

**Caracterização, Desenvolvimento e Validação de Método Analítico para
Determinação de Pirroloquinolina Quinona em Formulações Orais e
Injetáveis de Uso Humano**

Erika Pontes Machado

Campo Grande – MS

2025

Caracterização, Desenvolvimento e Validação de Método Analítico para Determinação de Pirroloquinolina Quinona em Formulações Orais e Injetáveis de Uso Humano

Erika Pontes Machado

Dissertação apresentada ao Programa Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Nájla Mohamad Kassab

Campo Grande – MS

2025

ERIKA PONTES MACHADO

**Caracterização, Desenvolvimento e Validação de Método Analítico para
Determinação de Pirroloquinolina Quinona em Formulações Orais e
Injetáveis de Uso Humano**

Dissertação apresentada ao Programa Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Nájla Mohamad Kassab – Presidente

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

Profa. Dr. Lincoln Carlos Silva Oliveira – Membro Titular

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

Prof. Dr. Lucas Rannier Melo de Andrade - Membro Titular

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

Profa. Dr. Teófilo Fernando Mazon Cardoso - Suplente

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS

Profa. Dra. Helen Cassia Rosseto - Suplente

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS

Campo Grande, Mato Grosso do Sul.

2025

Machado, Erika Pontes

Caracterização, Desenvolvimento e Validação de Método Analítico para Determinação de Pirroloquinolina Quinona em Formulações Orais e Injetáveis de Uso Humano.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2025.

Orientadora: Professora Dra. Nájla Mohamad Kassab

AGRADECIMENTOS

A jornada até aqui foi marcada por desafios, descobertas e crescimento, e nada disso seria possível sem o apoio de pessoas especiais que caminharam comigo.

Primeiramente, agradeço a Deus, por me conceder força, sabedoria e serenidade nos momentos mais difíceis.

À minha mãe, Nelci Pelzl, minha base e inspiração. Seu amor incondicional, força e presença constante foram essenciais em cada etapa deste percurso. Você é parte fundamental da minha vida, e este trabalho também é seu.

À minha orientadora, Nájla Kassab, minha mais acertada escolha nesta caminhada. Sua escuta generosa, acolhimento, paciência e disposição em abraçar nossas ideias fizeram toda a diferença. Obrigada por acreditar, por orientar com leveza e por tornar esse processo mais humano.

À minha veterana de mestrado, Larissa Figueira, que foi meu farol no início de tudo. Sua ajuda foi essencial para que eu encontrasse meu caminho. Obrigada por estar presente sempre que precisei, com carinho e sabedoria.

Aos meus amigos queridos, os LTF'ers: Jefferson, Layna, Lucas e Luiz. Vocês foram minha rede de apoio, meu alívio e minha companhia constante. Juntos, dividimos dúvidas, experiências, gargalhadas — e muitos cafezinhos. Foi mais leve com vocês.

Aos professores Lincoln, Teófilo e Marco, minha gratidão pela generosidade em partilhar conhecimento e por estarem sempre disponíveis para esclarecer dúvidas ou auxiliar nos experimentos.

Às técnicas Maria Leticia, Luciana e Cristiane, obrigada pela colaboração, carinho e dedicação nos momentos em que precisei de apoio nos experimentos.

Expresso minha sincera gratidão à banca avaliadora pela valiosa dedicação e contribuição. Agradeço, em especial, por aceitarem o convite e por enriquecerem de forma tão significativa o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), à Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro e estrutural concedido, o qual foi fundamental para a realização e o desenvolvimento desta dissertação.

A todos vocês, meu mais sincero e emocionado agradecimento. Este trabalho carrega um pedacinho de cada um.

RESUMO

A pirroloquinolina quinona (PQQ) tem despertado crescente interesse científico e comercial devido as suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e neuroprotetoras, sendo frequentemente comercializada como suplemento alimentar. Considerando a escassez de estudos voltados à caracterização físico-química da matéria-prima e a validação de métodos específicos para sua quantificação, este trabalho teve como objetivo desenvolver e validar um método espectrofotométrico simples, rápido e eficiente para a determinação de PQQ em formulações farmacêuticas de uso oral e injetável. Além disso, foram empregadas técnicas analíticas complementares, como FTIR-ATR, RMN, TG/DTG, DSC e DRX, para a caracterização da substância. O método proposto apresentou linearidade na faixa de 5,0 a 25,0 $\mu\text{g/mL}$ ($r > 0,9999$), com limites de detecção e quantificação de 0,12 e 0,36 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. A precisão e a exatidão ficaram dentro dos limites recomendados, com DPR $< 1,9\%$ e recuperação entre 98,0% e 102,0%. A seletividade foi confirmada pela ausência de interferência dos excipientes comuns. O método também demonstrou robustez frente a variações experimentais e foi aplicado com sucesso na análise de amostras comerciais. Esses resultados confirmam a aplicabilidade e confiabilidade do método proposto, contribuindo para o controle de qualidade e segurança dos suplementos alimentares contendo PQQ.

Palavras-chave: PQQ; validação; espectrofotometria UV-Vis; caracterização físico-química; suplementos alimentares.

ABSTRACT

Pyroloquinoline quinone (PQQ) has attracted increasing scientific and commercial interest due to its antioxidant, anti-inflammatory, and neuroprotective properties, and is often marketed as a dietary supplement. Given the scarcity of studies focused on the physicochemical characterization of the raw material and the validation of specific methods for its quantification, this study aimed to develop and validate a simple, fast, and efficient spectrophotometric method for the determination of PQQ in pharmaceutical formulations for oral and injectable use. Additionally, complementary analytical techniques such as FTIR-ATR, NMR, TG/DTG, DSC, and XRD were employed to characterize the substance. The proposed method showed linearity in the range of 5.0 to 25.0 $\mu\text{g/mL}$ ($r > 0.9999$), with limits of detection and quantification of 0.12 and 0.36 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Precision and accuracy were within the recommended limits, with RSD $< 1.9\%$ and recovery between 98.0% and 102.0%. Selectivity was confirmed by the absence of interference from common excipients. The method also proved to be robust against experimental variations and was successfully applied to the analysis of commercial samples. These results confirm the applicability and reliability of the proposed method, contributing to the quality control and safety of dietary supplements containing PQQ.

Keywords: PQQ; method validation; UV-vis spectrophotometry; physicochemical characterization; dietary supplements.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC: *Association of Official Analytical Chemists*

ATR: Reflectância total atenuada

DEA: Análise de Calorimetria de Reação

DMA: Análise dinâmico-mecânica

DPR: Desvio padrão relativo

DRX: Difração de raios X

DSC: Calorimetria diferencial

DTA: Análise térmica diferencial

FTIR: Espectroscopia no infravermelho por transformada de fourrier

GAC: Química analítica verde

GC: Química verde

GSH: Glutathiona reduzida

HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência

ICH: *International Conference on Harmonization*

ICTAC: *International Confederation for Thermal Analysis and Calorimetry*

INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

ODSP: *Office of Dietary Supplement Programs*

PQQ: Pirroloquinolina Quinona

RMN: Ressonância magnética nuclear

SOD: Superóxido-dismutase

TGA: Termogravimetria

TMA: Análise Termomecânica

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas químicas do pirroloquinolina quinona (PQQ) - na forma oxidada: (a) PQQ na sua forma ácida, mostrando as três carboxilas (-COOH) e seus respectivos valores de pKa, sendo 3,16; 3,69 e 4,26. (b) PQQ na sua forma dissódica, onde duas das três carboxilas estão ionizadas, formando o sal dissódico (com íons Na ⁺ associados)	17
Figura 2. Espectros FTIR-ATR para PQQ.....	30
Figura 3. Curvas TG e derivadas (DTA) do PQQ, obtidas em razão do aquecimento de 10°C/min, no intervalo entre 25 à 900°C, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio.....	33
Figura 4. Curva de DSC do PQQ a uma razão de aquecimento de 5 °C/min, no intervalo de -80 a 500°C, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio.....	34
Figura 5. Curva de DSC do PQQ a uma razão de aquecimento de 5 °C/min, no intervalo de -80 a 130°C, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio.....	35
Figura 6. Difratoograma de difração de raios-x de PQQ.....	37
Figura 7 - Espectro Parcial de RMN ¹ H do PQQ (500Mz, D ₂ O, pH neutro)	38
Figura 8. Espectro Parcial de RMN ¹³ C do PQQ (125Mz, D ₂ O, pH neutro)	38
Figura 9. Ionização do PQQ na presença de água.....	38
Figura 10. Espectro Parcial de RMN ¹ H do PQQ (500Mz, D ₂ O, pH Básico)	40
Figura 11. Espectro Parcial de RMN ¹³ C do PQQ (125Mz, D ₂ O, pH básico)	41
Figura 12. Espectro de absorção na ordem zero de pirroloquinolina quinona (PQQ), obtido em água purificada por osmose reversa na região do UV (200 a 400 nm), na concentração de 15,0 µg/mL.....	42
Figura 13. Curva analítica da pirroloquinolina quinona obtida no espectro de ordem zero em 248 nm. Fonte: próprio autor empregando programa Excel.....	4
Figura 14. Distribuição dos resíduos em função da concentração da PQQ em 248 nm.....	43
Figura 15. Espectro de absorção da solução placebo sobreposta ao espectro de absorção da solução da amostra comercial analisada utilizando o método proposto.....	49

Figura 16. Diagrama de Pareto dos fatores individuais, (X1) comprimento de onda, (X2) tempo de sonicação e (X3) temperatura do ambiente e fatores combinados (X1X2, X2X3, X1X3)52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fatores e níveis de variação utilizados na robustez, de acordo com o método fatorial em dois níveis 2^3	26
Tabela 2: Combinação do planejamento fatorial 2^3 aplicadas na robustez.....	26
Tabela 3. Formulação da solução placebo.....	28
Tabela 4. Frequência da banda, pico da banda, identificação de componentes e modo vibracional dos componentes do PQQ.....	30
Tabela 5. Dados obtidos a partir da curva analítica de pirroloquinolina quinona nos parâmetros de linearidade, limites de detecção e quantificação.....	43
Tabela 6. Teste de <i>Grubbs</i> em cada nível de concentração para verificação de outliers no estudo da linearidade do método.....	44
Tabela 7. Resultados da análise estatística para linearidade do método espectrofotométrico proposto.....	45
Tabela 8. Resultados da análise estatística para linearidade do método espectrofotométrico proposto.....	47
Tabela 9. Resultados do ensaio de precisão de pirroloquinolina quinona utilizando o método espectrofotométrico proposto.....	48
Tabela 10. Planejamento fatorial 2^3 para avaliação da robustez.....	49
Tabela 11. Resultados ANOVA para teor de PQQ com nível de significância 5,0%.....	50
Tabela 12. Análise de 4 amostras comerciais de PQQ através do método espectrofotométrico proposto.....	52

Sumário

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Suplementos alimentares e controle de qualidade	16
2.2 Pirroloquinolina quinona (PQQ)	17
2.3 Métodos analíticos para determinação da PQQ	18
2.4 Validação de métodos analíticos	19
2.5 Química analítica verde	19
2.6 Caracterização físico-química de substâncias	20
3 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo geral	21
2.2 Objetivos específicos	21
4 MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1 Caracterização Físico-Química da Pirroloquinolina Quinona	21
4.1.1 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier Reflectância Total Atenuada (FTIR-ATR)	22
4.1.2 Termogravimetria (TG/DTG)	22
4.1.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	22
4.1.4 Difração de raios-x (DRX)	22
4.1.5 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	23
4.2 Validação do método analítico	23
4.2.1 Reagentes	23
4.2.2 Espectrofotômetro UV-Vis	24
4.2.3 Preparação da solução estoque do padrão e amostra comercial	24
4.3 Parâmetro analíticos	25
4.3.1 Linearidade	25
4.3.2 Limite de detecção e limite de quantificação	25
4.3.4 Robustez	26
4.3.5 Exatidão	28

4.3.6 Seletividade.....	28
4.3.7 Aplicabilidade do método desenvolvido e validado na avaliação da qualidade de amostras comerciais.....	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA PIRROLOQUINOLINA QUINONA.....	29
5.1.1 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier Reflectância Total Atenuada (FTIR-ATR).....	29
5.1.2 Termogravimetria (TG/DTG).....	32
5.1.4 Difração de raios-X (DRX).....	36
5.1.5 Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	38
5.2 VALIDAÇÃO DO METODO ANALITICO.....	42
5.2.1 Seleção do comprimento de onda.....	42
5.3 Parâmetros Analíticos	43
5.3.1 Linearidade, Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ).....	43
5.3.2 Precisão	48
5.3.3 Exatidão	48
5.3.4 Seletividade.....	49
5.3.5 Robustez.....	50
5.3.7 Aplicabilidade do método	53
REFERÊNCIAS	56

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, os suplementos alimentares têm ganhado destaque no mercado nacional e internacional, impulsionados por um estilo de vida mais saudável, o envelhecimento populacional e a prevenção de doenças. Esses produtos são comercializados em cápsulas, soluções ou pós, prometendo complementar a alimentação com nutrientes, substâncias bioativas e compostos funcionais que favorecem o equilíbrio fisiológico do organismo.

Apesar da popularidade dos suplementos, sua regulamentação ainda apresenta desafios, especialmente a respeito ao controle de qualidade e a comprovação da composição informada nos rótulos. Diante deste cenário a obtenção de métodos analíticos validados e confiáveis, que permitem garantir a identidade, pureza e concentração dos ativos presentes nesses produtos. A ausência de padronização pode comprometer tanto a segurança do consumidor quanto a eficácia terapêutica esperada.

Dentro desse contexto, destaca-se o interesse científico por compostos bioativos com potencial antioxidante, neuroprotetor e anti-inflamatório. Um desses compostos é a pirroloquinolina quinona (PQQ), substância que tem sido utilizada em formulações orais e injetáveis com alegações funcionais variadas. No entanto, poucos estudos abordam a caracterização físico-química da PQQ como matéria-prima e a validação de métodos específicos para sua análise em suplementos alimentares.

Diante da relevância do tema e da carência de dados científicos sobre a padronização analítica da PQQ, este trabalho propõe o desenvolvimento e a validação de um método espectrofotométrico simples, rápido e eficaz para sua quantificação além da caracterização físico-química da substância por meio de técnicas complementares. O presente estudo pretende contribuir para o controle de qualidade de produtos contendo PQQ, fortalecendo a confiabilidade desses suplementos no mercado brasileiro.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Suplementos alimentares e controle de qualidade

Suplementos alimentares são produtos que contêm nutrientes, substâncias bioativas, enzimas e probióticos, isolados ou combinados, disponíveis em diversas formas farmacêuticas. São destinados a indivíduos saudáveis com o propósito de complementar a alimentação [1]. O consumo desses produtos cresceu exponencialmente nas últimas duas décadas, impulsionado por mudanças nos hábitos alimentares, aumento da longevidade e uma crescente busca por saúde e bem-estar [2,3].

Apesar dos potenciais benefícios, a popularidade dos suplementos também traz desafios significativos, principalmente no que se refere à regulamentação e à fiscalização da qualidade desses produtos. No Brasil, a RDC nº 243/2018 estabelece critérios mínimos de composição, rotulagem e segurança. No entanto, devido à menor rigidez regulatória em comparação com medicamentos, muitos suplementos chegam ao mercado sem validação científica rigorosa, o que pode comprometer sua eficácia e segurança [4,5].

O cenário se torna ainda mais complexo com a influência das redes sociais, que frequentemente promovem o consumo com base em informações não verificadas ou sem respaldo técnico [6]. Durante a pandemia de COVID-19, esse efeito foi intensificado, uma vez que muitos consumidores passaram a acreditar que suplementos poderiam atuar na prevenção ou redução da gravidade da doença. Como reflexo dessa percepção, entre 2018 e 2020, as vendas do setor cresceram 50%, ultrapassando US\$ 220 bilhões em 2020 [7,8].

Em 2021, o mercado global de suplementos alimentares foi estimado em cerca de US\$ 152 bilhões. Segundo dados do *Statista Report*, a projeção é de que esse setor continue em expansão, podendo alcançar US\$ 300 bilhões até 2028. Esse crescimento expressivo reforça o papel cada vez mais presente dos suplementos alimentares na rotina da população mundial [9,10].

Diante desse cenário, torna-se essencial o desenvolvimento de métodos analíticos robustos, validados e acessíveis, capazes de identificar e quantificar os compostos ativos presentes nas formulações. Esses métodos são fundamentais para garantir a segurança do

consumidor, a qualidade dos produtos comercializados e a credibilidade do mercado de suplementos alimentares no mercado global.

2.2 Pirroloquinolina quinona (PQQ)

A pirroloquinolina quinona (Figura 1) (PQQ; ácido 4,5-dihidro-4,5-dioxo-1H-pirrolo[2,3-f] quinolina-2,7,9-tricarboxílico) é uma quinona com solubilidade em água caracterizada por sua estrutura tricíclica única, composta por um núcleo quinonoidal fusionado a anéis pirrol e quinolina, com três grupos carboxílicos (-COOH) em posições estratégicas (C-2, C-7 e C-9). Essa configuração molecular confere ao PQQ propriedades redox excepcionais [11,12,13]. Exibe alta estabilidade térmica cerca de até 200°C. Sua capacidade de quelar metais de transição (Cu^{2+} , Fe^{3+}) via grupos carboxílicos e nitrogênio do anel pirrol contribui para sua atividade antioxidante, neutralizando espécies reativas de oxigênio (ROS) [14]. Além de possuir baixa massa molecular (330,2 g/mol) e capacidade de atravessar barreiras biológicas [15].

É produzida por diversas espécies bacterianas como: *Klebsiella pneumoniae*, *Methylobacterium extorquens*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Hyphomicrobium spp.*, *Pseudomonas spp.* [16 -20]. A principal via de obtenção da PQQ por mamíferos é por meio da dieta [16]. Essa substância tem despertado atenção pela sua potente atividade antioxidante, anti-inflamatória, neuroprotetora e capacidade de induzir a biogênese mitocondrial [21-23].

Estudos demonstram que a PQQ estimula a expressão de proteínas como SIRT1 e SIRT3, atuando também na regulação de vias antioxidantes como NRF2 e HO-1, além de inibir enzimas como metaloproteinases [24,25]. Sua administração promove aumento da atividade de enzimas antioxidantes (SOD, catalase, GSH), redução da peroxidação lipídica e do apoptose celular. Em modelos *in vitro*, mostrou-se eficaz na proteção de células dopaminérgicas contra lesões induzidas por espécies reativas de oxigênio (ROS) [23].

O mecanismo de biossíntese do PQQ ainda não é totalmente elucidado, mas envolve ao menos seis genes (pqqA-F) que codificam enzimas responsáveis por uma cascata de reações bioquímicas. A formação da molécula ocorre a partir do intermediário ácido 3a-(2-amino-2-carboxietil)-4,5-dioxo-4,5,6,7,8,9-hexahidroquinolina-7,9-dicarboxílico (AHQQ),

gerado pela ação sequencial das enzimas PqqA (que liga os precursores glutamato e tirosina) e PqqB (que promove oxidações iniciais). A ciclização final é catalisada pela PqqC, que converte o AHQQ no núcleo tricíclico característico da PQQ, enquanto PqqD/E introduzem os grupos carboxílicos e PqqF realiza a proteólise liberando a molécula ativa [26,27].

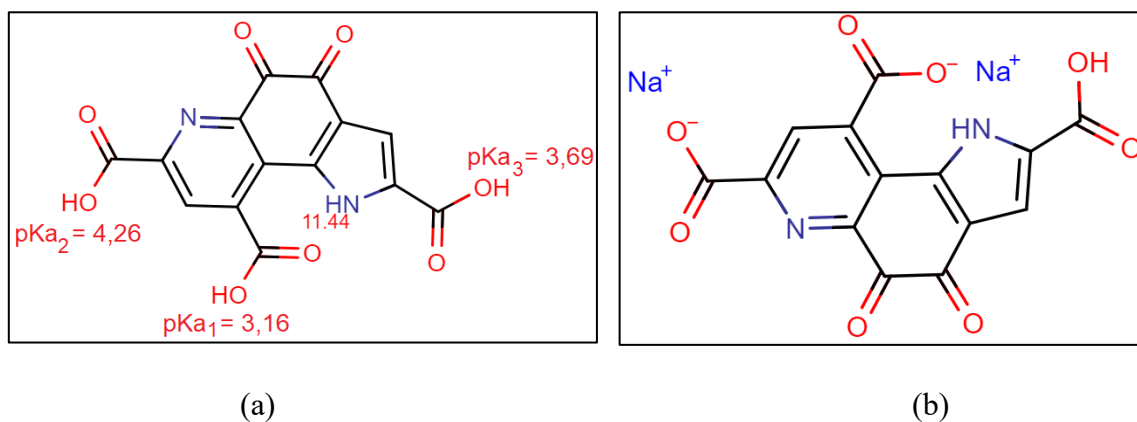


Figura 1. Estruturas químicas da pirroloquinolina quinona (PQQ) - na forma oxidada: (a) PQQ na sua forma ácida, mostrando as três carboxilas (-COOH) e seus respectivos valores de pKa: 3,16; 3,69 e 4,26. (b) PQQ na sua forma dissódica, onde duas das três carboxilas estão ionizadas, formando o sal dissódico (com íons Na⁺ associados). Fonte: Chemicalize (<https://chemicalize.com/app/calculation>).

2.3 Métodos analíticos para determinação da PQQ

Diversos métodos têm sido descritos na literatura para análise da PQQ em diferentes matrizes, como suplementos, alimentos e plasma humano. Os principais incluem a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) [28-30], cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) [31], métodos enzimáticos com *Escherichia coli* GDH [32] e eletroforese capilar de zona [33].

Apesar da eficácia dessas técnicas, ainda não foram encontrados métodos analíticos validados utilizando espectrofotometria UV/Vis direta em ordem zero para determinação da PQQ em suplementos alimentares, o que representa uma lacuna importante a ser explorada.

Diversos métodos analíticos para determinação de PQQ, em diferentes matrizes, foram publicados na literatura científica. Entre eles, destacam-se métodos que utilizam a cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) para determinar o PQQ no plasma

humano e em amostras de origem alimentar [28-30], a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas para análise em produtos alimentícios [31], métodos enzimáticos baseados na quantificação da atividade enzimática da *Escherichia coli* GDH em matérias-primas e alimentos [32] e a eletroforese capilar de zona [33]. No entanto, não foram encontrados na literatura científica métodos analíticos validados para a determinação de PQQ utilizando a espectrofotometria UV/Vis direta (ordem zero), em suplementos alimentares.

2.4 Validação de métodos analíticos

A validação de métodos analíticos é essencial para garantir confiabilidade, exatidão e reprodutibilidade nos resultados obtidos, especialmente na análise de substâncias em produtos farmacêuticos e suplementos alimentares [34,35]. No Brasil, a ANVISA regulamenta esse processo por meio da RDC 166/17. Os parâmetros exigidos incluem linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão, especificidade e robustez [36].

A linearidade avalia se os resultados são proporcionais às concentrações analisadas. O limite de detecção é a menor concentração detectável e o de quantificação determina a menor concentração mensurável com exatidão. A precisão pode ser intradia, interdía ou interlaboratorial. A exatidão é testada por recuperação da amostra padrão. A especificidade verifica a ausência de interferência de componentes da matriz já a robustez observa a estabilidade frente a pequenas variações experimentais [37–44].

2.5 Química analítica verde

A química analítica verde (*Green Analytical Chemistry – GAC*), busca reduzir os impactos ambientais causados pelas análises laboratoriais, promovendo métodos mais sustentáveis. Isso inclui o uso de solventes menos tóxicos, menor consumo energético e redução da geração de resíduos [45,46].

As diretrizes da GAC são baseadas em 12 princípios, sendo eles: prevenção, economia de átomos, síntese de produtos menos perigosos, desenho de produtos seguros, solventes e auxiliares mais seguros, busca pela eficiência de energia, uso de fontes renováveis de matéria-prima, evitar a formação de derivados, catalisar, desenho para a degradação,

análise em tempo real para a prevenção da poluição e química intrinsecamente segura para prevenção de acidentes. [38, 47].

Para avaliar a aplicação desses princípios na prática analítica, foram desenvolvidos sistemas de pictogramas e métricas visuais que quantificam o grau de sustentabilidade dos métodos. Entre os mais reconhecidos está o sistema AGREE [48], que utiliza um gráfico radial para avaliar 12 critérios de desempenho ambiental, e o NEMI [49], que emprega ícones para indicar redução de resíduos e uso de solventes verdes. Essas ferramentas visuais, representadas por símbolos como folhas verdes (indicando baixa toxicidade), setas de reciclagem (reuso de materiais) e ícones de baixo consumo energético, permitem uma rápida identificação e comparação da 'verdeza' dos métodos analíticos [38,47]. Essa abordagem padronizada tem sido fundamental para a implementação dos princípios da GAC em laboratórios de análise rotineiros e em pesquisas acadêmicas.

2.6 Caracterização físico-química de substâncias

A caracterização físico-química é um passo fundamental para compreender as propriedades estruturais, estabilidade e segurança de substâncias ativas. No caso da PQQ, essa caracterização é crucial para confirmar sua identidade, pureza e viabilidade tecnológica em formulações [50-53].

Técnicas analíticas frequentemente empregadas incluem espectroscopia na região UV, espectroscopia no infravermelho (FTIR), difração de raios X (DRX), ressonância magnética nuclear (RMN), termogravimetria (TG), calorimetria diferencial de varredura (DSC), entre outras. Essas ferramentas permitem determinar aspectos como estrutura química, cristalinidade, pureza, estabilidade térmica e comportamento analítico [54-57].

Além disso, entender as propriedades físico-químicas do PQQ é essencial para assegurar sua funcionalidade e qualidade como suplemento alimentar. Para isso, técnicas analíticas como espectroscopia no infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear (RMN) e difração de raios X (DRX), permitem elucidar sua estrutura química, pureza, cristalinidade e estabilidade térmica [50,51].

Na literatura encontram-se estudos de análise estrutural da PQQ com íon lantanídeo por espectroscopia de infravermelho (IV), utilizados para identificar características específicas desses complexos [50]. Também foram analisadas as propriedades estruturais do cristal de PQQ dissódico tri-hidratado em solução hidroalcoólica, por difração de raios X

(DRX) e calorimetria diferencial (DSC) [51]. Todavia, nenhum estudo específico, até o momento, abordou a análise das propriedades físico-químicas da matéria-prima pura da PQQ utilizada em formulações comerciais.

Esse cenário reforça a necessidade de métodos que sejam simples, rápidos, seletivos, economicamente viáveis e sustentáveis (ecológicos) para a determinação de PQQ em formulações farmacêuticas industriais e magistrais. Adicionalmente, ressalta-se a importância de caracterizar detalhadamente o composto, utilizando técnicas complementares, a fim de oferecer um entendimento aprofundado de suas propriedades essenciais.

3 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver e validar um método analítico para determinação quantitativa de pirroloquinolina quinona (PQQ) em formulações de uso oral e injetável de uso humano.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Realizar a caracterização físico-química da matéria-prima PQQ por meio de: espectrofotometria no ultravioleta (UV) e no infravermelho (IV), Ressonância magnética nuclear (RMN), termogravimetria/ termogravimetria derivada (TG/DTG), Calorimetria exploratória diferencial (DSC) e difração de raios X (DRX), com a finalidade de empregá-la como Substância Química de Referência Caracterizadas (SQC) no presente estudo;
- ✓ Desenvolver e validar a um método espectrofotométrico UV/Vis para a determinação quantitativa de PQQ em formulações de suplementos alimentares de uso oral e injetável;
- ✓ Realizar o controle de qualidade de amostras comerciais contendo PQQ, empregando o método analítico desenvolvido e validado neste projeto.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Caracterização Físico-Química da Pirroloquinolina Quinona

4.1.1 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier Reflectância Total Atenuada (FTIR-ATR)

As análises da matérias-primas de PQQ foram realizadas no espectrômetro da Agilent, modelo Cary 630 (EUA) com transformada de Fourier, utilizando acessório de ATR (Reflectância total atenuada). A região espectral analisada foi de 4000 a 500 cm^{-1} , com resolução espectral de 4 cm^{-1} e 32 scans.

4.1.2 Termogravimetria (TG/DTG)

Para as curvas de TG/DTG foi utilizando sistema termoanalisador TGA-Q50 (TA Instruments - EUA). Para esta análise foi pesado cerca de 10 mg de PQQ e posteriormente analisado em atmosfera de nitrogênio (N_2) com fluxo de 40 mL min^{-1} e razão de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até 900 $^{\circ}\text{C}$, com cadinhos de platina como suporte. Os dados obtidos foram plotados utilizando o software OriginPro[®] 8.5.

4.1.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Para a curva DSC das SQC foi utilizado o equipamento DSC-Q20 com sistema de refrigeração RCS-90 (TA Instruments-EUA). Nesta análise foi pesado cerca de 3 mg de PQQ adicionada ao cadinho de alumínio tampado e como referência, um cadinho similar, vazio e posteriormente analisada em atmosfera de nitrogênio (N_2) com fluxo de 60 mL min^{-1} e razão de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ na faixa de temperatura de -80 a 500 $^{\circ}\text{C}$. Repetições para as curvas foram obtidas em ciclos de resfriamento e aquecimento, inicialmente a temperatura foi equilibrada a 60 $^{\circ}\text{C}$, seguido de isoterma de 10 minutos e rampa de resfriamento até -60 $^{\circ}\text{C}$, numa razão de 5 $^{\circ}\text{C/min}$ completando o ciclo 1. Na sequência a temperatura foi equilibrada a -60 $^{\circ}\text{C}$, seguido de isoterma por 10 minutos e rampa de aquecimento a 5 $^{\circ}\text{C/min}$ até temperatura final de 130 $^{\circ}\text{C}$ completando o ciclo 2. Os dados obtidos foram plotados utilizando o software OriginPro[®] 8.5.

4.1.4 Difração de raios-x (DRX)

Os difratogramas de raios-x foram obtidos no equipamento difratômetro da Bruker (modelo D2 PHASER). Para o preparo das amostras, o pó dos resíduos foi colocado em um suporte de vidro com cavidades concêntricas e a superfície da amostra foi alinhada com

auxílio de uma lâmina de vidro. Utilizou-se fonte monocromática de raios-X de cobre com comprimento de onda de 1,54184 Å, operando a 40 kV e 10 mA. A varredura foi realizada numa escala de 2θ entre 8 e 60°, com passo de 0,05° e 5 segundos de intervalo entre passos a rotação a 15 RPM. Os dados obtidos foram tratados utilizando o software OriginPro® 8.5.

4.1.5 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram obtidos em espectrômetro Bruker (500/125 MHz), utilizando D_2O como solvente. Os deslocamentos químicos são expressos em partes por milhão (ppm). O sinal relativo ao hidrogênio residual do solvente (D_2O ^1H δ 4,6ppm) e/ou tetrametilsilano (TMS) foram empregados como referência interna. Os espectros foram processados por meio de do programa TOPSPIN 4.1 da Bruker.

4.2 Validação do método analítico

O método espectrofotométrico foi validado de acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 166 de 24 de julho de 2017 da Anvisa [36], INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia Normalização e Qualidade Industrial) [40], bem como os guias internacionais, Q2(R1) do *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use – ICH* [41] e *Official Methods of Analysis (Appendix F)* da *AOAC INTERNATIONAL* [42]. Os parâmetros avaliados incluíram a linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), seletividade e robustez.

Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando os programas Microsoft Excel® (Microsoft, Washington, EUA), OriginPro®, versão 8.5 (OriginLab, Reino Unido) e TIBCO Statistica® Ultimate Academic 14.0 (StatSoft, São Paulo, Brasil).

4.2.1 Reagentes

Para o desenvolvimento e validação do método analítico, utilizou-se uma matéria-prima a SQC de pirroloquinolina quinona (PQQ), com elevado teor de pureza (98,9%), que após passar por processos de caracterização com as seguintes técnicas: espectroscopia UV-

Vis, infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear (RMN), difração de raios-X, termogravimetria (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC), confirmando sua identidade, pureza e estabilidade, foi qualificada como substância química de referência caracterizada (SQC). Amostras comerciais na forma de cápsulas para uso oral de 10 mg e ampolas injetáveis de 5 mg foram adquiridas no comércio nacional (Brasil). Como solvente, foi empregada água purificada obtida pelo sistema purificador de água, osmose reversa, OS50 LX – Gehaka[®] (São Paulo, Brasil). Os excipientes utilizados no estudo de seletividade foram celulose, croscamelose sódica, lauril sulfato de sódio, dióxido de silício e talco da empresa Purifarma[®] (Anápolis, Brasil).

4.2.2 Espectrofotômetro UV-Vis

O método foi desenvolvido empregando o espectrofotômetro UV-Vis Thermo Scientific[®] modelo Evolution 60[®], (Madison-WI, EUA) operado pelo software VisioNlite[®] na faixa de 200-400 nm. Para o preparo das soluções, foi utilizada uma balança analítica eletrônica AUY220 (Shimadzu[®], São Paulo, Brasil) e um sonicador Ultracleaner 1400 (Unique[®], São Paulo, Brasil).

4.2.3 Preparação da solução estoque do padrão e amostra comercial

A solução inicial de PQQ foi preparada a partir da matéria-prima empregada como SQC, pesando analiticamente 10,0 mg, os quais foram transferidos para balões volumétricos de 200,0 mL. Os volumes foram então completados com água purificada para atingir uma concentração final de 50,0 µg/mL. Uma solução-estoque contendo 10,0 µg/mL de PQQ foi preparada e em seguida, submetida a sonicação em agitação ultrassônica por 15 minutos para obtenção da solução final. Esta solução foi utilizada para realizar uma varredura espectral na faixa de 200 a 400 nm, com a finalidade de determinar os comprimentos de onda apropriados para a análise da substância em questão.

Para preparar a solução-estoque da amostra comercial, determinou-se o peso médio de 20 cápsulas de PQQ, em seguida, homogeneizou-se o conteúdo com um gral e pistilo. Uma tomada de ensaio de pó, homogeneizada, equivalente a 10,0 mg de PQQ foi transferida para um balão volumétrico de 200,0 mL e o volume foi completado com água purificada, resultando em uma solução com concentração teórica de 50,0 µg/mL de PQQ. Posteriormente, esta solução foi submetida a uma agitação ultrassônica por 15 minutos.

Para as amostras comerciais injetáveis, que consistiam em uma solução aquosa contendo 5 mg de PQQ em 2 mL, essa solução foi transferida para um balão volumétrico de 100,0 mL e o volume foi completado com água purificada, resultando em uma solução com concentração de 50,0 µg/mL PQQ. Essa solução foi submetida a uma agitação ultrassônica por 15 minutos para garantir homogeneidade e solubilização adequada. Em seguida, uma alíquota de 1,5 mL dessa solução foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL, e o volume foi completado com água purificada, obtendo-se uma concentração final de 15 µg/mL para análise.

4.3 Parâmetro analíticos

4.3.1 Linearidade

A linearidade, definida como a capacidade do método de produzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito presente na amostra [41], foi avaliada construindo-se três curvas analíticas com PQQ-SQC, em nove níveis de concentrações diferentes, variando de 5,0 a 25,0 µg/mL, seguindo a lei de Lambert-Beer. Cada nível de concentração foi lido em triplicata.

As curvas analíticas foram construídas a partir das absorbâncias obtidas nos espectros de ordem zero em 248 nm. Os resultados foram avaliados estatisticamente, de acordo com o preconizado pelo guia nº 10/2017 - Guia para Tratamento Estatístico da Validação Analítica da Anvisa, por meio de da determinação do coeficiente de correlação (r), análise de outliers (teste de *Grubbs*) [55], confirmação da homocedasticidade dos dados (teste de *Cochran*), teste F da análise de variância (ANOVA) e avaliação da normalidade dos resíduos (Teste de Shapiro-Wilk). Todos os testes estatísticos foram realizados com nível de significância $\alpha=0,05$. As equações das retas foram determinadas pela análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO).

4.3.2 Limite de detecção e limite de quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) da PQQ foram obtidos a partir das curvas de calibração da substância, utilizando o desvio padrão do intercepto (SD) e a média dos valores de inclinação das curvas analíticas (a), conforme apresentado nas equações (1) e (2).

$$LD = 3,3 \times SD \text{ (1)}$$

$$LQ = 10,0 \times SD \text{ (2)}$$

4.3.3 Precisão

Os estudos de precisão foram conduzidos para determinar a confiabilidade do método analítico projetado, avaliando-se a repetibilidade (precisão intra-dia) e precisão intermediária (precisão inter-dia). A precisão foi demonstrada por meio do cálculo do desvio padrão relativo (DPR) entre as análises realizadas, tanto na repetibilidade quanto na precisão intermediária.

A repetibilidade foi avaliada a partir da análise de seis soluções preparadas individualmente, na concentração de 15,0 µg/mL, utilizando a mesma instrumentação, o mesmo analista e realizadas no mesmo dia. Para a precisão intermediária, o mesmo procedimento foi seguido, mas realizado por 3 analistas diferentes em três dias distintos. As soluções analisadas foram obtidas a partir de diluições da solução-estoque da amostra comercial, conforme descrito na Seção 4.2.3.

4.3.4 Robustez

A robustez refere-se à capacidade de resistir a pequenas e intencionais variações nas condições analíticas. A robustez do método proposto foi avaliada utilizando um planejamento fatorial 2³, no qual são analisados 3 fatores em dois níveis: nível superior (+) e nível inferior (-), totalizando 8 experimentos. Os três fatores escolhidos (variáveis independentes) que podem afetar o teor de PQQ (variável resposta) dentro do método analítico desenvolvido foram: comprimento de onda (A), tempo de sonicação (B) e temperatura (C), e os respectivos níveis estão apresentados na Tabela 1.

Este ensaio foi realizado em triplicata na concentração de 15,0 µg/mL da amostra comercial de PQQ, preparada conforme descrito no item 4.2.3. As respostas analíticas obtidas de cada experimento foram expressas em porcentagem de teor.

A significância dos efeitos foi interpretada estatisticamente e graficamente a partir da Análise da Variância (ANOVA) e do diagrama de Pareto, utilizando o *software* TIBCO Statistica® Ultimate Academic 14.0 (StatSoft, São Paulo, Brasil).

A matriz de planejamento fatorial 2^3 , utilizada na avaliação de robustez, foi construída considerando todas as combinações possíveis entre os níveis e os fatores, conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 1: Fatores e níveis de variação utilizados na robustez, de acordo com o método fatorial em dois níveis 2^3

Fatores	Unidade	Condição variada (-)	Condição normal	Condição variada (+)
Comprimento de onda (X1)	nm	246	248	250
Tempo de sonicação (X2)	min.	13	15	17
Temperatura do ambiente (X3)	°C	28	30	32

Tabela 2: Combinação do planejamento fatorial 2^3 aplicadas na robustez.

Experimentos	X1	X2	X3
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+

4.3.5 Exatidão

A exatidão, expressa em porcentagem, foi avaliada por meio da adição e recuperação de quantidades crescentes e conhecidas de solução padrão de PQQ (5,0; 10,0; 20,0 µg/mL) respectivamente, nas soluções de amostra comercial, com concentração fixa (5,0 µg/mL). Foram preparadas soluções de amostras aditivada de solução padrão, cujas concentrações finais esperadas foram: 10,0; 15,0; e 25,0 µg/mL. O teste foi realizado em triplicata e a porcentagem de recuperação foi calculada conforme indicado pela AOAC INTERNATIONAL [42], empregando a Equação (3)

$$\%R = \left[\frac{Ca - Cs}{Ct} \right] \times 100 \quad (3)$$

Onde *R*: recuperação; *Ca*: concentração de fármaco encontrada na amostra adicionada de padrão; *Cs*: concentração de fármaco encontrada na amostra não adicionada de padrão e *Ct*: concentração teórica de padrão adicionada à amostra.

Foi determinada a porcentagem de recuperação para cada nível de concentração, juntamente com os respectivos desvios padrão relativos (DPR).

4.3.6 Seletividade

A seletividade do método foi determinada pela avaliação da interferência dos adjuvantes presentes nas cápsulas, conferida sob o comprimento de onda de interesse analítico em 248 nm, com a finalidade de verificar se neste comprimento de onda haveria sobreposição de bandas oriundas dos excipientes que pudessem somar com a absorbância das amostras. Assim, para essa análise, foi preparada uma solução placebo contendo os excipientes mais comuns empregados em formulações de PQQ de uso oral. A solução placebo foi preparada contendo uma mistura dos adjuvantes, conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 3: Formulação da solução placebo.

Excipientes	Proporção (%)
Celulose	87,5
Croscarmelose sódica	3,0
Lauril sulfato de sódio	1,5
Dióxido de silício	3,0
Talco	5,0

4.3.7 Aplicabilidade do método desenvolvido e validado na avaliação da qualidade de amostras comerciais

Com o intuito de avaliar a eficiência do método proposto, foram analisadas quatro amostras comerciais distintas, de uso oral e injetável, na concentração de 15,0 µg/mL conforme descrito no item 4.2.3. Os teores de PQQ das 5 soluções foram determinados a partir da equação da reta da regressão linear da curva de calibração.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA PIRROLOQUINOLINA QUINONA

5.1.1 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier Reflectância Total Atenuada (FTIR-ATR)

A Figura 2 mostra o espectro do PQQ no Infravermelho e a Tabela 4 ilustra a frequência da banda, pico da banda, identificação de componentes e modo vibracional dos componentes do PQQ.

A análise de infravermelho foi realizada com o propósito de determinar a composição qualitativa do material empregado como SQC, bem como investigar potenciais interações químicas e aspectos estruturais relevantes. O espectro de infravermelho do PQQ obtido revelou uma série de bandas características que confirmam a presença de grupos funcionais importantes na molécula.

Uma banda larga em 3458 cm^{-1} foi atribuída ao grupo O-H, indicando a presença de grupos hidroxila. As bandas em 1718 e 1688 cm^{-1} são atribuídas a grupos C=O. A banda em 1718 cm^{-1} pode ser associada a um grupo ácido carboxílico, enquanto em 1688 cm^{-1} é característica do grupo C=O em quinonas. Já na banda em 1595 cm^{-1} apresenta uma atribuição complexa, com contribuições da deformação N-H de grupos amida (Amida II) e uma possível contribuição da deformação angular H-N-H de grupos amina. Embora tradicionalmente a Amida II seja esperada em torno de 1550 cm^{-1} , estudos de aminas, como a 1-heptilamina, mostram que deformações N-H podem contribuir para bandas na região de 1595 cm^{-1} [58,59].

Além das bandas já mencionadas, o espectro de IV do PQQ exibe outras bandas menos intensas, mas igualmente informativas. Uma banda em 1550 cm^{-1} pode ser atribuída à deformação N-H de amidas (Amida II), enquanto as bandas na região de 1191 a 1077 cm^{-1} são características dos estiramentos de C-O presentes em ácidos carboxílicos. As bandas observadas em 881 a 712 cm^{-1} são típicas dos grupos C-H fora do plano em anéis aromáticos.

Embora não existam espectros de infravermelho de PQQ disponíveis na literatura para comparação direta, é possível comparar os resultados obtidos neste estudo com espectros de compostos estruturalmente similares, como quinonas, aminas cíclicas ou ácidos carboxílicos aromáticos. Por exemplo, espectros de infravermelho de quinonas geralmente apresentam bandas de estiramento C=O na região de 1690 - 1650 cm^{-1} , o que é consistente com as bandas observadas em 1688 cm^{-1} no espectro do PQQ. Da mesma forma, espectros de infravermelho de aminas cíclicas [56,57] podem apresentar bandas de deformação N-H na região de 1600 - 1500 cm^{-1} , o que pode contribuir para a intensidade das bandas observadas em 1595 cm^{-1} no espectro do PQQ.

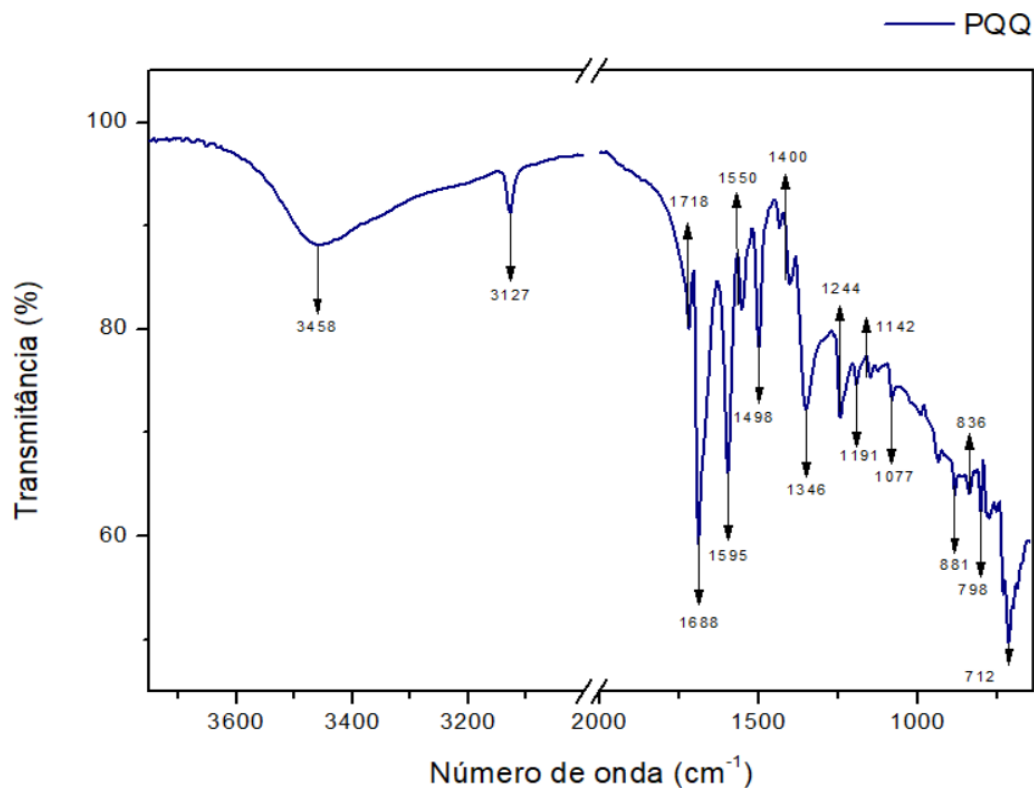


Figura 2. Espectros FTIR-ATR para PQQ.

Tabela 4. Frequência da banda, pico da banda, identificação de componentes e modo vibracional dos componentes do PQQ.

Banda (cm ⁻¹) PQQ	Modo vibracional	Grupo Funcional
3458	Alongamento	OH
3127	Alongamento	C-H
1718	Alongamento	C=O
1688	Alongamento	C=O
1595	Dobramento	N-H
1550	Alongamento	N-H
1498	Alongamento	C=O
1400	Dobramento	OH
1346	Alongamento	C-N

1244	Alongamento	C-N
1191	Alongamento	C-O
1142	Alongamento	C-O
1077	Alongamento	C-O
881	Dobramento	C-H
836	Dobramento	C-H
798	Dobramento	C-H
712	Dobramento	C-H

5.1.2 Termogravimetria (TG/DTG)

A análise termogravimétrica é empregada para monitorar as variações de massa de uma amostra à medida que a temperatura é alterada. No contexto farmacêutico, a TG pode ser aplicada para: a avaliação de pureza, umidade, estabilidade e degradação de substâncias farmacêuticas. Essa técnica pode ser utilizada para determinação de pureza e identificação de impurezas, análise de estabilidade térmica, estudo de perda de umidade, avaliação da decomposição térmica de fármacos, análise de polimorfismo e estudo de interações entre fármacos e excipiente [60].

As curvas TG/DTG da PQQ (Figura 3) revelam quatro eventos principais de perda de massa. O primeiro ocorre a 79,02 °C, sendo atribuído à liberação de água de adsorção ou de hidratação cristalina, fenômeno comum em compostos que apresentam grupos polares, como hidroxilas ou carboxilas. Essa perda ocorre por rompimento de ligações fracas, como pontes de hidrogênio, e não está relacionada a água estrutural (intramolecular).

A segunda etapa, com pico em 143,04 °C, pode estar relacionada à eliminação de solventes residuais de síntese ou à perda de grupos instáveis como o grupo COOH, por exemplo. Já as etapas com picos em 323,09 °C e 406,42 °C correspondem à decomposição térmica da estrutura molecular da PQQ, com ruptura de ligações covalentes e fragmentação da estrutura quinônica.

A principal etapa de decomposição é observada com perda de massa de 61,84%, iniciando-se a partir de 269,72 °C, com máximo em 323,09 °C, sugerindo que a PQQ anidra apresenta estabilidade térmica até aproximadamente 270 °C. A partir desse ponto, ocorre degradação intensa da matriz molecular. Ao final do processo térmico, observa-se um resíduo carbonáceo representando cerca de 25% da massa inicial, característico de compostos aromáticos submetidos à pirólise, indicando a formação de estruturas ricas em carbono, termoestáveis e pouco voláteis.

Esse comportamento térmico é coerente com o observado em outras quinonas. O perfil do PQQ apresenta semelhanças com o da 1,2-naftoquinona, conforme descrito por Sousa (2012) [60], que também exhibe múltiplas etapas de degradação térmica até cerca de 630 °C, evidenciando quebra da estrutura molecular e carbonização progressiva. Essa semelhança sugere que o PQQ, assim como outras quinonas, possui grupos funcionais reativos, como carbonilas e sistemas aromáticos conjugados, que favorecem a decomposição térmica em múltiplas etapas. O padrão de desidratação inicial, seguido por degradação oxidativa e posterior estabilização em forma de carbono residual é típico de compostos com estruturas altamente conjugadas e com potencial bioativo.

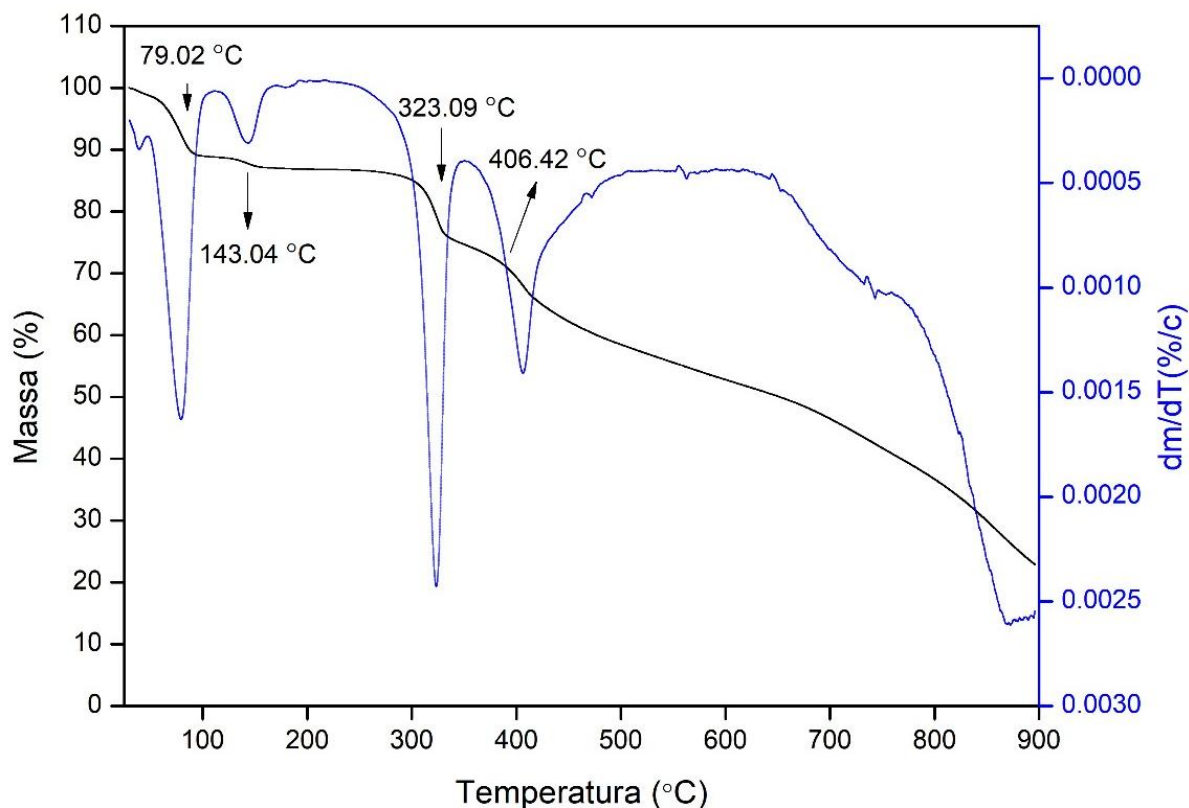


Figura 3. Curvas TG e derivadas (DTA) do PQQ, obtidas em razão do aquecimento de 10°C/min, no intervalo entre 25 à 900°C, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio.

5.1.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A curva DSC do PQQ (Figura 4), obtida com razão de aquecimento de 5 °C/min entre -80 e 480 °C, apresenta um pico endotérmico proeminente em 100,24 °C, com entalpia de 482,4 J/g, atribuído à perda de água de hidratação cristalina. Esse evento térmico não corresponde à fusão da substância, como evidenciado pela análise do ciclo de aquecimento e resfriamento (Figura 5), na qual não se observa nenhum pico exotérmico de cristalização durante o resfriamento.

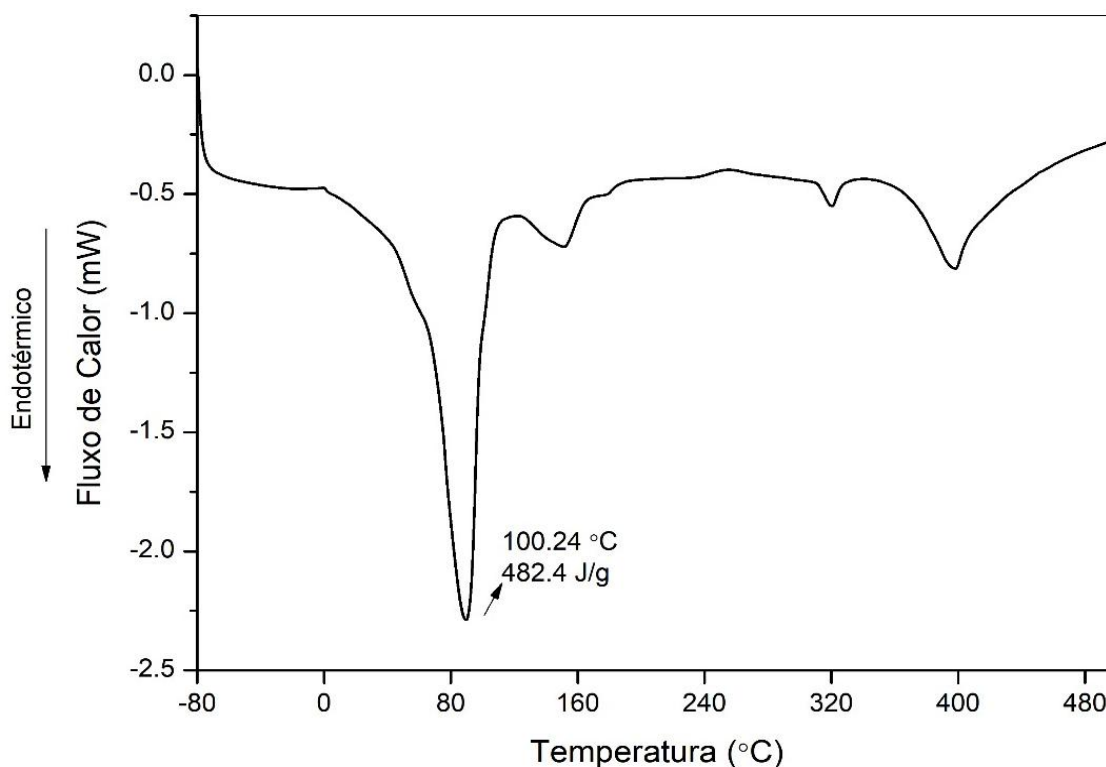


Figura 4. Curva de DSC do PQQ a uma razão de aquecimento de 5 °C/min, no intervalo de -80 a 500°C, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio.

A ausência de recristalização sugere que não ocorreu transição do estado sólido para o líquido, descartando a hipótese de fusão. Eventos térmicos menores observados nas curvas podem estar relacionados à decomposição térmica progressiva da amostra, como indicado na análise TG (Figura 5). Assim, conclui-se que o PQQ não apresenta um ponto de fusão definido.

A comparação com a 1,4-naftoquinona, conforme descrito por Sousa (2012) [60], é relevante, pois esse composto apresenta um pico endotérmico por volta de 122 °C, associado à desidratação ou a uma possível transição de fase. Embora ambas compartilhem o núcleo quinônico, o PQQ apresenta um perfil térmico significativamente diferente da 1,4-naftoquinona, evidenciado pela ausência de pico de fusão e recristalização. Essa diferença sugere que os eventos observados no PQQ são majoritariamente relacionados à eliminação de água de hidratação e à decomposição térmica, enquanto a 1,4-naftoquinona apresenta indícios de transição de fase ou desidratação em temperaturas mais elevadas.

Na Figura 5, a análise foi limitada ao intervalo de 0 a 130 °C, abrangendo os eventos térmicos mais significativos. Observou-se ainda que o pico endotérmico ocorreu a uma temperatura menor (70,74 °C), provavelmente devido à menor razão de aquecimento (5 °C/min), o que pode influenciar o deslocamento e a intensidade do evento térmico, tornando-o mais amplo e precoce.

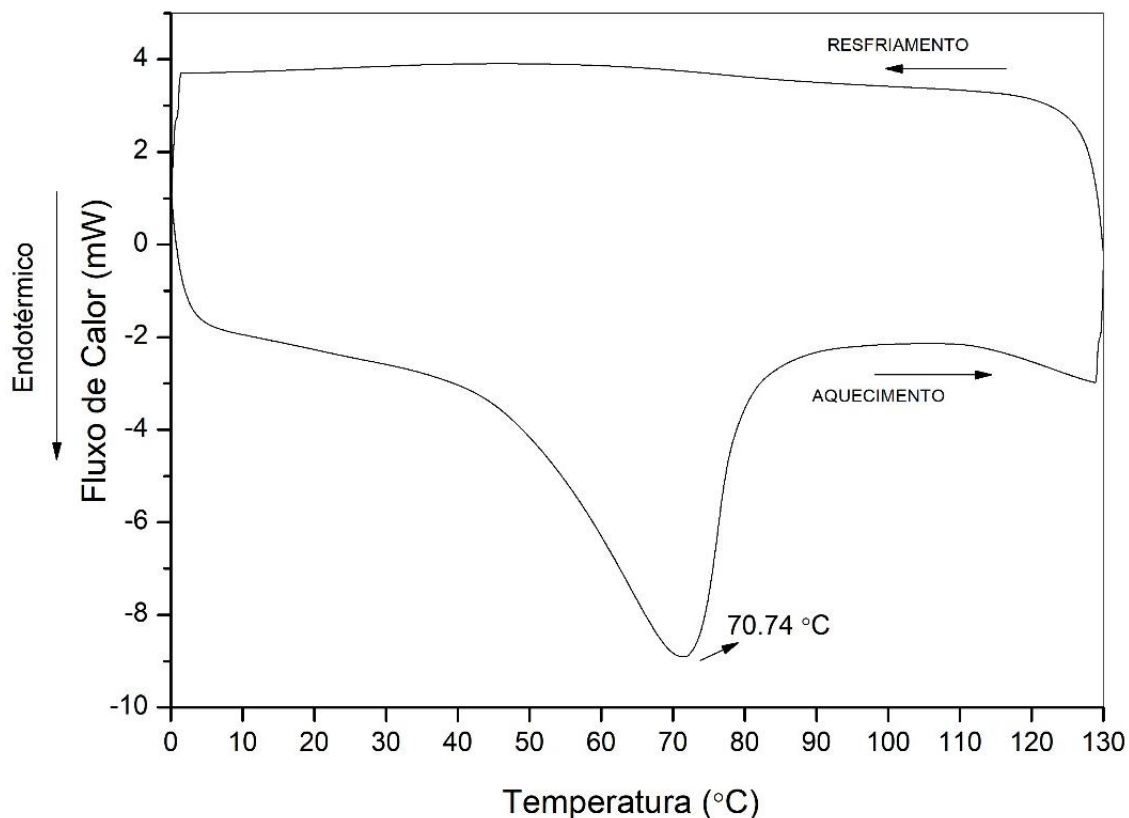


Figura 5. Curva de DSC do PQQ a uma razão de aquecimento de 5 °C/min, no intervalo de -0 a 130°C, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio.

5.1.4 Difração de raios-X (DRX)

A análise por difração de raios X (DRX) da pirroloquinolina quinona (PQQ) (Figura 6) revelou múltiplos picos de difração em diferentes ângulos 2θ , evidenciando sua natureza cristalina. Os picos mais intensos foram observados nas regiões de aproximadamente 10°, 20°, 30° e 40°, com destaque para o pico em torno de 20°, que apresentou a maior intensidade.

Esse pico pode indicar uma orientação cristalina preferencial ou maior empacotamento molecular nessa direção.

Esses resultados estão de acordo com os achados de Ikemoto et al. (2012) [52], que caracterizaram o PQQ como um tri-hidratado dissódico (PQQ *disodium trihydrate*), ressaltando a relevância das interações entre os íons de sódio e os grupos carboxílicos e quinonas na organização cristalina. A presença do pico mais intenso próximo de 20° pode refletir tais interações estruturais.

A comparação dos ângulos obtidos neste estudo com os valores reportados por Ikemoto et al. (ex: 9,1°, 10,3°, 17,7° e 18,3°) sugere que a amostra analisada apresenta características estruturais compatíveis com a forma tri-hidratada do PQQ. Além disso, a influência do conteúdo de água na estabilidade da substância, conforme discutido por Ikemoto et al., destaca a possibilidade de diferentes formas cristalinas em função da umidade.

Esses aspectos são essenciais para o desenvolvimento de formulações farmacêuticas, uma vez que a forma cristalina impacta diretamente a solubilidade, a biodisponibilidade e a estabilidade do PQQ durante o armazenamento. Assim, a identificação e o controle da forma cristalina constituem etapas fundamentais para assegurar a eficácia e a segurança de produtos à base desse composto.

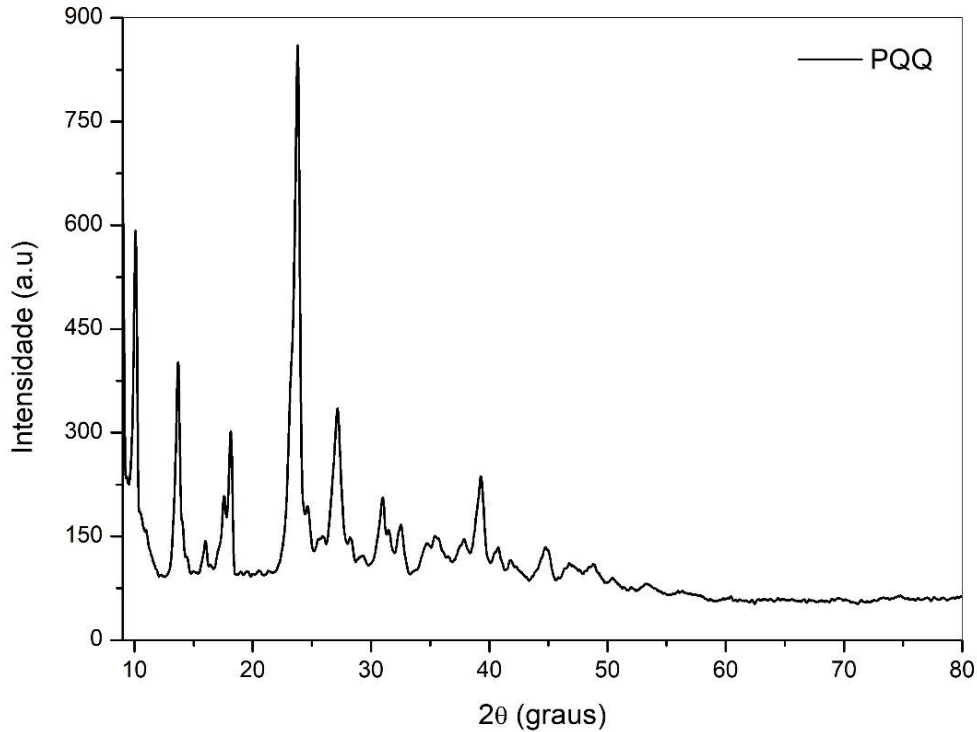


Figura 6. Difratoograma de difração de raios-x do PQQ.

5.1.5 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Adicionalmente, o PQQ foi caracterizado por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio (^1H) e de carbono-13 (^{13}C), uma técnica essencial para a confirmação estrutural de compostos orgânicos. Para a obtenção de espectros confiáveis, é imprescindível que o composto esteja em sua forma pura. Na análise inicial, os espectros de RMN ^1H e ^{13}C apresentaram um número de sinais superior ao esperado. No espectro de RMN ^1H , por exemplo, foram observados dois sinais distintos tanto para o próton H_3 quanto para o H_{10} (Figura 7), sugerindo a presença de mais de uma espécie molecular em equilíbrio.

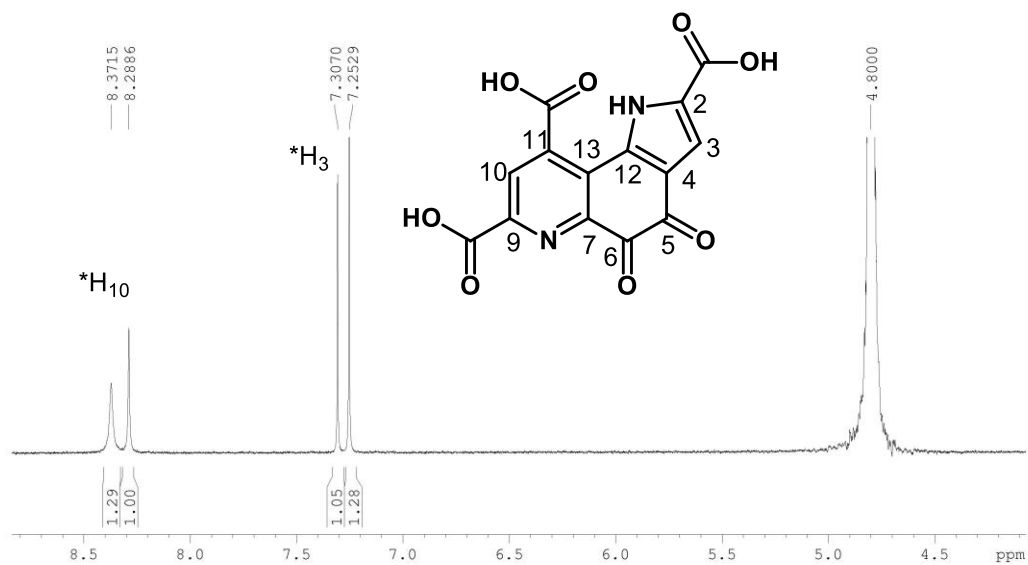


Figura 7 - Espectro parcial de RMN ^1H do PQQ (500Mz, D_2O , pH neutro)

No espectro de RMN ^{13}C também foi observado o dobro do número de sinais esperados para esse composto (Figura 8)

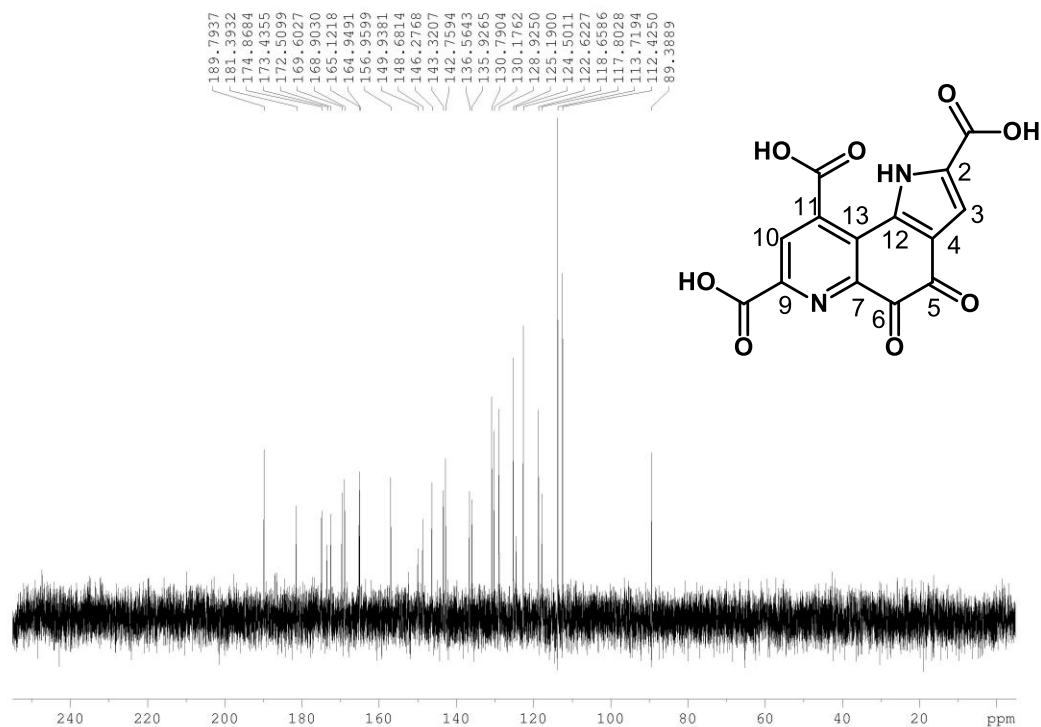


Figura 8. Espectro Parcial de RMN ^{13}C do PQQ (125Mz, D_2O , pH neutro)

Logo, foi levantada a hipótese de que o PQQ se ioniza na presença de água (Figura 9).

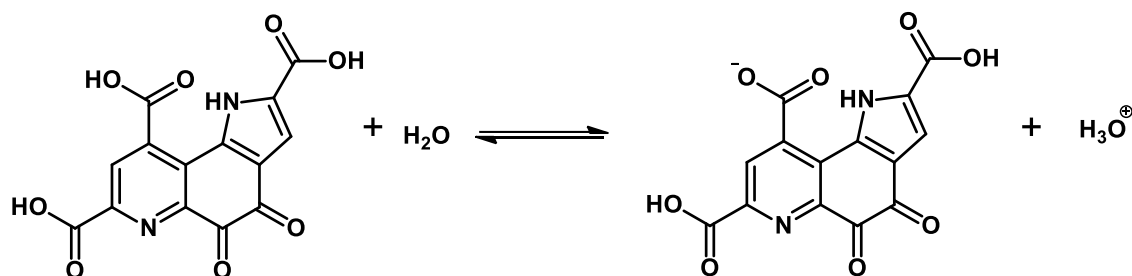


Figura 9. Ionização do PQQ na presença de água

Como a água foi o solvente em que o composto apresentou melhor solubilidade, não foi possível substituir o solvente deuterado por outro mais apolar. Assim, optou-se por repetir as análises em meio alcalino, utilizando D₂O ajustado com hidróxido de sódio 0,1 mol.L⁻¹. A expectativa era de que o aumento do pH promovesse a completa ionização dos grupos carboxila, permitindo a detecção de uma única espécie no meio.

Conforme mostra a Figura 10, a alcalinização do meio de análise resultou na observação do número de sinais correspondente à estrutura esperada, comprovando a hipótese levantada. Com isso, a caracterização por RMN ¹H foi realizada com sucesso, e os sinais observados puderam ser atribuídos com precisão aos hidrogênios do composto. É importante destacar que sinais de hidrogênios lábeis, como os das carboxilas e o hidrogênio ligado ao nitrogênio do anel indólico, tendem a desaparecer em meio aquoso deuterado devido à troca com os prótons do solvente [61]. Além disso, a concentração do composto influencia diretamente na visibilidade desses sinais.

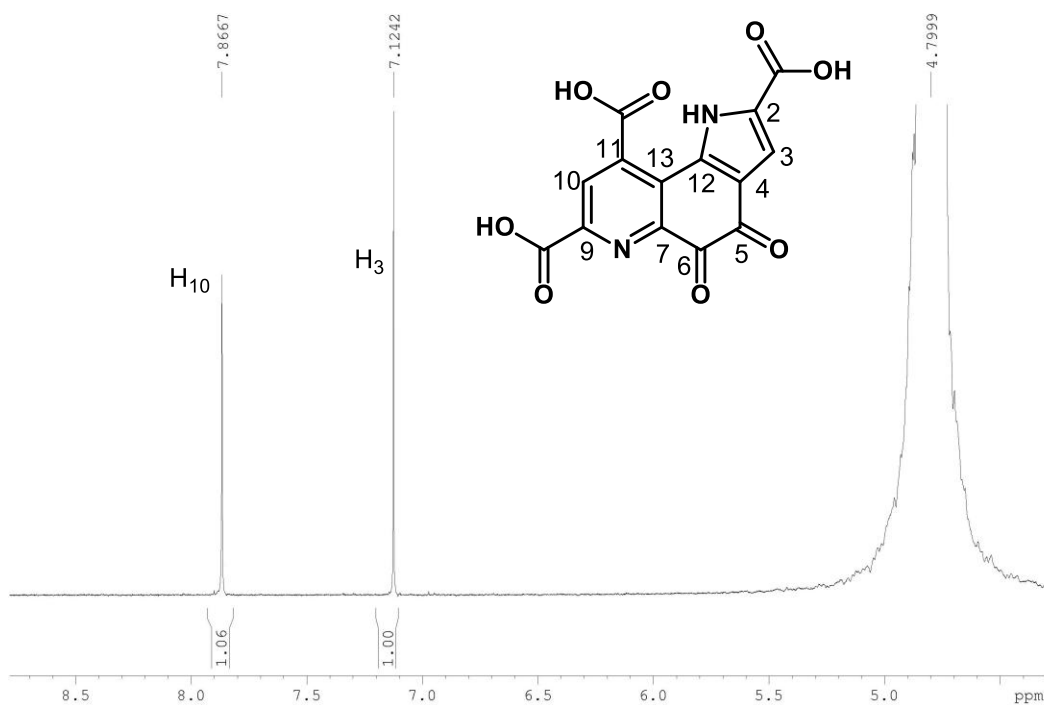


Figura 10. Espectro parcial de RMN ¹H do PQQ (500Mz, D₂O, pH Básico)

No espectro de RMN ¹³C obtido após a alcalinização do solvente deuterado (Figura 11), foi possível observar um perfil espectral compatível com a estrutura proposta do PQQ. Embora cinco sinais de carbono 13 não tenham sido detectados, em função do curto tempo de aquisição do experimento, o padrão de sinal observado, associado aos dados anteriores, confirma a identidade do composto. Ressalta-se que a análise será repetida com maior tempo de aquisição, a fim de melhorar a relação sinal-ruído e permitir a observação de todos os carbonos esperados na estrutura.

Dessa forma, a análise de RMN confirmou a estrutura química proposta para o PQQ, validando a identidade da substância e demonstrando a importância do ajuste do pH para a correta interpretação dos espectros.

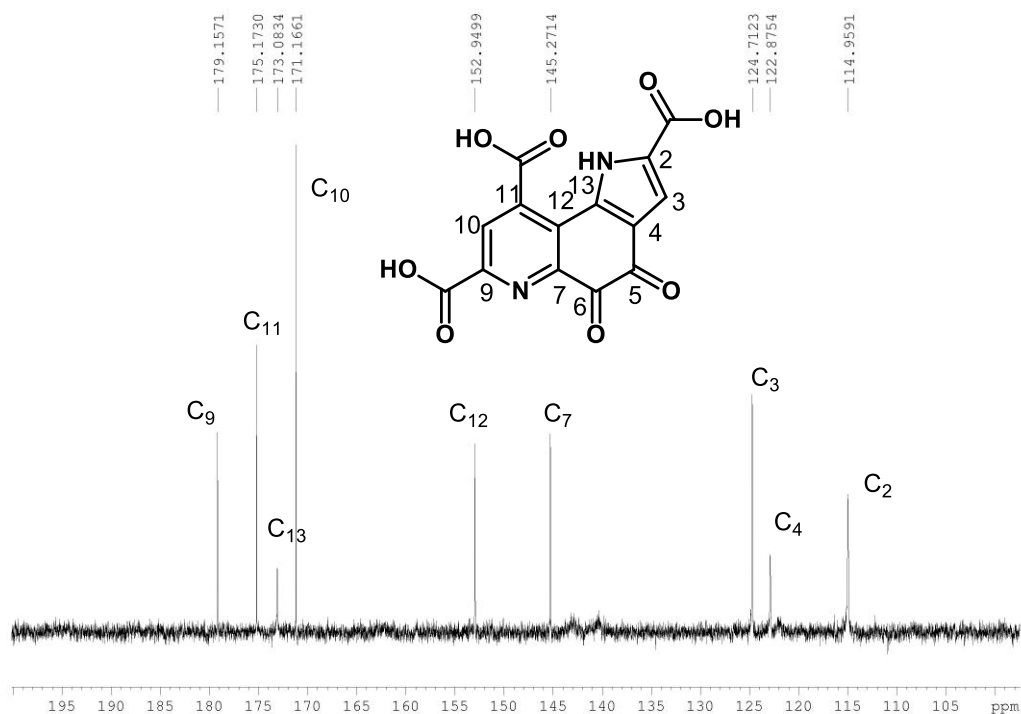


Figura 11. Espectro Parcial de RMN ¹³C do PQQ (125Mz, D₂O, pH básico)

5.2 VALIDAÇÃO DO METODO ANALITICO

5.2.1 Seleção do comprimento de onda

Considerando que a água purificada é um solvente de baixo custo, de fácil acesso e gera poucos resíduos químicos, este solvente proporcionou também uma excelente solubilização do PQQ (sal dissódico) e não dos excipientes não apresentando absorção na faixa de comprimento de onda analisado (200 - 400 nm), pois apresenta UV CutOff de 190 nm, e por isso foi selecionada como o solvente ideal para metodologia escolhida. A Figura 12 ilustra o perfil espectral da PQQ no modo varredura (200 a 400 nm), empregando água purificada como solvente.

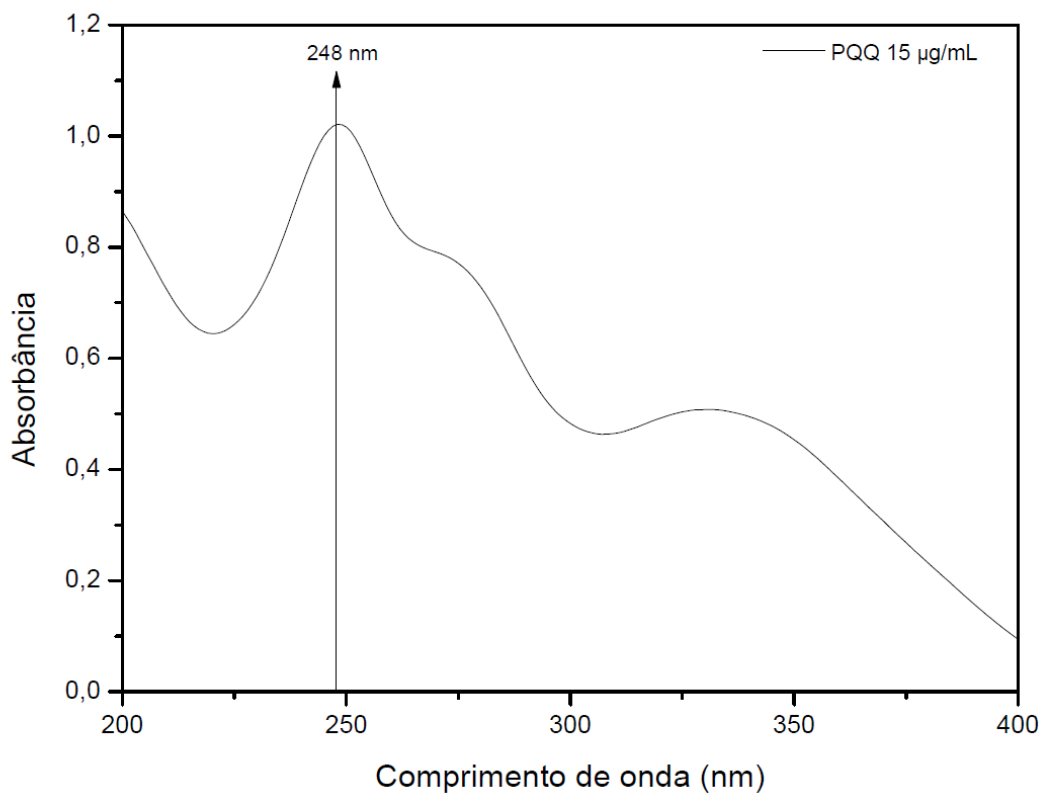


Figura 12. Espectro de absorção na ordem zero de pirroloquinolina quinona (PQQ), obtido em água purificada por osmose reversa na região do UV (200 a 400 nm), na concentração de 15,0 µg/mL. Perfil espectral plotado no programa OriginPro® 8.5.

5.3 Parâmetros Analíticos

5.3.1 Linearidade, Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

A média das curvas analíticas de PQQ, apresentada na Figura 13, foi obtida por meio da análise de regressão linear, plotando as absorbâncias obtidas no eixo y versus as diversas concentrações (5,0, 7,5, 10,0, 12,5, 15,0, 17,5, 20,0, 22,5, 25,0 µg/ mL) no eixo x.

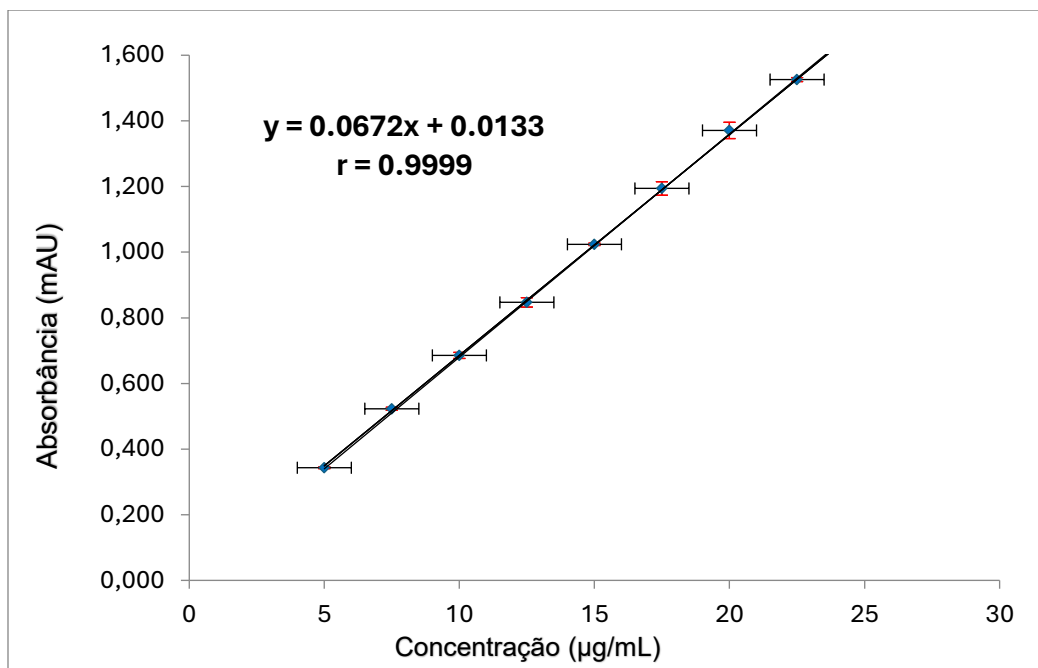


Figura 13. Curva analítica da pirroloquinolina quinona obtida no espectro de ordem zero em 248 nm. Fonte: próprio autor empregando programa Excel

Os resultados da análise de regressão linear estão apresentados na Tabela 5. A curva analítica apresentou coeficiente de correlação superior a 0,990 conforme exigido na RDC 166/2017 [36]. Isso demonstra que existe uma correlação linear significativa entre a resposta analítica (absorbância) e a concentração do analito, no intervalo de 5,0 a 25,0 µg/mL, permitindo uma quantificação precisa em diferentes níveis de concentração.

Tabela 5. Dados obtidos a partir da curva analítica de pirroloquinolina quinona nos parâmetros de linearidade, limites de detecção e quantificação.

Parâmetros	Resultados
λ (nm)	248
Faixa de linearidade (µg/mL)	5,0-25,0
Equação: $y = ax + b$	$y = 0,0672x + 0,0133$
Coefficiente de correlação (r)	0,9999
LD (µg/mL)	0,12

LQ ($\mu\text{g/mL}$)

0,36

Abreviaturas: (λ) Comprimento de onda; (LD) Limite de detecção; (LQ) Limite de quantificação.

Seguindo as recomendações do INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia Normalização e Qualidade Industrial), antes de realizar a regressão linear, foi verificada a ausência de outliers (valores aberrantes) para cada nível de concentração e a homocedasticidade dos dados [55].

Para a verificação da ausência de outliers, realizou-se o teste de *Grubbs*. Neste teste, foram analisados os valores, mínimos ($y_{\text{mínimo}}$) e máximos ($y_{\text{máximo}}$), para cada nível de concentração da curva analítica de PQQ, ao nível de significância de 5,0%. Conforme apresentado na Tabela 6, os valores de $G_{\text{calculado(máx.)}} < G_{\text{crítico}}$ e $G_{\text{calculado(mín.)}} < G_{\text{crítico}}$, em cada nível de concentração, demonstrando, assim, a ausência de outliers nos dados apresentados.

Tabela 6. Teste de *Grubbs* em cada nível de concentração para verificação de outliers no estudo da linearidade do método.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	$y_{\text{(máximo)}}$	$y_{\text{(mínimo)}}$	Média	Desvio Padrão	Teste de <i>Grubbs</i> ^a	
					$G_{\text{calculado(máx.)}}$	$G_{\text{calculado(mín.)}}$
5,0	0,345	0,340	0,343	0,00265	0,756	1,134
7,5	0,528	0,519	0,523	0,00458	1,091	0,873
10,0	0,696	0,678	0,686	0,00929	1,112	0,825
12,5	0,863	0,836	0,850	0,01350	0,987	1,012
15,0	1,028	1,021	1,024	0,00361	1,109	0,832
17,5	1,217	1,178	1,194	0,02042	1,126	0,784
20,0	1,399	1,353	1,371	0,02479	1,143	0,713
22,5	1,533	1,521	1,526	0,00643	1,141	0,726
25,0	1,692	1,679	1,685	0,00656	1,067	0,915

^a $G_{\text{crítico}} = 1,15$, para um tamanho de amostra (N) de 3 e com nível de significância de 5,0%.

A homoscedasticidade dos dados foi avaliada por meio do teste de Cochran, cujos resultados estão apresentados na Tabela 7. Conforme observado, o valor de $C_{\text{calculado}} < C_{\text{crítico}}$,

indicando que a variância dos resultados de y é constante para cada nível de concentração (dados homocedásticos), permitindo assim a aplicação do método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO).

Tabela 7. Resultados da análise estatística para linearidade do método espectrofotométrico proposto.

Testes Estatísticos	PQQ
Teste de Cochran	
$C_{\text{calculado}}$	0,027
$C_{\text{crítico}}^a$	0,478
Test F (ANOVA)	
$F_{\text{calculado}}$	31472,77
$F_{\text{crítico}}^b$	4,242
Teste de Shapiro-Wilk	
$W_{\text{calculado}}$	0,935
$W_{\text{crítico}}^c$	0,923

Abreviatura: (PQQ) Pirroloquinolina Quinona.

$^aC_{\text{crítico}} = 0,478$, para amostra com 9 pontos de calibração, 3 medições em cada ponto, com nível de significância de 5,0%.

$^bF_{\text{crítico}} = 4,242$ nos graus de liberdade (GL) especificados, $GL_1 = 1$ e $GL_2 = 25$, e com nível de significância de 5,0%.

$^cW_{\text{crítico}} = 0,923$, para um tamanho de amostra (N) de 27 e com nível de significância de 5,0%.

O próximo teste estatístico realizado foi o Teste F da Análise de Variância (ANOVA). Conforme os resultados mostrados na Tabela 7, o valor de $F_{\text{calculado}} > F_{\text{crítico}}$, confirmando a significância do coeficiente angular (coeficiente angular diferente de zero). Portanto, assume-se que y varia efetivamente em função de x, comprovando assim a linearidade do método.

A linearidade também foi verificada por meio da avaliação visual do gráfico de resíduos, gerados na análise de regressão linear. Na Figura 14, observa-se a distribuição

homogênea dos resíduos, próxima ao eixo zero, indicando que variância dos resíduos é constante nos diferentes níveis de concentração (homocedasticidade).

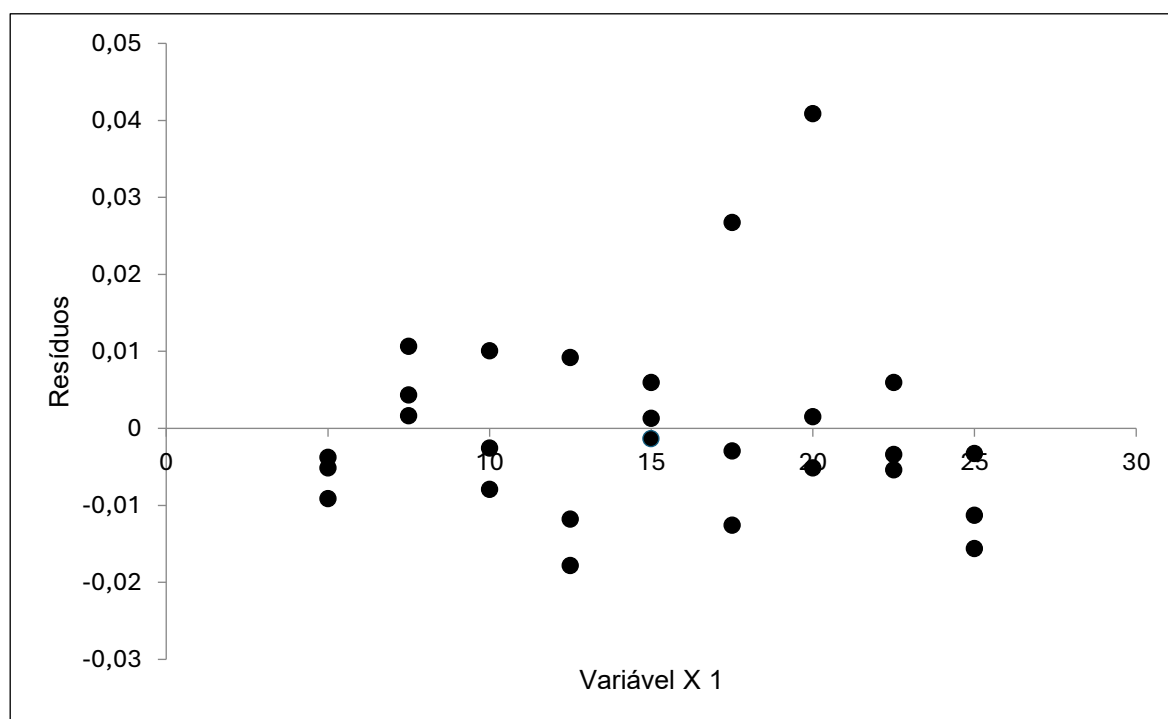


Figura 14. Distribuição dos resíduos em função da concentração da PQQ em 248 nm. Fonte: Autor empregando programa Excel

Por fim, foi realizado o Teste de *Shapiro-Wilk*, a fim de verificar a normalidade dos resíduos. Como mostrado na Tabela 6, valor de $W_{\text{calculado}} > W_{\text{crítico}}$, indicando que todos os resíduos gerados nas análises apresentaram uma distribuição normal.

Portanto, os resultados apresentados confirmaram que o método desenvolvido para determinação de PQQ foi linear dentro da faixa de concentração estudada (5,0– 25,0 $\mu\text{g/mL}$).

Os valores de LD e LQ estão apresentados na tabela 4. A partir da curva analítica, obteve-se os limites de detecção de 0,12 $\mu\text{g/mL}$ e de quantificação de 0,36 $\mu\text{g/mL}$, assegurando que o método proposto apresenta sensibilidade satisfatória, podendo detectar e quantificar a PQQ em formulações orais e injetáveis, em uma ampla faixa de concentração e com maior segurança.

5.3.2 Precisão

Os resultados obtidos nos ensaios de repetibilidade e precisão intermediária de PQQ estão apresentados na Tabela 8.

Conforme verificado, os resultados demonstraram que os valores de DPR ficaram abaixo do limite máximo recomendado de 1,9%, conforme AOAC [42]. Diante dos valores de DPR dentro dos limites recomendados, conclui-se que o método por espectrofotometria de ordem zero é preciso e confiável para a quantificação de PQQ.

Tabela 8. Resultados do ensaio de precisão de pirroloquinolina quinona utilizando o método espectrofotométrico proposto.

Amostra comercial	Concentração teórica (ug/mL)	Teor encontrado (%) \pm DPR (%)			Precisão intermediária ^b
		Repetibilidade ^a			
		Dia	Dia 2	Dia 3	
PQQ	15,0	98,63	99,21	98,43	98,33 \pm 0,002
		\pm	\pm	\pm	
		0,007	0,001	0,009	

Abreviaturas: (PQQ) Pirroloquinolina Quinona; (DPR) Desvio Padrão Relativo.

^aMédia de 6 determinações realizadas no mesmo dia.

^bMédia de 18 determinações realizadas por 3 analistas diferentes em três dias distintos.

5.3.3 Exatidão

A exatidão do método espectrofotométrico foi confirmada por meio de testes de recuperação, evidenciando a concordância entre os valores experimentais obtidos e os valores teóricos esperados. Conforme demonstrado na Tabela 9, o percentual de recuperação das soluções padrão de PQQ situou-se dentro dos limites aceitáveis de 98,0-102,0% e apresentou desvio padrão relativo (DPR) abaixo do limite máximo recomendado de 1,9% para os três níveis de concentração analisados [42].

Tabela 9. Valores experimentais obtidos no ensaio de exatidão através do método espectrofotométrico proposto.

Concentração teórica de PQQ adicionada (µg/mL)	Concentração de PQQ recuperada (µg/mL)	Recuperação (%) Resultado ± DPR (%)	Média ± DPR (%)
10,0	10,07	103,32 ± 0,0006	100,45 ± 0,0250
15,0	14,66	98,81 ± 0,0006	
25,0	24,56	99,21 ± 0,0010	

Abreviaturas: (PQQ) Pirroloquinolina Quinona; (DPR) Desvio Padrão Relativo.

5.3.4 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada comparando os espectros da solução placebo com o espectro das soluções padrão de PQQ da amostra comercial. Conforme apresentado na Figura 15, os excipientes (placebo) utilizados para o ensaio de seletividade não interferiram na determinação do PQQ, uma vez que exibem absorção em comprimentos de onda abaixo de 248 nm. Isso demonstra a seletividade do método desenvolvido para formulações farmacêuticas comerciais e magistrais de uso humano.

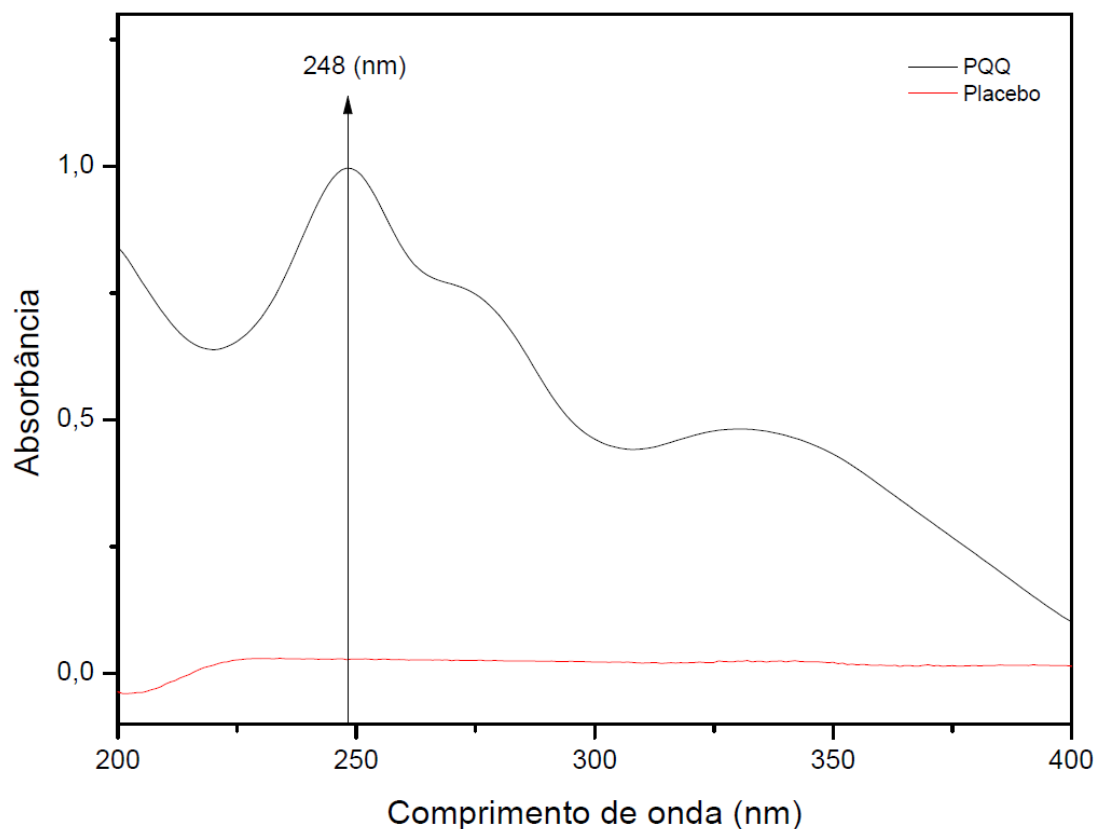


Figura 15. Espectro de absorção da solução placebo sobreposta ao espectro de absorção da solução da amostra comercial analisada utilizando o método proposto. Solvente empregado: água purificada por osmose reversa, modo “varredura” de 200 a 400 nm. Perfil espectral plotado no programa OriginPro[®]8.5

5.3.5 Robustez

O planejamento fatorial 2^3 utilizado neste estudo para investigar o impacto dos fatores e suas interações na determinação do teor de PQQ, juntamente com as respectivas respostas observadas, estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Planejamento fatorial 2^3 para avaliação da robustez.

Experimentos	Efeitos Fatoriais		Variável resposta	
	Comprimento de onda (nm)	Tempo de sonicação (min.)	Temperatura ambiente (°C)	Teor de PQQ (%)

1	246	12	28,9	98,54
2	250	12	28,9	99,21
3	246	18	28,9	98,93
4	250	18	28,9	98,93
5	246	12	32,9	99,9
6	250	12	32,9	100,59
7	246	18	32,9	99,02
8	250	18	32,9	100,68

Abreviatura: (PQQ) Pirroloquinolina Quinona.

A significância dos efeitos dos fatores e suas interações foi avaliada por meio da análise de variância (ANOVA) e com base no gráfico de Pareto (Figura 16).

Na ANOVA, a significância estatística de cada efeito dos fatores (X1, X2 e X3) e suas interações (X1X2, X1X3 e X2X3) foi verificada a partir dos valores de p e resultados do teste F (com 95,0% de confiança). Os resultados da ANOVA estão apresentados na Tabela 10 e é possível verificar que os fatores e as interações entre eles não apresentaram impacto significativo na variável resposta, teor de PQQ, pois os valores de p foram superiores a 0,05 ($p > 0,05$) e os valores de $F_{\text{calculado}}$ foram inferiores ao $F_{\text{crítico}}$ ($F_{\text{calculado}} < F_{\text{crítico}}$). Além disso, o coeficiente de determinação (R^2) encontrado foi de 0,9197, demonstrando que o modelo é capaz de explicar 91,97% do teor de PQQ (variável resposta) dentro do intervalo de variação dos fatores selecionados.

Tabela 11. Resultados ANOVA para teor de PQQ com nível de significância 5,0%.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Teor de PQQ	
				Teste F ^a	p-valor ^b
X1	1,0687	1	1,0687	2,7982	0,3430
X2	0,0741	1	0,0741	0,1940	0,7358
X3	2,7542	1	2,7542	7,2111	0,2269

X1X2	0,0051	1	0,0051	0,0134	0,9268
X1X3	0,3916	1	0,3916	1,0253	0,4960
X2X3	0,0776	1	0,0776	0,2032	0,7304
Erro	0,3819	1	0,3819		
Total	4,7533	7			

R^2 : 0,9197.

A partir do Gráfico de Pareto (Figura 16) é possível uma melhor compreensão visual do comportamento da variável resposta em relação aos fatores e suas interações. O gráfico de Pareto é um gráfico de barras horizontais que representam os efeitos de cada fator e suas interações. O gráfico inclui uma linha vertical tracejada que indica a significância estatística e que representa, neste estudo, ao limite de confiança de 95,0%. Sendo assim, os fatores/interações são significativos se as barras horizontais ultrapassam esta linha vertical ($p=0,05$). Conforme observado, o gráfico de Pareto mostrou que os fatores selecionados (comprimento de onda, tempo de sonicação e temperatura do ambiente) e suas interações não influenciaram significativamente no teor de PQQ. Conclui-se, portanto, que o método proposto é robusto dentro da faixa de variação dos fatores adotados neste estudo

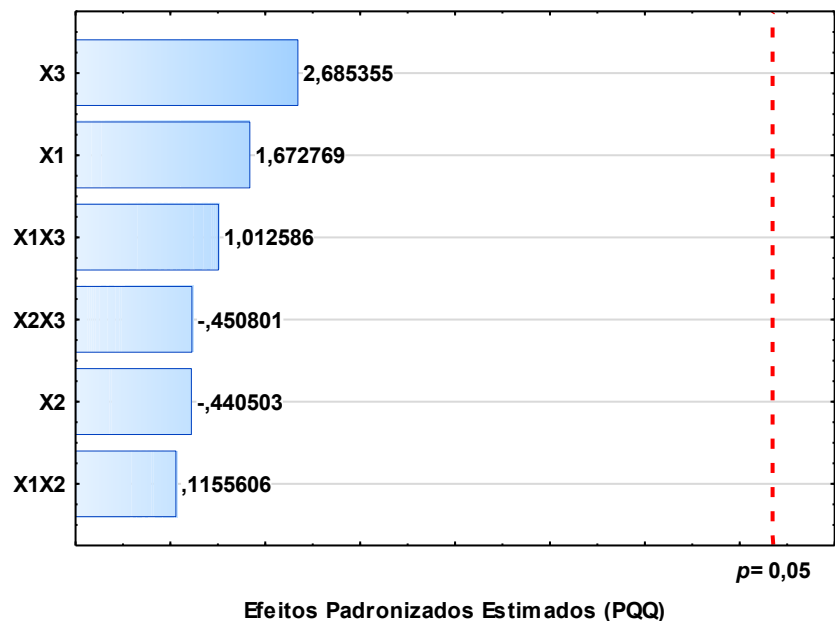


Figura 16. Diagrama de Pareto dos fatores individuais, (X1) comprimento de onda, (X2) tempo de sonicação e (X3) temperatura do ambiente e fatores combinados (X1X2, X2X3, X1X3). Fonte: Próprio autor empregando Software TIBCO Statistica® Ultimate Academic 14.0.

5.3.7 Aplicabilidade do método

A Tabela 12 apresenta os teores de pirroloquinolina quinona obtidos na análise de 5 amostras comerciais, empregando o método desenvolvido e validado neste estudo.

Tabela 12. Análise de 4 amostras comerciais de PQQ através do método espectrofotométrico proposto.

Amostra comercial PQQ	Descrição da amostra	Teor encontrado (%) ± DPR (%)	Concentração final µg/mL
Amostra 1	10 mg de PQQ, celulose microcristalina qsp.	98,44 ± 0,18	14,77
Amostra 2	10 mg de PQQ, estearato de magnésio 1% e celulose microcristalina qsp.	94,82 ± 0,53	14,22
Amostra 3	10 mg de PQQ, celulose microcristalina qsp.	83,30 ± 0,53	12,50

Amostra 4 (injetável)	5 mg de PQQ em 2 mL, água qsp.	98,20 ± 0,37	14,73
Amostra 5 (injetável)	5 mg de PQQ em 2 mL, água qsp.	102,03 ± 0,62	15,30

Diversos métodos para quantificação de PQQ foram descritos na literatura, em diferentes matrizes, cada um com suas vantagens e limitações. Métodos baseados em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), como os descritos por Fukuda et al. [29] e Noji et al. [30], são amplamente utilizados devido à sua alta sensibilidade e seletividade. No entanto, esses métodos geralmente requerem equipamentos caros, preparação de amostras complexa e tempos de análise mais longos, o que pode limitar sua aplicação em laboratórios com recursos limitados ou para análises em grande escala.

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), como empregada por Kumazawa et al. [31], oferece alta precisão e capacidade de detecção de traços, mas também apresenta desafios relacionados à volatilização da PQQ à necessidade de derivatização, o que pode aumentar a complexidade do processo analítico. Métodos enzimáticos, como o proposto por Kato et al. [32], são úteis para a quantificação indireta da PQQ, mas podem ser afetados por interferências enzimáticas e variações nas condições experimentais.

A eletroforese capilar de zona, descrita por Glatz et al. [33], é uma técnica eficiente para a separação de compostos com alta resolução, mas pode exigir otimização cuidadosa das condições de separação e não é tão amplamente disponível em laboratórios de rotina.

Em contraste, o método espectrofotométrico UV-Vis proposto neste estudo oferece várias vantagens significativas. Primeiramente, é uma técnica de baixo custo, que utiliza equipamentos comumente disponíveis na maioria dos laboratórios analíticos. Além disso, o método é rápido, com um tempo de análise reduzido em comparação com as técnicas cromatográficas, e requer uma preparação de amostra mais simples, o que o torna adequado para análises de rotina e em grande escala. A sensibilidade e seletividade do método foram validadas, demonstrando que ele é capaz de quantificar a PQQ de forma confiável, sem a necessidade de etapas adicionais de derivatização ou separação complexa. Outra vantagem do método espectrofotométrico UV-Vis é a sua versatilidade, permitindo a análise de uma

ampla gama de concentrações de PQQ com boa precisão e exatidão. Além disso, a simplicidade do método reduz o risco de erros operacionais, tornando-o uma alternativa atraente para laboratórios que buscam uma abordagem mais direta e econômica para a quantificação de PQQ.

6 CONCLUSÃO

- ✓ Com base nos resultados obtidos neste estudo, conclui-se que o método espectrofotométrico UV/Vis de ordem zero desenvolvido para a quantificação da pirroloquinolina quinona (PQQ), em formulações farmacêuticas, demonstrou ser linear, preciso, exato, seletivo e robusto;
- ✓ Os parâmetros de validação atendem às exigências regulatórias, permitindo sua aplicação em formulações farmacêuticas, tanto magistrais quanto industriais. Além disso, as técnicas analíticas complementares empregadas, como FTIR-ATR, RMN, TG/DTG, DSC e DRX, contribuíram para a caracterização físico-química da substância, fortalecendo o conhecimento sobre sua estrutura, estabilidade térmica e propriedades funcionais;
- ✓ Dessa forma, este trabalho oferece uma ferramenta analítica confiável para o controle de qualidade de suplementos alimentares contendo PQQ disponíveis principalmente no mercado nacional brasileiro.

REFERÊNCIAS

1. Brasil, RDC nº 243, de 26 de julho de 2018. Dispõe sobre os requisitos sanitários dos suplementos alimentares. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), Brasília.
2. Cespedes Feliciano EM Tinker L, Manson JE, Allison M, Rohan T, Zaslavsky O, et al. Change in dietary patterns and change in waist circumference and DXA trunk fat among postmenopausal women. *Obesity (Silver Spring)* [Internet]. 2016;24(10):2176–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/oby.21589>
3. Ding M, Ellervik C, Huang T, Jensen MK, Curhan GC, Pasquale LR, et al. Diet quality and genetic association with body mass index: results from 3 observational studies. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 2018;108(6):1291–300. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/ajcn/nqy203>
4. Molin TRD, Leal GC, Müller LS, Muratt DT, Marcon GZ, Carvalho LM de et al. Regulatory framework for dietary supplements and the public health challenge. *Rev Saude Publica* [Internet]. 2019;53:90. Available from: <http://dx.doi.org/10.11606/s1518-8787.2019053001263>
5. Taberner, P., Newton, P.N., 2023. Estimating the prevalence of poor-quality anti-TB medicines: A neglected risk for global TB control and resistance. *BMJ Glob Health*8. <https://doi.org/10.1136/bmjgh-2023-012039>.
6. Kubala, E., Strzepek, K., & Szopa, J. (2023). Dietary supplements: Benefits and risks for health. *Nutrients*, 15(15), 3320. <https://doi.org/10.3390/nu15153320>
7. Lordan R, Rando HM, COVID-19 Review Consortium, Greene CS. Dietary supplements and nutraceuticals under investigation for COVID-19 prevention and treatment. *ArXiv* . 2021;6(3). Available from: <http://dx.doi.org/10.1128/msystems.00122-21>
8. Gombart, A. F., Pierre, A., & Maggini, S. (2021). A review of micronutrients and the immune system—working in harmony to reduce the risk of infection. *Nutrients*, 13(1), 54. <https://doi.org/10.3390/nu13010054>
9. Pérez-Rodrigo, C., & Aranceta-Bartrina, J. (2020). Dietary supplements: Prevalence of use and attitudes among the European population. In *Nutritional and Health Aspects of Food in Western Europe* (pp. 137-155). Academic Press. https://doi.org/10.1007/978-3-030-47380-8_9
10. Grand View Research. (2022). *Dietary supplements market size, share & trends analysis report by ingredient (vitamins, minerals), by type, by application, by end-user, by distribution channel, by region, and segment forecasts, 2022-2030*. <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/dietary-supplements-market>
11. Chemicalize. (2024). *Chemicalize: Cheminformatics platform*. <https://chemicalize.com>
12. Jonscher KR, Chowanadisai W, Rucker RB. Pyrroloquinoline-quinone is more than an antioxidant: A vitamin-like accessory factor important in health and disease prevention.

Biomolecules [Internet]. 2021;11(10):1441. Available from:

<http://dx.doi.org/10.3390/biom11101441>

13. Salisbury, S. A., Forrest, H. S., Cruse, W. B. T., & Kennard, O. (1979). A novel coenzyme from bacterial primary alcohol dehydrogenases. *Nature*, 280(5725), 843-844. <https://doi.org/10.1038/280843a0>
14. Misra, H. S., Rajpurohit, Y. S., & Khairnar, N. P. (2012). Pyrroloquinoline-quinone and its versatile roles in biological processes. *PLoS ONE*, 7(11), e51224. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051224>
15. Chohanadisai, W., Bauerly, K. A., Tchapanian, E., Wong, A., Cortopassi, G. A., & Rucker, R. B. (2010). Pyrroloquinoline quinone stimulates mitochondrial biogenesis through cAMP response element-binding protein phosphorylation and increased PGC-1 α expression. *Journal of Biological Chemistry*, 285(1), 142-152. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.030130>
16. Karlyshev, A. V., & Wren, B. W. (1997). Detection and initial characterization of novel capsular polysaccharide among diverse *Campylobacter jejuni* strains using alcian blue dye. *Microbiology*, 143(10), 3149-3155. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-10-3149>
17. Mahan, M. J., Slauch, J. M., & Mekalanos, J. J. (1995). Selection of bacterial virulence genes that are specifically induced in host tissues. *Journal of Bacteriology*, 177(17), 5088-5098. <https://doi.org/10.1128/jb.177.17.5088-5098.1995>
18. Kroll, J. S., Wilks, K. E., Farrant, J. L., & Langford, P. R. (1998). Natural genetic exchange between *Haemophilus* and *Neisseria*: Intergeneric transfer of chromosomal genes between major human pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(21), 12381-12385. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.21.12381>
19. Mahan, M. J., Tobias, J. W., Slauch, J. M., Hanna, P. C., Collier, R. J., & Mekalanos, J. J. (1989). Antibiotic-based selection for bacterial genes that are specifically induced during infection of a host. *Journal of Bacteriology*, 171(1), 447-455. <https://doi.org/10.1128/jb.171.1.447-455.1989>
20. Ohsugi M, Noda H, Muro K, Ishiba A, Kondo Y, Nakao S. Effects of the yeast extract components pyrroloquinoline quinone and aspartic acid on vitamin B12 production in *Klebsiella pneumoniae* IFO 13541. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* [Internet]. 1989;35(6):661–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.3177/jnsv.35.661>
21. Ames BN. Prolonging healthy aging: Longevity vitamins and proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2018;115(43):10836–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1809045115>
22. Narendra K, Anand K, Sunanda P. Pyrroloquinoline quinone ameliorates l-thyroxine-induced hyperthyroidism and associated problems in rats: PYRROLOQUINOLINE QUINONE IN HYPERTHYROIDISM. *Cell Biochem Funct* [Internet]. 2014;32(6):538–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/cbf.3048>

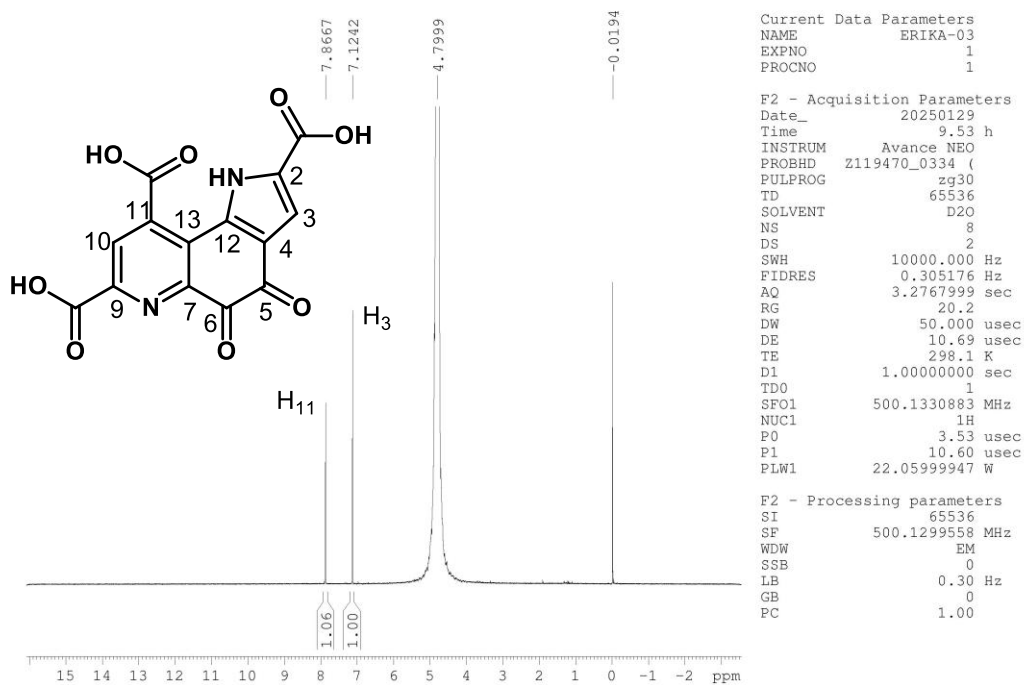
23. Zhang Q, Zhang J, Jiang C, Qin J, Ke K, Ding F. Involvement of ERK1/2 pathway in neuroprotective effects of pyrroloquinoline quinone against rotenone-induced SH-SY5Y cell injury. *Neuroscience* [Internet]. 2014; 270:183–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.04.022>
24. Zhang J, Meruvu S, Bedi YS, Chau J, Arguelles A, Rucker R, et al. Pyrroloquinoline quinone increases the expression and activity of Sirt1 and -3 genes in HepG2 cells. *Nutr Res* [Internet]. 2015;35(9):844–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nutres.2015.06.014>
25. Zhang C, Wen C, Lin J, Shen G. Protective effect of pyrroloquinoline quinone on ultraviolet A irradiation-induced human dermal fibroblast senescence in vitro proceeds via the anti-apoptotic sirtuin 1/nuclear factor-derived erythroid 2-related factor 2/heme oxygenase 1 pathway. *Mol Med Rep* [Internet]. 2015;12(3):4382–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.3892/mmr.2015.3990>
26. Zhu W, Martins AM, Klinman JP. Methods for expression, purification, and characterization of PqqE, a radical SAM enzyme in the PQQ biosynthetic pathway. *Methods Enzymol* [Internet]. 2018; 606:389–420. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.mie.2018.04.002> -
27. Wecksler SR, Stoll S, Tran H, Magnusson OT, Wu S-P, King D, et al. Pyrroloquinoline quinone biogenesis: demonstration that PqqE from *Klebsiella pneumoniae* is a radical S-adenosyl-L-methionine enzyme. *Biochemistry* [Internet]. 2009;48(42):10151–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/bi900918b>
28. Fukuda M, El-Maghrabey MH, Kishikawa N, Ikemoto K, Kuroda N. Ultrasensitive determination of pyrroloquinoline quinone in human plasma by HPLC with chemiluminescence detection using the redox cycle of quinone. *J Pharm Biomed Anal* [Internet]. 2017;145:814–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2017.08.008>
29. Fukuda M, Kishikawa N, Samemoto T, Ohta K, Ohyama K, El-Maghrabey MH, et al. Determination method for pyrroloquinoline quinone in food products by HPLC-UV detection using a redox-based colorimetric reaction. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* [Internet]. 2022;70(1):32–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1248/cpb.c21-00638>
30. Noji N, Nakamura T, Kitahata N, Taguchi K, Kudo T, Yoshida S, et al. Simple and sensitive method for pyrroloquinoline quinone (PQQ) analysis in various foods using liquid chromatography/electrospray-ionization tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2007;55(18):7258–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/jf070483r>
31. Kumazawa T, Sato K, Seno H, Ishii A, Suzuki O. Levels of pyrroloquinoline quinone in various foods. *Biochem J* [Internet]. 1995;307 (Pt 2):331–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1042/bj3070331>

32. Kato C, Kawai E, Shimizu N, Mikekado T, Kimura F, Miyazawa T, et al. Determination of pyrroloquinoline quinone by enzymatic and LC-MS/MS methods to clarify its levels in foods. PLoS One [Internet]. 2018;13(12):e0209700. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0209700>
33. Glatz Z, Moravcová M, Janiczek O. Determination of pyrroloquinoline quinone by capillary zone electrophoresis. J Chromatogr B Biomed Sci Appl [Internet]. 2000;739(1):101–7. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s0378-4347\(99\)00519-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0378-4347(99)00519-8)
34. Ribani, Marcelo & Bottoli, Carla Beatriz Grespan & Collins, Carol & Fontes, Jardim & Costa, Melo. (2004). Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. Química Nova. 27. 10.1590/S0100-40422004000500017.
35. Fares, M. Y., Abdel Aziz, S. E., Khalil, I. A., El Demerdash, A. O., & Habib, N. M. Development and validation of a stability-indicating HPLC method for simultaneous determination of amprolium, sulfaquinoxaline, diaveridine, and their related substances in powder soluble. *Scientific Reports*, (2024) 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-84849-4>
36. Brasil, RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília.
37. Santos AB, Silva CD, Oliveira EF. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. Quim Nova. 2023;46(3):123-130. doi:10.1590/S0100-40422004000500017
38. Aragão NM de, Veloso MC da C, Andrade JB de. Validação de métodos cromatográficos de análise: um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da “Química Verde” na determinação de metilxantinas em bebidas. Quim Nova [Internet]. 2009;32(9):2476–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422009000900043>
39. Brasil, RDC no 658, de 30 de março de 2022. Dispõe sobre as Diretrizes Gerais de Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília.
40. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO): Orientação sobre validação de métodos analíticos: INMETRO. Distrito Federal (BSB), 2020
41. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration Pharmaceuticals for Human Use (ICH), 2005. validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). ICH Harmonised Tripartite Guideline 1–17
42. AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements, 20th ed. Official Methods of Analysis, Washington, DC;2017

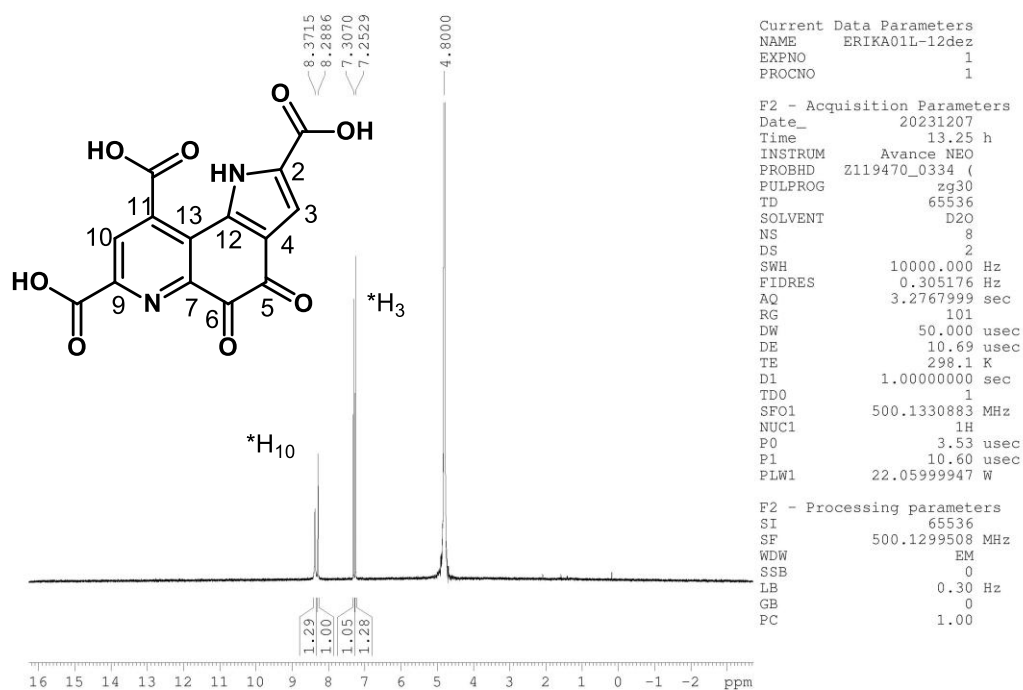
43. Elumalai S, Dantinapalli VLS, Palanisamy M. Comparative analysis of analytical method validation requirements across ICH, USP, ChP and ANVISA: A review. *J Pharm Res Int* [Internet]. 2024;36(12):54–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.9734/jpri/2024/v36i127628>
44. Marson B, Concentino V, Junkert A, Fachi M, Vilhena R, Pontarolo R. Validation of analytical methods in a pharmaceutical quality system: An overview focused on hplc methods. *Quim Nova* [Internet]. 2020; Available from: <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170589>
45. Sajid M, Płotka-Wasyłka J. Green analytical chemistry metrics: A review. *Talanta* [Internet]. 2022;238(Pt 2):123046. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2021.123046>
46. Shi M, Zheng X, Zhang N, Guo Y, Liu M, Yin L. Overview of sixteen green analytical chemistry metrics for evaluation of the greenness of analytical methods. *Trends Analyt Chem* [Internet]. 2023;166(117211):117211. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2023.117211>
47. P. dos Santos L, E. A. de Magalhães B, N. L. dos Santos W, B. Oliveira L, de G. Pereira M, de A. Santana D. Métricas Da Química Analítica Verde Na Avaliação De Método Ecológico Para Determinação De Defensivos Agrícolas Por CLAE-DAD. *Quim Nova* [Internet]. 2024;
48. Pena-Pereira, F., Wojnowski, W., & Tobiszewski, M. (2020). AGREE - Analytical GREENness Metric Approach and Software. *Analytical Chemistry*, 92, 10076-10082. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c01887>
49. Keith, L. H., Gron, L. U., & Young, J. L. (2007). Green Analytical Methodologies. *Chemical Reviews*, 107, 2695-2708. <https://doi.org/10.1021/cr068359e>
50. Lumpe H, Menke A, Haisch C, Mayer P, Kabelitz A, Yussenko KV, et al. The earlier the better: Structural analysis and separation of lanthanides with pyrroloquinoline quinone. *Chemistry* [Internet]. 2020;26(44):10133–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/chem.202002653>
51. Zhu W, Martins AM, Klinman JP. Methods for expression, purification, and characterization of PqqE, a radical SAM enzyme in the PQQ biosynthetic pathway. *Methods Enzymol* [Internet]. 2018; 606:389–420. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.mie.2018.04.002>
52. Ikemoto K, Sakamoto H, Nakano M. Crystal structure and characterization of pyrroloquinoline quinone disodium trihydrate. *Chem Cent J* [Internet]. 2012;6(1):57. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/1752-153X-6-57>
53. Lumpe H, Menke A, Haisch C, Mayer P, Kabelitz A, Yussenko KV, et al. The earlier the better: Structural analysis and separation of lanthanides with pyrroloquinoline quinone. *Chemistry* [Internet]. 2020;26(44):10133–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/chem.202002653>
54. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO). Orientação sobre validação de métodos analíticos [Internet]. Brasília (DF): INMETRO; 2020 [cited 2025 Mar 7]. Disponível em: <https://www.gov.br/inmetro/pt-br>.

55. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Guia nº 10/2017 – Guia para tratamento estatístico da validação analítica. Brasília (DF): Anvisa; 2017.
56. Cyran JD, Nite JM, Krummel AT. Characterizing anharmonic vibrational modes of Quinones with two-dimensional infrared spectroscopy. *J Phys Chem B* [Internet]. 2015;119(29):8917–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/jp506900n>
57. Pasieczna-Patkowska S, Cichy M, Flieger J. Application of Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy in characterization of green synthesized nanoparticles. *Molecules* [Internet]. 2025;30(3). Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules30030684>
58. Hellwig P. Infrared spectroscopic markers of quinones in proteins from the respiratory chain. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2015;1847(1):126–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2014.07.004>
59. Leyva-Porras C, Cruz-Alcantar P, Espinosa-Solís V, Martínez-Guerra E, Balderrama CIP-, Martínez IC, et al. Application of differential scanning calorimetry (DSC) and modulated differential scanning calorimetry (MDSC) in food and drug industries. *Polymers (Basel)* [Internet]. 2019;12(1):5. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/polym12010005>
60. Sousa ET, da Silva MM, de Andrade SJ, Cardoso MP, Silva LA, de Andrade JB. Evaluation of thermal stability of quinones by thermal analysis techniques. *Thermochim Acta* [Internet]. 2012; 529:1–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tca.2011.11.012>
61. Hore, P. J. (1995). *Nuclear Magnetic Resonance*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/oso/9780198504816.001.0001>

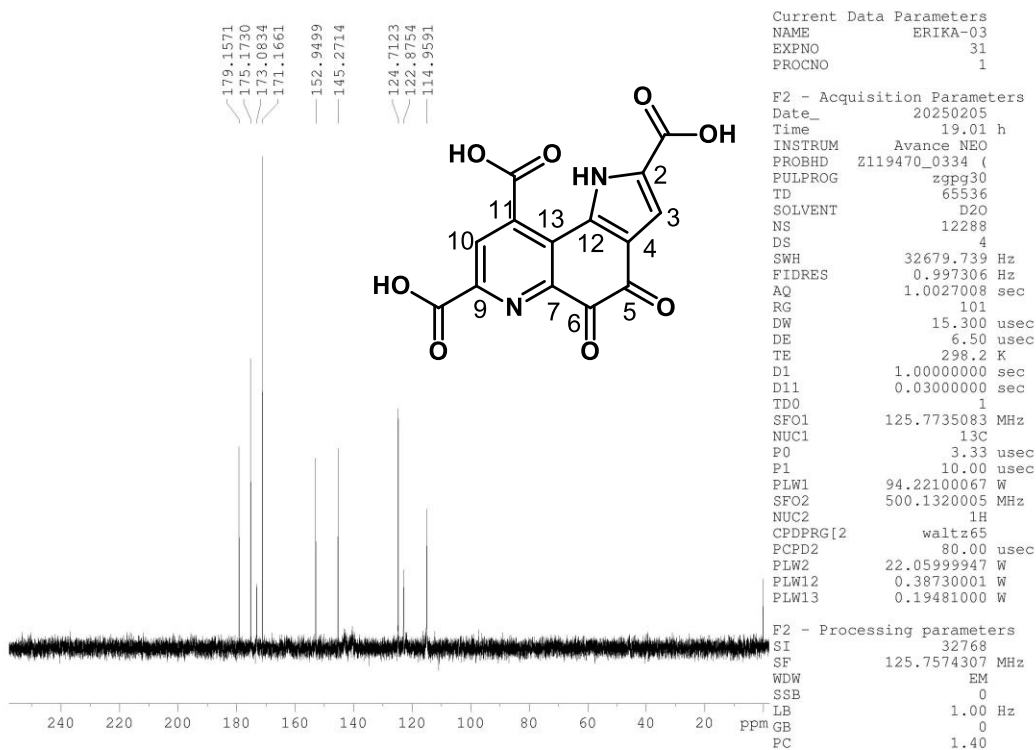
ANEXO 1 – Espectros parciais de RMN



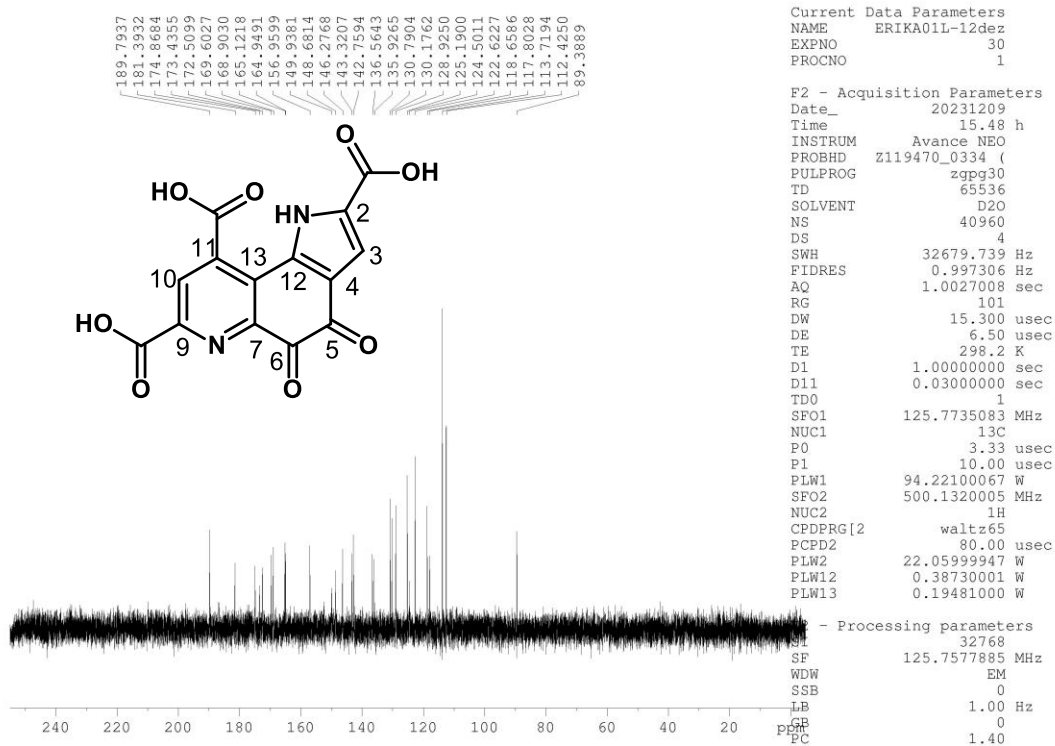
Espectro de RMN ^1H - 4,5-dioxo-4,5-dihydro-1H-pyrrolo[2,3-f]quinoline-2,7,9-tricarboxylic acid (500MHz, D_2O – Basificado com NaOH)



Espectro de RMN ^1H - 4,5-dioxo-4,5-dihidro-1H-pirrólo[2,3-f]quinolína-2,7,9-tricarboxílico (500MHz, D_2O – Neutro)



Espectro de RMN ^{13}C - 4,5-dioxo-4,5-dihydro-1H-pyrrolo[2,3-f]quinoline-2,7,9-tricarboxylic acid (125MHz, D_2O – Basificado com NaOH)



Espectro de RMN ^{13}C - 4,5-dioxo-4,5-dihydro-1H-pyrrolo[2,3-f]quinoline-2,7,9-tricarboxylic acid (125MHz, D_2O – Neutro)