAÇÃO				
Amostras	Padrão (mg)	Volume gasto (mL)	Volume teórico (mL)	Fator de Correção (FC)
1	201,9	10,10	9,89	0,979
2	202,8	10,25	9,93	0,969
3	201,8	10,15	9,88	0,974

Fonte: Autoria própria (2024).

Após a padronização do titulante, foi realizada a titulação do ácido cinâmico para escolha do indicador e obtidos os teores e desvio padrão relativo (DPR). Para os cálculos dos teores de AC foram utilizados os dados da titulação, o FA do AC (cada mL NaOH 0,1M equivale a 14,815 mg AC) e o FC obtido anteriormente (0,974).

A reação do ácido cinâmico (AC) com o a solução do hidróxido de sódio (NaOH) também é uma reação de neutralização, uma vez que o NaOH é uma base forte que promove a ionização da solução, o hidrogênio (H^+) do grupo carboxila (-COOH) da molécula ($C_9H_8O_2$) interage com o a hidroxila (OH^-) do NaOH resultando na formação de molécula de água (H_2O), sendo formado também um sal ($C_9H_7NaO_2$). Tal qual pode ser observado:

Figura 8. Reação entre o Ácido Cinâmico (AC) e Hidróxido de Sódio (NaOH)



*Moléculas geradas pelo web-application MolView.

Fonte: Autoria própria (2024).

Para minimizar os erros de uma titulação ácido-base deve ser escolhido um indicador de pH adequado, que apresente uma mudança de cor que corresponda ao pH próximo ao ponto de equivalência. Outra medida que pode ser utilizada para minimizar possíveis erros durante a titulação ácido-base é a correção com um branco, medida também utilizada neste método (Skoog *et al.*, 2015).

Dessa maneira, para escolher qual o indicador a ser utilizado foram realizadas de maneira prévia, à validação analítica, a titulação do AC em duplicata com quatro diferentes indicadores. Os indicadores investigados foram a fenolftaleína, o azul de bromotimol, o vermelho de metila e o vermelho fenol.

Quadro 5. Características dos indicadores de pH

Indicador de pH	Intervalo de pH	Mudança de cor
Fenolftaleína	8,3 - 10	Incolor para vermelho
Azul de bromotimol	6,2 - 7,6	Amarelo para azul
Vermelho de metila	4,2 - 6,3	Vermelho para amarelo

Vermelho fenol	6,8 - 8,4	Amarelo para vermelho
----------------	-----------	-----------------------

Fonte: Adaptado de Skoog e colaboradores (2023).

Conforme pode ser observado na tabela 2, grande parte dos indicadores apresentaram um baixo DPR e teores de AC próximos à 100%, não apresentando diferença significativa entre eles, com exceção do indicador Vermelho de metila.

Tabela 2. Valores da titulação do Ácido cinâmico (AC) para escolha do indicador

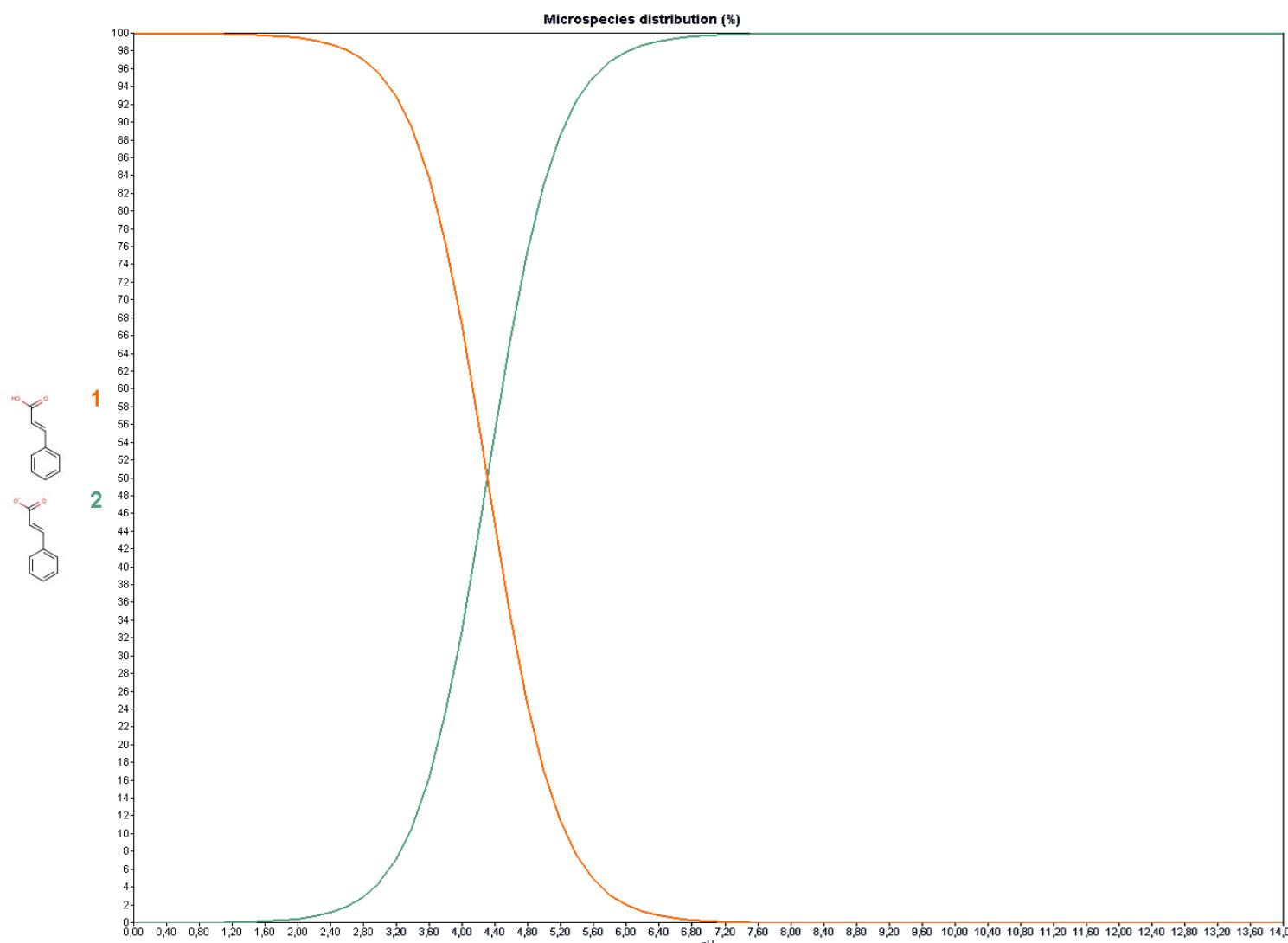
Indicadores de pH	Amostra	Massa de AC (mg)	Volume gasto de NaOH (mL)	Teor		DPR %
				mg	%	
Fenolftaleína	1	200,6	13,95	198,41	98,91	0,12
	2	200,2	13,90	197,69	98,75	
	Branco	-	0,20	-	-	
Azul de bromotimol	1	200,4	14,05	200,14	99,87	0,29
	2	200,5	14,00	199,42	99,46	
	Branco	-	0,18	-	-	
Vermelho de metila	1	200,3	13,60	193,36	96,53	5,52
	2	200,4	12,60	178,93	89,29	
	Branco	-	0,20	-	-	
Vermelho fenol	1	200,7	14,00	198,99	99,15	0,34

2	199,0	13,95	198,27	99,63
Branco	-	0,21	-	-

Fonte: Autoria própria (2024).

Vale salientar que dentre os indicadores avaliados, o vermelho de metila possui a menor faixa de pH, o que pode justificar seus baixos valores de teores e alto DPR, sendo este uma opção de indicador não viável para esse método. Isto ocorre devido a mudança do pH, na faixa de 4,2 – 6,3 (Quadro 5), sem a completa reação do AC com o NaOH. O pKa do AC é de 4,37 (Hu *et al.*, 2021) e sua neutralização deve ocorrer acima do pH 7,2, como é ilustrado na distribuição teórica da forma molecular/ionizada em função do pH, respectivamente representadas pela cor laranja (1) e verde (2) (Figura 9).

Figura 9. Distribuição teórica de espécies do ácido cinâmico (AC) em função do pH obtida no software Marvin



Legenda: Forma molecular do ácido cinâmico não ionizada em laranja (1) e ionizada em verde (2). Fonte: Autoria própria (2024).

Observa-se que a distribuição entre as formas molecular e ionizada ocorrem de maneira inversamente proporcional, uma vez que durante a adição do titulante na amostra é esperado a interação entre as substâncias e a consequente mudança de pH. Por conseguinte, nota-se que a partir do pH 7 ocorre a ionização completa da molécula, o que pode explicar o motivo de não haver diferenças significativas entre os indicadores que possuem viragem acima desse valor.

Nesse sentido, dentre as opções favoráveis, tomou-se a liberdade de selecionar o indicador Fenolftaleína, que possui uma faixa de pH de mudança de cor de 8,3 - 10, devido ao seu ótimo DPR (0,12%) e bons valores de teor de AC entre os indicadores. Adicionalmente, foi estabelecido o uso de 50 µL do indicador para a padronização dos experimentos.

5.2 VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR VOLUMETRIA

5.2.1 Seletividade

O método demonstrou-se seletivo para o AC, uma vez que, mesmo havendo a adição de excipientes nas amostras, com peso equivalente correspondendo a proporção do ativo:excipientes (50:50 m/m), os dados apresentaram teores em massa (mg) e em porcentagem (%) próximos à totalidade esperada, além de um desvio padrão pequeno, como pode ser observado na Tabela 3.

Tabela 3. Dados referentes a seletividade do Ácido cinâmico (AC)

SELETIVIDADE						
Amostra*	AC (mg)	Volume gasto (mL)	Teor do AC (mg)	Teor do AC (%)	Média (mg / %)	Desvio Padrão
1	200,9	14	199,11	99,11	201,28 / 100,00	0,78
2	200,8	14,2	202,00	100,60		

3 200,7 14,15 201,28 100,29

*As amostras contêm 200mg do insumo (AC), 200mg da mistura de excipientes (80% de celulose, 10% de amido, 2,5% de glicolato, 2,5% de croscarmelose, 2% de estearato, 2% de talco e 1% de aerosil).

Fonte: Autoria própria (2024).

5.2.2 Linearidade e limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

A área gráfica obtida foi proporcional as concentrações do analito e obteve-se os seguintes dados:

Tabela 4. Dados referentes a linearidade, curva de calibração, LD e LQ na validação do método analítico

LINEARIDADE								
%	Massa AC (mg)	Volumes gastos de NaOH 0,1M (mL)*					Desvio padrão	CV (%)
		n1	n2	n3	Média			
50	100	7,27	7,16	7,13	7,19	0,07	1,04	
80	160	11,19	11,21	11,27	11,23	0,04	0,36	
100	200	13,95	13,94	13,91	13,93	0,02	0,16	
120	240	16,72	16,77	16,57	16,69	0,10	0,62	
150	300	20,72	20,86	20,83	20,80	0,07	0,34	

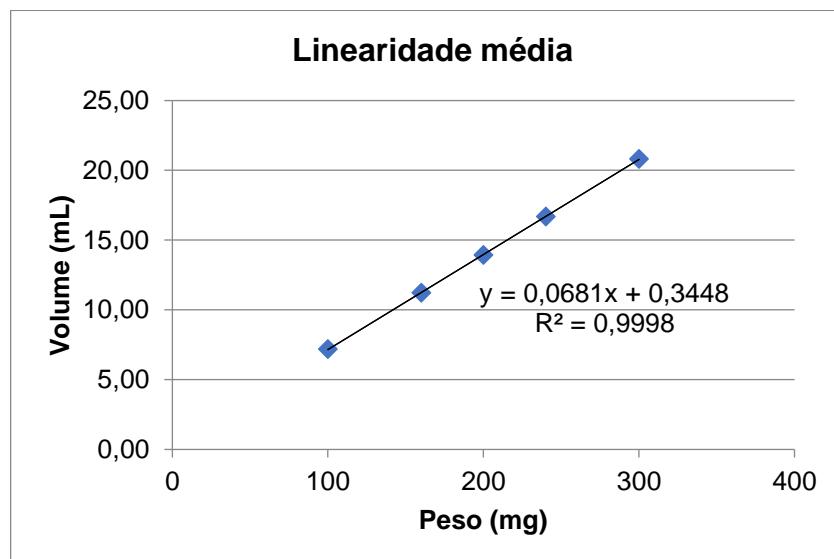
r^2	0,9998
LD (mg)	2,88
LQ (mg)	9,61

* Os volumes gastos receberam o tratamento de correção.

Legenda: CV: coeficiente de variação; LM: linearidade média; r: coeficiente de correlação; r^2 : coeficiente de determinação; LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação. Fonte: Autoria própria (2024).

Diante dos dados é observado um baixo coeficiente de variação (CV), bons valores de limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), além disso, o coeficiente de correlação (r) apresentado é 0,9999, ou seja, acima de 0,99 que de acordo com a RDC 166 de 2017, significa que o método apresenta linearidade. Ademais o coeficiente de determinação (r^2) é igual a 0,9998, o que significa que a variância dos dados obedece a uma ordem linear, ou seja, quanto maior o r^2 mais linear é o modelo. Assim, a variação em y em função de x pode ser aplicada pelo método linear, tal como pode ser observado no gráfico 1.

Gráfico 1. Resultado da análise de Linearidade Média



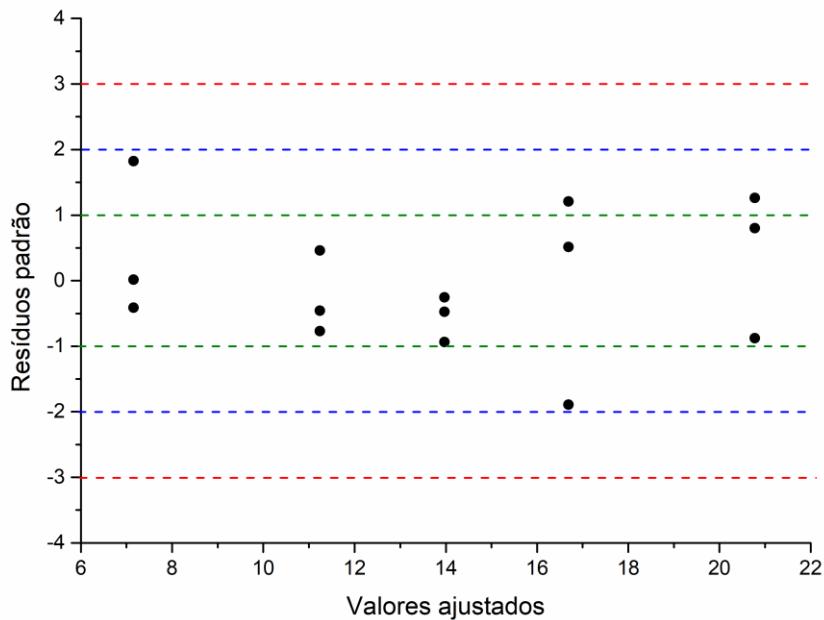
Fonte: Autoria própria (2024).

A homocedasticidade consiste em uma propriedade estatística utilizada para

analisar em modelos de regressões se a variância dos erros é constante. O valor C calculado foi de 0,4525, obtido pela razão da maior variância pelo somatório das variâncias. O valor obtido foi menor que o C crítico tabelado de 0,6838 (cinco níveis em triplicata), logo o erro existente independe da concentração investigada, por isso consideramos o presente modelo como homocedástico (Abe-matsumoto *et al.*, 2018; Estrella, 2023).

Bem como observado na plotagem de resíduos, é possível notar a distribuição de pontos ± 3 DP e de maneira aleatória o que sustenta a hipótese de independência dos erros, ou seja, não apresenta tendências (Gráfico 2). Os valores foram calculados a partir dos dados de regressão linear representados pela diferença entre os valores observados e esperados (Abe-matsumoto *et al.*, 2018; Chaves Júnior, 2023).

Gráfico 2. Plotagem de resíduos padronizados do Ácido cinâmico (AC)



Fonte: Autoria própria (2024).

Na avaliação dos coeficientes angulares, o valor-p estatisticamente confirma probabilidade da veracidade da hipótese nula (nenhum efeito), o valor obtido é muito baixo o que significa que é improvável que a hipótese nula seja verdadeira. Em outras palavras, o coeficiente angular é significativamente diferente de zero (Ferreira; Patino, 2015).

Ainda, para atestar a relação linear, pela aplicação do teste F, foi obtido um

valor de 75372, maior que o valor tabelado (4,67), descartando a hipótese nula, o que corrobora com o dado obtido de coeficiente de correlação, e confirmando que o método é linear (Ferreira; Patino, 2015; Chaves Júnior, 2023).

5.2.3 Precisão

O método investigado apresentou-se preciso, conforme pode ser observado na tabela 5 que demonstra os baixos valores de desvio padrão relativo (DPR).

Tabela 5. Dados referentes ao parâmetro de precisão do método analítico, expressa teor e DPR

Dia	%	Massa (mg)	Amostra	AC pesado (mg)	Gasto (mL)	Teor		Teor médio (%)	DPR (%)
						mg	%		
1	100	200	1	200,7	14,00	199,11	99,21	99,41	0,81
			2	200,9	14,00	199,11	99,11		
			3	200,6	13,95	198,39	98,90		
			4	200,2	13,91	197,81	98,81		
			5	201,3	14,29	203,30	100,99		
			6	200,9	14,05	199,83	99,47		
2	100	200	1	199,8	13,85	196,06	98,13	98,18	0,22
			2	200,8	13,90	196,78	98,00		
			3	201,5	13,95	197,49	98,01		
			4	199,9	13,90	196,78	98,44		

5	200,7	13,90	196,78	98,04
6	200,6	13,95	197,49	98,45

Fonte: Autoria própria (2024).

5.2.4 Exatidão

Os resultados obtidos na avaliação da exatidão estão presentes na tabela 6, o qual demonstrou nos diferentes níveis uma recuperação (em porcentagem) próxima dos 100%, o que indica que o método obteve uma excelente exatidão, além de um baixo valor de DPR.

Tabela 6. Dados referentes ao parâmetro de exatidão do método analítico, expressa teor (em mg e %), recuperação e DPR

EXATIDÃO						
%	Massa (mg)	Amostra	Teor		Recuperação (%)	DPR (%)
			mg	%		
50	100	1	102,44	102,03		
		2	101,00	100,40	100,81	1,07
		3	100,71	100,01		
100	200	1	199,11	99,21		
		2	199,11	99,11		
		3	198,39	98,90	99,41	0,81
		4	197,81	98,81		
		5	203,30	100,99		
		6	199,83	99,47		
150	300	1	296,21	98,71		
		2	298,67	99,36	99,09	0,35
		3	297,95	99,22		

Fonte: Autoria própria (2024).

5.2.5 Robustez

As variações experimentadas não interferiram significativamente nos ensaios, como pode ser observado na tabela 7 houveram bons valores de recuperação (próximos à 100%) e de DPR (menores que 2%). Logo, considera o método proposto como robusto.

Tabela 7. Dados referentes ao parâmetro de robustez a partir das variáveis e valores de recuperação e DPR obtidos

ROBUSTEZ			
Variação	Recuperação (%)	DPR (%)	
Volume etanol (mL)	15 mL	101,60	0,92
	40 mL	100,33	1,92
Volume indicador (µL)	25 µL	100,92	0,56
	75 µL	100,64	0,45
Tipo etanol (%)	96 %	100,34	0,77
	99 %	100,14	0,51
NaOH (M)	0,08 M	99,69	0,77
	0,12 M	98,95	0,48

*Os dados obtidos são resultados de ensaios realizados em triplicata.

Fonte: Autoria própria (2024).

Assim, os critérios dispostos na validação do estudo desenvolvido foram devidamente atestados. Logo, o cumprimento de todos os critérios necessários para validação desse método analítico, asseguram credibilidade à metodologia e a qualifica para a determinação do AC em matéria prima, ainda que na presença de outros excipientes comumente presentes em formulações sólidas.

6 CONCLUSÕES

- ✓ O método analítico desenvolvido atendeu o objetivo de utilizar a técnica de volumetria de neutralização para a determinação do AC em matéria-prima;
- ✓ Obtiveram-se bons resultados para o desenvolvimento do método ao utilizar técnicas para a padronização do titulante, como também a determinação de um indicador de pH adequado;
- ✓ Todos os parâmetros de validação de métodos preconizados pela ANVISA para este tipo de estudo foram atendidos;
- ✓ A validação do método analítico proposto utilizou de cálculos estatísticos para garantir a veracidade dos resultados;
- ✓ O método estudado apresentou-se seletivo, linear, homocedástico, preciso, exato e robusto para a determinação do AC;
- ✓ O presente estudo apresenta uma alternativa de análise de AC de fácil manuseamento laboratorial e com menores custos, diante da ausência de um método analítico clássico para esta substância em compêndios oficiais;

REFERÊNCIAS

ABE-MATSUMOTO, Lucile Tiemi *et al.* Validação de método analítico para o monitoramento de vitamina A em leites do Programa Viva Leite. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**, v. 6, n. 2, p. 67-73, 2018.

ADISAKWATTANA, Sirichai. Cinnamic acid and its derivatives: mechanisms for prevention and management of diabetes and its complications. **Nutrients**, v. 9, n. 2, p. 163, 2017.

AOAC International (*Association of Official Analytical Chemists International*). Official methods of analysis of AOAC International, in Guidelines for Standard Method Performance Requirements (Appendix F). Gaithersburg: AOAC International, 2016.

BACCAN, N., ANDRADE, J. C., GODINHO, O, E. S., BARONE. J.S. Química analítica qualitativa elementar (3^a ed.). São Paulo, Brasil: **Eds. Edgard Blucher**, 2001. ISBN 85-212-0296-2.

BŁASZCZYK, Natalia; ROSIAK, Angelina; KAŁUŻNA-CZAPLIŃSKA, Joanna. The potential role of cinnamon in human health. **Forests**, v. 12, n. 5, p. 648, 2021.

BLAZHEYEVSKIY, Mykola Ye *et al.* Titrimetric methods for determining cationic surfactants. **Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry**, v. 20, n. 3, p. 12-24, 2022.

BRASIL. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Farmacopeia Brasileira**, 6^a edição, Volume I. Brasília, 2019b.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Farmacopeia Brasileira**, 6^a Ed. Volume II – Monografias Insumos Farmacêuticos e Especialidades. Brasília, 2019a.

BRASIL. AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA (ANVISA). Notícia. **Anvisa é novo membro do ICH**: Agência foi aceita como membro do *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH). O grupo reúne autoridades reguladoras e associações de indústrias farmacêuticas para discutir registro de medicamentos. Brasília, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2018/anvisa-e-novo-membro-do-ich>. Acesso em: 14 de outubro de 2024.

BRASIL. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2017.

BREAUX, Jay; JONES, Kevin; BOULAS, Pierre. Analytical methods development and validation. **Pharm. Technol.**, v. 1, p. 6-13, 2003.

CARR, J. D.; HAGE, D. **Química analítica e análise quantitativa**. Rio de Janeiro: Pearson, 2011.

CHAVES JÚNIOR, José Venâncio. Obtenção de sal de metformina e ácido ferúlico com aumento de solubilidade aquosa e sua aplicação no desenvolvimento de comprimidos. 2023. 167f. Tese (Doutorado em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2023.

CHIKANBANJAR, Neera; SEMWAL, Nidhi; JYAKHWA, Ureena. A review article on analytical method validation. **J. Pharm. Innov.**, v. 1, p. 48-58, 2020.

CHRISTIAN, G. D.; DASGUPTA, P. K.; SCHUG, K. A. **Analytical chemistry**. 7. ed. Hoboken: J. Wiley & Sons, 2014.

DE CARO, Cosimo *et al.* **Titrimetry with Automated Instruments**. 2023. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/370600197_5623_418_PM_USP-NF_Titrimetry_with_Automated_Instruments. Acesso em: 13 de outubro de 2024.

DE, Prithwiraj; BALTAS, Michel; BEDOS-BELVAL, Florence. Cinnamic acid derivatives as anticancer agents-a review. **Current medicinal chemistry**, v. 18, n. 11, p. 1672-1703, 2011.

DIONISIO, Kathie L. *et al.* The Chemical and Products Database, a resource for exposure-relevant data on chemicals in consumer products. **Scientific data**, v. 5, n. 1, p. 1-9, 2018.

DOLTADE, Mayuri; SAUDAGAR, Ravindranath. The analytical method development and validation: a review. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, v. 9, n. 3, p. 563-570, 2019.

DRAKONTAEIDI, Aliki; PONTIKI, Eleni. Multi-target-directed cinnamic acid hybrids targeting Alzheimer's disease. **International journal of molecular sciences**, v. 25, n. 1, p. 582, 2024.

EC. Commission implementing Regulation (EU) No 872/2012 of 1 October 2012 adopting the list of flavouring substances provided for by Regulation (EC) No 2232/96 of the European Parliament and of the Council, introducing it in Annex I to Regulation (EC) No 1334/2008 of the European Parliament and of the Council and repealing Commission Regulation (EC) No 1565/2000 and Commission Decision 1999/217/EC Text with EEA relevance. **Official Journal of the European Union**, v. L267, p. 1-161, 2012. Disponível em: http://data.europa.eu/eli/reg_impl/2012/872/oj. Acesso em: 12 de outubro de 2024.

ERNAWATI, Teni *et al.* Cinnamic acid derivatives as α -glucosidase inhibitor agents. **Indonesian Journal of Chemistry**, v. 17, n. 1, p. 151-160, 2017.

ESTRELLA, Bruna Castello Longo. Estudo de casos da aplicabilidade do teste T-pareado e da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados: uma abordagem estatística aplicada à Química Analítica. 2023. 56f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Bacharel em Química) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Rio de Janeiro, 2023.

FERREIRA, Juliana Carvalho; PATINO, Cecilia Maria. O que realmente significa o valor-p?. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 41, p. 485-485, 2015.

FOTOPOULOS, Ioannis; HADJIPAVLOU-LITINA, Dimitra. Approaches for the discovery of cinnamic acid derivatives with anticancer potential. **Expert Opinion on Drug Discovery**, p. 1-11, 2024.

FRANÇA, S. B. *et al.* Synthesis, applications and Structure-Activity Relationship (SAR) of cinnamic acid derivatives: a review. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 1, p. e28010111691-e28010111691, 2021.

GARG, Nidhi; GOYAL, Anju; DAS, Payal. Recent Advances and Future Perspectives in Volumetric Analysis. **Advanced Techniques of Analytical Chemistry: Volume 1**, v. 1, p. 16, 2022.

GEORGIEVNA, Yusufova Sabina. **BASICS OF TITRIMETRIC METHODS OF ANALYSIS. Spectrum Journal of Innovation, Reforms and Development**, v. 20, p. 61-63, 2023.

GOMES, P. H. *et al.* SÍNTESE DE ÉSTERES DERIVADOS DO ÁCIDO CINÂMICO CANDIDATOS A AGENTES ANTIMICROBIANOS. In: **Congresso de Ensino Pesquisa e Extensão-CONEPE**. 2014.

GOMES, Victor Valentim *et al.* Percepção de Erros Experimentais em Análises Químicas Quantitativas por Alunos de Graduação. **Ensaios e Ciência C Biológicas Agrárias e da Saúde**, v. 25, n. 5-esp., p. 796-801, 2021.

GUNIA-KRZYŻAK, Agnieszka *et al.* Cinnamic acid derivatives in cosmetics: current use and future prospects. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 40, n. 4, p. 356-366, 2018.

GUZMAN, Juan David. Natural cinnamic acids, synthetic derivatives and hybrids with antimicrobial activity. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 19292-19349, 2014.

HU, Yi *et al.* Influence of the pKa Value of Cinnamic Acid and P-Hydroxycinnamic Acid on the Solubility of a Lurasidone Hydrochloride-Based Coamorphous System. **ACS omega**, v. 6, n. 4, p. 3106-3119, 2021.

ICH. International commission on harmonisation. **ICH Q2 (R2) validation of analytical procedures**, v2, 2023.

INDRIYANTI, Erwin; PRAHASIWI, Masitoh Suryaning. Synthesis of cinnamic acid based on Perkin reaction using sonochemical method and its potential as photoprotective agent. **JKPK (Jurnal Kimia dan Pendidikan Kimia)**, v. 5, n. 1, p. 54-61, 2020.

INMETRO. COORDENAÇÃO GERAL DE ACREDITAÇÃO. Orientação Sobre Validação De Métodos Analíticos: Documento de caráter orientativo. DOQ-CGCRE-008, Revisão 09, JUN/2020. INMETRO, 2020. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/pesquisa_link.asp?seq_tipo_documento=5&cod_uo_numeracao=00774&num_documento=008. Acesso em: 10 de outubro de 2024.

JEONG, Seung-Hyun *et al.* A sensitive UPLC-ESI-MS/MS method for the quantification of cinnamic acid in vivo and in vitro: Application to pharmacokinetic and protein binding study in human plasma. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, v.

50, p. 159-172, 2020.

KARATAS, Ozkan *et al.* Cinnamic acid decreases periodontal inflammation and alveolar bone loss in experimental periodontitis. **Journal of Periodontal Research**, v. 55, n. 5, p. 676-685, 2020.

LAVANYA, G. *et al.* Analytical method validation: an updated review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 4, n. 4, p. 1280, 2013.

LETIZIA, C. S. *et al.* Fragrance material review on cinnamic acid. **Food and chemical toxicology**, v. 43, n. 6, p. 925-943, 2005.

LI, Xing-Nuo *et al.* Cinnamic acid derivatives: inhibitory activity against *Escherichia coli* β -glucuronidase and structure–activity relationships. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 35, n. 1, p. 1372-1378, 2020.

LIMA, G. D. A. *et al.* Synthesis and antimetastatic activity evaluation of cinnamic acid derivatives containing 1, 2, 3-triazolic portions. **Toxicology in Vitro**, v. 53, p. 1-9, 2018.

MARCUCCI, Maria Cristina *et al.* Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Química Nova**, v. 19, n. 5, p. 529-536, 1996.

MARSON, Breno M. *et al.* Validation of analytical methods in a pharmaceutical quality system: An overview focused on HPLC methods. **Química Nova**, v. 43, p. 1190-1203, 2020.

MASLOV, Olexander *et al.* Development and validation of a titrimetric method for quantitative determination of free organic acids in green tea leaves. **Pharmakeftiki**, v. 33, n. 4, p. 304-11, 2021.

MIELECKI, Marcin; LESYNG, Bogdan. Cinnamic acid derivatives as inhibitors of oncogenic protein kinases—structure, mechanisms and biomedical effects. **Current Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 10, p. 954-982, 2016.

MINGOIA, Marina *et al.* Synthesis and biological evaluation of novel cinnamic acid-based antimicrobials. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 2, p. 228, 2022.

MORAVSKA, O. V.; LEVYTSKYY, T. R.; VOVK, S. O. Titrimetric method determination of the content of the mass part of silicium in feed additives. **Ukrainian Journal of Ecology**, v. 10, n. 1, p. 62-65, 2020.

OLADIMEJI, Olawale H. *et al.* Evaluation of antioxidant activity of cinnamic acid and some of its derivatives. **Eur. Chem. Bull.**, v. 8, n. 7, p. 224-226, 2019.

PATHURI, Rajani *et al.* A review on analytical method development and validation of pharmaceutical technology. **Journal of Current Pharma Research**, v. 3, n. 2, p. 855, 2013.

PEPERIDOU, Aikaterini *et al.* Multifunctional cinnamic acid derivatives. **Molecules**, v. 22, n. 8, p. 1247, 2017.

PIGERA, S. *et al.* Quantification of metabolite cinnamic acid of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) in human plasma. **Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka**, v. 51, n. 1, 2023.

PONTIKI, Eleni *et al.* Novel cinnamic acid derivatives as antioxidant and anticancer agents: Design, synthesis and modeling studies. **Molecules**, v. 19, n. 7, p. 9655-9674, 2014.

PRINCETON. **Chemistry**: The reaction of NaOH with KHP is shown below. 2024. Disponível em: <https://www.princeton.edu/~rpl/Labs/fall/NaOH2.html>. Acesso em: 30 de setembro de 2024.

PUBCHEM. **Cinnamic acid**. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cinnamic-acid>. Acesso em: 10 de outubro de 2024.

RAJAN, V. Rele; TIWATANE, Prathamesh P. A Validated Simple Titrimetric Method for the Quantitative determination of Isoxsuprine hydrochloride from Pharmaceutical dosages. **Asian Journal of Research in Chemistry**, v. 13, n. 3, p. 187-189, 2020.

RAPOSO, Francisco; IBELLI-BIANCO, Carolina. Performance parameters for analytical method validation: Controversies and discrepancies among numerous guidelines. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 129, p. 115913, 2020.

RATH, Susanne; MARTÍNEZ-MEJIA, Mónica Johanna; SCHRÖDER, Cláudia Hoffmann Kowalski. Considerações e implicações práticas do guia de validação e controle de qualidade analítica de fármacos em produtos para alimentação animal e medicamentos veterinários. **Química Nova**, v. 38, n. 05, p. 697-708, 2015.

RAVISANKAR, Panchumarthy *et al.* A review on step-by-step analytical method validation. **IOSR J Pharm**, v. 5, n. 10, p. 7-19, 2015.

RAY, S. **How is titrimetric analysis calculated? - Pharmacy Scope**. Disponível em: <<https://pharmacyscope.com/how-is-titrimetric-analysis-calculated/>>. Acesso em: 7 de outubro de 2024.

RODRIGUES, Michelle Peixoto *et al.* Synthesis of cinnamic acid derivatives and leishmanicidal activity against *Leishmania braziliensis*. **European journal of medicinal chemistry**, v. 183, p. 111688, 2019.

RUWIZHI, Ngonidzashe; ADERIBIGBE, Blessing Atim. Cinnamic acid derivatives and their biological efficacy. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 16, p. 5712, 2020.

SAFAEIAN, Leila *et al.* Cardiovascular protective effects of cinnamic acid as a natural phenolic acid: a review. **Archives of Physiology and Biochemistry**, p. 1-11, 2024.

SEBBEN, Viviane Cristina *et al.* Validação de metodologia analítica e estudo de estabilidade para quantificação sérica de paracetamol. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, p. 143-148, 2010.

SHARMA, Shivani; GOYAL, Swapnil; CHAUHAN, Kalindi. A review on analytical

method development and validation. **International Journal of Applied Pharmaceutics**, v. 10, n. 6, p. 8-15, 2018.

SKOOG, Douglas A.; WEST, Donald M.; HOLLER, F J.; CROUCH, Stanley R. **Fundamentos de Química Analítica**: Tradução da 9^a edição norte-americana. São Paulo: Cengage Learning Brasil, 2015. E-book. ISBN 9788522121373.

SKOOG, Douglas A.; WEST, Donald M.; HOLLER, F J.; *et al.* **Fundamentos de química analítica**. São Paulo: Cengage Learning Brasil, 2023. E-book. ISBN 9786555584387.

SON, Jaewoo *et al.* Production of trans-cinnamic acid by whole-cell bioconversion from L-phenylalanine in engineered *Corynebacterium glutamicum*. **Microbial Cell Factories**, v. 20, p. 1-12, 2021.

SOUZA, J. P. A. Estudo de ancoragem molecular de derivados de ácido cinâmico frente às enzimas do ciclo replicativo do hiv-1. 2015. 91 f. TCC (Graduação) - Curso de Licenciatura em Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2015.

SOUZA, Kelly Carla Almeida de; ABREU, Heber dos Santos. Biotecnologia aplicada ao estudo da lignificação. **Floresta e Ambiente**, v. 14, n. 1, p. 93-109, 2007.

SOVA, Matej. Antioxidant and antimicrobial activities of cinnamic acid derivatives. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 12, n. 8, p. 749-767, 2012.

VOGT, Thomas. Phenylpropanoid biosynthesis. **Molecular plant**, v. 3, n. 1, p. 2-20, 2010.

WANG, Yan; GENG, Jinling; ZHU, Zhiwei. A Comprehensive Teaching Laboratory Program on Titration Analysis: Transition from Classic to Modern Approaches. **Journal of Chemical Education**, v. 101, n. 2, p. 612-620, 2024.

WHETTEN, R.W.; MACKAY, J.J.; SEDEROFF, R.R. Recent advances in understanding lignin bio-synthesis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 49, p.585-609, 1998.

YILMAZ, Sevdan; SOVA, Matej; ERGÜN, Sebahattin. Antimicrobial activity of trans-cinnamic acid and commonly used antibiotics against important fish pathogens and nonpathogenic isolates. **Journal of Applied Microbiology**, v. 125, n. 6, p. 1714-1727, 2018.

