



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação Farmácia-Bioquímica

Mariana Carlomagno de Paula

**Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por
CLAE para quantificação de ácido gentísico em emulsão
cosmética**

Araraquara, SP

2022

Mariana Carlomagno de Paula

**Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por
CLAE para quantificação de ácido gentísico em emulsão
cosmética**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Farmacêutica Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antonio Corrêa

Araraquara, SP

2022

P324d Paula, Mariana Carlomagno de.
Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por CLAE para
quantificação de ácido gentísico em emulsão cosmética / Mariana Carlomagno de
Paula. – Araraquara: [S.n.], 2022.
46 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação – Farmácia Bioquímica) –
Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências
Farmacêuticas.

Orientador: Marcos Antonio Corrêa.

1. CLAE. 2. Cosmetologia. 3. Emulsões. 4. Ácida gentísico. I. Corrêa, Marcos
Antonio, orient. II. Título.

Dedicatória

A minha família que sempre me apoiou e esteve ao meu lado em todos os momentos, especialmente meus pais, Cláudia Carlomagno de Paula e Edison Doniseti de Paula, que sempre prezaram pela minha educação, visando a possibilidade de um futuro repleto de sucesso e possibilidades para mim.

Aos amigos que fiz durante a faculdade e que se tornaram minha família durante esse período, estando ao meu lado nos momentos bons e também nos difíceis, e que me ajudaram a superar todos os obstáculos e a ser uma pessoa melhor e mais forte. Em especial a Thayna Pizzocaro, Mayara Augusto, Beatriz Brighenti, Maria Carolina Franzini. Também a Giulia Pillon, com quem eu tive a incrível oportunidade de dividir minha casa e minha vida por dois anos, e, que em muitos momentos, foi o meu lar.

A todos meus amigos que estão na minha vida desde que me conheço por gente e aos que me apoiaram na difícil jornada final da faculdade durante a pandemia, especialmente a Julia Cupertino, Milena Escudero (e Alice Escudero), Fernanda Zanelatto, Julia Souza e Victória Pasquarelli.

E a Deus por ter me guiado e dado força para superar todos os obstáculos.

Agradecimentos

A todo corpo docente da Faculdade de Ciências Farmacêuticas que fizeram parte do meu processo de formação e não mediram esforços para passar todo o conhecimento que possuem, em especial ao meu professor orientador Marcos Antonio Corrêa e à coorientadora Caroline Magnani Spagnol que me ajudaram durante todo o desenvolvimento deste projeto.

Ao grupo de pesquisa do laboratório de Cosmetologia, por todos ensinamentos e ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

E por fim, gostaria de agradecer pelo auxílio financeiro provido pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), que foi de suma importância para a realização deste trabalho.

Resumo

O ácido gentísico (AGe) é um ácido fenólico encontrado em plantas medicinais da família *Lamiaceae*, que apesar de possuir propriedades interessantes, por exemplo atividade antioxidante, ainda é pouco utilizado em preparações cosméticas oferecidas no mercado e há poucos estudos que mostram sua eficácia quando incorporado a uma preparação. Além disso, não existem metodologias validadas para a quantificação do AGe nos compêndios oficiais. Visando suprir essa lacuna de informações a respeito do AGe, neste projeto desenvolvemos e validamos um método analítico por CLAE para quantificação do ativo, o qual foi incorporado em um sistema emulsionado óleo em água (O/A). O desenvolvimento e a validação de metodologia analítica tem como objetivo garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados analíticos necessários para, num momento posterior, ser aplicado a estudos de estabilidade e eficácia. Os parâmetros analisados foram linearidade, especificidade, exatidão, precisão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez.

Palavras-chave: CLAE, cosmetologia, emulsões, ácido gentísico.

Abstract

Gentisic acid (AGe) is a phenolic acid found in medicinal plants of the *Lamiaceae* family, which despite having interesting properties, such as antioxidant activity, is still little used in cosmetic preparations offered on the market and there are few studies that show its effectiveness when incorporated to a preparation. In addition, there are no validated methodologies for the quantification of AGe in official compendia. In order to fill this gap in information about AGe, in this project we developed and validated an analytical method by HPLC to quantify the active, which was incorporated into an oil-in-water (O/W) emulsified system. The development and validation of analytical methodology aims to ensure, through experimental studies, that the method meets the requirements of analytical applications, ensuring the reliability of the analytical results needed to, at a later time, be applied to stability and efficacy studies. The parameters analyzed were linearity, specificity, accuracy, precision, detection limit, quantification limit and robustness.

Keywords: HPLC, cosmetology, emulsions, gentisic acid.

Lista de figuras

Figura 1. Ácido gentísico, CAS 490-79-9, $C_7H_6O_4$, $154,12 \text{ g.mol}^{-1}$	16
Figura 2. Cromatograma obtido por CLAE no teste 1, utilizando-se proporção de fase móvel (etanol:água) 60:40; vazão $0,7 \text{ mL.min}^{-1}$; comprimento de onda 335nm e coluna C18 / 250 x 4mm / 5 μm	23
Figura 3. Cromatograma obtido por CLAE no teste 2, utilizando-se proporção de fase móvel (etanol:água) 60:40; vazão $0,7 \text{ mL.min}^{-1}$; comprimento de onda 220 nm e coluna C18 / 250 x 4mm / 5 μm	24
Figura 4. Cromatograma obtido por CLAE no teste 3, utilizando-se proporção de fase móvel (etanol:água) 60:40; água acidificada com ácido acético a 0,1%; vazão $0,7 \text{ mL.min}^{-1}$; comprimento de onda 220 nm e coluna C18 / 250 x 4mm / 5 μm	24
Figura 5. Cromatograma obtido por CLAE no teste 4, utilizando-se proporção de fase móvel (etanol:água) 60:40; água acidificada com ácido acético a 0,5%; vazão $0,7 \text{ mL.min}^{-1}$; comprimento de onda 220 nm e coluna C18 / 250 x 4mm / 5 μm	25
Figura 6. Cromatograma obtido por CLAE no teste 5 utilizando-se proporção de fase móvel (etanol:água) 70:30; água acidificada com ácido fórmico a 0,5%; vazão $0,7 \text{ mL.min}^{-1}$; comprimento de onda 220nm e coluna C18 / 250 x 4mm / 5 μm	25
Figura 7. Cromatograma obtido por CLAE no teste 6 utilizando-se proporção de fase móvel (etanol:água) 70:30; água acidificada com ácido fórmico a 0,5%; vazão $0,7 \text{ mL.min}^{-1}$; comprimento de onda 325nm e coluna C18 / 250 x 4mm / 5 μm	26
Figura 8. Cromatograma obtido por CLAE no teste 7 utilizando-se proporção de fase móvel (etanol:água) 70:30; água acidificada com ácido trifluoroacético a 0,5%; vazão $0,7 \text{ mL.min}^{-1}$; comprimento de onda 325nm e coluna C18 / 150 x 4,6mm / 5 μm	26
Figura 9. Cromatograma da injeção de padrão, amostra e base da emulsão, na concentração de $100 \mu\text{g/mL}$ diluídas na fase móvel utilizando coluna Eclipse Plus C18 (4,6 x 150 mm, 5 μm , Agilent), vazão $0,7 \text{ mL.min}^{-1}$, detecção a 325 nm.....	28
Figura 10. Cromatograma obtido por CLAE para solução de ácido gentísico ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$), em HCl.....	28
Figura 11. Cromatograma obtido por CLAE para solução de ácido gentísico ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$), em NaOH 0,001 M, a 80°C	29
Figura 12. Cromatograma obtidos por CLAE para solução de ácido gentísico ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$), em água, a 80°C	29
Figura 13. Cromatograma obtidos por CLAE para solução de ácido gentísico ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$), em luz ultravioleta.....	29
Figura 14. Cromatograma obtidos por CLAE para solução de ácido gentísico ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$), em H_2O_2 a 80°C	30

Figura 15. Curva analítica do AGe obtida pelo método cromatográfico, utilizando como solvente a fase móvel.....	31
Figura 16. Cromatograma do ácido gentísico em concentrações de 20, 40, 60, 80, 100 µg/mL, obtidas pelo CLAE a 325 nm.	31
Figura 17. Gráfico de Resíduos	32

Lista de Tabelas

Tabela 1. Composição percentual das emulsões.	17
Tabela 2. Condições testadas para validação do método.	18
Tabela 3. Preparo das soluções para o teste de recuperação de método CLAE.	21
Tabela 4. Valores das áreas referentes ao pico de ácido gentísico para obtenção da curva analítica do método cromatográfico.	30
Tabela 5. Análise de Variância (ANOVA) para os valores da Curva Analítica	32
Tabela 6. Valores obtidos no teste de recuperação do AGe na emulsão utilizando o método por CLAE.	33
Tabela 7. Valores das áreas referentes ao pico de ácido gentísico no estudo da repetibilidade e precisão intermediária do método.	33
Tabela 8. Teste F da precisão interanalista do método de CLAE.	34
Tabela 9. Determinação do limite de detecção do método analítico de quantificação do AC por CLAE.	34
Tabela 10. Valores obtidos na avaliação da robustez do método por CLAE para análise de AC.	35

Lista de Abreviaturas e Siglas

AGe – Ácido gentísico

CAS – Chemical Abstract Service

Calc - Calculado

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DP – Desvio padrão

DPR – Desvio padrão relativo

GL – Graus de liberdade

HCl – Ácido clorídrico

HPPC – Indústria Brasileira de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de quantificação

NaOH – Hidróxido de sódio

O/A – Óleo em água

SQ – Soma dos quadrados

Tab – Tabelado

TFA – Ácido trifluoroacético

Sumário

Dedicatória	3
Agradecimentos	4
Resumo	5
Abstract	6
Lista de figuras	7
Lista de Tabelas	9
Lista de Abreviaturas e Siglas	10
1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVO	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1. Desenvolvimento das formulações	17
3.2. Desenvolvimento de metodologia analítica para quantificação do AGe	17
3.3. Validação de metodologia analítica para quantificação do AGe	19
3.3.1. Linearidade	19
3.3.2. Seletividade	20
3.3.3. Exatidão	20
3.3.4. Precisão	21
3.3.5. Limite de detecção e de quantificação	22
3.3.6. Robustez	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1. Desenvolvimento de metodologia analítica para quantificação do AGe	23
4.2. Seletividade	27
4.3. Linearidade	30
4.4. Exatidão	32
4.5. Precisão	33
4.6. Limite de detecção e quantificação	34
4.7. Robustez	34
5. CONCLUSÃO	35
6. REFERÊNCIAS	38
Anexos	41

1. INTRODUÇÃO

O mercado brasileiro de cosméticos está entre os mais importantes do mundo, ocupando a 4ª posição no ranking mundial, ficando atrás apenas dos Estados Unidos, China e Japão. Nos últimos 20 anos, a Indústria Brasileira de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (HPPC) exibiu um crescimento médio deflacionado composto com proximidade a 11,4%. Esse crescimento se deve a diversos fatores, dentre eles o aumento da expectativa de vida, que trouxe a necessidade de conservar uma impressão de juventude (ABIHPEC, 2022).

Segundo dados do IBGE, o crescimento da população acima dos 40 anos é maior que o crescimento total da população brasileira. No ano 2000 essa faixa etária correspondia a 26,6% da população (46,7 milhões de pessoas), enquanto em 2016 essa população correspondia a 36,3% (76,1 milhões de pessoas). Em 16 anos, o crescimento total da população brasileira foi de 19,2%, enquanto o da população acima dos 40 anos 62,7%. Esses números ratificam a necessidade e importância do desenvolvimento de produtos com características técnicas e sensoriais específicas para essa faixa etária (KASRIEL-ALEXANDER, 2016).

O envelhecimento cutâneo está associado à perda de tecido fibroso, diminuição da velocidade de renovação celular e redução na rede vascular e glandular. A função de barreira que mantém a hidratação celular também fica prejudicada e as funções fisiológicas normais da pele podem diminuir em 50% até a meia-idade, dependendo do componente genético e do estilo de vida (Sociedade Brasileira de Dermatologia, 2016).

Durante o envelhecimento cronológico cutâneo, ocorrem modificações do material genético por meio de enzimas e alterações proteicas, que contribuem para redução da proliferação celular. Dessa forma, o tecido perde sua elasticidade e capacidade de regular as trocas aquosas, tornando a replicação do tecido menos eficiente. Reações de oxidação química e enzimática, com formação de radicais livres, aceleram o processo de envelhecimento (BAGATIN, 2010).

Considerando o panorama atual em que a longevidade concretiza-se como grande avanço a nível global, do ponto de vista da cosmetologia, vislumbram-se novas perspectivas de crescimento para o setor que pode e deve enxergar como uma oportunidade de negócios as preparações que envolvam o cuidado da pele,

conhecidos como preparações *skin care*. No Brasil esta expectativa ganha contornos mais relevantes ao considerar-se tratar de um setor com altíssima perspectivas de ser desenvolvido (ABIHPEC, 2022).

Dados recentes informam que o país ocupa a 2ª posição no mercado global no comércio de fragrâncias, produtos masculinos e desodorantes, sendo também o 2º mercado no ranking global de países que mais lançam produtos anualmente. Além disso o Brasil é o 3º maior mercado em produtos infantis e proteção solar; o 4º mercado em produtos para cuidados com o cabelo; o 5º mercado para higiene oral e produtos para banho, o 7º mercado em maquiagem e o 8º mercado para preparações que objetivam tratar a pele (ABIHPEC, 2022). Fatores como o aumento da expectativa de vida, o maior consumo das jovens brasileiras, o aumento do consumo masculino e a maior procura por produtos de limpeza e hidratação foram fatores que contribuíram para tais posições (ABIHPEC, 2022).

O mercado de *skin care* por sua vez é muito segmentado incluindo, dentre outros produtos, os cremes faciais com função antienvelhecimento, os cremes hidratantes faciais, as preparações destinadas à limpeza, ao tratamento da acne, os tonificantes, as clareadoras da pele, as destinadas os cuidados dos lábios, as máscaras faciais entre outros (ABDI; ABIHPEC, 2022). Apesar dessa segmentação, percebe-se claramente o espaço existente neste específico segmento de mercado com alta capacidade de ser desenvolvido comercialmente.

A premissa de que a afirmação acima é real torna-se compreensível ao considerar também que, de acordo com as tendências globais, o mercado nacional pode orientar um possível crescimento em consumo das preparações *skin care* baseado nas seguintes características, atitudes e comportamentos: o clima tropical brasileiro faz com que as mulheres sintam-se bem ao hidratar a pele do corpo e fundamentalmente a da face; existe alta recomendação de produtos prescritos por dermatologistas; as farmácias tem aumentado a participação de produtos dermatológicos em seu portfólio, incluindo consultoras para orientação e atendimento; os produtos para tratamento da pele estão atingindo cada vez mais as gerações Y e Z; a conscientização dos danos causados pelo sol tem reforçado a necessidade de cuidados específicos e a longevidade com o caráter saudável tem incrementado o segmento das

preparações antienvhecimento (ABIHPEC, 2018).

Tendo-se em conta que o envelhecimento é uma preocupação para a maioria das pessoas, somado ao fato de que a maioria delas acredita que a utilização de um produto antienvhecimento auxilia ou contribui para a prevenção de rugas, torna-se evidente que o nicho envolvendo o tratamento preventivo da pele ou das preparações antienvhecimento apresentam forte tendência de real crescimento.

Além disso, nos últimos anos foi possível observar um grande crescimento da demanda por produtos com ativos naturais graças às fortes tendências mundiais no que diz respeito a sustentabilidade e consciência ecológica (ABIHPEC; SEBRAE, 2018; MARCATO, 2019). É possível ver o reflexo dessas tendências ao observar-se o comportamento do consumidor que tem buscado cada vez mais produtos que possuam o apelo de natural, saudável e sustentável, permitindo o crescimento de vendas nesse setor. Grandes empresas de cosméticos como L'Oréal e O Boticário vem direcionando seu foco e marketing para o que diz respeito ao eco-design dos produtos, tendo em vista a seleção de matérias-primas adotando os princípios da química verde e a delimitação do impacto causado pelos ingredientes utilizados. Isso mostra que no Brasil existe clara percepção de mercado que o tema é bastante relevante a ponto de estar consolidado em fabricantes importantes deste setor (ZUCCO et al., 2020).

Devido à falta de tempo cada vez mais evidente na vida do século XXI, outro conceito que tem tido destaque, especialmente no que diz respeito aos cosméticos antienvhecimento, é o de produtos “multifuncionais”. Homens e mulheres cada vez mais procuram manter a aparência jovial, porém cada vez menos têm tempo para se dedicar aos rituais de beleza, portanto os cosméticos com multifunções são uma escolha certa que levam à economia de tempo e até mesmo de dinheiro, já que com o uso de diversos ativos com diferentes funções em um só produto há economia de embalagens e trabalho de produção. (SATHLER, 2018). A alta demanda por preparações que ofereçam mais de um benefício é uma realidade do setor cosmético a nível global. Do ponto de vista tecnológico diversas matérias-primas têm sido introduzidas visando facilitar as técnicas de formulações e proporcionando habilidades para desenvolver produtos que possam atender a estas multifunções (WIECHERS, 2003).

As preparações antienvhecimento ou anti-idade que contenham ativos

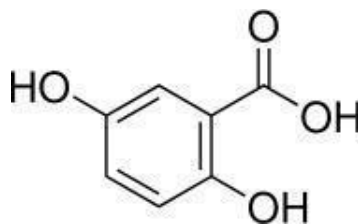
naturais vêm ganhando destaque no setor cosmético. Esses ativos se mostram tecnicamente e economicamente mais viáveis quando possuem propriedades multifuncionais (WIECHERS, 2003).

A presença de compostos fenólicos em plantas medicinais tem sido frequentemente estudada. Dentre elas, a família *Lamiaceae* apresenta diversos destes compostos na forma livre, entre eles o ácido gentísico (AGe) (GRAZYNA e KAZIMIERZ, 2001). Este grupo de compostos fenólicos é constituído por algumas substâncias denominadas de ácidos fenólicos. Essas substâncias são caracterizadas por terem um anel benzênico e um grupamento carboxílico ligado a ele, além de um ou mais grupamentos de metoxila e/ou hidroxila também ligados ao anel. Embora o ácido gentísico possa ser encontrado na natureza, conforme citado acima, o uso da planta *in natura* em preparações cosméticas pode ser de difícil aplicação e solução farmacotécnica, assim como sua extração da planta, o que pode tornar esta fonte natural inviável economicamente. Por se tratar de uma molécula relativamente simples, sua síntese encontra-se muito bem elucidada (MORRIS, 1949), existindo diversos fabricantes disponíveis no mercado, o que reduz de modo significativo o seu custo e, portanto, pode viabilizar sua utilização em preparações cosméticas, desde que comprovada sua eficácia conforme se propõe neste estudo.

De acordo com Giada (2006), a atividade antioxidante dos compostos fenólicos é um efeito da facilidade com a qual um átomo de hidrogênio de um grupo hidroxila (OH) da sua estrutura aromática é doado para um radical livre, bem como a habilidade desta em suportar um elétron não emparelhado através do deslocamento deste ao redor de todo o sistema de elétrons da molécula.

O ácido gentísico e seus sinônimos: ácido 2,5-dihidroxibenzoico; 2,5- BHBA; ácido hidroquininacarboxílico, é registrado no Chemical Abstract Service (CAS) com número 490-79-9. Apresenta fórmula molecular $C_7H_6O_4$, fórmula linear $(OH)_2C_6H_3CO_2H$ e massa molar $154,12 \text{ g.mol}^{-1}$. Apresenta-se como pó cristalino de branco a amarelado, ponto de fusão de $199,5^\circ\text{C}$ e possui a característica de formar cristais monoclinicos em forma de prisma quando em solução aquosa. Sua solubilidade em água é estimada em $12,3 \text{ g.litro}^{-1}$, pH 1,74 e pKa 2,53.

Figura 1. Ácido gentísico, CAS 490-79-9, C₇H₆O₄, 154,12 g/mol



Fonte: Wikipédia, 2021.

Esse trabalho teve como objetivo desenvolver e validar uma metodologia analítica através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para a quantificação do ácido gentísico em emulsão cosmética. Essa é uma técnica de separação que tem grande destaque na química analítica devido à sua capacidade de realizar análises quantitativas e qualitativas em diferentes tipos de amostras, dentre elas espécies voláteis e termicamente instáveis, com resultados confiáveis (RIBANI et al., 2004; TONHI et al., 2002). Para realizá-la é necessário a utilização de um cromatógrafo composto por bomba e coluna cromatográfica que suportem altas pressões que são inerentes à eluição da fase móvel, ao registrador e ao detector (DEGANI et al., 1998; PERES, 2002).

Durante a técnica de CLAE, as partículas da fase estacionária passam por um processo denominado “miniaturização” devido às altas pressões utilizadas, isso significa que pode haver redução do diâmetro dessas moléculas (em torno de 5,0 µm). Tal processo leva a um aumento da área superficial da coluna cromatográfica, gerando uma separação mais eficiente dos componentes da amostra e também permite a utilização de volume de amostra e coluna menores, gerando a redução dos gastos com a fase móvel (FRANCO, 2015). A separação das moléculas promovida por CLAE pode ocorrer por adsorção, partição, exclusão molecular ou troca iônica e acontece com base na interação que ocorre entre a amostra, a fase estacionária e a fase móvel (DEGANI et al., 1998).

Apesar de possuir propriedades interessantes, o ácido gentísico é pouco utilizado em preparações cosméticas oferecidas no mercado e há poucos estudos que mostram a eficácia desse ácido incorporado a uma preparação. Para comprovar tal eficácia foi realizado o desenvolvimento e validação de metodologia analítica por CLAE, a qual garante, através de estudos experimentais, que o método atende às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados.

2. OBJETIVO

Este trabalho de conclusão de curso teve como objetivo desenvolver e validar o método analítico por CLAE para quantificação de ácido gentísico em emulsão cosmética.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Desenvolvimento das formulações

Foram desenvolvidas emulsões óleo em água (O/A) contendo ácido gentísico em diferentes concentrações. O controle foi feito através de formulação emulsão base (Tabela 1).

Tabela 1. Composição percentual das emulsões.

Compostos	F1	F2	F3	F4	Emulsão Base
Álcool Cetearílico	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0
Álcool cetoestearílico etoxilado 20EO	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Monoestearato de Glicerila	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Monoestearato de Glicerila AE	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Glicerina	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Fenoxietanol	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
EDTA Dissódico	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Ácido Gentísico	0,04	0,06	0,08	0,10	-
Água q.s.p	100	100	100	100	100

Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

3.2. Desenvolvimento de metodologia analítica para quantificação do AGe

Validar um processo significa que um processo analítico é aceitável para a finalidade a que ele se destina. As condições da validação de um método analítico englobam estudos da linearidade, especificidade, precisão, exatidão e limite de detecção e quantificação (HARRIS, 2012).

Diversas condições cromatográficas foram testadas, a fim de encontrar aquela que permitiria a quantificação confiável do fármaco, redução da assimetria do pico, redução de danos à coluna cromatográfica, além de diminuir a geração de resíduos.

Foi utilizado o equipamento Waters®, composto de bomba cromatográfica gradiente binária Waters 1525, injetor manual Rheodyne Breeze 7725i com detector UV Waters 248 e coluna Eclipse Plus C18 (150 x 4,6 mm / 5 µm).

Os métodos desenvolvidos foram comparados através de análise estatística utilizando a análise de variância (ANOVA), disponível no programa Excel (MS Office), com nível de significância de 95%.

As condições que foram testadas na cromatografia líquida de alta eficiência estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Condições testadas para validação do método.

Teste	Proporção de Fase Móvel (Etanol:Água)	Água Acidificada	Vazão (mL.min ⁻¹)	Comprimento de onda (nm)	Coluna
1	60:40	-	0,7	335	Waters Symetry C18 (250 x 4 mm / 5 µm)
2	60:40	-	0,7	220	Waters Symetry C18 (250 x 4 mm / 5 µm)
3	60:40	Ácido acético 0,1%	0,7	220	Waters Symetry C18 (250 x 4 mm / 5 µm)
4	60:40	Ácido acético 0,5%	0,7	220	Waters Symetry C18 (250 x 4 mm / 5 µm)
5	70:30	Ácido fórmico 0,5%	0,7	220	Waters Symetry C18 (250 x 4 mm / 5 µm)
6	70:30	Ácido fórmico 0,5%	0,7	325	Waters Symetry C18 (250 x 4 mm / 5 µm)
7	70:30	Ácido	0,7	325	Eclipse Plus

trifluoroacético	C18 (150 x
0,5%	4,6
	mm / 5 µm)

Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

Os cálculos realizados foram:

- Estimativa do volume morto

Sendo,

$$\frac{1}{2} \text{volume} = \frac{\pi \cdot (r)^2 \cdot \text{comprimento da coluna}}{2} \quad (1)$$

$$\text{Volume morto} = \frac{\left(\frac{\frac{1}{2} \text{volume morto}}{1000} \right)}{\text{vazão}} \quad (2)$$

- Fator de capacidade

$$K = \frac{T_r - T_o}{T_o} \quad (3)$$

- Fator de alargamento

$$T = \frac{(a+b)}{2a} \quad (4)$$

- Número de pratos

$$N = 5,54 \cdot \left(\frac{V_e}{W_{\frac{1}{2}}} \right)^2 \quad (5)$$

Onde:

$W_{\frac{1}{2}}$: largura do pico na metade da altura deste

V_e : tempo de retenção em cm.minuto⁻¹

3.3. Validação de metodologia analítica para quantificação do AGE

Na validação dos métodos foram utilizados critérios de aceitação de acordo com o ICH e a RDC 166, de 25 de julho de 2017.

3.3.1. Linearidade

A linearidade de um método analítico é a capacidade de produzir resultados que são diretamente proporcionais a concentração do analito incluso em uma dada faixa (BRASIL, 2017).

Para avaliação da linearidade foram preparadas cinco soluções padrão do AGE em diferentes concentrações, em triplicata: Padrão 1: 20 µg.mL⁻¹; Padrão 2: 40 µg.mL⁻¹; Padrão 3: 60 µg.mL⁻¹; Padrão 4: 80 µg.mL⁻¹; Padrão 5: 100 µg.mL⁻¹.

Verificando-se a relação linear e os resultados foram tratados pelo coeficiente

de variação em relação ao fator de resposta de cada concentração. Foram consideradas satisfatórias as curvas analíticas com coeficiente de correlação acima de 0,999. Além disso, as curvas analíticas foram estatisticamente avaliadas pela análise de variância (ANOVA), disponível no programa Excel (MS Office). No teste de hipótese da significância da regressão, a hipótese nula (H_0) considerou o coeficiente angular $b \neq 0$ e a hipótese alternativa (H_1), $b = 0$. Se o valor de F calculado for maior que F tabelado a hipótese nula é rejeitada e a alternativa aceita, ressaltando a linearidade no intervalo estudado; caso contrário, mostra que o método está sujeito a erros sistemáticos.

3.3.2. Seletividade

A seletividade pode ser avaliada submetendo-se o analito a condições de estresse, que forcem a obtenção de produtos de degradação, sendo possível verificar a interferência destes produtos na análise. Porém, o método por CLAE não é capaz de identificar os compostos gerados. Esta análise foi realizada, primeiramente pelo preparo da solução padrão de AGE a $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em balão de 100 mL, posteriormente sendo dividida em 5 frascos-shot, cada um contendo 15 mL da solução padrão, e o volume deve ser completado para 25 mL com: (1) solução de ácido clorídrico 0,001 M; (2) solução de hidróxido de sódio 0,001 M; (3) solução oxidativa contendo peróxido de hidrogênio 3%; (4 e 5) água. Sendo que (4) foi exposto à luz ultravioleta (254 nm) e (5) à água, e todos ficaram expostos à água a 80°C , exceto o (4), que ficou a 25°C . Todos os frascos foram expostos por um período de oito horas, então foi possível verificar a presença de picos de degradação que possam interferir na análise.

3.3.3. Exatidão

A exatidão de um método analítico é o grau de concordância entre o valor médio obtido de uma sequência de resultados e o valor de referência aceito como verdadeiro (BRASIL, 2017).

Foi determinada pelo ensaio de recuperação, utilizando o método de adição de padrão. O teste de recuperação foi realizado adicionando três níveis de concentração, 80 (R1), 100 (R2) e 120% (R3), em relação à concentração de trabalho, de solução de AGE às amostras. O ensaio foi realizado em triplicata nas concentrações de 48; 60 e $72 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A porcentagem de recuperação foi

calculada para cada nível de concentração. Desta maneira, foi possível avaliar a exatidão do método em determinar o teor de amostras com concentrações pré-determinadas. As amostras foram preparadas de acordo com a Tabela 3.

Valores entre 98,0% e 102,0% foram considerados adequados (MARQUES; BROW, 2002).

Tabela 3. Preparo das soluções para o teste de recuperação de método CLAE.

Soluções	Volume		Concentração	Recuperação
	adicionado de emulsão base (µL)	Volume adicionado de padrão (µL)	final teórica (µg.mL ⁻¹)*	
R1	2000	1200	48	80%
R2	2000	1500	60	100%
R3	2000	1800	72	120%
P	-	1500	60	100%

Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

3.3.4. Precisão

Segundo Brasil (2017), a precisão do método analítico é o grau de consonância entre valores de medidas independentes ao redor de um valor central, efetuada várias vezes em uma amostra homogênea com condições pré-estabelecidas. A precisão é expressa em termos de desvio padrão e desvio padrão relativo.

Foi avaliada por meio da repetibilidade, na qual sete réplicas da solução de AGe na concentração de 60,0 µg.mL⁻¹ foram analisadas no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais e pelo mesmo analista e o desvio padrão relativo (DPR) entre as análises foi calculado.

Também foi realizada a precisão intermediária, análise entre diferentes analistas no mesmo dia, e o desvio padrão relativo foi calculado para as respostas obtidas para as sete réplicas da solução de AGe preparadas pelos diferentes analistas.

Considerou-se a precisão dos métodos adequada quando foram obtidas estimativas de desvio padrão relativo entre as determinações inferiores a 2% (USP, 2008).

3.3.5. Limite de detecção e de quantificação

O limite de detecção, chamado também de limite inferior de detecção, é a quantidade mínima do analito que é significativamente diferente de um branco (HARRIS, 2012). O limite da detecção (LD) do AGe foi determinado a partir das três curvas analíticas obtidas, utilizando-se os dados de desvio padrão do intercepto e inclinação média da curva analítica, conforme a Equação 6 apresentada abaixo:

$$LD = \frac{DPa \cdot 3,3}{IC} (6)$$

Em que:

DPa= desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, três curvas analíticas;

IC= inclinação da curva analítica.

Já o limite de quantificação (LQ) caracteriza a menor concentração da substância analisada que pode ser medida, utilizando um certo procedimento experimental. Este será obtido com base nos mesmos dados descritos, segundo a Equação 7 apresentada abaixo:

$$LQ = \frac{DPa \cdot 10}{IC} (7)$$

Em que:

DPa= desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, três curvas analíticas;

IC: inclinação da curva analítica.

Ambos os limites são expressos em concentrações (BRASIL, 2017).

3.3.6. Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso rotineiro.

Na avaliação da robustez constata-se a suscetibilidade do método a variações nas condições analíticas e, assim, as precauções que devem ser incluídas no procedimento para controlar o processo.

Foi avaliada por meio de modificações nas condições cromatográficas previamente estabelecidas. Foi injetado em CLAE o padrão 40 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

alternando-se as variáveis:

- Comprimento de onda: 324 nm, 325 nm e 326 nm.
- Vazão da fase móvel: 0,68 mL.min⁻¹, 0,70 mL.min⁻¹ e 0,72 mL.min⁻¹.
- Proporção da fase móvel: etanol e água 65:35; 70:30; 75:25.
- Volume de injeção: 18 µL, 20 µL e 22 µL.
- Fabricante do etanol: JT Baker® e Tedia®.

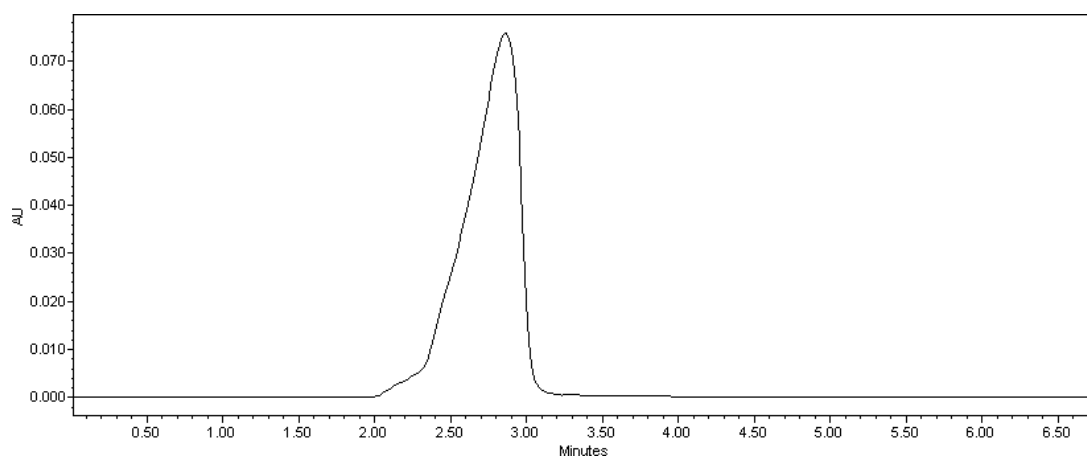
O parâmetro que apresenta maior variação nas medições deve ser controlado e monitorado durante as análises de rotina (BRASIL, 2017).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Desenvolvimento de metodologia analítica para quantificação do AGE

No teste 1, apresentado na Tabela 2, é possível observar através da Figura 2 que o pico saiu antes do volume morto e apresentou área maior que a esperada.

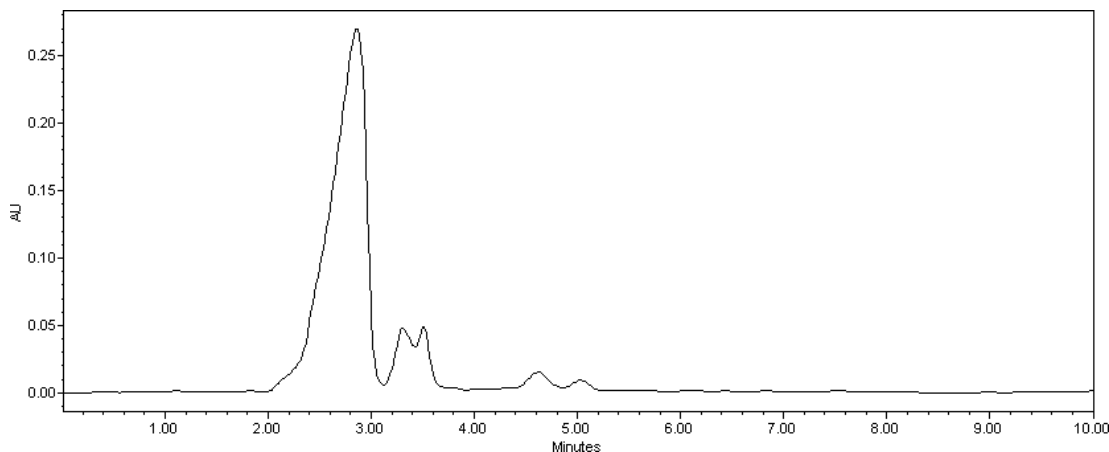
Figura 2. Cromatograma obtido por CLAE no teste 1, utilizando-se proporção de fase móvel (etanol:água) 60:40; vazão 0,7 mL.min⁻¹; comprimento de onda 335nm e coluna C18 / 250 x 4mm / 5 µm



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Supeitou-se que os problemas apresentados ocorreram pelo comprimento de onda e, por isso, no segundo teste trocou-se o comprimento de onda para 220 nm; porém esta troca também não foi eficiente. Como pode-se ver na Figura 3, o pico continuou apresentando área maior que a esperada, saindo antes do volume morto e houve o aparecimento de um segundo pico.

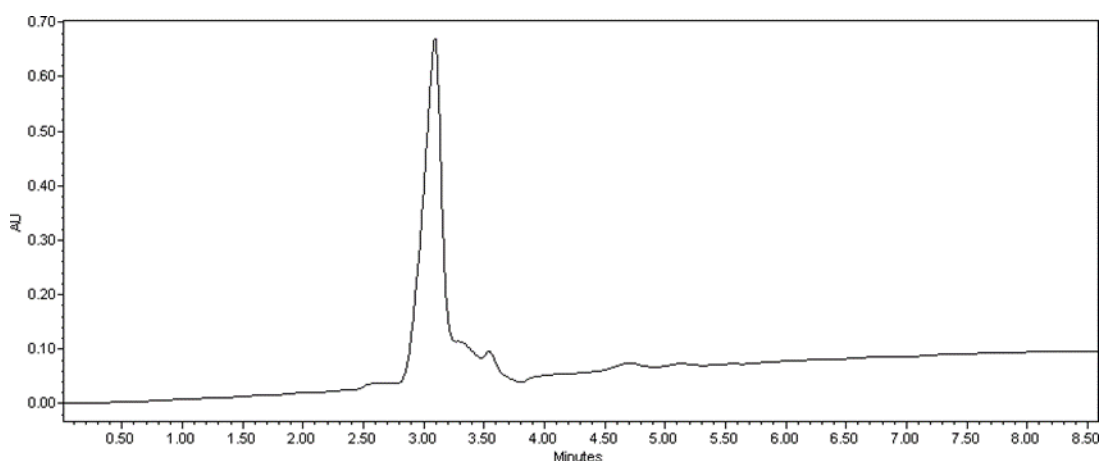
Figura 3. Cromatograma obtido por CLAE no teste 2, utilizando-se proporção de fase móvel (etanol:água) 60:40; vazão 0,7 mL.min⁻¹; comprimento de onda 220 nm e coluna C18 / 250 x 4mm / 5 μm



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Na tentativa de resolver os problemas apresentados, a fase móvel foi acidificada com 0,1% de ácido acético, porém o pico continuou apresentando problemas de assimetria, alargamento e baixa resolução, como pode-se ver na Figura 4.

Figura 4. Cromatograma obtido por CLAE no teste 3, utilizando-se proporção de fase móvel (etanol:água) 60:40; água acidificada com ácido acético a 0,1%; vazão 0,7 mL.min⁻¹; comprimento de onda 220 nm e coluna C18 / 250 x 4mm / 5 μm

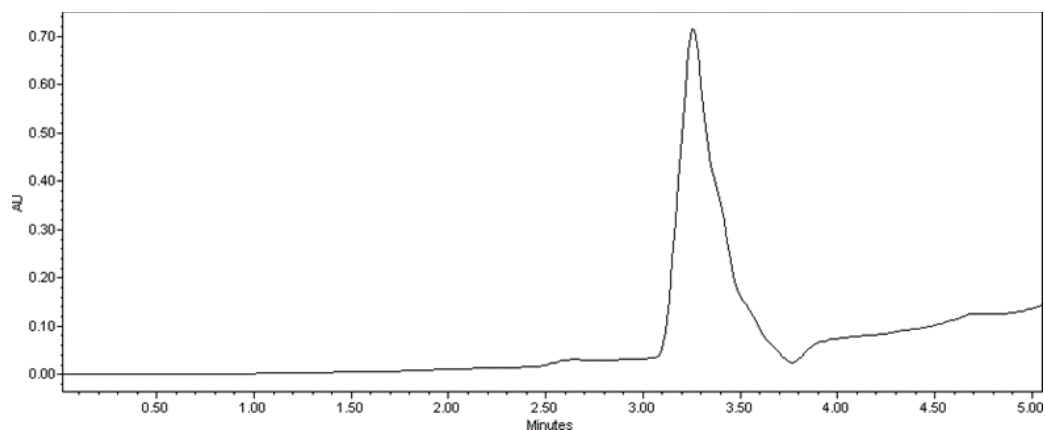


Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Em seguida, a fase móvel foi acidificada com 0,5% de ácido acético, o que também não resolveu o problema, pois apesar de o tempo de retenção ter aumentado, o pico continuou apresentando as características anteriores. Ao acidificar-se a fase móvel a molécula é deslocada para a sua forma molecular, não-ionizada, com característica mais apolar, assim interagindo mais com a

coluna cromatográfica, também apolar, aumentando o tempo de retenção, como pode-se ver na Figura 5.

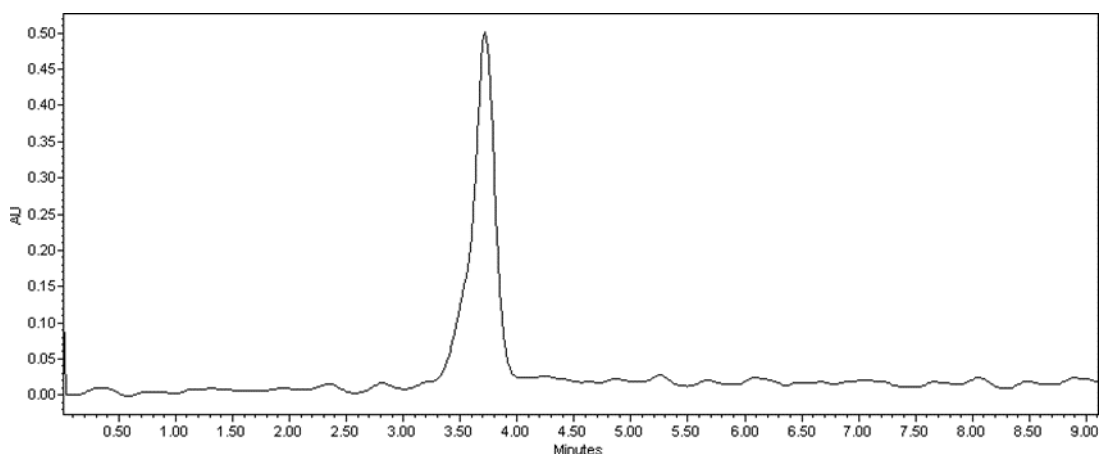
Figura 5. Cromatograma obtido por CLAE no teste 4, utilizando-se proporção de fase móvel (etanol:água) 60:40; água acidificada com ácido acético a 0,5%; vazão 0,7 mL.min⁻¹; comprimento de onda 220 nm e coluna C18 / 250 x 4mm / 5 µm



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Na tentativa de sanar os problemas apresentados, a proporção de fase móvel foi alterada de 60:40 (etanol:água) para 70:30, além disso o ácido acético foi substituído por ácido fórmico na acidificação da água, levando a uma melhora na resolução do pico, porém a linha de base ficou irregular e apresentou fronting (quando a parte anterior do pico fica mais larga), como mostrado na Figura 6.

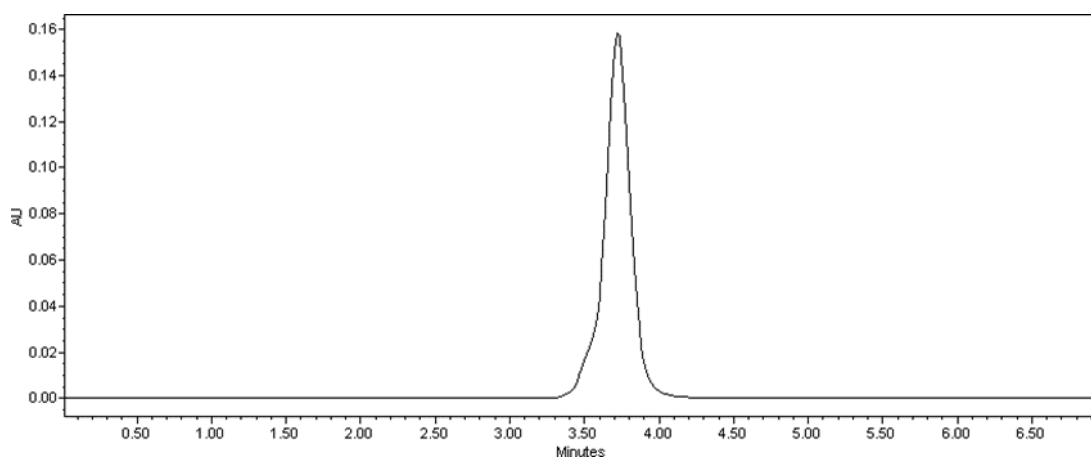
Figura 6. Cromatograma obtido por CLAE no teste 5 utilizando-se proporção de fase móvel (etanol:água) 70:30; água acidificada com ácido fórmico a 0,5%; vazão 0,7 mL.min⁻¹; comprimento de onda 220nm e coluna C18 / 250 x 4mm / 5 µm



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

No sexto teste houve a mudança do comprimento de onda de 220 nm para 325 nm, visando melhorar as características citadas anteriormente, desta forma houve uma melhora na linha de base, no entanto o fronting permaneceu, como pode-se ver na Figura 7.

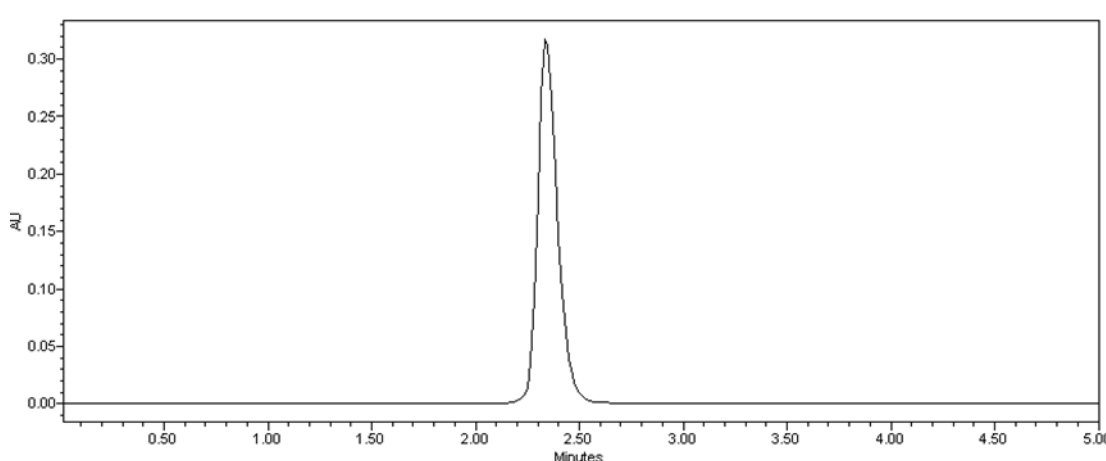
Figura 7. Cromatograma obtido por CLAE no teste 6 utilizando-se proporção de fase móvel (etanol:água) 70:30; água acidificada com ácido fórmico a 0,5%; vazão 0,7 mL.min⁻¹; comprimento de onda 325nm e coluna C18 / 250 x 4mm / 5 µm



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Por último, houve a substituição do ácido fórmico para o ácido trifluoroacético e da coluna Waters Symetry C18 (250 x 4 mm, 5 µm) para a coluna Eclipse Plus C18 (4,6 x 150 mm, 5 µm, Agilent), resultando em um pico com todos os parâmetros de conformidade do sistema cromatográfico adequados, como pode-se ver na Figura 8.

Figura 8. Cromatograma obtido por CLAE no teste 7 utilizando-se proporção de fase móvel (etanol:água) 70:30; água acidificada com ácido trifluoroacético a 0,5%; vazão 0,7 mL.min⁻¹; comprimento de onda 325nm e coluna C18 / 150 x 4,6mm / 5 µm



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Os cálculos realizados foram estimativa do volume morto, fator de capacidade, fator de alargamento e número de pratos, conforme apresentados nas equações no tópico 2.2

- Estimativa do volume morto

Sendo,

- Diâmetro= 4,6 mm e raio= 2,3 mm
- Comprimento= 150 mm

$$\frac{1}{2} \text{volume} = \frac{3,14 \cdot (2,3)^2 \cdot 150}{2} = 1245,795$$

$$\text{Volume morto} = \frac{\left(\frac{1245,795}{1000}\right)}{0,7} = 1,78$$

- Fator de capacidade

$$K = \frac{2,34 - 1,78}{1,78} = 0,314$$

- Fator de alargamento

$$T = \frac{1,9 + 1,9}{2 \cdot 1,9} = 1$$

- Número de pratos

$$N = 5,54 \cdot \frac{(13,7)^2}{0,8} = 1624,69$$

Através do estudo preliminar foi possível avaliar que a fase móvel composta por etanol:água purificada (70:30, v/v), vazão 0,7 mL.min⁻¹, sendo a água acidificada a 0,5% com ácido trifluoroacético (TFA), foi a que atendeu todos os quesitos citados que garantem a quantificação confiável do ativo, a simetria, altura e largura do pico, o número de pratos teóricos, a diminuição de resíduos e a conservação da coluna.

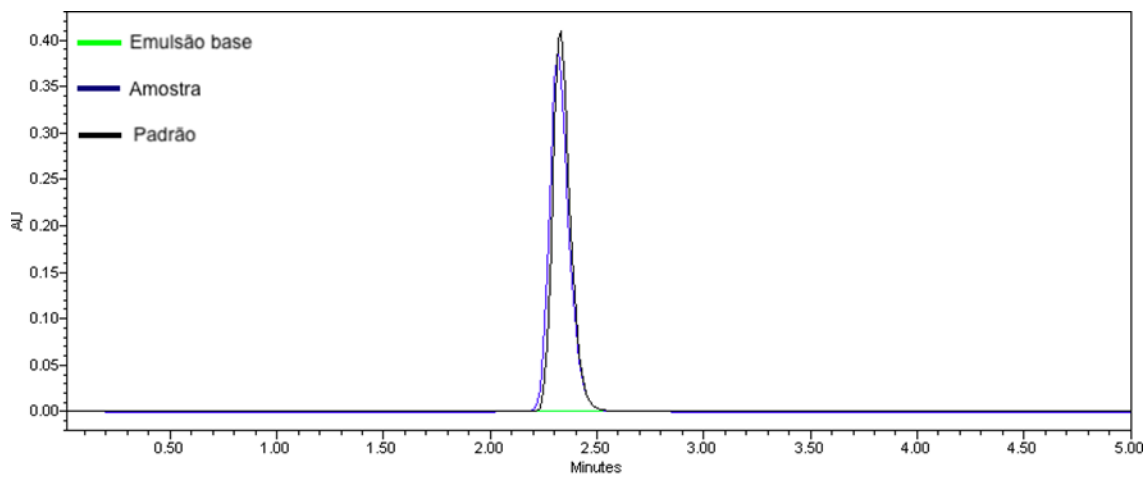
4.2. Seletividade

Foram preparadas soluções estoques contendo amostra da emulsão com e sem AGe, e o padrão contendo somente AGe para comparação. Todas as amostras com concentrações finais de 100 µg.mL⁻¹ em etanol. A leitura de cada amostra no CLAE foi feita de forma individual e depois os picos foram sobrepostos para uma melhor visualização e detecção de possíveis contaminantes.

Não foram obtidos picos na solução com a emulsão base, próximos ou no mesmo tempo de retenção do AGe, portanto não interferiram na análise.

A Figura 9 representa a injeção da amostra e base da emulsão em relação ao padrão de AGe a $60 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$.

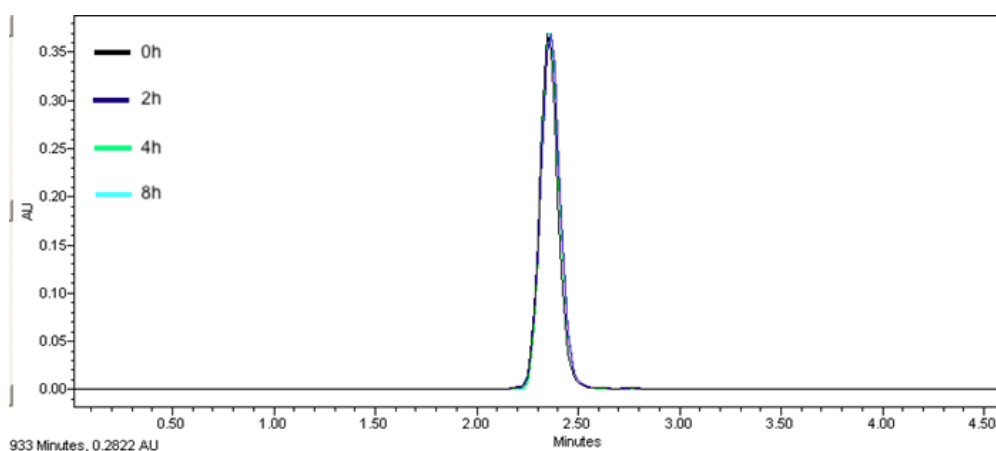
Figura 9. Cromatograma da injeção de padrão, amostra e base da emulsão, na concentração de $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ diluídas na fase móvel utilizando coluna Eclipse Plus C18 ($4,6 \times 150 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$, Agilent), vazão $0,7 \text{ mL}.\text{min}^{-1}$, detecção a 325 nm .



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Para a condição de estresse, injetou-se diferentes soluções com concentração de $100 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ do AGe expostas a degradação ácida, básica, oxidativa, fotolítica e em alta temperatura. Após o período de exposição, estas soluções foram imediatamente injetadas e, deste modo, foram obtidos os cromatogramas que podem ser observados nas Figuras 10 a 14.

Figura 10. Cromatograma obtido por CLAE para solução de ácido gentísico ($100 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$), em HCl $0,001 \text{ M}$, a 80°C .



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Figura 11. Cromatograma obtido por CLAE para solução de ácido genticóico ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), em $\text{NaOH} 0,001 \text{ M}$, a 80°C .

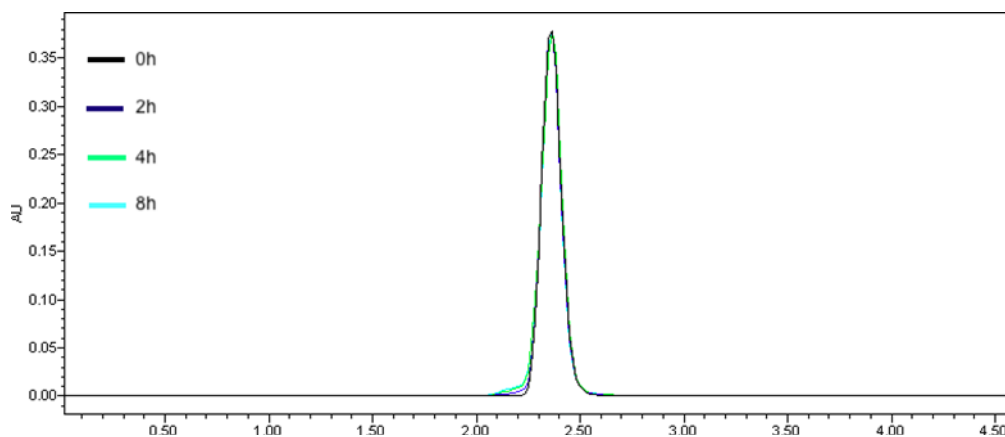


Figura 12. Cromatograma obtidos por CLAE para solução de ácido genticóico ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), em água, a 80°C .

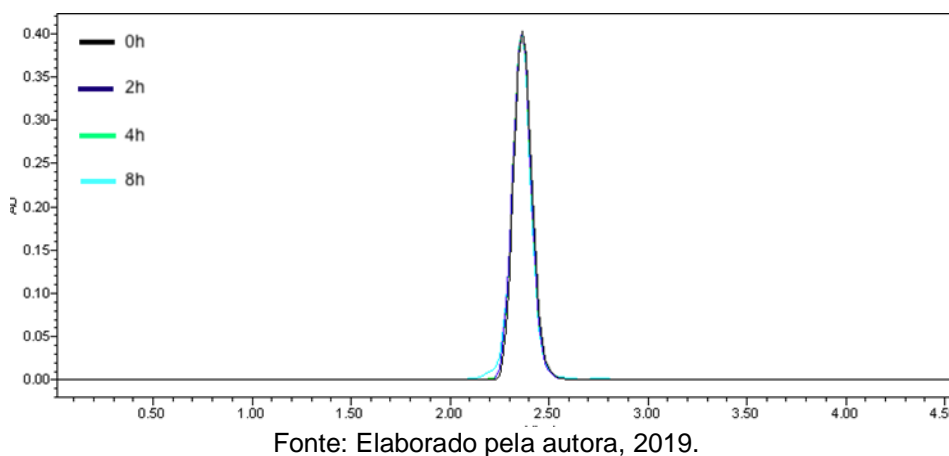


Figura 13. Cromatograma obtidos por CLAE para solução de ácido genticóico ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), em luz ultravioleta.

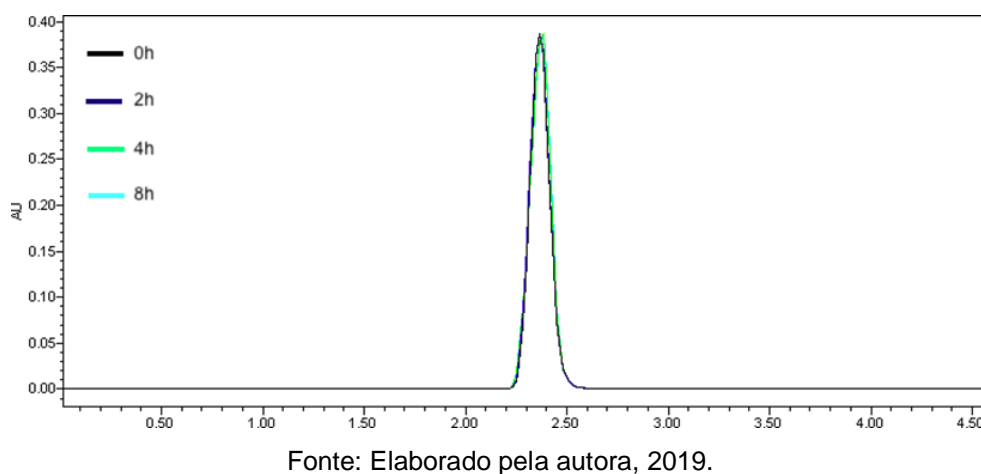
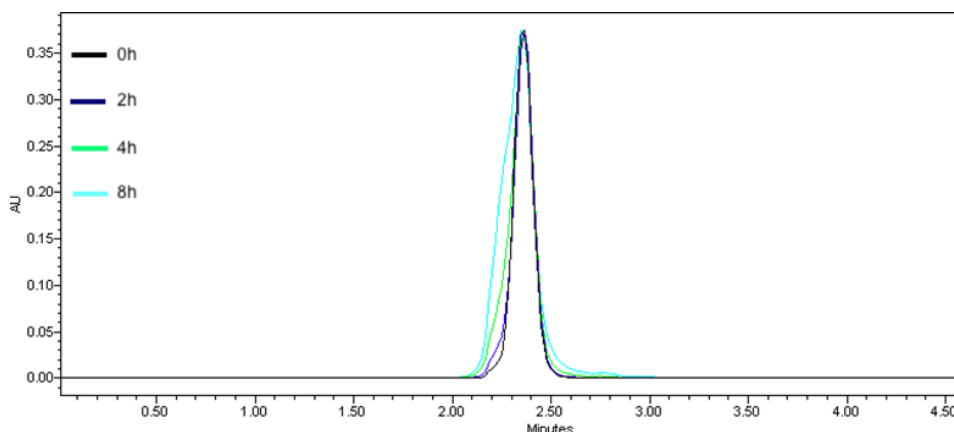


Figura 14. Cromatograma obtidos por CLAE para solução de ácido gentísico ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$), em H_2O_2 a 80°C .



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

No teste de estresse notou-se que não existem interferentes no pico de análise do AGE, ou seja, não foi observado nenhum pico próximo ao tempo de retenção do padrão, porém pode ser observado o alargamento do pico principal na condição com H_2O_2 , portanto é uma condição que deve ser evitada e monitorada.

4.3. Linearidade

Os resultados dos valores das áreas obtidas para a curva analítica de AGE estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Valores das áreas referentes ao pico de ácido gentísico para obtenção da curva analítica do método cromatográfico.

Concentração final $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1ª curva	2ª curva	3ª curva	Média	DP	DPR (%)
20	860158,0000	830011,0000	817524,3333	835897,7778	21917,9834	2,6221
40	1510153,6667	1522268,0000	1590890,0000	1541103,8889	43539,4294	2,8252
60	2379969,0000	2441682,0000	2436788,0000	2419479,6667	34304,6264	1,4179
80	3405701,0000	3075476,0000	3255502,0000	3245559,6667	165336,8536	5,0942
100	4087646,3333	4070962,0000	4168894,3333	4109167,5555	52393,2985	1,2750

Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

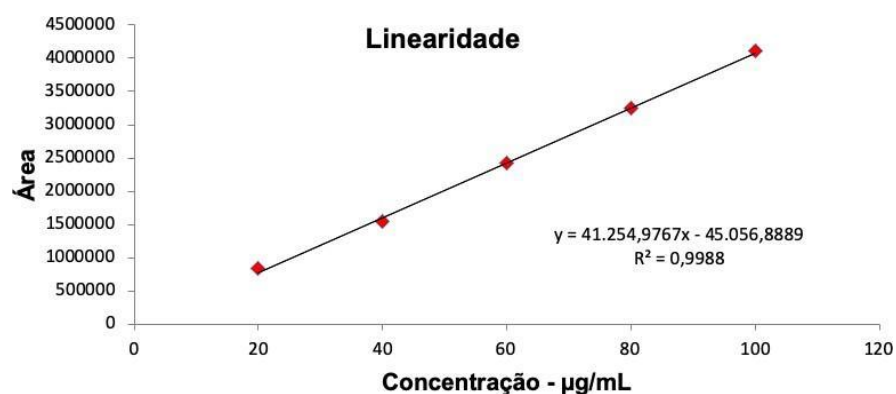
DP: desvio padrão; DPR: desvio padrão relativo.

A curva analítica do AGE (Figura 15) nas concentrações de 20, 40, 60, 80 e $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foi construída com as médias dos valores das áreas de três curvas analíticas obtidas durante os ensaios de linearidade. A equação da reta,

determinada pelo método dos mínimos quadrados, é $y = 41.254,9767x - 45.056,8889$; $R^2 = 0,9988$. O coeficiente de correlação foi satisfatório indicando excelente correlação linear entre os dados analisados.

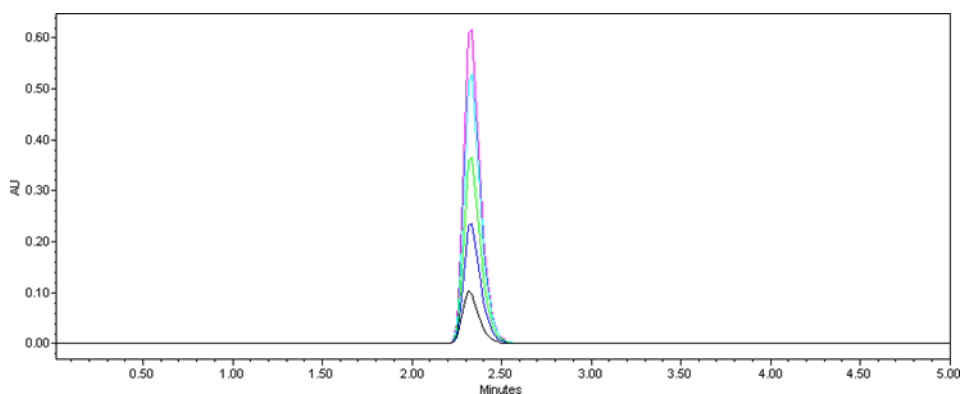
A Figura 16 apresenta o cromatograma com os picos das concentrações de 10, 20, 30, 40, 50 e 60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do ácido gentísico.

Figura 15. Curva analítica do AGe obtida pelo método cromatográfico, utilizando como solvente a fase móvel.



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Figura 16. Cromatograma do ácido gentísico em concentrações de 20, 40, 60, 80, 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, obtidas pelo CLAE a 325 nm.



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

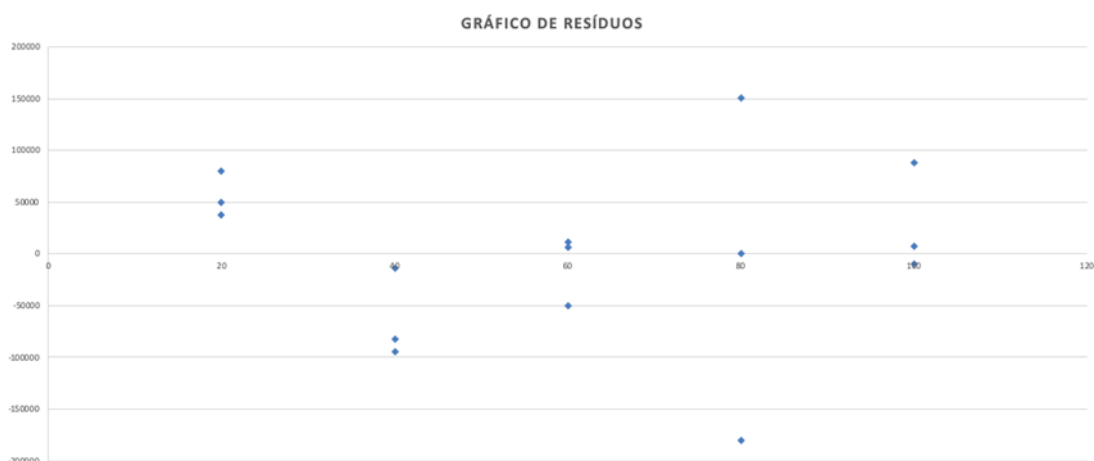
Após a construção da curva analítica e a constatação de que os valores apresentaram-se lineares pelo R^2 encontrado ($R^2 = 0,9988$) foi realizada a análise de variância (ANOVA) na Tabela 5, para os respectivos valores e feita a análise residual através do gráfico de resíduos apresentado na Figura 17.

Tabela 5. Análise de Variância (ANOVA) para os valores da Curva Analítica

Fontes de Variação	GL	SQ	Variância	Fcal	Ftab (0,05)
Entre doses	4	20448448358826,00000	5112112089706,51000	759,96	3,48
Regressão linear	1	20407161255814,00000	20407161255814,00000	3033,69	4,96
Desvio linearidade	3	41287103012,07940	13762367670,6931000	2,05	3,71
Dentro (resíduo)	10	67268400558,17190	6726840055,817190000	-	-
Total	14	20515716759384,20000	-	-	-

Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

Figura 17. Gráfico de Resíduos



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Na análise da variância (ANOVA) (Tabela 5) foi possível constatar que não houve variação significativa entre as doses, uma vez que F calculado (759,96) > F tabelado (3,48) e a análise demonstrou que a regressão linear foi significativa, visto que F calculado (3033,69) > F tabelado (4,96).

O gráfico de dispersão dos resíduos (Figura 17) apresentou resultados favoráveis, pois os pontos não ultrapassaram os valores entre 2 e -2 no eixo vertical, obtendo somente um outlier, garantindo assim a linearidade do método.

4.4. Exatidão

Os resultados obtidos no teste de recuperação para o AGE utilizando CLAE na emulsão estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Valores obtidos no teste de recuperação do AGe na emulsão utilizando o método por CLAE

	AGe adicionado ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	AGe recuperado ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Recuperação (%)	Recuperação Média (%)	DPR
R1	42	49,37	102,67		
R2	50	60,2	99,35	101,68	1,99
R3	58	73,23	103,00		

Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

DRP: desvio padrão relativo

De acordo com os resultados obtidos no ensaio de recuperação é possível concluir que o método é exato, uma vez que a recuperação média foi de 101,68% para a emulsão, o que mostra proximidade entre as concentrações teóricas e experimentais obtidas nos ensaios realizados (BRASIL, 2017).

4.5. Precisão

A precisão foi determinada por meio da repetibilidade e forneceu desvio padrão relativo de 1,24%. A repetibilidade demonstra a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e a mesma instrumentação.

Também foi avaliada a precisão entre analistas, obtendo-se desvio padrão relativo de 0,64% para o segundo analista. O teste F demonstrou que não houve diferença significativa entre os valores de área encontrados entre os dois analistas, já que o $F_{\text{cal}} 3,92 < F_{\text{tab}} 4,28$ e o $P_{\text{valor}} 0,06 > 0,05$, comprovando a precisão intermediária do método proposto, frente ao parâmetro avaliado, conforme apresentado nas tabelas 7 e 8.

Tabela 7. Valores das áreas referentes ao pico de ácido gentísico no estudo da repetibilidade e precisão intermediária do método.

60 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	Área1	Área2	Área3	Área4	Área5	Área6	Área7	Média	DPR%
Analista 1	2566974	2513634	2541514	2524525	2474684	2488058	2510545	2517133	1,24
Analista 2	2462476	2462070	2461592	2431004	2423395	2447431	2447431	2447914	0,64

Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

DRP: desvio padrão relativo

Tabela 8. Teste F da precisão interanalista do método de CLAE.

	Analista 1	Analista 2
Média	2517133,429	2447914,143
Variância	972686346	247854650,5
Observações	7	7
gl	6	6
F	3,924422415	
P (F<=f) uni-caudal	0,060304522	
F crítico uni-caudal	4,283865714	

Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

4.6. Limite de detecção e quantificação

Aplicando-se os valores apresentados na Tabela 9 na equação 6, p.23, foi encontrado que a concentração mínima que o método analítico é capaz de detectar é $1,565509749 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de AGe.

Tabela 9. Determinação do limite de detecção do método analítico de quantificação do AGe por CLAE.

	Intercepção com o eixo Y	Inclinação Curva Analítica
Curva 1	-56.431,60	41.752,62
Curva 2	-22.453,20	40.175,55
Curva 3	-56.285,86	41.863,76
Média	-45.056,89	41.263,98
Desvio Padrão	19575,5025	944,2411731

Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

Já, ao aplicar os valores apresentados na Tabela 9 na equação 7, p.23, foi encontrado que a concentração mínima que o método analítico é capaz de quantificar é $4,74 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de AGe.

A primeira concentração usada na curva analítica deve ser maior do que o valor do limite de detecção e do limite de quantificação, ou seja, deve ser maior que $4,74 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

4.7. Robustez

A robustez foi avaliada modificando-se a vazão de fase móvel, comprimento de onda, proporção etanol:água na fase móvel, volume de injeção e marca do solvente utilizado. Os valores do teor obtidos após estas modificações não apresentaram valores de desvio padrão relativo (DPR) maiores que 5%. Isso

indica que o método é robusto, já que pequenas alterações no método utilizado não provocaram variações significativas nos resultados obtidos, como mostra a Tabela 10.

Tabela 10. Valores obtidos na avaliação da robustez do método por CLAE para análise de AC.

Variável	Faixa investigada	AC (%)	DPR (%)
Comprimento de onda para leitura dos resultados (nm)	324	58,70	1,7577
	325	60,00	
	326	60,78	
Vazão da fase móvel (mL.min ⁻¹)	0,68	62,22	2,9070
	0,70	60,00	
	0,72	58,76	
Proporção etanol:água na fase móvel	65:35	61,13	1,0684
	70:30	60,00	
	75:25	61,11	
Volume de injeção (µL)	18	60,00	0,1806
	20	60,00	
	22	60,22	
Fabricante do etanol	JT Baker®	60,00	1,7915
	Tedia®	61,54	

Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

DPR: desvio padrão relativo

5. CONCLUSÃO

O método analítico desenvolvido foi validado assegurando todos os parâmetros de linearidade, especificidade, precisão, exatidão e robustez estabelecidos.

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que, após as condições testadas para validação do método, foi possível encontrar a condição mais satisfatória para realização dos testes, na qual utilizou-se proporção de fase móvel (etanol:água) 70:30; água acidificada com ácido trifluoroacético a 0,5%; vazão 0,7 mL.min⁻¹; comprimento de onda 325nm e coluna Eclipse Plus C₁₈ / 150 x 4,6mm / 5 µm. Foi esta condição que atendeu todos os quesitos citados que garantem a quantificação confiável do ativo, a simetria, altura e largura do pico, o número de pratos teóricos, a diminuição de resíduos e a conservação da coluna.

Após os testes de estresse realizados para avaliação da seletividade, foi possível concluir que não existem interferentes no pico de análise do AGE, ou seja, não foi observado nenhum pico próximo ao tempo de retenção do padrão, porém pode ser observado o alargamento do pico principal na condição com H₂O₂, portanto é uma condição que deve ser evitada e monitorada.

O gráfico de dispersão de resíduos obtidos através dos testes realizados para avaliação da linearidade mostrou resultados favoráveis que garantem a linearidade do método, isto é, os pontos não ultrapassam os valores entre 2 e -2 no eixo vertical, obtendo somente um outlier.

De acordo com os resultados obtidos no ensaio de recuperação, o qual foi realizado para avaliar a exatidão do método, é possível concluir que o método é exato, uma vez que a recuperação média foi de 101,68% para a emulsão, o que mostra proximidade entre as concentrações teóricas e experimentais obtidas nos ensaios realizados.

A precisão foi determinada por meio da repetibilidade e forneceu desvio padrão relativo de 1,24%. Também foi avaliada a precisão entre analistas, obtendo-se desvio padrão relativo de 0,64% para o segundo analista. O teste F demonstrou que não houve diferença significativa entre os valores de área encontrados entre os dois analistas, comprovando a precisão intermediária do método proposto, frente ao parâmetro avaliado.

Foram calculados os valores correspondentes aos limites de detecção e quantificação, os quais são, respectivamente, 1,565509749 µg.mL⁻¹ e 4,74 µg.mL⁻¹ de AGE. Portanto, a primeira concentração usada na curva analítica deve ser maior do que os valores obtidos, ou seja, maior que 4,74 µg.mL⁻¹.

Os valores de teor obtidos após as modificações realizadas para testar a robustez do método não apresentaram valores de desvio padrão relativo (DPR) maiores que 5%. Isso indica que o método é robusto, já que pequenas alterações no método não provocaram variações significativas nos resultados obtidos.

Por fim, ao avaliar-se todos os parâmetros necessários para a validação do método analítico por CLAE para quantificação do ácido gentísico em emulsão cosmética é possível concluir que o método mostrou-se seletivo, linear, exato, preciso e robusto, sendo adequado para quantificação do analito

em emulsão cosmética. Ou seja, o processo analítico é aceitável para a finalidade a que ele se destina.

6. REFERÊNCIAS

1. ABDI. Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial; ABIHPEC. Associação brasileira da indústria de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos; SEBRAE. Serviço brasileiro de apoio às micro e pequenas empresas. **Caderno de tendências 2014-2015**: São Paulo: Higiene Pessoal-Perfumaria-Cosméticos, 2014. Cap. 5, 6, 7, p.52-175.
2. ABIHPEC. Panorama do Setor de HPPC 2018. São Paulo, 2018. Disponível em: <<https://abihpec.org.br/publicacao/panorama-do-setor-2018/>>. Acesso em: 25 mai. 2022.
3. ABIHPEC. A Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos. São Paulo, 2022. Disponível em: < <https://abihpec.org.br/publicacao/panorama-do-setor/2022>>. Acesso em: 25 mai. 2022.
4. ALMEIDA, M.G.J.; CHIARI, B.G.; CORREA, M.A.; MAN CHIN, C.;ISAAC, V.L.B. Validation of an alternative analytical method for the quantification of antioxidant activity in plant extracts. **Acta Farm. Bonaer.**, v. 32, p. 90-95, 2013.
5. BAGATIN, Edileia. Mecanismos do envelhecimento cutâneo e o papel dos cosmeceúticos. **RBM rev. bras. med**, p. 5-11, 2009.
6. BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e da outras providências.
7. DEGANI, A. L.; CASE, Q. L.; VIERA, P. C. Cromatografia um breve ensaio. **Química nova na escola**, São Paulo, n.7, p.21-25, 1998.
8. FRANCO, L. G. **Cromatografia Verde**. Trabalho de conclusão de Curso (Licenciatura em Química) Faculdade de Ciências, Unesp – Departamento de Química, Bauru, 2015.
9. GIADA, M. L. R.; MANCINI FILHO, J. Importância dos compostos fenólicos na dieta na promoção da saúde humana. **Publ. UEPG Ci. Biol. Saúde**, Ponta Grossa, v.12, n.4, p.7- 15, Dez. 2006.

10. HAKKINEN, S. H. et al. HPLC Method for Screening of Flavonoids and Phenolic Acids in Berries. **J Sci Food Agric**, v.77, p. 543-551, 1998.
11. HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 8. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012. 900 p.
12. KASRIEL-ALEXANDER, Daphne. Top 10 global consumer trends for 2015. São Paulo: Euromonitor International, 2016.
13. MARCATO, D. C. **Estudo da eficácia in vitro e citotoxicidade do ácido ferúlico e sua incorporação em emulsão cosmética**. Tese (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP. Araraquara, 2019.
14. MARQUELE, F. D.; OLIVEIRA, A. R. M.; BONATO, P. S.; LARA, M. G.; FONSECA, M. J. V. Propolis extract release evaluation from topical formulations by chemiluminescence and HPLC. **J. Pharm. Biomed. Analysis**, v.41, p.461–468, 2006.
15. MARQUELE-OLIVEIRA, F.; FONSECA, Y. M.; DE FREITAS, O.; FONSECA, M. J. V. Development of topical functionalized formulations added with propolis extract: Stability, cutaneous absorption and in vivo studies. **Int. J. Pharm.**, v.342, p.40–48, 2007.
16. MELO, E. A.; GUERRA, N. B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Bol. SBCTA**, Campinas: v.36, n.1, p.1- 11, 2002.
17. MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; DOS SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytother. Res.**, v.15, p.127–130, 2001.
18. MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarinn J. Sci. Technol.**, v.26, n.2, p.211-219, 2004.
19. MORRIS, S. G. Preparation of gentisic acid and its fatty alcohol esters.

- Journal of the American Chemical Society** v. 71, p. 2056-2057, 1949.
- OECD. ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. guidance document for the conduct of skin absorption studies, n.28, Paris, 2004.
20. PERES, T. B. Noções básicas de cromatografia. **Biológico**, São Paulo, v. 64, n.2, p.227-229, 2002.
21. PUSSAYANAWIN, V. et. al. Fluorescence Detection and Measurement of Ferulic Acid in Wheat Milling Fractions by Microscopy and HPLC. **J. Agric. Food Chem**, v. 36, p. 515-520, 1988.
22. RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L.F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
23. SATHLER, Nathalia Souza. **Cosméticos multifuncionais: aspectos históricos, características e uma proposta de formulação**. 2018. 49 f. Monografia (Graduação em Farmácia) - Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2018.
24. SCOTTI, L.; VELASCO, M.V.R. **Envelhecimento cutâneo à luz da cosmetologia**. São Paulo: Tecnopress, 2003. 115 p.
25. TONHI, E.; COLLINS, K.E.; JARDIM, I.C.S.F.; COLLINS, C.H. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Quim. Nova**, v. 25, n. 4, p. 616-623, 2002.
26. WIECHERS, J. W. Aspects of multifunctionality in skin care products. In: SCHUELLER, R.; ROMANOWSKI, P. (Ed.). **Multifunctional cosmetics**. New York: Marcel Dekker, 2003, (Cosmetic Science and Technology Series, v.26), Cap. 5, p.83-98.
27. ZUCCO, Alba; DE SOUSA, Francisco Santana; DO CARMO ROMEIRO, Maria. Cosméticos naturais: uma opção de inovação sustentável nas empresas. **Brazilian Journal of Business**, v. 2, n. 3, p. 2684-2701, 2020.

Anexos

ANEXO 1- APOIO FINANCEIRO E APROVAÇÃO DE RELATÓRIO FAPESP



VISUALIZAÇÃO DE DESPACHO

Processo	2019/00172-2
Linha de Fomento	Programas Regulares / Bolsas / No País / Iniciação Científica - Fluxo Contínuo
Situação	Em Execução
Vigência	01/08/2019 a 31/07/2020
Beneficiário	Mariana Carlomagno de Paula
Responsável	Marcos Antonio Corrêa
Vínculo Institucional do Processo	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara/FCFAR/UNESP
Título	Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por CLAE para quantificação de ácido gentísico em emulsão cosmética.

Folha de Despacho

Datas do Despacho

Emitido em : 04/09/2020

Objetos de análise

Objeto de análise	Data de Submissão	Resultado
Relatório Científico 2	06/07/2020	Aprovado

Observações / Transcrições / Frases

Observações ao Beneficiário

Comunicamos que o Relatório Científico relativo ao processo acima referido foi analisado pela assessoria científica da FAPESP.

A transcrição do parecer está sendo enviada exclusivamente ao orientador, sendo de sua responsabilidade compartilhar as partes que considerar relevantes com o bolsista, o qual receberá uma cópia desta mensagem.

Para visualizar o despacho, por favor, acesse o Sistema SAGe (www.fapesp.br/sage), clique no menu Processos/Meus Processos e em Mais Informações/Despachos.

Atenciosamente,
Luiz Eugênio A. M. Mello
Diretor Científico da FAPESP

Frases para o Beneficiário

Não há frases associadas.

Transcrição de Parecer para o Beneficiário



Frases para Termo de Outorga

Não há frases associadas.

Relatório Científico 2 (Aprovado)

Compromisso	30/09/2020
Período Relacionado	10/01/2020 a 31/07/2020
Situação	Atendido

ANEXO 2- PARTICIPAÇÃO EM EVENTO CIENTÍFICO


BiotecFarma

Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por CLAE para quantificação de ácido gentsísico em emulsão cosmética

Mariana Carlomagno de Paula¹, Caroline Magnani Spagnol¹, Marcos Antonio Corrêa¹

¹Departamento de Fármacos e Medicamentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP

Introdução	Resultados e Discussão
<p>Apesar de possuir propriedades interessantes, o ácido gentsísico (AGe) é pouco utilizado em preparações cosméticas e há poucos estudos que mostram a eficácia deste incorporado a uma preparação. Para comprovar tal eficácia, deve ser feita uma validação de metodologia analítica, a qual deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Seletividade: foi avaliada por meio dos testes de estresse, os quais mostraram que não existem interferentes no pico de análise do AGe, inclusive do placebo; • Linearidade: os testes realizados para sua avaliação resultaram no gráfico de dispersão dos resíduos, o qual mostrou resultados favoráveis que garantem a linearidade do método; • Exatidão: avaliada pelo ensaio de recuperação, o qual leva à conclusão de que o método é exato, já que a recuperação média foi de 101,68% para a emulsão, o que mostra proximidade entre as concentrações teóricas e experimentais obtidas nos ensaios realizados; • Precisão: determinada por meio da repetibilidade e precisão entre analistas, as quais forneceram, respectivamente, desvios padrões relativos (DPR) de 1,24% e 0,64%. O teste F mostrou que não houve diferença significativa entre os valores de área encontrados entre os dois analistas, comprovando a precisão intermediária do método proposto; • Limite de detecção e quantificação: foram calculados os valores correspondentes, que foram, respectivamente, 1,56 µg/mL e 4,74 µg/mL de AGe. Portanto, a primeira concentração usada na curva analítica deve ser maior que 4,74 µg/mL; • Robustez: foi testada através de modificações no método. Os valores obtidos não apresentaram DPR maiores que 5%, indicando que o método é robusto.
<div style="background-color: #007070; color: white; text-align: center; padding: 2px 5px;">Objetivo</div> <p>Desenvolver e validar o método analítico por CLAE para quantificação de ácido gentsísico em emulsão cosmética.</p>	<div style="background-color: #007070; color: white; text-align: center; padding: 2px 5px;">Conclusão</div> <p>Após avaliarem-se todos os parâmetros necessários para a validação do método, é possível concluir que esse se mostrou seletivo, linear, exato, preciso e robusto, sendo adequado para quantificação do ácido gentsísico em emulsão cosmética. Ou seja, o processo analítico é aceitável para a finalidade a que ele se destina.</p>
<div style="background-color: #007070; color: white; text-align: center; padding: 2px 5px;">Metodologia</div> <p>Foi utilizado o equipamento Waters®, composto de bomba cromatográfica gradiente binária Waters 1525, injetor manual Rheodyne Breeze 7725i com detector UV Waters 248; com proporção de fase móvel (etanol:água) 70:30; água acidificada com ácido trifluoroacético a 0,50%; vazão 0,70 mL/min; comprimento de onda 325nm e coluna Eclipse Plus C₁₈ / 150 x 4,60mm / 5 µm.</p>	



UNESP
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"SILVIO DE MESQUITA FILHO"



Certificado

← Jornada Farmacêutica da UNESP →

Certificamos que o trabalho **“Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por CLAE para quantificação de ácido gentísico em emulsão cosmética.”** dos autores: **Mariana Carlomagno de Paula, Caroline Magnani Spagnol e Marcos Antonio Corrêa**

Submetido e apresentado por **Mariana Carlomagno de Paula** no BiotecFarma, realizado de 17 a 21 de agosto de 2020,

Foi aprovado e publicado em forma de Anais na Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada.

Natália Valadares de Moraes

Prof. Dra. Natália Valadares de Moraes
Primeira Conselheira da 67ª JFU

Luís Sacramento

Prof. Dr. Luís Vítor Silva do Sacramento
Diretor da FCF-UNESP

Mariane Dias Venturelli

Mariane Dias Venturelli
Presidente da 67ª JFU

ANEXO 3- PUBLICAÇÕES RESULTANTES DO TRABALHO

O resumo apresentado no evento BiotecFarma foi publicado em forma de resumo nos Anais na Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada no dia 2 de setembro de 2020. Disponível em: <http://rcfba.fcfar.unesp.br/index.php/ojs/article/view/703>



Revista de Ciências
Farmacêuticas
Básica e Aplicada
*Journal of Basic and Applied
Pharmaceutical Sciences*

ISSN 2179-443X
Vol 41 (2020): Suplemento 1. Jornada Farmacêutica 2020

FM. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por CLAE para quantificação de ácido genticico em emulsão cosmética

Mariana Carlomagno de Paula¹, Caroline Magnani Spagnol¹, Marcos Antonio Corrêa¹.

¹Departamento de Fármacos e Medicamentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP.

Introdução: Apesar de possuir propriedades interessantes, o ácido genticico (AGe) é pouco utilizado em preparações cosméticas oferecidas no mercado e há poucos estudos que mostram a eficácia deste incorporado a uma preparação. Para comprovar tal eficácia, deve ser feita uma validação de metodologia analítica, a qual deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. **Objetivo:** Desenvolver e validar o método analítico por CLAE para quantificação de ácido genticico em emulsão cosmética. **Metodologia:** Foi utilizado o equipamento Waters®, composto de bomba cromatográfica gradiente binária Waters 1525, injetor manual Rheodyne Breeze 7725i com detector UV Waters 248; com proporção de fase móvel (etanol:água) 70:30; água acidificada com ácido trifluoroacético a 0,50%; vazão 0,70 mL/min; comprimento de onda 325nm e coluna Eclipse Plus C₁₈ / 150 x 4,60mm / 5 µm. **Resultados e discussão:** Os testes de estresse realizados para avaliação da seletividade, mostraram que não existem interferentes no pico de análise do AGe, porém pode ser observado o alargamento do pico principal na condição com H₂O, sendo esta uma condição que deve ser evitada e monitorada; além disso não existe nenhum pico do placebo que interfira na quantificação do AGe. O gráfico de dispersão dos resíduos obtido através dos testes realizados para avaliação da linearidade mostrou resultados favoráveis que garantem a linearidade do método. O ensaio de recuperação, realizado para avaliar a exatidão do método, leva a conclusão de que o método é exato, já que a recuperação média foi de 101,68% para a emulsão, o que mostra proximidade entre as concentrações teóricas e experimentais obtidas nos ensaios realizados. A precisão foi determinada por meio da repetibilidade e forneceu desvio padrão relativo de 1,24%. Também foi avaliada a precisão entre analistas, obtendo-se desvio padrão relativo de 0,64% para o segundo analista. O teste F demonstrou que não houve diferença significativa entre os valores de área encontrados entre os dois analistas, comprovando a precisão intermediária do método proposto, frente ao parâmetro avaliado. Foram calculados os valores correspondentes aos limites de detecção e quantificação, os quais são, respectivamente, 1,56 µg/mL e 4,74 µg/mL de AGe. Portanto, a primeira concentração usada na curva analítica deve ser maior do que os valores obtidos, ou seja, deve ser maior que 4,74 µg/mL. Os valores do teor obtidos após as modificações realizadas para testar a robustez do método não apresentaram desvio padrão relativo (DPR) maiores que 5%, indicando que o método é robusto, já que pequenas alterações não provocaram variações significativas nos resultados obtidos. **Conclusão:** Após avaliarem-se todos os parâmetros necessários para a validação do método, é possível concluir que esse se mostrou seletivo, linear, exato, preciso e robusto, sendo adequado para quantificação do ácido genticico em emulsão cosmética. Ou seja, o processo analítico é aceitável para a finalidade a que ele se destina.

Palavras-chave: CLAE, cosmetologia, ácido genticico.

Apoio financeiro: FAPESP (2019/00172-2).