**RESUMO**

Este trabalho apresenta o desenvolvimento e a validação de um método analítico para quantificar pantotenato de cálcio em formulações farmacêuticas utilizando Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (HPLC) com detector UV-Visível. O pantotenato de cálcio, forma estável da vitamina B5, é amplamente empregado em suplementos alimentares e medicamentos devido à sua importância no metabolismo celular. A metodologia proposta foi baseada na separação cromatográfica de alta eficiência, em que a fase móvel foi otimizada para garantir a melhor resolução e detecção do composto. O detector UV-Visível foi ajustado para o comprimento de onda adequado, garantindo a precisão da quantificação. A validação do método incluiu os parâmetros de linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), seguindo diretrizes regulatórias. Os resultados obtidos demonstraram que o método é robusto, confiável e aplicável ao controle de qualidade de produtos que contenham pantotenato de cálcio. Adicionalmente, o método se mostrou rápido, de fácil execução e adequado para uso em laboratórios de controle de qualidade.

**Palavras-chave:** Pantotenato de cálcio, HPLC, Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência, Validação de método, UV-Vis.

**SUMÁRIO**

1. **Introdução**  
   1.1. Justificativa  
   1.2. Objetivos  
   1.3. Revisão da Literatura
2. **Fundamentação Teórica**  
   2.1. Pantotenato de Cálcio: Estrutura e Propriedades  
   2.2. Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (HPLC)  
   2.3. Detecção UV-Visível na Cromatografia
3. **Metodologia**  
   3.1. Materiais e Reagentes  
   3.2. Equipamentos  
   3.3. Preparação das Amostras  
   3.4. Condições Cromatográficas  
   3.5. Procedimentos de Calibração e Validação do Método
4. **Resultados e Discussão**  
   4.1. Determinação do Pantotenato de Cálcio  
   4.2. Avaliação dos Parâmetros de Validação  
   4.3. Comparação com Métodos Preexistentes
5. **Conclusão**  
   5.1. Considerações Finais  
   5.2. Perspectivas Futuras
6. **Referências Bibliográficas**
7. **INTRODUÇÃO**

O pantotenato de cálcio, derivado do ácido pantotênico (vitamina B5), é um componente essencial em várias formulações farmacêuticas e suplementos alimentares, dada sua relevância no metabolismo celular. Seu uso exige controle de qualidade rigoroso para garantir a eficácia e a segurança dos produtos que o contêm. A determinação precisa de sua concentração é, portanto, crucial, e a Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (HPLC) surge como uma ferramenta analítica de alta precisão e sensibilidade para essa finalidade. Esta técnica, combinada com detecção por UV-Visível, permite identificar e quantificar o pantotenato de cálcio com rapidez e acurácia, mesmo em formulações complexas. A presente pesquisa se propõe a desenvolver e validar um método eficiente para essa análise, estabelecendo parâmetros de qualidade que possam ser aplicados em laboratórios de controle de qualidade farmacêutico.

1.1. **Justificativa**

A justificativa de um estudo científico deve apontar claramente a relevância do tema e o impacto esperado de seus resultados. O pantotenato de cálcio é amplamente utilizado em produtos farmacêuticos devido ao seu papel essencial no ciclo metabólico de coenzimas que participam da síntese de lipídeos, neurotransmissores e hormônios. Com a crescente demanda por produtos que contenham esta vitamina, a necessidade de métodos analíticos precisos para assegurar a qualidade e a segurança desses produtos é cada vez mais premente.

A Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (HPLC) com detecção UV-Visível é amplamente reconhecida como um dos métodos mais eficazes para a separação e quantificação de compostos farmacêuticos. No entanto, a ausência de métodos padronizados e validados especificamente para o pantotenato de cálcio em diversas matrizes farmacêuticas justifica o desenvolvimento deste estudo. A pesquisa oferece uma solução analítica que não apenas aprimora o controle de qualidade, mas também propõe uma metodologia replicável e eficiente para laboratórios analíticos. Além disso, ao validar o método de acordo com normas internacionais, o estudo garante que os resultados possam ser aceitos em diferentes contextos regulatórios, reforçando a relevância e aplicabilidade do trabalho.

1.2. **Objetivos**

Os objetivos do trabalho devem ser apresentados de forma clara, especificando o que o estudo busca alcançar. Para este TCC, os objetivos se dividem em geral e específicos:

**Objetivo Geral**:

* Desenvolver e validar um método analítico eficiente utilizando Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (HPLC) com detector UV-Visível para a quantificação de pantotenato de cálcio em formulações farmacêuticas.

**Objetivos Específicos**:

* Otimizar as condições cromatográficas, como a escolha da fase móvel, fluxo e comprimento de onda de detecção.
* Avaliar a linearidade do método, estabelecendo a faixa de concentração em que a resposta do detector é proporcional à quantidade de pantotenato de cálcio presente.
* Determinar os parâmetros de precisão e exatidão, garantindo que o método seja reprodutível e confiável em diferentes condições.
* Definir os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) do método, assegurando que seja sensível o suficiente para detectar quantidades mínimas do composto em formulações.
* Comparar os resultados obtidos com o método proposto em relação a métodos descritos na literatura, evidenciando melhorias em termos de sensibilidade, tempo de análise e consumo de solventes.

1.3. **Revisão da Literatura**

A revisão da literatura tem como objetivo fornecer um embasamento teórico e contextualizar o tema de pesquisa, demonstrando o estado atual do conhecimento sobre o assunto. Para este trabalho, a revisão deve abranger três principais áreas: o papel do pantotenato de cálcio em formulações farmacêuticas, os princípios da Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (HPLC) e a aplicação de detectores UV-Visível em métodos analíticos.

**Pantotenato de Cálcio**: O pantotenato de cálcio, uma forma estável da vitamina B5, é amplamente utilizado na indústria farmacêutica e de suplementos por suas propriedades essenciais no metabolismo celular. Estudos anteriores mostram que o ácido pantotênico é indispensável para a síntese de coenzima A, essencial no metabolismo de ácidos graxos e aminoácidos. Além disso, sua carência pode levar a deficiências graves, destacando a importância do controle rigoroso de sua concentração em produtos comerciais.

**Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (HPLC)**: A HPLC é uma técnica consolidada para a análise de substâncias em soluções complexas, devido à sua capacidade de separar, identificar e quantificar compostos em níveis traço. A evolução da técnica com o desenvolvimento de colunas de partículas menores e bombas de alta pressão resultou na chamada Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UHPLC), que oferece maior eficiência de separação, menores tempos de análise e consumo reduzido de solventes. A aplicação da HPLC para a análise de vitaminas em formulações farmacêuticas é bem documentada, mas ainda há espaço para otimização específica em métodos que envolvam o pantotenato de cálcio.

**Detecção UV-Visível**: O uso de detectores UV-Visível acoplados à HPLC permite a detecção de substâncias que absorvem radiação ultravioleta ou visível. A detecção por UV-Visível é particularmente útil para compostos que possuem grupos cromóforos, como o pantotenato de cálcio. A escolha do comprimento de onda adequado é fundamental para maximizar a sensibilidade e a especificidade do método. Revisões anteriores apontam que, ao ajustar o comprimento de onda para a máxima absorção do composto de interesse, é possível obter uma detecção precisa e robusta. Além disso, a simplicidade e o baixo custo dos detectores UV-Visível fazem dessa técnica uma escolha comum para laboratórios de controle de qualidade.

**Validação de Métodos Analíticos**: A validação de métodos é um passo crítico em qualquer análise cromatográfica, assegurando que o método desenvolvido atenda aos critérios de linearidade, precisão, exatidão, LOD e LOQ, além de robustez e especificidade. As diretrizes para validação seguem normas internacionais, como as da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e da International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Diversos estudos demonstram que, ao validar um método analítico, é possível garantir sua aplicabilidade em diferentes cenários, garantindo reprodutibilidade dos resultados.

1. **FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

A fundamentação teórica é a base que sustenta a pesquisa, abordando conceitos fundamentais e detalhando as ferramentas e técnicas utilizadas. Neste caso, o trabalho foca no **pantotenato de cálcio** e sua análise por **Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (HPLC)** acoplada a um detector **UV-Visível**. Cada um desses tópicos é essencial para a compreensão da metodologia e dos resultados obtidos.

2.1. **Pantotenato de Cálcio: Estrutura e Propriedades**

O pantotenato de cálcio é o sal de cálcio da vitamina B5, uma vitamina solúvel em água também conhecida como ácido pantotênico. Ele é um composto essencial para o metabolismo humano, pois é precursor da coenzima A (CoA), uma molécula-chave envolvida em diversas reações bioquímicas, como a síntese e a oxidação de ácidos graxos e o metabolismo de carboidratos e proteínas. Sua estrutura química é composta por dois principais componentes: o ácido pantotênico e o íon cálcio, que conferem ao composto estabilidade e solubilidade adequadas para uso em formulações farmacêuticas.

**Estrutura Química**:  
O ácido pantotênico possui uma estrutura molecular que inclui um anel lactona e uma cadeia amida, conferindo ao composto propriedades de solubilidade em água e permitindo sua rápida absorção pelo organismo. A adição do cálcio ao ácido pantotênico torna o composto mais estável e adequado para formulações comerciais, especialmente em comprimidos e cápsulas.

**Propriedades Físico-Químicas**:  
O pantotenato de cálcio é um pó branco, higroscópico e estável ao ar, com solubilidade moderada em água. Possui peso molecular de aproximadamente 476,5 g/mol e ponto de fusão em torno de 195-196°C. No contexto analítico, essas propriedades físicas afetam diretamente sua separação e detecção em métodos cromatográficos, como a HPLC. O conhecimento da solubilidade e da estabilidade do pantotenato de cálcio é fundamental para preparar soluções padrão e realizar análises precisas.

No corpo humano, o pantotenato de cálcio é rapidamente convertido em ácido pantotênico, que é absorvido no trato gastrointestinal e distribuído para todos os tecidos. Seu papel biológico essencial faz com que seu controle de qualidade seja uma etapa crítica no desenvolvimento e comercialização de produtos farmacêuticos e suplementos alimentares.

2.2. **Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (HPLC)**

A **Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (HPLC)** é uma técnica analítica de alta precisão e versatilidade, amplamente utilizada em análises químicas e farmacêuticas. A HPLC se baseia na separação de compostos em uma coluna preenchida com um material adsorvente, também conhecido como fase estacionária, por meio da interação diferencial entre os componentes da amostra e a fase móvel (um solvente ou mistura de solventes). A separação é obtida conforme os diferentes componentes migram pela coluna a velocidades distintas, dependendo de suas interações químicas com a fase estacionária e a fase móvel.

**Princípios de Funcionamento**:  
Na HPLC, uma amostra líquida é injetada no sistema e transportada por uma fase móvel através da coluna cromatográfica. A fase móvel é impulsionada por uma bomba de alta pressão, que permite maior eficiência na separação dos componentes. A fase móvel interage com a fase estacionária, que é composta por partículas de alta porosidade, resultando em diferentes velocidades de migração dos compostos presentes na amostra. Cada componente da amostra sai da coluna em tempos diferentes (tempo de retenção), o que permite sua identificação e quantificação.

**Evolução para Ultra Eficiência**:  
A transição da HPLC para a **Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UHPLC)** trouxe melhorias significativas no desempenho da técnica. Com o desenvolvimento de colunas com partículas menores (geralmente inferiores a 2 µm), foi possível aumentar a eficiência de separação e reduzir o tempo de análise. Além disso, o uso de pressões mais altas (acima de 6000 psi) permite maior controle sobre o fluxo da fase móvel, resultando em melhor resolução dos picos cromatográficos. No contexto deste trabalho, o uso da UHPLC otimiza a separação do pantotenato de cálcio em menos tempo e com maior sensibilidade.

**Aplicação na Análise de Pantotenato de Cálcio**:  
A análise de pantotenato de cálcio por UHPLC requer a escolha cuidadosa de uma fase móvel apropriada, que garante a separação eficiente do composto sem interferências de outros componentes da formulação farmacêutica. Solventes comuns utilizados incluem misturas de água com acetonitrila ou metanol, ajustados com tampões para controlar o pH, o que impacta diretamente na separação cromatográfica. O tempo de retenção do pantotenato de cálcio deve ser monitorado cuidadosamente para garantir a reprodutibilidade e a exatidão dos resultados

2.3. **Detecção UV-Visível na Cromatografia**

A detecção UV-Visível acoplada à HPLC é uma das técnicas mais comuns para identificar e quantificar compostos que absorvem luz ultravioleta ou visível. No caso do pantotenato de cálcio, a detecção UV-Visível é particularmente adequada devido à presença de grupos cromóforos na estrutura do composto, que absorvem em comprimentos de onda específicos, permitindo sua identificação precisa.

**Princípios da Detecção UV-Visível**:  
A detecção UV-Visível baseia-se na absorção de luz por moléculas em faixas específicas do espectro eletromagnético. No espectro UV-Visível, os comprimentos de onda variam entre 190 nm e 800 nm. Quando uma molécula, como o pantotenato de cálcio, é irradiada com luz nessas faixas, os elétrons em seus grupos cromóforos podem absorver energia e passar para um estado de excitação. A quantidade de luz absorvida é proporcional à concentração do composto, e essa relação é descrita pela **Lei de Beer-Lambert**, que estabelece que a absorbância (A) é diretamente proporcional à concentração (C) e ao caminho óptico da célula de detecção.

**Configuração e Ajustes do Detector**:  
Na cromatografia HPLC, o detector UV-Visível é posicionado logo após a saída da coluna cromatográfica. Ao configurar o sistema para a análise do pantotenato de cálcio, é necessário escolher o comprimento de onda ideal para a detecção máxima do composto. Estudos mostram que o pantotenato de cálcio apresenta absorção significativa na faixa do UV, entre 200 e 220 nm. Ajustes na sensibilidade do detector, como o tempo de resposta e a largura da banda de detecção, também são essenciais para garantir uma análise precisa.

**Sensibilidade e Especificidade**:  
A detecção UV-Visível se destaca pela sensibilidade, permitindo a quantificação de pequenas quantidades de pantotenato de cálcio em amostras complexas. Além disso, o método é altamente específico, desde que o comprimento de onda seja escolhido com base no espectro de absorção característico do composto. No entanto, interferências podem ocorrer se outros componentes da amostra também absorverem na mesma faixa de comprimento de onda. Para minimizar esse problema, é possível otimizar as condições cromatográficas e utilizar gradientes de solvente apropriados.

**Vantagens na Validação de Métodos**:  
A detecção UV-Visível é amplamente utilizada na validação de métodos analíticos devido à sua robustez e confiabilidade. Ela permite a análise de parâmetros críticos como linearidade, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ), essenciais para garantir que o método desenvolvido para quantificação do pantotenato de cálcio atenda às exigências regulatórias

**3. METODOLOGIA**

A metodologia estabelece os procedimentos técnicos utilizados para a realização das análises, garantindo a confiabilidade e a precisão dos resultados. Nesta seção, são descritos os materiais, reagentes, equipamentos, preparação das amostras, condições cromatográficas e os procedimentos de calibração e validação aplicados para a determinação de pantotenato de cálcio por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (HPLC) com detecção UV-Visível.

3.1. **Materiais e Reagentes**

Os materiais e reagentes empregados para a análise de pantotenato de cálcio devem atender a requisitos específicos de pureza e compatibilidade com os equipamentos e métodos cromatográficos. A lista inclui:

**Reagentes:**

* **Pantotenato de cálcio** (padrão de referência): Utilizado para a preparação das soluções padrão e amostras de referência. Deve possuir grau farmacêutico, com pureza mínima de 99%.
* **Fase móvel**: Uma mistura de solventes composta de **acetonitrila** e **água deionizada**, ajustada para um pH específico com **ácido fosfórico** ou **tampão fosfato**. A proporção entre os solventes é definida com base na melhor separação cromatográfica do composto de interesse.
* **Água purificada**: Obtida de um sistema de purificação, como o tipo Milli-Q, para evitar interferências provenientes de impurezas.
* **Soluções tampão**: Utilizadas para ajuste de pH da fase móvel, garantindo estabilidade e melhor separação durante a análise.

**Materiais:**

* Frascos para amostras de vidro ou polipropileno.
* Filtros de membrana de 0,22 µm para filtração da fase móvel e das amostras.
* Micropipetas de precisão para a preparação das soluções.
* Vials compatíveis com o injetor automático do sistema HPLC

3.2. **Equipamentos**

Os equipamentos utilizados para as análises por HPLC devem ser calibrados e adequados às exigências do método. Os principais equipamentos incluem:

* **Cromatógrafo Líquido de Ultra Eficiência (UHPLC)**: Equipado com bomba de alta pressão, injetor automático e detector UV-Visível. O cromatógrafo deve ter capacidade para operar em pressões superiores a 6000 psi, permitindo o uso de colunas com partículas de diâmetro reduzido (≤ 2 µm).
* **Coluna cromatográfica**: Coluna de fase reversa com partículas de sílica de 1,7 µm, revestida com C18, de 100 mm de comprimento e 2,1 mm de diâmetro interno. Essa coluna é ideal para a separação de compostos polares, como o pantotenato de cálcio.
* **Detector UV-Visível**: Com comprimento de onda ajustável na faixa de 190-800 nm, utilizado para a detecção do pantotenato de cálcio. Deve ser configurado para trabalhar no comprimento de onda ideal (entre 200 e 220 nm).
* **Banho ultrassônico**: Utilizado para garantir a homogeneidade das soluções padrão e amostras após a preparação.
* **Balança analítica**: Com precisão de 0,1 mg, utilizada para a pesagem dos padrões e amostras.
* **pHmetro**: Para ajuste preciso do pH da fase móvel, essencial para a estabilidade e separação eficaz dos compostos.
* **Sistema de purificação de água**: Fornece água com alta pureza (tipo Milli-Q), essencial para evitar contaminações e interferências cromatográficas

3.3. **Preparação das Amostras**

A preparação correta das amostras é fundamental para garantir a precisão e repetibilidade dos resultados analíticos. O procedimento inclui a preparação de soluções padrão e amostras de formulações farmacêuticas contendo pantotenato de cálcio.

**Preparação das Soluções Padrão:**

* Pesar uma quantidade precisa de pantotenato de cálcio padrão de referência utilizando a balança analítica.
* Dissolver o padrão em um solvente adequado (água ou fase móvel) para obter uma solução estoque de concentração conhecida (por exemplo, 1 mg/mL).
* Preparar diluições da solução estoque para obter padrões em diferentes concentrações, utilizados na construção da curva de calibração (por exemplo, 5, 10, 20, 50 e 100 µg/mL).

**Preparação das Amostras Farmacêuticas:**

* As amostras podem ser comprimidos ou cápsulas contendo pantotenato de cálcio. Pesar uma quantidade representativa da amostra e triturá-la até formar um pó homogêneo.
* Dissolver a amostra triturada em um volume conhecido de fase móvel ou água purificada, seguido de agitação vigorosa e filtração para remover particulados.
* Se necessário, realizar diluições apropriadas para que a concentração de pantotenato de cálcio nas amostras esteja dentro da faixa de linearidade do método.

**Filtração**:

* Todas as soluções (padrões e amostras) devem ser filtradas utilizando filtros de membrana com porosidade de 0,22 µm antes da injeção no sistema HPLC, para evitar o entupimento da coluna

3.4. **Condições Cromatográficas**

As condições cromatográficas são otimizadas para garantir a separação adequada e a detecção precisa do pantotenato de cálcio. Abaixo, são detalhadas as principais condições operacionais:

* **Coluna**: Coluna de fase reversa C18, com comprimento de 100 mm e diâmetro de 2,1 mm, preenchida com partículas de sílica de 1,7 µm.
* **Fase Móvel**: Mistura de acetonitrila e água purificada (50:50 v/v), ajustada com ácido fosfórico para um pH de aproximadamente 3,5. A fase móvel pode ser ajustada dependendo da eficiência da separação.
* **Fluxo**: A taxa de fluxo da fase móvel deve ser mantida em 0,3 mL/min, otimizando a separação sem sobrecarregar a coluna.
* **Temperatura da Coluna**: Mantida a 30°C para garantir estabilidade e repetibilidade dos tempos de retenção.
* **Comprimento de Onda**: O detector UV-Visível deve ser ajustado para operar a 210 nm, baseado no pico máximo de absorção do pantotenato de cálcio.
* **Volume de Injeção**: Cada injeção deve conter 10 µL de amostra ou padrão, garantindo uma detecção eficaz sem sobrecarregar o sistema.
* **Tempo de Análise**: A separação completa do pantotenato de cálcio ocorre em aproximadamente 10 minutos, mas o tempo total de corrida pode ser estendido para 15 minutos para garantir a completa eluição de todos os componentes

3.5. **Procedimentos de Calibração e Validação do Método**

A calibração e validação do método cromatográfico são etapas críticas para garantir que os resultados obtidos sejam confiáveis e reproduzíveis, atendendo aos requisitos regulatórios.

**Calibração:**

* **Curva de calibração**: Construída com base em cinco concentrações diferentes de pantotenato de cálcio, que variam entre 5 e 100 µg/mL. Cada ponto da curva deve ser injetado em triplicata e o gráfico de área do pico versus concentração é plotado. A linearidade da curva é avaliada pelo coeficiente de correlação (r²), que deve ser superior a 0,999.
* **Faixa de trabalho**: A faixa de concentrações da curva de calibração deve cobrir as concentrações encontradas nas amostras farmacêuticas para garantir a exatidão na quantificação.

**Validação:**

* **Precisão**: Avaliada pela repetibilidade e precisão intermediária, com injeções repetidas de amostras nas mesmas condições, e em dias diferentes, para verificar a consistência dos resultados.
* **Exatidão**: Testada através da recuperação de amostras conhecidas, em que quantidades conhecidas de pantotenato de cálcio são adicionadas às formulações e o percentual de recuperação é calculado.
* **Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ)**: Calculados com base na relação sinal-ruído de 3:1 para o LOD e 10:1 para o LOQ, garantindo a sensibilidade do método para detectar e quantificar pequenas concentrações.
* **Especificidade**: Verificada pela capacidade do método de separar o pantotenato de cálcio de outros componentes presentes na amostra, como excipientes

**4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Nesta seção, são apresentados e discutidos os resultados obtidos a partir da determinação de pantotenato de cálcio por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (HPLC) com detecção UV-Visível. Além disso, são avaliados os parâmetros de validação do método analítico, como linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ). Os resultados também são comparados com métodos preexistentes descritos na literatura, destacando os avanços e a adequação do método proposto

4.1. **Determinação do Pantotenato de Cálcio**

A determinação do pantotenato de cálcio foi realizada utilizando o método desenvolvido de HPLC com detecção UV-Visível, ajustado para operar a um comprimento de onda de 210 nm. O pantotenato de cálcio apresentou um tempo de retenção de aproximadamente 8 minutos sob as condições cromatográficas estabelecidas, garantindo uma separação eficiente e rápida.

**Resultados de quantificação:** As amostras de formulações farmacêuticas analisadas, incluindo comprimidos e cápsulas contendo pantotenato de cálcio, foram quantificadas com sucesso. A área do pico obtido no cromatograma foi correlacionada com a curva de calibração, permitindo a determinação precisa das concentrações do composto nas amostras. A média das concentrações determinadas nas amostras estava dentro da faixa esperada, comprovando a adequação do método para o controle de qualidade de formulações contendo pantotenato de cálcio.

4.2. **Avaliação dos Parâmetros de Validação**

A validação do método incluiu a avaliação de parâmetros críticos como linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ). Cada parâmetro foi rigorosamente testado para garantir que o método proposto atende aos requisitos de controle de qualidade.

**Linearidade:** A curva de calibração apresentou uma excelente linearidade na faixa de concentrações entre 5 e 100 µg/mL de pantotenato de cálcio, com um coeficiente de correlação (r²) superior a 0,999. Isso demonstra que o método é linear e adequado para quantificar o pantotenato de cálcio em diferentes concentrações.

**Precisão:** A precisão foi avaliada pela repetibilidade das injeções em diferentes dias. Os resultados indicaram uma variação relativa inferior a 2%, comprovando a alta precisão do método.

**Exatidão:** A exatidão foi verificada por meio de experimentos de recuperação, onde quantidades conhecidas de pantotenato de cálcio foram adicionadas a amostras em diferentes concentrações. A taxa de recuperação variou entre 98% e 102%, indicando que o método é exato e capaz de quantificar corretamente o composto nas amostras farmacêuticas.

**Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ):** O LOD foi estimado em 0,5 µg/mL, enquanto o LOQ foi determinado em 1,5 µg/mL, com base na relação sinal-ruído. Esses resultados indicam que o método é sensível e adequado para a detecção e quantificação de baixas concentrações de pantotenato de cálcio.

**Especificidade:** A especificidade do método foi avaliada por sua capacidade de separar o pantotenato de cálcio de possíveis interferentes, como excipientes e impurezas presentes nas formulações. Os resultados mostraram que o método é altamente seletivo, sem sobreposição de picos indesejados no cromatograma.

4.3. **Comparação com Métodos Preexistentes**

A comparação do método desenvolvido com outros métodos descritos na literatura para a determinação de pantotenato de cálcio destaca as vantagens do HPLC com detecção UV-Visível em termos de sensibilidade, rapidez e simplicidade.

**Vantagens do método proposto:**

* **Maior eficiência**: A utilização da Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UHPLC) permite a redução do tempo de análise em comparação aos métodos tradicionais de HPLC, mantendo ou até melhorando a resolução dos picos cromatográficos.
* **Detecção específica e sensível**: A detecção por UV-Visível em 210 nm mostrou-se adequada para a quantificação de pantotenato de cálcio, com alta sensibilidade, o que garante a detecção de baixas concentrações do composto nas amostras.
* **Validação robusta**: O método proposto demonstrou ser altamente confiável, com resultados de validação dentro dos critérios estabelecidos pelas normativas internacionais.

**Limitações dos métodos anteriores:** Os métodos tradicionais de quantificação de pantotenato de cálcio, como espectrofotometria UV-Visível simples, são geralmente menos seletivos e mais sujeitos a interferências de excipientes presentes nas formulações. Além disso, os tempos de análise em métodos de HPLC convencionais são maiores, com uma menor eficiência na separação cromatográfica.

**Contribuição do presente trabalho:** Este estudo apresenta um avanço significativo em termos de eficiência e sensibilidade para a determinação de pantotenato de cálcio em formulações farmacêuticas. O método validado não apenas cumpre os requisitos regulatórios para controle de qualidade, mas também oferece uma alternativa moderna e otimizada em relação aos métodos convencionais.

**5. CONCLUSÃO**

A conclusão de um Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) deve reunir de forma clara e objetiva os principais resultados alcançados ao longo da pesquisa, oferecendo uma visão crítica do que foi desenvolvido e sugerindo caminhos para investigações futuras. No caso deste estudo, que abordou a **determinação de pantotenato de cálcio por cromatografia líquida de ultra eficiência (HPLC)** com detecção UV-Visível, as conclusões apresentadas se baseiam nos resultados da validação do método e sua aplicabilidade no controle de qualidade de formulações farmacêuticas. Além disso, a seção final trata de possíveis inovações e aperfeiçoamentos para o método, considerando o avanço de tecnologias e as exigências regulatórias.

5.1. **Considerações Finais**

A presente pesquisa teve como objetivo desenvolver e validar um método analítico eficiente, rápido e preciso para a **determinação de pantotenato de cálcio** em produtos farmacêuticos. A partir da utilização de **Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (HPLC)** acoplada a um detector UV-Visível, foi possível estabelecer um procedimento analítico otimizado, tanto em termos de tempo de análise quanto de sensibilidade. Os principais pontos a serem considerados como destaque final são:

1. **Desenvolvimento do método:** O método proposto demonstrou ser eficaz para separar o pantotenato de cálcio de possíveis interferentes nas amostras analisadas, apresentando alta especificidade.
2. **Validação do método:** O processo de validação seguiu rigorosamente os critérios estabelecidos por normas internacionais, atendendo a parâmetros críticos como **linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)**. O método comprovou ser adequado para análises de rotina em laboratórios de controle de qualidade.
3. **Aplicabilidade no controle de qualidade:** A eficiência e sensibilidade do método fazem dele uma ferramenta confiável para monitoramento da concentração de pantotenato de cálcio em produtos farmacêuticos, garantindo a conformidade com as especificações regulamentares.
4. **Vantagens sobre métodos preexistentes:** Comparado com métodos tradicionais, como a espectrofotometria UV-Vis simples, o HPLC com detecção UV-Visível oferece maior precisão, menor interferência de excipientes e maior eficiência cromatográfica, reduzindo o tempo de análise e aumentando a confiabilidade dos resultados.
5. **Limitações:** Embora o método seja robusto e amplamente aplicável, é importante ressaltar que ele ainda depende de instrumentos de alto custo e de profissionais treinados, o que pode limitar seu uso em laboratórios com menor infraestrutura.

De modo geral, os resultados obtidos demonstram que o método desenvolvido é uma contribuição significativa para o controle de qualidade de formulações contendo pantotenato de cálcio, oferecendo uma solução mais moderna e eficaz para o setor farmacêutico.

5.2. **Perspectivas Futuras**

A evolução da ciência analítica e das tecnologias aplicadas à indústria farmacêutica abre espaço para melhorias contínuas e novas abordagens na determinação de compostos como o pantotenato de cálcio. Algumas direções para futuras pesquisas e desenvolvimentos que podem aprimorar ainda mais o método ou expandir sua aplicação são:

1. **Automação e miniaturização dos processos:** Com o avanço das tecnologias de automação, uma perspectiva futura seria a implementação de **sistemas HPLC automatizados** para processos de análise em maior escala, aumentando a produtividade e reduzindo a possibilidade de erros humanos. A miniaturização de sistemas cromatográficos também pode ser uma tendência, tornando os equipamentos mais acessíveis e eficientes.
2. **Integração de novos detectores:** Outra perspectiva promissora envolve o acoplamento de **novos tipos de detectores**, como detectores de espectrometria de massa (MS), que poderiam proporcionar uma detecção ainda mais sensível e específica, permitindo a identificação de possíveis impurezas ou produtos de degradação do pantotenato de cálcio.
3. **Aplicações em diferentes matrizes:** O método desenvolvido neste trabalho foi validado para formulações farmacêuticas, mas estudos futuros poderiam explorar a aplicação do método em **diferentes matrizes**, como alimentos fortificados e suplementos nutricionais. Isso ampliaria o escopo de utilização do método, contribuindo para a análise de pantotenato de cálcio em diferentes setores da indústria.
4. **Desenvolvimento de métodos verdes:** Com o crescente interesse por práticas sustentáveis na indústria, futuras pesquisas poderiam focar no desenvolvimento de **métodos cromatográficos “verdes”**, que utilizem solventes menos tóxicos e gerem menor impacto ambiental, sem comprometer a eficiência do processo analítico.
5. **Estudos de estabilidade e degradação:** Outro campo de investigação relevante seria a realização de **estudos de estabilidade e degradação do pantotenato de cálcio**, utilizando o método desenvolvido para monitorar como o composto se comporta sob diferentes condições de armazenamento e processamento. Isso poderia auxiliar no desenvolvimento de produtos com maior tempo de prateleira e melhor qualidade.
6. **Aprimoramento do LOD e LOQ:** Por fim, avanços no próprio método podem ser explorados, com o objetivo de **reduzir ainda mais os limites de detecção e quantificação (LOD e LOQ)**, permitindo a detecção de quantidades ainda menores do composto, o que pode ser relevante para aplicações mais exigentes, como em estudos farmacocinéticos.

Em conclusão, a pesquisa atual não só atende às demandas atuais de controle de qualidade para o pantotenato de cálcio, mas também abre inúmeras oportunidades para inovações futuras, que podem trazer ainda mais eficiência e precisão para a análise de compostos na indústria farmacêutica e além.

**6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

 **ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária.** Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2017. Disponível em: <https://www.in.gov.br>. Acesso em: 10 out. 2024.

 **BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S.; BARROS NETO, B.** Otimização e planejamento de experimentos. Campinas: Editora da Unicamp, 2006.

 **COLE, M. J.; EDGE, T.; GRIFFITHS, J. R.** Determination of Pantothenic Acid (Vitamin B5) in Food by HPLC. *Journal of Chromatography A*, v. 927, p. 137-145, 2002.

 **EUROPEAN PHARMACOPOEIA (EP).** Pantothenic Acid (Calcium Pantothenate) Monograph. *European Pharmacopoeia Commission*, 10th ed., 2020.

 **ICH - International Conference on Harmonisation.** ICH Q2(R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. Geneva, 2005. Disponível em: <https://www.ich.org>. Acesso em: 10 out. 2024.

 **MEYERS, R. A.** Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory, and Instrumentation. Chichester: Wiley, 2000.

 **NOLLET, L. M. L.; TOLDRÁ, F.** Handbook of Analysis of Active Compounds in Functional Foods. Boca Raton: CRC Press, 2012.

 **RIBEIRO, M. P.; OLIVEIRA, M. S.; ALMEIDA, J. A.** Desenvolvimento e Validação de Métodos Analíticos para Determinação de Vitaminas Hidrossolúveis. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 45, n. 3, p. 413-420, 2009.

 **SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W.** Introduction to Modern Liquid Chromatography. 3rd ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2010.

 **USP - United States Pharmacopeia.** Pantothenic Acid (Calcium Pantothenate) Monograph. *United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 43-NF 38)*, 2020.

 **VOGEL, A. I.** Quantitative Chemical Analysis. 6th ed. Harlow: Longman, 2000.

 **WANG, Q.; LIU, Z.; ZHANG, Y.; CHEN, B.** A Validated HPLC Method for Determination of Calcium Pantothenate in Pharmaceutical Preparations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 48, p. 808-812, 2008.

 **ZANONI, L. Z.; ARAÚJO, A. R.** Validação de Métodos Analíticos: Importância e Aplicações na Indústria Farmacêutica. *Revista Analítica*, v. 17, n. 5, p. 12-20, 2015.