Universidade de São Paulo
Instituto de Química de São Carlos

Determinação de ácido ascórbico por técnicas eletroquímicas e cromatográficas. Uma comparação estatística de desempenho.

Pollyana Ferreira da Silva

**São Carlos - SP
2015**

Pollyana Ferreira da Silva

Determinação de ácido ascórbico por técnicas eletroquímicas e cromatográficas. Uma comparação estatística de desempenho

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de pós-Graduação em Química do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Química Analítica e Inorgânica.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Antônio Spínola Machado

São Carlos-SP

2015

Dedico este trabalho:

Aos meus pais, Vanda e Gilmar, e a minha irmã, Larissa, e ao Yuri por sempre estarem ao meu lado e me ajudarem nos momentos difíceis, e, principalmente, pelos momentos felizes.

“A necessidade é a mãe da invenção”

Platão

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, pelas bênçãos, oportunidades e conquistas que me tem concedido.

À Universidade de São Paulo, pela oportunidade de desenvolvimento do mestrado.

Ao CNPq, pelo auxílio concedido para o desenvolvimento da pesquisa.

Aos meus pais, Vanda e Gilmar, e a minha irmã, Larissa, por serem a base da minha formação pessoal e profissional.

Ao Yuri, pelo companheirismo, carinho, compreensão e paciência.

Ao Prof. Dr. Sergio Antônio Spínola Machado, pela confiança, ajuda e incentivo durante o mestrado.

A todos do GMEME, especialmente ao Paulo Raymundo, pela colaboração.

Aos amigos: Érica, Bruna e Ricardo, especialmente a Érica, pela amizade, companheirismo, carinho, ajuda, “estudos em grupo”, simplesmente por terem sido minha família e fazerem parte da minha vida.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, muito obrigada!

Resumo

As técnicas de voltametria de pulso diferencial e de cromatografia líquida de alta eficiência foram utilizadas para a detecção do ácido ascórbico (AA) em amostras farmacêuticas. O eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas de antimônio ancoradas em nanotubos de carbono de paredes múltiplas foi utilizado para a determinação eletroanalítica de ácido ascórbico. Parâmetros como eletrólito suporte, volume adicionado do nanocompósito à superfície do eletrodo, pH do eletrólito, amplitude e incremento de potencial foram avaliados e definidos os que obtiveram os melhores resultados. A curva analítica obtida para a determinação de AA com concentrações entre 291-698 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em comprimidos pelo método eletroanalítico apresentou boa linearidade (0,998) e limites de detecção e quantificação 0,0235 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 0,0783 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. O método cromatográfico utilizado foi validado e a curva analítica obtida para a determinação de AA com concentrações entre 291-698 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em comprimidos através desse método apresentou boa linearidade (0,998) e limites de detecção e quantificação 0,0594 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 0,1981 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Os resultados obtidos foram validados comparados estatisticamente pelo método de regressão linear descrito por Miller e Miller¹, para avaliar a equivalência entre os métodos foi utilizado-se um teste t de Student pareado, que confirmou a equivalência dos métodos estudados para esta aplicação.

Palavras Chave: Eletroanálise, Cromatografia líquida de alta eficiência, comparação estatística, ácido ascórbico.

Índice de Figuras

Figura 1 - Estrutura do ácido ascórbico.....	3
Figura 2 - Equilíbrio Ceto-enólico do ácido ascórbico	3
Figura 3 - Representação da reação de oxidação do ácido ascórbico.....	5
Figura 4 - Micrografias dos diferentes tipos de nanotubos de carbono	6
Figura 5 - Forma geral dos limites de confiança para uma concentração calculada	12
Figura 6 - Método de adição de padrão	16
Figura 7 - Uso de linhas de regressão para comparação de métodos analíticos	18
Figura 8 - Caracterização do MWCNT (a) e MWCNT-SbNPs (b) por FEG e EDX	26
Figura 9 - Voltamogramas cíclicos obtidos para os eletrodos de carbono vítreo não modificado, MWCNT e MWCNT-SbNPs. Eletrólito HCl 0,5 mol L ⁻¹ e velocidade de varredura de 50 mV s ⁻¹	27
Figura 10 - Definição do eletrólito Suporte – Voltametria de Pulso Diferencial do eletrodo MWCNT-SbNPs nos diferentes eletrólitos contendo AA 521,3 μmol L ⁻¹ incremento de potencial 10,5 mV, amplitude 50 mV.	28
Figura 11 – Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em PBS 0,1 mol L ⁻¹ contendo 521,3 μmol L ⁻¹ de ácido ascórbico, pH 6,8, para os eletrodos GC, MWCNT e MWCNT-SbNPs; incremento de potencial 10,5 mV e amplitude 50 mV.....	29
Figura 12 - Relação entre a variação de volume de suspensão adicionado à superfície do eletrodo de GC e os valores de IPA e EPA	30
Figura 13 - Relação entre a variação de volume de suspensão adicionado à superfície do eletrodo de GC e o valor de Θ	31
Figura 14 - Voltamogramas de pulso diferencial em PBS 0,1 mol L ⁻¹ em diferentes pHs contendo 476 μmol L ⁻¹ ; amplitude 50mV e incremento de potencial 10,5mV.....	32
Figura 15 - Relação entre a variação do pH do PBS 0,1 mol L ⁻¹ e os valores de IPA e EPA	32
Figura 16 - Relação entre a variação do pH do PBS 0,1molL ⁻¹ e os valores de b	33
Figura 17 - Relação entre a variação da amplitude e os valores de I_{PA} e E_{PA} em PBS 0,1 mol L⁻¹ pH 6,8.....	35
Figura 18 - Relação entre a variação da amplitude e os valores do coeficiente angular da curva analítica em PBS 0,1 mol L⁻¹ pH 6,8.....	35
Figura 19 - Relação entre a variação do incremento de potencial e os valores de I _{PA} e E _{PA} em PBS 0,1 mol L ⁻¹ pH 6,8.	36
Figura 20 - Relação entre a variação do incremento de potencial e os valores do coeficiente angular da curva analítica em PBS 0,1 mol L ⁻¹ pH 6,8.....	37
Figura 21 - Voltamogramas de pulso diferencial para concentrações crescentes de AA – entre 291 e 698 μmol L ⁻¹ - em PBS 0,1 mol L ⁻¹ ; amplitude 50 mV e incremento de potencial 10,5 mV - Determinação de AA em soluções padrão.	38

Figura 22 - Gráfico médio das curvas analíticas (n=5) para concentrações crescente de AA (291, 338, 385, 431, 476, 521, 566, 610, 654, 698 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em PBS 0,1 mol L^{-1} , amplitude 50 mV e incremento de potencial 10,5 mV - Determinação de AA em Soluções Padrão.	38
Figura 23 - Voltamogramas de pulso diferencial para concentrações crescentes de AA – entre 291 e 698 $\mu\text{mol L}^{-1}$ - em PBS 0,1 mol L^{-1} ; amplitude 50 mV e incremento de potencial 10,5 mV - Determinação de AA em comprimidos.....	40
Figura 24 - Gráfico médio das curvas analíticas (n=5) para concentrações crescentes de AA (291, 338, 385, 431, 476, 521, 566, 610, 654, 698 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em PBS 0,1 mol L^{-1} , amplitude 50 mV e incremento de potencial 10,5 mV - Determinação de AA em Comprimidos.	40
Figura 25 - Cromatograma do AA na concentração 476 $\mu\text{mol L}^{-1}$. FM: Ácido acético 2%, fluxo 1,0 mL min^{-1} , Volume de Injeção: 20 μL , Temperatura da coluna: $\sim 25^{\circ}\text{C}$	43
Figura 26 - Cromatograma obtido para amostra comprimido - demonstração da seletividade do método. FM: Ácido acético 2%, fluxo 1,0 mL min^{-1} , Volume de Injeção: 20 μL , Temperatura da coluna: $\sim 25^{\circ}\text{C}$. [AA] 476 $\mu\text{mol L}^{-1}$	44
Figura 27 - Gráfico médio das curvas analíticas (n=5) para concentrações crescentes de AA (291, 338, 385, 431, 476, 521, 566, 610, 654, 698 $\mu\text{mol L}^{-1}$). FM: Ácido acético 2%; vazão: 1,0 mL min^{-1} ; VI: 20 μL , T_{col} : 25°C - Determinação de AA em soluções padrão.	46
Figura 28 - Gráfico médio das curvas analíticas (n=5) para concentrações crescentes de AA (291, 338, 385, 431, 476, 521, 566, 610, 654, 698 $\mu\text{mol L}^{-1}$). FM: Ácido acético 2%; vazão: 1,0 mL min^{-1} ; VI: 20 μL , T_{col} : 25°C - Determinação de AA em comprimidos.	46
Figura 29 – Efeito de matriz na análise cromatográfica, comparação das curvas analíticas médias para concentrações crescentes de AA (291, 338, 385, 431, 476, 521, 566, 610, 654, 698 $\mu\text{mol L}^{-1}$) obtidas na análise dos padrões e da amostra de comprimido. FM: Ácido acético 2%; vazão: 1,0 mL min^{-1} ; VI: 20 μL , T_{col} : 25°C	47
Figura 30 - Gráfico de regressão linear dos valores obtidos pelas técnicas DPV e HPLC para detecção de AA em soluções padrão.	49
Figura 31 - Gráfico de regressão linear dos valores obtidos pelas técnicas DPV e HPLC para detecção de AA em amostras de comprimido.	49

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Parâmetros utilizados para as técnicas de voltametria cíclica e de pulso diferencial	21
Tabela 2 - Parâmetros Utilizados pela técnica cromatográfica.....	23
Tabela 3 - Descrição do preparo das soluções estoque de padrão de concentração 1mg mL ⁻¹	23
Tabela 4 - Descrição do preparo das soluções para injeção cromatográfica a partir das soluções estoque de concentração 1mg mL ⁻¹	24
Tabela 5 - Composição dos materiais, análise semi-quantitativa (EDX)	25
Tabela 6 - Resultados dos parâmetros de validação do método eletroanalítico para determinação de AA em soluções padrão.....	39
Tabela 7 - Resultados dos parâmetros de validação do método eletroanalítico para determinação de AA em amostras de comprimido.....	41
Tabela 8- Resultados dos parâmetros de validação do método eletroanalítico para determinação de AA por HPLC	47

Lista de Abreviaturas e Siglas

AA	Ácido Ascórbico
CNT	Carbon Nanotubes (Nanotubos de Carbono)
DPR	Desvio Padrão Relativo
DPV	Differential Pulse Voltammetry (Voltametria de Pulso Diferencial)
EDX	Espectroscopia de raios X por dispersão em energia
E _{PA}	Potencial de Pico Anódico
FM	Fase móvel
FEG	Microscopia Eletrônica de Varredura de Efeito de Campo
GC	Glass Carbon Electrode (Eletrodo de Carbono Vítreo)
GL	Graus de Liberdade
GMEME	Grupo de Materiais Eletroquímicos e Métodos Eletroanalíticos,
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
I _{PA}	Corrente de Pico Anódico
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MWCNT	Multi-Walled carbon nanotubes (Nanotubos de Carbono de Paredes Múltiplas)
MWCNT-SbNPs	Nanotubos de carbono de paredes múltiplas modificados com nanopartículas de antimônio
NPs	Nanopartículas
VC	Voltametria Cíclica
t _R	Tempo de Retenção
UV-Vis	Ultravioleta-Visível

Sumário

1. Introdução.....	3
1.1 Ácido ascórbico.....	3
1.2 Análises de ácido ascórbico	4
1.3 Análise Eletroquímica de ácido ascórbico	4
1.3.1 Nanotubos de Carbono	5
1.3.2 Nanopartículas de Antimônio	7
1.4 Métodos Cromatográficos.....	8
1.5 Validação de métodos analíticos	9
1.5.1 Linearidade	9
1.5.2 Sensibilidade.....	12
1.5.3 Exatidão	13
1.5.4 Precisão	13
1.5.5 Limite de detecção e Limite de quantificação.....	14
1.6 Método de adição de padrões	15
1.7 Uso de linhas regressão para comparar métodos analíticos	16
2 Objetivos.....	19
3 Materiais e métodos.....	20
3.1 Metodologia eletroquímica utilizada para determinação de ácido ascórbico	20
3.1.1 Funcionalização dos Nanotubos de Carbono de Paredes Múltiplas (MWCNT).....	20
3.1.2 Modificação dos nanotubos de carbono com nanopartículas de antimônio MWCNT-SbNPs.....	20
3.1.3 Caracterização morfológica e estrutural dos nanocampósitos	20
3.1.4 Modificação dos eletrodos de carbono vítreo com nanotubos de carbono	21
3.1.5 Caracterização eletroquímica dos sensores	21
3.1.6 Comportamento eletroquímico do ácido ascórbico sobre a superfície dos sensores MWCNT-SbNPs.....	21
3.1.7 Utilização de eletrodos modificados para a determinação de ácido ascórbico.....	22
3.2 Metodologia cromatográfica utilizada para determinação de ácido ascórbico.	22
3.2.1 Parâmetros Utilizados na análise cromatográfica.....	22

3.2.2	Preparo das Soluções padrão de AA.....	23
3.2.3	Preparo das amostras de comprimido	24
4	Resultados e Discussão	25
4.1	Caracterização estrutural e morfológica do nanocompósito MWCNT-SbNPs.....	25
4.2	Caracterização eletroquímica do nanocompósito MWCNT-SbNPs	26
4.3	Análise Eletroquímica do ácido ascórbico.....	27
4.3.1	Avaliação do Eletrólito suporte para determinação de ácido ascórbico com eletrodos de carbono vítreo modificados com MWCNT-SbNPs	27
4.3.2	Efeito do MWCNT-SbNPs na superfície do eletrodo de carbono vítreo para oxidação do ácido ascórbico	29
4.3.3	Otimização do volume de suspensão de MWCNT-SbNPs	30
4.3.4	Estudo do pH	31
4.3.5	Otimização dos parâmetros da Voltametria de Pulso Diferencial.....	34
4.4	Validação Eletroanalítica de ácido ascórbico	37
4.4.1	Obtenção da Curva Analítica média do AA padrão em PBS 0,1molL ⁻¹	38
4.3.2	Obtenção da Curva Analítica média do AA em amostras de comprimidos.....	40
4.5	Análise Cromatográfica	43
4.5.1	Validação da Metodologia Cromatográfica	45
4.5.2	Efeito de Matriz.....	47
4.6	Comparação Estatística dos métodos analíticos de determinação do AA pelo método de regressão linear.....	48
5	Conclusão	51
6	Referências Bibliográficas	52

1. Introdução

1.1 Ácido ascórbico

O ácido L-ascórbico ou vitamina C, Figura 1, é um carboidrato com dois prótons dissociáveis (pK_1 4,04 e pK_2 11,25), sua basicidade deve-se a dupla ligação (vinil) que permite o deslocamento eletrônico entre os grupos hidroxila, formando o equilíbrio ceto-enólico, Figura 2, sendo sua forma enólica a mais estável.²

Figura 1 - Estrutura do ácido ascórbico

Figura 2 - Equilíbrio Ceto-enólico do ácido ascórbico

Esse composto é um excelente agente redutor devido a sua fácil oxidação ao ácido dehidroascórbico. Essa vitamina hidrossolúvel participa da síntese do colágeno como co-fator das enzimas *lisil* e *prolil hidroxilases*, responsáveis pela formação e estabilização do colágeno tripla hélice. Além disso, o ácido ascórbico auxilia no sistema imunológico protegendo contra diversas doenças provocadas por radicais livres.

A vitamina C pode ser encontrada em diversos alimentos como frutas cítricas, laranja, acerola, limão, e vegetais, alface, brócolis, rúcula. Esse ácido e alguns de seus sais também têm sido utilizados pela indústria alimentícia como conservantes e aditivos.³

1.2 Análises de ácido ascórbico

A determinação do ácido ascórbico pode ser realizada por diferentes técnicas como: a titulação com uma solução oxidante (normalmente utiliza-se iodeto de potássio), método padrão utilizado pela farmacopeia brasileira para determinação desse composto em medicamentos⁴, a cromatografia líquida de alta eficiência que pode ser utilizada para sua determinação em amostras aquosas, alimentícias e fluidos biológicos, claro, desde que sejam utilizados métodos eficientes de extração⁵, espectrometria UV-Vis⁶ e outras técnicas.

Além das técnicas anteriormente citadas, há também as técnicas eletroanalíticas que podem ser opções frente as anteriores devido a possibilidade de aplicação em diversas matrizes, assim como as técnicas cromatográficas, no entanto, possibilitando, na maioria das vezes, a análise direta da amostra, ou seja, sem que sejam necessários tratamentos e quando o pré-tratamento de amostras torna-se necessário, esses procedimentos são mais simples e demandam menor tempo e custo, quando comparados aos realizados previamente a análises cromatográficas.

As técnicas eletroanalíticas relacionam medidas de quantidades elétricas, como corrente, carga e potencial, com parâmetros químicos, com a concentração do analito de interesse. Essas técnicas são menos seletivas e sensíveis que as cromatográficas, mas são mais rápidas e baratas. A aplicação das técnicas eletroanalíticas para análise de ácido ascórbico utiliza métodos, potenciométricos, cronoamperométricos ou voltamétricos, que podem ser escolhidos de acordo com o sensor a ser utilizado.⁷

1.3 Análise Eletroquímica de ácido ascórbico

O ácido ascórbico é um composto biológico eletroativo e é facilmente oxidado. A reação eletroanalítica mostra apenas um pico anódico, devido a formação do par redox irreversível com o ácido deidroascórbico, Figura 3.

Figura 3 - Representação da reação de oxidação do ácido ascórbico.

O mecanismo de oxidação do ácido ascórbico descreve uma reação de transferência eletrônica reversível acoplada a reações químicas irreversíveis, o que determina um processo irreversível: envolve o compartilhamento de dois elétrons e dois prótons, para produzir o ácido deidroascórbico. Em valores de pH maiores que o valor do primeiro pka (aproximadamente 4,04) há compartilhamento de apenas um próton com o ânion ascorbato como espécie eletroativa.⁷

1.3.1 Nanotubos de Carbono

Descobertos em 1991, os nanotubos de carbono (CNTs), devido às suas propriedades eletrônicas, grande resistência mecânica e propriedades químicas, têm despertado grande interesse em diferentes aplicações e se tornaram um dos componentes mais utilizados no desenvolvimento da nanotecnologia.⁸

Existem dois tipos principais de nanotubos de carbono, apresentados na Figura 5: nanotubos de carbono de parede simples (SWCNT, *Single-Walled Carbon Nanotubes*) que consistem numa única folha de grafeno enrolada sobre si mesma para formar um tubo cilíndrico e nanotubos de carbono de parede múltiplas (MWCNT, *Multi-Walled Carbon Nanotubes*) que correspondem a um conjunto de três ou mais nanotubos concêntricos enrolados sobre si. Além disso, outros tipos de CNTs podem ser sintetizados, como: nanotubos de carbono de paredes duplas, nanotubos de carbono em formato de cone (cup-stack), sendo que a obtenção destas estruturas deve-se a variações dos parâmetros de síntese.

Figura 4 - Micrografias dos diferentes tipos de nanotubos de carbono

A utilização dos CNTs no desenvolvimento de sensores eletroanalíticos deve-se a duas de suas principais propriedades: a alta área superficial, permitindo, portanto, uma amplificação do sinal analítico, e a eletrocatalise, devido ao mecanismo de transporte de elétrons apresentado por esse material que pode variar desde o tipo semicondutor até o tipo metálico.⁹

Alguns estudos^{10,11} demonstraram que o transporte eletrônico nos CNTs pode ocorrer de forma balística, sem espalhamento no decorrer do tubo possibilitando a condução de correntes através de grandes extensões dos CNTs sem a necessidade de aquecimento, no plano basal. Além disso, o aumento da velocidade no transporte eletrônico nos CNTs é explicado pela presença de grupos funcionais, localizados, principalmente, nos planos de borda, que surgem nos CNTs via tratamento em meio oxidante. Tais planos de borda são encontrados em sua maioria em defeitos presentes no corpo do tubo e nas extremidades, denominadas “boca do tubo”.

As características de condução balística e a presença de planos de borda fornecem aos CNTs a capacidade de mediar a transferência de elétrons em reações com espécies em solução.¹²

Assim, os nanotubos de carbono atendem as principais características necessárias para que um material seja utilizado para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos, como: alta velocidade na transferência eletrônica, alta área superficial e a presença de grupos funcionais que fazem com que os sensores baseados em

CNTs sejam atrativos para serem modificados com diversos tipos de espécies, como, por exemplo, nanopartículas metálicas.

1.3.2 Nanopartículas de Antimônio

A nanotecnologia tem contribuído significativamente para a produção de materiais com melhor desempenho, eficiência e durabilidade. A vantagem de sensores em nanoescala é a alta porosidade, que leva a uma elevada relação área superficial/volume. Além disso, possibilita aumento das propriedades catalíticas devido a melhor dispersão, obtida pelo pequeno tamanho do sensor.¹³

As propriedades físicas e químicas das nanopartículas metálicas (NPs) dependem de seu tamanho e forma: quanto menor o tamanho das partículas maior a sua área superficial, o que melhora a eficiência desses materiais em aplicações como a catálise, que dependem de sítios superficiais. Quando as nanopartículas metálicas são suportadas em superfícies reativas sua atividade catalítica aumenta significativamente. Dentre os principais suportes utilizados para essa finalidade está o carbono, uma vez que quando suportadas neste material sua separação dos produtos orgânicos ocorre com maior facilidade, viabilizando sua reutilização. Nanotubos de carbono de paredes múltiplas têm sido utilizados para esse suporte.¹⁴

Estudos recentes descreveram a utilização dos nanocompósitos (CNTs-NPs) na área eletroanalítica, como: sensor não enzimático de glicose baseado em nanopartículas de cobre¹⁵, sensor para detecção de arsênio baseado em CNTs modificados com nanopartículas de Pt-Fe¹⁶, sensor para determinação do antibiótico cefotaxima utilizando carbono vítreo modificado com CNTs-Au-PtNPs¹⁷ e sensor para determinação de ácido ascórbico e dopamina, utilizando ITO modificado com CNTs-Ag/Ag₂S.¹⁸

Eletrodos de antimônio vêm sendo cada vez mais utilizados em eletroquímica devido a suas propriedades intrínsecas como sobrepotencial negativo para evolução de hidrogênio, podem ser utilizados em uma ampla faixa de potencial e apresentam baixo sinal de corrente de redissolução. Além disso, o antimônio apresenta propriedades similares ao bismuto e pode ser utilizado para detecção de metais pesados. Devido a essas características, há um número significativo de trabalhos que usam eletrodos de antimônio.¹⁹⁻²¹

Os nanocompósitos baseados em materiais de carbono, como grafite, nanotubos e grafeno, e nanopartículas de antimônio (SbNPs) tem sido utilizados em anodos para baterias de lítio, devido a microestrutura não cristalina das SbNPs, permitindo o mecanismo de inserção gradual do lítio, possibilitando o aumento da estabilidade do eletrodo.

Há poucos trabalhos publicados que utilizam nanopartículas de antimônio e nanotubos de carbono em sensores eletroquímicos, entretanto, considerando as características do antimônio e as propriedades eletrônicas dos nanotubos de carbono os nanocompósitos obtidos utilizando esses materiais são promissores para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos, principalmente devido a soma do alto poder catalítico das SbNPs com as propriedades eletrônicas dos CNTs sem comprometê-las.²²

1.4 Métodos Cromatográficos

A cromatografia tem como princípio básico a separação de misturas por interação diferencial dos seus componentes entre uma fase estacionária (líquida ou sólida) e uma fase móvel (líquida ou gasosa).

Para que ocorra a separação cromatográfica a amostra deve ser dissolvida numa fase móvel que é forçada através de uma fase estacionária, a qual é fixa numa coluna ou superfície sólida, dependendo do tipo de cromatografia utilizada.

Os componentes que são retidos pela fase estacionária movem-se vagarosamente com a aplicação do fluxo da fase móvel enquanto os componentes que interagem pouco com a fase estacionária movem-se mais rapidamente. Devido a estas migrações diferenciadas, os vários componentes da mistura se separam em bandas discretas que podem ser analisadas quali e quantitativamente.²³

Há uma vasta quantidade de trabalhos na literatura cujos temas consistem na determinação cromatográfica de ácido ascórbico em diferentes matrizes como frutos e sucos²⁴⁻²⁸, grãos^{29,30} e fármacos³¹ e a técnica cromatográfica mais utilizada para tais determinações é a cromatografia líquida de alta eficiência.

Entretanto, o ácido ascórbico pertence a um grupo de moléculas polares de difícil retenção pelo método de cromatografia de fase reversa. As fases estacionárias

de octadecilsilano (ODS) podem ser utilizadas para a determinação de ácido ascórbico, no entanto, a retenção deste analito é muito baixa, o que faz com que ele elua próximo ao volume morto. Para aumentar a retenção utiliza-se uma fase móvel com alta porcentagem de água (ácidos inorgânicos ou orgânicos, ou tampão inorgânico em pHs baixos).

Uma fase móvel com pH menor que o pK_1 do ácido ascórbico (4,04) deve ser utilizada para impedir a formação de íons ascorbato e aumentar a retenção do ácido ascórbico, porém, valores baixos de pH podem acelerar a degradação da sílica presente na coluna devido à dissolução deste material.

1.5 Validação de métodos analíticos

A validação de um método analítico é realizada para garantir que este seja adequadamente aplicado ao tipo de amostra em que um ou mais compostos serão determinados e também para assegurar a confiabilidade dos resultados. Os parâmetros avaliados num processo de validação são: sensibilidade, linearidade e faixa de aplicação, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez.³²

1.5.1 Linearidade

Os resultados obtidos por um método analítico, no mínimo cinco pontos de concentrações diferentes, são organizados na forma de um gráfico a fim de obter uma curva analítica. Para tal, devem ser plotados colocando-se o eixo y o sinal obtido pela técnica e no eixo x os valores de concentração utilizados na medida (ou os padrões de calibração). Os padrões de calibração devem compreender toda a faixa de concentração das análises subsequentes e não se deve excluir o valor do branco – amostra sem o analito – da curva de calibração, visto que muitas vezes esse sinal é diferente de zero e suscetível a erros, portanto, não se pode subtraí-lo.¹

A curva analítica de um método analítico deve ser avaliada quanto a sua linearidade, para tal, deve-se assumir que sua forma obedece a equação 1:

$$y = a + bx$$

Equação 1

Onde, a : intercepto no eixo x e b : coeficiente angular da reta. Os valores de a e b são determinados por um método matemático conhecido como regressão linear, e, por isso, esses coeficientes também são denominados coeficientes de regressão.¹

1.5.1.1 Linha de regressão de y em x

Assumindo que a curva analítica é descrita pela equação 1, deve-se calcular a linha que melhor representa dos dados obtidos, para tal considera-se que todos os erros estão em y . Os valores dos coeficientes a e b , são calculados através do método dos mínimos quadrados, de acordo com as equações 2 e 3.¹

Coeficiente angular, b :

$$b = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2} \quad \text{Equação 2}$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad \text{Equação 3}$$

Sendo o ponto $(\bar{x}, \bar{y})$ a centroide do gráfico.

A linha calculada pelas equações 1, 2 e 3 corresponde a linha de regressão linear de y em x e é utilizada para estimar as concentrações de materiais testes e o limite de detecção, assim, os erros associados ao intercepto e ao coeficiente angular devem ser calculados. Os limites de confiança de a e b são dados pelas equações 4 e 5, respectivamente.¹

$$a \pm t(n-2)S_a \quad \text{Equação 4}$$

$$b \pm t(n-2)S_b \quad \text{Equação 5}$$

Os valores dos desvios padrão são dados pelas equações 6, 7 e 8. Primeiramente é calculado o $S_{y/x}$ para estimar os erros na direção y , segundo a equação 6.

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}} \quad \text{Equação 6}$$

A equação 6 utiliza os y residuais: $y_i - \hat{y}_i$, onde os valores de $\hat{y}_i$ são os pontos calculados na linha de regressão correspondentes aos valores individuais de x .¹

$$S_a = S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{Equação 7}$$

O desvio padrão do coeficiente angular, S_b , é dado pela equação 8.

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{Equação 8}$$

Após o cálculo do coeficiente angular, b , e do intercepto da regressão linear, pode-se calcular a concentração correspondente a cada sinal medido. Além disso, é preciso calcular o erro associado a cada concentração. Sabe-se que os valores de a e b estão sujeitos a erros, sendo assim, a determinação do erro associado a uma concentração é complexa. Desta forma, utiliza-se um cálculo aproximado, descrito pela equação 9.¹

$$S_{x_0} = \frac{S_{x/y}}{b} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{Equação 9}$$

Quando o analista faz diversas medidas para obter o valor de y_0 a equação 9 deve ser reescrita considerando o número de leituras (m), equação 10.¹

$$S_{x_0} = \frac{S_{x/y}}{b} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{Equação 10}$$

Onde, S_{x_0} : desvio padrão estimado de x_0 ; y_0 : valor experimental de y para a concentração x_0 ; m : número de leituras; n : número de pontos de calibração.¹

Os limites de confiança são calculados segundo a equação 11, com $n-2$ graus de liberdade. A Figura 5 apresenta uma forma geral dos limites de confiança para uma concentração calculada.¹

$$x_0 \pm t(n-2)S_{x_0} \quad \text{Equação 11}$$

Figura 5 - Forma geral dos limites de confiança para uma concentração calculada

Fonte: MILLER; MILLER (2005).

1.5.1.2 Avaliação da linearidade

Para avaliar a linearidade é preciso determinar o coeficiente de correlação produto momento (r), cujo valor em módulo deve ser próximo de 1,0, pois, quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Valores de r maior que 0,99 significam que os dados obtidos pelo método analítico relacionam-se linearmente. O valor de r é obtido pela equação 12.¹

$$r = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\{[\sum_i (x_i - \bar{x})^2][\sum_i (y_i - \bar{y})^2]\}^{1/2}} \quad \text{Equação 12}$$

Quando valores muito baixos de r são obtidos é necessário fazer um teste t bicaudal, considerando-se $n-2$, comparando-se com o valor tabelado no nível de confiança desejado. Se o valor de t calculado for maior que o tabelado, a hipótese nula deve ser rejeitada e pode-se concluir que os dados apresentam correlação linear.¹

1.5.2 Sensibilidade

A sensibilidade demonstra a variação da resposta do método com a variação da concentração do analito e pode ser expressa pela inclinação da reta de regressão de calibração, b .¹

1.5.3 Exatidão

A exatidão representa quão próximo do valor real encontra-se o valor medido. Para que seja avaliada a exatidão devem-se analisar amostras de diferentes concentrações preparadas em triplicata, além disso, devem ser realizadas um mínimo de nove determinações com três diferentes níveis de concentração.³³

A exatidão é afetada por erros aleatórios e sistemáticos e pode ser avaliada utilizando-se ensaios de recuperação.

1.5.3.1 Avaliação da exatidão utilizando ensaios de recuperação

A recuperação de um analito é estimada pela análise de amostras fortificadas com o mesmo, em pelo menos três concentrações diferentes do mesmo: próxima ao limite de detecção, próxima à média da faixa de utilização do método e próxima à concentração máxima permitida. A recuperação é calculada pela equação 13.³³

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{(C_{af} - C_a)}{C_{ad}} \times 100 \quad \text{Equação 13}$$

Sendo:

C_{af} : concentração do analito na amostra fortificada;

C_a : concentração do analito na amostra não fortificada;

C_{ad} : concentração do analito adicionada à amostra fortificada.

1.5.4 Precisão

A precisão é uma medida da dispersão entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra sob condições definidas, ou seja, utilizando um determinado método. É expressa através da repetitividade e da reprodutibilidade, que são avaliadas pelo desvio padrão. Na prática, em validação de métodos, o número de determinações é geralmente pequeno e o que se calcula é a estimativa do desvio padrão absoluto. Outra expressão da precisão é através da estimativa do desvio padrão relativo (*DPR*), estabelecida pela equação 14. Normalmente, métodos que quantificam compostos em macroquantidades requerem um *DPR* de 1 a 2%.¹

$$DPR = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{Equação 14}$$

Sendo:

$\bar{x}$: a concentração média determinada

s: o desvio padrão, calculado pela equação 15

$$s = \sqrt{\frac{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad \text{Equação 15}$$

1.5.4.1 Repetitividade

A repetitividade descreve a precisão entre replicatas realizadas sob as mesmas condições de medição: mesmo procedimento, mesmo observador, mesmo instrumento, mesmas condições ambientes e repetição em curto espaço de tempo. É expressa quantitativamente pela dispersão dos resultados.¹

1.5.4.2 Reprodutibilidade

A reprodutibilidade descreve a precisão entre resultados de medidas de uma mesma amostra realizadas sob condições variadas de medição. Este é um componente da validação executado por diferentes laboratórios, é efetuado quando o laboratório busca a verificação do desempenho dos seus métodos, comparando-se os dados de validação obtidos por laboratórios diferentes.¹

1.5.4.3 Comparação da precisão entre métodos

O teste f pode ser utilizado para se comparar a precisão de dois métodos. Quando se deseja comparar se um método é mais preciso do que o outro, utiliza-se um teste f unilateral. O teste f bilateral, por sua vez, é utilizado quando a comparação é feita a fim de verificar se os métodos diferem-se quanto às suas precisões. O teste f considera a razão entre duas variâncias de amostras, ou seja, a razão entre os quadrados dos desvios padrão, como descrito pela equação 16.

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad \text{Equação 16}$$

A hipótese nula será verdadeira quando a razão entre as variâncias for próxima a 1; desvios deste valor ocorrem devido a erros aleatórios. Se o valor de F calculado for maior que o tabelado a hipótese nula é rejeitada. O valor tabelado de F depende do tamanho das amostras, do nível de significância e do tipo de teste realizado.¹

1.5.5 Limite de detecção e Limite de quantificação

A definição de limite de detecção é a concentração mínima de uma substância que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, ou seja, a

concentração que gera um sinal y significativamente diferente do branco utilizando um determinado procedimento experimental. O valor do limite de detecção é calculado pela equação 17.¹

$$\text{limite de detecção} = y_B + 3S_B \quad \text{Equação 17}$$

O limite de quantificação é a menor concentração de uma substância de interesse que pode ser determinada por um método analítico. O valor do limite de quantificação é calculado pela equação 18.¹

$$\text{limite de Quantificação} = y_B + 10S_B \quad \text{Equação 18}$$

Onde, y_B é o sinal do branco e S_B é o desvio padrão do branco. No entanto, deve-se utilizar $S_{x/y}$ no lugar de S_B para a determinação dos limites de detecção e quantificação.¹

1.6 Método de adição de padrões

Esse método é utilizado para amostras que já contêm uma determinada concentração do analito e que, além disso, têm efeito de matriz. O procedimento padrão utilizado consiste em utilizar volumes iguais da amostra fortificando-as com concentrações diferentes do analito e diluir, se necessário, todas as soluções para volumes iguais. Os sinais medidos apresentam comportamento similar ao da Figura 6. Apesar da diferença visual, calcula-se a linha de regressão normalmente, mas extrapola-se para quando $y=0$. O intercepto negativo no eixo x, x_e corresponde a quantidade de analito presente na amostra não fortificada. Este valor é dado pela razão entre o intercepto e o coeficiente angular da linha de regressão, ou seja, a/b e, portanto, também é susceptível a erros. Entretanto, o valor de x_e não é dado por um único valor medido de y, então, o desvio padrão desse coeficiente é calculado através da equação 19.¹

$$S_{x_e} = \frac{S_{x/y}}{b} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{y}^2}{b^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{Equação 19}$$

O limite de confiança para x_e é determinado pela equação 20.

$$x_e \pm t(n-2)S_{x_e} \quad \text{Equação 20}$$

O método de adição de padrão, em termos estatísticos, é um método de extrapolação menos preciso que as técnicas de interpolação, mas uma alternativa para a interferência de matriz. Entretanto, esse método apresenta algumas desvantagens: pode necessitar de maior quantidade de amostra e cada amostra pode requerer uma curva analítica.¹

Figura 6 - Método de adição de padrão

Fonte: MILLER; MILLER (2005).

1.7 Uso de linhas regressão para comparar métodos analíticos

O desenvolvimento de uma nova metodologia requer a validação da mesma, este procedimento pode ser realizado através da comparação com um procedimento padrão. Essa comparação é realizada a fim de identificar os erros sistemáticos e avaliar se os resultados obtidos pelo novo método são maiores ou menores que os obtido com a aplicação do procedimento padrão.¹

A comparação de dois métodos pode ser feita utilizando-se as linhas de regressão dos mesmos, plotando-se um gráfico como apresentado pela Figura 8. O eixo y corresponde aos resultados obtidos pelo novo método e o eixo x aos resultados obtidos pelo método padrão; cada ponto do gráfico representa a concentração de uma amostra obtida por dois métodos distintos. Assim, devem-se calcular os coeficientes de regressão, a e b e o coeficiente de correlação produto-momento da linha de regressão.¹

Os resultados obtidos devem ser comparados com os comportamentos apresentados pela Figura 7. O resultado da Figura 7a indica que ambos os métodos apresentam resultados idênticos para toda a faixa de concentração analisada, de modo que a linha de regressão tem o intercepto igual a zero e os coeficientes angular e de correlação iguais a 1; esta é uma situação que não acontece na prática, pois ainda que não haja erros sistemáticos, os erros aleatórios impedem que ambos os procedimentos deem resultados idênticos.¹

A situação apresentada pela Figura 7b, ocorre quando o sinal do branco for calculado erroneamente para um dos dois métodos, o que faz com que o intercepto, a , seja diferente de zero.¹

Há também a possibilidade de que o coeficiente angular de uma linha de regressão seja maior ou menor que 1, como representado nas Figuras 7c e 7d, isso ocorre devido a existência de erros sistemáticos no coeficiente angular de um dos métodos. A Figura 7e também representa a ocorrência de erros sistemáticos.¹

A situação descrita na Figura 7f pode acontecer quando o analito apresenta duas formas químicas e apenas um dos métodos é capaz de detectar ambas.¹

Há uma preocupação excessiva com o coeficiente de correlação em estudos comparativos, uma vez que r não tem papel direto no estabelecimento ou não de erros sistemáticos, visto que mesmo que o valor de r seja muito próximo de 1, a regressão pode ser um pouco curvada. E em outros casos pode-se verificar que o valor de r não é tão próximo a 1, mas ainda assim os valores de a e b não são significativamente diferentes de 0 e 1, respectivamente.¹

Figura 7 - Uso de linhas de regressão para comparação de métodos analíticos

Fonte: MILLER; MILLER (2005).

2 Objetivos

O objetivo principal foi comparar os resultados obtidos via eletroanálise com os obtidos a partir de metodologias cromatográficas (HPLC) utilizando-se os modelos estatísticos descritos no livro Miller e Miller.¹ após o desenvolvimento, caracterização e aplicação de uma metodologia eletroanalítica para análise de ácido ascórbico em amostras farmacêuticas. O objetivo principal foi dividido nas seguintes etapas:

- Modificação e caracterização da superfície de eletrodos de carbono vítreo com nanotubos de carbono e comparação de suas respostas eletroquímicas.
- Modificação dos CNTs com nanopartículas de antimônio. Comparação dos resultados obtidos com aqueles obtidos pelo eletrodo modificado apenas com CNTs.
- Utilização dos eletrodos modificados na quantificação eletroanalítica de AA e desenvolvimento de uma metodologia eletroanalítica para detecção deste compostos em fármacos utilizando-se técnicas como voltametrias de pulso diferencial.
- Aplicação uma metodologia cromatográfica (HPLC) já publicada para a detecção do AA, em faixas de concentração coincidentes com as da técnica eletroanalítica.
- Comparação estatística da metodologia eletroanalítica proposta com a cromatografia líquida de alta eficiência, e determinação da equivalência dos resultados obtidos pelas duas técnicas.

3 Materiais e métodos

3.1 Metodologia eletroquímica utilizada para determinação de ácido ascórbico

3.1.1 Funcionalização dos Nanotubos de Carbono de Paredes Múltiplas (MWCNT)

Preparou-se 20 mL de uma mistura dos ácidos nítrico e sulfúrico concentrados na proporção de 1:3 (v:v), à essa mistura adicionou-se 50mg de MWCNT e submeteu-se a agitação magnética durante nove horas.

Após o período de agitação filtrou-se os MWCNT em membrana de Nylon® de 0,45 µm, e lavou-se com água deionizada até que o filtrado atingisse pH próximo de 6. Por fim, secaram-se os MWCNT em estufa durante 12 horas na temperatura de 60°C.

3.1.2 Modificação dos nanotubos de carbono com nanopartículas de antimônio MWCNT-SbNPs

Para a síntese do nanocompósito MWCNT-SbNPs, pesou-se 18,7 mg de cloreto de antimônio em um Eppendorf®, em seguida, adicionou-se 1 mL de etanol P.A. a esse recipiente. Essa mistura foi agitada em ultrassom durante 30 minutos.

Em um béquer contendo 20 mL de etanol P.A. adicionou-se 40mg de MWCNT e 40 mg de dodecil sulfato de sódio, essa mistura foi agitada em ultrassom durante 20 minutos para que houvesse dispersão completa dos nanotubos de carbono. Após esta etapa, adicionou-se 80 mg de borohidreto de sódio, o conteúdo do béquer foi agitado em banho ultrassônico por mais 20 minutos.

Adicionou-se o conteúdo do eppendorf® lentamente sob agitação ultrassônica, e agitou-se a mistura final em sonda durante uma hora. Filtrou-se o nanocompósito em membrana Milipore de Nylon® 0,45 µm e secou-se em estufa durante 12 horas a 60°C.²²

3.1.3 Caracterização morfológica e estrutural dos nanocompósitos

A caracterização morfológica e estrutural dos nanocompósitos foi realizada pelas técnicas de FEG e EDX.

3.1.4 Modificação dos eletrodos de carbono vítreo com nanotubos de carbono

Antes da modificação do eletrodo, foi feito o polimento e limpeza mecânica da superfície do eletrodo de carbono vítreo que foi inicialmente polida em lixa 1200/4000 de carbeto de silício. Em seguida, o eletrodo foi lavado com água deionizada.

Finalmente, 12 μL de uma suspensão contendo MWCNTs em Dimetilformamida (2 mg de MWCNT:2 mL DMF) foram gotejados em três adições de 4 μL sobre a superfície do carbono vítreo.

O mesmo procedimento é seguido para a modificação do eletrodo de carbono vítreo com o nanocompósito MWCNT-SbNPs, a rota de síntese desse material está descrita nas subseções posteriores do procedimento.

3.1.5 Caracterização eletroquímica dos sensores

Utilizou-se a técnica voltametria cíclica em meio ácido, HCl 0,5 mol L⁻¹, para comparar o comportamento eletroquímico dos diferentes materiais, GC, MWCNT e MWCNT-SbNPs.

3.1.6 Comportamento eletroquímico do ácido ascórbico sobre a superfície dos sensores MWCNT-SbNPs

O estudo do comportamento eletroquímico do ácido ascórbico foi realizado utilizando-se técnicas voltamétricas: voltametrias cíclicas e de pulso diferencial. Os parâmetros utilizados estão descritos na Tabela I.

Tabela 1 - Parâmetros utilizados para as técnicas de voltametria cíclica e de pulso diferencial

Parâmetros	Voltametria Cíclica	Voltametria de Pulso Diferencial
Tempo de Equilíbrio	3 s	3 s
Faixa de Potencial	-1,2 V a +1,2 V	-0,6 V a 0,6 V
Velocidade de Varredura	50 mV s ⁻¹	10,5 mV s ⁻¹
Incremento de Potencial	3 mV	10,5 mV
Amplitude	-	50 mV

3.1.7 Utilização de eletrodos modificados para a determinação de ácido ascórbico

3.1.7.1 Determinação de AA Soluções Padrão

O ácido ascórbico foi determinado, primeiramente, a partir de uma solução padrão deste analito. Preparou-se uma solução estoque na concentração $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ do padrão de AA e adicionou-se à célula eletroquímica, cujo volume inicial da solução tampão era de 20 mL, primeiramente uma alíquota de 600 μL correspondendo à concentração de $291 \mu\text{mol L}^{-1}$ e a partir desta concentração alíquotas sucessivas de 100 μL até a concentração de $698 \mu\text{mol L}^{-1}$.

3.1.7.2 Determinação de AA na amostra de comprimido

Para a determinação do AA em amostras de comprimido utilizaram-se 10 comprimidos de aproximadamente 1g contendo 500 mg de AA provenientes de um mesmo lote. Pesaram-se todos os comprimidos obtendo um valor médio de $982,2 \pm 2,31 \text{ mg}$ e as amostras foram maceradas com auxílio de um almofariz e um pistilo até a formação de uma amostra homogênea.

A partir desta amostra considerando-se a quantidade de AA presente na amostra aproximadamente 50% em massa, preparou-se uma solução estoque de $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ pesando-se o dobro da massa calculada na seção 3.1.7.1, e preparou-se 20 mL de uma amostra com aproximadamente $125 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AA em PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ utilizada como amostra inicial. . Após a primeira determinação, a amostra foi fortificada com quantidades conhecidas de da solução padrão de AA (adição de volumes iguais aos pré-estabelecidos em 3.1.7.1) e novas quantificações eletroanalíticas foram realizadas.

3.2 Metodologia cromatográfica utilizada para determinação de ácido ascórbico.

Para a determinação de ácido ascórbico por cromatografia líquida de alta eficiência utilizou-se o material de referência certificado (Reagente padrão) da farmacopeia americana, cuja pureza é de 99,99%.

3.2.1 Parâmetros Utilizados na análise cromatográfica

As amostras preparadas anteriormente foram analisadas por HPLC-UV conforme as condições cromatográficas descritas na Tabela 2.:²⁸

Tabela 2 - Parâmetros Utilizados pela técnica cromatográfica

Equipamento	Cromatógrafo líquido de alta eficiência
Detector	Ultravioleta no comprimento de onda de 243 nm
Coluna	C18 250 mm x 4,6 mm, 5 µm (Sigma Aldrich) (Ascentis®Supelco)
Temperatura da Coluna	25°C
Fase Móvel	Ácido Acético 2% (V/V)
Fluxo da Fase Móvel	1,0 mL min ⁻¹
Volume de Injeção	20 µL
Duração da Corrida	5,0 min
Cromatográfica	
Tempo de Retenção	2,7 min
Aproximado	

3.2.2 Preparo das Soluções padrão de AA

As soluções de concentrações conhecidas foram preparadas a partir de uma solução estoque de padrão ácido ascórbico preparada como descrita na Tabela 3.

Tabela 3 - Descrição do preparo das soluções estoque de padrão de concentração 1mg mL⁻¹

Massa de Material de Referência (mg)	Volume de Solução Preparado (mL)	Diluyente	Quantidade de Diluyente	Concentração (µmol L⁻¹)
25	25	Ácido acético 2% (V/V)	Quantidade Suficiente Para 25 mL	5678

As soluções estoque de concentração 1mg mL⁻¹ foram diluídas conforme descrito na Tabela 4 para injeção cromatográfica.

Tabela 4 - Descrição do preparo das soluções para injeção cromatográfica a partir das soluções estoque de concentração 1mg mL⁻¹

Volume de Solução Padrão Pipetada (μL)	Volume de Solução Preparado (mL)	Diluyente	Quantidade de Diluyente	Concentração (μmol L⁻¹)
256	5,0	Ácido acético 2% (V/V)	Quantidade Suficiente Para 5,0 mL	291,2
298	5,0	Ácido acético 2% (V/V)	Quantidade Suficiente Para 5,0 mL	338,2
339	5,0	Ácido acético 2% (V/V)	Quantidade Suficiente Para 5,0 mL	384,6
379	5,0	Ácido acético 2% (V/V)	Quantidade Suficiente Para 5,0 mL	430,6
419	5,0	Ácido acético 2% (V/V)	Quantidade Suficiente Para 5,0 mL	476,2
459	5,0	Ácido acético 2% (V/V)	Quantidade Suficiente Para 5,0 mL	521,3
498	5,0	Ácido acético 2% (V/V)	Quantidade Suficiente Para 5,0 mL	566
537	5,0	Ácido acético 2% (V/V)	Quantidade Suficiente Para 5,0 mL	610,3
576	5,0	Ácido acético 2% (V/V)	Quantidade Suficiente Para 5,0 mL	654,2
614	5,0	Ácido acético 2% (V/V)	Quantidade Suficiente Para 5,0 mL	697,7

3.2.3 Preparo das amostras de comprimido

O preparo da amostra de comprimido foi feito de maneira análoga ao procedimento descrito na seção 3.1.7.2, exceto a fortificação da amostra inicial que seguiu o procedimento descrito na Tabela 4.

4 Resultados e Discussão

4.1 Caracterização estrutural e morfológica do nanocompósito MWCNT-SbNPs

Para a caracterização morfológica e estrutural do nanocompósito MWCNT-SbNPs utilizaram-se as técnicas de Microscopia Eletrônica de Varredura de Efeito de Campo (FEG) e Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios X (EDX). A Figura 8 apresenta os resultados obtidos por ambas as técnicas para os materiais MWCNT e MWCNT-SbNPs.

A análise por EDX é do tipo semi-quantitativa, pois, além de tratar-se de uma técnica pontual, baseia suas estimativas de composição da amostra. Por esta técnica são obtidas a composição química das amostras em questão e as percentagens de cada espécie contida nas mesmas. As composições dos materiais estudados obtidas por EDX encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5 - Composição dos materiais, análise semi-quantitativa (EDX)

Elemento	MWCNT	MWCNT-SbNPs
Carbono	87,11%	63,55%
Oxigênio	12,89%	11,24%
Antimônio	--	25,21%

Analisando-se as Figuras 8a e 8b é possível verificar na análise por EDX os picos referentes ao carbono (grafite) em aproximadamente 0,30 keV e de átomos de oxigênio em aproximadamente 0,58 keV. Enquanto no MWCNT-SbNPs podem ser observados, além dos picos referentes ao carbono e oxigênio, uma série de picos referentes ao antimônio entre 3,40 keV e 4,50 keV.

As imagens obtidas por FEG evidenciam a presença das nanopartículas de antimônio com tamanhos variando entre 5 e 35 nm.

Figura 8 - Caracterização do MWCNT (a) e MWCNT-SbNPs (b) por FEG e EDX

4.2 Caracterização eletroquímica do nanocompósito MWCNT-SbNPs

A Figura 9 apresenta os voltamogramas cíclicos obtidos em HCl 0,5 mol L⁻¹ para os eletrodos de carbono vítreo não modificado (GC), modificado com MWCNT e com MWCNT-SbNPs.

Figura 9 - Voltamogramas cíclicos obtidos para os eletrodos de carbono vítreo não modificado, MWCNT e MWCNT-SbNPs. Eletrólito HCl 0,5 mol L⁻¹ e velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹.

Na Figura 9 é possível observar picos anódicos: A em -0,020 e B entre 0,150 e 0,400 V vs. Ag/AgCl referentes aos processos de oxidação do antimônio⁺ e a formação de uma camada de passivação do óxido de antimônio devido ao aumento da concentração de antimônio na superfície, respectivamente. E um pico catódico C em -0,350 V vs. Ag/AgCl referente a redução do óxido de antimônio.²²

4.3 Análise Eletroquímica do ácido ascórbico

4.3.1 Avaliação do Eletrólito suporte para determinação de ácido ascórbico com eletrodos de carbono vítreo modificados com MWCNT-SbNPs

Os eletrólitos suporte avaliados foram solução tampão acetato 0,1 mol L⁻¹, KCl 0,1 mol L⁻¹ e tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹. A Figura 10 apresenta os voltamogramas de pulso diferencial do eletrodo de carbono vítreo modificado com MWCNT-SbNPs nos diferentes eletrólitos contendo ácido ascórbico na concentração 521,3 μmol L⁻¹.

Figura 10 - Definição do eletrólito Suporte – Voltametria de Pulso Diferencial do eletrodo MWCNT-SbNPs nos diferentes eletrólitos contendo AA 521,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ incremento de potencial 10,5 mV, amplitude 50 mV.

Analisando-se os resultados apresentados na Figura 10 verifica-se que o eletrólito suporte mais adequado para esta determinação é o Tampão Fosfato 0,1 mol L⁻¹, uma vez que esse eletrólito possibilita a obtenção de um pico mais bem definido para o ácido ascórbico quando comparado aos outros eletrólitos estudados.

O tampão acetato apresenta alto valor de corrente de pico anódico, próximo de 28 μA , entretanto, o pico do analito coincide com o pico do branco apresentando apenas um incremento de corrente, dificultando, portanto, a análise quantitativa do composto estudado. A solução de KCl 0,1 mol L⁻¹ não apresenta pico referente a oxidação do ácido ascórbico na faixa de potencial aplicada: entre -0,6 V e 0,6 V.

4.3.2 Efeito do MWCNT-SbNPs na superfície do eletrodo de carbono vítreo para oxidação do ácido ascórbico

O efeito da modificação com MWCNT-SbNPs foi avaliado na presença de $521,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ácido ascórbico em PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Os voltamogramas de pulso diferencial obtidos são apresentados na Figura 11. Os parâmetros utilizados para a obtenção destes dados foram amplitude 50 mV e incremento de potencial 10,5 mV.

Comparando-se os resultados apresentados na Figura 12, verifica-se que a modificação do eletrodo de carbono vítreo com Sb-MWCNT apresenta maior corrente de pico que os eletrodos de carbono vítreo não modificado e modificado com MWCNT. Um deslocamento de potencial para próximo de zero também pode ser observado, principalmente quando comparados o eletrodo de carbono vítreo não modificado e o eletrodo de carbono vítreo modificado com MWCNT-SbNPs, portanto, o segundo é mais eletrocatalítico para a determinação de ácido ascórbico.

Figura 11 – Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $521,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ácido ascórbico, pH 6,8, para os eletrodos GC, MWCNT e MWCNT-SbNPs; incremento de potencial 10,5 mV e amplitude 50 mV.

4.3.3 Otimização do volume de suspensão de MWCNT-SbNPs

Os volumes de suspensão estudados foram 4, 8 e 12 μL , respectivamente. A Figura 12 apresenta a variação do potencial de pico anódico e da corrente de pico anódica em função da variação do volume de suspensão adicionado. A corrente de pico anódica aumenta linearmente de acordo com o aumento do volume do nanocompósito. Além disso, o potencial de pico anódico referente a oxidação do ácido ascórbico diminui linearmente de acordo aumento do volume de suspensão adicionado, evidenciando o efeito catalítico do nanocompósito.

A Figura 13 apresenta a variação do coeficiente angular, Θ da curva analítica em função da variação do volume de suspensão adicionado.

Figura 12 - Relação entre a variação de volume de suspensão adicionado à superfície do eletrodo de GC e os valores de IPA e EPA

Figura 13 - Relação entre a variação de volume de suspensão adicionado à superfície do eletrodo de GC e o valor de Θ

O coeficiente angular, Θ , ou seja, a tangente da curva analítica aumenta linearmente de acordo com o aumento do volume do nanocompósito. Assim pode-se concluir que a modificação do eletrodo de carbono vítreo também contribui para o aumento da sensibilidade do método analítico.

Desta forma, combinando os resultados obtidos, o volume de 12 μL mostrou-se o mais indicado para esta aplicação.

4.3.4 Estudo do pH

Os valores de pH foram avaliados considerando-se a região tamponante do tampão fosfato utilizando-se os valores entre $6,8 \pm 1,0$. A Figura 14 apresenta os voltamogramas de pulso diferencial obtidos em PBS 0,1 mol L^{-1} nos diferentes pH contendo 476,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AA para o eletrodo de carbono vítreo modificado com MWCNT-SbNPs.

Figura 14 - Voltamogramas de pulso diferencial em PBS 0,1 mol L⁻¹ em diferentes pHs contendo 476 $\mu\text{mol L}^{-1}$; amplitude 50mV e incremento de potencial 10,5mV.

Figura 15 - Relação entre a variação do pH do PBS 0,1 mol L⁻¹ e os valores de IPA e EPA

Figura 16 - Relação entre a variação do pH do PBS 0,1molL⁻¹ e os valores de b

Analisando-se tais resultados podem-se verificar a dependência entre a concentração hidrogeniônica do eletrólito e os valores de corrente e potencial de pico (Figura 15) e com os valores do coeficiente angular da curva de calibração (Figura 16), ou seja a dependência entre o pH do tampão e a sensibilidade do método.

É sabido que quanto maior o pH maior a facilidade de oxidação do ácido ascórbico, uma vez que em soluções básicas esse composto encontra-se ionizado, na forma de ascorbato, que é facilmente oxidado a deidroascorbato.⁷ Entretanto, apesar da maior facilidade de oxidação o pH mais básico estudado, 7,8 não apresenta o maior valor de corrente de pico nem o maior valor de coeficiente angular da reta, b, ou seja, não apresenta maior sensibilidade.

Portanto, o potencial hidrogeniônico ideal para a quantificação eletroanalítica do ácido ascórbico determinado é de 6,8.

4.3.5 Otimização dos parâmetros da Voltametria de Pulso Diferencial

A fim de verificar as melhores condições de trabalho para a quantificação do ácido ascórbico, realizaram-se estudos variando-se os parâmetros de amplitude e incremento de potencial da técnica aplicada, DPV.

4.3.5.1 Amplitude

O efeito da variação da amplitude em função da corrente e potencial de pico anódico foi avaliado, bem como a Variação do Coeficiente Angular da Curva de Calibração em função da variação desse parâmetro, os resultados encontram-se apresentados nas Figuras 17 e 18, respectivamente. O valor do incremento foi fixado em 10,5 mV.

Analisando-se os resultados obtidos tem-se que os valores da Corrente de Pico Anódico (I_{PA}) e do coeficiente angular da curva analítica (b) variam linearmente com o aumento da amplitude de 30 até 50 mV, enquanto o valor do Potencial de Pico Anódico (E_{PA}) diminui para a mesma faixa de amplitude mantém-se praticamente constante entre as amplitudes de 30 mV e 60 mV, variando entre 0,150 V e 0,154 V. Assim o valor de amplitude escolhido para a quantificação do ácido ascórbico é de 50mV.

Figura 17 - Relação entre a variação da amplitude e os valores de I_{PA} e E_{PA} em PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 6,8

Figura 18 - Relação entre a variação da amplitude e os valores do coeficiente angular da curva analítica em PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 6,8.

4.3.5.2 Incremento de Potencial (Step Potential)

A relação entre a variação do incremento de potencial e os valores de I_{PA} e E_{PA} e a variação do valor do coeficiente angular da curva analítica apresentam-se nas Figuras 19 e 20. O valor de amplitude para estas medidas foi fixado em 50mV.

Figura 19 - Relação entre a variação do incremento de potencial e os valores de I_{PA} e E_{PA} em PBS 0,1 mol L⁻¹ pH 6,8.

Figura 20 - Relação entre a variação do incremento de potencial e os valores do coeficiente angular da curva analítica em PBS 0,1 mol L⁻¹ pH 6,8.

A partir dos dados obtidos pode-se constatar que o melhor valor de incremento de potencial para determinação de ácido ascórbico é 10,5 mV uma vez que este apresenta os maiores valores de I_{PA} e b e também o menor valor de E_{PA} .

4.4 Validação Eletroanalítica de ácido ascórbico

Após os estudos das melhores condições experimentais para determinação eletroquímica de ácido ascórbico com a técnica DPV obtiveram-se cinco curvas analíticas que apresentaram um comportamento linear da corrente de pico anódico em função do aumento da concentração do analito como se podem ser verificados nas Figuras 21 e 22 - esse procedimento foi repetido para soluções padrões de ácido ascórbico em solução tampão fosfato 0,1mol L⁻¹ pH 6,8 e também para amostras de ácido ascórbico em comprimido. A partir das cinco repetições obteve-se um conjunto de valores de corrente de pico médias e seus respectivos erros.

4.4.1 Obtenção da Curva Analítica média do AA padrão em PBS 0,1molL⁻¹

Os voltamogramas de pulso diferencial e a curva analítica média obtidos nas análises do padrão de AA encontram-se na Figura 21 e 22, respectivamente. Os parâmetros estatísticos representativos da curva apresentada na Figura 22 são listados na Tabela 6.

Figura 21 - Voltamogramas de pulso diferencial para concentrações crescentes de AA – entre 291 e 698 $\mu\text{mol L}^{-1}$ - em PBS 0,1 mol L⁻¹; amplitude 50 mV e incremento de potencial 10,5 mV - Determinação de AA em soluções padrão.

Figura 22 - Gráfico médio das curvas analíticas (n=5) para concentrações crescente de AA (291, 338, 385, 431, 476, 521, 566, 610, 654, 698 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em PBS 0,1 mol L⁻¹

¹, amplitude 50 mV e incremento de potencial 10,5 mV - Determinação de AA em Soluções Padrão.

Tabela 6 - Resultados dos parâmetros de validação do método eletroanalítico para determinação de AA em soluções padrão.

Parâmetro	AA padrão em PBS 0,1 mol L ⁻¹
Faixa de Concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	291-698
Curva Analítica ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	$13,3576 + 0,0216x$
Coeficiente de Correlação (R)	0,9999
Precisão (mín-máx) em RSD (%)	3,15-3,51
Recuperação (mín-máx, %)	99,00-100,94
LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,0015
LQ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,0498

4.3.2 Obtenção da Curva Analítica média do AA em amostras de comprimidos

Os voltamogramas de pulso diferencial e a curva analítica média, obtidos nas análises da amostra de comprimido fortificada com padrão de AA, encontram-se na Figura 23 e 24, respectivamente. Os parâmetros estatísticos representativos da curva apresentada na Figura 24 são listados na Tabela 7.

Figura 23 - Voltamogramas de pulso diferencial para concentrações crescentes de AA – entre 291 e 698 $\mu\text{mol L}^{-1}$ - em PBS 0,1 mol L^{-1} ; amplitude 50 mV e incremento de potencial 10,5 mV - Determinação de AA em comprimidos.

Figura 24 - Gráfico médio das curvas analíticas (n=5) para concentrações crescentes de AA (291, 338, 385, 431, 476, 521, 566, 610, 654, 698 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em PBS 0,1 mol L^{-1}

¹, amplitude 50 mV e incremento de potencial 10,5 mV - Determinação de AA em Comprimidos.

Tabela 7 - Resultados dos parâmetros de validação do método eletroanalítico para determinação de AA em amostras de comprimido.

Parâmetro	Comprimido
Faixa de Concentração ($\mu mol L^{-1}$)	291-698
Curva Analítica ($\mu mol L^{-1}$)	$2,8133 + 0,0117x$
Coefficiente de Correlação (R)	0,99837
Precisão (mín-máx) em RSD (%)	2,01-4,18
Recuperação (mín-máx, %)	108,46-120,36
LD ($\mu mol L^{-1}$)	0,0235
LQ ($\mu mol L^{-1}$)	0,0783

Analisando-se os resultados obtidos verifica-se uma diminuição dos valores de corrente de pico e da sensibilidade na análise dos comprimidos, bem como o deslocamento do potencial de pico anódico para aproximadamente 0,200 V. Essas alterações podem ser explicadas pela presença de interferentes na amostra de comprimido provenientes do excipiente da amostra, uma vez que as amostras foram analisadas sem tratamento prévio. Esses interferentes podem dificultar a transferência

de carga fazendo com que a reação de oxidação do ácido ascórbico aconteça em potenciais maiores, comparados com os potenciais de oxidação das amostras padrão (~0,120 V).

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) obtidos pela técnica eletroanalítica foram calculados segundo as equações 17 e 18, respectivamente, para as amostras de padrão o LD calculado foi de 0,0015 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e o LQ 0,0498 $\mu\text{mol L}^{-1}$; para as amostras de comprimido o LD calculado foi de 0,0235 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e o LQ 0,0783 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Também foi a média dos pontos para cada amostra e seus respectivos erros, de acordo equação 21:

$$\bar{x} \pm t_{n-1} s \sqrt{n} \quad \text{Equação 21}$$

Onde: $\bar{x}$: valor médio do sinal obtido, t_{n-1} : 2,78, α : 0,05, e $n = 5$.

Foram calculados também a equação da reta que melhor descreve o conjunto médio dos pontos, onde a foi calculado de acordo com a equação 3 e b , de utilizando-se a equação 2. O coeficiente de correlação linear foi calculado pela equação 12. E a recuperação e a precisão utilizando-se as equações 13 e 14, respectivamente. Todos os parâmetros foram calculados de acordo com o método proposto por Miller e Miller.¹

Os valores de recuperação obtidos para as amostras de padrão variam entre 99,00-100,94% com DPR máximo 3,51%, enquanto os valores de recuperação obtidos para as amostras de comprimido variam entre 108,46-120,36%, com DPR máximo: 4,18. Deste modo, apesar de serem recomendados valores de recuperação próximos a 100%, desvios desse parâmetro são aceitáveis desde que os valores de DPR obtidos sejam menores que 5%.³⁴

4.5 Análise Cromatográfica

O método cromatográfico utilizado para a determinação do ácido ascórbico baseia-se num ensaio desenvolvido para determinação do AA em sucos, ou seja, matrizes orgânicas e complexas. Os parâmetros utilizados encontram-se descritos na seção 3.3.1 ²⁸. A Figura 25 representa o cromatograma do AA ($476\mu\text{mol L}^{-1}$), cujo pico aparece no tempo de retenção t_R 2,73 minutos.

Figura 25 - Cromatograma do AA na concentração $476\mu\text{mol L}^{-1}$. FM: Ácido acético 2%, fluxo $1,0\text{ mL min}^{-1}$, Volume de Injeção: $20\mu\text{L}$, Temperatura da coluna: $\sim 25^\circ\text{C}$.

Comparando-se os cromatogramas obtidos na determinação de AA $476\mu\text{mol L}^{-1}$ (nas amostras de padrão e comprimido fortificado) pode-se verificar a seletividade do método, Figura 26.

Figura 26 - Cromatograma obtido para amostra comprimido - demonstração da seletividade do método. FM: Ácido acético 2%, fluxo 1,0 mL min⁻¹, Volume de Injeção: 20 µL, Temperatura da coluna: ~25°C. [AA] 476 µmol L⁻¹

As curvas analíticas médias foram obtidas a partir de três repetições das diferentes concentrações de ácido ascórbico, de modo que as Figuras 27 e 28 apresentam as curvas médias para os padrões e para as amostras de comprimido fortificadas, respectivamente.

4.5.1 Validação da Metodologia Cromatográfica

Os resultados foram avaliados posteriormente quanto aos valores de recuperação, precisão, limite de detecção e quantificação, esses parâmetros encontram-se descritos na Tabela 8.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) obtidos pela técnica eletroanalítica foram calculados segundo as equações 17 e 18, respectivamente, para as amostras de padrão o LD calculado foi de $0,0236 \mu\text{mol L}^{-1}$ e o LQ $0,0788 \mu\text{mol L}^{-1}$; para as amostras de comprimido o LD calculado foi de $0,0594 \mu\text{mol L}^{-1}$ e o LQ $0,1981 \mu\text{mol L}^{-1}$. Também foi a média dos pontos para cada amostra e seus respectivos erros, de acordo equação 21, considerando-se os parâmetros descritos na seção 4.3.2.

Foram calculados também a equação da reta que melhor descreve o conjunto médio dos pontos, onde a foi calculado de acordo com a equação 3 e b , de utilizando-se a equação 2. O coeficiente de correlação linear foi calculado pela equação 12. E a recuperação e a precisão utilizando-se as equações 13 e 14, respectivamente. Todos os parâmetros foram calculados de acordo com o método proposto por Miller e Miller.¹

Os valores de recuperação obtidos para as amostras de comprimido variam entre 89,23-97,15%, com desvio padrão máximo de 4,06%, recomenda-se que esses valores sejam próximos a 100%, entretanto, nesse caso como o RSD é menor que 5%, valores menores que o ideal são aceitáveis.³⁴ Desta forma o método aplicado para a análise de comprimidos é preciso.

Figura 27 - Gráfico médio das curvas analíticas (n=5) para concentrações crescentes de AA (291, 338, 385, 431, 476, 521, 566, 610, 654, 698 $\mu\text{mol L}^{-1}$). FM: Ácido acético 2%; vazão: 1,0 mL min^{-1} ; VI: 20 μL , T_{col} : 25°C - Determinação de AA em soluções padrão.

Figura 28 - Gráfico médio das curvas analíticas (n=5) para concentrações crescentes de AA (291, 338, 385, 431, 476, 521, 566, 610, 654, 698 $\mu\text{mol L}^{-1}$). FM: Ácido acético 2%; vazão: 1,0 mL min^{-1} ; VI: 20 μL , T_{col} : 25°C - Determinação de AA em comprimidos.

Tabela 8- Resultados dos parâmetros de validação do método eletroanalítico para determinação de AA por HPLC

Parâmetro	Soluções Padrão	Comprimido
Faixa de Concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	291-698	291-698
Curva Analítica (μmolL^{-1})	$-5437 + 7887x$	$948303 + 7664x$
Coefficiente de Correlação (R)	0,9965	0,9983
Precisão (mín-máx) em RSD (%)	0,62-3,7	2,31-4,06
Recuperação (min-máx, %)	98,55-101,47	89,23-97,15
LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,0236	0,0594
LQ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,0788	0,1981

4.5.2 Efeito de Matriz

A Figura 29 apresenta uma comparação entre as curvas analíticas médias obtidas para as análises das soluções padrão e da amostra de comprimido de AA.

Figura 29 – Efeito de matriz na análise cromatográfica, comparação das curvas analíticas médias para concentrações crescentes de AA (291, 338, 385, 431, 476, 521, 566, 610, 654, 698 $\mu\text{mol L}^{-1}$) obtidas na análise dos padrões e da amostra de comprimido. FM: Ácido acético 2%; vazão: 1,0 mL min⁻¹; VI: 20 μL , T_{col}: 25°C.

Analisando-se os resultados obtidos verifica-se que como a amostra de comprimido já continha uma determinada quantidade de AA ($\sim 150 \mu\text{mol L}^{-1}$) a resposta obtida para as diferentes concentrações apresentou um incremento proporcional à esse valor.

4.6 Comparação Estatística dos métodos analíticos de determinação do AA pelo método de regressão linear

Para a obtenção das curvas de regressão linear primeiramente foram determinadas cinco curvas de calibração para as técnicas eletroquímica e cromatográfica, respectivamente, nas mesmas concentrações de padrão e amostra - neste caso o comprimido – para as diferentes metodologias. A partir das cinco curvas de calibração obtidas foi calculada uma curva média para ambas as técnicas.

Amostras de concentrações conhecidas, cujas concentrações deveriam fazer parte da faixa de concentração linear das curvas, foram utilizadas a fim de que suas concentrações fossem determinadas pela interpolação do sinal obtido (Corrente de pico anódico para a eletroanálise e área do pico cromatográfico para a cromatografia.) com a equação da curva de calibração média calculada para ambos os métodos.

Por fim, um gráfico foi construído colocando os valores de concentração obtidos pela interpolação dos sinais para a análise eletroquímica o eixo y, uma vez que este é o novo método proposto para a determinação do ácido ascórbico, versus os valores de concentração obtidos pela interpolação dos sinais para a análise cromatográfica para cada amostra no eixo x, pois este foi determinado como método padrão de comparação.

Os gráficos obtidos, representados nas Figuras 30 e 31 para os casos de análise de amostras de padrão e de comprimidos, respectivamente, são denominados curvas de regressão linear. Estes gráficos foram avaliados considerando-se os valores do seu intercepto, a , do seu coeficiente angular ou tangente da reta, b , e do seu coeficiente de correlação linear, r .

Figura 30 - Gráfico de regressão linear dos valores obtidos pelas técnicas DPV e HPLC para detecção de AA em soluções padrão.

Figura 31 - Gráfico de regressão linear dos valores obtidos pelas técnicas DPV e HPLC para detecção de AA em amostras de comprimido.

As figuras 30 e 31 apresentam os gráficos de regressão linear dos valores obtidos pelas técnicas DPV e HPLC para a determinação de AA em soluções padrão e amostras de comprimido. Esta metodologia avalia os valores do intercepto e do coeficiente angular das regressões obtidas.

Os comportamentos obtidos pelas Figuras 33 e 34 comparam-se com o exemplo representado na Figura 7d, o desvio do valor ideal do intercepto (0) pode ser explicado por erros do sinal de branco de um dos métodos. Além disso, o desvio do valor ideal do coeficiente angular (1) é explicado pela ocorrência de erros sistemáticos no coeficiente de uma das curvas de calibração. O problema no branco é muito comum em análises eletroquímicas e pode ser explicado, principalmente, pelo efeito da corrente capacitiva, característica de tais medidas.

A fim de verificar-se a correspondência entre os dois métodos avaliaram-se ambos os métodos pela realização de um teste t de Student Pareado, os resultados obtidos foram 1,82 para a análise de soluções padrão e 1,25 para a amostra de comprimido, valores menores que o tabelado, 2,23 para 10 graus de liberdade e 95% de confiança.

Assim, o novo método de determinação de AA, DPV, para ambas as amostras é equivalente à técnica padrão, HPLC.

5. Conclusão

Desenvolveu-se uma nova metodologia analítica para determinação de AA em amostras aquosas, para tal verificou-se o efeito da modificação do eletrodo de carbono vítreo com os diferentes materiais, o eletrólito suporte e seu respectivo pH, o volume de nanocompósito adicionado à superfície do carbono vítreo e os parâmetros da técnica DPV, amplitude e incremento de potencial.

Os valores escolhidos foram aqueles que contribuíram de forma significativa com a corrente e o potencial de pico anódicos e com a sensibilidade da técnica, avaliada pela tangente de inclinação das curvas analíticas obtidas para cada parâmetro.

Otimizados os parâmetros da DPV, aplicou-se a novo método para a detecção de ácido ascórbico em amostras de comprimido, obtendo-se uma curva analítica média representada pela equação $2,8133 + 0,0117x$, R: 0,99837, LQ: $0,0235 \mu\text{mol L}^{-1}$, LQ: $0,0783 \mu\text{mol L}^{-1}$ e RSD inferior a 4,18%.

A metodologia cromatográfica foi aplicada para a determinação de AA em amostras de comprimido e a curva analítica obtida corresponde à equação $948303 + 7664x$, cujo coeficiente de correlação 0,9983, LQ: $0,0594 \mu\text{mol L}^{-1}$, LQ: $0,1981 \mu\text{mol L}^{-1}$ com RSD inferior a 4,06% e definida como método padrão

A comparação dos resultados obtidos por ambas as técnicas foi realizada a partir dos gráficos de regressão linear. Verificou-se que os valores do intercepto e do coeficiente de correlação obtidos diferem-se do valor ideal, devido a erros aleatórios nas medidas bem como a erros no sinal do branco, que podem ser explicados pela corrente capacitiva presente no método eletroanalítico. Um teste t pareado confirmou a equivalência entre os métodos estudados para determinação de AA em comprimidos.

6. Referências Bibliográficas

- ¹MILLER, J. N.; MILLER, J. C. **Statistics and chemometrics for analytical chemistry**. 5ed. Harlow: Pearson Education, 2005. p. 107-147.
- ²SPINOLA, V.; EULOGIO, CASTILHO, P. Determination of vitamin C in foods: Current state of method validation. **Journal of Chromatography A**, v. 1369, p. 2-17, 2014.
- ³FONTANNAZ, P.; KILINÇ, T.; HEUDI, O. HPLC-UV determination of total vitamin C in a wide range of fortified food products. **Food Chemistry**, v. 94, n. 4, p. 626-631, 2006.
- ⁴AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. **Farmacopéia Brasileira**. 5 ed. Brasília, 2010. v. 2, p. 570-572. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/pdf/volume2.pdf>. Acesso em: 18 abril. 2014.
- ⁵NOVÁKOVÁ, L.; SOLICH, P.; SOLICHOVÁ, D. HPLC methods for simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids. **Trends in Analytical chemistry**, v. 27, n. 10, p. 942-958, 2008.
- ⁶VERMEIR, S.; HERTOOG, M. L. A. T. M.; SCHENKB, A.; BEULLENS, K.; NICOLAI, B. M.; LAMMERTYNA, J. Evaluation and optimization of high-throughput enzymatic assays for fast l-ascorbic acid quantification in fruits and vegetables. **Analytical Chimica Acta**, v. 618, n. 1, p. 94-101, 2008.
- ⁷PISOSCHI, A. M.; POP, A.; SERBAN, A. I.; FAFANEATA, C. Electrochemical methods for ascorbic acid determination. **Electrochimica Acta**, v. 121, p. 443-460, 2014.
- ⁸IJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. **Nature**, v. 354, p. 56-58, 1991.
- ⁹HAMADA, N.; SAWADA, S.; OSHYAMA, A. New one-dimensional conductors: graphitic microtubes. **Physical Review Letters**, v. 68, n. 10, p. 1579-1581, 1992.
- ¹⁰BAUGHMAN, R. H. Z., A. A.; HEER, W. A. Carbon nanotubes - The route toward applications. **Science**, v. 297, n. 5582, p. 787-792, 2002.
- ¹¹MASHETER, A. T.; ABIMAN, P.; WILDGOOSE, G. G.; WONG, E.; XIAO, L.; REES, N. V.; TAYLOR, R.; ATTARD, G. A.; BARON, R.; CROSSLEY, A.; JONES, J. H.; COMPTON, R. G. Investigating the reactive sites and the anomalously large changes in surface pKa values of chemically modified carbon nanotubes of different morphologies. **Journal of Materials Chemistry**, v. 17, n. 25, p. 2616-2626, 2007.
- ¹²HIURA, H.; EBBESEN, T. W.; TANIGAKI, K. Opening and purification of carbon nanotubes in high yields. **Advanced Materials**, v. 7, n. 3, p. 275-276, 1995.
- ¹³LIKODIMOS, V.; DIONYSIOU, D.; FALARAS, P. Clean water: water detoxification using innovative photocatalysts. **Reviews in Environment Science and Biotechnology**, v. 9, n. 2, p. 87-94, 2010.

- ¹⁴JAHJAH, M.; KIHN, Y.; TEUMA, E.; GOMEZ, M. Ruthenium nanoparticles supported on Multi-Walled carbon nanotubes: Highly effective catalytic system for hydrogenation processes. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 332, n.1, p.106-112, 2010.
- ¹⁵LUO, J.; JIANG, S.; ZHANG, H.; JIANG, J.; LIU, X. A novel non-enzymatic glucose sensor based on Cu nanoparticle modified graphene sheetes Electrode. **Analytical Chimica Acta**, v. 709, n. 1, p. 47-53, 2012.
- ¹⁶SHIN, S. H.; HONG, H. G. Anodic stripping voltammetric detection of arsenic(III) at platinum-iron(III) nanoparticle modified carbon nanotube on glassy carbon electrode. **Korean Chemical Society**, v. 31, n. 11, p. 3077-3083, 2010.
- ¹⁷SHAHROKHIAN, S.; RASTGAR, S. Construction of an electrochemical sensor based on the electrodeposition of Au-Pt nanoparticles mixtures on multi-walled carbon nanotubes film for voltammetric determination of cefotaxime. **Analyst**, v. 137, n. 11, p. 2706-2015, 2012.
- ¹⁸CHIH, Y. K.; YANG, M. C. Simultaneous detection of dopamine and ascorbic acid using silver/silver sulfide modified carbon nanotube electrodes. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 45, n. 3 p. 833-839, 2014.
- ¹⁹TESAROVA, E.; BALDRIANOVA, L.; HOCEVAR, S. B.; SAVANCARA, I.; VYTRAS, K. Anodic stripping voltammetric measurement of trace heavy metals at antimony film carbon paste electrode. **Electrochimica Acta**, v. 54, n. 5, p. 1506-1510, 2009.
- ²⁰WANG, Z.; TIAN, W.; LIU, X.; YANG, R.; LI, X. Synthesis and electrochemical performances of amorphous carbon-coated Sn–Sb particles as anode material for lithium-ion batteries. **Journal of Solid State Chemistry**, v.180, n. 12, p. 3360-3365, 2007.
- ²¹SVANCARA, I.; VYTRAS, K.; OGOREVEC, B. Anodic stripping voltammetric measurement of trace heavy metals at antimony film carbon paste electrode. **Eletrochimica Acta**, v. 54, n. 5, p. 1506-1510, 2009.
- ²²MORAES, F. C.; CESARINO, I.; CESARINO, V.; MASCARO, L. H.; MACHADO, S. A. S. Carbon nanotubes modified with antimony nanoparticles: A novel material for electrochemical sensing. **Eletrochimica Acta**, v. 85, n. 12 p. 560-565, 2012.
- ²³SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de química analítica**. 8. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010. p. 862-898.
- ²⁴SCHERER, R.; RYBKA, A. C. P.; GODOY, H. T. Determinação simultânea dos ácidos orgânicos tartárico, málico, ascórbico e cítrico em polpas de acerola, açaí e caju e avaliação da estabilidade em sucos de caju. **Química Nova**, .v. 31, n. 5, p. 1137-1140, 2008.
- ²⁵HERNÁNDEZ, Y.; LOBO, M.G.; GONZÁLEZ, M. Determination of vitamin C in tropiacal fruits: a comparative evaluation of methods. **Food Chemistry**, v. 96, n. 4, p. 654-664, 2006.

- ²⁷GARRIDO-FRENICH, A.; HERNÁNDEZ-TORRES, M. E.; BELMONTE-VEJA, A.; MARTINEZ-VIDAL, J. L.; PLAZA BOLAÑOS, P. Determination of ascorbic acid and carotenoids in food commodities by liquid chromatography with mass spectrometry detection. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, v. 53, n. 19, p. 7371-7376, 2005.
- ²⁸FURUSAWA, N-Rapid high-performance liquid chromatographic identification/quantification of total vitamin C in fruit drinks. **Food Control**, v. 12, n. 1, p. 27-29, 2001.
- ²⁹SÁNCHEZ-MATA, M. C.; CÁMARA-HURTADO, M.; DÍEZ-MARQUÉS, C.; TORIJA-IASASA, M. E. Comparison of high performance liquid chromatography and spectrofluorimetry for vitamin C analysis of green beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **European Food Research and Technology**, v. 210, n. 3, p. 220-225, 2000.
- ³⁰ENGEL, R.; STEFANOVITS-BÁNYAI, É.; ABRANKÓ, L. LC simultaneous determination of free forms of B group vitamins and vitamin c in various fortified food products. **Chromatographia**, v. 71, n. 11, p. 1069-1074, 2010.
- ³¹NOVÁKOVÁ, L.; SOLICHOVÁ, D.; PAVLOVICOVÁ, S.; SOLICH, P. Hydrophilic interaction liquid Chromatography method for the determination of ascorbic acid. **Journal of Separation Science**, v. 31, n. 9, p. 1634-1644, 2008.
- ³²SINGH, R. HPLC method development and validation, an overview. **Journal of Pharmaceutical Education and Research**, v. 4, n. 1, p. 26-33, 2013.
- ³³INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. DOQ-CGCRE-008 – Revisão 04- Jul/2011. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/organismos/doc_organismos.asp?tOrgtOrgan=CalibEnsaio>. Acesso em: 27 jun. 2015.
- ³⁴BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. Resolução nº. 899 de 29 de maio de 2003. **Diário Oficial da União**, Brasília, de 02 de Junho de 2003. Seção 2.4.3, p. 5. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4983b0004745975da005f43fbc4c6735/RE_899_2003_Determina+a+publica%C3%A7%C3%A3o+do+Guia+para+valida%C3%A7%C3%A3o+de+m%C3%A9todos+anal%C3%ADticos+e+bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 27 jun. 2015.