



Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação de pirroloquinolina quinona em formulações orais e injetáveis de uso humano

Development and validation of an analytical method for the determination of pyrroloquinoline quinone in magistral and commercial formulations for human use

E. P. Machado*; N. M. Kassab; L.F. Santos; L. M. R Andrade; T. F. M Cardoso

Laboratório de Tecnologia Farmacêutica do Departamento/Laboratório/Setor, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 79070-900, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil

*erika.pontes@ufms.br

(Recebido em 14 de janeiro de 2025; aceito em 28 de julho de 2025)

Um método espectrofotométrico UV/Vis foi desenvolvido e validado para a determinação de pirroloquinolina quinona sal dissódico (PQQ-2Na) em cápsulas e injetáveis de uso humano. A PQQ-2Na foi quantificada por espectrofotometria direta (no espectro de ordem zero), no seu λ máximo de absorção a 248 nm, utilizando água purificada como solvente. A avaliação dos parâmetros analíticos seguiu as diretrizes estabelecidas na Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 166 de 24 de julho de 2017 da ANVISA, Instituto Nacional de Metrologia Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO), bem como os guias internacionais, Q2(R1) do International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) e Official Methods of Analysis da AOAC INTERNATIONAL. O método demonstrou linearidade na faixa de concentração de 5,0–25,0 µg/mL, com um coeficiente de correlação (r) superior a 0,990. Os limites de quantificação e detecção foram determinados em 0,36 µg/mL e 0,12 µg/mL, respectivamente, evidenciando a sensibilidade do método. A precisão foi estabelecida com um desvio-padrão relativo (DPR) inferior a 1,9%, com recuperação de $100,45 \pm 0,0250$, dentro dos limites aceitáveis. O método proposto foi seletivo, uma vez que os excipientes não interferiram na determinação de PQQ-2Na. O método também demonstrou robustez, não apresentando interferências significativas dentro da faixa de variação dos fatores estudados sob o teor de PQQ-2Na. Em suma, o método desenvolvido e validado mostrou-se confiável, simples, econômico e de rápida aplicação, facilitando sua utilização em análises de rotina em laboratórios de controle de qualidade.

Palavras-chave: PQQ, controle de qualidade, espectrofotometria UV/Vis.

A UV/Vis spectrophotometric method was developed and validated for the determination of pyrroloquinoline quinone disodium salt (PQQ-2Na) in capsules and injectables for human use. PQQ-2Na was quantified by direct spectrophotometry (in the zero-order spectrum) at its absorption λ maximum of 248 nm, using purified water as the solvent. The evaluation of the analytical parameters followed the guidelines established in the Collegiate Board Resolution (RDC) No. 166 of July 24, 2017, by ANVISA, National Institute of Metrology, Standardization and Industrial Quality (INMETRO) as well as the international guidelines, Q2(R1) of the International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) and Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. The method demonstrated linearity in the concentration range of 5.0–25.0 µg/mL, with a correlation coefficient (r) greater than 0.990. The limits of quantification and detection were determined to be 0.36 µg/mL and 0.12 µg/mL, respectively, demonstrating the sensitivity of the method. Precision was established with a relative standard deviation (RSD) below 1.9%, with a recovery of 100.45 ± 0.0250 , within acceptable limits. The proposed method was selective, as the excipients did not interfere with the determination of PQQ-2Na. The method also demonstrated robustness, showing no significant interference within the variation range of the studied factors in the PQQ-2Na content. In summary, the developed and validated method proved to be reliable, simple, economical, and quick to apply, facilitating its use in routine analyses in quality control laboratories.

Keywords: PQQ, quality control, UV/Vis spectrophotometry.

1. INTRODUÇÃO

Suplementos alimentares são produtos que contêm nutrientes, substâncias bioativas, enzimas e probióticos, isolados ou combinados, disponível em diversas formas farmacêuticas e destinados a indivíduos saudáveis com o propósito de complementar a alimentação [1].

Nos últimos 20 anos, observou-se um crescimento expressivo no uso de suplementos alimentares, oferecendo aos consumidores uma ampla variedade de produtos, marcas e formulações, disponíveis em diversos canais de venda e marketing [2]. Esse crescimento é impulsionado pela busca por mais saúde, pela prevenção de deficiências nutricionais e pela melhoria do bem-estar. Um dos fatores que são importantes para essa tendência é a dificuldade de muitas pessoas em obter todos os nutrientes necessários apenas por meio da alimentação, especialmente devido ao aumento do consumo de dietas ricas em gorduras, alimentos ultraprocessados e bebidas com adição de açúcares [3]. Os principais motivos para o uso de suplementos incluem o fortalecimento da saúde imunológica (36%) e a manutenção do bem-estar geral (44%) [4].

O aumento na demanda por suplementos alimentares é impulsionado, em grande parte, pelas redes sociais, que facilitam a acessibilidade à compra. Contudo, essa popularidade também apresenta desafios significativos para a fiscalização, tornando-se um obstáculo na precaução da adulteração desses produtos. Este cenário não apenas aumenta os riscos à saúde dos consumidores, mas também resulta em prejuízos financeiros. Assim, é crucial implementar novos métodos analíticos, que sejam robustos e eficazes, além de intensificar a fiscalização por parte das autoridades para assegurar a qualidade desses suplementos no mercado nacional [5, 6].

A Pirroloquinolina quinona (PQQ; ácido 4,5-dihidro-4,5-dioxo-1H-pirrolo[2,3-f]quinolina-2,7,9-tricarboxílico) e seu sal dissódico e seu sal dissódico (PQQ-2Na) (Figuras 1a e 1b) é uma quinona com solubilidade em água. Produzida por diversas espécies bacterianas e por plantas [7], possui potente ação antioxidante, anti-inflamatória e induz a biogênese mitocondrial [8]. Possui propriedades neuroprotetoras [9], além de contribuir na diminuição da peroxidação lipídica [10] e atuar como cofator para algumas enzimas bacterianas. Em mamíferos, a principal via de obtenção da PQQ é através da dieta [11].

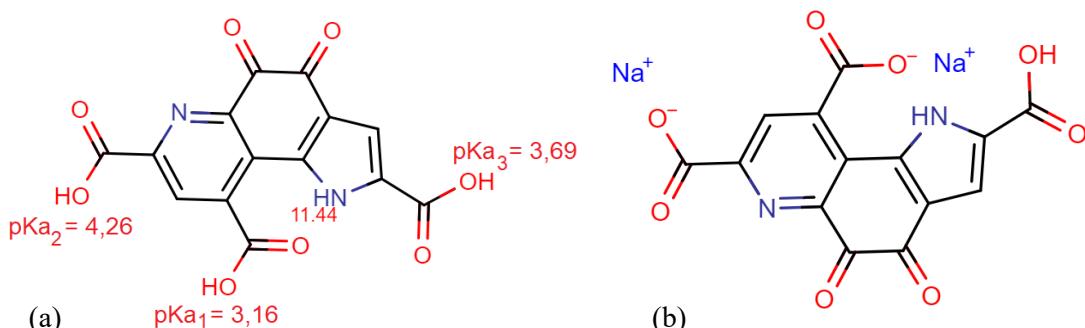


Figura 1: Estruturas químicas do pirroloquinolina quinona (PQQ) - na forma oxidata: (a) PQQ na sua forma ácida: Mostra as três carboxilas (-COOH) e seus respectivos valores de pKa (3,16, 3,69 e 4,26). Nesta forma, as carboxilas estão protonadas. (b) PQQ na sua forma dissódica (PQQ-2Na): Duas das três carboxilas estão ionizadas, formando o sal dissódico (com íons Na⁺ associados). Nesta forma, as carboxilas estão desprotonadas. Fonte: Chemicalize (<https://chemicalize.com/app/calculation>).

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 alta eficiência (CLAE) para determinar a PQQ no plasma humano e em produtos alimentícios [12-14], a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas para análise em produtos alimentícios [15], os métodos enzimáticos baseados na quantificação da atividade enzimática da *Escherichia coli* GDH em matérias-primas e alimentos [16] e a eletroforese capilar de zona [17]. Até o momento, não há métodos validados na literatura para determinação de PQQ em suplementos alimentares utilizando espectrofotometria UV/Vis de ordem zero. Diante dessa

lacuna, o desenvolvimento e validação desse método representam uma abordagem inovadora, destacando-se por sua simplicidade, rapidez, viabilidade econômica e sustentabilidade, já que dispensa o uso de grandes quantidades de solventes orgânicos ou equipamentos de alto custo. Além disso, a técnica facilita a fiscalização e o controle de qualidade, contribuindo para a segurança do consumidor e a integridade do mercado. Assim, este estudo preenche uma lacuna metodológica e oferece uma ferramenta prática e acessível para análise de PQQ-2Na, promovendo avanços no campo de suplementos alimentares.

Sendo assim, o objetivo deste estudo consistiu em desenvolver e validar um método analítico inovador, simples, rápido, seletivo, economicamente viável e sustentável (ecológico) para a determinação de PQQ-2Na em formulações farmacêuticas industriais e magistrais, comercializadas como suplementos alimentares, destinadas ao uso humano, empregando a espectrofotometria UV/Vis. O método proposto foi concebido para ser simples, sensível e rápido, com o intuito de oferecer uma abordagem qualitativa e quantitativa para a análise desse composto.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Reagentes

Para o desenvolvimento e validação do método analítico utilizou-se uma matéria-prima, PQQ-2Na, com elevado teor de pureza (98,9%). Após passar por processos de caracterização, conforme preconizado pelas farmacopeias brasileira e europeia [18, 19], a substância foi qualificada como substância química de referência caracterizada (SQC), uma vez que não existe comercialização disponível da substância química de referência. Os testes realizados incluíram espectroscopia UV-Vis, infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear (RMN), difração de raio-X, termogravimetria (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC), os quais confirmaram a identidade, pureza e estabilidade da PQQ-2Na. Amostras comerciais na forma de cápsulas e injetáveis foram adquiridas no comércio nacional. 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®.

2.2 Equipamentos

O método foi desenvolvido empregando o espectrofotômetro UV-Vis ThermoScientific® 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).

2.3 Validação do método espectrofotométrico para a determinação de pirroloquinolina quinona

O método espectrofotométrico foi validado de acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 166 de 24 de julho de 2017 da Anvisa [20], INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia Normalização e Qualidade Industrial) [21], bem como os guias internacionais, Q2(R1) do International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use – ICH [22] e Official Methods of Analysis (*Appendix F*) da AOAC INTERNATIONAL [23]. 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).

2.3.1 Preparação da solução-estoque do padrão e amostra comercial

A solução-estoque da SQC da pirroloquinolina quinona sal dissódico (PQQ-2Na) foi preparada pesando analiticamente 10,0 mg, os quais foram transferidos para balões volumétricos de 200,0 mL. Os volumes foram completados com água purificada para atingir uma concentração final de 50,0 µg/mL. Uma solução-estoque contendo 10,0 µg/mL de PQQ-2Na 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, a fim de determinar os comprimentos de onda apropriados para a análise da substância em questão.

Para preparar a solução-estoque da amostra comercial em cápsulas, determinou-se o peso médio de 20 cápsulas de PQQ-2Na, contendo 10 mg do princípio ativo cada, completadas com excipiente (celulose microcristalina). O conteúdo das cápsulas foi homogeneizado com um gral e pistilo. Em seguida, uma quantidade de pó equivalente a 10,0 mg de PQQ-2Na foi transferida para um balão volumétrico de 200,0 mL, e o volume foi completado com água purificada, resultando em uma solução com concentração de 50,0 µg/mL de PQQ-2Na. Esta solução foi submetida a uma agitação ultrassônica por 15 minutos para garantir a completa solubilização do princípio ativo.

Para as amostras comerciais injetáveis, que consistiam em uma solução aquosa contendo 5 mg de PQQ-2Na em 2 mL, uma alíquota dessa 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-2Na. 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.

2.3.2 Parâmetros analíticos

2.3.2.1 Linearidade

A linearidade, definida como a capacidade do método de produzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito presente na amostra [20], foi avaliada construindo-se três curvas analíticas para a SQC da PQQ-2Na, em nove níveis de concentrações diferentes, variando de 5,0 a 25,0 µg/mL e seguindo a Lei de Lambert-Beer. Cada determinação foi realizada 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 [24], através da determinação do coeficiente de correlação (*r*), análise de outliers (teste de Grubbs) [24], 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).

2.3.2.2 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).

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

a

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

a

2.3.2.3 Precisão

Os estudos de precisão foram conduzidos para determinar a confiabilidade do método analítico projetado, avaliando-se a repetibilidade (precisão intradia) e precisão intermediária (precisão interdia). A precisão foi demonstrada através 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 2.3.1.

2.3.2.4 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-2Na (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 pirroloquinolina quinona, preparada conforme descrito no item 2.3.1. As respostas analíticas obtidas de cada experimento foram expressas em porcentagem de teor.

Tabela 1: Fatores e níveis de variação utilizados na robustez, de acordo com o método fatorial em dois níveis 2³.

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

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 2³, utilizada na avaliação de robustez, foi construída considerando todas as combinações possíveis entre os níveis e os fatores, conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2: Combinação do planejamento fatorial 2³ aplicadas na robustez.

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

2.3.2.5 Exatidão

A exatidão, expressa em porcentagem, foi avaliada por meio da adição e recuperação de quantidades crescentes e conhecidas de solução padrão de PQQ-2Na (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 fortificadas 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 [23], empregando a Equação (3)

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

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).

2.3.2.6 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, isto é, em 248 nm, a fim 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 nas formulações de PQQ-2Na 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

2.4 Aplicabilidade do método desenvolvido e validado

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 2.3.1. Os teores de PQQ-2Na das 4 soluções foram determinados a partir da equação da reta da regressão linear da curva de calibração.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Seleção do solvente e comprimento de onda

Considerando que a água purificada é um solvente de baixo custo, de fácil acesso e gera poucos resíduos químicos, a água proporcionou também uma excelente solubilização da PQQ-2Na e não dos excipientes e, principalmente, não apresenta absorção na faixa de comprimento de onda analisada (200 - 400 nm), pois apresenta UV CutOff de 190 nm, e por isso foi selecionada como

o solvente ideal para metodologia escolhida. A Figura 2 ilustra o perfil espectral da PQQ-2Na no modo varredura (200 a 400 nm), empregando água purificada como solvente.

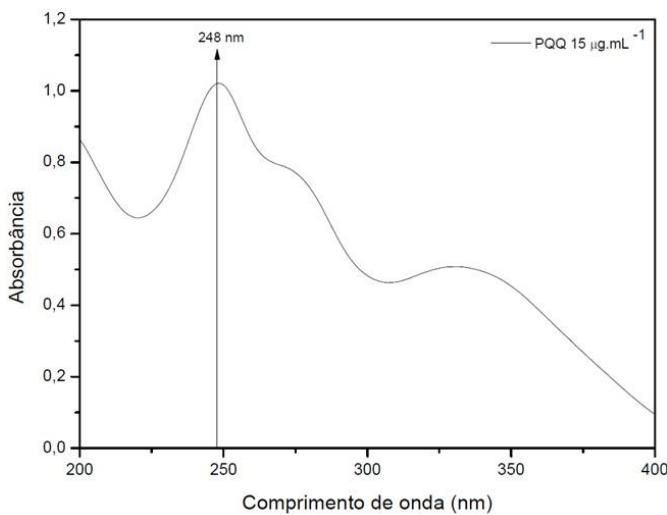


Figura 2: Espectro de absorção na ordem zero de PQQ-2Na. Fonte: OriginPro®8.5.

A partir do espectro de ordem zero de PQQ-2Na (Figura 2), foi escolhido o comprimento de onda de 248 nm, pois esta região apresentou máxima absorção de PQQ-2Na no UV, além de não apresentar interferência dos outros componentes da matriz, conforme demonstrado adiante, no parâmetro da seletividade do método (seção 3.2.4). Portanto, em 248 nm, foi possível a determinação de PQQ-2Na.

3.2 Validação do Método Analítico

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

A média das curvas analíticas de PQQ-2Na, apresentada na Figura 3, 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*.

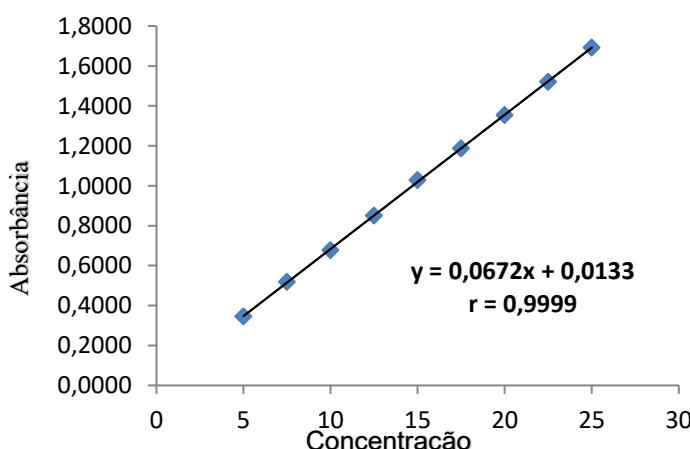


Figura 3: Curva analítica da pirroloquinolina quinona obtida no espectro de ordem zero em 248 nm.

Os resultados da análise de regressão linear estão apresentados na Tabela 4. A curva analítica apresentou coeficiente de correlação superior a 0,990, conforme exigido na RDC 166/2017 [20]. 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 4: 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: $y = ax + b$	$y = 0,0672x + 0,0133$
Coeficiente de correlação (r)	0,9999
LD (µg/mL)	0,12
LQ (µg/mL)	0,36

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

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

Tabela 5: Teste de Grubbs em cada nível de concentração para verificação de outliers no estudo da linearidade do método.

Concentração (µg/mL)	Y(máximo)	Y(mínimo)	Média	Desvio Padrão	Teste de Grubbs ^a	
					$G_{calculado(máx.)}$	$G_{calculado(min.)}$
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 $G_{crítico} = 1,15$, 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 6. Conforme observado, o valor de $C_{calculado} < C_{crítico}$, 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 6: Resultados da análise estatística para linearidade do método espectrofotométrico proposto.

Testes Estatísticos	PQQ-2Na
Teste de Cochran	
$C_{\text{calculado}}$	0,027
$C_{\text{crítico}}^{\text{a}}$	0,478
Test F (ANOVA)	
$F_{\text{calculado}}$	31472,77
$F_{\text{crítico}}^{\text{b}}$	4,242
Teste de Shapiro-Wilk	
$W_{\text{calculado}}$	0,935
$W_{\text{crítico}}^{\text{c}}$	0,923

Abreviatura: (PQQ-2Na) Pirroloquinolina Quinona Sal Dissódico.

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

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

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

Conforme os resultados mostrados na Tabela 6, 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 4, observa-se a distribuição homogênea dos resíduos, próxima ao eixo zero, indicando que variância dos resíduos é constante nos diferentes níveis de concentração (homocedasticidade).

Como mostrado na Tabela 6, o valor de $W_{\text{calculado}} > W_{\text{crítico}}$ indica que todos os resíduos gerados nas análises apresentaram uma distribuição normal. Portanto, os resultados apresentados confirmaram que o método desenvolvido para determinação de PQQ-2Na foi linear dentro da faixa de concentração estudada (5,0–25,0 µg/mL).

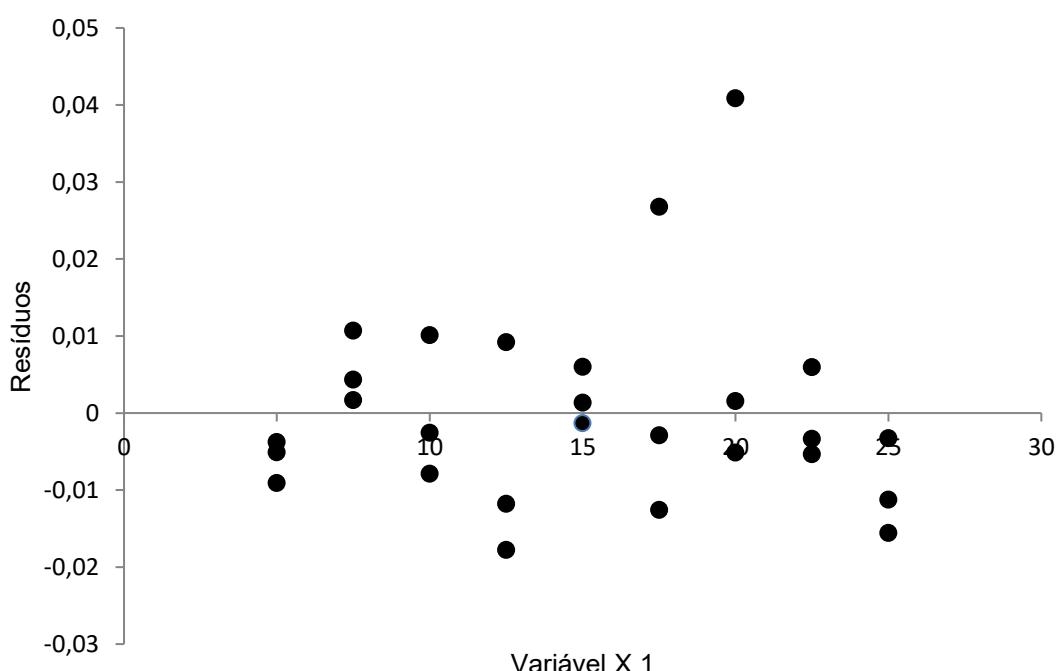


Figura 4: Distribuição dos resíduos em função da concentração da PQQ-2Na em 248 nm.

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 µg/mL e de quantificação de 0,36 µg/mL, assegurando que o método proposto apresenta boa sensibilidade e que pode detectar e quantificar a PQQ-2Na em formulações orais e injetáveis, em uma ampla faixa de concentração e com segurança.

3.2.2 Precisão

Os resultados obtidos nos ensaios de repetibilidade e precisão intermediária de PQQ-2Na estão apresentados na Tabela 7.

Conforme verificado, os resultados demonstraram que os valores de DPR ficaram abaixo do limite máximo recomendado de 1,9%, conforme AOAC INTERNATIONAL [23]. Portanto, o método por espectrofotometria de ordem zero para determinação de PQQ-2Na, apresentou uma precisão adequada, garantindo a confiabilidade na determinação do PQQ-2Na.

Tabela 7: Resultados do ensaio de precisão de PQQ-2Na utilizando o método espectrofotométrico proposto.

Amostra comercial	Concentração teórica (µg/mL)	Teor encontrado (%) ± DPR (%)			
		Repetibilidade ^a			
		Dia	Dia 2	Dia 3	
PQQ-2Na	15,0	98,63 ± 0,007	99,21 ± 0,001	98,43 ± 0,009	98,33 ± 0,002

Abreviaturas: (PQQ-2Na) Pirroloquinolina Quinona Sal Dissódico; (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.

3.2.3 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 8, o percentual de recuperação das soluções padrão de PQQ-2Na 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 [23].

Tabela 8: Valores experimentais obtidos no ensaio de exatidão através do método espectrofotométrico proposto.

Concentração teórica de PQQ-2Na adicionada (µg/mL)	Concentração de PQQ-2Na recuperada (µg/mL)	Recuperação (%) Resultado ± DPR (%)	Média ± DPR (%)
10,0	10,07	103,32 ± 0,0006	
15,0	14,66	98,81 ± 0,0006	100,45 ± 0,0250
25,0	24,56	99,21 ± 0,0010	

Abreviaturas: (PQQ-2Na) Pirroloquinolina Quinona Sal Dissódico; (DPR) Desvio Padrão Relativo.

3.2.4 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada comparando os espectros da solução placebo com o espectro das soluções padrão de PQQ-2Na da amostra comercial. Conforme apresentado na Figura 5, os excipientes (placebo) utilizados para o ensaio de seletividade não interferiram na determinação do PQQ-2Na, 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.

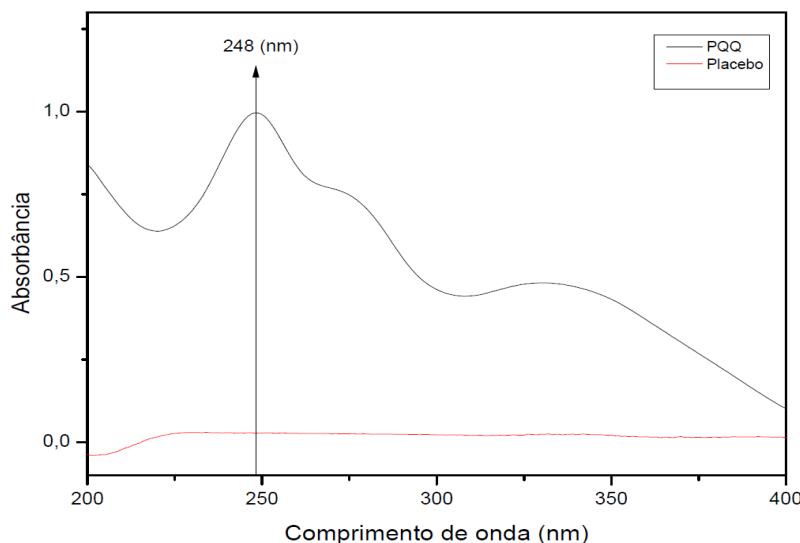


Figura 5: Espectro de absorção da solução placebo sobreposta ao espectro de absorção da solução da amostra comercial analisada utilizando o método proposto. Fonte: OriginPro®8.5.

3.2.5 Robustez

O planejamento fatorial 2^3 utilizado neste estudo para investigar o impacto dos fatores e suas interações na determinação do teor de PQQ-2Na, juntamente com as respectivas respostas observadas, estão apresentados na Tabela 9. A escolha dos fatores avaliados foi baseada em sua relevância para o método analítico proposto e na possibilidade de variações desses parâmetros em análises laboratoriais rotineiras.

Tabela 9: 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-2Na (%)
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-2Na) Pirroloquinolina Quinona Sal Dissódico.

Na ANOVA, a significância estatística de cada efeito dos fatores (X_1 , X_2 e X_3) e suas interações (X_1X_2 , X_1X_3 e X_2X_3) 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 de resposta no teor de PQQ-2Na, 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-2Na (variável resposta) dentro do intervalo de variação dos fatores selecionados.

Tabela 10: Resultados ANOVA para teor de PQQ-2Na com nível de significância 5,0%.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Teor de PQQ-2Na	p-valor ^b
				Teste F ^a	
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.

Abreviaturas: (PQQ-2Na) Pirroloquinolina Quinona Sal Dissódico; (X1) Comprimento de Onda (nm); (X2) Tempo de sonicação (min.); (X3) Temperatura do Ambiente (°C); (X1X2) Interação entre fator X1 e X2; (X1X3) Interação entre fator X1 e X3; (X2X3) Interação entre fator X2 e X3.

^a $F_{\text{crítico}}(0,05, 1, 1) = 161,4$, nos graus de liberdade (GL) especificados, $GL_1 = 1$ e $GL_2 = 1$, e com nível de significância de 5,0%.

^bp-valor >0,05: efeito não significativo.

A partir do Gráfico de Pareto (Figura 6) 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-2Na. Conclui-se, portanto, que o método proposto é robusto dentro da faixa de variação dos fatores adotados neste estudo.

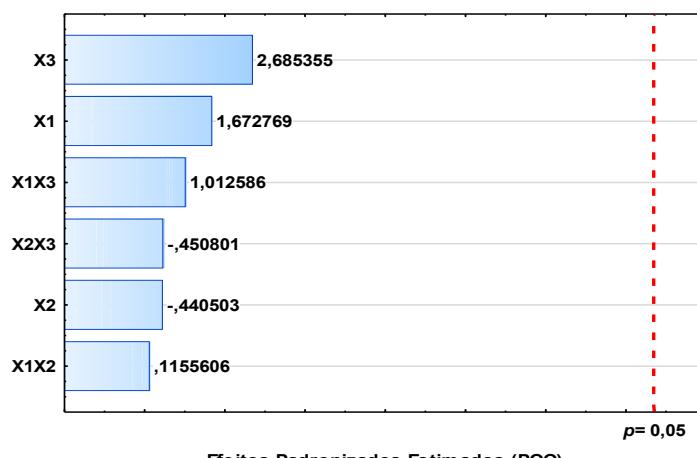


Figura 6: Diagrama de Pareto dos fatores individuais, (X1) comprimento de onda, (X2) tempo de sonicação e (X3) temperatura do ambiente e fatores combinados (X1X2, X2X3, X1X3). Fonte: Software TIBCO Statistica® Ultimate Academic 14.0.

3.3 Aplicabilidade do método

A Tabela 11 apresenta os teores de PQQ-2Na obtidos na análise de 5 amostras comerciais, empregando o método desenvolvido e validado neste estudo.

Tabela 11: Análise de 4 amostras comerciais de PQQ-2Na através do método espectrofotométrico proposto.

Amostra comercial PQQ-2Na	Descrição da amostra	Teor encontrado (%) ± DPR (%)	Concentração final µg/mL
Amostra 1	10 mg de PQQ-2Na , celulose microcristalina qsp.	98,44 ± 0,18	14,77
Amostra 2	10 mg de PQQ-2Na , estearato de magnésio 1% e celulose microcristalina qsp.	94,82 ± 0,53	14,22
Amostra 3	10 mg de PQQ-2Na , celulose microcristalina qsp.	83,30 ± 0,53	12,50
Amostra 4 (injetável)	5 mg de PQQ-2Na em 2 mL, água qsp.	98,20 ± 0,37	14,73
Amostra 5 (injetável)	5 mg de PQQ-2Na em 2 mL, água qsp.	102,03 ± 0,62	15,30

Abreviaturas: (PQQ-2Na) Pirroloquinolina Quinona Sal Dissódico; (DPR) Desvio Padrão Relativo.

Diversos métodos para quantificação de PQQ-2Na foram descritos na literatura, em diferentes matrizes, cada um com suas vantagens e limitações. Métodos baseados em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), coo os descritos por Fukuda et al. (2017) [12], Fukuda et al. (2022) [13] e Noji et al. (2007) [14], 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. (1995) [15], oferece alta precisão e capacidade de detecção de traços, mas também apresenta desafios relacionados à volatilização da PQQ-2Na e à necessidade de derivatização, o que pode aumentar a complexidade do processo analítico. Métodos enzimáticos, como o proposto por Kato et al. (2018) [16], são úteis para a quantificação indireta da PQQ-2Na, mas podem ser afetados por interferências enzimáticas e variações nas condições experimentais.

A eletroforese capilar de zona, descrita por Glatz et al. (2000) [17], 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-2Na 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-2Na 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-2Na.

4. CONCLUSÃO

Um método espectrofotométrico foi desenvolvido e validado para a determinação de pirroloquinolina quinona sal dissódico em cápsulas e soluções injetáveis de uso humano. O método desenvolvido apresentou linearidade, sensibilidade, precisão, seletividade e robustez, de acordo com o preconizado na resolução da diretoria colegiada (RDC) nº 166 de 24 de julho de 2017 da ANVISA [20], Instituto Nacional de Metrologia Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) [21], bem como os guias internacionais, Q2(R1) do International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) [22] e da AOAC INTERNATIONAL [23]. Demonstrou ser um método de fácil aplicabilidade, possibilitando a economia de tempo e recursos dentro de um laboratório de controle de qualidade. Essa afirmação baseia-se em critérios como a não utilização de solventes orgânicos, uma vez que o método emprega apenas água como solvente, reduzindo custos com reagentes, minimizando impactos ambientais e dispensando a manipulação de solventes tóxicos. Além disso, o método utiliza equipamentos de baixo custo e amplamente disponíveis. A geração mínima de resíduos, devido ao uso de água como solvente e à necessidade de pequenos volumes de amostra, também contribui para a sustentabilidade do método, alinhando-se às práticas de química verde. Por fim, o ensaio é rápido e de simples execução, não exigindo etapas demoradas ou complexas e demandando pouca mão de obra. Esses critérios tornam o método uma alternativa viável e econômica para a quantificação de PQQ-2Na em laboratórios de controle de qualidade, além de viabilizar a segurança e eficácia da comercialização desses suplementos contendo PQQ-2NA na sua composição.

5. AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (<https://ppgfarmacia.ufms.br/>).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brasil. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). RDC nº 243, de 26 de julho de 2018. Dispõe sobre os requisitos sanitários dos suplementos alimentares. Brasília (DF): Diário Oficial da União; 26 jul 2018. Disponível em: <https://share.google/kzDlMqC1owGlfqkc>
- Lam M, Khoshkhat P, Chamani M, Shahsavari S, Dorkoosh FA, Rajabi A, et al. In-depth multidisciplinary review of the usage, manufacturing, regulations & market of dietary supplements. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2022;67:102985. doi: 10.1016/j.jddst.2021.102985
- Augustus E, Haynes E, Guell C, Morrissey K, Murphy MM, Halliday C, et al. The impact of nutrition-based interventions on nutritional status and metabolic health in small island developing states: A systematic review and narrative synthesis. *Nutrients.* 2022;14(17):3529. doi: 10.3390/nu14173529.
- Council for Responsible Nutrition [Internet]. 2021 CRN Consumer survey on dietary supplements. Crnusa.org; 2021 [acesso em 7 mar 2025]. Disponível em: <https://www.crnusa.org/resources/2021-crn-consumer-survey-dietary-supplements-0>.
- Molin TRD, Leal GC, Müller LS, Muratt DT, Marcon GZ, Carvalho LM, et al. Regulatory framework for dietary supplements and the public health challenge. *Rev Saúde Pública.* 2019;53:90. doi: 10.11606/s1518-8787.2019053001263
- Tabernero P, Newton PN. Estimating the prevalence of poor-quality anti-TB medicines: A neglected risk for global TB control and resistance. *BMJ Glob Health.* 2023;8:e012039. doi: 10.1136/bmjgh-2023-012039
- 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.* 2021;11(10):1441. doi: 10.3390/biom11101441

8. Ames BN. Prolonging healthy aging: Longevity vitamins and proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2018;115(43):10836-44. doi: 10.1073/pnas.1809045115
9. Kumar N, Kar A, Panda S. Pyrroloquinoline quinone ameliorates l-thyroxine-induced hyperthyroidism and associated problems in rats. *Cell Biochem Funct.* 2014;32(6):538-46. doi: 10.1002/cbf.3048
10. 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.* 2014;270:183-91. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.04.022
11. Singh AK, Pandey SK, Naresh Kumar G. Pyrroloquinoline quinone-secreting probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 ameliorates ethanol-induced oxidative damage and hyperlipidemia in rats. *Alcohol Clin Exp Res.* 2014;38(7):2127-37. doi: 10.1111/acer.12456
12. Fukuda M, El-Maghreb M, 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.* 2017;145:814-20. doi: 10.1016/j.jpba.2017.08.008
13. Fukuda M, Kishikawa N, Samemoto T, Ohta K, Ohyama K, El-Maghreb M, et al. Determination method for pyrroloquinoline quinone in food products by HPLC-UV detection using a redox-based colorimetric reaction. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 2022;70(1):32-6. doi: 10.1248/cpb.c21-00638
14. 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.* 2007;55(18):7258-63. doi: 10.1021/jf070483r
15. Kumazawa H, Sato K, Seno H, Ishii A, Suzuki O. Levels of pyrroloquinoline quinone in various foods. *Biochem J.* 1995;307(2):331-3. doi: 10.1042/bj3070331
16. 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.* 2018;13(12):e0209700. doi: 10.1371/journal.pone.0209700
17. Glatz Z, Moravcová M, Janiczek O. Determination of pyrroloquinoline quinone by capillary zone electrophoresis. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2000;739(1):101-7. doi: 10.1016/s0378-4347(99)00519-8
18. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Farmacopeia Brasileira. Vol. 1 e 2. 6^a ed. Brasília (DF): ANVISA; 2019.
19. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM). European Pharmacopoeia. 10th ed. Strasbourg (France): EDQM; 2020.
20. Brasil. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Brasília (DF): Diário Oficial da União; 24 jul 2017. Disponível em: <https://share.google/rIzqbKoTaOHYS0Bdu>
21. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO). Orientação sobre validação de métodos analíticos. Brasília (DF): INMETRO; 2020.
22. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). ICH Harmonised Tripartite Guideline. 2005;1-17.
23. Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. In: *Official Methods of Analysis.* 20th ed. Washington (US): AOAC; 2017.
24. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Guia nº 10/2017 – Guia para tratamento estatístico da validação analítica. Brasília (DF): Anvisa; 2017.