Universidade de Brasília

Faculdade de Ciências da Saúde

Departamento de Farmácia

VALIDAÇÃO DE MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE BERGENINA E ÁCIDO ALFA-LIPOICO NA PELE

Aluna: Clara Soares Alves

Matrícula: 20/0016393

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso

Co-Orientador: Dr. Breno Noronha Matos

Brasília

2025

CLARA SOARES ALVES

VALIDAÇÃO DE MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE BERGENINA E ÁCIDO ALFA-LIPOICO NA PELE

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília como requisito à obtenção do grau de bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso

Co-Orientador: Dr. Breno Noronha Matos

Brasília

2025

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho faz parte do projeto de Mestrado do estudante Samuel Dutra, com o tema "Desenvolvimento de formulação tópica contendo nanopartículas co-encapsulando bergenina e ácido alfa-lipóico para o tratamento do fotoenvelhecimento cutâneo".

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer aos meus pais, Joaquim e Carolina, por toda educação, paciência, amor e respeito que sempre me proporcionaram.

Em segundo lugar, gostaria de agradecer a todos os meus amigos e familiares que sempre torceram por mim e estiveram ao meu lado ao longo da minha trajetória acadêmica.

Por último, quero agradecer a todos os estudantes, mestrandos, doutorandos, professores e amigos do Laboratório de Tecnologia de Medicamentos, Alimentos e Cosméticos (LTMAC) que me acolheram e me ajudaram a desenvolver este trabalho. Agradeço especialmente ao professor Guilherme Gelfuso pela oportunidade e a Samuel, Breno, Mateus, Paula, Rebeca e Nara por todo o apoio e conhecimento compartilhados. Sem vocês, este trabalho não teria se tornado realidade.

RESUMO

O ácido alfa-lipoico (ALA) é uma molécula amplamente estudada por suas propriedades antioxidantes e aplicações cosméticas consolidadas. A bergenina (BER), por sua vez, embora menos explorada nesse contexto, apresenta características promissoras para utilização em formulações tópicas, principalmente devido às suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes. Diante disso, a validação de um método analítico, capaz de quantificar ambas as substâncias extraídas da pele, constitui uma contribuição relevante para pesquisas voltadas ao desenvolvimento de novos produtos cosméticos. Neste estudo, foi validado um método baseado em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a quantificação simultânea de ALA e BER extraídos da pele. A metodologia empregou uma coluna cromatográfica de fase reversa C_{18} (250 mm × 6 mm; 5 µm), utilizando-se eluição em gradiente com fase móvel composta por acetonitrila e solução aquosa de ácido fosfórico (pH = 3). A vazão da fase móvel foi fixada em 1 mL/min, a temperatura do forno mantida em 40 °C, o volume de injeção das amostras foi de 50 µL e a detecção foi realizada a 210 nm. O tempo total de corrida foi de 20 minutos, com tempos de retenção de 6,2 minutos para a BER e 14,3 minutos para o ALA. A validação do método seguiu os parâmetros estabelecidos pelas diretrizes internacionais, incluindo avaliação de linearidade, seletividade, limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), precisão, exatidão e robustez. A seletividade foi confirmada por meio da quantificação das substâncias na presença de contaminantes de pele suína. A linearidade foi observada na faixa de 0,5 a 15 µg/mL, com coeficientes de correlação (r) superiores a 0,999 para ambas as moléculas. Os valores de LOD e LOQ para a bergenina foram de 0,090 µg/mL e 0,273 µg/mL, respectivamente, enquanto para o ALA foram de 0,143 µg/mL e 0,435 µg/mL, respectivamente. Os valores de desvio padrão relativo (DPR%) para verificação da precisão foram inferiores a 3,9%, e os testes de exatidão mostraram valores de erro relativo compreendidos entre 95% e 115%, demonstrando a confiabilidade do método desenvolvido. Além disso, o método mostrou-se robusto frente a pequenas variações nas condições cromatográficas. Concluiu-se que o método desenvolvido é adequado para a quantificação simultânea de ALA e BER na pele para o desenvolvimento de formulações cosméticas.

Palavras-chave: ácido alfa-lipoico; bergenina; CLAE; validação; método analítico; método cromatográfico; pele; cosmetologia.

ABSTRACT

Alpha-lipoic acid (ALA) is a widely studied molecule due to its antioxidant properties and established cosmetic applications. Bergenin (BER), on the other hand, although less explored in this context, presents promising characteristics for use in topical formulations, mainly because of its anti-inflammatory and antioxidant properties. Therefore, the validation of an analytical method capable of quantifying both substances extracted from the skin constitutes a significant contribution to research aimed at developing new cosmetic products. In this study, a method based on high-performance liquid chromatography (HPLC) was validated for the simultaneous quantification of ALA and BER extracted from the skin. The methodology employed a C18 reverse-phase chromatographic column (250 mm × 6 mm; 5 µm), using gradient elution with a mobile phase composed of acetonitrile and aqueous phosphoric acid solution (pH = 3). The flow rate of the mobile phase was fixed at 1 mL/min, the oven temperature maintained at 40 °C, sample injection volume was 50 µL, and detection was performed at 210 nm. The total run time was 20 minutes, with retention times of 6.2 minutes for BER and 14.3 minutes for ALA. The method validation followed parameters established by international guidelines, including assessments of linearity, selectivity, limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), precision, accuracy, and robustness. Selectivity was confirmed through quantification of the substances in the presence of impurities from porcine skin. Linearity was observed in the range of 0.5 to 15 µg/mL, with correlation coefficients (r) greater than 0.999 for both molecules. The LOD and LOQ values for bergenin were 0.090 µg/mL and 0.273 µg/mL, respectively, while for ALA, they were 0.143 µg/mL and 0.435 µg/mL, respectively. The relative standard deviation (RSD) values for precision verification were below 3.9%, and the accuracy tests showed relative error values between 95% and 115%, demonstrating the reliability of the developed method. Additionally, the method proved to be robust against small variations in chromatographic conditions. It was concluded that the developed method is suitable for the simultaneous quantification of ALA and BER in the skin for the development of cosmetic formulations.

Keywords*: alpha-lipoic acid; bergenin; HPLC; validation; analytical method; chromatographic method; skin; cosmetology.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química da molécula de BER 15
Figura 2 – Estruturas químicas dos isômeros do ALA 17
Figura 3 – Sistema de CLAE composto por duas bombas, um injetor automático, um forno, um detector espectrofotométrico e um computador com o software Shimadzu LC 20
Figura 4 – Curva-padrão de BER na faixa de concentração de 0,5 a 15 µg/mL.....29
Figura 5 – Curva-padrão de ALA na faixa de concentração de 0,5 a 15 µg/mL.....30
Figura 6 – Cromatogramas da etapa de seletividade 31
Figura 7 – Comparação entre os tempos de retenção de BER e ALA na presença das camadas de pele 32
Figura 8 – Áreas de pico de BER e de ALA na presença de contaminantes.....33
Figura 9 – Representação gráfica da linearidade de BER e ALA na faixa de concentração de 0,5 a 15 µg/mL 33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados analíticos de BER e ALA encontrados na literatura científica 21
Tabela 2 – Gradiente de fases móveis aplicado no método de quantificação de BER e ALA 22
Tabela 3 – Precisão do método para a determinação de BER, com dados da repetibilidade e precisão intermediária.....34
Tabela 4 – Precisão do método para a determinação de ALA, com dados da repetibilidade e precisão intermediária.....35
Tabela 5 – Exatidão baseada nas concentrações mensuradas de BER em diferentes dias, por diferentes analistas 36
Tabela 6 – Exatidão baseada nas concentrações mensuradas de ALA em diferentes dias, por diferentes analistas 36
Tabela 7 – Robustez do método para BER em 5 µg/mL 37
Tabela 8 – Robustez do método para ALA em 5 µg/mL 38

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
ALA	Ácido Alfa-Lipoico
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BER	Bergenina
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DPR	Desvio Padrão Relativo
EC	Estrato Córneo
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use
LOD	Limite de Detecção
LOQ	Limite de Quantificação
MeOH	Metanol
MP	Matéria-Prima
pH	Potencial Hidrogeniônico
PV	Pele Viável
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 13
2 OBJETIVOS 14
2.1 Objetivo geral 14
2.2 Objetivos específicos 14
3 REFERENCIAL TEÓRICO 15
3.1 Bergenina 15
3.2 Ácido alfa-lipoico 16
3.3 Importância do método analítico 17
3.4 Cromatografia líquida de alta eficiência 18
4 MATERIAL E MÉTODOS 19
4.1 Material e Equipamentos 19
4.2 Método analítico para quantificação da bergenina e do ácido alfa-lipoico 20
4.2.1 Preparo das soluções 22
4.2.2 Padronização das soluções 22
4.3 Validação 23
4.3.1 Preparo dos extratos de pele 23
4.3.2 Seletividade 24
4.3.3 Linearidade 24
4.3.4 Limites de detecção e quantificação 26
4.3.5 Precisão 26
4.3.6 Exatidão 27
4.3.7 Robustez 28
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 28
5.1 Padronização do método 28
5.2 Padronização das soluções 28

5.3 Seletividade 30
5.4 Linearidade 33
5.5 Limites de detecção e de quantificação 34
5.6 Precisão 34
5.7 Exatidão 35
5.8 Robustez 37
6 CONCLUSÃO 39
REFERÊNCIAS 39

1 INTRODUÇÃO

A bergenina (BER) é uma substância natural isolada de diversas espécies vegetais, inclusive da flora brasileira, e tem sido associada a efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e hepatoprotetores (Oliveira *et al.*, 2023; Salimo *et al.*, 2023; Zhou *et al.*, 2008). Apesar de seu potencial terapêutico, há uma escassez de estudos que avaliem sua aplicabilidade na cosmetologia, especialmente em formulações de uso tópico, o que justifica sua seleção para esta investigação (Boros *et al.*, 2014; Salimo *et al.*, 2023).

O ácido alfa-lipoico (ALA) é uma substância reconhecida por sua atividade terapêutica (Packer *et al.*, 1995), notadamente por suas propriedades antioxidantes e pelo uso amplamente consolidado em produtos cosméticos voltados à prevenção do envelhecimento cutâneo e à melhora da aparência da pele (Papageorgiou *et al.*, 2020; Kim *et al.*, 2021). Considerando as propriedades farmacológicas da BER e a capacidade antioxidante do ALA, a associação entre essas duas substâncias demonstra potencial promissor para o desenvolvimento de novas formulações cosméticas de uso tópico. Por essa razão, ambas foram selecionadas como foco da presente pesquisa.

Durante o desenvolvimento de novas formulações cosméticas, é fundamental a realização de diversos ensaios de controle de qualidade, com o objetivo de assegurar tanto a segurança quanto a eficácia dos produtos em sua resposta terapêutica (Brasil, 2008, 2012). Nesse contexto, a validação de um método analítico capaz de quantificar os fármacos constitui uma etapa essencial para garantir a confiabilidade dos resultados obtidos em todas as fases do controle de qualidade, assegurando a exatidão, precisão e reprodutibilidade dos dados experimentais (Marson *et al.*, 2020; Polycarpo, 2023).

Além disso, a etapa de seletividade da validação permite comprovar a capacidade do método em quantificar os fármacos mesmo na presença de possíveis interferentes, como componentes da formulação e da pele (Brasil, 2017). Essa comprovação é essencial para a condução dos ensaios de permeação cutânea, que integram o controle de qualidade e garantem a eficácia das novas formulações tópicas na liberação adequada do fármaco na pele (Brasil, 2008, 2012).

A validação de um método analítico capaz de quantificar simultaneamente mais de um fármaco na presença de contaminantes provenientes de matrizes complexas, como

a pele, configura uma tarefa desafiadora. Isso se deve ao fato de que uma das técnicas mais utilizadas para esse fim, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), envolve etapas críticas influenciadas por fatores intrínsecos aos analitos, como suas propriedades físico-químicas, a afinidade pelas fases de separação e a própria natureza da matriz (Polycarpo, 2023).

A validação de um método que permita a quantificação simultânea de dois fármacos nunca antes combinados representa uma investigação relevante e inovadora, com potencial para contribuir significativamente com pesquisas futuras na área farmacêutica. Além disso, o êxito do método permite disponibilizar dados inéditos de análise cromatográfica na literatura científica, os quais futuramente servirão como informações de suporte a ensaios farmacêuticos, seja de desenvolvimento de novas formas farmacêuticas, seja de controle de qualidade de medicamentos e cosméticos. Também é importante destacar que, até o momento da publicação do presente trabalho, não há artigos que analisam a associação de BER e ALA, assim como não existem métodos de quantificação simultânea para ambos os fármacos.

Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo o desenvolvimento e a validação de um método analítico capaz de quantificar simultaneamente BER e ALA por meio da técnica de CLAE. Essa quantificação simultânea amplia significativamente as ferramentas analíticas disponíveis e possibilita novas abordagens em pesquisas voltadas ao desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas e cosméticas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi validar um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a quantificação simultânea de BER e ALA, visando oferecer suporte analítico aos ensaios de desenvolvimento de formulações tópicas contendo ambos os fármacos em associação.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar a seletividade do método analítico;

- Avaliar a linearidade e calcular os limites de detecção e quantificação;
- Determinar a precisão e exatidão do método;
- Verificar a robustez do método analítico.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Bergenina

A BER é um composto bioativo presente em diversas espécies de plantas medicinais ao redor do mundo, como *Saxifraga crassifolia* L. (Ásia Central), *Mallotus philippinensis* (Ásia e Austrália), *Corylopsis spicata* (Japão) e *Sacoglottis gabonensis* (África Tropical e América do Sul) (Salimo *et al.*, 2023; Veloso *et al.*, 2023). Essa substância também é encontrada em espécies da região amazônica, com destaque para a *Endopleura uchi*, árvore produtora do fruto popularmente conhecido como uxi amarelo (Oliveira *et al.*, 2023). De acordo com a estrutura química da molécula de BER (**Figura 1**), ela é definida como um C-glicosídeo do ácido 4-O-metil-gálico e, como um metabólito secundário, é classificada como uma isocumarina (Bajracharya, 2015; Veloso *et al.*, 2023).

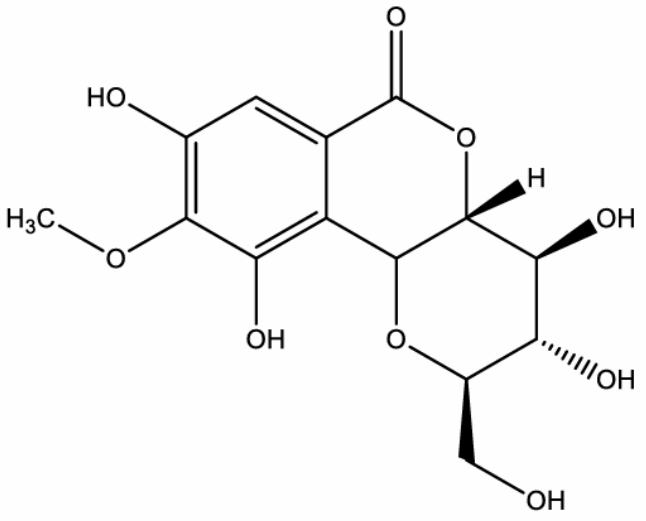


Figura 1 – Estrutura química da molécula de BER. Peso molecular = 328,27 g/mol (Sigma-Aldrich, 2025); pKa1 = 5,46 ± 0,13; pKa2 = 5,74 ± 0,18; log P = de - 1,06 ± 0,033 a - 1,19 ± 0,044 em pH 1,0-6,0 a 37 ºC (Zhou et al., 2008). Fonte: Veloso et al. (2023).

As propriedades farmacológicas da BER são extensas e abrangem diferentes ações terapêuticas na saúde humana, como atividades antioxidante, anti-inflamatória, citoprotetora, antifúngica, antiviral, antidiabética, antimalárica, entre outras (Bajracharya, 2015; Salimo *et al.*, 2023; Veloso *et al.*, 2023). Assim, a BER é um fármaco com potencial de uso em diferentes áreas farmacêuticas, podendo ser alvo de estudos dentro da Cosmetologia.

No desenvolvimento de formulações cosméticas de uso tópico, as propriedades físico-químicas do fármaco, como a lipofilicidade, expressa pelo coeficiente de partição octanol-água (log P), e a solubilidade, são essenciais para a escolha da forma farmacêutica ideal para o objetivo terapêutico e a via de administração de escolha. Para a molécula de BER, o valor de log P varia entre - 1,06 ± 0,033 e - 1,19 ± 0,044 em pH 1,0 - 6,0 a 37 º C (Zhou *et al.*, 2008). Isso significa que ela apresenta um caráter mais hidrofílico, o que dificulta a permeação em locais de maior lipofilicidade, como a camada córnea da pele. Contudo, a solubilidade de BER na pele pode ser melhorada por meio da associação com outros compostos mais lipofílicos, como a molécula de ALA, permitindo maior interação com as camadas da pele quando em formulações tópicas.

3.2 Ácido alfa-lipoico

O ALA é um princípio ativo bastante documentado na literatura científica e utilizado comercialmente como suplemento nutricional e em formulações cosméticas de uso tópico (Matsugo *et al.*, 2011). O ALA (ácido 1,2-ditiolano-3-pentanoico), também conhecido como ácido tióctico, se apresenta na forma de dois isômeros: R- e S-ácido alfa-lipoico (**Figura 2**). O isômero R-ácido alfa-lipoico é encontrado naturalmente nas mitocôndrias de animais e em plantas, atuando como cofator de enzimas fundamentais para reações do metabolismo energético, como a piruvato desidrogenase (Mosallaei *et al.*, 2024; Smith *et al.*, 2004).

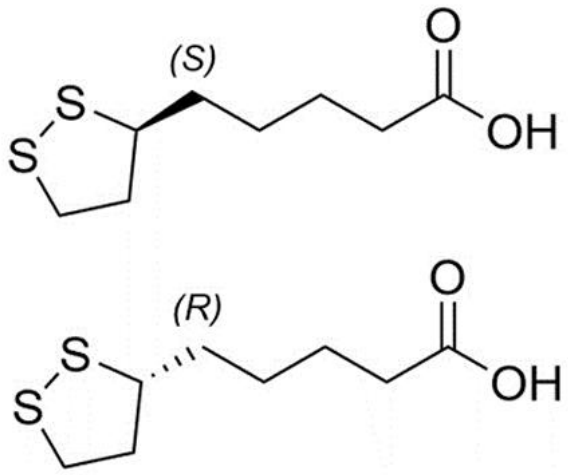


Figura 2 – Estruturas químicas dos isômeros do ALA. Peso molecular = 206,33 g/mol (Sigma-Aldrich, 2025); pKa = 4,9; log P = 1,7 (Papageorgiou *et al.*, 2020). Fonte: Mosallaei *et al.* (2024).

Devido ao grupamento funcional ditiol (-S-S-) presente na estrutura do ALA, essa substância apresenta alta capacidade de eliminação de espécies reativas de oxigênio por meio da redução de formas oxidadas de outros antioxidantes, como a glutationa e a vitamina E (Kim *et al.*, 2021; Nguyen *et al.*, 2024). Há evidências que indicam que a ação antioxidante do ALA possui efeito antienvelhecimento sobre a pele, impedindo danos às funções de células epiteliais e aumentando a expressão de proteínas estruturais da epiderme (Kim *et al.*, 2021; Matsugo *et al.*, 2011). Essas propriedades do ALA mostram o grande potencial de aplicação desse fármaco na área da cosmetologia.

Em adição, a molécula de ALA apresenta valor de log P = 1,7 e pKa = 4,9 (Papageorgiou *et al.*, 2020), ou seja, alta lipofilicidade e solubilidade em meios mais ácidos, características também encontradas nas camadas mais superficiais da pele (De Szalay *et al.*, 2023). Dessa forma, as propriedades físico-químicas e farmacológicas do ALA contribuem para a escolha dele como princípio ativo cosmético e possível componente a ser associado à molécula de BER.

3.3 Importância do método analítico

O desenvolvimento e a validação de um método analítico confiável, capaz de quantificar BER e ALA em associação, representa uma contribuição significativa para a literatura científica, principalmente no âmbito das ciências farmacêuticas, pois não há, atualmente, nenhum estudo que associe os dois fármacos. Ao mesmo tempo, a existência desse método possibilita novas oportunidades em pesquisas de cosméticos e

medicamentos inovadores, visto que garante o monitoramento das concentrações dos princípios ativos na presença de outros compostos, como adjuvantes de formulações, e permite investigar o surgimento de produtos de degradação, que interferem na eficácia terapêutica e comprometem a saúde do paciente (Nikolin *et al.*, 2004).

3.4 Cromatografia líquida de alta eficiência

Segundo a *Farmacopeia Brasileira* (Brasil, 2024), a CLAE é uma técnica de separação de misturas de compostos químicos comumente utilizada em análises farmacêuticas. A separação química proporcionada pela CLAE se baseia na aplicação de duas fases imiscíveis entre si: a fase móvel e a fase estacionária. A fase móvel se apresenta na fase líquida e geralmente é composta por um solvente orgânico de pureza cromatográfica, enquanto a fase estacionária consiste em um sólido adsorvente ligado a partículas de sílica e contido em uma coluna cilíndrica. O equipamento de CLAE possui como componentes principais: um reservatório para a fase móvel; uma bomba para promover a vazão da fase móvel pelo sistema; um injetor para introdução da amostra; uma coluna cromatográfica como fase estacionária; um detector, geralmente espectrofotométrico (UV-Vis); e um dispositivo de captura de dados, como um *software*.

Assim como outras técnicas de controle de qualidade aplicadas à indústria farmacêutica, a CLAE deve seguir protocolos de segurança específicos, as Boas Práticas Cromatográficas, a fim de garantir a confiabilidade nos processos e a manutenção adequada de todos os componentes do sistema (Gama *et al.*, 2019). Esse tipo de cromatografia possui alta versatilidade, pois possibilita diferentes mecanismos de separação de amostras e soluções. Contudo, na maioria das análises farmacêuticas, é realizada a separação dos componentes da amostra entre fases móveis polares e fases estacionárias apolares, sistema denominado cromatografia em fase reversa (Yabré *et al.*, 2018).

A separação cromatográfica é influenciada pela natureza química dos componentes da amostra, assim como pela composição e fluxo da fase móvel e pela área superficial da fase estacionária. Um aspecto interessante da CLAE é a possibilidade de modificar a composição dos solventes da fase móvel durante a corrida cromatográfica, técnica conhecida como eluição em gradiente, que auxilia na separação de misturas complexas de substâncias com tempos e fatores de retenção muito distintos, como ocorre em análises farmacêuticas (Brasil, 2024).

Por envolver uma análise farmacêutica, o método desenvolvido no presente estudo utilizou o sistema de cromatografia em fase reversa, com fase móvel de caráter polar e fase estacionária apolar, e aplicou a técnica de eluição da fase móvel em gradiente a fim de proporcionar uma separação mais eficiente dos fármacos contidos nas soluções amostrais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material e Equipamentos

As matérias-primas (MP) de ALA e de BER utilizadas para o preparo de todas as soluções do estudo foram doações da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Para a identificação das moléculas, foram utilizados padrões analíticos do ALA e da BER, ambos obtidos da Sigma-Aldrich (Merck, Darmstadt, Alemanha). O metanol (MeOH) e a acetonitrila (ACN) de grau cromatográfico usados nas análises cromatográficas foram obtidos da J.T. Baker (Avantor, Phillipsburg, EUA). A solução aquosa de ácido fosfórico (pH 3) usada como um dos solventes do gradiente do método foi preparada com ácido fosfórico (85% em peso em H_2O) adquiridas pela Sigma-Aldrich e água ultrapurificada de sistema Milli-Q® da Millipore (Merck, Darmstadt, Alemanha). A solução aquosa do ácido foi padronizada na proporção de 15 µL de ácido para 500 mL de água ultrapurificada (solução 0,003 v/v % de ácido fosfórico em água).

Para a obtenção das soluções de camadas de pele, utilizou-se o método de *tape-stripping*, que consiste na aplicação de 15 pedaços pequenos de fitas adesivas da Scotch Book Tape (3M, Alemanha) sobre camadas de pele para retirar amostras representativas de toda área superficial e preparar extratos. As peles utilizadas foram obtidas de orelhas de suínos adquiridas pelo Frigorífico Suíno Bom (Ceilândia, Distrito Federal, Brasil). As orelhas foram coletadas logo após o abate e mantidas sob refrigeração durante todo o transporte até o laboratório. Após a lavagem das orelhas em água corrente, as peles foram removidas com o auxílio de bisturi e separadas das camadas adiposas com auxílio de tesoura. Em seguida, as peles foram cortadas em fragmentos circulares e armazenadas à temperatura de - 4 ºC durante cerca de um mês até o uso nos testes.

Para a determinação dos comprimentos de onda de absorção máxima para as amostras de ALA e BER, utilizou-se um espectrofotômetro de UV-Vis modelo UV-1800

(Shimadzu, Japão). Para todas as análises cromatográficas, utilizou-se um sistema de CLAE modelo LC-20-AD (Shimadzu, Japão) composto por duas bombas (modelo LC 20-AT), um injetor automático (modelo 9SIL-20AD), um forno (modelo CTO-20AS), um detector espectrofotométrico (modelo SPD-M20A) e um computador equipado com o programa de análise cromatográfica Shimadzu LC (**Figura 3**). A coluna cromatográfica de fase reversa usada nas análises foi do modelo Discovery® C18, tamanho de partícula 5 µm, comprimento de 25 cm por 6 mm de diâmetro interno, fornecida pela Sigma-Aldrich.



Figura 3 – Sistema de CLAE composto por duas bombas, um injetor automático, um forno, um detector espectrofotométrico e um computador com o software Shimadzu LC. Fonte: Autoria própria.

4.2 Método analítico para quantificação da bergenina e do ácido alfa-lipoico

A princípio, testou-se a eluição isocrática para o método e um baixo volume de injeção das amostras. Entretanto, a observação dos picos dos dois fármacos, principalmente do ALA, não foi satisfatória. Dessa forma, optou-se pelo uso da eluição em gradiente e pelo aumento do volume de injeção das amostras na tentativa de melhorar a performance do método e a visualização dos picos. Além disso, diferentes valores de comprimentos de onda foram analisados dentro da faixa de 190 a 360 nm (Boros *et al.*, 2014) até a identificação do comprimento ideal para a detecção simultânea dos picos dos dois fármacos. A partir de dados na literatura científica, foi possível otimizar as condições

analíticas e a quantificação simultânea dos compostos, contornando as dificuldades encontradas experimentalmente. Os principais dados analíticos que auxiliaram no desenvolvimento e na otimização do método foram dispostos na **Tabela 1**.

Tabela 1 – Dados analíticos de BER e ALA encontrados na literatura

FÁRMACO	ARTIGO	COMPRIMENTO DE ONDA (nm)	FASE MÓVEL	VOLUME DE INJEÇÃO (µL)	TEMPO DE RETENÇÃO (min)
BER	Boros *et al.*, 2014	280	Eluição em gradiente: (A) Solução de ácido trifluoroacético em água (pH 2,0; 0,1 v/v %) (B) Solução de TFA em MeOH (pH 2,0; 0,1 v/v %)	0,5	10,7
	Zhou *et al.*, 2008	275	Eluição isocrática (30 : 70, v/v): (A) MeOH (B) Água (pH 2,5)	Não informado	Não informado
ALA	Papageorgiou *et al.*, 2020	340	Eluição isocrática (60 : 40, v/v): (A) Solução de di-hidrogenofosfato de potássio (pH 4,5; 0,05 M) (B) ACN	20	7,2
	Ta *et al.*, 2025	334	Eluição isocrática (50 : 50, v/v): (A) ACN (B) Água (pH 4,0)	50	4,8

Fonte: Autoria própria.

A partir das otimizações aplicadas ao longo da pesquisa, desenvolveu-se um método analítico de quantificação simultânea das moléculas baseado em um gradiente de fases móveis. A composição do gradiente e as proporções de cada fase móvel em cada momento da corrida analítica foram dispostos na **Tabela 2**.

Tabela 2 – Gradiente de fases móveis aplicado no método de quantificação de BER e ALA

FASE MÓVEL	PROPORÇÃO	MOMENTO DA CORRIDA (MIN)
A – Acetonitrila (ACN)	10%	0,00
	30%	2,00
	40%	6,00
	60%	9,00
	10%	10,01
B – Solução aquosa de ácido fosfórico (0,003 v/v %)	90%	0,00
	70%	2,00
	60%	6,00
	40%	9,00
	90%	10,01

Fonte: Autoria própria

4.2.1 Preparo das soluções

Inicialmente, preparou-se uma solução-estoque de concentração 100 µg de ALA por mL de MeOH e outra solução-estoque de concentração 100 µg de BER por mL de MeOH. Para ambas as soluções-estoque, pesou-se em balança analítica 5 mg da amostra, transferiu-se para um balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com MeOH. Para a análise cromatográfica, foram feitas diluições em seis concentrações (0,5; 1; 2; 5; 10; e 15 µg/mL) para ambas as moléculas, cada uma em um balão volumétrico de 10 mL.

Após a análise individual dos fármacos, preparou-se uma solução-estoque de concentração 100 µg/mL contendo BER e ALA juntos em MeOH. Pesou-se em balança analítica 5 mg de cada fármaco, transferiu-se para um balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com MeOH. Novamente, para a análise cromatográfica, foram feitas diluições em 6 concentrações (0,5; 1; 2; 5; 10; e 15 µg/mL).

4.2.2 Padronização das soluções

Com o objetivo de comprovar a pureza da amostra de ALA e da MP de BER utilizadas no preparo das solução-estoque, foi construída uma curva padrão de análise cromatográfica com as diluições dos padrões analíticos, depois realizou-se o doseamento em CLAE de uma concentração conhecida, em triplicata, da amostra de ALA e da MP de BER para determinar o teor em porcentagem de cada fármaco.

Para isso, em balança analítica, pesou-se 5 mg de cada padrão analítico, transferiu-se para um balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com MeOH, formando soluções-estoque de 100 µg/mL em MeOH com os padrões de BER e ALA. Em seguida, foram feitas diluições em seis concentrações (0,5; 1; 2; 5; 10; e 15 µg/mL), cada uma em um balão volumétrico de 10 mL. Todas as diluições foram transferidas para *vials* para serem analisadas no equipamento de CLAE com o método desenvolvido. Para o cálculo do teor de cada fármaco, utilizaram-se a equação da reta de cada padrão e os valores das absorbâncias para as triplicatas de BER e ALA (5 µg/mL).

4.3 Validação

O método desenvolvido foi validado por CLAE seguindo as diretrizes estabelecidas na RDC nº 166/2017 e na Resolução nº 899/2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil, 2017, 2003), e nas normas definidas pela International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) (ICH, 2005). Dessa forma, foram analisados os seguintes parâmetros do método: linearidade, seletividade, limites de detecção e de quantificação, precisão, exatidão e robustez.

4.3.1 Preparo dos extratos de pele

Os extratos foram obtidos pelo método denominado *tape-stripping*, que utiliza fitas adesivas para coletar amostras representativas de toda a área superficial da pele e preparar as soluções de EC. Após a retirada do EC, utilizou-se uma tesoura cirúrgica para cortar a PV. Foram utilizados três pedaços de pele suína previamente limpos e cortados em círculos de cerca de 2 cm de diâmetro. Para cada pedaço de pele, utilizaram-se 15 pedaços de fita adesiva para retirar o EC.

As fitas contaminadas com o EC foram armazenadas em tubos tipo Falcon contendo 5 mL de MeOH. As PV foram cortadas em pequenos pedaços com a ajuda de

tesoura e também armazenadas em tubos com 5 mL de MeOH. No total, foram feitos seis tubos, sendo três de EC e três de PV. Todos os tubos foram deixados em rotação de 30 rpm durante 24 horas para a completa extração dos componentes no solvente. O equipamento utilizado para a rotação foi do modelo *Multi Bio* RS-24 da Biosan (Neobio, Brasil). Posteriormente, para a etapa de seletividade do método, uma amostra de 5 µg/mL de BER + ALA foi contaminada com 500 µL da solução de EC, e outra amostra de 5 µg/mL de BER + ALA foi contaminada com 500 µL da solução de PV.

4.3.2 Seletividade

A seletividade é a capacidade do método de quantificar a solução BER + ALA mesmo na presença de impurezas, como diluentes e interferentes presentes na amostra (Brasil, 2017). O interferente selecionado para essa etapa da validação foi uma matriz biológica complexa composta por duas camadas da pele obtidas de orelhas suínas: estrato córneo (EC) e pele viável (PV).

O experimento consistiu na análise individual dos picos cromatográficos e dos tempos de retenção dos fármacos, do diluente e de cada uma das camadas de pele. Para a análise estatística, as área de pico dos fármacos em solução sem contaminantes foram comparadas com os picos dos fármacos contaminados com as camadas de pele.

Também se calcularam as médias e os desvios padrões para as amostras contaminadas com EC (BER + EC; ALA + EC) e PV (BER + PV; ALA + PV). O teste estatístico utilizado foi a análise de variância (ANOVA *one way*), realizado pelo sistema *GraphPad Prism*. Considerou-se o nível de significância para os testes estatísticos de 5%, ou seja, valor-p igual ou menor que 0,05 ($p \leq 0,05$), para indicar diferença significativa entre os resultados.

Para a análise, no total, foram feitas doze diluições, seis para cada camada de pele, sendo duas réplicas de cada uma das três soluções-estoque. A concentração escolhida para os fármacos foi de 5 µg/mL da diluição da solução-estoque 100 µg/mL. Em cada amostra com 5 µg/mL de BER + ALA, adicionou-se a mesma proporção em volume (500 µL) do extrato da camada de pele para contaminar a amostra e completou-se o volume com MeOH. Todas as amostras foram filtradas com filtros hidrofóbicos (porosidade de 0,45 µm) antes de serem injetadas nos respectivos *vials* com o auxílio de seringas de 1 mL.

4.3.3 Linearidade

De acordo com a RDC nº 166/2017 da Anvisa, a linearidade é a capacidade do método de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração do analito nas amostras. Para determiná-la, a legislação estabeleceu o uso de, no mínimo, cinco concentrações diferentes do princípio ativo estudado, preparadas em, no mínimo, triplicatas (Brasil, 2017). Seguindo essas exigências, a avaliação da linearidade do método BER + ALA utilizou sete concentrações em triplicata, obtidas a partir de três soluções-estoque com os dois fármacos na concentração de 100 µg/mL. Para construir a curva analítica, as concentrações selecionadas foram de 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 7,5; 10; e 15 µg/mL de BER e de ALA.

Os dados analíticos foram representados em um gráfico de regressão linear, com equação da reta calculada considerando as concentrações dos analitos (variáveis x) e as áreas dos picos (variáveis y). A equação da reta foi representada no formato $y = ax + b$, com a correspondendo ao coeficiente angular da reta e b ao coeficiente linear. O coeficiente angular da reta (a) foi analisado quanto à significância, devendo apresentar valor diferente de zero.

Na avaliação estatística, foram calculados: os coeficientes de correlação de Pearson (r) e de determinação (r^2) para definir a associação linear entre as variáveis do método; a média amostral ($\bar{x}$) e o desvio padrão relativo (DPR). Segundo a Anvisa, o valor de r deve estar acima de 0,990 para que a relação linear entre as variáveis seja significativa estatisticamente; enquanto os valores para DPR não devem apresentar variação maior do que 5% (Brasil, 2003, 2017).

4.3.3.1 Preparo das diluições

As diluições foram obtidas a partir de três soluções-estoque BER + ALA 100 µg/mL. As soluções-estoque foram preparadas a partir da dissolução dos fármacos na forma de pó em MeOH. Para preparar a solução de 100 µg/mL, em balança analítica, foram pesados 5 mg de cada fármaco, que foram transferidos para um balão volumétrico de 50 mL, e o volume foi completado com MeOH. Repetiu-se esse processo até a obtenção de três soluções-estoque. De cada solução-estoque, foram obtidas seis diluições (0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 7,5; 10; e 15 µg/mL), com cada concentração sendo representada em triplicata, totalizando 18 diluições.

As diluições foram preparadas utilizando-se pipetas automáticas para a coleta dos volumes necessários das soluções-estoque, três balões volumétricos de 10 mL e MeOH

como solvente. Posteriormente, as soluções diluídas foram transferidas para os *vials* de CLAE com o uso de seringas de 1 mL acopladas a filtros hidrofóbicos, a fim de garantir a remoção de partículas e preservar a integridade do sistema analítico.

4.3.4 Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção (LOD) é a menor quantidade do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, pelo método; enquanto o limite de quantificação (LOQ) é a menor quantidade do analito que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis dentro do método analítico (Brasil, 2017). Ambos os limites foram calculados (**Equação 1** e **Equação 2**) a partir de parâmetros das três curvas analíticas da etapa de linearidade.

Equação 1 – Cálculo do LOD

$$LOD = 3{,}3 \,.\frac{\sigma}{IC}$$

(*IC* é a inclinação da curva analítica; σ é o desvio padrão)

Equação 2 – Cálculo do LOQ

$$LOQ = 10 \,.\frac{\sigma}{IC}$$

(*IC* é a inclinação da curva analítica; σ é o desvio padrão)

4.3.5 Precisão

A precisão é o parâmetro que determina a proximidade entre os resultados obtidos com as amostras do método. Em geral, a precisão deve ser expressa por meio da repetibilidade e da precisão intermediária (Brasil, 2017). A repetibilidade analisou as amostras sob mesmas condições de operação, com mesmo analista, e em uma única corrida analítica. Para essa etapa, foram necessárias nove amostras, compostas por três concentrações (baixa, média e alta), cada uma com três repetições. As concentrações baixa, média e alta utilizadas foram, respectivamente: 1,0; 5,0; e 10 µg/mL. As diluições foram obtidas a partir de três soluções-estoque BER + ALA 100 µg/mL. De cada solução-

estoque, foram preparadas três diluições, uma para cada concentração. A precisão intermediária analisou amostras iguais às da repetibilidade, no mesmo laboratório, porém feitas por um operador distinto do primeiro.

Além da repetibilidade e da precisão intermediária, também se realizou a precisão interdia, ou seja, a análise das mesmas amostras preparadas na repetibilidade e na precisão intermediária, porém em um dia diferente, para avaliar a reprodutibilidade do método. A repetibilidade, a precisão intermediária e a precisão interdia foram todas expressas pelo cálculo do DPR em porcentagem (%) (**Equação 3**), obedecendo ao limite de variação de até 5% (Brasil, 2003).

Equação 3 – Cálculo do DPR

$$DPR = \frac{\sigma}{CMD} \times 100$$

(σ é o desvio padrão; *CMD* é a concentração média determinada)

4.3.6 Exatidão

A exatidão é o parâmetro da validação que determina o grau de concordância entre os resultados individuais do método em relação a um valor aceito como verdadeiro (Brasil, 2017). As amostras utilizadas para o cálculo da exatidão foram as mesmas da etapa de precisão: nove amostras, compostas por três concentrações (baixa, média e alta), cada uma com três repetições. As concentrações baixa, média e alta utilizadas foram, respectivamente: 1,0; 5,0; e 10 µg/mL. Os valores escolhidos como verdadeiros para o cálculo da exatidão (**Equação 4**) foram as concentrações teóricas das soluções de BER + ALA (1,0; 5,0; e 10 µg/mL). Os valores em porcentagem (%) para a exatidão deveriam ser iguais ou superiores a 95%.

Equação 4 – Cálculo da exatidão/recuperação

$$Exatidão\ ou\ Recuperação\ (\%) = \frac{concentração\ média\ experimental}{concentração\ teórica\ do\ analito} \times 100$$

4.3.7 Robustez

De acordo com a RDC nº 166/2017 da Anvisa, a robustez é o parâmetro que indica a capacidade do método analítico de resistir a pequenas e deliberadas variações das condições analíticas. Para métodos analíticos em CLAE, a RDC estabeleceu as seguintes possibilidades de variação para avaliar a robustez: variação do pH da fase móvel; variação na composição da fase móvel; diferentes lotes ou fabricantes de colunas; temperatura e vazão da fase móvel (Brasil, 2017).

Para a avaliação da robustez do método BER + ALA, foram selecionadas três condições de variação: temperatura, vazão da fase móvel e diferente lote de coluna. Como a temperatura de forno do método é de 40 °C, determinou-se que as variações seriam de 1 °C abaixo e 1 °C acima, ou seja, 39 °C e 41 °C, respectivamente. A vazão da fase móvel do método corresponde a 1 mL/min, então as variações escolhidas foram 0,9 mL/min e 1,1 mL/min. A coluna cromatográfica de fase reversa do método corresponde ao modelo Discovery® C18 (25 cm x 6 mm; 5 µm). Dessa forma, utilizou-se outra coluna do mesmo modelo C18 (25 cm x 6 mm; 5 µm), mas de lote diferente, para avaliar a robustez.

A concentração escolhida para as amostras BER + ALA foi o ponto médio, ou seja, 5 µg/mL, de cada uma das três soluções-estoque, em triplicata (total de nove amostras). A cada corrida analítica, variou-se apenas uma condição por vez e analisaram-se as mesmas nove amostras em todas as corridas. No total, foram feitas cinco corridas analíticas, e os resultados foram comparados com os valores encontrados nas outras etapas de validação que utilizaram a mesma concentração da amostra, mas com as condições originais do método.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Padronização do método

A duração da corrida analítica foi de 20 minutos, e o comprimento de onda escolhido para melhor visualização dos picos de concentração foi de 210 nm. O tempo de retenção para a BER foi em torno de 6,2 minutos, enquanto para o ALA foi de aproximadamente 14,3 minutos. O forno foi mantido a 40 °C, com pressão de 7,8 mPa, vazão de 1 mL/min e volume de injeção das amostras de 50 µL.

5.2 Padronização das soluções

Para comprovar a pureza das MP de ALA e BER, foram construídas curvas-padrão de BER e de ALA na faixa de concentração de 0,5 a 15 µg/mL e, em seguida, com base nas amostras de 5 µg/mL em triplicata de cada fármaco, calcularam-se os teores de BER e ALA. Para os cálculos, utilizaram-se a equação da reta encontrada para cada padrão e os valores das absorbâncias das amostras de BER e ALA (5 µg/mL).

A partir da curva-padrão de BER, representada graficamente pela Figura 4, obteve-se a equação da reta igual a y = 59666 x + 7229. Os valores das absorbâncias para a MP de BER (5 µg/mL) foram: 250796, 252671 e 253969 AU. Já na curva-padrão de ALA, representada pela Figura 5, obteve-se a equação da reta igual a y = 21898 x + 8414. Os valores das absorbâncias para a MP de ALA (5 µg/mL) foram: 103389, 103225 e 101127 AU. Após os cálculos, a pureza média de BER (5 µg/mL) foi de 82,13 ± 5,03 %, enquanto a pureza média de ALA (5 µg/mL) foi de 86 ± 12,17 %.

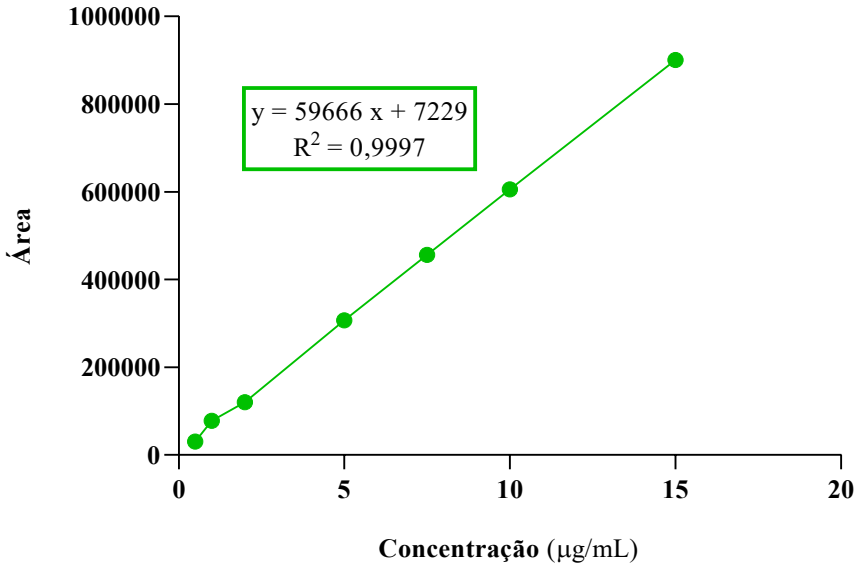


Figura 4 – Curva-padrão de BER na faixa de concentração de 0,5 a 15 µg/mL. Equação da reta: y = 59666x + 7229. Coeficiente de determinação = 0,9997.

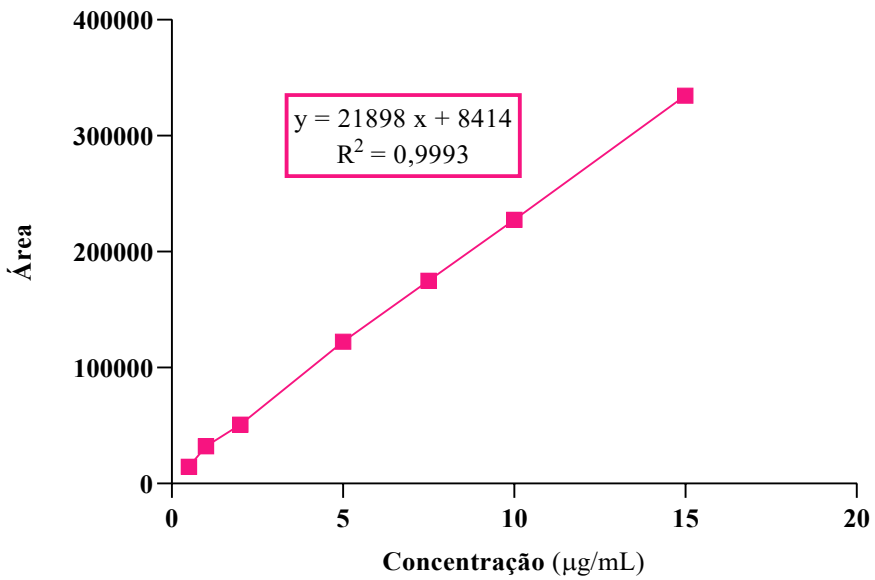


Figura 5 – Curva-padrão de ALA na faixa de concentração de 0,5 a 15 µg/mL. Equação da reta: y = 21898x + 8414. Coeficiente de determinação = 0,9993.

5.3 Seletividade

Para avaliar a seletividade do método, foi realizada a análise comparativa entre os tempos de retenção dos fármacos sem contaminantes (**Figura 6A**), das camadas de pele (**Figuras 6B** e **6C**) e dos fármacos com contaminantes (**Figuras 6D** e **6E**). A partir dessa comparação, foi possível expressar graficamente **(Figura 7)** que os tempos de retenção, tanto para BER quanto para ALA na concentração de 5 µg/mL, não apresentaram variações significantes entre si, mesmo na presença das camadas de pele, e permaneceram em torno de 6,27 min (BER) e de 14,29 min (ALA).

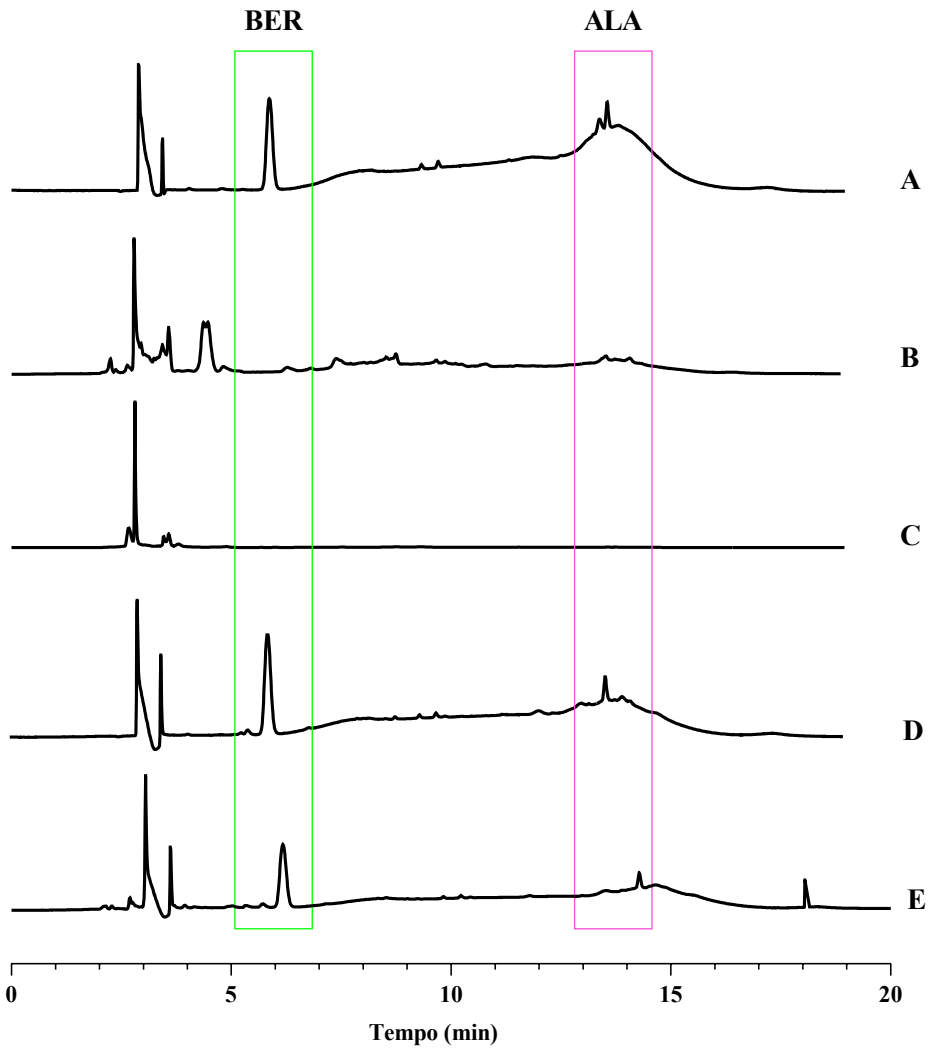


Figura 6 – Cromatogramas da etapa de seletividade. (A) BER + ALA 5 µg/mL em MeOH sem contaminantes; (B) EC de pele suína em MeOH; (C) PV suína em MeOH; (D) EC + BER + ALA 5 µg/mL em MeOH; (E) PV + BER + ALA 5 µg/mL em MeOH. ALA – ácido alfa-lipoico; BER – bergenina; EC – estrato córneo; MeOH – metanol; PV – pele viável.

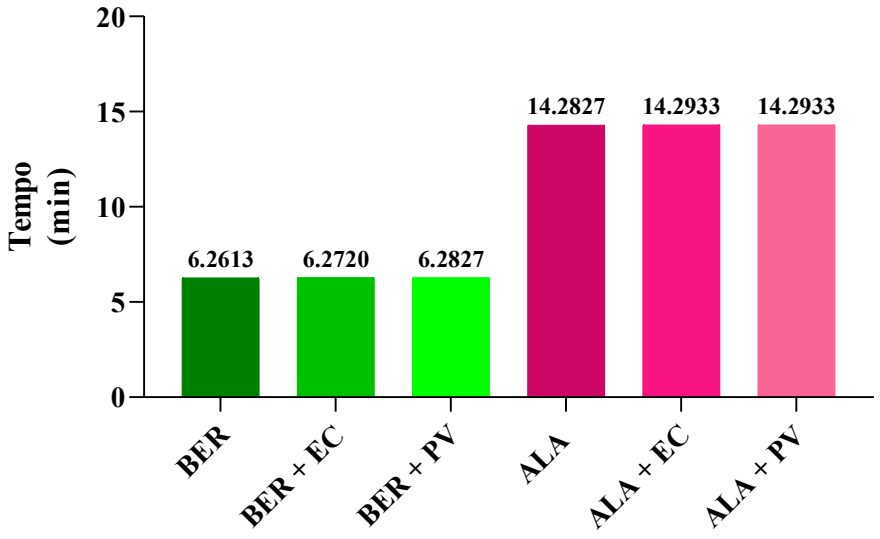


Figura 7 –Comparação entre os tempos de retenção de BER e ALA na presença das camadas de pele. ALA – ácido alfa-lipoico; BER – bergenina; EC – estrato córneo; PV – pele viável.

Além disso, foi feita a análise estatística por análise de variância (ANOVA *one way*) a partir dos resultados das áreas de pico dos fármacos em solução sem contaminantes e dos fármacos contaminados com as camadas de pele. A análise por ANOVA *one way* revelou que não foram observadas diferenças significativas entre os resultados, pois o valor-p estatístico para todos os resultados foi maior que 0,05 ($p \geq 0,05$), como observado na **Figura 8**.

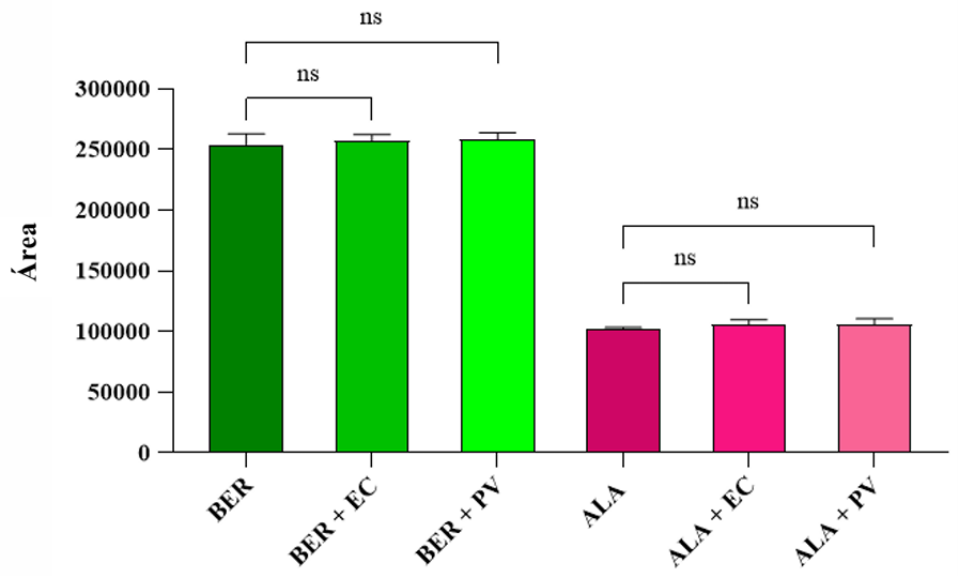


Figura 8 – Áreas de pico de BER e de ALA na presença de contaminantes. Análise estatística por ANOVA one way: ns – diferença não significativa ($p \geq 0,05$). ALA – ácido alfa-lipoico; BER – bergenina; EC – estrato córneo; PV – pele viável.

5.4 Linearidade

A partir da avaliação dos resultados do método BER + ALA com sete concentrações de cada fármaco em triplicata (0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 7,5; 10; e 15 µg/mL), foi possível projetar um gráfico de regressão linear com duas equações da reta. Considerando as concentrações dos analitos (variáveis x) e as áreas dos picos (variáveis y), foram obtidas as seguintes equações da reta para a linearidade da BER e do ALA, respectivamente: y = 51935x – 10797 e y = 20460x + 1658. Seguindo as exigências estabelecidas pela Anvisa e pela ICH, os coeficientes angulares tiveram valores diferentes de zero e a relação linear entre as variáveis foi significativa estatisticamente, com valores para os coeficientes de correlação de Pearson (r) maiores que 0,990 (**Figura 9**). Dessa forma, o método é considerado linear.

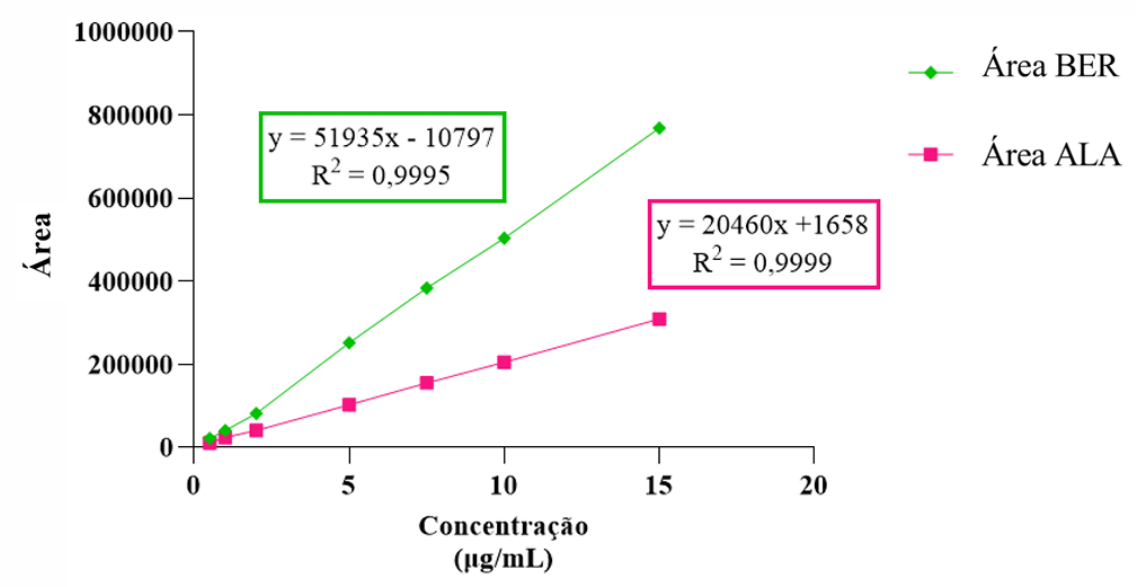


Figura 9 – Representação gráfica da linearidade de BER e ALA na faixa de concentração de 0,5 a 15 µg/mL. Equação da reta para BER: y = 51935x – 10797. Coeficiente de determinação da BER = 0,9995. Equação da reta para ALA: y = 20460x + 1658. Coeficiente de determinação do ALA= 0,9999.

5.5 Limites de detecção e de quantificação

Os valores de LOD e LOQ foram calculados por meio dos resultados das três curvas analíticas da etapa de linearidade de cada fármaco. Para BER, o LOD e o LOQ foram, respectivamente: 0,090 e 0,273 µg/mL. Para ALA, o LOD e o LOQ foram, respectivamente: 0,143 e 0,435 µg/mL. Esses resultados foram satisfatórios por serem valores mais baixos que os limites encontrados na literatura científica, tanto para BER (Boros *et al.*, 2014), quanto para ALA (Papageorgiou *et al.*, 2020).

5.6 Precisão

A precisão do método para análise de BER e ALA foi determinada pelos resultados das etapas de repetibilidade e precisão intermediária. As concentrações teóricas avaliadas na precisão foram 1,0; 5,0; e 10 µg/mL, para ambos os fármacos. De acordo com o dia da análise (1 e 2) e o analista responsável (A e B), os resultados foram expressos pelas concentrações reais mensuradas, adicionadas de seus respectivos desvios padrões, e pelos DPR (%) de cada concentração. Todos os valores de DPR obtidos obedeceram ao limite de variação de até 5% (Brasil, 2003), o que comprovou a reprodutibilidade do método. Os resultados da precisão para BER e ALA foram organizados separadamente (**Tabelas 3** e **4**).

Tabela 3 – Precisão do método para a determinação de BER, com dados da repetibilidade e precisão intermediária

DIA	ANALISTA	CONCENTRAÇÃO TEÓRICA (µg/mL)	CONCENTRAÇÃO MENSURADA (µg/mL)	DPR (%)
1	A	1,0	1,02 ± 0,03	3,38
		5,0	5,10 ± 0,18	3,53
		10,0	10,24 ± 0,40	3,90
	B	1,0	1,00 ± 0,03	2,92
		5,0	4,92 ± 0,13	2,56
		10,0	10,12 ± 0,24	2,37
2	A	1,0	1,00 ± 0,02	2,05
		5,0	5,18 ± 0,10	2,02
		10	10,38 ± 0,10	1,00
	B	1,0	0,99 ± 0,02	2,37
		5,0	5,14 ± 0,14	2,72
		10,0	10,31 ± 0,16	1,53

Fonte: Autoria própria.

Tabela 4 – Precisão do método para a determinação de ALA, com dados da repetibilidade e precisão intermediária

DIA	ANALISTA	CONCENTRAÇÃO TEÓRICA (µg/mL)	CONCENTRAÇÃO MENSURADA (µg/mL)	DPR (%)
1	A	1,0	1,03 ± 0,01	1,29
		5,0	4,93 ± 0,04	0,79
		10,0	9,83 ± 0,31	3,15
	B	1,0	0,98 ± 0,03	3,52
		5,0	4,85 ± 0,08	1,68
		10,0	9,93 ± 0,33	3,33
2	A	1,0	1,02 ± 0,01	0,94
		5,0	5,01 ± 0,10	2,02
		10	9,90 ± 0,31	3,18
	B	1,0	1,02 ± 0,02	1,95
		5,0	4,97 ± 0,06	1,17
		10,0	9,95 ± 0,38	3,79

Fonte: Autoria própria.

5.7 Exatidão

Na exatidão, foi analisado o grau de concordância entre os resultados individuais do método em dias diferentes (1 e 2) e com analistas diferentes (A e B). As concentrações teóricas das soluções de BER e de ALA aceitas como verdadeiras foram 1,0; 5,0; e 10 µg/mL. Todos os valores obtidos para a exatidão das concentrações foram superiores a 95% e inferiores a 105%, obedecendo ao limite estabelecido pela legislação (Brasil, 2003). Os resultados da exatidão para BER e ALA foram organizados separadamente (**Tabelas 5** e **6**).

Tabela 5 – Exatidão baseada nas concentrações mensuradas de BER em diferentes dias, por diferentes analistas

DIA	ANALISTA	CONCENTRAÇÃO TEÓRICA (µg/mL)	CONCENTRAÇÃO MENSURADA (µg/mL)	DPR (%)	EXATIDÃO (%)
1	A	1,0	1,02 ± 0,03	3,38	101,98
		5,0	5,10 ± 0,18	3,53	101,92
		10,0	10,24 ± 0,40	3,90	102,37
	B	1,0	1,00 ± 0,03	2,92	100,20
		5,0	4,92 ± 0,13	2,56	98,40
		10,0	10,12 ± 0,24	2,37	101,20
2	A	1,0	1,00 ± 0,02	2,05	100,10
		5,0	5,18 ± 0,10	2,02	103,60
		10	10,38 ± 0,10	1,00	103,80
	B	1,0	0,99 ± 0,02	2,37	99,30
		5,0	5,14 ± 0,14	2,72	102,70
		10,0	10,31 ± 0,16	1,53	103,10

Fonte: Autoria própria.

Tabela 6 – Exatidão baseada nas concentrações mensuradas de ALA em diferentes dias, por diferentes analistas

DIA	ANALISTA	CONCENTRAÇÃO TEÓRICA (µg/mL)	CONCENTRAÇÃO MENSURADA (µg/mL)	DPR (%)	EXATIDÃO (%)
1	A	1,0	1,03 ± 0,01	1,29	103,00
		5,0	4,93 ± 0,04	0,79	98,50
		10,0	9,83 ± 0,31	3,15	98,30
	B	1,0	0,98 ± 0,03	3,52	98,00
		5,0	4,85 ± 0,08	1,68	97,10
		10,0	9,93 ± 0,33	3,33	99,30
2	A	1,0	1,02 ± 0,01	0,94	102,20
		5,0	5,01 ± 0,10	2,02	100,10
		10,0	9,90 ± 0,31	3,18	99,00
	B	1,0	1,02 ± 0,02	1,95	101,80
		5,0	4,97 ± 0,06	1,17	99,40
		10,0	9,95 ± 0,38	3,79	99,50

Fonte: Autoria própria.

5.8 Robustez

Para avaliar a robustez do método BER + ALA, foram feitas variações na temperatura, na vazão da fase móvel e no lote da coluna cromatográfica do método. As novas temperaturas de forno escolhidas foram 39 °C e 41 °C, e as novas vazões da fase móvel foram 0,9 mL/min e 1,1 mL/min. A concentração escolhida para as amostras dos fármacos foi de 5 µg/mL, e cada variação nas condições do método foi analisada individualmente. Os resultados da robustez do método foram organizados em duas tabelas, uma para cada fármaco (**Tabelas 7** e **8**).

Tabela 7 – Robustez do método para BER em 5 µg/mL

PARÂMETRO	CONDIÇÃO TESTADA	CONCENTRAÇÃO MENSURADA (µg/mL)	DPR (%)	EXATIDÃO (%)	TEMPO DE RETENÇÃO (MIN)	NÚMERO DE PRATOS TEÓRICOS	FATOR DE CAUDA	RESOLUÇÃO
Temperatura de forno (°C)	39	4,90 ± 0,17	3,50	98,00	6,38	6279	0,90	31,49
	40	5,01 ± 0,08	1,60	100,30	6,18	7628	1,13	39,02
	41	4,99 ± 0,11	2,20	99,80	6,23	5762	0,78	31,14
Vazão da fase móvel (mL/min)	0,9	4,83 ± 0,13	2,60	96,50	6,96	6862	0,83	31,08
	1,0	5,01 ± 0,08	1,60	100,30	6,18	7628	1,13	39,02
	1,1	4,83 ± 0,14	2,90	96,50	5,75	5664	0,77	31,05
Lote da coluna cromatográfica	Original	5,01 ± 0,08	1,60	100,30	6,18	7628	1,13	39,02
	Diferente	4,91 ± 0,17	3,50	98,10	5,84	5541	0,79	31,69

Fonte: Autoria própria.

Tabela 8 – Robustez do método para ALA em 5 µg/mL

PARÂMETRO	CONDIÇÃO TESTADA	CONCENTRAÇÃO MENSURADA (µg/mL)	DPR (%)	EXATIDÃO (%)	TEMPO DE RETENÇÃO (MIN)	NÚMERO DE PRATOS TEÓRICOS	FATOR DE CAUDA	RESOLUÇÃO
Temperatura de forno (°C)	39	4,89 ± 0,07	1,50	97,80	14,35	97520	0,99	31,49
	40	4,94 ± 0,05	1,10	98,90	14,28	187126	1,26	39,02
	41	4,77 ± 0,16	3,40	95,40	14,27	91478	0,96	31,14
Vazão da fase móvel (mL/min)	0,9	4,93 ± 0,03	0,70	98,60	15,27	6862	0,96	31,08
	1,0	4,94 ± 0,05	1,10	98,90	14,28	187126	1,26	39,02
	1,1	4,81 ± 0,11	2,40	96,20	13,52	77190	1,14	31,05
Lote da coluna cromatográfica	Original	4,94 ± 0,05	1,10	98,90	14,28	187126	1,26	39,02
	Diferente	4,86 ± 0,06	1,20	97,20	14,04	76268	0,79	31,69

Fonte: Autoria própria.

Os resultados foram comparados com valores obtidos para amostras de 5 µg/mL dentro das condições originais do método (T = 40 °C, vazão = 1,0 mL/min, com coluna original). Em todos os casos, os DPR (%) obedeceram ao limite de até 5% e os valores de exatidão foram superiores a 95% (Brasil, 2003). Além disso, todos os parâmetros de adequação do sistema (tempos de retenção, número de pratos teóricos, fator de cauda e resolução) obedeceram aos limites estabelecidos pelo Guia de Validação de Métodos Cromatográficos do *Center for Drug Evaluation and Research* (CDER), pertencente ao

Food and Drug Administration (FDA, 1994). Dessa forma, o método demonstrou robustez para análise dos dois fármacos frente a pequenas alterações que se possam ter com relação à temperatura, vazão da fase móvel e lote da coluna cromatográfica utilizada.

6 CONCLUSÃO

O método cromatográfico desenvolvido para a quantificação simultânea de BER e ALA foi devidamente validado, atendendo a todos os parâmetros exigidos pelas diretrizes da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e do *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* (ICH).

O método mostrou-se seletivo, pois foi capaz de quantificar os dois fármacos mesmo na presença de uma matriz biológica complexa como a pele, e linear, porque confirmou a proporcionalidade entre os sinais instrumentais e as concentrações dos analitos dentro da faixa de 0,5 a 15 μg/mL. BER e ALA obtiveram LOD e LOQ baixos, o que demonstrou a sensibilidade do método desenvolvido.

A precisão e a exatidão do método também foram comprovadas, assegurando a reprodutibilidade da metodologia analítica para a quantificação simultânea de BER e ALA. Além disso, verificou-se que pequenas variações nos parâmetros cromatográficos chave não comprometeram o desempenho do método, demonstrando sua robustez.

O êxito na validação do método BER + ALA representa relevante contribuição para a literatura científica, viabilizando avanços em pesquisas na área farmacêutica, especialmente no desenvolvimento de novas formulações voltadas à prevenção do envelhecimento cutâneo e à melhora da aparência da pele, explorando as propriedades terapêuticas desses dois fármacos.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, L. F. F. *et al*. Development and validation of a chromatographic method for ibrutinib determination in human and porcine skin. **Chemistry**, Basel, v. 6, n. 2, p. 272-282, fev. 2024. Disponível em: https://doi.org/10.3390/chemistry6020014. Acesso em: 28 abr. 2025.

BAJRACHARYA, G. B. Diversity, pharmacology, and synthesis of bergenin and its derivatives: Potential materials for therapeutic usages. **Fitoterapia**, Amsterdam, v. 101, p. 133-152, jan. 2015. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2015.01.001. Acesso em: 22 maio 2025.

BOROS, B. *et al.* Validated HPLC method for simultaneous quantitation of bergenin, arbutin, and gallic acid in leaves of different bergenia species. **Chromatographia**, Heidelberg, v. 77, p. 1129-1135, jan. 2014. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s10337-014-2624-x. Acesso em: 2 abr. 2025.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia brasileira**. 7. ed. Brasília: Anvisa, 2024. v. I, MG5.2.17.4-01. Disponível em: https://www.gov.br/anvisa/pt-br. Acesso em: 22 maio 2025.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos: uma abordagem sobre ensaios físicos e químicos. **Portal da Anvisa**: Cosméticos – Manuais e Guias, Brasília, 2ª edição, revista, 2008. Disponível em: https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/cosmeticos/manuais-e-guias/guia-de-controle-de-qualidade-de-produtos-cosmeticos.pdf. Acesso em: 19 jun. 2025.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos. Sugere critérios para avaliação de segurança dos produtos cosméticos e fornecer os subsídios para este fim, não limitando as empresas de apresentarem alternativas de avaliações de segurança. **Portal da Anvisa**: Cosméticos – Manuais e Guias, Brasília, 2ª edição, revista, 2012. Disponível em: https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/cosmeticos/manuais-e-guias/guia-para-avaliacao-de-seguranca-de-produtos-cosmeticos.pdf. Acesso em: 19 jun. 2025.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para tratamento estatístico da validação analítica. Recomenda modelos e procedimentos de análise estatística de alguns parâmetros da validação, para cumprimento da Resolução RDC nº 166/2017, que dispõe sobre a validação de métodos analíticos. **Portal da Anvisa**: Medicamentos – Guia nº 10, Brasília, versão 1, 30 ago. 2017. Disponível em: https://anexosportal.datalegis.net/arquivos/1860537.pdf. Acesso em: 5 maio 2025.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n. 141, 25 jul. 2017. Acesso em: 2 abr. 2025.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, 29 maio 2003. Acesso em: 5 maio 2025.

DE SZALAY, S.; WERTZ, P. W. Protective barriers provided by the epidermis. **Int. J. Mol. Sci.**, Basel, v. 24, n. 4, fev. 2023. Disponível em: https://doi.org/10.3390/ijms24043145. Acesso em: 19 jun. 2025.

FERREIRA, L. A. **Validação de método analítico para quantificação de espironolactona em sistemas nanoparticulados e em estudos de permeação cutânea.** 2019. 21 f., il. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Farmácia) – Universidade

de Brasília, Brasília, 2019. Disponível em: https://bdm.unb.br/handle/10483/24231. Acesso em: 15 maio 2025.

FDA – Food and Drug Administration. **FDA Reviewer Guidance**: Validation of Chromatographic Methods. Rockville: FDA, 1994. 30 p. Disponível em: https://www.gmp-compliance.org/files/guidemgr/1-6-13.pdf. Acesso em: 27 jul. 2025.

GAMA, R. G. M., CHAVES, M. H. C. Boas práticas para cromatografia líquida de alta eficiência: uma abordagem para o controle de qualidade farmacêutico. **Scientia Chromatographica**, v. 11, n. 3, p. 108-125, jan. 2019. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/344143180. Acesso em: 20 jun. 2025.

ICH – INTERNATIONAL COUNCIL ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. **Validation of analytical procedures**: Text and Methodology Q2(R1). Geneva: ICH, 2005. 17 p. Disponível em: https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf. Acesso em: 2 abr. 2025.

KIM, K.; KIM, J.; KIM, H.; SUNG, G. Y. Effect of α-lipoic acid on the development of human skin equivalents using a pumpless skin-on-a-chip model. **Int. J. Mol. Sci.**, Basel, v. 22, n. 4, fev. 2021. Disponível em: https://doi.org/ 10.3390/ijms22042160. Acesso em: 22 maio 2025.

MARSON, B. M.; CONCENTINO, V.; JUNKERT, A. M. *et al.* Validation of analytical methods in a pharmaceutical quality system: an overview focused on HPLC methods. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 43, n. 8, p. 1190-1203, jul. 2020. Disponível em: https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170589. Acesso em: 20 abr. 2025.

MATSUGO, S.; BITO, T.; KONISHI, T. Photochemical stability of lipoic acid and its impact on skin ageing. **Free Radical Research**, London, v. 45, n. 8, p. 918-924, jun. 2011. Disponível em: https://doi.org/10.3109/10715762.2011.587420. Acesso em: 18 abr. 2025.

MOSALLAEI, N. *et al.* A comprehensive review on alpha-lipoic acid delivery by nanoparticles **BioImpacts**, Tabriz, v. 14, n. 6, fev. 2024. DOI: 10.34172/bi.2024.30136. Disponível em: https://bi.tbzmed.ac.ir/citation_report/bi-30136/crossref. Acesso em: 22 maio 2025.

NIKOLIN, B. *et al.* High performance liquid chromatography in pharmaceutical analyses. **Biomol Biomed**, Sarajevo, v. 4, n. 2, p. 5-9, maio 2004. Disponível em: https://doi.org/10.17305/bjbms.2004.3405. Acesso em: 20 jun. 2025.

NGUYEN, H. *et al.* **Alpha-lipoic acid**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024. *E-book*. 5 p. Bookshelf ID: NBK564301. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564301/. Acesso em: 22 maio 2025.

OLIVEIRA, R. T. *et al.* Nutritional characterization, antioxidant activity and bergenin content of the pulp of *Endopleura uchi*. **Acta Amaz.**, Manaus, v. 53, n. 3, p. 254-263, jul./set. 2023. Disponível em: https://doi.org/10.1590/1809-4392202202462. Acesso em: 23 abr. 2025.

PACKER, L. *et al.* Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. **Free Radic Biol Med**, Amsterdam, v. 19, n. 2, p. 227-250, ago. 1995. Disponível em: https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)00017-R. Acesso em: 16 abr. 2025.

PAPAGEORGIOU, S. *et al.* Development and validation of a reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the quantitation and stability of a-lipoic acid in cosmetic creams. **Int J Cosmet Sci**, Hoboken, v. 42, p. 221-228, jan. 2020. DOI: 10.1111/ics.12603. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ics.12603. Acesso em: 30 abr. 2025.

POLYCARPO, E. S. Análise quantitativa de compostos complexos por HPLC: estratégias e desafios. *In*: PANIAGUA, C. E. S (org.). **O papel da química entre as ciências naturais 2**. Ponta Grossa: Atena Edição de Livros Ltda, 2023. cap. 2, p. 14-24. Disponível em: https://atenaeditora.com.br/catalogo/post/analise-quantitativa-de-compostos-complexos-por-hplc-estrategias-e-desafios-2. Acesso em: 19 jun. 2025.

SALIMO, Z. M. *et al.* Chemistry and Pharmacology of Bergenin or Its Derivatives: A Promising Molecule. **Biomolecules**, Basel, v. 13, n. 403, fev. 2023. Disponível em: https://doi.org/10.3390/biom13030403. Acesso em: 30 abr. 2025.

SIGMA-ALDRICH. **(±)-α-Lipoic acid**. Darmstadt: Merck, 2025. Disponível em: https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/sigma/62320?srsltid=AfmBOopeaAKWbVPc8bZ8qg0hlDUSNZGnMFZb2C7N1PhZTfkiJjvOzGy0. Acesso em: 28 maio 2025.

SIGMA-ALDRICH. **Bergenin**. Darmstadt: Merck, 2025. Disponível em: https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/substance/bergenin32827477907?srsltid=AfmBOoriQX7zR-KO2Q68O5B6ynce1zYolvc5f3wsZVT5fehRNIpIXTMo. Acesso em: 28 maio 2025.

SMITH, A. R. *et al.* Lipoic acid as a potencial therapy for chronic diseases associated with oxidative stress. **Cur Med Chem**, Oxford, v. 11, n. 9, p. 1135-1146, 2004. Disponível em: https://doi.org/10.2174/0929867043365387. Acesso em: 28 mar. 2025.

TA, P. L. *et al.* Optimization and Validation of a High-Performance Liquid Chromatography (HPLC-UV) Method for Quantification of α-Lipoic Acid in Cyclodextrins Complex for Ocular Delivery. **Biomedical Chromatography**, Nova Jersey, v. 39, n. 6, p. e70133, jun. 2025. Disponível em: https://doi.org/10.1002/bmc.70133. Acesso em: 27 jul. 2025.

UWAI, T. Y. **Validação de método analítico para quantificação na pele de fármaco utilizado na quimioterapia de melanoma**. 2023. 51 f., il. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Farmácia) – Universidade de Brasília, Brasília, 2023. Disponível em: https://bdm.unb.br/handle/10483/38469. Acesso em: 28 mar. 2025.

VELOSO, D. M. N. *et al.* Atividades farmacológicas de bergenina e derivados: uma revisão sistemática. **RECIMA21 – Revista Científica Multidisciplinar**, [*S. l.*], v. 4, n. 1, p. e412615, jan. 2023. DOI: 10.47820/recima21.v4i1.2615. Disponível em: https://recima21.com.br/index.php/recima21/article/view/2615. Acesso em: 22 maio 2025.

YABRÉ, M. *et al.* Greening reversed-phase liquid chromatography methods using alternative solventes for pharmaceuticl analysis. **Molecules**, Basel, v. 23, n. 5, maio 2018. Disponível em: https://doi.org/10.3390/molecules23051065. Acesso em: 20 jun. 2025.

ZHOU, D. *et al.* Physicochemical properties of bergenin. **Pharmazie**, Oxford, v. 63, n.5, p. 366-371, set. 2008. Disponível em: https://doi.org/10.1691/ph.2008.7308. Acesso em: 2 abr. 2025.